



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRODEJENERATİF MEKANİZMALARIN BAŞLANGICININ
5XFAD TRANSGENİK ALZHEİMER HASTALIĞI FARE
MODELİNDE PROTEOMİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

İREP URAS
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Dr. Betül Şahin

İSTANBUL-2024



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRODEJENERATİF MEKANİZMALARIN BAŞLANGICININ
5XFAD TRANSGENİK ALZHEİMER HASTALIĞI FARE
MODELİNDE PROTEOMİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

İREP URAS
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Dr. Betül Şahin

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

11.06.2024

İrep Uras

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hayata geçmesine vesile olan tez danışmanım Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a ve doktora eğitimimde emeği geçen başta Prof. Dr. Aysel Özpınar olmak üzere Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Deneyimleriyle, bilgisiyle, dostluğuyla ve güler yüzüyle her zaman yanımda olan ikinci danışmanım Dr. Betül Şahin'e,

Çalışmaların her aşamasında yanımda olup usanmadan bana gece gündüz destek olan ve her daim güç veren değerli ekip arkadaşlarım Dr. Merve Karayel-Başar, Dr. İrem Kırış ve Sebile Koca'ya,

Tanıştığımız andan itibaren hayatın her yönünde benden desteklerini esirgemeyen ve yanımda olan Dr. Belal Soobadar'a,

Hayatım boyunca arkamda durup bana maddi, manevi ve psikolojik olarak hep destek olan ve yanımdan hiç ayrılmayan sevgili babam Hasan Uras, canım halam Sultan Uras ve sevgili kuzenim Kuzey Uras başta olmak üzere çok sevdiğim canım aileme gönülden teşekkür ederim.

BİDEB 2211-A Genel Yurt içi Doktora Burs Programı ve BİDEB 2214-A Yurtdışı Araştırma Burs Programı kapsamında çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından desteklenen 217S834 numaralı "Mekanizmaların Başlangıcının 5xFAD Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modelinde Proteomik Yöntemlerle Araştırılması" başlıklı TÜBİTAK 1001 projesi ve "Neonatal 5xFAD Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modelinde Nörodejeneratif Mekanizmaların Metabolomik Yöntemlerle Araştırılması" başlıklı TÜBİTAK 2214-A projesi kapsamında yapılmıştır. TÜBİTAK'a proje desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER	7
2.1 Alzheimer Hastalığı.....	7
2.1.1 Tarihçe.....	7
2.1.2 Etiyoloji ve epidemiyoloji.....	8
2.1.3 Tanı kriterleri	9
2.1.4 Alzheimer hastalığı evreleri.....	10
2.1.5 Hastalığın patofizyolojisi.....	10
2.1.5.1 Nöropatoloji	11
2.1.5.2 Hastalığın moleküler genetiği.....	13
2.1.6 Hipotezler	14
2.1.6.1 Amiloid hipotezi.....	14
2.1.6.2 Tau ilişkili hipotez	16
2.1.6.3 Kolinergik hipotez.....	17
2.1.7 Tedavi	18
2.2 Alzheimer Hastalığı Fare Modelleri	19
2.3 Kütle Spektrometresi (MS).....	19
2.3.1 LC-MS/MS	21
2.3.2 Kütle spektrometresi görüntüleme (MSI)	21
3 GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1 Gereçler	24
3.2 Yöntem	26
3.2.1 Deney hayvanları	26
3.2.1.1 Deney hayvanlarının bakımı	26
3.2.1.2 Deney hayvanlarının üretimi.....	26

3.2.2	Genotipleme	26
3.2.2.1	DNA izolasyonu	27
3.2.2.2	Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	27
3.2.2.3	Agaroz jel elektroforezi.....	29
3.2.3	Primer Hücre Kültürü Çalışması.....	29
3.2.3.1	Primer hücre kültürü	30
3.2.3.2	Hücrelerin toplanması ve homojenize edilmesi	32
3.2.3.3	FASP protokolü ile triptik peptitlerin hazırlanması	33
3.2.3.4	LC-MS/MS analizi.....	34
3.2.3.5	LC-MS/MS datalarının işlenmesi	34
3.2.3.6	Biyoinformatik analizler	35
3.2.4	MALDI kütle spektrometresi görüntüleme çalışması.....	35
3.2.4.1	Beyin dokusu diseksiyonu.....	36
3.2.4.2	Beyin doku kesitlerinin alınması ve hazırlanması	37
3.2.4.3	Doku üzeri tripsinizasyon işlemi	38
3.2.4.4	Matriks uygulaması.....	38
3.2.4.5	MALDI kütle spektrometresi görüntüleme analizleri.....	38
3.2.4.6	MALDI-MSI görüntülerine ait verilerin işlenmesi	40
3.2.4.6.1	SCiLS Lab ile yenidoğan dokularının segmentasyon analizi	40
3.2.4.6.2	İntensite değerlerinin normalize edilmesi	41
3.2.4.6.3	m/z değerlerinin internal kalibrasyonu	42
3.2.4.6.4	Verilerin gruplandırılması.....	42
3.2.4.6.5	İstatistiksel analizler.....	43
3.2.4.7	LC-MS/MS analizleri ile protein tanımlama	43
3.2.4.7.1	Doku üzeri tripsinizasyon ile LC-MS/MS analizi için örnek hazırlanması	44
3.2.4.7.2	Direk doku kesitinden LC-MS/MS analizi için örnek hazırlama	44
3.2.4.7.3	FASP Protokolü ile triptik peptitlerin hazırlanması	45
3.2.4.7.4	LC-MS/MS analizi.....	45
3.2.4.8	MALDI-MSI ve LC-MS/MS datalarının eşleştirilmesi ve proteinlerin tanımlanması.....	45
3.2.5	Western Blot Yöntemi ile MALDI-MSI Sonuçlarının Validasyonu	46
3.2.5.1	Western Blot Analizi için Protein Örneklerinin Hazırlanması	46
3.2.5.2	Western Blot Yöntemi.....	46
3.2.5.3	Western blot yöntemi ile elde edilen dataların istatistiksel analizi	48
3.2.6	DESI kütle spektrometresi görüntüleme çalışması	49
3.2.6.1	Beyin dokusu diseksiyonu.....	50
3.2.6.2	Beyin doku kesitlerinin alınması ve saklanması	50
3.2.6.3	DESI kütle spektrometresi görüntüleme analizleri	51
3.2.6.4	DESI-MSI datalarının işlenmesi	52
3.2.6.5	Biyoinformatik analizler	52
4	BULGULAR	53
4.1	Transgenik Hayvanların Genotipleme ile Belirlenmesi	53
4.2	Primer Hücre Kültürü	53
4.2.1	Primer hücre kültürü LC-MS/MS analizi sonuçları	55
4.2.2	Korteks bölgesine ait LC-MS/MS ile tanımlanan anlamlı proteinler.....	55

4.2.3	Serebellum bölgesine ait LC-MS/MS ile tanımlanan anlamlı proteinler	57
4.2.4	İfade farklılıkları bulunan proteinlerin yolak analizleri	59
4.3	MALDI-MSI Analizlerinin Sonuçları	62
4.3.1	LC-MS/MS Analizi sonuçları	62
4.3.2	MALDI-MSI Analizi Sonuçları	63
4.4	Western Blot Yöntemi Validasyon Sonuçları	71
4.5	DESI-MSI Analizlerinin Sonuçları	72
5	TARTIŞMA	80
5.1	Primer Hücre Kültürü	80
5.2	MALDI-MSI Analizleri	87
5.3	DESI-MSI Analizleri	92
6	SONUÇ	95
7	KAYNAKLAR	96
8	EKLER	111
EK 1		111
Etik Kurul İzni		111
EK 2		112
Korteks Bölgesine Ait Proteinlerin Listesi		112
EK 3		115
Serebellum Bölgesine Ait Proteinlerin Listesi		115
9	ÖZGEÇMİŞ	117

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

Aβ	Amiloid Beta
ACN	Asetonitril
ACh	Asetilkolin
AH	Alzheimer Hastalığı
AmBic	Amonyum Bikarbonat
APP	Amiloid Precursor Protein
APS	Amonyum Persülfat
BME	β -mercaptoethanol
BSA	Bovine Serum Albumin
ChAT	Kolin Asetiltransferaz
CRMP	Collapsin Response Mediator Protein
DESI	Desorption Electrospray Ionization
DHB	2,5-dihidroksibenzoik Asit
DIA	Data Independent Acquisition
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EOAD	Early-Onset Alzheimer's Disease
ESI	Electrospray Ionization
FA	Formik Asit
FASP	Filter Aided Sample Preparation
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FDR	False Discovery Rate/Yanlış Keşif Oranı
Glu-Fib	Glu-1-fibrinopeptit B
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme
HC	Hierarchical Clustering
HTL	Heated Transfer Line
IAA	Iodoacetamide
ITO	Indium Tin Oxide
IVC	Individually Ventilated Cages
LeuEnk	Leucine Enkephalin
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry

LM	Littermate
LOAD	Late-Onset Alzheimer's disease
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MAPT	Microtubule Associated Protein Tau
MBP	Myelin Basic Protein
MSI	Mass Spectrometry Imaging
NaCl	Sodyum Klorit
NFY	Nörofibriller Yumaklar
NMDA	N-metil D-aspartat
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBST	Phosphate-Buffered Saline with Tween 20
PCA	Principle Component Analysis
PHF	Paired Helical Fragments
PIC	Proteaz İnhibitör Kokteyli
PDL	Poli-D-Lizin
PLL	Poli-L-Lizin
PSEN	Presenilin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEM	Standart Error of the Mean
TEMED	Tetrametiletildiamin
TFA	Trifloraasetik Asit
TIC	Total Ion Count
TOF	Time-of-Flight
UPX	Universal Protein Extraction Kit
VACHT	Veziküler Asetilkolin Taşıyıcı
WHO	World Health Organization/Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Alzheimer hastalığı sırasında beyinde amiloid ve tau patolojisinin yayılımı	11
Şekil 2. Nörofibriler yumakların (NFY) oluşumu	12
Şekil 3. APP'nin ekstrasellüler domain içinde bölünmesi	15
Şekil 4. Asetilkolinin (ACh) presinaptik ve postsinaptik sinir uçları arasındaki sentez ve taşıma yolu	17
Şekil 5. Primer hücre kültürü çalışma planı	30
Şekil 6. NeuroCult Enzymatic Dissociation Kit Protokolü	31
Şekil 7. MALDI-MSI çalışma planı	36
Şekil 8. MALDI-MSI görüntülerine ait verilerin işlenmesindeki iş akışı	40
Şekil 9. Tripsin enziminin triptik otoliz peptitlerine ait m/z değerleri ve hata oranları	43
Şekil 10. DESI-MSI çalışma planı	50
Şekil 11. 5xFAD fare dokularına ait PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: DNA standardı; LM: Littermate (kontrol); Tg: Transgenik (5xFAD) fare)	53
Şekil 12. Korteks bölgesine ait venn diyagramı, PCA analizi, HC analizi	56
Şekil 13. Serebellum bölgesine ait venn diyagramı, PCA analizi, HC analizi	58
Şekil 14. R1, R2 ve R3 bölgelerine ait segmentasyon haritaları ve spektrumları	63
Şekil 15. Bölgelere özgü m/z değerlerine ve tanımlanan proteinlere ait Venn diyagramı (A) R1, R2 ve R3 bölgelerine ait istatistiksel olarak anlamlı m/z değerlerinin ($d > 0,8$, $p < 0,05$) Venn diyagramı. (B) 1 ppm hata oranının altında tanımlanan istatistiksel olarak anlamlı proteinlerin Venn diyagramı	65
Şekil 16. 5xFAD ve kontrol (LM) beyin doku kesitlerine ait istatistiksel olarak anlamlı m/z değerlerinin doku üzerindeki dağılımları ve intensite grafikleri (A) Stathmin, (B) NogoA, (C) Hspa4, (D) eIF3A, (E) VCP, (F) EF-2. Veriler, bar grafiği ve ortalama $\pm$ SEM ile sunulmuştur. İntensite değerleri için istatistiksel olarak anlamlı farklılık $*(p < 0,05)$, $** (p < 0,01)$ ile gösterilmiştir. (a.i.) auto intensite değerlerini temsil etmektedir. Renk gradyanı, intensite seviyelerini ve siyah-gri renk çubuğu ise beyin doku kesitlerinin boyutunu göstermektedir.	68

Şekil 17. Histolojik tanımlamalar için kullanılan görüntüler (A) MALDI-MSI analizleri için kullanılan koronal doku kesitlerinin taranmış optik görüntüleri. (B) MALDI-MSI yöntemi ile analiz edilen kesitlerin H&E boyaması. (H&E: hematoksin ve eozin) 69

Şekil 18. Stathmin, NogoA, HSPa4, Eif3a, VCP ve EF-2 proteinlerine ait Western blot görüntüleri. İstatistiksel anlamlılık, normalite testi sonuçlarına bağlı olarak independant t-test ile değerlendirilmiştir (*p < 0,05, ns: *not significant*, anlamlı değil). Veriler, dağılım grafiği ve ortalama $\pm$ SEM ile gösterilmiştir. Grafiklerin altında proteinlere ait Western blot görüntüleri verilmiştir. 71

Şekil 19. R1, R2, R3 bölgelerine ait segmentasyon haritaları ve spektrumları 72

Şekil 20. R1, R2 ve R3 bölgelerine ait m/z ve intensite değerlerinin PCA analizleri 74

Şekil 21. Düşük ağırlıklı metabolit metodu sonucunda elde edilen m/z ve intensite değerlerine ait PCA analizi (ALM: Kontrol, ALZ: 5xFAD transgenik) 74

Şekil 22. 5xFAD ve kontrol beyin doku kesitlerinde lipit metoduyla tanımlanan m/z değerlerinin doku üzerindeki dağılımları 78

Şekil 23. 5xFAD ve kontrol beyin doku kesitlerinde metabolit metoduyla tanımlanan m/z değerlerinin doku üzerindeki dağılımları 79

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Yenidoğan beyin doku kesitlerine ait temsili ITO lam görüntüsü. Lokasyon işaretleri (X) ve damlatılan BSA proteini görülmektedir. 37

Resim 2. Temsili Hücre kültürü görüntüleri. (A) Korteks kontrol, (B) Korteks transgenik, (C) Korteks ko-kültür, (D) Serebellum kontrol, (E) Serebellum transgenik, (F) Serebellum ko-kültür, (G) Hipokampus Kontrol, (H) Hipokampus transgenik, (İ) Hipokampus ko-kültür..... 54



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihaz, alet ve laboratuvar malzemelerinin listesi.....	24
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi	25
Tablo 3. Genotipleme analizinde kullanılan primer dizileri.....	27
Tablo 4. PZR reaksiyonu bileşenleri	28
Tablo 5. PZR reaksiyon aşamaları.....	28
Tablo 6. Bruker peptit kalibrasyon standardı II peptit listesi ve m/z değerleri	39
Tablo 7. Total intensite normalizasyonu aşamaları ve hesaplama örneği	41
Tablo 8. Western blot için transfer parametreleri	47
Tablo 9. Western blot analizlerinde kullanılan birincil ve ikincil antikorlar.....	48
Tablo 10. LC-MS/MS ile tanımlanan ve anlamlı farklılık gösteren protein sayıları .	55
Tablo 11. Korteks bölgesine ait istatistiksel olarak anlamlı proteinlerin listesi.....	56
Tablo 12. Serebellum bölgesine ait istatistiksel olarak anlamlı proteinlerin listesi ...	58
Tablo 13. Korteks bölgesine ait proteinlerin Reactome yolak analizi.....	59
Tablo 14. Serebellum bölgesine ait Reactome yolak analizi.....	60
Tablo 15. Korteks bölgesindeki yolaklara ait proteinler ve değişim katsayıları	61
Tablo 16. Serebellum bölgesindeki yolaklara ait proteinler ve değişim katsayıları...	62
Tablo 17. R1, R2 ve R3 bölgelerine ait m/z değerleri ve tanımlanan protein sayıları	64
Tablo 18. R1, R2 ve R3 bölgelerine ait ifadesi artan proteinlerin listesi	66
Tablo 19. R1, R2 ve R3 bölgelerine ait ifadesi azalan proteinlerin listesi	67
Tablo 20. R1, R2 ve R3 bölgesine ait AH ile ilişkilendirilen proteinlerin listesi.....	70
Tablo 21. Lipit metodu kullanılarak tanımlanan metabolitlerin listesi	76
Tablo 22. Düşük ağırlıklı metabolit metodu ile tanımlanan metabolitlerin listesi	77

Tablo 23. Korteks bölgesi ko-kültür grubu istatistiksel olarak anlamlı protein listesi	112
Tablo 24. Korteks bölgesi transgenik grup istatistiksel olarak anlamlı protein listesi	113
Tablo 25. Serebellum ko-kültür grubu istatistiksel olarak anlamlı protein listesi ...	115
Tablo 26. Serebellum transgenik grup istatistiksel olarak anlamlı protein listesi	116



ÖZET

Nörodejeneratif Mekanizmaların Başlangıcının 5xFAD Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modelinde Proteomik Yöntemlerle Araştırılması

Alzheimer hastalığı (AH), belirgin hafıza eksikliği ile unutkanlığa neden olan, çeşitli moleküler patolojilerle karakterize ve yaşlı nüfusunda en sık görülen ilerleyici bir hastalıktır. Hastalık tanısından önce mevcut olan patoloji, klinik semptomlarla oldukça ilişkilidir. Bu ilişki, hastalığın çeşitli evrelerinde, özellikle beyin dokusu üzerinde proteomik ve metabolomik temelli çalışmalarla incelenmiştir. Ancak hastalığın yenidoğan evresi kadar erken dönemini hedefleyen ve başlangıç noktasında moleküler seviyede ne gibi değişimler olduğunu aydınlatmaya yönelik çalışmalar literatürde bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, yenidoğan 5xFAD AH fare modeli beynindeki proteomik ve ayrıca metabolomik değişimlerin bölgesel olarak incelenmesi ve hastalığın erken evredeki moleküler izlerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, yenidoğan 5xFAD beyin dokusundaki proteomik değişiklikler MALDI-MSI, metabolomik değişiklikler ise DESI-MSI yöntemi ile incelenmiştir. MALDI-MSI ve DESI-MSI analizleri sonucunda tanımlanan protein ve metabolitler literatür yardımıyla AH ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmanın diğer bir basamağında, nörodejenerasyonda “Seyirci Etkisi” olarak isimlendiren faktörün erken nörodejenerasyon kavramındaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol fare beyinleri korteks, serebellum ve hipokampus bölgelerine ayrılarak ko-kültür çalışmaları yapılmış ve doğuştan hasarlı olduğu düşünülen 5xFAD hücrelerinin, kontrol hücreleri üzerindeki nörodejeneratif etkisi LC-MS/MS proteomik analizler ile araştırılmıştır. Sonuç olarak elde edilen bulgular, hastalığın erken moleküler mekanizmalarının ortaya çıkarılmasının AH’nin patogenezi için daha iyi anlamak için büyük önem taşıdığını göstermektedir. Ayrıca, AH’nin doğum kadar erken dönemde var olabileceği ve beyin hasara karşı daha savunmasız olduğu yaşlılık döneminde ortaya çıkabileceği ve bazı moleküllerin yenidoğan AH beyinde nörodejeneratif öncüler olabileceği fikrini desteklemektedir.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer hastalığı, nörodejenerasyon, MALDI-MSI, DESI-MSI, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Proteomic Investigation of Neurodegenerative Mechanisms in Neonatal 5xFAD Transgenic Alzheimer Disease Mouse Model

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by memory loss that mainly affects the elderly population. The pathology present before the diagnosis is highly correlated with clinical symptoms. This relationship has been studied at various stages of the disease, particularly through proteomic and metabolomic-based studies on brain tissue. However, there are no studies in the literature that focus on the neonatal stage of the disease to elucidate the molecular changes that occur at the onset of the disease. This study aims to investigate the spatial proteomic and also metabolomic changes in the brain of the neonatal 5xFAD AD mouse model and to uncover the molecular traces of the disease in its early stages. For this purpose, proteomic changes in the neonatal 5xFAD brain tissue were investigated by MALDI-MSI, and metabolomic changes were examined by DESI-MSI analyses. The proteins and metabolites identified by MALDI-MSI and DESI-MSI analyses were associated with AD according to the literature. Another aim of this study is to investigate the role of the "Bystander Effect" in early neurodegeneration. For this purpose, co-culture studies were performed by separating the cortex, cerebellum, and hippocampus regions of neonatal 5xFAD transgenic and control mouse brains. The neurodegenerative effect of 5xFAD brain cells, presumed to be congenitally damaged, on control cells was investigated by LC-MS/MS analyses. The results indicate that elucidating the early molecular mechanisms of AD is crucial for a better understanding of its pathogenesis. These findings support the idea that AD may exist as early as birth and appear in old age, when the brain is more vulnerable to damage, and that some proteins are neurodegenerative presages in the neonatal AD brain.

Keywords: Alzheimer's disease, neurodegeneration, MALDI-MSI, DESI-MSI, LC-MS/MS.

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH), belirgin hafıza kaybı ve unutkanlığa neden olan, yaşlı nüfusunda en sık görülen ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır (1). AH, amiloid-beta plaklarının ($A\beta$) hücre dışında, tau proteininin ise hücre içinde nörofibriler yumaklar (NFY'ler) şeklinde birikmesi ile karakterize edilen çeşitli moleküler patolojiler ile tanımlanmaktadır (2). Bunlar hastalığın iki ana patolojik belirteci olmasına rağmen, AH aksonal dejenerasyon, otofajik süreçler ve sinaptik kayıp ve işlev bozukluğu gibi farklı önemli süreçlerin de rol oynadığı multifaktöriyel bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Bu agregatların aşırı birikimi sinapsların, aksonların ve dendritlerin kaybına yol açmaktadır (3). Bu nedenle, sinaptik kaybın bilişsel gerilemenin önemli bir yapısal belirleyicisi olduğu ve AH'nin ilerleyici demansının altında yatan etken olabileceği düşünülmektedir (4,5). Dünya çapında 47 milyon kişi demans hastasıdır ve bu sayının 2030 yılına kadar 76 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (6). AH olan bireylerin sayısı hızla artmaktadır, bu nedenle AH'nin erken mekanizmalarına ışık tutmayı amaçlayan çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

AH'nin altında yatan mekanizmaları ve hastalığın patogenezi anlamaya yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (1). *Post-mortem* beyin dokusu kullanılarak yapılan çalışmalar birçok bilinmezi aydınlatsa da, deneysel fare modelleri, AH'nin altında yatan mekanizmasını ve patofizyolojisini çözmek için paha biçilmez varlıklardır. Mevcut fare modelleri, $A\beta$ plakları veya NFY'ler olmak üzere hastalığın sadece belirli yönlerini yansıtmaktadır ve AH'nin tüm özellikleri aynı modelde bir arada sunulamamaktadır (7). 5 mutasyonlu AH transgenik fare modeli olan 5xFAD, erken başlangıçlı AH fare modeli olması nedeniyle literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu AH fare modeli, $A\beta$ plakları, nöroinflamasyon, gliosis, sinaptik dejenerasyon ve nöronal kayıp gibi insan AH'nin birçok özelliğini yansıtmaktadır (8,9). 5xFAD fare modeli herhangi bir tau patolojisi sergilemese de, sahip olduğu diğer özellikleri ve bölgeye özgü nörodejenerasyon göstermesi nedeniyle AH araştırmaları için uygun bir deneysel hayvan modelidir (8,10).

Son zamanlarda ortaya çıkan sistem biyolojisi yaklaşımları, nörodejeneratif hastalıkların patogenezi için yeni bir ışık tutmak için proteom, genom, metabolom ve

çevre arasındaki etkileşimlerin bütünsel olarak incelenmesine olanak sağlamıştır (11). Bu tür çalışmaları kolaylaştırmak amacıyla ortaya çıkan yeni teknolojilerden biri de kütle spektrometresi görüntüleme (*Mass Spectrometry Imaging, MSI*) yöntemidir. Geleneksel kütle spektrometresi (MS) analiz yöntemleri, vücut sıvıları veya dokulardan elde edilen analitlerin incelenmesine olanak sağlar. Fakat, biyolojik örnekler her zaman homojen olmadığından ve dokular aynı tip hücrelerden oluşmadığından bu analiz yöntemleri ile konumsal (*spatial*) biyokimyasal farklılıklar gözlemlenemez (11,12). AH'de, bazı beyin bölgelerinin nörodejeneratif süreçlere daha duyarlı olduğu ve nörolojik ve davranışsal anormalliklerin bölgeye özgü nöronal fonksiyon bozukluklarından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (13). Bu nedenle, proteinlerin bölgesel ifade değişimlerini incelemek onların AH'deki rolünü ve hastalığın ilerleyişini anlamak için büyük öneme sahiptir. Ayrıca, yakın zamana kadar olan çalışmalarda, tüm hücrelerin hayatta kalmak için enerji metabolizmasına bağlı olmasından dolayı beyin, metabolitlerin dağılımı açısından homojen bir yapı olarak kabul edilmekteydi. Bu nedenle, metabolitlerin bölgesel özgüllüğü hesaba katılmadan tanımlanmaları ve kantifikasyonları, hastalık patolojisini anlamak için önemli olabilecek konumsal olarak farklı metabolik değişiklikleri saptamada başarısız olmaktaydı (11). Bu eksikliklerin tanınmasıyla, yüzlerce biyomolekölün aynı anda görüntülenmesine olanak sağlayan MSI analizleri nörodejeneratif hastalıklardaki konumsal metabolik değişiklikleri saptamak, profillemek ve potansiyel biyobelirteç geliştirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (14,15). MS temelli kütle spektrometresi görüntüleme (MSI) yöntemleri ile protein, peptit, lipid ve metabolit gibi biyomoleküller homojenizasyon işlemi olmadan, doğrudan doku kesiti üzerinde görselleştirilip incelenebilmektedir (16,17). Bu nedenle, bu yöntem sayesinde dokunun homojenizasyon işlemi ile kaybedilecek olan kimyasal ve konumsal bütünlüğü korunur. Proteinlerin, peptitlerin, lipidlerin ve metabolitlerin konumsal (*spatial*) dağılımlarının analizi, patolojik süreçlerdeki rolleri hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır ve ayrıca AH'de olduğu gibi patofizyolojisi bilinmeyen nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesi sırasında oluşan moleküler değişikliklerde rehberlik etmektedirler (18).

Hastalık tanısından önce mevcut olan patoloji, klinik semptomlarla oldukça ilişkilidir. Bu ilişki, hastalığın çeşitli evrelerinde, özellikle beyin dokusu üzerinde genomik, proteomik ve metabolomik temelli çalışmalarla açıklanmaya çalışılmıştır (15,19–24). AH'nin ileri dönemlerini ele alarak yapılan çalışmalar birçok bilinmezi aydınlatırsa da, hastalığın yenidoğan evresi kadar erken dönemini hedefleyen, hastalık patolojisinin hangi noktada başladığını ve bu başlangıç noktasında moleküler seviyede nasıl değişimler olduğunu aydınlatmaya yönelik çalışmalar literatürde bulunmamaktadır.

Ekibimizde yapılan önceki çalışmalarda, AH'nin farklı evrelerinde beyin proteomundaki değişimleri araştırmak amacıyla yenidoğan (1 günlük) ve 3-6-12 aylık 5xFAD beyin dokuları kullanılarak proteomik analizler gerçekleştirilmiştir (13,25). Özellikle yenidoğan 5xFAD fare modeline ait verilerin, diğer evrelere kıyasla, *post-mortem* insan AH proteom profilleriyle benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (25). Yenidoğan döneminde ciddi değişimlerin görülmesi ve 3 ve 6 aylık dönemlerde değişimin azalmış olması, AH beynindeki moleküler değişikliklerin doğumda bile var olabileceğini ve bazı proteinlerin yenidoğan AH beyninde nörodejeneratif öncüler olabileceğini göstermiştir. Buradan yola çıkarak, bu tez çalışmasında yenidoğan 5xFAD AH fare modeli beynindeki proteomik ve metabolomik değişimlerin bölgesel olarak incelenmesi ve AH patolojisinin erken evredeki moleküler izlerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, yenidoğan 5xFAD beyin dokusundaki proteomik değişiklikler MALDI kütle spektrometresi görüntüleme (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging*, MALDI-MSI) analizleri ile, metabolomik değişiklikler ise DESI kütle spektrometresi görüntüleme (*Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*, DESI-MSI) analizleri aracılığıyla incelenmiştir.

Tez çalışmasının diğer bir basamağında nörodejenerasyonda “Seyirci Etkisi” (*Bystander Effect*) olarak isimlendiren faktörün erken nörodejenerasyon kavramındaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Seyirci etkisi, nörodejenerasyondan etkilenen ve/veya nörodejenerasyonun başlangıcında olan hücrelerin diğer sağlıklı hücreleri etkilediğine dair, üzerinde çeşitli çalışmalar yapılan bir hipotezdir. Yapılan bir çalışmada, 3 aylık farelerden alınan kan plazmasının 18 aylık farelere enjekte edilmesi

sonucunda, enjekte edilen genç fare kanının yaşı farelerde bilişsel fonksiyonları olumlu yönde değiştirdiği gözlemlenmiştir (26). Bu amaçla, yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol fare beyinleri korteks, serebellum ve hipokampus olmak üzere 3 bölgeye ayrılmış ve bu bölgelerden primer hücre kültürleri yapılmıştır. Yenidoğan farelerde primer hücre kültürü çalışmaları transgenik (5xFAD), kontrol (non-transgenik) ve transgenik+kontrol (5xFAD+non-transgenik) ko-kültürleri olarak üç grup halinde çalışılmıştır. Burada, doğuştan hasarlı olduğu düşünülen 5xFAD beyin hücrelerinin, kontrol beyin hücreleri üzerindeki nörodejeneratif etkisi araştırılmıştır. Araştırılmak istenen Seyirci Etkisi kapsamında transgenik hücrelerin kontrol hücreleri üzerinde gerçekleştirdiği proteomik değişiklikler nano LC-MS/MS yöntemi ile tespit edilmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı

Demans, günlük aktiviteleri yerine getirmeyi engelleyen hafıza kaybı, unutkanlık, dil, problem çözme ve diğer düşünme yeteneklerinin kaybı için kullanılan genel bir terimdir. Demansın en yaygın formu olan Alzheimer hastalığı (AH) ise hafıza kaybı ile başlayan, sonrasında davranış, konuşma, oryantasyon bozukluğu ile devam eden ve motor sistemi etkileyebilen bilişsel fonksiyonlardaki kayıp ile karakterize ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır (27).

2.1.1 Tarihçe

Hafıza kaybı ve azalan sosyal etkileşimlerle kendini gösteren bilişsel bozukluklar, antik çağlardan beri insanların dikkatini çekmiştir. Demans, AH'nin keşfedilmesinden uzun zaman önce, hastaların psikolojik ve sosyal yönlerini etkileyen bütün bilişsel bozukluklar için kullanılan yaygın bir terimdir. Latince kökenli olan demans terimi, eksik anlamına gelen “de-” öneki ile akıl veya düşünce anlamına gelen “-mens” ekinin birleştirilmesiyle, akli eksik/akılsız anlamına gelen “*demens*” kelimesinden türetilmiştir (28,29).

AH, Alman psikiyatrist ve nöropatolog Alois Alzheimer tarafından 20. yüzyılın başlarında, 1901 yılında başlayan bir çalışmanın ardından keşfedilmiştir. Dr. Alois Alzheimer, akıl hastanesinde tedavi gören ve normal demans vakalarına kıyasla farklı semptomatolojiye sahip 51 yaşındaki Auguste Deter isimli hasta ile ilgilenmeye başlamıştır. 5 yıl boyunca gözlemlediği ve semptomları giderek kötüleşen hastanın ölümünden sonra yaptığı otopside beyinde nöritik plaklar ve nörofibriler yumakların varlığını keşfetmiş ve bunu hastalığın nöropatolojik temeli olarak tanımlamıştır (28). Demansın bu yeni formu, 1910 yılında Emil Kraepelin tarafından Alzheimer Hastalığı olarak adlandırılmıştır (30).

2.1.2 Etiyoloji ve epidemiyoloji

Demansın en yaygın formu olan AH, tanı konulan tüm bilişsel bozukluk vakalarının yaklaşık %60 ile %80'ini temsil etmektedir (28). Dünya çapında yaklaşık 50 milyon AH hastası bulunmakta ve bu sayının her 5 yılda bir ikiye katlanarak 2050 yılına kadar 152 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (31). AH'nin küresel maliyetinin yıllık 1 trilyon dolar olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle, AH Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından halk sağlığı açısından öncelikli bir hastalık olarak kategorize edilmiştir (32).

AH'nin ortaya çıkmasında hem genetik hem de çevresel risk faktörleri rol oynamaktadır. Hastalığın en büyük risk faktörü ise yaşlılıktır. 65 yaşında AH olma olasılığı yaklaşık %3 iken, 85 yaşına gelindiğinde bu oran %30'un üzerine çıkmaktadır. 65 yaş altında hastalığın görülme insidansı kesin olmamakla birlikte, bu yaş grubunun AH vakalarının yaklaşık %3'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir. Genel nüfusun yaşlanmasıyla birlikte, bazı ülkelerde yaşa özgü insidansın düştüğü görülmektedir (33).

AH genel olarak ailesel erken başlangıçlı AH ve sporadik geç başlangıçlı AH olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Erken başlangıçlı AH (*early-onset Alzheimer's disease, EOAD*) 65 yaşından önce ortaya çıkarken, vakaların %95'ini oluşturan geç başlangıçlı AH (*late-onset Alzheimer's disease, LOAD*) 65 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır (34,35). Ailesel AH, mendelyen (genellikle dominant) kalıtım gösterirken, sporadik AH ailevi bağlantı göstermez (36). Çoğu LOAD vakası sporadik formdayken, neredeyse tüm EOAD vakaları aileseldir çünkü bu vakalar *APP*, *PSEN1* veya *PSEN2* genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Genom çapında ilişkilendirme (GWAS) çalışmaları ve sekanslama, sporadik vakalara katkıda bulunan 20'den fazla risk lokusu belirlemiştir (33).

2.1.3 Tanı kriterleri

1984 yılında *The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* ve *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* tarafından AH klinik tanı kriterlerini belirlemek için bir komite oluşturulmuştur. AH'nin klinik tanısı üç farklı kategoride tanımlanmıştır: 1) nöropsikolojik testler ile doğrulanan demans, ilerleyici hafıza kaybı, günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve afazi (dil bozukluğu), apraksi (motor beceri bozukluğu) ve agnozi (algı kaybı) gibi semptomlarla teşhis edilebilen olası AH. Belirtiler herhangi bir sistemik veya beyin hastalığı olmaksızın 40-90 yaş arasında başlayabilir. 2) nörolojik, psikiyatrik bozuklukların yokluğunda ve sistemik veya beyin hastalığı gibi başka bir hastalığın varlığında (ancak bunların demansın başlıca nedeni olmaması durumunda) teşhis edilebilen muhtemel AH ve 3) biyopsi veya otopsi ile elde edilen histopatolojik doğrulama ile teyit edilen kesinleşmiş AH (31,37).

2011 yılında *The National Institute on Aging-Alzheimer's Association*, AH'nin tanısında daha yüksek özgüllük ve duyarlılık için 1984 yılında tanımlanan kriterlere çeşitli değişiklikler yapmış ve kriterleri güncellemiştir (31). Yeni kriterler, Alzheimer hastalığının üç aşamalı bir spektrumda ilerlediğini kabul etmektedir. Bu aşamalar hiçbir belirti göstermeyen erken, klinik öncesi dönem; hafif bilişsel bozukluğun olduğu orta dönem ve demans belirtilerinin görüldüğü son dönem olarak tanımlanmıştır. 1984 tanı kriterleri hafıza kaybını demansın ilk ve tek başlıca kriteri olarak kabul ederken, yeni kriterler bunu genişleterek kelime bulma yeteneği veya muhakeme gibi diğer bilişsel yeteneklerin önce bozulabileceğini göz önüne almaktadır. Ayrıca yeni kriterler, AH ve diğer demans çeşitlerinin arasındaki farklılıkların ve benzerliklerin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Güncellenmiş kriterler, AH'yi teşhis etmek için altta yatan nörolojik hastalıkların göstergeleri olan biyobelirteçlerin potansiyel kullanımını kabul etmektedir (38).

2.1.4 Alzheimer hastalığı evreleri

Alzheimer hastalığının klinik evreleri 4 kategoride sınıflandırılmaktadır (31,39).

1. Klinik öncesi dönem (*pre-clinical/pre-symptomatic*): Bu evre, korteks ve hipokampüste gelişen erken patolojik değişiklikler ve hafif hafıza kaybı ile karakterize olmakta, günlük aktivitelerde işlevsel bozulma ve AH'nin klinik belirti ve semptomları bulunmamaktadır.
2. Hafif/erken dönem (*mild or early*): Hastalarda konsantrasyon ve hafıza kaybı, oryantasyon bozukluğu, ruh halinde değişiklik ve depresyon gelişimi ile hastanın günlük yaşamında sorunlar gibi çeşitli belirtilerin ortaya çıkmaya başladığı evredir.
3. Orta dönem (*moderate*): Hastalığın serebral korteks bölgelerine yayıldığı ve bunun sonucunda hafıza kaybının arttığı, aile ve arkadaşları tanımada güçlük çekildiği, dürtü kontrolünün kaybedildiği ve okuma, yazma ve konuşmada güçlük çekildiği orta derecede AH evresidir.
4. Şiddetli dönem (*severe or late*): Hastalığın nöritik plakların ve nörofibriler yumakların yoğun birikimi ile tüm korteks alanına yayılmasını içeren, hastaların ailelerini hiç tanıyamadığı, yutma ve idrar yapma güçlükleri ile yatalak hale gelebildiği ve sonunda bu komplikasyonlar nedeniyle hastanın ölümüne yol açan ilerleyici işlevsel ve bilişsel bozuklukla sonuçlanan son evredir.

2.1.5 Hastalığın patofizyolojisi

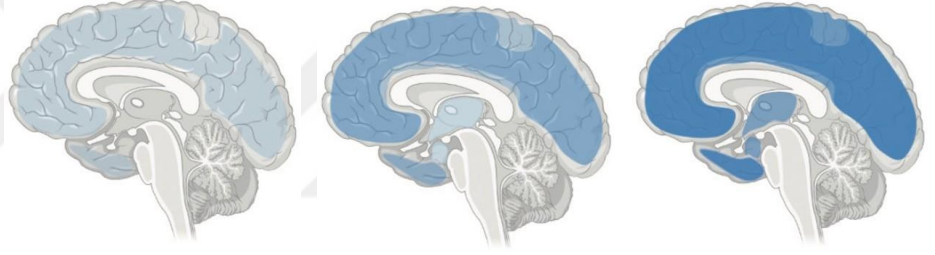
AH, serebral kortekste nöronların atrofisi ve sinaps kaybı ile karakterizedir. Medial temporal lob en şiddetli etkilenen bölgedir (33,40). Patolojinin hipokampus ve entorinal bölgelerde başladığı ve daha sonra fronto-temporal korteksler boyunca yayıldığı görülmektedir. Genellikle serebellum bölgesi korunarak striatum ve talamusa kadar ulaşır. Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) taramaları bu bölgelerin küçüldüğünü göstermektedir. Özellikle, hipokampusun CA1 piramidal hücreleri, hafıza kaybının ana belirtileri ile uyumlu olarak morfolojik değişikliklere ve hücre ölümüne karşı savunmasızdır (33).

Hastalığın ilerleyişini ve belirtilerini açıklayan nöropatolojik değişiklikler “birikimler” ve “kayıplar” olarak 2 kategori altında sınıflandırılabilir: 1) Alzheimer hastalarının beyinlerinde oluşan nörofibriler yumaklar (NFY), amiloid plaklar (A β plaklar), distrofik nöritler ve nöropil ipliklerin birikimi ve 2) nöral, nöropil ve sinaptik kayba bağlı atrofi. Bunların yanı sıra, nöroinflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, metal iyonlarının aşırı birikimi ve kolinergik nöronların hasarı gibi başka etkenlerin de nörodejenerasyona neden olabileceği tartışılmaktadır (31,32,41).

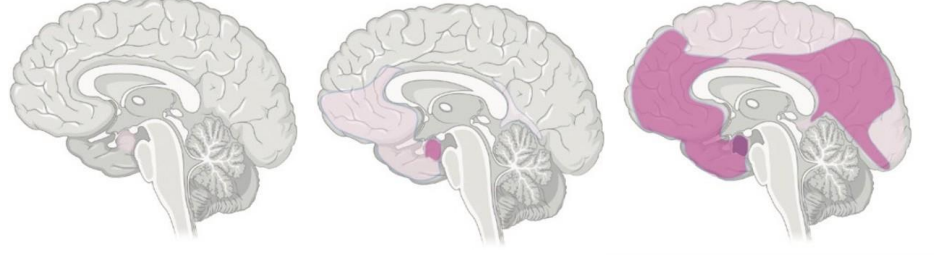
2.1.5.1 Nöropatoloji

AH'nin başlıca nöropatolojik özellikleri A β plaklarının aşırı birikimi, nörofibriler yumakların oluşumu ve nöron kaybıdır (32).

Amiloid



Tau

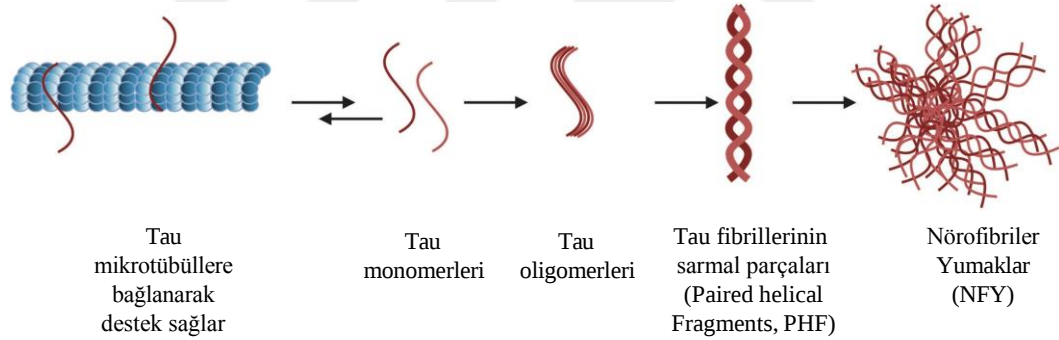


Şekil 1. Alzheimer hastalığı sırasında beyinde amiloid ve tau patolojisinin yayılımı

A β plaklar, degradasyona dirençli A β tabakaları oluşturmak üzere fibrilizasyona uğrayan 36-43 kalıntı uzunluğunda çeşitli amiloid peptitlerden oluşmaktadır (42). Genellikle nöronal kalıntılar, aktive olmuş mikroglialar ve astrositler ile birlikte lokalize olurlar ve ilk olarak neokorteksin frontal, temporal ve oksipital loblarında ortaya çıkarlar. Neokortikal alanların yanı sıra önce hipokampal formasyon ve entorhinal bölgeye, ardından serebral korteksin striatum ve talamus gibi daha geniş alanlarına yayılırlar (Şekil 1). Amiloid patolojisinin, tau patolojisinden önce ortaya

çıktığı ve NFY'lerin yalnızca amiloidin zaten mevcut olduğu bölgelerde bulunduğu saptanmıştır (33).

NFY'ler mikrotübül ilişkili protein tau (*microtubule associated protein tau*, *MAPT*) geni tarafından kodlanan hiperfosforile tau proteinin intranöronal birikimleridir (43). Nöralperikaryal sitoplazmada, aksonlarda ve dendritlerde birikerek hücre iskeleti mikrotübüllerinin ve tübülünle ilişkili proteinlerin kaybına neden olurlar (31). Yaklaşık 20 nm çapındaki tau fibrillerinin sarmal parçalarından (*paired helical fragments*, *PHF*) oluşmaktadırlar (Şekil 2). Aβ plakları gibi hastalık ilerledikçe entorhinal korteks yakınında başlayarak beyin boyunca yayılırlar. NFY'ler önce trans-entorhinal bölgede görülür, ardından limbik sisteme yayılır ve neokortekste görülürler, en son evrede ise patoloji tüm neokortekste gözlemlenir (Şekil 1). AH'ye ek olarak, diğer bazı nörodejeneratif hastalıklar NFY'lerin varlığı nedeniyle tauopatiler olarak sınıflandırılmaktadır (33).



Şekil 2. Nörofibriler yumakların (NFY) oluşumu (33)

Amiloid ve tau birikimlerinin her ikisi de nöronal kayıp ve toksisite ile ilişkilendirilmiş olsa da AH ilerledikçe bilişsel gerileme ile zayıf bir korelasyona sahiptirler. Aksine, sinaptik kayıp, AH'de bilişsel gerilemenin en güçlü göstergelerinden biridir (5). Neokorteks ve limbik sistemdeki sinaptik kayıp, hafıza kaybına yol açmaktadır. Sinaptik kayıp mekanizmaları, aksonal taşımadaki bozuklukları, mitokondriyal hasarı, oksidatif stresi ve sinaptik bölgelerdeki amiloid ve tau birikimine katkıda bulunabilecek çeşitli süreçleri içermektedir. Bu süreçler

sinaptik öncesi terminallerin ve dendritik dikenlerin kaybıyla birlikte aksonal distrofiye yol açmaktadır (31).

2.1.5.2 Hastalığın moleküler genetiği

AH, karmaşık ve multigenik bir hastalıktır. Ailesel AH, A β peptidinin fizyolojik olarak işlenmesine müdahale eden *PSEN1*, *PSEN2* ve *APP*'yi kodlayan genlerle ilişkilendirilmiştir (44).

Ailesel AH'nin ortaya çıkması ile ilişkilendirilen, *PSEN1* geninde 300'den fazla mutasyon (221 patojenik) ve *PSEN2* geninde ise 80 mutasyon (19 patojenik) tanımlanmıştır. *PSEN* genlerinin spektrumu, özellikle *PSEN1*'de olmak üzere *missense* mutasyonları, küçük eklemeleri ve genomik silmeleri içermektedir (44). *PSEN1* mutasyonları, tam penetrans ile AH'nin en şiddetli formlarına neden olmakta ve hastalığın başlangıcı 25 yaş gibi erken bir yaşta ortaya çıkabilmektedir. *PSEN2* genindeki *missense* mutasyonları eksik penetrans gösterebilmekte ve taşıyıcılar *PSEN1* mutasyonu olanlara göre daha ileri bir hastalık başlangıç yaşı göstermektedir (45).

APP geni toplam 17 ekzondan oluşmakta ve ekzon 7 ve 8'in alternatif eklenmesi sonucu oluşan çeşitli izoformları kodlamaktadır. Sadece merkezi sinir sisteminde ifade edilen bu izoformların üçü (izoform 695,751, 770) AH ile ilişkilendirilmiştir. Ekzon 16 ve 17, *APP*'nin proteolitik işleminden sonra oluşturduğu A β fragmanını kodlamaktadır. En yaygın olanı Val717Ile/Londra mutasyonu olan 73 mutasyon (32 patojenik) tanımlanmıştır. *APP* genindeki mutasyonlar, A β 42/A β 40 oranında ve nöronlarda toplam tau ve fosforile tau seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Trizomi 21'li hastaların çoğunda AH'dekine benzer erken patolojik değişiklikler görülmekte, fakat hepsinde hastalık gelişmemektedir. Bu durum, ailesel AH vakalarında da gözlenen *APP*'nin genetik yükündeki artışın, tüm vakalarda hastalığın gelişmesine neden olmadığını ortaya koymaktadır (45).

Sporadik AH ile sıkça ilişkilendirilen ve AH riskini üç ila sekiz kat arttıran başlıca gen, *APOE* genidir (46). Fizyolojik izoform olan ApoE- ϵ 3 (Cis112Arg158), sağlıklı

nüfusun %50-90'ında bulunmaktadır. APOE geninin ana polimorfizmleri, 112 ve 158 pozisyonlarında tek bir amino asitle farklılık gösteren protein izoformlarını ifade eden alellerden oluşmaktadır. Bunlar, ApoE-ε2 izoformu (Cis112Cis158) ve ApoE-ε4 izoformu (Arg112Arg158)'dur ve bu alelin en az bir kopyası AH'li hastaların %40-65'inde tespit edilmiştir (47). Ancak, bu alelin kopyalarına sahip tüm kişilerde hastalık gelişmemekte ve bu sadece bir yatkınlık risk faktörünü temsil etmektedir. *APOE*, yüzeyindeki Aβ reseptörlerine rekabetçi bir şekilde bağlanarak AB'nin alımını ve temizlenmesini engellemekte ve fibriller Aβ birikiminin başlangıcını desteklemektedir. Yapılan çalışmalar, *APOE*'nin tau aracılı nörodejenerasyonu ve AH ile ilişkili patolojilere olan mikrogliyal yanıtları etkilediğini göstermektedir (45,47).

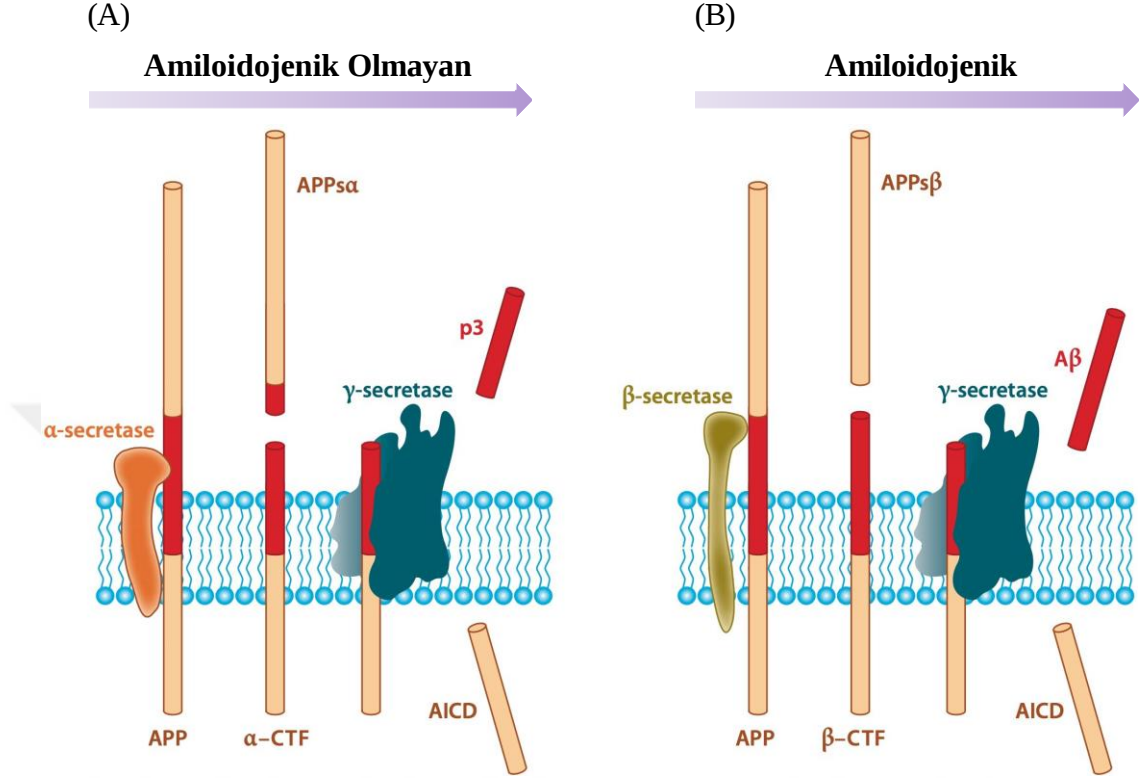
2.1.6 Hipotezler

Alzheimer hastalığı; genetik faktörler, beyin travmaları, artan yaş, vasküler hastalıklar, enfeksiyonlar ve çevresel faktörler (ağır metaller, eser metaller ve diğerleri) gibi çeşitli risk faktörleri ile ilişkilendirilmiş multifaktöriyel bir hastalıktır. AH patogenezi ve hastalığın altında yatan mekanizmalar hala bilinmemekle birlikte, çeşitli hipotezler öne sürülmüştür (31).

2.1.6.1 Amiloid hipotezi

Amiloid hipotezi ilk olarak 1991 yılında John Hardy ve David Allsop tarafından ortaya atılmıştır (48). Senil plak oluşumunu ve hastalığın en önemli özelliği olan Aβ oligomerlerinin birikimini açıklaması nedeniyle en çok kabul gören hipotezdir (49). APP bölünmesinin ana proteolitik parçası olan Aβ'nin, AH patogenezinde ana etken olduğunu vurgulamaktadır. Nöronların somatodendritik ve aksonal kompartmanlarında bulunan APP, büyük ekstraselüler domain ve kısa bir sitoplazmik kuyruğa sahip tek bir transmembran domainle tanımlanan tek geçişli bir tip I membran proteindir (32). APP'nin ekstrasellüler domain içinde bölünmesi iki farklı mekanizma ile gerçekleşebilir: amiloidojenik olmayan ve amiloidojenik yollak (Şekil 3). İlk olarak, α-sekretaz veya β-sekretaz APP'nin ekstrasellüler domainde kesilmesinden sorumludur. Kesilme sonucunda membrana bağlı C-terminal fragmanları oluşur. Daha sonra, her iki yolakta da γ-sekretaz, oluşan membrana bağlı C-terminal fragmanlarının,

transmembran kesilmesinden ve APP intrasellüler domain (AICD) olarak adlandırılan sitozolik polipeptitlerin üretilmesinden sorumludur (32,50).



Şekil 3. APP'nin ekstrasellüler domain içinde bölünmesi

Amiloidojenik olmayan yolda, APP'nin işlenmesi α -sekretaz enziminin ardından γ -sekretaz ile kesilme işlemini içerir. APP'nin α -sekretaz ile kesilmesi çözünür olan APP α 'yı ve C-terminal fragmanı α 'yı (CTF- α) üretir. Ardından, CTF- α 'nın γ -sekretaz tarafından kesilmesi, patolojik etkilere sahip olmayan bir peptit olarak sınıflandırılan, amiloidojenik olmayan ve p3 adı verilen bir APP fragmanının oluşmasıyla sonuçlanır (Şekil 3A). Amiloidojenik yolak ise, BACE-1 (β -sekretaz) ve ardından γ -sekretaz kesilmesini içerir. APP'nin β -sekretaz tarafından kesilmesi çözünür olan APP β 'yı ve C-terminal fragmanı β 'yı (CTF- β) üretir. Ardından, CTF- β 'nın γ -sekretaz tarafından kesilmesi A β peptitlerinin üretilmesine neden olur (Şekil 3B). A β peptitleri, kendi kendilerini oligomerize etme yetenekleri nedeniyle nörotoksisiteye neden olurlar. Oligomerize olmaya yatkın A β monomerleri, protofibriller ve fibriller oluşturarak agregat haline gelirler. Bu agregatların toksisiteleri oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, membran geçirgenliğinde

değişiklikler, inflamasyon, sinaptik disfonksiyon ve ekzitotoksisteyi indükleyebilme yetenekleri ile açıklanmaktadır. Ayrıca, A β peptitleri kanallara, membran proteinlerine ve reseptörlere de müdahale ederek hücre sinyalizasyonunu bozabilmektedir (32,50).

2.1.6.2 Tau ilişkili hipotez

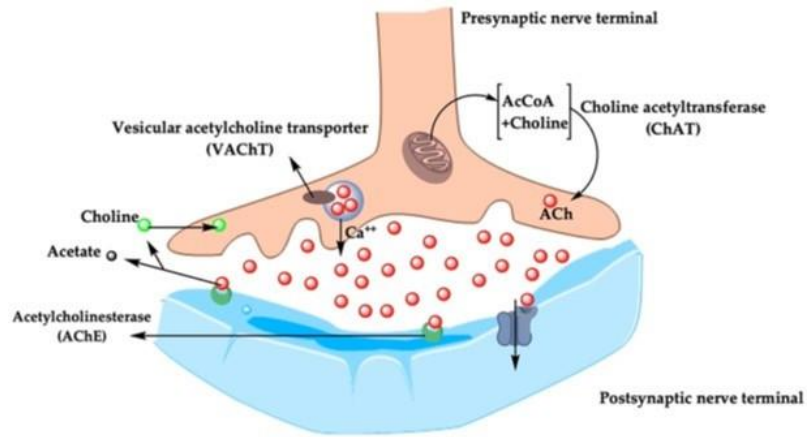
Nöronların içinde bulunan tau proteini agregatlarını içeren nörofibriler yumakların oluşumu, AH'nin ikinci en yaygın histopatolojik özelliğini temsil etmektedir. Fosfoprotein tau, mikrotübülle ilişkili proteinler ailesine aittir ve ağırlıklı olarak aksonlarda ve daha az oranda somatodendritik bölmelerde ve glial hücrelerde bulunmaktadır (32,51). Tau proteini, mikrotübüllerin stabilizasyonundan ve bir araya getirilmesinden sorumludur ve aksonal taşınmayı ve dendrit yapısını destekler. Biyolojik aktivitesi, birden fazla bölgede fosforilasyon da dahil olmak üzere, post-translasyonel modifikasyonlar tarafından düzenlenmektedir. Anormal tau fosforilasyonu, proteinin mikrotübüllere olan affinitesini azaltır ve proteini agregat oluşumuna daha yatkın hale getirir. Bu nedenle, tau hiperfosforilasyonu, proteinin doğal işlevinin kaybına yol açarak, mikrotübüllerin bir araya getirilmesinde, aksonal trafikte ve dendritik yapıda bozulmalara, sinaps kaybına, nöronal ölüme ve sonunda demansa neden olmaktadır. A β agregatlarında gözlemlendiği gibi bu prefibriller agregatlar da tau aracılı nörotoksiteden sorumludur. Fosforile tau, daha sonra sarmal ve düz filamentler halinde olgunlaşan oligomerleri oluşturmak üzere bir araya toplanır (Şekil 2) (51).

Tau aracılı toksisite ile ilişkilendirilen birçok faktör bulunmasına rağmen, bu proteinin anormal hiperfosforilasyonu ile en çok ilişkilendirilen iki ana neden bulunmaktadır. Birincisi, AH'den etkilenen beyinde tau'yu defosforilasyondan daha çok fosforilasyon için daha uygun bir substrat haline getiren konformasyonel değişiklik(ler)dir. İkincisi ise, normal fosforilasyon durumunun düzenlenmesinden sorumlu olan protein kinazlar ile protein fosfataz 1 ve 2A (PP1 ve PP2A) aktiviteleri arasındaki dengesizliktir. PP1 ve PP2A tarafından katalize edilen defosforilasyon, anormal tau proteininin normal durumuna geri döndürülmesinden sorumludur (51,52). Tau proteini, AH'de glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3), siklin bağımlı protein kinaz-5 (cdk5), protein kinaz A (PKA) ve kalsiyum ve kalmodulin bağımlı protein kinaz-II

(CaMKII) gibi birkaç farklı kinaz tarafından 30'dan fazla serin/treonin kalıntısında fosforile edilmektedir (32,52).

2.1.6.3 Kolinerjik hipotez

Kolinerjik hipotez, bugün piyasada bulunan ilaçların çoğunun temelini oluşturan bilinen en eski hipotezdir (49). 1970'lerde, neokortikal ve presinaptik kolinerjik bozuklukların asetilkolin (ACh) sentezinden sorumlu olan kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bazal ön beyindeki kolinerjik nöronlar, AH'den en erken etkilenenlerdir ve kalan nöronlarda ChAT transkripsiyonu ve aktivitesinde azalma görülmektedir (49). ACh'nin bilişsel işlevdeki temel rolü nedeniyle, AH'nin kolinerjik hipotezi önerilmiştir. ACh, kolinerjik nöronların sitoplazmasında, ChAT enzimi tarafından kolin ve asetil-koenzim A'dan sentezlenir ve veziküler asetilkolin taşıyıcı (VACHT) tarafından sinaptik veziküllere taşınır (Şekil 4). ACh beyinde hafıza, dikkat, duyuşsal bilgi, öğrenme ve diğer önemli işlevler gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynar. AH'de kolinerjik nöronların dejenerasyonunun gerçekleştiği ve bilişsel fonksiyon ve hafıza kaybına neden olduğu bulunmuştur. Aβ'nın kolinerjik nörotransmisyonu etkilediği, kolin alımında azalma ve ACh salınımına neden olduğu düşünülmektedir. Araştırmalar, kolinerjik sinaptik kaybın ve amiloid fibril oluşmasının, Aβ oligomerlerinin nörotoksitesi ve ACh yıkımında görevli asetilkolinesteraz ile Aβ peptidi arasındaki etkileşimlerle bağlantılı olduğunu göstermektedir (31).



Şekil 4. Asetilkolinin (ACh) presinaptik ve postsinaptik sinir uçları arasındaki sentez ve taşıma yolu (31)

2.1.7 Tedavi

Günümüzde, AH için bir tedavi olmasa da hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilen ve hastaların yaşam kalitesini artırabilen çeşitli tedavi seçenekleri bulunmaktadır (53). Farmakolojik olarak, AH belirtilerini yavaşlatan iki ilaç sınıfı bulunmaktadır. Bunlar, asetilkolinin enzimatik parçalanmasını engelleyen asetilkolinesteraz inhibitörleri ve hücre ölümünü önlemek için glutamatın NMDA reseptörlerine bağlanmasını engelleyen N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleridir.

Donepezil, Galantamine ve Rivastigmine FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) tarafından kullanımı onaylanmış asetilkolinesteraz inhibitörleridir. Bu ilaçların geliştirilmesi hafıza kaybı, öğrenme, dikkat ve diğer bilişsel işlevlerin bozulmasında önemli rol oynadığı öne sürülen kolinerjik hipotezine dayanmaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörlerin sinapslarda asetilkolinin kullanılabilirliğini artırdığı ve AH ile ilişkili belirtileri geciktirmede klinik olarak yararlı olduğu kanıtlanmıştır (54).

Glutamatın neden olduğu NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, uyarıcı sinyal iletimini artırarak, eksitotoksiteye ve nöral bozulmaya neden olmaktadır. Bu durum, sinyalizasyon bozukluklarına ve nöronların kademeli olarak dejenerasyonuna yol açmaktadır. Bu nedenle, NMDA reseptör antagonisti olan FDA onaylı Memantine, nörotransmisyon sırasında fizyolojik sinyallerin normal iletimini eski haline getirmek amacıyla, fazla glutamatın sonuçlarını önlemek için geliştirilmiştir (55).

Ancak, bu ilaçlar hastalığı tedavi edememekte veya önleyememektedir. Bu nedenle, AH'nin patofizyolojik gelişimini önleme veya yavaşlatma işlevi görebilecek, hastalığın seyrini değiştirici tedavilerin keşfine artan bir ilgi bulunmaktadır. Bunların çoğu, A β 'yi hedef alan monoklonal antikorlardır. Lecanemab, erken AH tedavisi ve Aducanumab ise AH tedavisi için FDA onayı almıştır. Klinik çalışmalarda, bu iki tedavi de AH hastalarında bilişsel bozulma hızında orta düzeyde azalmalara neden olmuştur (53).

2.2 Alzheimer Hastalığı Fare Modelleri

Deneysel fare modelleri, AH'nin altta yatan mekanizmasını ve patofizyolojisini çözmeye kullanılan çok değerli araçlardır. AH araştırmalarında kullanılan deneysel modellerin büyük çoğunluğu, EOAD ile ilişkilendirilen insan genlerini aşırı ifade eden transgenik farelerdir (34,35). Mevcut fare modelleri hastalığın yalnızca belirli yönlerini (A β plakları veya NFY'ler) yansıtmaktadır ve AH'nin tüm özellikleri aynı modelde bir arada bulunamamaktadır (7). Bu nedenle, hiçbir ideal fare modeli insan AH semptomatolojisini doğru bir şekilde temsil etmemekte ve tam olarak yansıtmamaktadır. 5 mutasyonlu AH transgenik fare modeli (5xFAD), erken dönemden itibaren AH patolojisini göstermesinden dolayı çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (56). Bu transgenik fareler, İsveç (K670N, M671L), Florida (I716V), ve Londra (V717I) mutasyonlu insan APP genlerine ek olarak M146L ve L286V insan PSEN1 mutasyonlarını taşımaktadır. Literatürde yaygın olarak kullanılan (tüm AH çalışmalarının ~%10'u) erken başlangıçlı bir AH fare modeli olan 5xFAD, A β plaklar, nöroinflamasyon, gliozis, sinaptik dejenerasyon ve nöron kaybı gibi insan AH'sinin çok sayıda özelliğini taşımaktadır. 5xFAD fare modeli herhangi bir tau patolojisi sergilemese de taşıdığı diğer özellikler ve bölgeye özgü nörodejenerasyon sergilemesi, onu AH araştırmaları için uygun bir fare modeli haline getirmektedir (8,10).

2.3 Kütle Spektrometresi (MS)

Kütle spektrometresi (MS), bir örneğin moleküler bileşimini analiz etmek için fizik, kimya ve biyolojiyi birleştiren disiplinler arası bir tekniktir. Bu teknik, hücre düzeyinden başlayarak biyolojik süreçleri ve bütün biyolojik sistemleri inceleme imkanı sunmaktadır. Kütle spektrometresi, analitleri iyonlaştıran iyon kaynağı, analitleri molekül ağırlıklarına göre ayıran kütle analizörleri ve farklı analitlerin varlığını kaydeden dedektör olmak üzere 3 temel bileşenden oluşmaktadır (16,57). MS'nin hem kalitatif hem de kantitatif analizlerde kullanılabilirliği, çok çeşitli uygulama alanlarını kapsamaktadır. Bu uygulamalar arasında bilinmeyen bileşiklerin tanımlama, bir moleküldeki elementlerin izotopik kompozisyonunu veya yapısını belirleme, bir örnekteki bileşiğin miktarını ölçme ve gaz fazı iyon kimyasının temellerini inceleme yer almaktadır. MS, fiziksel, kimyasal veya biyolojik birçok

bileşimin özelliklerini inceleyen analitik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (58).

İyon kaynağı, kütle spektrometresinin analiz edilen materyali (analit) iyonlaştıran bölümüdür. İyonlaştırma yöntemleri arasında atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI), kimyasal iyonizasyon (*chemical ionization*, CI), elektron iyonizasyonu (*electron ionization*, EI), elektrosprey iyonizasyonu (*electrospray ionization*, ESI), hızlı atom/ion bombardmanı (*fast atom/ion bombardment*, FAB), alan desorpsiyonu/alan iyonizasyonu (*field desorption/field ionization*, FD/FI), MALDI, termospray iyonizasyonu (*thermospray ionization*, TSP) bulunmaktadır. Çoğu iyonlaştırma yöntemi ile analiz edilen örneğin proton bağlılığına bağlı olarak hem pozitif hem de negatif yüklü iyonlar oluşturulabilmektedir (58). ESI ve MALDI, günümüzde biyomoleküler kütle spektrometresi için en yaygın kullanılan iyonizasyon kaynaklarıdır. Bu teknikler, geniş kütle aralığı ve yüksek duyarlılık sunarak biyolojik moleküllerin analizinde önemli bir rol oynamaktadır.

Kütle analizörünün görevi, iyonları kütle-yük oranlarına (m/z) göre ayırmaktır (59). Kütle spektrometre analizlerinde kullanılan birkaç farklı türde kütle analizörü bulunmaktadır. Bu analizörler arasında yaygın olarak kullanılan kuadrupol (*quadrupole*), kuadrupol iyon tuzağı (*quadrupole ion trap*, QIT), lineer iyon tuzağı (*linear ion trap*, LIT) uçuş süresi (*time-of-flight*, TOF) ve orbitrap bulunmaktadır (60).

Kütle analizörleri, tandem kütle spektrometresi (MS/MS) gerçekleştirmek için bir araya getirilebilmektedir. Bu, genellikle iki kütle analizinin seri olarak gerçekleştiği görece basit bir kavramdır. MS/MS için yaygın bir yaklaşım, üçlü kuadrupol analizör veya bir TOF/TOF analizörü gibi iki veya daha fazla aynı kütle analizörünü seri olarak birleştirilmesidir. Alternatif olarak, MS/MS için hibrit cihazlar oluşturmak üzere iki veya daha fazla türde kütle analizörü de bir araya getirilebilmektedir. Örnek olarak, bir kuadrupol ve TOF'un bir araya getirilmesiyle Q-TOF cihazı oluşturulabilir. Bu eşleşmelerle kütle spektrometresi analizi, ilk kütle analizinin veya filtrelemenin uygulanması, seçilen iyonların parçalanmanın meydana geldiği çarpışma hücreesine geçirilmesi ve ardından ikinci kütle analizinin yapılmasıyla gerçekleştirilmektedir.

MS/MS, yapısal karakterizasyon veya tanımlamanın yanı sıra hedefli kantitatif analizler için de kullanılmaktadır (60).

2.3.1 LC-MS/MS

Sıvı kromatografi (*liquid chromatography*, LC), analitlerin sabit bir faz (kromatografi kolonu) ile sıvı fazlar arasındaki etkileşime dayanarak ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu etkileşimler, polarite, iyonik etkileşimler ve boyut dışlama (*size exclusion*) gibi farklı mekanizmalara dayanmaktadır (60). Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS), sıvı kromatografisinin (veya HPLC) fiziksel ayırma özelliklerini kütle spektrometresinin (MS) kütle analizi özellikleriyle birleştiren bir analitik kimya tekniğidir. LC-MS/MS, biyokimya, farmakoloji, gıda ve içecek endüstrisi, çevre bilimleri, klinik araştırmalar ve biyoteknoloji dahil olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır (61).

LC-MS tabanlı proteomikte, karmaşık protein karışımları önce enzimatik olarak parçalanır ve ardından ortaya çıkan peptitler MS kullanılarak analiz edilir. Bu yaklaşım, karmaşık protein karışımlarının analizinde yaygın olarak kullanılan bottom-up proteomiks analizidir. Bu yöntem, örnekten proteinlerin ekstraksiyonu, fraksiyonlama, proteinlerin peptitlere enzimatik parçalanması, parçalanma sonrası ayırma işlemleri ile daha homojen peptit karışımı elde edilmesi ve MS analizi olmak üzere 5 farklı aşama içermektedir (62). Literatürde, AH fare modelleri ve Alzheimer hasta dokuları ve biyolojik örneklerini içeren birçok LC-MS/MS tabanlı proteomik ve metabolomik çalışma bulunmaktadır (63–65).

2.3.2 Kütle spektrometresi görüntüleme (MSI)

Kütle spektrometresi görüntüleme tekniği (MSI), biyolojik doku kesitlerinde proteinler, peptitler, lipitler, ilaçlar ve metabolitler gibi biyomoleküllerin mekansal dağılımını görselleştirmek ve incelemek için geliştirilen nispeten yeni bir teknik olarak geliştirilmiştir (18,66–69).

Yüzlerce biyomolekülün etiketsiz (*label-free*) ve multipleks görüntülenmesine olanak sağlayan MSI analizlerinde moleküler kütle kullanılmaktadır. Bu teknikte, örnekte bulunan bileşiklerin miktarları, tespit edilen sinyalin yoğunluğuyla ilişkilendirilmektedir. Her kütle spektrumu, belirli bir x ve y koordinat çiftindeki yerel moleküler kompozisyonu yansıtır. Dokudan yerel olarak alınan tüm kütle spektrumları, dijital bir fotoğraftaki piksellere benzer şekilde bir görüntü veri seti oluşturur. Görüntüler, belirli bir m/z değerinin tüm toplanan spektrumlardan çıkarılan yoğunluk dağılımına göre doku kesiti içindeki bileşiğin dağılımını göstermektedir. O iyonun her pikseldeki göreceli bolluğu, iki boyutlu (2D) harita içinde bir renk yoğunluk ölçeği ile görselleştirilebilmekte ve elde edilen görüntüler, mekansal olarak edinilen MS veri dosyalarından karşılık gelen m/z aralıkları için veri çıkarılarak oluşturulmaktadır.

MSI çalışmaları, yüzlerce biyomolekülün etiketsiz (*label-free*) ve multipleks görüntülenmesine olanak sağlamasından dolayı nörobilim çalışmaları ve nörodejeneratif hastalıkların araştırması için çeşitli avantajlara sahiptir (17,70). MSI tekniği kullanılarak biyomoleküller, doku kesiti üzerinde homojenizasyon işlemi olmaksızın doğrudan mekansal olarak görselleştirilebilmekte ve incelenebilmektedir. Bu nedenle, homojenizasyon sırasında kaybolacak olan bölgesel değişiklikler ve dokunun kimyasal ve mekansal bütünlüğü, bu yöntem kullanılarak korunmaktadır. MALDI görüntüleme kütle spektrometresi (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging, MALDI-MSI*) ve DESI görüntüleme kütle spektrometresi (*Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging, DESI-MSI*) yaygın olarak kullanılan kütle spektrometresi görüntüleme yöntemleridir.

MALDI-MSI, hassasiyeti, hızı, geniş moleküler kütle aralığı ve çözünürlüğü nedeniyle farklı biyomedikal alanlarda geniş uygulamalara sahip en yaygın kullanılan MSI tekniğidir (71,72). Biyolojik doku örneklerinin görüntülenmesi, genellikle 8-16 µm kalınlığında ince doku kesitleriyle gerçekleştirilir (16). Analiz edilecek örnek ve analitlere göre farklı örnek hazırlıkları gerçekleştirilir. MALDI-MSI'da, lazer önceden matriksle kaplanmış doku yüzeyine atışılır. Enerji, matriks molekülleri tarafından emilir, bu moleküller, çalışılan biyomoleküllerle birlikte iyonlaşır ve bir kütle

analizörü kullanılarak ölçülür (68). Her kütle pikinin yoğunluk dağılımı görüntüleme verisi olarak elde edilir. MALDI-MSI deneyleri beş adımda özetlenebilir: (1) örnek hazırlığı/matriks kaplama, (2) lazer iyonizasyonu, (3) kütle analizi, (4) görüntü ve (5) veri analizi (73). Yüksek kaliteli görüntüler oluşturmak için, her adım, çalışılan dokuya bağlı olarak çeşitli optimizasyon adımlarını gerektirir. MALDI-MSI kullanılarak proteinlerin analizi, örnek karmaşıklığı ve elde edilen sinyallerin tanımlanamaması nedeniyle zorlu olabilmektedir. Peptitlerin moleküler ağırlığının daha düşük olması nedeniyle, peptitlerin tespiti ve tanımlanması proteinlere göre daha kolaydır. Bu nedenle, proteinler genellikle tripsin enzimi kullanılarak parçalanır ve oluşan peptitlerinin dağılımı MALDI-MSI tekniği kullanılarak görüntülenir. Bu yaklaşımı kullanarak, bir doku kesiti MALDI-MSI ile analiz edilir ve ardışık olarak doku üzerinde sindirilmiş kesit veya ardışık doku lizati, protein tanımlaması için LC-MS/MS ile analiz edilir.

MALDI-MSI yöntemi 2000'li yılların başından beri kullanılırken DESI-MSI nispeten daha yeni kullanılmaya başlanan bir tekniktir (12). MALDI-MSI analizlerinde, çalışılan örneğin üzerinin uygun matriks ile kaplanması gerekmektedir. Doku kesiti üzerine uygulanan matriks eşit düzeyde dağılmazsa, görüntü artefaktlarına neden olmaktadır (74,75). Ayrıca, MSI analizleri sonucunda elde edilen spektrumda görülen yoğun matriks pikleri araştırılmak istenen pikleri baskılayabilmektedir. MALDI-MSI analizleri, doku kesitinin yüksek vakum altında olmasını gerektirir ve doku üzerine lazer uygulanması ile doku zarar gördüğünden, aynı doku başka analizler için efektif olarak tekrardan kullanılamamaktadır. Buna karşılık, DESI-MSI analizleri atmosferik basınç altında gerçekleştirilir ve çalışılan doku zarar görmediği için yeniden analiz edilebilir (12,16). DESI-MSI analizleri, matriks uygulaması gerektirmemesi sayesinde örnek hazırlığı aşamasının daha kolay olması ve metabolit piklerini baskılayabilecek matriks piklerinin bulunmamasından dolayı metabolomik çalışmalarda daha avantajlı kabul edilmektedir.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri, malzemeler ve kimyasallar Tablo 1 ve Tablo 2’de listelenmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihaz, alet ve laboratuvar malzemelerinin listesi

Kullanılan Cihaz, Alet, Malzeme	Marka, Model
0,5, 1,5 ve 5 mL Hacimli Kapaklı Tüpler	Eppendorf
5, 10 ve 25 mL hacimli Steril Serolojik Pipetler	Isolab
Azot Tankı	Thermo 30, Thermo Scientific
ChemiDoc MP System	Bio-RAD
Cryostat	Thermo Scientific ve Leica Biosystems
Çalkalayıcı Isı Bloğu	Witeg Wisd Laboratory Instruments
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Çeşitli Hacimlerde Pipet Uçları (0,1-1000 µL)	Eppendorf
Derin dondurucu (-80C)	Haier Biomedical
Derin Donduruculu Buzdolabı (+4C ve - 20C)	Kirsch Medical
Etüv (37°C - Proteomiks)	Hera Term Oven, Thermo Scientific
DESI Kütle Spektrometresi	Waters
ITO Kaplı Lam	Bruker
Jel Görüntüleme Cihazı	Chemidoc Imaging System, Bio-RAD
Lo-bind tüp	Eppendorf
LoBind Microcentrifuge Tube (1,5 mL)	Eppendorf
MALDI TOF/TOF Kütle Spektrometresi	RapifleX MALDI Tissue typer, Bruker
Mikroskop	Axio Vert. A1, Carl Zeiss
Mini-PROTEON Tetra Cell nanoACQUITY UPLC BEH C18 Column	Waters
nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column	Waters
nLC-MS/MS Kütle Spektrometresi	nanoACQUITY UPLC M Class ile bağlı SYNAPT Xevo G2-XS, Waters
PCR Cihazı	CFX Connect Real-Time PCR Bio-RAD
PCR tüp (0,2 ve 0,5 µL)	Isolab
pH Metre	Thermo Scientific
Poly-L-lizin Kaplı Lam	Thermo Scientific
Thermo-çalkalayıcı	Biosan
Trypsin ve Matriks Uygulama İstasyonu	SunCollect, SunChrom GmbH
Ultrasonik işleyici	VialTweeter, HielScher

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Marka/Kodu
Agaroz	Sigma, 9539
APS	Sigma, A3678
Asetonitril (LC-MS saflığında)	Merck,100030
BSA	Bruker, 8217498
Clarity Western ECL Blotting Substrate	Bio-RAD, 170-5060
Formik Asit	Fluka, 94318
Glu1-Fibrinopeptide B Standart	Waters, 700004729
KCl	Sigma, P9333
Laemmli Örnek Tampon Çözeltisi	Bio-RAD, 1610737
Leucine-Enkephalin	Waters, 186006013
NaCl	Sigma, S7653
Neurobasal Medium	Stemcell Technologies, 05700
NeuroCult Enzymatic Dissociation Kit	Stemcell Technologies, 05715
Paraformaldehit (PFA)	Sigma, 158127
PCR Primerleri	Sentromer DNA Teknolojileri
Peptit Standardı	Bruker, 8222570
Potasyum Fosfat, Monobazik	Merck, 529568
Proteaz inhibitör Kokteyli	Thermo Scientific, 78440
Renkli Protein Markerı	Bio-RAD, 1610374
Renksiz Protein Markerı	Bio-RAD, 1610363
SafeView DNA boyası	ABM, JK7947
SDS	Sigma, L3771
Su (LC-MS saflığında LiChrosolve)	Merck, 115333
Taq PCR kit	Biolabs, E5000S
TEMED	Sigma, T9281
TGX Stain-Free Fastcast %12 Akrilamit Jel Kiti	Bio-RAD, 161-085
Trans-Blot Turbo RTA Mini PVDF Transfer Kit	Bio-RAD 161-0175
Trypsin	Thermo Scientific, 90057
Trypsin Gold	Promega, V5280
Tris/HCl	Sigma, T5941
Trypan Blue	Stemcell Technologies, 07050
Tween20	Sigma, P1339
UPX Universal Protein Extraction Kit	Expedeon
Üre	Merck, 818710
Yükleme Boyası	Biolabs, 95502

3.2 Yöntem

3.2.1 Deney hayvanları

Bu tez çalışması, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ACU-HADYEK) tarafından 20.09.2018 tarihli ve HDK-2018/49 sayılı etik kurul izni (Ek 1) kapsamında yürütülmüş ve hayvan kullanım ve bakım yönergelerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1 Deney hayvanlarının bakımı

Deney hayvanları, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (ACU-DEHAM) tarafından Jackson Laboratuvarı'ndan (Bar Harbor, Maine, USA) temin edilmiştir. AH fare modeli olan 5xFAD transgenik fareleri ve hem cins hem de yaş uyumlu kontrol farelerinin üretimleri ve bakımları bulundukları ortamdan izole olacak şekilde ayrı ayrı havalandırılan IVC (*Individually Ventilated Cages*) kafeslerde ve kontrollü ortamda (12:12 aydınlık/karanlık döngüsü ve sabit sıcaklık: $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.2 Deney hayvanlarının üretimi

Çalışmada kullanılan yenidoğan farelerin üretilmesi amacıyla 5xFAD (B6SJL-Tg (APPSwFlLon, PSEN1*M146L*L286V)6799Vas/J)) transgenik fareler ile hibrid B6SJL fareler (B6SJLF1/J) çiftleştirilmiştir. Her bir 5xFAD erkek fare, 3-4 adet dişi B6SJL fare ile; dişi 5xFAD fareler de erkek B6SJL fareler ile üreme kafesine bırakılmıştır.

3.2.2 Genotipleme

Hem heterozigot transgenik (5xFAD) hem de transgenik olmayan (ALM-Littermate) yavruların tek batında bulunması nedeniyle, yeni doğan yavrulardan kuyruk doku örneği alınarak genotipleme analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için, genotipleme analizlerinde de yaygın olarak kullanılan “kirli” DNA izolasyonu yöntemi kullanıldı. Bunun için, tüplere alınan ve işaretlenen doku örnekleri üzerine 75 µl 25 mM NaOH/0,2 mM EDTA eklendi ve PZR cihazı içerisinde 1 saat boyunca 98°C’de inkübe edildikten sonra 15°C’ye soğutuldu. İnkübasyon sonrası, nötralizasyon amacıyla tüplere 75 µl 40 mM Tris/HCl (pH 5,5) eklendi. 4000 rpm’de 3 dk santrifüj edilen örneklerin süpernatantından 4 µl alınarak, PZR analizinde template DNA olarak kullanıldı.

3.2.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

İzole edilen total DNA’larda hedef genlerin amplifikasyonu için standart PZR yöntemi kullanıldı. Kontrol gruplarından farklı olarak 5xFAD fareler, ailevi AH’ye neden olduğu bilinen APP (*Amyloid Precursor Protein*) geni üzerinde 3 adet ve PS1 (Presenilin) geni üzerinde 2 adet mutasyon taşımaktadır. PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere, kontrol ve 5xFAD farelerde amplifiye olması beklenen internal pozitif kontrol ve yukarıda belirtilen mutasyonları taşıyan genlerin amplifikasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan primerler Tablo 3’te gösterildiği gibi sentezletirildi (Sentromer DNA Teknolojileri Ltd. Şti., İstanbul).

Tablo 3. Genotipleme analizinde kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Baz Dizisi (5' -> 3')	Baz Sayısı	Tm (°C)	Beklenen Baz Sayısı
Kontrol_Forward	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	24	59,3	324
Kontrol_Reverse	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	25	61,3	324
APP_Forward	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG	20	61,4	377
APP_Reverse	CGG GGG TCT AGT TCT GCA T	19	58,8	377
PS1_Forward	AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA	20	57,3	608
PS1_Reverse	GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT	20	57,3	608

Liyofilize halde gelen primerler, önerilen miktarda ddH₂O ile çözülerek 100 µM stok solüsyonlar elde edildi ve PZR reaksiyonu öncesinde 20 µM solüsyonlar elde edecek şekilde dilue edildi. PZR reaksiyon karışımı, Taq PCR kiti kullanılarak (NEB, E5000S) Tablo 4’te belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 4. PZR reaksiyonu bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Test Grubu (1 örnek için)	Final Konsantrasyon
ddH ₂ O	9,2 µl	25 µl
10X Reaction Buffer	2,4 µl	1X
10 mM dNTP	0,5 µl	200 µM
Kontrol-Forward	1,2 µl	1 µM
Kontrol-Reverse	1,2 µl	1 µM
APP-Forward	1,6 µl	1.3 µM
APP-Reverse	1,6 µl	1.3 µM
PS1-Forward	1,6 µl	1.3 µM
PS1-Reverse	1,6 µl	1.3 µM
Taq DNA polimeraz	0.125 µl	0,125 U
Template DNA	4 µl	-
Toplam	25 µl	-

Tablo 4’te belirtilen oranlarda birleştirilerek hazırlanan örneklerin PZR reaksiyonu aşamaları Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. PZR reaksiyon aşamaları

Derece (°C)	Süre (dk)	Döngü
94	3:00	1
94	00:30	
57,3	1:00	35
72	1:00	
72	2:00	1
10	∞	-

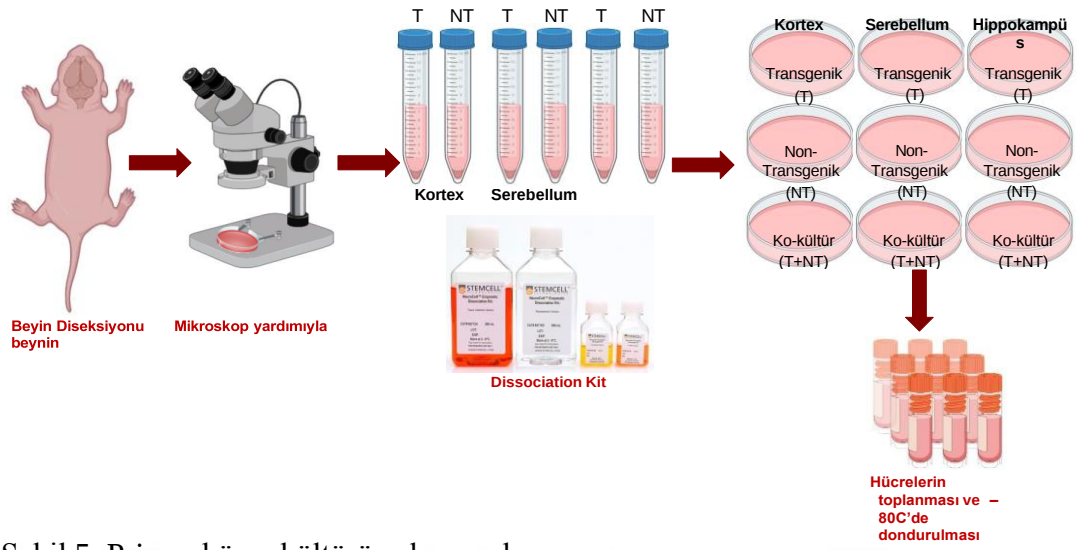
3.2.2.3 Agaroz jel elektroforezi

PZR sonuçlarının görüntülenmesi, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla kullanılacak olan her bir jel için, 3 gr agaroz, 100 ml TAE tampon çözeltisi içerisinde (%3'lük jel), mikrodalga fırında 5 dk kaynatıldı. Jel polimerize olmadan önce içerisine nükleik asitleri UV ışık altında görünür hale getiren DNA boyasından (Safeview, ABM) 5 µl eklendi. Boya jel içerisine homojen olarak dağıtıldıktan sonra jel yürütme kasetine dökülerek, oda sıcaklığında polimerize olması beklenildi. PZR ürünleri, yükleme boyası ile (6X Gel Loading Dye, NEB B7021-S) ile 1:5 oranında karıştırılarak jele yüklenmeye hazır hale getirildi. Polimerize olan jele, DNA standardı (Quickload 2-log DNA Ladder, NEB N0496), pozitif ve negatif kontrol örnekleri ve test edilecek örneklerden 10 µl yüklendi. 80V'da 45 dk yürütüldü ve ChemiDoc Görüntüleme Sistemi (BioRad) kullanılarak görüntülenmesi yapıldı.

3.2.3 Primer Hücre Kültürü Çalışması

Nörodejenerasyonun başlangıç mekanizmalarını erken dönemde incelemek ve ayrıca sağlıklı ile hasta kökenli hücrelerin birbirlerini etkileyip etkilemediğini (*Bystander effect*) görmek için 5xFAD ve kontrol yenidoğan fare beyni korteks, hipokampus ve serebellum bölgelerine ait primer hücre kültürü ve ko-kültür çalışmaları yapıldı.

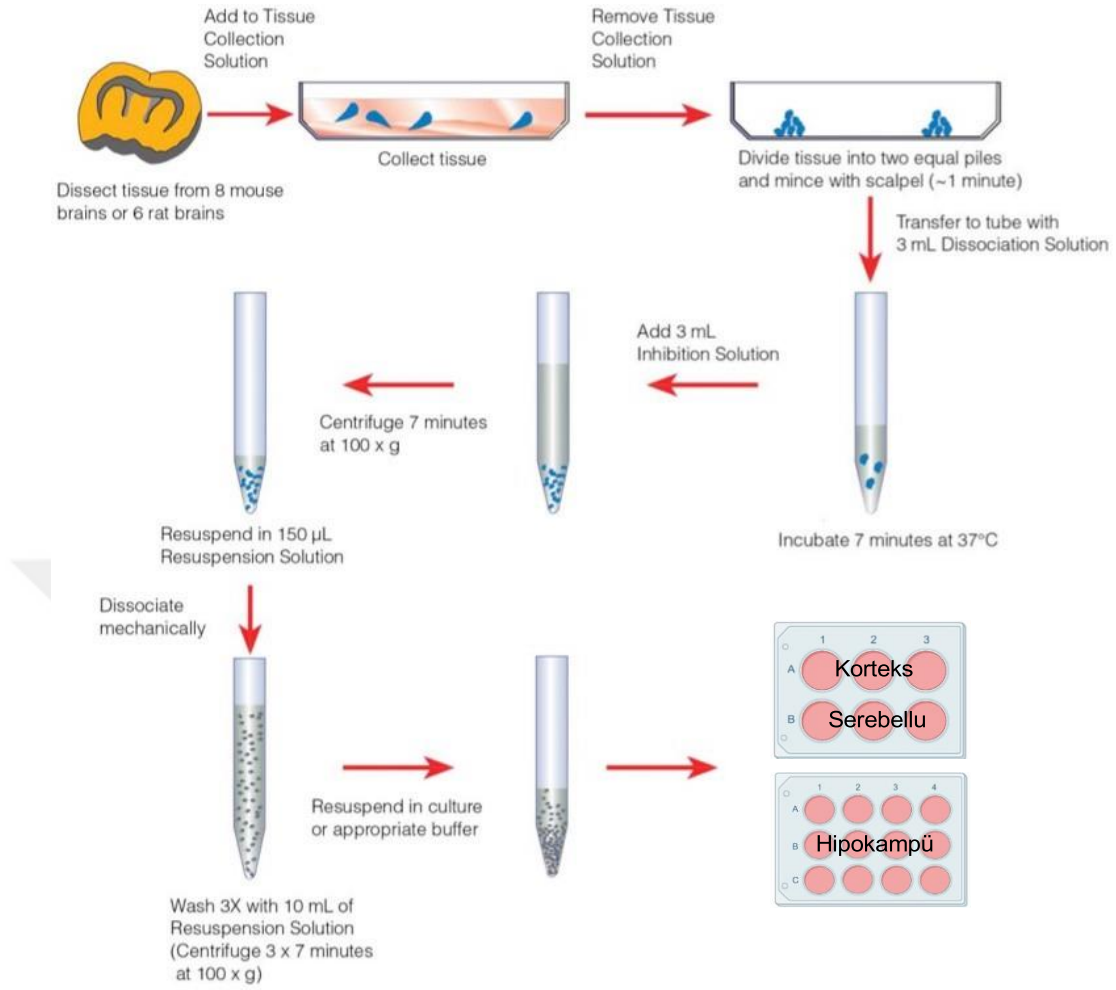
Primer hücre kültüründe örnek hazırlığından hücrelerin toplanmasına kadar olan süreç Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. Primer hücre kültürü çalışma planı

3.2.3.1 Primer hücre kültürü

Üretilen yenidoğan fareler (0-24 saat) genotipleme analizi yapıldıktan sonra hipotermi yöntemi ile anestezi altına alınıp sakrifiye edilerek beyinler mikroskop altında korteks, hipokampus ve serebellum bölgelerine ayrıldı. Korteks, hipokampus ve serebellum bölgelerine ait primer hücre kültürü için *NeuroCult Enzymatic Dissociation Kit* (Stemcell Technologies, 05715) kullanıldı. Kullanılan kit protokolü Şekil 6'da özetlenmiştir.



Şekil 6. NeuroCult Enzymatic Dissociation Kit Protokolü

Disekte edilen beyin bölgeleri buz üzerinde *Tissue Collection Solution* içeren petrilere aktarıldı. Ardından, *Tissue Collection Solution* pipet yardımıyla petriden alındı ve doku steril bir neşter yardımıyla 1 dk boyunca hızlı bir şekilde dikine ve boyuna kesikler atılarak olabildiğince küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılmış olan doku üzerine, dokunun boyutuna uygun olarak (300-500 µl) *Dissociation Solution* eklendi. Doku parçaları resüspanse edildi ve 15 ml'lik falkon tüpe pipet yardımıyla hava kabarcıkları olmayacak şekilde aktarıldı. Petride kalan doku parçaları üzerine tekrardan aynı miktarda *Dissociation Solution* eklendi ve falkona aynı şekilde hava kabarcıkları olmayacak şekilde aktarıldı. Dokular 37°C'lik su banyosunda (minimum 7 dk) parçalar dibe çökene kadar inkübe edildi. Ardından su banyosundan alındı, üzerlerine eklenen toplam *Dissociation Solution* miktarı kadar (600-1000 µl)

Inhibition Solution eklendi ve hava kabarcığı oluşturmada yavaşça pipetaj yaparak karıştırıldı. 100 g'de 7 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve elde edilen pellet 150 µl *Resuspension Solution* ile resüspanse edildi. Pellet, 180 µl'e ayarlanmış 200 µl'lik pipet yardımıyla kremi bir süspansiyon haline gelip pipet ucuna takılmadan geçebilecek duruma gelene kadar 5-10 kez yavaşça pipetaj yaparak yukarı aşağı pipetlendi. Üzerine 100 µl *Resuspension Solution* eklendi ve hacim 300 µl'e çıkartıldı. Elde edilen süspansiyon, 280 µl'e ayarlanmış 1000 µl'lik pipet yardımıyla homojen bir süspansiyon elde etmek için 5 kez daha hava kabarcığı oluşturmada yavaşça pipetaj yaparak karıştırıldı. Hücre süspansiyonuna son hacim 5 ml olacak şekilde *Resuspension Solution* eklendi ve iyice karıştırıldı. 100 g'de 7 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet üzerine 200 µl *Resuspension Solution* eklenerek 200 µl'e ayarlanmış pipet yardımıyla 5 kez yavaşça pipetaj yaparak yukarı aşağı pipetlendi. Hücre süspansiyonuna son hacim 5 ml olacak şekilde *Resuspension Solution* eklendi ve iyice karıştırıldı. 100 g'de 7 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 200 µl *Resuspension Solution* kullanılarak yapılan yıkama işlemi toplamda 3 yıkama olacak şekilde tekrar edildi. Santrifüjden sonra elde edilen hücre pelleti, büyüklüğüne göre 0,5-1 ml *Neurobasal Medium* (Stemcell Technologies, 05700) içinde resüspanse edildi. 50 ml'lik steril falkon tüpün ağzına 40 µm *Cell Strainer* yerleştirildi, *strainer* üzerine elde edilen süspansiyon yavaşça pipet yardımıyla bırakıldı ve hücre süspansiyonunun müdahale edilmeden kendi halinde aşağı akması beklendi. Hücrelerin hacmi ölçülerek Trypan Blue (Stemcell Technologies, 07050) ve hemositometre yardımıyla hücrelerin sayımı yapıldı. Hücreler, her kuyuda eşit sayıda hücre olacak şekilde poli-D-lizin kaplı plate'lere (Thermo Fisher Scientific, NC-152035 ve Corning, 354470) ekildi.

3.2.3.2 Hücrelerin toplanması ve homojenize edilmesi

Ko-kültür çalışmalarından elde edilen hücreler 200 µl 1X PBS ile 3 kez yıkandı. Ardından, hücreler üzerine içerisinde proteaz inhibitörü bulunan 200 µl UPX (Universal Protein Extraction Kit Buffer, Expedon) tampon çözeltisi eklendi ve hücre sıyırıcı (İsolab, I.121.01.013) kullanılarak hücreler dikkatlice poli-D-lizin kaplı

kuyucuktan kazındı. Elde edilen hücre süspansiyonu mikro pipet yardımıyla Lo-Bind (Eppendorf) tüplere alındı.

Homojenizasyon işlemi için Lo-Bind tüpler buz kalıbı üzerine alındı ve içerisinde bulunan hücre süspansiyonuna 1 µl proteaz inhibitör kokteyli (PIC, Thermo Scientific) eklendi. 5 kere 10 saniye boyunca ultrasonikatör (VialTweeter, HielScher) kullanılarak hücre lizisi gerçekleştirildi. Ardından hücreler, termo-çalkalayıcıda (Biosan) 15 dk 95°C’de 1000 rpm’de çalkalanarak kaynatıldı ve kaynama işlemini takiben 30 dk 4°C’de inkübe edildi. Hücreler, 10 dk 16000 g’de santrifüj edildi ve süpernatant yeni Lo-Bind tüpe alındı.

3.2.3.3 FASP protokolü ile triptik peptitlerin hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen proteinlerden triptik peptitlerin hazırlanması için FASP (*Filter Aided Sample Preparation*) protokolü uygulandı (76). Homojenizasyon işleminin ardından elde edilen proteinler filtreli tüplere alınarak toplam hacim 230 µl olacak şekilde üzerine 8 M üre eklendi ve 15 dk 14000 g’de santrifüj edildi. Santrifüj ardından 200 µl üre eklendi ve tekrar 15 dk 14000 g’de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken tüm sıvılar atıldı. 8 M üre kullanılarak 10X iyodoasetamit (IAA) solüsyonu hazırlandı. 10 µl 10X IAA ve 90 µl üre solüsyonu filtre üzerine eklendi ve 1 dk çalkalayıcı ile karıştırıldı. Ardından 20 dk boyunca karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında filtreli tüpler 10 dk 14000 g’de santrifüj edildi. Örneklerdeki SDS’i uzaklaştırmak için tüm örnekler 3 kere 100 µl üre solüsyonu eklenerek 15 dk 14000 g’de santrifüj edildi ve toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Bu aşamadan sonra üreyi uzaklaştırmak için örnekler 3 kere 100 µl amonyum bikarbonat solüsyonu (50 mM, AmBic) eklenerek 10 dk 14000 g’de santrifüj edildi. Triptik peptit eldesi için 50mM AmBic solüsyonu içinde olan örneklerin üzerine 1µg/75µl tripsin solüsyonu eklendi ve tüp kapakları parafilmlelenerek gece boyu (maksimum 18 saat) 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Triptik peptitleri içeren filtreler yeni tüplere alındı, üzerlerine 40 µl 50 mM AmBic solüsyonu eklendi ve 10 dk 14000 g’de santrifüj edildi. Filtrelere 50 µl 0.5 M sodyum klorit solüsyonu (NaCl) eklendi ve tekrar 10 dk 14000 g’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtreden geçerek tüpte toplanan triptik peptitler LC-MS/MS cihazına verilmek üzere vialle alındı.

3.2.3.4 LC-MS/MS analizi

Primer hücre kültürü çalışmalarından elde edilen peptitlerin analizleri için Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi'nde bulunan nanoLC-ESI-QTOF (Xevo G2-XS, Waters) cihazı kullanıldı. Analiz öncesinde kolon, %0,1 formik asit içeren %97 mobil faz A ile dengelendi. Sonrasında, MassLynx yazılımı kullanılarak 200 pg/µl Leucine Enkephalin (LeuEnk) ile dedektör ayarı ve 100 fmol/µl Glu-1-fibrinopeptit B (Glu-fib) ile cihazın kalibrasyonu yapıldı. Bağımsız veri toplama (*data independent acquisition, DIA*) metodu olan SONAR *sensitivity* modunda kullanıldı. FASP protokolü uygulanarak elde edilen ve enjeksiyonu yapılacak olan triptik peptitler cihaza verildi. Örnekler, önce nanoACQUITY UPLC M Class kromatografi sistemi üzerinde yer alan trap kolonundan (ZENFIT-nanoEase MZ Symmetry C18 Trap Column, 100 Å, 5 µm 180 µm x 20 mm, Waters-186008821) geçirildi. Ardından, hidrofobiklik özelliklerine göre ayrılacakları analitik kolona (ZENFIT- nanoEase MZ HSS T3 Column, 100 Å, 1.8 µm, 75 µm x 250 mm, Waters-186008818) yönlendirildi. 0.300 µl/dk akış hızında, %4-40 aralığında ACN gradienti uygulanarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlandı. Pozitif iyon modunda, ESI sonucunda kütle spektrometresinde analiz edildi. Analiz sırasında, 50-1950 m/z aralığındaki tüm peptitler için veri toplandı. MS/MS analiziyle peptitler parçalanarak sekans bilgisinin elde edilmesi sağlandı.

3.2.3.5 LC-MS/MS datalarının işlenmesi

Proteinlerin tanımlanması ve peptitlerin kantitatif analizi için Progenesis QI (V.2.0, Waters) yazılımı kullanıldı. UniProt/SwissProt protein veri bankasındaki en güncel *mus musculus* veritabanı (Uniprot, Eylül 2022) kullanarak protein tanımlamaları gerçekleştirildi. Kütle spektrometresindeki kütle ölçümlerinin doğruluğunu artırmak için kalibrant (*lockmass calibration*) olarak 785,8426 m/z değeri (Glu-fib peptidi) kullanıldı ve örnek setleri toplam iyon yoğunluğuna göre normalize edildi.

Karbamidometil-sistein, metiyonin oksidasyonu *fixed* modifikasyon olarak, asetil N-TERM, asparajin ve glutamin deaminasyonu modifikasyonları ise *variable*

modifikasyon olarak yazılım üzerinde seçildi. Tanımlama kriterleri olarak yanlış keşif oranı (*false discovery rate*, $FDR \leq 1\%$) 1% 'den küçük olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen proteinler, en az 2 ve üzeri benzersiz peptit (*unique peptide*), $p < 0,05$ ve değişim katsayısı ≥ 1.3 olacak şekilde filtrelendi.

3.2.3.6 Biyoinformatik analizler

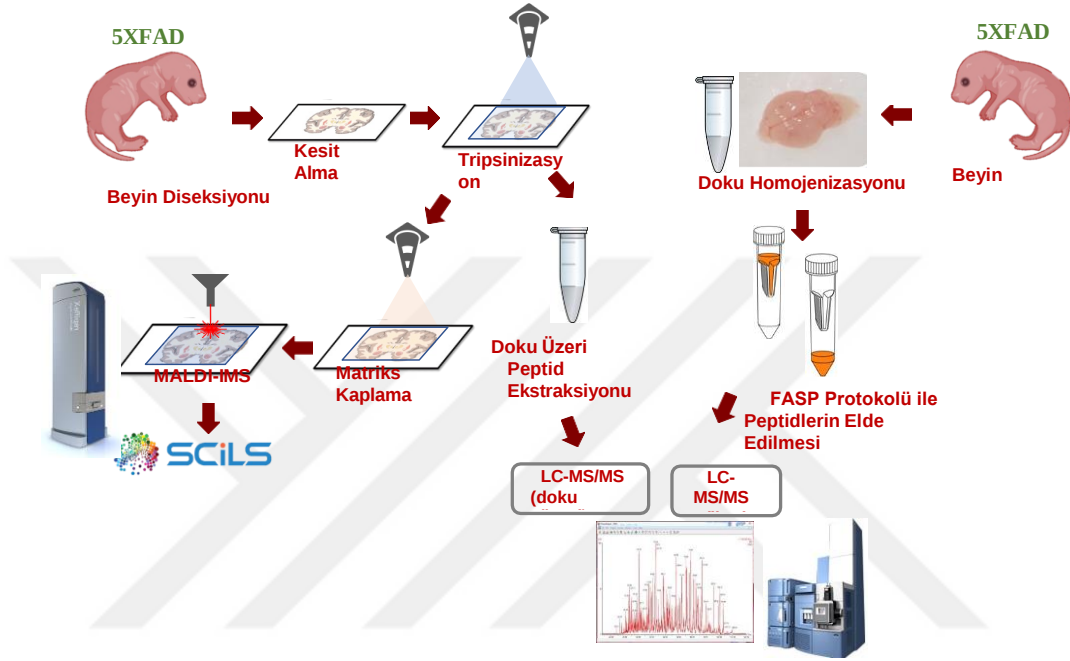
Primer hücre kültürü örneklerinden tanımlanan ve anlamlı ifade farklılıkları gösteren proteinlerin biyoinformatik analizlerini gerçekleştirmek için çeşitli çevrimiçi yazılımlar kullanıldı. Kontrol, transgenik ve ko-kültür gruplarının protein ifade profillerini analiz etmek ve gruplar arasındaki benzerlikleri ve farklılıkları gözlemlemek amacıyla hem temel bileşenler analizi (*Principal Component Analysis*, PCA) hem de hiyerarşik kümeleme (*hierarchical clustering*, HC) analizi gerçekleştirildi. Analizler çevrimiçi Clustvis yazılımı ile gerçekleştirildi. PCA analizinde, satır bazında birim varyans ölçeklendirmesi (unit variance scaling) ve temel bileşenleri hesaplamak için tekil değer ayrışımı (singular value decomposition, SVD) kullanıldı. Örnek gruplarının etrafında bulunan elipsler %95 güven aralığını kapsayacak şekilde yazılım tarafından çizildi. HC analizinde, satırlar ortalandıktan (centered) sonra satırlara birim varyans ölçeklemesi uygulandı. Hem satırlar hem de sütunlar, korelasyon mesafesi (correlation distance) ve ortalama bağlantı (average linkage) kullanılarak kümelendirildi. Anlamlı ifade farklılıkları gösteren proteinlerin yolak analizleri Reactome Pathways yazılımı aracılığıyla gerçekleştirildi.

3.2.4 MALDI kütle spektrometresi görüntüleme çalışması

Çalışmanın bu basamağında, yenidoğan 5xFAD beyin dokusundaki proteomik değişiklikler bölgesel olarak MALDI-MSI analizleri ile incelendi. Literatürde yenidoğana ait hiçbir MALDI-MSI görüntüleme çalışmasına rastlanmadı. Bu nedenle, MALDI-MSI deneyleri için alınabilecek bir referans noktası bulunmamasından ve yenidoğan farelerden disekte edilen beyin dokularının yapısından dolayı MALDI-MSI analizinde örnek hazırlığı zorlu bir optimizasyon süreci gerektirdi. Tamamlanan optimizasyon deneylerinin ardından tekrarlanabilir görüntüler elde edildikten sonra çalışmalara devam edildi. Yenidoğan 5xFAD ve kontrol beyin dokusu üzerinde

yapılan MALDI-MSI analizleri aşağıda açıklanan, optimize edilmiş yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi.

MALDI-MSI analizlerinde örnek hazırlığından veri işlenmesine kadar olan süreç Şekil 7’de gösterilmiştir.



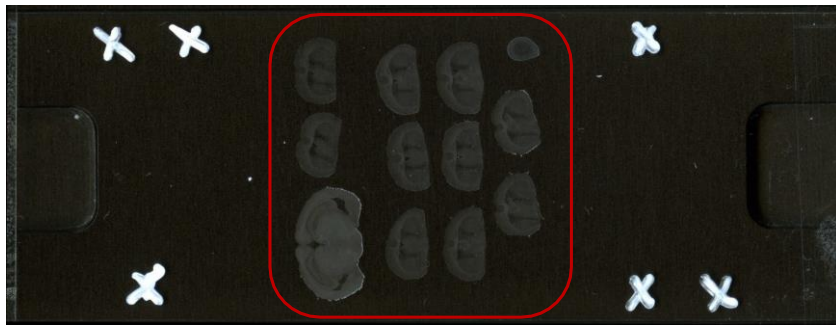
Şekil 7. MALDI-MSI çalışma planı

3.2.4.1 Beyin dokusu diseksiyonu

Yenidoğan farelerden, doğum gerçekleşikten 24 saat içerisinde total beyin diseksiyonu gerçekleştirildi. Hayvanlar 3 dakika buz üzerinde bekletilerek hipotermiye sokuldu ve dekapite edildi. Beyin steril mikrocerrahi aletler yardımıyla, bütünlüğü bozulmadan 2 dk içerisinde çıkartıldı. Toplanan beyin dokuları, moleküler bütünlüğünün ve anatomik şeklinin korunması için sıvı azot üzerinde yüzen alüminyum folyoya yerleştirilerek donduruldu (77,78). Dondurulan beyin dokusu örnekleri, deney zamanına kadar -80°C ’ de muhafaza edildi.

3.2.4.2 Beyin doku kesitlerinin alınması ve hazırlanması

Analizden önce, kesit alınacak yenidoğan fare beyinleri -80°C 'den çıkartıldı ve dokunun termal dengeye ulaşması için yaklaşık 30 dk boyunca -35°C cryostat (Cryotome FE, Thermo Fisher Scientific) içerisinde bekletildi. $10\ \mu\text{m}$ kalınlığında seri koronal kesitler -12°C 'de cryostat yardımıyla alındı. LC-MS/MS analizleri ve Western blot validasyonları için ardışık doku kesitleri kullanıldı. MALDI-MSI analizleri için doku kesitleri soğutulmuş, poli-L-lizin kaplı indium-tin-oxide (ITO) lamlara (Bruker) fırçalar yardımıyla ($25\ \text{mm} \times 25\ \text{mm}$ alana) alındı ve lamalar, doku kesitlerinin kuruması için 1 saat boyunca desikatöre yerleştirildi. Ardından, hücre lipidleri, inorganik tuzları ve istenmeyen kalıntıları uzaklaştırmak için lamalar sırasıyla $+4^{\circ}\text{C}$ 'de soğutulmuş %70 etanol içerisinde 30 saniye, %100 etanol içerisinde 30 saniye, Carnoy's solüsyonu (%10 glasiyal asetik asit, %30 kloroform, %60 etanol) içerisinde 2 dk, %100 etanol içerisinde 30 saniye, %40 etanol içerisinde 30 saniye ve son olarak %100 etanol içerisinde 5 saniye bekletilerek yıkama protokolü uygulandı (79). $1\ \mu\text{l}$ Bovin serum albumin (BSA) proteini ITO lamlarda bulunan doku kesitlerinin yanına damlatıldı ve lamalar desikatör içerisinde tekrar 30 dk boyunca kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminin ardından, lamaların köşeleri su bazlı beyaz bir kalemle işaretlendi (X) ve dokunun konumunu cihaza tanıtılması amacıyla Epson tarayıcı kullanılarak yüksek çözünürlükte (2400 dpi) tarandı (Resim 1).



Resim 1. Yenidoğan beyin doku kesitlerine ait temsili ITO lam görüntüsü. Lokasyon işaretleri (X) ve damlatılan BSA proteini görülmektedir.

3.2.4.3 Doku üzeri tripsinizasyon işlemi

Trypsin enzimi (Trypsin Gold, MS Grade, Promega), 50 mM asetik asit içinde çözüldü. 50 mM AmBic tamponu ve %5 asetonitril (ACN) içeren 100 ng/μl tripsin çözeltisi, SunCollect Automatic Sprayer (SunChrom) kullanılarak 2 bar basınç ve 10 μl/dk akış hızında, doku kesitlerinin üzerine 8 katman olacak şekilde püskürtüldü (Resim 1). Tripsinizasyon işleminin gerçekleşmesi için lamalar nemin kontrolüne olanak sağlayan SunDigest Incubation Chamber (SunChrom) içerisinde 45°C’de 2 saat boyunca *smart* modda inkübasyona bırakıldı. Doku üzeri tripsinizasyon işlemini takiben lamalar 30 dk boyunca desikatörde kurutuldu.

3.2.4.4 Matriks uygulaması

Matriks kaplama işlemi için peptit analizlerinde yaygın olarak kullanılan 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB, Bruker) MALDI matriksi kullanıldı. Matriks çözeltisi, %50 ACN ve %0,2 trifloroasetik asit (TFA) içerisinde 30 mg/mL DHB içerecek şekilde her analizden önce taze olarak hazırlandı ve 30 dk boyunca su banyosu içinde sonike edildi. Sonikasyon işlemini takiben, matriks uygulaması öncesinde 10 dk 18,000 g’de santrifüj edildi. Matriks çözeltisi, SunCollect Automatic Sprayer (SunChrom) kullanılarak 2 bar basınçta beş katman olacak şekilde dokuların üzerine püskürtüldü. İlk katman için akış hızı 10 μl/dk, diğer dört katman için ise 35 μl/dk olarak ayarlandı. Matriks kaplama işlemi tamamlandıktan sonra, cihazın kalibrasyonu için kullanılacak olan peptit standardı (Peptide Calibration Standard II, Bruker), matriks çözeltisi ile 1:1 (v/v) oranında karıştırıldı ve lam üzerine damlatıldı.

3.2.4.5 MALDI kütle spektrometresi görüntüleme analizleri

MALDI kütle spektrometresi görüntüleme analizi öncesinde doku kesitlerinin konumunun cihaza tanıtılması gerekmektedir. Bu amaçla, tripsinizasyon işlemi öncesinde işaretlenen ve taranan lam görüntüsünün üzerinde bulunan beyaz işaretler (X) kullanıldı. Doku kesitlerinin bulunduğu lamalar “MTP Slide Adapter II” içerisine yerleştirilerek cihaza verildi. FlexControl programı (V3.4, Bruker) aracılığıyla doku

kesitlerinin konumu, seçilen dokular üzerine lazer atışı yapılabilmesi için cihaza tanıtıldı.

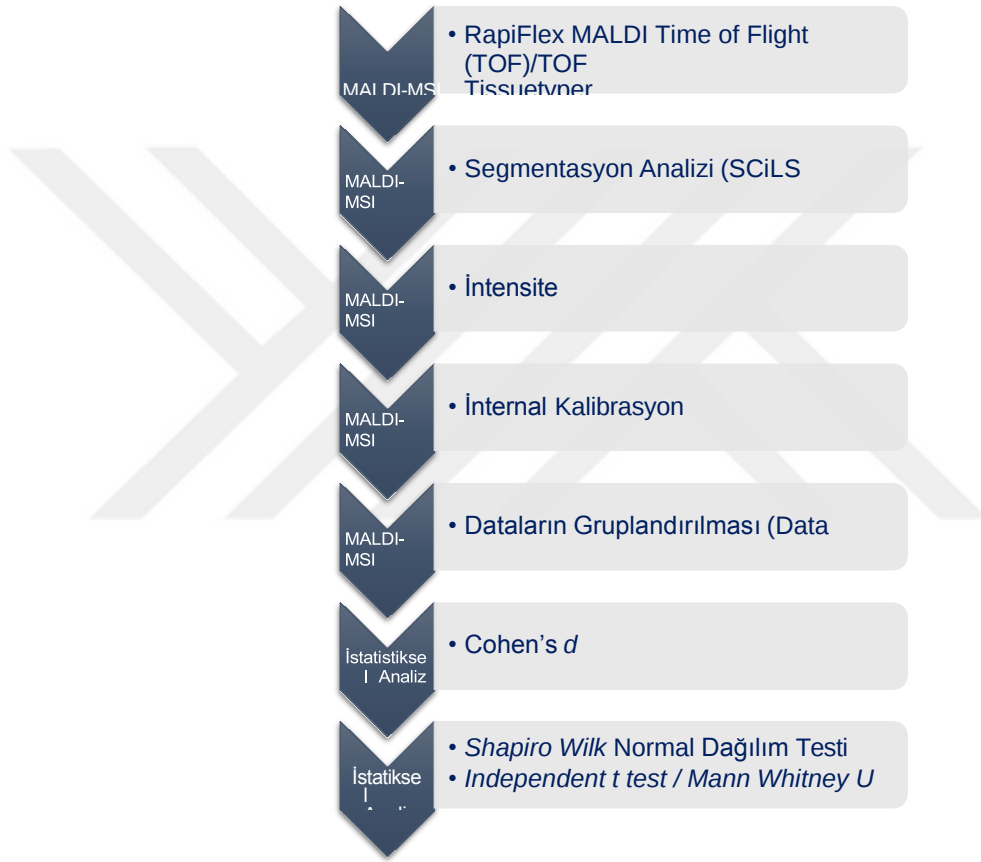
Yenidoğan fare beyin dokularının (6 tane 5xFAD ve 6 tane kontrol) MALDI-MSI analizleri için Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi'nde bulunan RapiFlex MALDI-TOF/TOF (Bruker) cihazı kullanıldı. Analiz önce ve sonrasında cihazın temizliği, dedektör ayarı ve kalibrasyonu yapıldı. Kalibrasyon işlemi için lam üzerine damlatılan, 700 ile 3200 Da kütle aralığında 9 adet peptit içeren peptit kalibrasyon standardı II (Bruker) kullanıldı (Tablo 6). Her analiz öncesinde cihaz 1,5 ppm hata oranının altında kalibre edildi. Doku analizlerinden önce tripsinizasyon işleminin verimliliği lam üzerine yerleştirilen BSA örneği ile kontrol edildi. Temsili BSA kromatogram görüntüleri ile elde edilen BSA görüntüsü karşılaştırıldı ve benzer kromatogram görüntüleri elde edildiğinde tripsinizasyon işlemi başarılı kabul edilerek yeni doğan beyin doku kesitlerinin analizlerine başlandı (80). Ayrıca, cihazın ve analizlerin doğruluğunu ve tutarlılığını kontrol etmek amacıyla her bir lama yerleştirilen yetişkin fare beyin dokusunun yarısı analiz edildi. Doku kesitlerinin analizleri pozitif iyon reflektör modunda, 700 ile 3200 Da kütle aralığında, gerçekleştirildi. FlexControl programı (V3.4, Bruker) ile çözünürlük nokta (spot) başına 1000 lazer vuruşu ile 35 µm'ye ayarlandı. Veri toplama, işleme ve görselleştirme işlemleri Bruker Flex yazılım paketleri (sırasıyla flexControl V3.4, flexAnalysis V3.4, flexImaging V5.0) kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 6. Bruker peptit kalibrasyon standardı II peptit listesi ve m/z değerleri

Peptit Adı	[M+H] ⁺ Mono; s; top; k	[M+H] ⁺ Ortalama
Bradykinin 1-7	757,3992	757,86
Angiotensin II	1046,5418	1047,19
Angiotensin I	1296,6848	1297,49
Substance P	1347,7354	1348,64
Bombesin	1619,8223	1620,86
ACTH clip 1-17	2093,0862	2094,43
ACTH clip 18-39	2465,1983	2466,68
Somatostatin	3147,4710	3149,57

3.2.4.6 MALDI-MSI görüntülerine ait verilerin işlenmesi

MALDI-MSI analizlerinden elde edilen yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol beyin dokularına ait veriler MALDI-MSI görüntülerinin istatistiksel analizi için yaygın olarak kullanılan SCiLS Lab (Versiyon 2016b, Bruker) yazılımı kullanılarak analiz edildi. MALDI-MSI verilerinin işlenmesinde kullanılan yöntemler ve genel iş akışı Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8. MALDI-MSI görüntülerine ait verilerin işlenmesindeki iş akışı

3.2.4.6.1 SCiLS Lab ile yenidoğan dokularının segmentasyon analizi

Yenidoğan beyin doku kesitlerine ait veri setleri, tek tek SCiLS Lab yazılımına yüklendi ve analiz edildi. Analizlerde, literatürde yapılan çalışmalarda ve yazılımın kullanma kılavuzunda belirtilen parametreler kullanıldı (61). Verilere “*convolution baseline removal*” (width:20) ve total iyon normalizasyonu (TIC) uygulandı. Elde edilen m/z değerleri arasındaki yanlış hizalanmanın (*misalignment*) etkisini ortadan

kaldırmak için pik seçimi (peak picking) ve pik hizalama (*peak alignment*) yapıldı ve “*interval width: 0,156 Da*”, “*interval processing mode: mean value on interval*”, “*baseline removal algorithm: deconvolution*” ve “*no normalization*” parametreleri uygulanarak otomatik segmentasyon analizi gerçekleştirildi. Segmentasyon analizi sonucunda R1, R2 ve R3 olmak üzere 3 farklı bölge tanımlandı.

3.2.4.6.2 İntensite değerlerinin normalize edilmesi

Segmentasyon analizleri sonucunda elde edilen, bölgelere özgü m/z değerleri ve intensiteler Excel programına aktarıldı. Doku kesitlerinden elde edilen intensitelere, kütle spektralarını etkileyebilecek sistematik artifaktları gidermek, cihazdaki günlük dalgalanmalardan kaynaklanabilecek deneysel varyasyonları minimuma indirmek ve kesitlere ait bireysel kütle spektralarını birbirleriyle karşılaştırılabilir hale getirmek için normalizasyon faktörü kullanılarak total intensite normalizasyonu uygulandı (81). Özetle, bölgelere özgü intensiteler kendi içlerinde toplanarak en küçük toplama bölündü ve kullanılacak olan normalizasyon faktörü hesaplandı. Mevcut intensite değerleri bu normalizasyon faktörüne bölünerek normalize edilmiş intensite değerleri elde edildi. Total intensite normalizasyonu aşamaları Tablo 7’de örnek olarak gösterildi.

Tablo 7. Total intensite normalizasyonu aşamaları ve hesaplama örneği

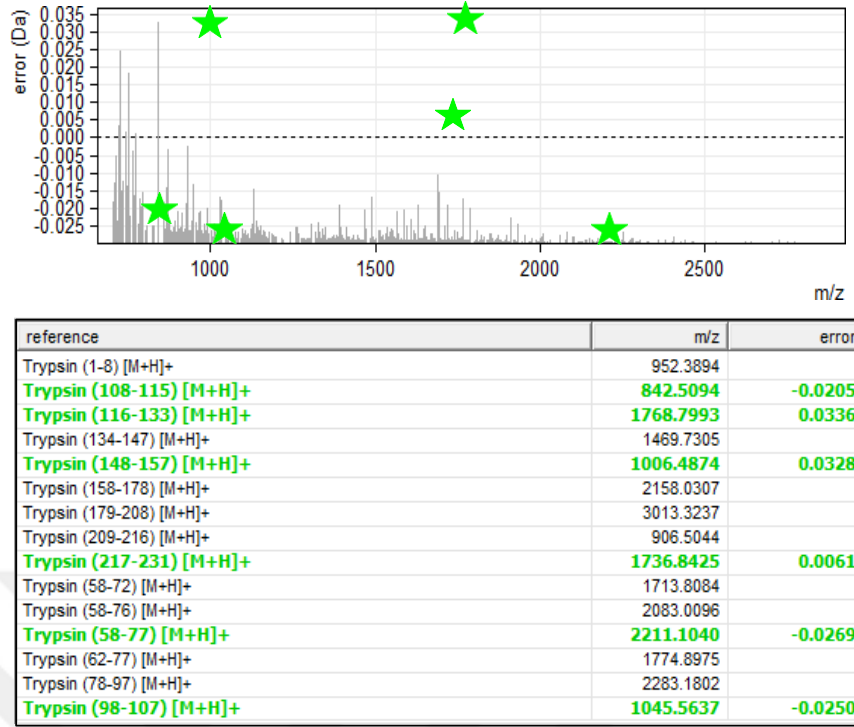
R3 Bölges*	ALM1	ALM2	ALM3	ALZ1	ALZ2	ALZ3
İntens*teler Toplamı	614.7039	224.2181	140.3262	611.8482	103.7313	66.81924
Normal*zasyon Faktörü	9.199505	3.355592	2.100086	9.156768	1.552416	1
m/z	712.02	712.318	712.016	712.045	735.37	712.042
İntens*te	1.08891	0.443641	0.443843	0.760841	0.226741	0.115871
Normal*ze İntens*te	0.118366	0.132209	0.211345	0.083091	0.146057	0.115871

3.2.4.6.3 m/z değerlerinin internal kalibrasyonu

MALDI-MSI analizleri öncesinde peptit standardı kullanılarak cihazın eksternal kalibrasyonu yapılmasına rağmen, verilerin güvenilirliğinin artırılması ve farklı gün ve zamanlarda yapılan analizler arasındaki varyasyonların ortadan kaldırılması için m/z değerlerinin internal kalibrasyonunun da yapılması gerekmektedir (82). Yapılan literatür taramalarında, MALDI-MSI çalışmalarında *Myelin Basic Protein* (MBP) kullanılarak internal kalibrasyon yapıldığı gözlemlendi. Fakat, yenidoğan fare beyinde myelin yapısı daha zayıf olduğu için MBP'ye ait olan m/z değerlerinden belirgin bir görüntü elde edilemedi. Bu nedenle, yenidoğanda MBP ile internal kalibrasyon yapılamayacağına karar verilip, yapılan literatür araştırmaları sonucunda mMass yazılımı (Versiyon 5.5.0, www.mmass.org) ile tripsin enziminin triptik otoliz peptitleri kullanılarak internal kalibrasyon gerçekleştirildi (83–85). Önceden normalize edilmiş intensite değerleri csv dosya formatında mMass yazılımına aktarıldı. Savitzky-Golay metodu kullanılarak “smoothing” (window size: 0.2 m/z in two cycles) işlemi ve “baseline correction” (precision: 15, relative offset: 25) yazılım tarafından gerçekleştirildi. Pikler, sinyal-gürültü oranı (S/N ratio) 3,0 kullanılarak otomatik olarak seçildi ve omuz pikleri (peak shoulders) yazılım tarafından kaldırıldı.

3.2.4.6.4 Verilerin gruplandırılması

Pik seçimi sonucunda SCiLS Lab yazılımının belirlediği m/z (700-3200 aralığında) ve intensite değerleri arasında istatistiksel testler yapılabilmesi ve spektrumların boyutunun azaltılarak birbirleriyle karşılaştırılabilmesi için m/z değerleri 0.04 Da aralıklarda gruplandırıldı (86). Gruplandırma işleminin (data binning) mMass yazılımı ile belirlenen 0.04 Da aralıklarda yapılmasının nedeni, internal kalibrasyon sonucu tripsin enziminin bilinen triptik otoliz peptitlerine ait m/z değerlerinin, analizler sonucunda belirlenen m/z değerleri ile 0.04 Da'dan küçük hata oranında eşleşmesidir (Şekil 9). m/z ve intensite değerlerinin gruplandırılması 12 farklı doku kesitinin (6 tane 5xFAD ve 6 tane kontrol) birbiriyle karşılaştırılmasına olanak sağladı. 5xFAD veya kontrol grubunda en az üç intensite değeri olan m/z değerleri istatistiksel analizler için kullanıldı.



Şekil 9. Tripsin enziminin triptik otoliz peptitlerine ait m/z değerleri ve hata oranları

3.2.4.6.5 İstatistiksel analizler

Tüm istatistiksel analizler SPSS yazılımı (Versiyon 25.0, IBM Corp) kullanılarak gerçekleştirildi. MALDI-MSI analiz sonuçlarında 1000'den fazla piksel noktası bulunması nedeniyle veri büyüklüğünden bağımsız olan Cohen's *d*-testi gruplar arasında (5xFAD ve kontrol) karşılaştırma yapmak için kullanıldı. Cohen's değeri 0,8 den büyük ($d > 0,8$) olan intensite değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve *Shapiro-Wilk* normal dağılım testi yapıldı. İstatistiksel anlamlılık, normalite testi sonuçlarına bağlı olarak parametrik *independant t-test* veya parametrik olmayan *Mann Whitney-U* testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.4.7 LC-MS/MS analizleri ile protein tanımlama

MALDI-MSI analizlerinden elde edilen istatistiksel olarak anlamlı m/z değerlerinin tanımlanması için yenidoğan beyin doku kesiti üzerinden ve direk doku kesitinden elde edilen peptitler ile LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi. LC-MS/MS

analizleri için MALDI-MSI analizlerinde her bir beyin dokusu için kullanılan kesitlere ardışık doku kesitleri kullanıldı.

3.2.4.7.1 Doku üzeri tripsinizasyon ile LC-MS/MS analizi için örnek hazırlanması

Tanımlamalarda kullanılacak protein bilgisini elde etmek amacıyla yapılan doku üzeri tripsinizasyon işlemi için MALDI-MSI analizinde kullanılan örnek hazırlığı protokolünün matris uygulamasına kadar olan kısımların aynısı izlendi. Kısaca, MALDI-MSI analizi için kullanılan doku kesitine ardışık kesitler poli-L-lizin kaplı lam üzerine cryostat yardımıyla alındı ve ardından desikatöre kondu. Desikatörden alınan lamlara, tripsinizasyon işleminden önce hücre lipidlerini ve diğer kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla yıkama protokolü uygulandı. Tripsin enzimi 100 ng/μl konsantrasyonda olacak şekilde 50 mM AmBic ile çözüldü ve doku kesitlerinin üzerine SunCollect Sprayer (SunCrom) yardımı ile püskürtüldü. Tripsin uygulamasını takiben, SunDigest (SunCrom) cihazında 45°C’de 2 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Tripsinizasyon işlemi sonrasında doku kesitleri, %10 ACN ve %0,1 FA içeren bir çözelti ile tamamen kaplandı ve oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak 3 dk boyunca inkübe edildi. Inkübasyonun ardından, peptitleri içeren çözelti dokunun kenarından pipet yardımıyla Lo-Bind tüplere toplandı. İlk olarak %25 ACN ve %0,1 FA içeren bir çözelti ile ve ardından %45 ACN ve %0,1 FA içeren bir çözelti ile toplama işlemi tekrarlandı (84).

3.2.4.7.2 Direk doku kesitinden LC-MS/MS analizi için örnek hazırlama

MALDI-MSI analizlerinde kullanılan kesitlere ardışık 50 μm kalınlığında 10 tane doku kesiti Lo-Bind tüpe alındı. Lo-Bind tüpler buz kalıbı üzerine alındı, doku kesitlerine %1 PIC içeren 50 μl UPX tampon çözeltisi eklendi ve 7 kere 10 saniye boyunca ultrasonikatör kullanılarak homojenize edildi. Sonrasında, termo-çalkalayıcıda (Biosan) 15 dk 95°C’de 1400 rpm’de çalkalanarak kaynatıldı ve kaynama işlemini takiben 1,5 saat 4°C’de inkübe edildi. 15 dk 18000 g’de santrifüj edildi ve süpernatant yeni Lo-Bind tüpe alındı.

3.2.4.7.3 FASP Protokolü ile triptik peptitlerin hazırlanması

Homojenizasyon sonrası direk doku kesitinden elde edilen proteinlerden triptik peptitlerin hazırlanması için 3.2.3.3 başlığı altında detaylıca anlatılan FASP protokolü kullanıldı.

3.2.4.7.4 LC-MS/MS analizi

Doku üzeri tripsinizasyon işleminden elde edilen peptitler ile direk doku kesitlerine FASP protokolü uygulanarak elde edilen peptitlerin analizleri için Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi'nde bulunan nanoLC-ESI-QTOF (Xevo G2-XS, Waters) cihazı kullanıldı. LC-MS/MS analizi ve LC-MS/MS datalarının işlenmesi detaylı olarak sırasıyla 3.2.3.4 ve 3.2.3.5 başlıkları altında anlatıldı.

3.2.4.8 MALDI-MSI ve LC-MS/MS datalarının eşleştirilmesi ve proteinlerin tanımlanması

MALDI-MSI analizlerinden elde edilen istatistiksel olarak anlamlı m/z değerlerine karşılık gelen proteinleri tanımlayabilmek için hem doku üzeri hem de direk doku kesitleriyle gerçekleştirilen LC-MS/MS analizlerinden elde edilen proteinlerin sekans bilgileri kullanıldı. MALDI-MSI analizinden elde edilen m/z değerleri ile LC-MS/MS datasının eşleştirilmesinde, yani proteinlerin tanımlanmasında en düşük ppm hata oranı ile tanımlama kuralı uygulandı (87). Eşleştirmede, MALDI-MSI analizinde, doku yüzeyindeki peptitler daha kolay iyonlaşabildiği için, protein tanımlaması için doku üzeri tripsinizasyon ile elde edilen bilgilere öncelik verildi. Eğer doku üzeri tripsinizasyon yöntemi ile düşük ppm hata oranı ile eşleştirilme yapılamazsa, direk doku kesitlerinden elde edilen protein bilgisi ile eşleştirme gerçekleştirildi. Eşleştirilme sonrasında tanımlanan proteinlerin literatür taraması gerçekleştirildi.

3.2.5 Western Blot Yöntemi ile MALDI-MSI Sonuçlarının Validasyonu

MALDI-MSI analizleri ile elde edilen istatistiksel olarak anlamlı proteomik sonuçların doğrulanması amacıyla Western blot validasyon analizleri gerçekleştirildi. MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizleri sonucunda tanımlanan proteinlerin varlığı ve miktarı Western blot analizi ile farklı ve bağımsız bir yöntemle doğrulandı.

3.2.5.1 Western Blot Analizi için Protein Örneklerinin Hazırlanması

Protein ekstraksiyonu için MALDI-MSI analizlerinde kullanılan beyin doku kesitlerine ardışık kesitlerden prenatal fare beyin atlasına göre R1 bölgesine karşılık gelen korteks bölgesi ve R3 bölgesine karşılık gelen korpus kallozum bölgesi dikkatlice mikrodisekte edildi. 50 µm kalınlığında 10 adet ardışık kesit kullanıldı. Mikrodisekte edilen doku kesitleri, ultrasonikatör (VialTweeter, HielScher) kullanılarak %1 PIC içeren UPX tamponunda homojenize edildi, ardından termo-çalkalayıcıda (Biosan) 95°C'de 15 dk 1400 rpm'de çalkalanarak kaynatıldı ve kaynama işlemini takiben 1,5 saat boyunca 4°C'de inkübe edildi. Ardından, 15 dk 18000 g'de santrifüj edildi ve ekstrakte edilen proteinleri içeren süpernatant yeni Lo-Bind tüplere alındı. Bradford yöntemi ile konsantrasyon tayini yapıldıktan sonra -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.5.2 Western Blot Yöntemi

Jel dökme sistemi 0,75 mm aralıklı cam plakalar (Biorad) kullanılarak kuruldu ve Western blot analizlerinde kullanılmak üzere %12'lik jeller, *TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit* (Biorad) protokolünde belirtilen şekilde taze olarak hazırlandı. İlk olarak, kit içinde bulunan *resolver A* ve *resolver B* solüsyonları 1:1 (v/v) oranında karıştırıldı ve karışımın içerisine %10 APS ve TEMED eklenerek *resolver* solüsyonu hazırlandı. Ardından, *stacker* solüsyonu aynı şekilde *stacker A* ve *stacker B* solüsyonları 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak ve karışıma %10 APS ve TEMED eklenerek hazırlandı. Baloncuk oluşumuna dikkat edilerek hazırlanan cam plakaların arasına, önce *resolver* solüsyonu kuyucukların yaklaşık 1 cm altında kalacak şekilde döküldü ve üzeri hazırlanan *stacker* solüsyonu ile tamamlandı. Örneklerin yükleneceği

kuyucukların oluşturulması için tarak yerleştirilerek oda sıcaklığında 45 dk polimerize olmak üzere bırakıldı.

Her örnekten 10 µg protein, %5 β-merkaptoetanol içeren 4X Laemmli tamponu (BioRad) ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde karıştırıldı ve ardından 5 dk boyunca 95°C'de kaynatıldı. Hazırlanan jel, içerisi 1X TGS tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, %0,1 SDS, pH 8,3; BioRad) ile doldurulmuş yürütme tankına yerleştirildi. Hazırlanan protein örnekleri ile 5'er µl renkli ve renksiz moleküler standartlar jelin kuyucuklarına yüklendi. Proteinlerin jele yavaş giriş yapması için önce 20 dk 100V'da, ardından mavi boya jel tabanına ulaşana kadar 200V'da (~25 dk) yürütüldü.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, jel dikkatlice 1X PBST (PBS'de çözülmüş %0,1 Tween-20) solüsyonuna alındı ve ChemiDoc görüntüleme sistemi (BioRad) kullanılarak jel aktivasyonu gerçekleştirildi. Proteinlerin jelden PVDF membrana transfer işlemi semi-dry transfer sistemiyle *TransBlot Turbo RTA Transfer Kit*'i (BioRad) kullanılarak gerçekleştirildi. Transfer işleminden önce PVDF membran %100 metanol içerisinde 2 dk bekletilerek aktif hale getirildi. Transfer işleminde kullanılacak olan kurutma kağıtları, aktifleştirilmiş membran ve transfer edilecek proteinleri içeren jel, kit içerisinde bulunan 1X Towbin transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 metanol, pH 8,3; BioRad) içerisinde ıslatıldı. Transfer kasetinin içerisine, sırasıyla kurutma kağıdı, PVDF membran, proteinleri içeren jel ve tekrardan kurutma kağıdı sandviç şeklinde yerleştirildi ve kaset *TransBlot Turbo* cihazına (BioRad) konuldu. Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre Tablo 8'de belirtilen parametreler kullanılarak transfer işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 8. Western blot için transfer parametreleri

Protokol	Moleküler Ağırlık	Süre	1 M*n* Jel
H*gh MW	> 150 kD	10 dk	25V'a kadar sab7t 1,3 A
Low MW	< 30 kD	5 dk	
M*xed MW	5-150 kD	7 dk	

Bloklama işleminden önce, transfer olmuş proteinleri taşıyan PVDF membran ChemiDoc görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi ve %5 süt tozu içeren 1X PBST solüsyonunda (bloklama solüsyonu) 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Ardından PVDF membran, birincil antikor içerisinde 2 saat boyunca inkübe edildi. PVDF membran, 3 kez 5'er dk 1X PBST ile yıkandı ve ardından ikincil antikor ve renksiz moleküler standardın görüntülenmesi için kullanılan StrepActin-HRP (BioRad) içeren bloklama solüsyonu içerisinde 1 saat boyunca inkübe edildi. Bütün inkübasyonlar oda sıcaklığında çalkalanarak gerçekleştirildi. Birincil ve ikincil antikolar Tablo 9'da gösterilen miktarlarda %5 bloklama solüsyonu içerisinde taze olarak hazırlandı. PVDF membran, 3 kez 5'er dk 1X PBST ile yıkandı ve *Clarity Western ECL Substrate* (BioRad) kullanılarak ChemiDoc Görüntüleme sistemi ile zayıf sinyallerin tespitinde kullanılan yüksek duyarlılık (*high sensitivity*) modunda görüntülendi.

Tablo 9. Western blot analizlerinde kullanılan birincil ve ikincil antikorlar

Antikor	Dilüsyon	Moleküler Ağırlık	Marka
Stathmin	1:10,000	19 kDa	Abcam, ab52630
VCP	1:10,000	89 kDa	Abcam, ab109240
EF-2	1:1000	95 kDa	Cell Signaling, 2332
HSPa4	1:1000	110 kDa	Abcam, ab185962
eIF3a	1:2000	167 kDa	Abcam, ab86146
NogoA	1:1000	180 kDa	Abcam, ab62024
Keçi anti-tavşan IgG-HRP	1:4000	-	Abcam, ab6721
StrepActin-HRP	1:10,000	-	BioRad, 1610381

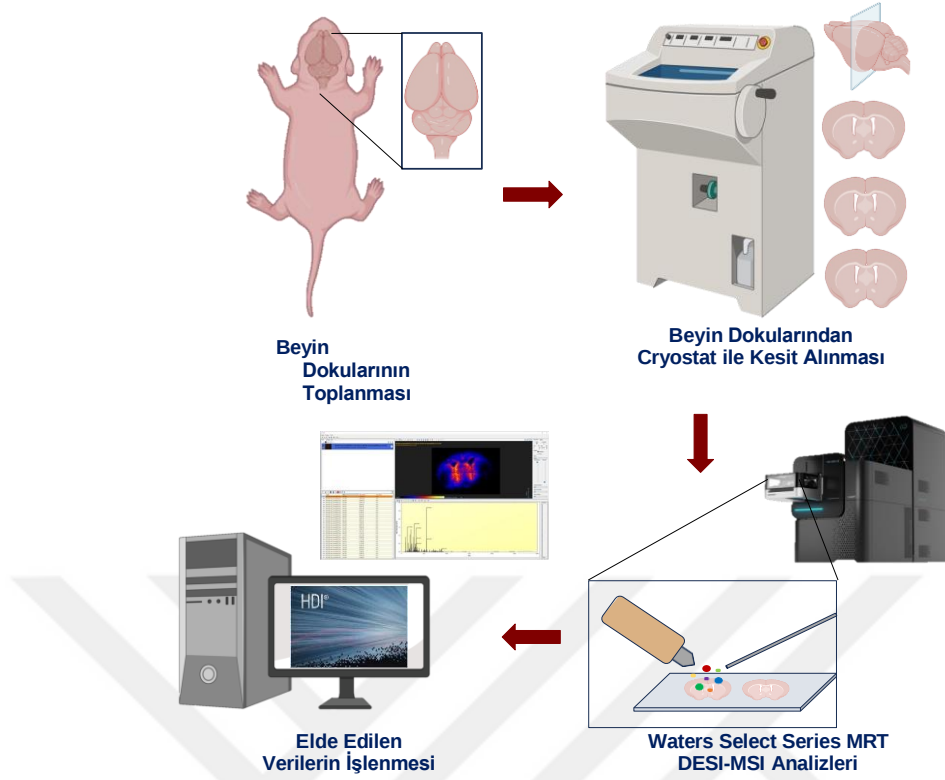
3.2.5.3 Western blot yöntemi ile elde edilen dataların istatistiksel analizi

Densitometrik analizler ve toplam protein normalizasyonu, ImageLab yazılımı (Versiyon 6.1, BioRad) ve GraphPad Prism (Versiyon 8.0) yazılımı kullanılarak yapıldı. Yükleme miktarındaki değişkenlikleri düzeltmek ve Western blot analiz sonuçlarını doğru yorumlayabilmek amacıyla toplam protein normalizasyonu; transfer işlemi sonrası görüntülenenen toplam protein bantlarının yoğunluğunun antikor ile

hedeflenen proteine ait bandın yoğunluğuna oranlanmasıyla gerçekleştirildi. Verilere, *Shapiro-Wilk* normal dağılım testi yapıldı. Bütün veriler normal dağılım gösterdiği için istatistiksel anlamlılık *independant t-test* ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değer i istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.6 DESI kütle spektrometresi görüntüleme alışması

Tez çalışmasının bu basamağında, yenidoğan 5xFAD beyin dokusundaki metabolomik değeriklikler bölgesel olarak DESI-MSI analizleri ile incelendi. Yapılan literatür taraması sonucunda, AH fare modellerine ait MS görüntüleme temelli metabolomik çalışmalar bulunurken, yenidoğan AH fare modelini içeren herhangi bir metabolomik çalışmaya rastlanmadı. DESI-MSI deneyleri için alınabilecek bir referans noktası bulunmamasından dolayı, çalışmalara başlamadan önce örnek hazırlığı ve kullanılan metotların parametreleri optimize edildi. Optimizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, deney protokolünün tekrarlanabilirliğini test etmek için önce yetişkin fare beyin dokusu kullanılarak DESI-MSI deneyleri gerçekleştirildi. Görüntülerin tekrarlanabilir olduğu gösterildikten sonra, yenidoğan fare beyin dokusu kesitlerinde metabolitlerin görüntülenmesi için uygun metodu seçmek amacıyla farklı parametrelere sahip metotlar test edildi. Yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol fare beyin dokularında düşük ağırlıklı metabolitlerin (< 500 m/z) ve lipidlerin (> 500 m/z) görüntülenmesi için DESI-MSI analizleri 2 farklı metot kullanılarak gerçekleştirildi. DESI-MSI analizlerinde örnek hazırlığından verilerin işlenmesine kadar olan süreç şekil 10’da gösterilmiştir.



Şekil 10. DESI-MSI çalışma planı

3.2.6.1 Beyin dokusu diseksiyonu

Çalışmada kullanılan yenidoğan beyin dokuları, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi'nden temin edildi. Kısaca, transgenik 5xFAD ve kontrol yenidoğan fareler (1 günlük) hızlı bir şekilde dekapite edildi ve beyin dokuları diseksiyon sonrasında 2 dk içerisinde toplandı. Toplanan beyin dokuları, sıvı azot üzerinde yüzen alüminyum folyoya yerleştirilerek donduruldu. Dondurulan beyin doku örnekleri deney sürecine kadar -80°C 'de saklandı.

3.2.6.2 Beyin doku kesitlerinin alınması ve saklanması

Analizden önce, kesit alınacak yenidoğan fare beyinleri -80°C 'den çıkartıldı ve dokunun termal dengeye ulaşması için yaklaşık 30 dk boyunca -35°C cryostat (CM1950, Leica Biosystems) içerisinde bekletildi. Yenidoğan beyin dokusu önce küçük bir su damlası kullanılarak mantar diske monte edildi ve ardından mantar disk OCT bileşiği kullanılarak numune diskine yerleştirildi. Cryostat yardımıyla -12°C 'de

10 µm kalınlığında seri koronal kesitler alındı. Doku kesitleri, önceden soğutulmuş X-tra Adhesive (Leica Biosystems) lamlara fırçalar yardımıyla alındı. Kesit alma işlemi tamamlandıktan sonra kesitler, hava kompresörü kullanılarak nazıkçe kurutuldu ve tekli lam saklama kutularına yerleştirildi. Ardından vakumlanarak görüntüleme analizlerine kadar -80°C’de muhafaza edildi.

3.2.6.3 DESI kütle spektrometresi görüntüleme analizleri

DESI-MSI analizlerinde kullanılmadan önce, kesitler üzerinde oluşabilecek kondensasyonu önlemek amacıyla lamalar vakumlu paketlerden çıkarılmadan oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk boyunca çözdürüldü. Lamlar siyah Staedtler kalemi (m/z 666,06) ile işaretlendi. Bu işaretler ile analiz öncesinde intensite yoğunluğu kontrol edildi ve doku kesitlerinin konumu cihaza tanıtıldı.

Yenidoğan fare beyin dokularının (6 tane 5xFAD ve 6 tane kontrol) DESI-MSI analizleri Sheffield Hallam Üniversitesi’nde bulunan Waters Select Series MRT, DESI XS sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Cihazın kütle çözünürlüğü 200,000 FWHM’dir. Cihaz, her analizden önce manuel olarak polialanin ile 0,10 ppm hata oranının altında kalibre edildi. Yenidoğan doku kesitlerinin analizi negatif iyon modunda 50 ile 2400 Da kütle aralığında, 30 µm çözünürlükte gerçekleştirildi. Sprey solventi olarak içerisinde 100 pg/µl leucine enkephalin ve 0,5 mM glutarik asit bulunan 95:5 metanol/su karışımı kullanıldı. Elektrosprey solventi 2 µL/dk akış hızına ve nebulize edici gaz (nitrojen) basıncı 2 bara ayarlandı.

Düşük ağırlıklı metabolitlerin (< 500 m/z) ve lipidlerin (> 500 m/z) görüntülenmesi iki farklı metot kullanılarak gerçekleştirildi. Düşük ağırlıklı metabolitlerin analizinde quadrupole profili m/z 50, 100, 200 olarak ve ısıtmalı transfer hattı (heated transfer line, HTL) sıcaklığı 100°C olarak ayarlandı. Lipitlerin analizinde ise quadrupole profili m/z 500, 900, 1100 olarak ve HTL sıcaklığı 400°C olarak ayarlandı. DESI-MSI analizlerinde kullanılan metot içine entegre edilmiş *continuous lock mass correction* fonksiyonu sayesinde dokuların analizi sırasında internal kalibrasyonu gerçekleştirildi. Düşük ağırlıklı metabolitlerin analizinde

glutarik asit (m/z 131,0349), lipidlerin analizinde ise leucine enkaphalin (m/z 554,2615) internal kalibrant olarak kullanıldı.

3.2.6.4 DESI-MSI datalarının işlenmesi

Yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol beyin dokusu kesitlerine ait DESI-MSI görüntülerinin analizleri SCiLS Lab Pro (Versiyon 2024b, Bruker) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Yenidoğan beyin doku kesitlerine ait kalibre edilmiş (*lock mass corrected*) veri setleri teker teker SCiLS Lab yazılımına yüklendi. Bu nedenle, dışarıdan manuel olarak internal kalibrasyon işlemine gerek kalmadı. Yükleme sırasında 50-1000 m/z aralığı seçildi, “*interval width*: 0,005 Da” olarak ayarlandı ve total iyon normalizasyonu uygulandı. SCiLS Lab yazılımı ile otomatik segmentasyon analizi gerçekleştirildi. Yazılımın yeni versiyonuna eklenen verilerin gruplandırılması (*data binning*) fonksiyonu sayesinde, elde edilen verilerin manuel olarak gruplandırılmasına gerek kalmadı.

3.2.6.5 Biyoinformatik analizler

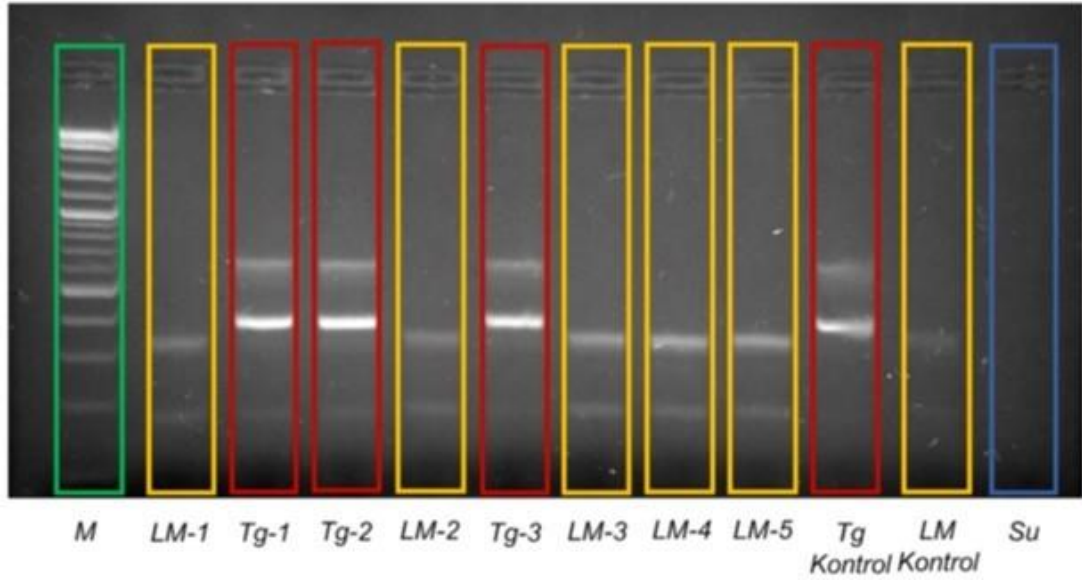
SCiLS Lab yazılımı tarafından pik seçimi (*peak picking*) sonucunda elde edilen m/z ve intensite değerleri çevrimiçi MetaboAnalyst yazılımı aracılığıyla istatistiksel testler kullanılarak karşılaştırıldı. DESI-MSI analizlerinden elde edilen verilerin birbirleriyle karşılaştırılabilir hale getirilmesi için öncelikle total intensite normalizasyonu uygulandı. Ardından normalize edilen m/z ve intensite değerleri ile PCA analizi gerçekleştirildi. Örnek gruplarının etrafında bulunan elipsler %95 güven aralığını kapsayacak şekilde yazılım tarafından çizildi.

5xFAD transgenik ve kontrol beyin dokularının DESI-MSI analizleri sonucunda elde edilen m/z değerleri çevrimiçi LIPID MAPS (www.lipidmaps.org) ve Metabolomics Workbench (www.metabolomicsworkbench.org) veritabanları kullanılarak en düşük ppm hata oranı ile ayrı ayrı tanımlandı.

4 BULGULAR

4.1 Transgenik Hayvanların Genotipleme ile Belirlenmesi

5xFAD transgenik ve kontrol farelerin ayırt edilmesi amacıyla genotipleme analizleri gerçekleştirildi. Örnek genotipleme jel görüntüsü Şekil 10’da gösterilmiştir. Çift bant gözlemlenen örnekler 5xFAD transgenik hayvanlara aitken, tek bant gözlemlenen örnekler kontrol hayvanlarına aittir. PZR reaksiyonunun başarılı olup olmadığını kontrol etmek amacıyla pozitif ve negatif kontrol örnekleri kullanılmıştır.

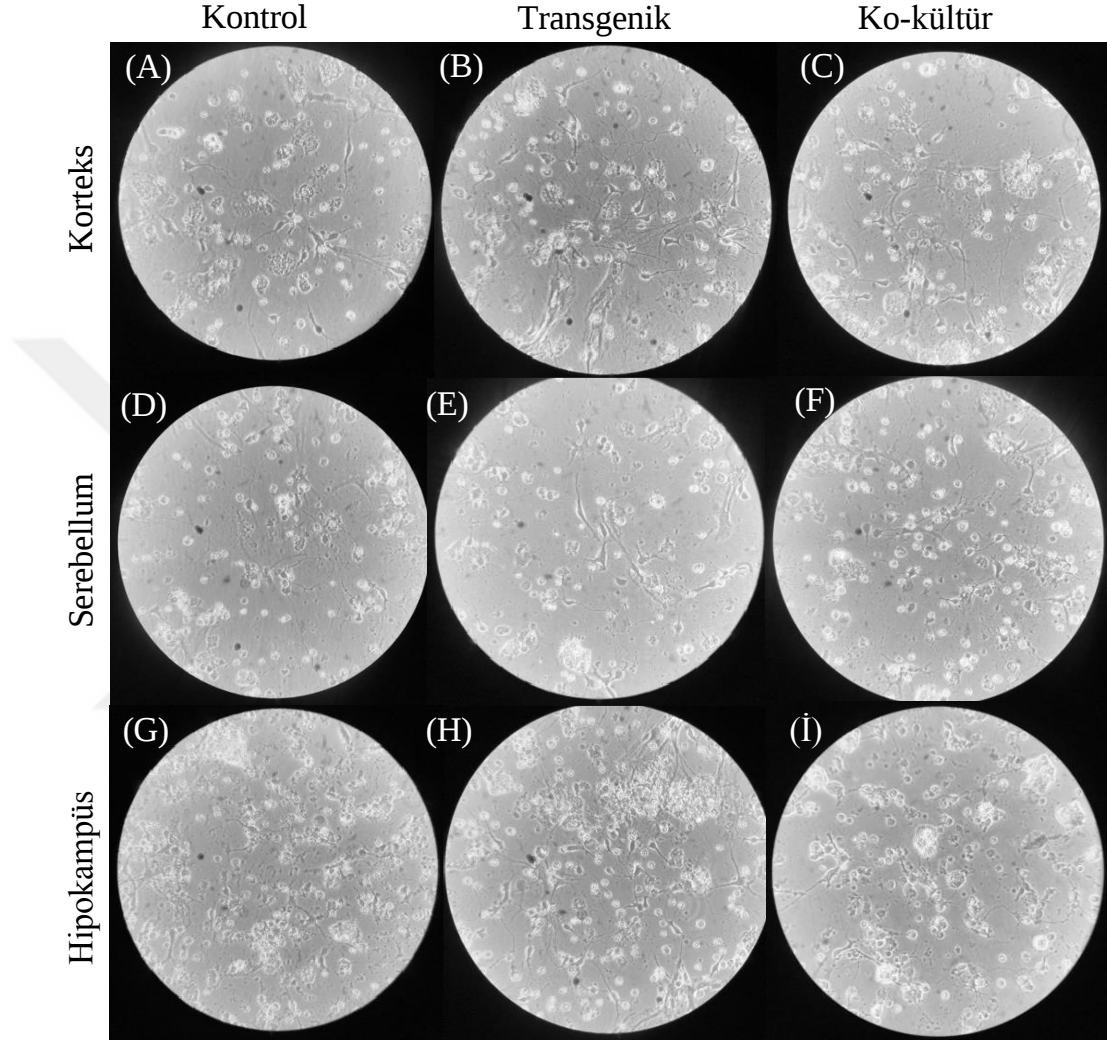


Şekil 11. 5xFAD fare dokularına ait PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: DNA standardı; LM: Littermate (kontrol); Tg: Transgenik (5xFAD) fare)

4.2 Primer Hücre Kültürü

Yapılan hücre kültürü çalışmaları doğrultusunda, 5xFAD transgenik yenidoğan fare beyninin non-transgenik kontrol fare beynine kıyasla daha küçük olduğu gözlemlendi. Hipokampus bölgelerinin diseksiyonu sonrası elde edilen hücrelerden poli-D-lizin kaplı 6 kuyucuklu plate’e hem ekilip hem de ko-kültür çalışması yapacak kadar yeterli sayıda hücre elde edilemediği görüldüğü için sadece hipokampus kültürü ve ko-kültürü çalışmalarında poli-D-lizin kaplı 6 kuyucuklu plate (9.5 cm²) yerine alanı daha küçük olan poli-D-lizin kaplı 12 kuyucuklu plate’lerin (3.8 cm²)

kullanılmıştır. Bu nedenle hipokampus için 12, serebellum ve korteks için 6 kuyucuklu plate'ler kullanılarak hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Resim 2'de hücre kültürü çalışmalarına ait temsili görüntüler verilmiştir.



Resim 2. Temsili Hücre kültürü görüntüleri. (A) Korteks kontrol, (B) Korteks transgenik, (C) Korteks ko-kültür, (D) Serebellum kontrol, (E) Serebellum transgenik, (F) Serebellum ko-kültür, (G) Hipokampus Kontrol, (H) Hipokampus transgenik, (I) Hipokampus ko-kültür

4.2.1 Primer hücre kültürü LC-MS/MS analizi sonuçları

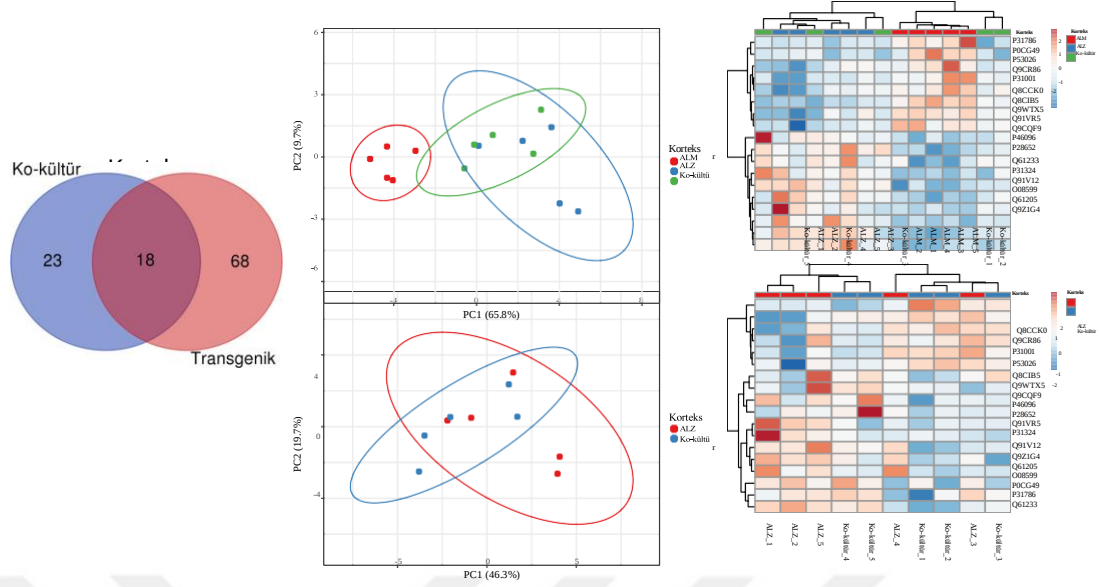
Korteks, hipokampus ve serebellum beyin bölgelerine ait primer hücre kültürü örneklerinin LC-MS/MS ile analizi sonucu elde edilen protein sayıları Tablo 10’da gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla ifade seviyesinde anlamlı farklılık gösteren proteinler $p < 0,05$, özgün peptit ≥ 2 (*unique peptide*) ve değişim katsayısı ≥ 1.3 kriterlerine göre belirlenmiştir. Hipokampus bölgesinde kontrole kıyasla anlamlı ifade farklılığı gösteren protein bulunmamıştır.

Tablo 10. LC-MS/MS ile tanımlanan ve anlamlı farklılık gösteren protein sayıları

	Anlamlı Protein Sayısı		
	Total Protein Sayısı	Transgenik	Ko-Kültür
Korteks	1162	86	41
Serebellum	1079	34	26
Hipokampus	712	0	0

4.2.2 Korteks bölgesine ait LC-MS/MS ile tanımlanan anlamlı proteinler

Korteks bölgesine ait toplam 1162 protein tanımlanmıştır ve bu proteinlerin 86 tanesi transgenik hücre kültürü grubunda, 41 tanesi ise ko-kültür hücre kültürü grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 10). Bu iki hücre kültürü grubu arasında 18 tane ortak protein gözlemlenmiştir. Bu proteinlerden 10 tanesinin ifadesinin kontrole kıyasla arttığı, 8 tanesinin ifadesinin ise azaldığı gözlemlenmiştir. Proteinlerin listesi ve kontrole kıyasla değişim katsayıları Tablo 11’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Korteks bölgesine ait venn diyagramı, PCA analizi, HC analizi

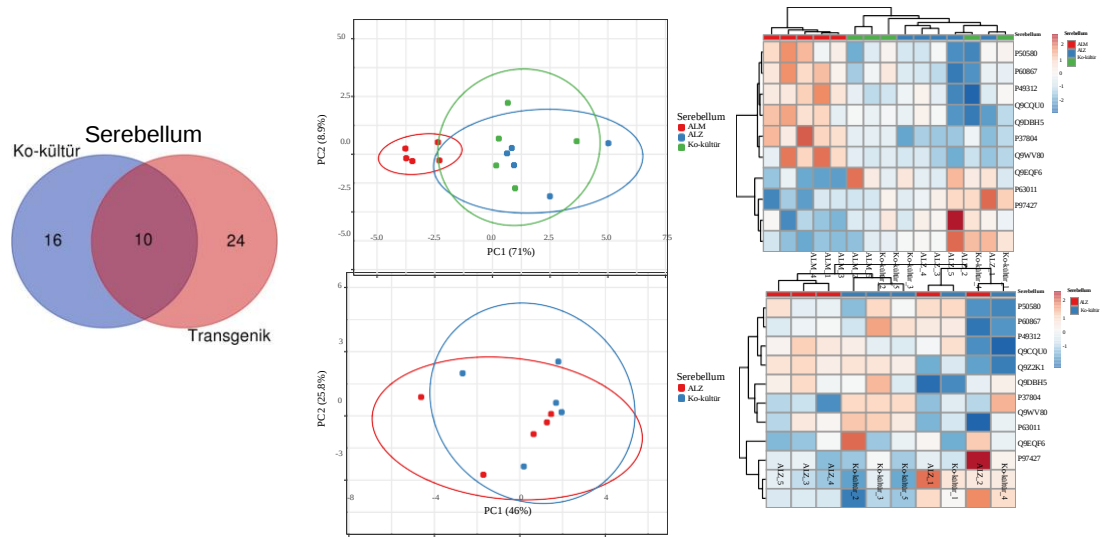
Tablo 11. Korteks bölgesine ait istatistiksel olarak anlamlı proteinlerin listesi

UniProt Accession	Protein	Değişim Katsayısı	
		Ko-kültür	Transgenik
P46096	Synaptotagmin-1	1.94982626	1.850215975
P31324	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	1.65540173	2.325347838
P28652	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta	1.58432022	1.701203181
Q61233	Plastin-2	1.58141681	1.789832835
Q9Z1G4	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a 1	1.49883382	2.061035185
Q61205	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit	1.49741439	2.098159273
Q91VR5	ATP-dependent RNA helicase DDX1	1.46836785	1.312193766
O08599	Syntaxin-binding protein 1	1.37034009	1.982714451
Q91V12	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	1.32819087	1.816441309
Q9CQF9	Prenylcysteine oxidase 1	1.3046343	1.333548662
Q8CCK0	Core histone macro-H2A.2	-2.11882058	-2.53023228
Q8CIB5	Fermitin family homolog 2	-1.62260942	-1.67038852
Q9CR86	Calcium-regulated heat stable protein 1	-1.42938678	-1.78809433
P53026	60S ribosomal protein L10a	-1.40986896	-1.39499571
P0CG49	Polyubiquitin-B	-1.36772286	-1.32617694
Q9WTX5	S-phase kinase-associated protein 1	-1.36592277	-1.58784947
P31786	Acyl-CoA-binding protein	-1.35775958	-1.33486991
P31001	Desmin	-1.34244713	-1.51275297

Korteks bölgesi transgenik ve ko-kültür gruplarına ait kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ortak proteinlerin benzerlik ve farklarını gözlemlemek amacıyla PCA analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 11). Transgenik ve kontrol hücrelerin karışımı olan ko-kültür grubunun transgenik grupla örtüşme göstermesi, hastalıklı hücrelerin (transgenik) sağlıklı hücreleri (kontrol) etkilediğini göstermiştir. Ek olarak, transgenik ve ko-kültür grubunun ikili karşılaştırılması yapılarak grupların örtüştüğü teyit edilmiştir (Şekil 11). Ortak proteinlerin detaylı incelenmesi için ayrıca HC analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 11). Kontrol grubundaki örnekler kendi içinde bir arada kümelenip ayrım gösterirken, transgenik ve ko-kültür grubundaki örneklerin birbirine karışarak kümelenmesi, bu sonuçları doğrulamıştır. Ko-kültür grubunun kontrol değil de transgenik grup ile benzerlik göstermesi nörodejeneratif hücrelerin sağlıklı hücreleri etkilediğini göstermiştir.

4.2.3 Serebellum bölgesine ait LC-MS/MS ile tanımlanan anlamlı proteinler

Serebellum bölgesine ait toplam 1079 protein tanımlanmıştır ve bu proteinlerin 34 tanesi transgenik hücre kültürü grubunda, 26 tanesi ise ko-kültür hücre kültürü grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 10). Bu iki hücre kültürü grubu arasında 10 ortak proteinden 4 tanesinin ifadesinin kontrole kıyasla arttığı, 6 tanesinin ifadesinin ise azaldığı gözlemlenmiştir. Proteinlerin listesi ve kontrole kıyasla değişim katsayıları Tablo 12’de gösterilmiştir.



Şekil 13. Serebellum bölgesine ait venn diyagramı, PCA analizi, HC analizi

Tablo 12. Serebellum bölgesine ait istatistiksel olarak anlamlı proteinlerin listesi

UniProt Accession	Protein	Değişim Katsayısı	
		Ko-kültür	Transgenik
Q9WV80	Sorting nexin-1	1.69810095	1.68718941
P63011	Ras-related protein Rab-3A	1.49623675	1.7294948
P97427	Dihydropyrimidinase-related protein 1	1.33839506	1.53870483
Q9EQF6	Dihydropyrimidinase-related protein 5	1.30904593	1.39902044
P37804	Transgelin	-1.48175602	-1.6629338
P49312	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	-1.44601074	-1.3404375
Q9CQU0	Thioredoxin domain-containing protein 12	-1.42859032	-1.4433432
P50580	Proliferation-associated protein 2G4	-1.41863617	-1.3878279
P60867	40S ribosomal protein S20	-1.3850519	-1.5221587
Q9DBH5	Vesicular integral-membrane protein VIP36	-1.71117205	-2.9554463

Serebellum bölgesi transgenik ve ko-kültür gruplarına ait kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren ortak proteinlerin benzerlik ve farklarını gözlemlemek amacıyla PCA analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 12). Transgenik, kontrol ve ko-kültür gruplarının üçünde örtüşme gözlemlenmesine rağmen, transgenik ve ko-kültür örneklerinin birbirine yakınlık göstermesi hastalıklı hücrelerin

(transgenik) sağlıklı hücreleri (kontrol) etkileyerek kendine benzettiğini göstermiştir. Ek olarak, transgenik ve ko-kültür grubunun ikili karşılaştırılması yapılarak grupların örtüştüğü teyit edilmiştir (Şekil 12). Korteks bölgesinde olduğu gibi ortak proteinlerin detaylı incelenmesi için ayrıca HC analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 12). Kontrol grubundaki örnekler kendi içinde bir arada kümelenip ayrım gösterirken, transgenik ve ko-kültür grubundaki örneklerin birbirine karışarak kümelenmesi, elde edilen sonuçları doğrulamıştır. Serebellum bölgesinde de ko-kültür grubunun kontrol değil de transgenik grup ile benzerlik göstermesi, nörodejeneratif hücrelerin sağlıklı hücreleri etkilediğini göstermiştir.

4.2.4 İfade farklılıkları bulunan proteinlerin yolak analizleri

Korteks ve serebellum hücre kültürü örneklerinden tanımlanan ve anlamlı ifade farklılıkları gösteren proteinlerin biyolojik işlevlerini anlamak, hastalık mekanizmalarını incelemek ve AH ile ilişkisini keşfetmek için Reactome Pathways yazılımı aracılığıyla yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen en anlamlı ilk 5 yolak korteks bölgesi için Tablo 13'te ve serebellum bölgesi için Tablo 14'te listelenmiştir.

Tablo 13. Korteks bölgesine ait proteinlerin Reactome yolak analizi

Yolak Adı	p değeri	Yanlış Keşif Oranı (FDR)
Mitokondriyal Yağ Asidi Beta-Oksidasyonu	1,54E-3	1,38E-1
Demir alınımlı ve Taşınımı	3,52E-3	1,38E-1
Nöreksinler ve Nöroliginler	3,76E-3	1,38E-1
Botulinum Toksin Tip G Toksisitesi	6,1E-3	1,38E-1
Sinapslarda Protein-Protein Etkileşimleri	8,41E-3	1,38E-1

Tablo 14. Serebellum bölgesine ait Reactome yolak analizi

Yolak Adı	<i>p</i> değeri	Yanlış Keşif Oranı (FDR)
CRMP'lerin Sema3a Sinyalizasyonundaki Rolü	8,25E-5	6,18E-3
SARS-CoV-1 Translation Machinery	5,1E-4	1,89E-2
Semaphorin Etkileşimleri	1,29E-3	3,23E-2
SARS-CoV-1 Konakçı Etkileşimleri	3,67E-3	6,6E-2
SARS-CoV-1 Enfeksiyonu	7,18E-3	9,73E-2

Korteks bölgesinde mitokondriyal yağ asidi beta-oksidasyonu, demir alınımlı ve taşınımı, nöreksinler ve nöroliginler, botulinum toksin tip G toksisitesi, sinapslarda protein-protein etkileşimleri ile ilgili yollar, serebellum bölgesinde ise CRMP'lerin Sema3A sinyalizasyonundaki rolü, semaphorin etkileşimleri ve SARS-CoV-1 ile ilgili yollar tespit edilmiştir. Serebellum ve korteks bölgelerinde ortak proteinlere ve yollara rastlanmamıştır. Bu durum, her bölgede farklı yolların aktifleştğini göstermektedir.

Reactome Pathways tarafından tanımlanan yollara ait proteinler ve değişim katsayıları, korteks bölgesi için Tablo 15'te, serebellum bölgesi için Tablo 16'da listelenmiştir.

Tablo 15. Korteks bölgesindeki yollara ait proteinler ve değişim katsayıları

UniProt Accession	Protein	Değişim Katsayısı	
		Ko-kültür	Transgenik
Mitokondriyal Yağ Asidi Beta-Oksidasyonu			
P31786	Acyl-CoA-binding protein	-1.35775958	-1.33486991
Q91V12	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	1.32819087	1.816441309
Demir alınımı ve Taşınımı			
Q9WTX5	S-phase kinase-associated protein 1	-1.36592277	-1.58784947
Q9Z1G4	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a 1	1.49883382	2.061035185
Nöreksinler ve Nöroliginler			
O08599	Syntaxin-binding protein 1	1.37034009	1.982714451
P46096	Synaptotagmin-1	1.94982626	1.850215975
Botulinum Toksin Tip G Toksisitesi			
P46096	Synaptotagmin-1	1.94982626	1.850215975
Sinapslarda Protein-Protein Etkileşimleri			
O08599	Syntaxin-binding protein 1	1.37034009	1.982714451
P46096	Synaptotagmin-1	1.94982626	1.850215975

Tablo 16. Serebellum bölgesindeki yolaklara ait proteinler ve değişim katsayıları

UniProt Accession	Protein	Değişim Katsayısı	
		Ko-kültür	Transgenik
CRMP’lerin Sema3a Sinyalizasyonundaki Rolü			
P97427	Dihydropyrimidinase-related protein 1	1.33839506	1.53870483
Q9EQF6	Dihydropyrimidinase-related protein 5	1.30904593	1.39902044
SARS-CoV-1 Translation Machinery			
P60867	40S ribosomal protein S20	-1.3850519	-1.5221587
P49312	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	-1.44601074	-1.3404375
Semaphorin Etkileşimleri			
P97427	Dihydropyrimidinase-related protein 1	1.33839506	1.53870483
Q9EQF6	Dihydropyrimidinase-related protein 5	1.30904593	1.39902044
SARS-CoV-1 Konakçı Etkileşimleri			
P60867	40S ribosomal protein S20	-1.3850519	-1.5221587
P49312	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	-1.44601074	-1.3404375
SARS-CoV-1 Enfeksiyonu			
P60867	40S ribosomal protein S20	-1.3850519	-1.5221587
P49312	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	-1.44601074	-1.3404375

4.3 MALDI-MSI Analizlerinin Sonuçları

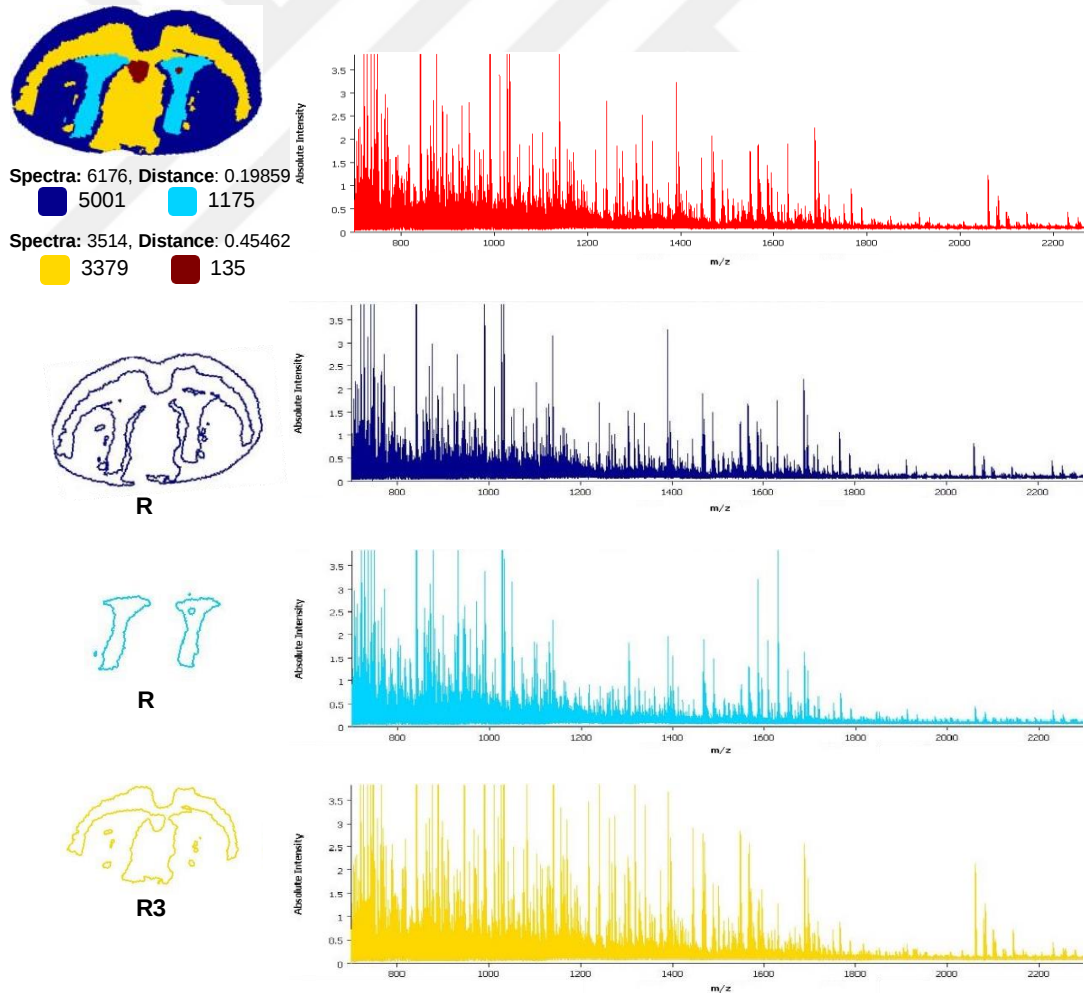
4.3.1 LC-MS/MS Analizi sonuçları

MALDI-MSI analizleri sonucunda elde edilen istatistiksel olarak anlamlı m/z değerlerinin tanımlanması için yenidoğan beyin doku kesiti üzerinden ve direk doku kesitinden elde edilen peptitler ile LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi. LC-MS/MS analizleri için, MALDI-MSI analizlerinde her bir beyin dokusu için kullanılan kesitlere ardışık doku kesitleri kullanıldı. LC-MS/MS analizleri sonucunda doku üzeri tripsinizasyon sonucunda elde edilen triptik peptitlerden 1.29 ppm ortalama peptit hata oranı (*mean peptide error*) ile 161 adet protein tanımlanırken, direk doku kesitlerinden elde edilen triptik peptitlerden 0.66 ppm ortalama peptit hata oranıyla 2254 adet protein tanımlandı. Bu proteinlerden elde edilen peptit sekansları MALDI-MSI

analizlerinden elde edilen istatistiksel olarak anlamlı m/z değerlerinin tanımlanmasında kullanıldı.

4.3.2 MALDI-MSI Analizi Sonuçları

Yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol fare beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI analizleri ile elde edilen görüntülerinin, SCiLS Lab yazılımıyla gerçekleştirilen otomatik segmentasyon analizi sonucunda R1, R2 ve R3 olmak üzere 3 farklı bölge tanımlandı. Bu bölgelere ait temsili segmentasyon haritası ve spektrumları Şekil 13'te gösterilmiştir. 3 bölgeye ait m/z ve intensite değerleri kendi içlerinde 5xFAD ve kontrol grubu olarak (örneğin R1-5xFAD vs R1-LM) istatistiksel testler kullanılarak karşılaştırıldı.

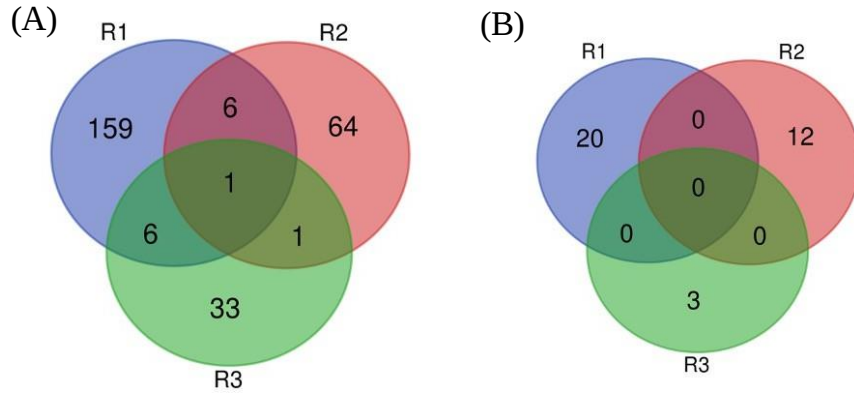


Şekil 14. R1, R2 ve R3 bölgelerine ait segmentasyon haritaları ve spektrumları

Yenidoğan 5xFAD ve kontrol beyin dokusu kesitlerinin segmentasyon analizi sonucunda elde edilen verilerin birbirleriyle karşılaştırılabilir hale getirilmesi için, önce her bölgeye ait intensite değerlerine normalizasyon faktörü kullanılarak kendi içlerinde total intensite normalizasyonu uygulandı. Sonra, mMass yazılımı ile tripsin enziminin triptik otoliz peptitleri kullanılarak internal kalibrasyon gerçekleştirildi ve m/z değerleri 0.04 Da aralıklarla gruplandırıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri sonucunda, yenidoğan 5xFAD ve kontrol dokularında R1 bölgesi için tekrarsız (*non-redundant*) 172 adet m/z değeri, R2 için tekrarsız 72 m/z değeri ve R3 için tekrarsız 41 m/z değeri istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 17). Her bölgeye ait istatistiksel olarak anlamlı m/z değerleri, yenidoğan beyin doku kesiti üzerinden ve direk doku kesitinden LC-MS/MS analizleriyle elde edilen peptit sekans bilgileri kullanılarak ve <1 ppm hata oranının altında eşleştirilerek R1, R2 ve R3 bölgelerinde toplam 35 protein tanımlandı (Tablo 17). Tanımlamada, MALDI-MSI analizlerinde doku yüzeyindeki peptidler daha kolay iyonlaşabildiği için doku üzeri tripsinizasyon ile elde edilen bilgiye öncelik tanındı. Eğer doku üzeri tripsinizasyon ile düşük ppm’de eşleştirilme yapılamamışsa, direk doku kesitlerinden elde edilen protein bilgisi ile eşleştirme gerçekleştirildi. Yöntem bölümünde açıklandığı gibi, analizlerin çeşitli aşamalarında kullanılan sıkı parametreler nedeniyle yanlış tanımlama olasılığı en aza indirildi.

Tablo 17. R1, R2 ve R3 bölgelerine ait m/z değerleri ve tanımlanan protein sayıları

	R1	R2	R3
0,4 Da Aralıklarla Gruplandırma	836	637	930
Cohens <i>d</i> -değeri > 0.8	429	282	290
<i>d</i> > 0.8 ve <i>p</i> < 0.05	172	72	41
Tanımlanan Proteinler (< 1 ppm)	20	12	3
Alzheimer Hastalığı ile İlişkilendirilen Proteinler	16	7	3



Şekil 15. Bölgelere özgü m/z değerlerine ve tanımlanan proteinlere ait Venn diyagramı (A) R1, R2 ve R3 bölgelerine ait istatistiksel olarak anlamlı m/z değerlerinin ($d > 0,8$, $p < 0,05$) Venn diyagramı. (B) 1 ppm hata oranının altında tanımlanan istatistiksel olarak anlamlı proteinlerin Venn diyagramı.

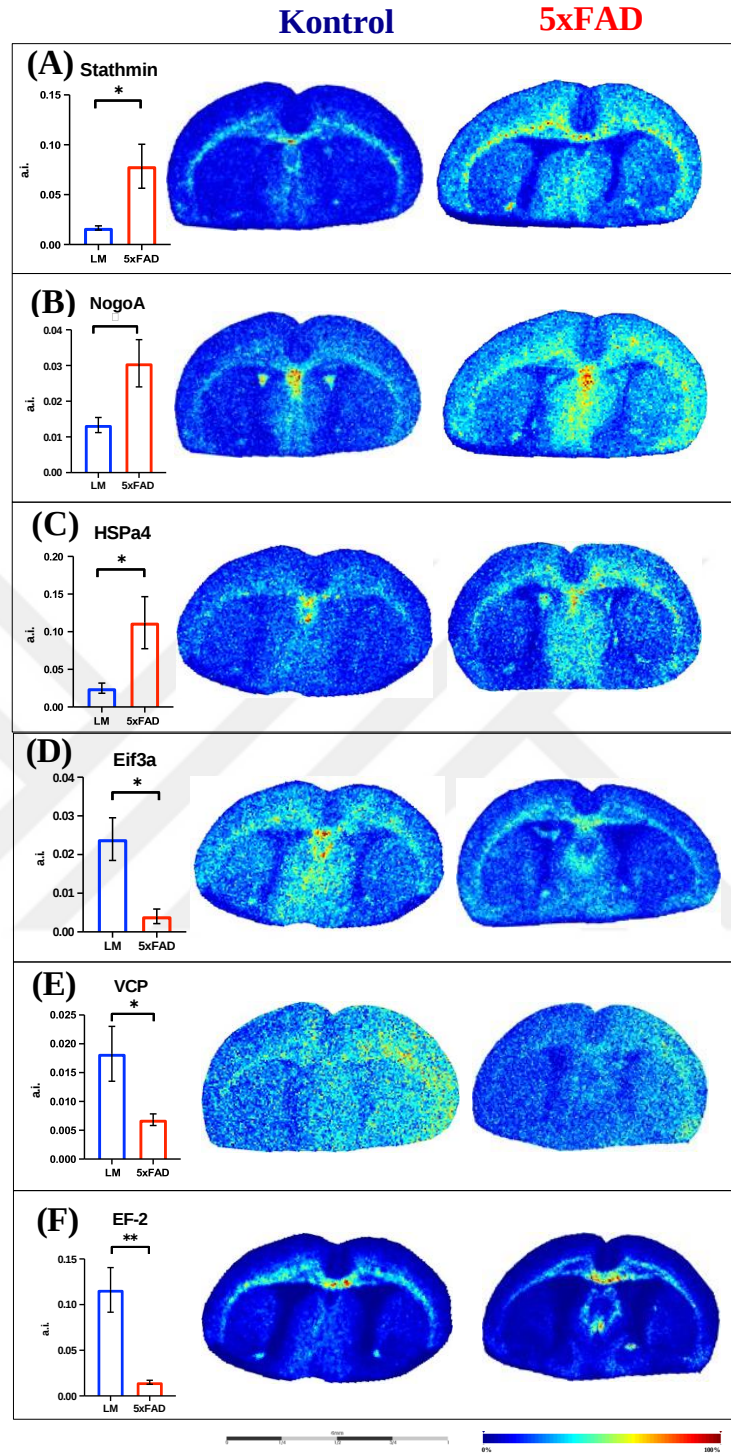
Venn diyagramında gösterildiği üzere, tüm bölgelerde ortak sadece bir adet m/z değeri bulundu (Şekil 14A). Protein tanımlamalarından sonra, her bölgenin farklı istatistiksel olarak anlamlı proteinleri (R1'de 20 protein, R2'de 12 protein ve R3'te 3 protein) ifade ederek kendi benzersiz proteomuna sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 14B). Tanımlanan 35 proteinden 17 tanesinin (sırasıyla 9, 5 ve 3 protein R1, R2 ve R3 bölgesinde) ifadesinin arttığı ve 18 tanesinin ise (sırasıyla 11 ve 7 protein R1 ve R2 bölgesinde) ifadesinin azaldığı görüldü (Tablo 18 ve Tablo 19). Tanımlanan 35 proteinden 6 proteinin doku kesiti üzerindeki dağılımları ve intensite grafikleri Şekil 15'te temsili olarak gösterilmiştir.

Tablo 18. R1, R2 ve R3 bölgelerine ait ifadesi artan proteinlerin listesi

Region	MALDI- MSI observed m/z	LC- MS/MS m/z	Accession	Description	ppm error
	887.4574	887.4581	Q9D394	Protein RUFY3	-0.844998
	902.4613	902.4618	Q9Z1F9	SUMO-activating enzyme subunit 2	-0.540411
	1104.5905	1104.5895	P46935	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	0.926136
	1108.5384	1108.5382	Q8K0E8	Fibrinogen beta chain	0.303102
R1	1139.5884	1139.5878	Q6QNU9	Toll-like receptor 12	0.545811
	1165.5494	1165.5484	P54227	Stathmin	0.894
	1178.5721	1178.5722	Q99P72	Reticulon-4 / Neurite outgrowth inhibitor	0.013576
	1793.8915	1793.8916	O08788	Dynactin subunit 1	-0.020626
	2247.1006	2247.1	P31001	Desmin	0.297717
	1461.7374	1461.7373	P97792	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog	0.138876
	1514.7722	1514.771	Q6ZQA6	Immunoglobulin superfamily member 3	0.79682
R2	1555.8108	1555.8115	P47738	Aldehyde dehydrogenase	-0.412004
	1583.7737	1583.7747	P17183	Gamma-enolase / Neuron-specific enolase	-0.644031
	1708.8237	1708.8249	P35802	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	-0.685851
	1495.7011	1495.7023	Q61316	Heat shock 70 kDa protein 4	-0.786253
R3	954.4829	954.4832	P17751	Triosephosphate isomerase	-0.354328
	1861.9001	1861.9113	Q62419	Endophilin-A2	0.262308

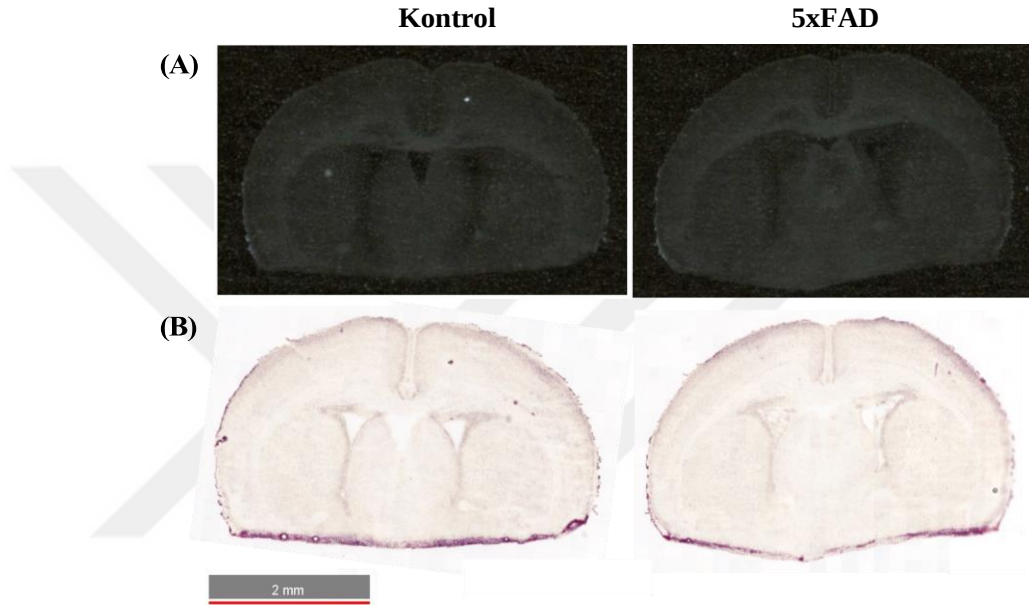
Tablo 19. R1, R2 ve R3 bölgelerine ait ifadesi azalan proteinlerin listesi

Region	MALDI- MSI observed m/z	LC- MS/MS m/z	Accession	Description	ppm error
	1240.6511	1240.6507	P58252	Elongation factor 2	0.360295
	1410.7230	1410.7237	P23116	Eukaryotic translation initiation factor 3	-0.447288
	1559.8125	1559.8118	Q8R570	Synaptosomal-associated protein 47	0.516729
	1708.8854	1708.8839	Q7TPM6	Fibronectin type III and SPRY domain- containing protein 1	0.862551
	1764.8488	1764.8487	Q8BP47	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	0.145622
	1822.8915	1822.893	Q8K310	Matrin-3	-0.784467
R1	1825.9754	1825.9767	Q61033	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms alpha/zeta	-0.679636
	1859.9383	1859.9399	Q6R0H7	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha	-0.818306
	1989.9668	1989.9664	Q9CY58	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	0.182415
	2057.9601	2057.9622	Q91XV3	Brain acid soluble protein 1	-0.983497
	2151.0901	2151.0903	Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase / Valosin-containing protein	-0.095301
	1002.5284	1002.5578	P63085	Mitogen-activated protein kinase	-0.380039
	1089.5394	1089.5398	O70570	Polymeric immunoglobulin receptor	-0.21477
	1171.5704	1171.5711	P60710	Actin, cytoplasmic	-0.486526
R2	1173.5790	1173.5786	P46735	Unconventional myosin-Ib	0.304198
	1299.6586	1299.6579	P61202	COP9 signalosome complex subunit 2	0.507057
	1524.7556	1524.7553	Q9CQE8	UPF0568 protein C14orf166 homolog	0.197409
	1592.6879	1592.6863	P83917	Chromobox protein homolog 1	0.977594



Şekil 16. 5xFAD ve kontrol (LM) beyin doku kesitlerine ait istatistiksel olarak anlamlı m/z değerlerinin doku üzerindeki dağılımları ve intensite grafikleri (A) Stathmin, (B) NogoA, (C) Hspa4, (D) eIF3A, (E) VCP, (F) EF-2. Veriler, bar grafiği ve ortalama $\pm$ SEM ile sunulmuştur. İntensite değerleri için istatistiksel olarak anlamlı farklılık $^*(p < 0,05)$, $^{**}(p < 0,01)$ ile gösterilmiştir. (a.i.) auto intensite değerlerini temsil etmektedir. Renk gradyanı, intensite seviyelerini ve siyah-gri renk çubuğu ise beyin doku kesitlerinin boyutunu göstermektedir.

MALDI-MSI analizlerinde kullanılan lamalar, doku kesitlerinin anatomisini belirlemek amacıyla hematoksilin ve eosin (H&E) ile boyandı (Şekil 16). Prenatal fare beyin atlasına göre, R1 bölgesi büyük ölçüde korteksi ve kaudat putameni temsil ederken, R2 bölgesinin ventriküler ve subventriküler bölgeleri, R3 bölgesinin ise korpus kallozumu ve septal çekirdekleri (medial septal çekirdek ve lateral septal çekirdek) temsil ettiği gözlemlendi.



Şekil 17. Histolojik tanımlamalar için kullanılan görüntüler (A) MALDI-MSI analizleri için kullanılan koronal doku kesitlerinin taranmış optik görüntüleri. (B) MALDI-MSI yöntemi ile analiz edilen kesitlerin H&E boyaması. (H&E: hematoksilin ve eozin)

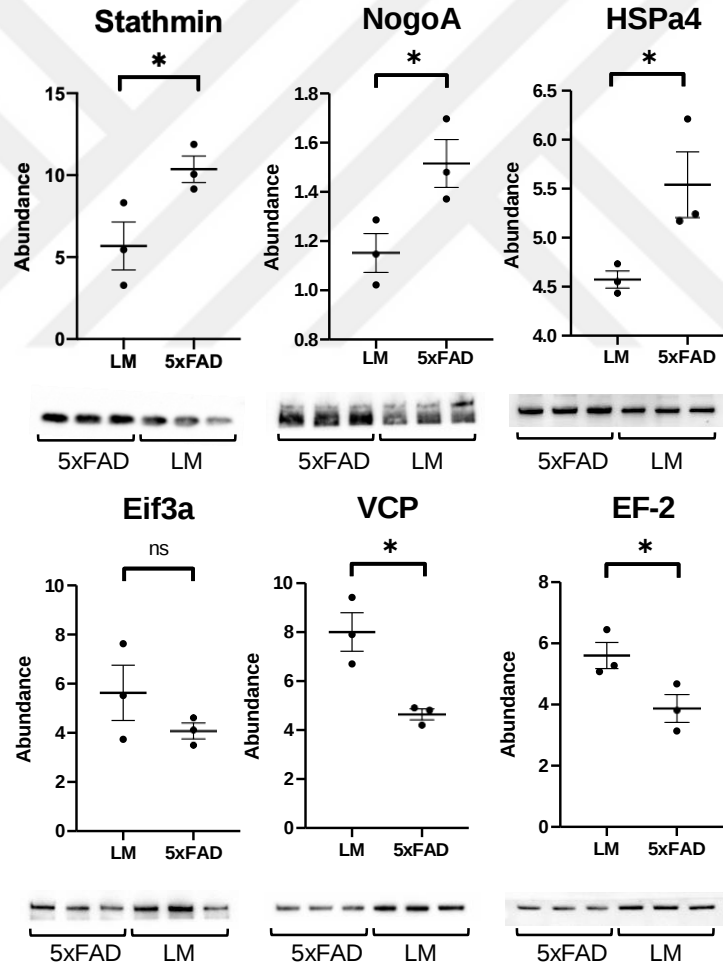
Yapılan detaylı literatür taraması sonucunda, tanımlanan 35 proteinden yalnızca 26 tanesi AH ile ilişkilendirilmiştir. AH ile ilişkilendirilen proteinlerin listesi, kontrole kıyasla gösterdikleri artış veya azalış ve literatür bilgileri Tablo 20’de gösterilmiştir. Geriye kalan 9 proteinin AH hastalığı ile ilişkisi ilk kez bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Anlamlı farklılık gösteren 26 proteinin AH ile ilişkisini detaylı incelemek için proteinler 5 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar, sinaptik plastisite ile ilişkili proteinler, aksonal dejenerasyon, otofaji, nörokoruyucu özelliklere sahip proteinler ve diğerleri olarak adlandırılan proteinleri içermektedir.

Tablo 20. R1, R2 ve R3 bölgesine ait AH ile ilişkilendirilen proteinlerin listesi

	Accession	Protein Name	Short Name	5x FAD	AD Patient	AD Mouse Model	
R1	Q9D394	Protein RUFY3	Rufy3	↑	zelaya2015	↑	bastrup2020 ↑
	Q9Z1F9	SUMO-activating enzyme subunit2	Sac2	↑	lee2013	*	lee2014 *
	P46935	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	Nedd4	↑	kwak2012	↑	
	Q8K0E8	Fibrinogen betachain	Fgb	↑	rehiman2020	↑	
	Q6QNU9	Toll-like receptor 12	Tlr12	↑	gambuzza2014 arroyo2011	*	*
	P54227	Stathmin	Stmn	↑	cheon2001 hayashi2006	↓	martin2008 chadwick2010 ↑
	Q99P72	Reticulon-4 / Neurite outgrowth inhibitor	Nogo	↑	kulczynska-przybik2021	↑	masliah2010 *
	P31001	Desmin	Des	↑			chadwick2010 *
	P58252	Elongation factor2	EF-2	↓			beckelman2019 *
	P23116	Eukaryotic translation initiation factor 3	eIF3A	↓	ivanov2016	↑	bastrup2020 *
	Q8R570	Synaptosomal-associated protein 47	SNAP-47	↓	berezki2018	↓	
	Q8K310	Matrin-3	Matr3	↓	yamoah2020 malik2021	*	bastrup2020 ↓
	Q61033	Lamina-associated polypeptide 2	Tmpo	↓	seyfried2017	*	neuner2017 *
	Q9CY58	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	PAI-RBP1	↓	barker2012 angelucci2019	↑	*
	Q91XV3	Brain acid soluble protein 1	Basp1	↓	dayon2018 drummond2017	↓	delfino2019 ↓
R2	Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase/ Valosin-containing protein	VCP	↓	cenini2014 kaleem2007	↓	*
	P97792	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog	Car	↑	zussy2016	*	chadwick2010 ↑
	P47738	Aldehyde dehydrogenase	Aldh	↑	michel2010 grünblatt2014	↑	
	P17183	Gamma-enolase	NSE	↑	schmidt2014 hafner2013	↑	*
	P35802	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	M6a	↑	muraoka2020 quiroz-baez2020 chiasserini2020	↑	lachén-montes2016 ↑
	P63085	Mitogen-activated protein kinase	MAPK 1	↓	gerschutz2014 du2019	*	du2019 ↓
R3	P61202	COP9 signalosome complex subunit 2	SGN2	↓	wang2013	*	
	Q61316	Heat shock 70 kDa protein 4	Hspa4	↑	hunt2020 silva2014	*	campanella2018 lu20114 *
	P17751	Triosephosphate isomerase	TIM	↑	tajes2014 tajes2013 hipkiss2019	*	*
	Q62419	Endophilin 2	Endop2	↑	zhang2017	*	

4.4 Western Blot Yöntemi Validasyon Sonuçları

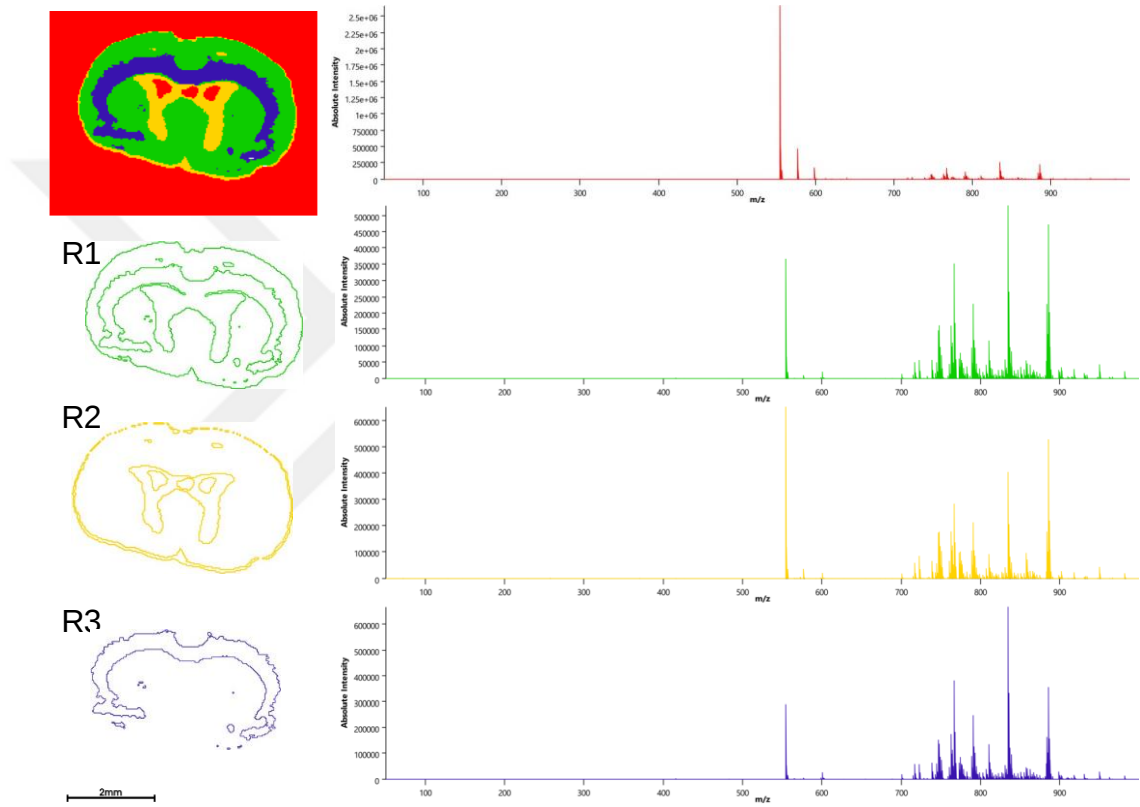
MALDI-MSI analizleri ile elde edilen istatistiksel olarak anlamlı proteomik sonuçların validasyonu amacıyla, AH ile ilişkilendirilen 6 protein (Stathmin, NogoA, HSPa4, Eif3a, VCP ve EF-2) ile Western blot analizleri gerçekleştirildi. Bu proteinler R1 ve R3 bölgesinden yukarıda tanımlanan 5 grubu temsil edecek şekilde seçildi. Böylelikle, MALDI-MSI analizleri 2 farklı açıdan doğrulandı. Eif3a dışındaki tüm proteinlerin Western blot sonuçları istatistiksel olarak anlamlı ve MALDI-MSI sonuçları ile uyumlu bulundu. eIF3A validasyon sonucu da MALDI-MSI sonuçları ile uyumlu bulunurken, istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmedi.



Şekil 18. Stathmin, NogoA, HSPa4, Eif3a, VCP ve EF-2 proteinlerine ait Western blot görüntüleri. İstatistiksel anlamlılık, normalite testi sonuçlarına bağlı olarak independant t-test ile değerlendirilmiştir (* $p < 0,05$, ns: *not significant*, anlamlı değil). Veriler, dağılım grafiği ve ortalama $\pm$ SEM ile gösterilmiştir. Grafiklerin altında proteinlere ait Western blot görüntüleri verilmiştir.

4.5 DESI-MSI Analizlerinin Sonuçları

Yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol fare beyin doku kesitlerinde DESI-MSI analizleri ile elde edilen lipid dağılım görüntülerinin, SCiLS Lab yazılımıyla gerçekleştirilen otomatik segmentasyon analizi sonucunda R1, R2 ve R3 olmak üzere 3 farklı bölge tanımlandı. Bu bölgelere ait temsili segmentasyon haritası ve spektrumları Şekil 19’da gösterilmiştir.



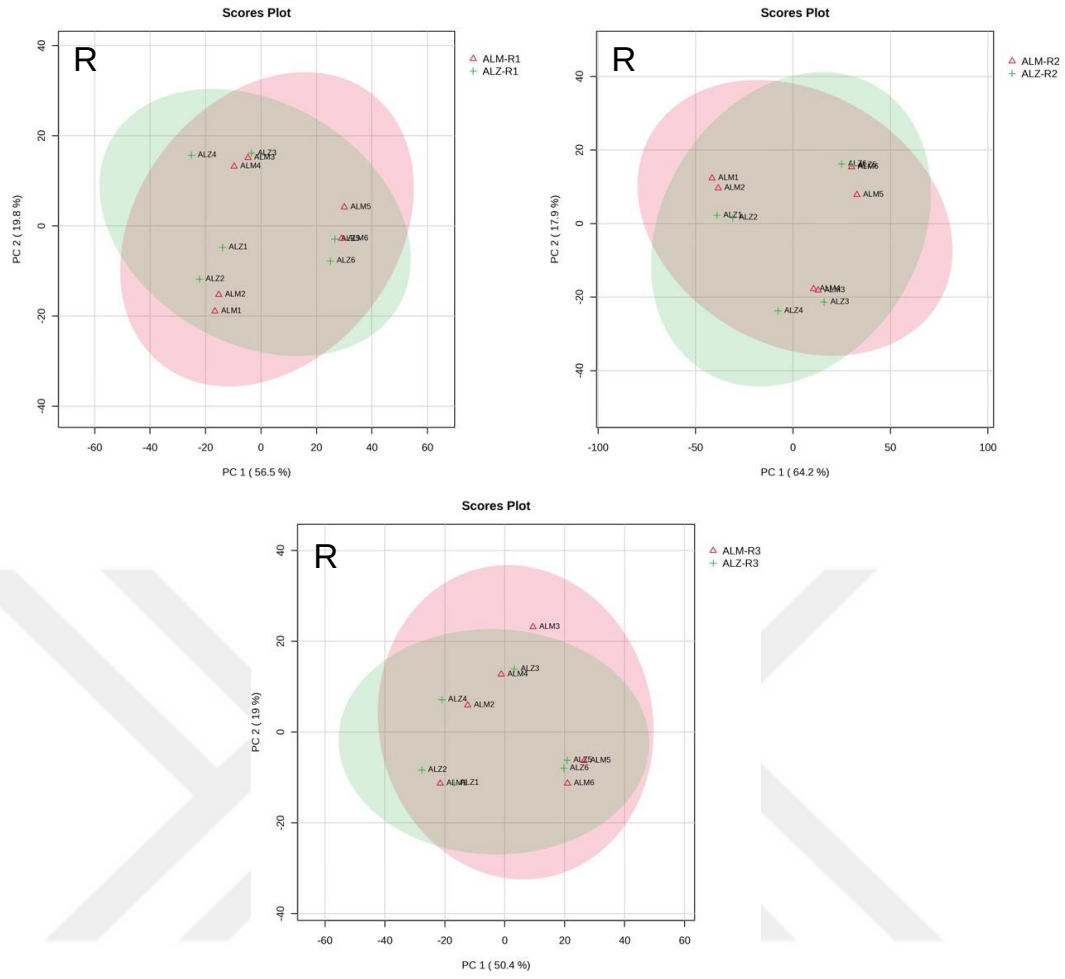
Şekil 19. R1, R2, R3 bölgelerine ait segmentasyon haritaları ve spektrumları

SCiLS Lab yazılımı tarafından pik seçimi (*peak picking*) sonucunda elde edilen her bir beyin dokusunda ait m/z değerleri, her bir bölge (R1, R2, R3) için tek bir liste altında toplandı. R1 bölgesi için 366 adet m/z değeri, R2 bölgesi için 326 adet m/z değeri ve R3 bölgesi için 278 adet m/z değeri elde edildi. Ardından, 3 bölgeye ait m/z ve intensite değerleri kendi içlerinde 5xFAD transgenik ve kontrol grubu (örneğin R1-5xFAD vs R1-LM) olarak çevrimiçi MetaboAnalyst yazılımı aracılığıyla istatistiksel testler kullanılarak karşılaştırıldı. DESI-MSI analizlerinden elde edilen verilerin birbirleriyle karşılaştırılabilir hale getirilmesi için, öncelikle MetaboAnalyst yazılımı

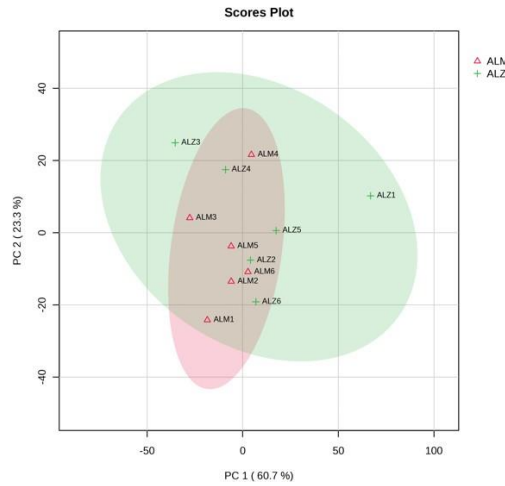
ile total intensite normalizasyonu uygulandı ve sonrasında normalize edilen m/z ve intensite değerleri ile PCA analizi gerçekleştirildi. PCA analizi sonucunda R1, R2 ve R3 bölgelerinde 5xFAD transgenik ve kontrol grubu arasında belirgin bir ayrım gözlemlenmedi.

Yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol fare beyin doku kesitlerinin düşük ağırlıklı metabolit metodu kullanılarak DESI-MSI analizleri sonucunda elde edilen görüntülerinin SCiLS Lab yazılımıyla gerçekleştirilen otomatik segmentasyon analizi sonucunda doku kesitlerinde net bir bölgesel ayrım gözlemlenmedi. Bu nedenle, istatistiksel analizlere bölgesel ayrım gözlenmeksizin tüm doku kesiti üzerinden pik seçimi sonucunda elde edilen 190 m/z ve intensite değerleri ile devam edildi. Verilerin birbirleriyle karşılaştırılabilir hale getirilmesi için, öncelikle MetaboAnalyst yazılımı ile total intensite normalizasyonu uygulandı ve sonrasında normalize edilen m/z ve intensite değerleri ile PCA analizi gerçekleştirildi. PCA analizi sonucunda 5xFAD transgenik ve kontrol grubu arasında belirgin bir ayrım gözlemlenmedi.

Elde edilen sonuçlar, her iki grubun (5xFAD transgenik vs kontrol) metabolomik profillerinin (hem lipit hem de düşük ağırlıklı metabolitler) benzer olduğunu ve 5xFAD transgenik ve kontrol beyin dokuları arasında yenidoğan seviyesinde metabolomik ifade farklılıkları bulunmadığını düşündürmektedir. Lipit metodu kullanılarak elde edilen m/z ve intensite değerlerine ait PCA analizi sonuçları Şekil 20 ve düşük ağırlıklı metabolit metodu kullanılarak elde edilen verilere ait PCA analizi sonucu ise Şekil 21’de gösterilmiştir.



Şekil 20. R1, R2 ve R3 bölgelerine ait m/z ve intensite değerlerinin PCA analizleri



Şekil 21. Düşük ağırlıklı metabolit metodu sonucunda elde edilen m/z ve intensite değerlerine ait PCA analizi (ALM: Kontrol, ALZ: 5xFAD transgenik)

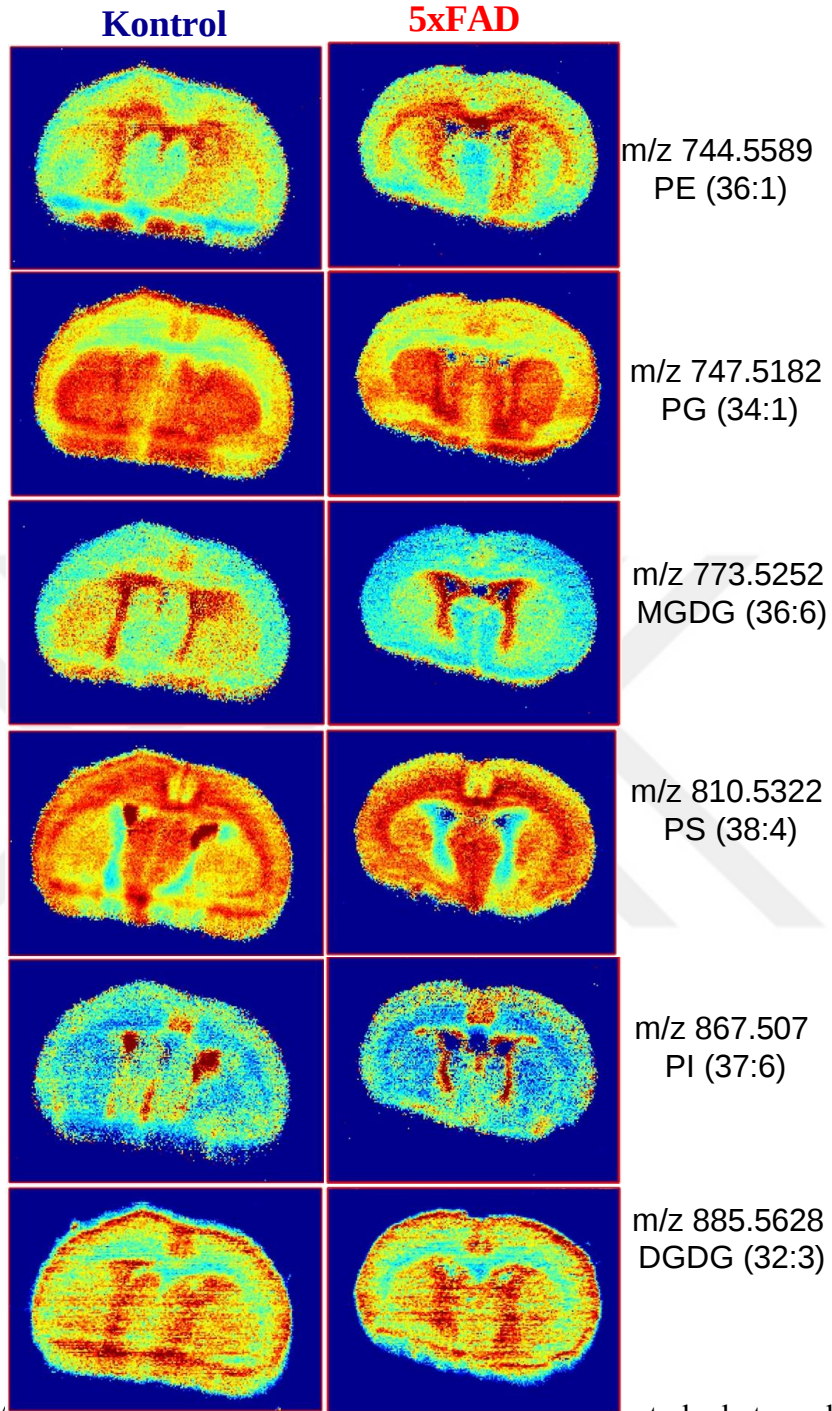
5xFAD transgenik ve kontrol beyin dokuları arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar görülmemesine rağmen her iki metot sonucunda elde edilen m/z değerleri çevrimiçi LIPID MAPS (www.lipidmaps.org) ve Metabolomics Workbench (www.metabolomicsworkbench.org) veritabanları kullanılarak en düşük ppm hata oranı ile ayrı ayrı tanımlandı. R1, R2 ve R3 bölgesine ait toplam 40 lipit tanımlandı ve yapılan literatür taraması sonucunda bu lipitlerden 8 tanesinin AH çalışmalarında gözlemlendiği tespit edildi (Tablo 21). Analizler sonucunda, R1 bölgesinde 5 lipit, R2 bölgesinde 15 lipit ve R3 bölgesinde 20 lipitin göreceli olarak arttığı gözlemlendi. Düşük ağırlıklı metabolit metodu ile gerçekleştirilen DESI-MSI analizleri sonucunda elde edilen 190 adet m/z değerinden 7 adet tanımlama gerçekleştirildi (Tablo 22). Tanımlanan lipit ve düşük ağırlıklı metabolitlerin doku kesiti üzerindeki dağılımları Şekil 22 ve Şekil 23'te temsili olarak gösterilmiştir.

Tablo 21. Lipit metodu kullanılarak tanımlanan metabolitlerin listesi

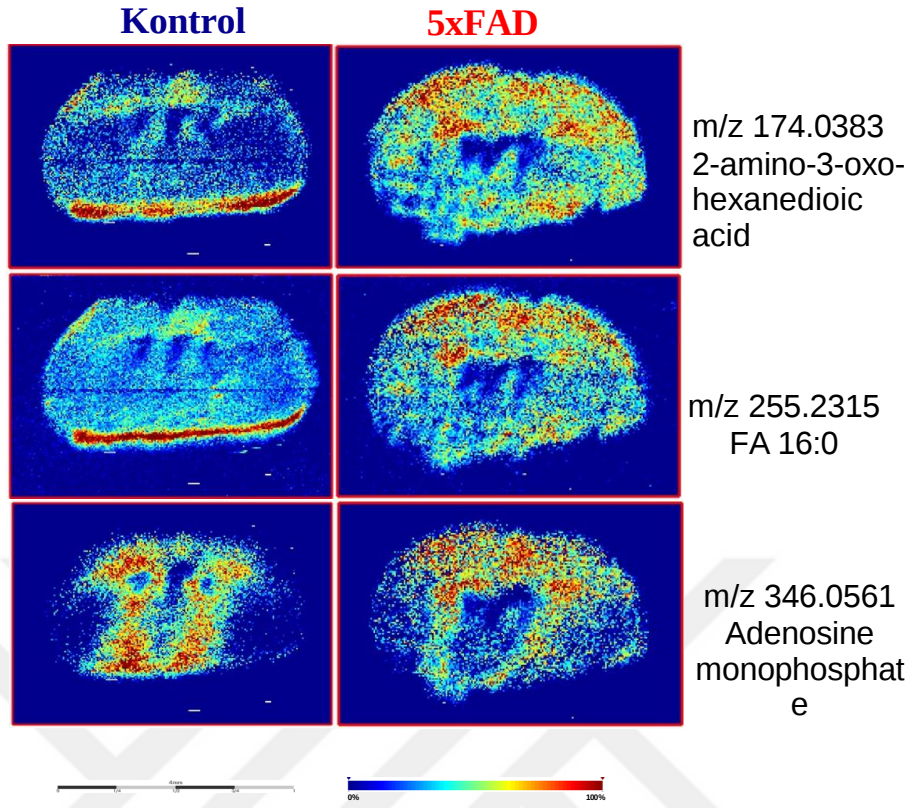
DESI m/z	LipidMaps m/z	Tanımlama	Formül
732.5211	732.5185	PS O-33:1	C39H76NO9P
738.5032	738.5079	PE 36:4	C41H74NO8P
744.5589	744.5549	PE 36:1	C41H80NO8P
747.5182	747.5182	PG 34:1	C40H77O10P
748.5155	748.5134	PS 33:0	C39H76NO10P
751.5406	751.5366	MGDG 34:3	C43H76O10
760.5119	760.5134	PS 34:1	C40H76NO10P
762.568	762.5655	PS O-35:0	C41H82NO9P
764.5278	764.5236	PE 38:5	C43H76NO8P
766.5437	766.5392	PE 38:4	C43H78NO8P
773.5252	773.5209	MGDG 36:6	C45H74O10
774.5314	774.5291	PS 35:1	C41H78NO10P
775.5389	775.5366	MGDG 36:5	C45H76O10
776.5478	776.5447	PS 35:0	C41H80NO10P
778.5435	778.5392	PC 36:5	C44H78NO8P
780.5183	780.5185	PE 38:5; O	C43H76NO9P
786.5252	786.5291	PS 36:2	C42H78NO10P
788.5202	788.5236	PE 40:7	C45H76NO8P
792.5519	792.5549	PE 40:5	C45H80NO8P
794.5357	794.5342	PS O-38:5	C44H78NO9P
795.5427	795.5417	FA 48:10;O7	C48H76O9
796.5511	796.5498	PS O-38:4	C44H80NO9P
806.5434	806.5458	SHexCer 36:1;O2	C42H81NO11S
807.5388	807.5393	PI O-33:1	C42H81O12P
810.5322	810.5291	PS 38:4	C44H78NO10P
812.5339	812.5295	IPC 34:0;O4	C40H80NO13P
816.5523	816.5549	PE 42:7	C47H80NO8P
818.5689	818.5705	PE 42:6	C47H82NO8P
820.5085	820.5134	PS 39:6	C45H76NO10P
833.5197	833.5186	PI 34:2	C43H79O13P
834.5762	834.5771	SHexCer 38:1;O2	C44H85NO11S
836.5537	836.5543	Dideoxymycobactin	C47H75N5O8
838.5638	838.5604	PS 40:4	C46H82NO10P
840.5787	840.576	PS 40:3	C46H84NO10P
858.5318	858.5291	PS 42:8	C48H78NO10P
859.534	859.5342	PI 36:3	C45H81O13P
867.507	867.5029	PI 37:6	C46H77O13P
882.5276	882.5291	PS 44:10	C50H78NO10P
885.5628	885.5581	DGDG 32:3	C47H82O15
933.5452	933.5499	PI 42:8	C51H83O13P

Tablo 22. Düşük ağırlıklı metabolit metodu ile tanımlanan metabolitlerin listesi

DESI m/z	LipidMaps m/z	Tanımlama	Formül
171.1389	171.1391	FA (10:0)	C10H20O2
174.0383	174.0408	2-amino-3-oxo-hexanedioic acid	C6H9NO5
175.0273	175.0248	FA (6:2;O4)	C6H8O6
191.0193	191.0197	FA (6:2;O5)	C6H8O7
255.2315	255.233	FA 16:0	C16H32O2
283.2613	283.2612	Oleic acid	C18H32O2
346.0561	346.0558	Adenosine monophosphate	C10H13N5O7P



Şekil 22. 5xFAD ve Kontrol grupları için MS/MS yöntemiyle tanımlanan m/z değerlerinin doku üzerindeki dağılımları



Şekil 23. 5xFAD ve kontrol beyin doku kesitlerinde metabolit metoduyla tanımlanan m/z değerlerinin doku üzerindeki dağılımları

5 TARTIŞMA

Demansın en yaygın formu olan AH, beyinde atrofi ile birlikte hafıza ve bilişsel fonksiyonların kaybolması ile tanımlanan ve nöropatolojik olarak ekstraselüler SP'ler, intraselüler NFY'ler, nöroinflamasyon, nöron ve sinaps kaybıyla karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır (88). AH'ye yönelik tedaviler yalnızca semptomatik iyileşme sağlarken, nöropatolojik durumu değiştirmeye yönelik tedaviler eksik kalmaktadır. Bu durumun en temel sebebi AH'nin moleküler mekanizmalarının tümüyle anlaşılamamış olmasından kaynaklanmaktadır. *Post-mortem* AH beyin dokusu kullanılarak yapılan çalışmalar, hastalık sürecinin sonunda mevcut olan moleküler değişiklikler hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Ancak bu çalışmalar, hastalık patolojisinin hangi noktada başladığını ve bu başlangıç noktasında meydana gelen moleküler değişiklikleri açıklamada sınırlı kalmaktadır. AH fare modelleri, hastalığın başlangıcında ve ilerlemesinde beyinde meydana gelen moleküler değişikliklerin aydınlatılmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle, çeşitli AH fare modelleri kullanılarak, hastalığın sebeplerinin ve oluşum mekanizmalarının aydınlatılmasını hedef alan temel çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında, yenidoğan 5xFAD beyin dokusundaki proteomik ve metabolomik değişiklikler bölgesel olarak incelenmiş ve elde edilen bilgilerin erken dönem nörodejenerasyon ile ilişkisi araştırılmıştır. Ayrıca, ko-kültür deneyleri ile yenidoğan 5xFAD farelerde hasta ve sağlıklı nöron profillerinin birbiri üzerine etkisi incelenmiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda, yenidoğan farelerde farklı beyin bölgelerini kapsayan AH'ye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

5.1 Primer Hücre Kültürü

Tez çalışmasının ilk basamağında nörodejenerasyonda “Seyirci Etkisi” (*Bystander Effect*) olarak isimlendiren faktörün erken nörodejenerasyon kavramındaki rolü araştırılmıştır. Seyirci etkisi, nörodejenerasyondan etkilenen ve/veya nörodejenerasyonun başlangıcında olan hücrelerin diğer sağlıklı hücreleri etkilediği görüşünü temel alan bir hipotezdir. Yenidoğan farelerde primer hücre kültürü çalışmaları transgenik (5xFAD), kontrol (non-transgenik) ve transgenik + kontrol

(5xFAD + non-transgenik) ko-kültürleri olarak üç grup halinde yapılmıştır. Burada, doğuştan hasarlı olduğu düşünülen 5xFAD beyin hücrelerinin, kontrol yani sağlıklı beyin hücreleri üzerindeki nörodejeneratif etkisi proteomik yöntemler ile araştırılmıştır. Bu amaçla, yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol fare beyinleri korteks, serebellum ve hipokampus olmak üzere mikroskop altında 3 bölgeye ayrılmış ve bu bölgelerden primer hücre kültürü yapılmıştır. Araştırılmak istenen Seyirci Etkisi kapsamında transgenik hücrelerin kontrol hücreleri üzerinde protein bazında yaptığı değişiklikler LC-MS/MS ile tespit edilmiştir. Tüm beyin doku analizleri yerine beyin dokusunun spesifik 3 bölgeye ayrılıp incelenmesinin nedeni çalışmanın bölgesel protein değişikliklerini araştırmayı hedef almasıdır.

Korteks, serebellum ve hipokampus bölgelerine ait primer hücre kültürü örneklerinin LC-MS/MS ile analizi sonucu elde edilen protein sayıları Tablo 10'da verilmiştir. Hipokampus bölgesine ait toplam 712 protein tanımlanmış, ancak bu proteinlerden hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunmamıştır. Bunun nedeni olarak, verilerin değişim katsayısı (değişim katsayısı $\geq 1,3$) eşiğinin altında kalmasıdır. Protein ekspresyon seviyesinde 1,2 katlık bir değişimin biyolojik bir etkisinin olacağı kabul edilmekle beraber, LC-MS/MS analizlerinde cihazların teknik yeterliliklerinden kaynaklanan hata payları bulunduğundan ötürü, sınır değer olarak 1,3 kat değişimin altında kalan proteinler anlamlı olarak değerlendirilmemektedir. Bu nedenle, hipokampus bölgesinde gerçekleşen potansiyel biyolojik değişiklikleri aydınlatmak için alternatif yaklaşımlar veya daha büyük örnek grupları kullanılarak araştırma yapılması gerekmektedir.

Korteks bölgesinde, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren transgenik ve ko-kültür grubu arasında 18 ortak protein gözlemlenmiştir. Bu proteinlerin Reactome Pathways yazılımı aracılığıyla yapılan yolak analizleri sonucunda mitokondriyal yağ asidi beta-oksidasyonu, demir alınımlı ve taşınımı, nöreksinler ve nöroliginler, botulinum toksin tip G toksisitesi, sinapslarda protein-protein etkileşimleri ile ilgili yolaklar tespit edilmiştir (Tablo 15). Nöreksinler ve nöroliginlerin sinaptik proteinler olmasından dolayı, sinapslarda protein-protein etkileşimleri ile birlikte tartışılmıştır.

Yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, öncelikle mitokondri, ikincil olarak ise peroksizomda gerçekleşmektedir (89). Yağ asitlerinin beyin enerjisi gereksinimini karşılamadaki yakıt substratları olarak rolü belirsizliğini korumaktadır (90). Ancak, özellikle peroksitlenmiş yağ asitlerinin zamanında yıkımı, hücre fonksiyonları üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle beyin sağlığı için kritik öneme sahiptir (91). Glikozun oksidatif yıkımı ile karşılaştırıldığında, mitokondrilerdeki yağ asidi beta-oksidasyonu daha yüksek miktarda reaktif oksijen türleri (ROS) üretmektedir (90). Nöronlar yüksek metabolik hızla sahip olup oksidatif hasara karşı oldukça duyarlıdır çünkü ROS'u detoksifiye etme kapasiteleri sınırlıdır (89). Nöronların bu sınırlı antioksidan kapasitesi, artan ROS, oksidatif stres ve peroksidize olmuş lipid birikimine yol açmaktadır (90,92). Artan ROS seviyesi, AH nöropatolojisine yatkın beyin bölgelerinde yüksek oksidatif strese neden olmaktadır (93). Beyin, yüksek oksijen ihtiyacı ve lipid açısından zengin yapısı nedeniyle oksidatif strese karşı özellikle hassastır. Bu nedenle, oksidatif stresten kaynaklanan beyin hasarı, merkezi sinir sistemi işlevlerini bozabilmekte ve ilerleyici hücre hasarı, nörodejenerasyon ve hücre ölümüne neden olabilmektedir (94). Ayrıca, nöronlarda mitokondriyal ve sinaptik disfonksiyon olarak kendini göstermektedir (93,95). Oksidatif stres kaynaklı nöronal fonksiyon bozukluğu, AH'nin tedavisinde yeni ilaçların bulunmasında giderek önem kazanmaktadır (93).

Çok sayıda çalışma bakır, demir, çinko, magnezyum ve alüminyum gibi metal iyonlarının, AH'nin ortaya çıkışı ve gelişiminde rol oynadığını göstermiştir (96,97). Ayrıca yapılan klinik çalışmalar sonucunda, Alzheimer hasta beyinlerinde bakır, demir ve çinko seviyelerinin yükseldiği tespit edilmiştir (98). Bu nedenle, metal iyonların nöronal metabolizmayı etkilediği, oksidatif strese neden olduğu ve Aβ birikimini ve senil plakların oluşumunu teşvik ettiği düşünülmektedir (99). Beyinde demir, sadece miyelin ve nörotransmitterlerin sentezinde ve metabolizmasında yer almakla kalmamakta, aynı zamanda nöronların yüksek metabolik kapasitesinin korunmasında da önemli bir rol oynamaktadır (96,100). Normal fizyolojik koşullar altında demir metabolizması, beyindeki homeostazı korur. Demir alınımı, taşınması veya metabolizmasındaki bozuklukların, beyinde nörodejeneratif etkileri olduğu bildirilmiştir (96). İnsan vücudunda en bol bulunan redoks-aktif metal olan demirin

beyinde birikimi, nörodejeneratif hastalıkların önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. AH'de demir birikimi, hücrel hasarlara yol açan ROS oluşumundan, A β agregasyonu ve oligomerizasyonunu artırarak A β toksisitesine katkıda bulunmaktan ve tau proteininin hiperfosforilasyonu ve agregasyonundan sorumlu olarak görülmektedir (32).

Bağlantılar, nöronların en belirleyici özelliklerinden biridir ve sağlıklı sinapslar olmadan, nöronlar bilişsel ve diğer sinirsel süreçleri tanımlayan uyarıları iletemezler. Sinapsların işlevleri, protein-protein etkileşimleri aracılığıyla modüle edilir (101). Bozulmuş sinaptik bağlantılar, nöronal işlev bozukluğuna yol açmaktadır. Sinaptik dejenerasyon ve sinaptik hasarın, AH'nin gelişiminin erken evrelerinde meydana geldiği ve ayrıca AH ile diğer nörodejeneratif bozukluklarda gözlemlenen demans ve bilişsel bozukluklara yol açtığı düşünülmektedir (5,101). Sinaptik bağlantı kaybı, pre-veya post-sinaptik proteinlerdeki değişikliklerden kaynaklanabilmektedir (101). Nöreksinler ve nöroliginler, sinaptik hücre adhezyon molekülleridir ve sinapslarda pre-sinaptik ve post-sinaptik nöronları birbirine bağlar, sinaptik geçiş yoluyla sinyalleşmeyi sağlar ve sinaptik işlevleri belirleyerek sinir ağlarının özelliklerini şekillendirirler (102). Çeşitli araştırmalarda, nöreksinler ve nöroliginlerin AH'nin gelişiminde, ilerlemesinde ve hastalığın altında yatan sinaptik kayıpta rol oynayabileceği gösterilmiştir (101,103).

Botulinum toksini ve AH arasında doğrudan bir ilişki bulunmamaktadır. Ancak yakın zamanda yapılan bir çalışmada, botulinum nörotoksininin nöronlarda patolojik tau proteininin aksonal salınımını düzenlediği gösterilmiştir (104). Ayrıca bazı araştırmalar, botulinum toksininin, sinir hücrelerinin aktivitesini düzenleyen ve sinir iletimini engelleyen bir mekanizma kullanarak AH'nin semptomlarını hafifletebileceğini öne sürmektedir. Botulinum nörotoksin enjeksiyonunun farelerde öğrenme ve hafızayı iyileştirdiği literatürde gösterilmiştir (105).

Serebellum bölgesinde, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren transgenik ve ko-kültür grubu arasında 10 ortak protein gözlemlenmiştir. Serebellum bölgesinde korteks bölgesine kıyasla daha az değişim gözlenmesinin

sebebinin, serebellum bölgesinin hastalıktan en geç ve en az etkilenen beyin bölgesi olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Serebellum bölgesi transgenik ve ko-kültür gruplarına ait kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren ortak proteinlerin Reactome Pathways yazılımı aracılığıyla yapılan yolak analizleri sonucunda CRMP'lerin Sema3A sinyalizasyonundaki rolü, semaphorin etkileşimleri ve SARS-CoV-1 ile ilgili yollar tespit edilmiştir. Bu yollara ait proteinlerin listesi ve değişim katsayıları Tablo 16'da verilmiştir. Sema3A'nın (semaphorin 3A) semaphorin ailesinin bir üyesi olmasından dolayı, CRMP'lerin Sema3A sinyalizasyonundaki rolü ve semaphorin etkileşimleri birlikte tartışılmıştır.

Dihydropyrimidinase-related proteinler olarak adlandırılan *collapsin response mediator* proteinleri (CRMP), beş homolog sitozolik fosfoproteinden (CRMP1-5) oluşan bir ailedir (106,107). CRMP'lerin hepsi, gelişmekte olan beyin ve yetişkin sinir sisteminde yüksek düzeyde ifade edilirler. Bu proteinlerin, hücre içi ve hücre dışı yollarda sinyal iletiminde görevli olduğu ve fosforilasyon aracılığıyla hücre göçü, nörit uzaması, aksonal rehberlik, dendritik diken gelişimi ve sinaptik plastisite dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde önemli roller oynadığı tespit edilmiştir (106). Ayrıca CRMP'ler, nöronal polarite ve farklılaşmanın, dendritik desenlemenin (patterning), sinir ağı organizasyonu ve yeniden yapılanmasının temeli olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar CRMP'lerin özellikle nöropsikiyatrik, nörolojik ve nörodejeneratif bozukluklar olmak üzere çeşitli insan patolojilerinde de önemli rolleri olduğunu göstermektedir (107). CRMP'lerin AH üzerindeki rolüne yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalar CRMP'lerin (özellikle CRMP5) mikrotübüllerin yeniden şekillenmesini durdurarak, GluA1 yüzey ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla uyarıcı iletimi (excitatory transmission) azaltarak ve mitokondriyel işlevi bozarak AH'de önemli rolleri olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan bir çalışmada, üç farklı AH mutasyonu taşıyan transgenik (3xTg) farelerde CRMP5'in aşırı ekspresyonu hafıza kaybını hızlandırdığı gözlemlenmiştir (107). CRMP genlerinin ifadesi serebral korteks, serebellum, dentate gyrus ve hipokampusun diğer bölgelerinde tespit edilmiştir (108).

CRMP'lerin Sema3A sinyalizasyonu tarafından düzenlendiği ve bunun muhtemelen hem belirli kalıntıların fosforilasyonu ile hem de CRMP yapısındaki konformasyonel değişikliklerle gerçekleştiği düşünülmektedir (109). Sema3A sinyalizasyonunun AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda bozulan sinaptogenez ve sinaptik plastisiteyi aktif olarak düzenlediği öne sürülmüştür (110). Sema3A'nın, AH'de görülen nörodejenerasyonun erken evrelerinde rol oynayabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Ayrıca, Sema3A ekspresyonu ve salınımındaki bir düzensizliğin AH beyinlerinde olası bir erken gösterge olabileceği, NFY'den yoksun nöronlarda bile gözlemlendiği ve bu nedenle tau hiperfosforilasyonu ve agregasyonundan önce olabileceği öne sürülmüştür. Sema3A ile olası bir downstream tau hiperfosforilasyonu arasındaki ilişkinin, Sema3A sinyalizasyonunda yer alan kinazlardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (110,111). Son araştırmalar, Sema3A'ya bağlanarak nöronlardaki biyolojik süreçleri düzenleyen PLXNA4 geninde AH ile ilişkili tek nükleotid polimorfizmleri (single nucleotide polymorphism, SNP) tespit ederek tau fosforilasyonunu Sema3A sinyalizasyonu ile ilişkilendirmektedir. AH ile ilişkili en üst sıralarda listelenen SNP'lerin çoğu Sema3A bağlanma bölgesini kodlayan bölgede yer almaktadır (110,112). Bunlara ek olarak, *in vitro* koşullarda nöral progenitör hücrelerin, duyu nöronlarının, serebellar granül hücrelerin ve sempatik nöronların apoptozunu doğrudan indükleyebilmesi nedeniyle, AH nörodejenerasyonunda doğrudan rol oynayabileceği düşünülmektedir (113).

Elde edilen veriler, neonatal serebellum hücre kültüründe CRMP ailesine üye iki proteinin ifadesinin transgenik grupta kontrol gruba kıyasla arttığını göstermektedir. Bu bulgular, literatürdeki bulgularla uyumlu ve destekleyici niteliktedir. AH patogeneğinde aktif olarak rol alan bu proteinlerin neonatal kadar erken dönemde gözlemlenmesi hastalığın başlangıcında önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Ayrıca, bu proteinlerin ifadelerinin ko-kültür grubunda da kontrol grubuna kıyasla artışının gözlemlenmesi, bu proteinlerin diğer sağlıklı hücreleri etkileyici etkisi olabileceğini önermektedir. Distrofik aksonlar ve dendritler ile işlevsiz sinapslar, AH'de nörodejenerasyona neden olan hafıza eksikliklerinin merkezinde yer almaktadır. Bu nedenle, sinaptik yapıların oluşumunda, yeniden şekillendirilmesinde veya onarılmasında ve pek çok nörogelişimsel süreçlerde kilit rol oynadığı bilinen

CRMP'ler gibi özgün moleküllerin, AH'nin erken teşhisi ve tedavisinde etkili olabileceği çeşitli çalışmalar tarafından bildirilmiştir (107,108).

Serebellum bölgesi transgenik ve ko-kültür gruplarına ait kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren ortak proteinlerin Reactome Pathways analizinde, bu proteinlerin SARS-CoV-1 ile ilgili yollarda katılım göstermesinin bir sebebi, son yıllarda SARS-CoV-1'in yoğun bir şekilde araştırılmasıdır. Bu grupta yer alan proteinlere bakıldığında, aynı iki protein (40S ribosomal protein S20 ve heterogeneous nuclear riboprotein A1) üç yollarda da gözlemlenmiş ve bireysel düzeyde bu proteinlerin ayrıca AH ile ilişkilendirildikleri tespit edilmiştir. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) proteininin rolünün kanser gibi pek çok farklı hastalıkta incelenmiş olmasına rağmen hnRNP A1 disfonksiyonunun nörodejeneratif hastalıkların patogeneze katkıda bulunduğu ancak yakın zamanda gösterilmiştir (114). Bu durum, bu proteinlerin neden nörodejeneratif bir yolla değil de SARS-CoV-1 yollarıyla ilişkilendirildiğini açıklayabilir.

Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda gözlemlenen ortak özellik, sitoplazma veya çekirdek içinde yanlış katlanmış, çözünmeyen proteinlerin toksik birikimidir (115). Ancak yakın zamanda yapılan bazı çalışmalar, nörodejenerasyonda anormal protein birikiminden çok, nörolojik patogeneze tetikleyici bir faktör olarak muhtemel RNA bozukluklarına doğru kaymakta ve RNA metabolizmasına (RNA transkripsiyonu, pre-mRNA splicing, mRNA taşınması, translasyon, sekestrasyon ve degradasyon) önemli ölçüde katkıda bulunan RNA bağlayıcı proteinler (RNA binding proteins, RBP'ler) üzerine yoğunlaşmaktadır (116,117).

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1), nöronlarda yüksek düzeyde ifade edilen önemli bir RNA bağlayıcı proteindir. hnRNP A1'in ana işlevi, transkripsiyon, pre-mRNA'nın alternatif kesilip eklenmesi, translasyon, miRNA işlenmesi ve mRNA stabilitesi gibi çeşitli RNA metabolik süreçlerini düzenlemektir (114,118). AH risk genlerinin incelendiği bir çalışmada, Alzheimer hastaları ile kontrol grubu arasında hnRNP A1 geninde farklılıklar tespit edilmiştir (118,119). Araştırmalar, hnRNP A1'in hem A β hem de tau agregatlarının oluşumunu

etkileyebileceğini öne sürmektedir. hnRNP A1'in A β oluşumunu etkilediği teorisi, APP'ye ait pre-mRNA'nın alternatif kesilimi (*alternatif splicing*) aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (120). Ayrıca, kolinerjik sinyalleşmenin hnRNP A1 ekspresyonunu kontrol etmede de rol oynayabileceği ve AH'de gözlemlenen kolinerjik nöron kaybının hnRNP A1'in down-regülasyonuna ve APP'ye ait mRNA'nın modifiye alternatif kesilimine katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (121). Ek olarak, AH fare modelinde yapılan bir çalışmada hnRNP A1'in önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir (118). Elde edilen veriler, neonatal serebellum hücre kültüründe hnRNP A1'in transgenik ve ko-kültür grubunda kontrol grubuna kıyasla azaldığını göstermiştir ve bu bulgu literatürü destekler niteliktedir.

5.2 MALDI-MSI Analizleri

Yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI analizleri sonucunda, SCiLS Lab yazılımı ile gerçekleştirilen *unsupervised* segmentasyon analizi ile R1, R2 ve R3 olmak üzere üç farklı bölge belirlendi. MALDI-MSI yöntemi ile analiz edilen lamalar, doku kesitlerinin anatomisinin belirlenmesine yardımcı olmak için hematoksisilen ve eosin (H&E) ile boyandı ve histolojik inceleme için kullanıldı (Şekil 16). Prenatal fare beyin atlasına göre, R1 bölgesinin büyük ölçüde korteks ve kaudat putameni, R2 bölgesinin ventriküler ve subventriküler bölgeleri, R3 bölgesinin ise korpus kallozum ve septal çekirdekleri (medial septal çekirdek ve lateral septal çekirdek) temsil ettiği gözlemlendi. Belirlenen bu bölgelerin AH ile ilişkisi, literatürde bulunan diğer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. R1, R2 ve R3 bölgelerinde toplam 35 proteinin anlamlı ifade farklılığı gösterdiği istatistiksel analizler sonucunda tespit edildi. Yapılan detaylı literatür taraması sonucunda, tanımlanan 35 proteinden yalnızca 26 tanesi AH ile ilişkilendirildi (Tablo 17). Geriye kalan 9 proteinin AH hastalığı ile ilişkisi ilk kez bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Anlamlı farklılık gösteren 26 proteinin AH ile ilişkisini detaylı incelemek amacıyla proteinler 5 gruba ayrıldı. Bu gruplar, sinaptik plastisite ile ilişkili proteinler, aksonal dejenerasyon, otofaji, nörokoruyucu özelliklere sahip proteinler ve diğerleri olarak adlandırılan proteinleri içermektedir. MALDI-MSI analizleri ile elde edilen istatistiksel olarak anlamlı proteomik sonuçların validasyonu amacıyla, AH ile

ilişkilendirilen 6 protein seçilerek Western blot analizleri gerçekleştirildi. Analizlerin 2 farklı açıdan doğrulanması amacıyla, bu proteinler R1 ve R3 bölgesini ve yukarıda tanımlanan 5 grubu temsil edecek şekilde seçildi.

Literatür taramaları sonucunda 26 proteinden 14 tanesi (sırasıyla R1, R2 ve R3 bölgelerinde 9, 4 ve 1 protein) AH ile doğrudan veya dolaylı olarak sinaptik plastisite ile ilişkilendirilmiştir. Bu proteinler R1 bölgesinde Sae2, Nedd4, Tlr12, Stmn, Nogo, EF-2, SNAP-47, PAI- RBP1, Basp1; R2 bölgesinde Car, M6a, Act, SGN2 ve R3 bölgesinde Endop2'dir (Tablo 20). Sinaptik plastisite ile ilişkili proteinlerin çoğu (14 proteinden 9'u) büyük ölçüde korteksi temsil eden R1 bölgesinde görülmektedir. Şiddetli AH patolojisi olan beyinlerde sıklıkla etkilenen korteks bölgesinin sinaptik plastisite için önemli olması ve sinaptik plastisite ile ilişkili proteinlerin çoğunun kortekste (R1) gözlemlenmiş olması, bulguların ve MALDI-MSI sonuçlarının bağımsız doğrulanmasını sağlamaktadır (122,123).

AH ile ilişkilendirilen 26 proteinden 5 tanesinin nörokoruyucu özellikleri olduğu literatür yardımıyla belirlendi (124–128). Bu proteinler, R1 bölgesinde Rufy3; R2 bölgesinde Aldh, NSE, MAPK1 ve R3 bölgesinde Hspa4'tür. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, Rufy3'ün aşırı ifadesi nöronal akson onarımını ve sinaptik plastisiteyi teşvik ettiği ve nörokoruyucu bir etki gösterdiği görülmüştür (124). NSE; proliferasyon, rejenerasyon, büyüme ve farklılaşma gibi nörotrofik aktivitelere sahiptir. Nöronların hayatta kalmasını, farklılaşmasını ve nörit rejenerasyonunu, mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) sinyal iletim yolu aktivasyonu aracılığıyla kontrol ederek AH gibi A β ile ilişkili nörodejenerasyonda nörokoruyucu bir rol sergiler (126). Hspa4, heat shock protein 110 (HSP) ailesinin bir üyesidir (129). HSP'ler, intraselüler ve ekstraselüler alanlardaki proteinlerin agregasyonunu ve disagregasyonunu kontrol eden şaperonlardır. Kanıtlar, HSP'lerin, AD gibi nörodejeneratif bozukluklarda tipik olan protein agregasyonuna karşı koruyucu etkisini desteklemektedir (128). Rufy3, NSE, Aldh ve Hspa4 ekspresyon seviyelerinin, neonatal 5xFAD beyinlerinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir.

Endofilin 2 (Endo2) proteini daha önce AH ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, AH patogenezindeki rolü henüz detaylı olarak incelenmemiştir. Ancak literatürde, Endofilin B1'in kaybının A β birikiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir, bu nedenle Endofilin B1'in AH'de nörokoruyucu bir rol oynadığı öne sürülmüştür (130). Yukarıda nörokoruyucu özelliklere sahip olduğu bildirilen diğer proteinler gibi, Endofilin 2 ifade düzeyi de yenidoğan 5xFAD grubunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Endofilin 2 ve Endofilin B1 proteinlerinin aynı aileye ait olması nedeniyle, bu artışın Endofilin 2 proteininin nörokoruyucu etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu teoremin daha kapsamlı deneylerle desteklenmesi gerekmektedir.

Aksonal dejenerasyon, hem normal gelişim sırasında aksonun yeniden şekillenmesi (*remodelling*) gibi fizyolojik koşullarda hem de yaralanma veya nörodejeneratif bozukluklar gibi patolojik koşullarda meydana gelen yaygın bir fenomendir (131). Normal şartlarda, yeniden şekillenme sırasında akson dejenerasyonu çok hızlı gözlemlenir, ancak AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda aksonların dejenerasyonu çok daha uzun sürmektedir. Bazı nörodejeneratif bozuklukların başlangıcında görülen progresif aksonal dejenerasyonu A β ve tau birikimi ile bağlantılı bulunmuş ve AH'nin erken evreleriyle ilişkilendirilmiştir (132). MALDI-MSI analizleri sonucunda, R1 bölgesinde aksonal dejenerasyon ve AH ile ilişkili üç protein (Rufy3, Nogo ve Basp1) tespit edilmiştir. Buna ek olarak, R2 bölgesinde gözlenen IgSF3 proteininin detaylı literatür taraması sonucunda, IgSF3 proteini ile AH veya diğer nörodejeneratif hastalıklar arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Ancak, IgSF3 proteininin serebral hücre kültüründe aksonal büyümeyi ve dallanmayı inhibe ettiği yayınlanmıştır (133). Aksonal büyümenin önemi ve aksonal dejenerasyonun AH'deki rolü göz önüne alındığında, bu proteinin ifade seviyesindeki artış ilk defa bu çalışmada AH ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, IgSF3 ve AH arasındaki ilişkinin daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

AH'de gözlenen A β ve tau proteinlerinin metabolizması otofajiden önemli ölçüde etkilenebilir (134). Otofaji, organel ve proteinlerin parçalandığı ve enerjiye dönüştürüldüğü lizozoma bağımlı, homeostatik bir süreçtir. Bu nedenle, otofajideki işlev bozukluğunun AH beyinde zararlı proteinlerin birikimine yol açabileceği öne

sürülmektedir (135). MALDI-MSI analizlerinin sonucunda, otofaji ve AH ile ilişkili R1 bölgesinde iki protein (Matr3 ve VCP) tanımlanmış ve bu proteinlerin ifade seviyelerinin yenidoğan 5xFAD transgenik grubunda kontrole kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. Literatürde ayrıca otofajide gözlemlenen artışın, AH patogenezinin seyrinde koruyucu bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür (135).

AH ile ilişkilendirilen 26 proteinden 5 tanesi (Fgb, Des, eIF3A, Tmpo ve TIM), yukarıda tanımlanan kategorilerden herhangi birine uymadığı için diğer grubu altında sınıflandırılmıştır. Des ve TIM proteinleri daha önce AH ile ilişkilendirilmiş, ancak yenidoğan 5xFAD beynindeki ifade seviyelerindeki artış ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir (Tablo 20). Kan pıhtılaşmasında rol oynayan Fgb proteininin Alzheimer hastalarının plazmalarında arttığı bildirilmiştir (136). Ancak, bu proteinin yenidoğan 5xFAD fare beynindeki bölgesel dağılımı ilk kez bu çalışmada MALDI-MSI analizleriyle gösterilmiştir.

AH ile ilişkilendirilen proteinlerin ifade seviyelerindeki değişiklikler, korteks bölgesini temsil eden R1 bölgesinde gözlemlenen 3 protein dışında (Stmn, PAI-RBP1 ve eIF3A), literatür ile uyumlu bulunmuştur. Literatüre göre, Alzheimer hasta dokularının hipokampusunda Stmn protein seviyelerinde düşüş gözlenirken, AH fare modelinin korteks bölgesinde Stmn ifade seviyesinde artış gözlenmiştir ki bu sonuç tez çalışmasındaki bulgular ile uyumludur (1,137–139). Literatür ile bu çalışmada gözlemlenen farklılığın nedeninin, farklı beyin bölgelerinin (hipokampus vs korteks) incelenmiş olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Literatür ile farklılık gösteren proteinlerden biri de PAI-RBP1 proteindir. Alzheimer hastalarının *post-mortem* beyin dokularında immünohistokimyasal boyama (IHC) yöntemi ile PAI-RBP1 proteininin ifade seviyelerinde artış bildirilmiştir (140,141). Fakat, yenidoğan 5xFAD beyin dokusunda bu proteinin ifadesinde azalma gözlemlenmiştir. Ancak, yapılan çalışmada IHC boyama için alınan kesitlerin hangi bölge veya bölgelere ait olduğu hakkında detaylı bilgi verilmediği için, gözlemlenen bu farkın nedeninin çalışmalar arasındaki bölgesel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülebilir. Son olarak, yenidoğan 5xFAD fare modelinde eIF3A proteininin ifade seviyesinde azalma gözlemlenirken, Alzheimer hastalarının kanında önemli bir artış bildirilmiştir (142). Bu proteinin ifade seviyesindeki farklılığın, incelenen örnek türlerinin (5xFAD fare beyin dokusu vs

Alzheimer hasta kanı) farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir. Tüm bu bulgular, bütün doku ve bölgesel doku kesiti çalışmalarının önemli ölçüde farklılıklar gösterdiği fikrini desteklemektedir.

Sonuç olarak literatüre göre, 26 proteinden 14'ü beyinde bilgi depolama, hafıza oluşumu ve öğrenme süreçlerinin altında yatan hücrel mekanizmayı oluşturan sinaptik plastisite ile doğrudan veya dolaylı olarak ilişkilendirilmiştir. Sinaptik plastisite ve sinaps kaybı, bilişsel gerileme ile paralel olarak, AH'nin klinik belirtilerinin merkezinde yer almaktadır. AH'nin ilk klinik belirtisi, hafıza oluşumu ve depolanmasında yaşanan aksaklıklardır. Hastalığın erken evrelerinde, sinapsların ve sinaptik reseptörlerin sayısında global değişiklikler meydana gelir ve bu değişiklikler bilişsel gerileme ile en iyi korelasyonu göstermektedir (143,144). Uzun yıllar boyunca, AH ile ilişkili bilişsel gerilemenin birincil sebebinin nöron kaybı olduğu düşünülse de, artık sinaptik plastisitenin hücrel ve moleküler mekanizmalarındaki dengenin bozulmasının bu gerilemeden sorumlu olduğu teorisi yaygın olarak kabul görmektedir (145). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında, AH'nin bir sinaptopati olarak da değerlendirilebileceği son zamanlarda önerilmektedir ve bu da sinaptik plastisitenin AH'deki önemli rolünü daha da vurgulamaktadır (146).

Amiloid kaskad hipotezi, yıllardır AH araştırmalarının ana odağı olmuştur. Beyindeki A β birikimi, amiloid görüntüleme ile gözlemlenebilmektedir. Bu yeni teknoloji sayesinde, bilinen bilişsel veya demans semptomları olmayan birçok sağlıklı yaşlı bireyin AH patolojisine sahip olduğu ve ayrıca klinik olarak teşhis edilmiş AH olan hastaların hiç veya çok az A β birikimine sahip olduğu keşfedilmiştir (147). Bu bulgular göz önüne alındığında, amiloid kaskad hipotezi tutarlı değildir ve A β plaklarının varlığı, AH'nin klinik özellikleriyle doğrusal bir ilişki göstermemektedir. Ayrıca, başarısız klinik çalışmalar ve etkili bir tedavinin geliştirilememesi, hastalığı anlamamızda önemli bir boşluk olduğuna işaret etmekte ve alternatif bir bakış açısının geliştirilmesinin gerekli olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, AH'nin patogenezinde rol oynayan diğer faktörleri veya olayları bulmaya yönelmiştir (148). AH'nin ayırt edici özelliklerinin ötesinde, hastalığın klinik özellikleriyle, özellikle de demans ve bilişsel bozuklukla daha yakından ilişkili başka patolojik olaylar da bulunmaktadır. Sinaptik dejenerasyon, erken patojenik bir olaydır ve AH'de

görülen bilişsel bozulmanın en iyi patolojik göstergesidir (149,150). Bu nedenle, sinaptik plastisite, AH'nin biyolojik fenotipi ile klinik özellikleri arasındaki en önemli biyolojik bağlantı olarak görünmektedir.

5.3 DESI-MSI Analizleri

Kütle spektrometresi görüntüleme tekniğine dayanan birçok metabolik temelli çalışma AH'nin beyindeki metabolit değişiklikleriyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (151–154). Artan kanıtlar, beyinde görülen metabolik disfonksiyonun AH patolojisine ve nörodejenerasyonuna katkıda bulunabileceğini öne sürmektedir (155,156). AH hastaları ile yapılan çalışmalarda, düşük ağırlıklı metabolitlerin ve lipidlerin metabolizmasında değişiklikler bulunduğu tespit edilmiştir (156–158). Ancak, hastalığın erken evresinde gözlemlenen metabolomik değişiklikler henüz bilinmemektedir. Fare modelleri kullanarak yapılan çalışmaların artması, AH'nin erken evresindeki metabolik değişikliklerin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır.

Yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol beyin doku kesitlerinin lipid analiz metodu ile gerçekleştirilen DESI-MSI analizleri sonucunda, SCiLS Lab yazılımı ile yapılan segmentasyon analizinde R1, R2 ve R3 olmak üzere MALDI-MSI proteomik analizleri ile benzer olarak üç farklı bölge belirlenmiştir. Ancak, düşük moleküler ağırlıklı metabolit metodu kullanılarak yapılan analizlerden elde edilen görüntülerin segmentasyon analizi sonucunda doku kesitlerinde net bir bölgesel ayırım gözlemlenmemiştir. Bu durum, düşük ağırlıklı metabolitlerin bölgesel dağılımının, lipidlerin dağılımı kadar belirgin olmadığını göstermektedir.

Her iki metot ile elde edilen verilerin PCA analizleri sonucunda 5xFAD transgenik ve kontrol grubu arasında belirgin bir ayırım tespit edilememiştir. Bu bulgu, 5xFAD transgenik ve kontrol gruplarının yenidoğan seviyesinde benzer metabolomik profillere sahip olduğuna işaret edebilir. Lipid profillemeye üzerine yapılan birçok çalışma, doku homojenizatları, hücre lizatları ya da biyolojik sıvılar üzerinde gerçekleştirildiğinde hedefsiz olarak binlerce metabolit tanımlanabilmekte ve düşük konsantrasyona sahip olan metabolitlerin tespiti yapılabilmektedir. Ancak doku

üzerinde yapılan çalışmalar, entstrümentasyon, örnek hazırlığı ve veri edinimi gibi kısımlardaki mevcut teknik kapasite sebebiyle daha zorlayıcı olmaktadır. Temel olarak, doku üzerinde iyonize edilebilen moleküller arasında, içlerinde en yüksek konsantrasyonda bulunanların tanımlamaları daha yüksek olasılıklıdır. Yapılan analizde de fonksiyonel olanlara oranla yapısal lipidlerin tanımlanması, bu lipidlerde istatistiksel olarak anlamlı değişimler olmamasını açıklayabilir. Ancak tanımlanan bazı metabolitlerin literatürde AH ile ilişkilendirilmiş olması, yenidoğan 5xFAD transgenik fare modeli beyin dokularında AH ile ilişkili metabolitlerin varlığını göstermektedir. Bu metabolitler, hastalığın ilerleyen evrelerinde ortaya çıkabilecek daha belirgin metabolik değişikliklerin habercisi olabilir. Dolayısıyla, AH ile ilişkilendirilen ve yenidoğan seviyesinde gözlemlenen bu metabolitlerin erken dönemde belirgin olmayan, ancak zamanla gelişip AH'ye ilişkin patolojik değişikliklerde rol alabileceği düşünülmektedir.

2 ve 3 aylık APP/PS1 AH fare modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, PCA analizleri sonucunda AH ve kontrol grubu arasında belirgin bir ayrım gözlemlenmiştir (153). Ancak, hiyerarşik kümeleme analizi sonuçları, gruplanmanın genotip yerine yaşa göre olduğunu göstermiştir. HC analizi ile elde edilen ısı haritasında, 2 aylık AH ve kontrol fareleri birlikte gruplanırken, 3 aylık AH ve kontrol farelerinin birlikte gruplandığı gözlemlenmiştir. Bu durum, farklı evreleri ve farklı yaş gruplarını içeren karşılaştırma çalışmalarının önemini vurgulamaktadır.

APP23 AH fare modelinde yapılan bir çalışmada, 3, 6 ve 18 aylık farelerin beyin doku kesitleri kullanılarak DESI-MSI analizleri gerçekleştirilmiştir (156). Bu analizlerde AH ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık gösteren metabolitler tanımlanmış ve bu metabolitlerin 12 beyin bölgesindeki değişiklikleri incelenmiştir. Bu çalışmada elde edilen metabolit tanımlamalarıyla, yenidoğan beyin doku kesitlerinden tanımlanan metabolitler arasında ortak metabolitler (PE 36:4, PE 36:1, PE 38:4 ve PE 38:5) olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada, 3 aylık farelere ait beyin doku kesitleri ile yapılan DESI-MSI analizleri sonucunda tanımlanan metabolitler arasında, AH ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılıklar gösteren metabolit gözlemlenmemiştir. AH ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı metabolitler daha çok 18. ayda görülmektedir (156). Bu bulgular, AH'nin yenidoğan

kadar erken evrelerinde metabolit seviyelerinde belirgin değişikliklerin olmamasını destekleyici niteliktedir. Metabolik değişikliklerin AH'nin ilerleyen evrelerinde daha belirgin hale geldiğini düşündürmektedir.

Nöronal hücre membranları genellikle kolesterol, gliserofosfolipitler ve sfingolipitlerden oluşur (159). Nöronal hücre membranlarının asimetrik lipit çift tabakası kompozisyonu, hücresel sinyal iletimi, hücresel taşıma ve enerji metabolizması gibi süreçlerde anahtar rol oynayarak beyin fonksiyonunu etkilemektedir (160). Yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol beyin dokularının DESI-MSI analizleri sonucunda tanımlanan metabolitlerin çoğunlukla gliserofosfolipit grubuna ait olan fosfatidilserin (PS), fosfatidiletanolamin (PE) ve fosfatidilinositol (PI) (sırasıyla 15, 9 ve 5 tane) ve serbest yağ asitleri (FA, 5 tane) olduğu gözlemlenmiştir. PS ve diğer fosfolipidlerin değişimi hücre membranının viskozitesini değiştirmekte ve enzim aktivitesi, sinyal iletim etkinliği ve zar taşıyıcılığı gibi birçok biyolojik süreci engellemektedir (161). AH hastalarının beyin dokularında PS'nin değişimi konusunda tartışmalar bulunmaktadır. Bazı çalışmalar, PS'nin AH hastalarının beyinlerinde azaldığını göstermiştir (161–166). Bununla birlikte, diğer çalışmalar da PS'nin Alzheimer hastalarının beyinlerinde arttığını veya değişmeden kaldığını bulmuştur (167–170). Alzheimer hastaları ile benzer şekilde, AH fare modellerine ait beyin dokularında gözlemlenen PS değişiklikleri tutarlılık göstermemektedir (171–176). Bu tutarsızlığın nedenleri, literatürde çalışmalarda kullanılan beyin bölgeleri, AH evreleri ve yaş gibi faktörlerle açıklanmıştır (166). Bu çeşitli sonuçlar, AH'nin patolojisindeki lipit metabolizmasının karmaşıklığını vurgulamakta, hastalığın farklı evrelerinde değişen lipit profilleri olduğunu düşündürmekte ve tez çalışmasında elde edilen verileri desteklemektedir. Ayrıca, AH'de PS'lerin işlevi henüz tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da, klinik çalışmalar PS'nin Alzheimer hastalarına fayda sağladığını göstermiştir (166,177). Klinik çalışmalar, PS takviyesinin Alzheimer hastalarında bilişsel fonksiyonları ve hafıza kaybını önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermektedir (166).

6 SONUÇ

Bu tez çalışmasında, yenidoğan 5xFAD AH fare modeli beyindeki proteomik değişiklikler MALDI-MSI analizleri ile, metabolomik değişimler ise DESI-MSI analizleri ile bölgesel olarak incelenmiştir. Ayrıca, yenidoğan 5xFAD transgenik ve kontrol fare beyinleri korteks, serebellum ve hipokampus bölgelerine ayrılmış ve bu bölgelerden primer hücre kültürü yapılarak doğuştan hasarlı olduğu düşünülen 5xFAD beyin hücrelerinin, kontrol beyin hücreleri üzerindeki nörodejeneratif etkisi LC-MS/MS yöntemi ile proteomik açıdan araştırılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen protein ve metabolitler literatür yardımıyla AH ile ilişkilendirilmiştir. Tüm bu verilerin beraber değerlendirilmesi ile AH oluşum mekanizması yeni bir bakış açısıyla incelenmiş ve bu mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlanmıştır.

Sonuç olarak elde edilen veriler, AH'nin patogenezi için erken moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılmasının büyük önem taşıdığını göstermektedir. Yenidoğan 5xFAD beyin dokusunda gözlemlenen ve AH beyniyle benzerlik gösteren moleküler değişikliklerin uzun süre boyunca herhangi bir patolojiye neden olmaması veya herhangi bir semptom göstermemesinin nedeni, nöroprotektif ve yıkıcı mekanizmaların eşzamanlı olarak etkili olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen bulgular, AH'nin doğum kadar erken dönemde var olabileceği ve beyin hasara karşı daha savunmasız olduğu yaşlılık döneminde ortaya çıkabileceği fikrini ve bazı proteinlerin yenidoğan AH beyinde nörodejeneratif öncüler olduğu fikrini desteklemektedir.

7 KAYNAKLAR

1. Martin B, Brenneman R, Becker KG, Gucek M, Cole RN, Maudsley S. iTRAQ analysis of complex proteome alterations in 3xTgAD Alzheimer's mice: Understanding the interface between physiology and disease. *PLoS One*. 2008;3(7).
2. Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science* (80-). 2006;314(5800):777–81.
3. Teter B, Ashford JW. Neuroplasticity in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2002;70(3):402–37.
4. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*. 1990;27(5):457–64.
5. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 1991;30(4):572–80.
6. Gauthier S, Rosa-Neto P, Morais JA & WC. World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia. London, England: Alzheimer's Disease International. [Internet]. Alzheimer's Disease International. 2021. Available from: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2021/>
7. Jankowsky JL, Zheng H. Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2017 Dec 22;12(1):89. Available from: <https://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13024-017-0231-7>
8. Forner S, Kawauchi S, Balderrama-Gutierrez G, Kramár EA, Matheos DP, Phan J, et al. Systematic phenotyping and characterization of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Data*. 2021;8(1):1–16.
9. Ismeurt C, Giannoni P, Claeysen S. The 5×FAD mouse model of Alzheimer's disease. In: *Diagnosis and Management in Dementia* [Internet]. Elsevier; 2020. p. 207–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128158548000136>
10. Oblak AL, Forner S, Territo PR, Sasner M, Carter GW, Howell GR, et al. Model organism development and evaluation for late- onset Alzheimer's disease: MODEL- AD. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* [Internet]. 2020 Jan 23;6(1):1–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/trc2.12110>
11. Chen K, Baluya D, Tosun M, Li F, Maletic-Savatic M. Imaging Mass Spectrometry: A New Tool to Assess Molecular Underpinnings of Neurodegeneration. *Metabolites* [Internet]. 2019 Jul 10;9(7):135. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-1989/9/7/135>
12. Walker HJ. Metabolite imaging by mass spectrometry: A new discovery tool [Internet]. 1st ed. Vol. 98, *Advances in Botanical Research*. Elsevier Ltd.; 2021. 271–296 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.abr.2020.09.022>
13. Gurel B, Cansev M, Koc C, Ocalan B, Cakir A, Aydin S, et al. Proteomics Analysis of CA1 Region of the Hippocampus in Pre-, Progression and Pathological Stages in a Mouse Model of

- the Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2019;16(7):613–21.
14. Schumacher-Schuh A, Bieger A, Borelli W V., Portley MK, Awad PS, Bandres-Ciga S. Advances in Proteomic and Metabolomic Profiling of Neurodegenerative Diseases. *Front Neurol* [Internet]. 2022 Jan 31;12(January):1–14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2021.792227/full>
 15. Wilkins JM, Trushina E. Application of Metabolomics in Alzheimer's Disease. *Front Neurol* [Internet]. 2018 Jan 12;8(JAN):1–20. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2017.00719/full>
 16. Barre FPY, Heeren RMA, Potocnik NO. Mass Spectrometry Imaging in Nanomedicine: Unraveling the Potential of MSI for the Detection of Nanoparticles in Neuroscience. *Curr Pharm Des*. 2017;23(13):1974–84.
 17. Esteve C, Jones EA, Kell DB, Boutin H, McDonnell LA. Mass spectrometry imaging shows major derangements in neurogranin and in purine metabolism in the triple-knockout 3×Tg Alzheimer mouse model. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2017;1865(7):747–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.04.002>
 18. Huber K, Khamehgir-Silz P, Schramm T, Gorshkov V, Spengler B, Römpp A. Approaching cellular resolution and reliable identification in mass spectrometry imaging of tryptic peptides. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(23):5825–37.
 19. Naj AC, Schellenberg GD. Genomic variants, genes, and pathways of Alzheimer's disease: An overview. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* [Internet]. 2017 Jan 12;174(1):5–26. Available from: <file:///C:/Users/Carla%0ACarolina/Desktop/Artigos%0Apara%0Aacrescentar%0Ana%0Aqualificação/The%0Aimpact%0Aof%0Abirth%0Aweight%0Aon%0Acardiovascular%0Adisease%0Arisk%0Ain>
 20. Farfel JM, Yu L, Buchman AS, Schneider JA, De Jager PL, Bennett DA. Relation of genomic variants for Alzheimer disease dementia to common neuropathologies. *Neurology*. 2016;87(5):489–96.
 21. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem*. 2003;85(6):1394–401.
 22. Wesenhagen KEJ, Teunissen CE, Visser PJ, Tijms BM. Cerebrospinal fluid proteomics and biological heterogeneity in Alzheimer's disease: A literature review. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2020;57(2):86–98. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1670613>
 23. Baird AL, Westwood S, Lovestone S. Blood-based proteomic biomarkers of Alzheimer's disease pathology. *Front Neurol*. 2015;6(NOV).
 24. Varma VR, Oommen AM, Varma S, Casanova R, An Y, Andrews RM, et al. Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: A targeted metabolomics study. Brayne C, editor. *PLOS Med* [Internet]. 2018 Jan 25;15(1):e1002482. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002482>

25. Mazi AR, Arzuman AS, Gurel B, Sahin B, Tuzuner MB, Ozansoy M, et al. Neonatal Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Transgenic Mouse Model. *J Alzheimer's Dis reports*. 2018 Apr;2(1):79–91.
26. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, Castellano JM, Mosher KI, Luo J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med*. 2014;20(6):659–63.
27. Deture MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2019;14(1):1–18.
28. Ciurea VA, Covache-Busuioc RA, Mohan AG, Costin HP, Voicu V. Alzheimer's disease: 120 years of research and progress. *J Med Life [Internet]*. 2023 Feb;16(2):173–7. Available from: <https://medandlife.org/wp-content/uploads/1.-jml-2022-0111.pdf>
29. Cipriani G, Dolciotti C, Picchi L, Bonuccelli U. Alzheimer and his disease: A brief history. *Neurol Sci*. 2011;32(2):275–9.
30. Bermejo-Pareja F, del Ser T. Controversial Past, Splendid Present, Unpredictable Future: A Brief Review of Alzheimer Disease History. *J Clin Med*. 2024;13(2).
31. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules [Internet]*. 2020 Dec 8;25(24):5789. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/24/5789>
32. Monteiro AR, Barbosa DJ, Remião F, Silva R. Alzheimer's disease: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and disease-modifying drugs. *Biochem Pharmacol [Internet]*. 2023 May 23;211(2):115522. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-014-1375-y>
33. Sheppard O, Coleman M. Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. In: *Alzheimer's Disease: Drug Discovery [Internet]*. Exon Publications; 2020. p. 1–22. Available from: <https://exonpublications.com/index.php/exon/article/view/252>
34. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol [Internet]*. 2017 Feb 26;133(2):155–75. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-016-1662-x>
35. Drummond E, Nayak S, Faustin A, Pires G, Hickman R, Askenazi M, et al. Proteomic Differences in Amyloid Plaques in Rapidly Progressive and Sporadic Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol*. 2017;133(6):933–54.
36. Talwar P, Sinha J, Grover S, Rawat C, Kushwaha S, Agarwal R, et al. Dissecting Complex and Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease Pathogenesis: a Clinical, Genomic, and Systems Biology Perspective. *Mol Neurobiol [Internet]*. 2016;53(7):4833–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-015-9390-0>
37. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group* under the auspices of department of health and human services task force on alzheimer's disease. *Neurology*. 1984;34(7):939–44.

38. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2011 May 22;7(3):263–9. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
39. Abubakar MB, Sanusi KO, Ugusman A, Mohamed W, Kamal H, Ibrahim NH, et al. Alzheimer's Disease: An Update and Insights Into Pathophysiology. *Front Aging Neurosci*. 2022;14(March):1–16.
40. Kashyap G, Bapat D, Das D, Gowaikar R, Amritkar RE, Rangarajan G, et al. Synapse loss and progress of Alzheimer's disease -A network model. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Apr 25;9(1):6555. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-43076-y>
41. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2011 Sep 1;1(1):a006189–a006189. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a006189>
42. Thal DR, Walter J, Saido TC, Fändrich M. Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2015 Feb 23;129(2):167–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-014-1375-y>
43. Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Berry RW. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2005 Jan;1739(2–3):216–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443904001619>
44. Cacace R, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early- onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2016 Jun 23;12(6):733–48. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.jalz.2016.01.012>
45. Andrade-Guerrero J, Santiago-Balmaseda A, Jeronimo-Aguilar P, Vargas-Rodríguez I, Cadena-Suárez AR, Sánchez-Garibay C, et al. Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Feb 13;24(4):3754. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/4/3754>
46. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2015 Jan;77(1):43–51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
47. Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2019 Sep;15(9):501–18. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-019-0228-7>
48. Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2019 Aug 23;4(1):29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>
49. Agarwal M, Alam MR, Haider MK, Malik MZ, Kim DK. Alzheimer's Disease: An Overview of Major Hypotheses and Therapeutic Options in Nanotechnology. *Nanomaterials* [Internet].

- 2020 Dec 29;11(1):59. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/1/59>
50. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 2011 Jul 21;34(1):185–204. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>
 51. Kanaan NM, Himmelstein DS, Ward SM, Combs B, Binder LI. Tau Protein. In: *Movement Disorders* [Internet]. Second Edi. Elsevier; 2015. p. 857–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405195-9.00056-1>
 52. Iqbal K, del C. Alonso A, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2005 Jan;1739(2–3):198–210. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443904001784>
 53. Madnani RS. Alzheimer's disease: a mini-review for the clinician. *Front Neurol*. 2023;14(June):1–7.
 54. Vejandla B, Savani S, Appalaneni R, Veeravalli RS, Gude SS. Alzheimer's Disease: The Past, Present, and Future of a Globally Progressive Disease. *Cureus*. 2024;16(1):1–8.
 55. Lukiw WJ. Amyloid beta (A β) peptide modulators and other current treatment strategies for Alzheimer's disease (AD). *Expert Opin Emerg Drugs* [Internet]. 2012 Mar 23;17(1):43–60. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728214.2012.672559>
 56. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal β -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci* [Internet]. 2006 Oct 4;26(40):10129–40. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
 57. Murayama C, Kimura Y, Setou M. Imaging mass spectrometry: principle and application. *Biophys Rev* [Internet]. 2009 Sep 9;1(3):131–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12551-009-0015-6>
 58. Kang JS. Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. In: *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles* [Internet]. InTech; 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-applications-and-principles/principles-and-applications-of-lc-ms-ms-for-the-quantitative-bioanalysis-of-analytes-in-various-biol>
 59. Haag AM. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2016. p. 157–69. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-41448-5_7
 60. Thomas SN, French D, Jannetto PJ, Rappold BA, Clarke WA. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nat Rev Methods Prim* [Internet]. 2022 Dec 8;2(1):96. Available from: <https://www.nature.com/articles/s43586-022-00175-x>
 61. Gross JH. Mass Spectrometry [Internet]. Vol. 56, Analytical Chemistry. Cham: Springer

- International Publishing; 2017. 417–467 p. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00269a027>
62. Karpievitch Y V., Polpitiya AD, Anderson GA, Smith RD, Dabney AR. Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. *Ann Appl Stat* [Internet]. 2010 Dec 1;4(4):2105–6. Available from: <https://projecteuclid.org/journals/annals-of-applied-statistics/volume-4/issue-4/Liquid-chromatography-mass-spectrometry-based-proteomics--Biological-and-technological/10.1214/10-AOAS341.full>
 63. Chen R, Yi Y, Xiao W, Zhong B, Zhang L, Zeng Y. Urinary protein biomarkers based on LC–MS/MS analysis to discriminate vascular dementia from Alzheimer’s disease in Han Chinese population. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2023 Jan 25;15(January). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2023.1070854/full>
 64. Korecka M, Shaw LM. Alzheimer ’ s Disease biomarkers in biological fluids. 2022;159(2):211–33.
 65. Lin CH, Lin YN, Lane HY, Chen CJ. The identification of a potential plasma metabolite marker for Alzheimer’s disease by LC-MS untargeted metabolomics. *J Chromatogr B* [Internet]. 2023 May;1222(October 2022):123686. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123686>
 66. Barre FPY, Heeren RMA, Potocnik NO. Mass Spectrometry Imaging in Nanomedicine: Unraveling the Potential of MSI for the Detection of Nanoparticles in Neuroscience. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2017 May 23;23(13):1974–84. Available from: <http://www.eurekaselect.com/node/149154/article>
 67. Beine B, Diehl HC, Meyer HE, Henkel C. Tissue maldi mass spectrometry imaging (MALDI MSI) of peptides. *Methods Mol Biol*. 2016;1394:129–50.
 68. Basu SS, Regan MS, Randall EC, Abdelmoula WM, Clark AR, Gimenez-Cassina Lopez B, et al. Rapid MALDI mass spectrometry imaging for surgical pathology. *npj Precis Oncol* [Internet]. 2019;3(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41698-019-0089-y>
 69. Kriegsmann J, Kriegsmann M, Casadonte R. MALDI TOF imaging mass spectrometry in clinical pathology: A valuable tool for cancer diagnostics (review). *Int J Oncol*. 2015;46(3):893–906.
 70. Chen Y, Hu D, Zhao L, Tang W, Li B. Unraveling metabolic alterations in transgenic mouse model of Alzheimer’s disease using MALDI MS imaging with 4-aminocinnoline-3-carboxamide matrix. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2022;1192:339337. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339337>
 71. Buchberger AR, DeLaney K, Johnson J, Li L. Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights [Internet]. Vol. 90, *Analytical Chemistry*. 2018. 240–265 p. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.7b04733>
 72. Hoffmann F, Umbreit C, Krüger T, Pelzel D, Ernst G, Kniemeyer O, et al. Identification of Proteomic Markers in Head and Neck Cancer Using MALDI–MS Imaging, LC–MS/MS, and Immunohistochemistry. *Proteomics - Clin Appl*. 2019;13(1):1–26.

73. Boughton BA, Thinakaran D, Sarabia D, Bacic A, Roessner U. Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochem Rev.* 2015;15(3):445–88.
74. Cobice DF, Goodwin RJA, Andren PE, Nilsson A, Mackay CL, Andrew R. Future technology insight: mass spectrometry imaging as a tool in drug research and development. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2015 Jul 5;172(13):3266–83. Available from: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13135>
75. Chughtai K, Heeren RMA. Mass Spectrometric Imaging for Biomedical Tissue Analysis. *Chem Rev* [Internet]. 2010 May 12;110(5):3237–77. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr100012c>
76. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* [Internet]. 2009 May 19;6(5):359–62. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmeth.1322>
77. Thomas A, Chaurand P. Advances in tissue section preparation for MALDI imaging MS. *Bioanalysis.* 2014;6(7):967–82.
78. Cillero-Pastor B, Heeren RMA. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging for peptide and protein analyses: A critical review of on-tissue digestion. *J Proteome Res.* 2014;13(2):325–35.
79. Kakuda N, Miyasaka T, Iwasaki N, Nirasawa T, Wada-Kakuda S, Takahashi-Fujigasaki J, et al. Distinct deposition of amyloid- β species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5(1):73.
80. Karayel-Basar M. HUNTINGTON HASTALIĞI BEYİN PROTEOM DEĞİŞİMLERİNİN YAC128 TRANSGENİK FARE MODELİNDE MALDI- MS GÖRÜNTÜLEME TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI. Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University; 2022.
81. Bergvall T. Normalization Methods for Imaging Mass. Uppsala University School of Engineering UPTEC; 2008.
82. Gustafsson JOR, Eddes JS, Meding S, Koudelka T, Oehler MK, McColl SR, et al. Internal calibrants allow high accuracy peptide matching between MALDI imaging MS and LC-MS/MS. *J Proteomics* [Internet]. 2012;75(16):5093–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.054>
83. Gobom J, Mueller M, Egelhofer V, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. A calibration method that simplifies and improves accurate determination of peptide molecular masses by MALDI-TOF MS. *Anal Chem.* 2002;74(15):3915–23.
84. Angel PM, Norris-Caneda K, Drake RR. In Situ Imaging of Tryptic Peptides by MALDI Imaging Mass Spectrometry Using Fresh-Frozen or Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *Curr Protoc Protein Sci.* 2018;94(1):1–21.
85. Harris WA, Janecki DJ, Reilly JP. Use of matrix clusters and trypsin autolysis fragments as mass calibrants in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16(18):1714–22.
86. Ransom HW, Varghese RS, Goldman R. Computational Methods for Analysis of MALDI-TOF

- Spectra to Discover Peptide Serum Biomarkers. 2009;1175–83.
87. Schober Y, Schramm T, Spengler B, Römpf A. Protein identification by accurate mass matrix-assisted laser desorption/ionization imaging of tryptic peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011;25(17):2475–83.
 88. Moodley KK, Chan D. The Hippocampus in Neurodegenerative Disease. In: *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* [Internet]. 2014. p. 95–108. Available from: <https://karger.com/books/book/245/chapter/5169657>
 89. Yin F. Lipid metabolism and Alzheimer's disease: clinical evidence, mechanistic link and therapeutic promise. *FEBS J* [Internet]. 2023 Mar 18;290(6):1420–53. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.16344>
 90. Schönfeld P, Reiser G. How the brain fights fatty acids' toxicity. *Neurochem Int* [Internet]. 2021 Sep;148(April):105050. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018621000966>
 91. Schönfeld P, Reiser G. Brain energy metabolism spurns fatty acids as fuel due to their inherent mitotoxicity and potential capacity to unleash neurodegeneration. *Neurochem Int* [Internet]. 2017 Oct;109:68–77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018617301092>
 92. Szrok-Jurga S, Turyn J, Hebanowska A, Swierczynski J, Czumaj A, Sledzinski T, et al. The Role of Acyl-CoA β -Oxidation in Brain Metabolism and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Sep 12;24(18):13977. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/18/13977>
 93. Bhatt S, Puli L, Patil CR. Role of reactive oxygen species in the progression of Alzheimer's disease. *Drug Discov Today* [Internet]. 2021 Mar;26(3):794–803. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.12.004>
 94. Sharma C, Kim S. Oxidative stress: culprit or consequence in Alzheimer's amyloidopathy. *Neural Regen Res* [Internet]. 2023;18(9):1948–9. Available from: https://journals.lww.com/nrronline/Citation/9000/Oxidative_stress__culprit_or_consequence_in.99690.aspx
 95. Butterfield DA, Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2019 Mar 8;20(3):148–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6>
 96. Liu JL, Fan YG, Yang ZS, Wang ZY, Guo C. Iron and Alzheimer's Disease: From Pathogenesis to Therapeutic Implications. *Front Neurosci* [Internet]. 2018 Sep 10;12(SEP):1–14. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00632/full>
 97. Wang T, Wang CY, Shan ZY, Teng WP, Wang ZY. Clioquinol Reduces Zinc Accumulation in Neuritic Plaques and Inhibits the Amyloidogenic Pathway in A β PP/PS1 Transgenic Mouse Brain. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2012 Mar 30;29(3):549–59. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2011-111874>
 98. Bush AI. The Metal Theory of Alzheimer's Disease. Perry G, Zhu X, Smith MA, Sorensen A,

- Avila J, editors. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2012 Dec 27;33(s1):S277–81. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2012-129011>
99. Lovell M., Robertson J., Teesdale W., Campbell J., Markesbery W. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* [Internet]. 1998 Jun 26;158(1):47–52. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1066896907302118>
 100. Gerlach M, Ben- Shachar D, Riederer P, Youdim MBH. Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases? *J Neurochem* [Internet]. 1994 Sep 23;63(3):793–807. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1471-4159.1994.63030793.x>
 101. Sindi IA, Tannenberg RK, Dodd PR. A role for the neurexin–neuroligin complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2014 Apr;35(4):746–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.032>
 102. Südhof TC. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* [Internet]. 2008 Oct 16;455(7215):903–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature07456>
 103. Camporesi E, Nilsson J, Vrillon A, Cognat E, Hourregue C, Zetterberg H, et al. Quantification of the trans-synaptic partners neurexin-neuroligin in CSF of neurodegenerative diseases by parallel reaction monitoring mass spectrometry. *eBioMedicine* [Internet]. 2022 Jan;75:103793. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103793>
 104. Panzi C, Surana S, De La-Rocque S, Moretto E, Lazo OM, Schiavo G. Botulinum neurotoxin A modulates the axonal release of pathological tau in hippocampal neurons. *Toxicon* [Internet]. 2023 Jun;228(February):107110. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107110>
 105. Yesudhas A, Roshan SA, Radhakrishnan RK, Abirami GPP, Manickam N, Selvaraj K, et al. Intramuscular Injection of BOTOX® Boosts Learning and Memory in Adult Mice in Association with Enriched Circulation of Platelets and Enhanced Density of Pyramidal Neurons in the Hippocampus. *Neurochem Res* [Internet]. 2020 Dec 24;45(12):2856–67. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03133-9>
 106. Desprez F, Ung DC, Vourc'h P, Jeanne M, Laumonnier F. Contribution of the dihydropyrimidinase-like proteins family in synaptic physiology and in neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci*. 2023;17(April).
 107. Lin YS, Lin YF, Chen KC, Yang YK, Hsiao YH. Collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) causes social deficits and accelerates memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* [Internet]. 2019;157(June):107673. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107673>
 108. Quach TT, Moutal A, Khanna R, Deems NP, Duchemin AM, Barrientos RM. Collapsin Response Mediator Proteins: Novel Targets for Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2020 Sep 29;77(3):949–60. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-200721>
 109. Schmidt EF, Strittmatter SM. The CRMP Family of Proteins and Their Role in Sema3A

- Signaling. In: Bone [Internet]. 2007. p. 1–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
110. Quintremil S, Medina Ferrer F, Puente J, Elsa Pando M, Antonieta Valenzuela M. Roles of Semaphorins in Neurodegenerative Diseases. *Neurons - Dendrites Axons*. 2019;
 111. Good PF, Alapat D, Hsu A, Chu C, Perl D, Wen X, et al. A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *J Neurochem* [Internet]. 2004 Nov 27;91(3):716–36. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2004.02766.x>
 112. Jun G, Asai H, Zeldich E, Drapeau E, Chen C, Chung J, et al. *PLXNA* 4 is associated with Alzheimer disease and modulates tau phosphorylation. *Ann Neurol* [Internet]. 2014 Sep 29;76(3):379–92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.24219>
 113. Carulli D, de Winter F, Verhaagen J. Semaphorins in Adult Nervous System Plasticity and Disease. *Front Synaptic Neurosci* [Internet]. 2021 May 11;13(May):1–23. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2021.672891/full>
 114. Clarke JP, Thibault PA, Salapa HE, Levin MC. A Comprehensive Analysis of the Role of hnRNP A1 Function and Dysfunction in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disease. *Front Mol Biosci*. 2021;8(April):1–19.
 115. Chung CG, Lee H, Lee SB. Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018 Sep 12;75(17):3159–80. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2854-4>
 116. Clarke JP, Thibault PA, Salapa HE, Levin MC. A Comprehensive Analysis of the Role of hnRNP A1 Function and Dysfunction in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disease. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2021 Apr 12;8(April):1–19. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.659610/full>
 117. Low YH, Asi Y, Foti SC, Lashley T. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins: Implications in Neurological Diseases. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2021 Feb;58(2):631–46. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12035-020-02137-4>
 118. Ji XH, Liu TT, Wei AH, Lei HP, Chen Y, Wu LN, et al. Suppression of hnRNP A1 binding to HK1 RNA leads to glycolytic dysfunction in Alzheimer's disease models. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2023 Aug 31;15(August). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2023.1218267/full>
 119. Xiao X, Yuan Z, Guo L, Liao X, Zhou Y, Zhang W, et al. The role of frontotemporal dementia associated genes in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2021 Nov;107:153–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.05.016>
 120. Donev R, Newall A, Thome J, Sheer D. A role for SC35 and hnRNPA1 in the determination of amyloid precursor protein isoforms. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2007 Jul 13;12(7):681–90. Available from: <https://www.nature.com/articles/4001971>
 121. Berson A, Barbash S, Shaltiel G, Goll Y, Hanin G, Greenberg DS, et al. Cholinergic- associated

- loss of hnRNP- A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2012 Aug 25;4(8):730–42. Available from: <https://www.embopress.org/doi/10.1002/emmm.201100995>
122. Tsanov M, Manahan-Vaughan D. Synaptic plasticity from visual cortex to hippocampus: Systems integration in spatial information processing. *Neuroscientist*. 2008;14(6):584–97.
 123. Hawkinson TR, Clarke HA, Young LEA, Conroy LR, Markussen KH, Kerch KM, et al. In situ spatial glycomic imaging of mouse and human Alzheimer's disease brains. *Alzheimer's Dement*. 2021;(June):1–15.
 124. Wang Y, Xu J, You W, Shen H, Li X, Yu Z, et al. Roles of Rufy3 in experimental subarachnoid hemorrhage-induced early brain injury via accelerating neuronal axon repair and synaptic plasticity. *Mol Brain* [Internet]. 2022;15(1):1–20. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13041-022-00919-6>
 125. Chiu CC, Yeh TH, Lai SC, Wu-Chou YH, Chen CH, Mochly-Rosen D, et al. Neuroprotective effects of aldehyde dehydrogenase 2 activation in rotenone-induced cellular and animal models of parkinsonism. *Exp Neurol* [Internet]. 2015 Jan;263:244–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488614002994>
 126. Hafner A, Glavan G, Obermajer N, Živin M, Schliebs R, Kos J. Neuroprotective role of γ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging Cell*. 2013;12(4):604–14.
 127. Du Y, Du Y, Zhang Y, Huang Z, Fu M, Li J, et al. MKP-1 reduces $A\beta$ generation and alleviates cognitive impairments in Alzheimer's disease models. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2019;4(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-019-0091-4>
 128. Hunt AP, Minett GM, Gibson OR, Kerr GK, Stewart IB. Could Heat Therapy Be an Effective Treatment for Alzheimer's and Parkinson's Diseases? A Narrative Review. *Front Physiol*. 2020;10(January):1–14.
 129. Held T, Barakat AZ, Mohamed BA, Paprotta I, Meinhardt A, Engel W, et al. Heat-shock protein HSPA4 is required for progression of spermatogenesis. *Reproduction*. 2011;142(1):133–44.
 130. Wang DB, Kinoshita Y, Kinoshita C, Uo T, Sopher BL, Cudaback E, et al. Loss of endophilin-B1 exacerbates Alzheimer's disease pathology. *Brain*. 2015;138(7):2005–19.
 131. Wang J, He Z. NAD and axon degeneration: from the Wlds gene to neurochemistry. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2009;3(1):77–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372760>
 132. Salvadores N, Gerónimo-Olvera C, Court FA. Axonal Degeneration in AD: The Contribution of $A\beta$ and Tau. *Front Aging Neurosci*. 2020;12(October):1–16.
 133. Usardi A, Iyer K, Sigoillot SM, Dusonchet A, Selimi F. The immunoglobulin-like superfamily member IGSF3 is a developmentally regulated protein that controls neuronal morphogenesis. *Dev Neurobiol*. 2016;77(1):75–92.
 134. Zeng Q, Siu W, Li L, Jin Y, Liang S, Cao M, et al. Autophagy in Alzheimer's disease and promising modulatory effects of herbal medicine. *Exp Gerontol* [Internet]. 2019;119(December

- 2018);100–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.01.027>
135. Uddin MS, Stachowiak A, Al Mamun A, Tzvetkov NT, Takeda S, Atanasov AG, et al. Autophagy and Alzheimer's disease: From molecular mechanisms to therapeutic implications. *Front Aging Neurosci.* 2018;10(JAN):1–18.
 136. Rehiman SH, Lim SM, Lim FT, Chin AV, Tan MP, Kamaruzzaman SB, et al. Fibrinogen isoforms as potential blood-based biomarkers of Alzheimer's disease using a proteomics approach. *Int J Neurosci* [Internet]. 2020;0(0):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1860038>
 137. Cheon MS, Fountoulakis M, Cairns NJ, Dierssen M, Herkner K, Lubec G. Decreased protein levels of stathmin in adult brains with Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2001;(61):281–8.
 138. Hayashi K, Pan Y, Shu H, Ohshima T, Kansy JW, White CL, et al. Phosphorylation of the tubulin-binding protein, stathmin, by Cdk5 and MAP kinases in the brain. *J Neurochem.* 2006;99(1):237–50.
 139. Chadwick W, Brenneman R, Martin B, Maudsley S. Complex and Multidimensional Lipid Raft Alterations in a Murine Model of Alzheimer's Disease. Casadesus G, editor. *Int J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2010;2010:604792. Available from: <https://doi.org/10.4061/2010/604792>
 140. Barker R, Kehoe PG, Love S. Activators and inhibitors of the plasminogen system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2012;16(4):865–76.
 141. Angelucci F, Čechová K, Průša R, Hort J. Amyloid beta soluble forms and plasminogen activation system in Alzheimer's disease: Consequences on extracellular maturation of brain-derived neurotrophic factor and therapeutic implications. *CNS Neurosci Ther.* 2019;25(3):303–13.
 142. Ivanov PA, Mikhaylova NM, Klyushnik TP. Distribution of translation initiation factor eIF3 in neutrophils in Alzheimer disease. *Biochem Suppl Ser A Membr Cell Biol.* 2016;10(4):328–32.
 143. Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease. In: *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. 2019. p. 231–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128047668000133>
 144. Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci* [Internet]. 2017;40(6):347–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.002>
 145. Cuestas Torres DM, Cardenas FP. Synaptic plasticity in Alzheimer's disease and healthy aging. *Rev Neurosci* [Internet]. 2020 Apr 28;31(3):245–68. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/revneuro-2019-0058/html>
 146. Pelucchi S, Stringhi R, Marcello E. Dendritic spines in alzheimer's disease: How the actin cytoskeleton contributes to synaptic failure. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):1–23.
 147. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2018 Jan 30;12(JAN). Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00025/full>

148. Connolly K, Lehoux M, O'Rourke R, Assetta B, Erdemir GA, Elias JA, et al. Potential role of chitinase- 3- like protein 1 (CHI3L1/YKL- 40) in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2022 Mar 2;(October 2021):1–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/alz.12612>
149. Skaper SD, Facci L, Zusso M, Giusti P. Synaptic Plasticity, Dementia and Alzheimer Disease. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* [Internet]. 2017 Apr 12;16(3):220–33. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5273&volume=16&issue=3&spage=220>
150. Tzioras M, McGeachan RI, Durrant CS, Spires-Jones TL. Synaptic degeneration in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2022 Dec 13; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-022-00749-z>
151. Zhang X, Liu W, Cao Y, Tan W. Hippocampus Proteomics and Brain Lipidomics Reveal Network Dysfunction and Lipid Molecular Abnormalities in APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Proteome Res* [Internet]. 2020 Aug 7;19(8):3427–37. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.0c00255>
152. Kaya I, Brinet D, Michno W, Syvänen S, Sehlin D, Zetterberg H, et al. Delineating Amyloid Plaque Associated Neuronal Sphingolipids in Transgenic Alzheimer's Disease Mice (tgArcSwe) Using MALDI Imaging Mass Spectrometry. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2017 Feb 15;8(2):347–55. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acschemneuro.6b00391>
153. Zhang X, Wu C, Tan W. Brain Lipid Dynamics in Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 Mouse Model of Early Alzheimer's Disease by Desorption Electrospray Ionization and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization–Mass Spectrometry Imaging Techniques. *J Proteome Res* [Internet]. 2021 May 7;20(5):2643–50. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.0c01050>
154. O'Rourke MB, Smith CC, De La Monte SM, Sutherland GT, Padula MP. Higher Mass Accuracy MALDI- TOF/TOF Lipid Imaging of Human Brain Tissue in Alzheimer's Disease. *Curr Protoc Mol Biol* [Internet]. 2019 Apr 8;126(1):1–13. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpmb.86>
155. de la Monte SM, Tong M. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014 Apr;88(4):548–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.012>
156. Wang X, Yang X, Hou Z, Tian S, Xu G, Li J, et al. Whole-brain mapping of metabolic alterations in a mouse model of Alzheimer's disease by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. *Talanta* [Internet]. 2023 Feb;253(July 2022):124046. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124046>
157. Kaddurah- Daouk R, Rozen S, Matson W, Han X, Hulette CM, Burke JR, et al. Metabolomic changes in autopsy- confirmed Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2011 May 15;7(3):309–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2010.06.001>
158. Snowden SG, Ebshiana AA, Hye A, An Y, Pletnikova O, O'Brien R, et al. Association between

- fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. Brayne C, editor. *PLOS Med* [Internet]. 2017 Mar 21;14(3):e1002266. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002266>
159. Blank M, Hopf C. Spatially resolved mass spectrometry analysis of amyloid plaque- associated lipids. *J Neurochem* [Internet]. 2021 Oct;159(2):330–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jnc.15216>
 160. Piomelli D, Astarita G, Rapaka R. A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2007 Oct;8(10):743–54. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrn2233>
 161. Akyol S, Ugur Z, Yilmaz A, Ustun I, Gorti SKK, Oh K, et al. Lipid Profiling of Alzheimer's Disease Brain Highlights Enrichment in Glycerol(phospho)lipid, and Sphingolipid Metabolism. *Cells* [Internet]. 2021 Sep 29;10(10):2591. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/10/2591>
 162. Corrigan FM, Horrobin DF, Skinner ER, Besson JAO, Cooper MB. Abnormal content of n–6 and n–3 long-chain unsaturated fatty acids in the phosphoglycerides and cholesterol esters of parahippocampal cortex from Alzheimer's disease patients and its relationship to acetyl CoA content. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 1998 Mar;30(2):197–207. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272597001258>
 163. Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL, McClure RJ. Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2001;26(7):771–82.
 164. Oma S, Mawatari S, Saito K, Wakana C, Tsuboi Y, Yamada T, et al. Changes in Phospholipid Composition of Erythrocyte Membrane in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* [Internet]. 2012 Aug 15;2(1):298–303. Available from: <https://karger.com/DEE/article/doi/10.1159/000341603>
 165. Sabogal-Guáqueta AM, Arias-Londoño JD, Gutierrez-Vargas J, Sepulveda-Falla D, Glatzel M, Villegas-Lanau A, et al. Common disbalance in the brain parenchyma of dementias: Phospholipid profile analysis between CADASIL and sporadic Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2020 Aug;1866(8):165797. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443920301423>
 166. Ma X, Li X, Wang W, Zhang M, Yang B, Miao Z. Phosphatidylserine, inflammation, and central nervous system diseases. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2022 Aug 3;14(August):1–18. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2022.975176/full>
 167. Wells K, Farooqui AA, Liss L, Horrocks LA. Neural membrane phospholipids in alzheimer disease. *Neurochem Res* [Internet]. 1995 Nov;20(11):1329–33. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00992508>
 168. Lampl Y, Lorberboym M, Blankenberg FG, Sadeh M, Gilad R. Annexin V SPECT imaging of phosphatidylserine expression in patients with dementia. *Neurology* [Internet]. 2006 Apr 25;66(8):1253–4. Available from: <https://www.neurology.org/doi/10.1212/01.wnl.0000208436.75615.8c>
 169. Martín V, Fabelo N, Santpere G, Puig B, Marín R, Ferrer I, et al. Lipid alterations in lipid rafts

- from Alzheimer's disease human brain cortex. *J Alzheimer's Dis.* 2010;19(2):489–502.
170. Kim WS, Jary E, Pickford R, He Y, Ahmed RM, Piguet O, et al. Lipidomics Analysis of Behavioral Variant Frontotemporal Dementia: A Scope for Biomarker Development. *Front Neurol* [Internet]. 2018 Feb 28;9(FEB):1–11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2018.00104/full>
 171. Yao JK, Wengenack TM, Curran GL, Poduslo JF. Reduced Membrane Lipids in the Cortex of Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Neurochem Res* [Internet]. 2009 Jan 29;34(1):102–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-008-9673-1>
 172. Martínez-Gardeazabal J, González de San Román E, Moreno-Rodríguez M, Llorente-Ovejero A, Manuel I, Rodríguez-Puertas R. Lipid mapping of the rat brain for models of disease. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2017 Sep;1859(9):1548–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.02.011>
 173. González-Domínguez R, García-Barrera T, Vitorica J, Gómez-Ariza JL. Region-specific metabolic alterations in the brain of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2014 Dec;1842(12):2395–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.09.014>
 174. Fitzner D, Bader JM, Penkert H, Bergner CG, Su M, Weil MT, et al. Cell-Type- and Brain-Region-Resolved Mouse Brain Lipidome. *Cell Rep* [Internet]. 2020 Sep;32(11):108132. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108132>
 175. Dejakaisaya H, Harutyunyan A, Kwan P, Jones NC. Altered metabolic pathways in a transgenic mouse model suggest mechanistic role of amyloid precursor protein overexpression in Alzheimer's disease. *Metabolomics* [Internet]. 2021 May 19;17(5):42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11306-021-01793-4>
 176. Yi M, Zhang C, Zhang Z, Yi P, Xu P, Huang J, et al. Integrated Metabolomic and Lipidomic Analysis Reveals the Neuroprotective Mechanisms of Bushen Tiansui Formula in an A β 1-42-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2020 Jun 20;2020:1–18. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2020/5243453/>
 177. Moré MI, Freitas U, Rutenberg D. Positive Effects of Soy Lecithin-Derived Phosphatidylserine plus Phosphatidic Acid on Memory, Cognition, Daily Functioning, and Mood in Elderly Patients with Alzheimer's Disease and Dementia. *Adv Ther* [Internet]. 2014 Dec 21;31(12):1247–62. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12325-014-0165-1>

8 EKLER

EK 1

Etik Kurul İzni



EK 2

Korteks Bölgesine Ait Proteinlerin Listesi

Tablo 23. Korteks bölgesi ko-kültür grubu istatistiksel olarak anlamlı protein listesi

Accession	Anova (p)	Max fold change	Protein
Q8CCK0	0.00973591	2.118820582	Core histone macro-H2A.2
Q91V76	0.04996542	2.022324962	Ester hydrolase C11orf54 homolog
P46096	0.01647791	1.949826262	Synaptotagmin-1
Q80UU9	0.02800417	1.80996738	Membrane-associated progesterone receptor component 2
Q9R112	0.01832572	1.795789685	Sulfide:quinone oxidoreductase
Q9CY27	0.00246838	1.749144127	Very-long-chain enoyl-CoA reductase
P31324	0.00568811	1.655401725	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
Q8CIB5	0.00497683	1.62260942	Fermitin family homolog 2
P67984	0.02115368	1.595745035	60S ribosomal protein L22
P28652	0.03588759	1.584320217	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II
Q61233	0.00838121	1.581416812	Plastin-2
Q921G7	0.03340132	1.559664383	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase
P52760	0.04583014	1.501232858	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase
Q9Z1G4	0.02487417	1.498833818	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a 1
Q61205	0.00514362	1.497414388	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit
Q9QYS9	0.0467902	1.474333438	Protein quaking
Q91VR5	0.03994643	1.468367847	ATP-dependent RNA helicase DDX1
P20108	0.02728582	1.45989002	Thioredoxin-dependent peroxide reductase
P53810	0.04811371	1.45565113	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform
Q9CR86	0.01704021	1.429386777	Calcium-regulated heat stable protein 1
E9Q912	0.01803669	1.413807644	Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1
P53026	0.00819898	1.409868958	60S ribosomal protein L10a
P16330	0.00379733	1.404198338	2-3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
Q9QUM9	0.02483911	1.398738553	Proteasome subunit alpha type-6
P45591	0.0110821	1.391331106	Cofilin-2
P06837	0.02720125	1.379761241	Neuromodulin
O08599	0.0028682	1.370340086	Syntaxin-binding protein 1
P0CG49	0.00500337	1.367722862	Polyubiquitin-B
Q9WTX5	0.00822655	1.365922772	S-phase kinase-associated protein 1
O70318	0.04989949	1.364048434	Band 4.1-like protein 2
P31786	0.00199094	1.35775958	Acyl-CoA-binding protein
Q69ZZ9	0.0345052	1.351906833	Microtubule-actin cross-linking factor 1
P31001	0.02106523	1.342447132	Desmin
Q91V12	0.01754498	1.328190867	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase
Q9DCW4	0.03237736	1.315992909	Electron transfer flavoprotein subunit beta
Q8K310	0.04628762	1.315181895	Matrin-3
Q9CQQ7	0.01280315	1.313800111	ATP synthase F(0) complex subunit B1
Q9JLF6	0.00359321	1.3106079	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K
P35980	0.0200329	1.307599931	60S ribosomal protein L18
Q9CQF9	0.00274312	1.304634301	Prenylcysteine oxidase 1
O08807	0.01995372	1.304569448	Peroxiredoxin-4

Tablo 24. Korteks bölgesi transgenik grup istatistiksel olarak anlamlı protein listesi

Accession	Anova (p)	Max fold change	Protein
P11152	0.02851737	7.355624814	Lipoprotein lipase
P28738	0.02738022	3.230316814	Kinesin heavy chain isoform 5C
P02301	0.02778407	2.802538944	Histone H3.3C
Q8CCK0	1.61E-05	2.530232281	Core histone macro-H2A.2
P31324	0.00045103	2.325347838	cAMP-dependent protein kinase type II
Q3ULJ0	0.02104209	2.212129022	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1
Q61205	1.08E-05	2.098159273	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB
Q9Z1G4	0.00033099	2.061035185	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a 1
P14231	0.00399434	2.053414897	Sodium/potassium-transporting ATPase
O08599	0.00057504	1.982714451	Syntaxin-binding protein 1
P46096	0.04394073	1.850215975	Synaptotagmin-1
Q91V12	0.01288592	1.816441309	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase
Q8R001	0.02052006	1.796774726	Microtubule-associated protein RP/
Q61233	0.00125339	1.789832835	Plastin-2
Q9CR86	0.01585885	1.78809433	Calcium-regulated heat stable protein 1
P62911	0.03515728	1.767683732	60S ribosomal protein L32
P51880	0.00359696	1.74693918	Fatty acid-binding protein
O35887	0.01983789	1.712784985	Calumenin
P28652	0.00083454	1.701203181	Calcium/calmodulin-dependent protein kinaseII
Q8CIB5	0.02643636	1.67038852	Fermitin family homolog 2
Q9ERD7	0.00330456	1.662338135	Tubulin beta-3 chain
P21279	0.04265077	1.642953911	Guanine nucleotide-binding protein G(q)
Q8K1M6	0.00484293	1.640551371	Dynamin-1-like protein
P97792	0.01808133	1.62352011	Coxsackievirus and adenovirus receptor
O88531	0.01014738	1.621362313	Palmitoyl-protein thioesterase 1
A2AQ07	0.00344684	1.611268393	Tubulin beta-1 chain
Q9Z1Q9	0.03688223	1.592317375	Valine--tRNA ligase
Q9WTX5	0.03165935	1.587849468	S-phase kinase-associated protein 1
P51655	0.02475401	1.57840629	Glypican-4
O88809	0.03246059	1.549374804	Neuronal migration protein doublecortin
P50580	0.03731079	1.54644186	Proliferation-associated protein 2G4
Q62188	0.0007392	1.518436099	Dihydropyrimidinase-related protein 3
Q5FWK3	0.02781868	1.517070167	Rho GTPase-activating protein 1
P31001	0.0349555	1.51275297	Desmin
Q5M8N0	0.02203979	1.511460707	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1
Q9D6F9	0.01272475	1.506609686	Tubulin beta-4A chain
P97427	0.00176012	1.505980013	Dihydropyrimidinase-related protein 1
P54227	0.00066584	1.503959994	Stathmin
Q62465	0.00713518	1.486375582	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1
P62717	0.02072094	1.482489264	60S ribosomal protein L18a
Q922F4	0.02998834	1.460318607	Tubulin beta-6 chain
Q9CQW1	0.00252208	1.454762773	Synaptobrevin homolog YKT6
Q922Q8	0.01056728	1.448282266	Leucine-rich repeat-containing protein 59
P48722	0.00898074	1.445204463	Heat shock 70 kDa protein 4L
P51863	0.01174509	1.43831907	V-type proton ATPase subunit d 1
O54901	0.00546742	1.437827252	V-type proton ATPase subunit

Tablo 24. Korteks bölgesi transgenik grup istatistiksel olarak anlamlı protein listesi (devam)

Accession	Anova (p)	Max fold change	Protein
O54901	0.00546742	1.437827252	V-type proton ATPase subunit
Q9D0F9	0.01720014	1.433154298	Phosphoglucomutase-1
Q91ZJ5	0.01893936	1.424388984	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
P70372	0.04336252	1.420375209	ELAV-like protein
Q8BFZ9	0.00864462	1.4181807	Erlin-2
P50396	0.00173679	1.415101545	Rab GDP dissociation inhibitor alpha
P63323	0.04171965	1.414477939	40S ribosomal protein S12
P16627	0.01561308	1.414207446	Heat shock 70 kDa protein 1-like
P08556	0.00330465	1.414074828	GTPase NRas
P05063	0.00045999	1.412189918	Fructose-bisphosphate aldolase C
P14094	0.02499574	1.40886496	Sodium/potassium-transporting ATPase
P18572	0.00643768	1.407648951	Basigin
P23927	0.00840019	1.402910139	Alpha-crystallin B chain
O55022	0.00449704	1.398112283	Membrane-associated progesterone receptor
P53026	0.04942214	1.394995705	60S ribosomal protein L10a
P20060	0.0087781	1.382814284	Beta-hexosaminidase subunit beta
Q8BK64	0.04076777	1.374651909	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase
P62960	0.02475999	1.374583417	Y-box-binding protein 1
P40240	0.01233314	1.373432777	CD9 antigen
Q9WUA3	4.72E-05	1.366336291	ATP-dependent 6-phosphofructokinase
Q9R0H0	0.00497425	1.356604151	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
Q9EQF6	0.01377406	1.356160766	Dihydropyrimidinase-related protein 5
Q99LB6	0.02482386	1.354668394	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta
P37804	0.01315372	1.354667025	Transgelin
Q99L04	0.00290196	1.351427256	Dehydrogenase/reductase SDR family member
Q9CZ30	0.0034778	1.349030899	Obg-like ATPase 1
P16125	0.00064299	1.345630927	L-lactate dehydrogenase B chain
P57776	0.02574507	1.342133918	Elongation factor 1-delta
P03995	0.00082952	1.338921203	Glial fibrillary acidic protein
P14873	0.00640219	1.336271306	Microtubule-associated protein 1B
P31786	0.00135133	1.334869907	Acyl-CoA-binding protein
Q9CQF9	0.00282833	1.333548662	Prenylcysteine oxidase 1
Q99JY9	0.0011662	1.327277201	Actin-related protein 3
P0CG49	0.00580499	1.326176941	Polyubiquitin-B
O35685	0.01697914	1.323877195	Nuclear migration protein nudC
Q01405	0.04728115	1.319522504	Protein transport protein Sec23A
P21107	0.01719999	1.312997475	Tropomyosin alpha-3 chain
Q91VR5	0.01555342	1.312193766	ATP-dependent RNA helicase DDX1
Q91VC3	0.03501261	1.302881608	Eukaryotic initiation factor 4A-III
P02088	0.01895346	1.302323166	Hemoglobin subunit beta-1
P61164	0.02697568	1.300862319	Alpha-centractin

EK 3

Serebellum Bölgesine Ait Proteinlerin Listesi

Tablo 25. Serebellum ko-kültür grubu istatistiksel olarak anlamlı protein listesi

Accession	Anova (p)	Max fold change	Protein
P33175	0.03189573	1.927405192	Kinesin heavy chain isoform 5A
P28656	0.008814	1.798589702	Nucleosome assembly protein 1-like 1
Q99KC8	0.0453793	1.794916532	von Willebrand factor A domain-containing protein 5A
Q9DBH5	0.00089895	1.711172045	Vesicular integral-membrane protein VIP36
Q9WV80	0.00655635	1.698100954	Sorting nexin-1
P97825	0.02219487	1.629507635	Jupiter microtubule associated homolog 1
P31001	0.02124844	1.615720429	Desmin
O08997	0.02237808	1.530563882	Copper transport protein AT
Q80YV3	0.00702359	1.528036524	Transformation/transcription domain-associated protein
P63011	0.03047402	1.496236752	Ras-related protein Rab-3A
P37804	0.0022531	1.481756023	Transgelin
Q8VBV7	0.02522947	1.462888542	C
P27600	0.00838707	1.447943339	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12
P49312	0.02175645	1.446010739	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
Q9CQU0	0.04450027	1.428590321	Thioredoxin domain-containing protein 12
P50580	0.03324509	1.418636172	Proliferation-associated protein 2G4
Q9DCH4	0.02826744	1.414097608	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F
P60867	0.02641477	1.385051902	40S ribosomal protein S20
Q8CGC7	0.02013825	1.381176424	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase
P97427	0.02330402	1.338395057	Dihydropyrimidinase-related protein 1
P17156	0.01148509	1.336364443	Heat shock-related 70 kDa protein 2
Q7TPR4	0.04187767	1.327437735	Alpha-actinin-1
P31786	0.03567149	1.322865094	Acyl-CoA-binding protein
Q05816	0.00639778	1.32004867	Fatty acid-binding protein 5
Q9EQF6	0.02131136	1.309045932	Dihydropyrimidinase-related protein 5
O88990	0.02144167	1.308104246	Alpha-actinin-3

Tablo 26. Serebellum transgenik grup istatistiksel olarak anlamlı protein listesi

Accession	Anova (p)	Max fold change	Protein
P55258	0.03999262	3.131082688	Ras-related protein Rab-8A
Q9DBH5	1.28E-05	2.955446302	Vesicular integral-membrane protein VIP36
Q99LC3	0.00915784	1.858382721	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10
P15105	0.02553693	1.805689404	Glutamine synthetase
P61264	0.0248044	1.795164215	Syntaxin-1B
Q6Q477	0.02404143	1.783380312	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4
Q9JLF6	0.0197502	1.740706363	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K
P63011	0.02209162	1.729494798	Ras-related protein Rab-3A
P48455	0.02614112	1.723655305	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit gamma isoform
Q9WV80	0.00397715	1.687189411	Sorting nexin-1
P37804	0.00094406	1.662933841	Transgelin
P68372	0.02047821	1.643262119	Tubulin beta-4B chain
P31254	0.04426142	1.546138527	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 Y
P97427	0.00070335	1.538704831	Dihydropyrimidinase-related protein 1
P60867	0.00692275	1.522158734	40S ribosomal protein S20
P84084	0.04186219	1.497375271	ADP-ribosylation factor 5
P51655	0.03432129	1.484603276	Glypican-4
Q9ERD7	0.0455927	1.480118111	Tubulin beta-3 chain
Q9CQU0	0.03489129	1.443343211	Thioredoxin domain-containing protein 12
P06837	0.0021626	1.432679274	Neuromodulin
P21107	0.01650762	1.430907403	Tropomyosin alpha-3 chain
P70372	0.01695649	1.427050891	ELAV-like protein 1
O54983	0.01967958	1.426781335	Ketimine reductase mu-crystallin
P16110	0.03882233	1.417693675	Galectin-3
Q6PIC6	0.01578399	1.413557884	Sodium/potassium-transporting ATPase
Q9EQF6	0.00804328	1.399020436	Dihydropyrimidinase-related protein 5
Q91XV3	0.00758446	1.397229868	Brain acid soluble protein 1
Q9CR67	0.02355226	1.396971542	Transmembrane protein 33
P62761	0.022484	1.39353999	Visinin-like protein 1
P50580	0.02452259	1.387827877	Proliferation-associated protein 2G4
Q99L04	0.01694222	1.381010278	Dehydrogenase/reductase SDR family member 1
P62855	0.02050317	1.376856091	40S ribosomal protein S26
P49312	0.02908062	1.34043752	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
Q62188	0.01485084	1.300032039	Dihydropyrimidinase-related protein 3

9 ÖZGEÇMİŞ



