

**LAKTASİSTİN'İN MEMBRAN LİPİDOMUNA VE NÖROEKZOSİTOZA
ETKİLERİNİN GÖRÜNTÜLEMELİ ToF-SIMS VE ELEKTROKİMYASAL
YÖNTEMLER İLE ANALİZİ**

Doktora Tezi

İnci BARUT

Eskişehir 2022

**LAKTASİSTİN'İN MEMBRAN LİPİDOMUNA VE NÖROEKZOSİTOZA
ETKİLERİNİN GÖRÜNTÜLEMELİ ToF-SIMS VE ELEKTROKİMYASAL
YÖNTEMLER İLE ANALİZİ**

İnci BARUT

DOKTORA TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER

(İkinci Danışman: Prof. Dr. John S. FLETCHER)

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Şubat 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İnci BARUT' un “*Laktasistin*'in Membran Lipidomuna ve Nöroekzozitoza Etkilerinin Görüntülemeli ToF-SIMS ve Elektrokimyasal Yöntemler ile Analizi" başlıklı tezi 25/01/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Doktora Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Ünvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	:	
Üye	:	
Üye	:	
Üye	:	
Üye	:	

.....
Enstitü Müdür

FINAL APPROVAL FOR THESIS

This thesis titled “ANALYSING THE EFFECTS OF LACTACYSTIN ON MEMBRANE LIPIDOMICS AND NEUROEXOCYTOSIS USING ToF-SIMS IMAGING AND ELECTROCHEMICAL METHODS” has been prepared and submitted by Inci BARUT in partial fulfillment of the requirements in “Anadolu University Directive on Graduate Education and Examination” for the Degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Analytical Chemistry Department has been examined and approved on 25/01/2022 .

<u>Committee Members</u>	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>Signature</u>
Member (Supervisor)	:
Member	:
Member	:
Member	:
Member	:

Director

Graduate School of Health Sciences

ÖZET

LAKTASİSTİNİN MEMBRAN LİPIDOMUNA VE NÖROEKZOSİTOZA ETKİLERİNİN GÖRÜNTÜLEMELİ ToF-SIMS VE ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLER İLE ANALİZİ

İnci BARUT

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2022

Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER

(İkinci Danışman: Prof. Dr. John S. FLETCHER)

UPS ve nörodejenerasyon arasındaki ilişki son yıllarda çokça çalışılsa da bu olaylarla bağlantılı metabolizmal değişimler henüz gizemini korumaktadır. Bu çalışmada bir paraneuron hücre modelinde, proteazomal bir inhibitör olan *laktasistin* farklı dozlarda kullanılmış, değişen membran lipidleri, görüntülemeli kütle spektrometrisi ile tespit edilmiştir. Özgün elektrokimyasal yöntemler olan tekil hücre amperometrisi (SCA) ve hücre içi vezikül etkili elektrokimyasal sitometri kullanılarak ise nöroekzositotik ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümlere göre negatif baş grubuna sahip olan fosfatidilserin (PS), fosfatidilinositol (PI) ve fosfatidik asit (PA) türleri, benzer bir eğilim grafiği göstermiştir. 1 µM-4sa *laktasistin* ile eter-bağlı fosfatidiletanolaminlerin (PE-O) bolluk seviyelerinin ve SCA yöntemi ile belirlenen katekolamin miktarlarının paralel olarak azaldığı görülmüştür. Diğerlerinden farklı olarak, 10 µM-4sa dozu ekzositotik ön-ayak olayı dinamiklerinde değişimlere ve fosfatidiletanolamin (PE) türlerinde belirgin bir artışa neden olmuştur. PE, PE-O, PI, PS, PA miktarları ise 10 µM-8sa dozu ile azalmıştır. Bu çalışma, belirli dozlarda *laktasistin*'in nöroekzositotik olayının en başında geçişli füzyon poru stabilizasyonunu artırarak nörotransmitter sızıntısını desteklediğini ve bu olayların negatif baş gruplu lipid türlerinin bolluğu ile eş zamanlı ilişkili olabileceğini göstermektedir. Proteazomal inhibisyonun farklı membran lipid sınıflarında değişimlere neden olarak nöroekzositotik dinamiklerini değiştirdiğini ve hücrede iki ucu keskin değişiklikler yapabileceğini söylemek mümkündür.

Anahtar Sözcükler: ToF-SIMS, Lipidomik, *Laktasistin*, Nöroekzositotik, SCA.

ABSTRACT

ANALYSING THE EFFECTS OF LACTACYSTIN ON MEMBRANE LIPIDOMICS AND NEUROEXOCYTOSIS USING ToF-SIMS IMAGING AND ELECTROCHEMICAL METHODS

Inci BARUT

Department of Analytical Chemistry

Graduate School of Health Sciences, Anadolu University, January 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Erol SENER

(Co-Supervisor: Prof. Dr. John S. FLETCHER)

The relationship between UPS and neurodegenerative diseases is of interest, yet underlying changes in cellular metabolism are unclear. Herein, a proteasomal inhibitor, *lactacystin*, has been used in a dose dependent manner on a para-neuron model cell line and membrane lipid changes have been measured by using mass spectrometry imaging. In the meantime, single cell amperometry (SCA) and intracellular vesicle impact electrochemical cytometry have been employed as novel electrochemical methods to measure the events of neuroexocytosis. According to the measurements, lipids with negative head groups such as phosphatidylserines (PS), phosphatidylinositols (PI) and phosphatidic acid (PA) showed similar trends. Abundance levels of ether-linked phosphatidylethanolamines (PE-O) and number of released catecholamines monitored by SCA significantly decreased with 1 μ M-4h *lactacystin* treatment. Unlike other doses, 10 μ M-4h changed the dynamics of exocytotic pre-spike events and elevated phosphatidylethanolamine (PE) levels. Besides; PE, PE-O, PI and PS levels upon 10 μ M-8h treatment showed a decreasing trend. Thus, *lactacystin* at certain doses promotes transient fusion pore stabilization and neurotransmitter leakage at the very beginning of neuroexocytosis which may be concurrently related with the abundance levels of lipids with negative head groups. Consequently, proteasomal inhibition can have double-edged activity in the cell by changing neuroexocytotic dynamics and altering different membrane lipid classes.

Keywords: ToF-SIMS, Lipidomics, *Lactacystin*, Neuroexocytosis, SCA.

ÖNSÖZ

Hakikate olan merakım çocukluktan başlayıp devam etmiş, bu serüvene zaman zaman çeşitli kültürel ketler vurulmuş zaman zaman öngörülü ve bilge insanlar tarafından bu halim desteklenmiştir. Fen ve sağlık bilimleri ile uğraşmak bol zaman ve bütçe gerektiren bir icra olduğundan özellikle geçmişte daha yoğun biçimde elit bir kesimin işi olsa da bu, zaman içinde daha geniş bir kitleye yayılarak zenginleşmeye başlamıştır. Ancak bugün ben bu topraklarda cinsiyet ve ekonomik durumdan bağımsız olarak bilim yolunda bir nebze katkı sunacak adımlar atabildiysem eğer; bunu öncelikle ülkemizin büyük şansı olan vizyoner ve cesur önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK'e ve o dönemde bu alanda emek veren tüm paydaşlarına borçluyum.

Doktoram süresince yaptığım bu multidisipliner çalışmanın bundan sonra yapılacak mekanistik ve terapötik hedefli çalışmalara ışık tutmasını umuyorum.

Doktora tez danışmanım sayın Doç. Dr. Erol ŞENER'e doktoramın ilk gününden bu yana verdiği destek, özgün bilimsel yaklaşımı, çemberin ötesini gören zihni ile analitik kimya alanına bakış açımı genişleterek bana kazandırdıkları ve YUDAB bursumu geniş yürekliliği ile kefaleti için;

İkinci tez danışmanım Prof. Dr. John S. Fletcher'a tezimin İsveç, Gothenburg Üniversitesi'nde yaptığım kısmında hem deney aşamasında hem veri analizi kısmında kıvrak zekâsı ve akademik yetkinliği ile yoluma ışık tuttuğu için;

Labının olanaklarını bana sağladığı, ziyaretçi araştırmacı olduğum dönemde kendi ekibinin bir parçası gibi davrandığı, aynı zamanda fiziksel ve ruhsal bütünlüğümüze Tang Soo Do Sensei'm olarak katkı sağladığı için Prof. Dr. Andrew EWING ve ekibine;

Çalışma arkadaşım Dr. Xiulan HE'ye tezimin elektrokimya analizlerine bulunduğu katkılar, Dr. Sanna SAMFÖRS'a ToF-SIMS cihazının kullanımını öğrenmemde ve sevgili Dr. Anna LARSSON'a elektrokimya verilerimin yorumunda verdiği değerli fikir ve tüm samimiyeti için;

Değerli hocam Prof. Dr. Emel Ulupınar'a tezim henüz fikir aşamasında iken bizimle birlikte beyin fırtınası yaparak kıymetli düşüncelerini aktararak katkılarını esirgemediği ve tez izleme komitemde bulunup bu süreci takip ettiği için;

Anabilim dalımız kıymetli hocalarımızdan sayın Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL AK'a tez izleme komitemde bulunduğu ve sürecime olan değerli katkıları için;

Anabilim dalı başkanımız sevgili hocam Prof. Dr. Göksel ARLI'ya güzel yüreği, tüm samimiyeti ve desteği için;

Organizasyon yeteneği, sabrı, bilimsel ve etik yaklaşımı ile bu süreçte kendisinden çok şey öğrendiğim sayın hocam Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN'a;

Anabilim dalımızda bulunan ve sürecime samimiyeti ile katkı sağlayan hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma, sevgili Dr. Neva ALASAĞ'a,

Sayın dekanımız, Prof. Dr. Bülent ERGUN'a doktora sürecim boyunca öngörüsünü, hoşgörüsünü ve değerli fikirlerini esirgemeyip bu süreci kolaylaştırdığı için;

Kendisi ile kısa da olsa çalışma şansı bulduğum, bundan sonra da birlikte çalışmayı dilediğim hem insani, hem bilimsel yönden eşine az rastlanır değerli bilim insanı Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya;

Hayatımda iyi ki varlar dediğim, gördüğümde hep iyilikler hissettiğim sevgili Ömer Abi'me, canım arkadaşım Dr. Betül BULUT'a, canım dayıma , zor zamanlarımda yanımda olan güzel insan Deniz ÇAKMAKKAYA'ya;

Tez sürecimi tüm anlayışı ile destekleyip, varoluşu ile hayatıma güzellik katan Mikael HELM'e;

Bugünlere gelmem için türlü emekler veren canım annem, canım babacığım ve bir tanecik canım kardeşime ; her baktığımda bana masumiyeti hatırlatan ve kucakladığımda huzur veren canım kedim BİDİK ve 6 yaşına kadar en yakınımdaya yaşayıp şimdi ışıklar içinde uyuyan canım kedim küçük kızım CİMCİME'ye;

gönülden teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

..../..../20....

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	ii
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	iii
FINAL APPROVAL FOR THESIS	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
ÖNSÖZ.....	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ubiquitin Proteazom Sistemi ve Nörodejenerasyon.....	5
2.1.1. Proteazomlar	5
2.1.2. Proteazomal inhibitörler	6
2.1.2.1. <i>Laktasistin</i>	6
2.2. Nöroekzositoz	7
2.2.1. Veziküller	7
2.2.2. Ekzositotik yolak.....	7
2.2.3. Ekzositozun düzenlenmesi	8
2.3. Nöronal Hücrelerde Lipid Dinamikleri.....	9

2.3.1. Fosfatidilinositol ve fosforile türevleri.....	9
2.3.2. Fosfatidilserin.....	9
2.3.3. Fosfatidiletanolaminler	10
2.4. Kütle Spektrometrisi	10
2.4.1. Kütle spektrometrisinin kısa tarihi.....	11
2.4.2. İkincil iyon kütle spektrometrisi (SIMS).....	12
2.4.3. Uçuş zamanlı kütle analizörü	12
2.5. Nöroekzozitoza Ait Olayların Analizi İçin Kullanılan Elektrokimyasal Yöntemler.....	13
2.5.1. Tekil hücre amperometrisi	13
2.5.2. Hücre içi vezikül etkili elektrokimyasal sitometri (IVIEC).....	15
3. GEREÇ	17
3.1. Kimyasal Maddeler	17
3.2. Cihazlar	17
4. YÖNTEM VE BULGULAR.....	19
4.1. Yöntem.....	19
4.1.1. Kromafin hücrelerinin izolasyonu ve kültürü	19
4.1.2. ToF-SIMS analizi için örneklerin hazırlanması	22
4.1.3. ToF-SIMS ölçümleri.....	22
4.1.3.1. <i>Görüntülemeli ToF-SIMS verilerinin analizi</i>	24
4.1.4. Elektrokimyasal ölçümler	25
4.1.4.1. <i>Tekil hücre amperometrisi</i>	25
4.1.4.2. <i>Hücre içi vezikül etkili elektrokimyasal sitometri</i>	26
4.1.4.3. <i>Amperometrik verilerin anlamlandırılması ve analizi</i>	26
4.2. Bulgular	28
4.2.1. Görüntülemeli ikincil iyon uçuş zamanlı kütle spektrometrisi bulguları	28
4.2.1.1. <i>Temel bileşen analizi sonuçları</i>	29
4.2.1.2. <i>LIPID-MAPS veri tabanı kullanılarak belirlenen lipidlerin listesi</i>	37

4.2.1.3. LIPID-MAPS ile atanan bazı lipid sınıfları ve türlerinin doza bağlı trendleri ve farkların kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	39
4.2.2. <i>Laktasistin</i> uygulanan hücrelerde doz bağımlı elektrokimyasal analiz cevapları	43
5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
5.1. Tartışma.....	48
5.2. Sonuç ve Öneriler	55
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal malzemelerin listesi.....	17
Tablo 3.2. Kullanılan cihazların listesi	17
Tablo 4.1. LIPID-MAPS veri tabanı kullanılarak farklı lipidlerin atanması (temel bileşen analizi sonuçlarından yola çıkmıştır.)	37
Tablo 4.2. Belirlenen lipidler ile LIPEA veri tabanı kullanılarak yapılan yolak zenginleştirme analizi sonuçları	42
Tablo 5.1. Doza bağımlı olarak uygulanan laktasistinin ekzositoz olayları ve lipid düzeyleri üzerindeki etkileri	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

- Şekil 2.1.** Laktasistin'in molekül yapısı, L-Sistein, N-asetil-S-[(3S,4R)-3-hidroksi-2-[(1S)-1-hidroksi-2-metilpropil]-4-metil-5-okso-D-prolil]- (ACI), (CAS Numarası: 133343-34-7)..... 7
- Şekil 2.2.** Tekil Hücre Amperometrisi (SCA) sonucu elde edilen ekzositoz pikine ait parametreler ve ekzositoz olayının bu parametrelerle eşleniminin şematik gösterimi. 15
- Şekil 4.1.** ToF-SIMS analizi için örneklerin hazırlanması için gereken adımların şematik gösterimi. 22
- Şekil 4.2.** J105 cihazının şematik gösterimi. Sürekli primer iyon akışı (yeşil) ve örnek yüzeyinden sıyrılan ikincil iyonlar (mor). ToF kütle analizörü (sol tarafta). ... 23
- Şekil 4.3.** Temel bileşen analizi sonucu kontrole karşı farklı dozlarda laktasistin uygulanmış hücrelere ait spektrumların temel bileşen-1 ve temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri. 29
- Şekil 4.4.** Temel bileşen analizi sonucu kontrole karşı 1µm-4sa laktasistin uygulanmış hücrelere ait spektrumların temel bileşen-1 ve temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri. 30
- Şekil 4.5.** Kontrole karşılık 1µm-4sa laktasistin uygulanmış hücrelere ait spektrumların temel bileşen-1 ağırlık düzlemine ait grafik. 30
- Şekil 4.6.** Temel bileşen analizi sonucu kontrole karşı 10 µm-4sa laktasistin uygulanmış hücrelere ait spektrumların temel bileşen-1 ve temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri. 31
- Şekil 4.7.** Kontrole karşılık 10 µm-4sa laktasistin uygulanmış hücrelere ait spektrumların temel bileşen-1 ağırlık düzlemine ait grafik. 31
- Şekil 4.8.** Kontrole karşılık 1µm-8sa laktasistin uygulanmış hücrelere ait spektrumların temel bileşen-1 düzlemindeki kümelenimleri..... 32

Şekil 4.9. Kontrole karşılık $1\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanmış hücelere ait spektrumların temel bileşen-1 ağırlık düzlemine ait grafik.....	32
Şekil 4.10. $1\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri.....	33
Şekil 4.11. $1\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 ağırlık düzlemine ait grafik.....	33
Şekil 4.12. $1\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $1\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri.....	34
Şekil 4.13. $1\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $1\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-1 ağırlık düzlemine ait grafik.....	34
Şekil 4.14. $1\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri.....	35
Şekil 4.15. $1\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 ağırlık düzlemine ait grafik.....	35
Şekil 4.16. $10\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri.....	36
Şekil 4.17. $10\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 ağırlık düzlemine ait grafik.....	36
Şekil 4.18. Eter-bağlı fosfatidiletanolamin türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik. .	39

Şekil 4.19. Fosfatidiletanolamin türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.....	39
Şekil 4.20. Fosfatidilserin türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.....	40
Şekil 4.21. Fosfatidilinositol türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.	40
Şekil 4.22. Fosfatidik asit türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.....	41
Şekil 4.23. Sfingolipid türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.....	41
Şekil 4.24. SCA, Doza Bağlı Olarak Hücrelerden Salınan Molekül Sayısı. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p<0.05$, *; $p<0.01$, **; $p<0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+).....	43
Şekil 4.25. Hücre içi Vezikül Etkili Elektrokimyasal Sitometri (IVIEC) Ölçümlerine Ait Grafik. (Hücre sayısı: 12; Hata Çubuğu: S.E.M. $p<0.05$, *; $p<0.01$, **; $p<0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)	43
Şekil 4.26. Laktasistinin Doza Bağlı Olarak Kromafin Hücrelerinde Parçalı Salım Üzerine olan Etkileri. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p<0.05$, *; $p<0.01$, **; $p<0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+).....	44
Şekil 4.27. Tekil Hücre Amperometrisi Sonuçlarından Elde Edilen Maksimum Pik Akım Şiddeti (I_{maks}) Değerlerinin (pA) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p<0.05$, *; $p<0.01$, **; $p<0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+).....	44
Şekil 4.28. Tekil Hücre Amperometrisi Sonuçlarından Elde Edilen Maksimum Pik Yükseliş Zamanı Değerlerinin (t_{rise} / ms) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p<0.05$, *; $p<0.01$, **; $p<0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+).....	45
Şekil 4.29. Tekil Hücre Amperometrisi Sonuçlarından Elde Edilen Maksimum Pik Yarı Yükseklik Zamanı Değerlerinin ($t_{1/2} / ms$) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p<0.05$, *; $p<0.01$, **; $p<0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+).....	45

- Şekil 4.30.** Tekil Hücre Amperometrisi Sonuçlarından Elde Edilen Maksimum Pik Düşüş Zamanı Değerlerinin (t_{fall} /ms) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $P<0.05$, *; $P<0.01$, **; $P<0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)..... 46
- Şekil 4.31.** Tekil Hücre Amperometrisi Sonucu Elde Edilen Maksimum Ön-Pik Ayağı Akım Şiddeti Değerlerinin (I_{foot} /pA) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p<0.05$, *; $p<0.01$, **; $p<0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)..... 46
- Şekil 4.32.** Tekil Hücre Amperometrisi Sonucu Elde Edilen Maksimum Ön-Pik Ayağı Maksimum Pik Yarı Yükseklik Zamanı Değerlerinin (t_{foot} / ms) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p<0.05$, *; $p<0.01$, **; $p<0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+) 47
- Şekil 4.33.** Tekil Hücre Amperometrisi Sonucu Elde Edilen Ön-Pik Ayağı Süresince Salınan Molekül Sayılarının Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p<0.05$, *; $p<0.01$, **; $p<0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)..... 47

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 4.1. Sığır adrenal bezinden kromafin hücrelerinin izolasyonu, adrenal bezin enine kesim aşaması.....	20
Görsel 4.2. Sığır adrenal bezinden kromafin hücrelerinin izolasyonu, adrenal bezin iç kısmı	21
Görsel 4.3. Sığır adrenal bezinden kromafin hücrelerinin izolasyonu, adrenal bez medullasından alınan hücrelerin ilk homojenizasyon basamağı	21
Görsel 4.4. J105 Görüntülemeli ToF-SIMS cihazının örnek muhafaza bölümünde vakum altında bulunan örneklerin analiz sırasında cihaz kamerasından görünümü.	24
Görsel 4.5. Kromafin hücrelerinin SCA yöntemi ile analizi, disk karbon fiber elektrotun hücre yüzeyi üzerindeki görünümü	26
Görsel 4.6. Kontrol 1 µm-4sa, 10 µm-4sa laktasistin uygulanmış kromafin hücrelerinin ToF-SIMS kimyasal imajları, m/z 885.5, PI(38:4).....	28

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH	: Alzheimer hastalığı
ALS	: Amiyotrofik lateral skleroz
DAG	: Diaçil gliseroller
DESI-MS	: Elektrosprey İyonizasyon Desorpsiyonu- Kütle Spektrometrisi
DHA	: Dokosahekzaenoik asit
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
FAB	: Hızlı atom bombardımanı
HSP	: Isı şok proteinleri
I_{ayak}	: Ekzositotik ayak olayına ait maksimum akım şiddeti
I_{maks}	: Maksimum pik akım şiddeti
IVIEC	: Hücreiçi vezikül etkili elektrokimyasal sitometri
İKO	: İndiyum kalay oksit
LDCV	: Büyük yoğun çekirdekli veziküller
m/z	: Kütle/yük
MALDİ	: Matriks-destekli Lazer Desorpsiyon/ İyonizasyon
mESPCs	: Minyatür eksitator akım frekansları
MS	: Kütle spektrometrisi
n	: Tekrar sayısı
ns	: Anlamlı değil
PA	: Fosfatidik asit
pA	: Pikoamper
PC	: Temel bileşen
PCA	: Temel bileşen analizi
PE-O	: Eter- fosfatidiletanolamin
PH	: Parkinson hastalığı
PI	: Fosfatidilinositol
PS	: Fosfatidilserin
pPE	: Plazmalojen etanolaminler
SCA	: Tekil hücre amperometrisi

SHexCer	: Sülfatid hekzosil seramidler
SNARE	: Çözünür NSF-bağlayıcı protein reseptör
SV	: Sinaptik vezikül
t_{1/2}	: Pik yarı yükseklik zamanı
t_{ayak}	: Ayak piki süresi
t_{düşüş}	: Pik düşüş zamanı
ToF	: Uçuş zamanlı kütle analizörü
ToF-SIMS	: Uçuş zamanlı ikincil iyon kütle spektrometrisi
t_{yükseliş}	: Pik yükseliş zamanı
UPS	: Ubikütin proteazom sistemi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ubikütün proteazom sistemi (UPS) temel olarak protein kalite kontrolünden sorumludur ve hücre içerisinde oldukça karmaşık bir orkestrasyona sahiptir. Alzheimer, Parkinson ve Amiyotrofik Lateral Skleroz hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıkların ortak patolojik durumlardan köken aldığı bilinmektedir [1]. Son yıllarda hücresel birçok önemli yolakla ilişkilendirilen bu sistemin en çok da nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi çalışılmış ancak bu ilişkinin etiopatogenezi ile ilgili ikilemler henüz gizemini yitirmemiştir. Nörodejeneratif hastalıklar; sinaptik bozulmalar, geç dönemlerde amiloid- β , Lewy cisimcikleri gibi ubikütün-pozitif birikimler ile karakterize olabilmektedir [2-4]. UPS ise protein kalite kontrolünün yanında lipid metabolizması ve ekzositoz gibi bir çok hücresel prosese katılıp sinaptik vezikül salımını etkilemektedir [4-6]. Nörodejeneratif hastalıklar gibi kompleks durumların anlaşılabilmesi için altta yatan lipid metabolizması sinaptik ileti durumu ve UPS sisteminin işleyişi gibi multifaktöriyel durumların incelenbilmesi bu hastalıklarda uygun terapötik yaklaşımların sağlanabilmesi için elzemdir. Bu tez çalışmasında, özgün analitik yöntemler ile doz bağımlı proteazomal inhibisyonun nöroekzositoz kinetikleri ve membran lipidomu üzerinde yarattığı değişimler analiz edilerek nörodejenerasyon bağlamında değerlendirilmiştir.

UPS'nin etkilerinin araştırılması amacı ile kullanılan ajanlardan olan proteazomal inhibitörler literatürde farklı dozlarda çalışılmış olup; yüksek dozlarda nörodejenerasyon modeli oluşturmayı mümkün kılarken, görece akut ve düşük konsantrasyonlarda uygulandığında terapötik etki gösterdiği farklı çalışmalarda tartışılmış olsa da bu durumun sebebi henüz bilinmemektedir. Proteazomal inhibitörlerin nöroekzositoz üzerindeki etkisini gösteren sınırlı sayıda yayın mevcut olmakla birlikte bu durumun proteazomal inhibitörlerin sinaptik vezikül salınım kinetiklerini etkileyebilecek bazı önemli proteinlerin devir hızı ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Hücre membranı lipidlerindeki değişimin nörodejenerasyon ile ilişkisi bilinmekle beraber bu etkinin nöroekzositoz üzerine etkileri tartışılmakta ancak; ne proteazomal inhibitörlerin membran lipidleri üzerindeki etkisini ne de bu etkinin nöroekzositoz üzerindeki rolünü gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışmada proteazomal bir inhibitör olan *laktasistin*'in kromafin hücreleri üzerinde doza bağımlı etkileri, membran lipidlerindeki değişimler ve nöroekzositoz dinamikleri yönünden

üç özgün analitik yöntem ile incelenmiştir. Bunlar; uçuş zamanlı- görüntülemeli ikincil iyon kütle spektrometrisi (ToF-SIMS), tekil hücre amperometrisi (SCA) ve hücre içi vezikül etkili elektrokimyasal sitometri (IVIEC) olup analizlerin sonucunda nörotransmitter salım mekanizmalarında rol oynayan membran lipidlerinde farklanmalar tespit edilmiş ve buna paralel olarak da nöroekzositoz dinamiklerinin değiştiği bulunmuştur.

Lipidler geçmişten bu yana hücrenin stabil yapı taşları olarak bilirse de, günümüzde artık lipid moleküllerinin lipid-protein etkileşimleri ile protein modülasyonu üzerindeki etkileri, dinamik uzay-zamansal bulunurluklarının değişimi ile hücre membranının hayatsal işlevi ve nörotransmitter salımı üzerindeki etkileri gibi kritik rolleri görünür hale gelmiştir. Nörodejenerasyonun patolojisinin anlaşılması ve nörodejenerasyona yönelik yeni tedaviler geliştirilmesi açısından da lipidler önemli bir yere sahiptir.

Hücre membranında bulunan lipid rafları lipidce zengin protein fraksiyonlarından oluşur ve bu yapılar nöroekzositoz için son derece önemlidir [7]. Yayımlanan son çalışmalara göre lipid ve lipid raft profillerinde meydana gelen değişikliklerin hem erken dönem hem de geç dönem nörodejeneratif değişiklikler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [8-13]. Dolayısıyla nöronal dokulardaki kritik rolleri ve nörodejenerasyon araştırmalarında artan yeri sayesinde lipidler, günümüzde terapötik hedefler haline gelmeye başlamıştır [14]. Bununla birlikte lipidlerin nöropatogenezdeki rolleri henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir [15].

Nöroekzositoz ile veziküllerden nörotransmitter salımının gerçekleşebilmesi için belli sırada olayların meydana gelmesi gerekmektedir. Bunlar sırasıyla; birden fazla protein-protein ve protein-lipid interaksyonunu gerektiren haberleşme, bağlanma, kenetlenme, füzyon olaylarıdır. Ekzositotik olayların regülasyonunda lipid-protein etkileşimlerinin fonksiyonu günümüze değin çok iyi anlaşılammıştır ve bunun anlaşılabilmesi UPS gibi protein regülasyon mekanizmalarının, membran lipidomunun ve ekzositozun işine katıldığı birden fazla kollu yaklaşımları gerektirir [16].

Membran lipidomundaki değişimler nöroekzositotik parametreleri değiştirmek suretiyle nöronal iletimde etkilidir. Fosfatidilinositoller ve fosfatidilserinler gibi bazı anyonik lipidler membranın iç yüzünde yer alarak sinaptotagmin gibi membran füzyonunda rol oynayan proteinlerle etkileşirler [17]. Fosfatidiletanolaminlerin ise hücre zarındaki asimetrik

dağılımının füzyon por oluşumunda promotor olarak rol aldığı bilinmektedir. Bu rol nörotransmitter salım mekanizmaları için oldukça önemlidir [18].

Literatürde yapılmış çalışmalarda proteazomal inhibitörlerin etkileri ile ilgili birbirine zıt görülebilecek durumlar bulunmaktadır. Proteazomal inhibisyonun nörodejenerasyona yol açtığı ve hatta nörodejenerasyon modeli oluşturmak için proteazomal inhibitörlerin kullanıldığı çalışmalar literatürde çoğunlukla mevcuttur [19]. Diğer taraftan, bazı çalışmalar da bunun aksi biçimde proteazomal inhibitörlerin nöroprotektif etkilerini savunmuştur [20, 21]. Öyle ki, bazı çalışmalar proteazomal inhibisyonun heat shock proteinlerini artırarak bir geri-besleme cevabı yarattığını ve böylelikle oksidatif stresi önlediğini bildirmiştir [22, 23]. Başka çalışmalar ise proteazomal inhibisyonun motor nöronlar arasında sinaptik gücü artırdığını göstermiştir [24]. Bahsedilen bu araştırmalar bir bütün olarak incelendiğinde yüksek doz proteazomal inhibitörlerin kullanıldığı çalışmaların apoptotik ve nörodejeneratif etkilere neden olduğu, düşük dozların kullanıldığı çalışmalarda ise nöroprotektif etkilerin savunulduğu dikkat çekmektedir. Dolayısı ile proteazomal inhibisyonun iki ucu keskin bu özelliklerinin anlaşılması ayrıntılı bir analiz gerektirmektedir.

Bu tez çalışması proteazomal inhibisyonun lipid profillerinin farklanması ve ekzositotik olaylar üzerindeki etkilerinin kapsayıcı olarak araştırılmasını amaçlamıştır. Lipid profillerinin farklanması ve ekzositoz etkileniminin kesişimi nörodejeneratif yollar bağlamında bir ortaklık göstermektedir. Proteazomun inhibisyonu için geri-dönüşümsüz bir inhibitör olan ve farklı sistemlerde daha önceden denenmiş olan *laktasistin* seçilmiştir [25]. Literatürde incelenen ve yüksek veya düşük doz kullanımından kaynaklı olduğu düşünülen farklı sonuçların yarattığı karşıtlığı da incelemek amacıyla, analizlerde 1µM-4 sa, 10µM-4 sa, 1µM-8 sa, 10µM-8 sa dozlarının kullanılması uygun bulunmuştur. Model olarak tercih edilen kromafin hücrelerinin membranına ait lipidomik değişikliklerin analizinde görüntülemeli ToF-SIMS kullanılmış olup, buna paralel olarak ekzositoz stimüle edilmiş hücrelerden salınan nörotransmitter miktarını ve veziküler nörotransmitter içeriğini ölçmek için de sırası ile tekil hücre amperometri (SCA) ve hücre içi veziküler etkili elektrokimyasal sitometri (IVIEC) kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında literatürde ilk olarak farklı dozlarda *laktasistin* ile indüklenmiş proteazomal inhibisyonun membran lipidomiği ve nöroekzositoz üzerine olan etkileri üç özgün analitik yöntem olan görüntülemeli ToF-SIMS, SCA ve IVIEC

ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar daha önceden bildirilen çalışmalar ile hem ekzositoz dinamikleri hem de lipid değişiklikleri açısından, ayrıca *laktasistin*'in doz değişkenliğinin yarattığı etkiler bakımından değerlendirilmiştir. Bu çoklu yaklaşım yardımı ile farklı analitik yöntemlerin bir arada kullanılması sonucu elde edilen veriler proteazomal inhibisyonun nörodejeneratif hastalıkların patolojisi ile bağının daha iyi anlaşılabilmesi için bir köprü görevi görmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ubiquitin Proteazom Sistemi ve Nörodejenerasyon

Ubikütün proteazom sistemi (UPS) hücrede kompleks bir orkestrasyona sahip, evrimsel olarak korunmuş ve temelde protein kalite kontrolü ile ilgili bir mekanizmadır. Ancak bu sistemin doğrudan veya dolaylı olarak hücrede başka sistemlerle de ilişkili olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar ile gösterilmeye başlanmıştır. Protein kalite kontrolünden sorumlu olması nedeni ile UPS özellikle Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi nörodejeneneratif hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir. Ancak bu hastalıkların mı UPS sistemini bozduğu yoksa UPS'de meydana gelen bozulmaların mı nörodejenerasyonun patolojisinde rol oynadığı henüz belirlenememiştir [20].

AH, PH ve ALS gibi nörodejeneneratif hastalıklar ileri yaşlarda ortaya çıkan, çeşitli semptomlar ile kendini gösteren, çoğunlukla sporadik olarak gelişen ve en önemlisi patogenezi açısından bazı ortaklıklar taşıyan nörodejeneneratif hastalıklardır. Moleküler düzeyde proteinopati olarak tanımlanmalarının sebebi hücre içi ve hücre dışında biriken toksik, anormal proteinlerin varlığından ileri gelir. Alzheimer hastalığında A β ve tau proteinlerinin birikimi, Parkinson hastalığında lewy cisimcikleri, parkin, ve α -sinüklein, ALS'de ise TDP-43 ve Bunina cisimcikleri gibi yapıların birikimi gözlenmiştir [26, 27].

Nöronların hücresel olarak efektif çalışması, hücre içerisindeki proteinlerin sentezi, degradasyonu ve bu olayların döngüsel hızını kontrol eden mekanizmaların iyi çalışıp çalışmadığına bağlıdır. Bu olaylar sırasında nöronlarda protein kalite kontrolü, hücre içi birikimlerin temizliği UPS, otofagolizozom ve ekzositoz ile gerçekleşir. Otofagolizozom mekanizması zarar görmüş hücre içi organellerin ve büyük proteinlerin temizliğinden sorumludur. UPS ise sitoplazmadaki ve hücre çekirdeğindeki mutant, yanlış katlanmış ve birikmiş proteinlerin kontrolünden sorumludur [28, 29].

2.1.1. Proteazomlar

Proteazomlar non-lizozomal protein degradasyonundan sorumlu, birden fazla alt ünitelerden oluşan proteazlardır. Ökaryotik hücrelerde sitozolde ve çekirdekte bulunurlar. Bir

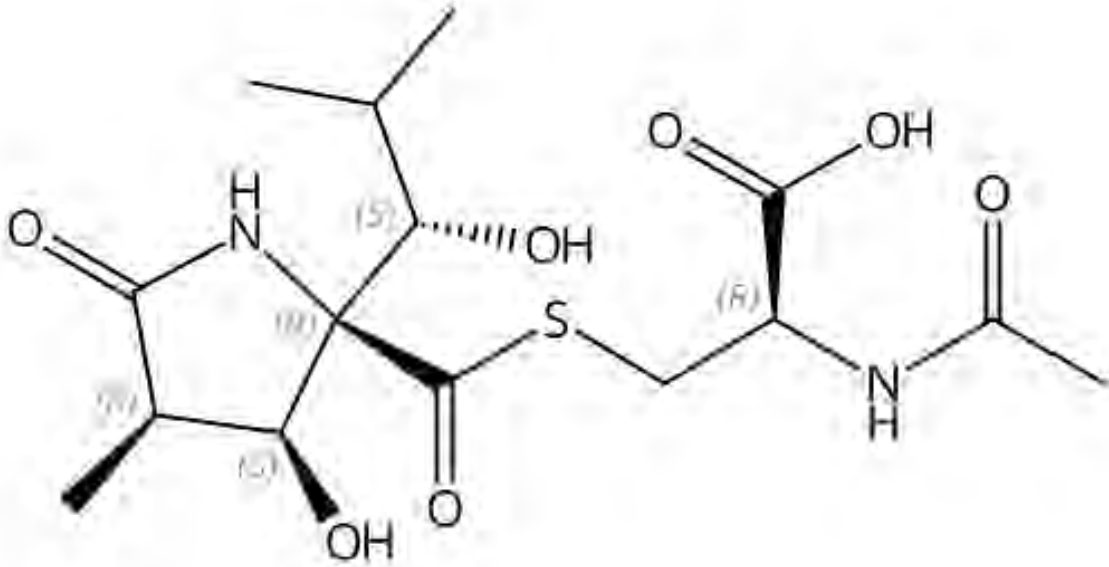
proteazom, 20S adı verilen bir katalitik merkez ve 19S'lik bir veya iki terminal regülatör kısımdan oluşur. Regülatör kısım 20S'lik merkez kısmının bir veya iki tarafına bağlanarak enzimatik olarak aktif birimleri meydana getirir aynı zamanda ubikütün bağlanmış proteinleri tanıır. Eğer 20S'lik merkez üniteye bir tane regülatör kısım bağlandı ise sedimantasyon kat sayısı 26S olur bu tür yapılar 26S proteazomu olarak anılır. Eğer regülatör kısım merkezin her iki tarafına bağlandıysa bu kez uzamış bir 30S'lik birim meydana gelir. 20S'lik proteazom ise 4 adet heteroheptamerik halkadan oluşur. Bunlar iki adet dışta α halkaları, iki adet ise içte β halkaları olarak konumlanırlar [30].

2.1.2. Proteazomal inhibitörler

Proteazomal inhibitörler UPS sisteminin etkilerini anlayabilmek amacı ile nörodejenerasyon odaklı olarak çalışılmış ancak çoğunlukla bu araştırmalar genetik veya proteomik düzeyde olmuştur [31, 32].

2.1.2.1. Laktasistin

Laktasistin, *streptomyces* tarafından üretilen doğal bir proteazomal inhibitördür. *Laktasistin* çoğunlukla proteazomun 20S alt katalitik merkezine bağlanarak işlev görerek şu ana kadar bilinen üç peptidaz aktivitesini inhibe ederken, aynı zamanda büyük 26S kompleksi üzerinde de peptit hidrolizine neden olarak kısa ve uzun ömürlü proteinlerin UPS tarafından kontrolünü de inhibe eder [25].



Şekil 2.1. Laktasistin'in molekül yapısı, L-Sistein, N-asetil-S-[(3S,4R)-3-hidroksi-2-[(1S)-1-hidroksi-2-metilpropil]-4-metil-5-okso-D-prolil]- (ACI), (CAS Numarası: 133343-34-7)

2.2. Nöroekzositoz

2.2.1. Veziküller

Veziküller nörotransmitterlerin ve diğer sinyal moleküllerinin taşınması ve salımından sorumlu organeller olup boyut ve içeriklerine göre kabaca ikiye ayrılırlar. Büyük yoğun çekirdekli veziküller (İng. large dense core vesicles, LDCV), adından da anlaşılacağı üzere görece daha büyük, transmisyon elektron mikroskobu kullanıldığında "yoğun çekirdek" kısmının gözlenebildiği türde yapılardır. Bu yoğun çekirdek adı verilen kısımda çoğunlukla bir protein karışımı bulunur ve bu karışım kromogranin protein ailesinden gelir [33, 34]. Sinaptik veziküller (SV) ise daha küçüktür ve protein içerikleri oldukça azdır [35]. Nörotransmitter taşıyıcı veziküllerde bazı membran proteinleri de mevcuttur ve bu proteinlerin seviyelerindeki değişimler hem vezikül içeriğindeki katekolamin miktarını değiştirebilmekte hem de ekzositoz dinamiklerini etkileyebilmektedir [36].

2.2.2. Ekzositotik yolak

Hem LDCV tipi hem de SV tipi veziküller endoplazmik retikulum orijinli olup trans-Golgi ağında sentezlenirler. Veziküllerin biyogenezi sonrası salım bölgesine transferleri

gerçekleşir. Veziküller hücre zarının aktif bölgelerinde yuvalanırlar (ing. docking) ve içeriklerini salmak üzere hazır hale gelmeye başlarlar (ing. priming) [36]. Veziküller hazır olduğunda sitozolde miktarı yükselen Ca^{2+} 'un yarattığı sinyal veziküler zar ile hücre zarının kaynaşmasını başlatır. Bu olayın gerçekleşmesi kalsiyum iyonlarının SNARE kompleksi adı verilen yapıların konformasyonel değişimi ve bu sayede vezikül ile hücre membranını kaynaşacak kadar yakınlaştırması ile mümkün olur. Kalsiyumun bu olayda nasıl bir rol oynadığı tam olarak bilinmemekle birlikte sinaptotagmin adı verilen proteinin kalsiyuma bağlandığı SNARE kompleksinde değişimler yarattığı düşünülmektedir. SNARE kompleksi aynı motife sahip üç farklı membran proteininden oluşmakta ve bunlardan sintaksin ve SNAP-25 ya hücre zarına kancalı halde ya da sitozolde çözümlü halde bulunur iken sinaptobrevin ise vezikül zarına bağlı halde bulunmaktadır. SNARE kompleksinin oluşumu veziküller hücre zarına yakinken meydana gelir ve bu proteinler ancak kalsiyum miktarının yükselmesi ile bir fermuar gibi kenetlenir. Böylece vezikül membranı ile hücre membranı bir açıklık (por) meydana getirecek kadar yaklaşmış olur [37].

2.2.3. Ekzositozun düzenlenmesi

Önceleri ekzositoz olayının yalnızca tek bir biçimde gerçekleştiği düşünülüyordu. Buna göre; SNARE kompleksi füzyon porunun ilk açılmasını regüle ettikten sonra por genişleyerek membranla tam olarak kaynaşır ve vezikül tüm içeriğini hücre dışına atar. Bu olay tam salım adını alır. Ancak zaman içerisinde araştırmalar ekzositoz olayının her zaman bu şekilde gerçekleşmediğini, füzyon porunun kaynaşmadan önce de açılıp kapanabileceğini göstermiştir. Bu olaylar porun açık kalma süresine ve ne miktarda içerik salındığına göre farklı isimlerle anılmıştır. Örneğin; "öp-kaç" modunda çok dar bir por açılır ve çok kısa sürede az miktarda transmitter salınarak por tekrar kapanır. Daha sonra vezikül aktif bölgeden ayrılır. "Parçalı salım" olayında ise por ilk olarak küçük bir miktar açılır ve görece daha uzun zaman açık kalır ve daha fazla transmitter salımı gerçekleşir. Parçalı salım hücrelerin daha esnek olabilmesiyle, dolayısıyla iç ve dış olaylara göre davranış değişikliğini daha kolay gerçekleştirebilmesiyle, yani nöroplastisite ile ilişkilendirilmektedir. Bazı araştırmalar genel geçer olarak bilinen ya hep ya hiç salımın yani tam salımın aksine parçalı salımın aslında daha çok gerçekleştiğini savunmuştur. Geliştirilen yeni elektrokimyasal

yöntemler sayesinde salınan transmitter maddelerin fraksiyonu ve parçalı salımın ne boyutta olduğu hakkında kantitatif bilgilere ulaşabilmek mümkündür [38].

2.3. Nöronal Hücrelerde Lipid Dinamikleri

2.3.1. Fosfatidilinositol ve fosforile türevleri

Memeli hücrelerinde bulunan fosfatidilinositol (PI) türleri inositol baş grubunun fosforile olması ile meydana gelir. PI türleri bir çok hücre tipinde az bulunurken beyinde oldukça fazla miktarda olup sinyal iletiminde önemli rol oynarlar. Veziküllerin sinaptik döngüsü sırasında hızlı bir membran füzyonu gerçekleşirken farklı proteinler bu sürece katılır ve hücre iskeletinde yeniden yapılanmalar meydana gelir. Bu süreçte farklı zamanlarda PI'lar da oluşur ve katabolize olur. Dinlenme durumundaki bir nöronun hücre zarında bulunan PI türlerine kltrin proteinleri, dinamin, epsin gibi bir çok nöronal protein bağlanır. Klasik fosfolipaz C-aracılı sinyal iletim süreçlerinde fosfatidil inositollerin ve diaçilgliserollerin metabolitleri hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu artırır. Sinaptik veziküllerin presinaptik membrana gönderilerek vezikül döngüsünün başlamasında DAG tarafında işlevlendirilen MUNC-13 adlı protein rol oynarken döngü sinyalinin kapatılabilmesi ise DAG kinazın DAG'ı fosforile ederek fosfatidik asit (PA) üretmesi ve akabinde PA'nın PI gibi farklı lipidlere dönüşmesi ile mümkün olur. Sinaptik veziküller salındıktan sonra döngünün devam edebilmesi için bu veziküllerin geri dönüşüme uğraması veya endositoz gerçekleştirilmesi gereklidir. Sinaptik vezikül döngüsünde AP2 gibi proteinler intakt PI formlarına ihtiyaç duyarken MUNC-13 gibi proteinler için bunların yıkım ürünleri gereklidir. Dolayısı ile fosfatidil inositol düzeyleri sinaps fonksiyonu ve sinyal iletimi için oldukça önemlidir.

2.3.2. Fosfatidilserin

Fosfatidilserin (PS) lipidleri normalde hücre zarının iç kısmında yer alır ancak apoptoz gibi hücre sel iletimde gerçekleşen farklanma durumlarında dış kısma da göçebilirler. Beyinde fosfatidilserinlerin hücre zarındaki bu şekildeki asimetrik dağılımının beyin ATP tüketiminin %20'sini oluşturduğu hesaplanmış olsa da bu asimetrinin işlevi tam olarak anlaşılammıştır. Bu durumun PS'nin sitoplazmaya dönük anyonik yapıda bir lipid olması ve

böylece SV döngüsü için gereken proteinlerin işlevselleştirmesindeki fonksiyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Fizyolojik pH'da PS'in negatif yükü -1'dir böylece elektrostatik bir düzenleyici olarak fonksiyon gösterir. Ayrıca birçok proteinin C2 domainine bağlanır. Bir sinaptik vezikül proteini olan sinaptotagmin-I, iki C2 domaini taşıyan bir kalsiyum sensörüdür. [39] Bu protein, C2 domainlerinin fosfatidilserin ve fosfatidilinosiollerin anyonik baş gruplarına bağlanması ile işlevsel hale gelir [40]. Aynı şekilde protein kinaz C alfa'nın da aktivitesi kalsiyum bağımlıdır ve kalsiyuma bağlanması ancak fosfatidilserine spesifik bağlanması ile mümkün olur. Fosfatidilserin ayrıca dokosaheksaenoik asit (DHA) gibi, diyetle de alınabilen biyoaktif yağ asitleri için de depo görevi görür. DHA kan beyin bariyerini geçerek hızlı bir şekilde hücre zarındaki PS gibi gliserofosfolipidlerle esterleşir. DHA miktarı arttıkça nöronal hücrelerde PS miktarı da artar [41].

2.3.3. Fosfatidiletanolaminler

Fosfatidilserin gibi fosfatidiletanolaminler (PE) de hücre zarının iç kısmında bulunurken PS'lere göre, PE'ler araşidonik asit açısından daha zengindir. PS'lerde ise DHA daha yüksek miktarda bulunur. Beyindeki fosfatidiletanolaminlerin büyük bir bölümü eter bağlarına sahiptir. Bunların da büyük bölümü de alkenil formlarıdır (C-O-C=C) ve etanolamin plazmalojenler (pPE) olarak adlandırılırlar. Plazmalojen etanolaminlerin bulunurluğunun fazla olmasının membran füzyonundaki rolü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Fizyolojik sıcaklıklarda pPE ters hegzagonal biyofiziksel özellik göstererek membran akışkanlığını artırır ve membran-membran füzyon olayı bu sayede artar. Sinaptik veziküllerde görece olarak pPE miktarı düşük olsa da, pPE açısından yoksun olan hücrelerde membran dinamiklerinin bozulduğu gösterilmiştir [39].

2.4. Kütle Spektrometrisi

Bir kütle spektrometresi en temelde iyonların kütle/yük (m/z) oranlarını ölçer. Üç aşamadan oluşan bu süreç öncelikle moleküllerin gaz fazında iyonlara dönüşmesini gerektirir. Daha sonra bu iyonlar kütle analizörü denilen kısımda m/z değerlerine göre birbirlerinden ayrılarak her bir türün miktarları saptanır. Son 20-30 yılda kütle spektrometrisi

teknolojisindeki gelişmeler sayesinde biyolojik ve klinik analizler mümkün kılınmış olsa da kütle spektrometrisinin ilginç tarihi 1900'lü yılların başından itibaren başlar [42].

2.4.1. Kütle spektrometrisinin kısa tarihi

Kütle spektrometrisinin (MS) temellerini bir katot ışın tüpündeki elektrik alanı içerisinde elektron tespiti yapmayı başaran fizikçi J.J. Thomson 1897 yılında atmıştır ve bu keşfi ile 1906 yılında Nobel Fizik Ödülü'nü almıştır. Bundan sonraki basamakta Thomson kütle spektrografı, daha sonra parabol spektrografı olarak adlandırılacak olan cihazı, geliştirerek elementlerin atomik ağırlıklarını ölçmüştür [43]. Bu cihaz içinde bulunan tahliye tüpleri olarak adlandırılan tüplerde oluşturulan iyonlar elektrik ve manyetik alanlara geçerek parabolik yörüngeler çizmiştir. Bunun sonucunda oluşan ışınlar ise fotografik tabakalar veya floresan perde üzerinde tespit edilmiştir. Daha sonra Thomson'un öğrencisi olan F.W Aston bu cihazı daha da geliştirerek iyonların kütlere göre saçılıp hızlarına göre odaklandığı bir sistem ortaya çıkararak rezolüsyonu artırmış, ^{20}Ne ve ^{22}Ne 'yi keşfederek stabil izotopların varlığını ortaya çıkarmış ve böylece kendisi de 1922'de Kimya alanında Nobel Ödülü'nü almaya hak kazanmıştır [44]. Kütle spektrometrisinin biyoanalitik kimya alanında uygulanmaya başlanması 1940'lı yıllarda modern kütle spektrometrisinin atası kabul edilen Alfred Nier öncülüğünde gerçekleşmiş, bu dönemde manyetik sektör alanlı kütle spektrometresi geliştirilmekle birlikte, ^{13}C gibi ağır kararlı izotoplar ile zenginleştirilen biyolojik yapıların iz takibi yapılmıştır. Dahası bu dönemde Johnson ve Nier işbirliği ile geliştirilen simetrik elektrostatik kütle analizörü ve asimetrik manyetik alanı sayesinde iyon demetinin açısal farklanmasını mümkün kılarak üretilen iyonların ayırımının optimizasyonunu sağlayan bir kütle spektrometresi geliştirilmiştir. 1950'li yılların ortalarında farklı organik moleküllerin fragmantasyon paternleri aydınlatılmaya başlanmış bundan sonra Kütle spektrometrisinin kullanımı biyolojik alana ve endüstriye taşınmıştır. 1980'li yıllara kadar ise kütle spektrometri analizleri küçük moleküller ile sınırlı kalmış hızlı atom bombardımanı (ing. FAB) tekniğinin gelişmesi ile büyük moleküller sıvı matrikste çözünmüş termal olarak değişken intakt polar bileşiklerle bombarde edilerek analiz edilmiştir. John Fenn ve Masamichi Yamashita'nın 1984 yılında elektrosprey iyonizasyon (ESI), 1985 yılında ise Hillenkamp ve Karas'ın matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI)

tekniklerini geliştirmesi ile peptitlerin ve proteinlerin izole yüklü türlerini elde etmek, kütle spektrometrisini sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi, kapiller elektroforez gibi ayırma yöntemleri ile de birleştirmek mümkün olmuş ve bu yöntem biyologların ve medikal alanda çalışanların büyük oranda ilgisini çekmiştir [45].

2.4.2. İkincil iyon kütle spektrometrisi (SIMS)

İkincil iyon kütle spektrometrisi yöntemi en genel olarak örnek yüzeyine enerji yüklü primer iyonların yüksek vakum koşulları altında gönderilmesi, bunun sonucunda da ikincil iyon türlerinin yüzeyden sıyrılması esasına dayanır. Yüzeyden sıyrılan ikincil iyonların küçük bir kısmı yüklü haldedir ve bunlar tahliye edilerek kütle spektrometresi içerisine yönlenirler [46]. SIMS analizlerinin dinamik ve statik olarak temelde iki modu bulunmaktadır. Statik SIMS cihazlarında çoğunlukla atımlı iyon kaynakları ve uçuş zamanlı kütle analizörleri (ToF) kullanılır. İyon demetli atımların yapıldığı kaynakların kullanılmaya başlanması ile ToF-SIMS analizlerinin sensitivitesinde büyük iyileşme olmuştur. İyon demetleri sayesinde moleküler iyon verimi artmış, yüzeydeki organik moleküllerin zarar görerek parçalanma ihtimalleri azalmış, böylece elementel yerine moleküler bilgiye ulaşım mümkün olmuştur. Dinamik SIMS'de ise sensitivite statik limite (10^{13} primer iyon/cm²) stn gelme durumu ile ilgilidir [46-48]. MALDI-MS (Matrix Destekli Lazer Desorpsiyon Kütle Spektrometrisi), DESI-MS (Elektrosprey İyonizasyon Desorpsiyonu Kütle Spektrometrisi) gibi diğerk yüzey desorpsiyon yöntemlerine nazaran SIMS daha yüksek bir yüzey sensitivitesine sahiptir. SIMS analizlerinde kullanılan bazı iyon bombardıman türleri sonucunda örnek yüzeyinde 50 nanometreden daha küçük fokuslanma alanlarını oluşturabilmek mümkün olur [46].

2.4.3. Uçuş zamanlı kütle analizörü

Uçuş zamanlı kütle analizörleri (ToF), kinetik enerjileri eşit ancak kütle-yük oranları farklı olan iyonların uzunluğu bilinen bir tp içerisinde uçurularak ayrılmasını sağlarlar. İyonizasyon prosesi süresince elde edilen iyonlar uçuş zamanı tüplerinde hızlandırılır ve düşük m/z'ye sahip iyonlar yüksek olanlardan daha hızlı yol alır. Bir iyonun tp boyunca

alacağı yol ile onun m/z değeri arasındaki ilişki, yüklenmiş olan partiküllerin potansiyel ve kinetik enerjisini gösteren eşitliklerden çıkarılabilir [49].

2.5. Nöroekzozitoza Ait Olayların Analizi İçin Kullanılan Elektrokimyasal Yöntemler

2.5.1. Tekil hücre amperometrisi

Tekil hücre amperometri tekniği 1990 yılında Wightman grubunun tekli adrenal kromafin hücrelerinde *in vitro* voltametrik çalışmalar yapması ile başlamıştır. Çalışmalarında ard arda yapılan taramalarda pik akımında gözlenen hızlı dalgalanmaları münferit ekzositotik salım olaylarına dayandırmalarının yanı sıra gözlenen bu akımın salınan katekolaminlerin oksidasyonundan kaynaklandığını da gözlemişlerdir. Daha sonra aynı yöntemi kullanarak ancak uygulanan potansiyeli sabit tutmak suretiyle zamansal çözünürlüğü anlamlı derecede yükseltmişler ve böylece tekil ekzositotik salım olaylarını ayırtlamayı başarmışlardır [50].

Tekil hücre amperometrisinde ortalama bir hücre büyüklüğü skalasındaki (5-10 μm) bir mikro elektrot 45° açı ile kültür içerisindeki hücrenin üzerine konumlandırılarak potansiyel uygulanır. Uygulanan potansiyel gözlenen akımın kütle transferi limitinde olmasını garantileyecek bir miktarda sabit tutulur. Katekolamin salımını görüntüleme de kullanılan çalışmalarda, çoğunlukla kullanılan potansiyel Ag|AgCl referans elektroduna karşılık 700 mV 'tur. Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu artırarak vezikül füzyonunu ve salımı tetiklemek için elektriksel ve kimyasal uyarım uygulanır. Salınan moleküller difüzyonun ve oksidasyonun etkisi ile elektrot yüzeyine hızlıca ulaşarak zamanın bir fonksiyonu olarak akım cevabının gözlenmesine olanak verirler. Aynı zamanda burada gözlenen pikin integrasyonu ile yük miktarı (Q) hesaplanır. Faraday yasasına göre; tekil bir olayda salınan mol sayısı elde edilen yük ile doğru orantılıdır ve

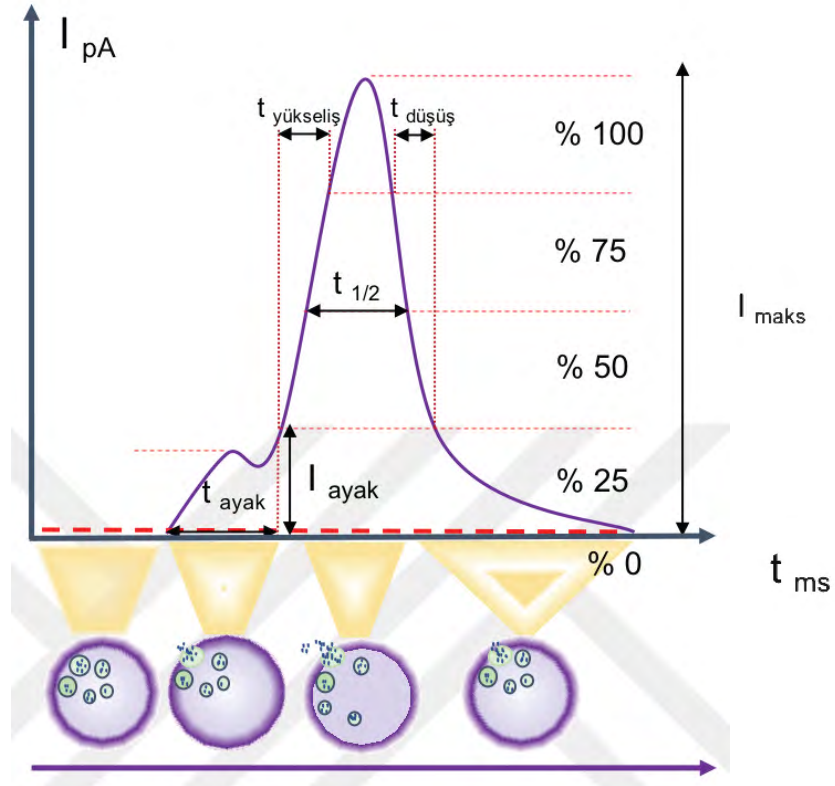
$$N = \frac{Q}{nF} \quad (2.1)$$

eşitliği ile ifade edilebilir. Bu eşitliği yeniden;

$$\text{molekül sayısı} = \frac{Q}{n}K \quad (2.2)$$

şeklinde ifade etmek mümkündür. n burada reaksiyon sırasında transfer edilen elektronları gösterirken, F faraday sabitini, N salınan mol sayısını K ise Avogadro sayısının Faraday sabitine bölümünü ($N_A/F = 6.2415e^{18}$ elektron/C) ifade eder.

Akım nörotransmitter salımı ile bağıntılı iken amperometrik pikin analizi ile füzyon porunun dinamik prosesleri ve transmitterlerin vezikülden sızıntısı hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bir salım olayında pikin yükselme zamanı ($T_{\text{yükseliş}}$) gözlenerek füzyon porunun genişlemesine dair; pikin düşüş zamanı ($T_{\text{düşüş}}$) gözlenerek ise porun kapanması ve ekstraselüler boşluğa salınan moleküllerin tükenişi hakkında kinetik bilgi elde etmek mümkündür. Pikin genliği (I_{maks}) saniyedeki maksimum molekül veya yük akışını gösterir. Pikin yarı yükseklikteki genişliği ise ($T_{1/2}$) tüm salım olayının süresinin anlaşılmasını sağlayan bir göstergedir. Füzyon poru oluşurken asıl salım haricinde pordan transmitterlerin ufak bir kısmı sızabilir bu olay amperometrik pik analizinde pik ayağı olarak gözlenir. Esas pik öncesi oluşan bu ufak yükselmenin süresi t_{ayak} , maksimum akım ise I_{ayak} olarak adlandırılır. Füzyon poru genişlerken salınan transmitter miktarı artar ve akımda yükselme meydana gelir. Nörotransmitter difüzyonunun ardından por kapanır ve akım yavaşça sönümlenir. Gözlenen tekil olayların ufak bir kısmında por bu ilk anda açılır ve tümünden bir salım meydana gelebilir.



Şekil 2.2. Tekil Hücre Amperometri (SCA) sonucu elde edilen ekzositoz pikine ait parametreler ve ekzositoz olayının bu parametrelerle eşleniminin şematik gösterimi.

2.5.2. Hücre içi vezikül etkili elektrokimyasal sitometri (IVIEC)

Hücre içi vezikül etkili sitometri, IVIEC yöntemi ile hücre içinde bulunan vezikül içeriklerini ölçebilmek mümkün hale gelmiştir. Roberts ve arkadaşları karbon-fiber nano elektrotlar ile hızlı taramalı döngüsel voltametri tekniklerini birleştirmiş böylece kromafin hücreleri içerisinde bulunan nor-epinefrin ve epinefrin içeren vezikülleri birbirinden ayırdetmeyi başarmışlardır. Bu çalışmanın sonunda epinefrin içeren veziküllerdeki katekolamin miktarının daha yüksek olduğunu bularak vezikülleri katekolamin içeriklerine göre sınıflamayı başarmışlardır. SCA ve IVIEC tekniklerini kombine ederek salım fraksiyonunu hesaplamak mümkündür. Salım fraksiyonu veziküllerden salınan transmitter madde miktarının IVIEC ile ölçülen veziküler içerik miktarına bölünmesi ile elde edilir. Ewing ve grubu bu iki yöntemi kombine olarak farmasötik çalışmalarda kullanarak, plastisite ve nörotransmisyon mekanizmaları ile alakalı yeni yaklaşımlar geliştirmektedir. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar, SCA ve IVIEC yöntemleri ile kokain ve metilfenidat maddelerinin

ekzositoz ve salım fraksiyonu üzerindeki etkisini araştırarak; bu iki maddenin veziküler katekolamin içeriğini ve ekzositotik katekolamin salımını azalttığını, ancak bu maddelerin salım fraksiyonu ve kognisyon üzerindeki etkilerinin bunun tersi olduğunu göstermişlerdir. Buradan yola çıkarak da salım fraksiyonunun kognisyon ile ilgisini tartişmışlardır [51].

3. GEREÇ

3.1. Kimyasal Maddeler

Tablo 3.1. *Kullanılan Kimyasal Malzemelerin Listesi*

Kimyasal Adı	Firma
Laktasistin	Sigma-Aldrich
Poli-D-Lizin	Sigma-Aldrich
2-Metilbütan	Sigma-Aldrich
Amonyum format	Sigma-Aldrich
Etanol 99,7 %	Solveco AB
KCl	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	Sigma-Aldrich
Glukoz	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Penisilin	Sigma-Aldrich
DMEM/Ham's F12	Invitrogen
Fötal Bovin Serum	Sigma-Aldrich
Amfoterisin B	Invitrogen
Sitozin β -D-Arabinofuranosit	Sigma-Aldrich
Triptan Mavisi	Sigma
5-fluoro-2'-deoksiüridin	Sigma-Aldrich
Streptomisin	Sigma-Aldrich
Kollajenaz P	Roche
Fosfat-Salin Tamponu (PBS)	Sigma-Aldrich
Epoksi	Epoxy Tech

3.2. Cihazlar

Tablo 3.2. *Kullanılan cihazların listesi*

Cihaz	Firma
ToF-SIMS-J105- 3D Kimyasal Görüntüleyici	IONOPTICA Ltd.
Saf Su Cihazı	Purelab Classic purification (ELGA, İsveç)
Vakumlu Örnek Kurutucu	Eppendorf Concentrator Plus
Invert Mikroskop	IX71, Olympus

Tablo 3.3. (Devam) *Kullanılan cihazların listesi*

Axopatch 200B Potansiyostat	Molecular Devices, Sunnyvale, CA
Patch-Clamp Mikromanipulator	PCS-5000, Burleigh Instruments, Inc., USA
Mikropipet Çekici	PE-21, Narishige, Inc., Japan

4. YÖNTEM VE BULGULAR

4.1. Yöntem

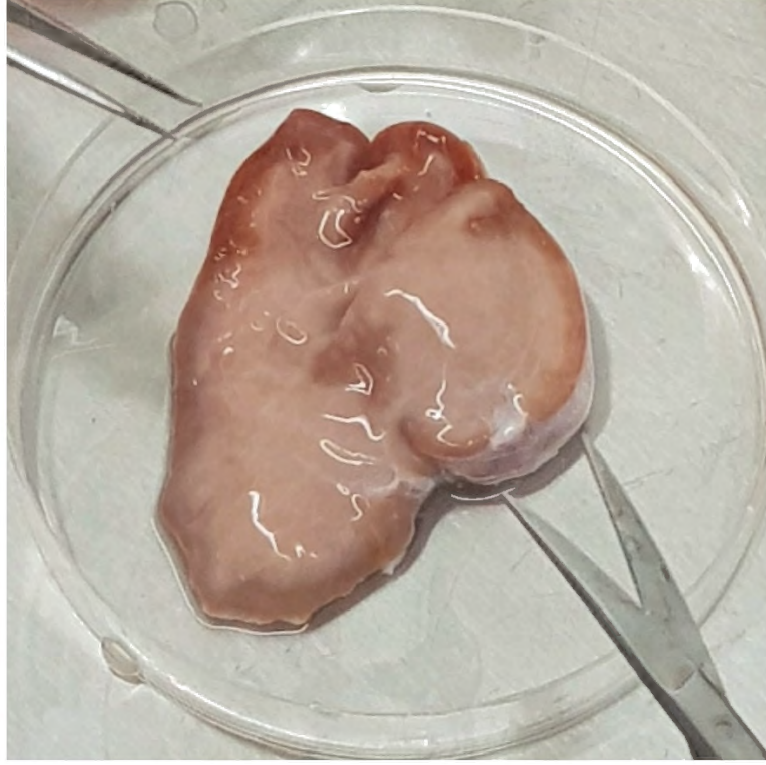
4.1.1. Kromafin hücrelerinin izolasyonu ve kültürü

Sığır adrenal bezleri yerel bir kesim yerinden temin edilmiştir. Yaklaşık 6-7 adet adrenal bez toplandıktan hemen sonra 300 mL Locke's tamponu ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$ amfoterisin B antifungalini içeren 1000X stok'un 1:1000 oranında seyreltilmesi ile elde edilir) içeren steril şişeye aktarılmıştır. Şişe buz üzerinde tutulmuştur. Hücre kültürü kabinde adrenal bez üzerindeki yağ ve bağ dokuları makas yardımı ile uzaklaştırılarak adrenal vene yaklaşık 10 mL, 1x Locke tamponu perfüze edilmiştir. Yıkanmış adrenal bez 1x Locke tamponunun içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra adrenal bez 1 mL 0.2% kollajenaz P çözeltisi ile 3 kez şişirilir ve alüminyum folyo ile kaplanmış 250 mL'lik steril cam beher içerisinde 15 dk 37°C 'de inkübe edilmiştir. Medulla bölgesinin izolasyonu için adrenal bezin alt ucu boylamasına kesilerek konveks dış yüzey pembe medullaya dek oyulmuştur. Korteksler özenle soyulup ve izole olan medulla petri kabı içine alınarak ufak parçalara ayrılmıştır. İyice ufalanmış medullalar 0.2% kollajenaz-P içeren steril tüpe alınmıştır. Bu karışım 30 dakika boyunca 37°C 'de hafifçe karıştırılarak inkübe edilmiş ve $250 \mu\text{m}$ steril filtreden geçirilmiştir. Filtrat 50 mL'lik santrifüj tüpüne aktararak 1xLocke tamponu ile hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında 400g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Hücreler $100 \mu\text{m}$ filtreden geçirilmiştir. Hücreleri Percoll gradiyenti kullanarak ayırabilmek amacıyla 20 mL Locke tamponu ile muamele edilmiş Percoll çözeltisi 20 mL hücre süspansiyonu üzerine eklenip nazikçe karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında 20 dakika santrifüjlenmiştir. Kırmızı kan hücreleri tüpün en altında, kromafin hücre bandı ise tüpün ortalarında yer almıştır. Tüpün üst kısmındaki 1/10'lük hücre topluluğu atılarak kromafin hücre bandına ulaşılmıştır. Yaklaşık 10 mL'lik bir hacim alındıktan sonra ayrılan kromafin hücreleri $40 \mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilmiştir. Filtrat üzerine 200 mL steril düşük glukozlu DMEM besiyeri eklenmiş ve 50 mL'lik alikotlara ayrılan hücreler tekrar 400g'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak hücreler 20 mL DMEM besiyeri ile tekrar süspansiyon edilir. Daha sonra hemasitometre ve triptan mavisi kullanılarak boyanmamış hücrelerin mikroskopta sayımı ile ve dilüsyon faktörleri de hesaba katılarak hücre sayısına karar verilmiştir. Önceden poli-D-Lizin ile kaplanmış petri kapları üzerine, elektrokimya deneyleri

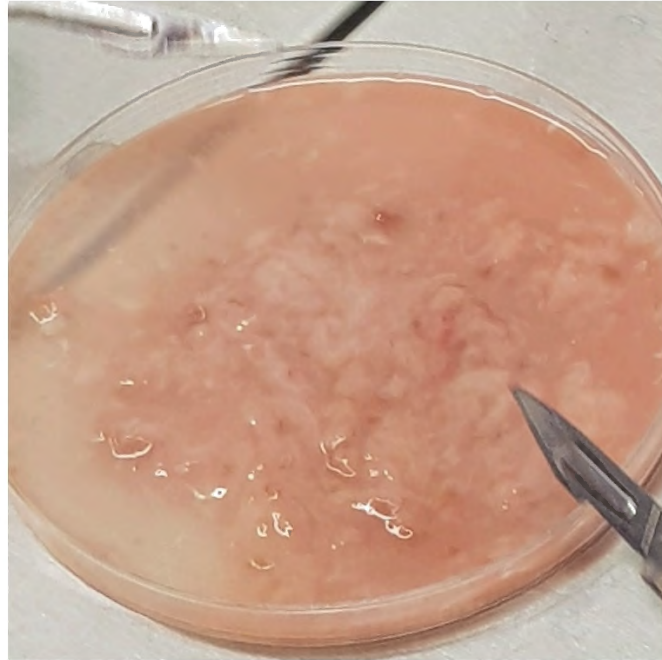
için yaklaşık 700,000 hücre ekilmiştir. 37 °C'de, 5% CO₂ ortamı sağlayan nemlendirilmiş bir inkübatörde 1 gün bekletilmiştir [52].



Görsel 4.1. *Sığır adrenal bezinden kromafin hücrelerinin izolasyonu, adrenal bezin enlemesine kesim aşaması.*



Görsel 4.2. *Sığır adrenal bezinden kromafin hücrelerinin izolasyonu, adrenal bezin iç kısmı.*



Görsel 4.3. *Sığır adrenal bezinden kromafin hücrelerinin izolasyonu, adrenal bez medullasından alınan hücrelerin ilk homojenizasyon basamağı.*

4.1.2. ToF-SIMS analizi için örneklerin hazırlanması

İndiyum kalay oksit (İKO) ile kaplı olan ve dolayısı ile elektriksel olarak iletken olan lamalar üzerine hücrelerin tutunabilmesi için poli-D-Lizin ile 1 gün boyunca muamele edilerek yüzeyin kaplanması sağlanmıştır. Tek hücre deneyleri için yaklaşık 300,000 hücre bu kaplı lamalara ekilmiş ve nemlendirilmiş inkübatörde 37 °C, 5% CO₂ ortamında hücrelerin tutunması için 1 gün beklenmiştir. Hücre şekilleri ve yüzeye tutunmaları ışık mikroskobu ile monitörize edilmiştir. Deney öncesi *laktasistin* alikotları (100 µM suda) hücre besiyeri ile (37°C) taze olarak son hacim 1 µM ve 10 µM olacak şekilde seyreltilmiştir. Hemen sonra 1 µM-4sa, 10 µM-4sa, 1 µM-8 sa ve 10 µM-8 sa olarak belirlenmiş dozlardaki *laktasistin* konsantrasyonu ile lamalar muamele edilmiştir. Kontrol dahil olmak üzere tüm deney setleri iki paralel olarak hazırlanmıştır. Belirlenen zaman sonunda kaplı lamalar nazıkçe 150 mM amonyum format çözeltisi ile yıkanarak besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından sıvı nitrojende soğutulmuş 2-metil bütan içerisine daldırılarak hücreler dondurulmuştur. Donuk hücrelerle kaplı bu lameller zaman geçmeden vakum cihazında hızlı kurutmaya tabi tutulmuştur. Daha sonra ToF-SIMS J105 cihazının vakumlu örnek bölümüne taşınarak gece boyu bu kısımda muhafaza edilmiş ve hemen sonra analize başlanmıştır.

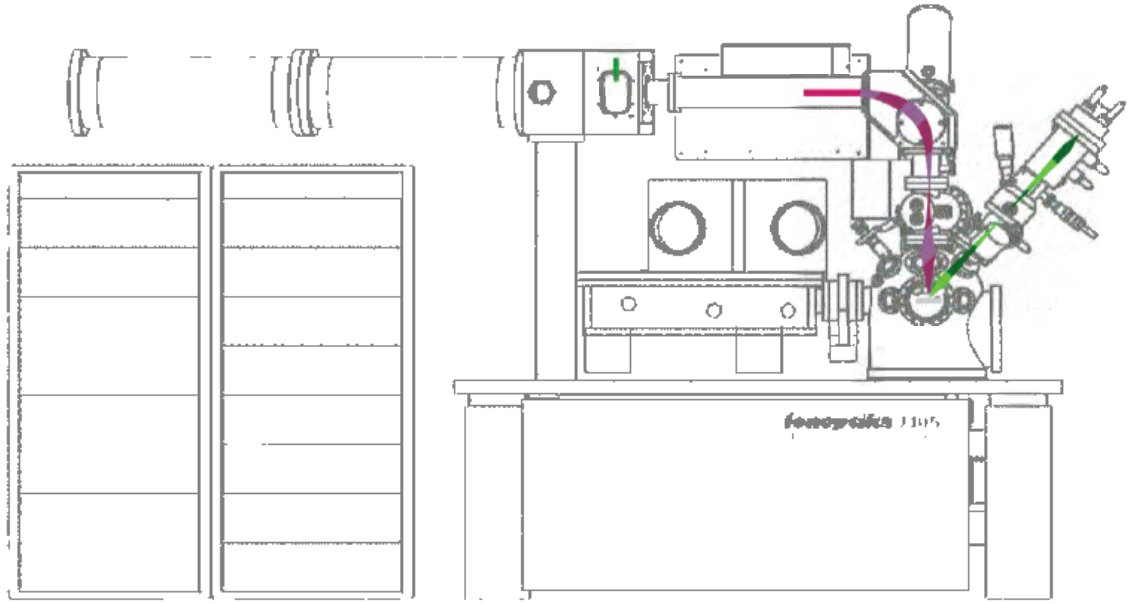


Şekil 4.1. ToF-SIMS analizi için örneklerin hazırlanması için gereken adımların şematik gösterimi.

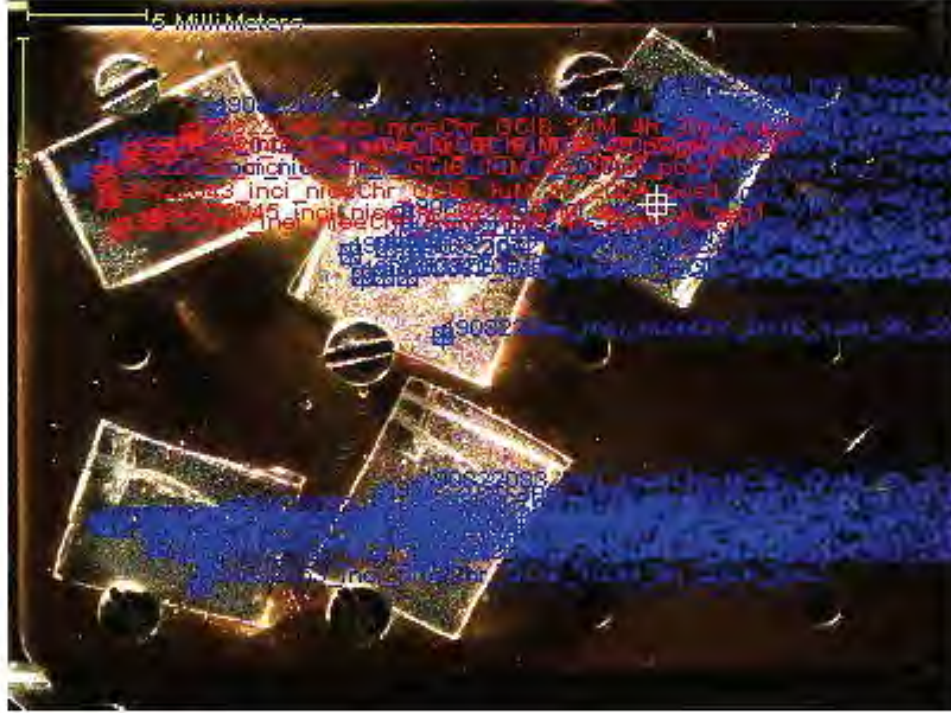
4.1.3. ToF-SIMS ölçümleri

Görüntülemeli İkincil İyon Kütle Spektrometrisi analizleri J105-3D Kimyasal Görüntüleyici ile gerçekleştirilmiştir [47]. Cihaz, sürekli gelen primer iyon saçımını ikincil iyon kaskatlarına dönüştürerek bir demetleyiciye iletmektedir. Demetleyici kısmında ikincil

iyon kaskatları sıkıştırılarak Uçuş zaman analizörünün kuadratik alanının girişinde zamansal olarak düzenlenmektedir. Bu çalışmada 40 kV gaz küme iyon saçıkları kullanılmış olup bu saçıklar 6000 CO₂ moleküllerinden oluşmuştur [53]. Analiz sırasında elde edilen kimyasal görüntüler 800 × 800 µm² alanda 128 × 128 piksel boyutu seçilerek elde edilmiş olup kullanılan primer iyon doz yoğunluğu of 2.56 × 10¹² iyon/cm² olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2. J105 cihazının şematik gösterimi. Sürekli primer iyon akışı (yeşil) ve örnek yüzeyinden sıyrılan ikincil iyonlar (mor). ToF kütle analizörü (sol tarafta).



Görsel 4.4. J105 Görüntülemeli ToF-SIMS cihazının örnek muhafaza bölümünde vakum altında bulunan örneklerin analiz sırasında cihaz kamerasından görünümü.

4.1.3.1. Görüntülemeli ToF-SIMS verilerinin analizi

Tekil hücrelere ait kimyasal görüntülerden toplanan sinyallere ait spektrumlar kaydedilmiş, sinyal gürültü oranını iyileştirmek üzere aynı koşula ait hücrelerden toplanan sinyaller birleştirilmiştir. İndiyum Kalay Oksit yüzeyden gelen sinyaller ve yoğun ama daha az karakteristik lipid fragmanlarına ait sinyalleri elimine etmek amacı ile kütle aralığı olarak 400 - 1200 m/z seçilmiştir. Bir başka deyişle bu bölge seçilerek intakt lipid sinyalleri elde edilmiştir. Sinyal intensitesi imaj verisinden ekstrakte edilen her spektruma ait piksel sayısına bölünerek normalize edilmiştir. Daha sonra veriler Matlab2019b yazılımına yüklenmiş ve 10 nanosaniye'lik paketlere indirgenerek hem gereken gürültü azaltılmış hem de gereken bilgisayar işlem gücü azaltılmıştır. Sinyal daha sonra ortalamaya göre non-lineer Tekrarlı Kısmi Küçük Kareler algoritması kullanılarak normalize edilmiştir. Ön işlemeye tabi tutulan veriler ile daha sonra temel bileşen analizi (PCA) yöntemi kullanılarak çok değişkenli istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. PCA yöntemine göre karşılaştırılan spektrumlara göre temel bileşen-1 (PC1) en yüksek varyansı yakalarken temel bileşen-2 (PC2) ikinci en yüksek varyansı yakalamaktadır. Analiz sonuçları skorlar ve ağırlık grafikleri (ing. loading plot) ile

değerlendirilmiştir. Skorların grafikleri kütle spektrumlarındaki benzerlik veya farklılıkları görsel olarak ortaya koymuş olup, yükleme grafikleri farklılıkların hangi değişkenlerden (m/z değerleri) kaynaklandığını göstermiştir.

4.1.4. Elektrokimyasal ölçümler

4.1.4.1. Tekil hücre amperometrisi

Tekil hücre amperometrisi uygulanmadan önce hücreler 3 kez izotonik tuz çözeltisi ile durulanmıştır. Tüm deney prosesi boyunca hücreler 37 °C'de izotonik çözelti içerisinde tutulmuştur. Elektrokimyasal kayıtlar tekli kromafin hücrelerinden Faraday kafesi içerisinde ters ışık mikroskobu altında alınmıştır. Axopatch potansiyostat kontrolü altında çalışma potansiyeli Ag/AgCl referans elektroduna karşılık +700 mV'tur. Çıktılar 2.1 kHz'de filtre edilmiş ve 5 kHz Axoscope 10.4 yazılımı kullanılarak dijitize edilmiştir. Ters ışın mikroskobu kullanılarak yapılan tüm deneyler 10x ve 40x objektif büyütmesi kullanılarak yapılmıştır. Tekil hücre ekzositoz deneyleri için bir disk-karbon fiber mikroelektrodu Patch-Clamp mikromanipülatörü ile yavaşça hareket ettirilerek hücre membran yüzeyine, zarar vermemeye dikkat ederek yerleştirilmiştir. Kayıt alınmaya başladıktan 10 saniye sonra cam bir mikropipet ile K⁺ (30 mM) stimülasyon solüsyonu kromafin hücrelerinin yüzeyine 30 saniyelik tek enjeksiyon vuruşu ile enjekte edilmiştir.



Görsel 4.5. *Kromafin hücrelerinin SCA yöntemi ile analizi, disk karbon fiber elektrotun hücre yüzeyi üzerindeki görünümü.*

4.1.4.2. Hücre içi vezikül etkili elektrokimyasal sitometri

IVIEC analizleri için karbon-fiber bir nanotip elektrot kromafin hücrelerinin içerisine yerleştirilerek nano boyuttaki veziküllerin içerikleri canlı hücre sitoplazması içerisinden ölçümlenmiştir.

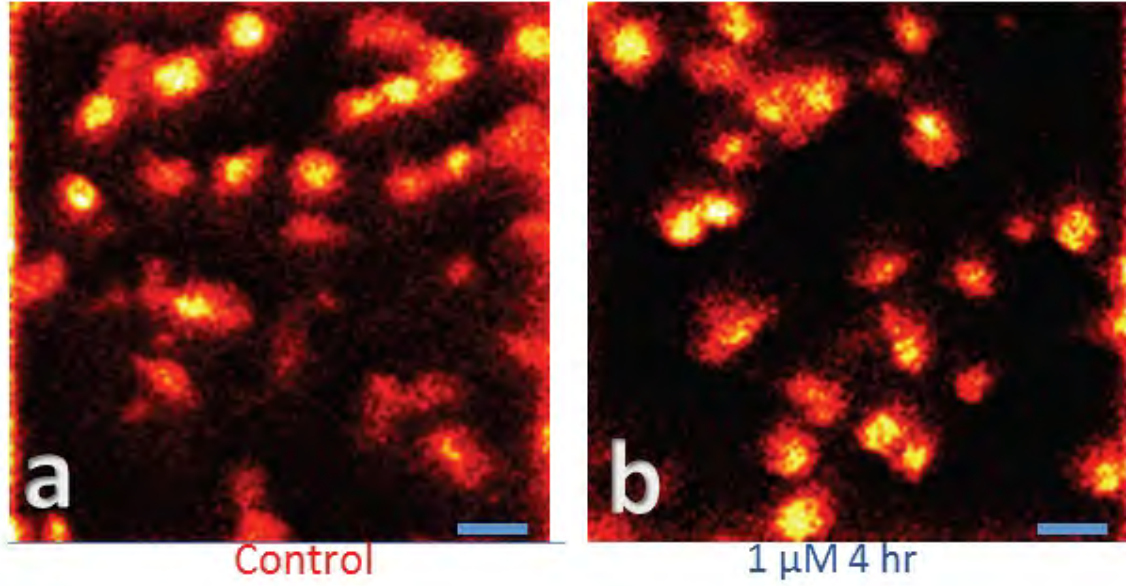
4.1.4.3. Amperometrik verilerin anlamlandırılması ve analizi

Amperometrik izler Igor Pro 6.22 yazılımı kullanılarak işlenmiştir. Akım için filtre 10 kHz seçilmiş olup pik tespiti için seçilen eşik değeri gürültünün standart sapmasının 3 katı olarak belirlenmiştir. Amperometrik izler pik dedeksiyonundan sonra dikkatlice analiz edilmiş, yanlış pozitifler manuel olarak reddedilmiştir. Tekil hücreler tarafından salınan molekül sayısı biriktirilerek her deneysel koşula ait data medyan değeri hesaplanmıştır. Yükseliş zamanı ($t_{yükseliş}$) pikin yükselen kısmının %25'i ile %75'i arasındaki zaman; Yarı pik

yüksekliindeki zaman ($t_{1/2}$); $t_{\text{düşüş}}$ pikin iniş kısmının %75'i ile %25'i arasındaki zaman olarak hesaplanmıştır. (bkz. Şekil 1). Veri setine ait ikili karşılaştırmalar Holm-Sidak metodu; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$ kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2. Bulgular

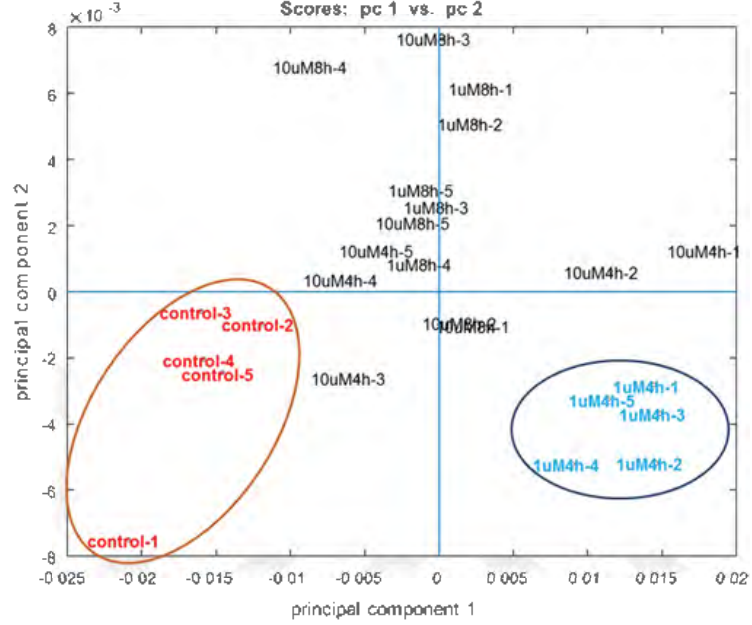
4.2.1. Görüntülemeli ikincil iyon uçuş zamanlı kütle spektrometrisi bulguları



Görsel 4.6. Kontrol 1 μM -4sa laktasistin uygulanmış kromafin hücrelerinin ToF-SIMS kimyasal imajları, m/z 885.5, PI(38:4).

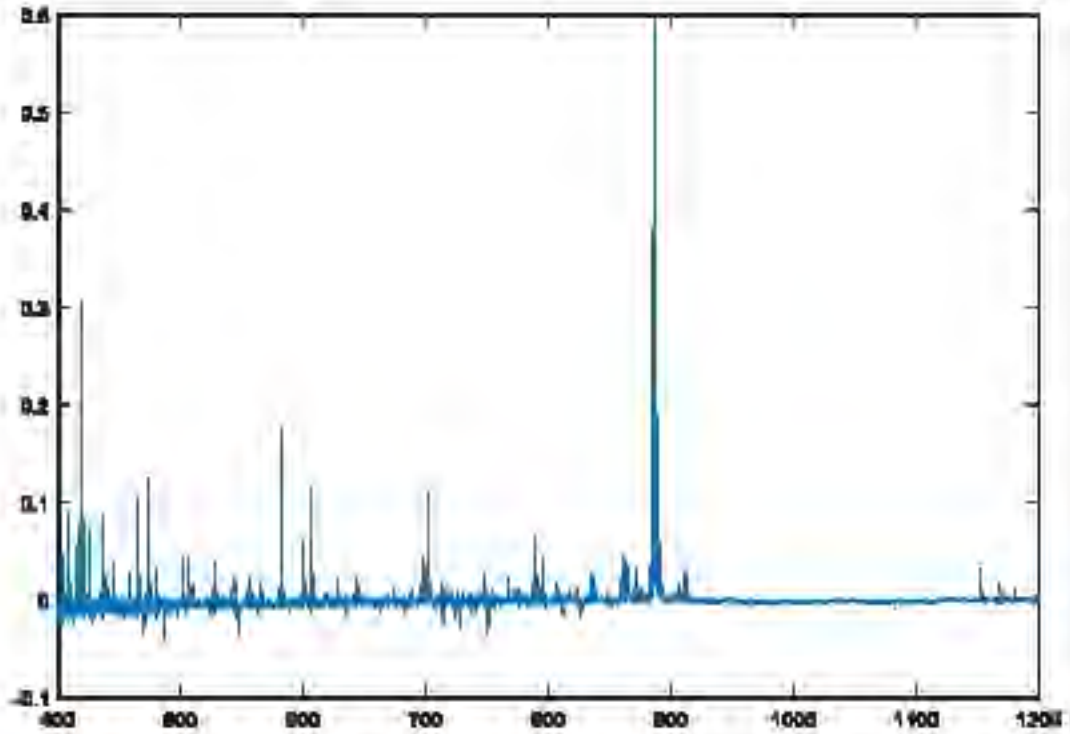
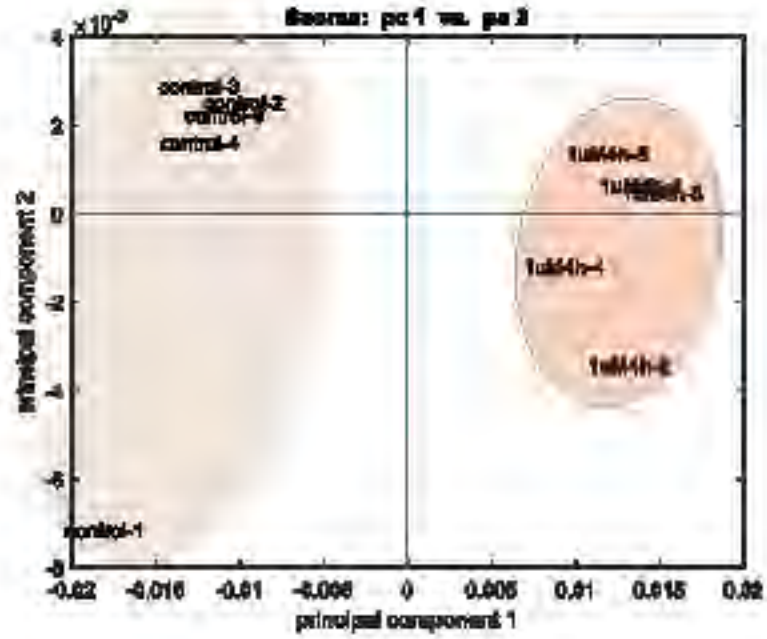
Görsel 4.6.'da görüldüğü üzere kontrol ve 1 μM -4sa laktasistin uygulanmış kromafin hücrelerinin kimyasal görselleri görüntülemeli ToF-SIMS analizleri sonucu elde edilmiştir. Hücrelere ait kimyasal imaj spektrumları toplanırken 885.5 m/z esas alınarak istenmeyen spektrumlar elimine edilmiştir.

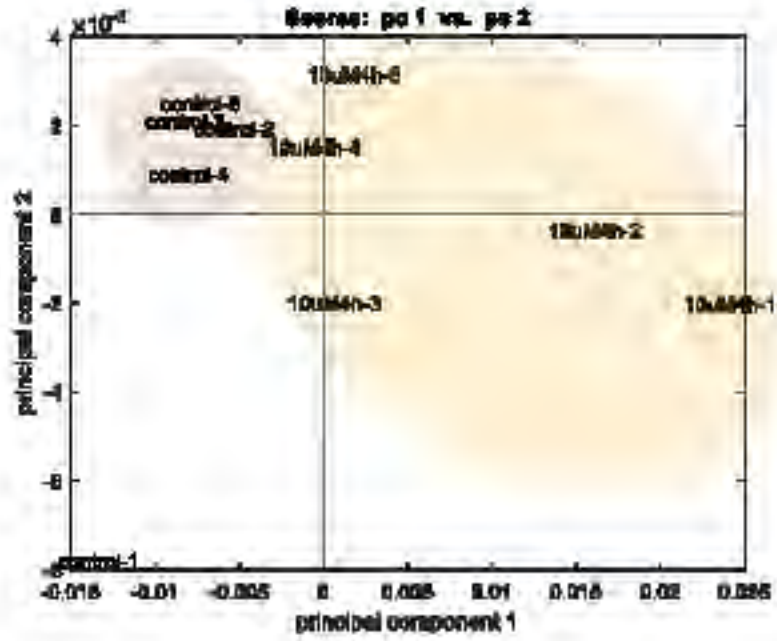
4.2.1.1. Temel bileşen analizi sonuçları



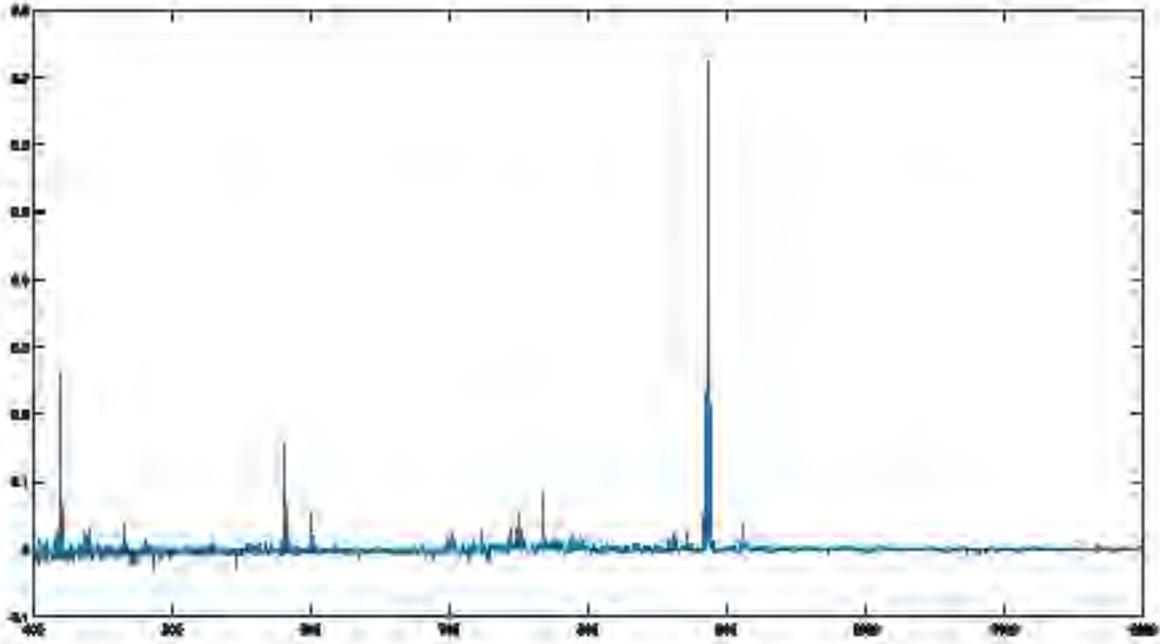
Şekil 4.3. Temel bileşen analizi sonucu kontrole karşı farklı dozlarda laktasistin uygulanmış hücrelere ait spektrumların temel bileşen-1 ve temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri.

Kontrol ve 1 μ M-4sa, 10 μ M-4sa, 1 μ M-8sa, 10 μ M-8sa dozlarında laktasistin uygulanmış kromafin hücrelerine ait iki boyutlu ToF-SIMS spektrumlarının temel bileşen analizi sonucu PC1 ve PC2 düzleminde elde edilen kümelenimleri Şekil 4.3'de verilmiştir.

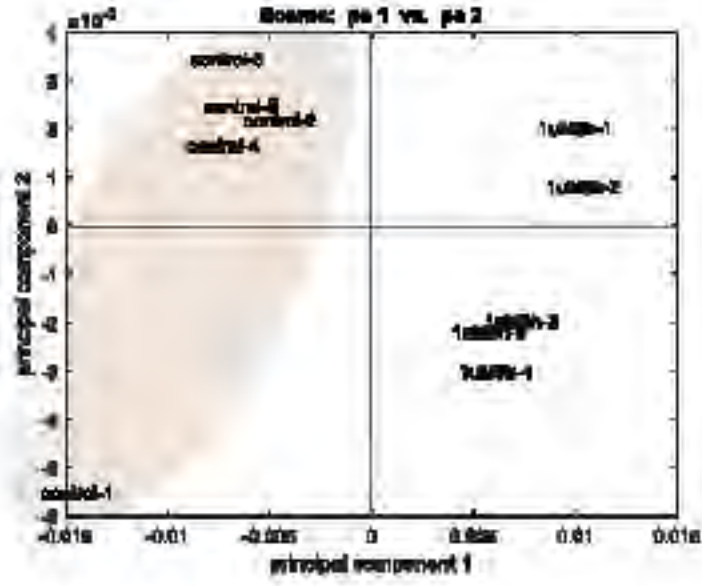




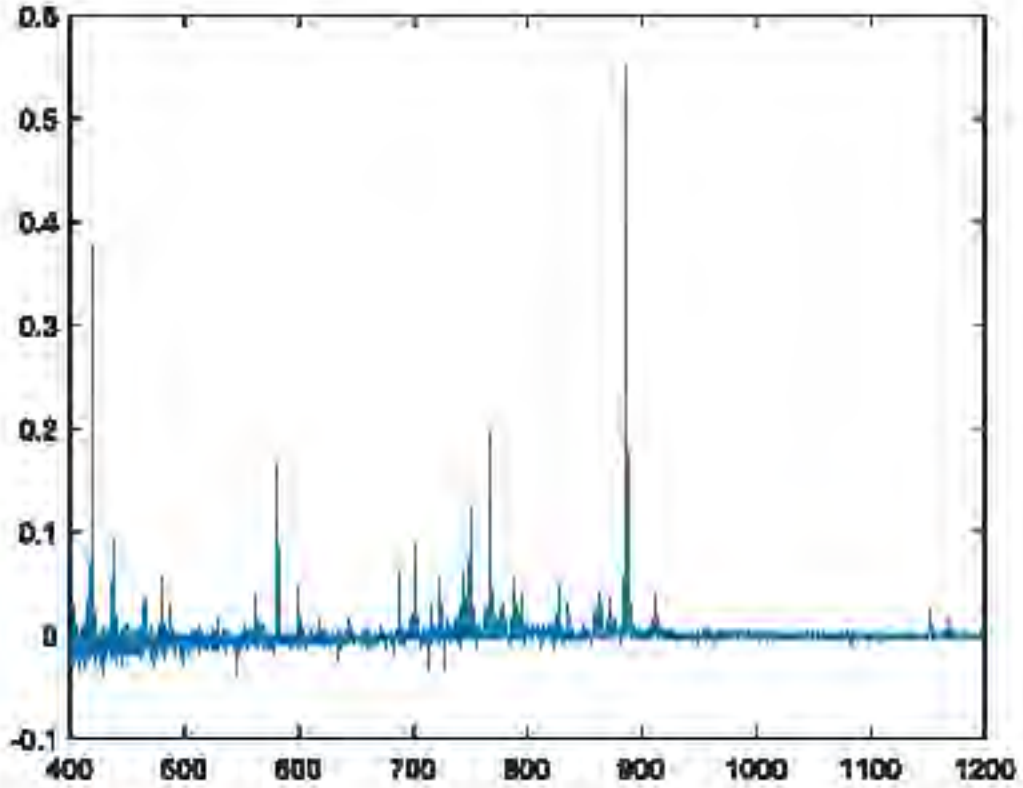
Şekil 4.6. Temel bileşen analizi sonucu kontrole karşı 10 µm-4sa laktasistin uygulanmış hücelere ait spektrumların temel bileşen-1 ve temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri.



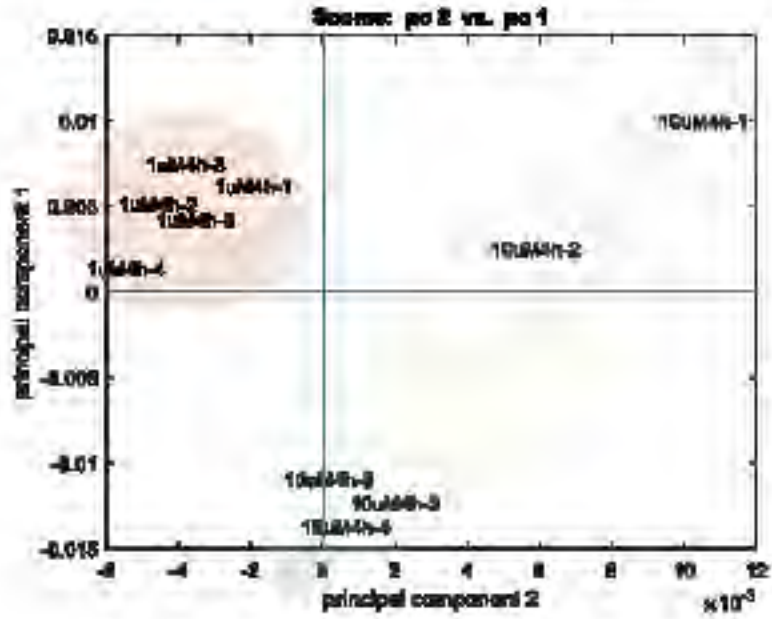
Şekil 4.7. Kontrole karşılık 10 µm-4sa laktasistin uygulanmış hücelere ait spektrumların temel bileşen-1 ağırlık düzlemine ait grafik.



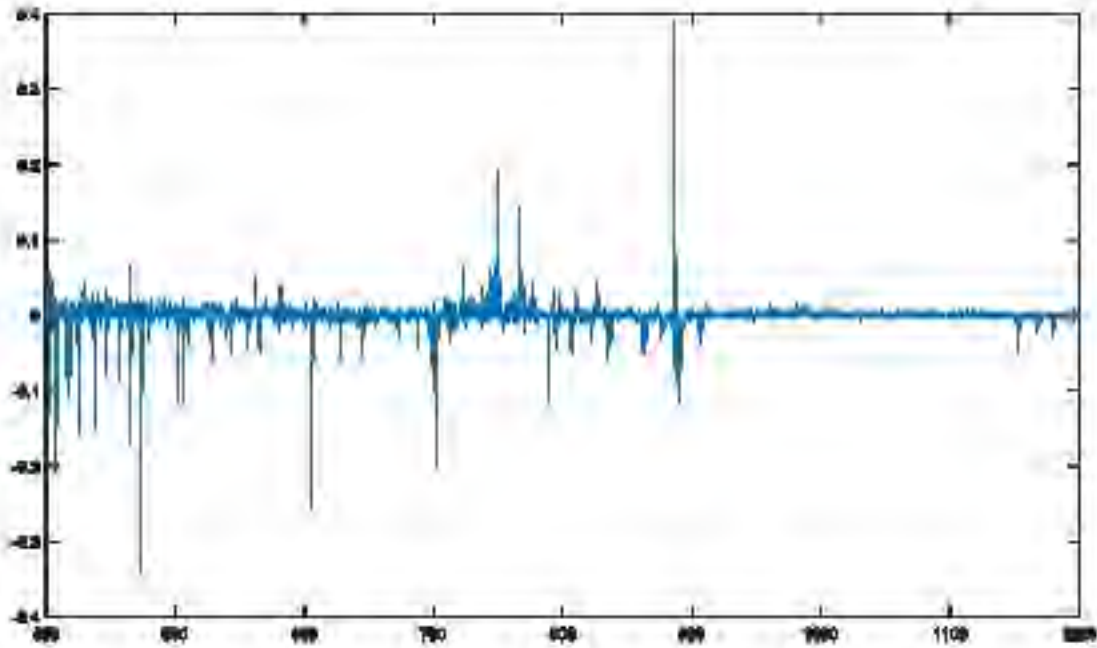
Şekil 4.8. Kontrolle karşılık $1\mu\text{-}8\text{sa}$ laktasistin uygulanmış hücrelere ait spektrumların temel bileşen-1 düzlemindeki kümelenimleri.



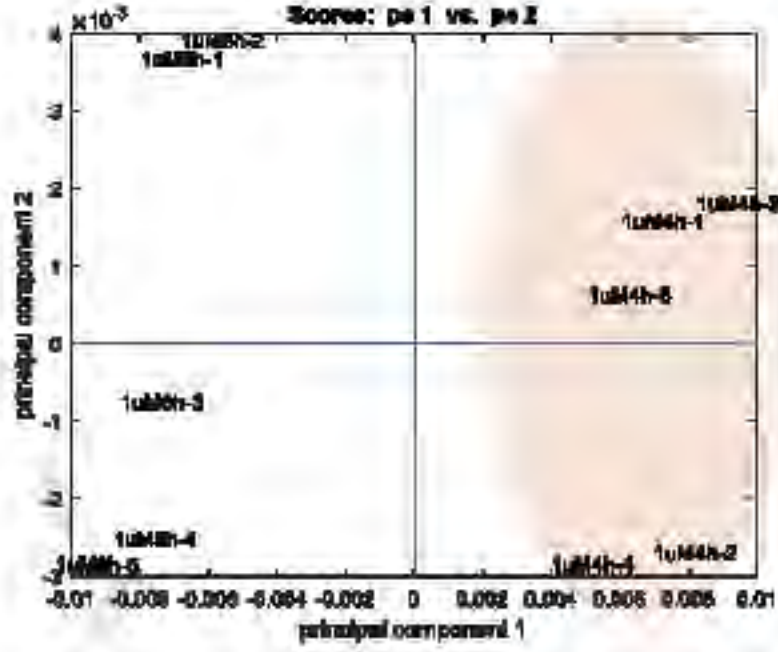
Şekil 4.9. Kontrolle karşılık $1\mu\text{-}8\text{sa}$ laktasistin uygulanmış hücrelere ait spektrumların temel bileşen-1 ağırlık düzlemine ait grafik.



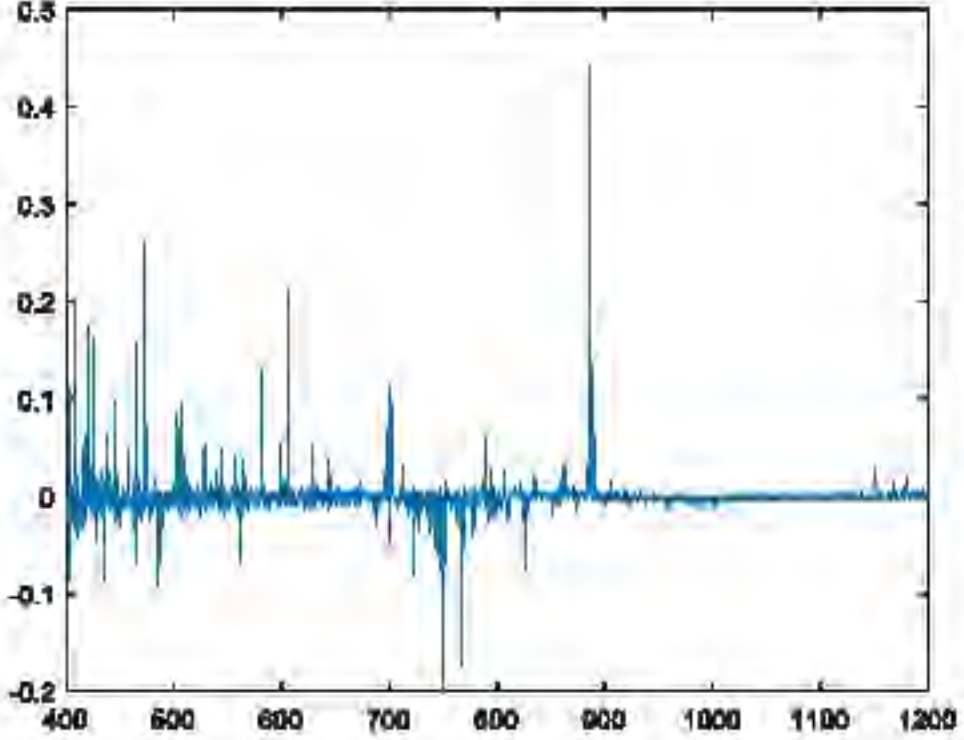
Şekil 4.10. $1\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri.



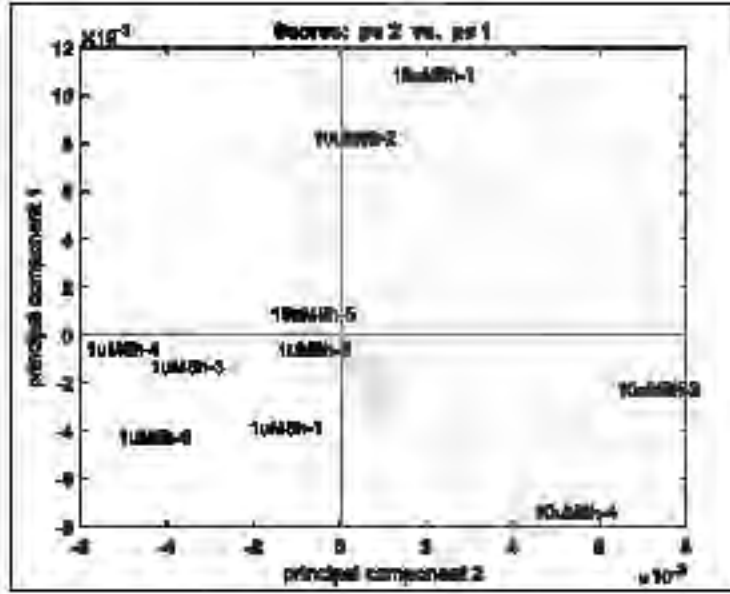
Şekil 4.11. $1\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 ağırlık düzleminde ait grafik.



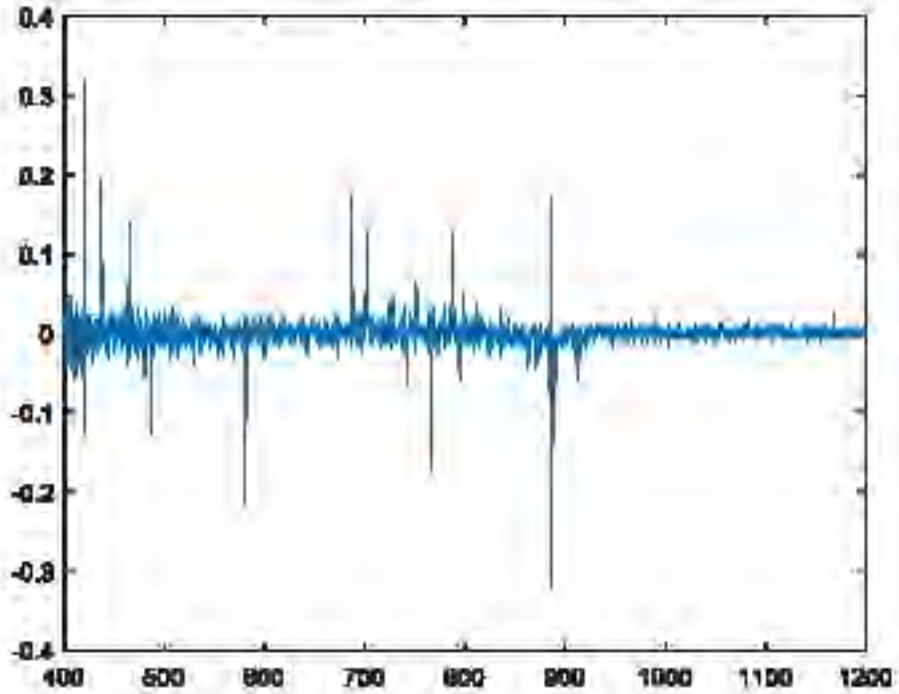
Şekil 4.12. $1\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $1\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri.



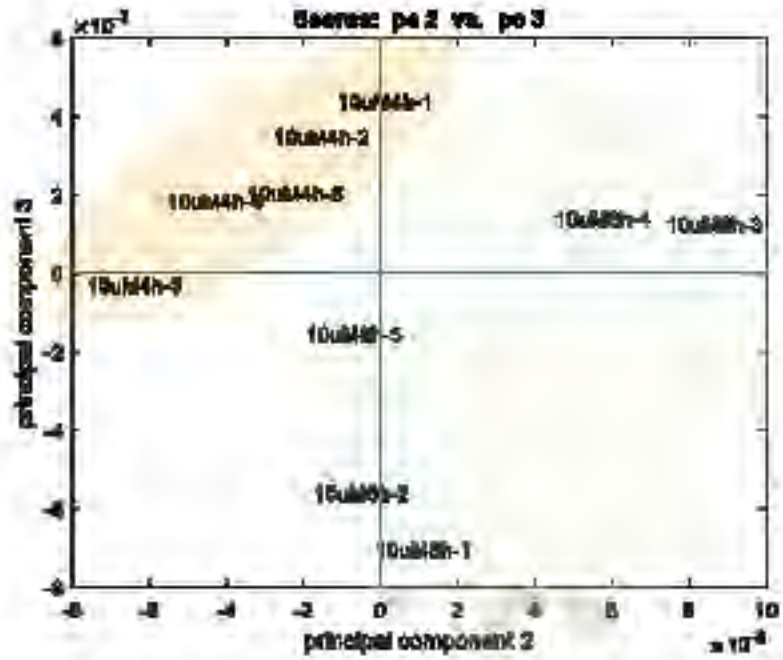
Şekil 4.13. $1\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $1\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-1 ağırlık düzleminde ait grafik.



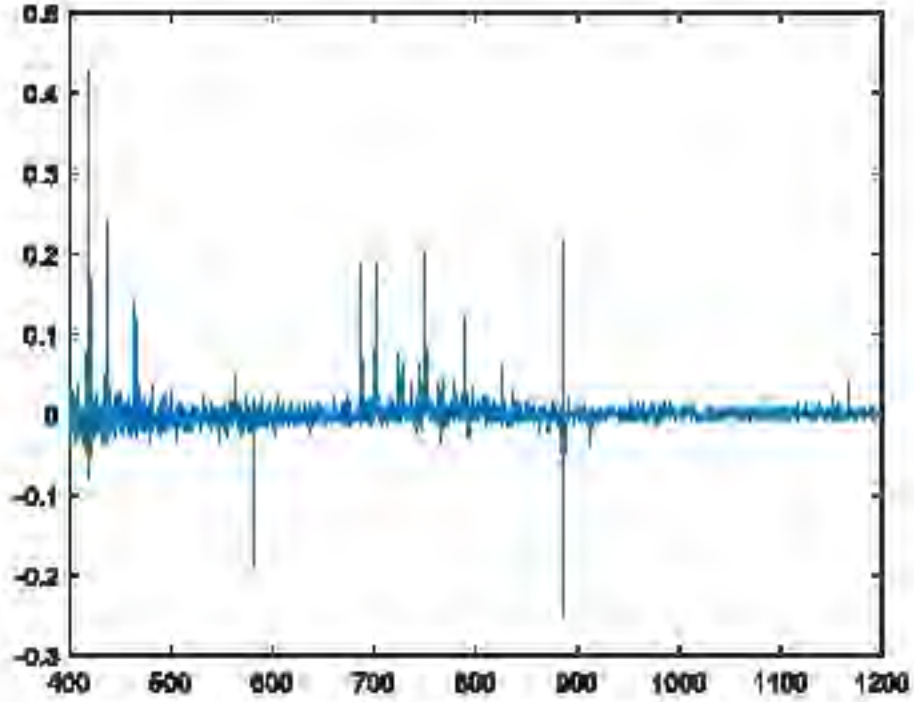
Şekil 4.14. $1\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri.



Şekil 4.15. $1\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 ağırlık düzlemine ait grafik.



Şekil 4.16. $10\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 düzlemindeki kümelenimleri.



Şekil 4.17. $10\mu\text{M}$ -4sa laktasistin uygulanan hücelere karşılık $10\mu\text{M}$ -8sa laktasistin uygulanan hücelere ait spektrumların temel bileşen-2 ağırlık düzlemine ait grafik.

4.2.1.2. LIPID-MAPS veri tabanı kullanılarak belirlenen lipidlerin listesi

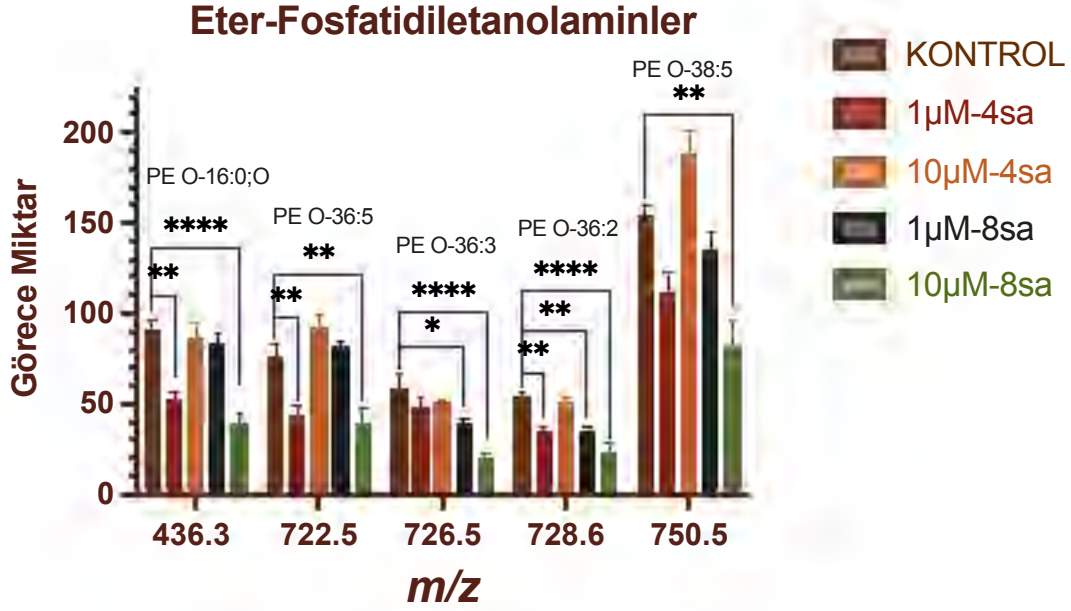
Tablo 4.1. LIPID-MAPS veri tabanı kullanılarak farklı lipidlerin atanması (Temel Bileşen Analizi sonuçlarından yola çıkılmıştır.)

Ölçülen m/z	Hesaplanan m/z	Lipid	Formül	İyon	Kütle Keskinliği / ppm
419.2544	419.2568	CPA 18:0	C ₂₁ H ₄₁ O ₆ P	[M-H]-	5.72
436.2821	436.2834	PE O-16:0;O	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	[M-H]-	2.98
437.2671	437.2674	LPA 18:0	C ₂₁ H ₄₃ O ₇ P	[M-H]-	0.69
465.2987	465.2987	LPA 20:0	C ₂₃ H ₄₇ O ₇ P	[M-H]-	0.00
480.3092	480.3096	LPE 18:0	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	[M-H]-	0.83
546.2792	546.2838	LPS 20:3	C ₂₆ H ₄₆ NO ₉ P	[M-H]-	8.42
599.3223	599.3202	LPI 18:0	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P	[M-H]-	3.50
673.4975	673.4926	PE-Cer 34:2;O3	C ₃₆ H ₇₁ N ₂ O ₇ P	[M-H]-	7.28
687.5428	687.5447	SM 34:1;O2	C ₃₉ H ₇₉ N ₂ O ₆ P	[M-CH ₃]-	2.76
695.4703	695.4657	PA 36:4	C ₃₉ H ₆₉ O ₈ P	[M-H]-	6.61
699.4998	699.4970	PA 36:2	C ₃₉ H ₇₃ O ₈ P	[M-H]-	4.00
700.5278	700.5287	PE O-34:2	C ₃₉ H ₇₆ NO ₇ P	[M-H]-	1.28
701.5172	701.5239	PE-Cer 36:2;O3	C ₃₈ H ₇₅ N ₂ O ₇ P	[M-H]-	9.55
713.5724	713.5726	TG 42:4	C ₄₅ H ₇₈ O ₆	[M-H]-	0.28
716.518	716.524	PE 34:1	C ₃₉ H ₇₆ NO ₈ P	[M-H]-	8.37
722.516	722.5130	PE O-36:5	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	[M-H]-	4.15
726.5447	726.5443	PE O-36:3	C ₄₁ H ₇₈ NO ₇ P	[M-H]-	0.55
728.5622	728.5600	PE O-36:2	C ₄₁ H ₈₀ NO ₇ P	[M-H]-	3.02
741.5931	741.5916	SM 38:2;O2	C ₄₃ H ₈₅ N ₂ O ₆ P	[M-CH ₃]-	2.02
744.5578	744.5549	PE 36:1	C ₄₁ H ₈₀ NO ₈ P	[M-H]-	3.89

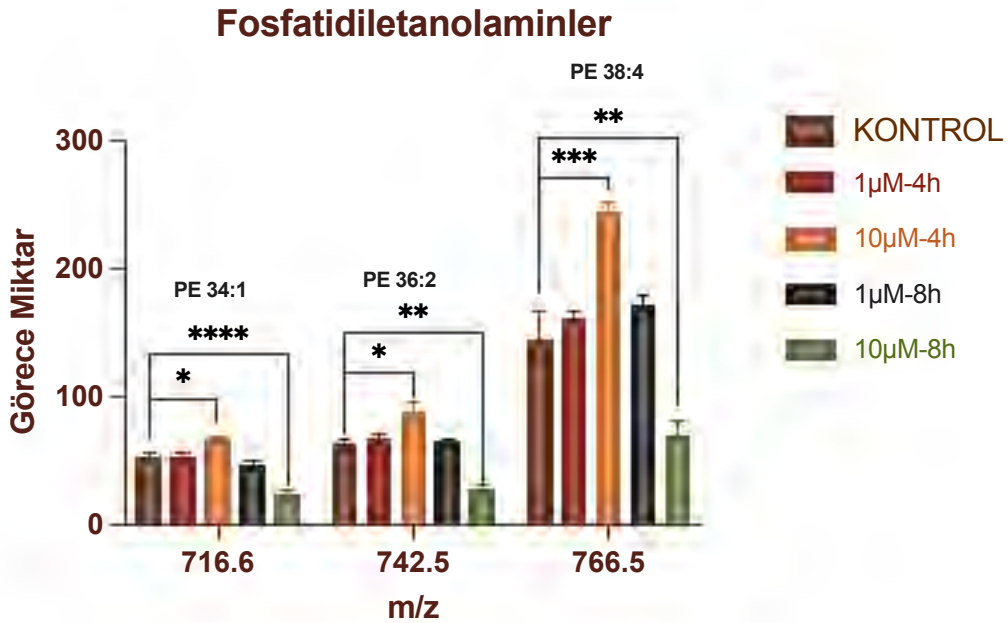
Tablo 4.1. (Devam) LIPID-MAPS veri tabanı kullanılarak farklı lipidlerin atanması (Temel Bileşen Analizi sonuçlarından yola çıkılmıştır.)

750.5430	750.5430	PE O-38:5	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	[M-H]-	0.00
766.5429	766.5392	PE 38:4	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	[M-H]-	4.83
788.5457	788.5447	PS 36:1	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₀ P	[M-H]-	1.27
790.5572	790.5604	PS 36:0	C ₄₂ H ₈₂ NO ₁₀ P	[M-H]-	4.05
806.5524	806.5553	SHexCer 36:1;O2	C ₄₂ H ₈₁ NO ₁₁ S	[M-H]-	3.60
810.5289	810.5291	PS 38:4	C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₀ P	[M-H]-	0.25
835.5352	835.5342	PI 34:1	C ₄₃ H ₈₁ O ₁₃ P	[M-H]-	1.20
857.515	857.5186	PI 36:4	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	[M-H]-	4.20
861.5516	861.5499	PI 36:2	C ₄₅ H ₈₃ O ₁₃ P	[M-H]-	1.97
863.5703	863.5655	PI 36:1	C ₄₅ H ₈₅ O ₁₃ P	[M-H]-	5.56
864.5758	864.5760	PS 42:5	C ₄₈ H ₈₄ NO ₁₀ P	[M-H]-	0.23
879.6407	879.6332	PI O-38:0	C ₄₇ H ₉₃ O ₁₂ P	[M-H]-	8.53
883.5412	883.5342	PI 38:5	C ₄₇ H ₈₁ O ₁₃ P	[M-H]-	7.92
885.5498	885.5499	PI 38:4	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	[M-H]-	0.11
886.5563	886.5604	PS 44:8	C ₅₀ H ₈₂ NO ₁₀ P	[M-H]-	4.62
887.5551	887.5655	PI 38:3	C ₄₇ H ₈₅ O ₁₃ P	[M-H]-	11.72
888.5800	888.5760	PS 44:7	C ₅₀ H ₈₄ NO ₁₀ P	[M-H]-	4.50
890.6390	890.6397	SHexCer 42:1;O2	C ₄₈ H ₉₃ NO ₁₁ S	[M-H]-	0.79
892.6110	892.6070	PS 44:5	C ₅₀ H ₈₈ NO ₁₀ P	[M-H]-	4.48
904.6123	904.6189	SHexCer 42:2;O3	C ₄₈ H ₉₁ NO ₁₂ S	[M-H]-	7.30

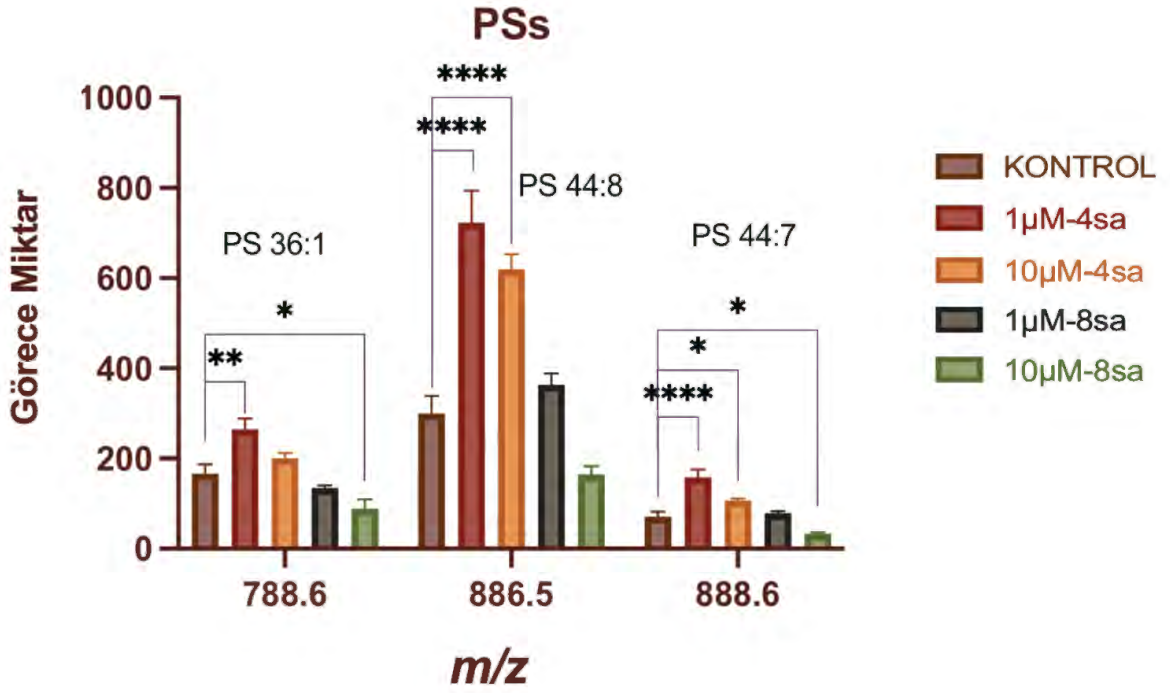
4.2.1.3. LIPID-MAPS ile atanan bazı lipid sınıfları ve türlerinin doza bağlı trendleri ve farkların kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması



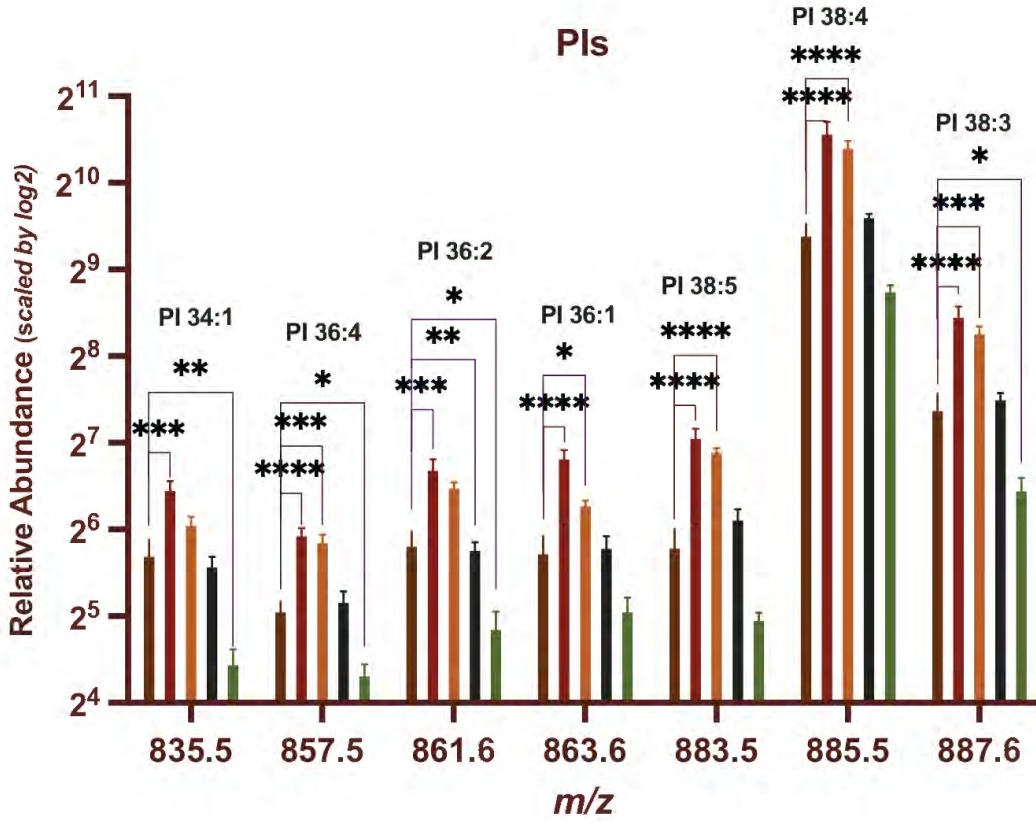
Şekil 4.18. Eter-bağlı fosfatidiletanolamin türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.



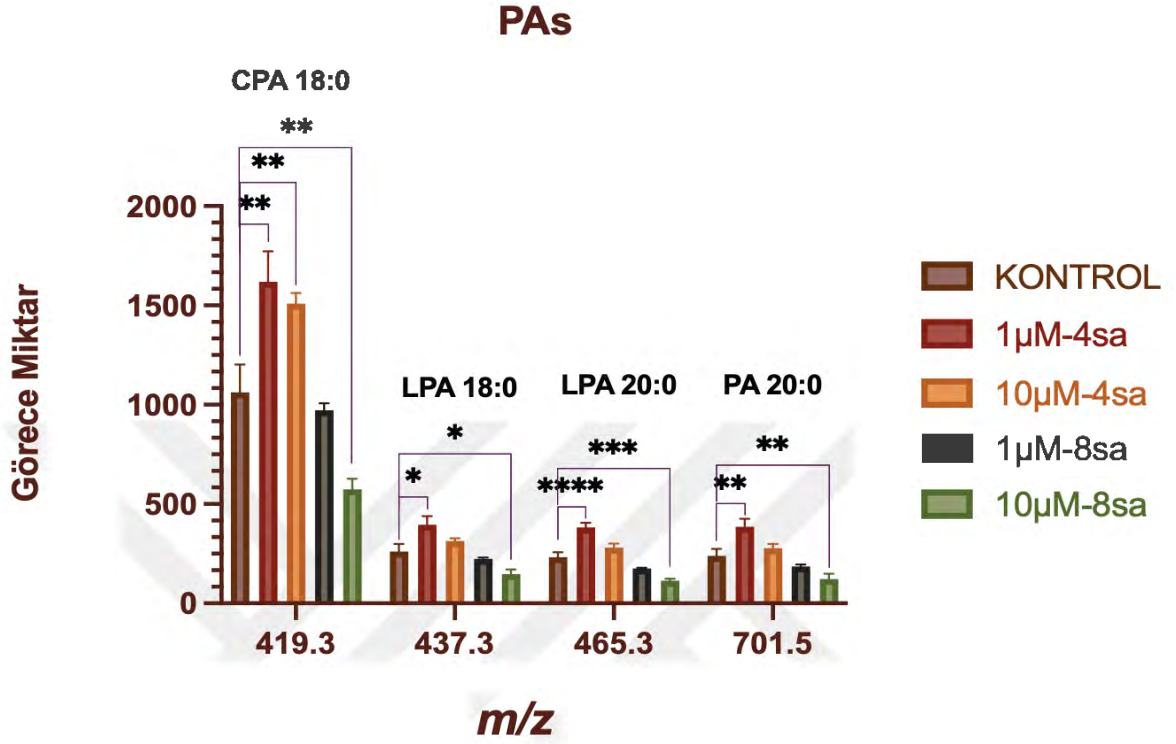
Şekil 4.19. Fosfatidiletanolamin türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.



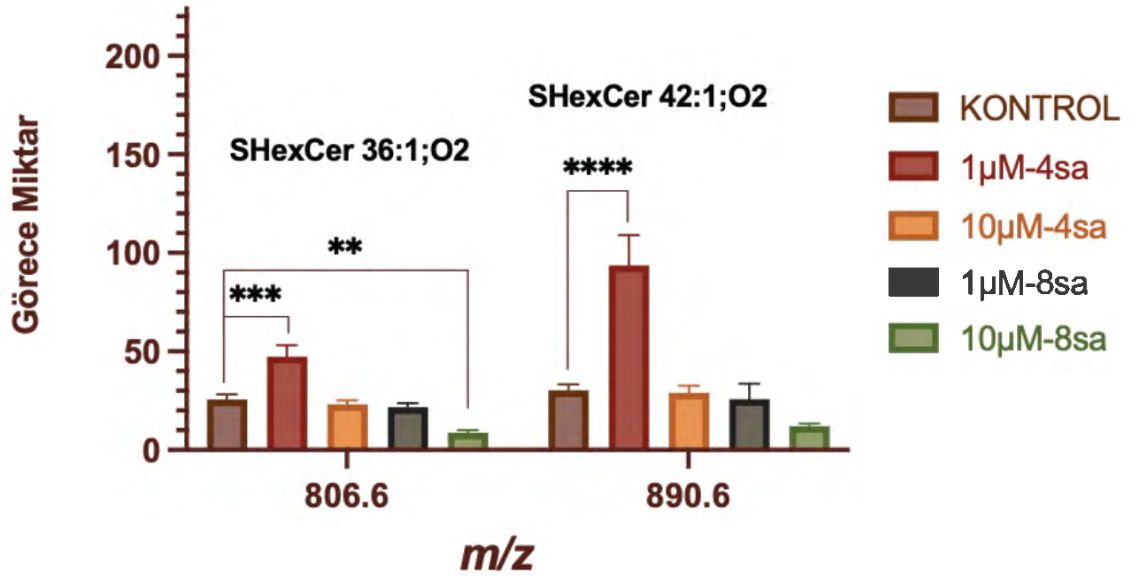
Şekil 4.20. Fosfatidilserin türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.



Şekil 4.21. Fosfatidilinositol türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.



Şekil 4.22. Fosfatidik asit türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.

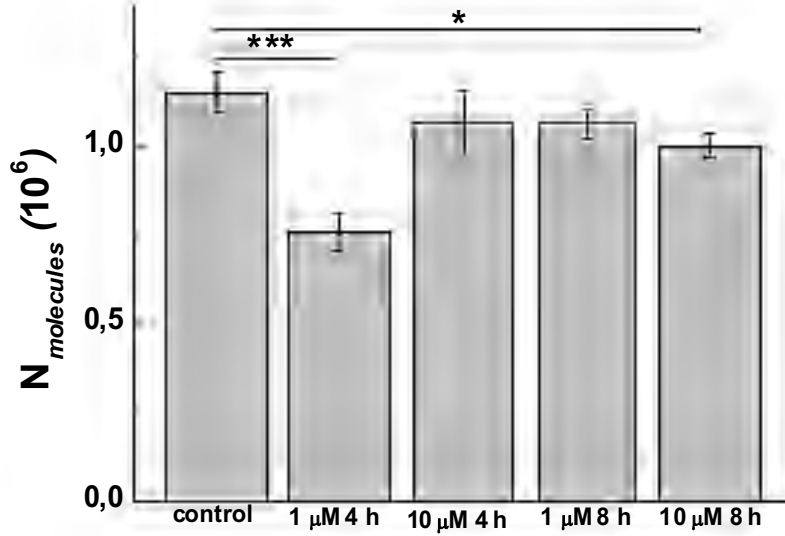


Şekil 4.23. Sfingolipid türlerinin doza bağlı trendini gösteren grafik.

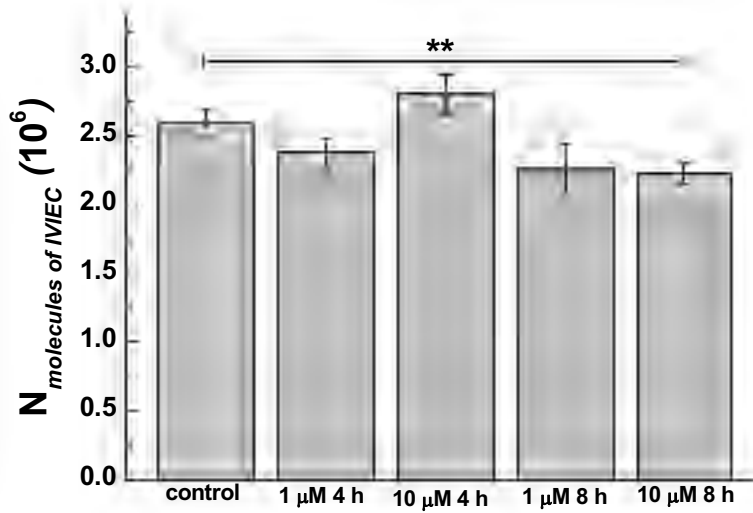
Tablo 4.2. Belirlenen lipidler ile LIPEA veri tabanı kullanılarak yapılan yolak zenginleştirme analizi sonuçları

Yolak Adı	Yolak Lipidleri	Ortaklaşan Lipid Sayısı	Ortaklaşan Lipid Yüzdesi	Ortaklaşan Lipid Listesi	p-değeri	Benjamini Düzeltmesi
Gliserofosfolipid Metabolizması	26	11	61,111	C18125, C02737, C04438, C05974, C00416, C05973, C00681, C01194, C00350, C03819, C03974	8.96527×10^{-12}	2.68958×10^{-12}
Otofaji - diğer	3	2	11,111	C01194, C00350	0,00316066	0,0316066
Glikozilfosfatidilin ositol (GPI)-cıpa biyosentezi	3	2	11,111	C01194, C00350	0,00316066	0,0316066
Ferroptoz	11	3	16.667	C21480, C21481, C21484	0,00449508	0,0337131
Otofaji - Hayvan	4	2	11,111	C01194, C00350	0,00619473	0,0371684

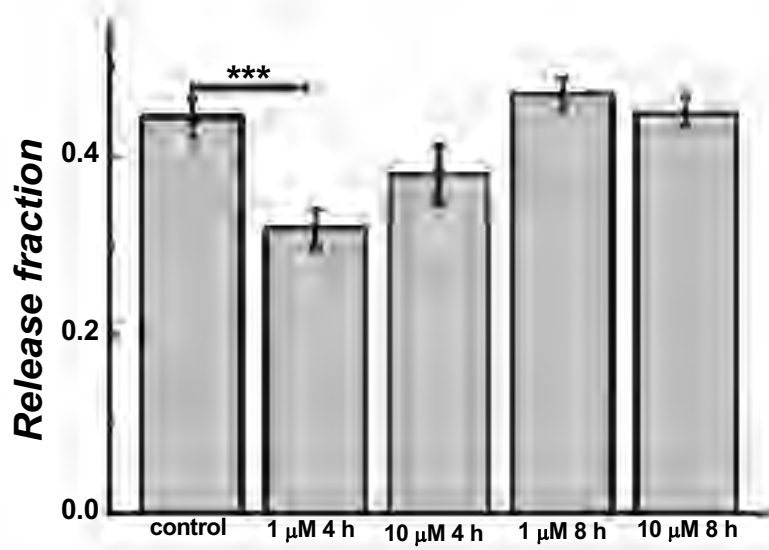
4.2.2. Laktasistin uygulanan hücrelerde doz bağımlı elektrokimyasal analiz cevapları



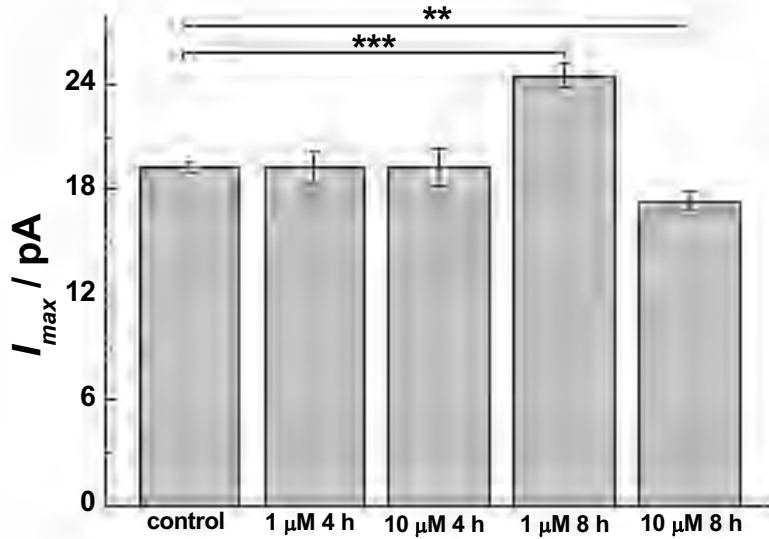
Şekil 4.24. SCA, Doza Bağılı Olarak Hücrelerden Salınan Molekül Sayısı. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K⁺).



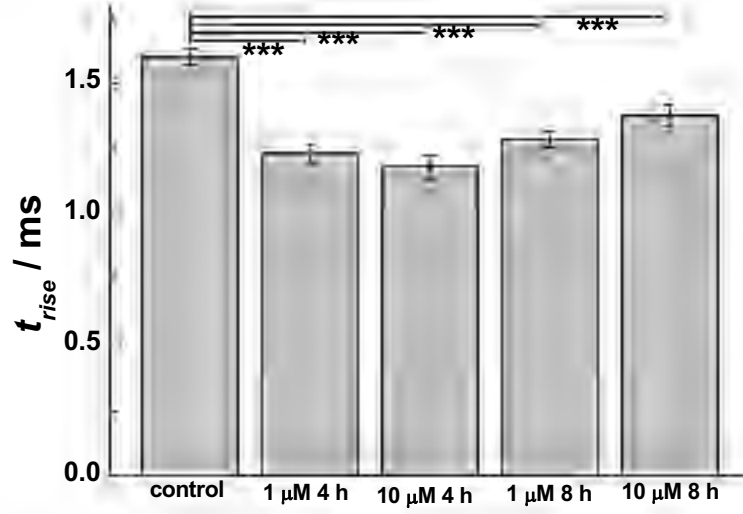
Şekil 4.25. Hücre içi Vezikül Etkili Elektrokimyasal Sitometri (IVIEC) Ölçümlerine Ait Grafik. (Hücre sayısı: 12; Hata Çubuğu: S.E.M. $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K⁺)



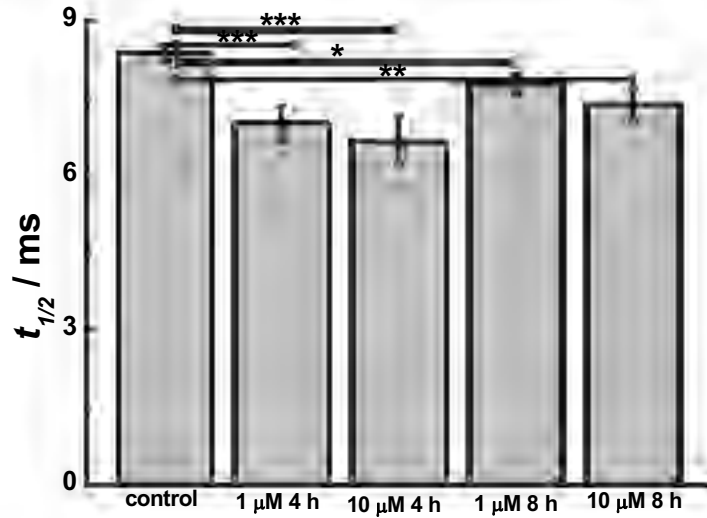
Şekil 4.26. Laktasistinin Doza Bağlı Olarak Kromafin Hücrelerinde Parçalı Salım Üzerine olan Etkileri. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)



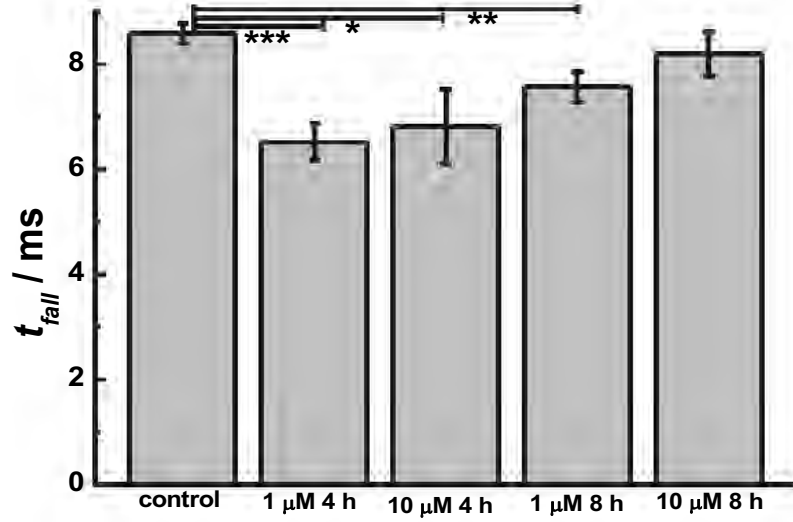
Şekil 4.27. Tekil Hücre Amperometri Sonuçlarından Elde Edilen Maksimum Pik Akım Şiddeti (I_{maks}) Değerlerinin (pA) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)



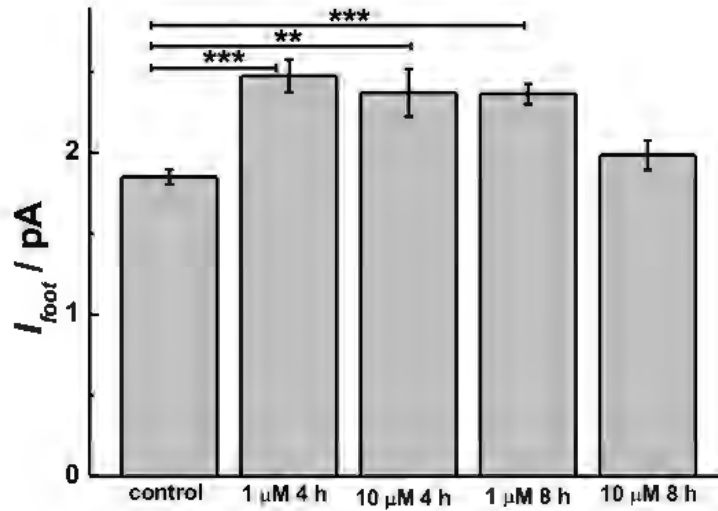
Şekil 4.28. Tekil Hücre Amperometrisi Sonuçlarından Elde Edilen Maksimum Pik Yükseliş Zamanı Değerlerinin (t_{rise} / ms) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)



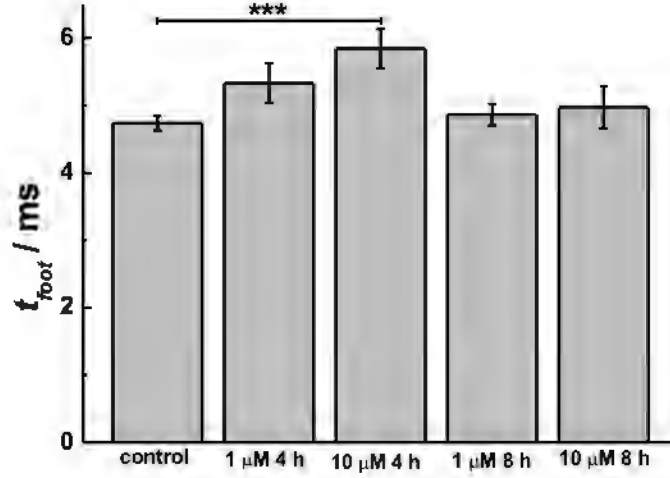
Şekil 4.29. Tekil Hücre Amperometrisi Sonuçlarından Elde Edilen Maksimum Pik Yarı Yükseklik Zamanı Değerlerinin ($t_{1/2} / ms$) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)



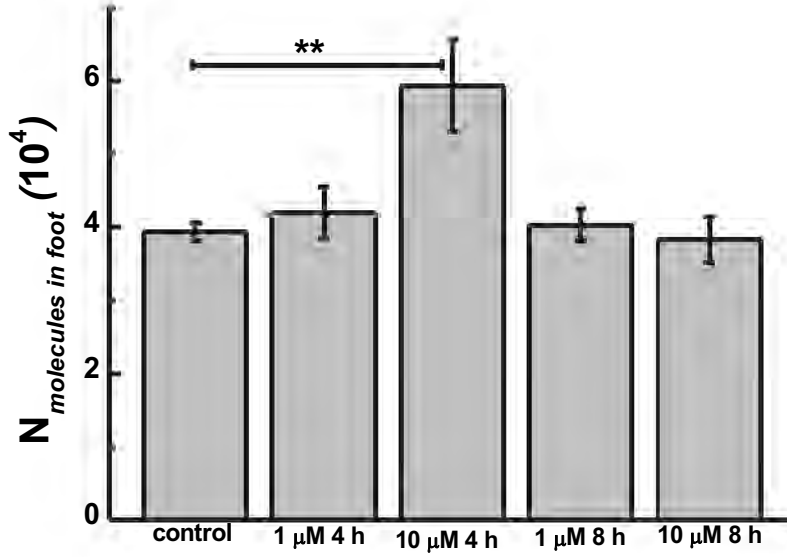
Şekil 4.30. Tekil Hücre Amperometrisi Sonuçlarından Elde Edilen Maksimum Pik Düşüş Zamanı Değerlerinin (t_{fall} / ms) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $P < 0.05$, *; $P < 0.01$, **; $P < 0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)



Şekil 4.31. Tekil Hücre Amperometrisi Sonucu Elde Edilen Maksimum Ön-Pik Ayağı Akım Şiddeti Değerlerinin (I_{foot} / pA) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)



Şekil 4.32. Tekil Hücre Amperometrisi Sonucu Elde Edilen Maksimum Ön-Pik Ayağı Maksimum Pik Yarı Yükseklik Zamanı Değerlerinin (t_{foot} / ms) Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)



Şekil 4.33. Tekil Hücre Amperometrisi Sonucu Elde Edilen Ön-Pik Ayağı Süresince Salınan Molekül Sayılarının Karşılaştırılması. (Hücre sayısı: 30; Hata Çubuğu: S.E.M. $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***; Stimülasyon Solüsyonu: 30 mM K^+)

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Tartışma

Bu tez çalışmasında bir proteazomal inhibitör olan *laktasistin*'in nöronal model olarak kullanılan kromafin hücrelerinde nöroekzositoz olayı ve membran lipidleri üzerindeki doz bağımlı etkileri nörodejenerasyon kapsamında analiz edilmiştir. Bunun için özgün analitik yöntemler kullanılmış olup bunlar; görüntülemeli ikincil iyon kütle spektrometrisi, SCA ve IVIEC'dir. Bu yöntemler aynı partide toplanan izole edilen hücrelerde aynı koşullarda aynı dozlarda *laktasistin* uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Bu yolla proteazomal inhibisyonun hem membran lipidomu üzerindeki etkisi hem nöroekzositoz üzerindeki etkisi hem de membran lipidomu ile nöroekzositoz olaylarının paralel olarak etkilenimleri nörodejenerasyon açısından değerlendirilmiştir.

Görüntülemeli ikincil iyon kütle spektrometrisi yönteminde örnek hazırlama basamağı en çok da yüzey kontaminasyonunu minimuma indirmek açısından son derece kritik olduğundan bu çalışmada farklı örnek hazırlama yöntemleri denenmiş olup sinyal ve stabilite bakımından en uygun olan örnek hazırlama yöntemi optimize edilmiştir. İlk olarak İndiyum Kalay Oksit yüzey yerine hücrelerin tutunabilmesi için silikon levhalar kullanılmıştır ancak yüksek sinyal veren kontaminasyon piklerinin yüzey kaynaklı olması ve bu sinyallerin diğer iyonları baskılaması nedeni ile indiyum kalay oksit yüzey tercih edilmiştir. Örnek hazırlama ile ilgili bir diğer önemli basamak ise hücrelerin analiz öncesi dondurulması ve kurutulması aşamasıdır. Bu aşamanın hem hücrelerin zarar görmeyeceği hem lipid migrasyonunun ve havadan gelen kontaminasyonun minimum olacağı koşullarda yapılması gerekmektedir. Örnekler önce doğrudan sıvı nitrojen kullanılarak dondurulmuş ancak bu aşamanın hücrelere zarar verdiği gözlenmiştir. Oysa hücrelerin olabildiğince hızlı dondurulması, içindeki suyun kristalleşerek hücrelerin bütünlüğünü bozma riski açısından elzemdir. Bu nedenle alternatif bir yöntem olarak sıvı nitrojen içerisinde soğutulmuş olan izopentan çözeltisi içerisinde hücrelerin donması sağlanmıştır. Bu örnek hazırlama basamağı uygulanarak kontaminasyon pikleri elimine edilmiştir.

Görüntülemeli ikincil iyon uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (ToF-SIMS Imaging) ile yapılan analiz sonucunda hücrelerin intakt yapıda olduğu, elde edilen kimyasal imajlar

Görsel 4.6. incelenerek belirlenmiştir. Negatif iyon modunda yapılan analiz sonucu elde edilen spektrumlar, doz farklılıklarına göre temel bileşen analizi ile karşılaştırılmış ve Şekil 4.3 'de görüldüğü üzere kümelenmişlerdir. PC1 kontrol hücreleri ile 1 μ M-4sa *laktasistin* uygulanan hücreler arasındaki ayrımı net bir şekilde göstermektedir. Tüm dozlar değerlendirildiğinde bunların içerisinde (PC1 ile kümelendikleri için) varyansı en büyük olan iki grubun kontrol ve 1 μ M-4sa olduğunu söylemek mümkündür. Buna rağmen temel bileşen-2 eksenini incelenecek olursa görece olarak yüksek dozlarda (1 μ M 8 sa, 10 μ M 4sa & 8 sa) bu farkın azaldığı görülmekte, bu bileşen yüksek doz uygulananın düşük doz ve kontrole göre varyansı hakkında bilgi sağlamaktadır.

Farklanan kütlelerin belirlenmesi işlemi öncelikle Şekil 4.3'de skor grafiği gösterilen analizin temel bileşen 1 ve temel bileşen 2'ye ait ağırlık grafikleri kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra özellikle doz gruplarının birbirine ve kontrole göre durumlarını daha net görebilmek ve spesifik olarak hangi kütlelerin fark yarattığını belirleyebilmek için PCA ikili durumlara göre de gerçekleştirilmiş bunların ağırlıklı grafikleri de incelenmiştir (Şekil 4.4-4.17).

Temel bileşen analizleri sonucu ortaya çıkan ağırlık grafiklerinden elde edilen kütlelere ait liste tablo 4.1'de verilmiştir. Elde edilen kütlelere karşılık gelen lipid türleri kullanılan cihazın standart örneklerine ait kütle doğruluğu (mass accuracy) değerlerinden yola çıkılarak (1-5 ppm) LIPID-MAPS veri tabanından atanmıştır [54]. Atanan bazı lipid sınıflarına ait lipid türleri tek-yönlü ANOVA ve Holm-Sidak ikili karşılaştırma yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$). Buna göre PE-O (Şekil 4.18), PE (Şekil 4.19), PS (Şekil 4.20), PI (Şekil 4.21), PA (Şekil 4.22), sfingolipid (Şekil 4.23), sınıflarına ait lipid türlerinin kendi içerisinde *laktasistin* dozuna bağlı olarak benzer bir eğilim gösterdiği görülmektedir. Bunun yanında PS, PI ve PA gibi anyonik lipid sınıflarının farklı *laktasistin* dozları ile de benzer bir eğilim grafiği gösterdiği dikkat çekmiştir.

Bulunan lipid türlerinin hangi biyolojik yollar ile ilişkili olabileceğini manuel olarak bulunan literatür bilgisinin haricinde de belirleyebilmek amacı ile yolak zenginleştirme çalışması LIPEA web aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [55]. Tablo 4.2'de görüldüğü üzere; bu tez çalışmasında bulunan lipid türleri, KEGG insan lipid veritabanı referans seçilerek yolak analizine tabi tutulmuş olup analiz sonucunda gliserofosfolipid

metabolizması, otofaji, GPI-çıpa biyosentezi, ve ferroptosis yolları anlamlı olarak zenginleşmiş, anlamlılık düzeyi Benjamini düzeltilmesi ile $p < 0.05$ olarak bulunmuştur. Ferroptoz yolağında farklı lipidler PE sınıfına ait olup, otofaji yolağında ise PI ve PE türleri birlikte yer almıştır.

Seçilen lipid sınıflarına ait bar grafiklerinden (Şekil 4.18-4.23) görülebileceği üzere doza bağlı *laktasistin* uygulaması doğrusal bir eğilim grafiği göstermemiştir. Doz artışına karşılık gözlenen böyle bir dalgalanma önceden proteazomal inhibitörler ile yapılmış bazı çalışmalarda belirtilmiş bir fenomen ile açıklanabilir. Buna göre proteazomal inhibitörler ile muamele edilen hücrelerin belli bir doz aralığında ilacın etkilerini kompanse ettiği düşünülmektedir. Bu çalışmalardan birine göre 24 saat boyunca 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM konsantrasyonlarında *laktasistin* uygulanmış kolinerjik hücrelerde 5 μM grubunun diğer gruplara göre daha fazla oksidatif stres gösterdiği yüksek konsantrasyonlarda ise (10 μM & 20 μM) çözünen veya çözünmeyen proteinlerin birikiminin arttığı görülmüştür [56]. Suh ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise MG132 proteazomal inhibitörü murin kortikal hücrelerine uygulanmış 0.1 μM nöronal apoptozu başlatırken görece yüksek dozlar (1-10 μM) ilginç bir biçimde programlı hücre ölümünü azaltmıştır [57].

Fosfatidiletanolaminler memeli hücrelerinde en çok bulunan fosfolipid sınıflarından biridir. Şekil 3.18 incelendiğinde 10 μM -4sa *lactacystin* uygulanan hücrelerde PE miktarında kontrol hücrelere göre anlamlı bir yükseliş gözlenirken 10 μM -8sa dozu uygulananlarda anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Yapılan bir çalışma da Parkinson hastalığı seyrinde PE türlerinde düşüş olduğunu bildirmiştir [58]. Bu tez çalışmasında görece olarak yüksek dozda *laktasistin*in kromafin hücre membranının PE türlerinde düşüklüğe yol açması da proteazom sisteminin inhibisyonunun belli bir seviyeden sonra nörodejenerasyon üzerindeki olumsuz etkilerini destekler niteliktedir. Diğer taraftan 10 μM -4sa *laktasistin*in PE konsantrasyonunda artışa neden oluşu ise kromafin hücrelerinde proteazomal inhibisyonun terapötik etki penceresi hakkında ipucu vermektedir.

Şekil 4.18 ve Şekil 4.19 karşılaştırıldığında eter-bağlı fosfatidiletanolaminlerin (PE-O) fosfatidiletanolaminlere (PE) göre doza bağlı cevaplarının farklılık gösterdiği görülmektedir. PE-O lipid sınıfı alkil-açilfosfolipidler ve plazmalojenler olarak da adlandırılan alkenil-

açılış fosfolipid türlerini kapsar. Etanolamin plazmalojenler gliserofosfolipidlerin önemli bir alt sınıfıdır ve gliserol iskeleti üzerinde *sn-1* pozisyonunda bir vinil eter bağlı olması ile karakterize edilirler. Plazmalojen lipidler memeli hücrelerinde görece olarak alkil-açıl fosfolipidlere göre daha fazla bulunur. Dolayısıyla bu tez çalışmasında *laktasistin* uygulaması ile farklandığı tespit edilen eter-lipidlerin büyük olasılıkla etanolamin plazmalojenler olduğu düşünülebilir. Plazmalojen etanolaminler nöronal dokularda yüksek bulunurluğa sahip olup oksidatif stres koşullarına karşı dayanıksızdırlar [59]. Şekil 4.18'de görüldüğü üzere 1 μM -4sa (kırmızı) ve 10 μM -8sa (yeşil) *laktasistin* dozu ile kromafin hücrelerinde PE-O düzeyleri anlamlı düzeyde düşmüştür. Ancak, önce açıklanan fenomenle uyumlu olarak [57] 10 μM -4 sa, *laktasistin* 1 μM -4sa ve 10 μM -8sa dozlarının aksine ters yönde hareket ederek gözle görülür bir yükseliş göstermiştir. Hücredeki bu kompensasyon durumunun bir defans mekanizmasından kaynaklanıyor olması muhtemeldir. Özellikle optimal dozlarda uygulanan proteazomal inhibitörlerin, ısı şok proteinleri (ing. HSP) gibi moleküler şaperonları harekete geçirdiği ve oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyon gibi stres koşulları altında hücre koruyucu etkilere neden olduğu bildirilmiştir [60].

PS, PI ve PA türlerinin *laktasistin* farklı dozlarına göre verdiği yanıtlar Şekil 4.20-4.22'de sırası ile incelendiğinde; bu membran lipid sınıflarının benzer cevaplar verdiği görülmektedir. 1 μM -4sa *laktasistin* dozu (kırmızı) bu lipidlerin miktarını önemli ölçüde yükseltirken 10 μM -4sa dozundan itibaren lipid miktarları düşüş eğilimi göstermiştir. En yüksek doz olan 10 μM -8sa (yeşil) grubunda ise kontrole göre lipid bulunurluğunun anlamlı derecede düştüğü en çok da PI türlerinde belirgin olarak görülmüştür. Parkin-mutant fibroblastlar ile parkinson hastalığının erken dönemlerinin modellendiği bir çalışmada gangliyosit, fosfatidilinositol ve fosfatidilserin türlerinde yükselme tespit edilmiş bu durum otofaji ve mitokondriyel devir-daim mekanizmalarındaki bozulma ile ilişkilendirilmiştir [61]. Otofaji ve UPS klirens sistemlerinin birbiri ile ilişkili sistemler olduğu bu sistemlerin birbirlerinin hedef moleküllerini karşılıklı olarak etkiledikleri yapılan çalışmalarla bildirilmiştir [62]. Bunun yanı sıra PS, PI ve PA sınıflarına ait türler membran kıvrımlanma mekanizmalarını farklı şekillerde etkileyen şekillere (sırasıyla ; ters-konik, silindirik, silindirik) sahip olmalarına rağmen bunların her biri anyonik baş gruplarına sahiptir. Bu nedenle negatif yüke sahip olan bu türler sinaptotagmin gibi kalsiyum bağlayan proteinler ile

etkileşime girerek membran akışkanlığına ve sinaptik füzyon olaylarına katkıda bulunmaktadır [17]. Belirli PI türlerinin plazma membranında negatif yüklü kümeler meydana getirerek pozitif yüklü fonksiyonel proteinlerle etkileştiği ve bu durumun da iyon kanallarının regülasyonundan sorumlu olduğu bildirilmiştir [63].

SCA yüksek temporal çözünürlüklü kulometrik bir yöntem olup karbon mikroelektrotların kullanımı ile ekzositoz olayı sırasında salınan katekolamin miktarının analiz edilebilmesini olanaklı kılar. Ekzositoz esnasında bu yöntem ile elde edilen pikler, füzyon poru stabilitesi ve kinetiği hakkında da bilgi verir. IVIEC ise *in situ* veziküler elektroaktif türlerin ölçülmesini sağlayan özgün bir yöntemdir [64, 65]. Bu tez çalışmasında SCA ve IVIEC yöntemleri birlikte uygulanmış ve bunlar görüntülemeli ToF-SIMS analizleri ile paralel olarak gerçekleştirilmiştir. SCA analizleri sonucu salınan elektroaktif türlerin kontrol hücrelerinde ve farklı dozlarda *laktasistin* uygulanmış kromafin hücrelerindeki miktarını Şekil 4.24'de incelemek mümkündür. Aynı şekilde *in situ* elektroaktif türlerin miktarları için yapılan IVIEC sonuçları Şekil 4.25'de verilmiştir. Hücrelere 1 μM -4sa ve 10 μM -8sa *laktasistin* uygulandığında hücrelerden salınan katekolamin miktarında azalma olduğu görülmektedir. SCA analizi ile bulunan molekül sayısını hücre içi veziküler salım miktarına oranlayarak her bir ekzositotik olayda salınan nörotransmitter fraksiyonunu hesaplamak mümkündür. Bu salım fraksiyonuna ait bar grafiği Şekil 4.26'de görülebilir. Buna göre 1 μM -4h *laktasistin*'in, salım fraksiyonunu anlamlı şekilde düşürdüğü görülmektedir. Ancak, ilginç biçimde tüm *laktasistin* dozlarının ekzositoz olayının zamansal olaylarını, hem pik yükseliş zamanı, $t_{\text{yükseliş}}$, (Şekil 4.28), hem yarı yükseklik zamanı, $t_{1/2}$, (Şekil 4.29), hem de pik düşüş zamanı, $t_{\text{düşüş}}$, (Şekil 4.30) olarak kısalttığı görülmüştür. Özellikle de 10 μM -4h (turuncu) dozunun ekzositoz olayının $t_{1/2}$ süresinin düşmesinde en yüksek etkiye sahip olduğu ancak bu dozda salınan molekül sayısı sabit kaldığından (Şekil 4.24) *laktasistin*'in ilgili dozda daha kısa sürede aynı miktar salıma neden olduğu söylenebilir. Buna rağmen saniyedeki maksimum molekül veya yük akışımı gösteren I_{max} değeri (Şekil 4.27) yalnızca 1 μM -8sa *laktasistin* dozu ile artmış 10 μM -8h uygulaması ile ise azalmıştır.

Füzyon por oluşumu hakkında bilgi sahibi olmak nöroekzositoz dinamiklerini anlamak açısından önemli olup bu durum nörotransmitter salımından kaynaklanan hücre sel sinyal akış

mekanizmaları ile doğrudan ilişkilidir. Füzyon olayı oldukça karmaşık bir sistem tarafından ana olarak SNARE kompleks oluşturan işlevsel proteinler ile kontrol edilir [66]. Proteazomal inhibisyonu gibi protein kalite-kontrol mekanizmalarında meydana gelebilecek değişikliklerin bu fonksiyonel proteinlerin miktarında ve devir daiminde etkili olabileceği şaşırtıcı değildir. *Sharma* ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada SNARE-bağımlı olarak hem *in vivo* (CSP α -eksik fare modeli) hem de *in vitro* (kortikal nöronlar) nörodejenerasyon modellerinde *laktasistin* 10 μ M-36sa kullanılmış nörodejenerasyonda iyileşme saptanmıştır. Çalışmaya göre proteazomal inhibisyonun terapötik etkileri hem SNARE kompleks proteinlerinde (SNAP-25, sintaksin-1 and sinaptobrevin-2) hem de Hsp90, Bip ve HSF-1 gibi stres-cevap proteinleri üzerinde görülmüştür [21]. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında 10 μ M-4sa *laktasistin* uygulanan hücrelerde görülen hızlı ekzositoz olayını, füzyon poru oluşumunu gerçekleştiren proteinlerin devir-daim hızının artışı ile ilişkilendirmek mümkündür. Dahası PE seviyelerinin de bu dozda anlamlı olarak artmış olması dikkat çekicidir. PE'ler konik şekilli lipid türleri olup membran dinamikleri üzerinde biyofiziksel bir avantaj yaratırlar. Konik şekil, membranda içe kıvrılma olayını destekleyerek membranda vezikül füzyon olayına katkıda bulunur böylece füzyon poru oluşumu, genişlemesini ve nörotransmitter salınımını kolaylaştırır. PC12 hücreleri ile yapılan bir çalışmada bireysel salım olaylarının ve salım kinetiklerinin fosfatidiletanolaminle sayesinde arttığı ancak silindirik şekilli lipidlerin bu durum üzerinde etkisiz olduğu gösterilmiştir [67]. Ayrıca PS'lerin de SNARE kompleks oluşumunu etkileyerek sinaptik vezikül doking olaylarında etkisi olduğu bildirilmiştir [66]. Böylece bu tez çalışması ile bağlantılı olarak; 10 μ M-4sa *laktasistin* dozu uygulanarak artan membran PE ve PS düzeylerinin, nörotransmitter salım hızını dolayısı ile hızlı ekzositoz olayını tetiklediğini söylemek yerinde olur.

SCA analizlerinde gözlenen pikler sıklıkla ön pik ayağı denilen ekzositoz olayının en başında küçük bir akım artışı ile karakterize olan bir omuzlanma gösterirler. Bu olayda gözlenen akımın büyüklüğünün, I_{ayak} , (Şekil 4.31) oluşan füzyon porunun şekli ile ilişkili olduğu ve bu sırada oluşan füzyon porundan bir miktar nörotransmitter sızıntısı olduğu bilinmektedir. Şekil 4.33'de görüldüğü üzere hücrelere 10 μ M-4sa *laktasistin* uygulanması ekzositoz olayı başlangıcındaki nörotransmitter salımını artırmış aynı zamanda bu dozda artan I_{ayak} değeri füzyon porunun büyüdüğünü de göstermiştir. Aynı zamanda bu dozda t_{ayak}

değeri artmış (Şekil 4.32), yani 10 μM -4sa uygulaması ile daha yavaş bir ön pik olayının meydana geldiğini göstermiştir. İlginç bir biçimde, uygulanan 1 μM -4h, 1 μM -8h dozları ile I_{ayak} yükselmiş, yani füzyon poru büyüklüğü artmış olsa da bu durum başlangıçta sızan katekolamin miktarını anlamlı olarak değiştirmemiştir. 10 μM -8sa *laktasistin* uygulanımı ise kromafin hücrelerinde hiçbir ön pik ayağı olayına etki etmemiştir. Memeli nöronlarında yapılan bir çalışma, akut proteazomal inhibisyonun (10 μM - birkaç dakika) spontan eksitator akım frekanslarını ve minyatür eksitator akım frekanslarını (mESPCs) 3 kata yakın artırarak daha hızlı ve yüksek frekanslı sinaptik akıma neden olduğu bildirilmiştir [68]. Bu mESPCs aksiyon potansiyeli oluşmadan da ortaya çıkabilen nörotransmitter ile dolu veziküllerden kaynaklanan sinyallerdir. Dolayısı ile bu olayın SCA ile gösterilen önpik ayak olayları ile benzerlik taşıdığı söylenebilir.

Membran yapı ve akışkanlığındaki lipid düzeyi kaynaklı değişiklikler ekzositotik salım olayları ile doğrudan ve dolaylı olarak ilişkili olabilir. Tablo 5.1'de bu çalışmada bazı lipid türlerinde ve ekzositotik olaylarda meydana gelen değişikliklerin farklı *laktasistin* dozları ile değişimi gösterilmiştir. Bunlardan bazı olayların birlikte değiştiği gözlenmiştir.

Tablo 5.1. Doza bağımlı olarak uygulanan *laktasistin*'in ekzositotik olayları ve lipid düzeyleri üzerindeki etkileri

	PE	PE-O	PI	PS	$N_{\text{molekül}}$ SCA	$N_{\text{molekül}}$ IVIEC	Parçalı Salım	$t_{1/2}$	$N_{\text{molekül}}$ /ayak	I_{ayak}	t_{ayak}
1 μM -4sa	ns	↓	↑	↑	↓	ns	↓	↓	ns	↑	ns
10 μM -4sa	↑	ns	↑	↑	ns	ns	ns	↓	↑	↑	↑
1 μM -8sa	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↓	ns	↑	ns
10 μM -8sa	↓	↓	↓	↓	↓	↓	ns	↓	ns	ns	ns

Membranın iç ve dış yüzeyinde bulunan lipid baş gruplarının yükü ile membran proteinlerinin fonksiyonu arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Membran yüzeyinde kümelenmiş olan negatif yüklü baş grubuna sahip lipidlerin, Ca^{2+} iyonlarının yüzeye olan afinitesini artırarak membran proteinlerinin aktivitesini etkilediği bildirilmiştir [69]. Bu tez çalışmasında PS (Şekil 4.20) ve PI (Şekil 4.21) gibi negatif baş grubuna sahip lipid türlerinin *laktasistin*'in farklı dozlarına bağlı olarak benzer bir eğilim grafiği göstermesi bu tür lipid gruplarının proteazomal inhibisyona karşı birlikte etkilendiğini ve bu durumun membran proteinlerinin aktivitelerini değiştirerek nöroekzositoz olayı üzerinde dolaylı olarak da etkileri olabileceğini ortaya koyabilir.

Ratlarla yapılan bir çalışmada proteazomal inhibisyonun sistematik olarak progresif Parkinson hastalığı modeli oluşturmada kullanıldığı ancak bu etkiler görülmeden önce, erken dönemde kullanılan proteazomal inhibitörlerin proteazomun bileşenlerinin aktivitelerini etkileyen transkripsiyon, translasyon faktörlerinin upregülasyonuna neden olduğu bildirilmiş ve bu aktivitelerin iki haftalık uygulamadan sonra düştüğü gösterilmiştir [19]. Vasküler düz kas hücrelerinin primer kültürü ile yapılan bir başka çalışmada ise proteazomal inhibisyonun proteazomal genlerin ekspresyonunu etkileyerek proteazomların *de novo* oluşumunu tetiklediği, böylece belli bir dozda otoregülatör bir geri besleme mekanizmasını harekete geçirdiği ortaya konmuştur [70]. Sonuç olarak yapılan bu tez çalışması, daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak, *laktasistin*'in doza bağlı olarak iki ucu keskin değişikliklere neden olabildiğini, optimal sayılabilecek dozlarda bazı membran lipidlerinin miktarlarını arttırdığını, ancak belli dozların üzerinde bu miktarlarda azalmaya neden olduğunu, ve ayrıca ekzositoz olayının kinetiklerini de doz bağımlı olarak değiştirdiğini göstermiştir.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Proteazomal olarak inhibe edilmiş kromafin hücrelerinde membran lipidomunun görüntülemeli ToF-SIMS yöntemi kullanılarak label-free olarak dedeksiyonu sonucunda; PS, PI, PA sınıflarına ait negatif baş grubuna sahip lipid türlerinde doza bağlı farklanmalar olduğu ve bu farklanmaların kendi içerisinde de benzer bir eğilim gösterdiği bulunmuştur. Bu lipidlerin birlikte değişimi bunların membrandaki lokasyonu ve ekzositoz olayı üzerindeki işlevsellikleri açısından anlamlıdır. SCA ve IVIEC özgün yöntemleri kullanılarak analiz

edilen ekzositoz olayının dinamiklerinde gözlenen değişimlerin bu lipid türlerinin değişiminden de etkilenmiş olması muhtemeldir. 1 µM-4sa *laktasistin* ile eter-bağlı fosfatidiletanolaminlerin miktarlarının ve SCA yöntemi ile belirlenen katekolamin miktarlarının birlikte düşüş eğilimi gösterdiği dikkat çekmiştir. Diğer taraftan 10 µM-4sa *laktasistin*'in PE lipid türlerinin konsantrasyonunda belirgin artışa olmasının yanında ekzositotik ayak olaylarının süresini azaltıp bu olaylar süresince salınan katekolamin miktarını artırması, PE türlerinin konik geometrisinin vezikül füzyonu üzerindeki kolaylaştırıcı rolünü destekleyici bir kanıt sunmaktadır. Doza bağımlı *laktasistin* ile lipid alterasyonu arasında şu ana kadar yapılan bir çalışmaya rastlanılmamış olup, altta yatan nedenlerin farklı lipidlerle ilişkisi bu tez çalışması boyunca tartışılmıştır. Tüm bu yönleriyle tamamlanan bu çalışma nörodejenerasyon, lipid metabolizması ve proteazomal inhibisyon durumları arasındaki bağlantıların aydınlatılmasında bir köprü görevi görmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] Opattova, A., Cente, M., Novak, M., Filipcik, P. (2015). The ubiquitin proteasome system as a potential therapeutic target for treatment of neurodegenerative diseases. *Gen Physiol Biophys.*, 34 (4), 337-352.
- [2] Zheng, Q., Huang, T., Zhang, L., Zhou, Y., Luo, H., Xu, H., Wang, X. (2016). Dysregulation of Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci.*, 8, 303.
- [3] Smith, D.M. (2018). Could a Common Mechanism of Protein Degradation Impairment Underlie Many Neurodegenerative Diseases? *J Exp Neurosci.*, 12, 1179069518794675.
- [4] Ding, M., Shen, K. (2008). The role of the ubiquitin proteasome system in synapse remodeling and neurodegenerative diseases. *Bioessays*, 30 (11-12), 1075-1083.
- [5] Tai, H.C., Schuman, E.M. (2008). Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci.*, 9 (11), 826-838.
- [6] Mitroi, D.N., Deutschmann, A.U., Raucamp, M., Karunakaran, I., Glebov, K., Hans, M., Walter, J., Saba, J., Graler, M., Ehninger, D., Sopova, E., Shupliakov, O., Swandulla, D., van Echten-Deckert, G. (2016). Sphingosine 1-phosphate lyase ablation disrupts presynaptic architecture and function via an ubiquitin- proteasome mediated mechanism. *Sci Rep.*, 6, 37064.
- [7] Joensuu, M., Wallis, T.P., Saber, S.H., Meunier, F.A. (2020). Phospholipases in neuronal function: A role in learning and memory? *J Neurochem.*, 153 (3), 300-333.
- [8] Mesa-Herrera, F., Taoro-Gonzalez, L., Valdes-Baizabal, C., Diaz, M., Marin, R. (2019). Lipid and Lipid Raft Alteration in Aging and Neurodegenerative Diseases: A Window for the Development of New Biomarkers. *Int J Mol Sci*, 20 (15)
- [9] Driver, A.M., Kratz, L.E., Kelley, R.I., Stottmann, R.W. (2016). Altered cholesterol biosynthesis causes precocious neurogenesis in the developing mouse forebrain. *Neurobiol Dis.*, 91, 69-82.
- [10] Alecu, I., Bennett, S.A.L. (2019). Dysregulated Lipid Metabolism and Its Role in alpha-Synucleinopathy in Parkinson's Disease. *Front Neurosci.*, 13, 328.
- [11] Saez-Orellana, F., Octave, J.N., Pierrot, N. (2020). Alzheimer's Disease, a Lipid Story: Involvement of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha. *Cells*, 9 (5)
- [12] Varma, V.R., Oommen, A.M., Varma, S., Casanova, R., An, Y., Andrews, R.M., O'Brien, R., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Toledo, J., Baillie, R., Arnold, M., Kastenmueller, G., Nho, K., Doraiswamy, P.M., Saykin, A.J., Kaddurah-Daouk, R., Legido-Quigley, C., Thambisetty, M. (2018). Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: A targeted metabolomics study. *PLoS Med.*, 15 (1), e1002482.
- [13] Zhu, L., Zhong, M., Elder, G.A., Sano, M., Holtzman, D.M., Gandy, S., Cardozo, C., Haroutunian, V., Robakis, N.K., Cai, D. (2015). Phospholipid dysregulation

- contributes to ApoE4-associated cognitive deficits in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 112 (38), 11965-11970.
- [14] Torres, M., Rossello, C.A., Fernandez-Garcia, P., Llado, V., Kakhlon, O., Escriba, P.V. (2020). The Implications for Cells of the Lipid Switches Driven by Protein-Membrane Interactions and the Development of Membrane Lipid Therapy. *Int J Mol Sci.*, 21 (7)
- [15] Shimizu, T. (2009). Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 49, 123-150.
- [16] Narayana, V.K., Kvaskoff, D., Meunier, F.A. (2017). New Developments in Free Fatty Acids and Lysophospholipids: Decoding the Role of Phospholipases in Exocytosis, *Lipidomics of Stem Cells* içinde (s. 191-205). Springer.
- [17] Suetsugu, S., Kurisu, S., Takenawa, T. (2014). Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiol Rev.*, 94 (4), 1219-1248.
- [18] Kreutzberger, A.J.B., Kiessling, V., Liang, B., Yang, S.T., Castle, J.D., Tamm, L.K. (2017). Asymmetric Phosphatidylethanolamine Distribution Controls Fusion Pore Lifetime and Probability. *Biophys J.*, 113 (9), 1912-1915.
- [19] McNaught, K.S., Perl, D.P., Brownell, A.L., Olanow, C.W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol.*, 56 (1), 149-162.
- [20] Ciechanover, A., Brundin, P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*, 40 (2), 427-446.
- [21] Sharma, M., Burre, J., Sudhof, T.C. (2012). Proteasome inhibition alleviates SNARE-dependent neurodegeneration. *Sci Transl Med.*, 4 (147), 147ra113.
- [22] Bush, K.T., Goldberg, A.L., Nigam, S.K. (1997). Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem.*, 272 (14), 9086-9092.
- [23] Bieler, S., Meiners, S., Stangl, V., Pohl, T., Stangl, K. (2009). Comprehensive proteomic and transcriptomic analysis reveals early induction of a protective anti-oxidative stress response by low-dose proteasome inhibition. *Proteomics*, 9 (12), 3257-3267.
- [24] Zhao, Y., Hegde, A.N., Martin, K.C. (2003). The ubiquitin proteasome system functions as an inhibitory constraint on synaptic strengthening. *Curr Biol.*, 13 (11), 887-898.
- [25] Fenteany, G., Schreiber, S.L. (1998). Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem.*, 273 (15), 8545-8548.
- [26] Pievani, M., Filippini, N., Van Den Heuvel, M.P., Cappa, S.F., Frisoni, G.B. (2014). Brain connectivity in neurodegenerative diseases—from phenotype to proteinopathy. *Nature Reviews Neurology*, 10 (11), 620-633.

- [27] Croese, T., Furlan, R. (2018). Extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Molecular aspects of medicine*, 60, 52-61.
- [28] Jara, J.H., Frank, D.D., Özdinler, P.H. (2013). Could dysregulation of UPS be a common underlying mechanism for cancer and neurodegeneration? Lessons from UCHL1. *Cell biochemistry and biophysics*, 67 (1), 45-53.
- [29] Papandreou, M.E., Tavernarakis, N. (2020). Crosstalk between endo/exocytosis and autophagy in health and disease. *Biotechnology journal*, 15 (8), 1900267.
- [30] Ōmura, S., Crump, A. (2019). Lactacystin: first-in-class proteasome inhibitor still excelling and an exemplar for future antibiotic research. *The Journal of antibiotics*, 72 (4), 189-201.
- [31] Hu, X., Zhang, H., Zhang, Y., Zhang, Y., Bai, L., Chen, Q., Wu, J., Zhang, L. (2014). Differential protein profile of PC12 cells exposed to proteasomal inhibitor lactacystin. *Neurosci Lett*, 575, 25-30.
- [32] Wilde, I.B., Brack, M., Winget, J.M., Mayor, T. (2011). Proteomic characterization of aggregating proteins after the inhibition of the ubiquitin proteasome system. *J Proteome Res.*, 10 (3), 1062-1072.
- [33] Huttner, W.B., Gerdes, H.H., Rosa, P. (1991). The granin-(chromogranin/secretogranin) family. *Trends in biochemical sciences*, 16, 27-30.
- [34] Wiedenmann, B., Huttner, W.B. (1989). Synaptophysin and chromogranins/secretogranins widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis. *Virchows Archiv B*, 58 (1), 95-121.
- [35] Jahn, R., Südhof, T.C. (1993). Synaptic vesicle traffic: rush hour in the nerve terminal. *Journal of neurochemistry*, 61 (1), 12-21.
- [36] Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., De Toledo, G.A., Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, 389 (6650), 509-512.
- [37] Milosevic, I., Sørensen, J.B. (2015). Fusion machinery: SNARE protein complex, *Presynaptic Terminals* içinde (s. 87-127). Springer.
- [38] Mellander, L.J., Trouillon, R., Svensson, M.I., Ewing, A.G. (2012). Amperometric post spike feet reveal most exocytosis is via extended kiss-and-run fusion. *Sci Rep.*, 2, 907.
- [39] Wenk, L.L.M. (2009). 9 Neuronal Membrane Lipids—Their Role in the Synaptic Vesicle Cycle. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Lipids*, 14, 223.
- [40] Shahin, V., Datta, D., Hui, E., Henderson, R.M., Chapman, E.R., Edwardson, J.M. (2008). Synaptotagmin perturbs the structure of phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 47 (7), 2143-2152.
- [41] Guo, M., Stockert, L., Akbar, M., Kim, H.-Y. (2007). Neuronal specific increase of phosphatidylserine by docosahexaenoic acid. *Journal of Molecular Neuroscience*, 33 (1), 67-73.

- [42] Millington, D., Kodo, N., Norwood, D., Roe, C. (1990). Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*, 13 (3), 321-324.
- [43] Thomson, J.J. (1897). XL. Cathode rays. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 44 (269), 293-316.
- [44] Aston, F. (1920). Isotopes and atomic weights. *Nature*, 105 (2646), 617-619.
- [45] Martins, D.N., Vendramini, P.H., Simionato, A.V.C., Sussulini, A. (2022). Introduction to Bioanalytical Mass Spectrometry, *Tools and Trends in Bioanalytical Chemistry* içinde (s. 431-465). Springer.
- [46] Sämfors, S., Fletcher, J.S. (2020). Lipid diversity in cells and tissue using imaging SIMS. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 13, 249-271.
- [47] Fletcher, J.S., Rabbani, S., Henderson, A., Blenkinsopp, P., Thompson, S.P., Lockyer, N.P., Vickerman, J.C. (2008). A new dynamic in mass spectral imaging of single biological cells. *Analytical Chemistry*, 80 (23), 9058-9064.
- [48] Fletcher, J.S., Vickerman, J.C. (2013). Secondary ion mass spectrometry: characterizing complex samples in two and three dimensions. *Analytical chemistry*, 85 (2), 610-639.
- [49] Cameron, A., Eggers Jr, D. (1948). An Ion "Velocitron". *Review of Scientific Instruments*, 19 (9), 605-607.
- [50] Finnegan, J.M., Pihel, K., Cahill, P.S., Huang, L., Zerby, S.E., Ewing, A.G., Kennedy, R.T., Wightman, R.M. (1996). Vesicular quantal size measured by amperometry at chromaffin, mast, pheochromocytoma, and pancreatic β -cells. *Journal of neurochemistry*, 66 (5), 1914-1923.
- [51] Hu, K., Nguyen, T.D., Rabasco, S., Oomen, P.E., Ewing, A.G. (2020). Chemical Analysis of Single Cells and Organelles. *Analytical Chemistry*, 93 (1), 41-71.
- [52] T O'Connor, D., Mahata, S.K., Mahata, M., Jiang, Q., Hook, V.Y., Taupenot, L. (2007). Primary culture of bovine chromaffin cells. *Nature protocols*, 2 (5), 1248-1253.
- [53] Angerer, T.B., Blenkinsopp, P., Fletcher, J.S. (2015). High energy gas cluster ions for organic and biological analysis by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 377, 591-598.
- [54] Fahy, E., Sud, M., Cotter, D., Subramaniam, S. (2007). LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Res.*, 35, W606-W612.
- [55] Acevedo, A., Durán, C., Ciucci, S., Gerl, M., Cannistraci, C.V. (2018). LIPEA: lipid pathway enrichment analysis. *bioRxiv.*, 274969.
- [56] Zhou, H.Y., Tan, Y.Y., Wang, Z.Q., Wang, G., Lu, G.Q., Chen, S.D. (2010). Proteasome inhibitor lactacystin induces cholinergic degeneration. *Can J Neurol Sci.*, 37 (2), 229-234.

- [57] Suh, J., Lee, Y.A., Gwag, B.J. (2005). Induction and attenuation of neuronal apoptosis by proteasome inhibitors in murine cortical cell cultures. *J Neurochem.*, 95 (3), 684-694.
- [58] Witt, S.N. (2014). Lipid disequilibrium in biological membranes, a possible pathway to neurodegeneration. *Commun Integr Biol.*, 7 (6), e993266.
- [59] Dean, J.M., Lodhi, I.J. (2018). Structural and functional roles of ether lipids. *Protein Cell*, 9 (2), 196-206.
- [60] Ikwegbue, P.C., Masamba, P., Oyinloye, B.E., Kappo, A.P. (2017). Roles of Heat Shock Proteins in Apoptosis, Oxidative Stress, Human Inflammatory Diseases, and Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*, 11 (1)
- [61] Lobasso, S., Tanzarella, P., Vergara, D., Maffia, M., Cocco, T., Corcelli, A. (2017). Lipid profiling of parkin-mutant human skin fibroblasts. *J Cell Physiol.*, 232 (12), 3540-3551.
- [62] Fujimoto, T., Ohsaki, Y. (2006). Proteasomal and autophagic pathways converge on lipid droplets. *Autophagy*, 2 (4), 299-301.
- [63] Hammond, G.R., Fischer, M.J., Anderson, K.E., Holdich, J., Koteci, A., Balla, T., Irvine, R.F. (2012). PI4P and PI(4,5)P2 are essential but independent lipid determinants of membrane identity. *Science*, 337 (6095), 727-730.
- [64] Li, X., Dunevall, J., Ewing, A.G. (2016). Using Single-Cell Amperometry To Reveal How Cisplatin Treatment Modulates the Release of Catecholamine Transmitters during Exocytosis. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 55 (31), 9041-9044.
- [65] Ren, L., Pour, M.D., Majdi, S., Li, X., Malmberg, P., Ewing, A.G. (2017). Zinc Regulates Chemical-Transmitter Storage in Nanometer Vesicles and Exocytosis Dynamics as Measured by Amperometry. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 56 (18), 4970-4975.
- [66] Lou, X., Kim, J., Hawk, B.J., Shin, Y.K. (2017). alpha-Synuclein may cross-bridge v-SNARE and acidic phospholipids to facilitate SNARE-dependent vesicle docking. *Biochem J.*, 474 (12), 2039-2049.
- [67] Uchiyama, Y., Maxson, M.M., Sawada, T., Nakano, A., Ewing, A.G. (2007). Phospholipid mediated plasticity in exocytosis observed in PC12 cells. *Brain Res.*, 1151, 46-54.
- [68] Rinetti, G.V., Schweizer, F.E. (2010). Ubiquitination acutely regulates presynaptic neurotransmitter release in mammalian neurons. *J Neurosci.*, 30 (9), 3157-3166.
- [69] Lee, A.G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Bba-Biomembranes*, 1666 (1-2), 62-87.
- [70] Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.M., Kruger, E. (2003). Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem.*, 278 (24), 21517-21525.