

Lizozomal Neu1 ve Neu4 Sialidazın Yağ Metabolizmasındaki Biyolojik Rolü: Lipidom Analizi

Program Kodu: 1010

Proje No: 112T410

Proje Yürütücüsü

Doç. Dr. Volkan Seyrantepe

Danışman: Dr. Crister Ejsing (University of Odense, Denmark)

Bursiyer: Secil Akyildiz Demir

Merve İsdar

Ocak 2015

İZMİR

ÖNSÖZ

Tay-Sachs hastalığı HexA genindeki mutasyonların sebep olduğu ve β -Hekzosaminidaz A enzim eksikliği sonucu ortaya çıkan ölümcül bir lizozomal depo hastalığıdır. Otozomal çekinik olarak kalıtılan ve bir çocukluk çağı hastalığı olan Tay-Sachs'ın patolojisini daha iyi anlamak ve uygun ilaç tedavi yöntemleri geliştirmek amacı ile β -Hekzosaminidaz A eksikliği olan fare modeli ($HexA^{-/-}$) yaratılmış fakat insandaki lizozomal depo hastalığı bulguları bu farelerde gözlenmemiştir. Bunun sonucunda insan ile fare arasında GM2 gibi glikolipidlerin yıkım yollarının farklı olduğu, farede bir ya da daha fazla sialidaz enziminin yer aldığı bir bypass mekanizmasının varlığı ileri sürülmüştür. Projemizin amacı lizozomal Neu1 ve Neu4 sialidaz enzimlerinin sialik asit içeren GM2 gangliosid gibi asidik glikolipidler ile çeşitli yağ moleküllerinin metabolizmasındaki biyolojik rolünü araştırmaktır. **EVRENA programı kapsamında ülkemize gelen Danimarkalı uzman araştırmacı Dr. Ejning kütle spektrometrisi ile yağ profillendirme metodlarını standardize etmiş ve öğrencilerimize gerekli eğitimi vermiştir.** İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünün ortak çalışmaları için kurulmuş bulunan Biyolojik Kütle Spektrometri Laboratuvarında bulunan QTRAP4000 (AB SCIEX) kütle spektrometri cihazı kullanılmış ve standardizasyon sonrası 8 farklı genotipe sahip farelerin (*Normal*, *Neu4^{-/-}*, *Neu1^{-/-}*, *Hexa^{-/-}*, *Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}*, *Hexa^{-/-}Neu1^{-/-}*, *Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*, *Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*) beyinlerinden daha önce elde edilen yağ özütleri ve kurulan deri fibroblast hücre hatlarının yağ profilleri çıkarılmıştır. Projemiz ülkemizde 'lipidomics: lipidom analizi' olarak adlandırılan ve ileri teknoloji ürünü kütle spektrometri cihazı kullanılarak yapılan yağ metabolizması konusundaki araştırmalara öncelik etmektedir.

İÇİNDEKİLER

Konu	Sayfa No
Özet	<u>11</u>
Abstract	<u>12</u>
Bölüm 1. Giriş	<u>13-15</u>
Bölüm 2. Gereç ve Yöntem	<u>16-22</u>
Bölüm 3. Sonuçlar	<u>23-79</u>
Bölüm 4. Tartışma	<u>72</u>
Kaynakça	<u>77</u>

ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

Sekil / Tablo

Şekil 1: Fare beyni genel yapısı yandan görünüşü. Kareler analiz için alınan bölgeleri gösteriyor; 1: beyincik – Beyin sapı, 2: Hipokampus, 3: talamus-hipotalamus, 4: ön korteks, 5: üst korteks, 6: alt korteks	19
Şekil 2: pLXSN16E6E7 retrovirus vektorünü içeren embriyonik fare fibroblast hattı	23
Şekil 3: Farklı dozlarda (0ml, 0.25ml, 0.5ml, 1ml, 1.5ml, 2ml viral süpernetant) viral infeksiyondan sonra 12 gün boyunca 400µg/ml G418 antibiyotiği uygulanan Cos-7 hücrelerinin 0.,4., 8. ve 12. gündeki görüntüsü	24
Şekil 4: A) <i>Neu1^{-/-}</i> , B) <i>HexA^{-/-}</i> , C) <i>HexA^{-/-} Neu4^{-/-}</i> , D) <i>HexA^{-/-} Neu1^{-/-}</i> , E) <i>Neu4^{-/-} Neu1^{-/-}</i> , F) <i>HexA^{-/-} Neu4^{-/-} Neu1^{-/-}</i> farelerinden elde edilmiş fibroblastların immortalizasyondan sonraki orijinal görüntüsü.	25
Şekil 5: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen yağ kategorileri (gliserolipid, gliserofosfolipid, sfingolipid ve sterolipid) ve beynin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)	26
Şekil 6: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı fosfotidiletanolamin (PE) yağı türleri ve beynin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)	27
Şekil 7: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı fosfotidilkolin (PC) yağı türleri ve beynin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)	27
Şekil 8: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı seramid (Cer) yağı türleri ve beynin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)	28
Şekil 9: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı fosfotidilinositol (PI) yağı türleri ve beynin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)	28
Şekil 10: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı sfingomiyelin (SM) yağı türleri ve beynin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)	29
Şekil 11: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı fosfotidilserin (PS) yağı türleri ve beynin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)	29

Şekil 12. Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampüs (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı fosfatidilgliserol (PG) yağı türleri ve beyin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)	30
Şekil 13. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri cerebellum bölgesinde farklı yağ türlerinin karşılaştırılması	31
Şekil 14. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri hipokampüs bölgesinde farklı yağ türlerinin karşılaştırılması	31
Şekil 15. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri talamusun bölgesinde farklı yağ türlerinin karşılaştırılması	32
Şekil 16. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri talamus bölgesinde GM2 miktarı	32
Şekil 17. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri hipokampüs bölgesinde GM2 miktarı	33
Şekil 18. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri serebellum bölgesinde GM2 miktarı	33
Şekil 19. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri talamus bölgesinde PC O- miktarı	34
Şekil 20. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri hipokampüs bölgesinde gözlemlenen PC O- miktarı	34
Şekil 21. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri serebellum bölgesinde gözlemlenen PC O- miktarı	35
Şekil 22. WT (yeşil barlar) HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri serebellum bölgesinde LPI miktarı	35
Şekil 23. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri hipokampüsün bölgesinde LPI miktarı	36
Şekil 24. WT (yeşil barlar) ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri talamus bölgesinde LPI miktarı	36
Şekil 25. 5-6 aylık Normal, Neu4 ^{-/-} , HexA ^{-/-} , Neu1 ^{-/-} , HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} , ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} genotipindeki farelerinin beyinlerinden elde edilen yağ özütleri ile yapılan ince tabaka kromatografisi(TLC)(n=2)	37
Şekil 26. 5-6 aylık Normal, Neu4 ^{-/-} , HexA ^{-/-} , HexA ^{-/-} Neu1 ^{-/-} , HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} , ve HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} genotipindeki farelerinin beyinlerinden elde edilen yağ özütleri ile yapılan kütle spektrometresi ve ince tabaka kromatografisi (TLC) analizinde GM2/GM1 oranının karşılaştırılması	38
Şekil 27. 5-6 aylık Normal, Neu4 ^{-/-} , HexA ^{-/-} , HexA ^{-/-} Neu1 ^{-/-} , HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} , ve	39

HexA ^{-/-} Neu4 ^{-/-} Neu1 ^{-/-} genotipindeki farelerinin beyinlerinden elde edilen yağ özütleri ile yapılan kütle spektrometresi analizi.	
Şekil 28: WT fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	41
Şekil 29: HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	41
Şekil 30: Neu4 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	41
Şekil 31: Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	42
Şekil 32: Neu4HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	42
Şekil 33: Neu4Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	42
Şekil 34: HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	43
Şekil 35: Neu4HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	43
Şekil 36: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki Sfingomiyelin miktarı	44
Şekil 37: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki Fosfatidilkolin miktarı	45
Şekil 38: Seramid ve glukozil seramid çeşitlerinin isimlendirilmesi	46
Şekil 39: WT fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda	47

gösterilmiştir.	
Şekil 40: WT fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	47
Şekil 41: HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	48
Şekil 42: HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	48
Şekil 43: Neu4 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	48
Şekil 44: Neu4 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	49
Şekil 45: Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	49
Şekil 46: Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	49
Şekil 47: Neu4HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	50
Şekil 48: Neu4HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	50
Şekil 49: Neu4Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	50
Şekil 50: Neu4Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	51
Şekil 51: HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için	51

yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	
Şekil 52: HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	51
Şekil 53: Neu4HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	52
Şekil 54: Neu4HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	52
Şekil 55: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki Seramid miktarı	53
Şekil 56: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki Seramid Fosfat miktarı	54
Şekil 57: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki Glukozil Seramid miktarı	55
Şekil 58: WT(A), HexA(B), Neu4(C), Neu4HexA(D), Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki Laktosil Seramid miktarı	56
Şekil 59: WT fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	58
Şekil 60: HexA mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	58
Şekil 61: Neu4 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	59
Şekil 62: Neu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsor iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	59
Şekil 63: Neu4HexA mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan	60

yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	
Şekil 64: Neu4Neu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	60
Şekil 65: HexANeu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	61
Şekil 66: Neu4HexANeu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	61
Şekil 67: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare fibroblast hücrelerindeki Fosfatidilkolin miktarı	62
Şekil 68: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare fibroblast hücrelerindeki Sfingomiyelin miktarı	63
Şekil 69: WT fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	64
Şekil 70: HexA mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	65
Şekil 71: Neu4 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	65
Şekil 72: Neu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	66
Şekil 73: Neu4HexA mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	66
Şekil 74: Neu4Neu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	66

Şekil 75: HexANeu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	67
Şekil 76: Neu4HexANeu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsor iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.	67
Şekil 77: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare fibroblast hücrelerindeki Seramid miktarı	68
Şekil 78: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare fibroblast hücrelerindeki Seramid Fosfat miktarı	69
Şekil 79: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare fibroblast hücrelerindeki GlukozilSeramid miktarı	70
Şekil 80: WT-HexA(A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare fibroblast hücrelerindeki LaktosilSeramid miktarı	71
Tablo1: 1uM, 5 uM ve 10 uM SM ve HexCer karışımlarının hazırlanışı	20
Tablo2: 10 uM SM ve HexCer standartları ve analiz edilecek örnek içeren karışımların hazırlanışı	22
Tablo3: Beyin dokusunda tanımlanan Fosfatidilkolin ve Sfingomiyelin çeşitleri	40
Tablo4: Beyin dokusunda tanımlanan Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid çeşitleri	48
Tablo5: İmmortal fare fibroblast hücrelerinde tanımlanan fosfatidilkolin ve sfingomiyelin çeşitleri	57
Tablo6: İmmortal fare fibroblast hücrelerinde bulunan Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid çeşitleri	64

ÖZET

Sialidazlar glikolipid ve glikoproteinlere bağlanmış sialik asitleri uzatlaştırarak çeşitli hücreyel olayları kontrol eden glikohidrolitik enzimlerdir. Memeli hücrelerinde genetik olarak 4 farklı sialidaz enzimi tanımlanmıştır. Bunlar lizozomal (Neu1), sitosolik (Neu2), hücre zar sialidazı (Neu3) ve lizozomal/mitokondrial sialidaz (Neu4) olarak isimlendirilirler. Neu4 sialidaz ilk kez klonlanarak biyokimyasal özellikleri çalışılmış ve in vitro şartlarda lizozomal sialidaz Neu4'ün asitik pH'da GM2 gibi glikolipid grubundaki gangliosidlere karşı aktivitesi olduğunu gösterilmiştir (V Seyrantepe et al, J Biol Chem, 2004). Yaptığımız bir çalışmada lizozomal bir depo hastalığı olan Tay-sachs hastalarına ait nöroglia hücre hatlarına Neu4 sialidaz aktarılmış ve lizozomlarda biriken GM2 gangliosid'inin Neu4 sialidaz tarafından yıkıldığı ve hücre lizozomlarında görülen patolojiyi düzeldiği gösterilmiştir (V Seyrantepe et al, Hum Mol Genet, 2008). Daha önce yapılan benzer bir çalışmada ise lizozomal Neu1 sialidaz'ın nöroglia hücrelerindeki patolojik bulguları azalttığı rapor edilmiştir. In vitro şartlarda Neu4 ve Neu1 sialidaz enzimlerinin GM2 gangliosid'ini yıktığı bilinmekle birlikte, in vivo olarak Tay-sachs hastalığı fare modelinde (Hexa^{-/-}) gangliosid yıkım yolağında bu iki sialidazın birlikte nasıl bir rol oynadığı bilinmemektedir. Bu amaçla öncelikle Neu4 ve Neu1 sialidaz eksikliği olan fareler (Neu4^{-/-} ve Neu1^{-/-}) yaratılmış ve β-hekzosaminidaz A eksikliği olan Tay-sachs fare modeli (Hexa^{-/-}) ile çiftleştirilerek önce Hexa^{-/-}Neu4^{-/-} ile Hexa^{-/-}Neu1^{-/-} ve daha sonrada üçlü enzim eksikliği olan fare modeli (Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}) elde edilmiştir. Sialidaz enzimlerinin yağ metabolizmasındaki rolünü daha iyi anlamak amacı ile kütle spektrometre kullanılarak bu farelerden daha önce elde edilen yağ özütleri ve oluşturulmuş deri fibroblast hatlarındaki yağ profilleri çıkarılmıştır. Kütle spektrometre kullanılarak 'Lipidomics: Lipidom analizi olarak adlandırılan yağ profillendirme çalışmalarına Danimarka'lı uzman araştırmacı ile ülkemizde ilk kez başlanmıştır. Elde edilen sonuçlar ölümcül bir çocukluk çağı hastalığı olan Tay-sachs hastalığının patolojisinin daha iyi anlaşılmasını ve yağ metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan Neu1 ve Neu4 sialidaz enzimlerinin hedeflendiği yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine öncelik edecektir.

Anahtar Kelimeler: Sialidaz, Lizozom, Tay-sachs, Yağ Metabolizması, Kütle spektrometri

ABSTRACT

Sialidases are glycohydrolytic enzymes that influence cellular activity by removing sialic acids from glycolipids and glycoproteins. Four genetically distinct sialidases have been identified in mammalian cells. These are lysosomal (Neu1), cytosolic (Neu2), plasma membrane associated (Neu3) and lysosomal /mitochondrial (Neu4). Previously, we have cloned and determined the biochemical properties of Neu4 sialidase and demonstrated that Neu4 sialidase has considerable activity towards gangliosides such as GM2 at acidic pH (V Seyrantepe et al, J Biol Chem, 2004). In vitro we also showed that glycolipid catabolism was successfully restored in Neu4-transfected lysosomal β -hexosaminidase A deficient Tay-sachs neuroglia cells indicating the correction of the organellar pathology as a result of reduction of accumulated GM2 ganglioside (V Seyrantepe et al, Hum Mol Genet, 2008). In similar study, it has been shown that lysosomal sialidase Neu1-transfected Tay-sachs neuroglia cells have no pathology. Although lysosomal sialidase Neu1 and Neu4 has activity towards GM2 ganglioside in vitro, the biological role of these sialidases in ganglioside degradation in the mouse model of Tay-sachs disease remain mainly unknown. Therefore, sialidase Neu1 and Neu4 deficient mouse models (Neu1^{-/-} and Neu4^{-/-}) were generated and crossed with β -hexosaminidase A deficient Tay-sachs disease mouse model (Hexa^{-/-}) to generate double deficient (Hexa^{-/-}Neu4^{-/-} and Hexa^{-/-}Neu1^{-/-}) and triple deficient mouse models (Hexa^{-/-}Hex4^{-/-}Neu1^{-/-}). In order to clarify the biological roles of sialidases in lipid metabolism, lipid profiles of total lipid extracts and skin fibroblast cell lines established from mouse models will be studied using mass spectrometry analysis. For lipid profiling in biological materials, 'Lipidomics: Lipidome Analysis' based research using mass spectrometry are initiated by expert scientist from Denmark for the first time in our country. Outcome of this study will help to understand better the pathology of lethal childhood Tay-sachs disease and the role of sialidases Neu1 and Neu4 in the regulation of lipid metabolism which will be targeted by new drugs and therapy.

Key Words: Sialidase, Lysosome, Tay-sachs, Lipid Metabolism, Mass Spectrometry

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Sialidazlar glikohidrolitik enzimler olup memelilerde farklı genlerden kodlanan 4 sialidaz enziminin varlığı gösterilmiştir. Bunlar Neu1 (lizozomal sialidaz), Neu 2 (sitoplazmik sialidaz), Neu 3 (hücre zar sialidazı) ve Neu 4 (lizozomal/mitokondrial sialidaz) olarak isimlendirilirler. Sialidazlar hücre içerisinde farklı bölgelerde yer almakta ve hepsinin farklı biyokimyasal özellikleri ve substratları bulunmaktadır. Memeli sialidaz enzimleri sialik asit içeren oligosakkaritler, glikoprotein ve glikolipidlerden sialik asitlerin glikohidrolizasyon ile yıkımını gerçekleştirirler. Bunun yanı sıra sialidazların glikoprotein ve glikolipidlerden sialik asitleri uzaklaştırarak (desialasyon) hücre farklılaşmasından reseptörlerin modifikasyonuna kadar farklı hücreyel olaylarda etkin rol oynayan önemli oyuncular olduğu gösterilmiştir (Monti et al, 2010). Örneğin son çalışmamızda lizozomal Neu1 sialidaz enziminin daha önce hiç bilinmeyen yeni bir fizyolojik rolünün olduğunu normale göre %8-10 düzeyinde Neu1 sialidaz aktivitesi bulunan hipomorfik fare modeli (Neu1^{-/-}) kullanılarak yapılan çalışmada makrofajlardaki fagositozun düzenlenmesinde lizozomal Neu1 sialidaz enziminin rolünü gösterdik (Seyrantepe et al, J Biol Chem, 2010).

Neu4 sialidaz geni ilk kez bu projenin yürütücüsü Dr. Seyrantepe tarafından klonlanarak biyokimyasal özelliklerini belirlenmiş ve bu sialidazın *in vitro* şartlarda GM1, GM2 gibi glikolipid grubundaki gangliosit'lere asitik pH ortamında aktivitesi olduğunu gösterilmiştir (Seyrantepe et al, J Biol Chem, 2004). Neu4 sialidaz'ın biyolojik rolünün daha iyi anlaşılması amacı ile 'knock-out' fare modeli yaratılmıştır (Seyrantepe V et al, Hum Mol Genet, 2008). Bu fare modelinde (Neu4^{-/-}) Neu4 sialidaz'ın eksikliğinden dolayı özellikle makrofaj ve dalak hücre lizozomlarında anormal büyüme gözlenmiştir ayrıca ince tabaka kromatografi metodu ile ilk kez fare Neu4 sialidaz'ın glikolipidlerin yıkım yolağında görevli lizozomal bir enzim olduğuda gösterilmiştir. Neu4 sialidaz normal farede sialik asit içeren bir başka glikolipid olan GD1a gangliosidinden sialik asiti uzaklaştırarak GM1 gangliosidine dönüştürmektedir. Neu4 sialidaz eksikliği sonucu fare beyinlerinde GD1a gangliosidi yıkılamayarak birikmekte ve GM1 miktarı azalırken GD1a miktarı artmaktadır. Ayrıca Neu4^{-/-} farelerde anormal yağ profili gözlenmiş özellikle kolesterol, fosfatidilkolin ve trigliseridlerde Neu4 sialidaz eksikliği ile bağlantılı olduğu düşünülen belirgin artış tesbit edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise Neu4 sialidaz'ın sadece GD1a gangliosid'i GM1 gangliosid'ine yıkan değil aynı zamanda bir başka gangliosid olan GM2 yıkımında rolü olan bir enzim olduğu gösterilmiştir. β -Hexosaminidaz A (Hexa) eksikliği olan Tay-Sachs hastalığı fare modelinin (Hexa^{-/-}) beyin gangliosid içeriği yine proje yürütücü Dr. Seyrantepe tarafından yaratılan ve hem Hexa hem

de Neu4 enzim eksikliği olan fare beyin gangliosid içeriği ile çalışılmış ve Neu4 eksikliğine bağlı olarak Hexa^{-/-}Neu4^{-/-} farelerde Hexa^{-/-} fare ile karşılaştırıldığında GM2 gangliosid'inin miktarında iki kat artış olduğu tesbit edilmiştir (Seyrantepe et al, Plos Genetics, 2010).

Tay-sachs hastalığı ise lizozomal depo hastalığıdır. Bu hastalıkta β -hekzosaminidaz A (HexA) adlı enzim eksikliği sonucu hücrelerde GM2 gangliosidi yıkılamayarak lizozomlarda birikmektedir. Sinir hücrelerinin hasar görmesi sonucu ise hastalar 3-4 yaşlarında ölmektedirler. Tay-sachs hastalığında patolojisini daha iyi anlamak ve ilaç tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi amacı ile hastalığın fare modeli yaratılmıştır (Phaneuf D et al. 1996). Bu farelerde β -hekzosaminidaz A (HexA) kodlayan gen "knock-out" edilmiş olmasına rağmen normal bir fenotip ile karşılaşılmıştır. HexA^{-/-} fareler Tay-sachs hastalarının tam tersine yaşamlarını normal olarak sürdürmekte ve ilk bir yıl içerisinde herhangi bir nörolojik bulgu göstermemektedir (12 aylık fare ömrü insanda 40 yaşa karşılık gelmektedir fakat Tay-sachs hastaları çocukluk çağında ölmektedir). Tay-sachs farelerinde normal fenotipin görülmesi sialidazların GM2 gangliosid'inin yer aldığı glikolipid yıkım yolağında rol aldığını düşündürmüştür. Bir hipoteze göre β -hekzosaminidaz A eksikliğinden dolayı birikmesi gereken ve sialik asid içeren GM2 gangliosidi bir ya da birden fazla sialidaz enzimi tarafından metabolik 'bypass' reaksiyonu ile önce GA2 adlı bir glikolipide yıkılmakta (sialik asitin hidrasyonu) ve daha sonra bir başka lizozomal enzim olan β -hekzosaminidaz B (HexB) tarafından laktozilseramid'e dönüştürülmektedir. GM2 gangliosid β -hekzosaminidaz A eksikliğine bağlı olarak az miktarda birikmekte buna karşın büyük bir kısmının sialidazlar ile yıkılması sonucu normal fare fenotipi ortaya çıkmaktadır.

In vitro şartlarda Neu1 ve Neu4 sialidaz enzimlerinin GM2 gangliosid'ini yıktığı gösterilmiş olmakla birlikte, in vivo olarak Tay-sachs hastalığı fare modelinde (Hexa^{-/-}) gangliosid yıkım yolağında bu iki sialidazın birlikte rol alıp almadığı henüz bilinmemektedir. Bu amaçla öncelikle sialidaz Neu4 ve sialidaz Neu1 (% 8-10 Neu1 sialidaz aktivitesi) eksikliği olan fareler (Neu4^{-/-} ve Neu1^{-/-}) yaratılmış ve β -hekzosaminidaz A eksikliği olan Tay-sachs fare modeli (Hexa^{-/-}) ile çiftleştirilerek önce Hexa^{-/-}Neu4^{-/-} ile Hexa^{-/-}Neu1^{-/-} ve daha sonrada üçlü enzim eksikliği olan fare modeli (Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}) elde edilmiştir. Sialidaz enzimlerinin yağ metabolizmasındaki rolünü daha iyi anlamak amacı ile bu farelerden daha önce elde edilen beyin dokusunda sadece gangliosidler ince tabaka kromatografi yöntemi ile analiz edilmiş fakat Hexa^{-/-}Neu4^{-/-} ve Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} arasında özellikle her iki sialidazın (Neu4 ve Neu1) birden eksik beyin dokusu örneklerinde GM2 gangliosid miktarında belirgin bir artış gözlenmemiştir. TÜBİTAK 2012 1002 hızlı destek programı tarafından desteklenen projemizde elde edilen sonuçlarımızda ince tabaka kromatografi yöntemi ile beyin dokusunda

bulunan GM1, GM2, GM3, GD3 ve GD1a gibi gangliosidleri nicelik olarak tesbit etmek mümkün olmakta birlikte bu yöntem seramid (Cer) laktoseramid (Lac-Cer), glukoseramid (Glu-Cer) gibi yağ molekülleri ile aynı moleküler ağırlıkta ama farklı pozisyonlarda sialik asit içeren GD1b, GT1a, GT1b, GT1c gibi diğer gangliositleri analiz etmek için yetersiz kalmaktadır. Son derece karmaşık yapıdaki gangliosidleri ise sadece kütle spektrometrisi ile analiz etmek mümkündür (Ikeda K et al, 2008). Bunun yanı sıra hücre zar lipidleri içerisindeki fosfolipidleri ve kolesterol gibi nötral yağların profili ve sialidaz enzim eksikliğinin bu yağların metabolizmasını nasıl etkilediği bilinmemektedir. Neu1 ve Neu4 sialidaz enzim eksikliği olan fare beyin dokusunda Lac-Cer de artış görülmekte fakat daha ayrıntılı ve yüksek çözünürlükte analizler için kütle spektrometrisi ile yapılacak lipidomics analizlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Projemizin amacı lizozomal Neu1 ve Neu4 sialidaz enzimlerinin sialik asit içeren gangliosid gibi asidik glikolipidler ile çeşitli yağ moleküllerinin metabolizmasındaki biyolojik rolünü araştırmaktır. **EVRENA programı kapsamında ülkemize gelen Danimarkalı uzman araştırmacı Dr. Ejsing projenin vazgeçilmez ve en önemli bölümü olan kütle spektrometrisi ile yağ profillendirme metodlarını standardize etmiş ve öğrencilerimize gerekli eğitimi vermiştir.** İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünün ortak çalışmaları için kurulmuş bulunan Biyolojik Kütle Spektrometri Laboratuvarında bulunan QTRAP4000 (AB SCIEX) kütle spektrometri cihazı kullanılmış ve standardizasyon sonrası 8 farklı genotipe sahip farelerinden (*Normal*, *Neu4^{-/-}*, *Neu1^{-/-}*, *Hexa^{-/-}*, *Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}*, *Hexa^{-/-}Neu1^{-/-}*, *Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*, *Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*) beyinlerinden daha önce elde edilen yağ özütleri ve kurulan deri fibroblast hücre hatlarının yağ profilleri çıkarılmıştır. Projemiz ülkemizde 'lipidomics: lipidom analizi' olarak adlandırılan ve ileri teknoloji ürünü kütle spektrometri cihazı kullanılarak yapılan yağ metabolizması konusundaki araştırmalara öncelik etmektedir.

BÖLÜM 2

GEREÇ ve YÖNTEM

Projemizin başlangıç döneminde öncelikle hücre kültürü ve virus çalışmalarında kullanılacak makina teçizat kaleminde alınması önerilen 1 adet biyogüvenlik kabini (Labogen, Scanlaf, Mars II,) ve 1 adet CO₂ inkübatörün (Nuair, NU-4850)) alımı gerçekleştirilmiştir. Cihazların tesliminden sonraki süreçte Kanada Montreal Üniversitesindeki araştırma ortağımız Dr. Pshezhetsky 'nin tarafından projemiz kapsamında kullanılmak üzere bağışlanan ve sıvı azotta saklanan 8 farklı genotipteki (*Normal*, *Neu4^{-/-}*, *Neu1^{-/-}*, *Hexa^{-/-}*, *Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}*, *Hexa^{-/-}Neu1^{-/-}*, *Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*, *Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*) farelerden ele edilmiş fibroblast hücre hatlarının immortalizasyonu çalışmalarını başlatılmıştır. Hücreler 37°C su banyosunda çözülmüş, 5 dk 2500 rpm hızında santrifuj edilip 25-cm² lik flasklarda %10 FBS ve antibiyotik içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)'de büyütülmüştür. 8 farklı genotipteki fibroblastlardan çoğalması sağlanmıştır. İmmortalize edilen hücre hatları;

1. *Normal*

2. *Neu4^{-/-}*

3. *Neu1^{-/-}*

4. *Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*

5. *Hexa^{-/-}*

6. *Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}*

7. *Hexa^{-/-}Neu1^{-/-}*

8. *Hexa^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*.

Bu hücrelerden 3-4 kez pasaj yapılmış ve bir kısmı dondurularak sıvı nitrojende saklanmıştır. ATCC'den satın alınan CRL-2203 katalog numaralı PA317 LXS_N 16E6E7 adlı paketleme hücre hattı kültüre başlamak için 37°C su banyosunda yaklaşık olarak iki dakikada çözülmüştür. Tüpün dış yüzeyi 70 % ethanol ile steril hale getirildikten sonra 1ml hücre üzerine 9 ml tam besin ortamı (10% FBS içeren DMEM) eklenerek 125g 'de 5 dakika satrifuj edilmiştir. Supernatant atıldıktan sonra hücreler üzerine 5 ml tam besin ortamı eklenerek 25 cm²lik flasklarda 37°C de 5% CO₂ ve 60% nem içeren inkübatörde büyütülmüştür. Pasajlama için ortamdan besin solüyonu alınarak 0.25% (w/v) trypsin-0.53 mM EDTA solüsyonu ile yıkanmış hücrelerin üzerine 1 ml Trypsin-EDTA solüsyonu eklenerek yaklaşık 7 dakika

37°C'de inkübatörde bekletilmiştir. Yüzeiden ayrılan hücrelerin üzerine 3 ml tam besin ortamı eklenerek 125g 'de 5 dakika sentrifuj edilerek 1:8 oranında seyreltilen hücreler tam besin ortamı kullanılarak 75cm²'lik flasklarda büyütölmeye devam edilmiştir Kültür sırasında 2-3 günde bir ortam yenilenmiştir. Virus içeren büyüme solüsyonlarının (viral supernatant) hepsi toplanarak 0.45 uM filtreden geçirildi ve -86°C derecede saklanmıştır. PA317 LXS_N 16E6E7 hücreler daha sonra kullanılmak üzere 5% (v/v) DMSO-tam besin ortamı içerisinde dondurularak sıvı azotta saklanmaktadır.

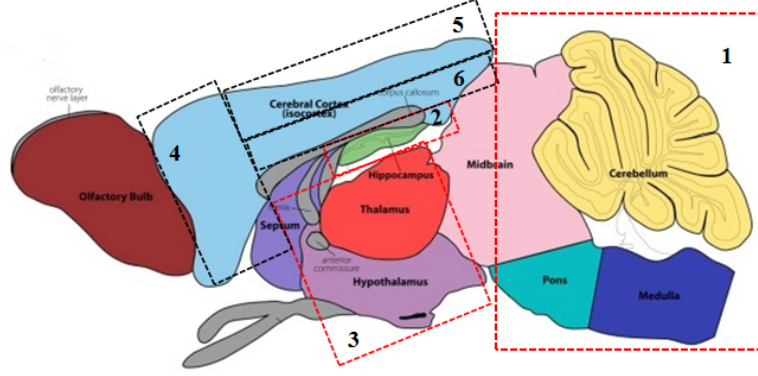
Çalışmamızda öncelikle viruse karşı hücrelerin toksisite testi yapılması gerekmiştir. Toplanan viral supernatant farklı dilüsyon oranlarında (1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:50000) 1 ml serumsuz 4 ug/ml polybrene içeren DMEM solüsyonu ile birleştirilerek 6-well-plate içerisinde %60 yoğunluktaki bir başka kaynaktan temin edilen Hek293 hücrelerinin üzerine yayıldıktan sonra 3 saat 37°C derecede inkübe edilmiştir. Daha sonra 1 ml serumsuz 4 ug/ml polybrene içeren DMEM solüsyonu flaska eklendi. 4 saat inkübe edildikten sonra viral ortam hücrelerden uzaklaştırılmıştır. 1X PBS ile yıkanan hücreler 50 ug/ml G418 ve %10 FBS içeren DMEM solüsyonunda 37°C derecede 72 saat büyütölmüş ve daha sonra besin ortamı hücrelerden uzaklaştırılarak hücreler kristal viyole ile boyanmıştır. Canlı hücre plakları sayılarak en uygun doz belirlenmiştir. Toplanan büyüme solüsyonlarının içerisindeki virus miktarı eşit olmadığı için bu işlem her yeni solüsyon kullanılacağında tekrar edilmiştir.

Belirlen uygun dozdaki viral supernatant (LXS_N 16E6E7 içeren) 3 ml serumsuz 4 ug/ml polybrene içeren DMEM solüsyonu ile birleştirilerek 75-cm² hücre kültür flaskında 60% yoğunluktaki fibroblast hücrelerinin üzerine yayılmıştır. Çalışmamızın ilk aşamasında deneme amacı ile sadece *Normal ve Neu4^{-/-}* genotipindeki hücre hatları seçildi. 3 saat 37°C derecede inkübe edildikten sonra 5 ml serumsuz 4 ug/ml polybrene içeren DMEM solüsyonu flaska eklenmiştir. 4 saat inkübe edildikten sonra viral ortam hücrelerden uzaklaştırılmış ve 1X PBS ile yıkanan hücreler %10 FBS içeren DMEM solüsyonu 80%-90% yoğunlukta olana kadar büyütölmüştür. Pasajlama sonrasında 75-cm² flasklara bölünen hücreler 50 ug/ml G418 ve 10%FBS içeren DMEM solüsyonunda 7 gün boyunca büyütölmeye devam edilmiş ve her pasajdan elde edilen hücreler dondurularak ve MS çalışmamızda kullanılmak üzere sıvı azotta saklanmıştır.

Projemiz kapsamında University of Southern Denmark'tan Dr. Christer Ejsing tarafından kütle spektrometri yöntemi ile lipidom analizleri şartlarının optimize edilmesi ve örneklerimizdeki yağ profili çıkarılması planlanmıştır. Dr. Ejsing'in tüm sarf malzeme (MS için

gerekli kolonlar ve control yağlar) ve makina/tehzizatın satın alınması tamamlandıktan projemizin ancak 3. Döneminde kurumumuza gelebilmiş ve çalışmalarımıza katılmıştır.

Dr. Ejsing IYTE'deki laboratuvarımıza gelmeden önce analiz için bekleyen örneklerden bir grubunu göndermemizi talep etmiştir. Çalışmalarında model organizma olarak maya kullanan ve bu organizma ile son derece deneyimle Dr. Ejsing kendi laboratuvarında fare beyin dokusu yağları ile ön çalışma yapmak istediğini belirtmiştir. Bu sebeple elimizdeki örneklerden bir kısmı kütle spektrometresi ile analiz edilmek üzere Danimarka'ya Dr. Ejsing'in laboratuvarına gönderilmiştir. Kütle spektrometresinde bu yağ özütleri ile yapılan ilk denemeler sonunda perfüzyonda kullanılan NaCl'nin Dr. Ejsing laboratuvarındaki kütle spektrometresindeki analizlerini olumsuz yönde etkilediği tesbit edilmiştir. Projemiz kapsamında analiz edilmek üzere kullanılması planlanan yağ özütlerinin izolasyonu daha önce Kanada Montreal Üniversitesindeki araştırma ortağımız Dr. Pshezhetsky'nin laboratuvarında gerçekleştirilmişti. Bu farelerin beyinleri alınmadan önce anestezi altında kalpten perfüzyon ile farelerin organları NaCl ile yıkanmış ve daha sonra yağ özütleri elde edilmişti. Dr. Ejsing farelerden beyin alınmadan önce kanı uzaklaştırmak için yapılan perfüzyon işleminde NaCl yerine kullanılan bir diğer tampon olan NH₄COO₃ (amonyum asetat) ile yapılması gerektiğini tavsiye etmiştir. Elimizdeki örnekler analize uygun olmadığı için uygun örneklerin eldesi amacıyla proje yürütücüsü Dr. Volkan Seyrantepe Kanada'daki proje ortağımız Dr. Pshezhetsky'nin laboratuvarı ile bağlantıya geçmiş ve yeni yağ özütlerinin hazırlanması amacı ile yeni planlamaya gidilmiştir. Dr. Pshezhetsky'nin laboratuvarı ile yapılan görüşmeler sonunda ise proje kapsamında araştırılması öngörülen 8 genotipteki (*Normal*, *Neu4^{-/-}*, *HexA^{-/-}*, *Neu1^{-/-}*, *HexA^{-/-}Neu1^{-/-}*, *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}*, *Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}* ve *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*) farelerden uygun yaşta (5-6 aylık) yeni bir grup oluşturulmuştur. Dr. Ejsing'in laboratuvarına gönderilen yağ özütleri ile yapılan kütle spektrometresi deneme analizleri farelerin tüm beyinden izole edilen yağ özütlerinin çok yoğun olduğunu ve yüksek miktardakiler yağların düşük miktardaki yağların tesbit edilmesini güçleştirdiği belirlenmiştir. Bunun çözümü olarak ise tüm beyinden yağ izolasyonu yapmak yerine beyni bölgelerine ayırarak her bir bölgeden izole edilen yağların analizinin yapılmasının daha uygun olacağı düşünülmüştür. Yeni örneklerin hazırlanması amacı ile bu konuda daha önce deneyimi bulunan proje yürütücüsü Dr. Volkan Seyrantepe proje bütçesinden herhangi bir ödenek talep etmeden kendi imkanları ile Kanada'ya Dr. Pshezhetsky'nin laboratuvarına gitmiştir. Hazır durumda bulunan uygun yaşdaki (5-6 aylık) farelerin amonyum asetat ile perfüzyon sonrasında beyinleri çıkartmıştır. Çıkarılan beyinler öncelikle 5-7 dakika buzda bekletilmiş, daha sonra diseksiyon mikroskobu yardımı ile bölgelere ayrılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1: Fare beyni genel yapısı yandan görünüşü. Kareler analiz için alınan bölgeleri gösteriyor; 1: beyincik – Beyin sapı, 2: Hipokampus, 3: talamus-hipotalamus, 4: ön korteks, 5: üst korteks, 6: alt korteks

Bu amaçla beyin öncelikle sağ ve sol olmak üzere iki yarım küreye ayrılmıştır. Daha sonra her yarım küre (sağ ve sol) beyincik-beyin sapı, hipokampus, talamus-hipotalamus, ön korteks, üst korteks ve alt korteks olmak üzere toplam 6 bölgeye ayrılmıştır. Bu örneklerden bir kısmı beyincik-beyin sapı, hipokampus ve talamus-hipotalamus bölgelerini analiz edilmek üzere Kanada'dan Dr. Ejsing'in laboratuvarına yollanmıştır. Diğer 3 bölge (ön, üst ve alt korteks) ise Dr. Ejsing geldiği zaman analiz edilmek üzere laboratuvarımıza getirilmiş ve -80°C'de saklanmıştır. Örneklerin diğer bir kısmı ise sonuçlarımızın güvenilirliğini test etmek amacı ile lipidomics konusunda uzman araştırmacıların bulunduğu ve özellikle fare dokusu ile çalışmalar yapan Almanya Dresden deki Lipotype isimli biyoteknoloji firmasına gönderilmiştir. Örneklerin analizi amacı ile projemizdeki hizmet alımı kalemindeki ödenek kullanılmıştır.

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kütle Spektrometri Laboratuvarında Yapılan Çalışmaları (Dr. Ejsing Yönetiminde)

Fare Beyin ve Fibroblast Hücre Hatlarından Yağ Özütü Eldesi

1 normal ve 7 mutant ($Neu4^{-/-}$, $HexA^{-/-}$, $Neu1^{-/-}$, $HexA^{-/-}Neu1^{-/-}$, $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}$, $Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}$ ve $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}$) fare beyninden yağ özütleri daha önce proje yürütücü Dr. Seyrantepe tarafından elde edilmiştir. 3 ml metanol içerisinde parçalanmış 300 mg beyin dokusu üzerine 3 ml kloroform eklenmiştir. 37 °C su banyolu sonikatör içerisinde 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. 15 dakika süresince cihaz 3 kere 3 dakika açılmıştır.

100 milyon fibroblast hücresi trypan blue kullanılarak hesaplanmıştır. Üzerine 3 ml metanol ve 3 ml kloroform konulmuştur. 30 sanye sonike edilerek tüm hücrelerin patlaması sağlanmıştır. Santrifüj edilerek süpernatant cam tüp içerisine alınmıştır. Pellet üzerine 2 ml kloroform/metanol/su (10/10/1) eklenerek santrifüj edilmiş süpernatant cam tüp üzerine eklenmiştir. Sonrasında 2 ml kloroform/metanol/su (30/60/8) kullanılarak aynı işlem tekrar edilmiştir. Birleştirilen süpernatantlar nitrojen gazı ile uçurulmuştur.

MS/MS Kütle Spektrometresi Optimizasyonu

İnternal Kontrol Lipidlerinin hazırlanması: İnternal kontrol olarak Sfingomiyelin(SM) 17:0 ve Heksasomin Seramid (HexCer) 12:0 kullanılmıştır. HexCer'in moleküler ağırlığı 643.95 mg/moldür. 5 mg HexCer 0.833 ml kloroform ve 1.6667 ml methanol (Kloroform :Metanol-1:2) kullanılarak çözülmüştür. 3.1 mM konsantrasyonda HexCer elde edilmiştir. SM'in moleküler ağırlığı 717.07 g/moldür. 5 mg SM 0.833 ml kloroform ve 1.6667 ml methanol (Kloroform :Metanol-1:2) kullanılarak çözülmüştür. 2.8 mM konsantrasyonda SM elde edilmiştir.

Amonyum Formit (AF) hazırlanması: 0.08 g AF 46 ml metanol içersinde çözülerek 27.6 mM AF hazırlanmıştır.

QTRAP Kütle Spektrometri Cihazı Kalibrasyonu: 1uM, 5 uM ve 10 uM SM ve HexCer karışımları hazırlanmıştır. QTRAP kütle spektrometri cihazında 10 uM SM-HexCer karışımı tanımlana bilmiştir.

1uM	5uM	10uM
0.5 ul 3.1 mM HexCer	2.5 ul 3.1 mM HexCer	5 ul 3.1 mM HexCer
0.5 ul 2.8 mM SM	2.5 ul 2.8 mM SM	5 ul 2.8 mM SM
978 ul Metanol	978 ul Metanol	978 ul Metanol
271.74 ul 27.6 mM AF	271.74 ul 27.6 mM AF	271.74 ul 27.6 mM AF
167 ul Kloroform	167 ul Kloroform	167 ul Kloroform
1500 ul total hacim	1500 ul total hacim	1500 ul total hacim

Tablo1: 1uM, 5 uM ve 10 uM SM ve HexCer karışımlarının hazırlanışı

HexCer ve SM standartları yukarıdaki tablodaki gibi hazırlanmıştır. Karışım 15 ul/dakika olacak şekilde cihaza verilmiştir. MS analizi sırasında HexCer ve SM standartları sırasıyla m/z oranı 644.4 ve 717.4 olarak gözlemlenene kadar cihaz üzerindeki declustering potential,

entrance potential, collision energy gibi kavramlar değiştirilmiştir. 644.4 ve 717.4 pikleri görüldükten sonra MS/MS yapılmıştır. MS/MS analizi sırasında 644.4 piki parçalandığında en küçük pik olarak 264.4 ve 717.4 piki parçalandığında beklenildiği gibi 184.4 iyonu görülmüştür. Daha sonra pozitif moda prekürsör iyon taraması yapılarak 184.4 iyonunu içeren yağlar tanımlanmıştır. Bu yağlar Sfingomiyelin(SPM) ve Fosfatidilkolin(PC) çeşitleridir (G Liebisch et al., 2004). Pozitif moda 264.4 iyonu için prekürsör iyon taraması yapıldığında Seramid(Cer) Seramid Fosfat(CerP), Glukozil Seramid (GlcCer) ve Laktosil Seramid(LacCer) çeşitleri tanımlanmıştır (G Liebisch et al., 1999).

Optimize Edilen MS/MS Ayarları:

50 cycle 50:800 Da

Collision energy: 5

Declustering potential(DP): 60 Volt

Source/Gas: Curtain Gas(CUR):10

Collision Gas:6

Ion spray Voltage: 3500

Temperature:0

Ion Source gas1:10

Ion source gas2:0

Optimize Edilen Prekürsör İyon Taraması Ayarları:

Pozitif mod

500Da-900Da 264.4 için 10 saniye

600Da-900Da 184.4 için 10 saniye

Declustering potential(DP): 60 Volt

Entrance potential:10

Collision energy: 52

Collision Cell Exit Potential(Cxp):9

Source/Gas: Curtain Gas(CUR):10

Collision Gas:6

Ion spray Voltage: 3500

Temperature:0

Ion Source gas1:10

Ion source gas2:0

Yağ Konsantrasyon Hesaplaması: İzole edilen yağlar Tablo 2 de olduğu gibi metanol, kloroform, 5 mM AF, 10 uM SM and 10 uM HexCer ile karıştırılarak sırasıyla, MS, MS/MS ve prekürsör iyon taraması yapılmıştır. Prekürsör iyon taramasından elde edilen sonuçlar konsantrasyon hesaplamasında kullanılmıştır. Konsantrasyon hesaplaması formül 1’de gösterildiği şekilde yapılmıştır.

Formül 1= $C_u/C_{std}=I_u/I_{std}$ (Yang & Han, 2011)

C_u = bilinmeyen yağın konsantrasyonu

C_{std} =internal standart olarak kullanılan yağın konsantrasyonu

I_u =bilinmeyen yağın pik uzunluğu

I_{std} =internal standart olarak kullanılan yağın pik uzunluğu

Beyin	Fibroblast
5 ul 3.1 mM HexCer	5 ul 3.1 mM HexCer
5 ul 2.8 mM SM	5 ul 2.8 mM SM
978 ul Metanol	978 ul Metanol
271.74 ul 27.6 mM AF	271.74 ul 27.6 mM AF
167 ul Kloroform	167 ul Kloroform
5 ul örnek	50 ul örnek
~1500 ul toplam hacim	~1500 ul toplam hacim

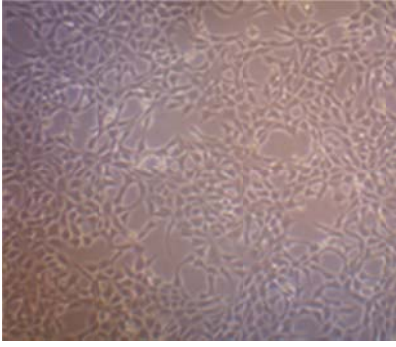
Tablo 2: 10 uM SM ve HexCer standartları ve analiz edilecek örnek içeren karışımların hazırlanışı

BÖLÜM 3

SONUCLAR

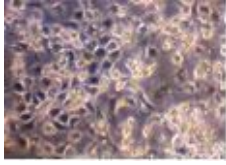
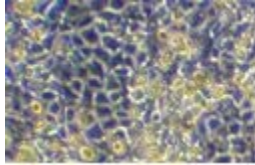


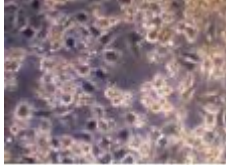
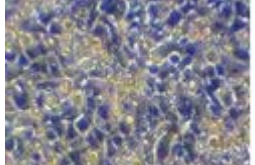
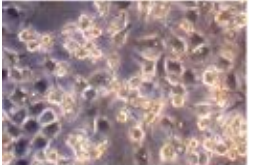
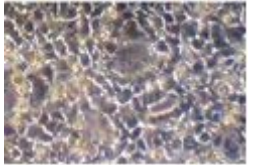
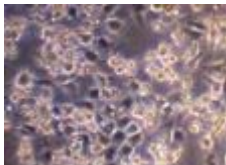
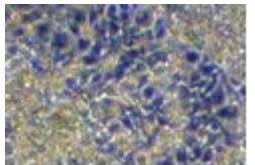
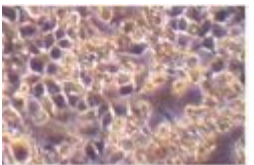
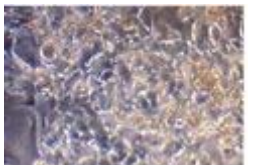
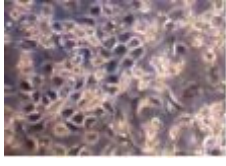
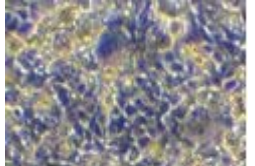
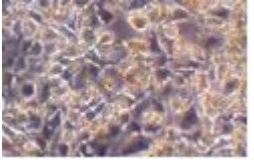

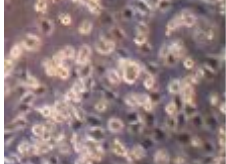
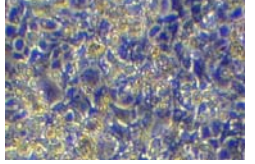
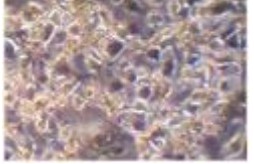

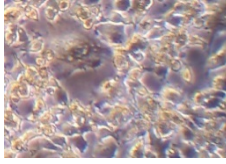
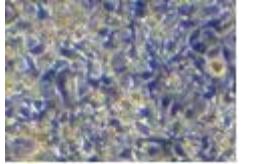
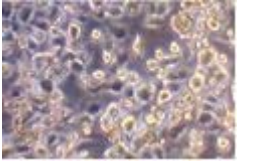

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde Gerçekleştirilen Hücre Hattı Immortalizasyon Sonuçları (Dr. Seyrantepe'nin Laboratuvarı)

ATCC'den alınan CRL-2203 katalog numaralı PA317 LXSN 16E6E7 adlı embriyonik fare fibroblast hücre hattı (Şekil 2) bir paketleme hücre hattıdır. İmmortalizasyon için yeterli viral süpernatant elde edilene kadar bu hücre hattının pasajına devam edilmiştir. Bu hücre hattı bir retrovirus vektörü olan pLXSN16E6E7'in Psi-2 ekotrofik hücre hattına verilmesi ile elde edilmiştir. Elimizdeki hücre hatlarının immortalizasyonunda kullanılmıştır. İçerisinde bulunan pLXSN16E6E7 vektörü insan papiloma virüs (HPV) tip 16 E6 ve E7 genlerini ve Geneticin (G-418) direnç genini içermektedir.



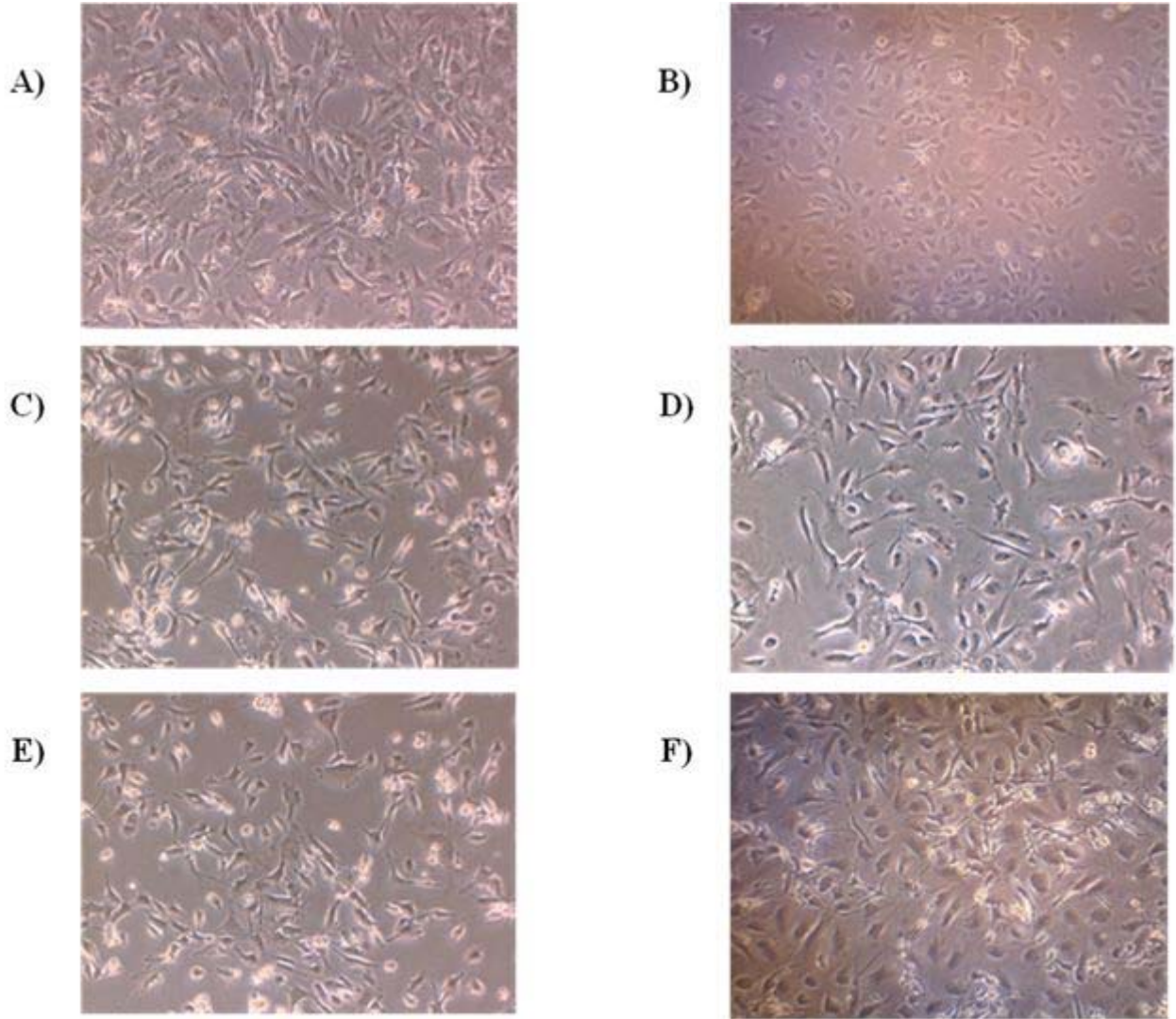
Şekil 2: pLXSN16E6E7 retrovirus vektörünü içeren embriyonik fare fibroblast hattı

COS-7 transfeksiyonu kolay olan bir memeli hücre hattıdır ve çalışmamızda optimizasyon amacı ile tercih edilmiştir. Normal koşullarda COS-7 hücreleri G418 antibiyotiğine karşı dirençli değildir. Viral infeksiyon sonrasında pLXSN16E6E7 viral vektörü alan hücreler neomisin genine de sahip olmuştur. Neomisin geni ise G418 antibiyotiğine dirençlilik kazandırmaktadır. Böylece virüsü alan COS-7 hücreleri G418 antibiyotiği bulunan ortamda yaşarken almayan hücreler ise ölmüştür (Şekil 3). Antibiyotik uygulamasına başlamadan önce tüm hücreler eşit miktardadır. Uygulamanın 4. gününde viral süpernatant miktarı ile bağlantılı olarak çok belirgin bir farklılık gözlemlenmemiştir. Fakat 8. günde hiç viral süpernatant uygulanmayan hücreler tamamen ölürken farklı dozlarda viral süpernatant uygulanan hücreler uygulanan süpernatant miktarı ile doğru orantılı olarak yaşamaya devam etmiştir. 12. günde de ise 8. güne benzer bir tablo izlenmiştir. Sonuç olarak 0.25ml viral süpernatantın immortalizasyon çalışmalarında kullanılabileceğine karar verilmiştir.

	0. Gün	4. gün	8. gün	12. gün
0 ml Viral Süpernetant				
0.25 ml Viral Süpernetant				
0.5 ml Viral Süpernetant				
1 ml Viral Süpernetant				
1.5 ml Viral Süpernetant				
2 ml Viral Süpernetant				

Şekil 3: Farklı dozlarda (0ml, 0.25ml, 0.5ml, 1ml, 1.5ml, 2ml viral süpernetant) viral infeksiyondan sonra 12 gün boyunca 400µg/ml G418 antibiyotiği uygulanan Cos-7 hücrelerinin 0.,4., 8. ve 12. gündeki görüntüsü

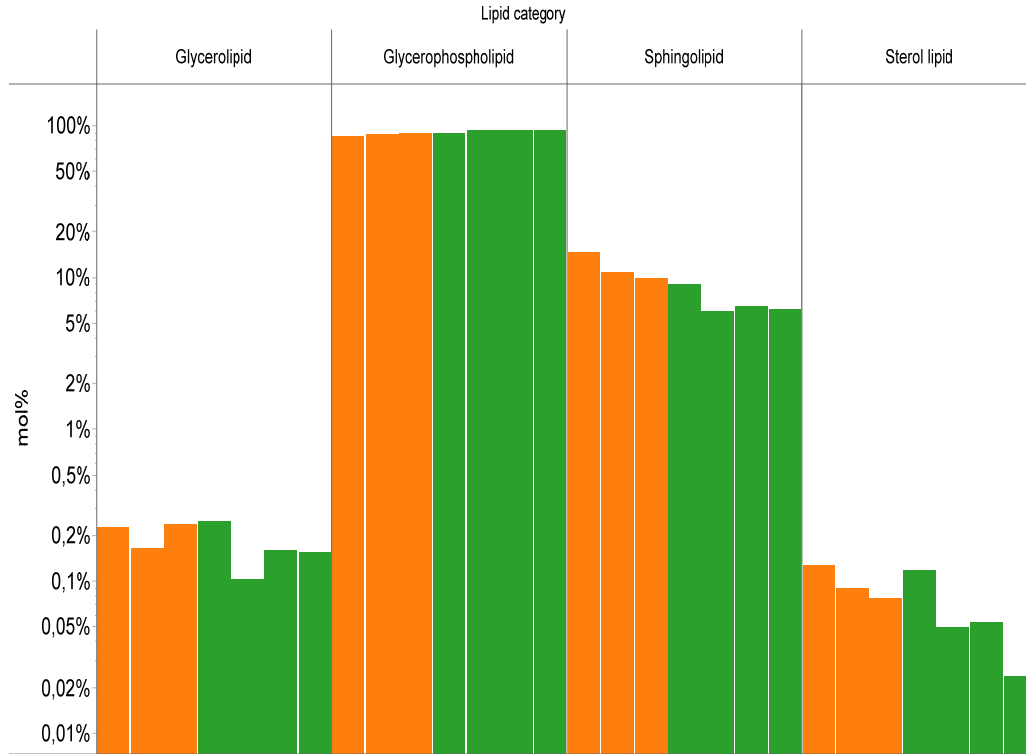
8 farklı genotipteki (*Normal*, *Neu4^{-/-}*, *Neu1^{-/-}*, *HexA^{-/-}*, *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}*, *HexA^{-/-}Neu1^{-/-}*, *Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*, *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*) farelerden elde edilmiş fibroblastlardan tümünün immortalizasyonu projemiz süresince tamamlanmıştır. Normal ve *Neu4^{-/-}* haric tüm hücre hattalarının orijinal görüntüleri aşağıda sunulmuştur (Şekil 4).



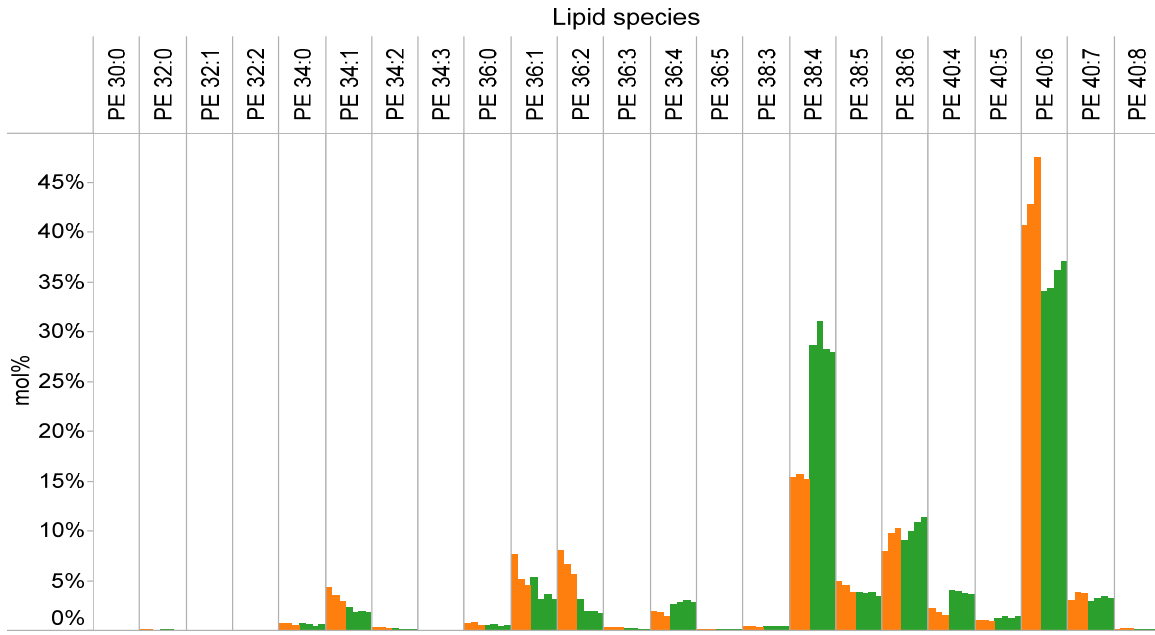
Şekil 4: A) *Neu1^{-/-}*, B) *HexA^{-/-}*, C) *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}*, D) *HexA^{-/-}Neu1^{-/-}*, E) *Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*, F) *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}* farelerinden elde edilmiş fibroblastların immortalizasyondan sonraki orijinal görüntüsü.

Beyincik (serebellum) ve hipokampus'da MS ile yapılan ön yağ analizi sonuçları (Dr. Ejsing'in Laboratuvarı, Danimarka)

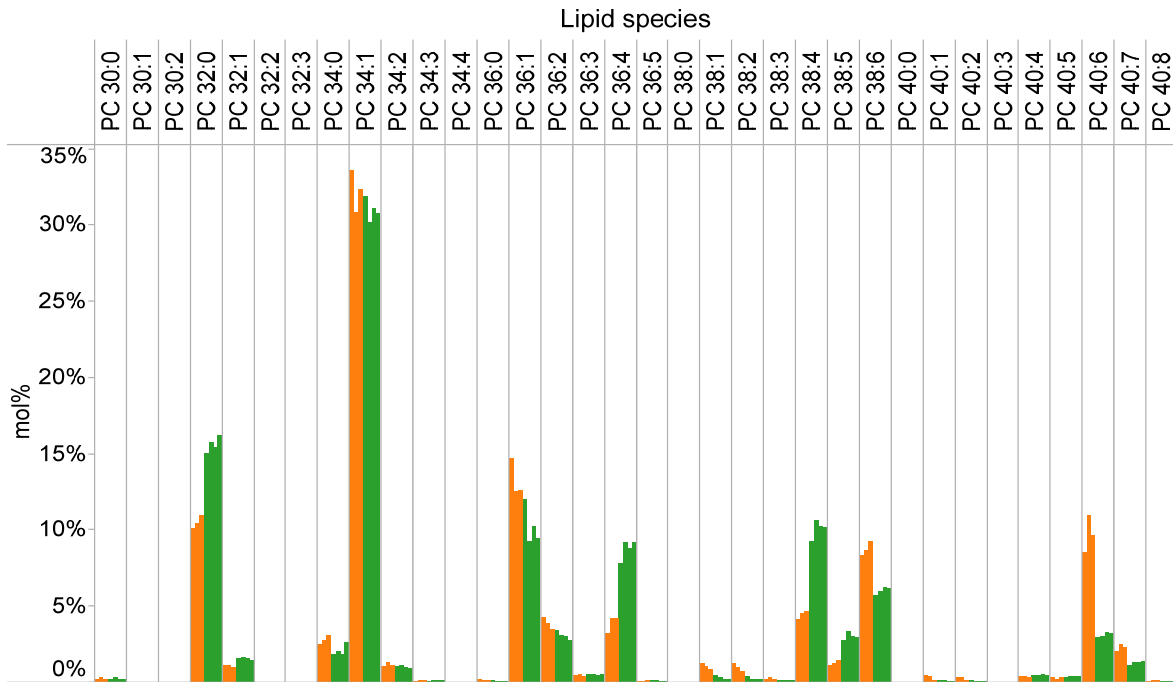
Dr. Ejsing'in kendisine gönderilen normal farelerin öncelikle beyincik ve hipokampus bölgelerinden elde edilen yağlar ile yaptığı optimizasyon çalışmaları hangi yağların kütle spektrometresi ile tesbit edilebileceğini göstermiştir. Analiz edilebilen yağ çeşitleri ve beyin beyincik ve hipokampus bölgelerinde bulunma oranları (% mol) için oluşturulan grafikler Şekil 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12'de gösterildiği gibidir.



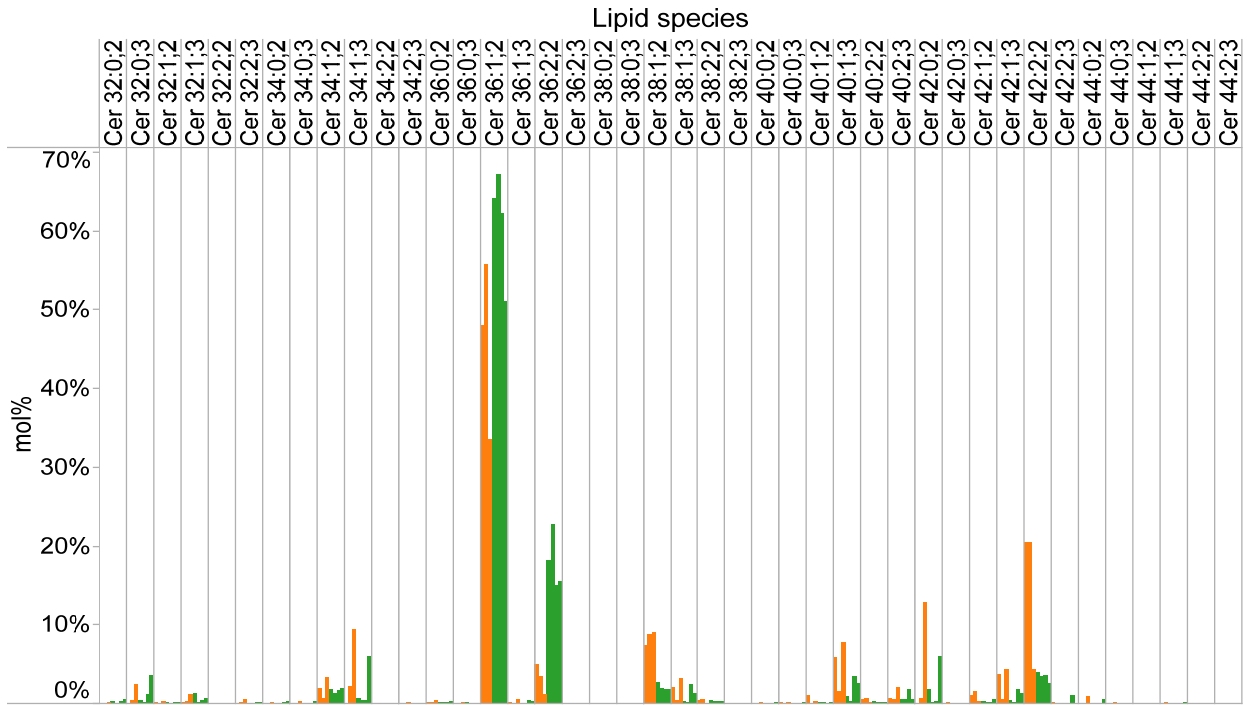
Şekil 5: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen yağ kategorileri (gliserolipid, gliserofosfolipid, sfingolipid ve sterolipid) ve beynin bu bölgelerinde bulunma oranları (% mol)



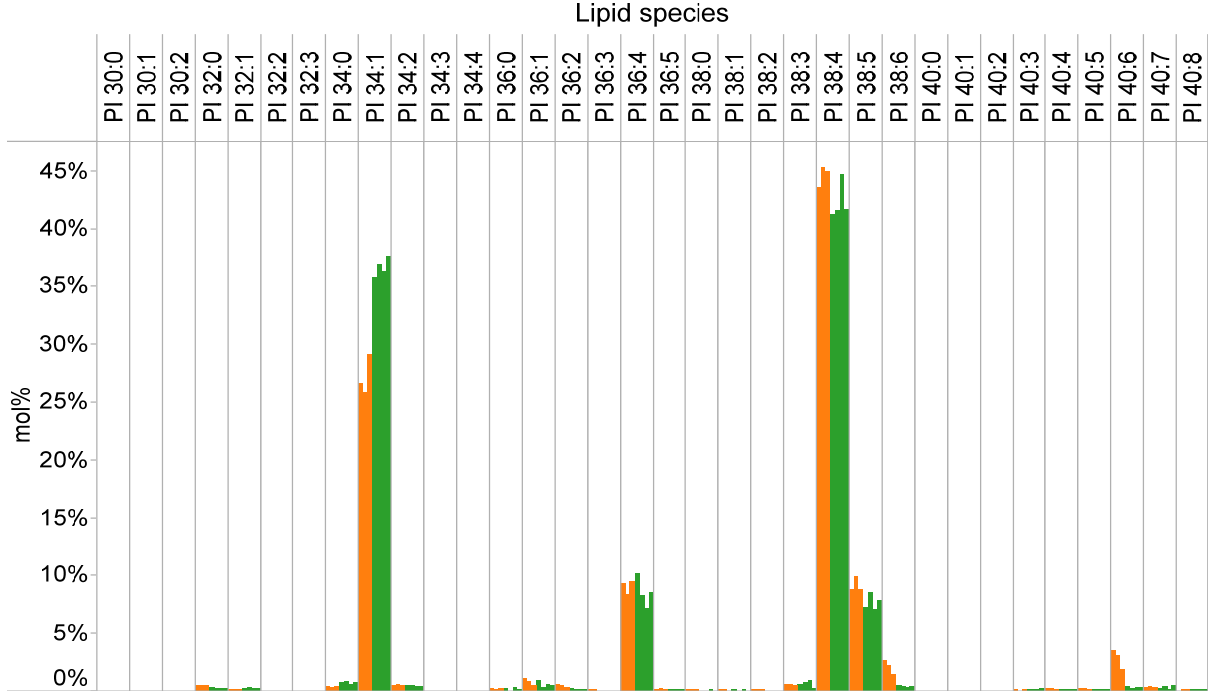
Şekil 6: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı fosfatidiletanolamin (PE) yağı türleri ve beyinin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)



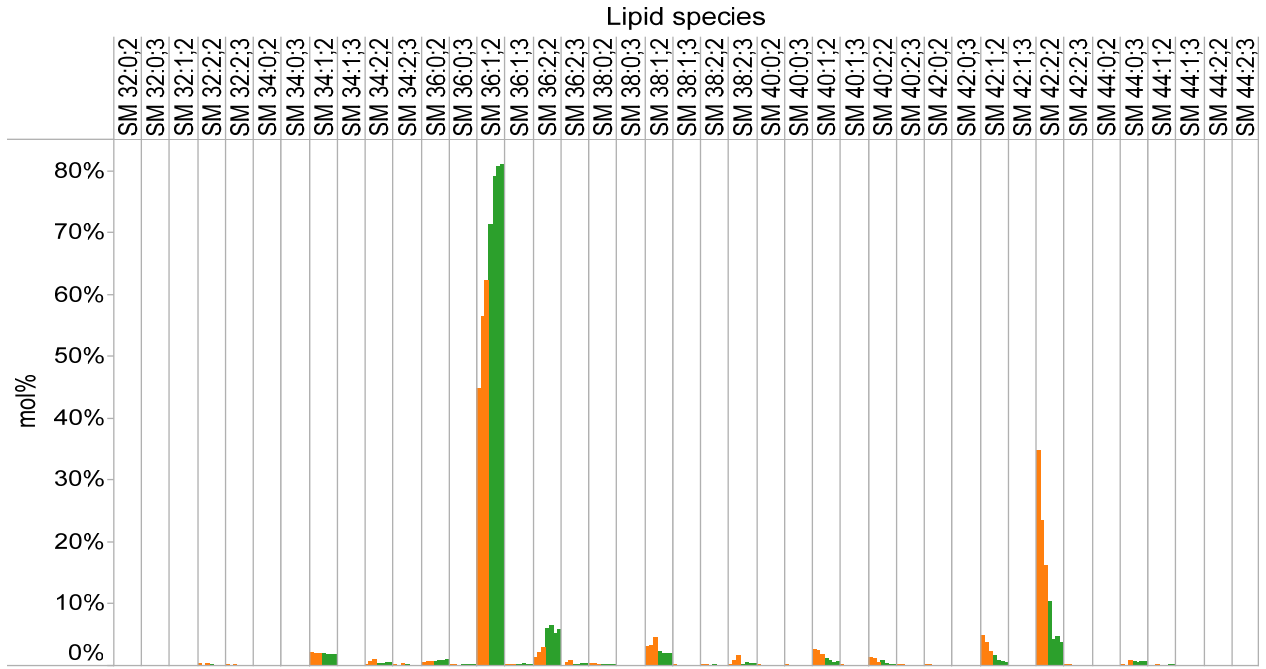
Şekil 7: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı fosfatidilkolin (PC) yağı türleri ve beyinin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)



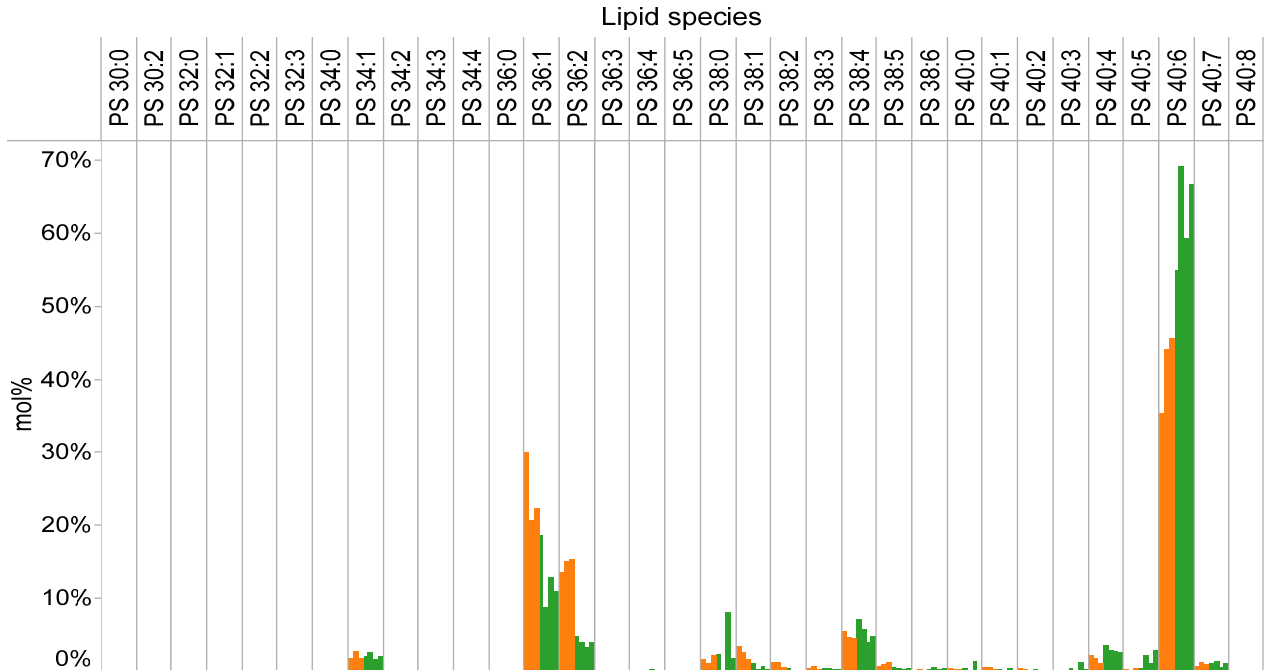
Şekil 8: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı seramid (Cer) yağı türleri ve beyin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)



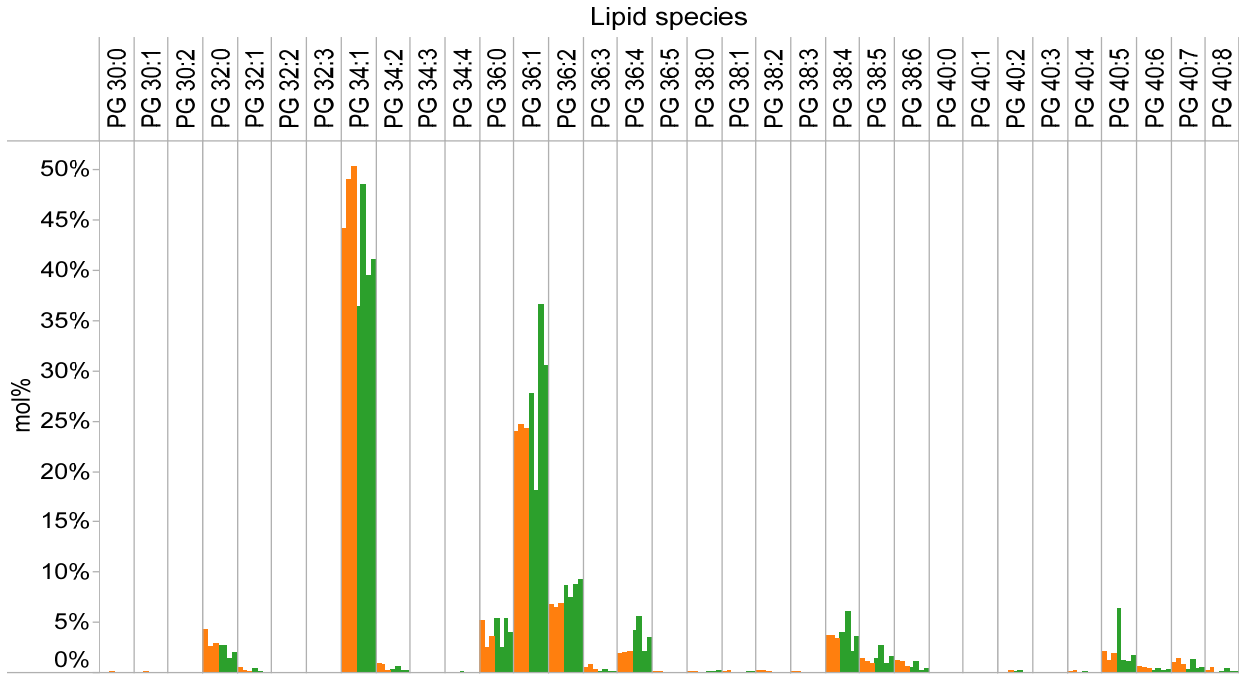
Şekil 9: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı fosfatidilinositol (PI) yağı türleri ve beyin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)



Şekil 10: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampüs (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı sfingomiyelin (SM) yağı türleri ve beynin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)

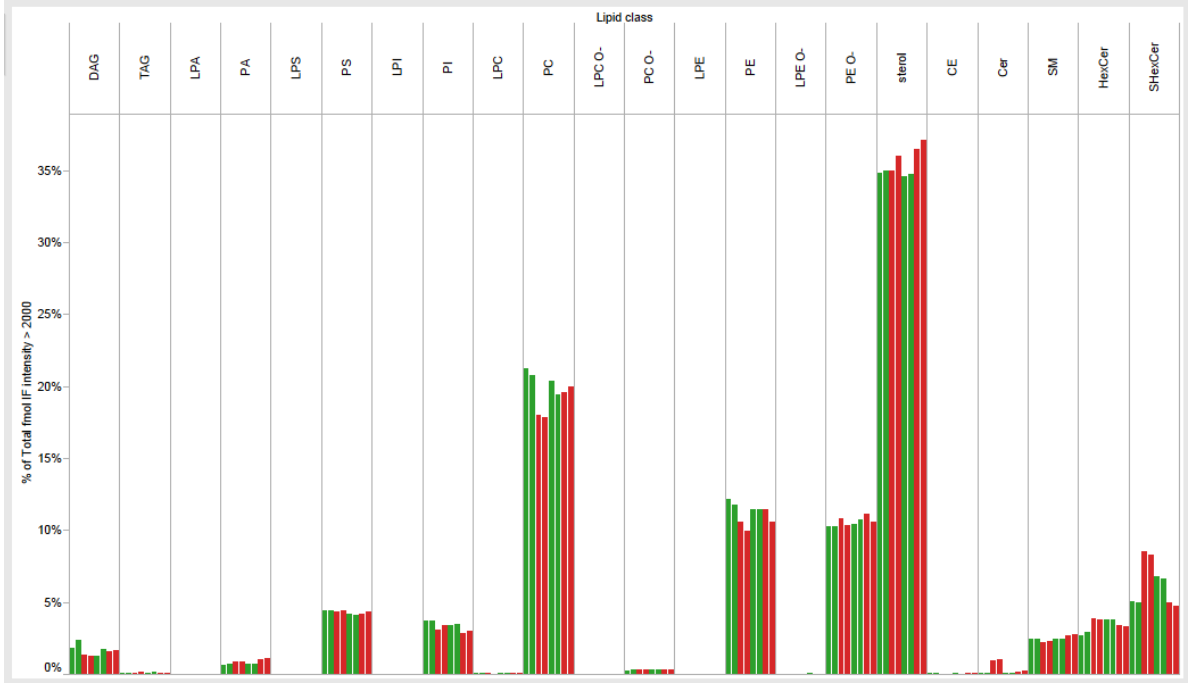


Şekil 11: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampüs (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı fosfatidilserin (PS) yağı türleri ve beynin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)

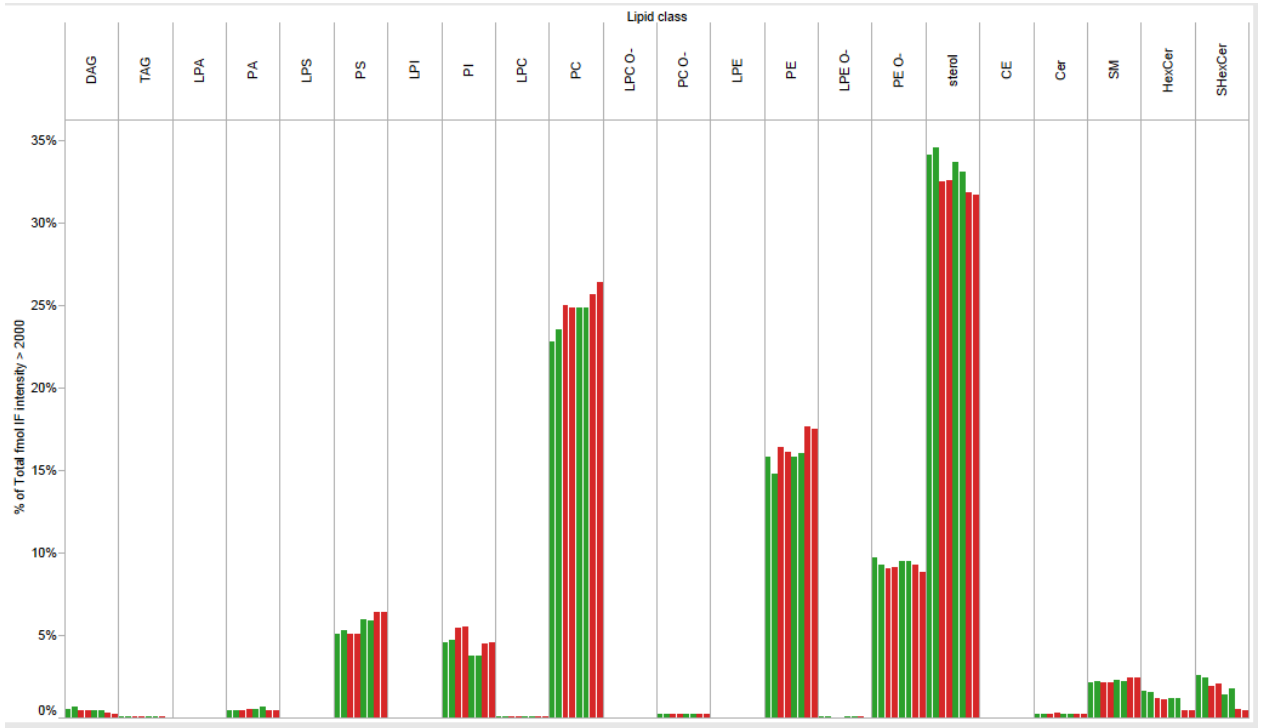


Şekil 12: Beyincik (turuncu barlar) ve hipokampus (yeşil barlar) bölgelerinde gözlemlenebilen farklı fosfatidilgliserol (PG) yağı türleri ve beyinin bu bölgelerinde bulunma oranları (%mol)

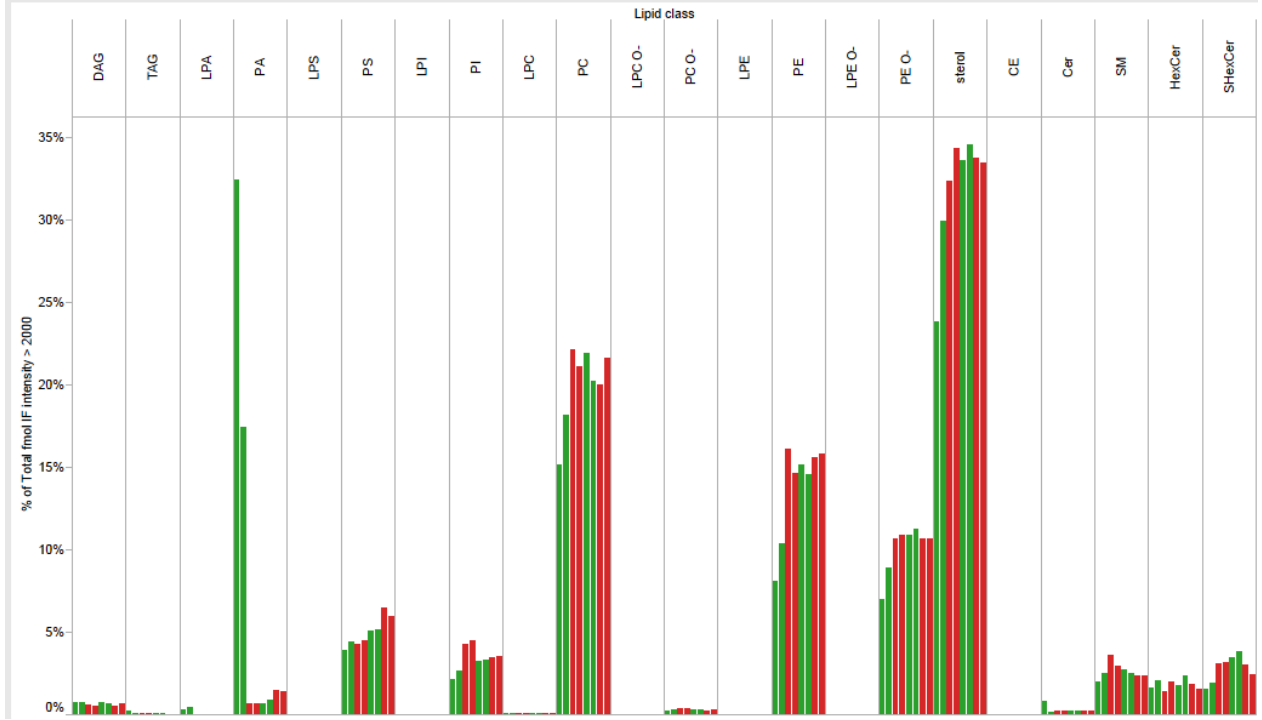
Projemiz kapsamında İYTE' ye yapması planlanan ziyareti çeşitli nedenlerle gerçekleştirilemeyen Dr. Ejsing'in kendi talebi üzerine zaman kazanmak amacı ile örnekleri kendi laboratuvarında analiz etmek istemiştir. Dr. Ejsing'in laboratuvarına gönderilen 5-6 aylık 8 farklı genotipteki fare beyininden *Normal* ve *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}* genotipindeki farelerin hipokampus, talamus-hipotalamus ve serebellum bölgelerinden yağ özütleri elde edilmiş ve QTRAP4000 kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Yine Almanya Deutches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Lipid Pathobiochemistry Group, Heidelberg'den Prof. Dr. Roger Sandorf ile iş birliği yapılmış 5-6 aylık (*Normal*, *Neu4^{-/-}*, *HexA^{-/-}*, *Neu1^{-/-}*, *HexA^{-/-}Neu1^{-/-}*, *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}*, ve *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*) genotipinde fare beyinleri Dr.Sandorf'un laboratuvarına sadece gangliosidler kütle spektrometresi ile analizi edilmiştir. Bu analizlerde triple quadrupole instrumen (VG Micromass (Cheshire, UK) model Quattro II) cihazı kullanılmıştır.



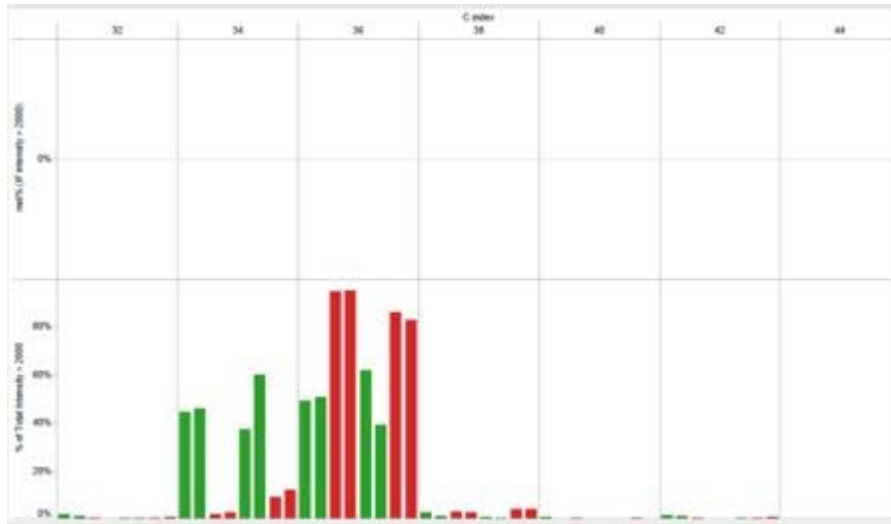
Şekil 13. WT (yeşil barlar) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri **cerebellum bölgesinde** farklı yağ türlerinin karşılaştırılması



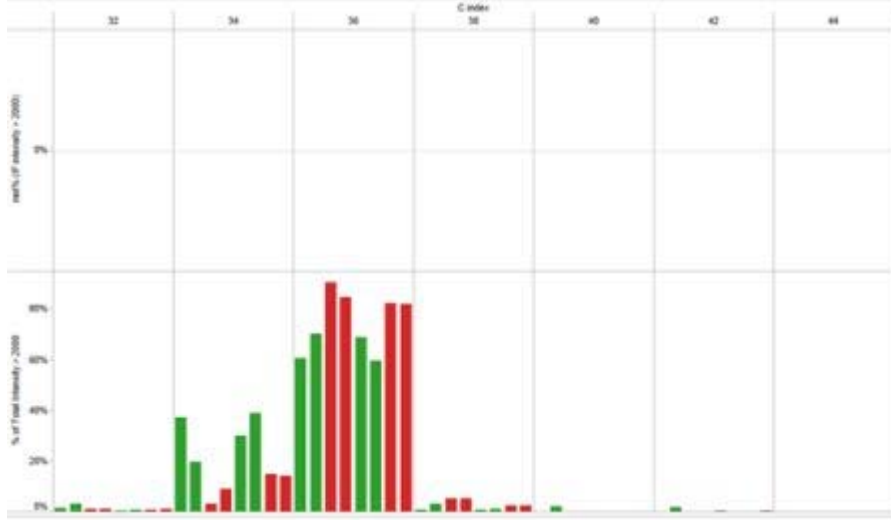
Şekil 14. WT (yeşil barlar) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri **hipokampus bölgesinde** farklı yağ türlerinin karşılaştırılması



Şekil 15. WT (yeşil barlar) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri **talamusun** bölgesinde farklı yağ türlerinin karşılaştırılması



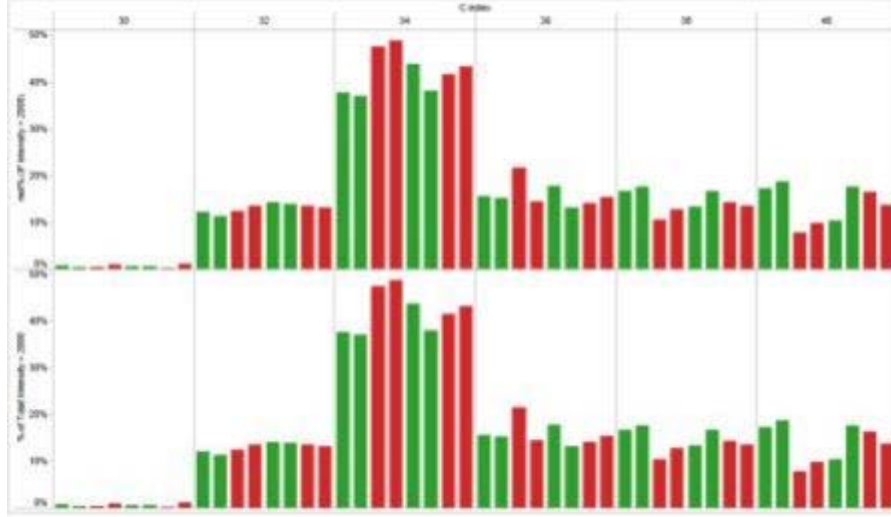
Şekil 16. WT (yeşil barlar) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri **talamus** bölgesinde GM2 miktarı



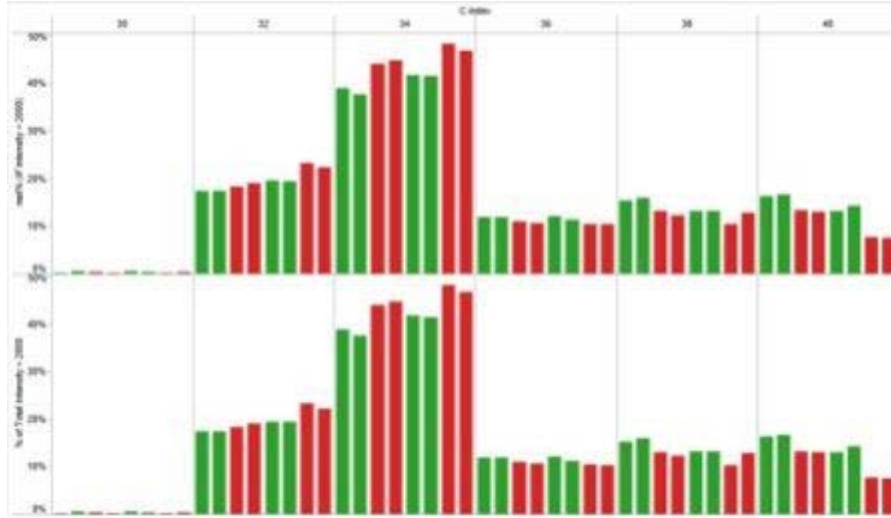
Şekil 17. WT (yeşil barlar) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri hipokampus bölgesinde GM2 miktarı



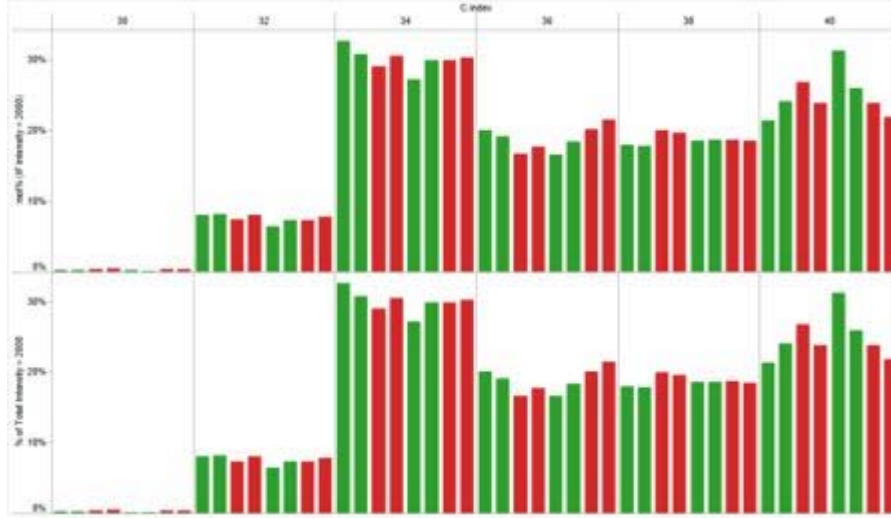
Şekil 18. WT (yeşil barlar) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri serebellum bölgesinde GM2 miktarı



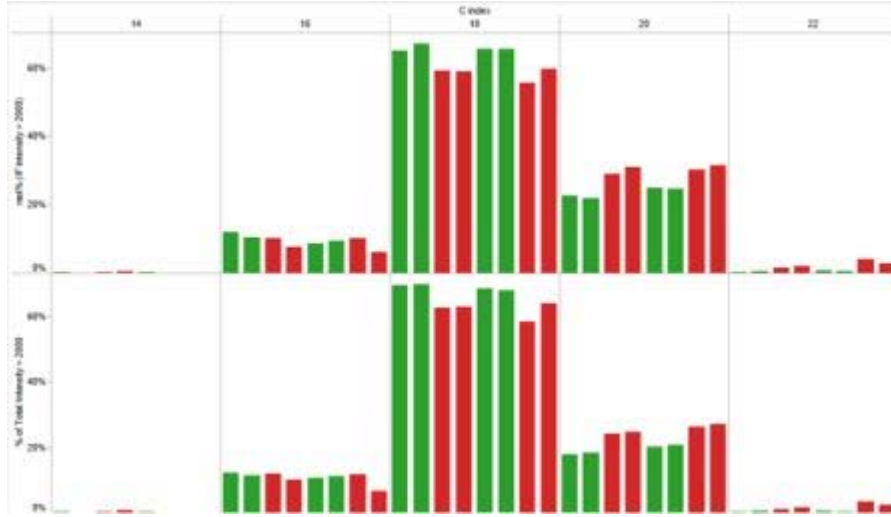
Şekil 19. WT (yeşil barlar) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri **talamus** bölgesinde PC O- miktarı



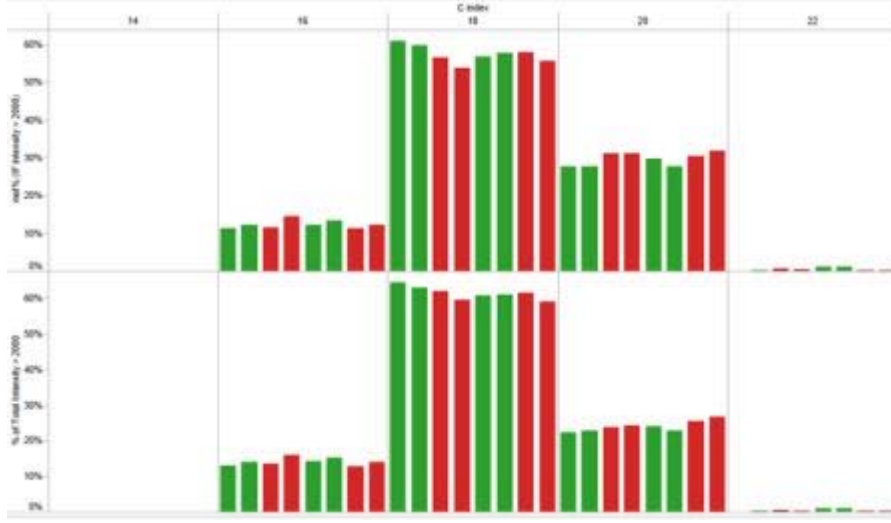
Şekil 20. WT (yeşil barlar) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri **hipokampüs** bölgesinde gözlemlenen PC O- miktarı



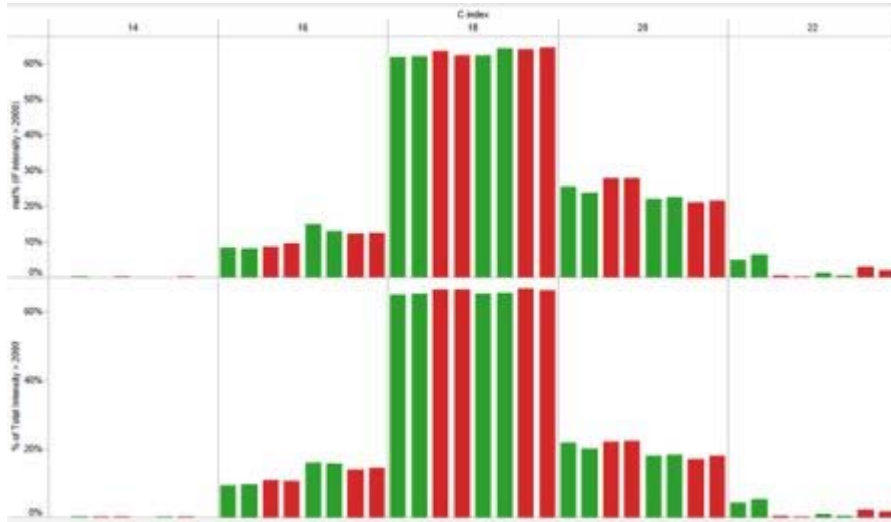
Şekil 21. WT (yeşil barlar) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyin **serebellum** bölgesinde gözlemlenen PC O- miktarı



Şekil 22. WT (yeşil barlar) HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} (kırmızı barlar) fare beyinleri **serebellum** bölgesinde LPI miktarı



Şekil 23. WT (yeşil barlar) ve $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}$ (kırmızı barlar) fare beyinleri hipokampüsün bölgesinde LPI miktarı



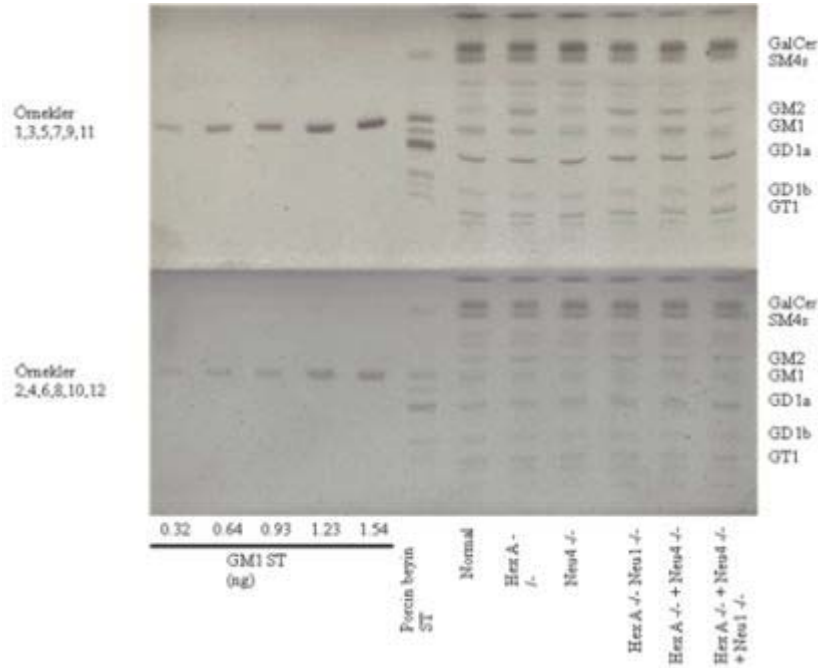
Şekil 24. WT (yeşil barlar) ve $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}$ (kırmızı barlar) fare beyinleri **talamus** bölgesinde LPI miktarı

Dr. Ejsing 5-6 aylık $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}$ fare beynini normal (gen eksikliği olmayan kontrol) fare beynine göre cerebellum, hipokampüs ve talamus bölgelerinde elde edilen yağlar ile yaptığı kütle spektrometresi çalışması ile karşılaştırmıştır (n=2). Yağ miktarları analiz edildiğinde $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}$ farelerinde C-36 GM2 miktarı talamus (Şekil 16) ve hipokampüste (Şekil 17), C-38 GM2 miktarın serebellumda (Şekil 18) C-34 PC O- miktarı

(Şekil 19) talamus ve hipotalamusta (Şekil 20) ve C-20 LPI miktarında serebelumda (Şekil 22) artış olduğu tesbit edilmiştir.

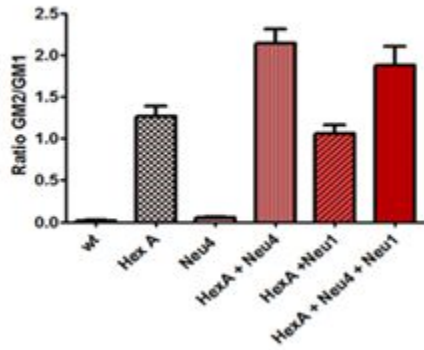
Gangliosidlerin Kütle Spektrometri ile Analiz Sonuçları (Dr. Sandhoff 'un Laboratuvarı, Almanya)

Dr. Ejsing gangliosidlerin MS analizi konusundan kendisinin çok az deneyimi olduğunu bu denenele örneklerimizin bu yağ türü için analizinde çok daha deneyimli bir başka grupta çalışmamızı tavsiye etmesi üzerine Almanya Mannheim Üniversitesinde bulunan Prof. Dr. Roger Sandoff ile yapılan iş birliği yapılmıştır. Bu işbirliği çerçevesinde 5-6 aylık (*Normal*, *Neu4^{-/-}*, *HexA^{-/-}*, *Neu1^{-/-}*, *HexA^{-/-}Neu1^{-/-}*, *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}*, ve *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*) farklı genotipdeki fare beyinlerinden özütler Dr.Sandoff'un laboratuvarına gönderilmiştir. İnce tabaka kromatografisi (TLC) (Şekil 25) ve kütle spektrometresi (Şekil 26-27) ile yağ özütü analizi yapılmıştır (n=2). GM2/GM1 oranı tüm beyin kullanılarak yapılan kütle analizlerinde *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}* farelerde *HexA^{-/-}* farelerle karşılaştırıldığında % 60 oranında artmış olmasına rağmen *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}* ve *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}* arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Buna karşılık GD1, GD2, GT1 ve SM4s gangliosid miktarlarında *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}* fare beyinlerinde diğer farelerle karşılaştırıldığında %200 oranında artış tesbit edilmiştir (Şekil 26).

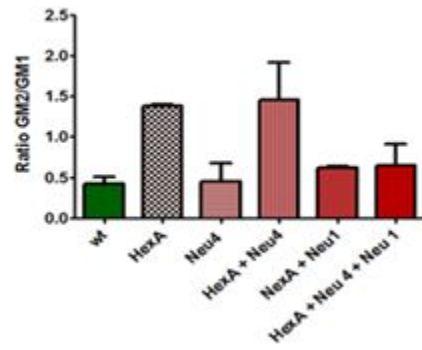


Şekil 25. 5-6 aylık *Normal*, *Neu4^{-/-}*, *HexA^{-/-}*, *Neu1^{-/-}*, *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}*, ve *HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}* genotipindeki farelerinin beyinlerinden elde edilen yağ özütleri ile yapılan ince tabaka kromatografisi(TLC)(n=2)

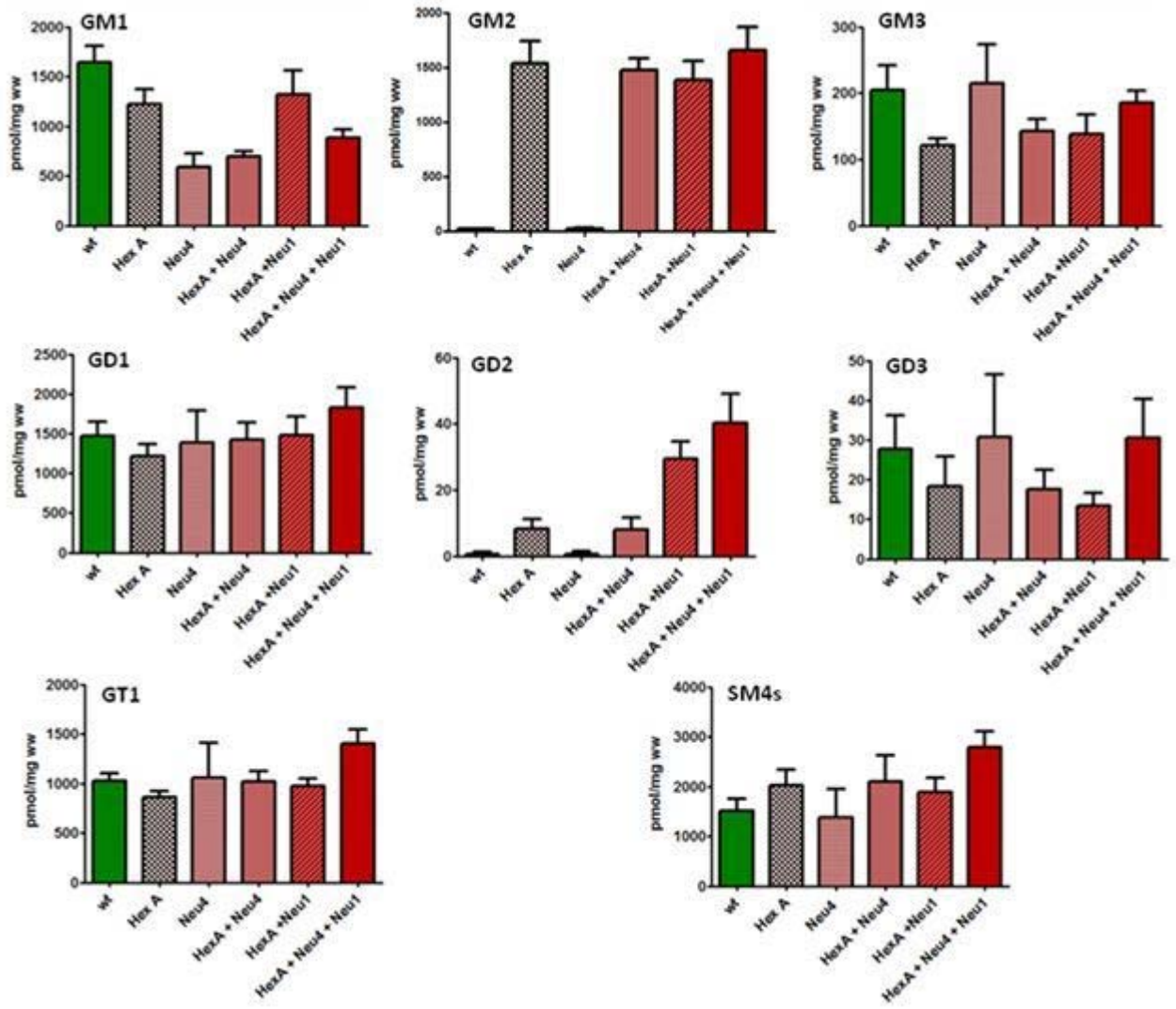
Kütle spektrometresi sonucu (n = 2*3)



TLC sonucu (n = 2)



Şekil 26. 5-6 aylık Normal, Neu4^{-/-}, HexA^{-/-}, HexA^{-/-} Neu1^{-/-}, HexA^{-/-}Neu4^{-/-}, ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-} Neu1^{-/-} genotipindeki farelerinin beyinlerinden elde edilen yağ özütleri ile yapılan kütle spektrometresi ve ince tabaka kromatografisi (TLC) analizinde GM2/GM1 oranının karşılaştırılması



Şekil 27. 5-6 aylık Normal, Neu4^{-/-}, HexA^{-/-}, HexA^{-/-} Neu1^{-/-}, HexA^{-/-}Neu4^{-/-}, ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-} Neu1^{-/-} genotipindeki farelerinin beyinlerinden elde edilen yağ özütleri ile yapılan kütle spektrometresi analizi.

Izmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kütle Spektrometresi Laboratuvarında Elde Edilen Sonuçlar

Beyin Dokusundan Yapılan Prekürsor İyon Taraması; Sfingomiyelin ve Fosfatidilkolin Çeşitlerinin Tanımlanması

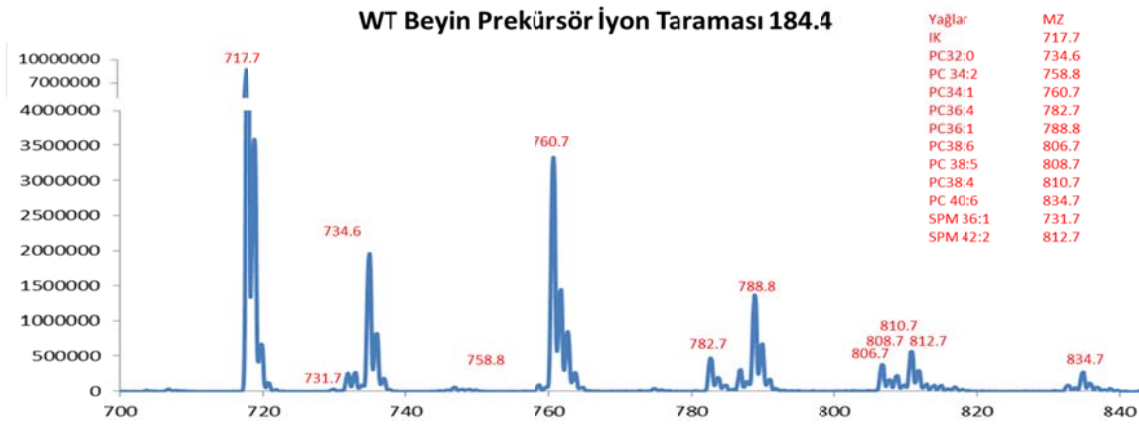
Prekürsor iyon taraması ile sadece elimizde bulunan 5-6 aylık WT ve 7 mutant (HexA, Neu4, Neu1, Neu4HexA, Neu4Neu1, HexANeu1 ve Neu4HexANeu1) her bir fare beyinde tek tek olacak şekilde ve daha önce elde edilen deneyimler çerçevesinde Fosfatidilkolin ve Sfingomiyelin yağları tanımlanmıştır.

Sfingomiyelin ve Fosfatidilkolin çeşitleri pozitif modta 184.4 iyonunu tarayarak yapılmıştır.

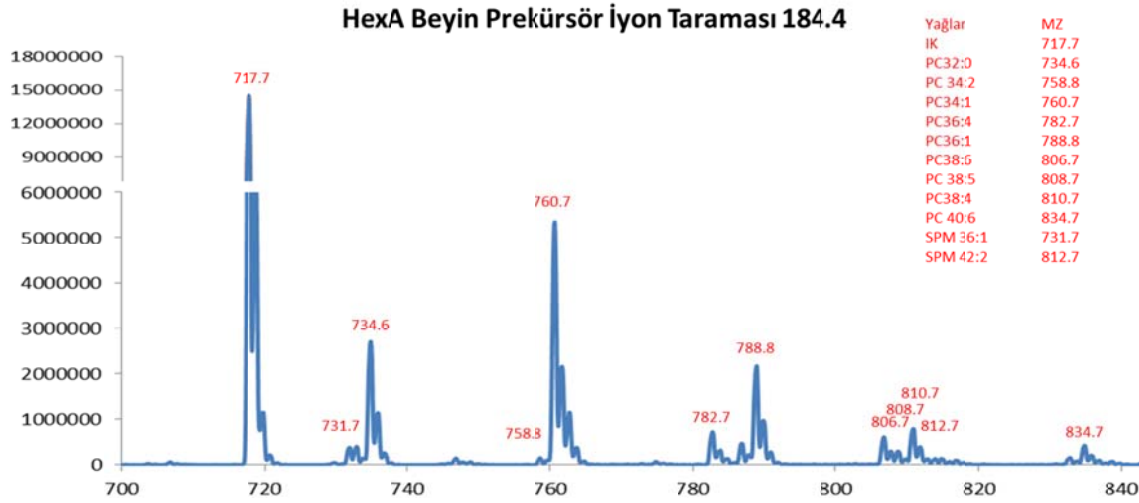
İnternal kontrol olarak ve konsantrasyon hesaplamada kullanılan sfingomiyelinin M/Z oranı 717.7 dir. Farebeyninde tanımlanan diğer Fosfatidilkolin ve Sfingomiyelin çeşitleri tabloda gösterilmiştir. Örneğin; PC32:0 çift bağ içermeyen 32 karbonlu fosfatidilkolindir. PC34:2 2 adet çift bağ içeren 34 karbonlu fosfatidilkolindir. SPM36:1 1 adet çift bağ içeren 36 karbonlu sfingomiyelin çeşitidir.

Fosfatidilkolin		Sfingomiyelin	
Yağ çeşidi	m/z	Yağ çeşidi	m/z
PC32:0	734.6	SPM 36:1	731.7
PC 34:2	758.8	SPM 42:2	812.7
PC36:4	782.7		
PC36:1	788.8		
PC38:6	806.7		
PC 38:5	808.7		
PC38:4	810.7		
PC 40:6	834.7		

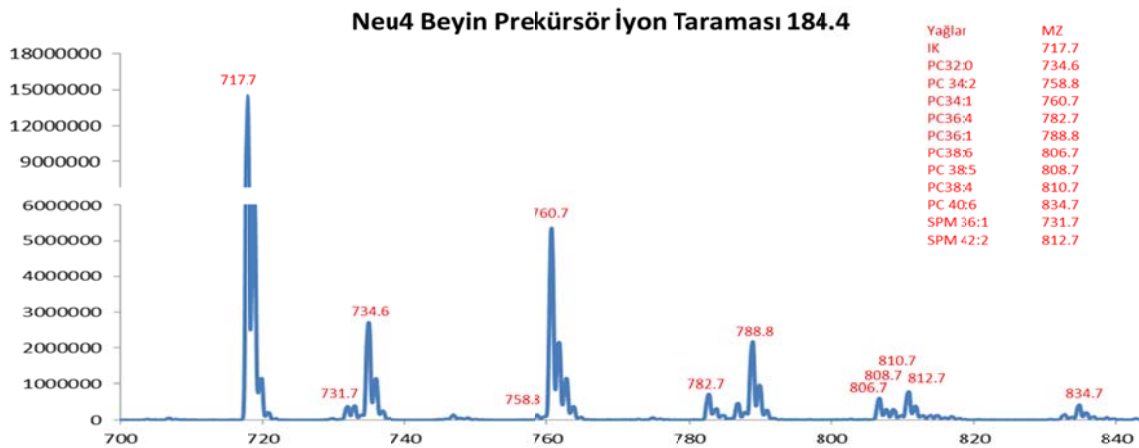
Tablo 3: Beyin dokusunda tanımlanan Fosfatidilkolin ve Sfingomiyelin çeşitleri



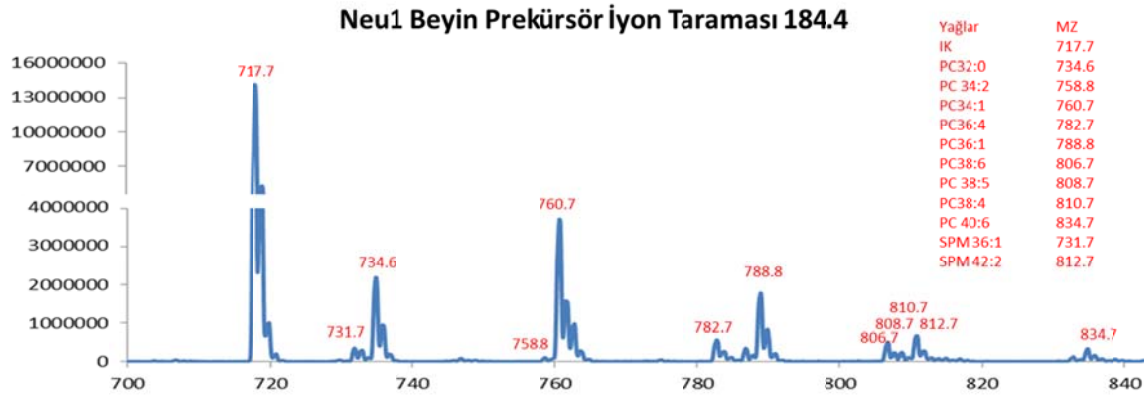
Şekil 28: WT fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



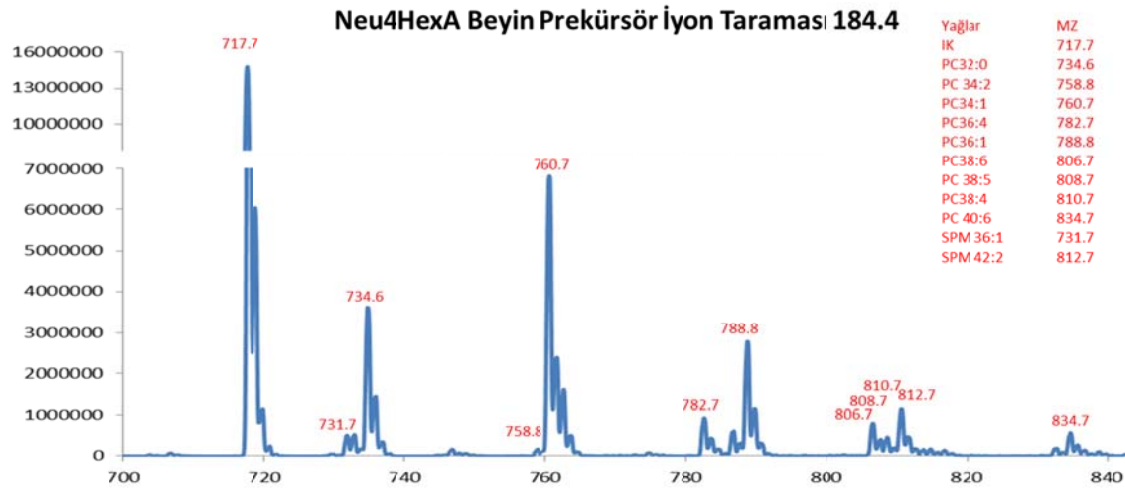
Şekil 29: HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



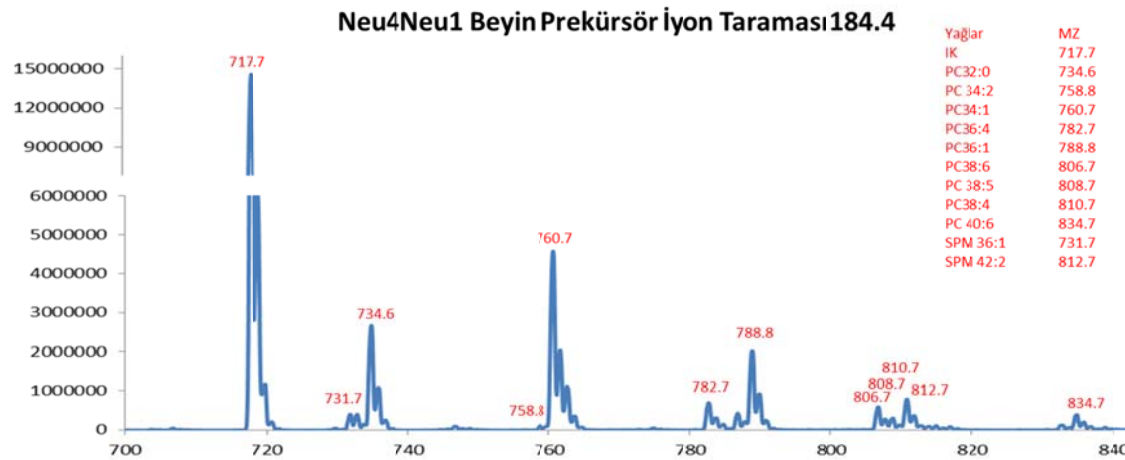
Şekil 30: Neu4 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



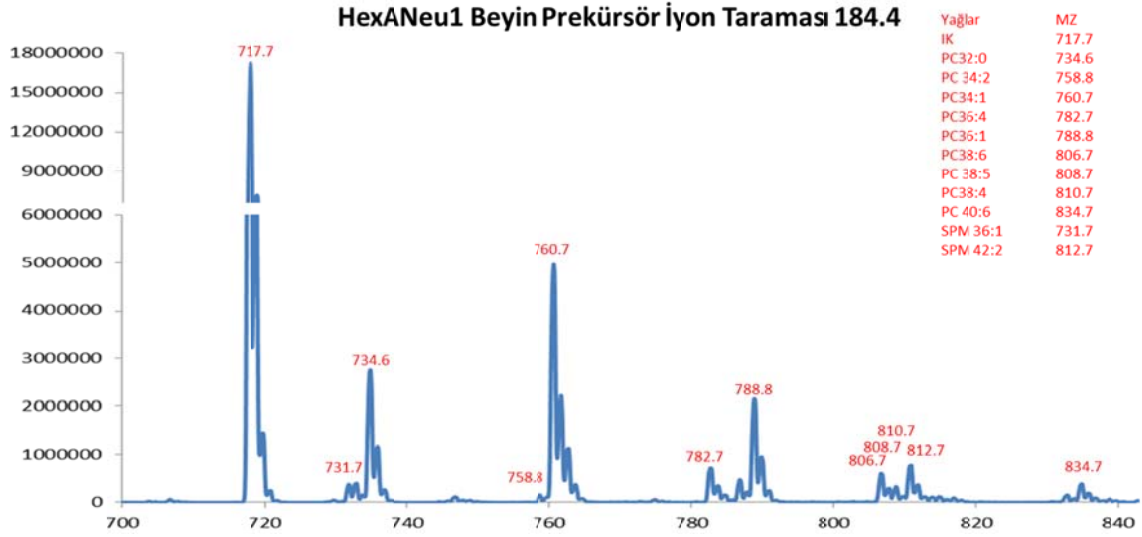
Şekil 31: Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması "184.4" M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



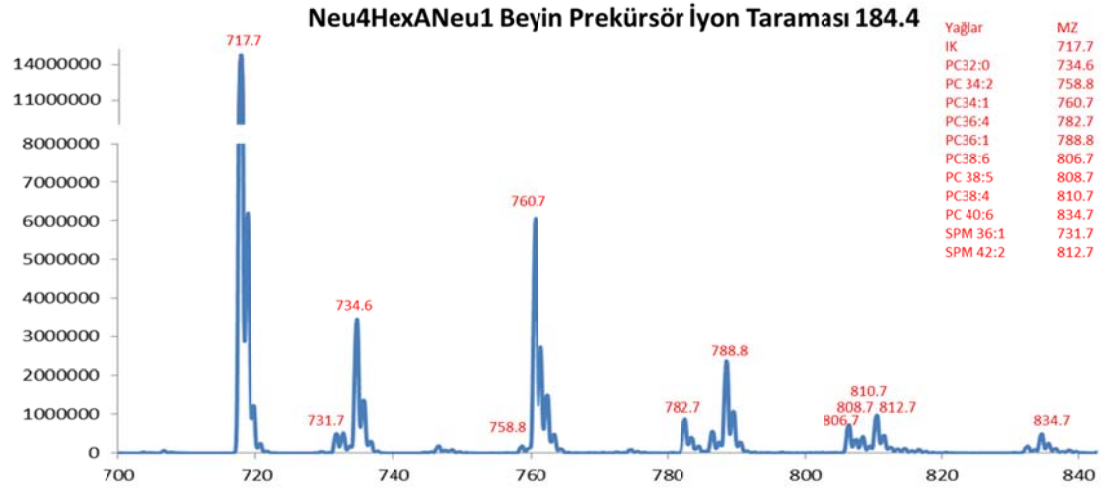
Şekil 32: Neu4HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması "184.4" M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



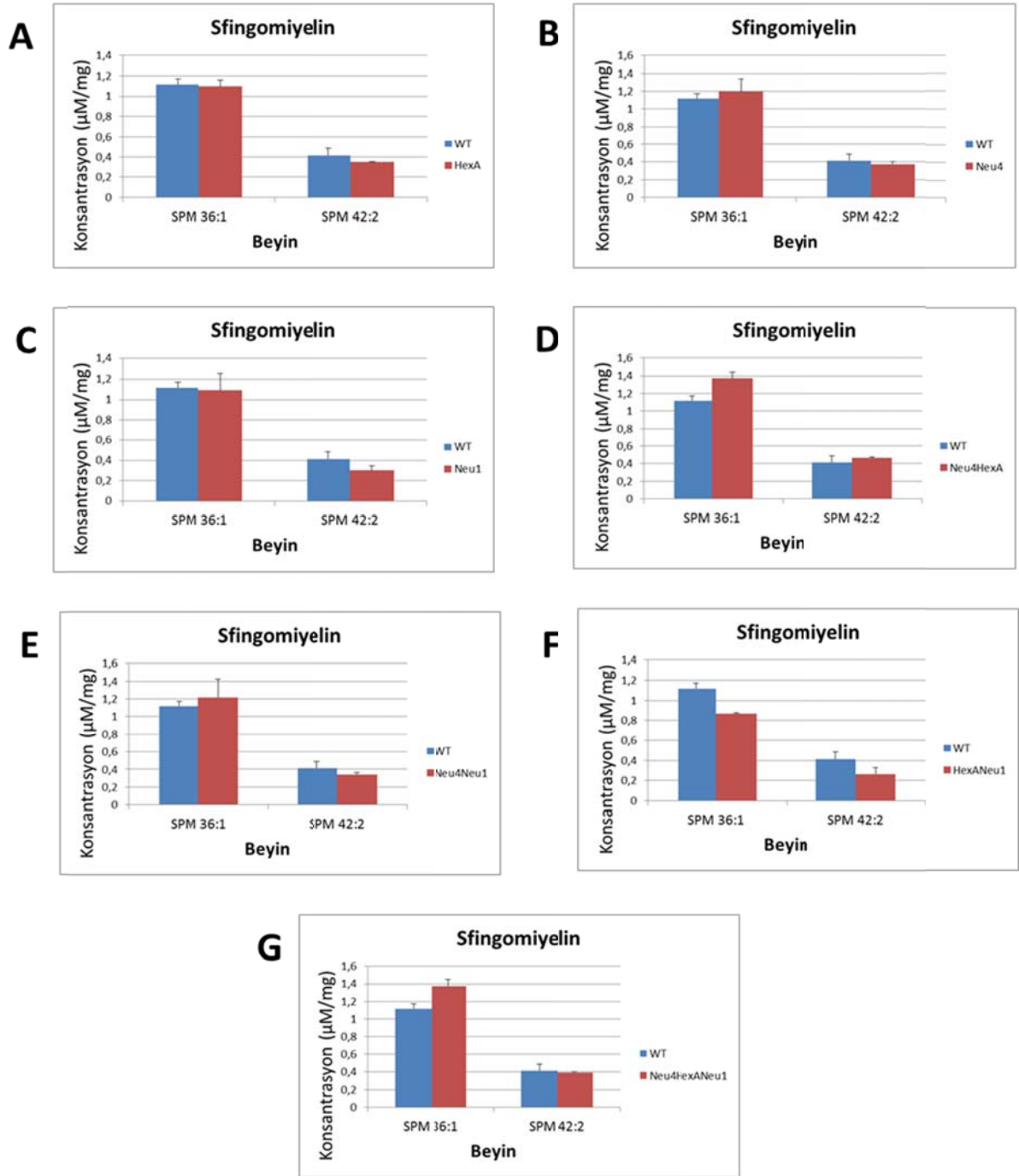
Şekil 33: Neu4Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması "184.4" M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



Şekil 34: HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.

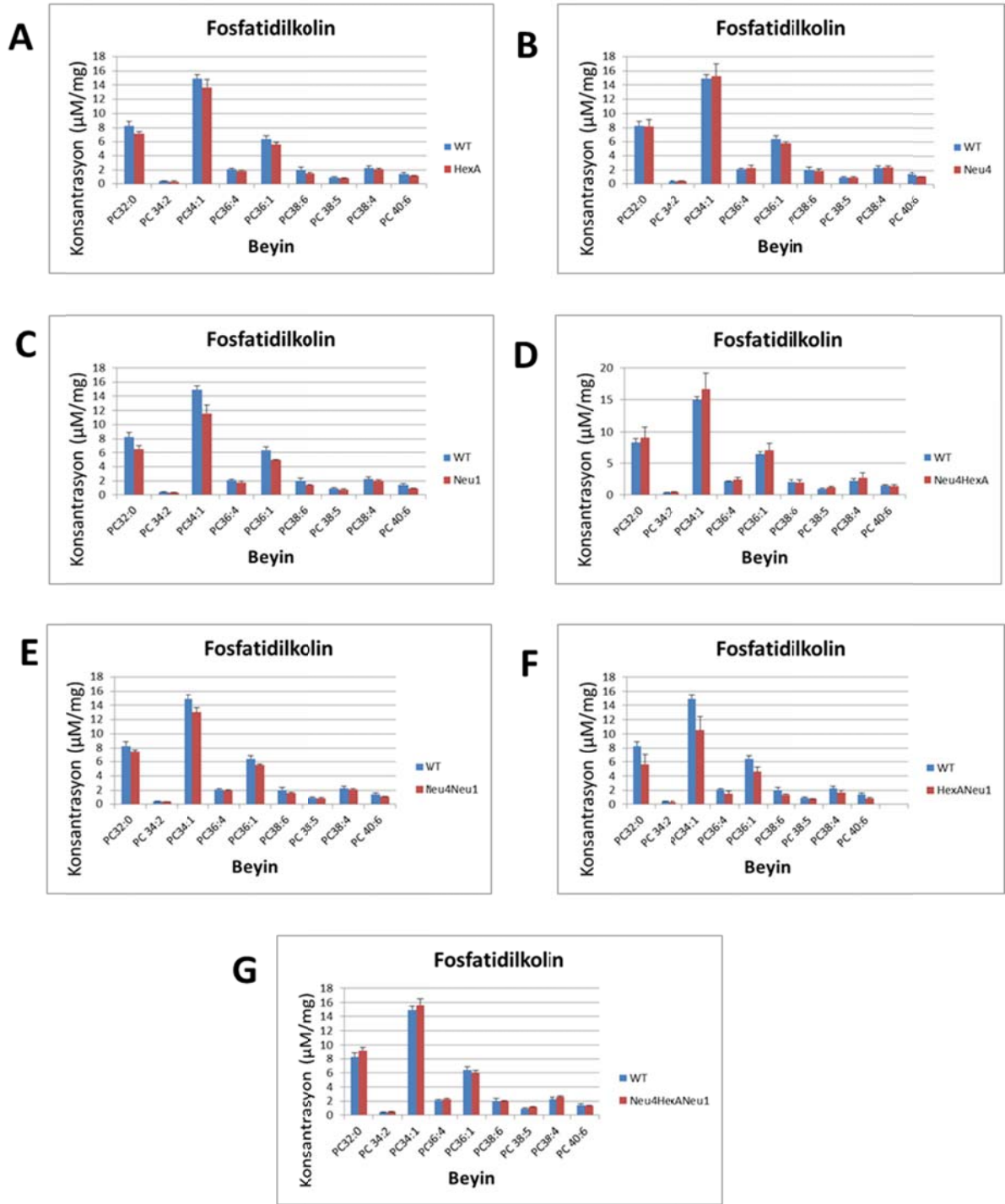


Şekil 35: Neu4HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



Şekil 36: WT-HexA (A), WT-Neu4(B), WT-Neu1 (C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), WT-HexANeu1(F) ve HexA-Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki **Sfingomiyelin** miktarı

36: 1 Sfingomiyelin miktarında WT-HexA, WT-Neu4, WT-Neu1, WT-Neu4Neu1 arasında önemli bir fark tesbit edilmezken, HexANeu4, HexANeu1 ve Neu4HexANeu1 da WT göre %20-35 oranında artış gözlenmiştir. 42:2 Sfingomiyelin miktarında ise örnekler arasında fark yoktur.



Şekil 37: WT-HexA (A), WT-Neu4 (B), WT-Neu1 (C), WT-Neu4HexA (D), WT-Neu4Neu1(E), WT-HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki **Fosfatidilkolin** miktarı

Neu1 enzim eksikliğine bağlı olarak sadece Wt-Neu1, Wt-HexA-Neu1 ve Wt Neu4-Neu1 da farklı orandaki fosfatidilkolin miktarı azalmış olmasına rağmen Wt-HexANeu4Neu1 farelerde artış vardır.

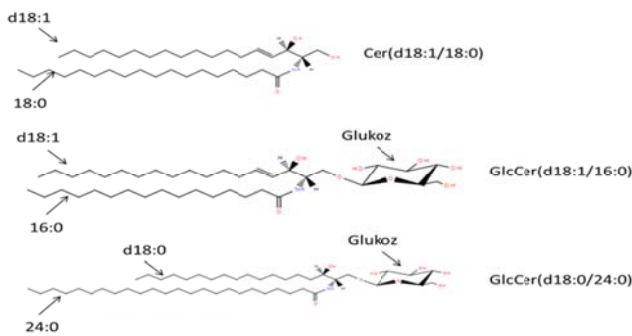
Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid Çeşitlerinin Tanımlanması

Prekürsör iyon taraması ile WT ve 7 mutant (HexA, Neu4, Neu1, Neu4HexA, Neu4Neu1, HexANeu1 ve Neu4HexANeu1) fare beyinde Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid çeşitleri tanımlanmıştır.

Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid çeşitleri pozitif modta 264.4 iyonunu tarayarak yapılmıştır. İnternal kontrol olarak ve konsantrasyon hesaplamada kullanılan HexCer'in M/Z oranı 644.7 dir. Fare beyinde tanımlanan diğer Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid çeşitleri Tablo 4 te gösterilmiştir.

Prekürsör iyon taraması yapılarak pozitif modta 264.4 iyonunu içeren sfingolipid çeşitleri elde edilmiştir. M/Z ve yoğunluk miktarları gözlemlenmiştir. M/Z oranına bakılarak hangi yağ olduğunu tanımlamak için makaleler (Shaner et al., 2009)(Hsu & Turk, 2002) ve kütle spektrometresi için Lipidview software kullanılmıştır.

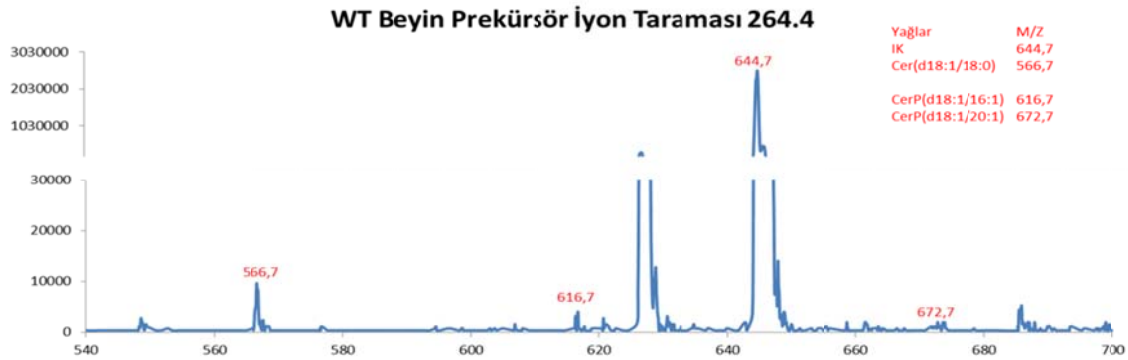
Seramid çeşitlerini isimlendirilmesi Şekil 38 deki gibidir. 2 adet kol vardır bunlardan birisi d olarak isimlendirilir. Örneğin; Cer(d18:1/18:0) d18:1 18 karbon atomu bulunduğunu ve üzerinde 1 tane çift bağın bulunduğunu ve 18:0 diğer kolda 18 karbon atomu bulunduğunu ve hiç çift bağ bulunmadığını göstermektedir. GlcCer(d18:0/24:0) Glc yapısında Glukoz içerdiğini, d18:0 18 karbon atomu bulunduğunu ve üzerinde çift bağ olmadığını ve 24:0 diğer kolda 24 karbon atomu bulunduğunu ve hiç çift bağ bulunmadığını göstermektedir



Şekil 38: Seramid ve glukozil seramid çeşitlerinin isimlendirilmesi

Seramid		Seramid Fosfat		Glukozil Seramid		Laktosil Seramid	
Yağ çeşidi	m/z	Yağ çeşidi	m/z	Yağ çeşidi	m/z	Yağ çeşidi	m/z
Cer(d18:1/18:0)	566,7	CerP(d18:1/16:1)	616,7	GlcCer(d18:1/16:0)	700,7	LacCer(d18:1/12:0)	806,7
		CerP(d18:1/20:1)	672,7	GlcCer(d18:1/18:0)	728,7	LacCer(d18:1/16:0)	862,7
				GlcCer(d18:0/19:0)	744,7	LacCer(d18:1/18:0)	890,7
				GlcCer(d18:1/20:0)	756,7		
				GlcCer(d18:0/21:0)	772,7		
				GlcCer(d18:0/23:0)	800,8		
				GlcCer(d18:1/24:1)	810,9		
				GlcCer(d18:1/24:0)	812,9		
				GlcCer(d18:0/24:0)	814,7		
				GlcCer(d18:1/25:1)	824,7		
				GlcCer(d18:0/25:1)	826,7		
				GlcCer(d18:0/25:0)	828,7		
				GlcCer(d18:0/26:0)	842,7		
				GlcCer(d18:0/26:0)	844,7		

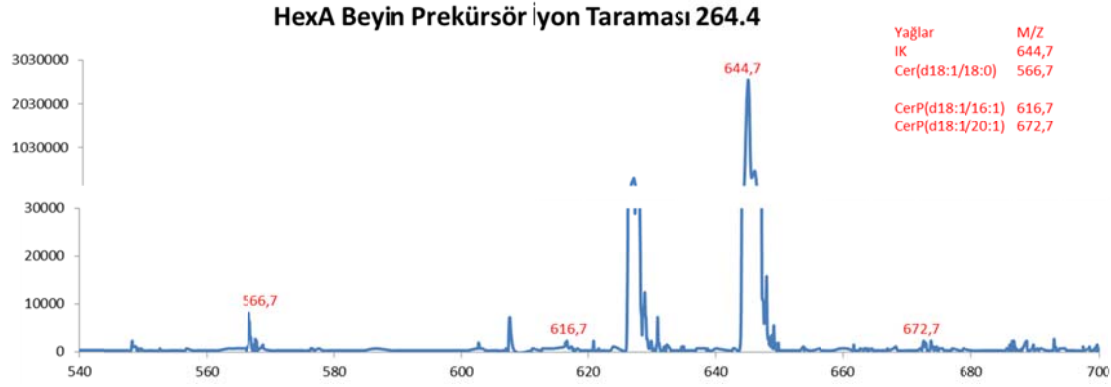
Tablo 4: Beyin dokusunda tanımlanan Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid çeşitleri



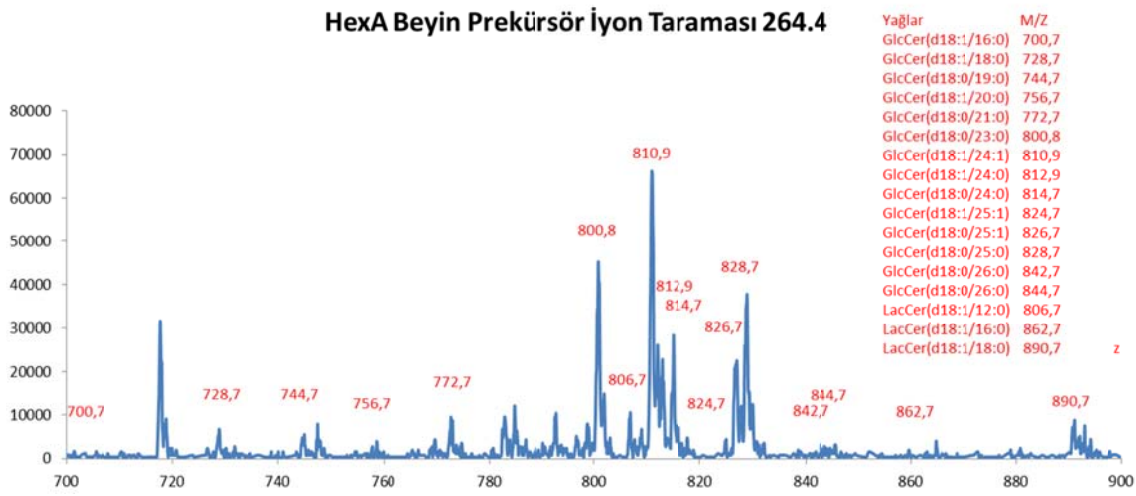
Şekil 39: WT fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



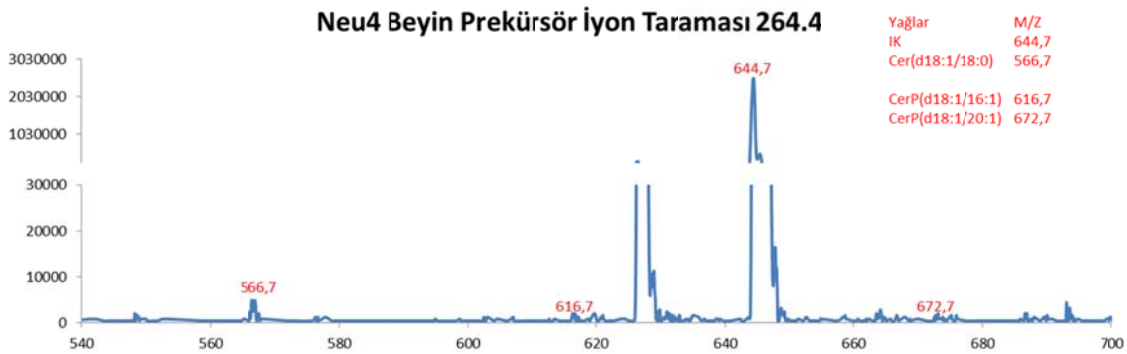
Şekil 40: WT fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



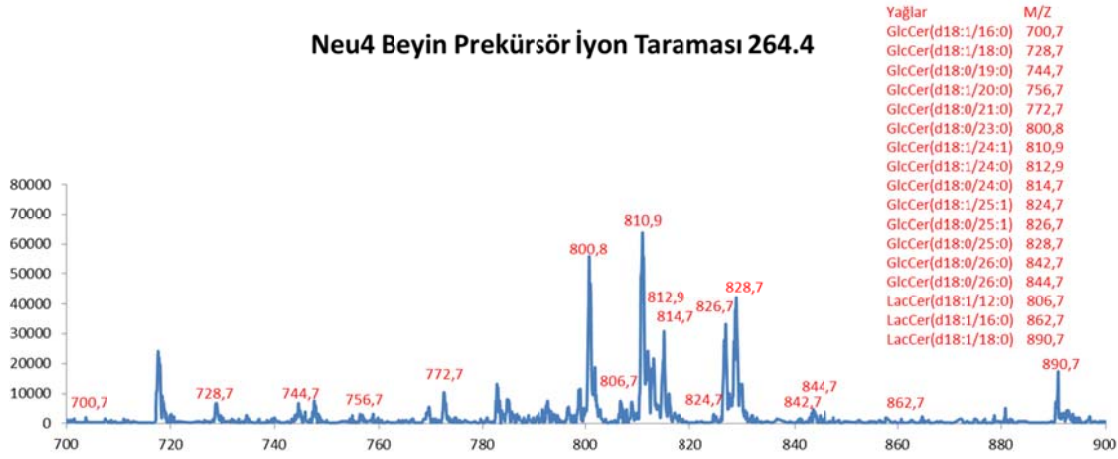
Şekil 41: HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



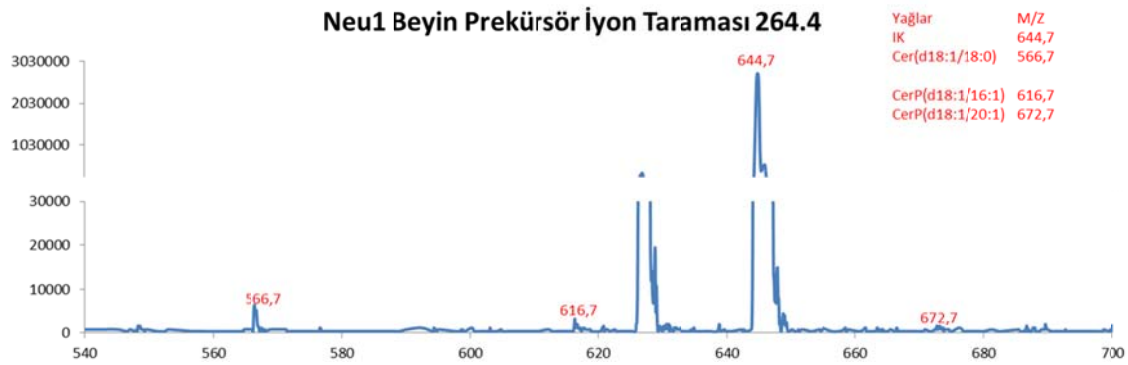
Şekil 42: HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



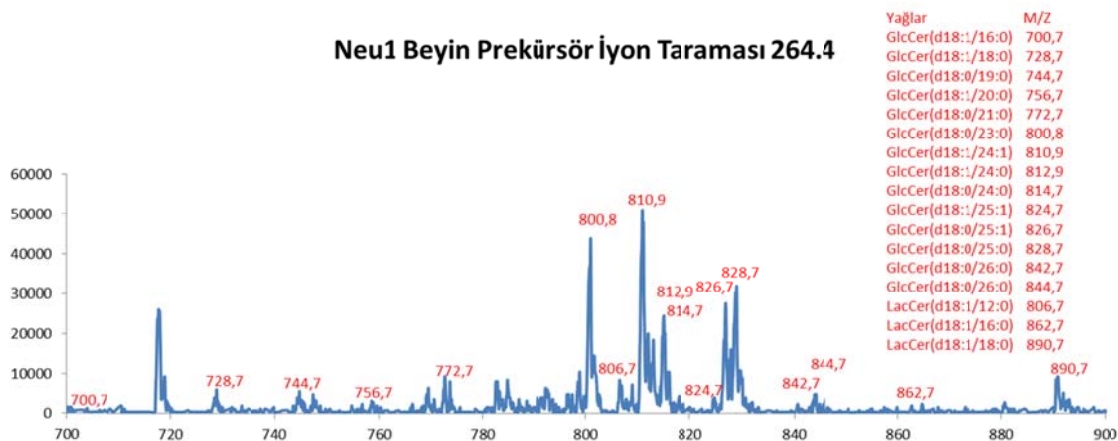
Şekil 43: Neu4 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



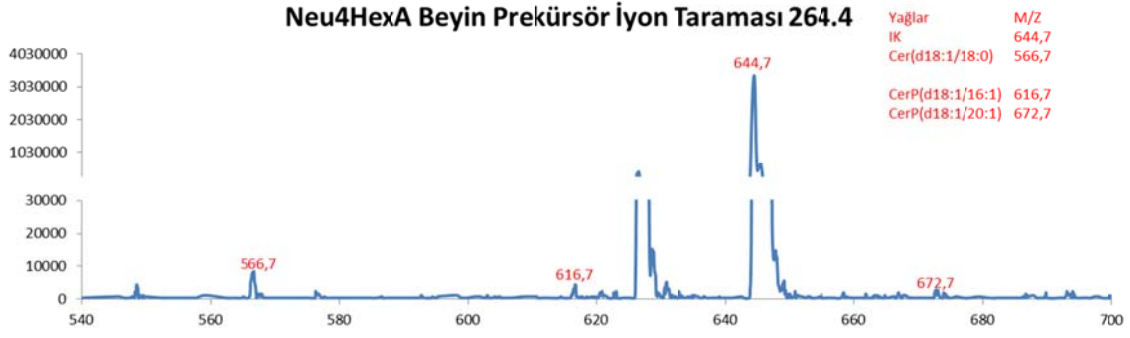
Şekil 44: Neu4 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



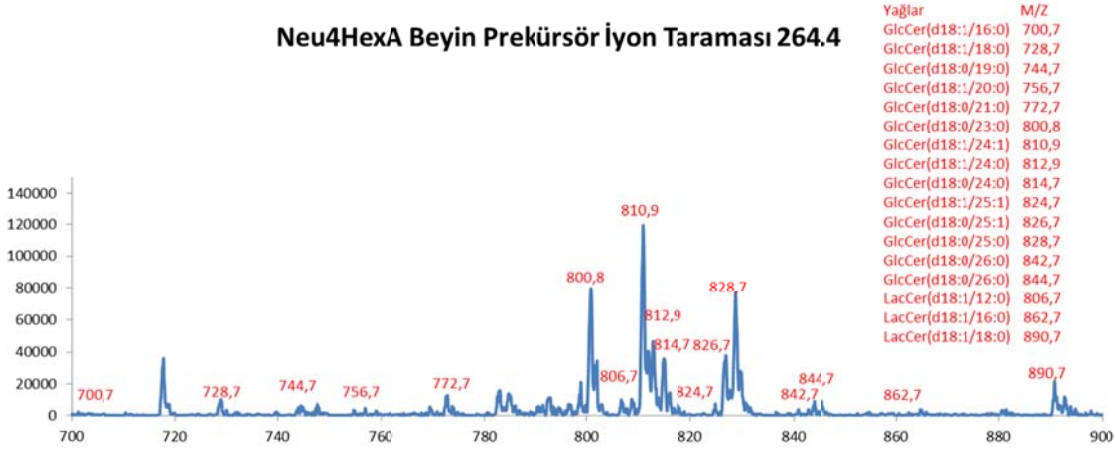
Şekil 45: Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



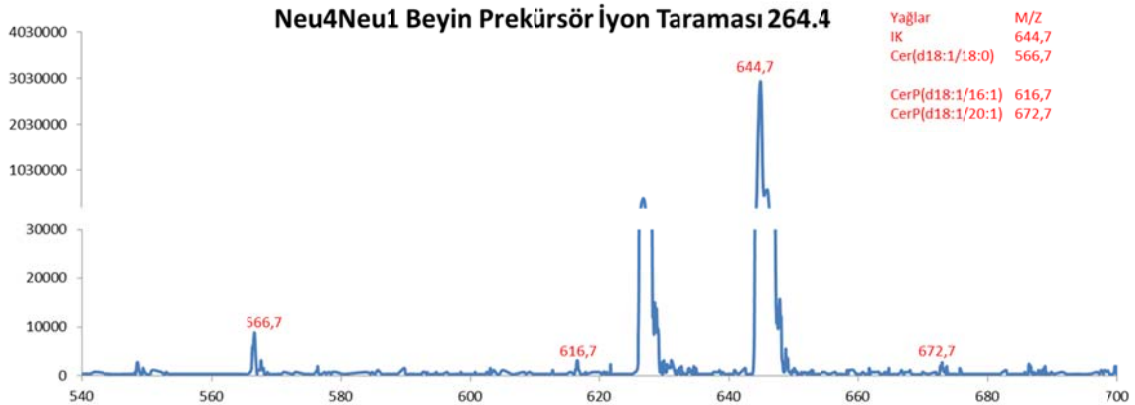
Şekil 46: Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



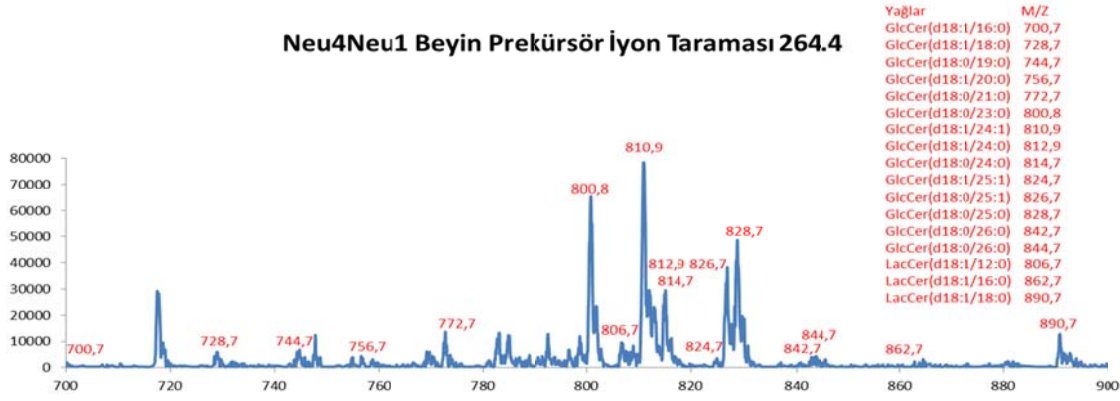
Şekil 47: Neu4HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



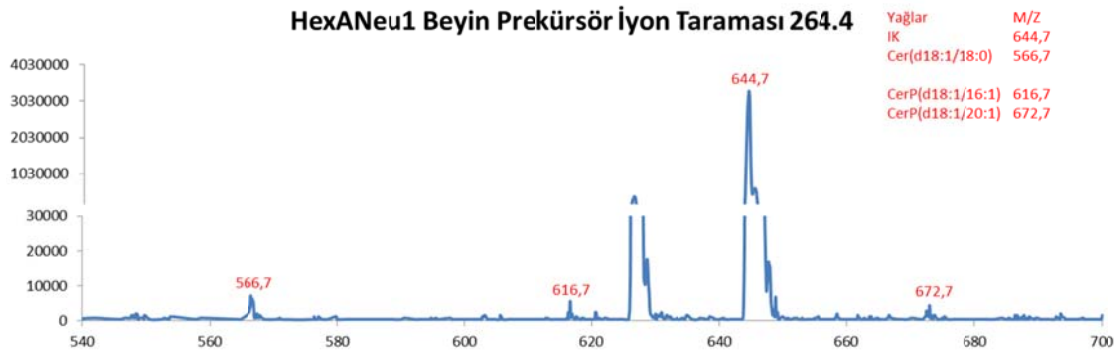
Şekil 48: Neu4HexA mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



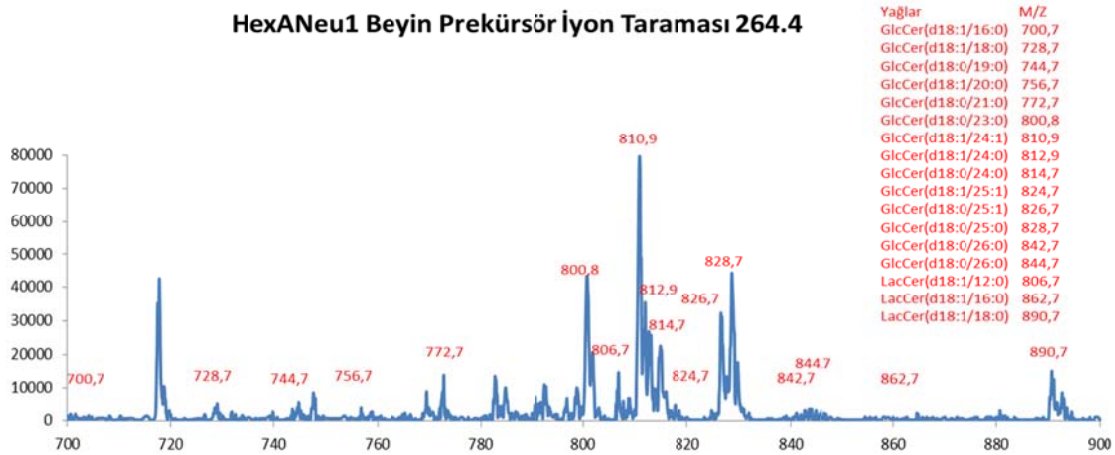
Şekil 49: Neu4Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



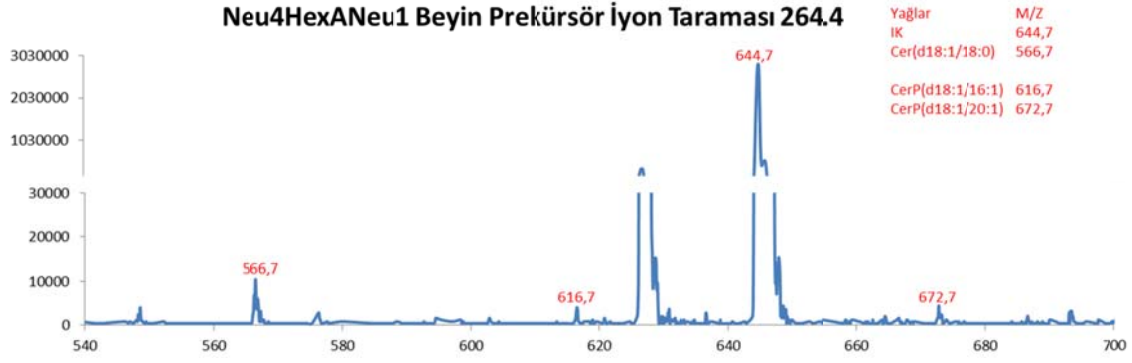
Şekil 50: Neu4Neu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



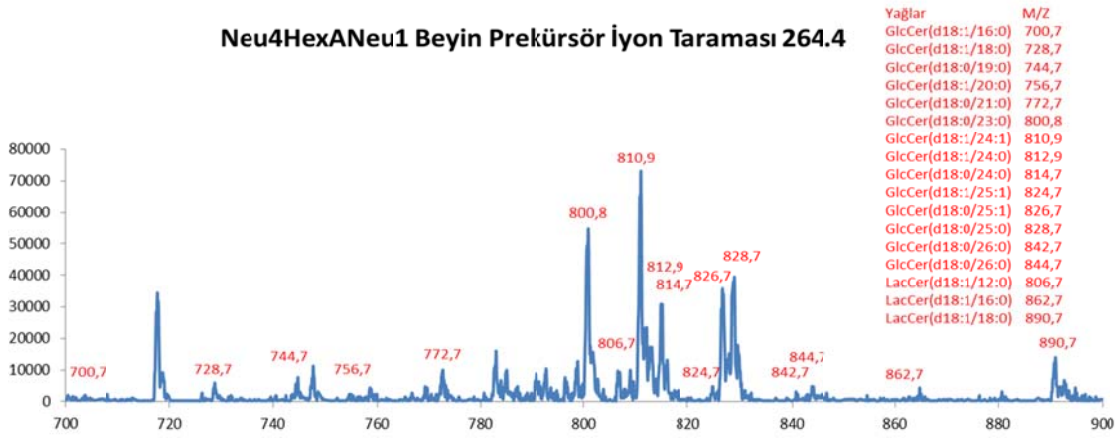
Şekil 51: HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



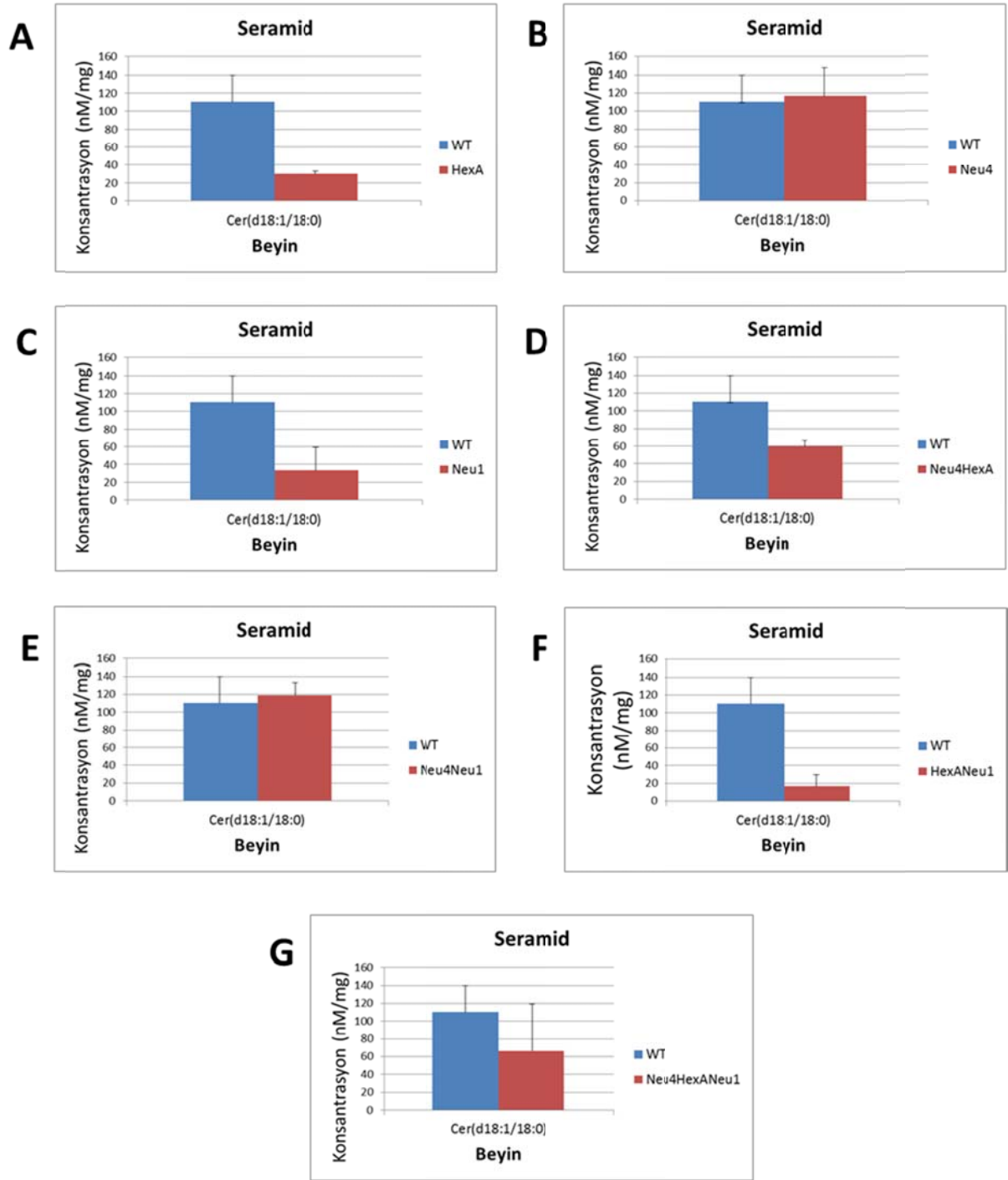
Şekil 52: HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



Şekil 53: Neu4HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 540 ve 700 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.

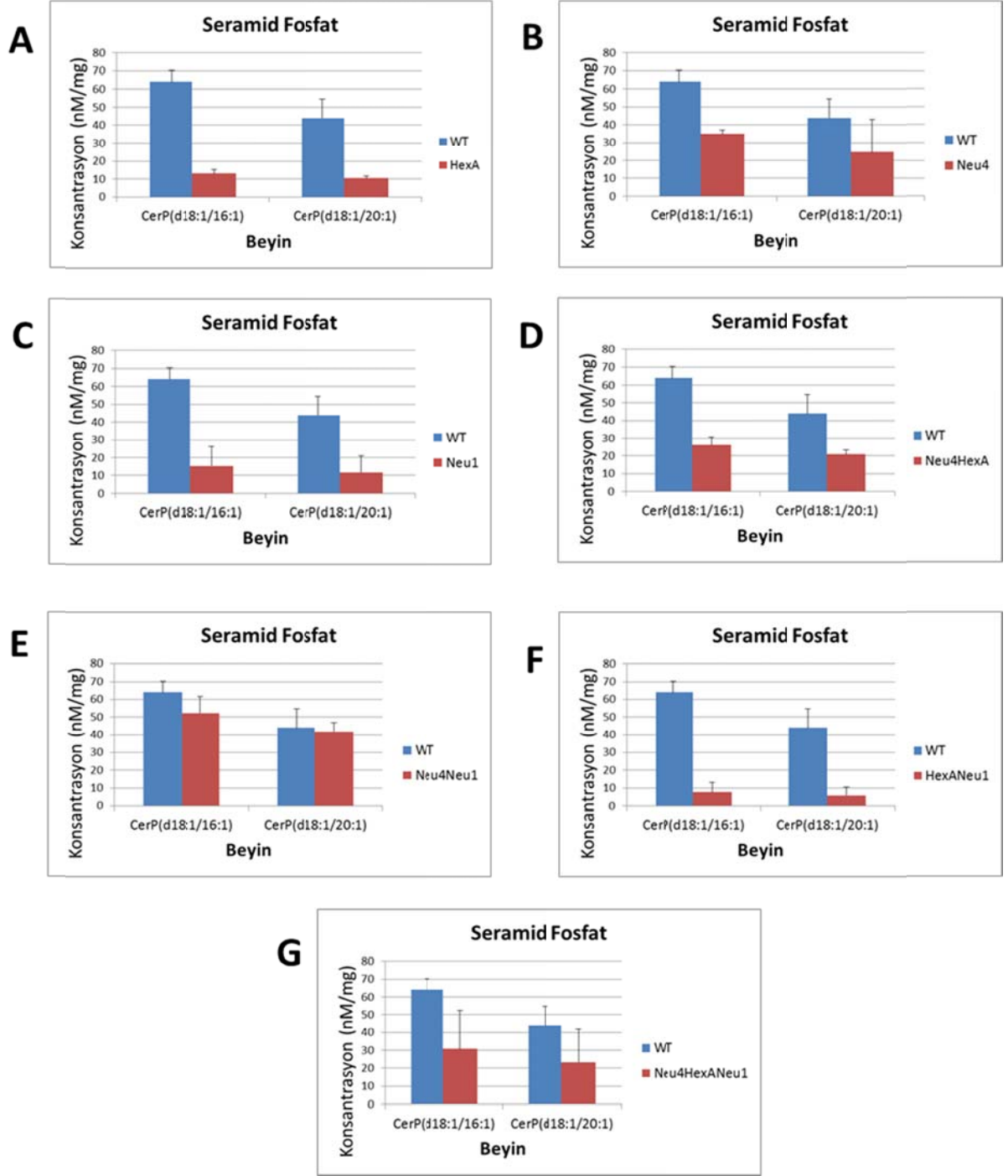


Şekil 54: Neu4HexANeu1 mutant fare beyin dokusundan izole edilen yağlar için yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 700 ve 900 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



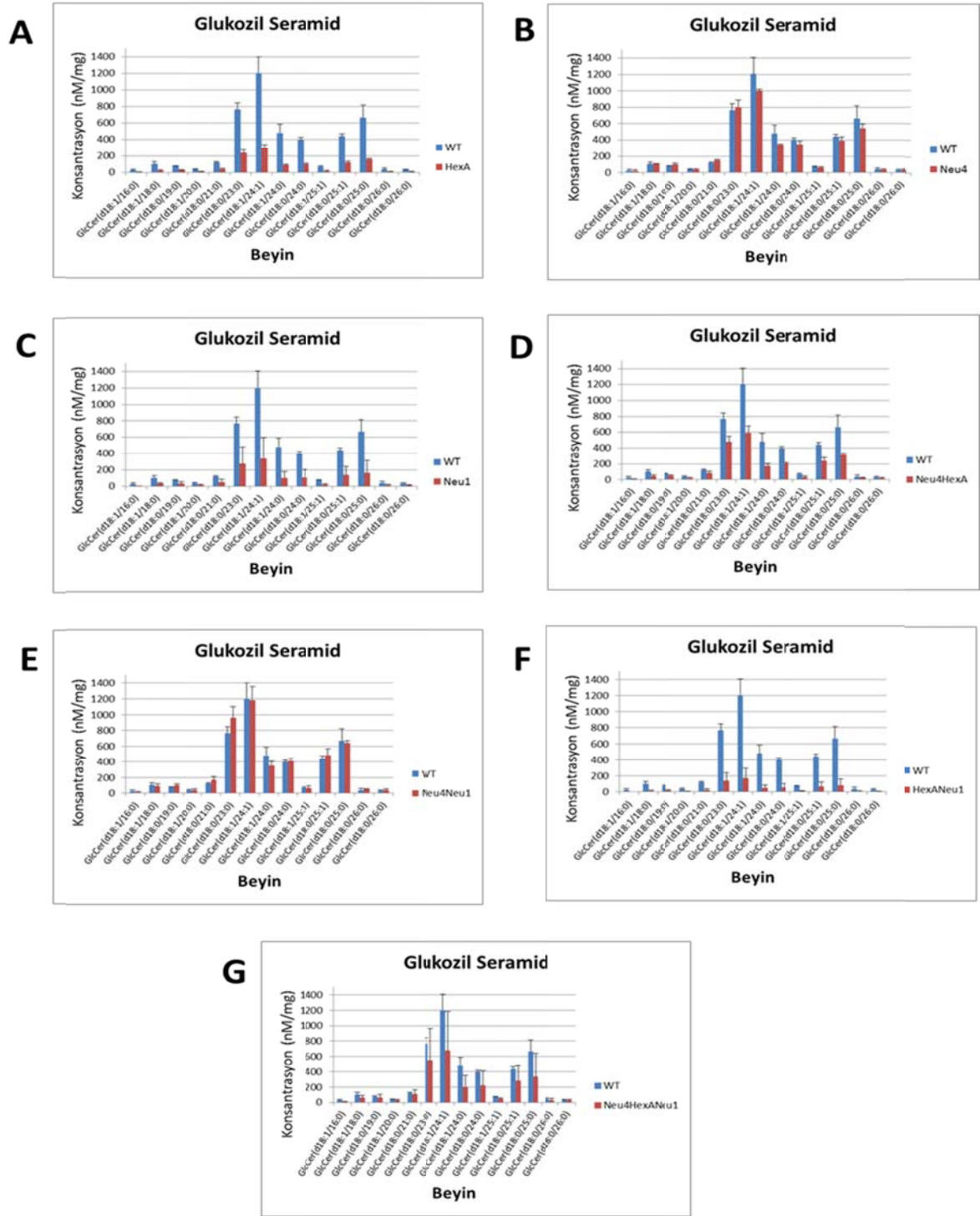
Şekil 55: WT(A), HexA(B), Neu4(C), Neu4HexA(D), Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki **Seramid** miktarı

Seramid miktarında ise WT fareler ile karşılaştırıldığında HexA, Neu1, HexANeu4, HexANeu1 ve HexANeu4Neu1 farelerde %20-60 oranında azalma tesbit edilmiştir.



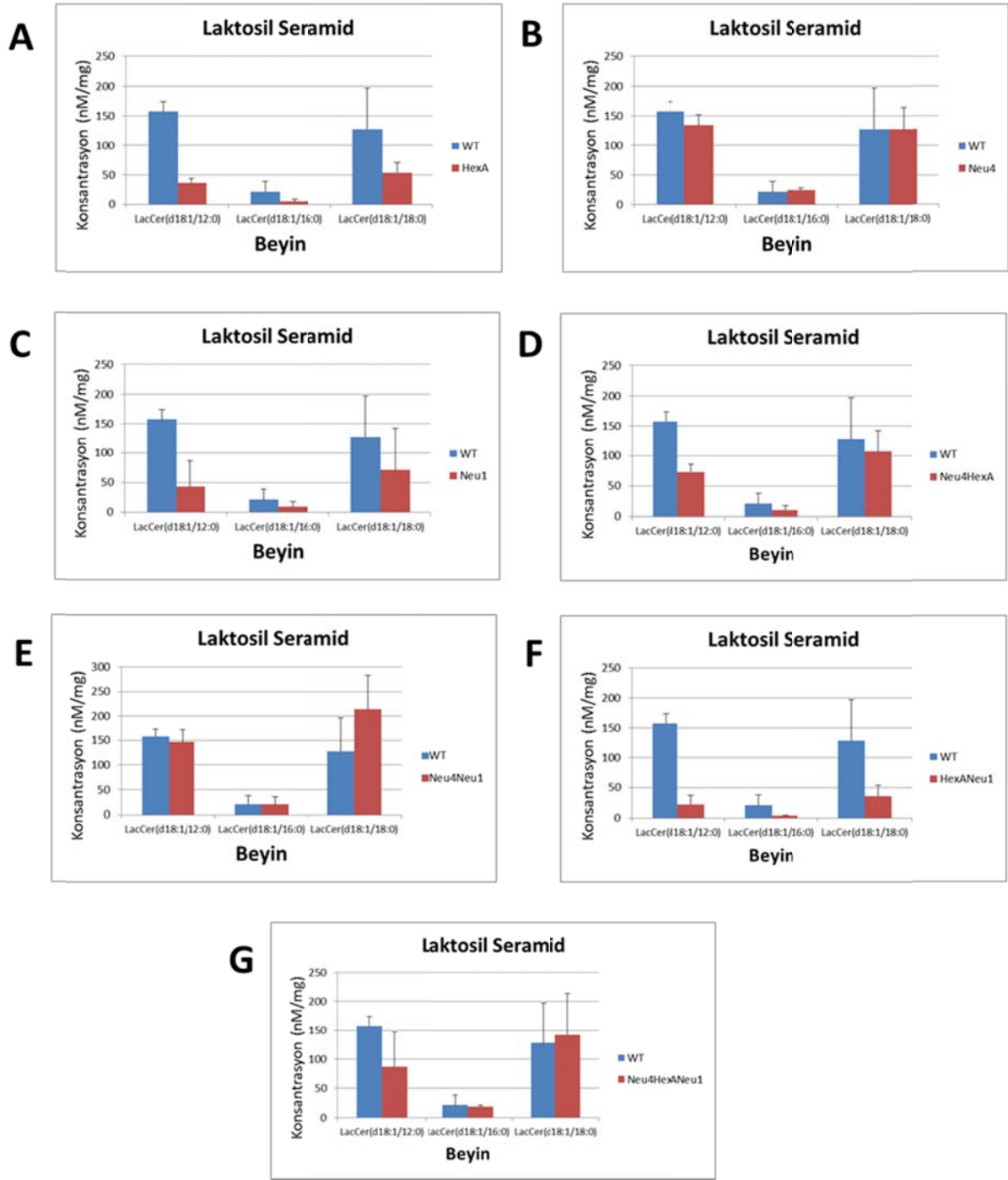
Şekil 56: WT-HexA (A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA (D), WT-Neu4Neu1(E), WT-HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki **Seramid Fosfat** miktarı.

Seramid fosfat miktarı çalışılan hemen her beyin örneğinde normal fare örnekleri ile karşılaştırıldığında azalmıştır. Bu azalmanın hangi enzimin eksikliği sonucu olduğu ise net olarak anlaşılamamıştır.



Şekil 57: WT-HexA (A), WT-Neu4(B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), WT-HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki **Glukozil Seramid** miktarı.

Glukozil seramid miktarında ise WT ile karşılaştırıldığında HexA, Neu1, HexANeu4 ve HexANeu1 farelerinde azalma tesbit edilmiş fakat Neu4 HexANeu4 ve HexANeu4Neu1 farelerinde fark gözlenmemiştir.



Şekil 58: WT-HexA (A), WT-Neu4 (B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA(D), WT-Neu4Neu1(E), WT-HexANeu1(F) ve WT-Neu4HexANeu1(G) fare beyin dokusundaki **Laktosil Seramid** miktarı

Laktosil seramid (d18:1/12:0) miktarı Neu4Neu1 haric tüm diğer örneklerde HexA eksikliği ile orantılı olarak Wt ile karşılaştırıldığında önemli miktarda azalmıştır.

Fare Fibroblast hücrelerinden yapılan Prekürsor İyon Taraması

Sfingomiyelin ve Fosfatidilkolin Çeşitlerinin Tanımlanması

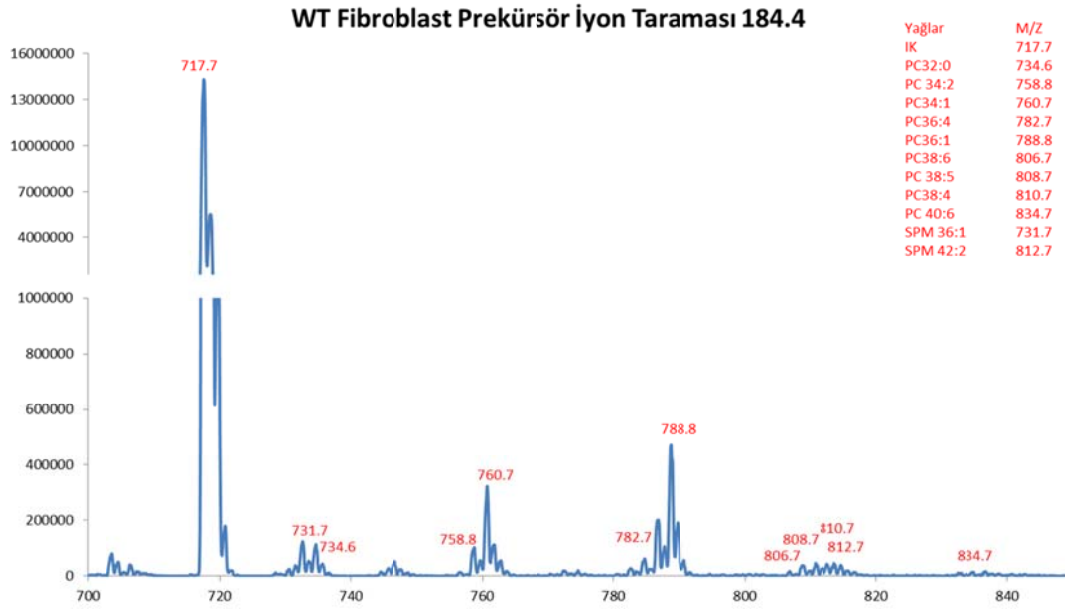
Prekürsor iyon taraması ile WT ve 7 mutant (HexA, Neu4, Neu1, Neu4HexA, Neu4Neu1, HexANeu1 ve Neu4HexANeu1) immortal fare fibroblast hücrelerinde Sfingomiyelin ve Fosfatidilkolin yağları tanımlanmıştır.

Sfingomiyelin ve Fosfatidilkolin çeşitleri pozitif modta 184.4 iyonunu tarayarak yapılmıştır.

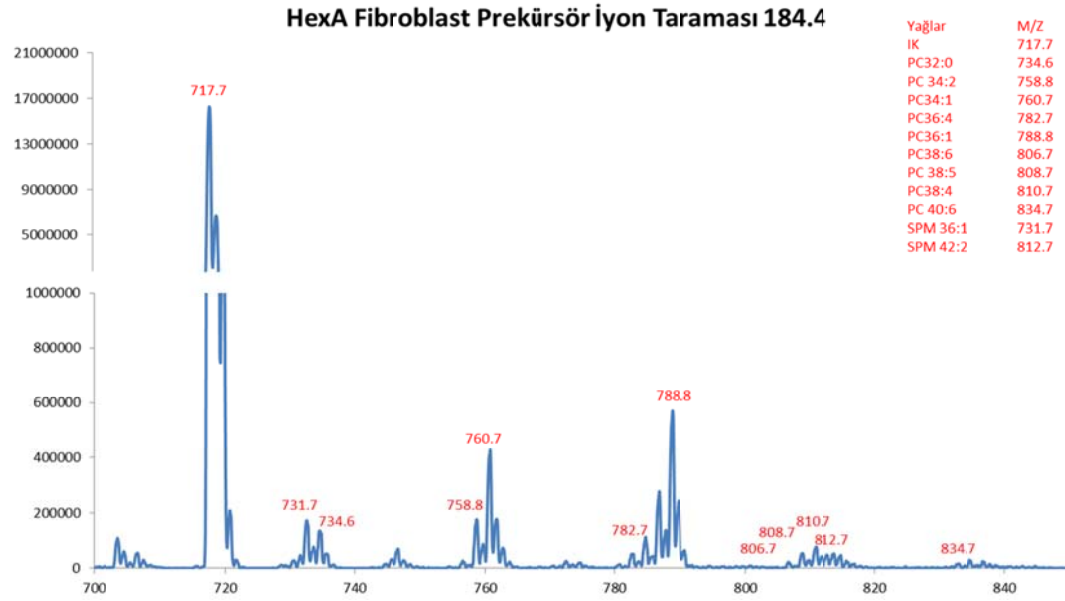
İnternal kontrol olarak ve konsantrasyon hesaplamada kullanılan sfingomiyelinin M/Z oranı 717.7 dir. İmmortal fare fibroblast hücrelerinde bulunan fosfatidilkolin ve sfingomiyelin çeşitleri Tablo5'te gösterilmiştir.

Fosfatidilkolin		Sfingomiyelin	
Yağ çeşidi	m/z	Yağ çeşidi	m/z
PC32:0	734.6	SPM 36:1	731.7
PC 34:2	758.8	SPM 42:2	812.7
PC36:4	782.7		
PC36:1	788.8		
PC38:6	806.7		
PC 38:5	808.7		
PC38:4	810.7		
PC 40:6	834.7		

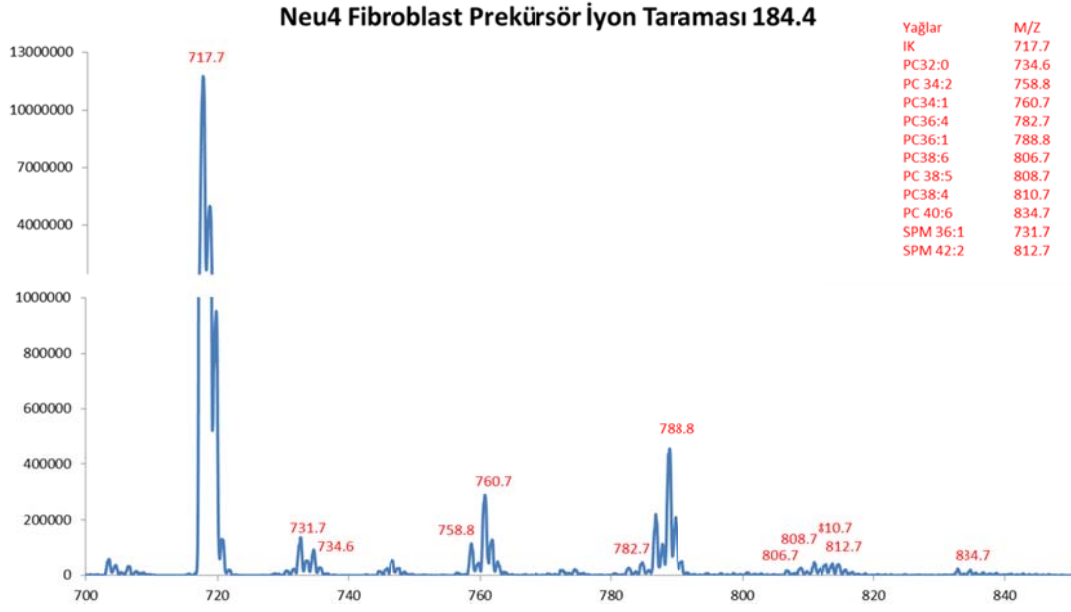
Tablo 5: İmmortal fare fibroblast hücrelerinde tanımlanan fosfatidilkolin ve sfingomiyelin çeşitleri



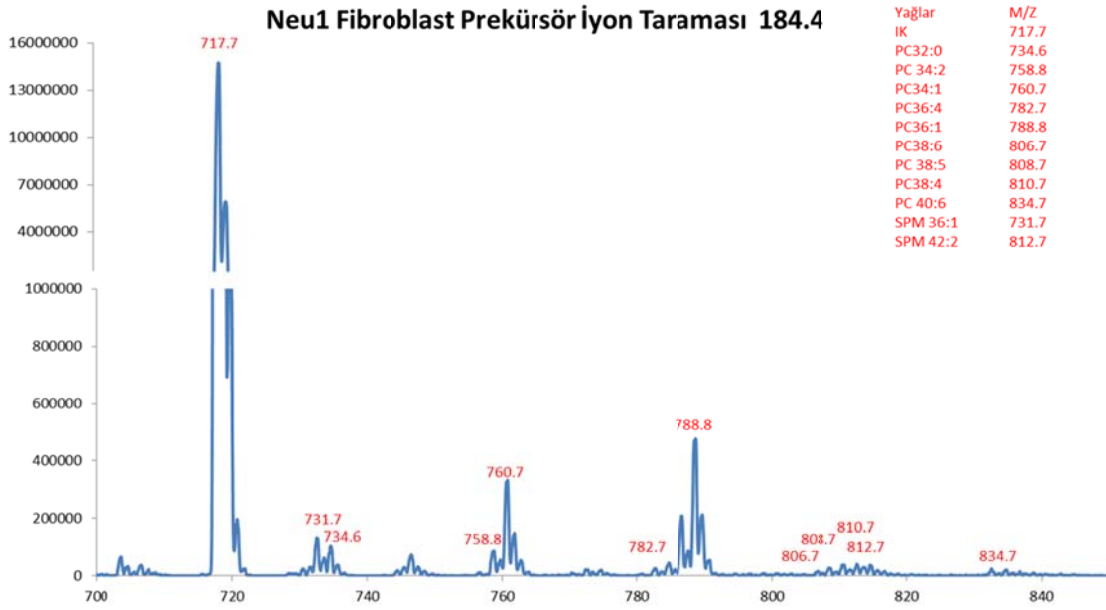
Şekil 59: WT fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



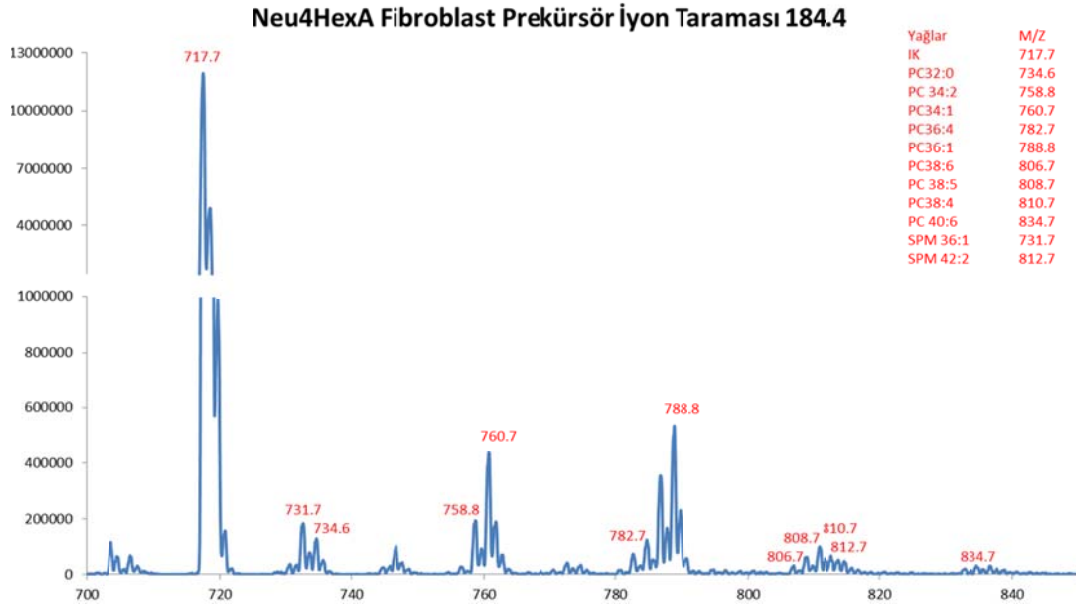
Şekil 60: HexA mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



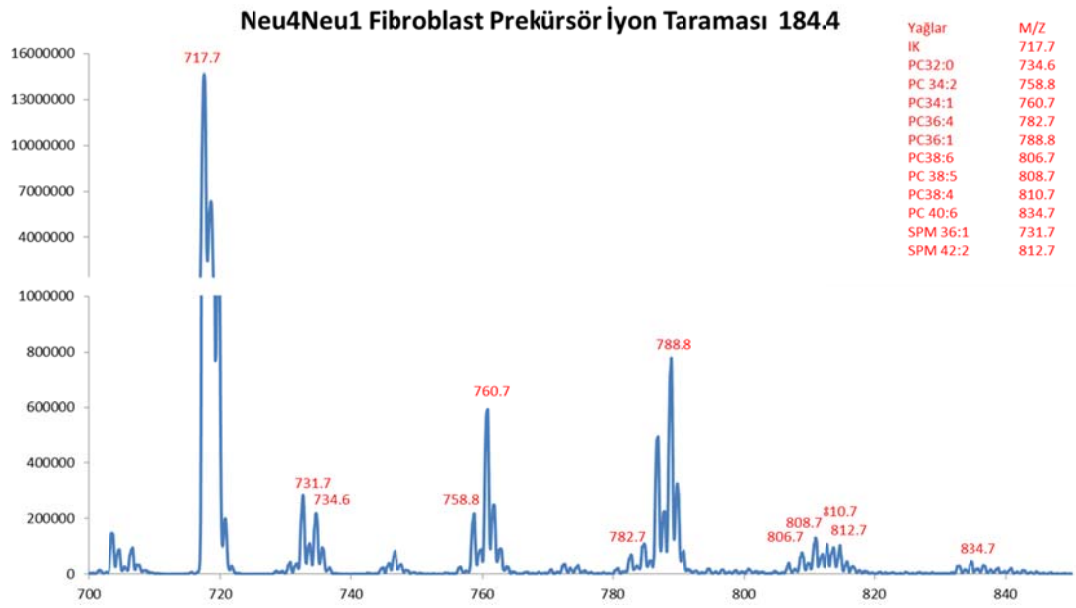
Şekil 61: Neu4 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



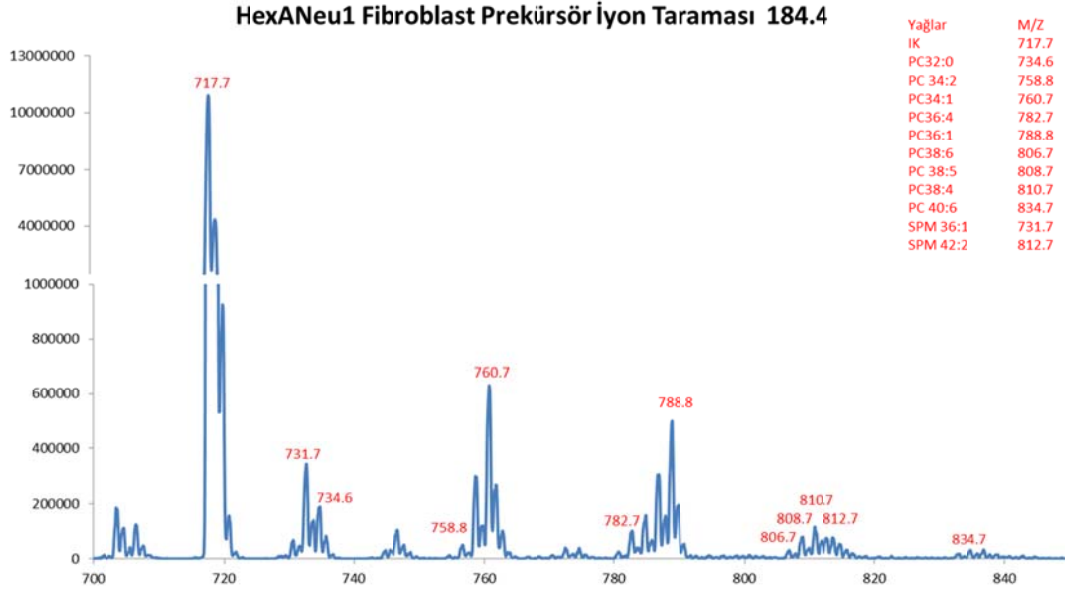
Şekil 62: Neu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



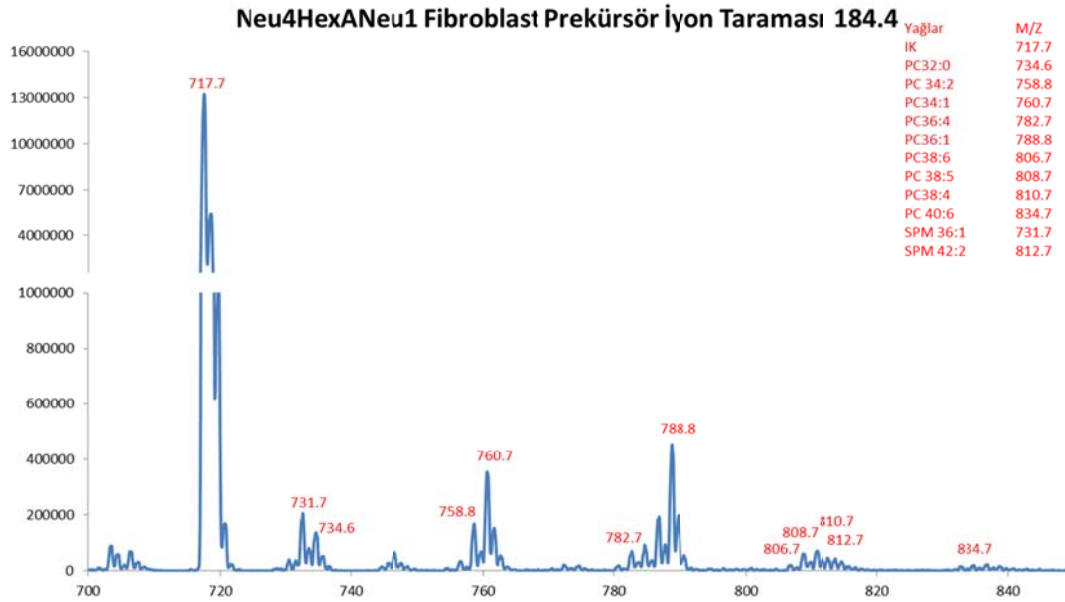
Şekil 63: Neu4HexA mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



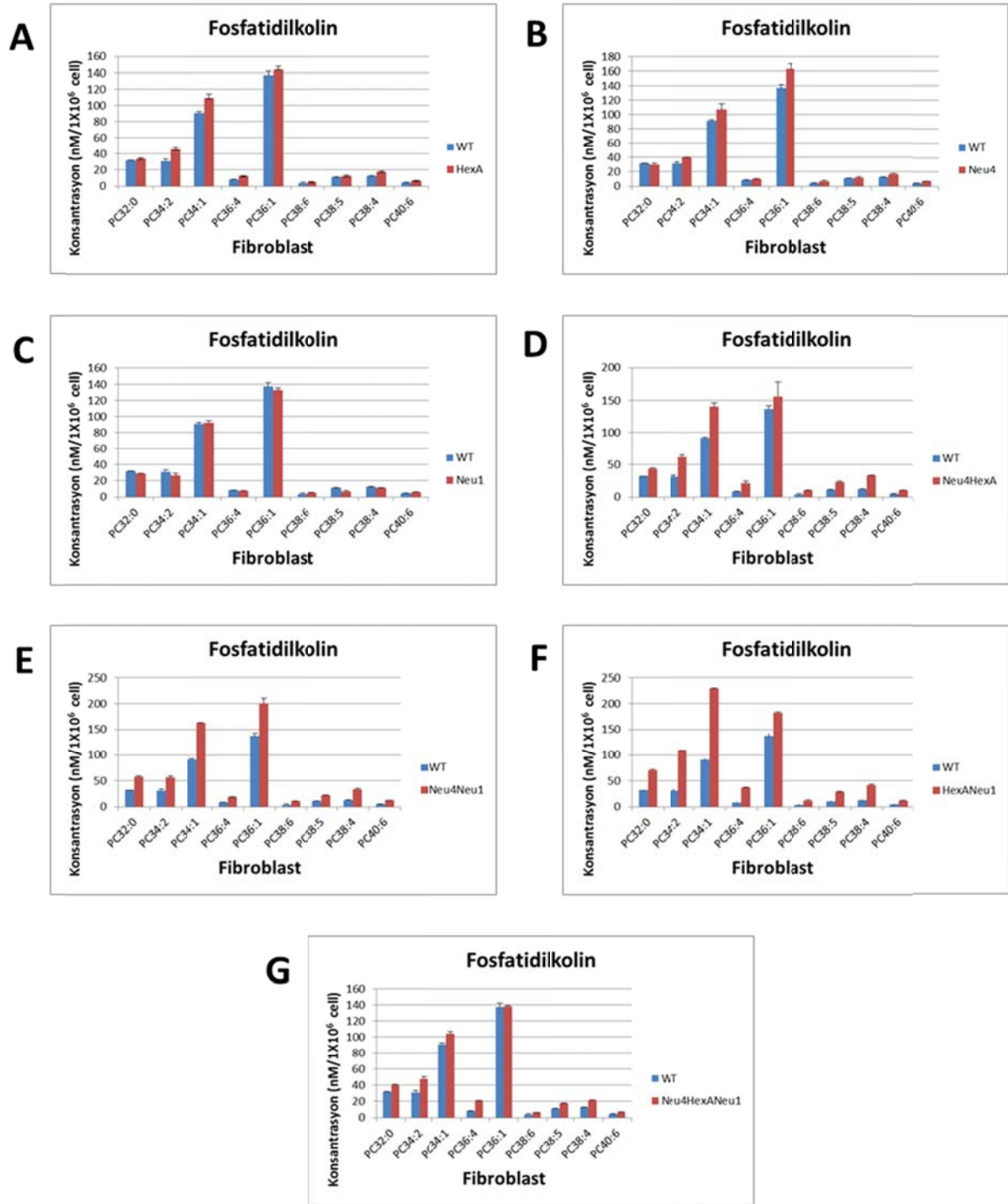
Şekil 64: Neu4Neu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



Şekil 65: HexANeu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.

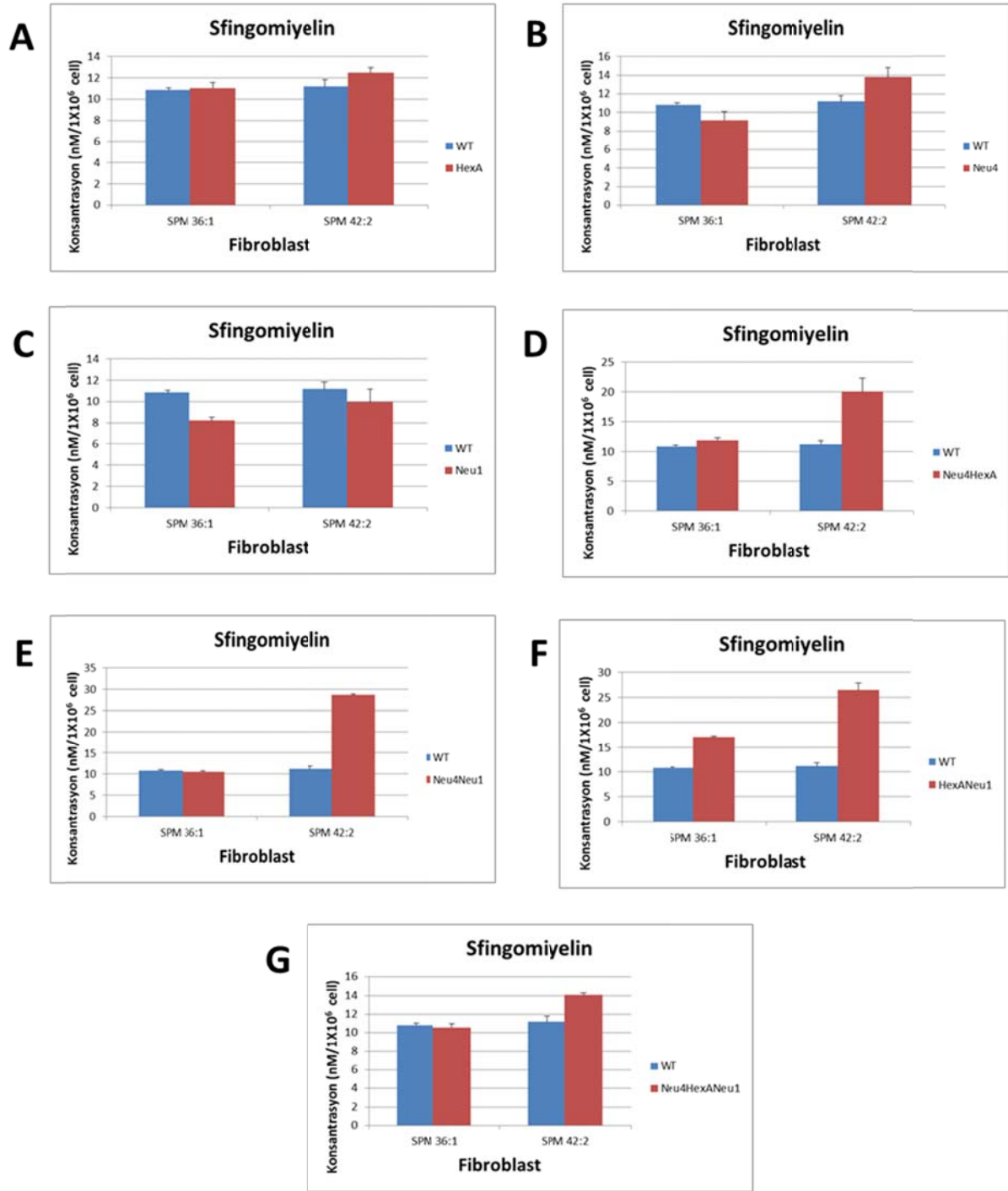


Şekil 66: Neu4HexANeu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “184.4” M/Z 700 ve 840 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



Şekil 67: WT-HexA (A), WT-Neu4 (B), WT-Neu1(C), WT-Neu4HexA (D), WT-Neu4Neu1(E), WT-HexANeu1 (F) ve WT-Neu4HexANeu1 (G) fare fibroblast hücrelerindeki **Fosfatidilkolin** miktarı

Özellikle HexANeu4, HexANeu1, Neu4Neu1 fare fibroblastlarında genelde tüm orandaki fostatidilkolin miktarı dikkate değer şekilde artmıştır.



Şekil 68: WT(A), HexA(B), Neu4(C), Neu4HexA(D), Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve Neu4HexANeu1(G) fare fibroblast hücrelerindeki **Sfingomiyelin** miktarı

36:1 sfingomiyelin miktarı HexA, Neu4Neu1 ve HexANeu1 farelerde değişmezken, Neu4 ve Neu1 farelerde artmıştır. 42:2 sfingomiyelin miktarı ise HexANeu4Neu1 farde WT ile karşılaştırıldığında artmıştır.

Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid Çeşitlerinin Tanımlanması

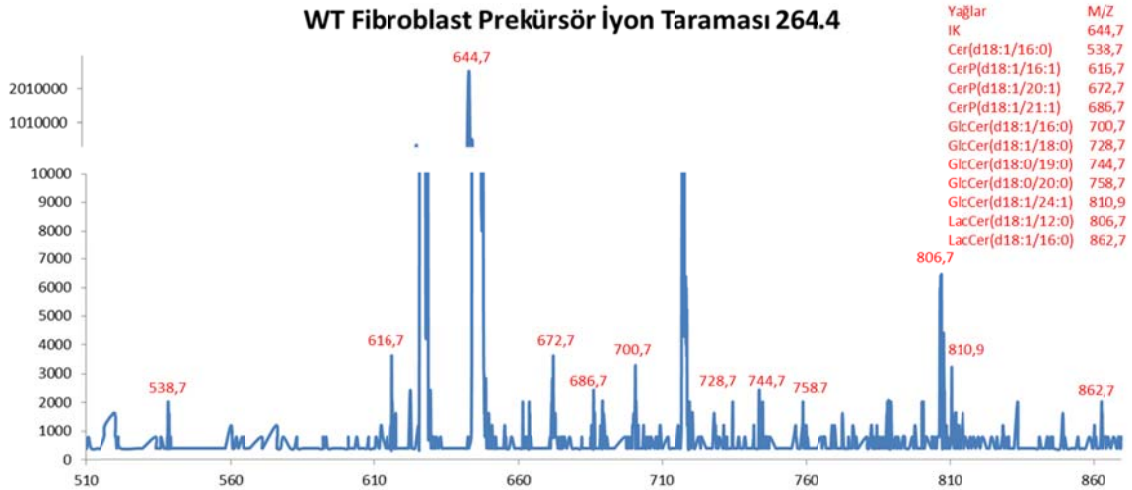
Prekürsor iyon taraması ile WT ve 7 mutant (HexA, Neu4, Neu1, Neu4HexA, Neu4Neu1, HexANeu1 ve Neu4HexANeu1) immortal fare fibroblast hücrelerinde Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid Çeşitlerinin tanımlanmıştır.

Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid çeşitleri pozitif modta 264.4 iyonunu tarayarak yapılmıştır. İnternal kontrol olarak ve konsantrasyon hesaplamada kullanılan HexCer'in M/Z oranı 644.7 dir. İmmortal fare fibroblast hücrelerinde tanımlanan diğer Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid çeşitleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

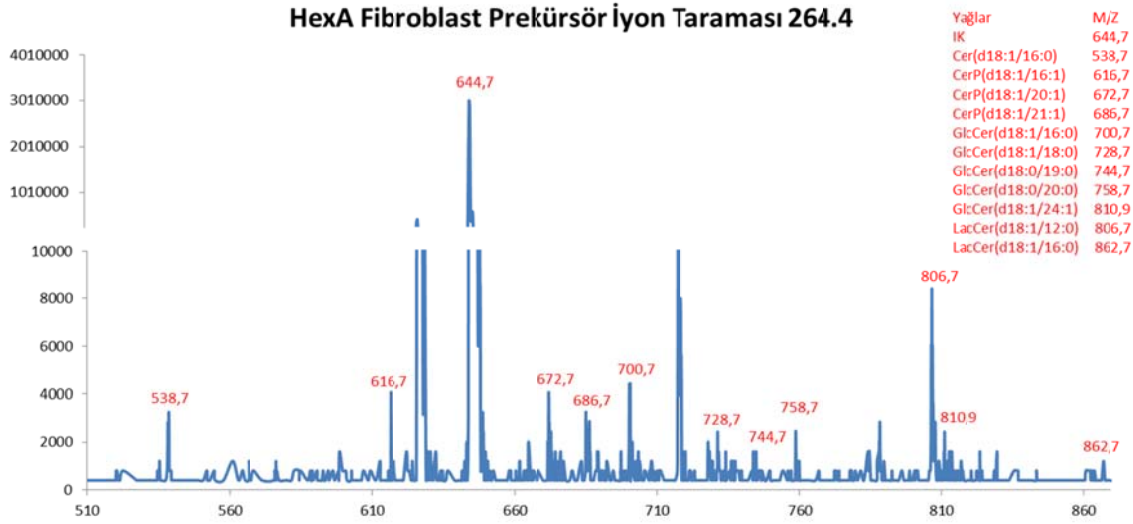
Farebeyin dokusunda Cer(d18:1/18:0) gözlemlenirken fibroblast hücrelerinde Cer(d18:1/16:0) seramidi gözlemlenmiştir.

Seraamid		Seraamid Fosfat		Glukozil Seramid		Laktosil Seramid	
Yağ çeşidi	m/z	Yağ çeşidi	m/z	Yağ çeşidi	m/z	Yağ çeşidi	m/z
Cer(d18:1/16:0)	538,7	CerP(d18:1/16:1)	616,7	GlcCer(d18:1/16:0)	700,7	LacCer(d18:1/12:0)	806,7
		CerP(d18:1/20:1)	672,7	GlcCer(d18:1/18:0)	728,7	LacCer(d18:1/16:0)	862,7
		CerP(d18:1/21:1)	686,7	GlcCer(d18:0/19:0)	744,7		
				GlcCer(d18:0/20:0)	758,7		
				GlcCer(d18:1/24:1)	810,9		

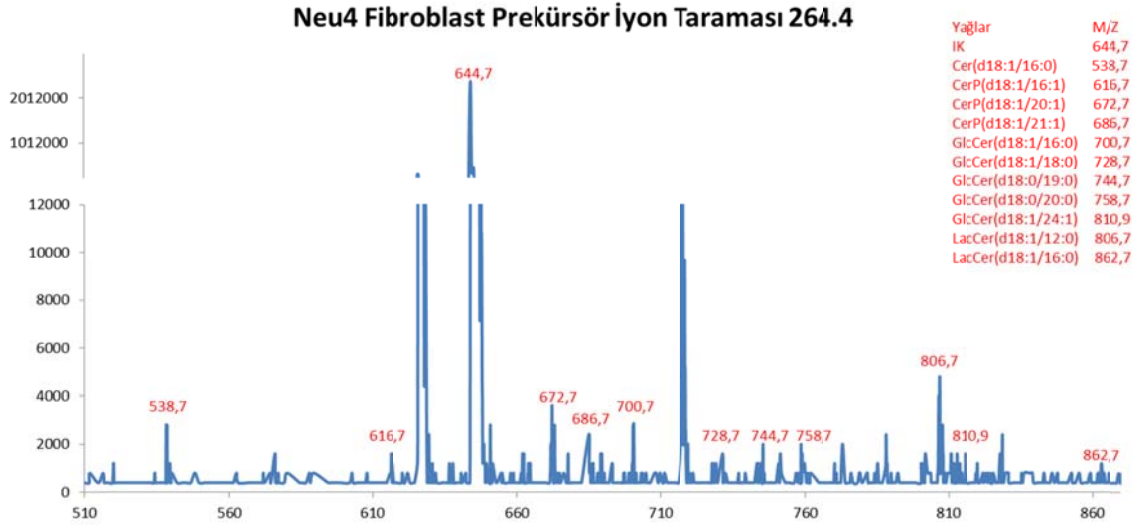
Tablo 6: İmmortal fare fibroblast hücrelerinde bulunan Seramid, Seramid Fosfat, Glukozil Seramid ve Laktosil Seramid çeşitleri



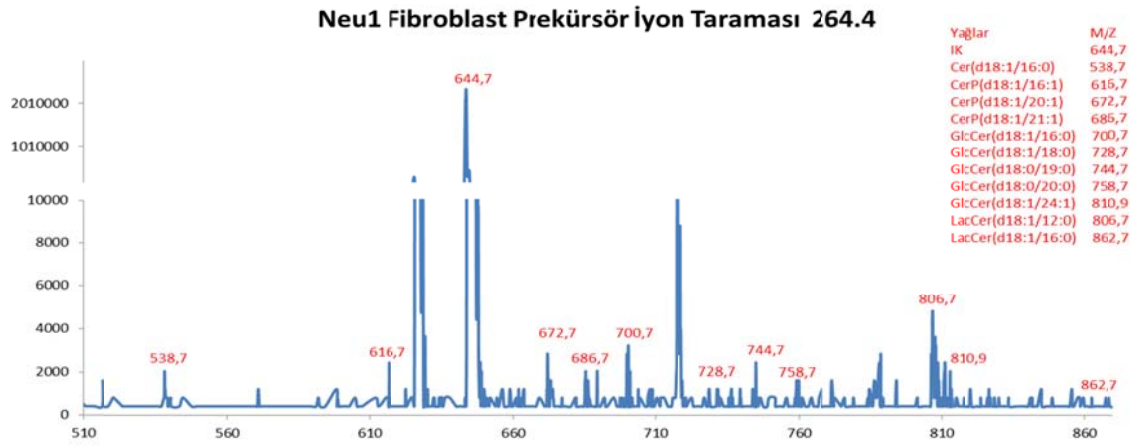
Şekil 69: WT fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsor iyon taraması "264.4" M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



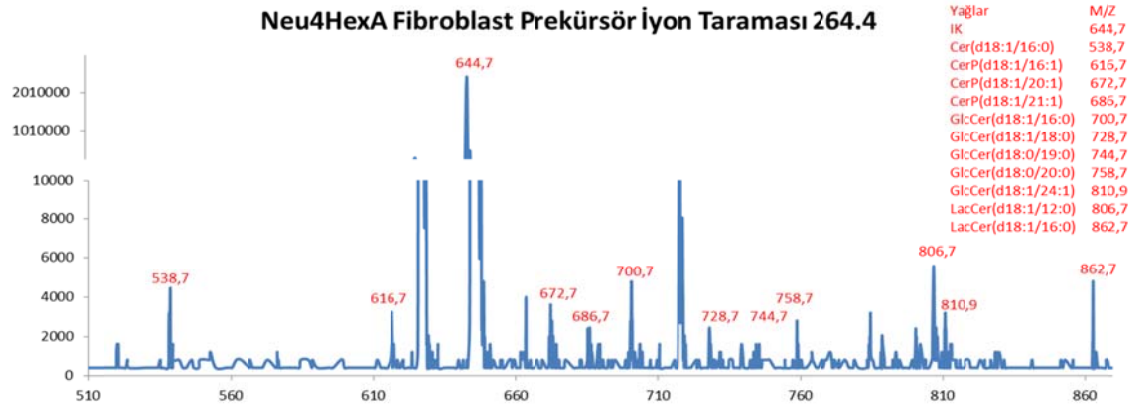
Şekil 70: HexA mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



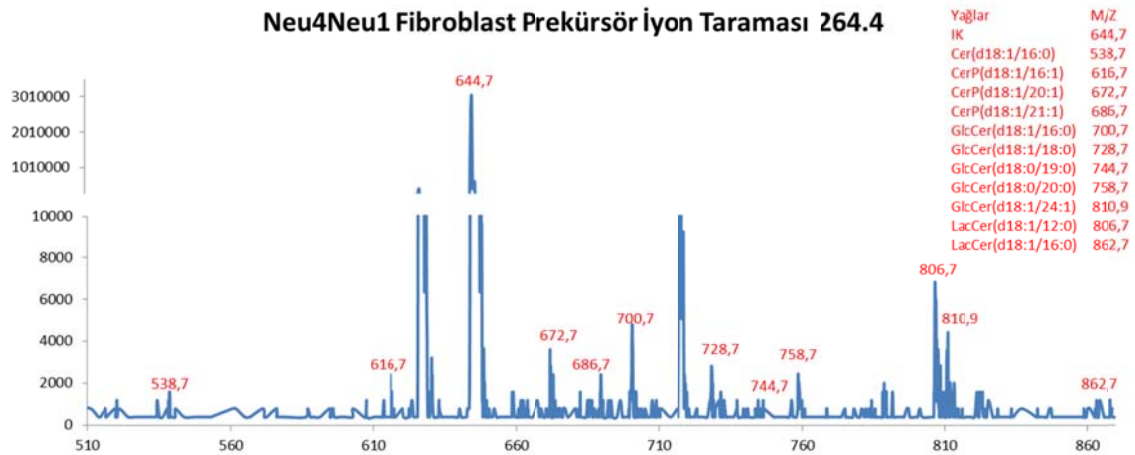
Şekil 71: Neu4 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



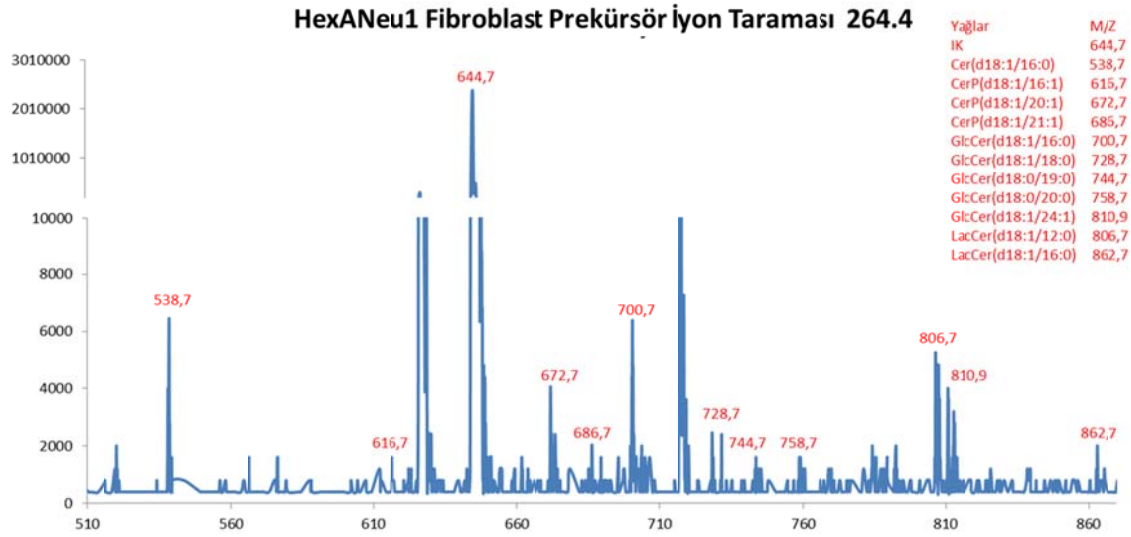
Şekil 72: Neu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



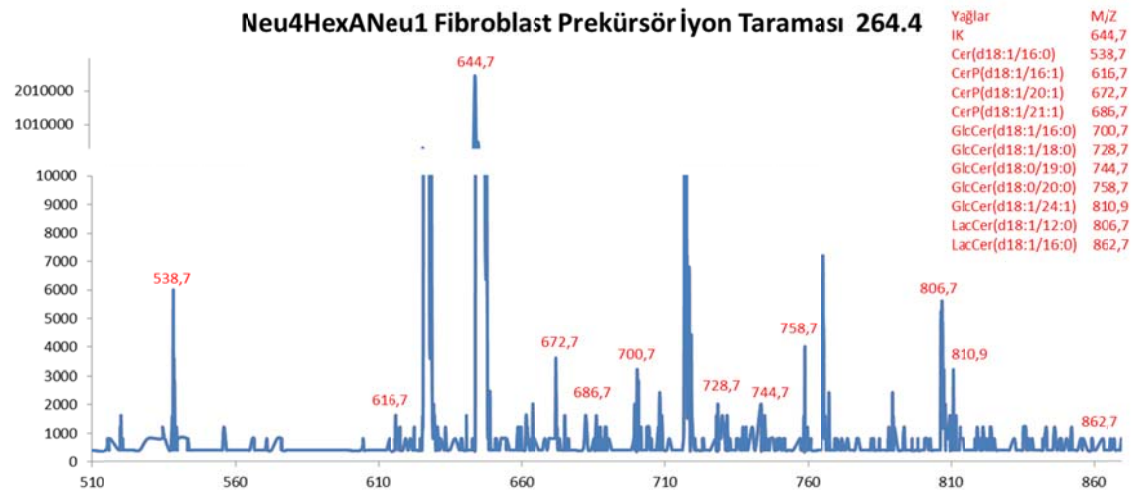
Şekil 73: Neu4HexA mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



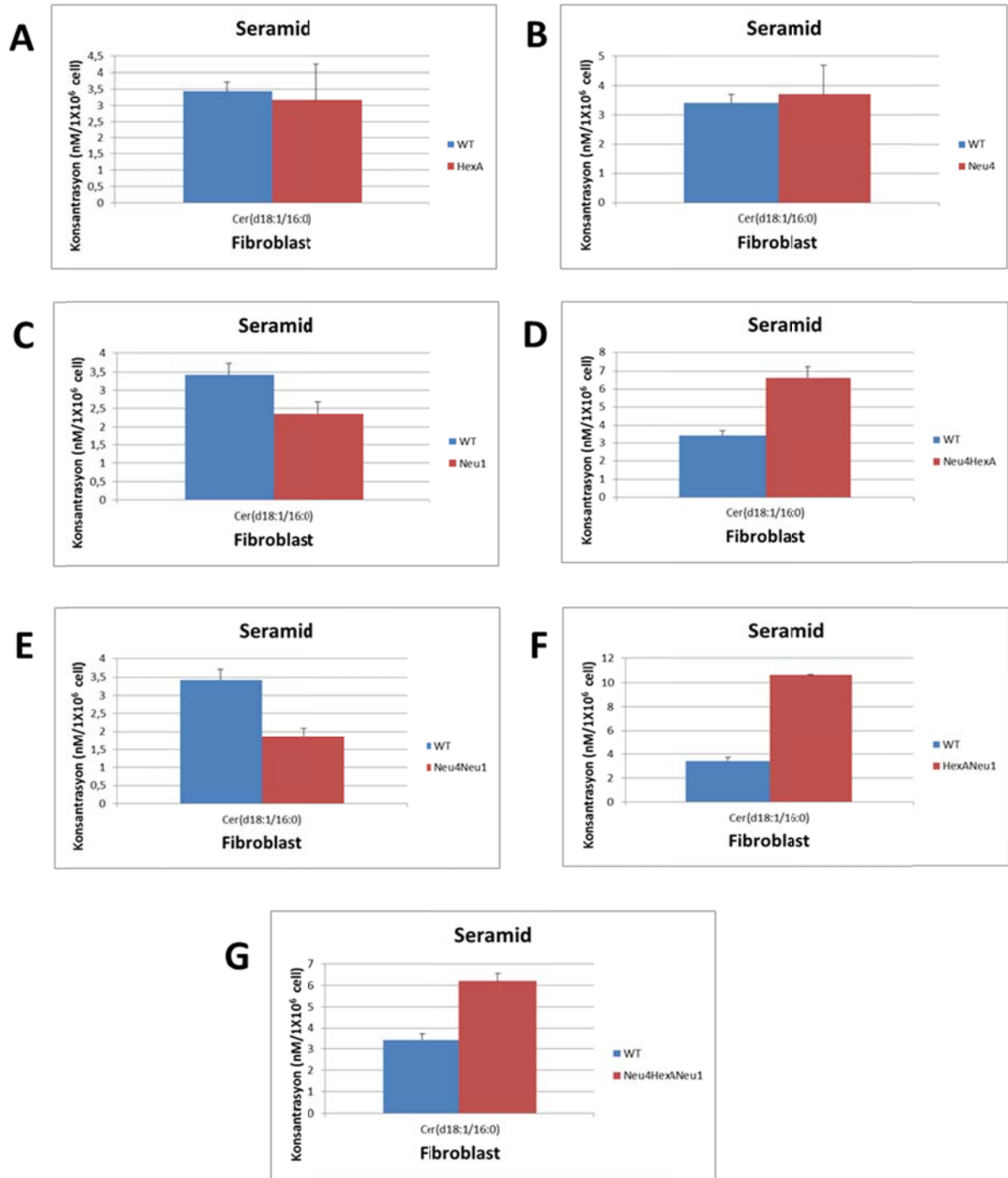
Şekil 74: Neu4Neu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



Şekil 75: HexANeu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.

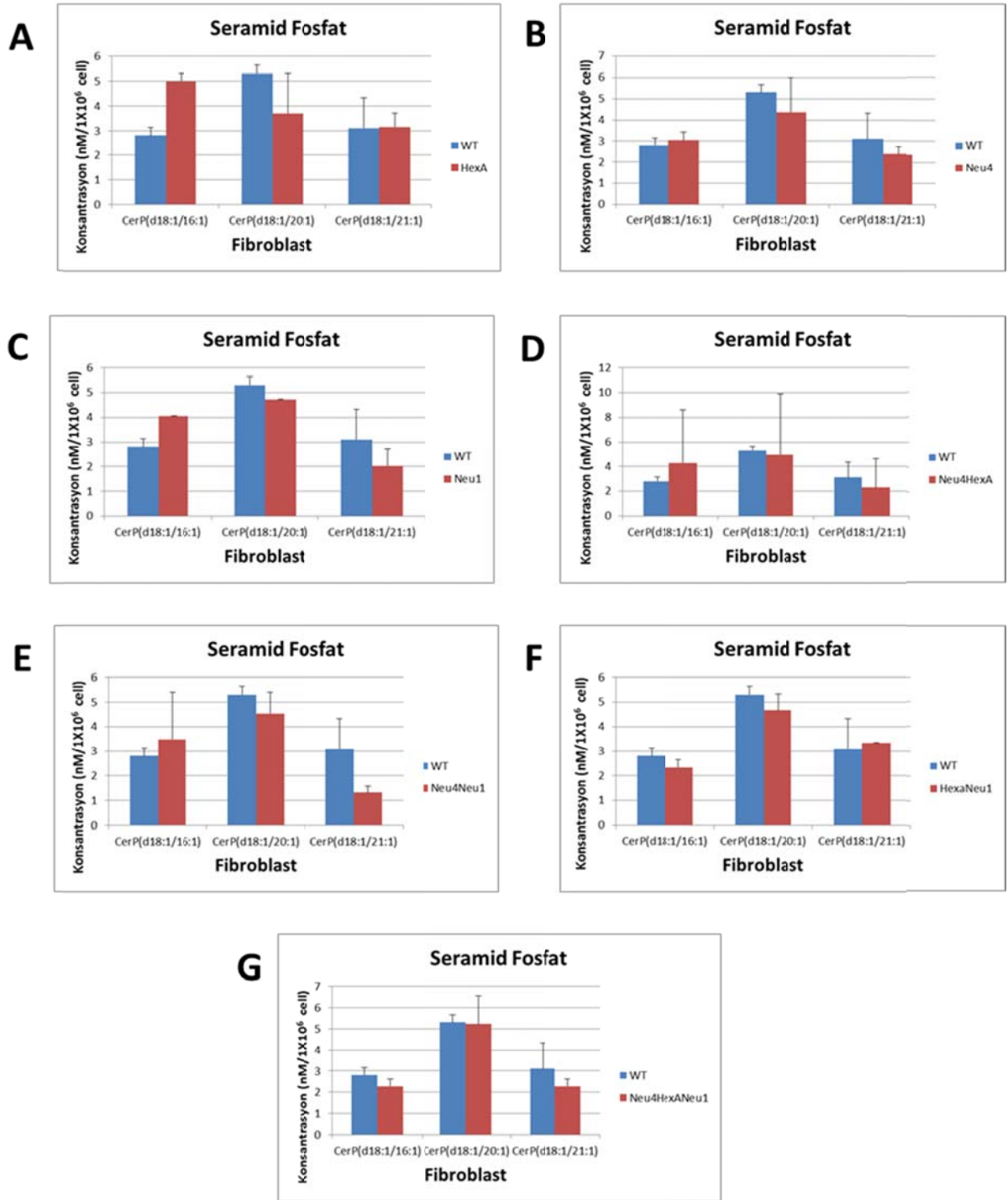


Şekil 76: Neu4HexANeu1 mutant fibroblast hücrelerinden izole edilen yağlardan yapılan prekürsör iyon taraması “264.4” M/Z 530 ve 870 arası. Yağlar ve M/Z oraları tabloda gösterilmiştir.



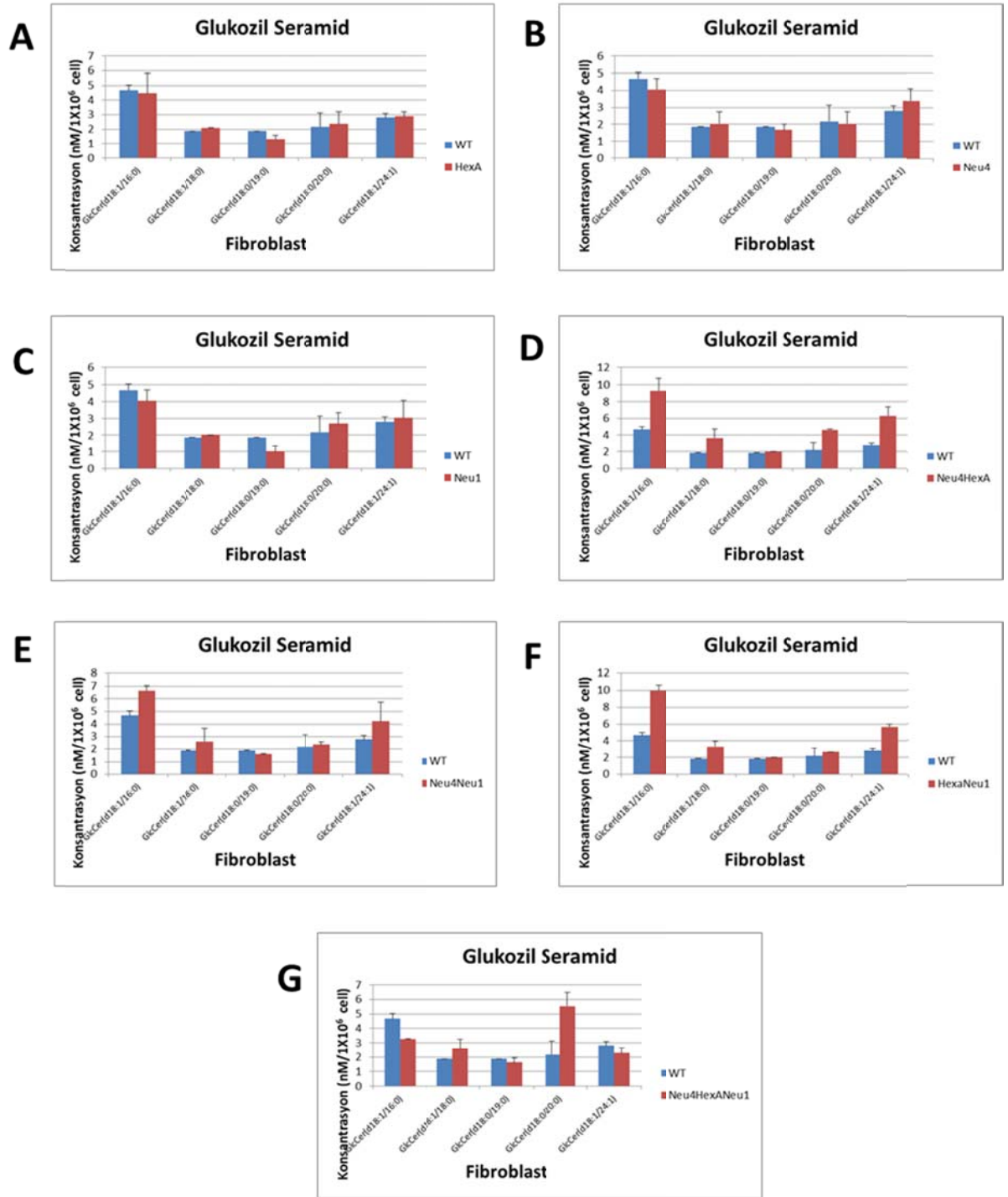
Şekil 77: WT(A), HexA(B), Neu4(C), Neu4HexA(D), Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve Neu4HexANeu1(G) fare fibroblast hücrelerindeki **Seramid** miktarı

Seramid miktarı ise fibroblast hücre hatlarında HexA ve Neu4 farelerde değişmezken, HexANeu4, HexNeu1 ve HexANeu4Neu1 farelerde 50-60% oranında artmıştır.



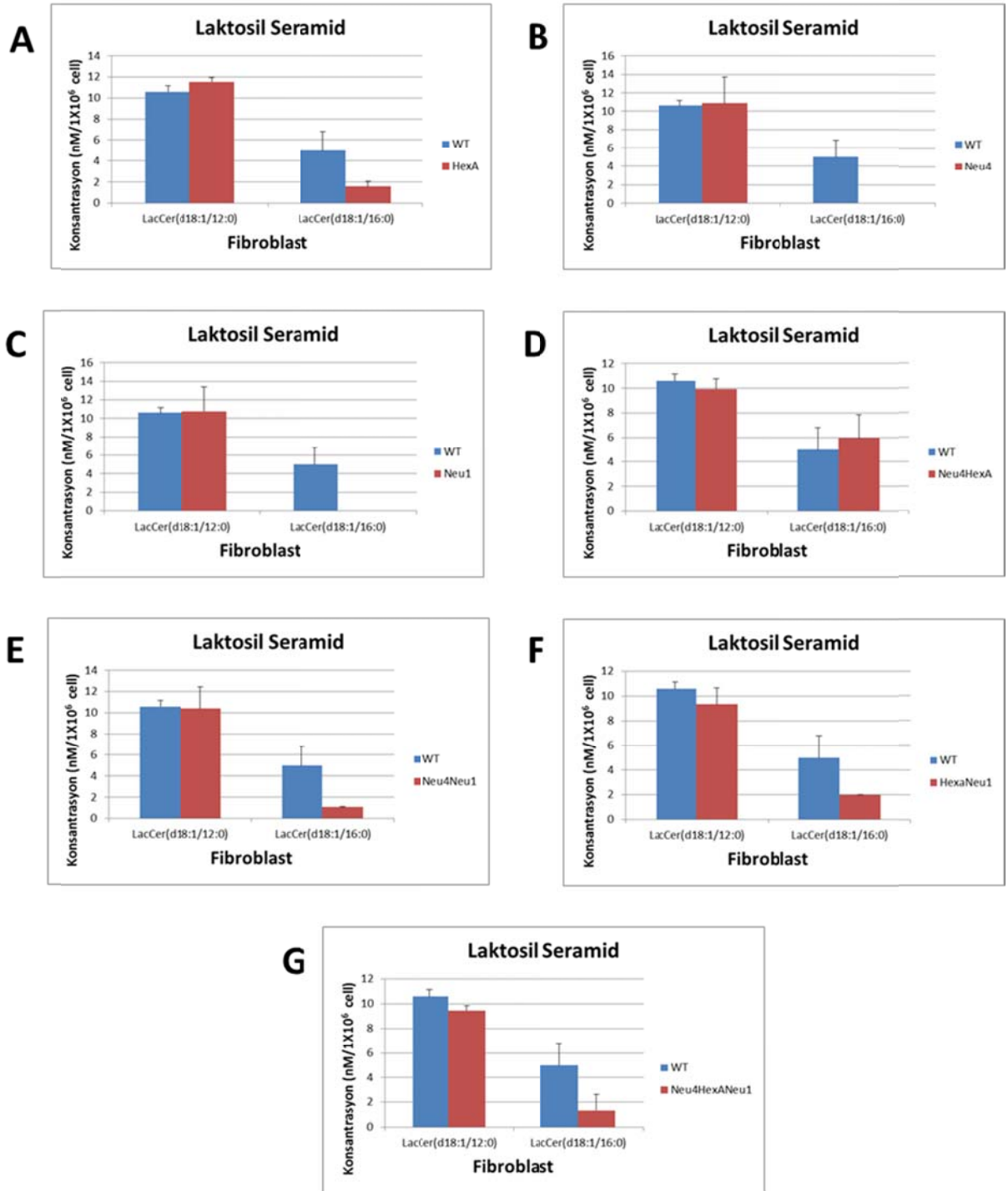
Şekil 78: WT(A), HexA(B), Neu4(C), Neu4HexA(D), Neu4Neu1(E), HexAHexA1(F) ve Neu4HexAHexA1(G) fare fibroblast hücrelerindeki **Seramid Fosfat** miktarı

Farklı enzim eksikliklerine ve seramid fosfat türlerine bakılarak fibroblastlarda elde edilen veriler net olarak değerlendirilememiştir. Bu nedenle analizlerin tekrar edilmesi planlanmıştır.



Şekil 79: WT(A), HexA(B), Neu4(C), Neu4HexA(D), Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve Neu4HexANeu1(G) fare fibroblast hücrelerindeki **GlukozilSeramid** miktarı

Özellikle glukozil seramid (d18:1/16:0) türünde HexANeu4, HexANeu1 ve Neu4Neu1 farelerde WT ile karşılaştırıldığında önemli artışlar gözlenmiştir.



Şekil 80: WT(A), HexA(B), Neu4(C), Neu4HexA(D), Neu4Neu1(E), HexANeu1(F) ve Neu4HexANeu1(G) fare fibroblast hücrelerindeki **Laktosil Seramid** miktarı

Laktosil seramid (d18.1716:0) HexANeu4Neu1, Neu4Neu1 ve HexANeu1 farelerde WT farelere göre %60 oranında azalmış diğerlerinde değişmemiştir.

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

Yağ molekülleri büyük çeşitlilik (10.000-100.000) gösteren karmaşık biyomoleküllerdir. 'Lipidomics' olarak adlandırılan ve yağ moleküllerinin hücre, doku ve organ fizyolojisindeki rolünün araştırıldığı kütle spektrometrisi analizleri dünyada son bir kaç yıldır çok büyük bir ivme kazanmıştır. Yağların düzenli bir şekilde yapım ve yıkımı hücrenin zar yapısı ve dinamiği, sinyal iletimi yada enerji homeostazının sağlanmasında önemli rol oynar. Vücudun çeşitli bölgelerindeki yağ düzeyi son derece sık bir şekilde kontrol edilmekte olup, yağ metabolizması enzimleri yada çeşitli yolaklardaki sorunların özellikle kanser, diabet, nörodejenatif ve enfeksiyon hastalıkları ile bağlantısı bilinmektedir. Alzhiemer, Down sendromu ve Farber ile Gaucher hastalığı gibi lizozomal depo hastalıklarında dokularda anormal fosfolipid düzeyi rapor edilmiştir .

Bu projede ülkemizde 'lipidomics' alanında kütle spektrometrisi kullanılarak yapılan hücre ve dokulardaki yağ moleküllerinin profillerinin çıkarılması araştırmalarını ilk kez başlattık. Proje kapsamında ülkemize davet edilen ve hem yayınları hem de yürüttüğü projeler bakımından 'Lipidomics' alanındaki uzmanlığı tartışmasız olan bilim insanı Danimarka'lı Dr. Elsing projenin başarıyla sonuçlandırılmasında önemli rol oynamıştır. **Dr. Elsing İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümünde bulunan QTRAP4000 kütle spektrometre cihazı ile gerekli olan standardizasyon çalışmalarını bizzat gerçekleştirmiş ve ziyaret süresince ayrıca 1 yüksek lisans ve 1 doktora öğrencisinin öğrencisine 'lipidomics' konusunda gerekli eğitim vermiştir.**

Projemiz lizozom biyoloji ve lizozomlardaki sialidaz enzimlerinin gangliosid gibi sialik asit içeren yağ moleküllerinin yıkım reaksiyonlarındaki biyolojik rollerinin daha iyi anlaşılmasına yöneliktir. Bu amaçla optimize edilen 'lipidomics' kütle spektrometre analiz yöntemleri ile elimizdeki biyolojik örnekler analiz edilebilmiştir. Biyoloji örnekler sekiz farklı genotipteki daha önce yaratılmış Tay-Sachs hastalığı fare modellerine ait hücre hatları ve 5-6 aylık fare dokularından elde edilen yağ özütlelerinden oluşmaktadır. Proje önerimizde daha önce 10-12 aylık farelerin çalışılacağı planlanmış olmasına rağmen elimizdeki örneklerin daha önce MS analizine uygun şekilde hazırlanmamış olması nedeni ile ve bu yaş grubunda farelerin Kanada'daki ortağımız Dr. Pshezhetsky'nin laboratuvarında bulunmaması nedeni ile sadece 5-6 aylık farelerin yağ profilleri çıkarılmıştır. Dr. Elsing hangi yağ türlerinin fare beyinde hangi bölümlerde daha yoğun bulunacağını normal fareler kullanarak çalışmıştır. Özellikle beyincik ve hipokampus'ün gliserofosfolipid ve sifingolipidler bakımından çok zengin olduklarını göstermiştir. Ayrıca bu iki bölüm PE (38:4, 40:6 ve 38:6), PC (34:1), Seramid (36:1,2), PI (38:4 ve 34:1), SM (36:1,2), PS (40:6) ve PG 34:1 ve 36:1 bakımından zengin olduğunu ilk kez göstermiştir. Dr. Elsing ile 5-6 aylık normal ve HexANeu4Neu1 farelerin

öncelikle cerebellum, hipokampus ve talamus bölgelerinde elde edilen yağlar ile yaptığı kütle spektrometresi çalışması yapılmıştır (n=2). Yağ miktarları analiz edildiğinde HexANeu4Neu1 farelerinde C-36 GM2 miktarı talamus ve hipokampüste, C-38 GM2 miktarın serebellumda, C-34 PC O- miktarının talamus ve hipotalamusta ve C-20 LPI miktarında serebellumda artış olduğu tesbit edilmiştir.

Dr.Sandoff'un laboratuvarında ince tabaka kromatografisi (TLC) ve kütle spektrometresi ile yağ özütü analizi yapılmıştır (n=2). GM2/GM1 oranı tüm beyin kullanılarak yapılan kütle analizlerinde HexANeu4 farelerde HexAfarelerle karşılaştırıldığında % 60 oranında artmış olmasına rağmen HexANeu1 ve HexANeu4Neu1 arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Buna karşılık GD1, GD2, GT1 ve SM4s gangliosid miktarlarında HexANeu4Neu1 fare beyinlerinde diğer farelerle karşılaştırıldığında %200 oranında artış tesbit edilmiştir.

Proje bursiyeri öğrencilerin İYTE Biyolojik Kütle laboratuvarında yaptığı çalışmalarda özellikle **36:1 sfingomiyelin** miktarında HexA, Neu4, Neu1, Neu4Neu1 arasında önemli bir fark tesbit edilmezken, HexANeu4, HexANeu1 ve Neu4HexANeu1 da WT göre %20-35 oranında artışlar gözlenmiştir. **42:2 sfingomiyelin** miktarında ise örnekler arasında fark yoktur. Neu1 enzim eksikliğine bağlı olarak sadece Neu1, HexA-Neu1 ve Neu4-Neu1 da farklı orandaki **fosfatidilkolin** miktarı azalmış olmasına rağmen HexANeu4Neu1 farelerde dikkat çekici bir artış vardır. **Seramid** miktarında ise WT fareler ile karşılaştırıldığında HexA, Neu1, HexANeu4, HexANeu1 ve HexANeu4Neu1 farelerde %20-60 oranında azalma tesbit edilmiştir. **Seramid fosfat** miktarı çalışılan hemen her beyin örneğinde normal fare örnekleri ile karşılaştırıldığında azalmıştır. Bu azalmanın hangi enzimin eksikliği sonucu olduğu ise net olarak anlaşılamamıştır. **Glukozil seramid** miktarında ise WT ile karşılaştırıldığında HexA, Neu1, HexANeu4 ve HexANeu1 farelerinde azalma tesbit edilmiş fakat Neu4, HexANeu4 ve HexANeu4Neu1 farelerinde fark gözlenmemiştir. **Laktosil seramid** (d18:1/12:0) miktarı Neu4Neu1 hariç tüm diğer örneklerde HexA eksikliği ile orantılı olarak WT ile karşılaştırıldığında önemli miktarda azalmıştır. Fibroblast hücre hatlarında ise özellikle HexANeu4, HexANeu1, Neu4Neu1 farelerde genelde tüm orandaki **fosfatidilkolin** miktarı dikkate değer şekilde artmıştır. **36:1 sfingomiyelin** miktarı HexA, Neu4Neu1 ve HexANeu1 farelerde değişmezken, Neu4 ve Neu1 farelerde artmıştır. **42:2 sfingomyelin miktarı** ise HexANeu4Neu1 farde WT ile karşılaştırıldığında artmıştır. **Seramid** miktarı ise fibroblast hücre hatlarında HexA ve Neu4 farelerde değişmezken, HexANeu4, HexNeu1 ve HexANeu4Neu1 farelerde 50-60% oranında artmıştır. Farklı enzim eksikliklerine ve seramid fosfat türlerine bakılarak fibroblastlarda elde edilen veriler net olarak değerlendirilememiştir. Bu nedenle analizlerin tekrar edilmesi planlanmıştır. Özellikle **glukozil seramid** (d18:1/16:0) türünde HexANeu4, HexANeu1 ve Neu4Neu1 farelerde WT ile karşılaştırıldığında önemli

artışlar gözlenmiştir. **Laktosil seramid** (d18.1716:0) ise HexANeu4Neu1, Neu4Neu1 ve HexANeu1 farelerde WT farelere göre %60 oranında azalmış diğerlerinde değişmemiştir.

Sialidaz enzimlerinin Tay-Sachs hastalığı fare modelinde β -Hekzosaminidaz A eksikliği sonucu birikmesi beklenen ve sialik asit içeren gangliosid GM2 sifingolipidini yıktığı ve bunun sonucunda ise farelerin hastalanmadığı düşünülmektedir. Bu hipotezi test etmek amacı ile yaratılan fare modellerine ait yağ profilleri kütle spektrometre kullanılarak çıkarılmıştır. Bu çalışmada farklı genotipteki farelerde normal farelerle karşılaştırıldığında değişken yağ profilleri tesbit edilmiştir. Buna karşılık özellikle Neu1 sialidazın farelerdeki bypass mekanizmasına katılmadığı fakat diğer gangliosidlerin yıkımında rol aldığı tesbit edilmiştir. Çalışmamızın ganglioside profillemeye ilgili çıktıları yayın olarak hazırlanmış ve Glycoconjugate Journal dergisine '**NEU1 contributes significantly to the degradation of neuronal B-series gangliosides but not to the bypass of the catabolic block in Tay-Sachs mouse models**'; ZK Timur, S Akyildiz Demir, C Marsching, R Sandhoff, V Seyrantepe' başlığı ile değerlendirilmek üzere sunulmuştur. Çalışmamızda farklı fare genotiplerine ait beyin dokusu ve fibroblast hücrelerinde tesbit ettiğimiz sifingomiyelin, fosfatidilkolin, seramid, fosfoseramid, glukozil seramid, ve laktozil seramid oranları ise değerlendirilerek yayın hazırlığı yapılmaktadır.

Bu çalışmadan elde edilen bilgiler sık rastlanan ve ölümcül bir nörodejeneratif hastalık olan çocukluk çağı Tay-sachs hastalığının tedavisine yönelik yeni metodların geliştirilmesinde önemli rol oynayabilir. β -hekzosaminidaz A eksikliği sonucu Tay-sachs hastalarında oluşan nöropatolojinin hastalığın erken döneminde durdurulabilmesi için sialidaz enzimlerinin ifade edilmesini veya aktivitelerinin artırılmasını sağlayan ve yağ metabolizmasının düzenlenmesine rol oynayacak ilaçların veya küçük moleküllerin bulunması özellikle bu ölümcül hastalığa yakalanan çocukların erken dönemde tedavi edilerek daha uzun ömürlü yaşamalarına olanak sağlayabilir. Özellikle bu hastalığın tedavisine yönelik ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları yapan ilaç firmaları projemiz kapsamında elde edilecek çıktılar doğrultusunda ileri düzeyde ilaç araştırmalarında bizimle iş birliği yapmak isteyeceklerdir. Tedaviye uygun ilaçların ülkemizde geliştirilmesi hem ilaç sektörüne hem de dünyadaki tüm Tay-sachs hastalarının tedavisine önemli bir katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

1. Monti E, Bonten E, D'Azzo A, Bresciani R, Venerando B, Borsani G, Schauer R, Tettamanti G. Sialidases in vertebrates: a family of enzymes tailored for several cell functions. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 2010;64:403-79. Review.
2. Seyrantepe V, Landry K, Trudel S, Hassan J, Morales CR, Pshezhetsky AV. Neu4, a novel human lysosomal lumen sialidase, confers normal phenotype to sialidosis and galactosialidosis cells. *J Biol Chem*. 2004; 279(35):37021-9.
3. Seyrantepe V, Canuel M, Carpentier S, Landry K, Durand S, Liang F, Zeng J, Caqueret A, Gravel RA, Marchesini S, Zwingmann C, Michaud J, Morales CR, Levade T, Pshezhetsky AV. Mice deficient in Neu4 sialidase exhibit abnormal ganglioside catabolism and lysosomal storage. *Hum Mol Genet*. 2008 Jun 1;17(11):1556-68.
4. Seyrantepe V, Lema P, Caqueret A, Dridi L, Bel Hadj S, Carpentier S, Boucher F, Levade T, Carmant L, Gravel RA, Hamel E, Vachon P, Di Cristo G, Michaud JL, Morales CR, Pshezhetsky AV. Seyrantepe V, Lema P, Caqueret A, Dridi L, Bel Hadj S, Carpentier S, Boucher F, Levade T, Carmant L, Gravel RA, Hamel E, Vachon P, Di Cristo G, Michaud JL, Morales CR, Pshezhetsky AV. Mice doubly-deficient in lysosomal hexosaminidase A and neuraminidase 4 show epileptic crises and rapid neuronal loss. *PLoS Genet*. 2010 Sep 16;6(9).
5. Phaneuf D, Wakamatsu N, Huang JQ, Borowski A, Peterson AC, Fortunato SR, Ritter G, Igdoura SA, Morales CR, Benoit G, Akerman BR, Leclerc D, Hanai N, Marth JD, Trasler JM, Gravel RA. Dramatically different phenotypes in mouse models of human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Hum Mol Genet*. 1996 J 5(1):1-14.
6. Ikeda K, Shimizu T, Taguchi R. Targeted analysis of ganglioside and sulfahide molecular species by LC/ESI-MS/MS with theoretically expanded multiple reaction monitoring. *J Lipid Research* 2008, 49: 2678-2689.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 112T410
Proje Başlığı: Lizozomal Neu1 ve Neu4 Sialidazın Yağ Metabolizmasındaki Biyolojik Rolü: Lipidom Analizi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. Volkan Seyrantepo
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Gülbahçe Köyü Urla/ İzmir
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Tunus Caddesi No:80 06100 Kavaklıdere / Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.10.2012 – 01.10.2014 (Uzatma 01.01.2015)
Öz (en çok 70 kelime) Çocukluk çağı hastalığı olan Tay-Sachs'ın patolojisini daha iyi anlamak ve uygun ilaç tedavi yöntemleri geliştirmek amacı ile yaratılan fare modellerinde lizozomal Neu1 ve Neu4 sialidaz enzimlerinin sialik asit içeren GM2 gibi glikolipidler ile çeşitli yağ moleküllerinin metabolizmasındaki biyolojik rolünü araştırdığımız EVRENA programı kapsamında ülkemize gelen Danimarkalı uzman araştırmacı Dr. Ejsing kütle spektrometrisi ile yağ profillendirme metodlarını standardize etmiş, öğrencilerimize gerekli eğitimi ve örneklerimiz analiz edilmiştir. Projemiz ülkemizde 'lipidomics: lipidom analizi' olarak adlandırılan ve ileri teknoloji ürünü kütle spektrometri cihazı kullanılarak yapılan yağ metabolizması konusundaki araştırmalara öncelik etmektedir.
Anahtar Kelimeler: Tay-Sachs, lipidom, sialidaz,
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/>
Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

Çalışmada elde edilen veriler yayın için hazırlanmaktadır.

Ekte Bulunan “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”, “Kazanımlar” Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşdığını Düşünüyorsanız “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”nu doldurunuz.

Proje Adı Lizozomal Neu1 ve Neu4 Sialidazın Yağ Metabolizmasındaki Biyolojik Rolü: Lipidom Analizi	Proje Yürütücüsü Doç. Dr. Volkan Seyrantepe
(PROJE ŞEKİL/GRAFİK/ FOTOĞRAF) <i>(En fazla 4 tane – jpg formatında, 35 x 35 cm (300 dpi)):</i> <i>İsimleriyle ve şekil altı açıklamalarıyla birlikte sıralanmış olarak formda belirtilmesi ve 300 dpi çözünürlükte ayrı jpeg dosyaları halinde formun ekleri olarak gönderilmesi gerekmektedir.</i>	Proje No 112T410
	Destek Miktarı (TL) 306.980TL
	Proje Başlama-Bitiş Tarihi: 01.10.2012 – 01.10.2014
	Yürütücü Kuruluş İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
	(PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ FOTOĞRAF) <i>300 dpi çözünürlükte ayrı jpeg dosyası olarak forma eklenmelidir.</i>
Projenin Amacı ve Önemi <i>(En fazla 150 kelime)</i> (Maddeler halinde sıralayınız). 1. Projemizin amacı lizozomal Neu1 ve Neu4 sialidaz enzimlerinin sialik asit içeren GM2 gangliosid gibi asidik glikolipidler ile çeşitli yağ moleküllerinin metabolizmasındaki biyolojik rolünü araştırmaktır. 2. EVRENA programı kapsamında ülkemize gelen Danimarkalı uzman araştırmacı Dr. Ejsing	

kütle spektrometrisi ile yağ profillendirme metodlarını standardize etmiş ve öğrencilerimize gerekli eğitimi vermiştir.

3. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünün ortak çalışmaları için kurulmuş bulunan Biyolojik Kütle Spektrometri Laboratuvarında bulunan QTRAP4000 (AB SCIEX) kütle spektrometri cihazı kullanılmış ve standardizasyon sonrası 8 farklı genotipe sahip farelerin beyinlerinden daha önce elde edilen yağ özütleri ve kurulan deri fibroblast hücre hatlarının yağ profilleri çıkarılmıştır.

4. Projemiz ülkemizde 'lipidomics: lipidom analizi' olarak adlandırılan ve ileri teknoloji ürünü kütle spektrometri cihazı kullanılarak yapılan yağ metabolizması konusundaki araştırmalara öncelik etmektedir.

Proje ile Elde Edilen veya Beklenen Bilimsel, Teknolojik, Ekonomik ve Sosyal Kazanımlar

(En fazla 200 kelime)

Tay-Sachs hastalığı tedavisi olmayan ve uygun fare modeli olmadığı için tedavi metodları geliştirilemeyen bir hastalıktır. Projede yapılan çalışmalar sonucunda farelerde insanlardan farklı olduğu bilinen glikolipid yıkım yolağında sialidaz Neu1 ve Neu4'in rol alabileceği konusunda bilgiler elde edilmiştir. Bu projede Neu1 sialidaz enzimin metabolik yolaktaki önemi gösterilmiş ve tamamen Neu1 sialidaz enzim eksikliği olan fare modelinin yaratılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu farenin elde edilmesi ve HexA fareler ile çiftleştirilmesi sonucu elde edilecek farelerde Tay-Sachs hastalık bulgularının görülmesi ile ilaç tedavi metodlarının uygulanabilmesi için ilk fare modeli elde edilecektir. Bu fareler kullanılarak herhangi bir ilacın geliştirilmesi hastalar ve aileleri için bir umut kaynağı olacaktır. Bu ilacın patentli bir ürüne dönüştürülmesi ülke ekonomisine çok önemli bir katkı sağlayacaktır.

Proje için TÜBİTAK Desteğinin Önemi *(En fazla 150 kelime)*

Bu proje daha önce yurt dışında başlatılan daha sonra TÜBİTAK tarafından desteklenen bir çalışmanın devamı niteliğindedir. TÜBİTAK'tan alınan proje desteği ile Türkiye'ye davet edilen Danimarkalı evrensel araştırmacı ve uzman Dr. C Ejsing ilk kez lipidomiks olarak adlandırılan ve kütle spektrometri analizi ile yağ profillendirme çalışmaları başlatılmıştır. Çok önemli bir çocukluk hastalığının fare modellerindeki yağ metabolizması ve burada rol alan sialidaz enzimlerinin önemi araştırılmıştır.

ARDEB BAŞARI ÖYKÜSÜ

1. Proje yürütücüsü iletişim bilgileri:

Adı – Soyadı : Volkan Seyrantepe

Unvanı : Doç. Dr.

Telefon : 05309334657

E-posta adresi : volkanseyrantepe@iyte.edu.tr