

**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GENETİK ABSANS EPİLEPSİ (GAERS) DENEYSEL  
MODELİNDE KORTEKS MEMBRAN  
PROTEOMLARININ İNCELENMESİ**

**Başak YÜCE DURSUN**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ayşe OGAN**

**İSTANBUL 2011**

**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GENETİK ABSANS EPİLEPSİ (GAERS) DENEYSEL  
MODELİNDE KORTEKS MEMBRAN  
PROTEOMLARININ İNCELENMESİ**

**Başak YÜCE DURSUN  
(141200520060050)**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ayşe OGAN**

**İSTANBUL 2011**

# TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle çalışmama yön veren, özverisini hiçbir zaman esirgemeyerek çalışmama maddi ve manevi her türlü desteği karşılıksız veren değerli hocam, Kimya Bölüm Başkanı ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşe OGAN'a,

Tez çalışmam sırasında tüm olanakları sunan sayın dekanımız Prof. Dr. Nihat ÖZTOPRAK'a,

Tez çalışmamda kullandığım deney hayvanlarının temin edilmesinde ve doku örneklerinin çıkarılmasında birebir yardımcı olan, çalışma ile ilgili bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan tez izleme komite üyesi Prof. Dr. Filiz ONAT'a,

Tez çalışmalarımı izleyerek fikirlerini aktaran tez izleme komite üyesi Doç. Dr. Rezzan GÜLHAN'a,

Tez çalışmamın başlangıcından son aşamasına kadar desteklerini ve yardımlarını benden esirgemeyen, özverileriyle karşılaştığım güçlükleri çözmemde büyük katkı sağlayan değerli arkadaşlarım Dr. Serap DEMİR'e ve Dr. Özkan DANIŞ'a,

Doktora eğitimim süresince aldığım Yurt İçi Doktora Burs Programı ile doktora eğitimime odaklanarak çalışmalarımı maddi sıkıntı düşünmeden daha rahat yürütmemi sağlayan, bilim destekçisi TÜBİTAK-BİDEB'e,

Tezimi destekleyen, Marmara Üniversitesi BAPKO'ya,

Bana küçük yaşlardan beri aşıladığı bilim ve eğitim sevgisiyle akademik yaşamı bana sevdiren ve bakış açımı geliştiren sevgili babam Prof. Dr. Rikap YÜCE'ye, desteğini ve sevgisini hayatımın sonuna dek yanımda hissedeceğim, fedakârlıklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem Dt. Emine YÜCE'ye,

Beni her zaman destekleyen, sevgisiyle cesaretlendiren, her konuda anlayış gösteren ve yardımcı olan sevgili eşim Gökhan DURSUN'a,

Tez çalışmamın yazım aşamasında annesine rahat bir hamilelik dönemi yaşatarak desteğini hissettiren, merakla beklediğimiz minik oğlum Can DURSUN'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Eylül, 2011

**Başak YÜCE DURSUN**

# İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vii
YENİLİK BEYANI .....	ix
SEMBOLLER .....	x
KISALTMALAR .....	xii
ŞEKİLLER .....	xiv
TABLolar .....	xv
BÖLÜM I GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER .....	4
II.1. EPİLEPSİ ve EPİLEPTİK NÖBET .....	4
II.2. EPİLEPSİ İNSİDANSI ve PREVALANSI .....	5
II.3. EPİLEPSİ PATOLOJİSİ .....	6
II.4. ABSANS EPİLEPSİ .....	7
II.5. DENEYSEL MODELLER .....	8
II.6. KORTEKS BÖLGESİ ve EPİLEPSİ PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ ÖNEMİ .....	9
II.7. MEMBRAN PROTEİNLERİ .....	10
II.8. PROTEOMİK .....	11
II.8.1. Proteomiğin Temeli .....	12
II.8.2. Örnek Hazırlığı ve Çözünürleştirme .....	14
II.8.3. Birinci Boyut – İzoelektrik Odaklama .....	18
II.8.4. İkinci Boyut – SDS-PAGE .....	20
II.8.5. Jellerin Boyanması .....	21
II.8.6. Proteinlerin Tanımlanması .....	22
II.8.7. Karşılaşılan Zorluklar .....	24
II.9. NÖROLOJİK ÇALIŞMALARDA PROTEOMUN YERİ .....	25

<b>II.10. MEMBRAN PROTEİNLERİNİN PROTEOM ÇALIŞMALARINDAKİ ÖNEMİ</b> .....	27
<b>BÖLÜM III ÇALIŞMALAR</b> .....	31
<b>III.1. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ</b> .....	31
<b>III.2. ARAŞTIRMA ARAÇLARI</b> .....	32
<b>III.2.1. Araştırmada Kullanılan Cihazlar</b> .....	32
<b>III.2.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar</b> .....	32
<b>III.3. YAPILAN ÇALIŞMALAR</b> .....	33
<b>III.3.1. Örnek Hazırlama</b> .....	33
<b>III.3.2. Bradford Metoduna Göre Protein Tayini</b> .....	34
<b>III.3.3. Elektroforez İşlemi Öncesi Arındırma ile Örneklerin Hazırlanması</b> .....	35
<b>III.3.4. İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi</b> .....	36
<b>III.3.4.1. Örneklerin IPG Şeritlerine Yüklenmesi</b> .....	36
<b>III.3.4.2. İzoelektrik Odaklama</b> .....	37
<b>III.3.4.3. SDS-PAGE İşleminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması</b> .....	39
<b>III.3.4.4. Jel Kasetlerinin Hazırlanması ve Jelin Dökülmesi</b> .....	40
<b>III.3.4.5. IPG Jellerin Dengelenmesi</b> .....	41
<b>III.3.4.6. SDS PAGE işlemi</b> .....	42
<b>III.3.5. Jellerin Kolloidal Coomassie ile Boyanması</b> .....	44
<b>III.3.5.1. Kullanılan Çözeltiler</b> .....	44
<b>III.3.5.2. Boyama İşlemi</b> .....	45
<b>III.3.6. Jel Görüntülerinin Bilgisayar Destekli Analizi</b> .....	46
<b>III.3.7. MALDI-Tof Analizi</b> .....	47
<b>III.3.7.1. Örnek Hazırlığı İçin Kullanılan Çözeltiler</b> .....	47
<b>III.3.7.2. Parçalama işlemi</b> .....	48
<b>III.3.7.3. Ekstraksiyon İşlemi</b> .....	49
<b>III.3.7.4. Örneklerin Uygulanması</b> .....	49
<b>BÖLÜM IV SONUÇLAR ve TARTIŞMA</b> .....	52
<b>IV.1. ÖRNEK HAZIRLAMA ve PROTEİN MİKTARLARI</b> .....	52
<b>IV.2. 2D-PAGE SONUÇLARI</b> .....	53
<b>IV.3. 2D-PAGE ANALİZ SONUÇLARI</b> .....	56
<b>IV.4. MALDI TOF/TOF SONUÇLARI</b> .....	57
<b>IV.5. TARTIŞMA</b> .....	59
<b>IV.5.1. Ekspresyonunda Artış Görülen Proteinler</b> .....	61

IV.5.1.1. Albümin .....	61
IV.5.1.2. 14-3-3 Proteini Epsilon İzofomu .....	62
IV.5.1.3. L-Laktat Dehidrojenaz B Zinciri .....	63
IV.5.2. Ekspresyonunda Azalma Görülen Proteinler .....	64
IV.5.2.1. Isı-Şok Proteinleri .....	64
IV.5.2.2. Aktin .....	65
IV.5.2.3. Guanin Nükleotid-Bağlayıcı Protein .....	66
IV.5.2.4. Malat Dehidrojenaz .....	67
<b>BÖLÜM V SON DEĞERLENDİRMELER ve ÖNERİLER</b> .....	69
<b>EKLER</b> .....	71
<b>EK. 1. KÜTLE ANALİZİ SONUÇLARI</b> .....	72
<b>EK. 2. TEZ METNİNDE GEÇEN TERİMLERİN AÇIKLAMALARI</b> .....	105
<b>KAYNAKLAR</b> .....	110
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	119

# ÖZET

## GENETİK ABSANS EPİLEPSİ (GAERS) DENEYSEL MODELİNDE KORTEKS MEMBRAN PROTEOMLARININ İNCELENMESİ

Epilepsi günümüzde, kendiliğinden oluşan ve tekrarlayan nöbetler ile tanımlanmaktadır. Her yaşta gerçekleşebilen, normal beyin fonksiyonunun önceden tahmin edilemeyen ve tekrarlayan kesintilere uğraması şeklinde karakterize edilen bir beyin hastalığıdır. Epilepsi üzerinde uzun yıllar sürdürülen çalışmalara rağmen, bu durumun altında yatan moleküler mekanizmalar hakkındaki bilgiler hala sınırlıdır. Epilepsi durumunda çeşitli reseptörler, iyon kanalı proteinleri ve beyindeki haberleşme mekanizmalarında yer alan proteinler üzerindeki değişiklikler, çeşitli protein analiz yöntemleri kullanılarak incelenmektedir.

Membran proteinleri, hücresel proteinlerin önemli bir kısmını oluştururlar. Hücre adhezyonu, sinyal iletimi, iyon ya da metabolit taşınımı gibi hücresel işlemlerde anahtar rol oynarlar. Bu nedenle de ilaç gelişimi için önemli hedeftirler. Aynı zamanda membrana bağlı çeşitli iyon kanallarında meydana gelen değişikliklerin epilepsi ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

Proteomiğin geniş ölçekte amacı, protein haritasını ve bu haritanın biyolojik fonksiyonlarını araştırmak, bunun sonucunda da yeni ilaç hedeflerini ve tanılayıcı belirteçleri ortaya koymaktır. Bir biyolojik sistemdeki proteinleri, bu proteinlerin yapılarını, etkileşimlerini ve post-translasyonel modifikasyonlarını belirlemeyi sağlayan, aynı zamanda spesifik hastalıklar ya da toksik ajanlar gibi dış etkenlerle indüklenen durumlarda ortaya çıkan farklılıkların araştırılması için kullanılan güçlü bir tekniktir. Bu teknikte proteinler önce iki boyutlu elektroforez ile izoelektrik noktalarına (pI) ve molekül ağırlıklarına göre ayrılır ve daha sonra jelden kesilen proteinler kütle spektrometresi ile tanımlanırlar.

Bu çalışmada, absans epilepsi genetik sıçan modeli olan “Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg; GAERS” beyin korteks dokusu membran proteinleri proteomik teknolojisi kullanılarak incelenmiştir. Doku örneklerindeki proteinler iki-boyutlu jel elektroforezi tekniği ile ayrılmıştır. Kontrol ve GAERS gruplarında anlamlı olarak ekspresyon farklılığı gösteren protein spotları PDQuest iki-boyutlu jel

analiz yazılımı ile belirlenmiş ve MALDI TOF/TOF ile tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinler sırasıyla; ısı-şok kognat 71 kDa proteini, albümin, 60 kDa ısı-şok proteini, aktin, 14-3-3 protein epsilon izoformu, guanin nükleotit bağlayıcı protein altünite beta-1, L-laktat dehidrojenaz B zinciri ve malat dehidrojenazdır. Tanımlanmış olan bu proteinlerden, albümin, 14-3-3 protein epsilon izoformu ve L-laktat dehidrojenaz B zinciri ekspresyonları GAERS grubunda artış gösterirken, diğer proteinlerin ekspresyonları azalma göstermektedir.

**Eylül, 2011**

**Başak YÜCE DURSUN**

# **ABSTRACT**

## **INVESTIGATION OF CORTEX MEMBRANE PROTEOMES IN GENETIC ABSENCE EPILEPSY (GAERS) EXPERIMENTAL MODEL**

Epilepsy is defined by spontaneous and recurrent seizures. It is a brain disorder, can occur at all ages and characterized by unpredictable and recurrent disruption of normal brain function. Despite long-term studies, the progress of understanding, molecular mechanisms underlying epilepsy have been still limited. In case of epilepsy, changes in various receptors, ion channel proteins and proteins that exist in brain communication mechanisms have been investigated by many protein analysis techniques.

Membrane proteins, constitute a significant proportion of the cellular proteins and play key functions in many cellular processes including cell adhesion, signal transduction, ion or metabolite transport. Therefore, they are important targets for drug development. Also the differentiation in protein expressions of membrane bound ion channel proteins are thought to be associated with epilepsy.

The goal of proteomics in broad perspective is to investigate the protein maps and their biological functions and consequently to detect novel drug targets and diagnostic markers. It is a powerful technique that is used for the investigation of changes of proteins in a biological system, their structures, interactions, post-translational modifications, and in particular the changes in their levels and their modifications, which are resulting from specific diseases or induced by various external factors, such as toxic agents. In this technique, proteins are first separated by two-dimensional electrophoresis on the basis of their pI's and molecular sizes and then identified by mass spectrometry.

In this study, membrane protein expressions of brain cortex tissue in a genetic rat model of absence epilepsy "Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg; GAERS" have been investigating by using proteomics technology. Proteins from tissue samples were isolated and separated by two-dimensional gel electrophoresis technique. Protein spots that showed significant differences in protein expression between control and GAERS groups were detected by PDQuest two-dimensional

electrophoresis analysis software and identified by MALDI TOF/TOF. Identified proteins were heat shock cognate protein 71 kDa, albumin, 60 kDa heat-shock protein, actin, 14-3-3 protein epsilon isoform, guanine nucleotide binding protein subunit beta-1, L-lactate dehydrogenase B chain and malate dehydrogenase, respectively. Expressions of albumin, 14-3-3 protein epsilon isoform and L-lactate dehydrogenase were upregulated, while expressions of other proteins were downregulated in GAERS.

# **YENİLİK BEYANI**

## **GENETİK ABSANS EPİLEPSİ (GAERS) DENEYSEL MODELİNDE KORTEKS MEMBRAN PROTEOMLARININ İNCELENMESİ**

Çok yaygın olarak rastlanan bir nörolojik hastalık olduğundan epilepsi ile ilgili çalışmalar literatürde oldukça fazladır. İlaç denemeleri, hastalar üzerinde doğrudan ve gen düzeyinde yapılan çalışmalar olmasına rağmen epilepsi hastalığı ile ilgili proteomik çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu konudaki bilimsel araştırmalar genellikle temporal mesiyal lob epilepsili hastalar, kindling ve kainik asitle oluşturulan epilepsili sıçanlarla yapılan çalışmalardır.

Patofizyolojik çalışmalar etik nedenlerden ötürü insanlar üzerinde gerçekleştirilemez. İyi karakterize edilmiş hayvan modelleri, insan epilepsisi ile ilişkili davranışsal ve fizyolojik değişikliklerin anlaşılması, epilepsinin altında yatan moleküler ve hücresel değişikliklerin aydınlatılması, epilepsinin tedavisinde yeni ve alternatif yaklaşımların belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu modellerden biri olan Strazburg-Genetik Absans Epilepsi (GAERS) modeli ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen bu model ile yapılan proteomik çalışmalar oldukça az sayıdadır. GAERS modeli ile ilgili protein değişikliklerini inceleyen az sayıda yayın vardır, ancak bu modelin beyin korteks dokusu membran proteinleri üzerinde proteom tekniği kullanılarak henüz bir çalışma yapılmamıştır.

Çalışmamızda GAERS deneysel modelinde beyin paryetal korteks dokusu membran proteinleri kit kullanılarak ilk kez ayrılmış, elde edilen bu örnekler üzerinde iki boyutlu jel elektroforezi ilk kez uygulanmış ve yine ilk kez sekiz adet proteinin ekspresyonunda farklılıklar (artma ve azalma) bulunduğu gösterilmiştir. Bu proteomik veriler, epilepsi patojenezinin anlaşılmasında önem taşıyan hücresel işaretçilerin belirlenmesini sağlayabilir. Bu işaretçilerin ekspresyonunun değişmesine yol açan sebebin açığa çıkarılması ile epilepsinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına önemli bir katkı sağlanabilir.

**Eylül, 2011**

**Prof. Dr. Ayşe OGAN**

**Başak YÜCE DURSUN**

# SEMBOLLER

<b>%</b>	: Yüzde
<b>~</b>	: Yaklaşık
<b>&lt;</b>	: Küçük
<b>&gt;</b>	: Büyük
<b>°C</b>	: Santigrad Derece
<b>‰</b>	: Binde
<b>Å</b>	: Angström
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>dk</b>	: Dakika
<b>g</b>	: Gram
<b>K</b>	: Potasyum
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>L</b>	: Litre
<b>M</b>	: Molarite
<b>mA</b>	: Miliamper
<b>M<sub>A</sub></b>	: Molekül ağırlığı
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mm<sup>3</sup></b>	: Milimetreküp
<b>N</b>	: Normalite
<b>Na</b>	: Sodyum
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>p</b>	: İstatistikte olasılık değeri
<b>s</b>	: Saniye
<b>V</b>	: Volt
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa

<b>β</b>	: Beta
<b>γ</b>	: Gama
<b>ε</b>	: Epsilon
<b>ζ</b>	: Zeta
<b>η</b>	: Eta
<b>θ</b>	: Teta
<b>μg</b>	: Mikrogram
<b>μL</b>	: Mikrolitre
<b>σ</b>	: Sigma
<b>τ</b>	: Tau

# KISALTMALAR

<b>2D</b>	: Two dimensional, İki boyutlu
<b>AEİ</b>	: Antiepileptik ilaç
<b>APS</b>	: Amonyum peroksidosülfat
<b>BSA</b>	: Bovine Serum Albumin, Sığır serum albümini
<b>c/s</b>	: döngü/saniye
<b>CBB</b>	: Coomassie Brilliant Blue
<b>CHAPS</b>	: 3-[(3-Kolamidopropil)dimetilamonyo]-1-propan-sülfonat)
<b>CHCA</b>	: $\alpha$ -siyano-4-hidroksisinamik asit
<b>DIGE</b>	: Differential In Gel Electrophoresis, Diferansiyel jel elektroforezi
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DTE</b>	: Ditiyoeritritol
<b>DTT</b>	: Ditiyotreitol
<b>EEG</b>	: Elektroensefalogram
<b>ESI-MS</b>	: Electron Spray Ionization-Mass Spectrometry, Elektronsprey iyonizasyon-kütle spektrometrisi
<b>GABA</b>	: Gama-amino bütirik asit
<b>GAERS</b>	: Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg, Strazburg- Genetik Absans Epilepsi Modeli
<b>GDP</b>	: Guanozin difosfat
<b>GNBP</b>	: Guanin nükleotid bağlayıcı protein
<b>GTP</b>	: Guanozin trifosfat
<b>HCN</b>	: Hiperpolarizasyon-aktif katyon
<b>HSC</b>	: Heat shock cognate, ısı-şok kognat proteini
<b>HSP</b>	: Heat shock protein, ısı-şok proteini
<b>IEF</b>	: Isoelectric Focusing, İzoelektrik odaklama
<b>ILAE</b>	: International League Against Epilepsy, Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği
<b>IPG</b>	: İmmobilize pH gradyan
<b>LDH</b>	: Laktat dehidrojenaz
<b>M.Ö.</b>	: Milattan önce

<b>m/z</b>	: Mass/charge, kütle/yük
<b>MALDI</b>	: Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon
<b>MDH</b>	: Malat dehidrojenaz
<b>mRNA</b>	: Messenger-RNA, mesajcı-RNA
<b>MS</b>	: Mass spectrometry, Kütle spektrometrisi
<b>NAD<sup>+</sup></b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NADH</b>	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NADP</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>pH</b>	: Potential of hydrogen, Hidrojen potansiyeli
<b>pI</b>	: İzoelektrik nokta
<b>Q-TOF</b>	: Quadrupol- Time of flight, Kuadrupol- Uçuş zamanı
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesilsülfat
<b>SWD</b>	: Spike-and-wave discharge, Diken-ve-dalga deşarjı
<b>TBP</b>	: Tribütilfosfin
<b>TCA</b>	: Triklorasetik asit
<b>TEMED</b>	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
<b>TFA</b>	: Trifloroasetik asit
<b>TOF</b>	: Time of flight, Uçuş zamanı
<b>Tris</b>	: Tris-(hidroksimetil)-aminometan
<b>v/v</b>	: Volume/volume, Hacim/hacim
<b>w/v</b>	: Weight/volume, Ağırlık/hacim
<b>WAG/Rij</b>	: Wistar Albino Glaxo/Rijswijk
<b>WHO</b>	: World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü
<b>yy</b>	: Yüzyıl

# ŞEKİLLER

	<u>SAYFA NO</u>
Şekil II.1 Serebral korteks .....	9
Şekil II.2 Beyin bölgeleri .....	10
Şekil II.3 Proteomiğin genel akış şeması .....	14
Şekil II.4 Proteinlerin çözünürleştirilmesinde yaygın olarak kullanılan deterjanlar.	17
Şekil II.5 Disülfit bağlarının DTT ile indirgenmesi .....	18
Şekil II.6 Uçuş zamanı tüpü çalışma prensibi. ....	23
Şekil III.1 Tez çalışmasında izlenen yöntemler. ....	31
Şekil III.2 Tablaya örneğin yayılması. ....	37
Şekil III.3 IPG şeridinin örnek çözeltisi üzerine yerleştirilmesi. ....	37
Şekil III.4 IPG şeritlerinin odaklama tablasına yerleştirilmesi. ....	38
Şekil III.5 Protean IEF hücresi .....	38
Şekil III.6 2D-PAGE için gerekli parçalar ve jel kaseti. ....	40
Şekil III.7 Döküm standı ve jel kaseti .....	40
Şekil III.8 Şeridin jel kasetine yerleştirilmesi .....	42
Şekil III.9 Merkezi soğutma ünitesinin bileşenleri ve jel kasetinin merkezi soğutma ünitesine yerleştirilmesi. ....	43
Şekil III.10 SDS PAGE'in gerçekleştirildiği Protean II xi Multi-cell elektroforez tankı .....	44
Şekil III.11 İki boyutlu jel analiz yazılımı ile kontrol ve GAERS gruplarına (n=5) ait jellerin karşılaştırılarak farklılaşan spotların bulunması .....	46
Şekil III.12 <i>Applied Biosystems</i> 4800 MALDI TOF/TOF sistemi.....	50
Şekil III.13 MALDI analiz sonuçlarının internette taranması.....	51
Şekil IV.1 Bradford – protein standart grafiği.....	52
Şekil IV.2 GAERS grubu korteks bölgelerine ait 2D-PAGE sonuçları .....	54
Şekil IV.3 Kontrol WISTAR grubu korteks bölgelerine ait 2D-PAGE sonuçları.....	55
Şekil IV.4 Kontrol ve GAERS gruplarının beyin korteks bölgesine ait 2D-PAGE jellerinin karşılaştırılması .....	56

# TABLolar

## SAYFA NO

<b>Tablo II.1</b> Epilepsi nöbetlerinin 2009 yılı sınıflandırması.....	5
<b>Tablo III.1</b> Çalışmada kullanılan hastalıklı ve sağlıklı sıçan grupları .....	33
<b>Tablo III.2</b> İzoelektrik odaklama işlemi .....	39
<b>Tablo III.3</b> Jel kompozisyonu .....	41
<b>Tablo IV.1</b> GAERS ve kontrol grubu hayvanların beyin korteks bölgelerinden elde edilen protein miktarları .....	53
<b>Tablo IV.2</b> GAERS ve kontrol grubu hayvanlarına ait protein spotlarının istatistiksel analiz sonuçları .....	57
<b>Tablo IV.3</b> Ekspresyonu farklılaşmış olan proteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları. ....	58
<b>Tablo IV.4</b> Ekspresyonu farklılaşmış olan proteinlerin bazı özellikleri. ....	59

# BÖLÜM I

## GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, kendiliğinden oluşan ve tekrarlayan nöbetler ile tanımlanan ve her yaşta meydana gelebilen en yaygın kronik, nörolojik rahatsızlıktır. Çok sayıda çeşidi olan epilepsi genel olarak, kısa süreli uyarılar ya da kasların ani hareketiyle oluşan şiddetli ve uzun süreli kasılmalar şeklinde görülmektedir. Nöbetler birtakım nöronların ani, genellikle kısa süreli ve aşırı elektriksel deşarjı nedeniyle meydana gelmektedir. Bu deşarjlar, beyinin çeşitli bölgelerinde ortaya çıkabilir. Tek bir nöbet epilepsinin işaretçisi değildir. Epilepsi tanısı konulabilmesi için kişinin iki veya daha fazla sayıda kendiliğinden gerçekleşen nöbet geçirmesi gerekmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2010 yılı verilerine göre dünya üzerinde yaklaşık 50 milyon insan epilepsi hastasıdır. Bu insanların yaklaşık % 90'ı gelişmekte olan ülkelerdedir. Her yıl görülen yeni vakalarda insidans 2 yaş altı çocuklarda ve 65 yaş üstü kişilerde yüksektir.

Mevcut antiepileptik ilaçlar (AEİ) epilepsi hastalarının % 60-80'inde, önemli bir yan etki yaratmaksızın, nöbetleri tamamen ya da yeterli ölçüde kontrol altına almaktadır (Engel, 2002). Bu ilaçlar nöbetleri kontrol altına almakta ancak nöbet oluşumuna sebep olan bozuklukları ortadan kaldırmamaktadır (Elger ve Schmidt, 2008). Antiepileptik ilaçlar (AEİ'ler); iyon kanalları, metabolik enzimler, beyindeki nörotransmitter reseptörleri ve taşıyıcıları ile etkileşerek veya nöronların patlayıcı (bursting) özelliklerini değiştirerek epileptik aktivitenin yayılmasını önlerler ve senkronizasyonu azaltırlar. Aynı zamanda bu ilaçlar, nöral tüp defektleri, konjenital kalp defektleri, geç gelişim ve kromozom anomalileri gibi pek çok fetal kusurun da en yaygın sebebidir. Nöbetlerin tedavi edilmesi için kullanılan AEİ'ler hücre çoğalması, nörojenez, nöronal göç, programlı hücre ölümü, sinaptojenez ve miyelinizasyonu etkileyerek gelişmekte olan beynin normal gelişimini bozarlar. Küçük yaştaki çocuklarda ve hamile kadınlarda kullanımları önemli yan etkilere sebep olabilir (Ikonomidou ve Turski, 2010).

Epilepsi hastalarının %30'u uygulanan ilaç tedavisine yanıt vermemektedir (Beyenburg ve ark., 2004; Garcia Garcia ve ark., 2010; Higgins ve ark., 2010). Çeşitli tedavilerin gerçekleştirildiği bu hastaların bir kısmına da cerrahi tedavi uygulanmaktadır (Engel, 2002; Shaefi ve Harkness, 2003; Garcia Garcia ve ark., 2010). Cerrahi tedavi sırasında beyindeki epileptik odak çıkarılarak, nöbetlerin engellenmesine çalışılmakta ancak radikal bir yaklaşım olan bu tedavi şeklinin de kendi içinde kısıtlamaları bulunmaktadır (Ryvlin ve Kahane, 2003). Bu nedenle yeni, yaş-bağımlı anti-epileptik tedavilerin geliştirilmesi zorunludur.

2009 yılında yapılan son sınıflandırmaya göre; epilepsi nöbetleri, jeneralize (tüm beyine yayılan), fokal ve bilinmeyen epileptik spazmlar olmak üzere 3 ana başlıkta toplanmaktadır (Berg ve ark., 2010). Jeneralize epilepsilerin altında yer alan tipik absans epilepsinin belirgin özellikleri, ani ve kısa süreli bilinç kaybı, yapılan aktivitenin kesintiye uğraması ve çevre uyarımlarına kısa süreli tepkisizlik olarak nitelendirilmektedir. Epilepsi hastası çocukların % 10'u tipik absans epilepsi grubundadır (Panayiotopoulos, 1999). Tipik absans nöbetleri elektroensefalogramda (EEG), ansızın başlayan ve biten çift taraflı, senkronize ve düzenli, saniyede üç döngülü (c/s) diken-ve-dalga deşarjları (spike and wave discharges, SWD'ler) ile birlikte gelişir (Danober ve ark., 1998). Bu alanda yapılan deneysel çalışmalar, etik nedenlerden ötürü insanlar üzerinde gerçekleştirilemez. Bundan dolayı, epilepsi çalışmaları için drosophila'dan insan-dışı primatlara kadar çok sayıda hayvan modeli vardır. 20. yy'ın başlarından bu yana var olan hayvan modelleri epileptojenezin altında yatan temel mekanizmaların anlaşılmasında ve yeni geliştirilen antiepileptik ilaçların izlenmesinde bir araç olarak kullanılmaktadırlar (Sarkisian, 2001).

Strazburg'daki (Fransa) bir laboratuarda üretilen Wistar sıçanlarının % 30'u serebral korteks üzerinde senkron ve bilateral kendiliğinden gelişen SWD'ler göstermişlerdir. Birkaç nesil boyunca inbred olarak üretilen ve aynı SWD'leri gösteren tüm hayvanlardan bir suş seçilerek bu suşa "Strazburg-Genetik Absans Epilepsi Modeli" (Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg; GAERS) adı verilmiştir. Strazburg'daki aynı Wistar kolonisinden hiçbir SWD göstermeyen bir kontrol suşu da 30'un üzerinde nesilde outbred olarak üretilmiştir (Danober ve ark., 1998).

Epilepsi üzerinde uzun yıllar sürdürülen çalışmalara rağmen, bu durumun altında yatan moleküler mekanizmalar hakkındaki bilgiler hala sınırlıdır. Epilepsi durumunda özellikle GABAerjik, glutamerjik ve kolinerjik reseptörler, çeşitli iyon

kanalı proteinleri ve beyindeki haberleşme mekanizmalarında yer alan proteinler üzerindeki değişiklikler, çeşitli protein analiz yöntemleri kullanılarak incelenmektedir (Eun ve ark., 2004).

Beyin kompartmanlarının proteomik analizleri merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarını araştırmada, beyin fonksiyonlarını ve nörodejeneratif hastalıkları açıklamada güçlü bir teknolojidir. Beynin her bir bölgesi, gelişme ve patolojik bozukluklar sırasında kendine özgü farklı protein kompozisyonları içerir. Bu nedenle normal ve anormal durumlarda gerçekleştirilen beyin proteom analizi, beyin fonksiyonlarının moleküler temelini ve hastalıkların nedenlerini anlamada tercih edilen bir tekniktir (Fountoulakis, 2004; Olsen ve ark., 2007). Bugüne kadar proteomik insan, sıçan ve fare beyin proteinlerinin tanımlanmasında ve düzeylerinin belirlenmesinde, çeşitli nörolojik hastalıklar (insanlarda ve hayvan modellerinde Alzheimer Hastalığı, Down Sendromu, Parkinson Hastalığı, Huntington Hastalığı, kanser vs.) sonucunda meydana gelen değişikliklerin ve düzey farklılıklarının anlaşılması amacıyla kullanılmıştır (Petricoin ve ark., 2002; Fountoulakis, 2004).

Bu tezin amacı, GAERS deneysel modeli kullanılarak, absans epilepsi nöbetlerinin oluşumu ve sürdürülmesinde önemli rol oynayan korteks dokularının membran proteinlerindeki olası değişikliklerin saptanması ve epilepsi mekanizmalarını açıklayabilecek, tanı ve tedavisinde kullanılacak yeni bilgilerin elde edilmesidir.

Bu çalışmada; GAERS (hastalıklı) ve kontrol (sağlıklı) sıçanlarının korteks beyin dokuları membran kiti aracılığı ile ayrılarak elde edilen protein ekstraktları iki boyutlu jel elektroforezi kullanılarak analiz edildi. Jel üzerindeki proteinler ve polipeptitler koloidal Coomassie mavisi (Coomassie Brilliant Blue, CBB) boyama yöntemi kullanılarak görünür hale getirildi ve dijital ortamda jel görüntüleri alınarak hastalıklı ve sağlıklı durumlar için protein profilleri oluşturuldu. Elde edilen protein profilleri, iki boyutlu jel analiz yazılımı ile incelendi ve farklılaşan proteinler kütle spektrometrisi (mass spectrometry, MS) ile incelenerek tanımlandı.

## BÖLÜM II

### GENEL BİLGİLER

#### II.1. EPİLEPSİ ve EPİLEPTİK NÖBET

Epilepsi kelimesi, ‘yakalamak, tutmak’ anlamlarına gelen yunanca “*ēpilambánein*” sözcüğünden türeyen “*epilēpsía*” dan gelmektedir. *Ēpilambánein*, ‘üzerinde’ anlamına gelen “*epi*” ve ‘tutmak, ele geçirmek’ anlamına gelen “*lambánein*” kelimelerinden türemiştir. Buna karşın nöbet kelimesinin karşılığı olarak kullanılan “seizure” kelimesi tutmak, yakalamak, ele geçirmek anlamındaki “to seizure” fiilinden gelişmiştir (Acharya ve ark., 2008).

Epilepsi ilk çağlardan beri bilinmektedir. M.Ö. 460 yılında doğan Hipokrat, epilepsiyi ilk kez bir beyin hastalığı olarak tanımlamıştır. Epilepsi ile ilgili ilk monograf olan “On the Sacred Disease - Kutsal Hastalık Hakkında” adlı kitabında epilepsinin inanıldığı gibi bir lanet ya da kehanet gücü olmadığını, hastalığın beyin yerleşimli olduğunu belirtmiş ve epilepsiye “*mal caduque*” adını vermiştir.

İlk kez John Hughlings Jackson, 19. yüzyılın sonlarında epilepsinin modern tanımını “kaslardaki sinir dokularının ara sıra, aşırı, düzensiz deşarjı” olarak yapmıştır (Seğmen, 2005).

Epilepsi günümüzde, kendiliğinden oluşan ve tekrarlayan nöbetler ile tanımlanmaktadır (Engel, 2002). Her yaşta gerçekleşebilen, normal beyin fonksiyonunun önceden tahmin edilemeyen ve tekrarlayan kesintilere uğraması şeklinde karakterize edilen bir beyin hastalığıdır (Fisher ve ark., 2005; Elger ve Schmidt, 2008). Nöronların ani, genellikle kısa süreli ve aşırı elektriksel deşarjı nedeniyle meydana gelen nöbetler, kısa süreli uyarılar şeklinde ya da kasların ani hareketiyle oluşan şiddetli ve uzun süreli kasılmalar şeklinde görülmektedir.

1909 yılında kurulan Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (The International League Against Epilepsy-ILAE) epileptik bir nöbeti, ‘beyindeki anormal aşırı veya senkronize nöronal aktiviteden kaynaklanan, geçici semptomlar’ olarak tanımlamaktadır (Bambal ve ark., 2011). Epilepsi nöbeti; klinikte, gelip geçici,

devimsel, duyumsal, duygusal, bilişsel ve otonom, sıklıkla pozitif, bazen de negatif belirtilerle şekillenen bir durumdur (Danış, 2010).

Epileptik nöbetlerin fonksiyonel anatomisi nöbet tipiyle yakından ilişkilidir. Başlangıç evrelerinde kritik durumda olan ve gerektiğinde cerrahi müdahale için hedef olarak seçilen tek bir nöbet odağının varlığından bahsedilebildiği gibi, birden fazla bölgenin de sorumlu olabildiği nöbet şekilleri bildirilmektedir (Bambal ve ark., 2011).

Epileptik nöbetlerin sınıflandırılması ilk kez 1960 yılında yapılmış ve ILAE'ye bağlı Sınıflandırma ve Terminoloji Komisyonu tarafından 1981 yılında nöbetler ile ilgili, 1989 yılında da epilepsiler ile ilgili çeşitli güncellemeler yapılmıştır. ILAE sınıflandırması, modern nöro-görüntüleme sistemleri, genomik teknolojiler ve moleküler biyolojideki gelişmelere dayanarak yıllar içerisinde güncellenmektedir. Bugün geçerli olan ve Tablo.II.1' de verilen son sınıflandırma, 2009 yılında ILAE komisyonu tarafından kabul edilen son sınıflandırmadır (Berg ve ark., 2010).

**Tablo II.1** Epilepsi nöbetlerinin 2009 yılı sınıflandırması.

<b>Epilepsi Nöbetlerinin 2009 Yılı Sınıflandırması</b>	
➤	Jeneralize Nöbetler
▪	Tonik-klonik
▪	Absans
-	Tipik
-	Atipik
-	Özel niteliklere sahip absans
○	Miyoklonik absans
○	Göz kapağı miyoklonisi
▪	Miyoklonik
-	Miyoklonik
-	Miyoklonik atonik
-	Miyoklonik tonik
▪	Klonik
▪	Tonik
▪	Atonik
➤	Fokal (odaksal) Nöbetler
➤	Bilinmeyen
▪	Epileptik spazmlar

## **II.2. EPİLEPSİ İNSİDANSI ve PREVALANSI**

Epilepsi dünyada görülen nörolojik rahatsızlıkların başında gelir. Aktif epilepsi hastaları, epidemiyolojik çalışmaların ilgi odağıdır. Epilepsinin genel özelliklerini gösteren ve son 5 yıl içerisinde en az bir nöbet geçirmiş kişiler, aktif epilepsi hastalarıdır. Bazı çalışmalarda, son nöbetinin üzerinden 5 yıldan fazla zaman geçmiş

ancak hala AEİ kullanan kişiler de aktif epilepsi hastası olarak kabul edilmektedir (Forsgren ve ark., 2005).

Bir insanın, ortalama 80 yıllık bir yaşam süresince epileptik nöbet geçirme olasılığı %3' tür (Elger ve Schmidt, 2008).

2010 yılı WHO verilerine göre dünya üzerinde yaklaşık 50 milyon insan epilepsi hastasıdır. Hastalığın görülme sıklığı gelişmiş ülkelerde % 4-10 arasında iken bu oran gelişmekte olan ülkelerde % 6-10 arasındadır. Gelişmiş ülkelerde her yıl yeni vaka oranı % 0.4-0.7 arasında iken, gelişmekte olan ülkelerde bu oran 2 katına çıkmaktadır (Forsgren ve ark., 2005; Seğmen, 2005).

2004 yılında Avrupa genelinde yapılan bir araştırmanın sonuçlarına göre; epilepsi prevalansı, çocuklarda ve ergenlerde % 5, 20-64 yaş arasında % 6, 65 yaş üzerinde ise % 7'dir. Aynı çalışma, Avrupa'daki tüm epilepsi hastalarının % 25'inin çocuk ve ergen, % 55'inin 20-64 yaş aralığında ve % 20'sinin ise 65 yaş üzeri olduğunu ortaya koymaktadır (Forsgren ve ark., 2005). Latin Amerika'yı kapsayan ve 33 çalışmayı içeren bir derlemede epilepsi prevalansı % 17-43, insidansı ise % 0.7-1.9 olarak gösterilmiştir (Burneo ve ark., 2005).

Gelişmekte olan ülkelerde epilepsinin insidansı ve prevalansı epilepsiye neden olan faktörlerden dolayı yüksektir. Doğum travması, kafa travması ve enfeksiyon epilepsinin önlenebilecek sebepleri arasında başta gelir ve gelişmekte olan ülkelerde epilepsi insidansını arttırmaları (de Bittencourt ve ark., 1996).

Epilepsiye erkeklerde kadınlardan 1.0-2.4 kez daha sık rastlanmaktadır (Seğmen, 2005).

### **II.3. EPİLEPSİ PATOLOJİSİ**

Yapılan çalışmalar, nöronlardan gönderilen eksitator ve inhibitör sinyallerin ancak belirli bir denge halinde olduklarında nöronal iletişimi gerçekleştirebildiklerini göstermektedir. Ancak, aşırı uyarılma ya da inhibitör defekti nedeniyle bu denge bozulduğunda hipereksitabilite oluşur. Bu durum epileptik krizin başlangıcıdır. Bu krizlerin çoğu kortikal yapıda oluşur ancak talamus gibi subkortikal yapılarda da bazı epilepsi türleri gerçekleşebilir (Garcia Garcia ve ark., 2010). Beyinde gerçekleşen herhangi bir anormallik, çeşitli sayıda pozitif semptomun ortaya çıkmasını sağlar. Eğer neden geçici ise, nöbet yalnızca bir kez gerçekleşir. Ancak epileptik nöbet geçiren insanların yaklaşık % 30'unda neden kalıcıdır ve nöbetler tekrarlanır. Bu da epilepsi hastalığı anlamına gelir (Engel, 2002).

Epilepsi üzerinde uzun süredir gerçekleştirilen çalışmalar olmasına rağmen, epilepsiye yol açan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Her ne kadar  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  kanal proteinleri ile ilgili genlerde mutasyonlar bildirilmişse de, hücre içi protein değişikliklerini gösteren çok az sayıda çalışma vardır.

Merkezi sinir sisteminde en çok bulunan nörotransmitterler olan glutamat ve gama aminobütirik asit (GABA) ile ilişkili glutamaterjik ve GABAerjik nöronlar arasındaki denge, geçici nöron senkronizasyonunu kontrol etmektedir. İnsan beyni karmaşık bir ağıdır ve senkronizasyonun beyin fonksiyonunda ve disfonksiyonunda önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Farklı beyin yapılarında ve bu yapılar arasında meydana gelen senkronizasyon veya osilatör aktivite anormalliklerinin; epilepsi, Parkinson ve şizofreni gibi nörolojik hastalıklar ile ilişkisi olabileceği bildirilmiştir (Shaefi ve Harkness, 2003; Bambal ve ark., 2011).

Voltaj kapılı iyon kanalları olan sodyum, potasyum ve klor kanallarının mutasyonları; jeneralize epilepsiler ve infantil nöbetlerle ilişkili bulunmuştur. Ligand kapılı iyon kanalları olan nikotinik asetilkolin reseptörlerinin ve GABA reseptörlerinin alt tipleri ise frontal ve jeneralize epilepsilerin spesifik sendromlarıyla bağlantılıdır (Seğmen, 2005).

Kullanılan antiepileptik ilaçlar; beyindeki iyon kanalları, metabolik enzimler, nörotransmitter reseptörler ve taşıyıcılar ile etkileşerek, nöronların özelliklerini değiştirerek, epileptik aktivitelerin yayılmasını önleyerek veya senkronizasyonu düşürerek etki etmektedir (Ikonomidou ve Turski, 2010).

#### **II.4. ABSANS EPİLEPSİ**

Absans epilepsi, hastaların jeneralize konvülsif olmayan nöbetleri ile çevre uyarılarına kısa süreli cevapsızlık ve uzuvlarını, gözkürelerini veya göz kapağını ekileyen otomatizmalar ile veya orta şiddetli tonik veya klonik bileşenlerin eşlik ettiği aktivitenin durması ile karakterize edilebilen özel bir epileptik sendromdur (Demir, 2007). Tipik absans nöbetleri EEG’de ansızın başlayan ve biten bilateral, senkronize ve düzenli, saniyede üç döngülü (c/s) SWD’ler ile birlikte gelişir. Genelleştirilmiş konvülsif veya kısmi nöbetlerin aksine, tipik absansları takip eden postiktal depresyon veya yavaşlama yoktur. Günde yüz kadar sıklıkla ve genellikle yoğun zayıflık, dikkatsizlik ve uyku ile uyanıklık arasındaki geçiş sırasında meydana gelirler, 10 ila 20 saniye sürerler. Absans nöbetlerinin farmakolojik reaktifliği de kendine özgüdür, diğer tüm nöbet formlarında inaktif olan etosüksimid tarafından

baskılanırlar ve genelleşmiş konvulsif ve kısmi nöbetlerde etkili olan karbamazepin, fenitoin ve bazı diğer anitepileptik ilaçlar kullanıldığında nöbetler ağırlaşır (Loiseau ve ark., 1995; Hirsch, 2009).

Absans, talamokortikal bölgedeki anormal osilatör ritim ile karakterize edilir. Bu durumun kaynağı, talamustaki retiküler çekirdekte bulunan inhibitör GABAerjik nöronlardır. Bu çekirdeğin deşarj kabiliyeti, talamik hiperpolarizasyon ile aktive olan T-tip kalsiyum kanalları ile belirlenir (Garcia Garcia ve ark., 2010).

Absans nöbet gösteren hastalar, diğer nörolojik veya nörofizyolojik rahatsızlıkları göstermezler. Çocukluk çağı absans epilepsisinde, hastaların %70'inde büyüme çağında hafifleme gözlenmektedir (Loiseau ve ark., 1995; Panayiotopoulos, 1999; Hirsch, 2009).

## **II.5. DENEYSSEL MODELLER**

İyi karakterize edilmiş hayvan modelleri, insan epilepsisi ile ilişkili davranışsal ve fizyolojik değişikliklerin anlaşılması, epilepsinin altında yatan moleküler ve hücresele değişikliklerin aydınlatılması, epilepsinin tedavisinde yeni ve alternatif yaklaşımların belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu nedenle deneysel çalışmalarda, insandaki epilepsi hastalığının patofizyolojik nedenini en iyi derecede yansıtan uygun modelin seçimi son derece önemlidir. Deneysel modeller, insandakine benzer şekilde, jeneralize (tüm beyine yayılan) ve parsiyel (lokalize) nöbet modelleri ya da akut ve kronik modeller olarak sınıflandırılabilirler. Akut olarak oluşturulan modeller daha çok nöbet modeli, kronik modeller ise epilepsi modeli olarak kabul edilirler. Akut epilepsiler, konvülsif ilaçlarla ya da elektriksel uyarılarla indüklenirler. Kronik modeller ise genellikle yapısal lezyonlar veya tekrarlayan elektrik uyarıları ile oluşturulurlar ya da spontan genetik epilepsi modellerini içerirler. Kronik epilepsi modelleri daha fazla bakım, zaman ve ekonomik güç gerektirirler, ancak bu modeller insandaki epilepsi patofizyolojisine daha yakındırlar (Sarkisian, 2001; Engel, 2002; Garcia Garcia ve ark., 2010; Bambal ve ark., 2011)

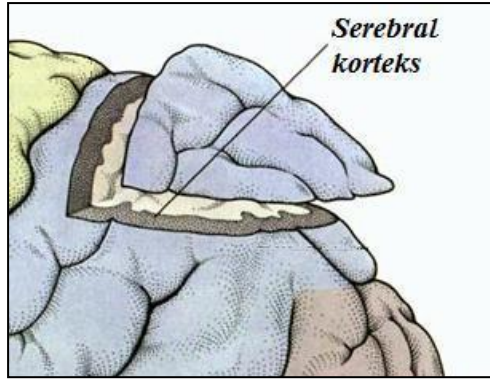
Tipik absans epilepsileri asıl olarak çocukları ve ergenlik çağındakileri etkilediğinden ve orta şiddette sonuçları olduğundan patofizyolojik çalışmalar etik nedenlerden ötürü insanlar üzerinde gerçekleştirilemez. Bu nedenle hayvan modelleri bu epilepsi türünü, aynı zamanda SWD'lerin oluşumunun ve kontrolünün altında yatan mekanizmayı anlamak için gereklidir.

Jeneralize genetik modeller arasında yer alan absans modeller 3 ana grupta toplanırlar.

1. Kimyasal olarak indüklenen hayvan modelleri
2. Tek gen mutasyonları ile oluşturulan fare modelleri
3. Poligenetik sıçan modelleri: GAERS, Wistar Albino Glaxo-Rijswijk (WAG/Rij) (Bambal ve ark., 2011).

## II.6. KORTEKS BÖLGESİ ve EPİLEPSİ PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ ÖNEMİ

Beyin, tüm omurgalıların sinir sisteminin merkezinde yer alan oldukça kompleks bir yapıdır. Memeli beyninin en dış kısmında yer alan serebral korteks (beyin kabuğu) bir nöral doku tabakasıdır. Hafıza, dikkat, algısal farkındalık, düşünce, dil ve bilinçte önemli bir rol oynar (Danış, 2010).

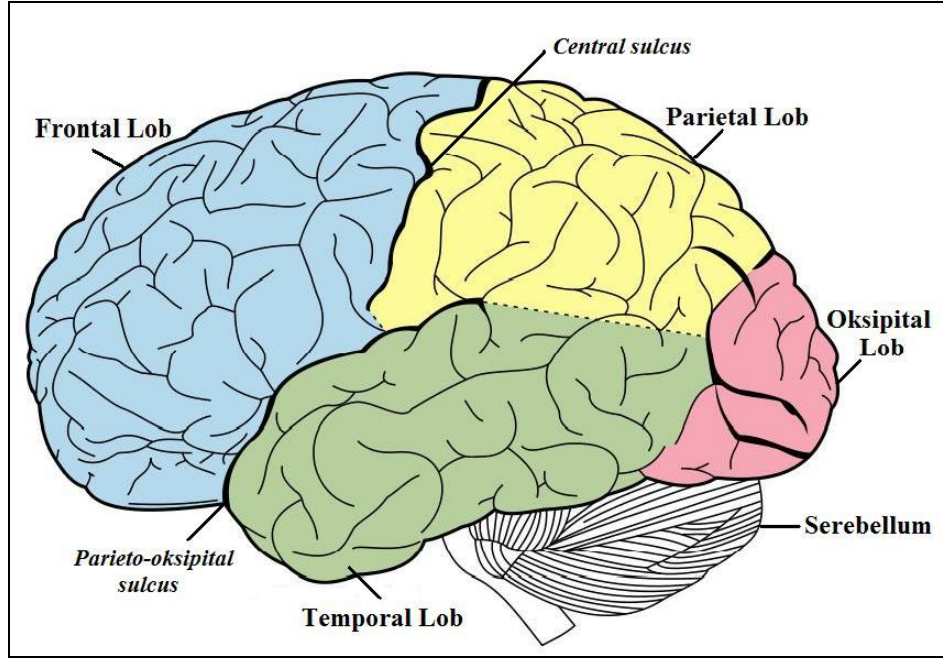


Şekil II.1 Serebral korteks

Serebral korteks filogenetik açıdan en genç beyin bölgesidir. Korteks yüzeyi derin katmanlar içerir, bu da yüzey alanının geniş olmasını sağlar. Görülebilir keskin tepe kısımlarına girus, görülebilir olmayan girintilere ise sulkus denir. İnsan beyni serebral korteksi yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişen yaklaşık 15-33 milyar nörondan meydana gelmektedir. Serebral korteksin her bir milimetreküpü 1 milyar sinaps içermektedir (Greenstein ve Greenstein, 2000).

Beyin kabuğu iki hemisferi de örter. Her bir hemisfer, central sulcus ve parieto-okspital sulcus ile 4 loba ayrılmıştır:

1. Frontal lob
2. Pariyetal lob
3. Temporal lob
4. Oksipital lob



Şekil II.2 Beyin bölgeleri

Pariyetal lob insan serebral korteksinin yaklaşık % 20'sini oluşturur. Görme, işitme ve dokunma duyusunun kesiştiği kavşakta bulunur. Kortikal ve subkortikal bölgelerle olan zorunlu bağlantıları motor yanıtı ile ilişkilidir, bu nedenle pariyetal korteks, duyuşal girdileri devimsel çıktıya dönüştürmede önemli rol oynamaktadır (Behrmann ve ark., 2004). Pariyetal lob korteksi absans nöbetlere ait somatosensöriyel odağın perioral bölgesini içerir (Danis ve ark., 2011). Beyin fonksiyonunun yüksek olmasının neokorteks aktivitesi ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (Alonso-Nanclares ve ark., 2008).

## II.7. MEMBRAN PROTEİNLERİ

Membran proteinleri, hücresel proteinlerin önemli bir kısmını (yaklaşık % 30) oluştururlar. Membran proteinleri, insan genomu tarafından kodlanan proteinlerin yalnızca 3'te 1'i kadar olmalarına rağmen, bilinen ilaç hedeflerinin 3'te 2'sinden fazlasını oluştururlar. Bu nedenle geniş aralıklı ve yüksek verimlilikte yaklaşımlar membran proteinlerinin karakterizasyonu için büyük önem taşırlar.

Membran proteinleri, hücre ve onu çevreleyen ortam ile bir arayüz oluşturarak dengeyi sağlarlar. Hücre adhezyonu, sinyal iletimi, hücre-hücre etkileşimi, iyon ya

da metabolit taşınımı gibi pek çok hücrenel işlemde anahtar rol oynarlar. Bu nedenle de ilaç gelişimi için önemli bir hedeftirler (Rabilloud, 2003; Görg ve ark., 2004).

## **II.8. PROTEOMİK**

Kökleri 1980'lerin başına dayanan proteomik terimi, proteom çalışmalarının bilimi ve metodolojisidir. İlk kez 1994 yılında Siena'da gerçekleşen bir toplantıda Marc Wilkins tarafından önerilmiştir. Proteom ise, protein ve genom kelimelerinden türetilmiştir (Dunn, 2000). Genomdan farklı olarak proteom zamanla değişir ve doku, organizma veya hücre kültüründe belirli şartlar altında herhangi bir anda mevcut olan proteinlerin tamamını ifade eder. Bir organizmanın tüm doku ve organlarının hücrelerinde aynı genetik bilgi mevcut olmakla birlikte bu genlerin sadece bir kısmı protein olarak ifade edilirler. Bu nedenle bir hücrenin DNA dizisinden belli bir zamanda o hücrede sentezlenen proteinlerin profilini çıkarmak mümkün değildir (Telefoncu ve ark., 2002). Anderson ve Seilhamer, 1997 yılında yaptıkları çalışmada transkripsiyon ürünleri ile protein düzeyleri arasında bir korelasyon olmadığını ortaya koymuşlardır (Anderson ve Seilhamer, 1997).

Proteomik bilimi, patofizyoloji nedeniyle ekspresyonu değişen proteinlerin listesini oluşturmaktan fazlasını içerir. Proteomiğin amacı, ekstraselüler mikroçevre ve serum/plazma makroçevresiyle iletişim kuran hücrelerarası protein bağlantılarının akış bilgisini karakterize etmektir (Petricoin ve ark., 2004). Proteomik, multidisiplinerdir ve teknoloji-tabanlıdır. Proteinlerin, hastalıkların ana etkeni olmaları nedeniyle, günümüzde kullanılan birçok ilaç nükleik asit düzeyinde değil, protein düzeyinde etki göstermek üzere tasarlanmaktadır.

Bir biyolojik sistemdeki proteinleri, bu proteinlerin yapılarını, etkileşimlerini ve post-translasyonel modifikasyonlarını belirlemeyi sağlayan aynı zamanda spesifik hastalıklar ya da toksik ajanlar gibi dış etkenlerle indüklenen çeşitli durumlarda ortaya çıkan farklılıkların araştırılması için kullanılan güçlü bir tekniktir (Stevens ve ark., 2003; Fountoulakis, 2004).

Proteom, post-translasyonel modifikasyonlar sebebiyle transkriptomdan daha karmaşıktır. Glikozilasyon, fosforilasyon, sülfasyon, deamidasyon, oksidasyon, proteolitik işlemler ve degradasyon; eksprese edilen proteinlerde gözlenen bazı post-translasyonel değişikliklerdir. Bu nedenle, bir hücre içerisinde herhangi bir zamanda tek bir proteinin birden fazla izoformu ve proteolitik olarak kırılmış türleri bulunabilir. Tüm bu protein türevlerine ait proteomlar farklı fizyolojik koşullarda

doğru bir Şekilde karşılaştırılarak çözümlenmeli ve karŐılaŐtırmalı olarak miktarları belirlenmelidir. Aynı zamanda, proteomdaki çok ufak değişiklikler her an oluŐabilir. Proteomik ile sağlık ve hastalık koşullarında farklılaşan proteinlerin belirlenmesi, miktarlarının tayin edilmesi ve yapılarının aydınlatılması ile bu modifikasyonlar belirlenebilir (Hewick ve ark., 2003; Colantonio ve Chan, 2005; Olsen ve ark., 2007; Li ve ark., 2010).

### **II.8.1. Proteomiğin Temeli**

Seneler boyu, bilim adamları proteinleri belirlemek amacıyla çok sayıda elektroforetik ve kromatografik teknolojiyi bir arada veya ayrı ayrı kullanmıŐlardır. Bu çalışmaların sonucunda binlerce proteinin ayırımı ve tanımlanması yapılmış ancak tüm proteinleri bir haritada toplayabilen tek bir yöntem uygulanmamıŐtır. Tek boyutlu ayırma işlemleri karmaşık protein karıŐımlarını ayırmak için yeterli değildir (Issaq ve Veenstra, 2008). Bu gerçek Smithies ve Poulik (Smithies ve Poulik, 1956) tarafından 50 yıl kadar önce ortaya atılmıŐ ve iki elektroforetik iŐlemin birleŐtirilmesinin tek başına yapılan ayırımlara göre çok daha fazla çözünürlük sağlayacağı bildirilmiştir.

1962 yılında Raymond ve Aurell (Raymond ve Aurell, 1962) serum proteinlerini ayırmak için çeşitli akrilamid jel konsantrasyonlarında 2D elektroforezi uygulayarak, proteinlerin elektroforetik hareketinin jel konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir.

1972 yılında Wright (Wright, 1972); birinci boyutta % 4.75'lik poliakrilamid jel kolonu uygulamıŐ, daha sonra elde ettiği silindiri camdan çıkarıp % 2'lik gradyan slab jelin üst kısmına yerleŐtirmiŐtir. Elektroforez sonunda, slab jel boyama çözeltisine alınmıŐ ve sonuçta 112 insan serum proteini görünür hale gelmiştir. Ancak bu yenilikçi yaklaşımlar özellikle hücre ya da serumda yaygın bulunan az sayıda proteinin ayrılmasına olanak sađlamıŐtır.

İki boyutlu-poliakrilamid jel elektroforezine (2D-PAGE) geçiş 1975 yılında O'Farrell'in (O'Farrell, 1975) hüresel proteinleri denatüre Őartlarda ayırmasıyla gerçekleŐmiŐ, sonucunda yüzlerce proteinin ayırımı yapılmıştır. Bu çalışmada, birinci boyutta izoelektrik odaklama (IEF) uygulanarak proteinler izoelektrik noktalarına göre, ikinci boyutta ise sodyum dodesilsülfat (SDS) varlığında molekül boyutuna göre ayrılmıŐlardır. Kullanılan bu yöntem modern 2D-PAGE'in temelini oluşturmaktadır.

1977 yılında insan plazma proteinlerinde 2D-PAGE tekniğini kullanılmış, boyama sonunda yaklaşık 300 protein spotu belirlenebilmiştir (Anderson ve Anderson, 1977). Günümüzde ise, kullanılan jel boyutuna ve pH gradyanına bağlı olarak aynı anda 5000'in üzerinde proteinin tanımlanmasını ve her spot başına <1 ng düzeyindeki proteinlerin kantitatif tayinini yapmak mümkündür (Görg ve ark., 2004).

2D-PAGE sadece çok sayıda proteinin tanımlanmasını sağlamaz, bu proteinlerin boyanması aynı zamanda protein miktar tayinine de olanak sağlar. İki farklı serum örneğinden (hastalıklı ve sağlıklı) ekstrakte edilen proteinler, ayrı jellere uygulanır ve boyama sonunda yazılımlar aracılığı ile üst üste çakıştırılan spotlar üzerindeki yoğunluk farkından protein miktarı belirlenebilir (Issaq ve Veenstra, 2008). Proteomik ile bir protein dizisindeki amino asitler, o proteinin izoelektrik noktası ve molekül ağırlığı tek bir jel spotu üzerinden elde edilebilir. Protein veri bankasında olduğu sürece, bu bilgiler bir proteini karakterize etmek için yeterlidir (Edgar ve ark., 2000).

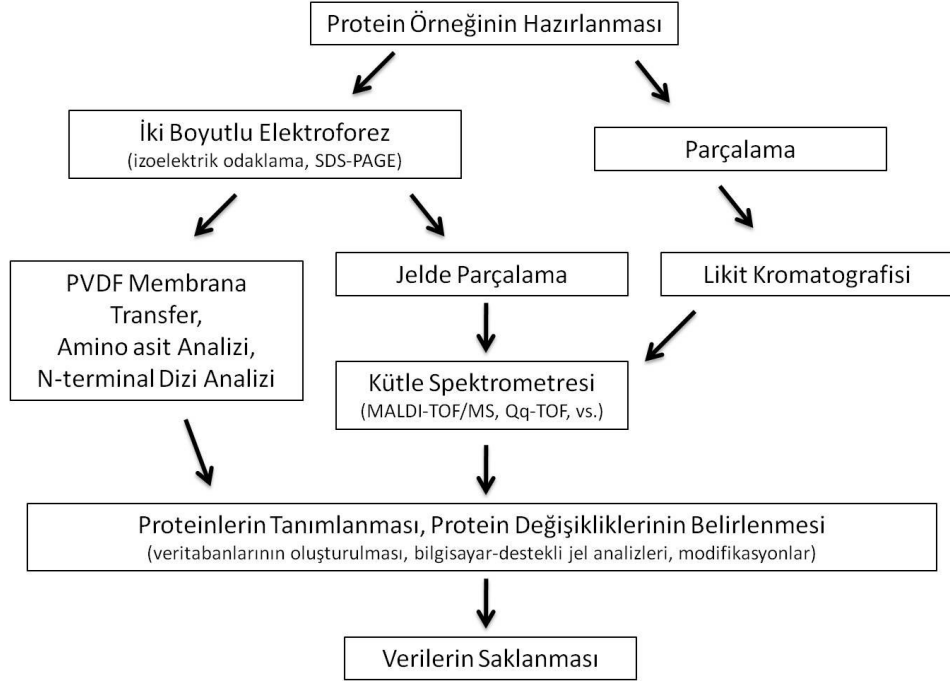
Proteomiğin geniş ölçekte amacı, protein haritasını ve bu haritanın biyolojik fonksiyonlarını araştırmak, bunun sonucunda da yeni ilaç hedeflerini ve tanılayıcı belirteçleri ortaya koymaktır. Diğer protein analiz tekniklerinden en önemli farkı, proteinleri tek tek analiz etmek yerine geniş çapta tayine olanak sağlamasıdır (Fountoulakis, 2004). IEF ve sodyum dodesilsülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile birleştirilmiş bir 2D-elektroforezinde, bir karışımdaki proteinlerin ayrılması, bu proteinlerin pI ve  $M_A$  değerlerine, çözünürlük özelliklerine ve göreceli miktarlarına bağlıdır (Görg ve ark., 2004).

Bir proteomik analiz başlıca 2 adımdan oluşur:

1. 2D jel elektroforeziyle protein karışımının ayrılması
2. Ayrılan proteinlerin kütle analizi gibi çeşitli yöntemlerle belirlenmesi

Bu amaçla uygulanan bir 2D elektroforez, iki aşamadan oluşur:

1. Proteinlerin, net yüklerindeki farklılığı temel alan izoelektrik odaklama (IEF) ile ayrılmaları
2. Odaklanmış proteinlerin, SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları (Fountoulakis, 2004).



**Şekil II.3** Proteomiğin genel akış şeması

Yüksek verimde bir 2D analizi için, protein örnekleri denatüre edilmeli, parçalara ayrılmalı, indirgenmeli ve çözünürleştirilmelidir. Böylece tüm moleküler etkileşimler ortadan kaldırılarak her bir spotun bir polipeptite özel olması sağlanmalıdır (Görg ve ark., 2004).

### II.8.2. Örnek Hazırlığı ve Çözünürleştirme

Örnek seçimi ve örneğin analize hazırlanması başarılı bir analiz için gerekli olan ön koşuldur (Fountoulakis, 2004). Tek adımda yapılan protein ekstraksiyonu, tekrarlanabilirlik ve kolaylık açısından istenen işlem olsa da, dünyada her tür örneğe uygulanabilecek tek bir yöntem mevcut değildir. Çok sayıda protokol vardır ve bu protokoller çalışılan örneğe adapte edilerek, örneğin çeşidine göre mutlaka optimize edilmelidir. Örnek hazırlığı, tekrarlanabilirliği arttırmak için basit olarak seçilmeli ve protein modifikasyonları en aza indirgenmelidir. Protein degradasyonunu önlemek için proteazlar, örnek hazırlığı aşamasında inaktive edilmelidir.

Örnek hazırlığı başlıca 3 adımdan oluşur:

#### 1. Hücrelerin parçalanması

Hücrelerin parçalanması işlemi, ozmotik lizis, donma-çözme döngüsü, deterjan lizisi, hücre duvarının enzimatik lizisi, sonikasyon, sıvı nitrojen ile öğütme, yüksek basınç, cam boncuk ve boncuk kırıcı ile homojenizasyon, azot kavitesi ve

karıştırıcı bıçaklarla homojenizasyon gibi çok çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Bu yöntemler tek başına ya da birkaç tanesi bir arada kullanılabilir. Mikrobiyal hücreler ve bitki örnekleri, hücre duvarları nedeniyle daha kuvvetli yöntemlere ihtiyaç duyarlar.

Hücrelerin parçalanmasının ardından proteolitik enzimler, tuzlar, lipitler, nükleik asitler, polisakkaritler, bitki fenoller ve çok yaygın olarak bulunan proteinler ortamdaki uzaklaştırılmalı veya inaktive edilmelidirler. Bunlardan en önemlileri tuz ve proteolizisdir.

## 2. Girişim gösteren bileşiklerin uzaklaştırılması veya inaktive edilmesi

Tüm canlı organizmalar proteolitik enzimler (proteazlar) içerirler. Proteazlar parçalanma sonrası hemen serbest kalırlar ve hücrel proteinlerle etkileşerek yük ve kütle değişikliklerine sebep olurlar. Böylece, elektroforez esnasında yüksek molekül ağırlığındaki proteinlerin kaybına ve yapay spotların oluşmasına yol açarlar. Örneklerin SDS-tamponunda kaynatılması ya da düşük pH'ta proteazların inaktive edilmesi (soğuk TCA ile çöktürme gibi) kullanılabilen yöntemler olsa da, ticari olarak satılan proteaz inhibitör karışımlarının örnekler eklenmesi en etkili yöntemdir. Bu karışımlar, proteini korumak için çeşitli proteaz inhibitörlerini bir arada içerirler.

Tuz konsantrasyonu çok yüksek (>100 mM) olduğunda, elektroforetik ayırma işlemiyle girişim göstereceğinden mutlaka ortamdaki uzaklaştırılmalıdır. Tuz, IEF jellerindeki iletkenliği arttırarak, kararlı duruma gelmek için gerekli olan süreyi de uzatır. Aşırı tuz varlığında, karşılaşılan tuz yüzeyleri nedeniyle IEF durabilir. Proteinleri TCA ya da organik çözücüler ile çöktürme, diyaliz ve 2D-arındırma kitleri tuz uzaklaştırmada kullanılan yöntemlerdir. Diğer bir yöntem ise, yüksek hacimde örneğin immobilize pH-gradyan (IPG) şerit üzerine yüklendikten sonra, birkaç saat 100 V gibi düşük bir voltaj uygulanarak tuzun elektrotlar üzerindeki filtre kağıtlarında toplanmasını sağlamaktır.

Yüksek miktarda lipit de, membran proteinleri ile etkileşebilir, detarjanları tüketebilir. Soğuk etanol ya da aseton gibi organik çözücülerle ekstrakte etmek lipit açısından zengin biyolojik materyalin (beyin dokusu gibi) delipidasyonunu sağlar. Aynı zamanda yüksek devirde santrifüj de oluşan lipit tabakasını uzaklaştırmada etkilidir.

Polisakkaritler ve nükleik asitler; taşıyıcı amfolitler ve proteinlerle etkileşerek 2D jellerde sürüklenmelere sebep olurlar. Aynı zamanda makromolekül

olduklarından çözeltinin viskozitesini değiştirerek poliakrilamit jel üzerindeki porların tıkanmasına neden olurlar. Çok düşük konsantrasyonda olmadıkları sürece, TCA/asetonla çöktürerek, proteaz içermeyen RNAz, DNAz eklenerek ya da ultrasantrifüj gibi yöntemlerle uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Hücre debris, polisakkarit, nükleik asit gibi çözünmeyen materyal içermediğini halde IEF öncesi 15.000 x g' de 20 dk. santrifüj işlemi uygulamak ve elde edilen süpernatantı IEF işleminde kullanmak tercih edilen yöntemdir.

Plazmanın % 60'ını kaplayan albümin gibi yaygın proteinler de, albümin uzaklaştırıcı ticari kitler kullanılarak uzaklaştırılmalıdırlar. Ancak dikkat edilmesi gereken nokta, bu kitlerin spesifik olmayan bağlanmaları nedeniyle diğer bazı proteinleri de ortamdan uzaklaştırma ihtimalleridir.

### 3. Proteinlerin çözünürleştirilmesi

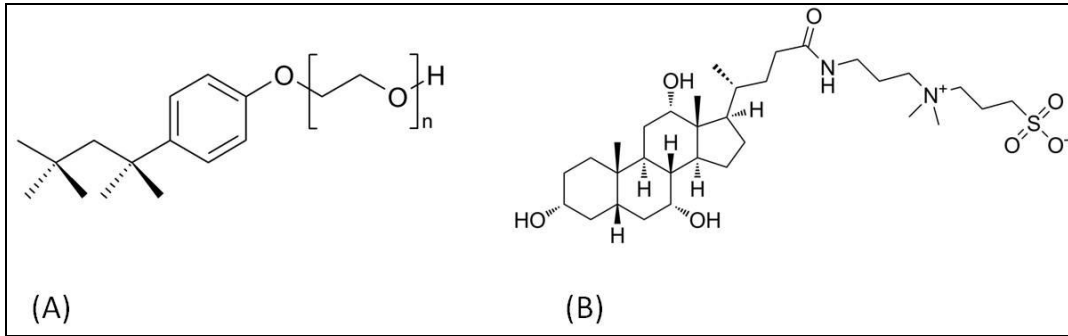
Hücrelerin parçalanmasının ve girişim gösteren bileşiklerin uzaklaştırılmasının ardından, polipeptitler denatüre edilmeli, indirgenerek intra- ve intermoleküler bağları kırılmalı ve çözünürleştirilerek doğal özellikleri ortaya çıkartılmalıdır. Örnek çözünürleştirilmesi genellikle kaotrop (üre / tiyoüre), non-iyonik ya da zwitter-iyonik deterjan (CHAPS, Triton X-100), indirgeme ajanı, taşıyıcı amfolit ve proteaz inhibitörü içeren bir tampon ile gerçekleştirilir. Sadece üre içeren lizis tamponları özellikle hidrofobik proteinler ve membran proteinleri için yeterli değildir. Hidrofobik proteinlerin çözünürlüğünü arttırmak için tiyoüre ve CHAPS gibi zwitter-iyonik bir deterjan kullanmak gereklidir.

Çözünürleştirme işlemlerinde kullanılan üre, hidrojen bağlarını parçalayarak, proteinin katlanmasını bozar ve denatüre eder. Tiyoüre, hidrofobik etkileşimleri daha kolay kırar ancak suda az çözünürdür. Derişik üre çözeltilerinde daha çözünür olduğundan üre ile birlikte kullanılır. Hidrofobik proteinler için en iyi çözünürleştirme uygun deterjan varlığında, 5-7 M üre / 2 M tiyoüre karışımıdır. Üre içeren çözeltiler karbamilasyon reaksiyonu oluşmaması için 37 °C'nin üzerine ısıtılmamalıdır.

Taşıyıcı amfolitler, asidik ve bazik gruplar içeren heterojen karışımlardır. İçerisinde sülfonat, bir ucunda karboksil, diğer ucunda serbest primer ve sekonder amino grupları içeren çeşitli amfoter maddeler bulunur. Ortamın pH'sına bağlı olarak net bir yüke sahiptirler. Elektriksel alan olmadığında taşıyıcı amfolitler gelişigüzel dağılmış haldedirler ve pH matrisi üzerinde aynı pH'ta (yaklaşık pH:7) bulunurlar. Elektriksel alan altında ise, net bir yüke sahip tüm taşıyıcı amfolitler göç etmeye

başlarlar. Net negatif yüke ve düşük pI değerine sahip olanlar anoda, net pozitif yüke ve yüksek pI değerine sahip olanlar katoda geçer. Net bir yük taşımayan nötral amfolitler hareket etmezler. Amfolit, siyanat (primer amin) süpürücü etkisi nedeniyle mutlaka üre çözeltisi içerisinde yer almalıdır.

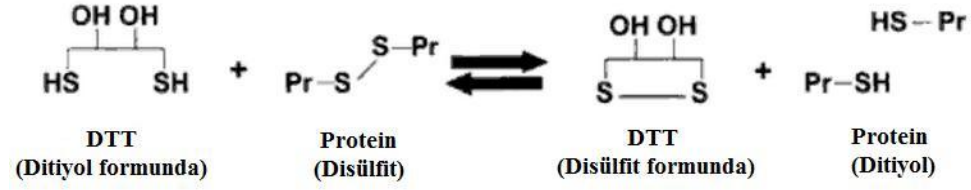
Detarjanlar, proteinlerin hidrofobik bölgeleri arasındaki hidrofobik etkileşimleri engellemek, agregasyon ve presipitasyon nedeniyle oluşabilecek protein kaybını önlemek amacıyla kullanılırlar. Çözünürleştirme işlemlerinde non-iyonik ve zwitter-iyonik deterjanlar tercih edilir. En yaygın kullanılan non-iyonik deterjanlar, NP-40, Triton X-100 ve dodesil maltozittir. Ancak bunlar hidrofobik membran proteinlerini çözünürleştirmede pek etkili değildirler. CHAPS ve sülfobetain (ASB-14, SB 3-10 gibi) gibi zwitter-iyonik deterjanlar özellikle üre ve tiyoüre gibi kaotropolar ile birleştiklerinde integral membran proteinlerini çözünürleştirme yeteneğine sahiptirler. Buna rağmen, pek çok membran proteini tek bir deterjanda çözünemeyebilir, bu nedenle çözünürleştirme tamponunun optimize edilmesi membran proteinleri açısından oldukça önemlidir.



**Şekil II.4** Proteinlerin çözünürleştirilmesinde yaygın olarak kullanılan deterjanlar.

(A) non-iyonik deterjan: Triton X-100, (B) zwitter-iyonik deterjan: CHAPS

Disülfid bağlarının indirgenmesi ve tekrar oksidasyonunun önlenmesi örneklerin hazırlanmasında önemli bir adımdır. İndirgeme ajanları, proteinin katlanmasını önleyen intra- ve intermoleküler disülfid bağlarını kırar. En sık kullanılan ajanlar, ditiyotretiol (DTT), ditiyoeritritol (DTE) ve tribütilfosfin (TBP)'dir. DTT ve DTE yüksek konsantrasyonlarda (>100 mM) uygulanırken, TBP düşük konsantrasyonlarda (2 mM) uygulanmaktadır. Ancak TBP, suda çözünürlüğü az, kısa yarılanma ömrüne sahip, toksik bir madde olduğundan birtakım kısıtlamaları bulunmaktadır (Görg ve ark., 2004; Görg ve Weiss, 2008).



Şekil II.5 Disülfit bağlarının DTT ile indirgenmesi

### II.8.3. Birinci Boyut – İzoelektrik Odaklama

Birinci boyut ayırma işlemlerinde genellikle IPG şeritler kullanılmaktadır. Bu hazır, kuru şeritler kolay kullanımları, verilerin ve sonuçların daha rahat karşılaştırılması gibi nedenlerle proteomiğin 2D uygulamalarında tüm dünyada yaygın olarak kabul gören ticari malzemelerdir (Görg ve ark., 2004).

İmmobilize pH gradyanı, akrilamit türevleriyle oluşturulmaktadır. Bu türevler, tamponlama kapasitesine sahip zayıf asit ve bazlardan oluşan, poliakrilamit jel üzerinde ko-polimerize halde bulunan bileşiklerdir. Böylece asidik ve bazik moleküller arasında pH gradyanı oluşur. Bu şeritlere elektriksel alan uygulandığında, pH gradyanı hareket etmez. Yalnızca protein örneğindeki yüklü moleküller hareket eder ve izoelektrik noktasına karşılık gelen dar bantta toplanır. Bu tarz izoelektrik odaklamalarda poliakrilamit jel plastik bir şerit üzerine tutturulmuş haldedir (Fountoulakis, 2004).

IPG şeritlerin kullanılmaya başlamasıyla birlikte 2D jel elektroforezi uygulamaları da artmıştır. Bu şeritlerin en büyük avantajı çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılabilirliğinin daha kolay olmasıdır. Kullanım kolaylığı da, yüksek verimde proteom analizi ve geniş ölçekli örnek uygulamaları anlamına gelir. Bu da protein tayini için oldukça yararlı bir durumdur. Kuru IPG şeritler ticari olarak çeşitli uzunluklarda (7-24 cm), geniş (pI 3-12), orta (pI 4-7) ve dar (pI 4.5-5.5) aralıklarda bulunurlar. Bu şeritlerde pH aralığı 2.5-12 arasında değişmektedir. pH 3-10 şeritleri lineer ve lineer olmayan (sigmoidal) biçimlerde vardır. Lineer olmayan şeritler, pI 4-7 aralığında bulunan proteinler için daha iyi odaklama sağlar (Fountoulakis, 2004; Görg ve ark., 2004). Dar aralıklı IPG şeritler genellikle 1-3 pH birimi genişliğinde olurlar ve diğer bir şerit ile en az 0.5 pH birimi çakışmalıdırlar. Çok sayıda dar aralıklı şerit üst üste çakıştırılarak yüksek çözünürlük elde edilebilir ve böylece daha fazla protein tanımlanabilir. Ancak her bir dar aralıklı şerit, ayrı jel kasedi ve belirli miktarda örnek yüklemesi gerektirdiğinden, örnek miktarı az

olduğunda çalışmayı yürütmek mümkün olmaz. Sınırlı miktarda örnek varlığında, geniş aralıklı IPG şeritler tercih edilmelidir (Issaq ve Veenstra, 2008).

IEF analizinden önce kuru stripler, indirgeme ajanı, amfolit, yüksek konsantrasyonda üre, tiyoüre ve deterjan (CHAPS gibi) içeren spesifik bir rehidrasyon çözeltisi ile rehidrate edilmelidirler. Rehidrasyon işlemi, analizi yapılacak olan protein örneğini de içeren bir çözelti içerisinde uygulanmalıdır. En uygun çözünürlüğün, yüksek spot sayısının, minimum düzeyde sürüklenmenin ve arka plan etkisinin oluşması; kullanılan pH gradyanı, şerit uzunluğu ve örneğin protein içeriği gibi pek çok koşula bağlıdır. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak tek bir jele yüklenecek olan protein miktarı belirlenmelidir. Uygulama sırasında jel yüzeyinin alta gelmesine ve hava kabarcığı olmamasına dikkat edilmelidir. Gece boyu süren pasif rehidrasyon 20 °C'de gerçekleşmelidir. Yüksek sıcaklıklar (> 37 °C) protein karbamilasyonuna, düşük sıcaklıklar (< 10 °C) ise jel üzerindeki ürenin donarak kristallenmesine neden olur. Yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin (> 100 kDa) jel matrisine girişini kolaylaştırmak amacıyla 30-50 V gibi düşük bir voltajda aktif rehidrasyon da uygulanabilir. Çapraz kontaminasyonu önlemek için, uygulamanın yapıldığı tabla her deneme sonrası titizlikle temizlenmelidir.

Odaklama zamanı da proteinlerin ayrılmasında önemli bir etkidir. Çok kısa zamanlı odaklamalar yatay sürüklenmelere neden olur. Ancak, uzun süreli odaklama da proteinlerin katoda göçünü engeller. Bu da protein deseninin bozulmasına, jelin bazik ucunda yatay sürüklenmelere ve proteinlerin kaybına neden olur. Optimum süre, IPG şeridin uzunluğuna, pH aralığına, protein örneğinin türüne ve miktarına bağlıdır. Bu süre, çeşitli denemeler sonucunda belirlenir ve optimize edilir (Görg ve ark., 2004).

IEF sonrası ikinci boyut ayırma işlemi uygulanacak olan şeritler üre, gliserol, DTT ve iyodoasetamit içeren SDS tamponunda dengeleme işlemine tabi tutulmalıdırlar. Odaklama sonrası proteinler, IPG jel matrisine tutunmuş yüklü gruplara taşıyıcı amfolitten daha sıkı bağlanırlar. 10-15 dk süren dengeleme süresi sırasında üre ve gliserol, elektroendozmotik etkiyi azaltarak proteinlerin birinci boyuttan ikinci boyuta geçişlerini daha kolay hale getirirler. Hidrofobik proteinlerin geçişi için mutlaka tiyoüre kullanılmalıdır, ancak tiyoüre dikey sürüklenmelere de neden olabilir. Kullanılmayacak olan şeritler temiz plastik tablalara aktarılarak, streç film ile iyice sarılmalı ve -80 °C'de saklanmalıdır (Fountoulakis, 2004; Görg ve ark., 2004).

#### II.8.4. İkinci Boyut – SDS-PAGE

Dengeleme sonrası, IPG şeritler ikinci boyut için SDS-PAGE jel yüzeyine uygulanırlar. Proteinlerin, IPG jel matrisi üzerinde adsorbsiyonu, yetersiz dengeleme süresi ve yıkama etkileri gibi nedenlerle IPG şerit üzerinde kalan proteinler, dengeleme adımı sırasında protein kaybına sebep olabilirler. Radyoaktif işaretli proteinler ile yapılan çalışmalar, dengeleme adımı sırasında proteinlerde % 20'ye varan kayıplar olduğunu göstermiştir (Görg ve ark., 2004).

İkinci boyut ayırma işlemleri dikey ya da yatay sistemlerde uygulanabilirler, ancak genellikle dikey SDS-jel sistemleri tercih edilir. Yatay sistemler hazır jeller için daha çok tercih edilmektedirler. Dikey sistemler, cihazın özelliklerine bağlı olarak 12 jeli aynı anda uygulamaya olanak sağlarlar. Çoklu jel sistemleri yüksek verimlilik için gereklidir. Bu sistemler jel hazırlamada ve çok sayıda örneğin analizinde oldukça ekonomiktir. SDS-jeller çeşitli firmalardan ticari olarak temin edilebilir ya da laboratuvar koşullarında hazırlanabilir. Hazır ticari jeller ile laboratuvarda hazırlananlar arasında bir fark yoktur. Hazır jeller, çeşitli akrilamid konsantrasyonlarında lineer ve gradyan biçimlerde bulunurlar ancak daha pahalıdır. Büyük jeller (20x20 cm) daha iyi spot çözünürlüğü sağlarlar ve genellikle post-translasyonel modifikasyonları belirlemek için tercih edilirler. Jel büyüklüğü nedeniyle, spotlar da göreceli olarak büyük olur ve protein kaybı meydana gelebilir. Bu nedenle büyük jellere daha fazla miktarda protein yüklemek gerekir (0.3-1.5 mg total protein). Küçük jellerde (10x10 cm), spot çözünürlüğü yüksek değildir ancak düşük miktarda protein uygulaması yeterlidir (0.1 mg). Genel olarak jeller 20x25 cm boyutunda ve 1 mm kalınlığındadır (Fountoulakis, 2004; Görg ve ark., 2004).

İkinci boyutta kullanılan en yaygın tampon sistemi Laemmli (Laemmli, 1970) tampon sistemidir. Dikey jellerde sıralama jeli kullanmak gerekmez, IPG şerit üzerinde protein bölgeleri zaten konsantre haldedir.

Düşük molekül ağırlıklı (< 15 kDa) ve yüksek molekül ağırlıklı (> 150 kDa) proteinleri tek bir jel üzerinde ayırmak yerine birkaç jel üzerinde çalışmak daha doğrudur. Böylece birbirine yakın molekül ağırlığına sahip proteinleri (5-30 kDa, 15-200 kDa, > 150 kDa gibi) ayırmak daha rahat olur. Yüksek molekül ağırlığına sahip proteinlerin büyük çoğunluğu hidrofobik proteinlerdir. Bu proteinlerin, üre içeren lizis ve rehidrasyon çözeltilerinde tamamen çözünmemeleri sorun yaratabilir.

Çözündükleri halde, IEF jel matrisine tamamen giremeyebilirler. Bu nedenle, birinci boyuttan ikinci boyuta transfer olamayabilirler (Görg ve ark., 2004).

#### **II.8.5. Jellerin Boyanması**

2D işleminin tamamlanmasının ardından, ayrılan proteinlerin görüntülenmesi için boyama işlemi uygulanır. Bir hücrede bulunan tek bir proteinin konsantrasyonu 6-7 kat fark gösterebilir. Glikolitik enzimler gibi çok bulunan proteinler birkaç milyon kopyaya sahipken, az bulunan proteinler yalnızca birkaç kopya halindedir. Protein konsantrasyonundaki bu büyük fark nedeniyle geliştirilen pek çok boyama yöntemi vardır. İstenilen boyama; yüksek duyarlılıkta (düşük dedeksiyon limiti), yüksek doğrusal dinamik aralıkta (kantitatif doğruluk için), kütle tayini için yeniden kazanılabilir ve kütle tayini ile uyumlu olmalıdır. Mevcut boyama yöntemleri bu isteklerin tamamını aynı anda karşılayamamaktadır.

En yaygın kullanılan yöntemler; anyonik boyama (Coomassie mavisi), metal katyonlarıyla negatif boyama (çinko imidazol), gümüş boyama, floresans ya da radyoaktif izotop boyama/işaretleme olarak bilinmektedir. Bu yöntemlerin çoğunda, çözülmüş polipeptitlerin boyama öncesi bir fiksasyon çözeltisi içerisinde birkaç saat ya da gece boyunca bekletilerek jel üzerine sabitlenmeleri ve tayin ile girişim gösterebilecek deterjanlardan uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Bazı spesifik boyamalar ise doğrudan jel üzerine uygulanabilmektedir (Görg ve ark., 2004).

CBB boyama yöntemi (Neuhoff ve ark., 1985), tüm dünyada en yaygın kullanılan yöntemdir. Düşük maliyeti, kolay kullanımı ve kütle spektrometrisi gibi çok sayıda protein analiz ve karakterizasyon yöntemiyle uyumlu olması nedeniyle tercih edilir. Ancak düşük miktardaki proteinlerin görüntülenmesinde yeterli hassasiyeti göstermezler. CBB ile her spotta 30-100 ng proteini tayin etmek mümkündür (Patton, 2002). CBB yöntemlerinin modifiye edilmesi ile bu hassasiyet arttırılmaktadır (Neuhoff ve ark., 1988).

Gümüş boyama yöntemi, CBB yönteminden daha hassastır (< 0.1 ng protein/spot). Ancak gümüş boyamada, kantitatif analizler için geri kazanım oldukça düşüktür. Daha oyalayıcı ve karmaşıktır. Kullanılan sabitleyici çözeltiler, proteinlere çapraz bağlanmaları nedeniyle kütle analizini engellerler.

Floresans boyalarla ya da radyo-işaretleyiciler ile proteinleri işaretlemek en yüksek hassasiyette ve kantitatif doğrulukta yöntemlerdir. Radyo-izotoplar ile *in vitro* ve *in vivo* işaretleme yapmak mümkündür. Sonrasında otoradyografi veya

florografi ile tayin yapılabilir. Radyoaktif çalışmaların da birtakım kendi içerisinde kısıtlamaları bulunmaktadır. Organik boyalar, gümüş boyama ve radyo-işaretleme yöntemlerindeki sıkıntılar floresans belirleme yöntemlerinin daha fazla önem kazanmasına yol açmıştır. Ticari Cy boya ile yapılan “Diferansiyel Jel Elektroforezi” (DIGE) işlemleri ve SYPRO Ruby boyamalar ile hassasiyet 1-2 ng protein/spot’tur. Pek çok floresans boyama yöntemi, kütle tayini gibi protein karakterizasyonu yöntemleri ile uyumludur (Görg ve ark., 2004).

#### **II.8.6. Proteinlerin Tanımlanması**

Proteomiğin en önemli amacı, kontrol ve deney grupları arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesidir. Bu farklılıklar, protein ekspresyonunun inhibisyonu (spotun ortadan kaybolması), indüklenmesi (spotun ortaya çıkması) ve değişmesi (spot büyüklüğünün veya şiddetinin artması/azalması) şeklinde olabilir. Bu özellikler jel üzerinde tespit edildikten sonra kütle analizine geçilir.

Bilgisayarlı jel görüntüleme sistemlerinin ilk basamağı, jel görüntüsünün dijital ortama aktarılmasıdır. Modifiye edilmiş belge tarayıcıları, lazer dansitometreler, kameralar, floresans ve fosfor görüntüleyiciler gibi çeşitli aygıtlar ile bu aktarma işlemi gerçekleştirilir (Görg ve ark., 2004).

Protein desenindeki farklılıklar, spot tayinine ve spotların kantitatif analizine olanak sağlayan çeşitli ticari yazılımlar ile belirlenirler. Spotlar bu yazılımlar aracılığı ile önce otomatik olarak taranırlar, daha sonra değerler girilerek manuel taramaya geçilir. Pek çok gelişmiş yazılım olmasına ve her geçen gün çok daha fazla geliştirilmelerine rağmen tamamı ile otomatik bir spot belirleme yazılımı yoktur. Tüm spotlar jel üzerinde otomatik olarak tam doğrulukla belirlenemez. Bu sebeple manuel taramanın yapılması mutlaka gereklidir.

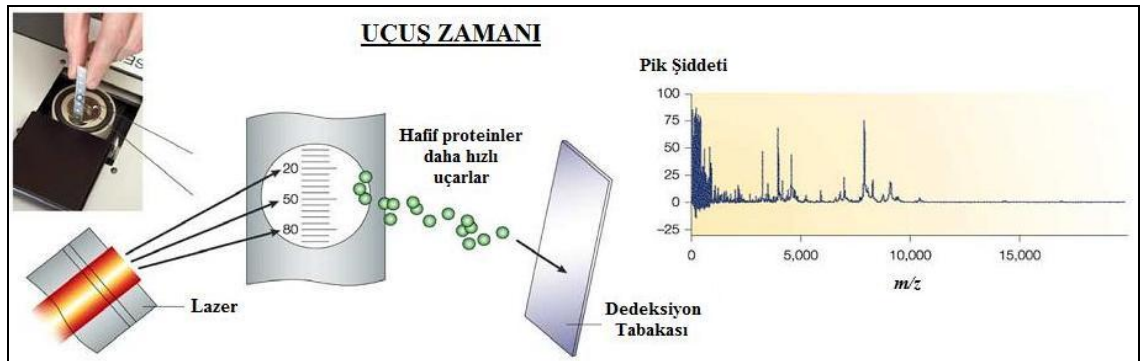
Normalizasyonun yapılması, arka plan etkisinin, dikey ve yatay sürüklenmelerin çıkartılması ile 2D-jelde bulunan tüm proteinlerin, belirli bir proteinle yapılan karşılaştırması sonucunda bu spot hacminin yüzdesi belirlenebilir. Aynı örneği taşıyan birkaç jel (en az 3, genellikle 5) üzerinde karşılaştırma yapmak, ortalama değerlerin eldesi ve jelden kaynaklanan hataların etkisini azaltmak için gereklidir. Protein düzeylerindeki farklılıklar  $p < 0.05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir (Fountoulakis, 2004; Görg ve ark., 2004).

Kütle analizi, 2D jellerden çıkartılan spotlardaki proteinlerin tanımlanmasında tercih edilen bir tekniktir. Femtomol veya attomol düzeyinde örnek gerektirir ve

oldukça hassastır. Glikozilasyon ve fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları da belirlemek mümkündür. Kütle analizi ile istenen proteinin karakteristik “peptit-kütle parmak izi” belirlenebilir. Deneysel olarak elde edilen bu parmak izinin veritabanlarındaki protein ve nükleotit dizi karşılığı aranarak istenen proteinin kimliği bulunabilir. Ancak bu yöntemle sadece, daha önce dizisi bulunmuş olan proteinlerin tayini yapılabilir, dizisi belirlenmemiş pek çok organizma ve bu organizmalara ait proteinler vardır ve bunlarla ilgili karşılaştırma yapmak mümkün değildir. Bir diğer problem de, proteinlerin çok kapsamlı olarak post-translasyonel modifikasyona uğramış olmalarıdır. Bu proteinler, veritabanındaki modifikasyona uğramamış protein dizisi ile eşleşemezler. Eğer tek bir spot üzerinde birkaç farklı protein varsa, parmak izi yöntemi bu proteinleri birbirinden ayıramaz. Ancak bazı arama motorları, düşük kalitedeki verilerle ve protein karışımları ile doğru protein belirlemesine olanak sağlamaktadır.

Kütle tayini, kaynak-sonrası bozunma ile ya da kimyasal destekli parçalama ile “Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Kütle Spektroskopisi” (MALDI-MS) ya da MS/MS yöntemleriyle yapılabilir. “Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanı-Kütle Spektroskopisi” (MALDI-TOF-TOF-MS/MS) ya da “Elektrospray İyonizasyon-Kütle Spektroskopisi” (ESI-MS/MS) üçlü kuadropol, iyon-tuzağı ya da Q-TOF gibi iki basamaklı MS/MS sistemleri diğerlerinden daha avantajlıdır (Görg ve ark., 2004).

ESI-MS ve ESI-MS/MS deneyleri, birbirini takip eden üçlü kuadropol aletinde ya da TOF-analizörü ile birleştirilmiş bir kuadropol aleti ile gerçekleştirilir. TOF-analizörüne bağlı sistemler yüksek doğrulukta ölçme imkanı sunar ve Q-TOF-MS olarak ifade edilir (Telefoncu ve ark., 2002).



Şekil II.6 Uçuş zamanı tüpü çalışma prensibi. (Petricoin ve ark., 2004)

Bu aletlerde, peptit karışımı çözelti halinde (1µl) uygulanır ve iyonik kaynağa püskürtülür. Oluşan düzenli damlacıklar ön vakum haznesindeki çözücülerini içermez ve aletin yüksek vakumlu haznesine konsantre iyon bulutu olarak enjekte edilir. Kütle spektroskopisine çarpışma hücresi eklenerek peptit iyonlarının seçimli fragmentasyonu sağlanabilir. İlk olarak, peptit çarpışma hücresi kullanılmadan normal ayırma modunda kuadropol ile analizlenir ve tipik “kütle parmak izi” elde edilir. İkinci olarak, m/z 4000’e kadar seçilmiş peptit iyonlarının MS/MS spektrumları, ana peptit iyonunun yüküne dayalı olarak çarpışmanın sağlanmasıyla ölçülür. Bozunma sonrası oluşan iyonlar, TOF analizörüne gönderilir. Bir peptid iyonunun, MS/MS spektrumu pek çok kütleli üretebilmektedir. Bu durum, 1, 2, 3, 4 veya daha fazla amino asit biriminin kaybı ile asıl peptit külesinden farklılık ile açıklanabilir. Spektrumların farklı olmasından peptitin dizisi hesaplanabilir.

MALDI-TOF-MS, total bir peptit karışımından peptit kütlelerinin tayinine olanak sağlayan proteomik çalışmalar için önemli bir araçtır. Tipik olarak vakum haznesi, azot lazer, zaman sürükleme/odaklama tekniği ve TOF kütle analizöründen oluşmaktadır. Çelik bir hedef; vakum haznesi içerisinde manuel ya da otomatik moda yerleştirilir ve bu hedef plaka daha önceden matriks ile karıştırılmış örnek peptit karışımını içeren çok küçük spotları üzerinde taşır. Matriks dihidrobenzoik asit veya α-siyano-4-hidroksisinnamik asit gibi bir organik asittir ve kolayca peptitleri tutabilen kristaller oluşturur. Lazer ışığı ile uyarılan kristaller kolayca iyonlaşma eğilimine sahiptir, kristaller uçucu hale gelirken aynı zamanda peptitlerin iyonlaşması gerçekleşir. Bu sayede bir ve iki yönlü jellerden triptik parçalama sonrası “kütle parmak izi analizi” ile peptitlerin amino asit dizilimleri hakkında bilgi edinilebilir. Her bir triptik peptit karışımında farklı kütleler elde edilebilir. Bunlar her bir özel protein için karakteristiktir ve eğer protein dizisi biliniyorsa ve ExPASy, Matrix Science “Mascot”, ProFound, MS-fit ya da protein prospector gibi veri tabanlarında listelenmiş durumdaysa protein tanımlanmasında kullanılabilir (Patton, 2002; Telefoncu ve ark., 2002; Butterfield, 2004).

### **II.8.7. Karşılaşılan Zorluklar**

IPG şeritlerin ortaya çıkmasıyla, dar aralıktaki şeritlerle çalışmak mümkün hale gelmiştir. Şeritleri birbirleriyle karşılaştırarak yüksek çözünürlük elde etmek mümkündür. Ancak modern 2D-PAGE ile izoelektrik noktası farkı 0.001 birimin

altında olan proteinlerde bu ayırım gerçekleştirilemez (Görg ve ark., 2004; Issaq ve Veenstra, 2008).

2D-PAGE ile spotların üst üste çakıştırılması işlemi oldukça zor ve zahmetli bir işlemdir, aynı zamanda 2D-PAGE'in tekrarlanabilirlik ve dinamik olarak ölçüm yapılması gibi konularda sınırlamaları vardır. Tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi için standart işlemlerin çok büyük bir dikkatle uygulanması gerekir (Issaq ve Veenstra, 2008; Danış, 2010).

2D-DIGE, 1997 yılında bu zorluklara karşı geliştirilmiş bir yöntemdir (Unlu ve ark., 1997). Tek jel üzerinde 3 farklı protein ekstraktının (hastalıklı, sağlıklı, hastalıklı ve sağlıklı örneklerden eş miktarda karıştırılarak elde edilen standart) görüntülenmesine olanak sağlar. Bu yöntemde proteinler 2D elektroforezinden önce, her biri farklı dalga boyunda emisyon yapan siyanin (Cy) floresans boya ile kovalent olarak işaretlenirler. Tek jel olduğundan örneklerin göç etme hızları konusunda farklılık olmaz, bu boya ile işaretlenmiş her bir örnek jel üzerinde aynı noktaya göç eder. Analizlerin tek jel üzerinde yapılması nedeniyle % 50 daha az jel harcanır, bu nedenle daha ekonomiktir. Aynı zamanda proteinlerin karşılaştırılması işlemi aynı jel üzerinde yapıldığından daha doğru, kesin ve hızlı sonuç elde edilir. Bu nedenle tekrarlanabilirlik daha yüksektir (Issaq ve Veenstra, 2008).

## **II.9. NÖROLOJİK ÇALIŞMALARDA PROTEOMUN YERİ**

Proteomik bugün, enfeksiyon hastalıklarının, kanser, kalp ve nörolojik hastalıkların araştırılmasında ve klinik teşhiste rutin olarak kullanılmaktadır (Fountoulakis, 2004). Beynin her bir bölgesi özellikle gelişim dönemlerinde ve patolojik rahatsızlıklarda kendine özgü protein kompozisyonları içerir. Bu nedenle beyin proteomunun ve burada gerçekleşen anormal durumların analizi, beyin fonksiyonlarını ve hastalıkların sebebini anlamada temel kabul edilmektedir (Olsen ve ark., 2007). Memelilerde bulunan genlerin yaklaşık % 30-50'si sinir sisteminde eksprese edilirler. Gen ekspresyonlarının farklı olması, nöronal fenotip çeşitliliğinin oluşması için gereklidir. Beyin bölgelerinin proteomik analizi; beyindeki karmaşıklığı anlamada, merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarını araştırmada ve ilgili belirteçleri belirlemede yararlı bir tekniktir (Fountoulakis, 2004).

Nöropatolojik çalışmalarda aydınlatıcı sonuçlara proteomik çalışmaları ile ulaşılabilmektedir ve bu konuda yapılmış çalışmalar temel çalışmalar olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmalarda aranan önemli proteinler olan sinyal proteinleri

nörokimyanın merkezinde yer alan proteinlerdir. Fosforilasyon-bağımlı proteinler, GTP-bağımlı proteinler, kinazlar ve adaptör proteinler gibi sinyal-bağımlı proteinler; tümörlerin de dahil olduğu çeşitli dokularda proteomik ile tanımlanabilirler (Lubec ve ark., 2003).

Bugüne kadar proteomik insan, sıçan ve fare beyin proteinlerinin tanımlanmasında ve düzeylerinin tayininde, çeşitli nörolojik hastalıklar (insanlarda ve hayvan modellerinde Alzheimer Hastalığı, Down Sendromu, Parkinson Hastalığı, Huntington Hastalığı, kanser vs.) sonucunda meydana gelen değişikliklerin ve düzey farklılıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu hastalıklarda değişiklik gösteren proteinlerin, başlıca nörotransmisyon, yönlendirme ve sinyal iletim fonksiyonlarında yer aldığı ya da detoksifikasyon, metabolizma ve konformasyonel değişiklikler ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Petricoin ve ark., 2002; Fountoulakis, 2004).

Epilepsi ile yapılan proteomik çalışmalar, çeşitli hayvan modellerinde ya da post-operatif insan örneklerinde gerçekleştirilebilir. Kainik asit kullanılarak oluşturulmuş sıçan epilepsi modeli üzerinde yapılan bir araştırmada kainik asit verilmiş olan hayvanlarda iki proteinin seviyesinde azalma olduğu ve bir heparin-bağı proteinin miktarının arttığı bulunmuştur (Krapfenbauer ve ark., 2001).

2004 yılında yapılan bir çalışmada epileptik hastalarda insan serebral korteksi proteomik ile incelenmiş ve epilepsi patojenezi ile ilgili olabileceği düşünülen 9 farklı proteinin miktarlarında değişiklikler saptanmıştır (Eun ve ark., 2004).

Nörolojik bozukluklardan olan Alzheimer ve şizofreni hastalarının post-mortem hipokampal beyin dokularında yapılan çalışmalarda şizofrenik hastalarda, 8 protein spotunun konsantrasyonunun azaldığı ve 8 protein spotunun konsantrasyonunun ise arttığı bildirilmiştir. Alzheimer hastalarında da benzer şekilde 35 protein spotunun konsantrasyonu azalırken, 73 protein spotunun konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. Her iki hastalıkta da azaldığı gözlenen bir proteinin karakterizasyon işlemleri sonucunda Diazepam bağlayıcı inhibitör ( $GABA_A$  reseptör hareketinin düzenlenmesini sağlamakla görevlidir) olduğu bulunmuştur (Edgar ve ark., 1999; Tsuji ve ark., 1999). Alzheimer hastalarının post-mortem temporal korteks beyin dokularında yapılan bir başka çalışmada 5 protein spotunun konsantrasyonunun arttığı, 28 tanesinin azaldığı ve 9 tanesinin sadece Alzheimer hastalarının temporal korteks beyin proteom analizinde ortaya çıktığı bulunmuştur (Tsuji ve ark., 1999).

Alzheimer hastası kişilerin beyin korteks bölgesi proteom çalışmalarında, voltaj-bağımlı anyon kanal-I proteinin değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Yoo ve ark., 2001a).

## **II.10. MEMBRAN PROTEİNLERİNİN PROTEOM ÇALIŞMALARINDAKİ ÖNEMİ**

Günümüzde, organellerden elde edilen veya spesifik olarak subselüler komplekslerden izole edilen protein kalıntıları ile yapılan analizler var olan karmaşıklığı azaltması nedeniyle nörobilimde tercih elden uygulamalardır. Sinapslardaki protein ağı organizasyonu ile ilgili proteomik çalışmalar, nöronların iletişimini gösteren nadir çalışmalardır. Bunun nedeni, sinaptik proteinler ağının membran ya da membrana bağlı proteinlerden (reseptörler, taşıma kanalları, ektoenzimler, vs.) oluşmasıdır. 2D-PAGE işleminde membran proteinlerinin stabilite ve çözünürlükleri, bu proteinlerin hidrofobik doğaları gereği bir takım kısıtlamalara neden olmaktadır. Çok sayıda ve yaygın olarak var olan çözünür proteinler, örneklerde bulunan pek çok membran proteinini perdeleyerek belirlenmesini olanaksızlaştırmaktadır. Diğer yandan membran proteinleri, memelilerde gerçekleştirilen proteom, nöronal reseptör, taşıyıcı ve hedef enzimler ile ilgili çalışmaların % 25-34'ünü oluşturmaktadır. Bu nedenle; proteom çalışmaları, bu moleküllerin fonksiyonunu anlamada ilgi çeken çalışmalar olarak kabul edilmektedir (Stevens ve ark., 2003).

İyon kanalları pek çok hücrede görev almaları nedeniyle, pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedeftirler. İyon kanalı bozukluklarının ortaya çıkmasıyla, iyon kanallarını hedef alan pek çok ilacın da terapötik önemi artmıştır (Camerino ve ark., 2007).

İyon kanalları birbirine çok benzeyen ancak farklı elektrokimyasal özelliklere sahip çok sayıda alt ünitelerden meydana gelmiştir. Nöronal ifadenin farklılığı ve bu alt ünitelerin diğer komplekslerle olan birleşimi, iyon kanallarının özelliklerinin ve dağılımlarının çok fazla sayıda olmasına sebep olmaktadır. İyon kanallarının fonksiyon bozukluğu çok sayıda nörolojik hastalığa neden olmaktadır. İyon kanallarının fonksiyonu voltaja (voltaj kapılı), kimyasal etkileşimlere (ligand kapılı) ve mekanik bozukluklara bağlıdır (Rose, 1998).

Kalsiyum ve voltaj duyarlı, yüksel iletken potasyum kanalları (BK, Maks-K veya Slo kanalları) membran potansiyelinin geride kalan kısmını, hareketli

potansiyel tekrar-polarizasyonunu ve merkezi sinir sisteminden nörotransmitter salınımını destekler. BK kanalları yüksek oranda düz kaslarda ve beyinde, daha az oranda ise iç kulak, böbrek ve epitel dokuda eksprese edilirler. Bu kanalların, soma ve akson terminallerinde, dendritlerin ve santral nöronların sinaptik terminallerinde lokalize olduğu elektrofizyolojik ve histolojik tekniklerle gösterilmiştir (Douglas ve ark., 2006).

1970-1990 yılları arasında farmakolojik yöntemler kullanılarak tanımlanmış ve sınıflandırılmış olan reseptörler, biyofiziksel düzeyde moleküler olarak da ifade edilmiştir. Böylece, Na<sup>+</sup> kanalı gibi epilepsi açısından önemi olan reseptörlerin anlaşılması mümkün hale gelmiştir. Bu kanalın protein alt üniteleri, sadece amino asit ve kanalı kodlayan gen sekansı ile değil, Å düzeyinde proteinin dördüncül yapısı ile de ortaya konmuştur. Yapının, Å düzeyinde bilinmesiyle, moleküler düzeyde kanalın nasıl çalıştığını anlamak mümkün hale gelmiştir. Kanalın açık ve kapalı durumu, kanaldaki peptit segmentlerinin hareketine ve porlu yapısının açılıp kapanmasına bağlıdır (Sutula, 2005).

Voltaj kapılı iyon kanalları olan sodyum, potasyum, klor kanalları mutasyonlarının jeneralize epilepsilerle ve infantil nöbetlerle ilişkili olduğu bulunmuştur. Ligand kapılı iyon kanalları olan nikotinik asetilkolin reseptörlerinin ve GABA reseptörlerinin alt tipleri ise frontal ve jeneralize epilepsilerin spesifik sendromlarıyla bağlantılıdır. 1995 yılında idiyopatik epilepsiye neden olan ilk gen mutasyonunun bulunmasından bu yana bu durumla ilişkili 13 gen tanımlanmış olup çoğunun ya voltaj kapılı ya da ligand kapılı iyon kanallarını kodladığı gösterilmiştir. İyi-gidişli ailesel yenidoğan nöbetlerinde voltaj kapılı potasyum kanallarında, otozomal dominant noktürnal frontal lob epilepsisinde nikotinik asetilkolin reseptörlerinde, ateşli nöbet artı jeneralize epilepside sodyum kanallarında mutasyon tespit edilmiştir (Seğmen, 2005).

Deneyssel oluşturulmuş epileptik nöbetlerde GABA'nın % 50-60 oranında azaldığı, GABAerjik inhibitör sinapsların fonksiyon kaybının epileptik odağı oluşturduğu düşünülmüştür. GABA'nın iki farklı mekanizma ile nöbetten sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Birincisi sinapslardaki GABA konsantrasyonu düştüğünde nöronal inhibisyonda azalma olması, ikincisi ise GABA konsantrasyonunun normal olması ancak mevcut GABA'nın kullanılamamasıdır (Cain ve ark., 1989). GABA<sub>A</sub> reseptörü, GABRG2 ve GABRA1 tarafından kodlanan alt ünitelerin sinaptik inhibisyon ve mutasyonlarının düzenleyicisidir. Bu alt üniteler,

idiyopatik jeneralize epilepsiler ve ateşli nöbet artı jeneralize epilepsi ile ilişkilidir (Heron ve ark., 2007).

Voltaj-kapılı potasyum kanalı alt ünite genlerindeki (KCNQ2 ve KCNQ3) mutasyonlar, iyi-gidişli ailesel yenidoğan nöbetli otozomal dominant epilepsi sendromu ile ilişkilidir. Bu nöbetler, doğumdan sonraki ilk birkaç günde meydana gelir. KCNQ2 ve KCNQ3'teki mutasyonlar ilk kez 1998 yılında iyi-gidişli ailesel yenidoğan nöbetlerde tanımlanmıştır. Bundan sonra KCNQ2'de yaklaşık 50 farklı mutasyon gösterilmiştir (Heron ve ark., 2007). İyi-gidişli ailesel yenidoğan nöbeti, KCNQ2 (kromozom 20 üzerinde) ve KCNQ3 (kromozom 8 üzerinde) mutasyonları ile ilişkili bulunmuş olup *in vitro* fonksiyonel çalışmalarda nöronun repolarizasyonunda önemli olan potasyum geçişinde fonksiyon kaybı olduğu tespit edilmiştir (Biervert ve ark., 1998).

Nöronal nikotinik asetilkolin reseptörü  $3\alpha$  ve  $2\beta$  altünitesi içeren, beyinde yaygın olarak bulunan pentamerik bir komplekstir. Nikotinik asetilkolin reseptör alt ünitelerindeki mutasyonlar, otozomal noktürnal frontal lob epilepsi ile ilişkilidir. Fakat bu epilepsiye sahip hastaların yalnızca % 12'sinin nikotinik asetilkolin reseptör alt ünitelerinde mutasyon vardır. Bu hastalıkta tanımlanan mutasyonlar, 4 farklı mutasyonla 'asetilkolin reseptör alt ünite  $\alpha 4$ ' geninde ve 3 farklı mutasyonla 'asetilkolin reseptör alt ünite  $\beta 2$ ' geninde görülmektedir (Combi ve ark., 2004).

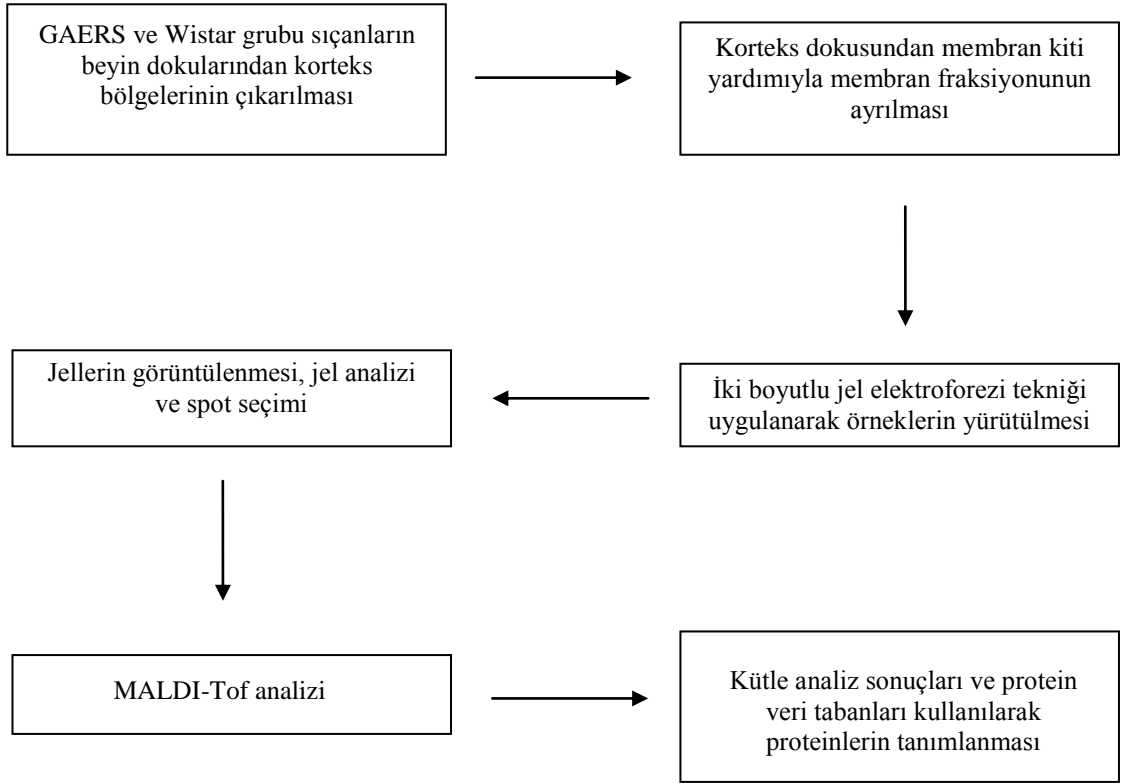
Voltaj-kapılı sodyum kanalları,  $1\alpha$  ve  $2\beta$  olmak üzere 3 alt üniteden oluşur. Voltaj-kapılı sodyum kanalı  $\alpha$  alt ünite genleri olan SCN1A ve SCN2A ile  $\beta$  alt ünite geni olan SCN1B' de meydana gelen mutasyonlar epilepsi ile ilişkilidir. SCN2A'da meydana gelen mutasyonlar, bu nöbet fenotipindeki 8 ailede belirlenmiştir. İyi-gidişli ailesel infantil nöbetli bir ailede SCN2A mutasyonları gösterilmiştir (Heron ve ark., 2007). SCN1B, idiyopatik epilepsi ile ilişkili olan ilk sodyum kanal genidir (Wallace ve ark., 1998). SCN1A mutasyonlarının bazı epileptik ensefalopatilerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Heron ve ark., 2007). SCN1A geninin yapımı doğumda başlayıp erişkinlikte devam etmektedir. Merkezi sinir sisteminde serebral korteks ve hipokampusu de içeren epilepsi patojenezinde önemi olduğu bilinen beyin alanlarında yaygın olarak bulunur. Ateşli nöbet artı jeneralize epilepsisi, ateşli nöbet artı temporal lob epilepsisi ve sütçocuğu miyoklonik epilepsisinin nedeni SCN1A mutasyonu olarak bulunmuştur. SCN1A'daki mutasyonların nöronal hücrelerin kendiliğinden ve kontrolsüz deşarjına neden olduğu düşünülmüştür. Bu mutasyonların fonksiyonel değerlendirilmesi için yapılan birkaç çalışmada, ateşli

nöbet artı jeneralize epilepsili ailelerde üç mutasyon üzerinde odaklanılmıştır. Bunlar T875M, W1204R ve R1648H'dir. Bu fonksiyonel çalışmalar, sodyum kanal mutasyonlarının sodyum geçişini değiştirerek nöronal hipereksitabiliteye neden olduğunu göstermiştir (Claes ve ark., 2001; Seğmen, 2005).

## BÖLÜM III

### ÇALIŞMALAR

#### III.1. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ



Şekil III.1 Tez çalışmasında izlenen yöntemler.

## III.2. ARAŞTIRMA ARAÇLARI

### III.2.1. Araştırmada Kullanılan Cihazlar

**Santrifüj:** *Sigma*, 3K 30 Yüksek Devirli, Soğutmalı (A.B.D.)

**Santrifüj Rotoru:** *Sigma*, 13131H (20000 RPM)

**Spektrofotometre:** *Thermo Scientific*, Helios Zeta UV-VIS (A.B.D.)

**Hassas Teraz:** *Sartorius Analytic*, A200S  $\pm 0,0001$  (Almanya)

**- 80°C Derin Dondurucu:** *Thermo Electron Corp.*, Forma (-80 °C) ULT Freezer (A.B.D.)

**Buzdolabı:** *Regal* (Türkiye)

**Su Banyosu:** *Wasserbad WB Serisi* (Almanya)

**Vorteks Karıştırıcı:** *Fisons*, Whirlimixer (İngiltere)

**Destile Su Cihazı:** *Millipore*, Rios-DI UV (A.B.D.)

**Manyetik Karıştırıcı :** *VELP Scientifica*, ARE (İtalya)

**Etüv:** *Genlab*, Midi/2/AL (0-100) (İngiltere)

**Otomatik Pipetler:** *Gilson*, Pipetman (Fransa)

**pH Metre:** *HANNA*, HI 9024 (Romanya)

**Orbital Karıştırıcı:** *IKA-Werke*, OS 10 B (Almanya)

**IEF Elektroforez Sistemi:** *Bio-Rad*, Protean IEF Cell (A.B.D.)

**İki Boyutlu Elektroforez Sistemi:** *Bio-Rad*, Protean II XL Multi-Cell (A.B.D.)

**Elektroforez Güç Kaynağı:** *Apelex*, PS 9009 TX (Fransa)

**Görüntüleme Sistemi:** *GE Healthcare UK*, ImageScanner III (İngiltere)

**Kütle Tayin Cihazı:** *Applied Biosystems*, 4800 MALDI TOF/TOF (A.B.D.)

### III.2.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

**Bio-Rad Firmasından Alınan Kimyasallar:** ReadyPrep Protein Extraction Kit (Membrane I), ReadyStrip IPG şeritleri (pH 3-10 lineer olmayan) 17 cm, Bio-Lyte 3/10 amfolit %40, mineral yağ, Quick Start-Bradford Reaktifi, ReadyPrep Proteomiks Kalite Su, ReadyPrep 2-D Cleanup kiti

**Sigma Firmasından Alınan Kimyasallar:** N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED), proteaz inhibitör kokteyli, sıgır serum albümini (BSA)

**Merck Firmasından Alınan Kimyasallar:** Metanol, asetik asit, amonyum peroksidosülfat (APS), sodyum dodesilsülfat (SDS), glisin, üre, tiyoüre, brom fenol mavisi, orto-fosforik asit, hidroklorik asit.

**Fluka Firmasından Alınan Kimyasallar:** Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB G-250), akrilamid, N, N' metilen-bis-akrilamid (bisakrilamid), Tris-(hidroksi metil)-aminometan (Tris), 3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonyum]-1-propan sülfonat (CHAPS), ditiyotireitol (DTT), gliserol, iyodoasetamit, amonyum sülfat, agaroz.

### III.3. YAPILAN ÇALIŞMALAR

#### III.3.1. Örnek Hazırlama

Örnek hazırlığı, Bio-Rad ReadyPrep Protein Ekstraksiyon Kiti (Membran I) kullanım kılavuzuna göre yapıldı. Çalışmada kullanılan sıçanlar Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Ana Bilim Dalı'ndan temin edildi ve hayvan çalışması için etik kurul raporu alındı. Çalışmada kullanılan sıçanlar 12 saat aydınlık-12 saat karanlık siklusu ve sabit sıcaklık ayarlaması bulunan hayvan bakım ve üretim ünitesinde üretildi ve bu ortamda muhafaza edildi. Dokuların çıkarılacağı gün aşağıdaki çalışma programı izlendi:

1. Tablo III.1'de verilen GAERS ve Wistar gruplarındaki sıçanlar eterli ortamda 2 ila 4 dakika bekletilerek bayıltıldı.

**Tablo III.1** Çalışmada kullanılan hastalıklı ve sağlıklı sıçan grupları

GAERS ♂ (Hastalıklı) Grubu	6 aylık, 286 g	6 aylık, 240 g	6 aylık, 266 g	6 aylık, 280 g	5 aylık, 245 g
Wistar ♂ (Kontrol) Grubu	5 aylık, 300 g	4 aylık, 240 g	4 aylık, 280 g	4 aylık, 270 g	6 aylık, 380 g

2. Bayıltılmış olan sıçanlar dekapite edilerek hızlı bir şekilde beyinleri çıkarıldı.
3. Çıkarılan beyin, yıkama tamponu (40 mM Tris-baz ve 5 mM proteaz inhibitör karışımı) kullanılarak artık dokulardan ve kandan temizlendi.
4. Buz üzerinde çalışılarak parietal korteks bölgeleri çıkarıldı.
5. Elde edilen korteks dokuları sıvı azot ile dondurularak toz haline gelecek şekilde öğütüldü.
6. Öğütülmüş olan dokular tartıldı ve her 50 mg doku için 5mM proteaz inhibitör karışımı içeren 500 µL Membran Protein Ekstraksiyon Tamponu-I ilave edilerek çözünürleştirildi.

7. Örneklerin her biri 4x30 s sonike edildi, her sonikasyon adımından sonra 1 dakika buz üzerinde bekletildi.
8. Ekstraktların üzerine 500 µL Membran Protein Ekstraksiyon Tamponu-II ilave edilerek, 4x60 s vortekslendi. Her vorteks adımının ardından ekstraktlar 60 s buz banyosunda tutuldu. Vorteks işleminin tamamlanmasının ardından tüm ekstraktlar 10 dk buz banyosunda bekletildi.
9. Bekleme süresi sonunda ekstraktlar 10 dakikada bir 30 saniye karıştırılarak 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dk inkübe edildi.
10. Su banyosundan alınan ekstraktlar oda sıcaklığında, 16000 g'de 5 dk santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonunda çok belirgin olmayan iki faz gözlemlendi. Üst faz temiz bir tüpe alınarak "hidrofilik fraksiyon" olarak etiketlendi.
12. Alt faz üzerine yeniden, 500 µL önceden soğutulmuş Membran Protein Ekstraksiyon Tamponu-II ilave edildi. 8-10. adımlarda yer alan vorteks, inkübasyon ve santrifüj işlemleri tekrarlandı. Santrifüj sonunda üst faz öncekilerle birleştirildi.
13. Alt faz temiz bir tüpe alınarak "hidrofobik fraksiyon" olarak etiketlendi.
14. Tüm fraksiyonlar 100 µL'lik hacimlere ayrıldı ve çalışmanın gerçekleştirildiği zamana kadar 80 °C'de saklandı.

### III.3.2. Bradford Metoduna Göre Protein Tayini

Örnek protein miktar tayini Bradford metoduna uygun olarak gerçekleştirildi (Bradford, 1976).

1. Standart ovalbümin çözeltisi, 2 mg/mL ovalbümin stok çözeltisinin 0.1 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilmesi ile hazırlandı.
2. Standart ovalbümin çözeltisinden belirli hacimlerde alınarak, son konsantrasyonlar sırasıyla 2µg/mL, 4µg/mL, 6µg/mL, 8 µg/mL ve son hacim 800 µL olacak şekilde destile su ile seyreltmeler yapıldı.
3. Her bir örnekten 2 µL alındı ve üzerine son hacim 800 µL olacak şekilde destile su ilave edildi.
4. Referans olarak kullanılacak ependorflara 800 µL destile su konuldu.
5. Standart, örnek ve referans çözeltilerine 200 µL Quick Start-Bradford Dye reaktifinden konularak tüm ependorf tüpleri karıştırıldı.

6. 15 dk sonra 595 nm dalga boyunda, standart ve örneklerin referansa karşı absorbans ölçümleri yapıldı.

### III.3.3. Elektroforez İşlemi Öncesi Arındırma ile Örneklerin Hazırlanması

Örneklerin, elektroforez esnasında düzgün ayrılabilmesi için ekstraksiyon işlemlerinden kalan ve izoelektrik odaklama (IEF) ile girişim gösterebilecek ajanlardan uzaklaştırılması gerekir. Elektroforez öncesi uygulanan ve arındırma adı verilen bu işlem için ReadyPrep 2-D Cleanup Kiti kullanım kılavuzuna uygun olarak aşağıdaki çalışma programı izlendi.

1. Örnekler 350 µg protein içerecek şekilde rehidrasyon tamponu ile (7 M üre, 2 M tiyoüre %1 CHAPS, 65 mM DTT, %0.5 (w/v) Bio-Lyte 3/10 amfolit) seyreltilerek son hacim 100 µL olacak şekilde ependorflara aktarıldı.
2. Ependorflara 300 µL Çöktürme Reaktifi-I ilave edildi, vortekslendi. 15 dk buz üzerinde inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda ependorflara 300 µL Çöktürme Reaktifi-II ilave edildi, vortekslendi.
4. Tüm ependorflar 4 °C'de ve 15000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşan pelete dokunmadan pipet yardımıyla süpernatant uzaklaştırıldı.
5. Ependorflar tekrar aynı pozisyonda santrifüje yerleştirildi, 4 °C'de ve 15000 g'de 1 dk daha santrifüj edildi. Kalan sıvı kalıntıları pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
6. Pelet üzerine 40 µL Yıkama Reaktifi-I ilave edildi. Ependorflar tekrar aynı pozisyonda santrifüje yerleştirildi, 4 °C'de ve 15000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Pelete dokunmadan pipet yardımıyla süpernatant uzaklaştırıldı.
7. Pelet üzerine 25 µL Proteomik Kalite Su ilave edildi ve 20 s vortekslendi.
8. 1 mL Yıkama Reaktifi-II (2 saat -20°C'de bekletilmiş) ve 5 µL Yıkama-II Ek Reaktifi ilave edildi. Ependorflar 1 dk vortekslendi.
9. Ependorflar -20 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi boyunca her 10 dk'da bir 30 s vortekslendi.
10. İnkübasyon sonunda ependorflar, 4 °C'de ve 16000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Pelete dokunmadan pipet yardımıyla süpernatant uzaklaştırıldı.
11. Ependorflar tekrar aynı pozisyonda santrifüje yerleştirildi, 4 °C'de ve 16000 g'de 1 dk daha santrifüj edildi. Kalan sıvı kalıntıları pipet yardımıyla

uzaklaştırıldı. Bu aşamada pelet beyaz renklidir. Ependorflar açık bırakılarak 5 dk (en fazla) kurutulduktan sonra şeffaf bir görünüm elde edildi.

12. Her pelet üzerine 250 µL rehidrasyon tamponu (7 M üre, 2 M tiyoüre %1 CHAPS, 65 mM DTT, %0.5 (w/v) Bio-Lyte 3/10 amfolit) ilave edildi, 30 s vortekslendi. Ependorflar 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Tekrar 1 dk boyunca vortekslenerek peletin iyice çözünmesi sağlandı.

13. Ependorflar oda sıcaklığında 16000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar IEF işleminde doğrudan kullanıldı.

### **III.3.4. İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi**

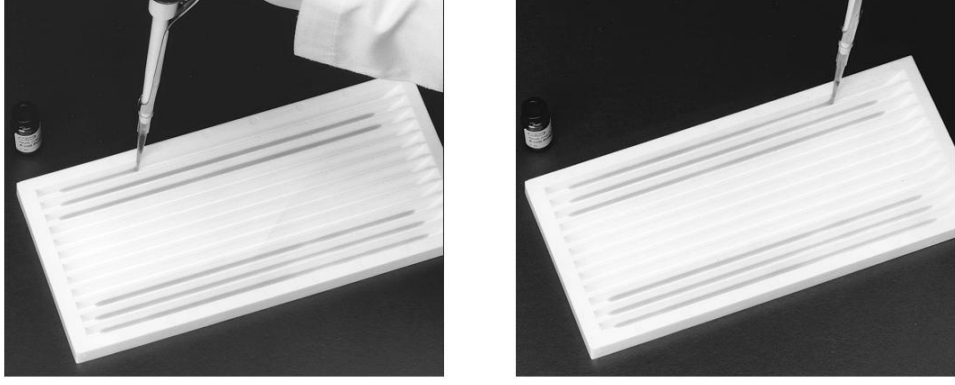
Tez çalışmasında proteinlerin birinci boyutta izoelektrik noktalarına göre ayırma işlemi, Bio-Rad firmasından temin edilen "ReadyPrep 2D starter kit" kullanım kılavuzuna uygun olarak yapıldı. Proteinlerin ikinci boyutta molekül ağırlıklarına göre ayırımı ise Laemmli'nin geliştirdiği SDS-PAGE sistemine göre yapıldı (Laemmli, 1970). Her iki yöntem de mevcut derleme yayınlarının ışığında çeşitli değişiklikler yapılarak güncellenmiştir (Görg ve ark., 2004).

Çalışmada izlenen yol aşağıdaki gibidir:

1. Örneklerin IPG şeritlere yüklenmesi, 45 dakika
2. IPG şeritlerinin rehidrasyonu, 11-16 saat
3. İzoelektrik odaklama, 7 saat
4. IPG şeritlerinin dengelenmesi, 20 dakika
5. SDS-PAGE, 4.5-5.5 saat
6. Jellerin Boyanması, 4 gün

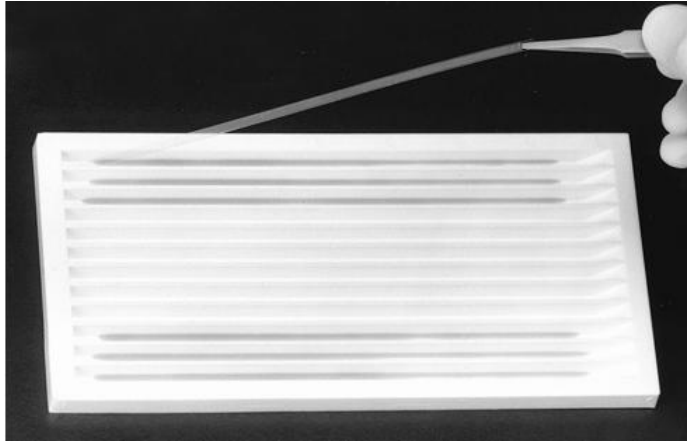
#### **III.3.4.1. Örneklerin IPG Şeritlerine Yüklenmesi**

1. Arındırma işlemi sonunda elde edilen 250 µL'lik hacimler doğrudan 1.boyut ayırma işleminde kullanıldı.
2. Örnek içeren çözeltiler, otomatik pipet yardımı ile özel hazırlanmış ve on iki kanaldan oluşan tablanın her bir kanalına dikkatlice yayıldı.
3. -80 °C'de saklanan kullanıma hazır IPG şeritlerinden bir tanesi sıcaklığının dengeye gelmesi için 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.



**Şekil III.2** Tablaya örneğin yayılması.

4. Şeridin jel kısmı üzerinde bulunan koruyucu bant çıkarıldı.
5. Şerit bir pens ile jel kısmı örneğin üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Bu esnada şeridin jel yüzeyinin tamamının örnek çözeltisi ile ıslanmasına dikkat edildi.



**Şekil III.3** IPG şeridinin örnek çözeltisi üzerine yerleştirilmesi.

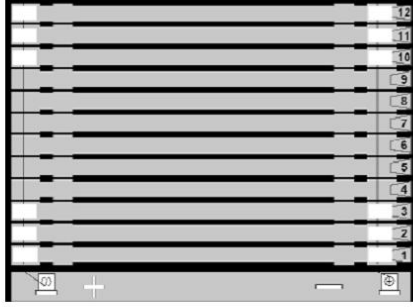
6. Tüm jelin örnek ile iyice temas etmesi ve hava kabarcığı kalmaması için pens jelin üzerinde yavaşça gezdirildi.
7. Tablanın kapağı kapatılarak jelin çözeltiyi emmesi için 45 dakika boyunca beklendi.

#### **III.3.4.2. İzoelektrik Odaklama**

1. Odaklama tablasının kanallarının (12 adet) her iki ucunda bulunan ve elektrik akımının geçmesini sağlayan tellerin üzerine, şeride yüklenen örnek sayısına göre 8  $\mu$ L destile su ile ıslatılmış elektrot kağıtları konuldu. Elektrot

kağıtları örneğin diğer amfoter olmayan bileşenlerini ve tuzlarını tutarak daha iyi sonuçların elde edilmesini sağlar.

2. Tablada bulunan örnek yüklenen şerit, bir pens ile alınarak + ucu odaklama tablasının + ucuna karşılık gelecek ve jel kısmı altta kalacak şekilde yerleştirildi.



**A**



**B**

**Şekil III.4** IPG şeritlerinin odaklama tablasına yerleştirilmesi.

A- Odaklama tablasına elektrot kağıtlarının yerleştirilmesi, B- IPG şeridinin odaklama tablasına yerleştirilmesi.

3. Şeritlerin üzerine 3 mL mineral yağ konuldu. Odaklama tablasının kapağı + ve – işaretlerinin karşılıklı gelmelerine dikkat edilerek kapatıldı.

4. Odaklama tablası Protean IEF hücresine yerleştirildi.



**Şekil III.5** Protean IEF hücresi

5. Protean IEF hücresinde odaklama işlemi 6 basamakta Tablo III.2’de verildiği şekilde yapıldı.

6. Elektroforez tamamlandıktan sonra şeritler odaklama tablasından bir pens ile alındı ve temiz bir tablaya jel kısımları üste gelecek şekilde konuldu.

7. Tablanın kapağı kapatıldı ve üzeri streç film ile sarılarak -80 °C'de saklandı.

**Tablo III.2** İzoelektrik odaklama işlemi

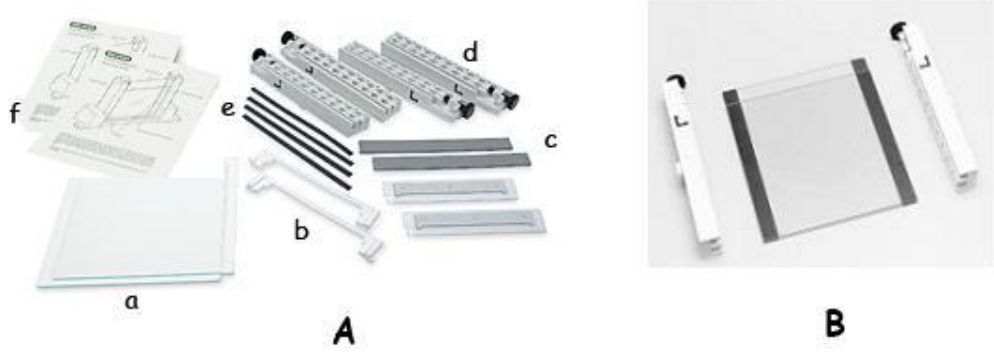
17 cm'lik şerit için	Voltaj	Mod	Zaman
1.Basamak	Rehidrasyon (20 °C)		13.5 saat
2.Basamak	150	Lineer	1 saat
3.Basamak	300	Lineer	1 saat
4.Basamak	1000	Lineer	1 saat
5.Basamak	5000	Hızlı	0.5 saat
6.Basamak	6000	Hızlı	6 saat
Toplam	-	-	23 saat (13.5 + 9.5)

### III.3.4.3. SDS-PAGE İşleminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **Agaroz Çözeltisi:** % 0.5 agaroz, 192 mM glisin, % 0.1 SDS, 25 mM Tris-baz ve eser miktarda brom fenol mavisi bir miktar destile suda çözüldükten sonra hacim 50 mL'ye tamamlandı, çözünmenin tamamlanması için kaynatıldı ve sonra 10 mL'lik hacimlere ayrılarak +4 °C'de saklandı.
- **Akrilamid/ Bisakrilamid çözeltisi:** 29.2 g akrilamid ve 0.9 g bisakrilamid destile su içinde çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.
- **1.5 M Tris-HCl çözeltisi (pH 8.8):** 18.15 g Tris-baz tartıldı ve bir miktar destile suda çözüldükten sonra pH'sı 6 N HCl ile 8.8'e ayarlandı, son hacmi 100 mL'ye tamamlanarak +4 °C'de saklandı.
- **Sodyum Dodesilsülfat (SDS, % 10, w/v):** 10 g SDS tartıldı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- **PAGE Tamponu:** 15 g Tris-baz, 75 g glisin ve 5 g SDS bir miktar destile suda çözüldükten sonra hacmi 5 L'ye tamamlandı. Bu tampon her elektroforez işleminden önce taze olarak hazırlandı.
- **Dengeleme tamponu (6 M üre, %2 SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, % 20 gliserol):** 9.08 g Tris-baz 35 mL destile suda çözüldü ve pH'sı 6 N HCl ile 8.8'e ayarlandı. 36.03 g üre, 2 g SDS tartıldı ve hazırlanan Tris çözeltisinde çözüldü. Çözeltiye 20 mL gliserol ilave edildi ve son hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

- **Amonyum Peroksidosülfat (APS, %10 w/v):** Her jel için taze olarak hazırlandı. 10 g APS alınarak destile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- **n-bütanol:su (20:1) karışımı:** 20 mL n-bütanol çözeltisi, 1 mL destile su ile karıştırılarak hazırlandı.

#### III.3.4.4. Jel Kasetlerinin Hazırlanması ve Jelin Dökülmesi



**Şekil III.6** 2D-PAGE için gerekli parçalar ve jel kaseti.

A- İki boyutlu jel elektroforezi için gerekli parçalar: a- cam plakalar, b- lastik şeritler, c- kauçuk şeritler, d- kışkaçlar, e- ara şeritler, f- hizalama kartları. B- Jel kasetinin organizasyonu

1. İçinde polimerleşmenin gerçekleşeceği kuru ve temiz cam plakalardan uzun olan (20 x 22.5 cm) plakanın her iki kenarına 0.8 cm eninde, 20 cm boyunda ve 1.5 mm kalınlığında ara şeritler konuldu.
2. Bunların üzerine kısa cam plaka (20 x 20 cm) yerleştirildi. Hizalama kartı iki cam plakanın arasına konuldu ve ara şeritler düzeltildi.
3. Cam plakalar, ara şeritlerin bulunduğu yerlerden kışkaçla tutturularak düzgünce birleştirildi ve böylece jelin döküleceği kaset hazırlandı.



**Şekil III.7** Döküm standı ve jel kaseti

4. Hizalama kartı aradan çıkarıldı ve cam plakalar ile ara şeritlerin aynı hizada olup olmadıkları kontrol edildi.
5. Döküm standı üzerinde bulunan vidalar açıldı.
6. Kasetin konulacağı bölmeye önce kauçuk şerit yerleştirildi, sonra üzerine hazırlanan kaset konuldu.
7. Döküm standının her iki tarafında bulunan vida ile kısıkaçlar tutturuldu.
8. Tablo III.3'e göre hazırlanan çözelti jel kasetinin içine döküldü, yüzey vakit kaybetmeden ~2 mL n-bütanol:su karışımı ile kaplandı, böylece jelin havadaki oksijenle temas etmesi önlenerek yüzeyin düzgün kalması sağlandı. Polimerleşme için bir saat kadar beklendi
9. Polimerleşmenin tamamlanmasının ardından n-bütanol:su karışımı dökülerek jel yüzeyi ~2 mL PAGE tamponu ile yıkandı.

**Tablo III.3** Jel kompozisyonu

55 mL % 12.5 'lik Jel Bileşimi	
Akrilamid/Bisakrilamid	22 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	13,75 mL
SDS % 10 (w/v)	550 µL
Destile su	18,50 mL
APS % 10 (w/v)	296 µL
TEMED	60 µL

#### III.3.4.5. IPG Jellerin Dengelenmesi

1. -80 °C'de saklanan örnek yüklenmiş IPG şeridinin mat beyaz rengi şeffaf olana ve şerit içerisinde bulunan üre çözünene kadar oda sıcaklığında bekletildi.
2. Daha sonra IPG şeridi üzerine dengeleme tamponu I'den (6 M üre, % 2 SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, % 20 gliserol, % 2 DTT(w/v)) 5 mL konuldu ve orbital karıştırıcıda 10 dakika çalkalanarak inkübe edildi.
3. 10 dakika sonunda IPG şeridinin üzerindeki dengeleme tamponu I döküldü ve şeridin üzerine dengeleme tamponu II'den (6 M üre, % 2 SDS, 0.375 M

Tris-HCl pH 8.8, % 20 gliserol, % 2.5 iyodoasetamid (w/v)) 5 mL konuldu ve orbital karıştırıcıda 10 dakika çalkalanarak inkübe edildi.

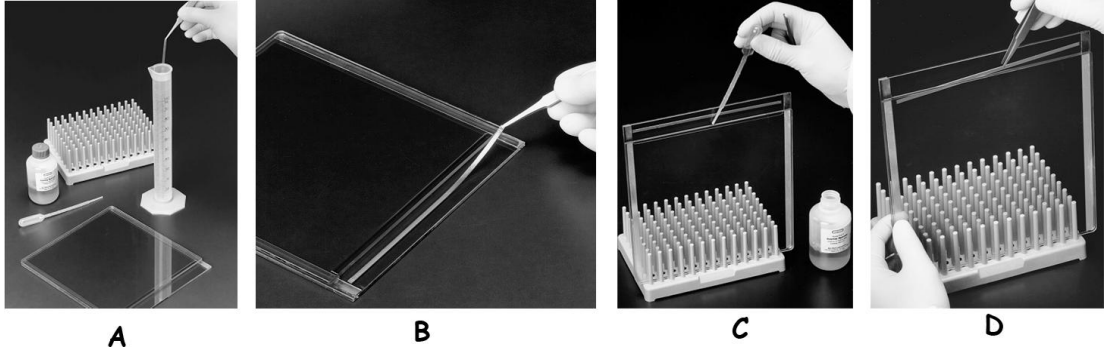
4. İşlem sonunda dengeleme tamponu II döküldü.

### III.3.4.6. SDS PAGE işlemi

1. 100 mL'lik bir mezüre PAGE tamponu konuldu.

2. IPG şeridi bir pensle tutulup mezür içindeki PAGE tamponuna birkaç defa batırılarak iyice ıslatıldı.

3. IPG şeridi, polimerleşmesi tamamlanmış jel kaseti üzerine yatay olarak ve şerit üzerindeki jel kısmı yukarı bakacak şekilde yerleştirildi. Polimer yüzey üzerine itilerek düzgünce yüzeye oturması sağlandı.



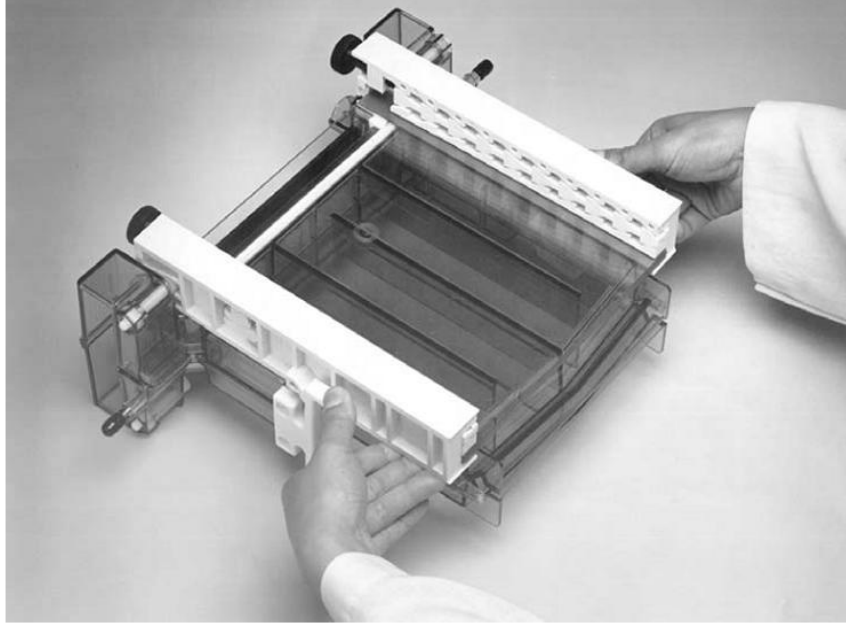
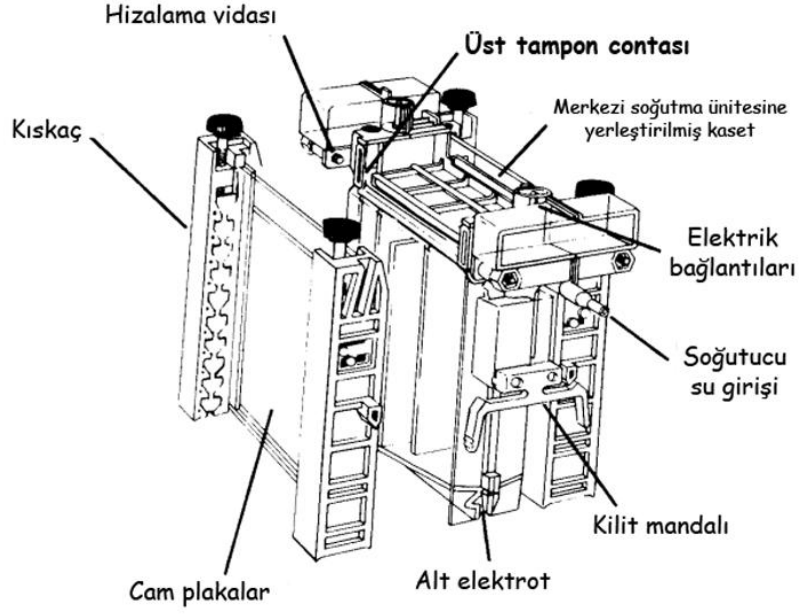
**Şekil III.8** Şeridin jel kasetine yerleştirilmesi

A- IPG şeridinin PAGE tamponu ile ıslatılması, B- IPG şeridinin kaset üzerine yerleştirilmesi, C- Agaroz çözeltisinin eklenmesi, D- Şeridin poliakrilamid jel ile tamamen temasta olacak şekilde agaroz çözeltisi içine yerleştirilmesi.

4. Agaroz çözeltisi ısıtıcı üzerinde 80 °C sıcaklığa kadar ısıtıldı. Şeridin yerleştirilmesinin ardından, kasete 2 mL sıcak agaroz çözeltisi konuldu ve agaroz çözeltisinin donması beklendi.

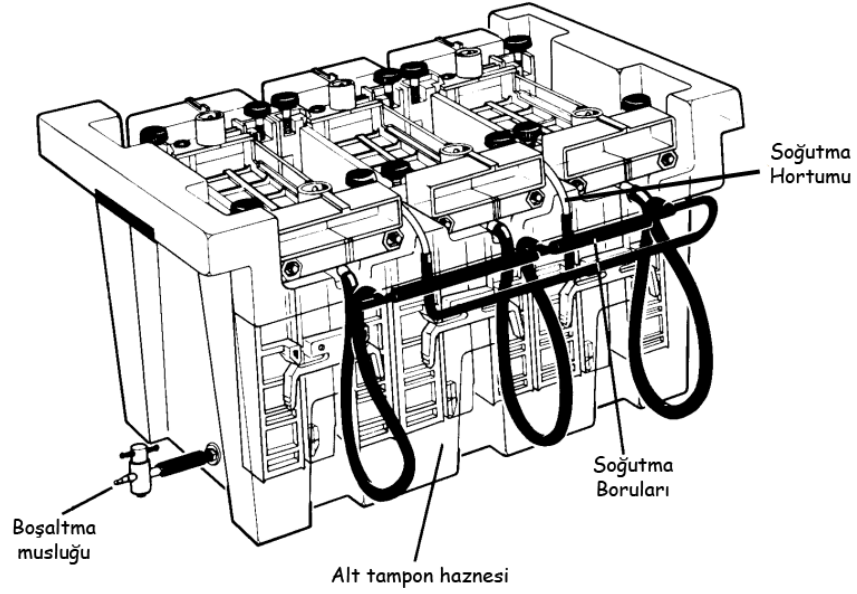
5. Merkezi soğutma ünitesinin her iki tarafının üst kısmında bulunan kısma lastik şeritler PAGE tamponunda ıslatıldıktan sonra iyice oturtuldu.

6. Agarozun donmasının ardından jel kaseti merkezi soğutma ünitesine takıldı.



**Şekil III.9** Merkezi soğutma ünitesinin bileşenleri ve jel kasetinin merkezi soğutma ünitesine yerleştirilmesi.

7. Bu işlemler çalışılacak olan her poliakrilamit jel için tekrarlandı.
8. Jel başına ilk yarım saat 20 mA ve sonrasında 30 mA akım verilerek örneğin ikinci boyutta yürümesi sağlandı. İşlem yaklaşık 4.5 - 5.5 saat sürdü.



Şekil III.10 SDS PAGE'in gerçekleştirildiği Protean II xi Multi-cell elektroforez tankı

### III.3.5. Jellerin Kolloidal Coomassie ile Boyanması

Jeller, hassas kolloidal boyama yöntemine göre (Neuhoff ve ark., 1985; Neuhoff ve ark., 1988) CBB ile boyandı.

#### III.3.5.1. Kullanılan Çözeltiler

- **Stok Boya A Çözeltisi (% 10 amonyum sülfat, % 2 fosforik asit):** 100 g amonyum sülfat 800 mL destile su içerisinde çözüldü, üzerine 20 mL fosforik asit konularak son hacim olan 1 L'ye destile su ile tamamlandı.
- **Stok Boya B Çözeltisi (% 5 CBB G-250):** 5 g CBB G-250 destile suda çözüldü, son hacim olan 100 mL'ye destile su ile tamamlandı.

- **Boya Çözeltisi:** Her bir jel için 200 mL Stok Boya A, 5 mL Stok Boya B ve 50 mL metanol karıştırılarak hazırlandı.
- **Fiksasyon Çözeltisi (% 20 amonyum sülfat):** 200 g amonyum sülfat destile su içerisinde çözüldü, son hacim olan 1 L'ye destile su ile tamamlandı.
- **Nötralizasyon Çözeltisi (0.1 M Tris, pH: 6.5):** 12,114 g Tris-baz destile su içerisinde çözüldü, pH'sı fosforik asit ile 6.5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra son hacim olan 1 L'ye destile su ile tamamlandı.

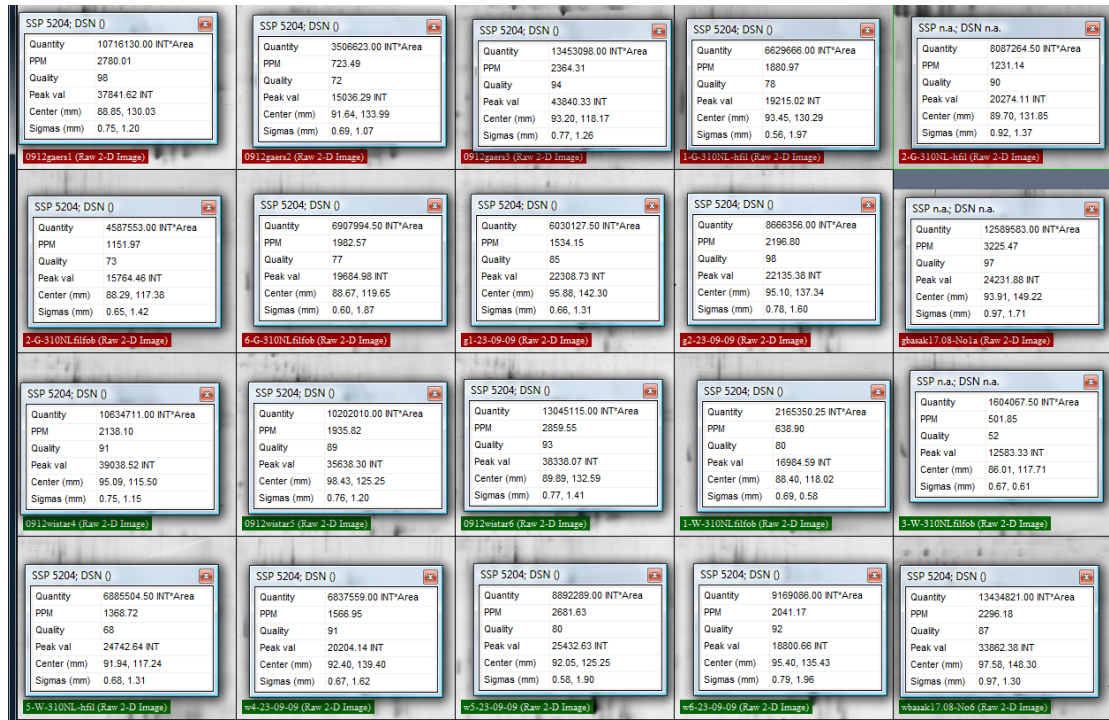
### III.3.5.2. Boyama İşlemi

1. Elektroforez işleminin sonunda jel kasetleri çıkarıldı.
2. Cam plakaları tutan kaskaçlar açıldı ve iki cam plaka arasındaki ara şeritler çıkarıldı.
3. Cam plakalar yıkandıktan sonra plastik bir spatula yardımı ile iki cam plakanın birbirinden ayrılması sağlandı.
4. Poliakrilamit jel, dikkatlice cam plakanın üzerinden alındı.
5. İçerisinde destile su bulunan saklama kabına konulan jel yıkandı.
6. Yıkama sonunda destile su döküldü, jel üzerine boya çözeltisi konuldu. Jel orbital karıştırıcı üzerinde bir gece boya çözeltisinde bekletildi.
7. Ertesi gün boya çözeltisi boşaltıldı, jel üzerine önce nötralizasyon çözeltisi konularak 3 dk orbital karıştırıcıda bekletildi. Süre sonunda nötralizasyon çözeltisi döküldü, jel ~50 s % 25 metanol çözeltisi içinde tutuldu. Süre sonunda metanol çözeltisi döküldü. Jel üzerine fiksasyon çözeltisi konuldu, bir gece fiksasyon çözeltisinde orbital karıştırıcı üzerinde bekletildi.
8. Ertesi gün fiksasyon çözeltisi döküldü ve jelin üzerine tekrar boya çözeltisi konularak, boyama, nötralizasyon, metanol ve fiksasyon adımları tekrarlandı.
9. Jel görüntüleri kurutma işlemi uygulanmadan "GE Healthcare UK, ImageScanner III" cihazı kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı.
10. Görüntülerinin alınmasının ardından jeller kilitli poşetlerde ve fiksasyon çözeltisi içerisinde +4 °C'de saklandı.

### III.3.6. Jel Görüntülerinin Bilgisayar Destekli Analizi

Jel görüntülerinin aktarılmasının ardından kontrol ve GAERS grubu kendi aralarında karşılaştırıldı ve her bir grubu temsil edecek özellikteki jeller seçildi. En uygun özellikteki bu jellerden elde edilen gruplar (n=5) PDQuest 8.0.1 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

Uygun parametreler girilerek önce otomatik jel taraması ile gruplar karşılaştırıldı ve farklılık gösteren spotlar belirlendi. Daha sonra bu işlem manuel olarak gerçekleştirildi. Bu incelemede jelden belirli bir bölge seçilerek bu bölgede mevcut spotların optik yoğunlukları kontrol ve GAERS grubunda karşılaştırıldı. Şekil III.12’de manuel olarak seçilmiş örnek bir spot için karşılaştırılan yoğunluk değerleri verilmiştir.



Şekil III.11 İki boyutlu jel analiz yazılımı ile kontrol ve GAERS gruplarına (n=5) ait jellerin karşılaştırılarak farklılaşan spotların bulunması

İstatistiksel çalışmada, iki-kuyruklu t-testi uygulandı. Kontrol ve GAERS grubunda seçilen spotların yoğunlukları ayrı ayrı her jel için girilerek, istatistiksel olarak anlamlı olan ve yoğunlukları en az 1.5 kat farklılık gösteren protein spotları incelenmek üzere seçildi.

### III.3.7. MALDI-Tof Analizi

Kütle spektrometresi ile proteinlerin tanımlanması işlemi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü bünyesinde bulunan kütle tayini cihazı kullanılarak protokole (Kinter ve Sherman, 2000) uygun olarak gerçekleştirildi. Bu protokol SDS-PAGE jellerinde spot ya da bant halinde bulunan proteinlerin tripsin ile parçalanmasını içermektedir. Bu işlem 1 ve 2 boyutlu elektroforez işlemleri sonucunda elde edilen bant ya da spotlar için uygulanabilmektedir.

#### III.3.7.1. Örnek Hazırlığı İçin Kullanılan Çözeltiler

Kullanılan tüm çözeltiler taze olarak hazırlandı. Çözeltilerin hazırlanmasında nano saflıkta su kullandı. Tripsin enzimi olarak otolizizi önlemek ve nontriptik proteaz aktivitelerini en aza indirmek amacıyla modifiye edilmiş, sekans-saflığında tripsin kullanıldı. Denemede gerekli olan ependorflar kullanılmadan önce etanolle yıkandı ve açık havada kurutuldu.

- Yıkama çözeltisi: 5 mL metanol, 2.5 mL suya ilave edildi. 500 µL asetik asit eklendikten sonra toplam hacim su ile 10 mL'ye tamamlandı. Son konsantrasyon % 50 metanol ve % 5 asetik asit içermektedir.
- 100 mM amonyum bikarbonat: 0.7906 g amonyum bikarbonat tartıldı ve bir miktar suda çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM amonyum bikarbonat: 0.3953 g amonyum bikarbonat tartıldı ve bir miktar suda çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 10 mM DTT: 1.5 mg ditiyotiretiol ependorfa tartıldı. Üzerine 1 mL 100 mM amonyum bikarbonat çözeltisi konuldu, vortekslendi.
- 100 mM iyodoasetamid: 18 mg iyodoasetamid ependorfa tartıldı. Üzerine 1 mL 100 mM amonyum bikarbonat çözeltisi konuldu, vortekslendi.
- 20 µg/mL tripsin çözeltisi: 20 µg modifiye tripsin tartıldı ve üzerine 1 mL, 50 mM soğuk amonyum bikarbonat çözeltisi eklendi. Otomatik pipet yardımıyla çözelti çekilip bırakılarak tripsinin iyice çözünmesi sağlandı. Kullanım anına kadar buz üzerinde bekletildi.
- Ekstraksiyon çözeltisi: 50 mL asetonitril, 25 mL suya eklendi. Üzerine 5 mL formik asit ilave edilerek toplam hacim su ile 100 mL'ye tamamlandı. Son konsantrasyon %50 (v/v) asetonitril ve %5 (v/v) formik asit içermektedir.

### III.3.7.2. Parçalama işlemi

Protokolde verilen hacimler 2-4 mm çapında, 1 mm kalınlığında ve toplam hacimleri 20 µL'nin altında olan spotlar için uygundur. Daha büyük spotlar için bu spotlar ile orantılı hacimler kullanılmıştır.

1. İstenilen protein spotları mümkün olduğunca spotlara yakın noktalardan lansetle kesilerek jelden çıkartıldı ve 1-2 mm<sup>3</sup>'lük küçük parçalara ayrılarak 1.5 mL'lik ependorf tüplere konuldu.
2. Ependorflara 200 µL yıkama çözeltisi ilave edildi ve oda sıcaklığında 4 saat çalkalanarak yıkandı.
3. Yıkama çözeltisi, otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve atıldı.
4. Tekrar 200 µL yıkama çözeltisi ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 - 3 saat çalkalanarak yıkandı.
5. Yıkama çözeltisi, otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve atıldı.
6. Tüplere 200 µL asetonitril konuldu ve jel kesitleri 5 dk oda sıcaklığında dehidrate edildi. Jellerin beyaz opak bir görünüm almasından ve hacimlerinin küçülmesinden dehidrate olduğu anlaşıldı.
7. Asetonitril, otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve atıldı.
8. Jel kesitleri ortam sıcaklığındaki vakum santrifüjünde 2 - 3 dk tamamen kurutuldu.
9. Tüplere 30 µL 10 mM DTT eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında bekletilerek proteinlerin indirgenmesi sağlandı.
10. DTT, otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve atıldı.
11. Tüplere 30 µL 10 mM iyodoasetamid eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında bekletilerek proteinlerin alkilenmesi sağlandı.
12. İyodoasetamid, otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve atıldı.
13. Tüplere 200 µL asetonitril konuldu ve jel kesitleri 5 dk oda sıcaklığında dehidrate edildi.
14. Asetonitril, otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve atıldı.
15. Jel kesitleri 200 µL, 100 mM amonyum bikarbonat içerisinde oda sıcaklığında 10 dk boyunca rehidrate edildi.
16. Amonyum bikarbonat, otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve atıldı.
17. Tüplere 200 µL asetonitril konuldu ve jel kesitleri 5 dk oda sıcaklığında dehidrate edildi.
18. Asetonitril, otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve atıldı.

19. Jel kesitleri ortam sıcaklığındaki vakum santrifüjünde 2 - 3 dk tamamen kurutuldu.
20. Tüplere 30 µL tripsin çözeltisi ilave edilerek 10 dk boyunca buz üzerinde rehidrate olmaları sağlandı. Tüpler 2 dakikada bir vortekslenerek karıştırıldı.
21. Tüpler 30 s santrifüj edilerek jel kesitlerinin dibine yerleşmesi sağlandı. Kalan tripsin çözeltisi otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve atıldı.
22. Tüplere 5 µL 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi ilave edildi ve tüpler vortekslendi. 30 s santrifüj edilerek jel kesitlerinin dibine yerleşmesi sağlandı ve 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılarak parçalama işlemi tamamlandı.

### III.3.7.3. Ekstraksiyon İşlemi

Parçalama sonucunda elde edilen peptidler aşağıda yer alan prosedür izelenerek ekstrakte edildi.

1. Tüplere 30 µL 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi ilave edildi ve tüpler 2 dakikada bir yavaşça vortekslenerek 10 dk boyunca inkübe edildi. 30 s santrifüj edilerek parçalama ürünlerinin dibine yerleşmesi sağlandı. Süpernatant, otomatik pipet yardımıyla dikkatlice toplandı ve 500 µL'lik ependorflara aktarıldı.
2. Jel kesitlerinin olduğu tüplere 30 µL ekstraksiyon çözeltisi konuldu ve tüpler 2 dakikada bir yavaşça vortekslenerek 10 dk boyunca inkübe edildi. 30 s santrifüj edilerek ekstraktların dibine yerleşmesi sağlandı. Süpernatant, otomatik pipet yardımıyla dikkatlice toplandı ve bir önceki basamakta elde edilen süpernatantlar ile birleştirildi.
3. Önceki adım tekrarlanarak, süpernatantlar birleştirildi.
4. Ekstrakt, ortam sıcaklığındaki vakum santrifüjünde evapore edilerek hacmi 20 µL'nin altına düşürüldü.
5. Parçalama ürününün hacmi % 1'lik asetik asit çözeltisi ile 20 µL'ye tamamlandı. Elde edilen çözeltiler doğrudan kütle analizi için kullanıldı.

### III.3.7.4. Örneklerin Uygulanması

Analiz işlemlerinin yapıldığı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü tarafından "İki tabakalı örnek hazırlama metodu" uygulandı. Uygulanan prosedüre göre; analizde α-siyano-4-hidroksisinamik asit (CHCA) matris olarak kullanıldı. İlk matris tabakası

için, 5 mg CHCA 100 µL metanolde çözüldü, üzerine 400 µL aseton eklendi ve tamamı çözüldü. Bu ilk matris tabakası, MALDI cihazının hedefi üzerine tatbik edildi. İkinci matris tabakası için, 5 mg CHCA 200 µL metanolde çözüldü, üzerine % 0.1 trifloroasetik asit içeren 300 µL su eklendi. Örnek ve ikinci matris tabakası 1:1 oranında karıştırıldı. Bu karışımdan alınan 1 µL hedef üzerinde yer alan birinci matris tabakası üzerine uygulandı ve ortam sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kurumanın ardından her bir örnek analiz edildi. Sistemin kalibrasyonu, peptit kalibrasyon standardı ile yapıldı.



Şekil III.12 Applied Biosystems 4800 MALDI TOF/TOF sistemi

Kütle analizi, Applied Biosystems 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz sonucunda elde edilen veriler Şekil III.13’de gösterildiği gibi [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com) adresinde, MASCOT veritabanında tarandı.

Matrix Science - Mascot - P x

www.matrixscience.com/cgi/search\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF

**MATRIX SCIENCE** HOME | WHAT'S NEW | MASCOT | HELP

Mascot > Peptide Mass Fingerprint

## MASCOT Peptide Mass Fingerprint

**Your name** Başak Yüce-Dursun **Email** basak.yuce@marmara.edu.tr

**Search title** örnek-1

**Database(s)** SwissProt  
 NCBI nr  
 contaminant  
 cRAP  
 MSDB

**Enzyme** Trypsin

**Allow up to** 1 missed cleavages

**Taxonomy** Rattus

**Fixed modifications** --- none selected

**Variable modifications** --- none selected

Display all modifications

Acetyl (K)  
 Acetyl (N-term)  
 Acetyl (Protein N-term)  
 Amidated (C-term)  
 Amidated (Protein C-term)  
 Ammonia-loss (N-term C)  
 Biotin (K)  
 Biotin (N-term)  
 Carbamidomethyl (C)  
 Carbamyl (K)  
 Carbamyl (N-term)

**Protein mass** kDa **Peptide tol. ±** 1.2 Da

**Mass values**  MH<sup>+</sup>  M<sub>r</sub>  M-H<sup>-</sup> **Monoisotopic**   Average

**Data file** Dosya Seg Dosya seğılmedi

**Query** 854.94  
 NB Contents of this field are ignored if a data file is specified.  
 1060.00  
 1384.60  
 2331.15  
 2692.00  
 3350.40

**Decoy**  **Report top** AUTO hits

**Start Search ...** **Reset Form**

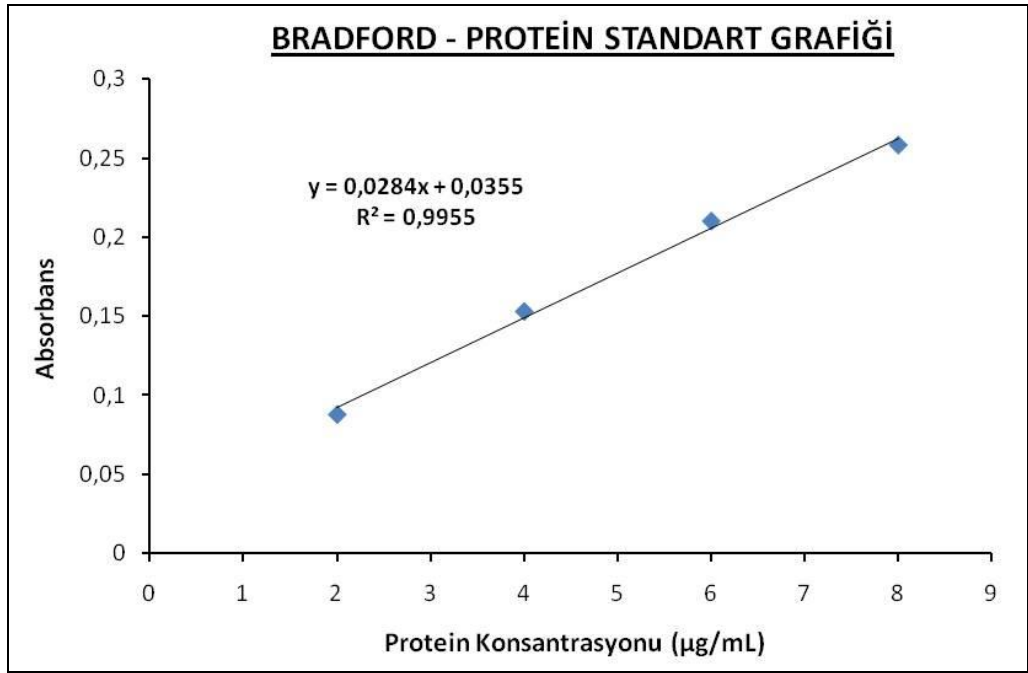
Şekil III.13 MALDI analiz sonuçlarının internette taranması.

## BÖLÜM IV

### SONUÇLAR ve TARTIŞMA

#### IV.1. ÖRNEK HAZIRLAMA ve PROTEİN MİKTARLARI

GAERS (hastalıklı) ve Wistar (kontrol) sıçanlarına ait beyin dokularının korteks bölgelerine ait proteinler Bölüm III.3.1’de anlatıldığı şekilde çözeltiyeye alındı. Bölüm III.3.2’de verilen Bradford yöntemine göre protein (ovalbümin) standart grafiği hazırlandı. Şekil IV.1’deki doğru denklemi kullanılarak hesaplanan, GAERS ve kontrol grubu korteks bölgelerine ait yaklaşık protein miktarları Tablo IV.1’de verildi.



Şekil IV.1 Bradford – protein standart grafiği

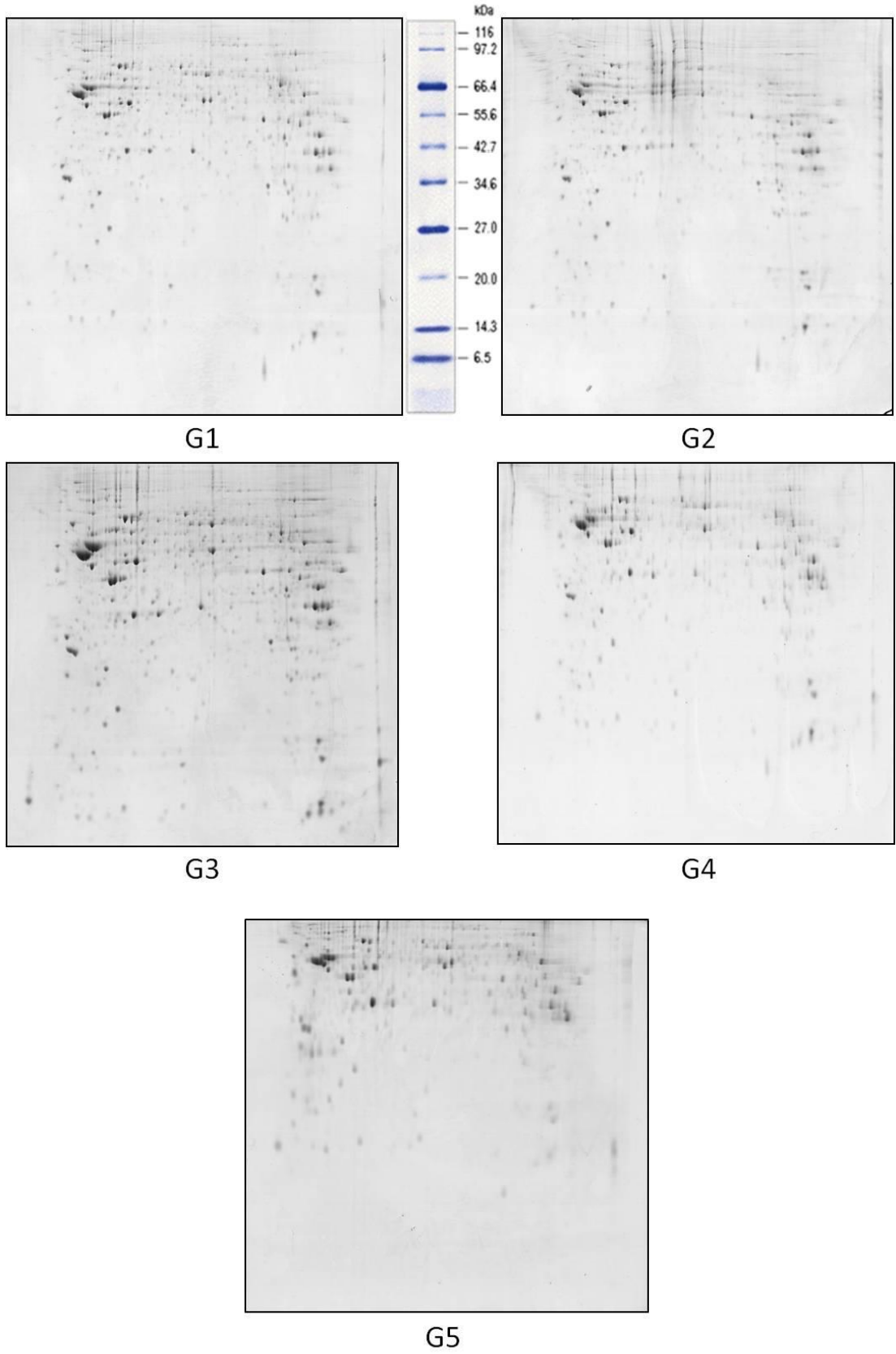
**Tablo IV.1** GAERS ve kontrol grubu hayvanların beyin korteks bölgelerinden elde edilen protein miktarları

GAERS ♂ Grubu Korteks	6 aylık, 286 g	6 aylık, 240 g	6 aylık, 266 g	6 aylık, 280 g	5 aylık, 245 g
	7.97 mg/mL	6.0 mg/mL	6.4 mg/mL	6.4 mg/mL	6.44 mg/L
Wistar ♂ Grubu Korteks	5 aylık, 300 g	4 aylık, 240 g	4 aylık, 280 g	4 aylık, 270 g	8 aylık, 380 g
	8.1 mg/mL	5.8 mg/mL	5.7 mg/mL	6.0 mg/mL	5.91 mg/mL

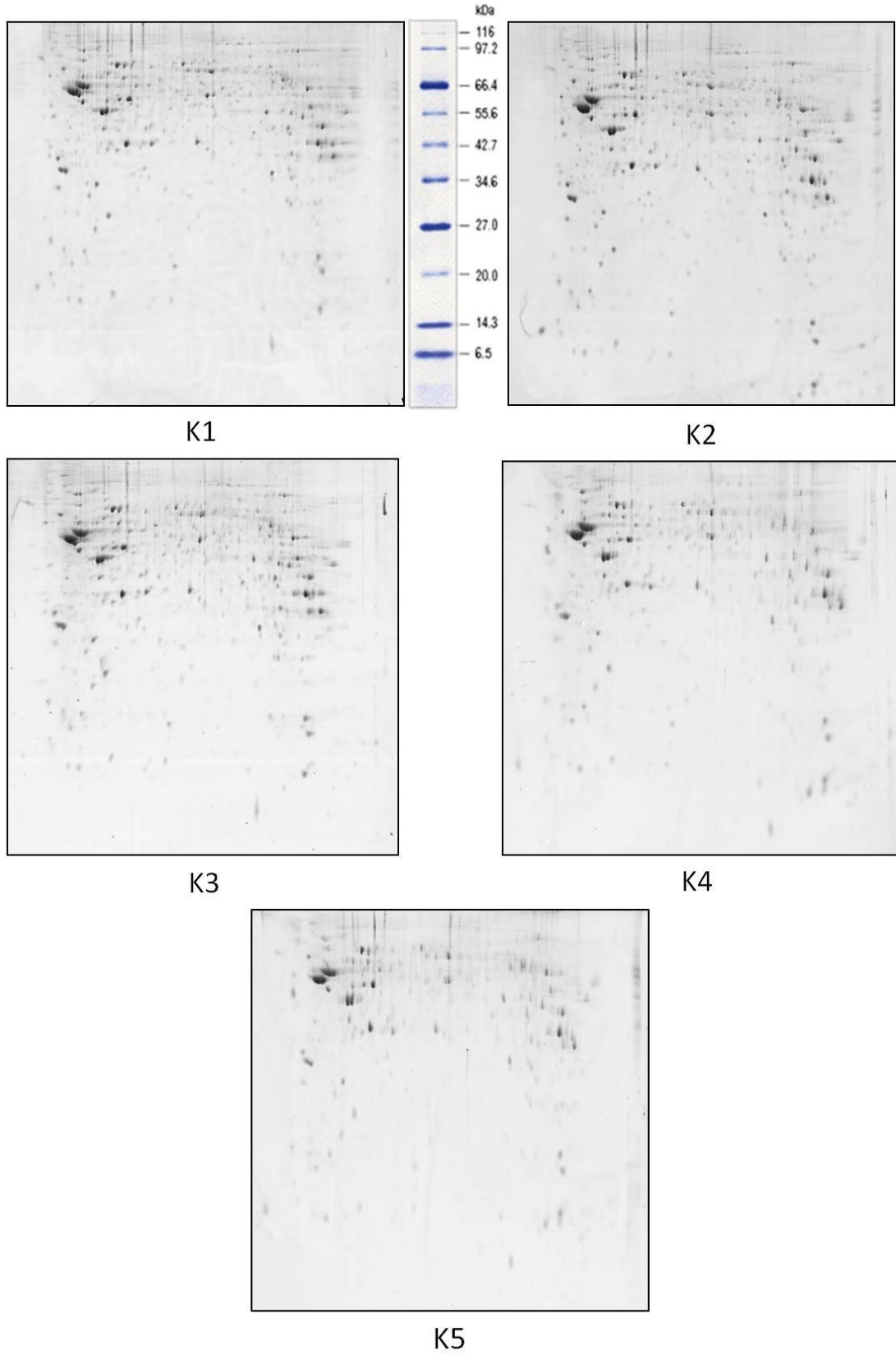
#### IV.2. 2D-PAGE SONUÇLARI

Bölüm III.3.3’de anlatıldığı şekilde örnekler uygulanan arındırma işleminin ardından, III.3.4’de anlatıldığı şekilde 2D-PAGE işlemi yapıldı. Bölüm III.3.5’de verilen modifiye koloidal CBB boyama yöntemine göre jeller boyandı. Tekrarlanabilir sonuçlar elde edebilmek için “Kontrol” ve “GAERS” grubu örnekler ile 2D-PAGE işlemi sürekli çalışıldı.

Çalışmada kullanılan GAERS (n=5) ve Kontrol Wistar (n=5) grubu korteks bölgelerine ait 2D-PAGE sonuçları Şekil IV.2 ve Şekil IV.3’de verildi.



Şekil IV.2 GAERS grubu korteks bölgelerine ait 2D-PAGE sonuçları



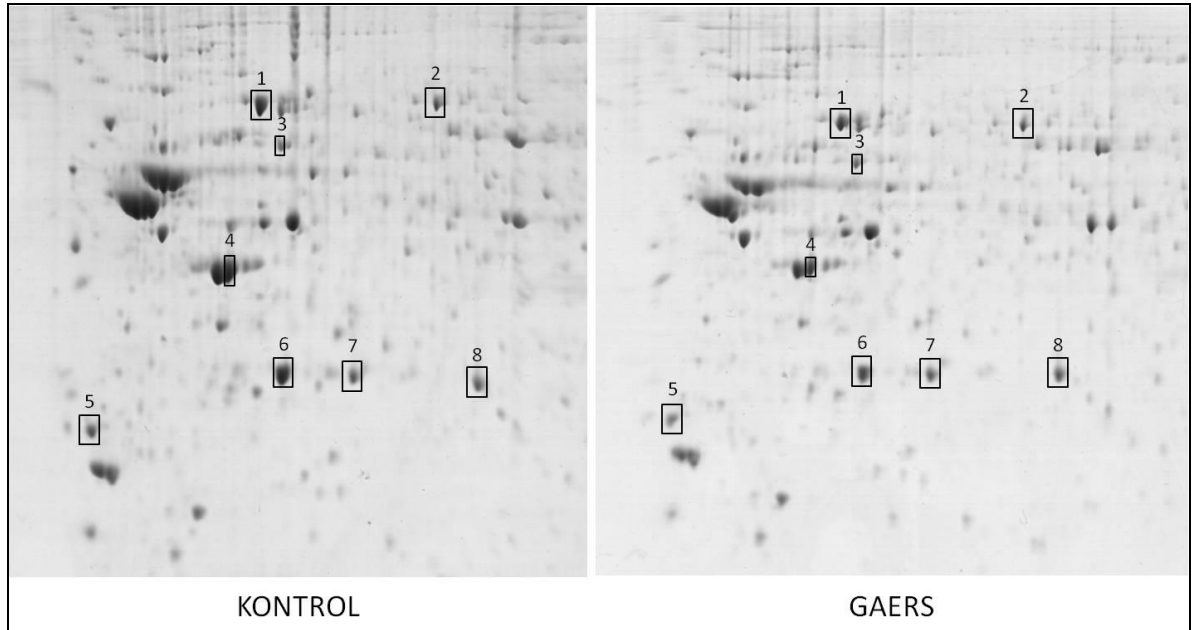
Şekil IV.3 Kontrol Wistar grubu korteks bölgelerine ait 2D-PAGE sonuçları

### IV.3. 2D-PAGE ANALİZ SONUÇLARI

2D-PAGE sonunda elde edilen jeller Bio-Rad firmasının PDQuest 8.01 iki boyutlu jel analiz yazılımının deneme sürümü kullanılarak hem otomatik hem de manuel olarak Bölüm III.3.6’da anlatıldığı şekilde incelendi. İnceleme sonunda kendi içlerinde uyumlu oldukları ve dolayısı ile tekrarlanabilir sonuçların elde edildiği tespit edildi.

Kolloidal CBB ile boyanan jeller PDQuest yazılımı içindeki renk seçeneklerinden biri olan gri formatında kaydedildi. Bu şekilde kaydedilen jeller üzerinde protein spot analizi yapıldı. Korteks bölgesi protein spotlarındaki farklılıklar Şekil IV.4’ de verildi.

Farklılaşan protein lekeleri 1’den 8’e kadar numaralar verilerek adlandırıldı. Mevcut farklılıklar incelenerek kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, GAERS grubunda ekspresyonları istatistiksel olarak artmış ( $p<0.001$ ) 3 protein lekesi ve GAERS grubunda ekspresyonları istatistiksel olarak azalmış ( $p<0.001$ ) 5 protein lekesi belirlendi.



**Şekil IV.4** Kontrol ve GAERS gruplarının beyin korteks bölgesine ait 2D-PAGE jellerinin karşılaştırılması; Farklılaşan protein lekeleri 1,2-8 olarak adlandırılmıştır.

İstatistiksel çalışma için iki-kuyruklu t-testi uygulandı. Kontrol ve GAERS grubuna ait, tarama yapılan tüm jellerden seçilen spotların yoğunlukları, birbirleriyle karşılaştırıldı. Grup içi ortalama değerler, standart hata ve sapmalar ile yoğunluklar arasındaki değişim miktarı Tablo IV.2’de verildi. İstatistiksel analiz sonucunda

p<0.001 bulundu Bu da, kontrol grubuna göre olan ekspresyon seviyesindeki değişimlerin (artma/azalma) anlamlı olduğunu gösterdi.

**Tablo IV.2** GAERS ve kontrol grubu hayvanlarına ait protein spotlarının istatistiksel analiz sonuçları (p değeri, GAERS ve kontrol gruplarına ait spot yoğunluklarının birbirleriyle karşılaştırılmaları sonucu ortaya çıkan anlamlılıkları ifade etmektedir.)

	Grup	Ortalama Pik Değeri	Standart Hata (SH)	Standart Sapma (SS)	Değişim Oranı	p değeri
1	GAERS	42472	2644	5912	- 1,74 kat	< 0,0001
	Kontrol	73885	2439	5454	-	< 0,0001
2	GAERS	44493	2593	6352	+ 2,06 kat	< 0,0001
	Kontrol	21550	1447	3545	-	< 0,0001
3	GAERS	21398	1189	2659	- 1,58 kat	< 0,0001
	Kontrol	33962	856	1915	-	< 0,0001
4	GAERS	39082	677	1514	- 1,49 kat	< 0,001
	Kontrol	57996	2114	4727	-	< 0,001
5	GAERS	30770	2632	5886	+ 1,69 kat	< 0,001
	Kontrol	18181	1357	3035	-	< 0,001
6	GAERS	28987	1642	3672	- 1,81 kat	< 0,0001
	Kontrol	52507	3423	7654	-	< 0,0001
7	GAERS	33116	3637	8132	+ 1,60 kat	< 0,0001
	Kontrol	20675	870	1946	-	< 0,0001
8	GAERS	17995	1079	2412	- 1,92 kat	< 0,0001
	Kontrol	34462	2442	5460	-	< 0,0001

#### IV.4. MALDI TOF/TOF SONUÇLARI

GAERS ve kontrol gruplarına ait 2D-PAGE sonuçları PDQuest iki boyutlu jel analiz yazılımı ile incelendikten sonra Şekil IV.4’de gösterilen protein spotları kesildi. Bölüm III.3.7’de anlatıldığı gibi örnekler kütle spektrometre analizi için hazırlandı. MALDI TOF/TOF cihazı kullanılarak protein örneklerinin analizi yapıldı.

Bu proteinlerin tanımlanabilmeleri için ham kütle verileri kullanılarak [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com) adresindeki Mascot arama motoru kullanılarak araştırma yapıldı. Tanımlanan proteinlere ait veriler Tablo IV.3’de gösterildi.

Tabloda yer alan protein skoru ifadesi, kütle parmak izi analizlerinde Mascot arama motoru tarafından, spektral kütle pikleriyle eşleşen her bir protein için hesaplanır. Protein skoru, Mascot için anlamlı olduğunda, güven aralığı % 95’in üzerinde olur. Güven aralığı yüzdesi, protein skorunun güven düzeyini temsil eder. Aramadan elde edilen skor, Mascot için eş anlam düzeyindeyse, % 95 güven aralığı anlamına gelir. En güvenilir sonuçların eldesi için bu aralığın % 99’un üzerinde

olması gerekmektedir. Güven aralığı % 100 olduğunda, proteinin tamamen doğru bir şekilde tanımlandığı anlamına gelir.

**Tablo IV.3** Ekspresyonu farklılaşmış olan proteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları.

	<b>Protein</b>	<b>Erişim Numarası (NCBI)</b>	<b>Protein Skoru</b>	<b>Güven Aralığı (%)</b>	<b>Kütle Analizi Alan Örtüşmesi (%)</b>
<b>1</b>	<i>Isı-şok kognat 71 kDa protein</i>	gi 51702273	391.00	100	57.24
<b>2</b>	<i>Albumin</i>	gi 55391508	340.00	100	52.67
<b>3</b>	<i>Isı-şok protein 60 kDa, mitokondriyal</i>	gi 206597443	383.00	100	35.97
<b>4</b>	<i>aktin, sitoplazmik 1</i>	gi 13592133	364.00	100	51.60
<b>5</b>	<i>14-3-3 protein epsilon izoformu</i>	gi 1469948	81.40	99.66	19.12
<b>6</b>	<i>Guanin nükleotid-bağlayıcı protein G(I)/G(S)/G(T) altünite beta-1</i>	gi 148747524	110.00	100	11.59
<b>7</b>	<i>L-Laktat dehidrojenaz B zinciri</i>	gi 6981146	213	100	27.12
<b>8</b>	<i>Malat dehidrojenaz, sitoplazmik</i>	gi 15100179	207	100	33.42

**Tablo IV.4** Ekspresyonu farklılaşmış olan proteinlerin bazı özellikleri.

	<b>Protein</b>	<b>Taksonomi</b>	<b>Fonksiyonel Kategorisi</b>	<b>Subselüler Lokalizasyonu</b>	<b>GAERS Grubunda Değişimi</b>
1	<i>Isı-şok kognat 71 kDa protein</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Alıcı Bağlama, Stres Yanıtı	Sitozol, Lizozom, Çekirdek, Sitoiskelet	↓
2	<i>Albümin</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Metabolizma	Endoplazmik retikulum, Golgi cisimciği	↑
3	<i>Isı-şok protein 60 kDa, mitokondriyal</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Mitokondriyal Protein Katlanması, Stres Yanıtı	Mitokondri	↓
4	<i>aktin, sitoplazmik 1</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Yapısal	Sitoiskelet	↓
5	<i>14-3-3 protein epsilon izoformu</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Sinyalizasyon	Sitozol, Çekirdek	↑
6	<i>Guanin nükleotid-bağlayıcı protein G(I)/G(S)/G(T) altünite beta-1</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Metabolizma Düzenleyici	Sitozol, Çekirdek, Endoplazmik retikulum	↓
7	<i>L-Laktat dehidrojenaz B zinciri</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Metabolizma Düzenleyici	Sitozol, Mitokondri, Endoplazmik retikulum	↑
8	<i>Malat dehidrojenaz, sitoplazmik</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Metabolizma Düzenleyici	Sitozol, Mitokondri, Peroksizom, Endoplazmik retikulum	↓

#### IV.5. TARTIŞMA

Beyin ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalara bakıldığında çeşitli bilimsel ve etik sorunlarla karşılaşıldığı görülmektedir. Sağlıklı bireylerin beyin dokularından örnek alınması mümkün olmadığından insan beyni üzerinde yapılan proteomik çalışmaları ya çeşitli beyin operasyonları geçirmiş hastalardan alınan dokularda (beyin tümörü veya cerrahi müdahale gibi) ya da ölüm sonrası alınan beyin dokularında gerçekleştirilebilir. Ancak böyle durumlarda doku alınan insanın başka hastalığının olup olmadığı, yaşı, cinsiyeti, uyruğu gibi özelliklerin çalışmada kullanılan hastalıklı grupla uyumlu olması gerekmektedir (Yang ve ark., 2005). Bu sebeplerden dolayı

deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Aynı genetik yapıya sahip olsalar dahi, hayvanlarla yapılan çalışmalarda yaş ve cinsiyet de önemlidir. Çünkü aynı organizma yaşamının farklı dönemlerinde farklı protein profillerini eksprese edebilir. 13 aylık (genç) ve 31 aylık (yaşlı) sıçanların böbreği ile yapılan bir çalışmada incelenen 380 protein spotundan 167'sinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2004). Böyle bir farklılığın yaşanmaması için çalışmamızda aynı yaş grubu (4-6 aylık) erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Sıçanların bayıltılması, beyinlerinin çıkartılması ve beyin bölgelerinin ayrılması sırasında yaşanan gecikmeler, sonikasyon ve çözeltiye alma şartlarındaki hatalar sonuçların farklı çıkmasına sebep olabilmektedir (Tsuji ve ark., 1999). Çalışma sırasında bu noktalara çok dikkat edilmiş ve tüm çalışma boyunca aynı koşullar sağlanmıştır. Çalışmada elde edilen korteks bölgesi 2D elektroforez jel görüntüleri incelendiğinde, çok sayıda proteinin ayrılmış olması, jellerin çözünürlüğünün yüksek olması ve jelden jele protein profilindeki farklılıkların yok denecek kadar az olması nedeniyle protein çözünürleştirilmesi ve örnek hazırlığının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği söylenebilir. Ancak, proteomik çalışmalarda hidrofobikliği oldukça fazla olan membran proteinleri gibi proteinlerin iki boyutlu (2D) jeller üzerinde gösterilmelerinde sıkıntılar yaşanmaktadır. İntegral membran proteinleri gibi hidrofobik proteinlerin 2D elektroforezi ile ayırımı ise oldukça zordur. Mevcut tüm membran proteinleri jel üzerinde görünmemektedir. Bunun bilinen nedenleri, suda düşük çözünürlüğe sahip olmaları, agregat oluşturma eğilimleri ve sulu ortamda çökmeleridir. Ancak diğer önemli neden ise, pek çok membran proteininin bazik pI değerine sahip olmaları ve az sayıda kopya halinde bulunmalarındadır. Membran proteinlerinin 2D jel üzerinde kaybolmalarının bir diğer sebebi de, çözünür halde düzgün şekilde IPG şeride aktarılıp, odaklama adımı sorunsuz uygulandıktan sonra ikinci boyuta geçerken şeritten düzgün şekilde jele ayrılamamasıdır. Çözünürlüğü arttırmak için kullanılan tiyoüre ve zwitter-iyonik deterjanlar ile bu sorunlar ortadan kaldırılmaya çalışılsa da, tüm proteinleri gözlemlenmek yine de zordur (Görg ve ark., 2004).

Çalışmada iki boyutlu elektroforez sonunda elde edilen jeller PDQuest 8.0.1 iki boyutlu jel analiz yazılımı ile hem otomatik hem de manuel olarak incelenmiştir. İnceleme sonunda kendi içlerinde uyumlu oldukları ve dolayısı ile tekrarlanabilir sonuçların elde edildiği tespit edilmiştir. Her bir grup için 5 hayvandan alınan jel örnekleri PDQuest iki boyutlu jel analiz programı ile önce kendi aralarında

karşılaştırılmış ve grubu temsil eden jeller otomatik olarak belirlenerek protein profilleri diğer grup ile kıyaslanmıştır.

2D-jeller ile yapılan proteom çalışmaları güvenilir çalışmalardır. Ancak 2D-jellerde meydana gelen birtakım hatalar bu yöntemde de dezavantajlar oluşturmaktadır. Tüm proteinin IPG şerit tarafından emilememesi ya da zayıf ve belirgin spotlar arasındaki hacim farkı nedeniyle miktar belirlemesinin doğru yapılamaması bunlara örnektir (Fountoulakis, 2004). Bu sebeple, çalışmamızda bu aşamaya oldukça önem verilmiş ve uygulamalar çok dikkatli bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada genetik absans epilepsi özellikleri gösteren sıçanların beyin dokusu korteks bölgesinde 8 proteinin ekspresyonunda farklılıklar gözlemlenmiştir. Mascot arama motorunda 48 veya üzeri protein skorunun elde edilmesi proteinlerin tanımlanması veya çok yüksek homolojiye sahip olduğunun belirlenmesi anlamına gelmektedir ( $p < 0.05$ ). Çalışmamızda tüm proteinler için en az 81 ve üzeri Mowse skoru elde edilmiştir, böylece istatistiksel olarak anlamlı ve güvenilir sonuçlara ulaşılmıştır.

#### **IV.5.1. Ekspresyonunda Artış Görülen Proteinler**

##### **IV.5.1.1. Albümin**

Epileptik nöbetler kan-beyin bariyerini değiştirme özelliğine sahiptirler, poligenetik bir sıçan modeli olan WAG/Rij sıçanlarında kan-beyin bariyerinin geçirgenliğinin Wistar grubu sıçanlara göre daha fazla olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Coenen ve van Luijtelaar, 2003). 1989 yılında yapılan bir çalışmada bikukulin ile indüklenen epileptik nöbet sonrası incelenen sıçanların % 67'sinde serebral kortekste albümin düzeyinin 24 saat içerisinde arttığı, kontrol grubunda ise herhangi bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Sokrab ve ark., 1989). Yapılan bir başka çalışmada ise kainik asit enjekte edilen sıçanların beyin dokuları incelenmiş ve albümin düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu ( $>1.5$  kat) belirlenmiştir (Inagawa ve ark., 2004). Çalışmamızda ise, GAERS grubuna ait beyin korteks dokusunda, albümin ekspresyonunun 2.06 kat arttığı bulunmuştur. Bulduğumuz bu artış literatür ile uyum içerisindedir.

#### IV.5.1.2. 14-3-3 Proteini Epsilon İzofomu

14-3-3 proteini yüksek oranda korunmuş, pek çok organizmada ve dokuda eksprese edilen bir protein ailesidir. Memelilerde 7 farklı izofomu bulunmaktadır. Bu izoformlardan 5 tanesi ( $\beta, \epsilon, \gamma, \eta$  ve  $\zeta$ ) beyinde yüksek oranda eksprese edilir ve nöronal faaliyetlerle ilgilidir. Diğer iki tanesi ( $\tau$  ya da  $\theta$  ve  $\sigma$ ) T hücrelerde ve epitel hücrelerde eksprese edilirler (Aitken ve ark., 1992; Hermeking, 2003; Aitken, 2006). Son yıllarda 14-3-3 ailesinin memeli dokulardaki fizyolojik fonksiyonları ile ilgili çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Protein trafiği, iyon kanalları, sinaptik fonksiyon, hücre döngüsü kontrolü ve apoptozis gibi fonksiyonlar ile kanser, Alzheimer, Parkinson, Creutzfeldt-Jakob, şizofreni ve diğer bazı nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalık bu protein ailesi ile ilişkilendirilmektedir (Zha ve ark., 1996; Berg ve ark., 2003; Hermeking, 2003; Aitken, 2006; Martins-de-Souza ve ark., 2010; Danis ve ark., 2011). İnsan frontal korteksiyle yapılan bir çalışmada mitokondriyal fraksiyonda tanımlanmıştır (Lubec ve ark., 2003). 2002 yılında Rajan ve arkadaşları 14-3-3 proteininin iyon kanallarının membran lokalizasyonunda önemli rol oynadığını göstermiştir (Rajan ve ark., 2002). Genetik absans epileptik sıçanlarla yapılan önceki çalışmalar, beyin korteks bölgesinde voltaj-kapılı sodyum kanalları olan Nav1.1 ve Nav1.6 iyon kanallarının ekspresyonunun (Klein ve ark., 2004) ve hiperpolarizasyon-aktif katyon (HCN1) kanal ekspresyonunun (Nersesyan ve ark., 2004) arttığını göstermiştir. Genetik absans epileptik sıçanlarda, iyon kanallarının ekspresyonunun artması pariyetal kortekste 14-3-3 proteininin ekspresyonunun artmasının bir sonucudur. 14-3-3 protein ailesinin bir izofomu olan, 14-3-3 epsilon izofomu ilk kez 1994 yılında Roseboom tarafından tanımlanmıştır (Roseboom ve ark., 1994). 14-3-3 epsilon üzerinde yapılan çalışmalar, bu proteinin birtakım nörolojik bozukluklara işaret olduğunu bildirmektedir. Sinir sistemindeki öneminin yanı sıra, insülin ve Ras sinyalizasyonu gibi diğer bazı yollarda da görev aldığı bilinmektedir (Han ve ark., 2010). Alzheimer hastalarının ve Down sendromlu Alzheimer hastalarının beyin bölgelerinde yapılan iki ayrı çalışmada 14-3-3 gama ve epsilon izoformlarının kontrol grubuna göre artış gösterdiği bildirilmiştir (Fountoulakis ve ark., 1999). Anabilim dalımızda beyin pariyetal korteks dokusunda yapılan proteom çalışmasında, 14-3-3 proteini zeta izoformunun GAERS grubu sıçanlarda anlamlı ölçüde arttığı bulunmuştur (Danis ve ark., 2011). Bu çalışmada ise, GAERS grubuna ait beyin korteks dokusunda, 14-3-3 proteini epsilon izoformunun ekspresyonunun 1.69 kat arttığı bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuç,

literatürdeki çalışmalar ile uyumludur ve GAERS grubu sıçanlarda epsilon izoformu için bir ilktir.

#### **IV.5.1.3. L-Laktat Dehidrojenaz B Zinciri**

Laktat dehidrojenaz (LDH), NADH/NAD<sup>+</sup> bağımlı pirüvat laktat dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Tetramerik bir yapıda olan LDH, 5 ayrı izoformda bulunur. LDHA ve LDHB genleri tarafından kodlanan, kas (M, LDHA) ve kalp (H, LDHB) alt ünitelerinin farklı kombinasyonlarıyla bu izoformlar meydana gelir (Echigoya ve ark., 2009). İnsan frontal korteksiyle yapılan bir çalışmada mikrozomal ve sitozolik fraksiyonda tanımlanmıştır (Lubec ve ark., 2003). Aynı zamanda sinaptik aktiviteyle ilişkisi olduğu bilinmektedir (Dufour ve ark., 2003). Tümör varlığında, LDHB ekspresyonunun arttığı daha önceki çalışmalarda belirlenmiş, bu LDH artışının tümör hücreleri için yeterli anaerobik/glikolitik metabolizma sağladığı ve oksijene olan bağımlılığını azalttığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2006). Serebrospinal sıvıda artan LDH miktarı, çocuklarda görülen mitokondriyal bozuklukların bir işaretçisi olarak da bilinir. LDH seviyesinin ölçülmesi bu bozukluğun nereden kaynaklandığı hakkında bir fikir vermektedir. Yapılan çalışmalarda mitokondriyal bozukluklarda görülen LDH artışının, epileptik nöbet sonrası görülenlerden daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Magner ve ark., 2011). GAERS grubu sıçanlarla 2003 yılında yapılan ve 30 farklı beyin bölgesini kapsayan bir histokimyasal çalışmada, LDH düzeyinin kontrol grubuna oranla yüksek olduğu gösterilmiştir. Çalışmada pariyetal kortekste GAERS grubunda % 19 artış olduğu tespit edilmiştir (Dufour ve ark., 2003). 2001 yılında epileptik nöbet geçiren hastalar ile yalancı nöbetlerin ayrılması konusunda bir çalışma yapılmış ve bu çalışmada jeneralize tonik-klonik nöbet geçiren hastalardan alınan kanda laktat dehidrojenaz düzeylerinin anlamlı ölçüde artmış olduğu gösterilmiştir (Bolayır ve ark., 2001). Ancak, epileptik sıçanların beyin dentat girus bölgesiyle yapılan bir çalışmada, bu sıçanların L-laktat dehidrojenaz B zinciri ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2010). Bu çalışmada ise, GAERS grubuna ait beyin korteks dokusunda, laktat dehidrojenaz B zinciri ekspresyonunun 1.60 kat arttığı bulunmuştur.

## IV.5.2. Ekspresyonunda Azalma Görülen Proteinler

### IV.5.2.1. Isı-Şok Proteinleri

Isı-Şok Proteinleri (Heat Shock Protein, HSP) beyindeki önemli fonksiyonları ve nörokoruyucu özellikleri nedeniyle yıllar boyunca pek çok araştırmanın konusu olmuşlardır. HSP'ler ilk olarak stres ile indüklenen proteinler olarak keşfedilmişlerdir. Ancak daha sonra, stres ile indüklenen HSP'lerin birbirleriyle yüksek homoloji gösterdikleri ve hücre temizleme fonksiyonunu gerçekleştirdikleri anlaşılmıştır. HSP süper ailesi, çok sayıda alt gruba ve kendisiyle yakından ilişkili pek çok protein üyesine sahiptir. Isı-şok kognat 71 protein (HSC71), HSPA/HSP70-1 ailesine aittir. Bu aileye ait proteinler şaperonlar olarak bilinir ve hücrel proteinlerin kontrolü, polipeptid zincirlerinin katlanması ve membran yapısı boyunca protein trafiği gibi pek çok olaydan sorumludur (Yasuko ve ark., 2003). HSPA ailesi, iyi korunmuş birkaç bölge içerir: N-terminalde bir ATPaz bölgesi, ortada bir substrat bağlama bölgesi (şaperon fonksiyonunu sağlar) ve nükleotid değişiminde substrat salınımını düzenleyen C-terminal bölgesi. HSPA üyeleri, şaperonlamada bu bölgelerin fonksiyonuna ek olarak, apoptozisi ve sinyalizasyon yolunda çeşitli proteinlerin değişmesini ve bağlanmasını sağlar. HSPA üyeleri, bazı proteinlerin tanınmasından ve bu proteinlerin lizozomlara girişinden de sorumludur (Stetler ve ark., 2010). HSPA8, HAS70, HSC70, HSP70-8, HSP73, HSPA10, Heat shock 70 kDa protein 8 ve Hsp73/HSPA8; HSC71'in bilinen diğer isimleridir. HSC70, baskın olarak sitozolde bulunur (Rohde ve ark., 2005; Stetler ve ark., 2010). İnsan frontal korteksiyle yapılan çalışmada mikrozomal ve sitozolik fraksiyonda tanımlanmıştır (Lubec ve ark., 2003). Normal koşullarda, HSC71'in de arasında olduğu, HSPA ailesinin bazı üyeleri spesifik protein katlama makineleri olarak görev alırlar. Bu proteinler DNAJ şaperon ailesi ve spesifik nükleotid değiştirme faktörü gibi çeşitli bağlayıcılarla uyum içerisinde çalışırlar. Aynı zamanda bu üyeler, denatüre olmuş veya yanlış katlanmış proteinleri tanıyarak açığa çıkan hidrofobik kalıntılara bağlanırlar.

HSP60 ise, HSPD ailesinin bir üyesidir. Baskın olarak mitokondriyal matraste yer alır. Ancak bu üyelerin pek çoğu kompartmanlar arasında taşınabilirler (Stetler ve ark., 2010). Şaperonların bu ayrı sınıfı da mitokondriyal protein katlanmasında görev almaktadır. HSP60, mitokondrinin doğru işlev görmesi için vazgeçilmez bir proteindir. Aynı zamanda stresle indüklenebilir, ancak hücre temizleme özelliği

yoktur (Truettner ve ark., 2009). HSP60, beynin astrosit, nöron, mikroglia, oligodendrosit ve ependimal hücrelerinde endojen olarak eksprese edilir. Büyük çoğunluğunun mitokondride olmasına rağmen, sitozol gibi ekstramitokondriyal bölgelerde de yer alabilirler. HSPD'nin şaperon aktivitesi için gerekli olan konformasyonel değişiklik ATP bağımlıdır. ATP ile aktive olan HSPD, substrat katlanması veya yeniden katlanması için apikal bölgesinde hidrofobik bir boşluk oluşturur (Stetler ve ark., 2010).

HSP indüksiyonu aynı zamanda epileptik nöbet aktivitesine bağlıdır. Kainik asit indüklü klasik nöbet modellerinin HSPA ailesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. HSP ekspresyonunun yaşayan ve ölmek üzere olan her iki hücrede de gerçekleşmesi, bu durumun koruyucu bir mekanizma olmasının yanı sıra hücrel strese de bir yanıt olduğunu ortaya koymaktadır. Bunun bir diğer kanıtı da, HSPA ailesinin in vitro ortamda kainik asit toksisitesine bir yanıt vermemesidir (Yang ve ark., 2008). Down sendromlu hastalar (Yoo ve ark., 2001c) ve Alzheimer'lı hastalar (Yoo ve ark., 2001b) ile yapılan iki ayrı çalışmada beyin bölgesi temporal kortekste HSC71 ekspresyonunun anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Alzheimer hastalarının tüm beyin bölgesiyle yapılan çalışmada (Tsuji ve ark., 2002) ve pariyetal korteks ile yapılan çalışmalarda (Kim ve ark., 2001; Yoo ve ark., 2001b) HSP60 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada ise, GAERS grubuna ait beyin korteks dokusunda, HSC71 proteini ekspresyonunun 1.74 kat azaldığı, HSP60 protein ekspresyonunun ise 1.58 kat azaldığı bulunmuştur. Bulduğumuz bu sonuç, literatürdeki çalışmalar ile benzerdir ve GAERS grubu sıçanların pariyetal korteks dokusunda ilk kez elde edilmiştir.

#### **IV.5.2.2. Aktin**

Epilepsi gelişimi merkezi sinir sistemi hücre yapıları ve fonksiyonu ile ilişkilidir. Aktin, sinir sisteminde dendiritik omurganın ana yapısal proteinidir. Bu bölgede aktin filamentleri yoğun olarak bulunur. Dendiritlere ve dendiritik omurgaya yapısal destek sağlar, biyokimyasal bölümlendirme, omurgaya protein translokasyonu, reseptör trafiği ve demirleme (anchoring) gibi fonksiyonları düzenler. Aktin filamentlerinin depolimerize olması, omurganın normal fizyolojik aktivitesini bozarak yapısal ve fonksiyonel değişikliklere sebep olmaktadır. Önceki yıllarda yapılan çalışmalar nöron aktivasyonunun ve uzun süreli potansiyelizasyonun, sinaptik esnekliği düzenleyen aktin dinamiğini değiştirdiğini

göstermiştir. Aktin dinamiği, cofilin gibi aktin bağlayıcı bazı bileşiklerin bağlanarak fizyolojik bir uyarın yoluyla aktin polimerizasyonunu değiştirmesiyle bozulabilir. Bunun dışında eğer ortada nöbet oluşumu gibi patolojik bir durum varsa, aktin ağında bozulmalar gerçekleşebilir. Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada hipokampal nöbetlerin, işaretili aktin filamentlerinin konsantrasyonunun dışmesine ve buna bağlı olarak da aktin filamentlerinin depolimerizasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Ouyang ve ark., 2007). Dentat girus, beyinde hipokampus içerisinde yer alan bir bölgedir ve temporal lob epilepsisi ile ilgili olduğu dışünülmektedir. Bu beyin bölgesinde yapılan bir proteom çalışmasında 3 yapısal proteinin ekspresyonunda değişiklik saptanmıştır. Bunlardan biri olan  $\beta$ -aktin, 6 farklı aktin izoformundan biridir. Aktin proteini genel olarak oldukça korunmuş, hücre hareketliliği, yapısı ve bütünlüğü için gereklidir. Yapılan bu çalışmada, epileptik sıçanlara ait dentat girusun supragranüle bölgesindeki aktin polimerizasyonunun azaldığı bulunmuştur. Aktin polimerizasyonu azalmasının, kendiliğinden gerçekleşen nöbet aktivitesinin bir sonucu olduğu sanılmaktadır (Li ve ark., 2010). Bir başka çalışma, kainat-indüklü nöbet aktivitesinin *in vivo* ortamda aktin depolimerizasyonunu başlattığını göstermiştir (Zeng ve ark., 2007). Çalışmamızda ise, GAERS grubuna ait beyin korteks dokusunda, aktin ekspresyonunun 1.49 kat azaldığı bulunmuştur. Bulduğumuz bu sonuç, literatürdeki çalışmalar ile benzerdir ve GAERS grubu sıçanların pariyetal korteks dokusunda ilk kez elde edilmiştir.

#### IV.5.2.3. Guanin Nükleotid-Bağlayıcı Protein

Guanin nükleotid-bağlayıcı proteinler (GNBP) G-proteinler olarak adlandırılan;  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  alt ünitelerinden oluşan heterotrimerik bir proteindir (Preininger ve Hamm, 2004). Sitoplazmik hücre membranına demirlemiş glikoproteinlerdir. Memeli hücrelerde; sinyal iletimi, protein taşınımı, büyümenin düzenlenmesi ve polipeptid zincir uzaması gibi pek çok hücrenel işlemden sorumludur (Roberts ve Waelbroeck, 2004). GTP-bağlayıcı proteinler ya da GTPazlar olarak da bilinirler. Bu protein ailesinin tüm üyeleri moleküler bir açma-kapama anahtarı olarak görev alırlar. Anahtar açık olduğunda guanozin trifosfat (GTP) bağlıdır, kapalı olduğunda ise guanozin difosfat (GDP) bağlıdır. Hücre dışındaki sinyali alır ve hücre içerisinde değişikliğe neden olur. Pek çok hormon, nörotransmitter ve diğer sinyal faktörleri ile iletişim kurar. GNBP, metabolik enzimleri, iyon kanallarını, taşıyıcıları ve diğer hücre mekanizmalarını düzenler,

transkripsiyonu, madde salınımını, hücre hareketliliğini ve daralmasını kontrol eder. Aynı zamanda embriyonik ve gonadal gelişim, öğrenme, hafıza ve homeostazis gibi sistemik fonksiyonları da düzenler (Neves ve ark., 2002). İnsan frontal korteksiyle yapılan çalışmada mitokondriyal, mikrozomal ve sitozolik fraksiyonda tanımlanmıştır (Lubec ve ark., 2003). Yapılan çalışmalar G-protein ile düzenlenen sinyal yollarının epileptojenezde rol oynadığını ortaya koymaktadır (Osberg ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada, GNBPs1 inhibe edici pertussis isimli bir madde, iki farklı farmakolojik deneysel absans epilepsi nöbet modelinde uygulanmış, sonucunda bu nöbetlerin süresinde azalma olduğu gösterilmiştir (Snead, 1992). 2002 yılında Alzheimer hastalarıyla yapılan bir çalışmada, bu hastaların beyin bölgelerinde Guanin nükleotid-bağlayıcı protein G(I)/G(S)/G(T) beta-1 alt ünitesinin (GNBPs1) ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Tsuji ve ark., 2002). Bu çalışmada ise, GAERS grubuna ait beyin korteks dokusunda, GNBPs1 proteinin ekspresyonunun 1.81 kat azaldığı bulunmuştur.

#### **IV.5.2.4. Malat Dehidrojenaz**

Malat dehidrojenaz (MDH);  $NAD^+/NADH$  bağımlı, malat oksalasetat dönüşümünü katalizleyen enzimdir.  $NAD$  ve  $NADP^+$ 'ye olan sepesifiteleri ve subselüler lokalizasyonları farklı birkaç farklı izoformu bulunmaktadır (Minarik ve ark., 2002). MDH, insan frontal korteksiyle yapılan çalışmada mitokondriyal, mikrozomal ve sitozolik fraksiyonda tanımlanmıştır (Lubec ve ark., 2003). Mitokondriyal membranda gerçekleşen malat-aspartat taşınımında ve mitokondriyal matraste gerçekleşen trikarboksilik asit döngüsünde anahtar rol oynar. Aynı zamanda glukoneojenezde de görev alır.  $NAD$  bağımlı dehidrojenazlar grubuna aittir ve oldukça büyük moleküllerdir (Minarik ve ark., 2002). Bir anlamda, enerji metabolizmasının ana enzimidir ve enerji metabolizmasının hız sınırlayıcı enzimi olarak tanımlanır. Mitokondriyal fonksiyon, nöronların uyarılması ve varlığını sürdürebilmesi için gerekli bir bileşendir. Bu nedenle MDH, nöron aktivitesi ile ilişkilidir. 2010 yılında Mathew ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada pilocarpine ile indüklenen epileptik sıçanların kas dokusunda MDH aktivitesinin arttığı, kalp dokusunda ise aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Beyin mitokondriyal membranının epileptik sıçanlarda daha akışkan olması mitokondriyal solunum zincirinin bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir. Yapısal değişikliği de beraberinde getiren bu zincir fonksiyonunun bozulması, kronik epileptik koşullarda

yeni ve önemli bir patofizyolojik mekanizmanın varlığını ortaya çıkarmaktadır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, morfin uygulanan sıçanların beyin mitokondriyal enzim düzeylerinin düşük olmasının nedeni bu patofizyolojik durum ile ilişkilidir (Mathew ve ark., 2010). Pikrotoksin ile indüklenen epileptik sıçanların beyin dokuları ile yapılan bir çalışmada, kontrol grubu ile kıyaslandığında MDH seviyelerinin % 80'e varan bir düşüş sergilediği gösterilmiştir (Acharya ve Katyare, 2005). Bu çalışmada ise, GAERS grubuna ait beyin korteks dokusunda, malat dehidrojenaz ekspresyonununun 1.92 kat azaldığı bulunmuştur. Bu sonuç GAERS grubu sıçanların pariyetal korteks dokusunda ilk kez elde edilmiştir. Genetik absans sıçanların mitokondriyal enzimlerinde bir bozukluk olduğuna işaret etmekte ve bu konuda ileri analizlerinin yapılması gerekmektedir.

## BÖLÜM V

### SON DEĞERLENDİRMELER ve ÖNERİLER

Membran kanal proteinlerinin analizi, çözümlü proteinlerin analizinden çok daha karmaşık ve güçtür. Ortaya çıkan sonuçların az olmasının nedeni, integral membran proteinleri gibi proteinlerin intraselüler, ekstraselüler ve membran içi bölgelerinin olmasıdır. Hem hidrofilik, hem de hidrofobik bölgeleri aynı anda barındıran bu tarz proteinleri analiz etmek durumu güçleştirmektedir. Bu hidrofobik bölgeleri çözümlüleştirmede çok güçlü ajanlar kullanılmış olsa dahi, transmembran bölgelerin lipitler ile kaplı olması nedeniyle bu bölgedeki çözümlüleştirme tam anlamıyla yapılamamaktadır. Çözümlüleştirmedeki zorluklara ek olarak aynı zamanda membran proteinleri az bulunur proteinler olduklarından jel üzerinde diğer proteinler gibi gözlenmeleri de güçtür. Her ne kadar deney koşullarında optimizasyon sağlansa da, var olan denenmiş yöntemler ile membran kanal proteinlerini çözümlü proteinlerden tamamen ayırmak mümkün değildir. Membran ayırma kiti aracılığı ile de hidrofilik proteinlerden tam anlamıyla ayırmak mümkün olmamıştır. Mevcut 2D elektroforez yöntemlerinin tamamında, yaygın bulunan hidrofilik kısımlar mutlaka görüntüleme aşamasında karşımıza çıkmaktadır.

Yaptığımız çalışmada GAERS genetik absans epilepsi modelinde beyin pariyetal korteks dokusu üzerinde çalışılmış ve korteks membran proteinleri, piyasada satılan bir membran kiti aracılığıyla fraksiyonlara ayrılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda 8 proteinin ekspresyonunda farklılık tespit edilmiştir. Bu proteinlerden 6 tanesinin ( $\beta$ -aktin, HSC71, HSP60, malat dehidrojenaz ve GNBPs1) ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hastalıklı GAERS grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı, 3 tanesinin (albümin, 14-3-3 proteini epsilon izoformu ve L-laktat dehidrojenaz B zinciri) ekspresyonunun ise arttığı saptanmıştır.

Proteomik analizler çok düşük miktarlarda örnek ile yapıldıklarından az bulunan proteinler çözümlülerde yüksek yüzdelerde bulunamamaktadır. Böyle

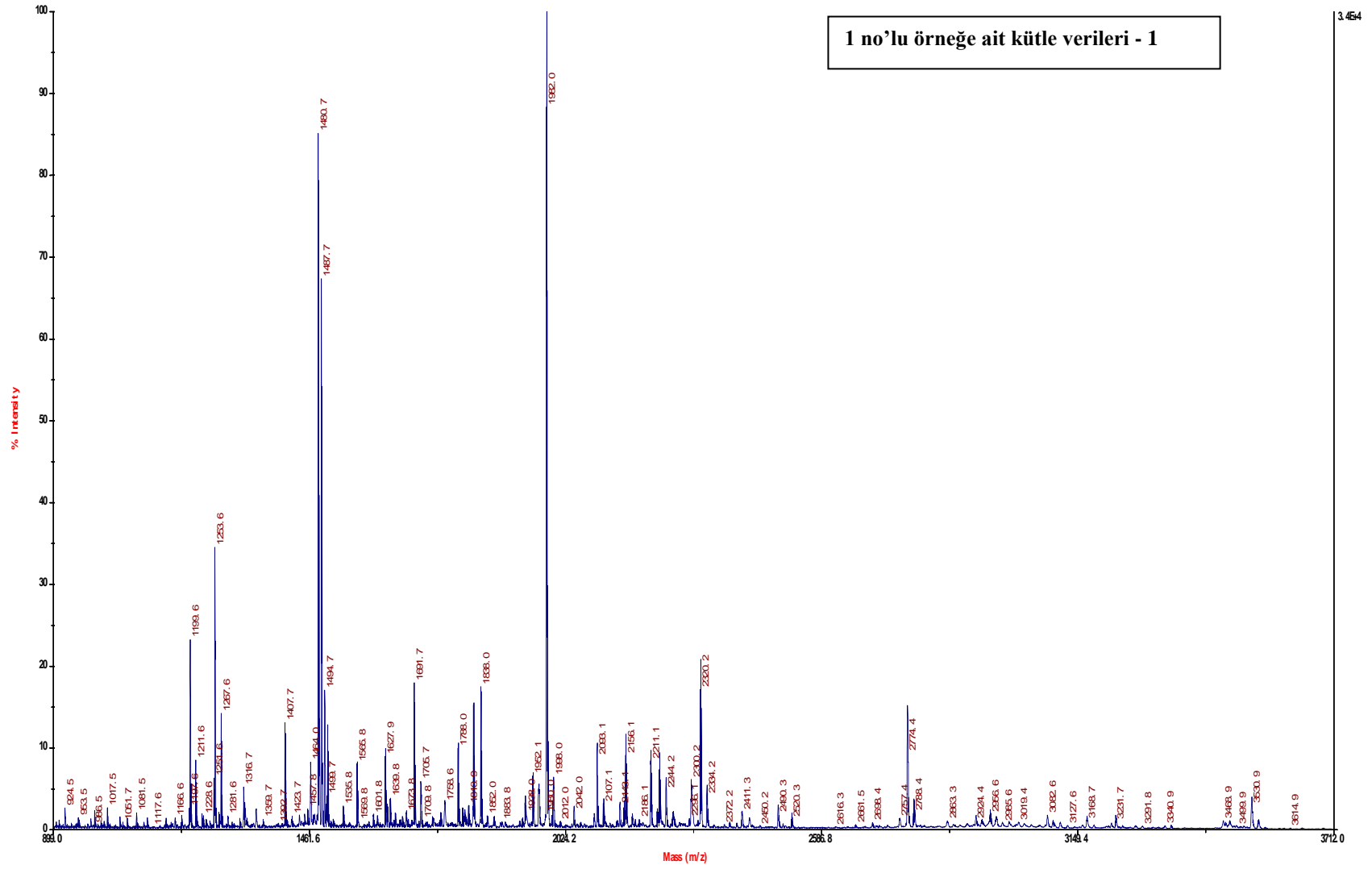
olmasına karşın, bu az kopyaya sahip proteinler, potansiyel ilaç hedefleri olarak kullanılmaktadır.

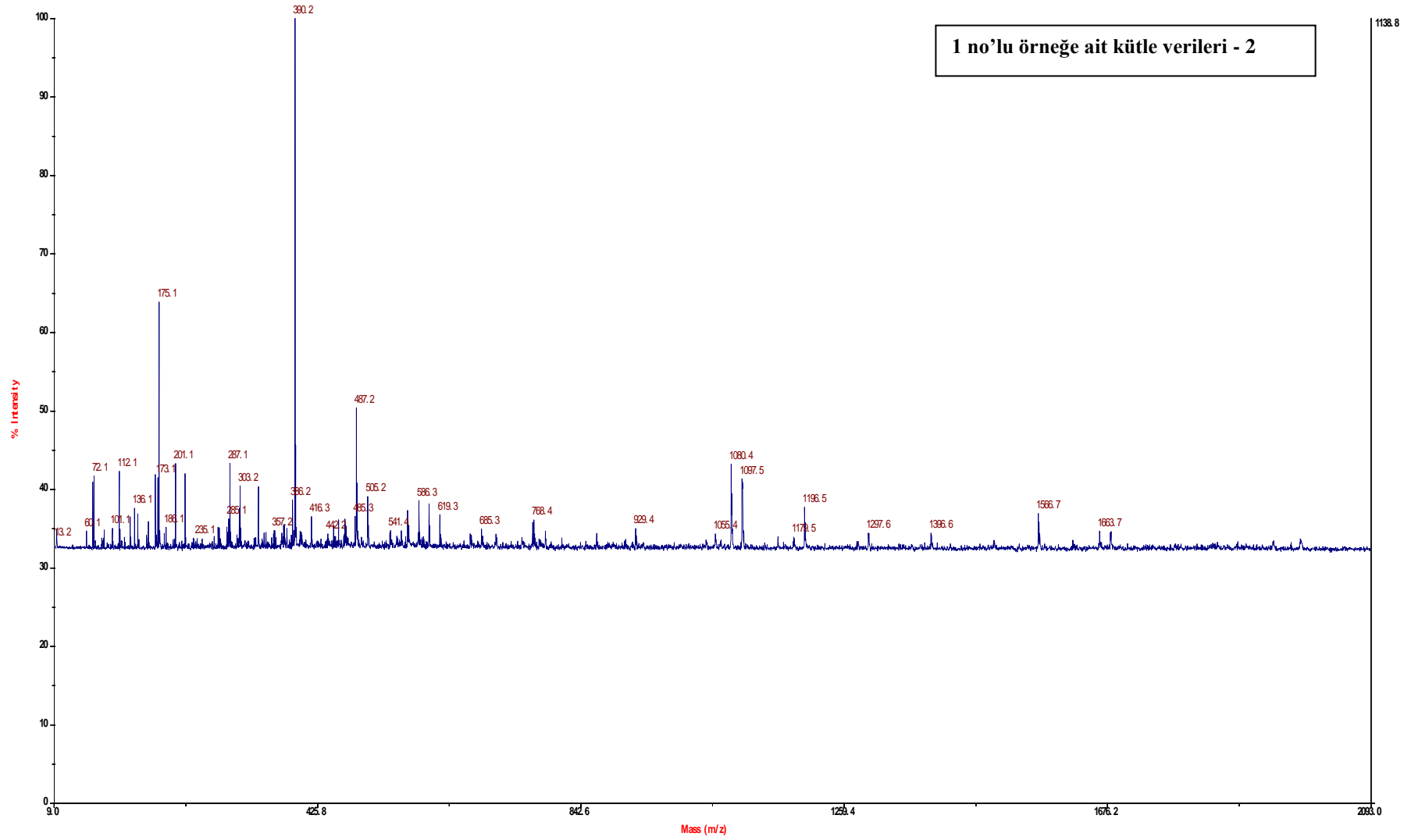
Çalışmada membran proteinlerine bağlı kanal proteinlerine özgü herhangi bir anlamlı farklılığa rastlanmamıştır. İleriki çalışmalarda bu proteinler spesifik olarak ortamda aranabilirler. Ancak yine de, membran-kanal proteinlerine ait bir değişiklik kesin olarak beklenmemelidir. Membran ile ilişkili olan HSC71, GNBPs1 ve 14-3-3 proteini epsilon izoformunda değişiklik saptanmış olması hastalığın membran ile ilişkisini ortaya koymaktadır. Özellikle membrana bağlı proteinler ile etkileşim halinde olan ve sinyalizasyonda görev alan bu proteinlerde değişiklik görülmesi hastalığın nedenlerini anlamada önemli bir adım olarak kabul edilebilir.

Farklılık bulunan proteinlerin eksprese edildikleri genlerin belirlenmesi ve mRNA seviyelerinin tespit edilmesi, proteinlerin ekspresyon değişikliklerinin sebeplerini anlamak için önemlidir. Ekspresyon değişikliğine sebep olan etkenlerin gen düzeyinde belirlenmesi, epilepsi mekanizmalarının altında yatan nedenleri ortaya çıkarmada etkili olacaktır. Bu nedenlerin ortaya çıkarılması, epilepsi tedavisinde kullanılacak, doğrudan hedefe yönelik yeni anti-epileptik ilaçların tasarlanmasında bir adım olabilecektir.

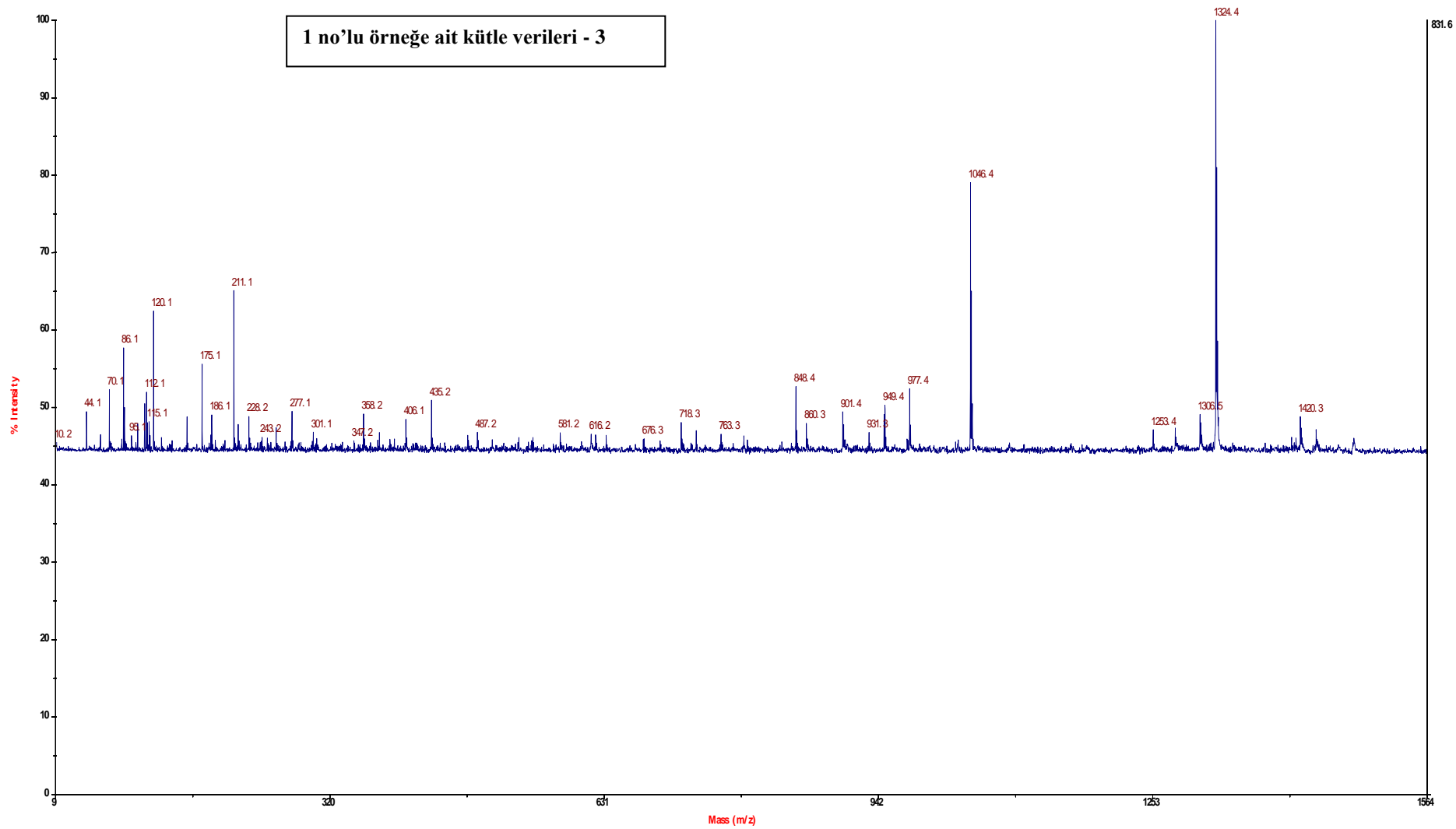
## **EKLER**

## **EK. 2. KÜTLE ANALİZİ SONUÇLARI**

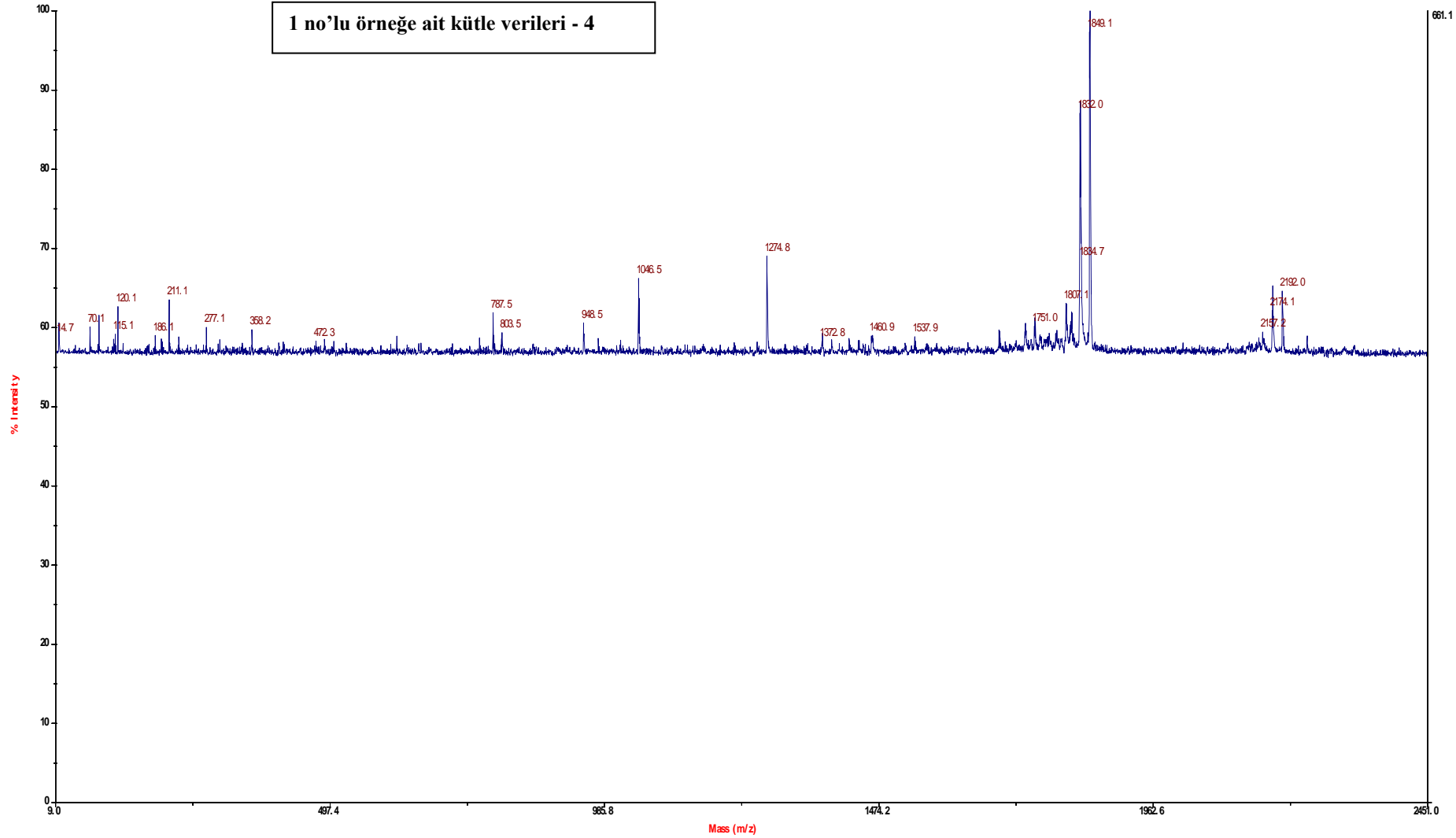


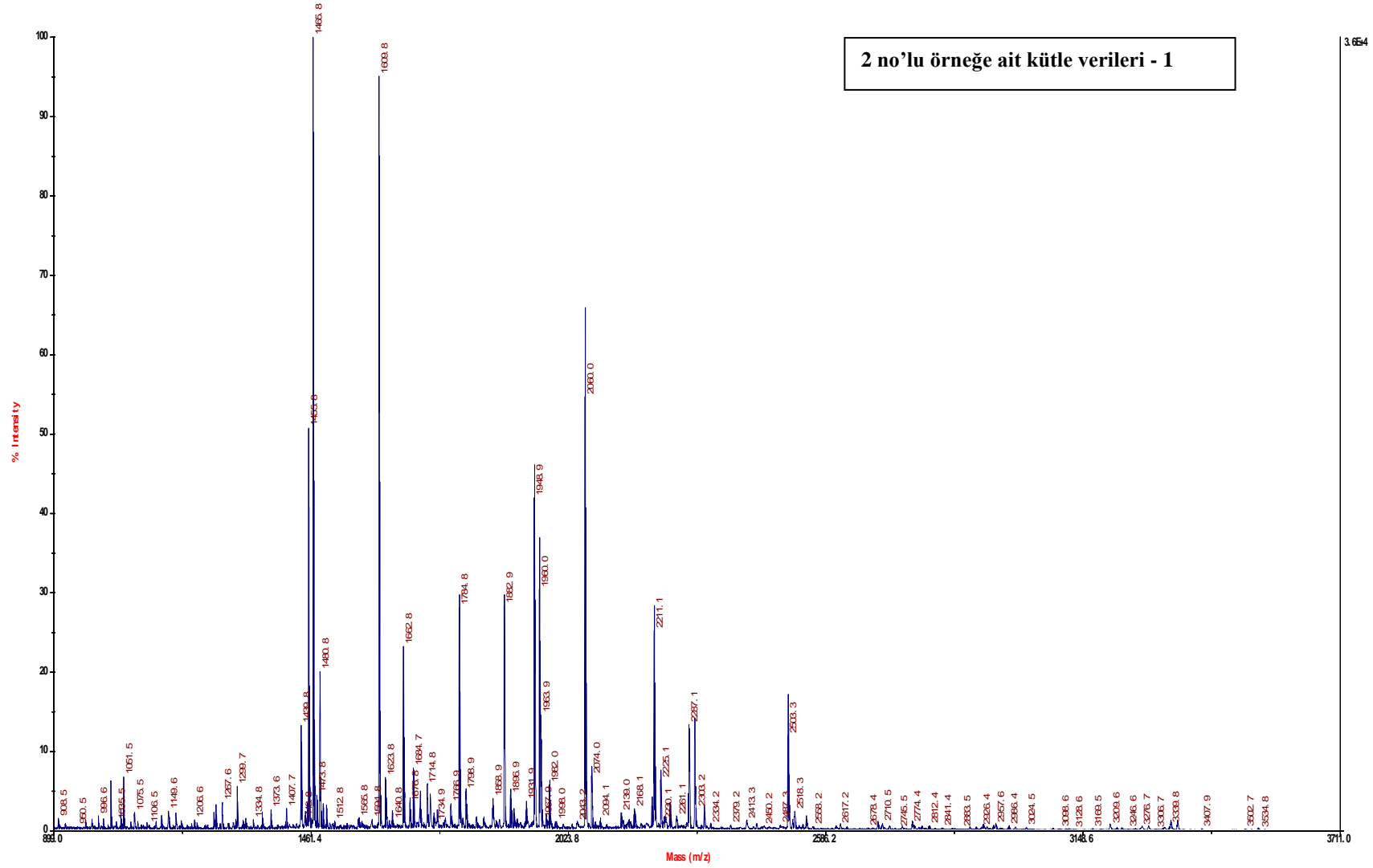


1 no'lu örneğe ait kütle verileri - 3

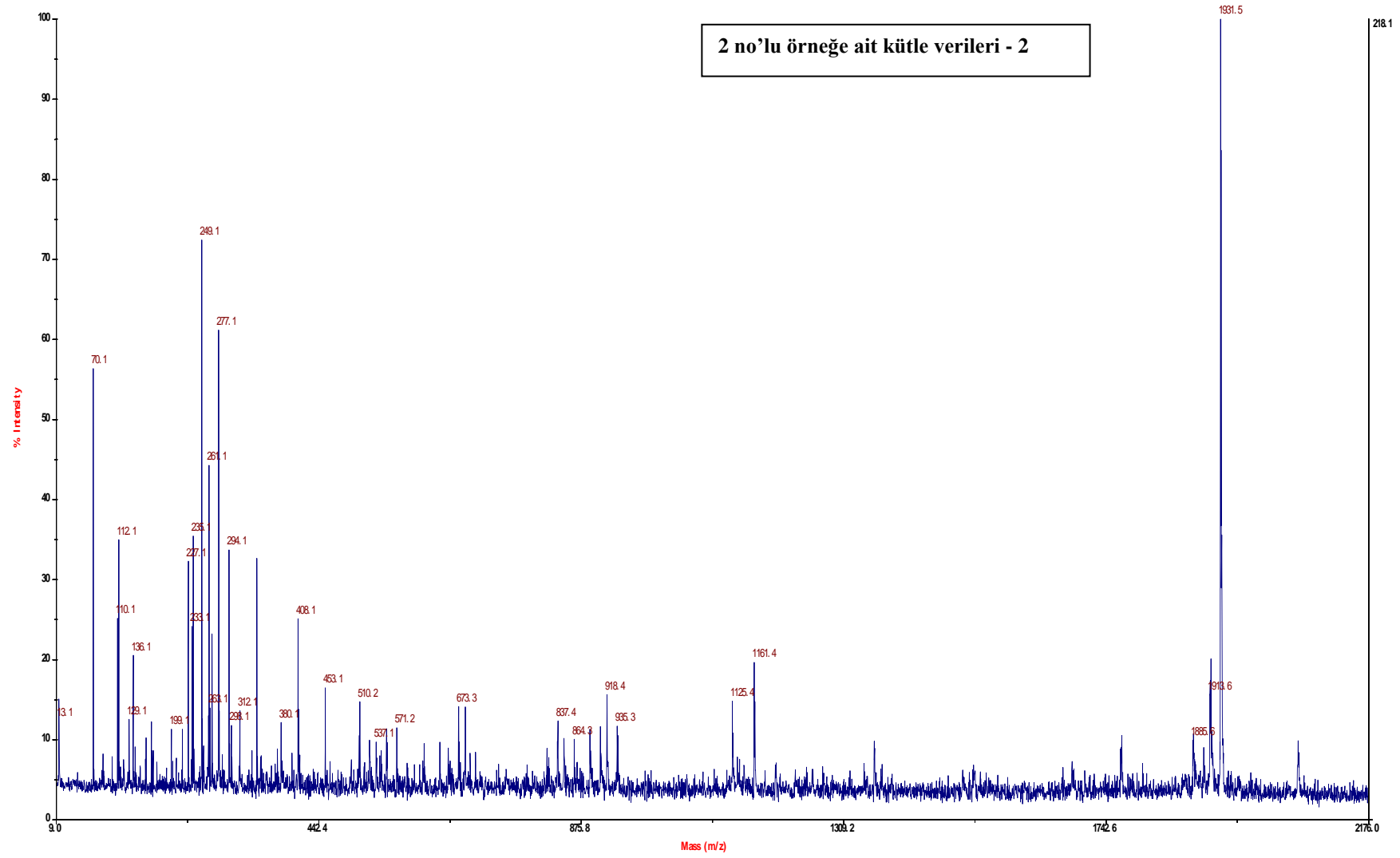


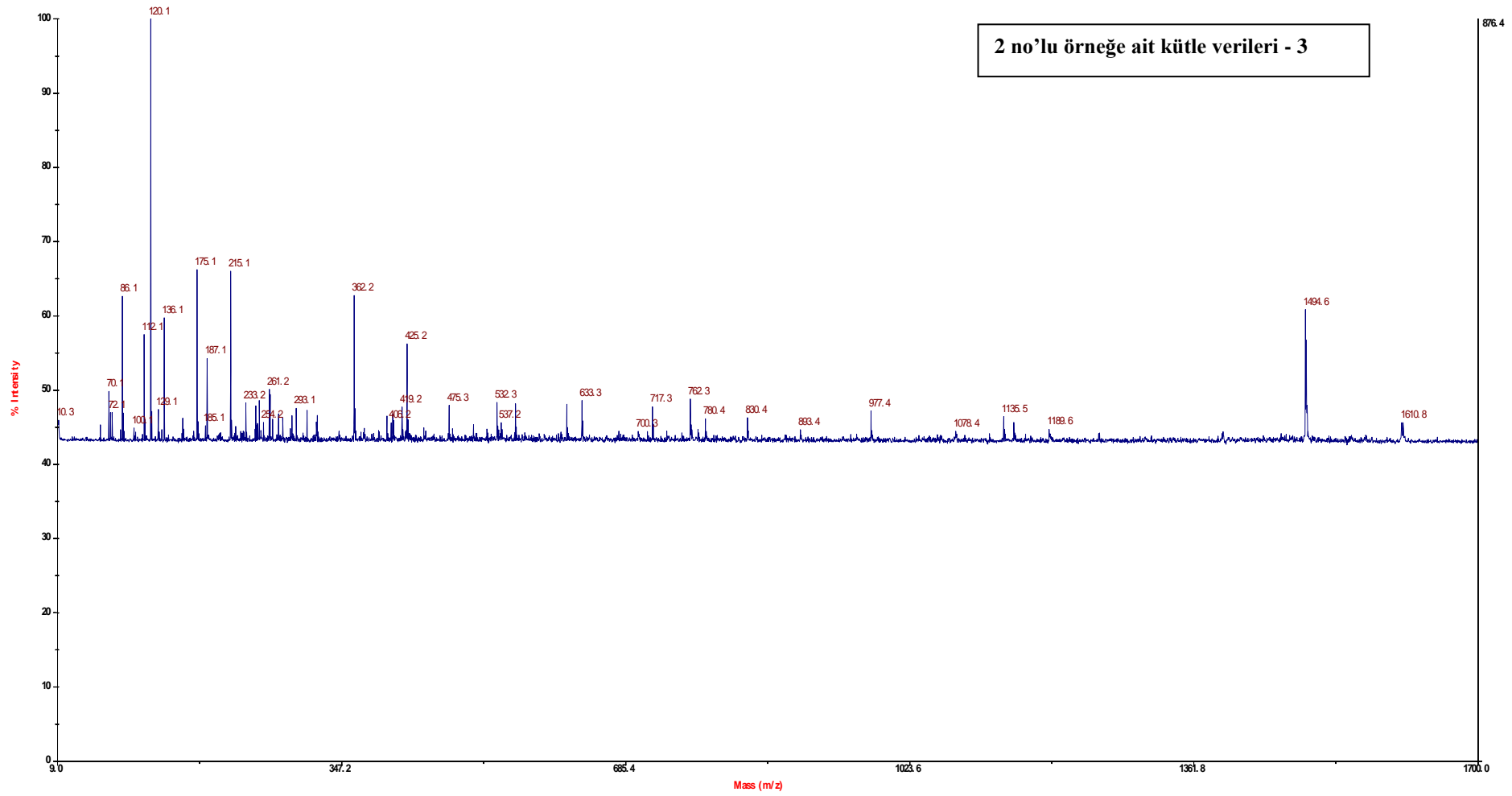
1 no'lu örneğe ait kütle verileri - 4



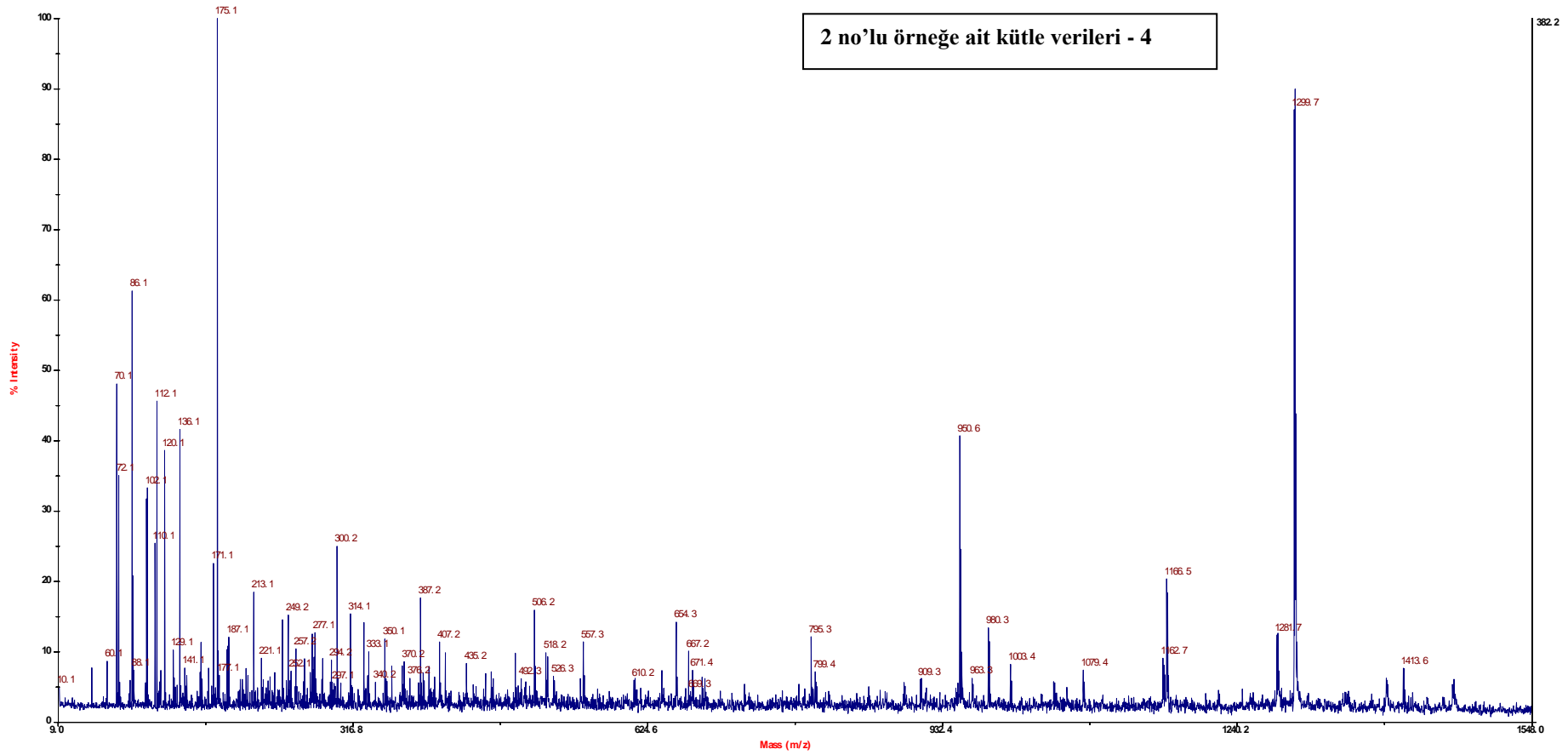


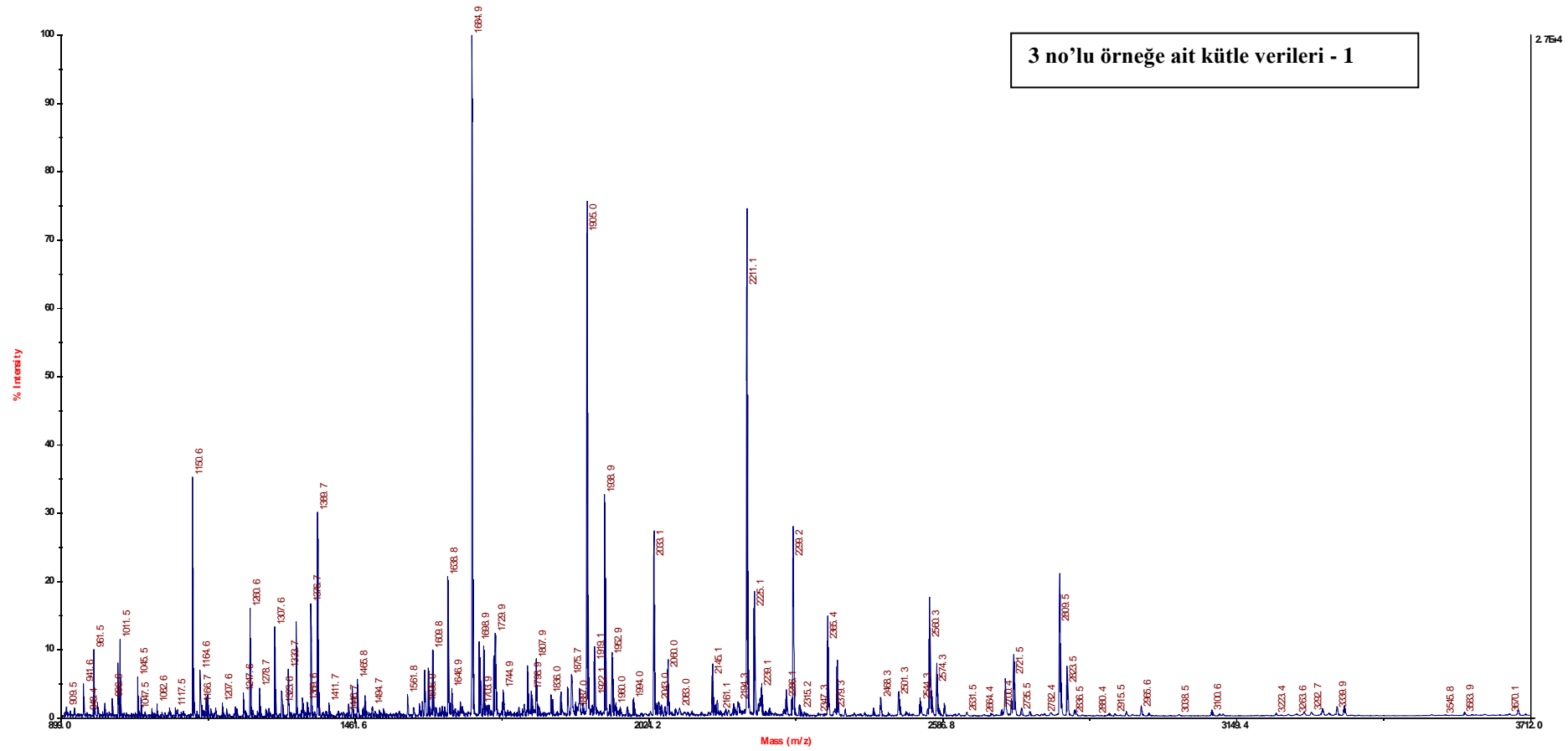
2 no'lu örneğe ait kütle verileri - 2

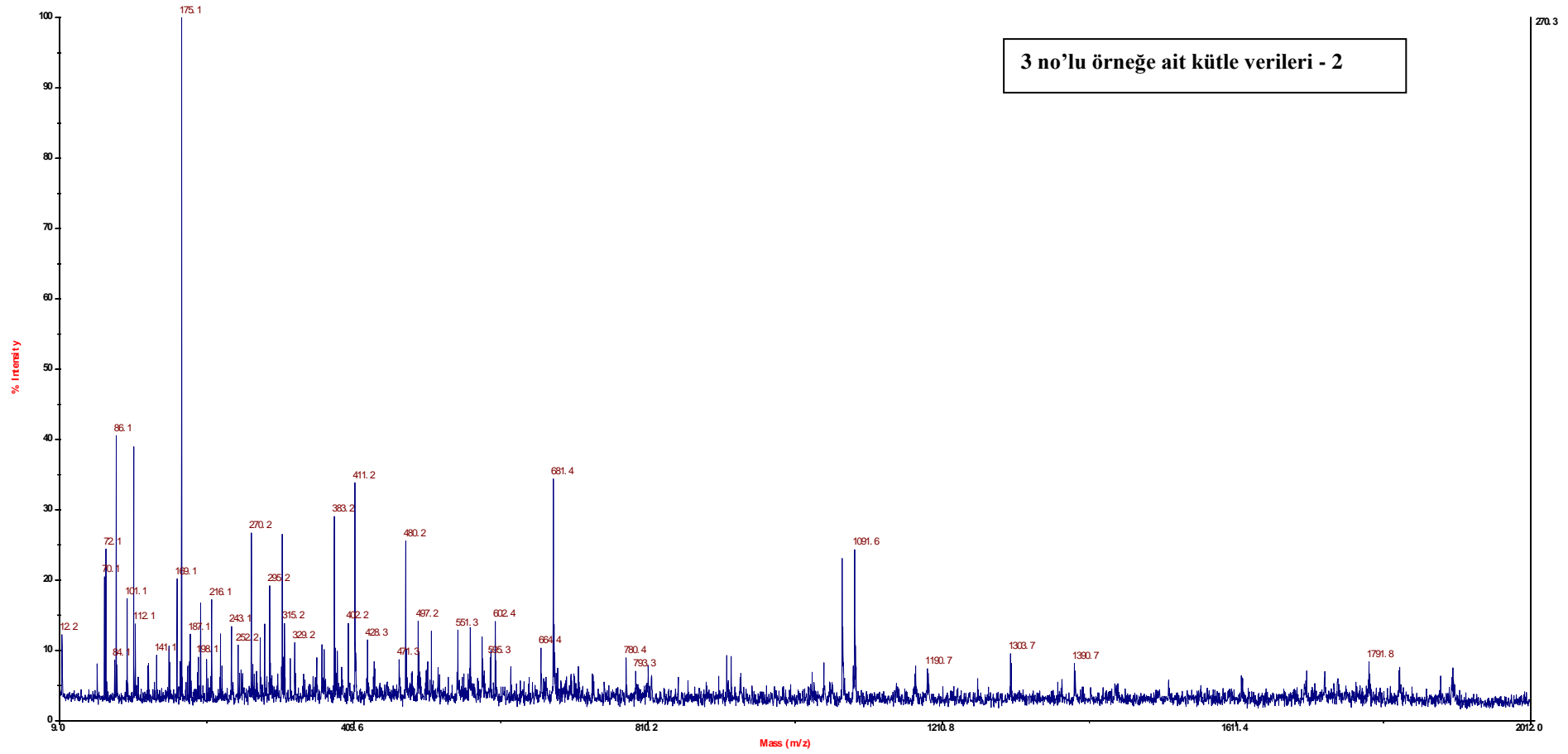


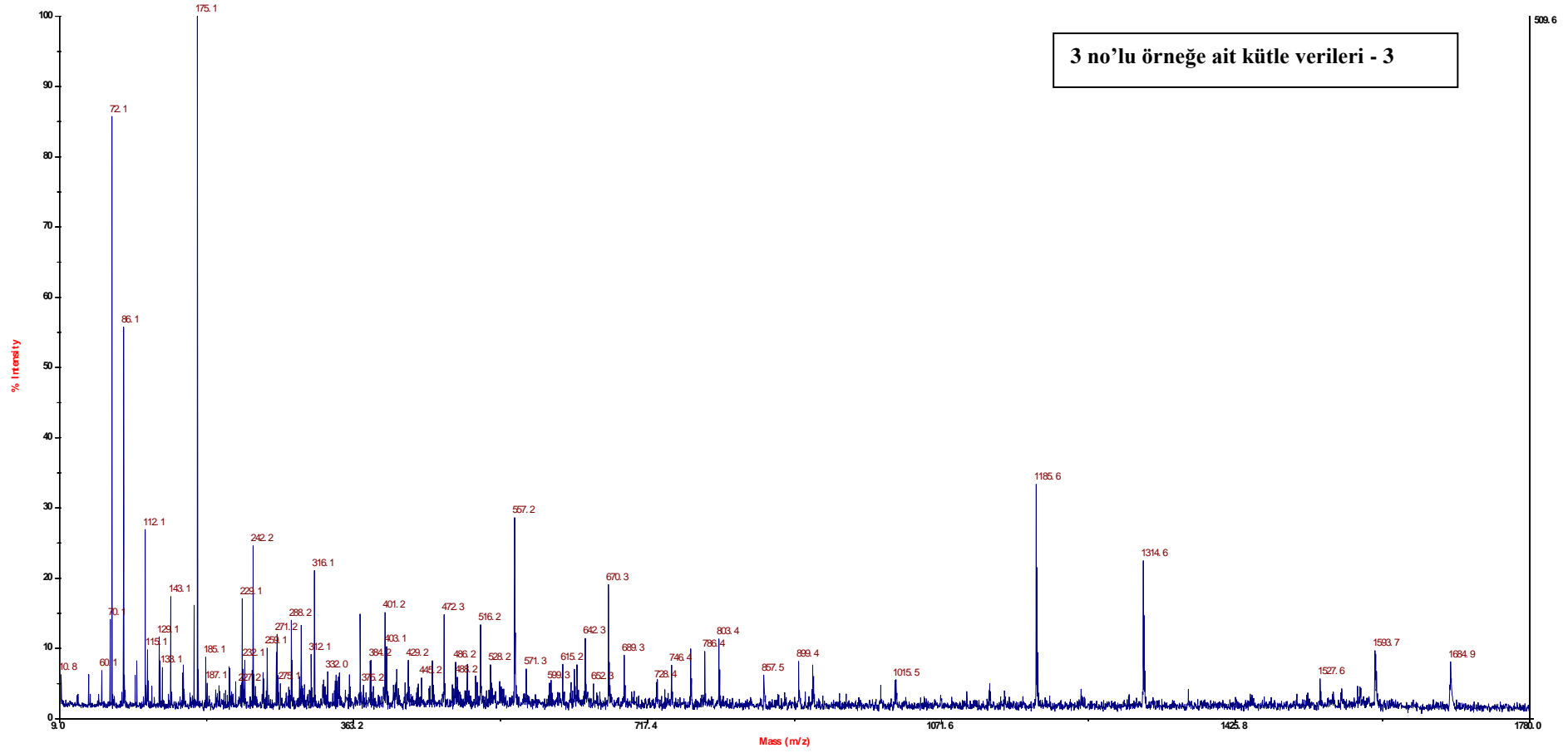


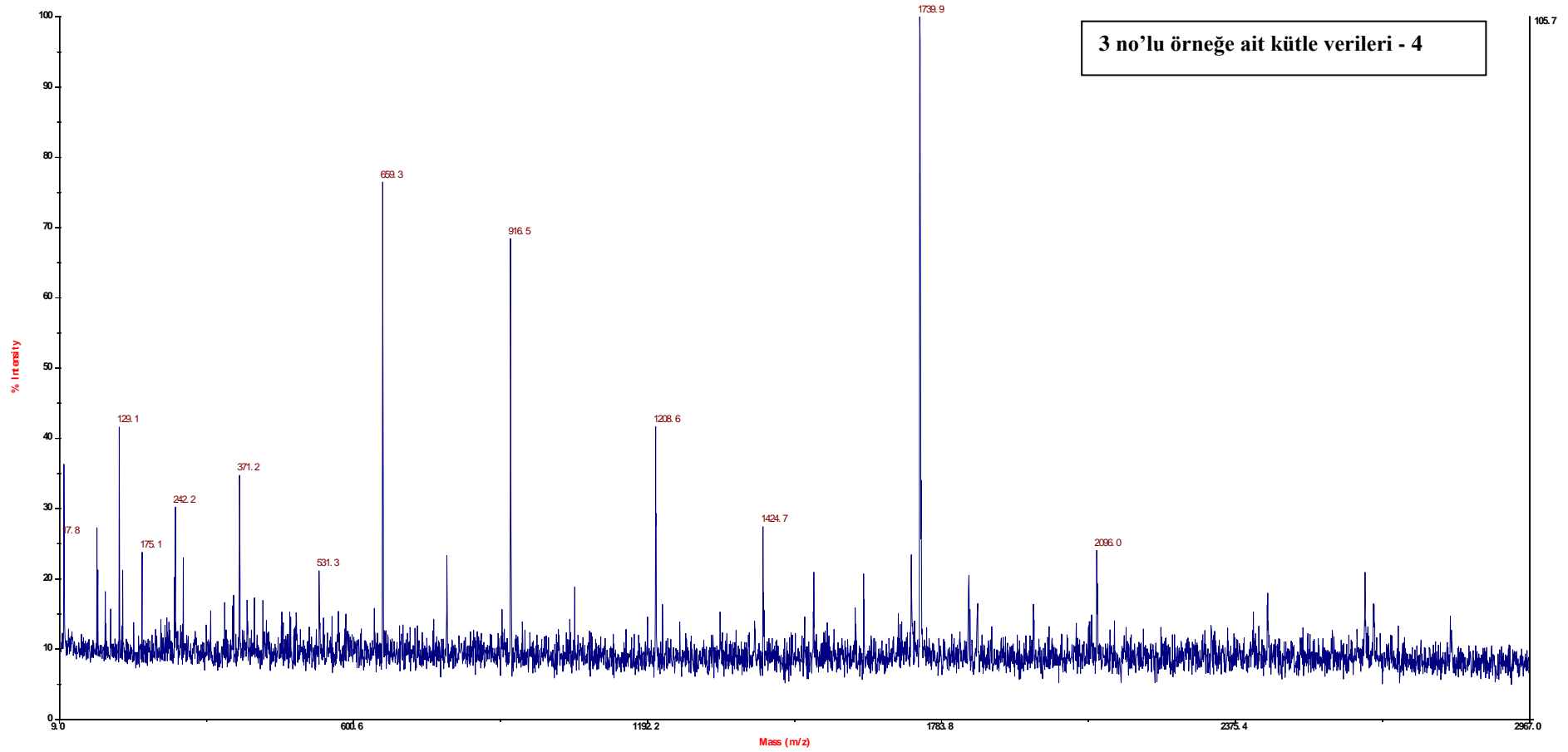
2 no'lu örneğe ait kütle verileri - 4

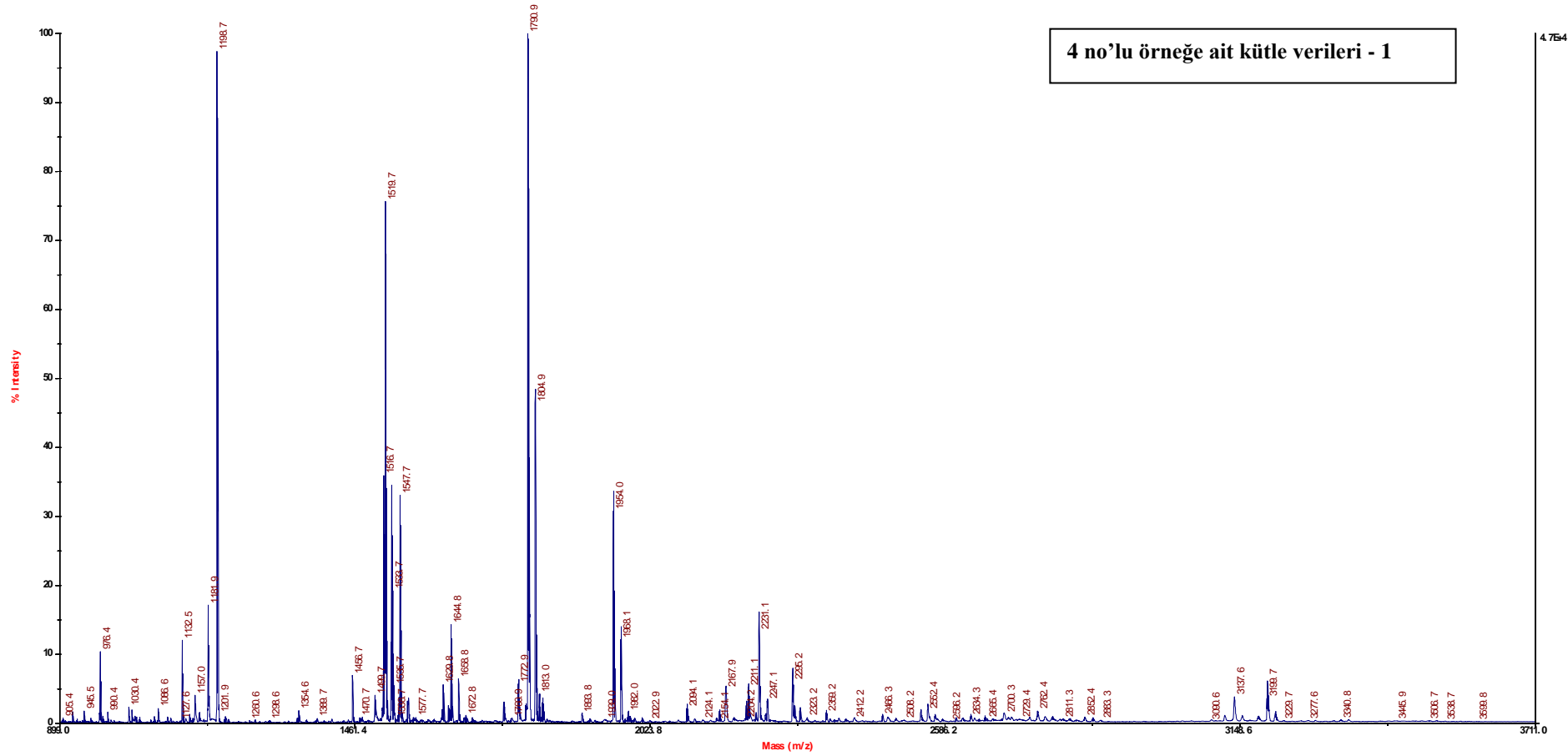


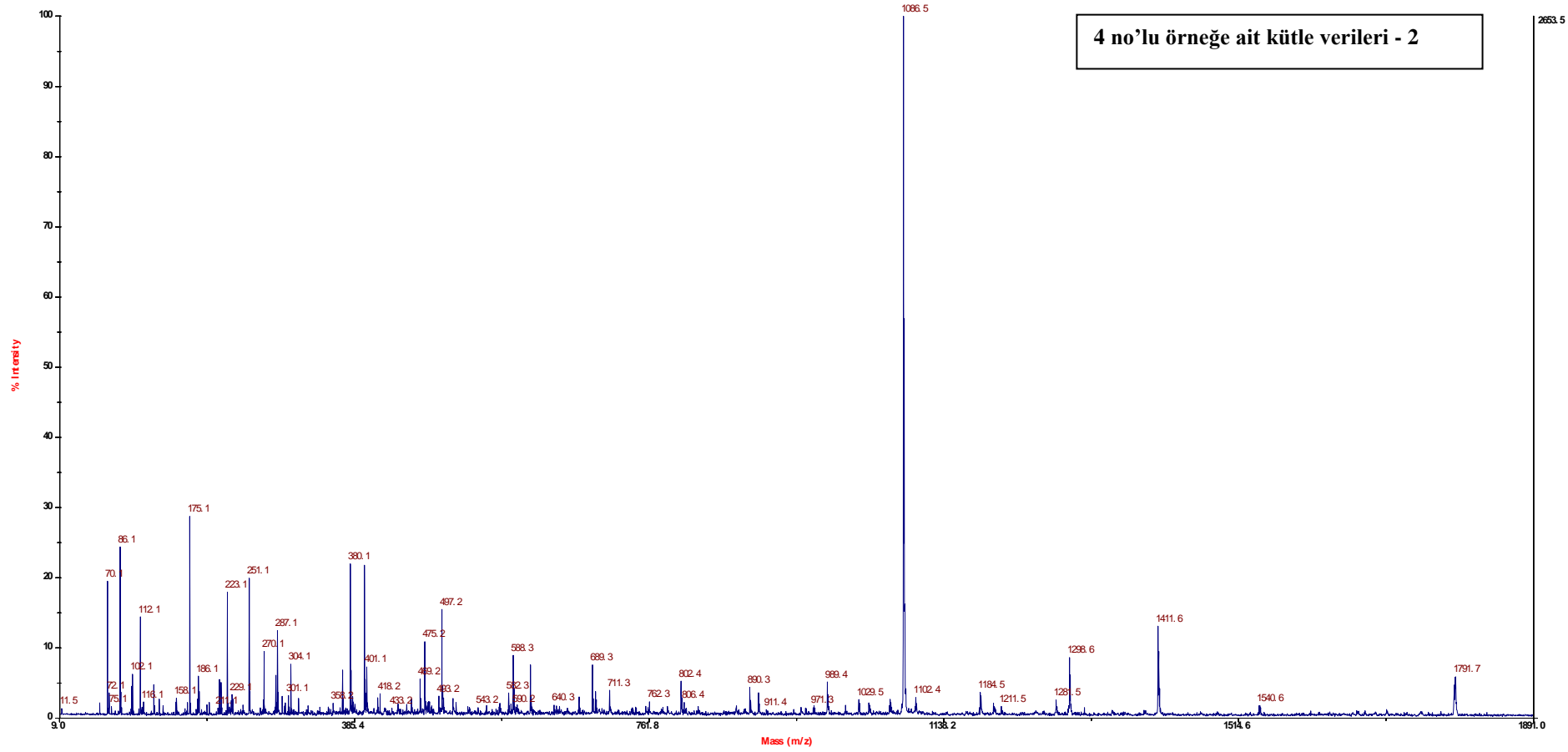




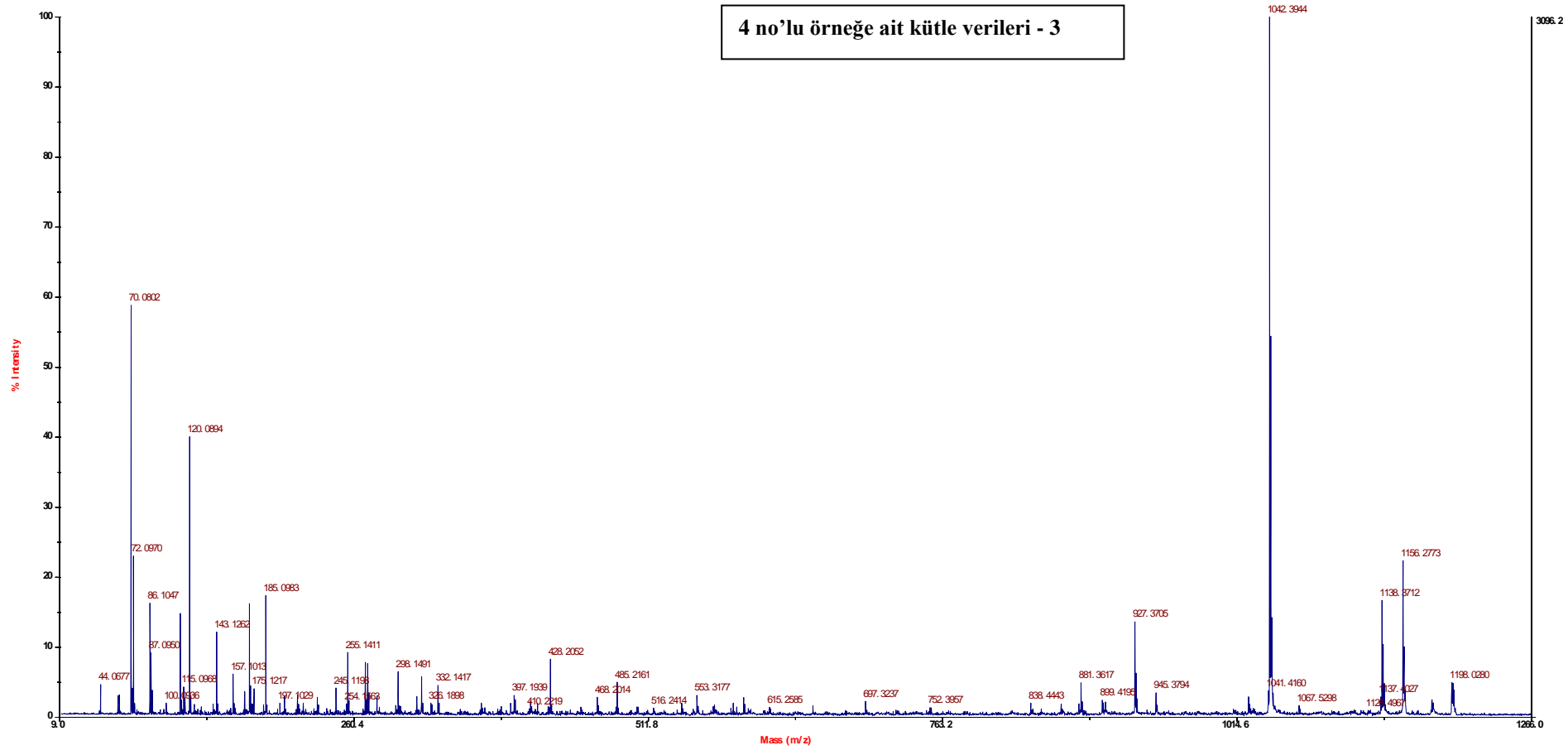


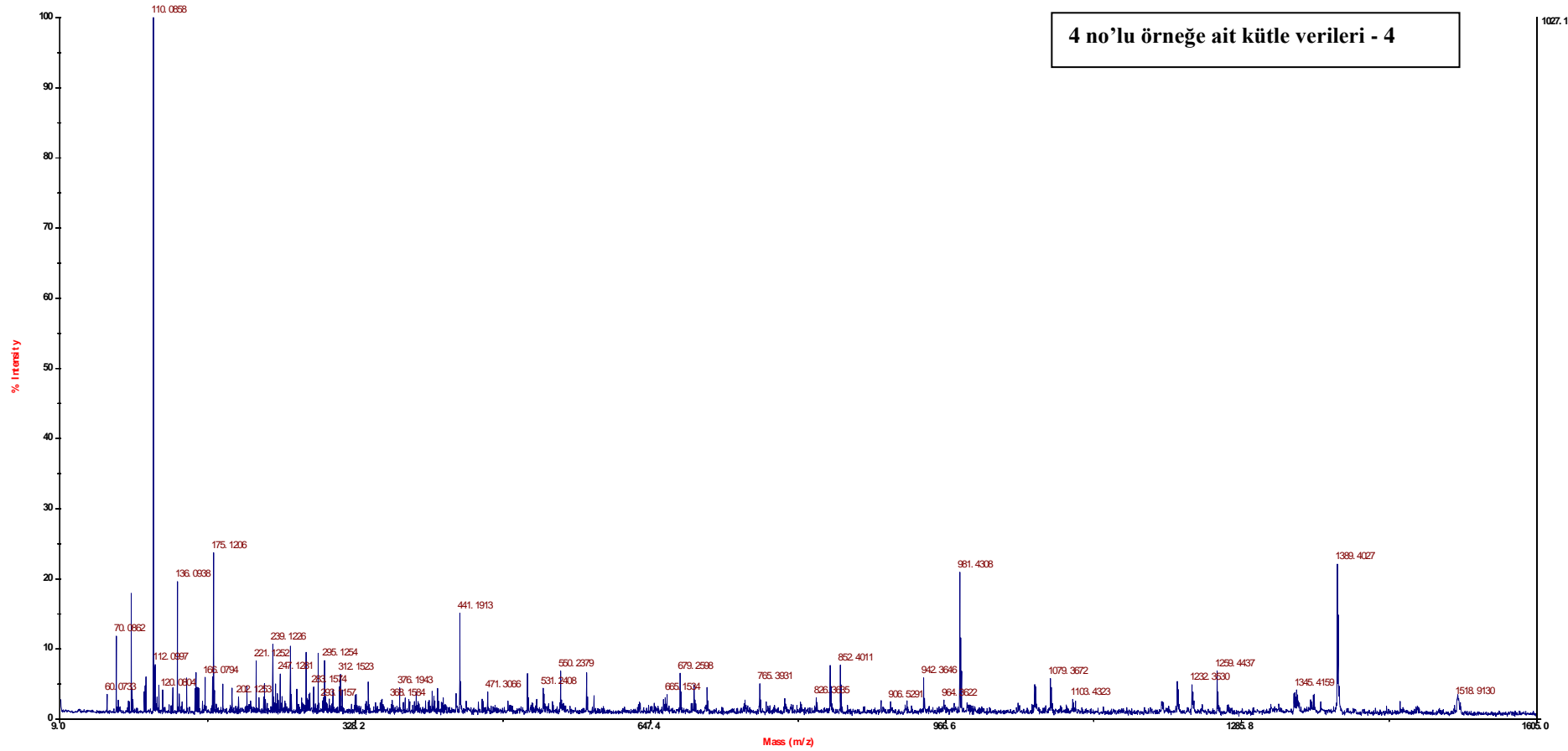


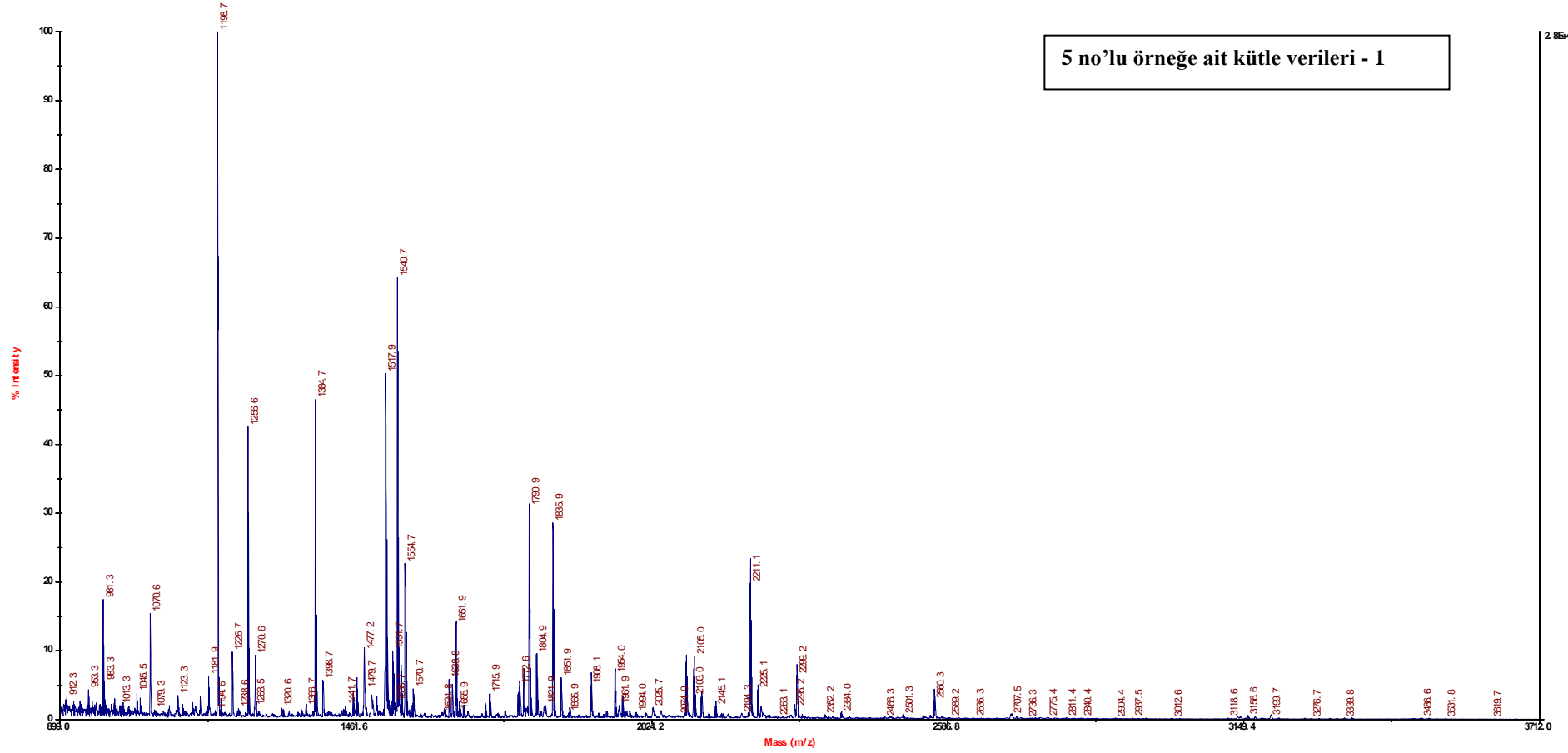




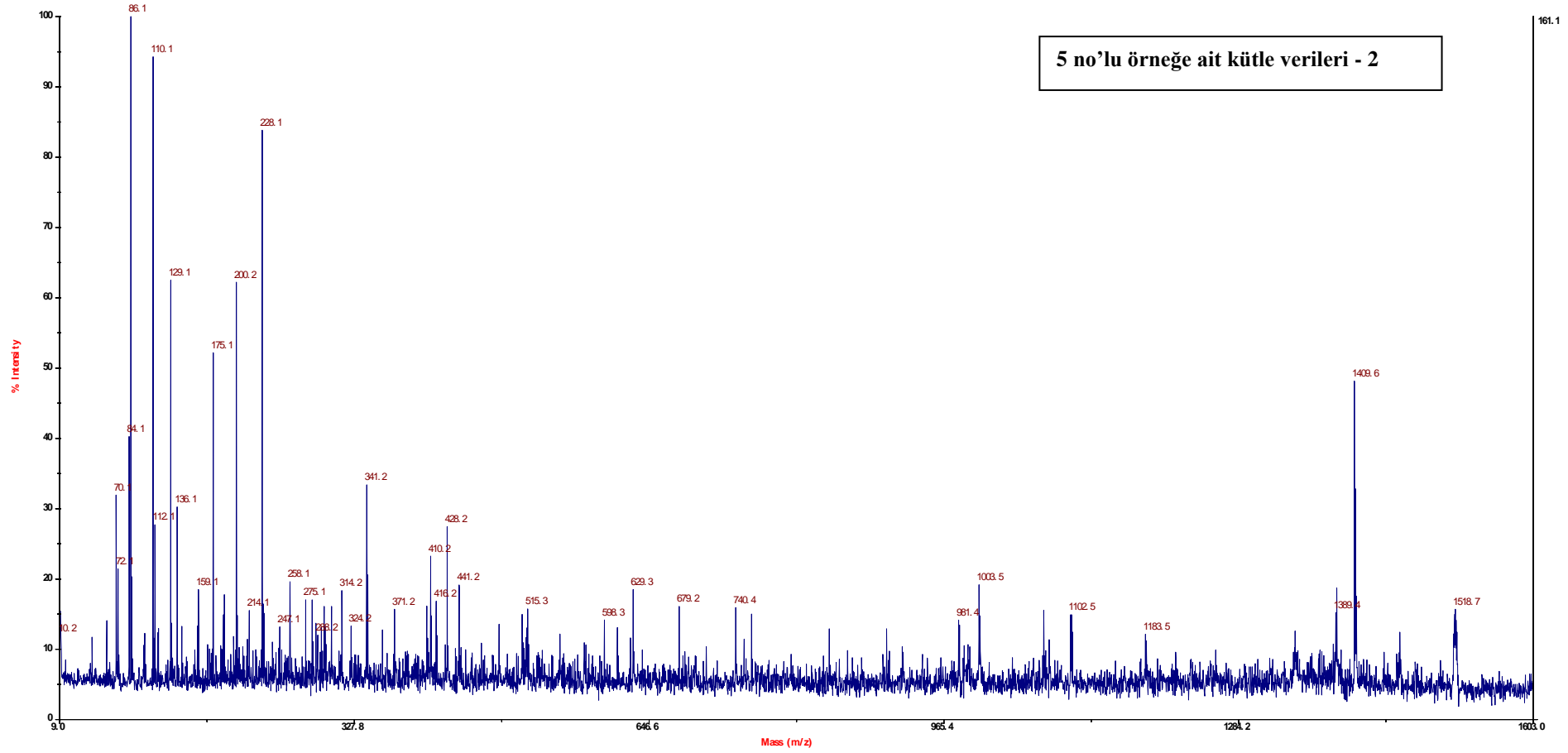
4 no'lu örneğe ait kütle verileri - 3



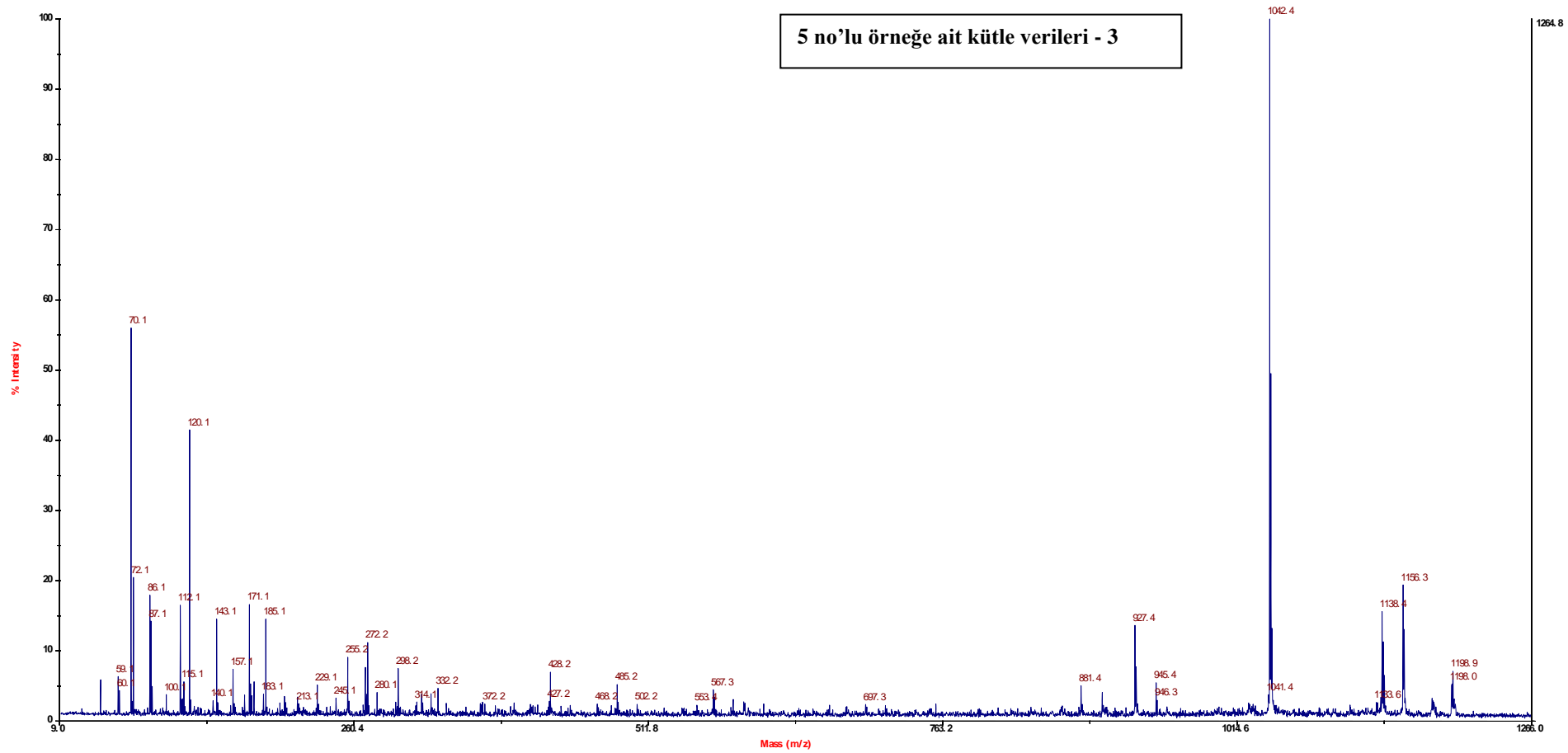




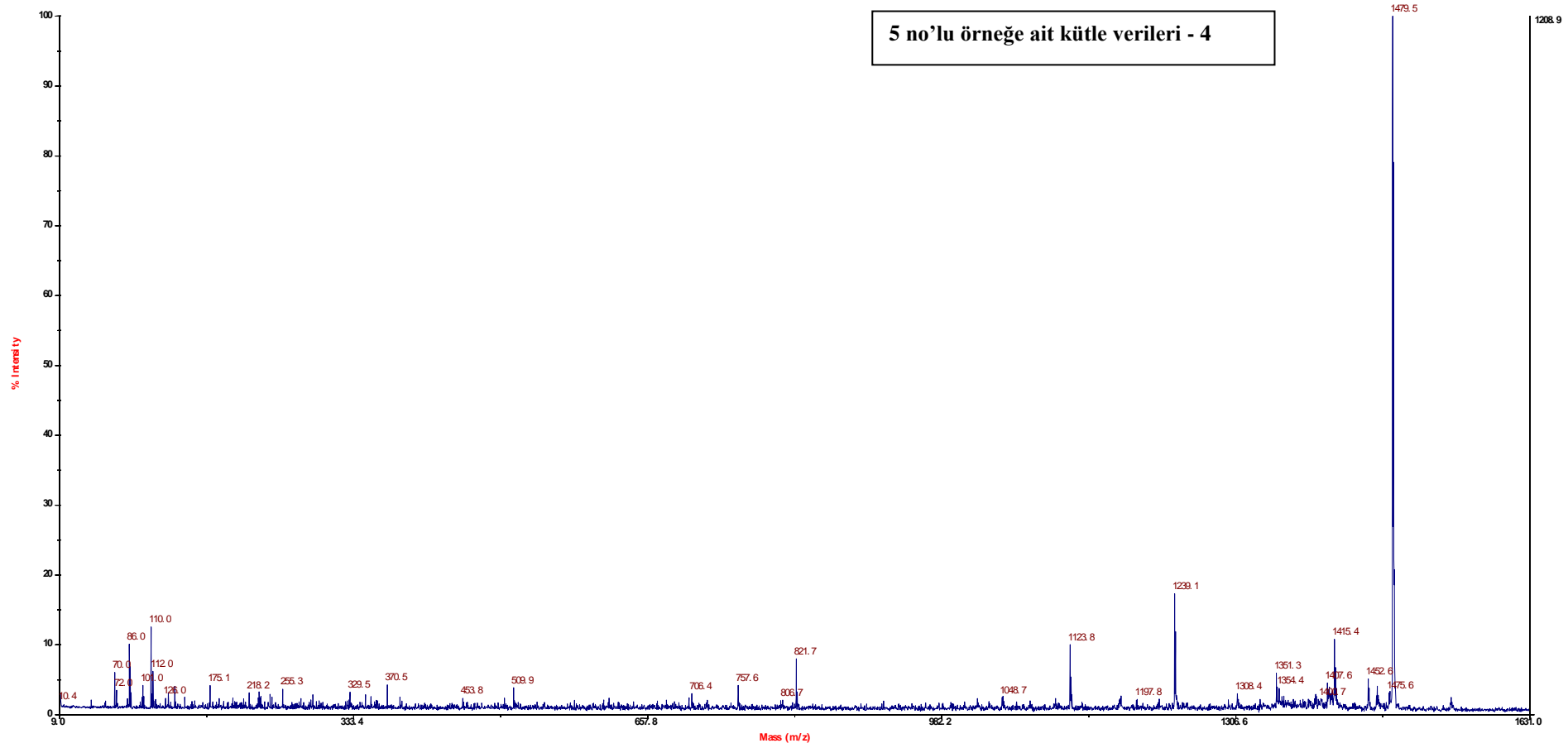
5 no'lu örneğe ait kütle verileri - 1

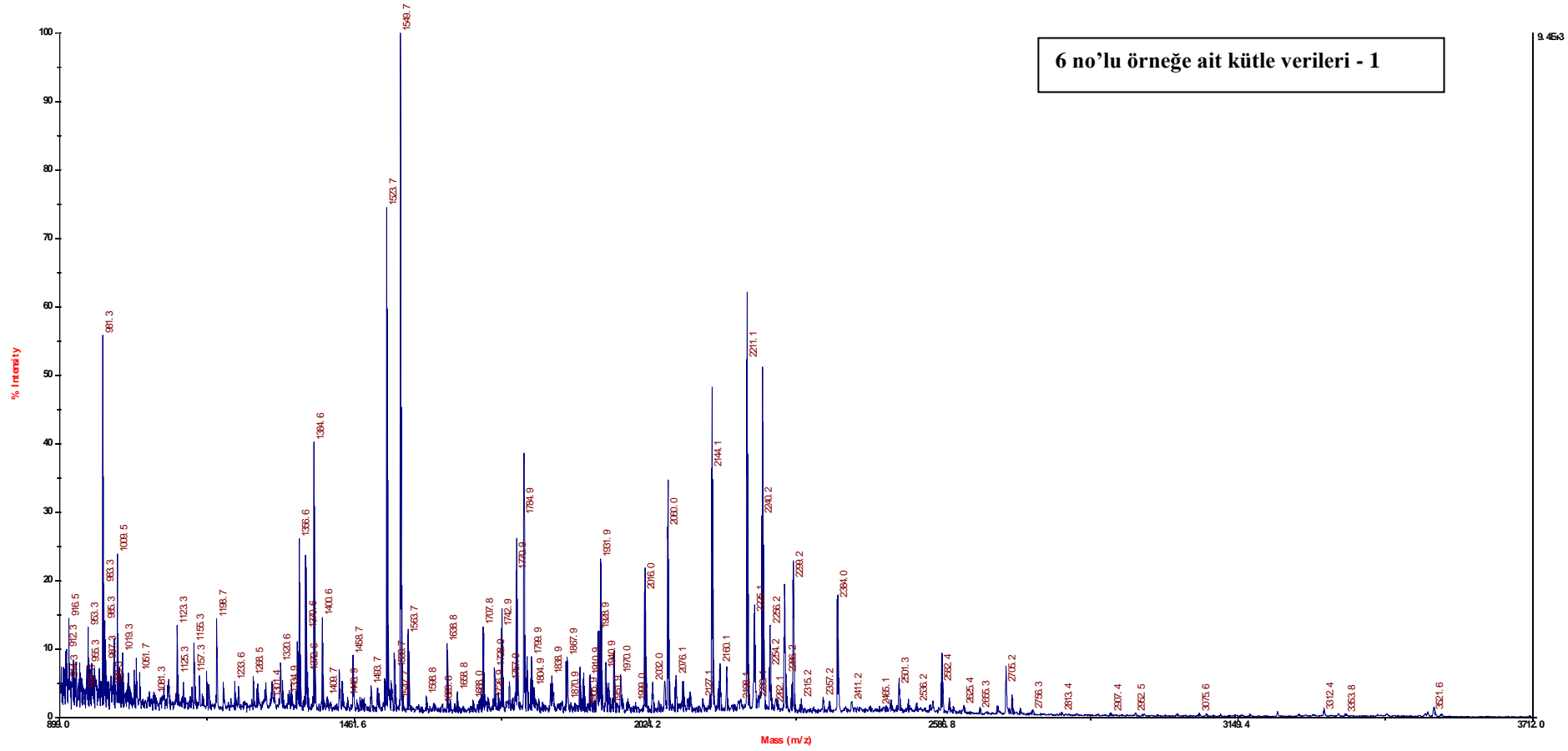


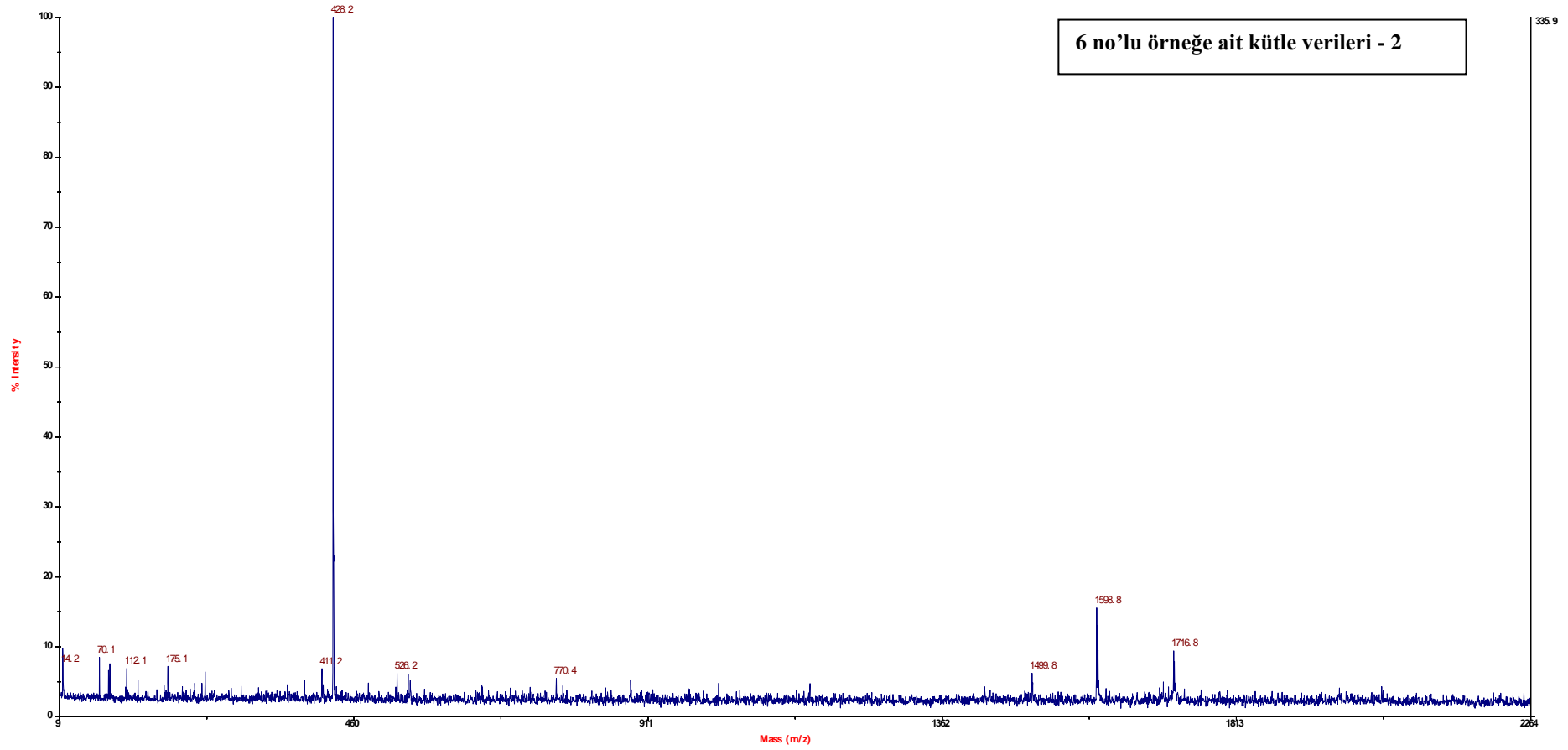
5 no'lu örneğe ait kütle verileri - 3

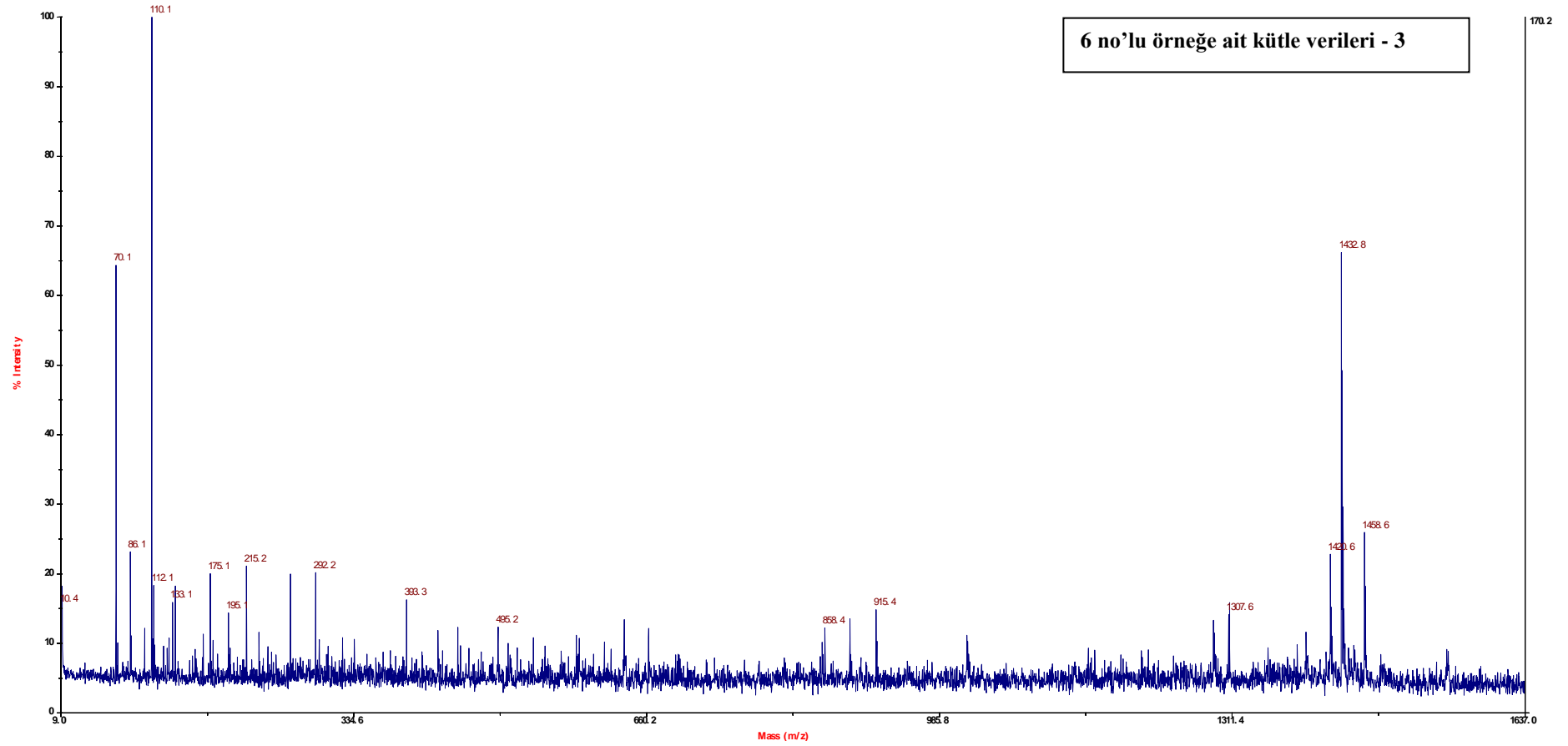


5 no'lu örneğe ait kütle verileri - 4

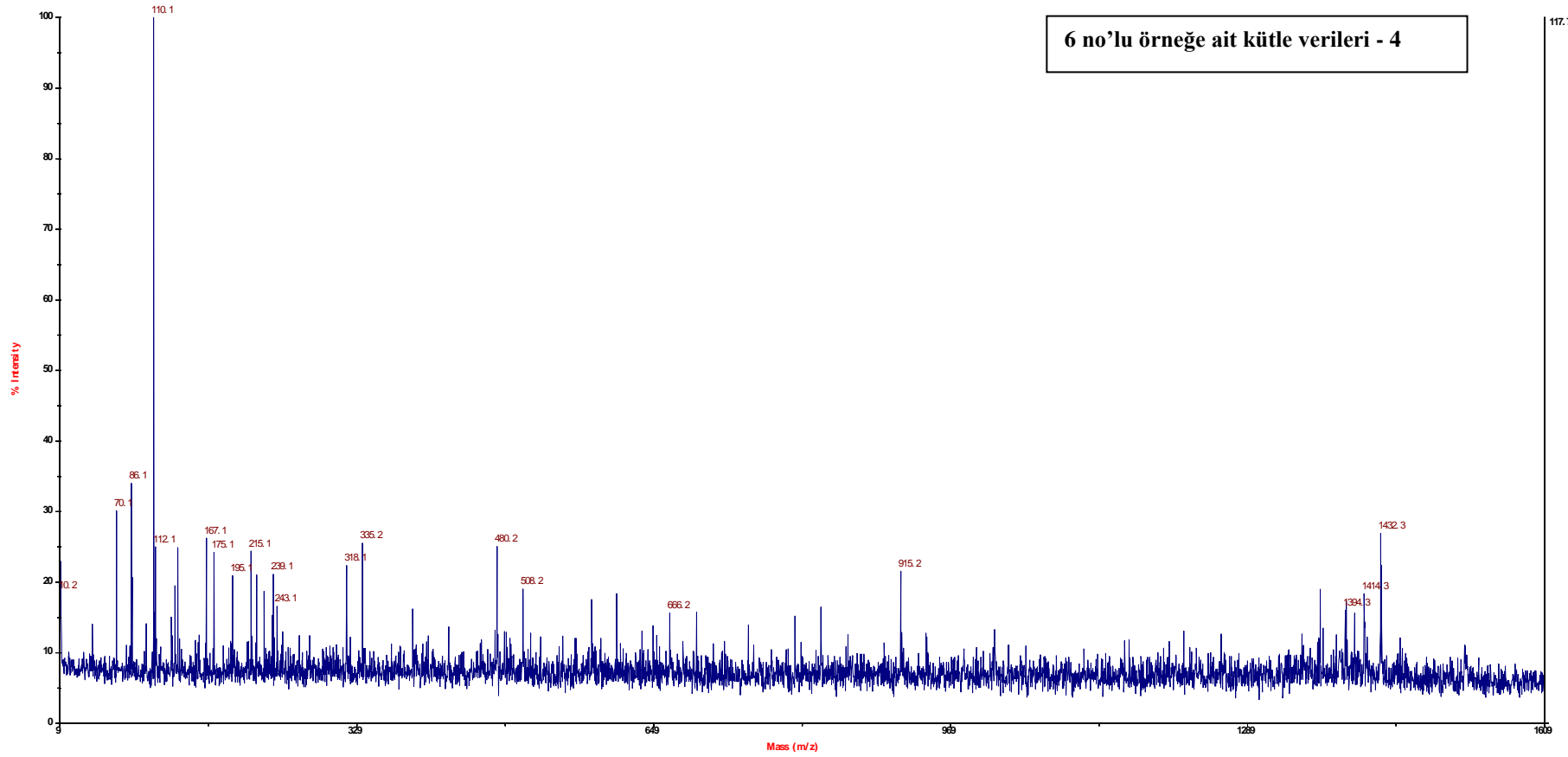




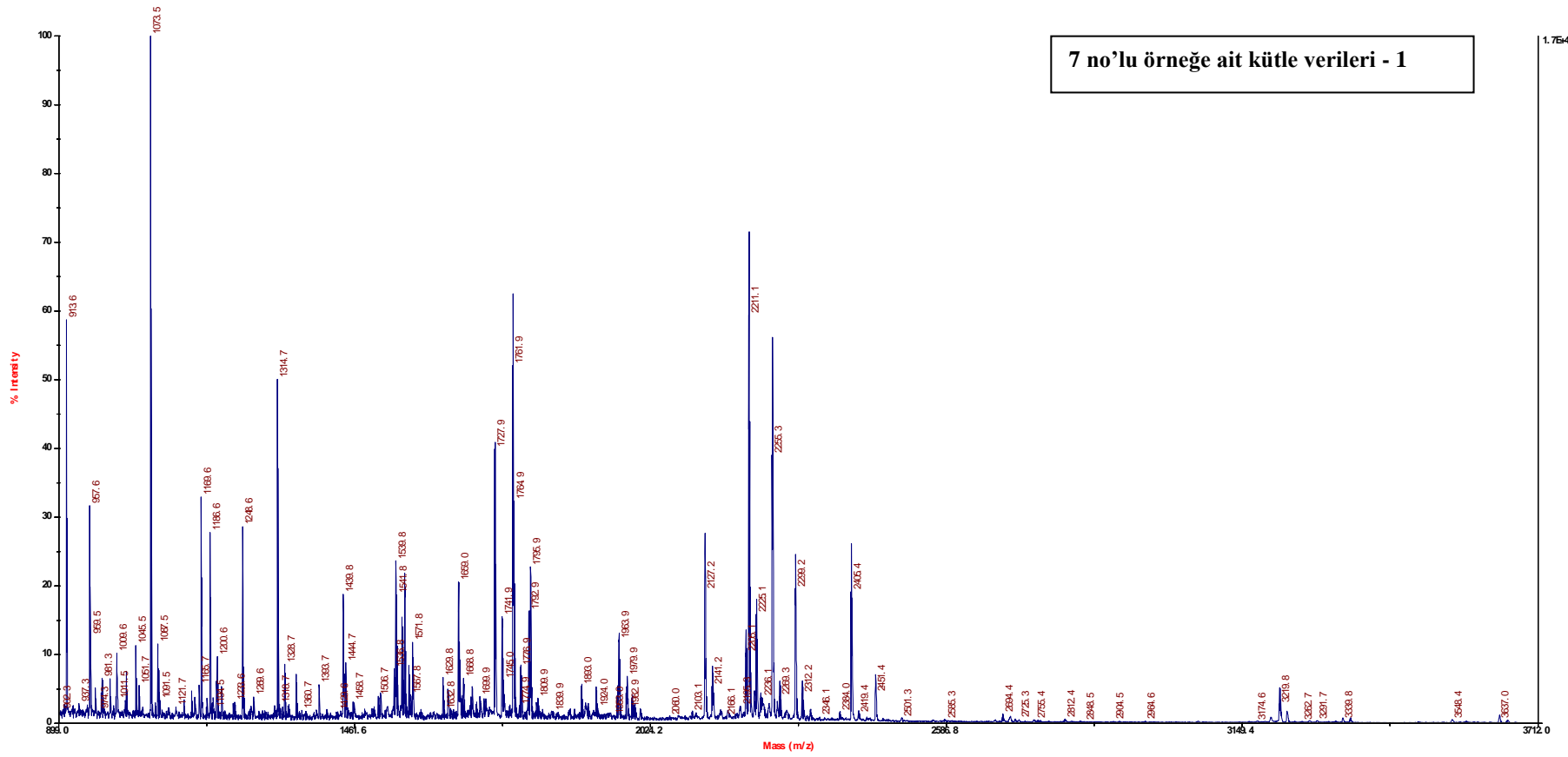




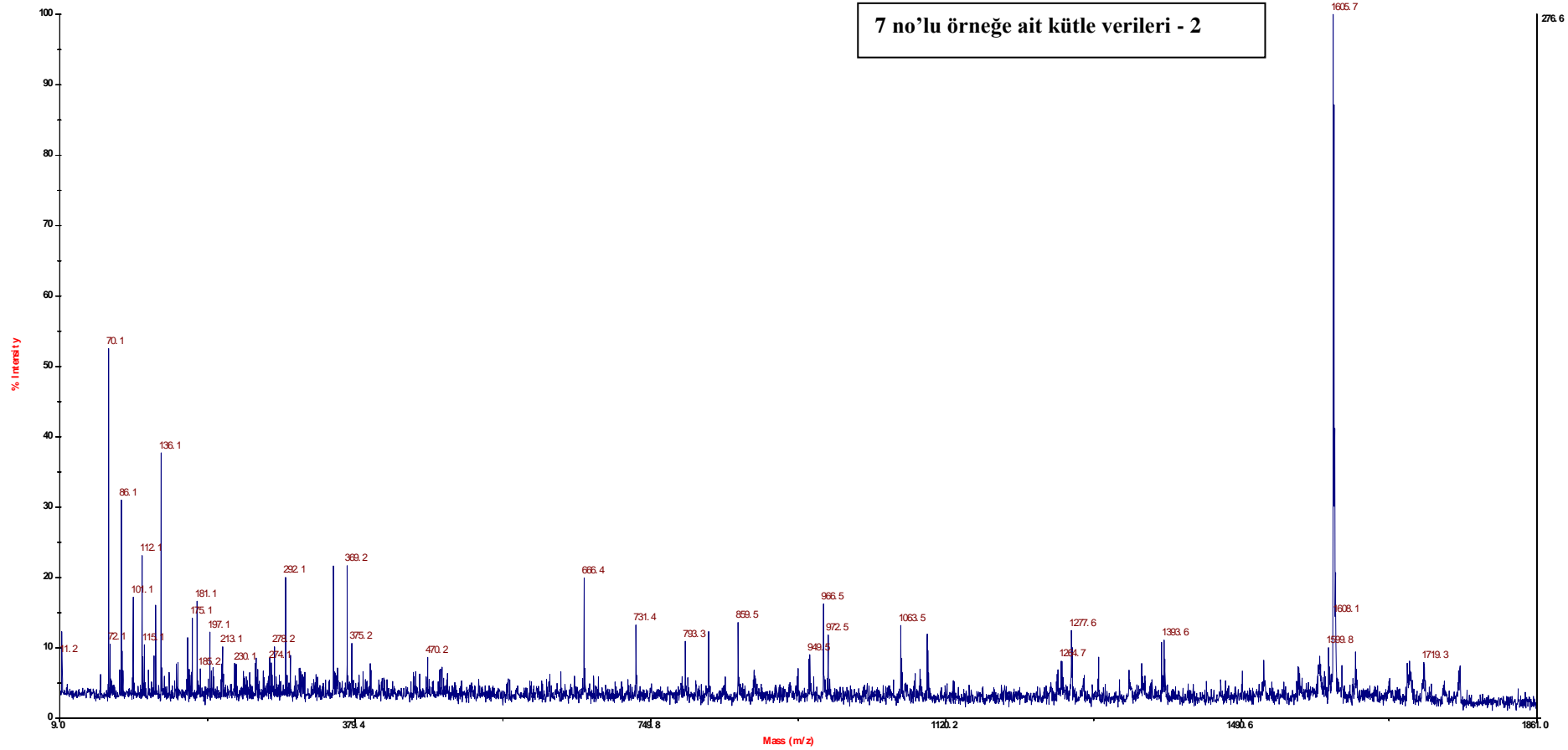
6 no'lu örneğe ait kütle verileri - 3

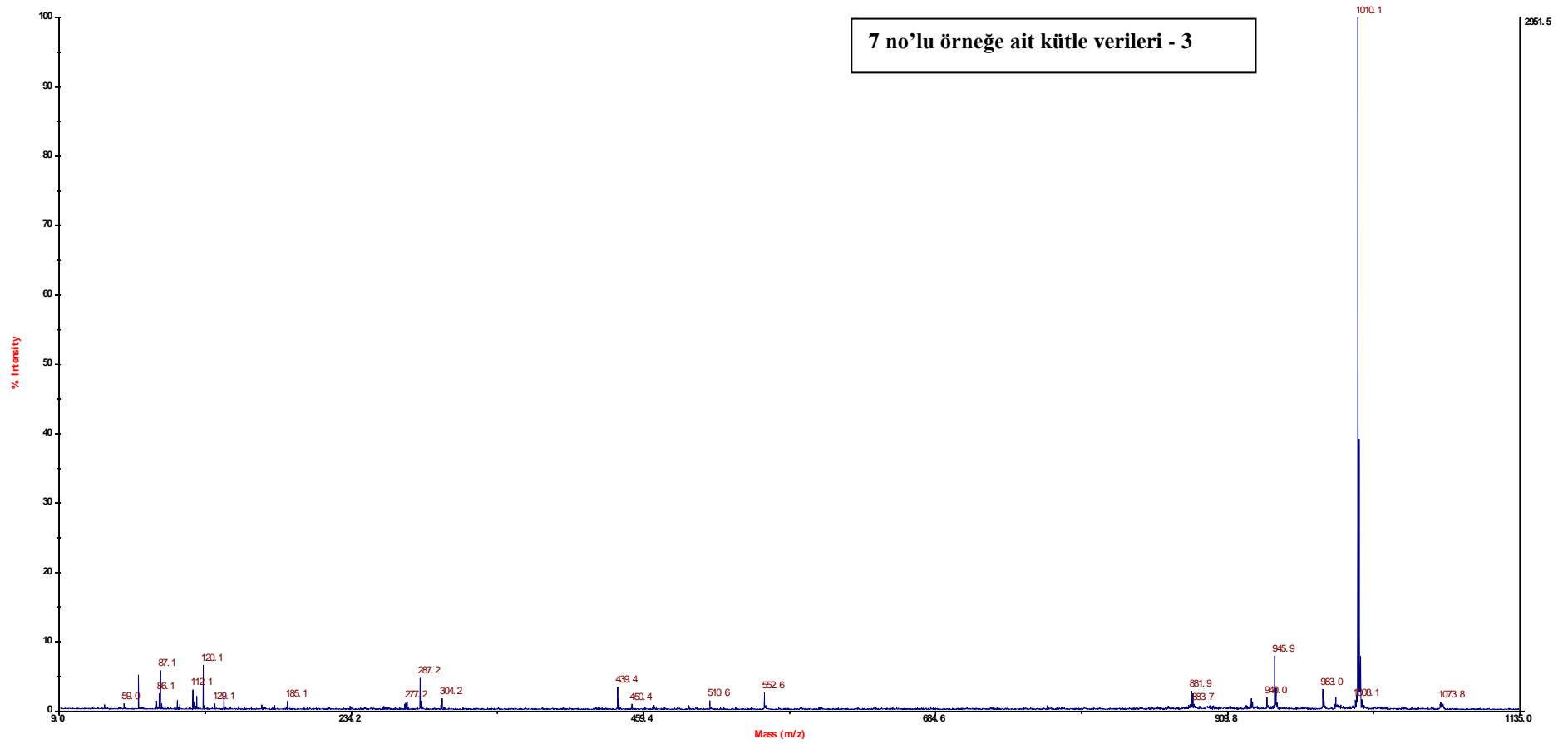


6 no'lu örneğe ait kütle verileri - 4

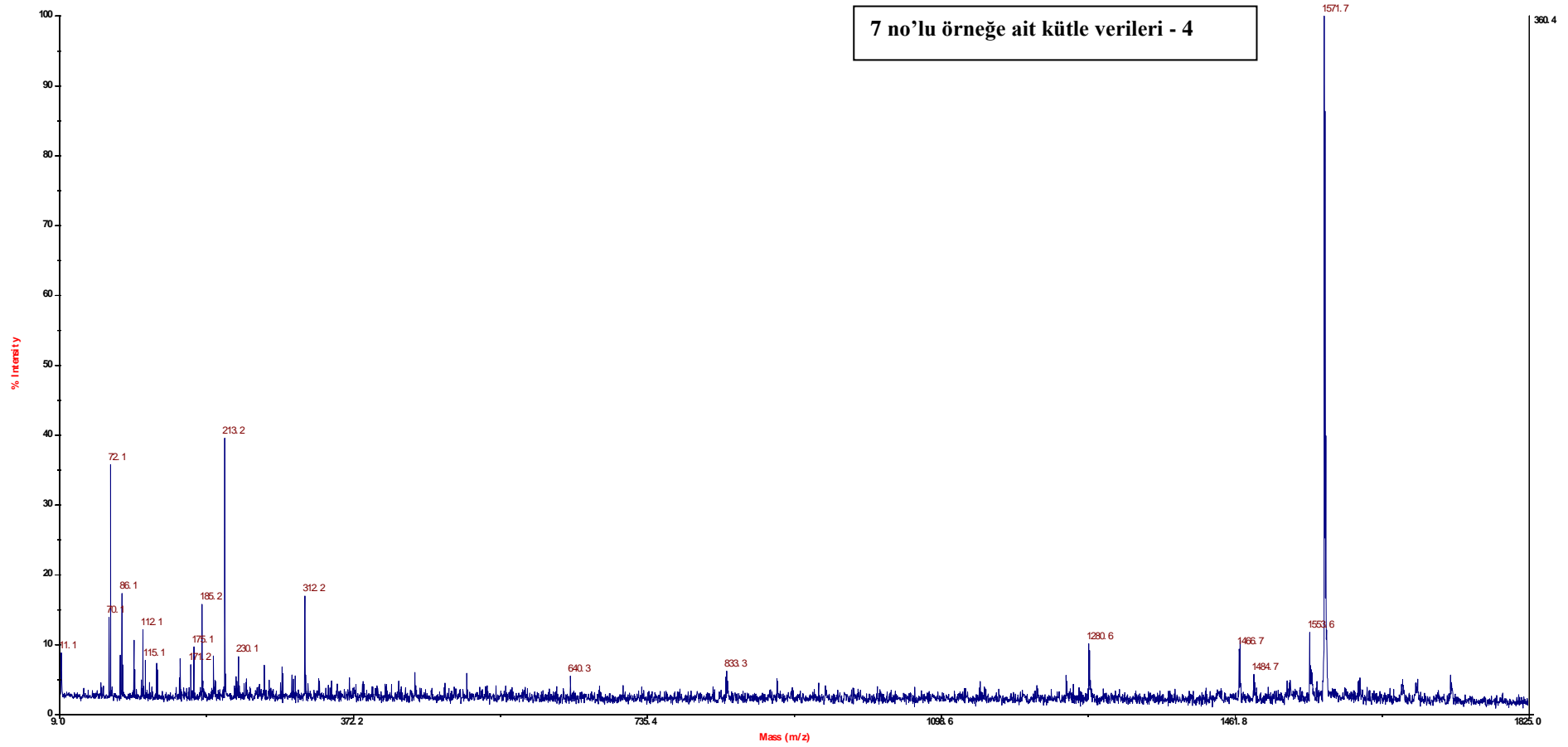


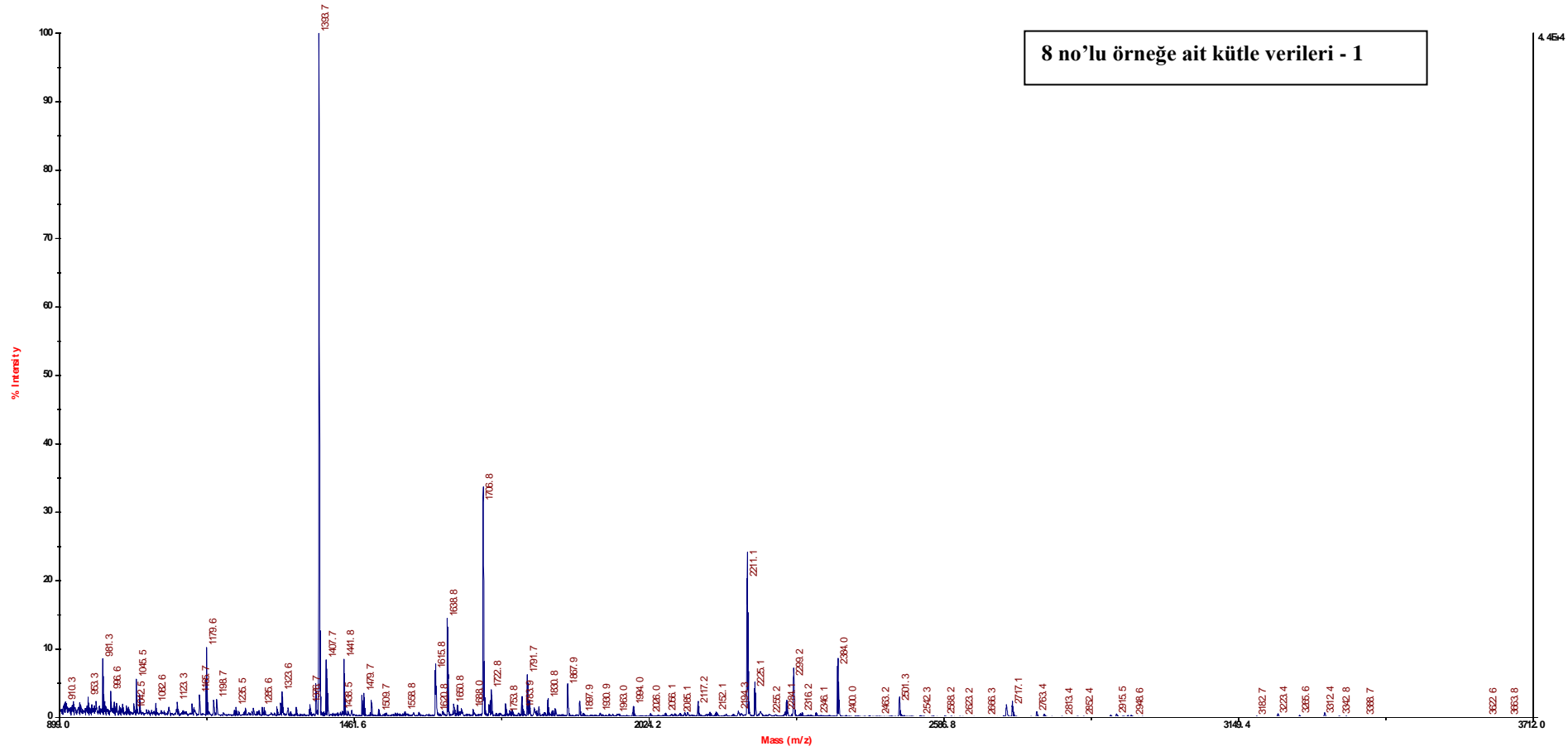
7 no'lu örneğe ait kütle verileri - 2

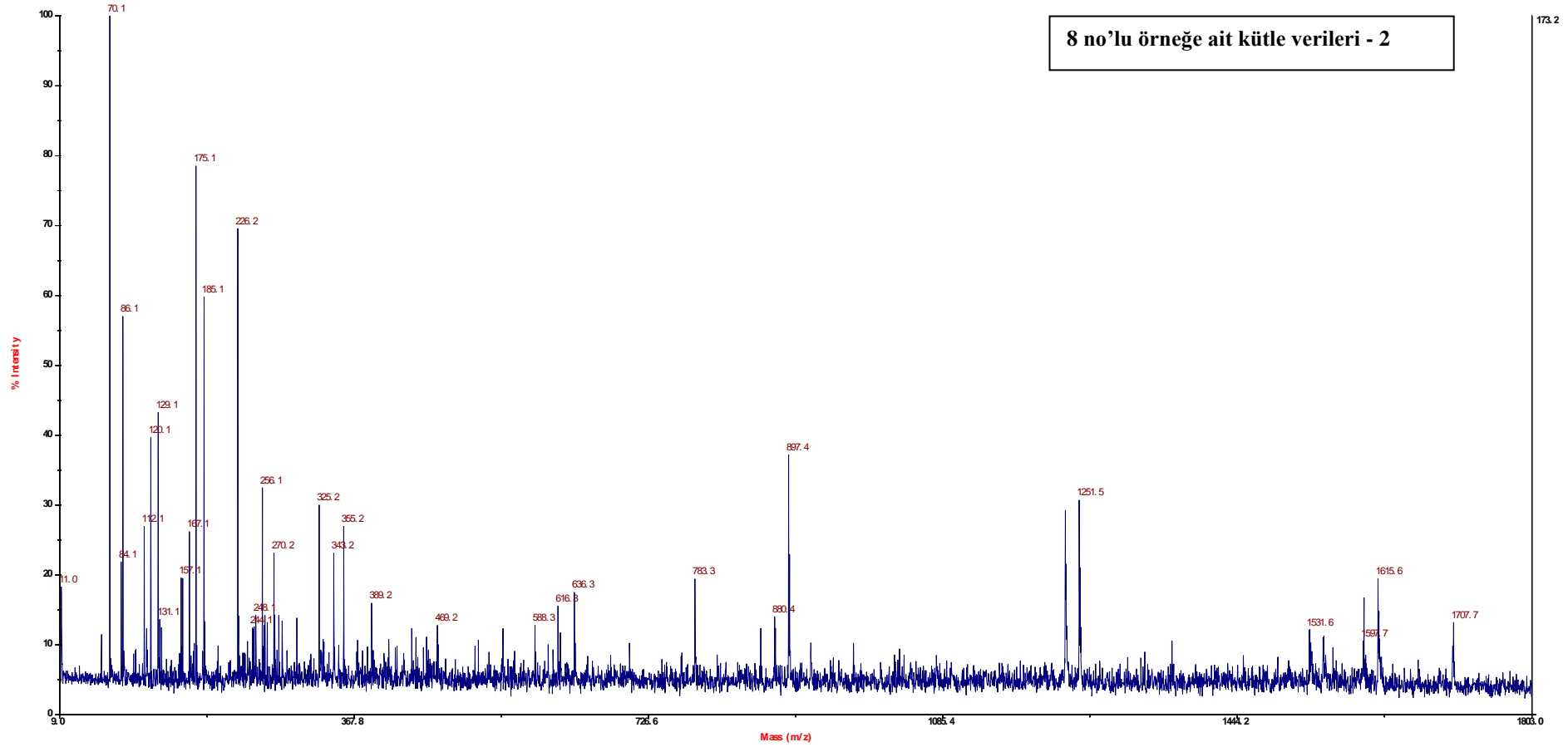


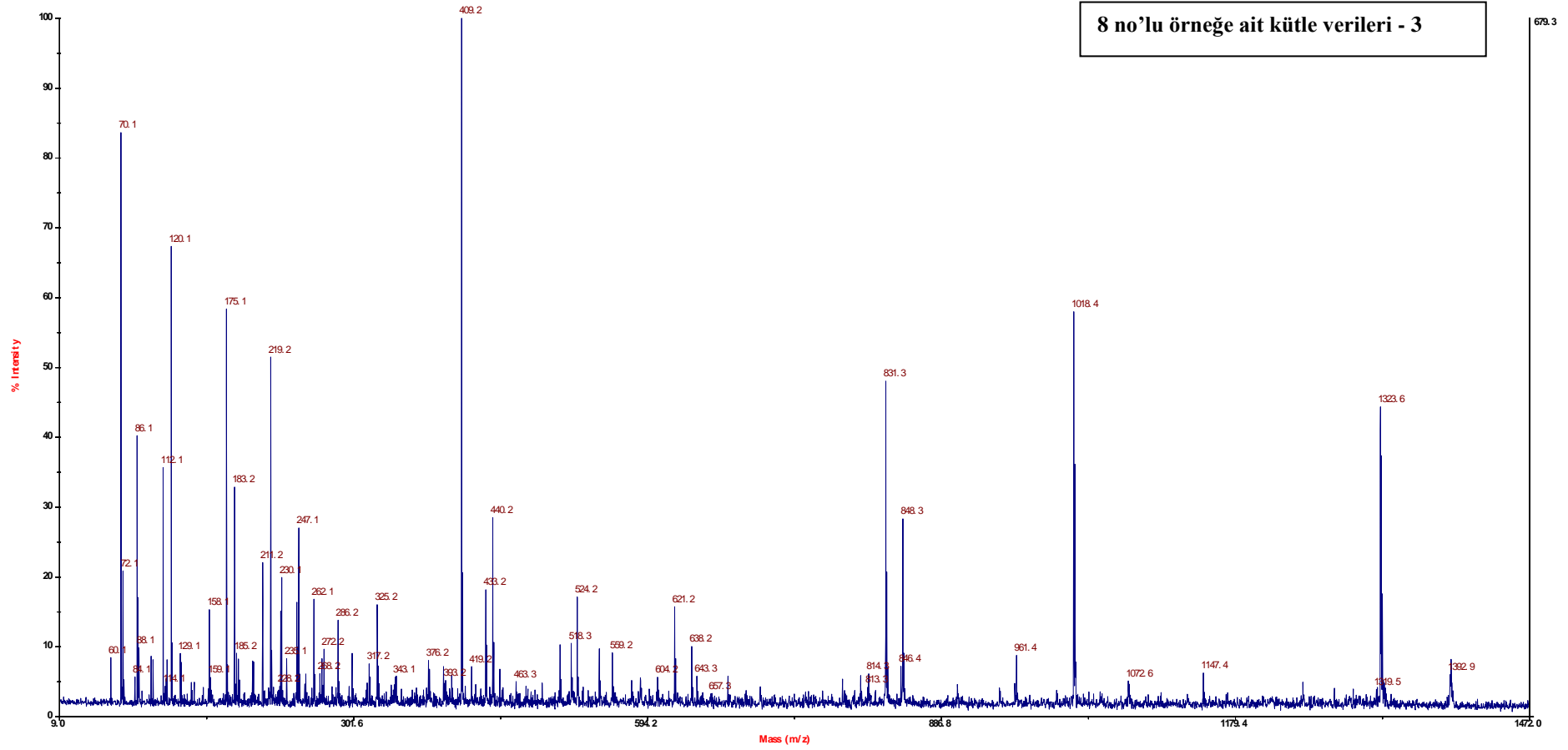


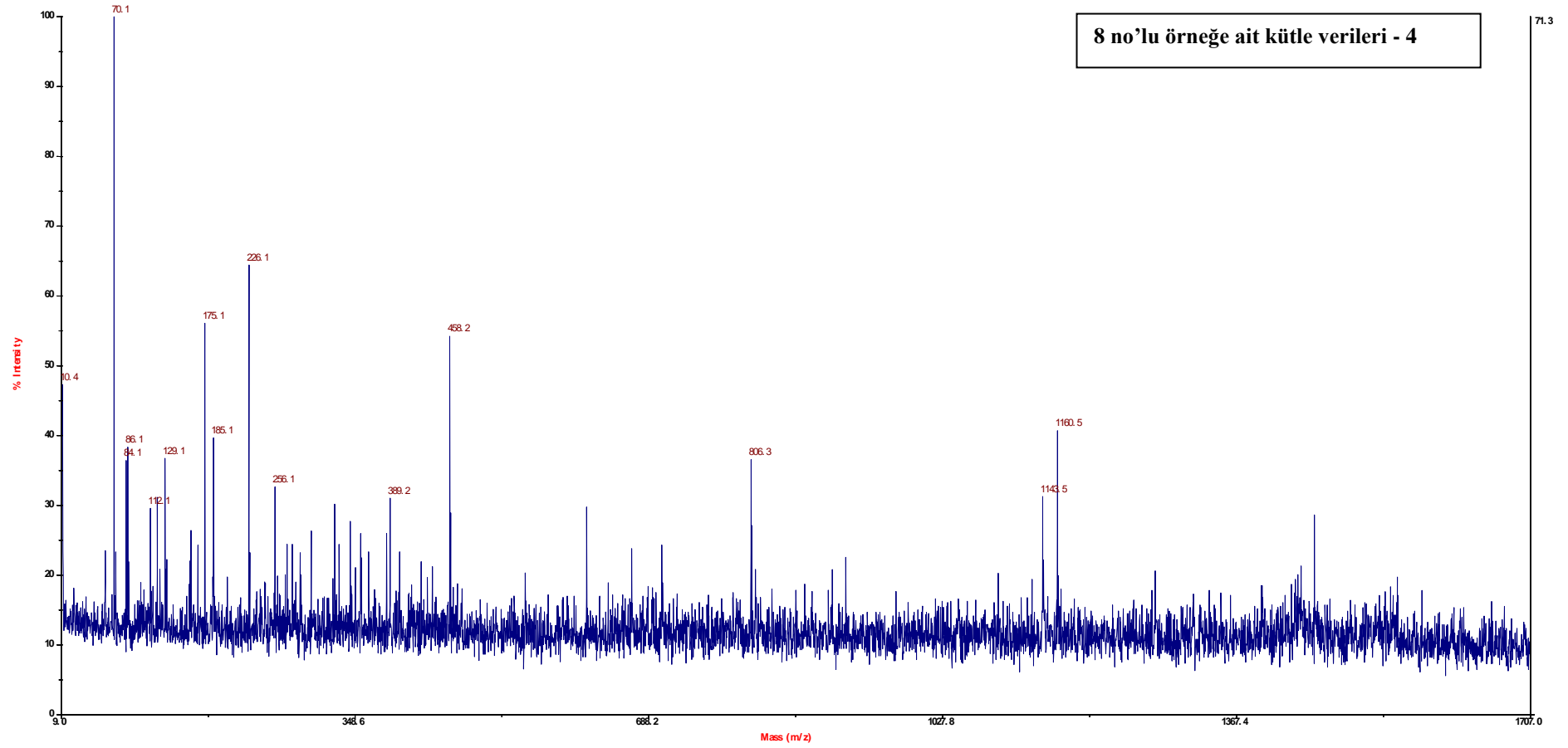
7 no'lu örneğe ait kütle verileri - 4











## EK. 2. TEZ METNİNDE GEÇEN TERİMLERİN AÇIKLAMALARI

**Adrenerjik:** Adrenalin (epinefrin) ve/veya noradrenalin (norepinefrin) ile ilgili olan.

**Akson:** Sinir hücreninin gövde dışında kalan kısmı. Uyarıları elektriksel ve kimyasal iletebilen uzun uzantıdır.

**Akut:** Hızlı bir şekilde başlayan veya kısa süreli hastalık türü.

**Alzheimer Hastalığı:** Günlük yaşamsal aktivitelerde azalma ve bilişsel yeteneklerde bozulma ile karakterize, nöropsikiyatrik semptomların ve davranış değişikliklerinin eşlik ettiği nörodejenaratif bir hastalık.

**Ansefalit:** Merkezi sinir sisteminin virüslerden ileri gelen iltihabı.

**Ansefalopati:** Pek çok farklı rahatsızlık tarafından oluşturulabilen beyin fonksiyon bozukluğu sendromu.

**Antiepileptojenik:** Epilepsi tablosunun ortaya çıkmasına yol açacak gelişmeleri önleyen.

**Antikonvülzan:** Epilepsi olgusunda epileptik nöbetleri durduran..

**Apoptozis:** Çok hücreli canlılarda meydana gelen programlı hücre ölümü işlemi.

**Creutzfeldt-Jacob Hastalığı:** Ölümcül bir nörodejenaratif prion hastalığı.

**Dendrit:** Uyarıları hücre gövdesine taşıyan, sinir hücrelerinin dallanmış stoplazmik uzantıları, sinir hücresinin kısa olan uzantısı.

**Dendritik omurga:** Nöron dendritlerinden küçük membran çıkıntılarıdır.

**Diken:** Süresi 70 ms olan EEG dalgasıdır. 50-80 ms arasında farklı bilgilere de rastlanır.

**Diken-dalga (spike and wave) kompleksi:** Süresi 70-200 ms kadar olan bir diken ile süresi 200-500 ms olan bir dalga çiftine verilen ad.

**Down Sendromu:** Genetik düzensizlik sonucu insanda fazladan bir 21. kromozomun bulunması durumu ve bunun sonucu olarak ortaya çıkan tabloya verilen isim.

**Elektroensefalografi (EEG):** Beyin dalgaları aktivitesinin elektriksel yöntemle izlenmesini ölçen yöntem.

**Epidemiyoloji:** Toplumdaki hastalık, kaza ve sağlıkla ilgili durumların dağılımını, görülme sıklıklarını ve bunları etkileyen belirteçleri inceleyen bir tıp bilimi dalıdır.

**Epileptojenik:** Epilepsi meydana getirebilme özelliği olan.

**Etiyoloji:** Hastalığın sebebi ile ilgili yapılan çalışmalar.

**Filogenetik:** Genomik bilgi kullanılarak canlılar arasındaki ilişkileri ve moleküler düzeydeki benzerlikleri anlamlandırmaya çalışan biyolojik bilim dalıdır.

**Fonksiyonel anatomi:** Nöbetlerin ortaya çıkışının ve yayılmasının temeli olan fiziksel ve fizyolojik koşulları anlatan terim.

**Frontal Lob:** Beynin ön bölgesinde yerleşmiş olan bilinçli düşünme ile ilgili beyin bölgesi.

**GABAerjik:** Gama amino bütirik asit (GABA) etkisi ile veya GABA'nın transmitter olarak görev aldığı nöral ya da metabolik yollar ile ilgili olan.

**Glutamerjik:** Glutamat etkisi ile veya glutamatın transmitter olarak görev aldığı nöral ya da metabolik yollar ile ilgili olan.

**İdiyopatik:** Kendiliğinden veya nedeni bilinmeyen belirsiz bir sebepten dolayı ortaya çıkan.

**İnbred:** En az 5 nesil boyunca kendi aralarında çiftleştirilmiş deney hayvanlarından üretilmiş olan.

**İnsidans:** Belirli bir hastalığa ait yeni vakaların ortaya çıkış sıklığı.

**Kaotropik ajan:** Protein, DNA veya RNA gibi makromoleküllerin üç boyutlu yapılarını bozan denatüre edici ajan

**Klonik kasılma:** Kasların hızla birbirini takip eden ve kısa süren kasılmalarıdır

**Kolinerjik:** Nörotransmitter olarak asetil kolin kullanan sinir hücreleri veya lifleri ile ilgili

**Konjenital:** Doğuştan gelen rahatsızlıklar

**Konvülsiyon:** Kasların irade dışı, amaçsız, genellikle bilinç kaybı ile birlikte olan tonik veya klonik kontraksiyon nöbetlerine denir.

**Kortikal:** Korteks ile ilgili

**Kronik:** Vücudun herhangi bir parçasında var olan, uzun süreli devam eden, kimi zaman hayat boyu düzelmeyen ve tedavi imkânları daha sınırlı kabul edilen hastalık türü.

**Merkezi Sinir Sistemi:** Sinir sisteminin, bilateriyal hayvanların tüm vücut parçalarının aktivitesini kontrol eden bölümü. Omurgalılarda beyin zarı ile çevrelenmiş bulunan beyin ve omurilikten oluşur.

**Miyelin:** Genellikle bir nöronun yalnızca aksonunu kaplayan yalıtkan madde. Farklı hücrelerce oluşturulan miyelinlerin kimyasal yapıları ve konfigürasyonları farklıdır ancak yalıtkan özellikleri korunmuştur.

**Miyelinizasyon:** Bazı sinir hücrelerinin aksonların etrafında sinir impulslarının daha hızlı hareket etmesini sağlamak için bir miyelin tabakası oluşturmak üzere değişmesi veya olgunlaşması.

**Multipl Skleroz:** Nörotravmanın ardından genç erişkinlerde en sık görülen nörolojik bozukluk. Hastalığın nedeni daha tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, genetik ve çevresel etkenlerin birleşimiyle ortaya çıktığına inanılmaktadır. Çeşitli tipleri olsa da, tümü merkezi sinir sisteminin enflamasyonu ile nitelenmekte ve miyelinsizleşme (sinir dokusunu saran özel miyelin proteinin bağışıklık sisteminde yok edilmesi) ile ilerlemektedir.

**Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri:** Çeşitli nöronların plazma membranlarında ve nöromuskular bağlantıların postsinaptik bölgelerinde ligant kapılı iyon kanalları oluşturan kolinerjik reseptörler.

**Nörodejeneratif:** Sinir dokusunun bozulumu ile ilgili

**Nöronal Göç:** Nöronların beyindeki orijinal yerlerinden beyindeki son yerleşim yerlerine hareket etmesi.

**Oksipital Lob:** Beynin arka bölgesine yerleşmiş görsel işlem merkezi.

**Osilatör:** Periyodik/tekrarlanan bir davranış içinde bulunan herhangi bir sistem bir osilatördür.

**Otomatizma:** Bilincin sislenmesi sırasında ortaya çıkan, az veya çok koordine istemsiz hareketlerdir. Nöbet sırasında ya da nöbetten sonra görülebilir.

**Otonom:** Otonomik sinir sisteminin kontrolünde olan

**Outbred:** Kendi aralarında yakın akrabalık taşımayan deney hayvanlarından üretilmiş olan.

**Parietal Lob:** Oksipital lobun üzerinde ve frontal lobun arkasında yerleşmiş olan somatosensoriyel bilgilerin işlenmesinden sorumlu beyin bölgesi.

**Parkinson Hastalığı:** Beynin alt kısımlarındaki gri madde çekirdeklerinin bozukluğuna bağlı bir sinir sistemi hastalığıdır.

**Patojenez:** Kimyasal, fiziksel veya mikrobiyolojik ajanların sebep olduğu, hücrelerin fonksiyon ve/veya yapısındaki bir dizi değişikliğin sonucunda hastalık gelişmesi sırasındaki tüm süreç.

**Perioral:** Ağız kısmını çevreleyen.

**Postiktal dönem:** Grand mal epilepsi nöbeti geçiren kişide, nöbet sonrasında beliren serin uyku, başağrısı gibi bulguların saptandığı dönem.

**Postmortem:** Ölüm sonrası.

**Prevalans:** Belli bir yer ve zamanda meydana gelen aynı türden belli vaka sayısı

**Romatoid Artrit:** Bağışıklık sisteminin eklemlere saldırmasına yol açan kronik, enflamatuvar bir otoimmün bozukluk

**Semptomatik:** O rahatsızlık için belirli semptomları gösteren.

**Serebral:** Beyinle ilgili.

**Sinaps:** Nöronların (sinir hücrelerinin) diğer nöronlara ya da kas veya salgı bezleri gibi nöron olmayan hücrelere mesaj iletmesine olanak tanıyan özelleşmiş bağlantı noktaları.

**Sinaptojenez:** Sinapsların oluşumu.

**Spazm:** Kasların istek dışı ani kasılmasıdır. Sebebi çoğunlukla, sinir hücrelerinin tahribi veya kas hücrelerinin iltihaplanmasıdır.

**Şizofreni:** Düşünüş, duyuş ve davranışlarda önemli bozuklukların görüldüğü, hastanın kişiler arası ilişkilerden ve gerçeklerden uzaklaşarak kendi dünyasında yaşadığı, genellikle gençlik çağında başlayan bir ruhsal hastalık

**Temporal Lob:** Temporal korteks ya da lobus temporalis olarak da adlandırılır. Konuşma, hafıza ve duymanın da dahil olduğu birçok görevi bulunan, beynin yan taraflarında yerleşimli telensefalon bölgesi.

**Teröpatik:** Tedaviye ait, tedavi edici.

**Tonik kasılma:** Çok şiddetli ve uzun süreli kontraksiyonlardır.

## KAYNAKLAR

- Acharya, M.M.; Hattiangady, B.; Shetty, A.K.: "Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy", *Progress in Neurobiology*, 84 (2008) 363-404.
- Acharya, M.M.; Katyare, S.S.: "Structural and functional alterations in mitochondrial membrane in picrotoxin-induced epileptic rat brain", *Experimental Neurology*, 192 (2005) 79-88.
- Aitken, A.; Collinge, D.B.; van Heusden, B.P.; Isobe, T.; Roseboom, P.H.; Rosenfeld, G.; Soll, J.: "14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins", *Trends in Biochemical Sciences*, 17 (1992) 498-501.
- Aitken, A.: "14-3-3 proteins: a historic overview", *Seminars in Cancer Biology*, 16 (2006) 162-72.
- Alonso-Nanclares, L.; Gonzalez-Soriano, J.; Rodriguez, J.R.; DeFelipe, J.: "Gender differences in human cortical synaptic density", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2008) 14615-14619.
- Anderson, L.; Anderson, N.G.: "High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (1977) 5421-5425.
- Anderson, L.; Seilhamer, J.: "A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver", *Electrophoresis*, 18 (1997) 533-537.
- Bambal, G.; Çakıl, D.; Ekici, F.: "Deneyisel Epilepsi Modelleri", *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2 (2011) 118-123.
- Behrmann, M.; Geng, J.J.; Shomstein, S.: "Parietal cortex and attention", *Current Opinion in Neurobiology*, 14 (2004) 212-217.
- Berg, D.; Holzmann, C.; Riess, O.: "14-3-3 proteins in the nervous system", *Nature Reviews. Neuroscience*, 4 (2003) 752-762.
- Berg, A.T.; Berkovic, S.F.; Brodie, M.J.; Buchhalter, J.; Cross, J.H.; van Emde Boas, W.; Engel, J.; French, J.; Glauser, T.A.; Mathern, G.W.; Moshe, S.L.; Nordli, D.; Plouin, P.; Scheffer, I.E.: "Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009", *Epilepsia*, 51 (2010) 676-685.
- Beyenburg, S.; Bauer, J.; Reuber, M.: "New drugs for the treatment of epilepsy: a practical approach", *Postgraduate Medical Journal*, 80 (2004) 581-587.

- Biervert, C.; Schroeder, B.C.; Kubisch, C.; Berkovic, S.F.; Propping, P.; Jentsch, T.J.; Steinlein, O.K.: "A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy", *Science*, 279 (1998) 403-406.
- Bolayır, E.; Kuğu, N.; Akyüz, A.; Topalkara, K.: "Jeneralize tonik klonik nöbet ile yalancı nöbetlerin ayırımında kas enzimleri ve prolaktinin önemi", *Epilepsi*, 7 (2001) 81-83.
- Bradford, M.M.: "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 248-54.
- Burneo, J.G.; Tellez-Zenteno, J.; Wiebe, S.: "Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence", *Epilepsy Research*, 66 (2005) 63-74.
- Butterfield, D.A.: "Proteomics: a new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain", *Brain Research*, 1000 (2004) 1-7.
- Camerino, D.C.; Tricarico, D.; Desaphy, J.F.: "Ion channel pharmacology", *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 4 (2007) 184-98.
- Chen, Y.; Zhang, H.; Xu, A.; Li, N.; Liu, J.; Liu, C.; Lv, D.; Wu, S.; Huang, L.; Yang, S.; He, D.; Xiao, X.: "Elevation of serum l-lactate dehydrogenase B correlated with the clinical stage of lung cancer", *Lung Cancer*, 54 (2006) 95-102.
- Claes, L.; Del-Favero, J.; Ceulemans, B.; Lagae, L.; Van Broeckhoven, C.; De Jonghe, P.: "De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy", *American Journal of Human Genetics*, 68 (2001) 1327-1332.
- Coenen, A.M.L.; van Luijtelaar, E.L.J.M.: "Genetic Animal Models for Absence Epilepsy: A Review of the WAG/Rij Strain of Rats", *Behavior Genetics*, 33 (2003) 635-655
- Colantonio, D.A.; Chan, D.W.: "The clinical application of proteomics", *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 357 (2005) 151-158.
- Combi, R.; Dalpra, L.; Tenchini, M.L.; Ferini-Strambi, L.: "Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy--a critical overview", *Journal of Neurology*, 251 (2004) 923-934.
- Danis, O.; Demir, S.; Gunel, A.; Aker, R.G.; Gulcebi, M.; Onat, F.; Ogan, A.: "Changes in intracellular protein expression in cortex, thalamus and hippocampus in a genetic rat model of absence epilepsy", *Brain Research Bulletin*, 84 (2011) 381-388.

- Daniş, O.: "Genetik Absans Epilepsi (GAERS) Deneysel modelinde talamus ve korteks proteomlarının profilendirilmesi", *Doktora Tezi*, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, (2010) 4-36.
- Danover, L.; Deransart, C.; Depaulis, A.; Vergnes, M.; Marescaux, C.: "Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat", *Progress in Neurobiology*, 55 (1998) 27-57.
- de Bittencourt, P.R.; Adamolekun, B.; Bharucha, N.; Carpio, A.; Cossio, O.H.; Danesi, M.A.; Dumas, M.; Meinardi, H.; Ordinario, A.; Senanayake, N.; Shakir, R.; Sotelo, J.: "Epilepsy in the tropics: I. Epidemiology, socioeconomic risk factors, and etiology", *Epilepsia*, 37 (1996) 1121-1127.
- Demir, S.: "Genetik Absans Epilepsi (GAERS) Deneysel modelinde hipokampus proteomlarının profilendirilmesi", *Doktora Tezi*, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, (2007) 3-24.
- Douglas, R.M.; Lai, J.C.; Bian, S.; Cummins, L.; Moczydlowski, E.; Haddad, G.G.: "The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is present in the inner mitochondrial membrane of rat brain", *Neuroscience*, 139 (2006) 1249-1261.
- Dufour, F.; Koning, E.; Nehlig, A.: "Basal levels of metabolic activity are elevated in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS): measurement of regional activity of cytochrome oxidase and lactate dehydrogenase by histochemistry", *Experimental Neurology*, 182 (2003) 346-352.
- Dunn, M.J.: "Studying heart disease using the proteomic approach", *Drug Discovery Today*, 5 (2000) 76-84.
- Echigoya, Y.; Sato, T.; Itou, T.; Endo, H.; Sakai, T.: "Molecular characterization and expression pattern of the equine lactate dehydrogenase A and B genes", *Gene*, 447 (2009) 40-50.
- Edgar, P.F.; Douglas, J.E.; Cooper, G.J.; Dean, B.; Kydd, R.; Faull, R.L.: "Comparative proteome analysis of the hippocampus implicates chromosome 6q in schizophrenia", *Molecular Psychiatry*, 5 (2000) 85-90.
- Edgar, P.F.; Schonberger, S.J.; Dean, B.; Faull, R.L.; Kydd, R.; Cooper, G.J.: "A comparative proteome analysis of hippocampal tissue from schizophrenic and Alzheimer's disease individuals", *Molecular Psychiatry*, 4 (1999) 173-178.
- Elger, C.E.; Schmidt, D.: "Modern management of epilepsy: a practical approach", *Epilepsy & Behavior : E&B*, 12 (2008) 501-539.
- Engel, J.: "Epilepsy in the world today: medical point of view", *Epilepsia*, 43 Suppl 6 (2002) 12-13.
- Eun, J.P.; Choi, H.Y.; Kwak, Y.G.: "Proteomic analysis of human cerebral cortex in epileptic patients", *Experimental & Molecular Medicine*, 36 (2004) 185-191.

- Fisher, R.S.; van Emde Boas, W.; Blume, W.; Elger, C.; Genton, P.; Lee, P.; Engel, J., Jr.: "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)", *Epilepsia*, 46 (2005) 470-472.
- Forsgren, L.; Beghi, E.; Oun, A.; Sillanpaa, M.: "The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review", *European Journal of Neurology : The Official Journal of The European Federation of Neurological Societies*, 12 (2005) 245-253.
- Fountoulakis, M.: "Application of proteomics technologies in the investigation of the brain", *Mass Spectrometry Reviews*, 23 (2004) 231-258.
- Fountoulakis, M.; Cairns, N.; Lubec, G.: "Increased levels of 14-3-3 gamma and epsilon proteins in brain of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome", *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 57 (1999) 323-335.
- Garcia Garcia, M.E.; Garcia Morales, I.; Matias Guiu, J.: "[Experimental models in epilepsy]", *Neurologia*, 25 (2010) 181-188.
- Görg, A.; Weiss, W.: *Proteomics Sample Preparation*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Almany, (2008).
- Görg, A.; Weiss, W.; Dunn, M.J.: "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics", *Proteomics*, 4 (2004) 3665-3685.
- Greenstein, B.; Greenstein, A.: "Color Atlas of Neuroscience: Neuroanatomy and Neurophysiology", *Thieme, New York, U.S.A.* (2000) 32.
- Han, D.; Ye, G.; Liu, T.; Chen, C.; Yang, X.; Wan, B.; Pan, Y.; Yu, L.: "Functional identification of a novel 14-3-3 epsilon splicing variant suggests dimerization is not necessary for 14-3-3 epsilon to inhibit UV-induced apoptosis", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396 (2010) 401-406.
- Hermeking, H.: "The 14-3-3 cancer connection", *Nature Reviews. Cancer*, 3 (2003) 931-943.
- Heron, S.E.; Scheffer, I.E.; Berkovic, S.F.; Dibbens, L.M.; Mulley, J.C.: "Channelopathies in idiopathic epilepsy", *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4 (2007) 295-304.
- Hewick, R.M.; Lu, Z.; Wang, J.H.: "Proteomics in drug discovery", *Advances in Protein Chemistry*, 65 (2003) 309-342.
- Higgins, G.A.; Breyse, N.; Undzys, E.; Derksen, D.R.; Jeffrey, M.; Scott, B.W.; Xin, T.; Roucard, C.; Bressand, K.; Depaulis, A.; Burnham, W.M.: "Comparative study of five antiepileptic drugs on a translational cognitive measure in the rat: relationship to antiepileptic property", *Psychopharmacology*, 207 (2010) 513-527.

- Hirsch, E.: "What are generalized seizures and epilepsies?", *Epilepsia*, 50 (2009) 21-21.
- Ikonomidou, C.; Turski, L.: "Antiepileptic drugs and brain development", *Epilepsy Research*, 88 (2010) 11-22.
- Inagawa, J.; Hirano, J.; Hattori, S.: "CyDye DIGE Fluor minimal dyes for tracking membrane protein abundance from epilepsy-induced rats: A clinical proteomic study.", *Life Science News*, 18 (2004) 16-18.
- Issaq, H.; Veenstra, T.: "Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives", *BioTechniques*, 44 (2008) 697-700.
- Kim, S.H.; Vlkolinsky, R.; Cairns, N.; Fountoulakis, M.; Lubec, G.: "The reduction of NADH ubiquinone oxidoreductase 24- and 75-kDa subunits in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease", *Life Sciences*, 68 (2001) 2741-2750.
- Kim, C.H.; Park, D.U.; Chung, A.S.; Zou, Y.; Jung, K.J.; Sung, B.K.; Yu, B.P.; Chung, H.Y.: "Proteomic analysis of post-mitochondrial fractions of young and old rat kidney", *Experimental Gerontology*, 39 (2004) 1155-1168.
- Kinter, M.; Sherman, N.E.: Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry. Wiley-Interscience, Inc., USA, (2000).
- Klein, J.P.; Khera, D.S.; Nersesyan, H.; Kimchi, E.Y.; Waxman, S.G.; Blumenfeld, H.: "Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy", *Brain Research*, 1000 (2004) 102-9.
- Krapfenbauer, K.; Berger, M.; Friedlein, A.; Lubec, G.; Fountoulakis, M.: "Changes in the levels of low-abundance brain proteins induced by kainic acid", *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268 (2001) 3532-3537.
- Laemmli, U.K.: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- Li, A.; Choi, Y.S.; Dziema, H.; Cao, R.; Cho, H.Y.; Jung, Y.J.; Obrietan, K.: "Proteomic profiling of the epileptic dentate gyrus", *Brain Pathology*, 20 (2010) 1077-1089.
- Loiseau, P.; Duche, B.; Pedespan, J.M.: "Absence epilepsies", *Epilepsia*, 36 (1995) 1182-1186.
- Lubec, G.; Krapfenbauer, K.; Fountoulakis, M.: "Proteomics in brain research: potentials and limitations", *Progress in Neurobiology*, 69 (2003) 193-211.
- Magner, M.; Szentivanyi, K.; Svandova, I.; Jesina, P.; Tesarova, M.; Honzik, T.; Zeman, J.: "Elevated CSF-lactate is a reliable marker of mitochondrial disorders in children even after brief seizures", *European Journal of Paediatric Neurology : EJPN : Official Journal of The European Paediatric Neurology Society*, 15 (2011) 101-108.

- Martins-de-Souza, D.; Maccarrone, G.; Wobrock, T.; Zerr, I.; Gormanns, P.; Reckow, S.; Falkai, P.; Schmitt, A.; Turck, C.W.: "Proteome analysis of the thalamus and cerebrospinal fluid reveals glycolysis dysfunction and potential biomarkers candidates for schizophrenia", *Journal of Psychiatric Research*, 44 (2010) 1176-1189.
- Mathew, J.; Paul, J.; Nandhu, M.S.; Paulose, C.S.: "Increased excitability and metabolism in pilocarpine induced epileptic rats: effect of *Bacopa monnieri*", *Fitoterapia*, 81 (2010) 546-551.
- Minarik, P.; Tomaskova, N.; Kollarova, M.; Antalík, M.: "Malate dehydrogenases--structure and function", *General Physiology and Biophysics*, 21 (2002) 257-265.
- Nersesyan, H.; Herman, P.; Erdogan, E.; Hyder, F.; Blumenfeld, H.: "Relative changes in cerebral blood flow and neuronal activity in local microdomains during generalized seizures", *Journal of Cerebral Blood flow and Metabolism : Official Journal of The International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24 (2004) 1057-1068.
- Neuhoff, V.; Stamm, R.; Eibl, H.: "Clear Background and Highly Sensitive Protein Staining with Coomassie Blue Dyes in Polyacrylamide Gels - a Systematic Analysis", *Electrophoresis*, 6 (1985) 427-448.
- Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W.: "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250", *Electrophoresis*, 9 (1988) 255-262.
- Neves, S.R.; Ram, P.T.; Iyengar, R.: "G protein pathways", *Science*, 296 (2002) 1636-1639.
- O'Farrell, P.H.: "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins", *The Journal of Biological Chemistry*, 250 (1975) 4007-4021.
- Olsen, J.V.; Nielsen, P.A.; Andersen, J.R.; Mann, M.; Wisniewski, J.R.: "Quantitative proteomic profiling of membrane proteins from the mouse brain cortex, hippocampus, and cerebellum using the HysTag reagent: mapping of neurotransmitter receptors and ion channels", *Brain Research*, 1134 (2007) 95-106.
- Osberg, S.; Melien, O.; Tauboll, E.; Gjerstad, L.: "G protein beta3 subunit C825T polymorphism modifies the presentation of temporal lobe epilepsy", *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, 188 (2008) 62-66.
- Ouyang, Y.; Yang, X.F.; Hu, X.Y.; Erbayat-Altay, E.; Zeng, L.H.; Lee, J.M.; Wong, M.: "Hippocampal seizures cause depolymerization of filamentous actin in neurons independent of acute morphological changes", *Brain Research*, 1143 (2007) 238-246.
- Panayiotopoulos, C.P.: "Typical absence seizures and their treatment", *Archives of Disease in Childhood*, 81 (1999) 351-355.

- Patton, W.F.: "Detection technologies in proteome analysis", *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences*, 771 (2002) 3-31.
- Petricoin, E.E.; Paweletz, C.P.; Liotta, L.A.: "Clinical applications of proteomics: proteomic pattern diagnostics", *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7 (2002) 433-440.
- Petricoin, E.F.; Ornstein, D.K.; Liotta, L.A.: "Clinical proteomics: Applications for prostate cancer biomarker discovery and detection", *Urologic Oncology*, 22 (2004) 322-328.
- Preininger, A.M.; Hamm, H.E.: "G protein signaling: insights from new structures", *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2004 (2004) re3.
- Rabilloud, T.: "Membrane proteins ride shotgun", *Nature Biotechnology*, 21 (2003) 508-510.
- Rajan, S.; Preisig-Muller, R.; Wischmeyer, E.; Nehring, R.; Hanley, P.J.; Renigunta, V.; Musset, B.; Schlichthorl, G.; Derst, C.; Karschin, A.; Daut, J.: "Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3", *The Journal of Physiology*, 545 (2002) 13-26.
- Raymond, S.; Aurell, B.: "Two-Dimensional Gel Electrophoresis", *Science*, 138 (1962) 152-153.
- Roberts, D.J.; Waelbroeck, M.: "G protein activation by G protein coupled receptors: ternary complex formation or catalyzed reaction?", *Biochemical Pharmacology*, 68 (2004) 799-806.
- Rohde, M.; Daugaard, M.; Jensen, M.H.; Helin, K.; Nylandsted, J.; Jaattela, M.: "Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms", *Genes & Development*, 19 (2005) 570-582.
- Rose, M.R.: "Neurological channelopathies", *British Medical Journal*, 316 (1998) 1104-1105.
- Roseboom, P.H.; Weller, J.L.; Babila, T.; Aitken, A.; Sellers, L.A.; Moffett, J.R.; Namboodiri, M.A.; Klein, D.C.: "Cloning and characterization of the epsilon and zeta isoforms of the 14-3-3 proteins", *DNA and Cell Biology*, 13 (1994) 629-640.
- Ryvlin, P.; Kahane, P.: "Does epilepsy surgery lower the mortality of drug-resistant epilepsy?", *Epilepsy Research*, 56 (2003) 105-120.
- Sarkisian, M.R.: "Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders", *Epilepsy & Behavior : E&B*, 2 (2001) 201-216.
- Seğmen, H.: "İdyopatik Jeneralize Epilepsilerde Genetiğin Yeri ve SCN1A Geninde D188V Mutasyonu", *Nöroloji Uzmanlık Tezi*, T.C. Sağlık Bakanlığı

Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye, (2005) 6-27.

Shaefi, S.; Harkness, W.: "Current status of surgery in the management of epilepsy", *Epilepsia*, 44 Suppl 1 (2003) 43-47.

Smithies, O.; Poulik, M.D.: "Two-dimensional electrophoresis of serum proteins", *Nature*, 177 (1956) 1033.

Snead, O.C., 3rd: "Evidence for G protein modulation of experimental-generalized absence seizures in rat", *Neuroscience Letters*, 148 (1992) 15-18.

Sokrab, T.E.; Kalimo, H.; Johansson, B.B.: "Endogenous serum albumin content in brain after short-lasting epileptic seizures", *Brain Research*, 489 (1989) 231-236.

Stetler, R.A.; Gan, Y.; Zhang, W.; Liou, A.K.; Gao, Y.; Cao, G.; Chen, J.: "Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system", *Progress in Neurobiology*, 92 (2010) 184-211.

Stevens, S.M., Jr.; Zharikova, A.D.; Prokai, L.: "Proteomic analysis of the synaptic plasma membrane fraction isolated from rat forebrain", *Brain Research. Molecular Brain Research*, 117 (2003) 116-128.

Sutula, T.P.: "Epilepsy after the Decade of the Brain: misunderstandings, challenges, and opportunities", *Epilepsy & Behavior : E&B*, 6 (2005) 296-302.

Telefoncu, A.; Salnikow, J.; Zihnioğlu, F.; Kılınç, A.: Proteom Analizi: Metodlar ve Uygulamalar. Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, Türkiye, (2002) 7-12.

Truettner, J.S.; Hu, K.; Liu, C.L.; Dietrich, W.D.; Hu, B.: "Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats", *Brain Research*, 1249 (2009) 9-18.

Tsuji, T.; Shimohama, S.; Kamiya, S.; Sazuka, T.; Ohara, O.: "Analysis of brain proteins in Alzheimer's disease using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis", *Journal of The Neurological Sciences*, 166 (1999) 100-106.

Tsuji, T.; Shiozaki, A.; Kohno, R.; Yoshizato, K.; Shimohama, S.: "Proteomic profiling and neurodegeneration in Alzheimer's disease", *Neurochemical Research*, 27 (2002) 1245-1253.

Unlu, M.; Morgan, M.E.; Minden, J.S.: "Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts", *Electrophoresis*, 18 (1997) 2071-2077.

Wallace, R.H.; Wang, D.W.; Singh, R.; Scheffer, I.E.; George, A.L., Jr.; Phillips, H.A.; Saar, K.; Reis, A.; Johnson, E.W.; Sutherland, G.R.; Berkovic, S.F.; Mulley, J.C.: "Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B", *Nature Genetics*, 19 (1998) 366-370.

- Wright, G.L., Jr.:"High resolution two-dimensional polyacrylamide electrophoresis of human serum proteins", *American Journal of Clinical Pathology*, 57 (1972) 173-185.
- Yang, J.W.; Czech, T.; Gelpi, E.; Lubec, G.:"Extravasation of plasma proteins can confound interpretation of proteomic studies of brain: a lesson from apo A-I in mesial temporal lobe epilepsy", *Brain Research. Molecular Brain Research*, 139 (2005) 348-356.
- Yang, T.; Hsu, C.; Liao, W.; Chuang, J.S.:"Heat shock protein 70 expression in epilepsy suggests stress rather than protection", *Acta Neuropathologica*, 115 (2008) 219-230.
- Yasuko, S.; Mitsuyuki, T.; Eijiro, K.; Hiroshi, S.; Yoshiaki, M.:"71 kDa heat shock cognate protein on the surface of human peripheral blood mononuclear cells.", *Japanese Journal of Transfusion Medicine*, 49 (2003) 33-39.
- Yoo, B.C.; Fountoulakis, M.; Cairns, N.; Lubec, G.:"Changes of voltage-dependent anion-selective channel proteins VDAC1 and VDAC2 brain levels in patients with Alzheimer's disease and Down syndrome", *Electrophoresis*, 22 (2001a) 172-179.
- Yoo, B.C.; Kim, S.H.; Cairns, N.; Fountoulakis, M.; Lubec, G.:"Deranged expression of molecular chaperones in brains of patients with Alzheimer's disease", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280 (2001b) 249-258.
- Yoo, B.C.; Vlkolinsky, R.; Engidawork, E.; Cairns, N.; Fountoulakis, M.; Lubec, G.:"Differential expression of molecular chaperones in brain of patients with Down syndrome", *Electrophoresis*, 22 (2001c) 1233-1241.
- Zeng, L.H.; Xu, L.; Rensing, N.R.; Sinatra, P.M.; Rothman, S.M.; Wong, M.:"Kainate seizures cause acute dendritic injury and actin depolymerization in vivo", *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of The Society for Neuroscience*, 27 (2007) 11604-11613.
- Zha, J.; Harada, H.; Yang, E.; Jockel, J.; Korsmeyer, S.J.:"Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)", *Cell*, 87 (1996) 619-628.

# ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Başak YÜCE-DURSUN  
Doğum Yeri ve Yılı : İstanbul-1981  
Yabancı Dil : İngilizce  
Adres : Marmara Üniversitesi Göztepe Kampüsü, Fen Edebiyat  
Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı  
34722 Kadıköy / İSTANBUL  
Tel (İş) : +90 216 348 77 59 (1335)  
Fax : +90 216 347 87 83  
E-posta : [basak.yuce@marmara.edu.tr](mailto:basak.yuce@marmara.edu.tr)  
Medeni Hali : Evli

## **EĞİTİM**

2006- : Doktora, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü  
2004-2006 : Yüksek Lisans, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri  
Enstitüsü  
2000-2004 : Lisans, İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya  
Bölümü  
1999-2000 : Yabancı Dil Hazırlık, İstanbul Üniversitesi, Yabancı Diller  
Bölümü, İngilizce

## **İŞ TECRÜBESİ**

Ekim 2007- : Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya  
Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı

## **YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Hesperidin, Rutin ve 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil) Kumarin Bileşiklerinin Lipit  
Düşürücü ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması  
Tez Danışmanı: Prof.Dr. Ayşe OGAN

## **YAYINLAR**

1. Danis, O.; **Yuce-Dursun, B.**; Gunduz, C.; Ogan, A.; Sener, G.; Bulut, M.; Yarat, A.: "Synthesis of 3-amino-4-hydroxy coumarin and dihydroxy-phenyl coumarins as novel anticoagulants", *Arzneimittelforschung*, 60 (10) (2010) 617-620
2. **Yuce, B.**; Danis, O.; Ogan, A.; Sener, G.; Bulut, M.; Yarat, A.: "Antioxidative and lipid lowering effects of 7,8-dihydroxy-3- (4-methylphenyl) coumarin in hyperlipidemic rats", *Arzneimittelforschung*, 59(Snead) (2009) 129-34.

## **ULUSAL KONGRELERDE SUNULAN BİLDİRİLER**

1. Danış, Ö.; Demir, S.; **Yüce-Dursun, B.**; Gündüz, C.; Bulut, M.: "Çeşitli Kumarin Türevlerinin Antioksidan ve Radikal Tutucu Özelliklerinin İncelenmesi", XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi 27-30 Ekim (2010) Eskişehir
2. **Yuce, B.**; Sener, G.; Ogan, A.: "Hesperidin, Rutin ve 7,8-Dihidroksikumarin Bileşiklerinin Sıçan Serum Lipid Düzeylerine Etkisinin Araştırılması", XX.Ulusal Kimya Kongresi, (2006) Kayseri

## **ULUSLARARASI KONGRELERDE SUNULAN BİLDİRİLER**

1. **Yuce-Dursun, B.**; Danis, O.; Demir, S.; Onat, F.; Ogan, A.: "Profiling of Coretx Membrane Proteomes in Genetic Absence Epilepsy (GAERS) Experimental Rat Model", 36<sup>th</sup> FEBS Congress, Jun 25-30, (2011) Torino-ITALY
2. Danis, O.; Demir, S.; **Yuce-Dursun, B.**; Gunduz, C.: "Assessment of Antioxidant Capacity and Radical Scavenging Activity of Various Hydroxycoumarin Derivatives", 36<sup>th</sup> FEBS Congress, Jun 25-30, (2011) Torino-ITALY
3. Altay, V.; **Yuce, B.**; Ogan, A.; Sener, G.; Bulut, M.: "The effect of lipid lowering agent 7,8-dihydroxy-3(3-methylphenyl) coumarin (DHMC) on the protein profiles of hyperlipidemia induced rat liver tissues", 33<sup>rd</sup> FEBS Congress, Jun 28-Jul 03, (2008) Athens-GREECE
4. **Yuce, B.**; Sener, G.; Ogan, A.; Danis, O.; Bulut, M.: "Hesperidin, Rutin and 7,8-Dihydroxycoumarin on Antioxidant and Lipid Status of Hyperlipidemic Rats", 31<sup>st</sup> FEBS Congress, (2006) Istanbul-TURKEY,

## **BURLAR**

1. TUBITAK-BİDEB Yurt İçi Doktora Burs Programı, Ekim 2006-2011
2. TUBITAK-BİDEB Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, 2006-2008