

TÜBİTAK

2007-283
CD'si ver.

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Group

9/ 90846

Proje No: 104S511

**Proteom Analizi ile Deneysel Epilepsi Modelinde Beyin Dokusu
Proteinlerindeki Olası Değişikliklerin Saptanması**

Prof.Dr. Ayşe OGAN
Prof.Dr.Filiz ONAT
Yrd.Doç.Dr.Rezzan AKER
Yrd.Doç.Dr.Aslıhan GÜNEL
Arş.Gör.Özkan DANIŞ
Arş.Gör.Serap DEMİR
Arş.Gör.Dr. Medine Gülçebi

TEMMUZ 2007
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Yıllardır uğraştığımız ve başarmak için büyük emek sarf ettiğimiz proteom analizini bu proje ile gerçekleştirmiş olduk. Farklı disiplinlerden gelen bilim insanları bu projede buluştu, bilgi ve deneyimlerini ortaya koydu ve paylaştı.

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı'nın çalıştığı ve büyük uğraş verdiği epilepsi hastalığının etiyolojisinin aydınlatılmasına uyguladığımız bu teknik ile katkıda bulunmaktan mutluyuz. Bu projede yer alan doktora öğrencisi Serap DEMİR doktora tezini bu proje sayesinde tamamlamıştır, diğer öğrencimiz ise tamamlama aşamasındadır. Projemizin bir bölümünü İstanbul'da yapılan 31. FEBS kongresinde sunmuştuk, tamamını ise 6-10 Ekim 2007 de Seul-Kore'de yapılacak olan 7. HUPO Proteom Kongresinde sunacağız. Bildirimizin böyle önemli bir kongrede sunulacak olması ve bildiri özetlerinin Science Citation Index'ce taranan bir dergide yayınlanacak olması da önemlidir.

Başta TÜBİTAK-SBAG olmak üzere, bu projenin gerçekleştirildiği Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi ve Tıp Fakültesi Dekanlıklarına, M.Ü. Mühendislik Fakültesi bünyesinde bulunan MALDI-Tof aletini kullanmamıza izin veren Mühendislik Fakültesi Dekanlığı'na, M.Ü Fen Edebiyat Fakültesi Kimya ve Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlıklarına, çalışmamızda görüntüleme sistemini kullandıran İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümüne şükranlarımızı sunarız.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
ÖNSÖZ.....	1
İÇİNDEKİLER.....	2
ŞEKİL LİSTESİ.....	4
TABLO LİSTESİ.....	6
ÖZET.....	7
ABSTRACT.....	8
BÖLÜM I.....	9
GİRİŞ.....	9
BÖLÜM II.....	12
GENEL BİLGİ.....	12
II.1.EPİLEPSİ.....	12
II.2. EPİLEPSİ FİZYOPATOLOJİSİ.....	13
II.3. ABSANS EPİLEPSİ.....	14
II.4. DENEYSEL MODELLER.....	15
II.5. PROTEOMİK.....	17
II.5.1.Örnek Hazırlama.....	18
II.5.2. Proteinlerin Ayırımı.....	18
II.5.3. Protein Görüntüleme Yöntemleri.....	20
II.5.4. 2D-PAGE Jellerin Değerlendirilmesi.....	20
II.5.5. Proteinlerin Tanımlanması.....	20
II.5.6. Proteom ve Uygulamaları.....	22
BÖLÜM III.....	24
GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ.....	25
III.2. ARAŞTIRMA ARAÇLARI	25
III.2.1.Araştırmada Kullanılan Cihazlar.....	25
III.2.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar.....	26

III.3.YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	26
III.3.1. Örnek Hazırlama.....	26
III.3.2. Bradford Metoduna Göre Protein Tayini.....	27
III.3.3. İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektrophorezi.....	27
III.3.4. MALDI-Tof.....	34
BÖLÜM IV.....	38
BULGULAR.....	38
IV.1. PROTEİN MİKTARLARI	38
IV.2. İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZ (2D-PAGE)	
SONUÇLARI	39
3. 2D-PAGE ANALİZ SONUÇLARI	46
4. MALDI-Tof SONUÇLARI.....	49
BÖLÜM V.....	51
TARTIŞMA/SONUÇ.....	51
UYGULAMA RAPORU.....	57
KAYNAKLAR.....	58

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>SAYFA NO</u>
Şekil II.1 2D-PAGE Tekniğinin Şematik Gösterimi.....	19
Şekil II.2 MALDI Kütle Spektrometresi.....	22
Şekil III.1 Çalışmada İzlenen Yöntemler.....	24
Şekil III.2 Protean IEF Hücresi.....	29
Şekil III.3 SDS PAGE'in Yapıldığı Elektrophorez Tankı.....	32
Şekil III.4 Örneğin MALDI-ToF'a Verilmesi.....	37
Şekil III.5 MALDI Analiz Sonuçlarının İnternette Taranması.....	37
Şekil IV.1 GAERS Hipokampus Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=HG1, B=HG2, C=HG3, D=HG4, E=HG5)	40
Şekil IV.2 Kontrol Hipokampus Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=HK1, B=HK2, C=HK3, D=HK4, E=HK5).....	41
Şekil IV.3 GAERS Korteks Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=KG1, B=KG2, C=KG3, D=KG4, E=KG5)	42
Şekil IV.4 Kontrol Korteks Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=KK1, B=KK2, C=KK3, D=KK4, E=KK5).....	43
Şekil IV.5 GAERS Talamus Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=TG1, B=TG2, C=TG3, D=TG4, E=TG5)	44
Şekil IV.6 Kontrol Talamus Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=TK1, B=TK2, C=TK3, D=TK4, E=TK5)	45
Şekil IV.7 GAERS ve Kontrol Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerinin Karşılaştırılması ; A. GAERS, B. Kontrol.....	46
Şekil IV.8 Kontrol ve GAERS Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerinin Karşılaştırılması ;	

A. Kontrol, B. GAERS.....	47
Şekil.IV.9 GAERS ve Kontrol Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerinin Karşılaştırılması ;	
A. GAERS, B. Kontrol.....	47
Şekil.IV.10 GAERS ve Kontrol Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerin Karşılaştırılması;	
A.GAERS, B. Kontrol	48
Şekil.IV.11 GAERS ve Kontrol Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerin Karşılaştırılması;	
A.GAERS, B.Kontrol.....	48
Şekil.IV.12 GAERS ve Kontrol Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerin Karşılaştırılması;	
A.GAERS, B.Kontrol.....	49

TABLO LİSTESİ

	<u>SAYFA NO</u>
Tablo III.1 Çalışmada Kullanılan Hastalıklı ve Sağlıklı Sıçan Grupları.....	26
Tablo III.2 İzoelektrik Odaklama İşlemi.....	29
Tablo III.3 Jel Kompozisyonu.....	31
Tablo III.4 Boya Çözeltilisini Oluşturan Bileşenler.....	33
Tablo IV.1. GAERS ve Kontrol Grubu Sıçan Beyinlerinden Elde Edilen Hipokampus, Korteks ve Talamus Bölgelerine Ait Protein Konsantrasyonları.....	39
Tablo IV.2. Hipokampus, Korteks ve Talamus bölgelerine ait farklılık gösteren protein spotlarının MALDI analiz sonuçları.....	50

ÖZET

PROTEOM ANALİZİ ile DENEYSEL EPİLEPSİ MODELİNDE BEYİN DOKUSU PROTEİNLERİNDEKİ OLASI DEĞİŞİKLİKLERİN SAPTANMASI

Beyindeki nöronların anormal aktivasyonu sonucu oluşan kronik ve tekrarlayan nöbetlerle giden bir bozukluk olan epilepsi en sık karşılaşılan nörolojik tablolardan biridir. Yapılan epilepsi çalışmalarında, bazı epilepsi türlerinde Na^+ , K^+ , Ca^{++} gibi iyon kanallarında veya nöronal sinyal iletiminden sorumlu genlerde farklılıklar saptanmakta ama epilepsinin moleküler, biyokimyasal ve farmakolojik temelleri tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmanın amacı; Strasbourg-Genetik Absans Epilepsi (GAERS) deneysel modelinde protein değişikliklerini Proteomik teknolojisi ile saptamak ve karşılaştırmaktır. Elektroforez ve kütle spektrometresinin kombinasyonu olan proteomik evrensel bir tekniktir. Bu teknikte çözünür proteinler ilk olarak iki boyutlu elektroforezde izoelektrik noktası (pI) ve moleküler büyüklüklerine göre ayrılırlar. Daha sonra jelden kesilen proteinler triptik parçalanmayı takiben peptit kütle parmak izinden tanımlanırlar.

Çalışmamızda kontrol (n=5) ve GAERS (n=5) hipokampus, korteks ve talamus proteinleri çözünürleştirilerek iki boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE) ile ayrıldı ve protein spotları kolloidal Coomassie boyası ile boyanarak görünür hale getirildi.

GAERS ve kontrol hayvanlarının hipokampus, talamus ve korteks dokularına ait 2D-PAGE jel görüntüleri PDQuest programı ile karşılaştırıldı. Hipokampus bölgesinde iki, korteks bölgesinde iki ve talamus bölgesinde iki olmak üzere 6 farklılaşan protein gözlemlendi.

Bu altı protein matriks yardımcı lazer dezorpsiyonu ve iyonizasyonu uçuş zamanı (MALDI-Tof) kütle spektrometresi ile analiz edildi. Hipokampüste nöron spesifik protein üyesi 1 proteininin kontrol grubunda olmadığı ve hCG2007412 proteininin de GAERS grubunda kaybolduğu bulunmuştur. Korteksde rCG45919 proteinin ve sindekan bağlayıcı proteininin GAERS grubunda ekspresyonlarının arttığı, yine aynı şekilde talamusda Ig gamma zincir V bölgesi protein ve hipotetik protein ekspresyonlarının GAERS grubunda arttığı bulunmuştur.

ABSTRACT

DETERMINATION of POSSIBLE ALTERATIONS in the PROTEIN PROFILES of the BRAIN TISSUES of EXPERIMENTAL EPILEPSY MODELS by PROTEOM ANALYSIS

Epilepsy, a chronic disorder characterized by repeated seizures resulting from abnormal activation of neurons in the brain, is one of the most frequent neurological disorders. Although studies defined mutations and polymorphisms in the genes related to Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ channels and neuronal signaling in some types of epilepsy but, molecular , biochemical and pharmacological basis of epilepsy is still poorly understood.

The aim of this study is to detect and compare the protein changes in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) Experimental Model with proteomics technology. Proteomics technique which is based on a combination of electrophoresis and mass spectrometry is a universal technique in which solubilized proteins are first separated by two-dimensional electrophoresis on the basis of their isoelectric points (pI) and molecular sizes and then identified by peptide mass fingerprinting following excision from the gel and tryptic digestion.

In this study, proteins solubilized from hippocampus, cortex and thalamus extracts of non-epileptic Wistar control rats (n=5) and GAERS (n=5) were separated by two dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) and the protein spots were visualized following stain with colloidal Coomassie blue. GAERS and control animals' hippocampus, cortex and thalamus protein spots appearing in 2D-PAGE gels were compared by PDQuest software. The number of differentiated proteins observed between control and GAERS groups were two in hippocampus, two in cortex and two in thalamus.

These six different proteins were analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-Tof). In hippocampus we found that neuron-specific protein family member 1 is absent in control group and hCG2007412 protein is absent in GAERS group. In cortex, we found that rCG45919 protein and syndecan binding protein's expression are increased in GAERS group. In thalamus Ig gamma-chain V-region proteins and hypothetical protein expressions increased in GAERS group.

BÖLÜM I

GİRİŞ

Epilepsi beyindeki nöronların aşırı ve anormal deşarjları nedeni ile meydana gelen, bir bölgede lokalize ya da jeneralize kronik ve tekrarlayan nöbetlerle giden bir bozukluktur. Epilepsi prevalansı multipl sklerozdan 10 kat, motor-nöron hastalıklarından 100 kat daha yüksektir (PORTER,1993). Epidemiyolojik çalışmalara göre, 80 yaşına kadar yaşayan kişilerden % 4'ünün yaşamlarının bir bölümünde kronik epileptik bozukluk tanısı konulacağı ve % 10'unun da en az bir kez epileptik nöbet geçireceği hesaplanmıştır (HAUSER ve diğ., 1984).

Günümüzde epilepsi tedavisi, olası yapısal bozukluğun giderilmesi değil ancak belirtilerin ortadan kaldırılması, yani nöbetlerin önlenmesi ile sınırlı kalmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, epilepside nörotransmitterler düzeyinde bir bozukluk olduğu düşünülmüş ve nöbetlerin GABA'erjik inhibitör tonus ile glutaminerjik eksitatör tonus arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıktığı fikri ortaya atılmıştır. Epilepsi tedavisinde geliştirilmiş yeni ilaçlar olmasına rağmen, epilepsi hastalarının %30'u tedaviye yanıt vermemekte ve yeterli derecede nöbet kontrolü sağlanamamaktadır. Bu hastalardan bir kısmına cerrahi tedavi uygulanmaktadır (SHAEFİ ve HARKNESS, 2003). 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).

Tipik absans epilepsileri asıl olarak çocukları ve ergenlik çağındakileri etkilediğinden ve orta şiddette sonuçları olduğu için patofizyolojik çalışmalar etik nedenlerden ötürü insanlar üzerinde gerçekleştirilemez. Bu nedenle; epilepsi mekanizmalarını ortaya koymak ve tedavisine ışık tutmak amacı ile deneysel modeller kullanılmaktadır. Bu modellerden biri de Strasbourg-Genetik Absans Epilepsi (GAERS) modelidir. Yaklaşık 20 yıl önce absans epilepsisinin iki farklı genetik modelinin geliştirilmesi ve karakterize edilmesi ile Strasbourg'da (Fransa) bir outbred Wistar kolonisinden absans epilepsisinin elektroensefalografik (EEG) ve davranış özelliklerini

%100 gösteren tamamı ile inbred bir sıçan kolonisi geliştirildi: Strasbourg-Genetik Absans Epilepsi (GAERS) ve Wistar Albino Glaxo suşu İngiltere’de inbred olarak yetiştirildi ve önce Rijswijk de (WAG/Rij) ve daha sonra Nijmegen’de (Hollanda) üretildi (DEPAULIS VE VAN LUIJTELAAR, 2006 a).

Toplumun her kesiminde görülebilen ve kronik bir bozukluk olan epilepsi hastalığının yüzyıllardan beri bilinmesine rağmen patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır ve günümüzde nöbetlerin engellenmesi için geliştirilmiş olan ilaç sayısı oldukça azdır. Bu çalışmanın amacı, hipokampus, korteks ve talamus beyin dokusu proteinlerindeki olası değişikliklerin saptanarak epilepsi mekanizmalarını açıklayabilecek, tanı ve tedavisinde kullanılabilecek yeni bilgilerin elde edilmesidir. Hipokampus, absans epilepsi patojenezinde rol almadığı düşünülen önemli bir beyin bölgesidir (DEPAULIS VE VAN LUIJTELAAR, 2006 b). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda absans epilepsili hayvanların hipokampus beyin dokularında morfolojik değişiklikler saptanmıştır (SIRVanci ve diğ., 2003). Talamus, normal talamo-kortiko-talamik ritmik aktivitenin düzenlenmesinde ve nöronal osilasyonların sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu yapı serebral korteksin uyarılabilirliğinden ve uyanıklığın kontrolünden sorumludur (CARMAN, 1964). Talamus nöronları, osilatuvar mod ve tonik ateşleme modu arasında geçiş yapabilme özelliğine sahiptirler. Böylece, talamus dış çevreden gelen uyarıların kortekse ulaşmasını denetlemektedir. Uyanıklık durumu, tonik ateşleme modundaki talamokortikal nöronlarının oluşturduğu desenkronize EEG ile karakterizedir. Bu durum, çevreden gelen uyarıların talamus aracılığı ile kortekse ulaşmasını sağlamaktadır. Bu tonik ateşleme modu osilatuvar, ritmik, patlama moduna dönüştüğünde, talamusun eksitator post-sinaptik potansiyel (EPSP) eşiği yükselmekte, kortekse ulaşan sinyal iletimi azalmaktadır. Bundan dolayı, uyanıklık hali kaybolmakta, EEG’de de bir senkronizasyon izlenmektedir. Bu ritm değişikliği talamusun retiküler çekirdeği (RtN) tarafından sağlanmaktadır. Bu durum, RtN’nin özel konumu ile talamus ve korteksle olan bağlantılarının yapısından kaynaklanmaktadır. Absans epilepsisi patojenezinde diken-dalga deşarjların primer somatosensoriyel korteksin peri-oral bölgesinden (Slpo) kaynak aldığı gösterilmiştir. Bu ritmik osilatuvar aktivitenin sürdürülmesinde ise, talamo-kortiko-talamik yolda, talamus ve özellikle de RtN’de gama-amino-bütirik asit (GABA) aracılı inhibitör nöronal iletinin rol oynadığı düşünülmektedir (NEIERMEYER, 1996).

Bu alışmada; GAERS (hastalıklı) ve Wistar (sağlıklı kontrol) sıçanların hipokampüs korteks ve talamus beyin dokularından elde edilen proteinler, iki boyutlu jel elektroforezi ile ayrıldı. Jeller kolloidal Coomassie boyası ile boyanarak protein profilleri çıkarıldı. GAERS ve kontrol grubuna ait jeller hem kendi içlerinde hem de birbirleri arasında PDQuest iki boyutlu jel analiz programı ile incelendi. Farklılaşan proteinler kütle spektrometre (MALDI-tof) yöntemi ile saptanarak tanımlandı.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİ

II.1. EPİLEPSİ

Epilepsi nöbeti; beyindeki bir ya da birkaç grup sinir hücresinin aşırı deşarjlarına bağlı olarak ortaya çıkan ve klinikte gelip geçici motor, duysal, duyumsal, duygusal, bilişsel ve otonom sıklıkla pozitif, bazen de negatif belirtilerle şekillenen bir durumdur. Bedende yaygın kasılma ve çarpınmalarla ve bilinç yitilmesi ile şekillenen büyük nöbetlerin (grand mal) sıklığı, ağız birleşği, göz kapağı, kol, bacak gibi sınırlı bölgelerdeki kasılmalar ya da atmalar, görme kaybı ya da ilüzyonları, konuşmada takılmalar, anlık dalmalar gibi küçük nöbetlerden çok daha seyrekir.

Epilepsi hastalığı ya da kısaca epilepsi, nöbetlerinin tekrarlama eğiliminin bulunduğu kronik bir durumdur. Buna göre epilepsi, idiyopatik, kriptojenik ve semptomatik epilepsiler olmak üzere 3 ana grupta toplanabilir.

Epilepsi ile ilgili diğer bir kavram da “epilepsi sendromu” dur. Epilepsi sendromu, başlangıç yaşı, nöbet özellikleri, klinik seyri, elektroensefalografik (EEG) bulguları açısından ortak özellikler gösteren durumlar için kullanılmaktadır. Buna göre, etiyolojik tanısı belirlenmiş olan durumlar “epilepsi”, belirlenmemiş olanlar “epilepsi sendromu” olarak tanımlanabilir (EŞKAZAN, 1998).

II.2. EPİLEPSİ FİZYOPATOLOJİSİ

Hücrel düzeyde pek çok sayıda araştırma yapılmasına rağmen epilepsinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Epilepsi olayı, bir çok faktörün rol aldığı karışık olaylar dizisinin bir sonucu olarak gözlenmektedir. Epileptik aktivitenin beyinden nasıl yayıldığı konusu da tam olarak aydınlatılmamıştır.

Hücre membranındaki potansiyelin devamı ve potansiyelin sinaps yolu ile yayılmasında rol oynayan kimyasal, hormonal ileticilerin epileptojenik aktivitede rol oynamaları olasıdır. Eksitator (uyarıcı) nörotransmitter olan Asetilkolin (ACh)'nin epileptik nöbetler sırasında bol miktarda salgılandığı saptanmıştır. ACh'nin ventriküle injeksiyonu nöbetlere neden olmuştur. Endojen ACh serbestlemesinin N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptörleri ile düzenlendiği ve bu reseptörlerin kolinerjik dendritler üzerine direkt etki ile ACh serbestlemesini artırdıkları saptanmıştır. Yine gama-amino-bütirik asit (GABA) agonistlerinin ACh serbestlemesini inhibe ettiği de rapor edilmiştir (CHAPMAN ve diğ., 1977). Bilinen en önemli inhibitör nörotransmitter olan, ayrıca epileptik nöbetlerin patojenezinden önemle sorumlu tutulan GABA eksikliğidir. Deneysel oluşturulmuş epileptik nöbetlerde GABA'nın % 50-60 oranında azaldığı, GABA'erjik inhibitör sinapsların fonksiyon kaybının epileptik odağı oluşturduğu düşünülmüştür. GABA'nın iki mekanizma ile nöbetten sorumlu olabileceği düşünülmektedir (CAIN ve diğ., 1989). Birincisi sinapslardaki GABA konsantrasyonu düşünce nöronal inhibisyonda azalma olacaktır. İkincisi GABA'nın konsantrasyonu normal olabilir, ancak mevcut GABA kullanılamamaktadır.

Epileptik nöbet oluşumunda diğer aminoasitlerin etkisi incelendiğinde taurinin konsantrasyonunun düşmüş olduğu, glisinin artmış olduğu saptanmıştır. Glisinin inhibitör etkisinin yanısıra diğer önemli etkisi glutamatın NMDA reseptörlerine cevabını arttırmasıdır. Böylece ekstrasellüler alanda artmış olan glisin glutamatın eksitator etkisini arttırmaktadır. Guilarte tarafından yapılmış çalışmada B6 vitamin eksikliği ile oluşturulmuş nöbetlerde korteks ve hipokampüste glutamatın anlamlı olarak düşmüş olduğu, glisinin ise anlamlı şekilde artmış olduğu saptanmıştır (GUILARTE, 1989).

Biyojenik aminlerin de epileptik nöbetlerin patojenezinde önemli olduğu, katekolaminlerin antikonvulzan etki gösterdiği bilinmektedir. Alfa, beta adrenerjik reseptörlerin bloke edilmesi nöbet eşikliğini düşürmektedir. Siklik nükleotidlerden siklik adenosin mono fosfat (cAMP) artışının nöbetleri önlediği, siklik guanozin mono fosfat (cGMP) artışının nöbetleri başlattığı saptanmıştır.

ACh ise guanil siklazı aktive ederek veya $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ geçişini etkileyerek depolarizasyon oluşturmaktadır. Bu pompanın hücre içi Na^+ ve Ca^{++} miktarını düzenlediği bilinmektedir. Hücre içi Ca^{++} miktarı artışı ise nörotransmitter salınımı ve sinaptik iletiyi bozmaktadır. Hücre içi Ca^{++} artışı hücre hasarının en önemli göstergesidir. Ayrıca, güçlü bir membran stabilizatörü olan Mg^{++} , çeşitli ATPazların (örn: Na^+ pompasını kontrol eden $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz) aktivatörüdür. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz enzimi Na^+ girişini azaltır, intrasellüler K^+ depolanmasını artırır. Membrandan Ca^{++} akımını düzenler. Mg^{++} , ayrıca enerji bağımlı reaksiyonlarda nöromediatörlerin (aminler, aminoasitler) sentezi, serbestlemesi, alımı ve depolanmasını artırır. Mg^{++} , inhibitör aminoasitlerin reseptörlerini aktive eder, eksitatör aminoasitlerinkini bloke eder. Güçlü epileptojenik ajanların katabolizması için gerekli taurinin hücre içine alınmasını artırır. İki ana siklik nükleotid olan “ikincil mesajcı” cAMP ve cGMP oluşumu üzerine de etkilidir. Mg^{++} , hiperpolarize edici etkisi olan ve adenilat siklazla aktiflenen cAMP sentezi için de gereklidir. Siklik nükleotidlerin oranı (cAMP/cGMP) Mg eksikliğinde azalır. Özellikle hipokampüste cGMP’de predominant bir artış olmaktadır (DURLACH ve diğ.,1987). Siklik nükleotidlerin oranındaki azalış, serotonin, ACh ve katekolamin dönüşümlerinde artış ve muhtemelen inhibitör aminoasit GABA ve taurin dönüşümlerinde azalmaya neden olmaktadır. Bütün bunların ışığında epileptik nöbet oluşumunda Mg^{++} eksikliği birçok olayı aktiflemesi açısından gözardı edilmemelidir.

Epileptik nöbet oluşumunda iskemi (bölgesel olarak geçici kansızlık) ve hipogliseminin de önemini vurgulamak gerekir, çünkü hipogliseminin nöbet eşikini düşürdüğü bilinmektedir. Glikoz hem nörotransmitter yapımı, hem de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz enzimi için gereklidir. İskemide metabolizma bozulması sonucu o bölgenin daha fazla kan akımı ihtiyacı doğmakta ve o bölgenin eksitabilite (uyarılabilirlik) eşiği düşmektedir (KAYA, 2005).

II.3. ABSANS EPİLEPSİ

Absans epilepsi, hastaların jeneralize konvülsif olmayan nöbetleri ile çevre uyarılarına kısa süreli cevapsızlık ve uzuvları, gözkürelerini veya göz kapağını ekileyen otomatizmalar veya orta şiddetli tonik veya klonik bileşenlerince eşlik edilen aktivitenin durması ile karakterize edilebilen özel bir epileptik sendromdur (LOISEAU ve diğ., 1995; Panayiotopoulos,1999). Tipik absans nöbetleri EEG’de ansızın başlayan ve biten bilateral, senkronize ve düzenli saniyede üç döngülü (c/s) diken-ve-dalga deşarjları (SWD) ile birlikte gelişir. Genelleştirilmiş konvulsif veya kısmi

nöbetlerin aksine, tipik absansları takip eden postiktal depresyon veya yavaşlama yoktur. Günde yüz kadar sıklıkla ve başlıca yoğun zayıflık, dikkatsizlik ve uyku ile uyanıklık arasındaki geçiş sırasında meydana gelirler, genellikle 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 ile nöbetler ağırlaşır. Absans Nöbetleri lezyonel olmayan idiyopatik jeneralize epileptik sendromlar içinde yer alır (PANAYIOTOPOULOS,1999; HIRSCH, 1994): çocukluk çağı absans epilepsi, juvenil absans epilepsi, juvenil miyoklonik absans epilepsi ve absans nöbetlerle birlikte izlenen gözkapağı miyoklonisi olmak üzere farklı gruplara ayrılabilir. Absans nöbetlerinin yanı sıra, hastalar diğer nörolojik veya nörofizyolojik rahatsızlıklar göstermezler. Çocukluk çağı absans epilepsisinde, hastaların %70'inde büyüme çağında hafifleme gözlenmektedir (LOISEAU ve diğ., 1995; PANAYIOTOPOULOS,1999; HIRSCH, 1994).

II.4. DENEYSEL MODELLER

Epilepsinin mekanizmalarını ortaya koymak ve tedavisine ışık tutmak amacıyla kullanılan deneysel modeller, insandakine benzer şekilde, jeneralize ve parsiyel 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 modeller, sistemik veya topikal olarak konvülzan maddelerin uygulanmasıyla ya da elektrik stimülasyonu veya metabolik değişiklikler sonucunda ortaya çıkan geçici epilepsi benzeri aktiviteleri içerir. Kronik modeller ise genellikle yapısal lezyonlar veya tekrarlayan elektrik stimülasyonları ile oluşturulurlar ya da spontan genetik epilepsi modellerini içerirler (HIRSCH, 1994).

Tipik absans epilepsileri asıl olarak çocukları ve ergenlik çağındakileri etkilediğinden ve orta şiddette sonuçları olduğu için patofizyolojik çalışmalar etik nedenlerden ötürü insanlar üzerinde gerçekleştirilemez. Bu nedenle hayvan modelleri bu epilepsi türünü ve SWD oluşumunun ve kontrolünün altında yatan mekanizmayı anlamak için gereklidir. Bu amaçla kemirgenler, kediler veya primatlara pentilentetrazol, penisilin, gamma-hidroksibütirat veya GABA antagonist enjeksiyonları ile oluşturulan elektriksel, davranışsal ve farmakolojik olarak absans nöbet karakteristiklerini gösteren hayvan modelleri kullanılmıştır. Her ne kadar bu

modeller SWD oluşumunun anlaşılmasına yardımcı olmuşlarsa da, bu nöbetlerin tekrarlanmaması hastalığın gelişiminin incelenememesine sebep olmuştur.

Yaklaşık 20 yıl önce, ilaç verilmemiş sıçanlarda kortikal EEG kaydı sırasında absans nöbetlerini çağrıştıran spontan SWD'ler bildirildi. Bu ilk gözlemler iki farklı başlangıç üretme kolonisinden sıçanlarda absans epilepsisinin iki farklı genetik modelinin geliştirilmesine ve karakterize edilmesine neden oldu. Strasbourg'da (Fransa) bir outbred Wistar kolonisinden absans epilepsisinin EEG ve davranış özelliklerini %100 gösteren tamamı ile inbred bir sıçan kolonisi geliştirildi: Strasbourg-Genetik Absans Epilepsi (GAERS) ve Wistar Albino Glaxo suşu İngiltere'de inbred olarak yetiştirildi ve önce Rijswijk de (WAG/Rij) ve daha sonra Nijmegen'de (Hollanda) üretildi. Bu sıçanlar, absans epilepsisi olduğu belirlendiğinde tamamen inbred durumdaydılar. Bir epileptik olmayan hayvan suşuda GAERS'lerle aynı başlangıç üretim kolonisinden kontrol hayvanları olarak seçildi. Nijmegen grubu ise bir başka inbred suşu kontrol olarak kullandı: (August Copenhagen Irish veya ACI sıçanları). Bu hayvanlar çok az absans nöbetleri gösterirler veya hiç göstermezler. GAERS ve WAG-Rij suşuları nöbet, büyüme ve farmakolojik reaktivite açılarından pek çok benzerlikler göstermektedirler. Ancak bazı yönlerden farklılıklar da oluşmaktadır. Elektrofizyolojiden moleküler genetiğe kadar farklı yaklaşımlar ile üzerlerinde yapılan çalışmalar sonucu son 20 yılda SWD oluşumunun altında yatan mekanizmalara dair pek çok veri toplanmış ve dörtüyzün üzerinde makale yayınlanmıştır (ENGEL, 1989).

GAERS'lerde SWD aktivitesi normal desenkronize EEG'de birdenbire başlar ve sonlanır. Yetişkin hayvanlarda bir deşarjdaki diken-dalga komplekslerinin sıklığı 7-11 Hz arasında gerçekleşebilir; sıklık daima nöbetlerin başlangıcında yüksek, sonlarına doğru ise yavaştır. Ortalama sıklık 8.0 $\pm$ 1.0 Hz dir. Kaydedilen yapının özelliğine bağlı olarak voltajları 300-1000 μ Vdur.

SWD'ler her zaman davranışsal hareketsizlik ve yüz kaslarının ritmik titremeleri ile birlikte meydana gelir. Boyundaki kas kuvveti genellikle azalır, bu da kademeli olarak başın hafif olarak alçalmasına neden olabilir. SWD'nin bitişi ile birlikte hayvan davranışına devam eder ve boyundaki kas kuvveti normal haline döner.

Bugüne kadar yapılmış olan yayınlar genellikle korteks ve talamus bölgelerini epilepsi ile ilişkilendirmektedir. Hipokampus absans epilepsi patojenezinde rol almadığı düşünülen önemli bir beyin bölgesidir (DEPAULIS VE VAN LUIJTELAAR, 2006 b). Bununla birlikte son

zamanlarda yapılan çalışmalarda absans epilepsili hayvanlarda hipokampüste morfolojik değişiklikler saptanmıştır (SIRVANCI ve diğ., 2003).

II.5. PROTEOMİK

PROTEin ve genOM kelimelerinden türetilen Proteom terimi, ilk kez 1994 yılında Siena'da (İtalya) iki boyutlu elektroforez toplantısında Marc Wilkins tarafından kullanılmış ve 1995 yılında literatüre geçmiştir (WILKINS ve diğ., 1995). Proteom, genomdan farklı olarak zamanla değişir ve doku, organizma veya hücre kültüründe belirli şartlar altında herhangi bir anda mevcut olan proteinlerin tamamını ifade eder. Bu proteomların incelenmesi ve analizi de proteomik olarak isimlendirilir.

Bir hücrenin DNA dizisinden belli bir zamanda o hücrede sentezlenen proteinlerin profilini çıkarmak mümkün değildir. Bir organizmanın tüm doku ve organlarının hücrelerinde aynı genetik bilgi mevcut olmakla birlikte, bu genlerin sadece bir kısmı protein olarak ifade edilir. Proteinin sentez sonrası farklı biyolojik moleküllerle (fosfat, karbohidrat, lipid, fosfat, metil, asetil...) değişikliğe uğramaları sonucu kazandıkları yapısal ve fonksiyonel özellikler genom haritaları ile belirlenemez. Özellikle ökaryotlarda, bir proteomda, genomda bulunan genlerden çok daha fazla protein mevcuttur.

Proteom; DNA ve RNA analizlerinin aksine proteinlerin gerçek miktarları ve translasyon sonrası modifikasyonları hakkında bilgi verir. Gen ekspresyon seviyeleri hücre içindeki aktif protein miktarını göstermez. Genlerin fonksiyonel özellikleri en gelişmiş biyolojik metodlarla incelense bile, çok yetersiz ve pratik olmayan sonuçlar elde edilmekte ve mRNA miktarından da aktif protein miktarı tahmin edilememektedir (GYBI ve diğ., 1999; ANDERSON ve SEILHAMER, 1997; FUTCHER, 1999). Günümüzde, belirli bir hücre veya organ içinde ifade edilen proteinlerin kalitatif ve kantitatif analizleri için uygulanabilir olan tek yöntem proteomiktir.

İki boyutlu poliakrilamit jel elektroforezi (2D-PAGE) kompleks protein karışımlarının ayrılması ve karakterizasyonunda kullanılan en önemli tekniklerden birisidir. 2D-PAGE'in bu gücü, iki ayırma tekniğinin kombinasyonu sonucudur. Bunlar, birinci boyutta izoelektrik odaklama (IEF:yüke bağımlı ayırma, pH gradienti) ve ikinci boyutta ise Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit jel Elektroforezidir (SDS-PAGE; moleküler kütleyle bağımlı

ayırma). Her bir teknik kendi başına 100 bileşiği ayırma kapasitesine sahipken birleştiklerinde ayırma teorik olarak 10^4 polipeptittir. Ancak; örnek hazırlama, dedeksiyon metodunun duyarlılığı, deneyim gibi faktörlerle sınırlandığında, IPG ve büyük formattaki iki boyutlu jellerin kullanımı ile 10000'e kadar farklı spot çıkaran bazı araştırmacıların olduğu bilinmektedir

II.5.1.Örnek Hazırlama

Örnek hazırlama, doku veya kan gibi biyolojik örneklerden proteinlerin iyi bir şekilde çözünürleştirilmesi ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesinde en önemli adımdır. Proteinler bulundukları ortamlarda homojen değildir; ayrıca, yaygın moleküler kütle, izoelektrik nokta, çözünürlük gibi farklı biyofiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduklarından çözünürleştirilme prosesinin optimize edilmesi önemlidir (HERBERT, 1999). Bu nedenle tüm protein sınıfları için tek bir hazırlık çözeltisi yoktur. Örnek hazırlığı, protein/protein, protein/lipid ve protein/nükleotid arasındaki karşılıklı etkileşimlerin kesilmesi amacı ile çözünürleştirme, denatürasyon ve indirgeme aşamalarını gerektirir. Genelde hücre ve doku örnekleri; sıvı azotta dondurularak öğütme, sonikasyon veya homojenizasyon gibi farklı tekniklerle parçalanır. Daha sonra genelde üre, dithiothreitol (DTT), 3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonyum]-1-propan sülfonat (CHAPS), amfolit pH 3-10 ve proteaz inhibitör içeren bir tampon sistemi ile çözünürleştirilir. Çalışılacak örneğe göre tampon sisteminde yer alan kimyasalların molaritesi, yüzdesi veya içeriği değişebilir.

Protein kompleksinin tam olarak çözünürleşmesi için inter ve intra disülfid bağlarının tamamen indirgenmesi gerekir. Bu amaçla genellikle serbest tiol grubu içeren β -merkaptotanol veya DTT kullanılır (RABILLOUD, 1996). Bununla birlikte DTT, yükü dolayısı ile bazı proteinlerle etkileşime girerek çözünürleştirmede kayıplara neden olur. Bu nedenle yüksüz olan tribütilfosfin (TBP) DTT yerine kullanılabilir (HERBERT, 1998).

II.5.2. Proteinlerin Ayırımı

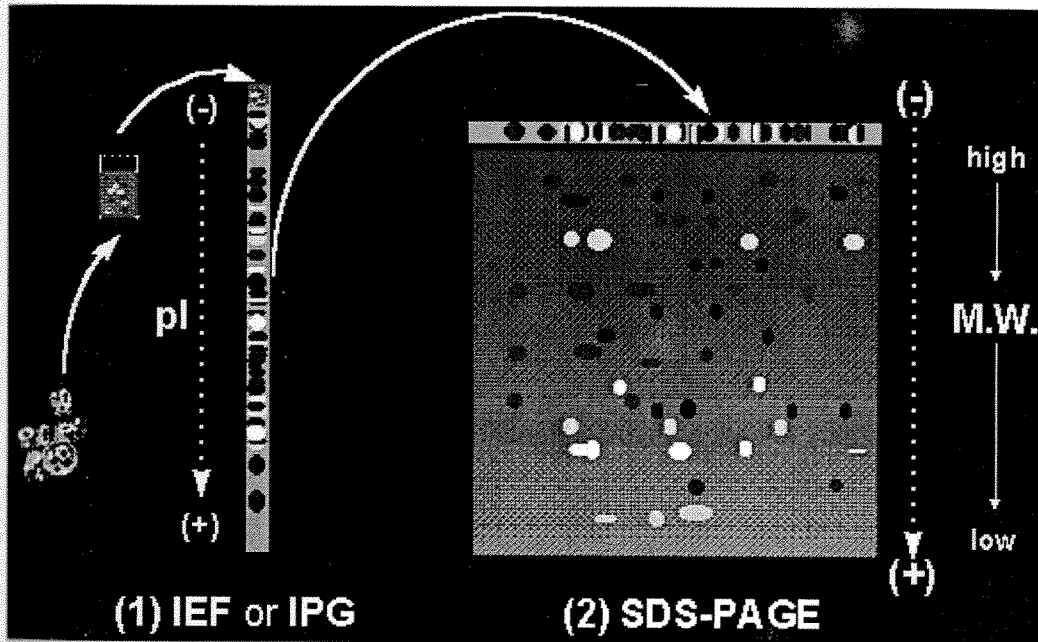
Örnek hazırlama basamağından sonra proteinlerin ayrılması gerçekleştirilir. Proteinlerin kompleks karışımlarının ayrılmasında en çok kullanılan metod 2D-PAGE'dir (RABILLOUD, 1996; GORG ve diğ., 2004). Bu teknik birinci boyutta yüke bağımlı bir ayırma yöntemi olan

izoelektrik odaklama (IEF) ile ikinci yönde SDS varlığında moleküler kütleyle göre ayırım yapan Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit jel Elektroforezinin (SDS-PAGE) birleşimidir.

İzoelektrik odaklama proteinlerin sürekli bir pH gradientinde izoelektrik noktalarına göre fraksiyonlanması temeline dayanır. Günümüzde ticari olarak immobilize pH gradient (IPG) jellerin kullanımı yaygındır. pH gradienti, poliakrilamit matriks fiberlerine kopolimerizasyon ile oluşturulur. Bu işlem “immobilin” adı verilen bir seri zayıf asit ve bazın tampon olarak kullanılması ile gerçekleştirilir. IPG’lerin kullanılması yüksek rezolüsyon, tekrarlanabilirlik ve fazla miktarlarda proteinlerin uygulanması açısından önemlidir. Immobilize pH gradient stripleri farklı pH aralıklarında ticari olarak temin edilebilmektedir.

IPG striplerine örnek yüklendikten sonra elektrik akımı verildiğinde proteinler yüklerine göre, net yüklerinin sıfır olduğu pH değerine (pI) kadar göç ederler ve bu noktada hareketsiz kalarak dar bir noktada odaklanırlar.

IPG striplerinde odaklanmış olan proteinler daha sonra 2D-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Elektroforetik ayırma sadece etkin moleküler kütleyle bağlıdır ve jeldeki moleküler elek doğrultusunda ayrılma gerçekleşir. Kullanılan poliakrilamit jel konsantrasyonu etkin ayrılmayı sağlar. IEF sonrası elde edilen jel, ayırma jeli üzerine agaroz ile yapıştırılır.



Şekil II.1 2D-PAGE Tekniğinin Şematik Gösterimi

II.5.3. Protein Görüntüleme Yöntemleri

Protein spotlarının görünür hale gelmesi için protein boyama yöntemleri kullanılır. Bunlardan en eski ve en yaygın olarak kullanılanı Coomassie Brilliant Blue R250 veya G250 boyalarıdır. Bu boyalar sırası ile 100 ng ve 50-100 ng proteini belirleyebilirler ve bu boyalar analizin diğer aşamalarındaki kütle spektrometresi cihazları ile uyum içindedirler.

II.5.4. 2D-PAGE Jellerin Değerlendirilmesi

Elde edilen jel görüntüleri komplike bilgisayar sistemleri ve yazılımlar kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilirler. Bu amaçla PDQuest ve Imagemaster gibi yazılımlar en yaygın olarak kullanılmaktadır. 2D-PAGE jellerde analizler ile belirlenen ve karakterize edilen proteinlerin çok büyük bir çoğunluğu 2D elektroforez databanklarında depolanır ve yılda bir kez "Electrophoresis" dergisinde yayınlanır. Bunlardan bazıları internet üzerinden temin edilebilir.

2D-PAGE databank sistemlerinde en yaygın kullanılan SWISS-2D PAGE'dir. Tüm internet adresleri üzerinden diğer sistemlere geçebilmek mümkündür. Ayrıca izoelektrik nokta ve moleküler kütlelerin yanı sıra; aminoasit bileşenleri, post-translasyonel modifikasyonlar, protein ve nükleotid dizi analizleri, sekonder ve tersiyer yapılar, metabolik databanklar, enzim databankları gibi adreslere de ulaşmak mümkündür (TELEFONCU ve diğ., 2002).

II.5.5. Proteinlerin Tanımlanması

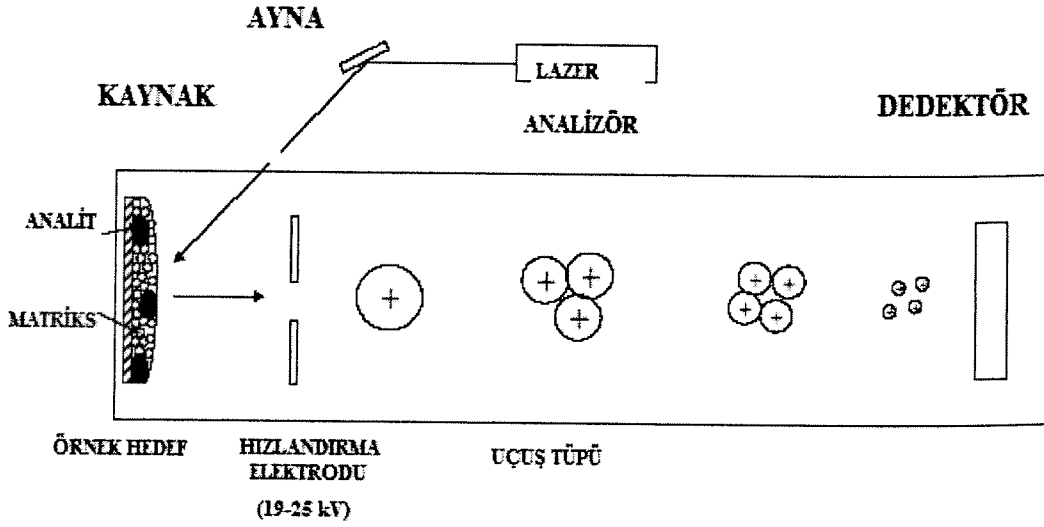
Dokudan hücreye kadar biyolojik orijinli makromoleküllerin, MALDI-Tof (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight) kütle spektrometresi ile çok yönlü analizi popüler hale gelmiştir. Geniş kütle dağılım (1-300 kDa), yüksek doğruluk ve hassasiyette kompleks örneklerde biyomoleküllerin (peptit, protein, oligosakkarit, oligonükleotid) tanımlanmasında umut verici bir metot olmaya başlamıştır.

1980'lerde Tanaka ve ekibi (TANAKA ve diğ., 1988), Karas ve Hillenkamp (KARAS ve HILLENKAMP, 1988) tarafından biyokimyasal analizlerde MALDI-Tof kütle spektrometresinin başarısı, incelemelerle kanıtlanmıştır. Alet özellikle 1991'den sonra ticari olarak geliştirilmeye başlanmıştır (STULTS, 1995). Biyomolekül çalışmalarda MALDI-Tof kütle spektrometresinin analitik bir alet olarak kullanımı son 15 yıldan beri gerçekleştirilmektedir. Disiplin olarak proteomiksin büyümesi, protein tanımlanmasında kullanılması ve hastalık biyobelirteçleri için

kuvvetli bir alet olarak analitik platformda umut verici potansiyele sahip olması dolayısı ile kütle spektrometresi kullanımı, diğer tekniklerle karşılaştırıldığında göreceli olarak yeni kullanılmaya başlanmasına rağmen yayınlarda MALDI metodu ve uygulamalarının kullanımı çok büyük bir oranda artmıştır (BONK VE HUMENY,2001; HARVEY, 1996; ZALUZEC ve diğ., 1995).

MALDI-Tof analizi aynı enerji ile uyarılan matriksle birlikte iyonlaşmasından sonra farklı kütlelere sahip olmaları nedeni ile değişik zamanlarda dedektöre ulaşma esasına dayanır. Analizörün Tof olarak adlandırılmasının nedeni, iyonların uçuş zamanlarından kütlelerinin hesaplanmasıdır. Dedektöre ulaşma zamanı iyonların kinetik enerjileri, yükleri ve kütlelerine bağlıdır.

MALDI-Tof kütle spektrometresi, total bir peptit karışımından peptit kütlelerinin tayinine olanak sağlayan bir tekniktir. Bu metot proteomik çalışmalar için önemli bir araçtır. Jel spotlarında, triptik veya diğer proteolitik enzimlerle parçalama sonrası elde edilen kütleler, protein veri tabanlarında listelenen tüm proteinlerin teorik parçalarının kütleleri ile karşılaştırılır ve enzim için triptik parçalama bölgeleri kullanılarak her bir protein için değerler hesaplanır. Triptik parçalama söz konusu olduğunda, bilgisayar programı; tüm proteinlerin her bir lizin ve arjininden sonra gelen peptit bağıntı parçalara ayırarak, teorik kütlelerini hesaplayabilmektedir. Bu kütlelerle uyum sağlayan doğru proteinin bulunması, gerçek kütlelerle kıyaslama yolu ile mümkün olmaktadır. Fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon gibi modifikasyonlar da bilgisayar arama programlarının içeriğine eklenebilir. Her bir protein karakteristik triptik peptit modellerine sahiptir, oluşan parçaların kütleleri, ana proteinin tanımlanmasında kullanılabilir. Bu nedenle, elde edilen kütle verileri “kütle parmak izi” olarak ifade edilir (TELEFONCU ve diğ., 2002).



Şekil II.2 MALDI Kütle Spektrometresi

II.5.6. Proteom ve Uygulamaları

Proteom teknolojisi, canlı hayatını ilgilendiren her alan ve proseste uygulama alanı bulmaktadır. Genel hücre biyolojisi, gen fonksiyonu, regülasyon mekanizmaları, metabolik yollar gibi, genel uygulamaların yanı sıra tarımda; dirençlik mekanizmaları (viral, bakteriyel, fungal veya böcek), verimlilik ve kalitenin artırılması, patojen parazit etkileşimleri, ayrıca alerji, toksikoloji, yeni ilaçların bulunması ve geliştirilmesi ve medikal uygulamalar bunlara örnek olarak verilebilir.

Günümüzde özellikle ticari proteom firmalarının da ağırlık verdiği ana konular ise ilaç dizaynı ve geliştirilmesi, tıpta ise teşhis ve tedaviye yönelik yapılan çalışmalardır.

Biyomedikal alanda vücut sıvı örneklerinin orijinlerinin belirlenmesi, vücut sıvı, hücre veya dokularda protein fenotip ve post-translasyonel modifikasyonlarının belirlenmesi, hastalığın profilendirilmesi ve protein ekspresyonu ve yeni hastalık spesifik proteinlerin tespiti temel hedeflerdir.

Proteomiks tekniği bugüne kadar Parkinson, Alzheimer, Huntington, Down sendromu ve kanser gibi pek çok hastalıkta ve hastalık modelinde uygulanmıştır. Kanser gibi hastalıkların moleküler temelini anlamamızdaki büyük ilerlemelere rağmen, hala hem hastalık mekanizmalarını anlamada hem de erken teşhis ve tedavi için etkin stratejiler geliştirmede çok

büyük boşluklar mevcuttur. Proteomikse olan ilginin nedeni hastalık araştırmalarında diğer yaklaşımların bazı sınırlamalarının üstesinden gelebileceği beklentileridir (PETRICON ve diğ., 2002). DNA mikroarraylerinin kullanımından önce lösemiler 2D-PAGE tekniği kullanılarak farklı alt tiplerine sınıflandırılmıştır (HANASH ve diğ., 2002). Kalp yetmezliğinin deneysel modelleri ile insan materyalinde miyokardiyal proteinlerde değişikliklerin ortaya çıktığı gösterilmiştir. “Miyozin hafif zincir 2” gibi proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları rapor edilmiştir (VAN EYK, 2001). Proteomiks kanser araştırmalarında, özellikle tümörün gelişmesi ve ilerlemesi ile ilgili çalışmalarda da kullanılmaktadır. En önemli alanlardan biri de, tümör büyüme ve gelişmesi ile ilgili ana faktörlerden biri olarak apoptotik mekanizmaların bozulması ileri sürüldüğü için, apoptozis çalışmalarıdır (ROBAYA ve diğ., 1994). Alzheimer hastalıklı (AD) post-mortem beyin proteinleri yaşa bağımlı olarak karşılaştırmalı proteom analizi ile analizlenmiş ve kontrol ve AD dokuları arasında 37 farklı protein saptanmıştır. Bu proteinler karbohidrat metabolizması, lipid transportu, stres cevabı gibi birkaç fonksiyonel katagoride toplanabilir. Ayrıca, AD patojenezinde daha önceden belirlenen α -kristalin, süperoksit dismutaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz gibi proteinler bu çalışmada tanımlanmıştır (SCHONBERGER ve diğ., 2001). Diğer bir çalışmada; Alzheimer hastalığı olan 15 hastanın ve nörolojik hastalığı olmayan 15 hastanın post-mortem temporel korteks beyin dokularında yapılan çalışmalarda her iki grupta 700 ortak protein spotu saptanmıştır. Hastalıklı ve sağlıklı protein spotlarının yoğunlukları karşılaştırıldığında 5 proteinde yoğunluk artarken, 28 spotta yoğunluğun azaldığı ve sadece 9 spotun hastalıklı grupta olduğu belirlenmiştir (TSUJI ve diğ., 1999). Mesial temporal lob epilepsilili (MTLE) ve sağlıklı hipokampus bölgeleri ile yapılan çalışmada apolipoprotein A-I olarak 2 protein spotu tanımlanmıştır (YANG ve diğ., 2005).

Kindling modeline göre epilepsi oluşturulmuş sıçan beyinlerinde yapılan çalışmada mitokondrial sitokrom *bc1* kompleksinin bir bileşeni olan Rieske demir-sülfür proteinin farklı modifikasyonları tanımlanmıştır (JUNKER ve diğ., 2005).

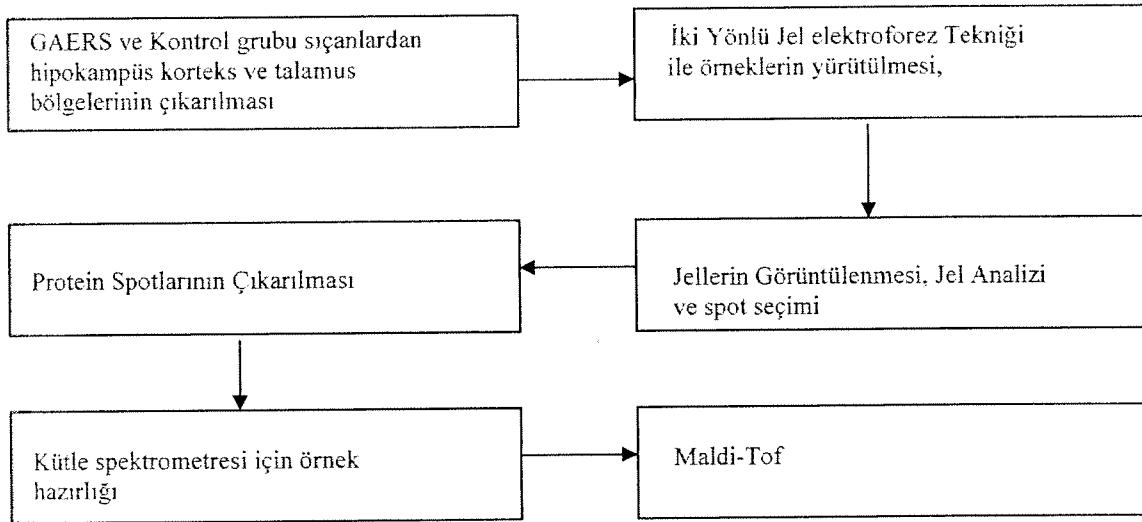
Kainik asit kullanılarak oluşturulmuş epilepsi modelinde sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada kainik asit verilmiş olan hayvanlarda iki proteinin seviyelerinde azalma olduğu ve bir heparin-bağılı proteinin miktarının arttığı bulunmuştur (KRAPPENBAUER ve diğ., 2001).

2004 yılında yapılan bir çalışmada epileptik hastalarda insan serebral korteksinin proteomik açıdan incelenmesi gerçekleştirilmiş ve epilepsi patojenezi ile ilgili olabileceği düşünülen 9 farklı proteinin miktarlarında değişiklikler saptanmıştır. (EUN ve diğ., 2004).

BÖLÜM III

GEREÇ ve YÖNTEM

III.1.ARAŞTIRMA YÖNTEMİ



Şekil III.1 Çalışmada İzlenen Yöntemler

III.2. ARAŞTIRMA ARAÇLARI

III.2.1.Araştırmada Kullanılan Cihazlar

SANTRİFÜJ:	Sigma 3K 30 Yüksek Devirli, Soğutmalı (A.B.D.)
SANTRİFÜJ ROTORU:	Sigma 13131H (20000 RPM)
SPEKTROFOTOMETRE:	Shimadzu UV 1601 (Japonya)
HASSAS TERAZİ:	Sartorius± 0,0001
DERİN DONDURUCU:	Vestel(0/-18 °C) çekmeceli tip (Türkiye)
BUZDOLABI:	Aygaz (Türkiye)
VORTEKS KARIŞTIRICI:	Fisons Whirlimixer (İngiltere)
HOMOJENİZATÖR:	Bath (İngiltere)
DİSTİLE SU CİHAZI:	Rios-DI UV Millipore
MANYETİK KARIŞTIRICI :	Chiltren Isıtıcı HS 31 (İngiltere)
ETÜV :	Genlab Midi/2/AL (0-100) İngiltere)
OTOMATİK PİPETLER:	Gilson marka pipetler 20,200,1000,2,10,100µL'lik
pH METRE:	HANNA HI 9024 (Romanya)
ORBİTAL KARIŞTIRICI:	(Almanya)
IEF ELEKTROFOREZ SİSTEMİ:	Protean IEF Cell Bio-Rad (A.B.D.)
ÇOKLU ELEKTROFOREZ TANKI:	Protean II XL Multi-Cell Bio-Rad A.B.D.)
ELEKTOFOREZ GÜÇ KAYNAĞI:	Apelex PS 9009 TX (Fransa)
HP SCANJET SCANNER 4370	
GÖRÜNTÜLEME SİSTEMİ	Molecular Imager GS-800 Calibrated Densitometer Bio-Rad (A.B.D)
Micromass M@LDI-R (MALDI-TOF):	Waters-Micromass (İngiltere)

III.2.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

Bio-Rad Firmasından Alınan Kimyasallar: ReadyStrip IPG strips (pH 3-10)17 cm, Bio-Lyte 3/10 Ampholite %40, dithiothreitol (DTT),Tributilfosfin (TBP), CHAPS (3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonyum]-1-propan sülfonat, İyodaasetamid, Ovalbumin, mineral yağ, Quick Start-Bradford Dye Reaktifi.

Sigma Firmasından Alınan Kimyasallar: Adrinokortikotropik hormon (ACTH) clip 18-39, Alkol Dehidrojenaz, Glufibrinopeptit B, Enolaz, Tripsin, Amonyum Bikarbonat, α -siyano-4 hidroksisinnamik asit, N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine (TEMED).

Merek Firmasından Alınan Kimyasallar: Asetonitril, Metanol, Asetik asit, Formik asit, Etanol, Trifloroasetik asit (TFA), Formik asit, Amonyum peroksido sülfat(APS), Gliserin, Sodyumdodesil sülfat(SDS), Tris.

Fluka Firmasından Alınan Kimyasallar: Coomassie Brilliant Blue G250, Akrilamid, N, N' Metilen-bis-akrilamid.

Prona Firmasından Alınan Kimyasallar: Agaroz

III.3.YAPILAN ÇALIşMALAR

III.3.1. Örnek Hazırlama

Tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesinde en önemli adım olan örnek hazırlığı Gorg ve ekibine göre (GORG ve diğ., 2003) Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji A.B.D' da aşağıdaki şekilde yapıldı:

1. Tablo III.1'de verilen GAERS ve kontrol (Wistar) gruplarındaki sıçanlar eterli ortamda bekletililerek (2-4 dakika) bayıldı.

Tablo III.1 Çalışmada Kullanılan Hastalıklı ve Sağlıklı Sıçan Grupları

GAERS ♂ (hastalıklı)grubu	7 aylık,277g A2/2	7 aylık,295g A2/2	6 aylık,250g A2/2	6aylık,261g A1/1	6aylık,258g A1/1
Wistar ♂ (Kontrol) Grubu	6 aylık,340g	6 aylık,296g	7 aylık,240g	7aylık,245g	7aylık,280g

2. Bayılan sıçanlar dekapite edilerek beyinleri 1-2 dakikada çıkarıldı.

III.2.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

Bio-Rad Firmasından Alınan Kimyasallar: ReadyStrip IPG strips (pH 3-10)17 cm, Bio-Lyte 3/10 Ampholite %40, dithiothreitol (DTT),Tributylfosfin (TBP), CHAPS (3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonyum]-1-propan sülfonat, İyodaasetamid, Ovalbumin, mineral yağ, Quick Start-Bradford Dye Reaktifi.

Sigma Firmasından Alınan Kimyasallar: Adrinokortikotropik hormon (ACTH) clip 18-39, Alkol Dehidrojenaz, Glufibrinopeptit B, Enolaz, Tripsin, Amonyum Bikarbonat, α -siyano-4 hidroksisinnamik asit, N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine (TEMED).

Merck Firmasından Alınan Kimyasallar: Asetonitril, Metanol, Asetik asit, Formik asit, Etanol, Trifloroasetik asit (TFA), Formik asit, Amonyum peroksido sülfat(APS), Gliserin, Sodyumdodesil sülfat(SDS), Tris.

Fluka Firmasından Alınan Kimyasallar: Coomassie Brilliant Blue G250, Akrilamid, N, N' Metilen-bis-akrilamid.

Prona Firmasından Alınan Kimyasallar: Agaroz

III.3.YAPILAN ÇALIŞMALAR

III.3.1. Örnek Hazırlama

Tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesinde en önemli adım olan örnek hazırlığı Gorg ve ekibine göre (GORG ve diğ., 2003) Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji A.B.D’da aşağıdaki şekilde yapıldı:

1. Tablo III.1’de verilen GAERS ve kontrol (Wistar) gruplarındaki sıçanlar eterli ortamda bekletililerek (2-4 dakika) bayıltıldı.

Tablo III.1 Çalışmada Kullanılan Hastalıklı ve Sağlıklı Sıçan Grupları

GAERS ♂ (hastalıklı)grubu	7 aylık,277g A2/2	7 aylık,295g A2/2	6 aylık,250g A2/2	6aylık,261g A1/1	6aylık,258g A1/1
Wistar ♂ (Kontrol) Grubu	6 aylık,340g	6 aylık,296g	7 aylık,240g	7aylık,245g	7aylık,280g

2. Bayılan sıçanlar dekapite edilerek beyinleri 1-2 dakikada çıkarıldı.

3. Hipokampus, korteks ve talamus bölgeleri disekte edildi (3-5.5 dakika).
4. Beyin bölgelerinden çıkarılan bu bölgeler sıvı azot ile dondurularak havanda öğütüldü.
5. 500 µL liziz tamponunda (7 M üre, 2 M tioüre, %1(w/v) ASB-14 deterjanı, 40 mM Tris baz, 5 mM proteaz inhibitör, % 0.001 brom fenol blue) çözünürleştirildi ve sonike edilerek (3x10 saniye) bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Bekleme süresi sonunda örnekler 16000 g'de 20 °C'de 20 dakika santrifüj edildi, süzüntü alınarak 25 µL'lik hacimlere ayrılarak -20 °C'de saklandı.

III.3.2. Bradford Metoduna Göre Protein Tayini

Örnek protein miktar tayini Coomassie mavisi metoduna göre yapıldı (BRADFORD, 1976).

1. 2 mg/mL ovalbumin stok çözeltisi 0.1 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek, standart olarak kullanıldı.
2. Standart çözeltilerinden 20 µL (2µg/mL), 40 µL (4µg/mL), 60 µL (6µg/mL), 80 µL (8 µg/mL) olacak şekilde alındı.
3. Örneklerden 2 µL alındı.
4. Standart ve örneklerin son hacmi distile su ile 800 µL'ye tamamlandı.
5. Referans olarak 800 µL distile su kullanıldı.
6. Standart, örnek ve referans çözeltilerine 200 µL Quick Start-Bradford Dye reaktifinden konularak tüm tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı.
7. 10 dakika sonra 595 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

III.3.3. İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Çalışmada proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrılması işlemi, Bio-Rad firmasından temin edilen ReadyPrep 2D starter kit manuel kitapçığına uygun olarak yapıldı (BIORAD). Proteinlerin ikinci boyutta molekül ağırlıklarına göre ayırımı ise Laemmli'nin geliştirdiği SDS-PAGE sistemine göre yapıldı (LAEMMLI 1970).

Çalışmada izlenen yol aşağıdaki gibidir:

- Rehidrasyon basamağı 45 dakika
- IPG rehidrasyonu 11-16 saat

- İzoelektrik Odaklama 7 saat
- IPG striplerin dengelenmesi
- SDS-PAGE 4.5-5.5 saat
- Jellerin Boyanması 3 gün

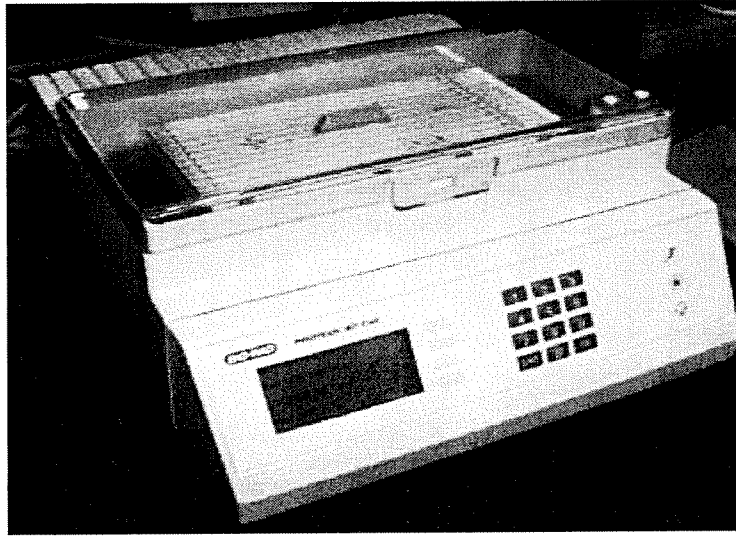
III.3.3.1. Örneklerin IPG stripine Yüklenmesi

1. 25 µL'lik örneklerin protein miktarlarına göre; örnek tamponu (8 M üre, %2 CHAPS, 50 mM DTT, %0.2 (w/v) Bio-Lyte amfolit pH 3-10, eser miktarda brom fenol blue) ile hacim 260 µL'ye tamamlandı.
2. Örnek pipet yardımı ile özel hazırlanmış ve on iki kanaldan oluşan tablanın bir kanalına dikkatlice yayıldı.
3. -20 °C'de saklanan striplerden bir tanesi çıkarılarak 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
4. Stribin jel kısmının üzerinde bulunan koruyucu bant çıkarıldı.
5. Strip bir pens ile jel kısmı örneğin üzerine gelecek şekilde yayıldı.
6. Tüm jelin örnek ile iyice temas etmesi ve hava kabarcığı kalmaması için pens jelin üzerinde yavaşça gezdirildi.
7. 15 dakika beklemenin sonunda örneğin jel tarafından iyice emilip emilmediği kontrol edildi. Gerekli durumda strip dikkatlice yerinden kaldırılarak tekrar örnek üzerine konuldu.
8. 45 dakika sonunda jelin ememediği eser miktardaki örnek bir peçete ile dikkatlice alındı.
9. Bu işlem sonunda stribin üzeri 3 mL mineral yağı ile kapatılarak hava ile teması kesildi.
10. Tabla plastik kapak ile kapatıldı ve oda sıcaklığında 11-16 saat boyunca bekletildi.

III.3.3.2. İzoelektrik Odaklama

1. Odaklama tablasının kanallarının (12 adet) her iki ucunda bulunan elektrik akımının geçmesini sağlayan tellerin üzerine, scribe yüklenen örnek sayısına göre 2-3 µL distile 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 strip mineral yağından bir pens ile çıkarıldı ve stribin ucundan 1-2 dakika tutularak yağın akması sağlandı.

3. Strip daha sonra odaklama tablasına + ve – uçlarına göre jel kısmı alta gelecek şekilde konuldu.
4. Stribin üzerine 3 mL mineral yağ konuldu. Odaklama tablasının kapağı + ve – işaretlerine dikkat edilerek kapatıldı.
5. Odaklama tablası Protean IEF hücresine yerleştirildi.
6. Protean IEF hücresinde odaklama işlemi 3 basamakta Tablo III.2’de verildiği şekilde yapıldı.



Şekil III.2 Protean IEF Hücresi

7. Elektroforez tamamlandıktan sonra strip odaklama tablasından alındı ve temiz bir tablaya jel kısmı üste gelecek şekilde konuldu.
8. İkinci boyutta SDS-PAGE işlemi yapılmadığında tablanın kapağı kapatıldı ve streç film ile iyice sarılarak strip -20 °C’de saklandı.

Tablo III.2 İzoelektrik Odaklama İşlemi

17 cm	Voltaj	Zaman	Volt-Saat	Mod
1.Basamak	250	20 dakika	-----	Lineer
2.Basamak	10000	2.5 saat	-----	Lineer
3.Basamak	10000	-----	40000 V-saat	Hızlı
Total		7 saat	~50000 V-saat	

III.3.3.3. SDS-PAGE

3a. Kullanılan Çözeltiler

- APS (%10 w/v): Kaç tane jel dökülecekse ona göre her defasında taze hazırlandı.
- Agaroz çözeltisi: % 0.5 agaroz, 192 mM glisin, % 0.1 SDS, 25 mM tris baz, eser miktarda brom fenol blue bir miktar distile suda çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlandı, kaynatıldıktan sonra 5 mL'lik hacimlerde +4°C'de saklandı.
- Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi: 29.2 g akrilamid ve 0.9 g bisakrilamid distile su içinde çözümlenerek 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 distile suda çözüldükten sonra pH'ı 6 N HCl ile 8.8'e ayarlandı ve son hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.
- SDS çözeltisi: 10 g SDS tartıldı, bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- TEMED: Orjinal şişesinden kullanıldı.
- PAGE Tamponu: 3 g Tris baz, 15 g Glisin ve 1 g SDS bir miktar distile suda çözüldükten sonra 1 L'ye hacmi tamamlandı (her elektroforez işleminde taze 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 distile suda çözüldü ve pH'ı 6 N HCl ile 8.8'e getirildi. 36.03 g Üre, 2 g SDS tartıldı ve hazırlanan Tris çözeltisinde çözüldü. Çözeltiye 20 mL Gliserol ilave edildi ve son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.

3b. Jel Kasetlerinin Hazırlanması ve Jelin Dökülmesi

1. İçinde jelin polimerize olacağı kuru ve temiz cam levhalardan uzun olan (20x22.5cm) en alta ve levhanın her iki kenarına 0.8 cm eninde, 20 cm boyunda ve 1.5 mm kalınlığında ara levha konuldu.
2. Bunların üzerine kısa levha (20x20cm) yerleştirildi. Hizalama kartı iki cam levhanın arasına konuldu ve ara levhalar düzeltildi.
3. Ara levhaların bulunduğu yerlerden kısıpçla tutturularak her iki cam levha birleştirildi ve böylece jelin döküleceği kaset hazırlandı.

4. Hizalama kartı aradan çıkarıldı ve cam levhalar ile ara levhaların aynı hizada olup olmadıkları kontrol edildi.
5. Döküm standı üzerinde bulunan vidalar açıldı.
6. Kasetin konulacağı bölmeye önce plastik pet yerleştirildi ve üzerine hazırlanan kaset konuldu.
7. Döküm standının her iki tarafında bulunan vida ile kısıkaçlar tutturuldu.

Tablo III.3 Jel Kompozisyonu

65 mL %12.5 'lik Jel Kompozisyonu	
Akrilamid/Bisakrilamid	26 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	16.25 mL
SDS %10 (w/v)	650 µL
Distile su	21,64 mL
APS %10 (w/v)	350 µL
TEMED	70 µL

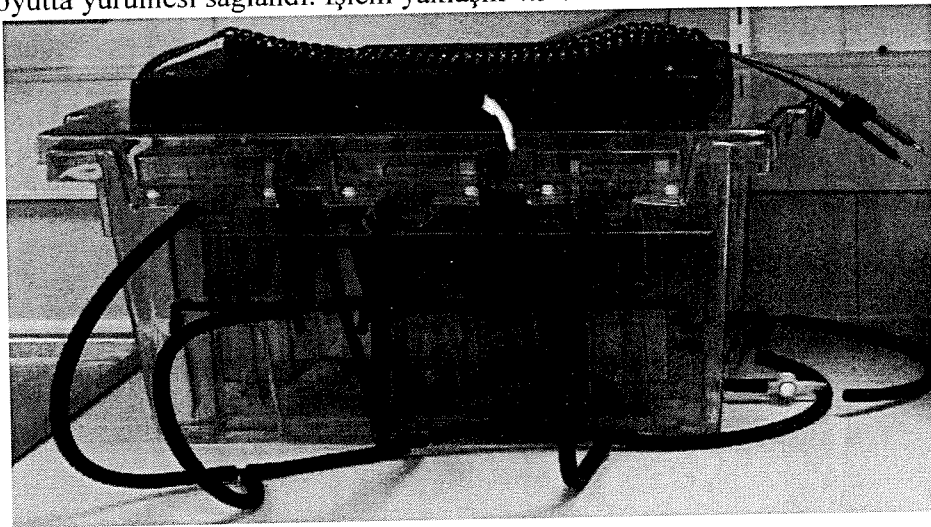
8. Tablo III.3'e göre hazırlanan çözelti jel kasetinin içine bir huni yardımı ile döküldü ve hemen arkasından 2D tarağı takıldı. Jelin polimerleşmesi için bir saat kadar beklendi.

3c. IPG Jellerin Dengelenmesi

1. -20 °C'de saklanan örnek içeren sribin mat beyaz rengi şeffaf olana ve başlangıçta sribin içinde olan üre çözünene kadar oda sıcaklığında bekletildi.
2. Bekleme sonunda jel kısmı üste bakan sribin üzerine dengeleme I tamponundan (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 bekletildi.
3. 10 dakika sonunda jelin üzerindeki dengeleme I tamponu döküldü. Daha sonra jelin üzerine dengeleme II tamponundan (6 M üre, %2 SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, %20 gliserol, %2.5 iyodaasetamid (w/v)) 5 mL konuldu ve 10 dakika orbital karıştırıcıda bekletildi.
4. İşlem sonunda dengeleme II tamponu döküldü.

3d. SDS PAGE işlemi

1. 100 mL'lik bir mezüre PAGE tamponu konuldu. Mezürün üzerindeki köpükler whatman kağıdı ile alındı.
2. Strip bir pensle tutulup mezürdeki PAGE tamponuna birkaç defa batırılarak iyice ıslatıldı.
3. Daha sonra jelin ıslaklığı dikkatlice whatman kağıdı ile alındı.
4. Jelin polimerleşmesinden sonra 2D tarağı jelin üst kısmından çıkarıldı.
5. Tarağın çıktığı yerin üzerine (ancak jelin içine girmeyecek şekilde) stripin jel yüzü bize bakacak şekilde yatırıldı.
6. Agaroz çözeltisi ısıtıcı üzerinde kaynayana kadar ısıtıldı. 2D tarağının çıktığı yere poliakrilamid jelinin üzerine sıcak agaroz çözeltisinden konuldu.
7. Bir dakikalık beklemeden sonra strip whatman kağıdı ile henüz donmamış olan agarozun içinden poliakrilamid jelinin üzerine doğru itildi.
8. Merkezi soğutma ünitesinin her iki tarafının üst kısmında bulunan kısma lastik şeritler PAGE tamponunda ıslatıldıktan sonra iyice oturtuldu.
9. Agarozun donmasından sonra jel kaseti örneğin olduğu taraf lastik şeritlerin olduğu tarafa gelecek şekilde merkezi soğutma ünitesine takıldı.
10. Merkezi soğutma ünitesinin her iki yönüne birer jel kaseti takılabilir. 6'lı sistemde bu üniteden 3 adet vardır ve dolayısı ile 6 jel aynı anda yürütülebilir.
11. 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.3 SDS PAGE'in Yapıldığı Elektroforez Tankı

III.3.3.4. Jellerin Kolloidal Coomassie ile Boyanması

Neuhoff ve ekibinin (NEUHOFF ve diğ., 1990) kullandığı yöntemle göre jeller kolloidal coomassie ile boyandı.

4a. Kullanılan Çözeltiler

Fiksasyon Çözeltisi (% 50 metanol,%10 asetik asit): 500 mL metanol üzerine 100 mL asetik asit konuldu ve son hacim 1 L'ye distile su ile tamamlandı.

Boya Çözeltisi (taze hazırlanır ve bir kullanımlıktır) : 85 g Amonyum sülfat 330 mL distile suda çözülür ve 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 0.325 g Coomassie G-250 üzerine 170 mL metanol konuldu ve iyice karıştırılarak boyanın çözülmesi sağlandı. Metanol-boya karışımına 15 mL fosforik asit konuldu ve 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Metanol-boya-fosforik asit karışımına amonyum sülfat çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi ve bu arada çözelti sürekli olarak manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Amonyum sülfat çözeltisiye tamamen eklendikten sonra çözelti 1 saat daha manyetik karıştırıcıda karıştırılır.

Tablo III.4 Boya Çözeltisini Oluşturan Bileşenler

Kimyasal	Son Konsantrasyon	Miktar
Amonyum sülfat	% 17	85 g
Coomassie G-250	% 0.065	0.325 g
Distile Su	-----	330 mL
Fosforik asit	% 3	15 mL
Metanol	%34	170 mL
Son hacim	-----	500 mL

Boya Çıkarma Çözeltisi (%10 Asetik asit): 100 mL asetik asit çözeltisi alındı ve hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

4b. Boyama İşlemi

1. Elektroforez işleminin sonunda jel kasetleri çıkarıldı.
2. Cam levhaları tutan kısıklar açıldı.
3. İki cam levha arasındaki ara levhalar çıkarıldı.

4. Cam levhalar yıkandıktan sonra plastik bir spatula yardımı ile iki cam levhanın birbirinden ayrılması sağlandı.
5. Poliakrilamid jel, jel tutucusu ile cam levhanın üzerinden alındı.
6. Saklama kabına %50 metanol ve %10 asetik asit içeren fiksasyon çözeltisi konuldu ve jel bu çözeltinin içine bırakıldı. Jel bir gece fiksasyon çözeltisinde bekletildi.
7. Ertesi günün sabahı fiksasyon çözeltisi boşaltıldı ve taze hazırlanan boya çözeltisinden 350 mL jelin üzerine döküldü ve orbital karıştırıcı üzerine konuldu.
8. Jel boya çözeltisinde 3 gün boyunca orbital karıştırıcıda bekletildi.
9. Boyama işleminden sonra boya çözeltisi döküldü ve jelin üzerine boya çıkarma çözeltisinden konuldu ve belirli aralıklarla çözelti yenilendi.
10. Boya çıkarma işlemi 2 gün sürdü.
11. Jellerin görüntüleri, HP marka 4370 model scanjet tarayıcı ile 300 dpi çözünürlükte tiff formatında alındı. Ayrıca İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde bulunan GS 800 jel görüntüleme sistemi kullanılarak da jellerin görüntüleri alındı.
12. Jeller kilitli poşetlerde %10'luk asetik asit içinde +4 °C'de saklandı.

III.3.4. MALDI-Tof

Kütle Spektrometresi ile proteinlerin tanımlanması işlemi Önder ve ekibine göre (ÖNDER ve diğ., 2006), Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi bünyesinde bulunan MALDI-Tof cihazı kullanılarak yapıldı.

III.3.4.1. Kütle spektrometresi için örnek hazırlığı

4a. Kullanılan Çözeltiler

100 mM Amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3): 0.07906 g NH_4HCO_3 tartıldı ve bir miktar distile suda çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

20 mM Amonyum bikarbonat/Asetonitril (50:50 v/v): 0.1581 g NH_4HCO_3 tartıldı ve 50 mL CH_3CN +50 mL distile su karışımında çözülerek hacmi hazırlanan asetonitril çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı

50 mM Amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3): 0.3953 g NH_4HCO_3 tartıldı ve bir miktar distile suda çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Tripsin çözeltisi (taze hazırlanır): 0.0015 g tripsin tartıldı ve 50 mM 250 mL NH_4HCO_3 ile çözüldü.

%1 Formik asit (HCOOH)/ %2 Asetonitril (CH_3CN): 1 mL HCOOH ve 2 mL CH_3CN otomatik pipet ile alındı ve hacmi balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

% 0.025 α -siyano-4-hidroksisinnamik asit: 0.0025 g α -siyano-4-hidroksisinnamik asit tartıldı ve 5 mL asetonitril+5 mL etanol+100 μL TFA (50:50 (v/v) CH_3CN /etanol, % 0.1 TFA) çözeltisinde çözüldü ve hacmi hazırlanan bu çözelti ile 10 mL'ye tamamlandı.

25 fmol Adrenokortikotropik hormone 18-39 (ACTH):1 mg ACTH, 6.5 mL etanol+3.5 mL CH_3CN +30 μL TFA (%65 etanol, %35 CH_3CN ,%0.3 TFA) içeren 10 mL çözeltide çözüldü. Bu çözeltiden 1 μL alındı ve hacmi 16.233 μL 'ye tamamlandı.

25 fmol Alkol Dehidrojenaz: 1 mg ADH, 6.5 mL etanol+3.5 mL CH_3CN +30 μL TFA (%65 etanol, %35 CH_3CN ,%0.3 TFA) içeren 10 mL çözeltide çözüldü. Bu çözeltiden 1 μL alındı ve hacmi 16.233 μL 'ye tamamlandı.

25 fmol Glufibrinopeptit B: 1 mg Glufibrinopeptit B, 6.5 mL etanol+3.5 mL CH_3CN +30 μL TFA (%65 etanol, %35 CH_3CN ,%0.3 TFA) içeren 10 mL çözeltide çözüldü. Bu çözeltiden 1 μL alındı ve hacmi 16.233 μL 'ye tamamlandı.

25 fmol Enolaz: 1 mg Enolaz, 6.5 mL etanol+3.5 mL CH_3CN +30 μL TFA (%65 etanol, %35 CH_3CN ,%0.3 TFA) içeren 10 mL çözeltide çözüldü. Bu çözeltiden 1 μL alındı ve hacmi 16.233 μL 'ye tamamlandı.

4b. Protein spotlarının boyasının çıkarılması

1. Jel analizi Bio-Rad firmasından temin edilen PDQuest iki boyutlu jel analiz software programının bir aylık deneme versiyonu ile yapıldı.
2. GAERS grubundaki her sıçan grubundan elde edilen jeller kendi içlerinde ve birlikte olarak analiz edildi. Aynı işlem kontrol grubu için de yapıldı.
3. Elde edilen jel görüntülerinden ve verilerden yararlanılarak hastalıklı ve sağlıklı grup jelleri kendi aralarında hem otomatik hem de manuel olarak incelendi.
4. Analiz sonunda hastalıklı ve sağlıklı grupta var olan ve/veya yok olan ya da spot yoğunluklarına göre farklılık gösteren protein spotları seçildi.

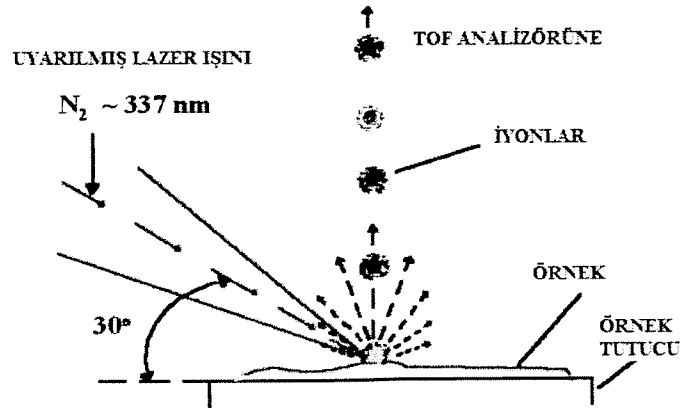
5. Seçilen protein spotları manuel olarak lansetle kesilerek çıkarıldı ve ependorf tüplere konuldu.
6. Protein spotları 300 µL 100 mM NH₄HCO₃ ile 15 dakika boyunca yıkandı.
7. Yıkama işleminden sonra süzüntü atıldı.
8. Daha sonra, 300 µL 20 mM NH₄HCO₃/CH₃CN (50:50 v/v) çözeltisi ile spotların boyaları çıkana kadar yıkandı. Bu arada her 15 dakikada süzüntü dökülerek çözelti yenilendi. Bu işlem yaklaşık 7-8 saat sürdü.
9. Spotların boyaları tamamen gidince süzüntü atıldı.
10. Protein spotları 100 µL CH₃CN ile 5 dakika süre ile yıkandı.
11. İşlem sonunda süzüntü atıldı.
12. Protein spotlarının tamamen kuruması için yaklaşık 5 dakika kadar açık havada bekletildi.

4c. Protein spotlarının triptik parçalanması

1. 50 mM NH₄HCO₃ içinde hazırlanan ve µL'inde 6 ng tripsin olan çözeltiden her protein spot örneğine 25 µL eklendi.
2. Çözelti jel parçasını örtmediği durumlarda tripsin içermeyen 50 mM NH₄HCO₃ çözeltisinden bir miktar daha eklendi.
3. Daha sonra örnekler 37 °C'de gece boyunca bekletildi.
4. Ertesi gün % 1 HCOOH ve % 2 CH₃CN içeren çözeltiden 30 µL eklendi ve 30 dakika boyunca örnek oda sıcaklığında vorteks ile karıştırıldı.
5. İşlem sonunda örnekler 25000 g'de santrifüjlendi.
6. Santrifüj işleminden sonra süzüntü alındı ve 5 µL'lik hacimlere ayrılarak MALDI işlemine kadar -20 °C'de saklandı.

5d. Örnek Uygulaması

Örnek ve matriks (% 0.025 α-siyano-4-hidroksisinnamik asit) (1:1) karıştırıldı. Adrenokortikotropik hormon (ACTH) clip 18-39, Alkol Dehidrojenaz, Glufibrinopeptit B ve Enolaz standart proteinleri matriks ile ayrı ayrı (1:1) karıştırıldı. Matriks ile karıştırılan örnek ve standart proteinler çelik hedefte bulunan kuyucuklara tatbik edildi. Örnek ve standartların uygulandığı çelik hedef vakum haznesine konuldu. Önce standartlarla alet kalibre edildi. Daha sonra örnekler analizlendi.



Şekil III.4 Örneğin MALDI-ToF'a Verilmesi

Analiz sonucunda elde edilen veriler Şekil III.5'de gösterildiği gibi www.matrixscience.com adresinde tarandı.

Address: http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMYER=Z&SEARCH=PMF

Matrix Science

HOME | WHAT'S NEW | MASCOT HELP | PRODUCTS | SUPPORT | TRAINING | CONTACT

Mascot > Peptide Mass Fingerprint

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name: Email:

Search title:

Database:

Taxonomy:

Enzyme: Allow up to missed cleavages

Fixed modifications:

Variable modifications:

Protein mass: kDa Peptide tol. Da

Mass values: ☒ MH⁺ ☐ M₂⁺ ☐ M-H⁺ Monoisotopic ☒ Average ☐

Data file:

Query:

Decoy: ☐ Report top: hits

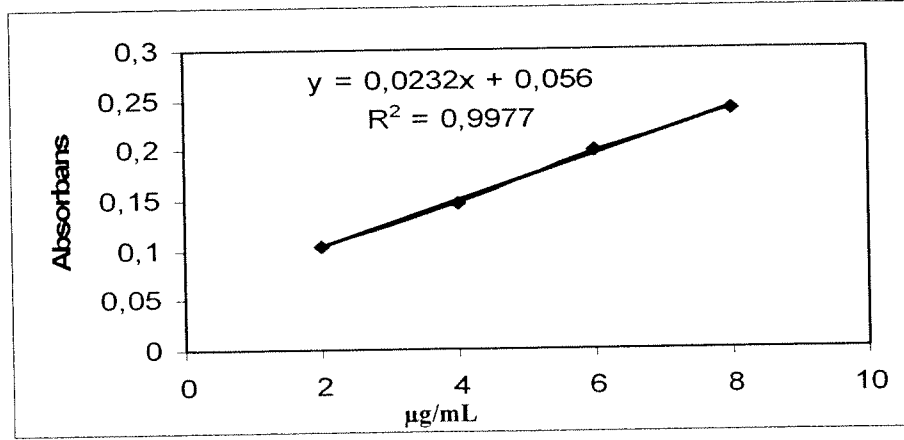
Şekil III.5 MALDI Analiz Sonuçlarının İnternette Taranması

BÖLÜM IV

BULGULAR

IV.1. PROTEİN MİKTARLARI

GAERS (hastalıklı) ve kontrol(Wistar) sıçanlarına ait beyinlerin hipokampus, korteks ve talamus bölgelerine ait proteinler Bölüm III.3.1’de anlatıldığı şekilde hazırlandı. Bölüm III.3.2’de verilen Bradford yöntemine göre protein standart eğrisi hazırlandı. Grafik IV.1’deki protein standart eğrisi kullanılarak hesaplanan, GAERS ve kontrol grubu hipokampus, korteks ve talamus bölgelerine ait yaklaşık protein miktarları Tablo IV.1’de verildi. Ayrıca Tablo IV.1’de GAERS sıçanlarının yaşları, ağırlıkları ve hangi aileden geldikleri; yine kontrol grubu sıçanların yaşları ve ağırlıkları da bu tabloda verildi.



Grafik IV.1. Ovalbumin kullanılarak hazırlanan Bradford protein standart eğrisi

Tablo IV.1. GAERS ve Kontrol Grubu Sıçan Beyinlerinden Elde Edilen Hipokampus, Korteks ve Talamus Bölgelerine Ait Protein Konsantrasyonları

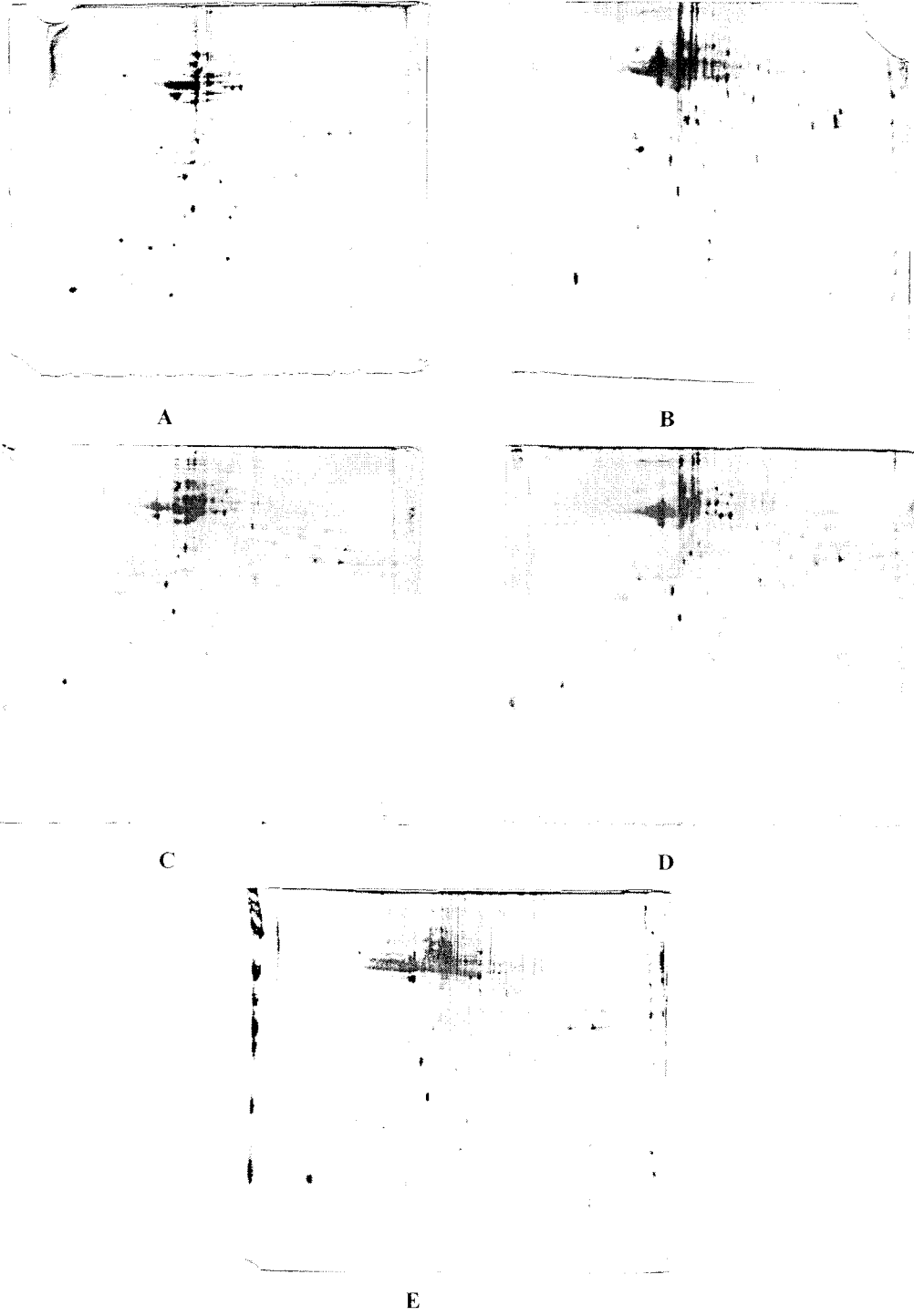
GAERS ♂ grubu (Hastalıklı)	7 aylık,277g A2/2 (1)	7 aylık,295g A2/2 (2)	6 aylık,250g A2/2 (3)	6 aylık,261g A1/1 (4)	6 aylık,258g A1/1 (5)
Hipokampus	10.7 mg/mL	11.6 mg/mL	9.6 mg/mL	10.3 mg/mL	10.1 mg/mL
Korteks	10.3 mg/mL	10.7 mg/mL	10.4 mg/mL	11.1 mg/mL	10.3 mg/mL
Talamus	9.8 mg/mL	11.2 mg/mL	10.6 mg/mL	9.7 mg/mL	10.6 mg/mL
Wistar ♂ Grubu (Kontrol)	6 aylık,340g	6 aylık,296g	7 aylık,240g	7 aylık,245g	7 aylık,280g
Hipokampus	11.9 mg/mL	10.3 mg/mL	8.4 mg/mL	8.5 mg/mL	9.8 mg/mL
Korteks	11.4 mg/mL	10.7 mg/mL	9.6 mg/mL	9.2 mg/mL	11.1 mg/mL
Talamus	11.2 mg/mL	10.6 mg/mL	10.5 mg/mL	9.8 mg/mL	10.4 mg/mL

IV.2. İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZ (2D-PAGE)

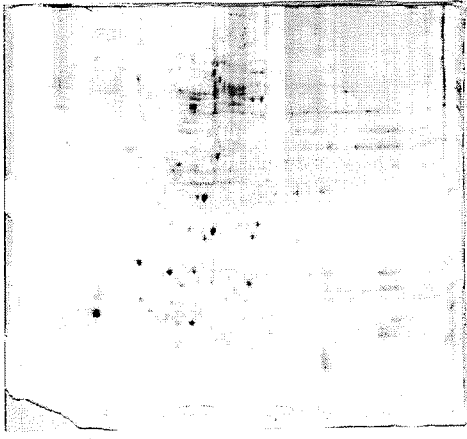
SONUÇLARI

Bölüm III.3.3'te anlatıldığı şekilde 2D-PAGE işlemi yapıldı. Bölüm III.3.3.4'te verilen kolloidal Coomassie boyama yöntemine göre jeller boyandı. Hem GAERS hem de kontrol gruplara ait her bir örnek için kendi işlerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilene kadar 2D-PAGE işlemi tekrar edildi.

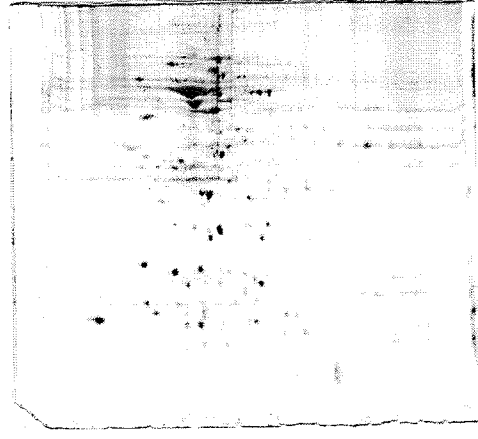
Çalışmada kullanılan GAERS (n=5) ve kontrol (n=5) grubu hipokampus, korteks ve talamus bölgelerine ait 2D-PAGE sonuçları Şekil IV.1, Şekil IV.2, Şekil IV.3, Şekil IV.4, Şekil IV.5, Şekil IV.6'da verildi.



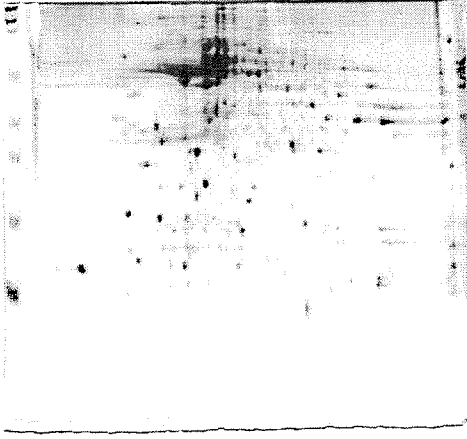
Şekil IV.1 GAERS Hipokampus Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=HG1, B=HG2,C=HG3, D=HG4, E=HG5)



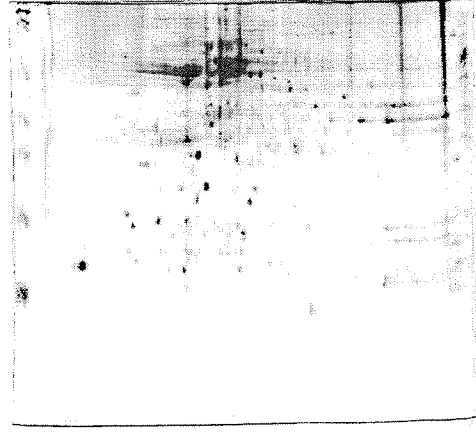
A



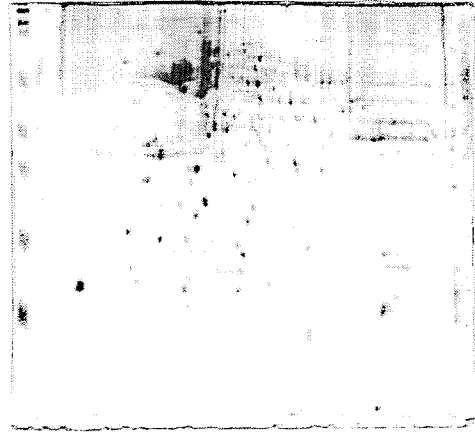
B



C

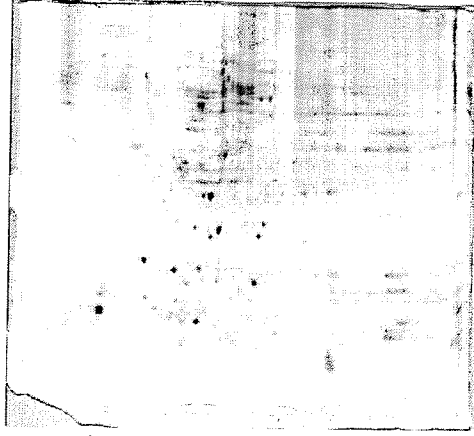


D

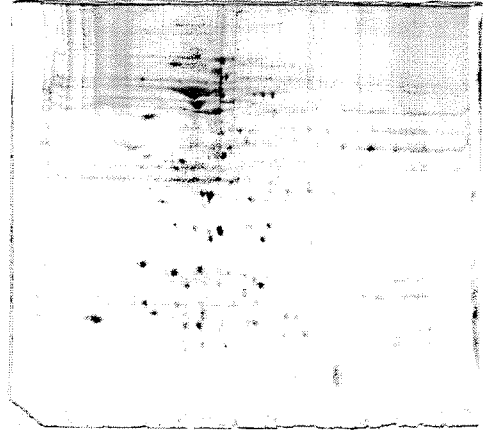


E

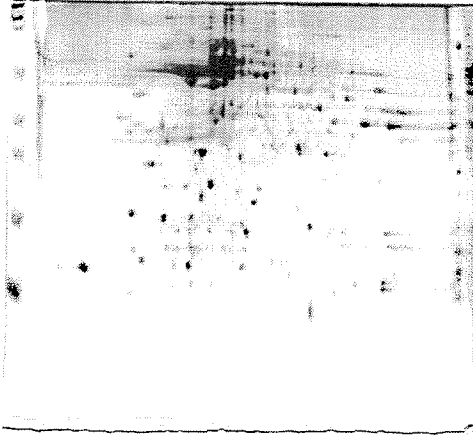
Şekil IV.2 Kontrol Hipokampus Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=HK1, B=HK2, C=HK3, D=HK4, E=HK5)



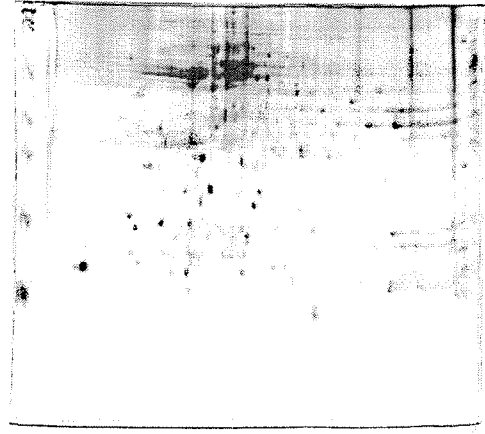
A



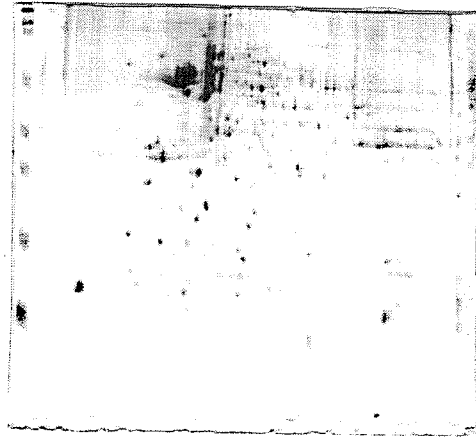
B



C

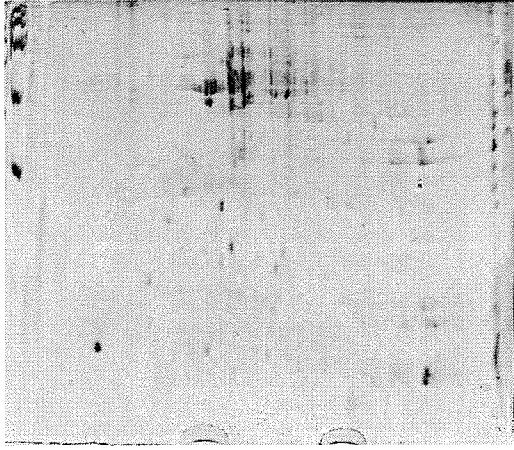


D

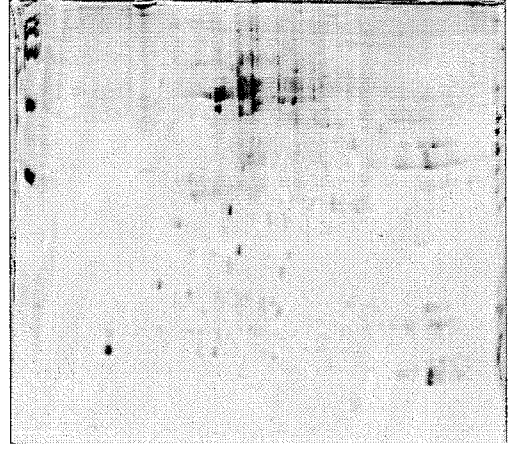


E

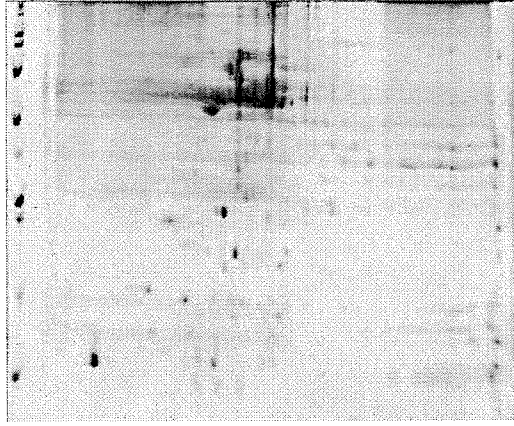
Şekil IV.2 Kontrol Hipokampus Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=HK1, B=HK2, C=HK3, D=HK4, E=HK5)



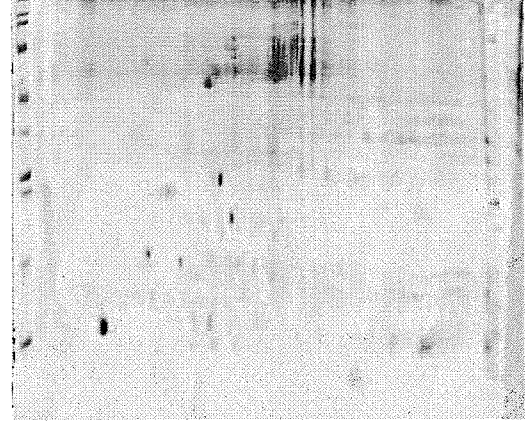
A



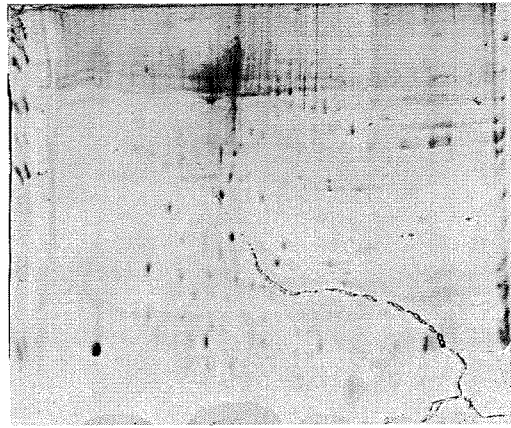
B



C

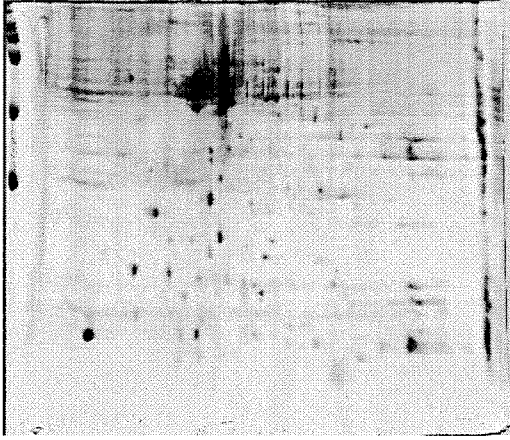


D

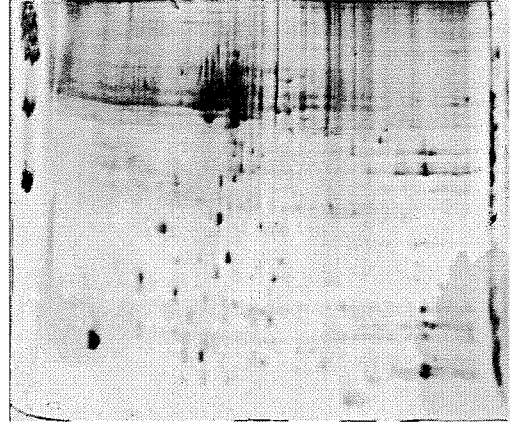


E

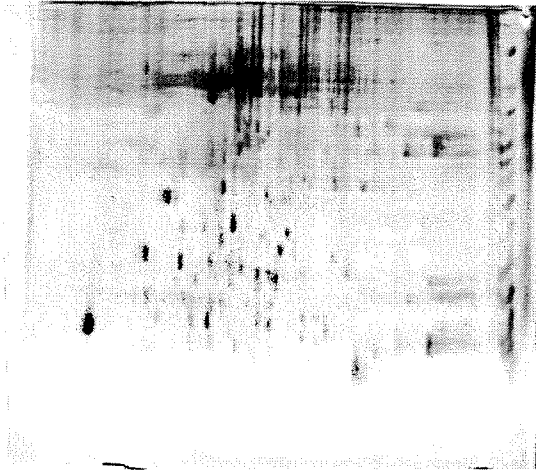
Şekil IV.3 GAERS Korteks Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=KG1, B=KG2,C=KG3, D=KG4, E=KG5)



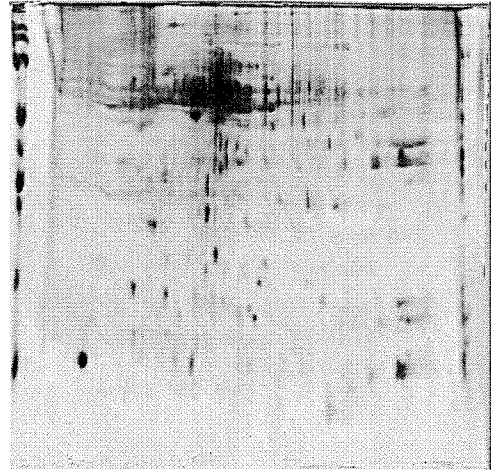
A



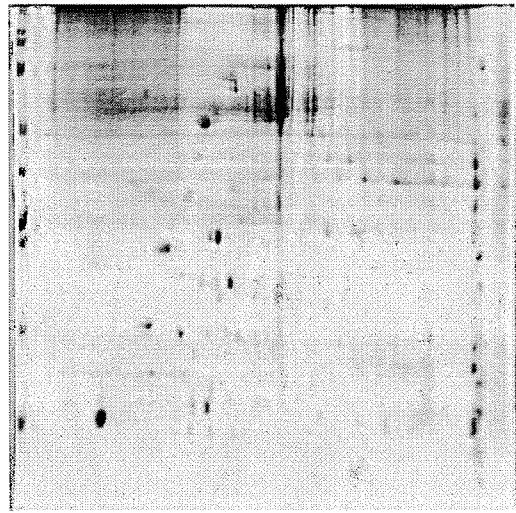
B



C

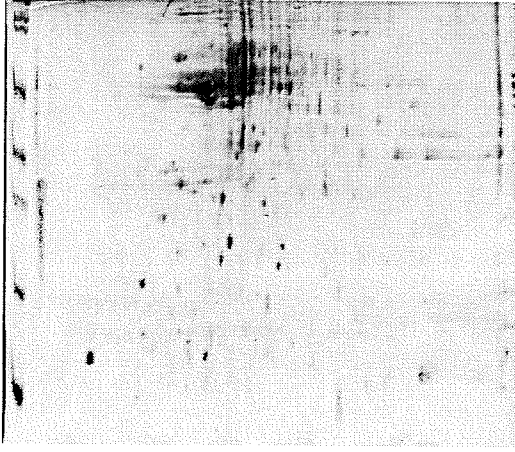


D

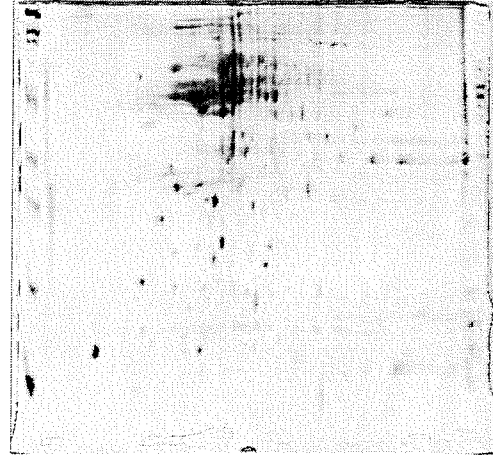


E

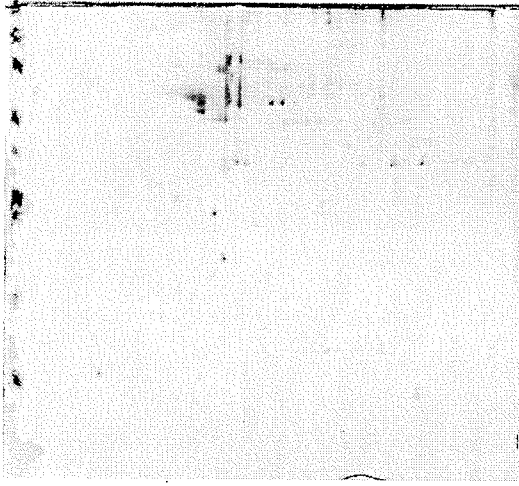
Şekil IV.4 Kontrol Korteks Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=KK1, B=KK2, C=KK3, D=KK4, E=KK5)



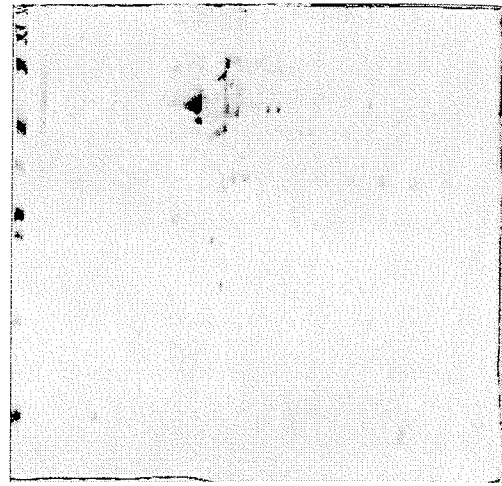
A



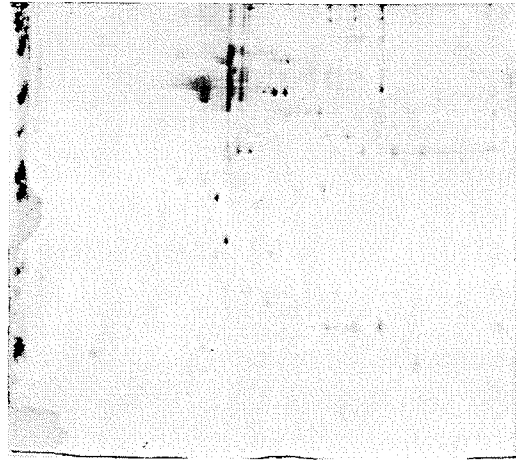
B



C



D

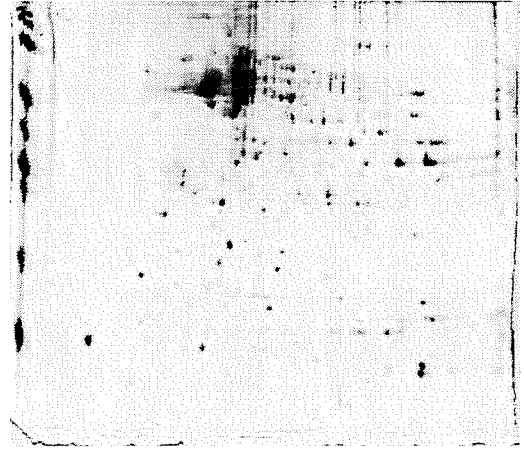


E

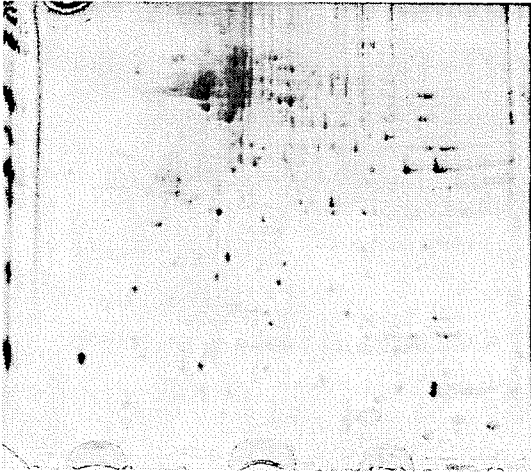
Şekil IV.5 GAERS Talamus Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=TG1, B=TG2, C=TG3, D=TG4, E=TG5)



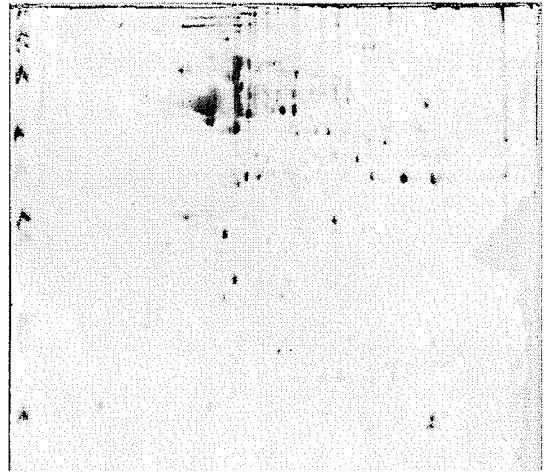
A



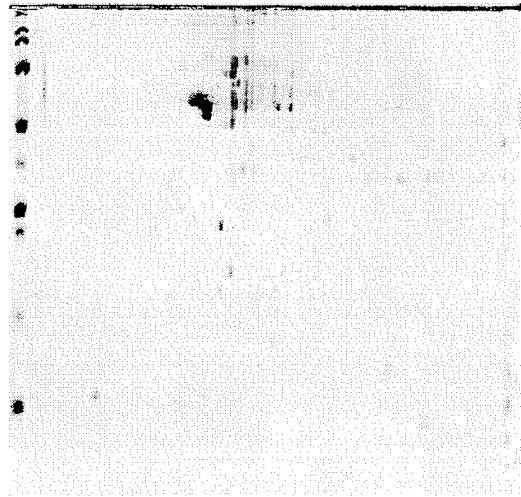
B



C



D



E

Şekil IV.6 Kontrol Talamus Bölgelerine Ait 2D-PAGE Sonuçları (A=TK1, B=TK2,C=TK3, D=TK4, E=TK5)

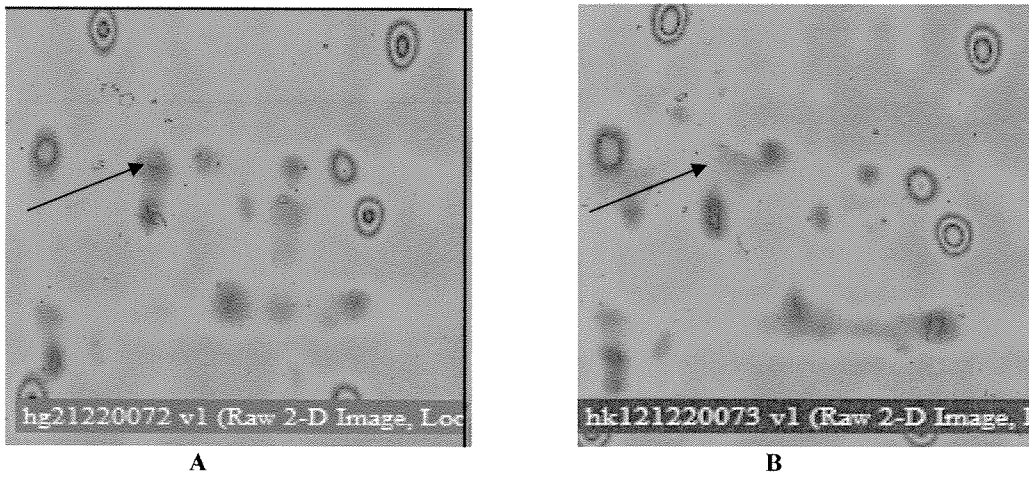
IV.3. 2D-PAGE ANALİZ SONUÇLARI

2D-PAGE sonunda elde edilen jeller PDQuest 8.0.1 iki boyutlu jel analiz software programı ile hem otomatik hem de manuel olarak incelendi. İnceleme sonunda kendi içlerinde uyumlu oldukları ve dolayısı ile tekrarlanabilir sonuçların elde edildiği tespit edildi.

Kollaidal Coomassie boyası ile boyanan jeller PDQuest programı içindeki renk seçeneklerinden biri olan gri formatında kaydedildi. Bu şekilde kaydedilen jeller üzerinde inceleme yapıldı. GAERS ve kontrol gruplarına ait jellerde yaklaşık 1500 kadar spot tespit edildi. Protein spot sayısı PDQuest iki boyutlu jel analiz software programının jel inceleme özellikleri hassaslaştırıldığında yaklaşık 1800 civarına çıktı. Spot sayısındaki bu artış jel üzerinde bulunan ve konsantrasyonları çok düşük olan protein spotlarının software programı ile görülebilir hale getirilmesinden ötürüdür. Ayrıca protein spotlarındaki farklılıkların daha iyi görülebilmesi için, yine programın içinde yer alan renk seçeneklerinden biri olan, false formatı kullanılarak inceleme yapıldı.

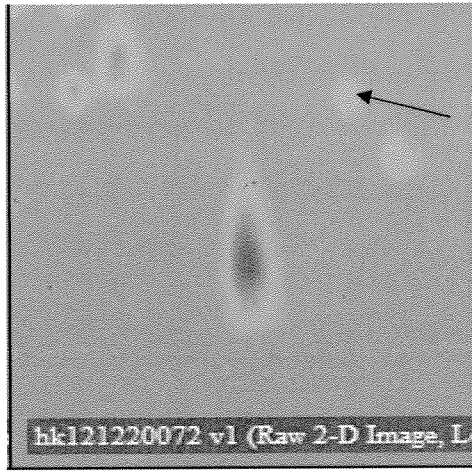
IV.3.1. Hipokampus Bölgesindeki Farklılıklar

Şekil.IV.7 A GAERS grubuna ait jellerde olup kontrol grubunda olmayan protein spotunu göstermektedir. Okla işaretlenen proteinin yaklaşık molekül ağırlığı 18 kDa ve izoelektrik noktası 6'dır.

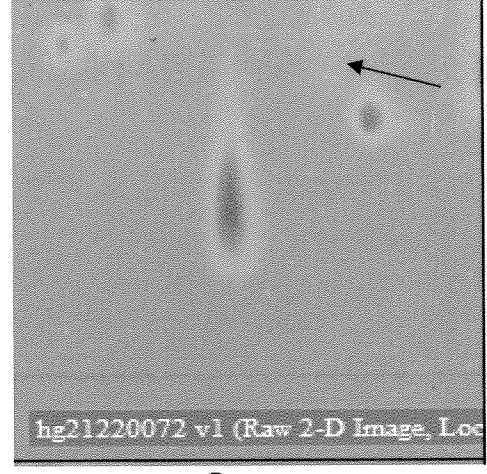


Şekil.IV.7 GAERS ve Kontrol Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerinin Karşılaştırılması ; A. GAERS, B. Kontrol

Şekil.IV.8 A'da ise kontrol hipokampus bölgesine ait jellerde olup GAERS grubu jellerde olmayan protein spotu gösterilmektedir. Bu proteinin yaklaşık molekül ağırlığı 13 kDa ve izoelektrik noktası 7.6'dır.



A

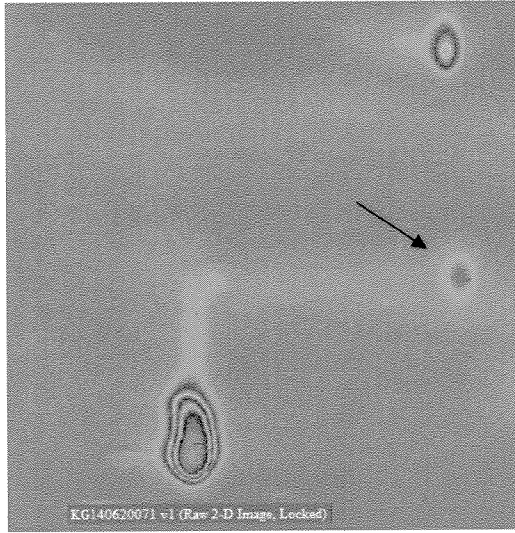


B

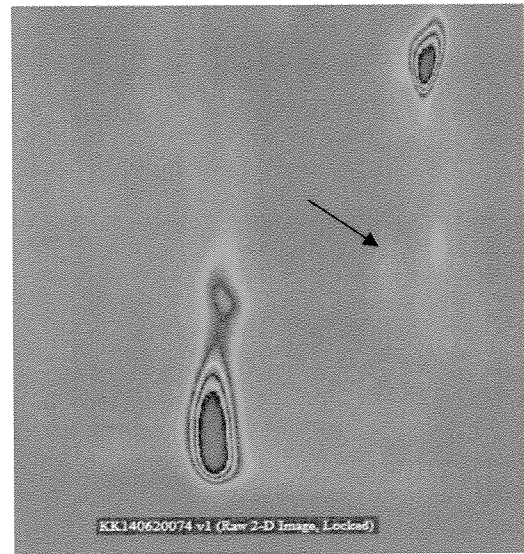
Şekil.IV.8 Kontrol ve GAERS Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerinin Karşılaştırılması ; A. Kontrol, B. GAERS

IV.3.2. Korteks Bölgesindeki Farklılıklar

Kontrol ve GAERS grubu korteks bölgelerine ait jeller karşılaştırıldığında, GAERS grubunda ekspresyonu artmış olan bir protein spotu tespit edilmiştir. Şekil.IV.9 A’da verilen ve okla işaretlenen proteinin yaklaşık molekül ağırlığı 16 kDa ve izoelektrik noktası 5’dir.



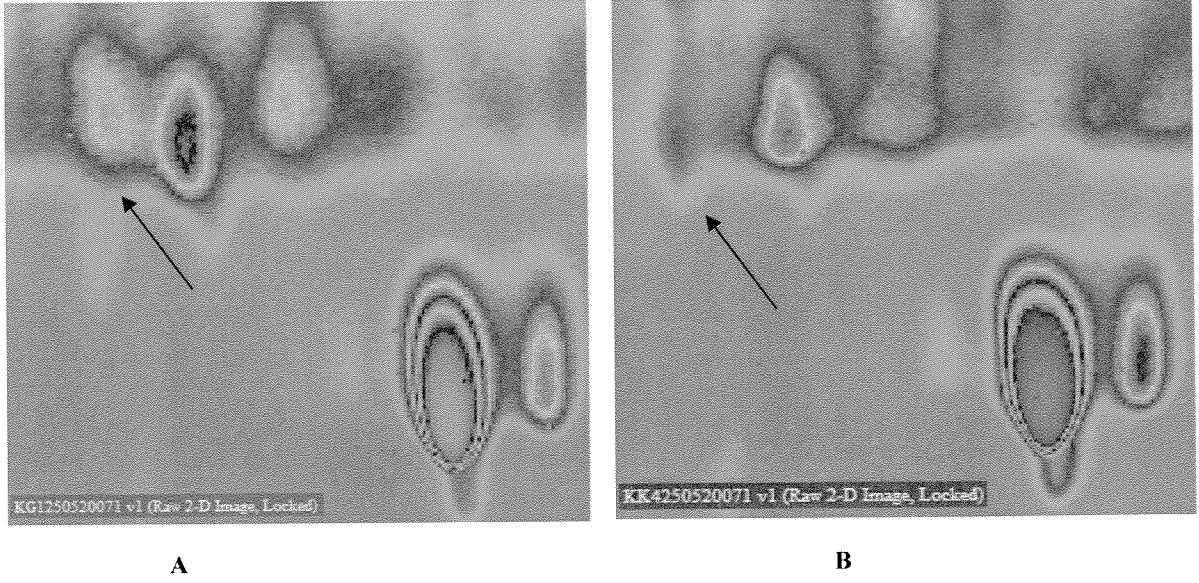
A



B

Şekil.IV.9 GAERS ve Kontrol Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerinin Karşılaştırılması ; A. GAERS, B. Kontrol

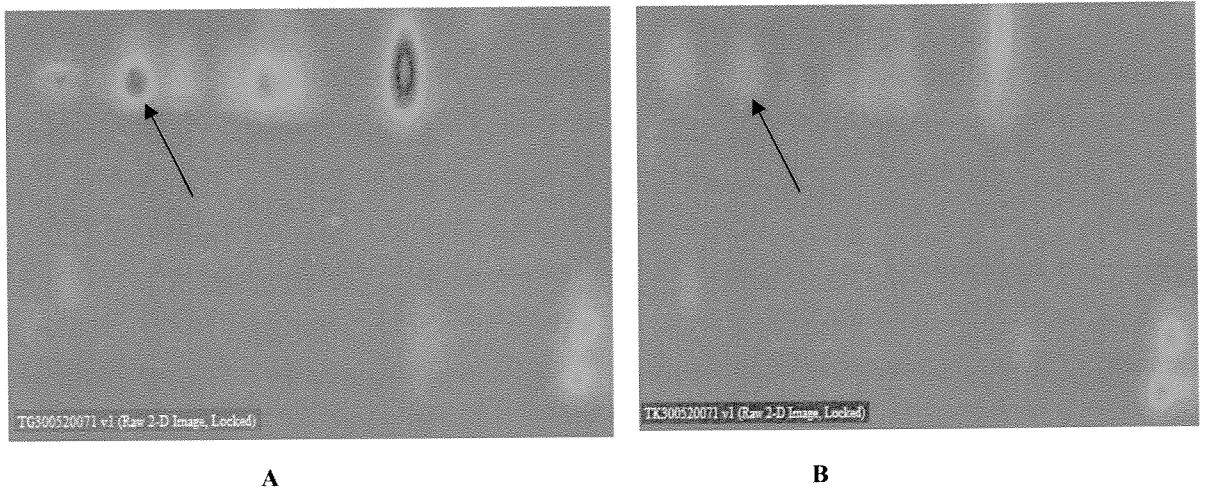
Şekil.IV.10 A'da GAERS grubunda kontrol grubuna göre ekspresyonu artmış olan bir protein spotu gösterilmektedir. Okla işaretlenen proteinin yaklaşık molekül ağırlığı 30 kDa ve izoelektrik noktası 7'dir.



Şekil.IV.10 GAERS ve Kontrol Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerin Karşılaştırılması; A.GAERS, B. Kontrol

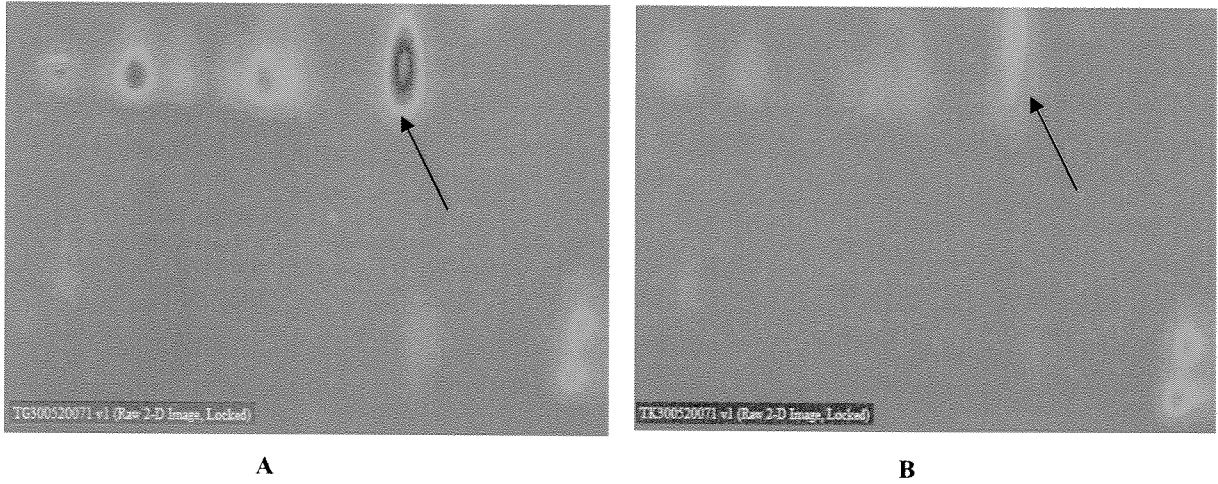
IV.3.3. Talamus Bölgesindeki Farklılıklar

Kontrol ve GAERS grubu talamus bölgelerine ait jeller karşılaştırıldığında, GAERS grubunda ekspresyonu artmış olan bir protein spotu tespit edilmiştir. Şekil.IV.11 A'da okla işaretlenen proteinin yaklaşık molekül ağırlığı 13 kDa ve izoelektrik noktası 7'dir.



Şekil.IV.11 GAERS ve Kontrol Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerin Karşılaştırılması; A.GAERS, B.Kontrol

Şekil.IV.12 A’da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GAERS grubunda ekspresyonu artmış olan bir protein spotu gösterilmektedir. Okla işaretlenen proteinin yaklaşık molekül ağırlığı 13 kDa ve izoelektrik noktası 7.6’dır.



Şekil.IV.12 GAERS ve Kontrol Gruplarına Ait 2D-PAGE Jellerin Karşılaştırılması; A.GAERS, B.Kontrol

IV.3.MALDI-Tof SONUÇLARI

GAERS ve kontrol gruplarına ait 2D-PAGE sonuçları PDQuest iki boyutlu jel analiz software programı ile incelendikten sonra farklılık gösteren Şekil.IV.7, Şekil.IV.8, Şekil.IV.9, Şekil.IV.10, Şekil.IV.11, Şekil.IV.12’de verilen protein spotları kesildi. Kütle spektrometre analizi için örnekler Bölüm III.4’te anlatıldığı şekilde hazırlandı. MALDI-Tof cihazı kullanılarak protein örneklerinin analizi yapıldı.

Bu proteinlerin ne olduklarına dair araştırma www.mascotscience.com adresinde yapıldı. Sonuçlar Tablo IV.2’de verilmiştir.

Tablo IV.2. Hipokampus, Korteks ve Talamus bölgelerine ait farklılık gösteren protein spotlarının MALDI analiz sonuçları

Protein Spot No	Protein adı	Kütlesi (kDa)	İzoelektrik Noktası	Ulaşım Numarası	Mascot Skoru	Kütle Geri kazanımı (%coverage)
H1	Neuron-specific protein family member 1 [Rattus norvegicus]	20.9	5.97	NSG1_RAT	22	30
H2	hCG2007412 [Homo sapiens]	15.5	7.08	gi 119630098	43	34
K1	rCG45919 [Rattus norvegicus]	13.5	5.11	gi 149039121	36	44
K2	syndecan binding protein [Rattus norvegicus]	32.4	7.05	gi 14010891	52	41
T1	Ig gamma-chain V-region [Mus musculus]	11.0	6.78	gi 194629	67	65
T2	hypothetical protein [Rattus norvegicus]	10.1	8.34	gi 109498152	38	47

BÖLÜM V

TARTIŞMA/SONUÇ

Bir doku veya organ tarafından ifade edilen proteinlerin tümü anlamına gelen proteom ve bu proteinlerin incelenmesi anlamına gelen proteomiks, canlı hayatını ilgilendiren her alan ve proste uygulama alanı bulmaktadır. Gen değışiklikleri ve anormal gen ekspresyonları, hastalık sonucu oluşan protein modifikasyonlarının belirlenmesinde proteomik metodu oldukça duyarlıdır.

Toplumun her kesiminde görülebilen ve kronik bir bozukluk olan epilepsi, beyindeki nöronların anormal aktivasyonu sonucu oluşan, kronik ve tekrarlayan nöbetler ile giden bir bozukluktur. Bazı epilepsi türlerinde Na^+ , K^+ , Ca^{++} gibi iyon kanallarında veya nöronal sinyal iletiminden sorumlu genlerde farklılıklar saptanmakla beraber epilepsinin moleküler, biyokimyasal ve farmakolojik temelleri tam olarak aydınlatılamamıştır (EUN ve diğ., 2004).

Epilepsi ile ilgili proteomik çalışmalar oldukça azdır. Bu konudaki araştırmalar da genellikle temporal mesial lob epilepsili hastalar, kindling ve kainik asitle oluşturulan epilepsili sıçanlarla yapılan çalışmalardır.

Bu çalışmada; GAERS (n=5) ve kontrol grubu (n=5) sıçanların hipokampus, korteks ve talamus bölgelerinden elde edilen proteinler, iki boyutlu jel elektroforezi ile ayrılmıştır. Sıçanların bayıltılmasında, beyinlerinin çıkarılmasında ve hipokampus, korteks ve talamus bölgelerinin kesilerek ayrılmasındaki gecikmeler, sonikasyon şartları ve çözünürleştirme çözeltilerinin hazırlanmasındaki hatalar gibi nedenlerden ötürü sonuçlar etkilenebilir (TSUJI ve diğ., 1999). Çalışmamızda bu noktalara çok dikkat edilmiş ve her hayvan kesiminde aynı çalışma şartları sağlanmıştır.

Yapılan araştırmalara bakıldığında özellikle insanlarla yapılan çalışmalarda etik ve bilimsel bazı sıkıntılar olmaktadır. Özellikle kontrol grubunun sağlanması oldukça zordur. Genelde post-mortem insanlar kontrol olarak kullanılmaktadır. Ancak böyle durumlarda ölen insanın başka

hastalığının olup olmadığı, yaşı, cinsiyeti, uyruğu, hangi sebepten öldüğü gibi özelliklerin çalışmada kullanılan hastalıklı grupla uyumlu olması gerekmektedir (YANG ve diğ., 2005). Bu nedenlerden ötürü epilepsi mekanizmalarını ortaya koymak ve tedavisine ışık tutmak amacı ile kullanılan deneysel modellerden biri olan Strasbourg-Genetik Absans Epilepsi (GAERS) modelini kullandık. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda yaş ve cinsiyet de önemlidir. 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 diğ., 2004). Böyle bir farklılığın yaşanmaması için çalışmamızda 6 ila 7 aylık erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Hipokampus Depaulis ve Van Luijtelaar'e göre absans epilepsi patogeneğinde rol almadığı düşünülen önemli bir beyin bölgesidir (DEPAULIS ve VAN LUIJTELAAR, 2006 b). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda absans epilepsili hayvanların hipokampus bölgelerinde morfolojik değişiklikler saptanmıştır (SIRVANCI ve diğ., 2003). En göze çarpan histopatolojik değişikliklerin olduğu hipokampus bölgesinin hem insan hem de hayvan modellerinde nöbetlerin gelişiminde şiddetle ilişkisinin olduğu düşünülmektedir (JUNKER, 2005). İnsan (BRIERLY ve GRAHAM, 1984; LEWIS, 1999; COHEN ve diğ., 2002) ve sıçanlarda (ONODERA ve diğ., 1986) nöbet aktivitesinden sonra özellikle hipoksi ile birlikte olan nöbetlerde hipokampal bölgenin CA1 alt ünitesinin çok etkilendiği belirtilmiştir (MELDRUM ve diğ., 1974; DAM, 1980).

Epilepsi ile hipokampus bölgesinin bir ilişkisinin olabileceğini düşünerek bu beyin bölgesini çalışmamızda kullanılmıştır. Bu kanıyı doğrulayacak çalışmalar da vardır. Örnek verilecek olursa; bir epilepsi modeli olan kindling sıçanlarının hipokampus bölgelerinde, proteomik metodu ile mitokondriyel sitokrom *bc1* kompleksin komponenti olan Rieske demir-kükürt proteinlerinin modifiye değişkenlerinin izoelektrik noktalarının daha alkali değerlere doğru değiştiği saptanmıştır (JUNKER ve diğ., 2005). En sık rastlanan epilepsi formu olan mesial temporal lob epilepsili (MTLE) hastaların hipokampus bölgelerindeki hücre iskeleti proteinlerindeki anormal ekspresyonlar 2DE ve MALDI spektrometresi ile tanımlanmıştır. 8 kontrol ve 8 MTLE'li hipokampus bölgeleri ile yapılan çalışmada toplam 77 protein analiz edilmiştir. MTLE'de 18 proteinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (YANG ve diğ., 2006). Diğer bir çalışmada ise; MTLE'li 8 hastanın ameliyatla alınan hipokampus bölgeleri çalışılmıştır. Kontrol olarak epilepsi hastası olmayan beyninde tümör olan iki kişinin ameliyat sırasında tümörle birlikte çıkarılan hipokampus bölgesi ve 5 post-mortem beyin kullanılmıştır. Epileptik

hipokampus bölgesinde, kontrol grubuna göre hücre yaşlanması süresince aspartil kalıntılarının anormal birikmesi sonucu zarar gören proteinlerin tamirinde görevli olan L-isoaspartil metil transferaz (PIMT) aktivitesi ve ekspresyonunun %50 daha az olduğu bulunmuştur. PIMT'nin mRNA ekspresyonu değişmemesine rağmen PIMT'nin post-translasyonel modifikasyona uğramasından ötürü daha az olduğu saptanmıştır. Dahası epileptik hipokampüste anormal aspartil kalıntılı birçok proteinin biriktiği de görülmüştür. Epileptik hipokampüste mikrotübül bileşeni olan β -tubulinde iki kat daha fazla aspartil kalıntısının biriktiği belirlenmiştir. MTLE'li hastalarda tubulinin zarar görmesi ile nöronlar iş göremez hale gelmektedir (LANTHIER ve diğ., 2002). Yang ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada ise; MTLE'li ve sağlıklı hipokampus bölgeleri ile yapılan çalışmada apolipoprotein A-I olarak 2 protein spotu tanımlanmıştır (YANG ve diğ., 2005).

Talamus, normal talamo-kortiko-talamik ritmik aktivitenin düzenlenmesinde ve nöronal osilasyonların sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu yapı serebral korteksin uyarılabilirliğinden ve uyanıklığın kontrolünden sorumludur. Talamus nöronları, osilatuvar mod ve tonik ateşleme modu arasında geçiş yapabilme özelliğine sahiptirler. Böylece, talamus dış çevreden gelen uyarıların kortekse ulaşmasını denetlemektedir. Uyanıklık durumu, tonik ateşleme modundaki talamokortikal nöronlarının oluşturduğu desenkronize EEG ile karakterizedir. Bu durum, çevreden gelen uyarıların talamus aracılığı ile kortekse ulaşmasını sağlamaktadır. Bu tonik ateşleme modu osilatuvar, ritmik, patlama moduna dönüştüğünde, talamusun eksitator post-sinaptik potansiyel (EPSP) eşiği yükselmekte, kortekse ulaşan sinyal iletimi azalmaktadır. Bundan dolayı, uyanıklık hali kaybolmakta, EEG'de de bir senkronizasyon izlenmektedir. Bu ritm değişikliği talamusun retiküler çekirdeği (RtN) tarafından sağlanmaktadır. Bu durum, RtN'nin özel konumu ile talamus ve korteksle olan bağlantılarının yapısından kaynaklanmaktadır. Absans epilepsisi patogeneğinde diken-dalga deşarjların primer somatosensoriyel korteksin peri-oral bölgesinden (S1po) kaynak aldığı gösterilmiştir. Bu ritmik osilatuvar aktivitenin sürdürülmesinde ise, talamo-kortiko-talamik yolakta, talamus ve özellikle de RtN'de gama-amino-bütirik asit (GABA) aracılı inhibitör nöronal iletinin rol oynadığı düşünülmektedir (DEPAULIS ve VAN LUIJTELEAAR, 2006).

Korteks ile sınırlı sayıda proteomik çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde Schlicht ve arkadaşları, insanlar üzerinde postmortem prefrontal korteks dokularında araştırma yapmış ve hastalıklı ve kontrol grubu arasında yoğunlukları farklı olan 5 protein spotu gözlemlemişlerdir.

Bunlardan üçü hastalıklı grupta olup MALDI-Tof analiz sonuçlarına göre α - kristalin zincir B, glial fibrüler asidik protein ve mangan süperoksid dismutaz oldukları belirlenmiştir. Bunlardan birincisi düşük moleküler ağırlıklı ısı-şok proteini iken, ikincisi gliozisde astrositik aktivasyon belirteci olduğu bilinmektedir. Üçüncü protein ise hücreleri oksidatif strese karşı koruyan bir antioksidan enzimdir (SCHLICHT ve diğ., 2007). Diğer bir çalışmada Eun ve arkadaşları, epileptik hastaların serebral kortekslerinde farklılık gösteren spotlardan birinin Mn-süperoksid dismutaz enzim aktivitesi gösterdiğini bulmuşlardır (EUN ve diğ., 2004).

Yapılan taramalarda epilepsi hastalığında talamus bölgesine ait proteom çalışması bulunamamıştır.

Çalışmamızda 2D-PAGE sonunda elde edilen jeller 8.0.1 versiyonlu PDQuest iki boyutlu jel analiz programı ile hem otomatik hem de manuel olarak incelenmiştir. İnceleme sonunda tekrarlanabilir sonuçların elde edildiği tespit edilmiştir. PDQuest data analiz programının kullanılması sırasında referans jel en az iki jelin karşılaştırılması sonucu otomatik olarak seçilmektedir. PDQuest data analiz programı ile jeller doğru analiz edilmekte ve daha güvenilir veriler alınabilmektedir. Bu programın kullanılması ile daha doğru sonuçlar elde edilebilmektedir (TSUJI ve diğ., 1999).

Çalışmamızda GAERS grubu sıçanların hipokampus bölgelerinde farklılık gösteren iki protein spotu saptanmıştır. Bu spotlardan birincisi sonuçlarda H1 olarak verilmiştir ve kontrol grubunda bu proteinin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil IV.7). İnternet ortamında yapılan tarama sonucunda, bu proteinin *Rattus norvegicus*'da nöron-spesifik protein aile üyesi 1 (beyin nöron sitoplazmik protein) olabileceği saptanmıştır (Mascot skoru 22, kütle geri kazanımı %30) Sutcliffe ve ekibinin yaptığı bir çalışmaya göre, bu aileye ait proteinlerden biri tanımlanmış ve nörotransmitter başlatıcılarından biri olabileceği bulunmuştur. Ayrıca bu proteinin serebellum, hipokampus, korteks ve diğer beyin sapı hücrelerinin iletişimde yer alabileceği öne sürülmüştür (SUTCLIFFE ve diğ., 2004).

Hipokampus bölgesinde saptanan diğer protein spotu sonuçlarda H2 olarak adlandırılmıştır ve bu proteinin GAERS grubunda olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil IV.8). Yapılan tarama sonucunda bu proteinin *homo sapiens*'de bulunan hCG2007412 proteini olabileceği saptanmıştır (Mascot skoru 43, kütle geri kazanımı %34). Bu proteinin gen sekuansı ilk olarak Science

dergisinde yayınlanan İnsan genomu sekuansı makalesinde yer almıştır. Ancak proteinin yapısı ve görevi ile ilgili herhangi bir yayın bulunmamaktadır (VENTER ve diğ., 2001).

Çalışmada korteks bölgesindeki iki proteinin ekspresyonunun GAERS grubunda kontrol grubuna göre artmış olduğu bulunmuştur. Bu proteinlerden biri sonuçlarda K1 olarak adlandırılmıştır (Şekil IV.9). Yapılan tarama sonucunda bu proteinin *Rattus norvegicus*'da bulunan rCG45919 proteini olabileceği saptanmıştır (Mascot skoru 36, kütle geri kazanımı %44). İlk olarak Florea ve arkadaşları tarafından 2005 yılında Norveç sıçanında tanımlanmıştır Yapısı incelendiğinde Gyp6 ve Gyp7 de bulunan yaygın domainlere sahip olduğu gözlemlenmiş, bu nedenle Rab-benzeri GTPazlar üzerinde GTP-aktivatör etkisi gösterebileceği düşünülmektedir. (FLOREA ve diğ., 2005) GTPazlar ökaryotik hücrelerde endositozda görev alırlar. Yapılan çalışmalar sinaptik veziküllerin endositozunun azaltılmasının epilepsi tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir (<http://www.biolink.org.au/library> erişim tarihi 09/2007). GAERS grubunda bu proteinin ekspresyonu artmıştır. Bu proteinin GTP-aktivatör özelliği olduğu düşünülürse bu bulgunun bilimsel verilerle uyumlu olduğu görülmektedir. Çünkü GTPazları aktive ederek sinaptik veziküllerin endositozunu arttırmaktadır.

Korteks bölgesinde saptanan diğer protein spotu sonuçlarda K2 olarak adlandırılmıştır ve bu proteinin GAERS grubunda ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. (Şekil IV.10). Yapılan tarama sonucunda bu proteinin *Rattus norvegicus*da bulunan sindekan bağlayıcı (syndecan binding) protein olabileceği saptanmıştır (Mascot skoru 52, kütle geri kazanımı %41). Sindekan bağlayıcı bir diğer protein olan sintenin'in nöronal membran organizasyonunun kontrolüne katıldığı ve kainat reseptörleri ile etkileşiminin sinapsların oluşumu ve gelişiminde etkili olabileceği bilinmektedir (HIRBEC ve diğ., 2005). Burada bulmuş olduğumuz proteininde de bir sindekan bağlayıcı olarak aynı görevi yapabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada talamus bölgesindeki iki proteinin ekspresyonunun GAERS grubunda kontrol grubuna göre artmış olduğu bulunmuştur. Bu proteinlerden biri sonuçlarda T1 olarak adlandırılmıştır (Şekil IV.11). Yapılan tarama sonucunda bu proteinin *Mus musculus*'da bulunan Ig gamma-zinciri V-bölgesi proteini olabileceği düşünülmektedir (Mascot skoru 67, kütle geri kazanımı %65).

Talamus bölgesinde saptanan diğer protein spotu sonuçlarda T2 olarak adlandırılmıştır ve bu proteinin GAERS grubunda ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. (Şekil IV.12). Yapılan

tarama sonucunda bu proteinin *Rattus norvegicus*da bulunan hipotetik protein gi/109498152 olabileceği saptanmıştır (Mascot skoru 38, kütle geri kazanımı % 47). Sıçan genomu üzerinde yapılan araştırmalar sonucu bu proteinin var olabileceği bulunmuş ve protein veri bankalarına eklenmiştir. Bu protein ile ilgili daha önce bir çalışma yapılmamış olup fonksiyonu bilinmemektedir.

Epilepsi hastalığının patogenezinin aydınlatılmasında proteom çalışmaları önemli veriler sağlayabilir. Epileptik sıçanların beyin proteomlarında normal sıçanlara göre farklılık gösteren proteinlerin ekspresyonu çeşitli ilaçlarla inhibe edilebilir. Bundan sonraki aşamada farklılık gösteren proteinleri inhibe eden veya bu proteinleri eksprese eden genleri susturan kimyasal moleküllerin modellenmesi ve sentezlenmesi için çalışmalar yapmayı düşünüyoruz. Bu amaçla öncelikle farklılık gösteren proteinlerin izole edilerek 3 boyutlu yapısının aydınlatılması ve bu proteinlerin sentezinden sorumlu genlerin bulunması gerekmektedir. Proje ekibimiz bundan sonraki araştırmalarında hastalığın genetik boyutuna yönelecektir.

UYGULAMA RAPORU

- 1- Projeden elde ettiğimiz sonuçların en kısa zamanda uluslararası indexlerce taranan bir dergide yayınlanması öncelikli olarak gerçekleştirilecektir.
- 2- Gerçekleştirmiş olduğumuz bu proje sonucunda epilepsi hastalığının tanı veya tedavisinde etkili olabilecek hedef proteinler saptanmıştır.
- 3- Bu amaçla öncelikle tanımlanan bu proteinlerin saflaştırılarak izole edilmeleri gerekmektedir.
- 4- Epileptik grupta bulunup kontrol grubunda bulunmayan proteinlerin denek sayısı artırılarak epilepsiye özgü olup olmadığı ve bu proteinlerin diğer vücut sıvılarında ki (serum, bos, vb.) varlıkları da araştırılabilir.
- 5- Saf olarak elde edilen bu proteinlerin üç boyutlu yapısının aydınlatılması ile bu proteini inhibe veya aktive edecek drogların bilgisayar modellemeleri yapılarak seçimi ve sentezi mümkün olabilir.
- 6- Yapısı aydınlatılmış olan bu proteinlerin genleri tespit edilerek bu genlerin susturulması yoluna gidilebilir.
- 7- Yukarıda tüm bu bahsettiğimiz araştırmaların gerçekleştirilmesi durumunda epilepsi tedavisinde etkin olabilecek ticari değeri olan drog sentezi gerçekleştirilebilecek ve bu da ekonomik bir getiri sağlayabilecektir.
- 8- Ticari drogların geliştirilmesi için ekibimiz ile işbirliği yapabilecek ilaç firmaları ile TÜBİTAK'ın proje sözleşmesine bağlı kalarak görüşmeyi düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

ANDERSON, L.; Seilhamer, J.: "A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver", *Electrophoresis*, 18, 533, (1997).

BIO-RAD: ReadyPrep 2-D Starter Kit Instruction Manual

BONK,T.; Humeny, A.: "MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA", *Neuroscienstist* ,7, 6-12 (2001).

BRADFORD, M.: "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Anal.Biochem.*,72, 248-254,(1976).

BRERLY, J.B.; Graham, D.I.: "Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system", *Greefield's Neuropathology* New York: Wiley, 125-209,(1984).

BRODIE, M.J.; Shorvon, S.D.; Canger,R.; Halasz, P.; Johannessen, S.; Thompson, P.; Wieser, H.G.; Wolf, P.: "ILEACommission report, Commission on European Affairs: Appropriate standards of epilepsy care across Europe", *Epilepsia*, 38(11) 1245-1250,(1997).

COHEN I.; Navarro V.; Clemenceau S.: " On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro", *Science*, 298,1418-21,(2002).

COLANTONIO,D.A.; Chan, D.W.: "The clinical application of proteomics", *Clinica Chimica Acta*, 357, 151-158, (2005).

DAM A.M.: "Epilepsy and neuronal loss in the hippocampus" *Epilepsia* 21, 617-29, (1980).

DEPAULIS, A.; van Luijelaar G.: " Chapter 18. Genetic Models of Absence Epilepsy in the Rat". Models of Seizures and Epilepsy, Elsevier Inc, 233- 248, (2006a).

DEPAULIS, A.; van Luijelaar G.: " Genetic models of absence epilepsy in the rat. In: Pitkanen A, Schwartzkroin P , Moshe S, ed. Animal Models of Epilepsy. San Diego, CA : Elsevier Inc, (2006b).

ENGEL, J.: "Seizures and epilepsy", F.A. Davis Company, Philadelphia, 85-87, (1989).

EŞKAZAN E.:" Epilepsilerde Tanı ve Tedavi", İ. Ü. Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Komisyonu 6-12, (1998).

EUN J.P.; Choi H.Y.; Kwak Y.G.: "Preteomic analysis of human cerebral cortex in epileptic patients" *Experimental and Molecular Medicine*. 36(2),185-191, (2004).

- FLOREA, L.; Di Francesco, V.; Miller, J.; Turner, R.; Yao, A.; Harris, M.; Walenz, B.; Mobarry, C.; Merkulov, G.V. ve diğ.: "Gene and alternative splicing annotation with AIR", *Genome Research*, 15(1), 54-66, (2005).
- FOUNTOULAKIS, M.; Tsangaris, G.T.; Maris, A.; Lubec, G.: "The rat brain hippocampus proteome", *Journal of Chromatography B*, 819, 115-129, (2005).
- FUTCHER, B.; Latter, G.I.; Monardo, P., McLaughlin, C.S.; Garrels, J.I.: "A sampling of the yeast proteome", *Mol.Cell.Biol.*, 19, 7357, (1999).
- GORG, A.; Boguth, G.; Drews, O.; Köpf, A.; Lück, C.; Reil, G.; Weiss, W.: "Two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis", Copyright by Gorg, A., Technical University of Munich, Germany, 6-9, (2003).
- GORG, A.; Weiss, W.; Dunn, M.J.: "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics", *Proteomics*, 12(4), 3665-3685, (2004).
- GYBI, S.P.; Rochon, Y.; Franza, B.R. and Aebersold, R.: "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast", *Mol.Cell.Biol.*, 19,1720,(1999).
- HANASH S.M.; Madoz-Gurpide, J.; Misek, D.E.: "Identification of novel targets for cancer therapy using expression proteomics", *Leukemia*, 16, 478-485, (2002).
- HARVEY, D.J.: "Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of oligosaccharides and glycoconjugates", *J.Chromatogr.A*, 720, 429-446, (1996).
- HAUSER, W.A.; Tabbarar, K.; Factor, P.R.; Finer, C.: "Seizures and head injury in an urban community", *Neurology*, 34,746-751, (1984).
- HERBERT, B.: "Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis", *Electrophoresis*, 20(4-5), 660-663, (1999).
- HIRBEC, H.; Martin, S.; Henley, J.M.: "Syntenin is involved in the developmental regulation of membrane architecture", *Mol.Cell. Neosci.*, 28(4), 737-746, (2005).
- HIRSCH, E.; Blanc-Platier, A.; Marescaux, C.: "What are the Relevant Criteria for a better Classification of Epileptic Syndromes with Typical Absences? In Idiopathic Generalised Epilepsies", *Clinical Experimental and Genetic Aspects*, 87-93, (1994).
- JUNKER, H.; Späte, K.; Suofu, Y.; Walther, R.; Schwarz, G.; Kammer, W.; Nordheim, A.; Walker, L.C.; Runge, U.; Kessler, C.; Popa-Wagner, A.: "Proteomic Identification of the Involvement of the Mitochondrial Rieske Protein in Epilepsy", *Epilepsia*, 46(3), 339-343(2005).
- KARAS, M.; Hillenkamp F.: "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons", *Anal.Chem.*, 60, 2299-2301,(1988).

- 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", *Exp. Gerontol.*, 39(8), 1155-1168, (2004).
- KRAPFENBAUER, K.; Berger, M.; Friedlein, A.; Lubec, G.; Fountoulakis, M.: "Changes in the levels of low-abundance brain proteins induced by kainic acid", *Eur.J.Biochem.*, 268, 3532-3537,(2001).
- LAEMMLI, U.K.: "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, 227, 680-685, (1970).
- LANTHIER, J.; Buthillier A.; Lapointe M.; Demeule M.; Beliveau R.; "Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damage tubulin", *Journal of Neurochemistry*, 83 ,581-591,(2002).
- LEWIS D.V.: "Febrile convulsions and mesial temporal sclerosis", *Curr. Opin. Neurol.*, 12,197-201,(1999).
- LOISEAU, P.; Ducha, B.; Padespan, J.M.: "Absence Epilepsies", *Epilepsia*, 96, 1182-1186,(1995).
- MARVIN, L.F.; Roberts, M.A.; Fay, L.B.: "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry", *Clinica Chimica Acta*, 337, 11-21,(2003).
- MELDRUM, B.S.; Horton, R.W.; Brierly, J.B.: "Epileptic brain damage in adolescent baboons following seizures induced by allylglycine", *Brain*, 97, 407-18,(1974).
- NEUHOFF, V.; Stamm, R.; Pardowitz, I.; Arold, N.; Ehrhardt, W.; Taube, D.: "Essential problems in quantification of proteins following Colloidal staining with Coomassie brilliant Blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution", *Electrophoresis*, 11, 101-117 ,(1990).
- ONEDERA, H.; Sato G.; Kogure K.: "Lesions to Schaffer collaterals prevent ischemic death of CA1 pyramidal cells", *Neurosci.Lett.*, 68, 169-74,(1986).
- ONDER, Ö.; Yoon, H.; Naumann, B.; Hippler, M.; Dancis, A.; Daldal, F.: "Modification of the Lipoamide Mitochondrial Subproteome in a yeast mutant defective in cysteine desulfurase", *Molecular & Cellular Proteomics*, 1426-1436,(2006).
- PANAYIOTOPOULOS, C.P.: "Typical Absence Seizures and Their Threatment", *Arch. Dis. Child*, 81351-355,(1999).
- PETRICON, E. F.; Zoon K.C.; Kohn E.C.; Barrett, J.C.; Liotta, L.A.: "Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality", *Nature Rev. Drug Discov.*,1, 683-695,(2002).

PORTER, R.J.: "Classification of epileptic seizures and epileptic syndromes" Laidlaw, J., Alan, R., Chadwick D., ed. A Textbook of Epilepsy, 4. Ed. Churchill Livingstone, 1-23, (1993).

RABILLOUD, T.: "Two-dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods", *Proteome Research*, Springer Verlag, Berlin, Germany, (2000).

ROBAYA B.; Doskeland A.P.; Suarez-Huerta, N.; Doskeland, S.O.; Dumont, J.E.: "Apoptotic cell death analysed at the molecular level by two dimensional gel electrophoresis", *Electrophoresis*, 15, 503-510, (1994).

RYVLIN, P.; Kahane, P.: "Does epilepsy surgery lower the mortality of drug-resistant epilepsy?", *Epilepsy Research*, 56(2-3), 105-120, (2003).

SCHONBERGER, S.J.; Edgar, P.F.; Kydd, R.; Faull, R.L.; Cooper, G.J.: "Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: molecular phenotype of a complex disease process", *Proteomics*, 1, 1519-1528, (2001).

SCHLICHT, K.; Büttner, A.; Siedler, F.; Scheffer, B.; Zill, P.; Eisenmenger, W.; Ackenheil, M.; Bondy, B.: "Comparative proteomic analysis with postmortem prefrontal cortex tissues of suicide victims versus controls", *Journal of Psychiatric Research*, 41, 493-501, (2007).

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

SIRVANCI, S.; Meshul, C.K.; Onat, F.; San, T.: "Immunocytochemical analysis of glutamate and GABA in hippocampus of genetic absence epilepsy rats (GAERS)", *Brain Res.*, 988(1-2), 180-88, (2003).

STULTS, J.T.: "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS)", *Current Opin. Struct.*, 5, 691-698, (1995).

SUTCLIFFE, J.G.; Milner, R.J.; Shinnick, T.M.; Bloom, F.E.: "Identifying the protein products of brain-specific genes with antibodies to chemically synthesized peptides", *Cell*, 33(3), 671-682, (1983).

TANAKA, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.: "Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry", *Rapid Communication Mass Spectrom.*, 2, 151-153, (1988).

TELEFONCU, A.; Salnikow, J.; Zihnioglu, F.; Kılınç, A.: "Proteom Analizi Metodlar ve Uygulamalar", Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, Türkiye, 7-21, (2002).

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, 100-106, (1999).

VAN DEN BERGH, G.; Arckens, L.: "Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics", *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 38-43, (2004).

VAN EYK, J. E.: "Proteomics unraveling the complexity of heart disease and striving to change cardiology", *Curr. Opin. Mol. Therapeut.*, 3, 546-553, (2001).

VENTER, J.C.; Adams, M.D.; Myers, E.W.; Li, P.W.; Mural, R.J.; Sutton, G.G.; Smith, H.O.; Yandell, M.; Evans, C.A.; Holt, R.A.; Gocayne, J.D.; Amanatides, P.; Ballew, R.M.; Huson, D.H. et al.; "The Sequence of the human genome", *Science*, 291(5507), 1304-1351, (2001).

WILKINS, M.R.; Sanchez, J.C.; Gooley, A.A.; Appel, R.D.; Humphrey-Smith, I.; Hochstrasser, D.F.; Williams, K.L.: "Progress with proteome project: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it", *Biotech. Gen. Eng. Reviews*, 13, 19, (1995).

<http://www.biolink.org.au/library/File/Bio-Link%20-%20Non-Confidential%20Dynamin%20Inhibitor%20Summary%20-%20Epilepsy-%20080307-.pdf>
09/2007

Yang, J.W.; Czech, T.; Felizardo, M.; Baumgartner, C.; Lubec, G.: "Aberrant expression of cytoskeleton proteins in hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy" *Amino Acids* 30(4), 477-93, (2006).

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", *Molecular Brain Research*, 139, 348-356, (2005).

ZALUZEC, E.J.; Gage, D.A.; Watson, J.T.: "Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization", *Protein Expr. Purif.*, 6, 109-123, (1995).

VAN DEN BERGH, G.; Arckens, L.: "Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics", *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 38-43, (2004).

VAN EYK, J. E.: "Proteomics unraveling the complexity of heart disease and striving to change cardiology", *Curr. Opin. Mol. Therapeut.*, 3, 546-553, (2001).

VENTER, J.C.; Adams, M.D.; Myers, E.W.; Li, P.W.; Mural, R.J.; Sutton, G.G.; Smith, H.O.; Yandell, M.; Evans, C.A.; Holt, R.A.; Gocayne, J.D.; Amanatides, P.; Ballew, R.M.; Huson, D.H. and others; "The Sequence of the human genome", *Science*, 291(5507), 1304-1351, (2001).

WILKINS, M.R.; Sanchez, J.C.; Gooley, A.A.; Appel, R.D.; Humphrey-Smith, I.; Hochstrasser, D.F.; Williams, K.L.: "Progress with proteome project: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it", *Biotech. Gen. Eng. Reviews*, 13, 19, (1995).

<http://www.biolink.org.au/library/File/Bio-Link%20-%20Non-Confidential%20Dynamin%20Inhibitor%20Summary%20-%20Epilepsy-%20080307-.pdf>
09/2007

Yang, J.W.; Czech, T.; Felizardo, M.; Baumgartner, C.; Lubec, G.: "Aberrant expression of cytoskeleton proteins in hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy" *Amino Acids* 30(4), 477-93, (2006).

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", *Molecular Brain Research*, 139, 348-356, (2005).

ZALUZEC, E.J.; Gage, D.A.; Watson, J.T.: "Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization", *Protein Expr. Purif.*, 6, 109-123, (1995).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No:104S511 (SBAG-2976)
Proje Başlığı: Proteom Analizi ile Deneysel Epilepsi Modelinde Beyin dokusu Proteinlerindeki Olası Değişikliklerin Saptanması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Proje Yürütücüsü: Prof.Dr. Ayşe OGAN, Araştırmacılar: Prof.Dr.Filiz ONAT, Yrd.Doç.Dr.Rezzan AKER, Yrd.Doç.Dr.Aslıhan GÜNEL, Arş.Gör.Özkan DANIŞ, Arş.Gör.Serap DEMİR, Arş.Gör.Dr. Medine Gülçebi
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı 34722,Göztepe-İstanbul
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Atatürk Bulvarı No:221 06100 Kavaklıdere-Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.07.2005- 01.07.2007
Özet Bu çalışmanın amacı; Strasbourg-Genetik Absans Epilepsi (GAERS) deneysel modelinde protein değişikliklerini Proteomik teknolojisi ile saptamak ve karşılaştırmaktır. Çalışmamızda kontrol (n=5) ve GAERS (n=5) hipokampus, korteks ve talamus proteinleri çözünürleştirilerek iki boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE) ile ayrıldı ve protein spotları koloidal Coomassie boyası ile boyanarak görünür hale getirildi. GAERS ve kontrol hayvanlarının hipokampus, talamus ve korteks dokularına ait 2D-PAGE jel imajları PDQuest programı ile karşılaştırıldı.Hipokampus bölgesinde iki, korteks bölgesinde iki ve talamus bölgesinde iki olmak üzere 6 farklılaşan protein gözlemlendi. Bu altı protein MALDI-Tof kütle spektrometresi ile analiz edildi. Hipokampüste nöron spesifik protein üyesi 1 proteininin kontrol grubunda olmadığı ve hCG2007412 proteininin de GAERS grubunda kaybolduğu bulunmuştur. Korteksde rCG45919 proteinin ve sindekan bağlayıcı proteininin GAERS grubunda ekspresyonlarının arttığı, yine aynı şekilde talamusda Ig gamma zincir V bölgesi protein ve hipotetik protein ekspresyonlarının GAERS grubunda arttığı bulunmuştur.
Anahtar Kelimeler: Proteom, GAERS, epilepsi, hipokampus, korteks, talamus
Projeden Yapılan Yayınlar: Ö.Danış, S.Demir, R.Aker, A.Günel, F.Onat, A.Ogan: "Determination of Alterations in Protein Profiles of Brain Tissues of Experimental Epilepsy Models by Proteome Analysis", The FEBS Journal, Vol 273, supplement 1, June 2006, p.252

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No:104S511 (SBAG-2976)
Proje Başlığı: Proteom Analizi ile Deneysel Epilepsi Modelinde Beyin dokusu Proteinlerindeki Olası Değişikliklerin Saptanması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Proje Yürütücüsü: Prof.Dr. Ayşe OGAN, Araştırmacılar: Prof.Dr.Filiz ONAT, Yrd.Doç.Dr.Rezzan AKER, Yrd.Doç.Dr.Aslıhan GÜNEL, Arş.Gör.Özkan DANIŞ, Arş.Gör.Serap DEMİR, Arş.Gör.Dr. Medine Gülcebi
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı 34722,Göztepe-İstanbul
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Atatürk Bulvarı No:221 06100 Kavaklıdere-Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.07.2005- 01.07.2007
Özet Bu çalışmanın amacı; Strasbourg-Genetik Absans Epilepsi (GAERS) deneysel modelinde protein değişikliklerini Proteomik teknolojisi ile saptamak ve karşılaştırmaktır. Çalışmamızda kontrol (n=5) ve GAERS (n=5) hipokampus, korteks ve talamus proteinleri çözünürleştirilerek iki boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE) ile ayrıldı ve protein spotları koloidal Coomassie boyası ile boyanarak görünür hale getirildi. GAERS ve kontrol hayvanlarının hipokampus, talamus ve korteks dokularına ait 2D-PAGE jel imajları PDQuest programı ile karşılaştırıldı.Hipokampus bölgesinde iki, korteks bölgesinde iki ve talamus bölgesinde iki olmak üzere 6 farklılaşan protein gözlemlendi. Bu altı protein MALDI-Tof kütle spektrometresi ile analiz edildi. Hipokampüste nöron spesifik protein üyesi 1 proteininin kontrol grubunda olmadığı ve hCG2007412 proteininin de GAERS grubunda kaybolduğu bulunmuştur. Korteksde rCG45919 proteinin ve sindekan bağlayıcı proteininin GAERS grubunda ekspresyonlarının arttığı, yine aynı şekilde talamusda Ig gamma zincir V bölgesi protein ve hipotetik protein ekspresyonlarının GAERS grubunda arttığı bulunmuştur.
Anahtar Kelimeler: Proteom, GAERS, epilepsi, hipokampus, korteks, talamus
Projeden Yapılan Yayınlar: Ö.Daniş, S.Demir, R.Aker, A.Günel, F.Onat, A.Ogan: "Determination of Alterations in Protein Profiles of Brain Tissues of Experimental Epilepsy Models by Proteome Analysis", The FEBS Journal, Vol 273, supplement 1, June 2006, p.252