

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

EIF2 ALFA FOSFORİLASYONU ÜZERİNDEN GERÇEKLEŞEN ÖKARYOTİK
TRANSLASYONEL KONTROL MEKANİZMASINA YENİ İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN
ETKİSİNİN PROTEOM EBADINDA ARAŞTIRILMASI

Selen PEKER

Danışman Öğretim Üyesi : Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP

Eş Danışman Öğretim Üyesi : Doç. Dr. Bertal Hüseyin AKTAŞ

Mart

2016

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.


Selen PEKER

ONAY

Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP danışmanlığında Selen PEKER tarafından hazırlanan bu çalışma 31/03/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mithat BOZDAYI

İmza:

Üye: Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP

İmza:

Üye: Prof. Dr. Mustafa ŞAHİN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Çetin KOCAEFE

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

EIF2 ALFA FOSFORİLYASYONU ÜZERİNDEN GERÇEKLEŞEN ÖKARYOTİK TRANSLASYONEL KONTROL MEKANİZMASINA YENİ İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN ETKİSİNİN PROTEOM EBADINDA ARAŞTIRILMASI

Selen PEKER

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman Öğretim Üyesi : Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP
Eş Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Bertal Hüseyin AKTAŞ

Endoplazmik retikulum (ER), ökaryotik hücrelerde salgı ve transmembran proteinler gibi kompleks proteinlerin sentez, katlanma ve translasyon sonrası modifikasyonlarında anahtar rol oynayan önemli bir organeldir. Proteinlerin katlanamaması veya hatalı katlanması ile ER’de birikmesi sonucunda ER stres oluşur. ER stres ise, evrimsel olarak korunmuş olan ve “katlanmamış protein cevabı (*Unfolded Protein Response, UPR*)” adı verilen bir cevabı tetikler. UPR’de PERK, ATF6 ve IRE1 olmak üzere üç sinyal yolu, hücrede translasyonu azaltarak ER’de protein birikimini önleme, protein katlama kapasitesini artırmak amacıyla şaperon kodlayan genlerin translasyonunu artırma ve katlanmamış proteinleri ER aracılı yıkım ile ortadan kaldırma yolları ile stresin giderilmesinde rol oynar. ER stresin ve UPR’nin obezite, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu hastalıklar protein sentezinin anormal düzenlenmesi sonucu geliştiğinden, translasyonel kontrolün moleküler temellerinin ve mekanizmasının anlaşılması son derece önemlidir. Yapılacak daha ileri çalışmalar bu fizyolojik mekanizmaların tam rolünü açıklamak için gereklidir ve potansiyel terapiler için yeni yollar sağlayacaktır.

ER strese ilk yanıt olarak PERK, ER’deki yükü ve protein katlama talebini azaltmak üzere translasyon başlangıç üçlü kompleksi eIF2–GTP–tRNA^{Met}’nin bileşeni olan eIF2 α ’yı Serin 51 bölgesinden fosforile eder ve genel protein sentezini durdurur. N,N’-diarilürelerin protein sentezinin başlangıcını kontrol eden PERK/eIF2 α fosforilasyon kolunu HRI (*heme regulated kinase*)’ı aktive etmek sureti ile değiştirdiği ve böylece translasyon başlangıç üçlü kompleks bolluğunu azalttığı direkt fonksiyonel genetik ve biyokimyasal çalışmalarla gösterilmiş, ancak global olarak hangi proteinlerin ifadesinde değişiklik meydana getirdiği henüz araştırılmamıştır.

Bu çalışmada insan prostat kanser hücre hattı (PC-3) model olarak kullanılmış, bu hücrelerin Serin 51 mutant (S51A) ve yaban tiplerinin (WT) anti-kanser aktif (1781) veya inaktif (1527) N,N’-diarilüre bileşiklerle muamele edilmesiyle dört grup oluşturulmuştur. Anti-kanser aktif bileşiğin PC-3 insan prostat kanseri üzerindeki etkisi altında yatan moleküler mekanizmayı proteomik açıdan inceleyebilmek amacıyla iki boyutlu jel elektroforezi (2DE) ile oluşturulan protein profil haritalarının karşılaştırmalı analizleri gerçekleştirilmiş ve analizler sonucunda protein ifadesinde en az iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan protein spotlarından Matriks Eşliğinde Lazer İyonlaştırıcılı ve Uçuş Zamanıyla Ölçüm Yapan (MALDI-TOF) kütle spektrometresi ile metabolizma, transkripsiyon, sinyal iletimi, proteoliz ve protein katlanması gibi çeşitli biyolojik süreçler ile bağlantılı 17 protein tanımlanmıştır.

2016, 82 sayfa

Anahtar kelimeler: Endoplazmik retikulum stresi, katlanmamış protein cevabı, kanser, diarilüre, proteom, iki boyutlu jel elektroforezi, MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF NEW PHARMACEUTICAL ACTIVE MOLECULES ON EUKARYOTIC TRANSLATIONAL CONTROL MECHANISMS THROUGH EIF2 ALPHA PHOSPHORYLATION BY PROTEOMIC TOOLS

Selen PEKER

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Duygu ÖZEL DEMİRALP

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Bertal Hüseyin AKTAŞ

Endoplasmic reticulum (ER) is an organelle in eukaryotic cells that plays key role in the synthesis, folding and post-translational modifications of complex proteins such as secretory and transmembrane proteins. Accumulation of unfolded or misfolded proteins in the ER cause the ER stress, which triggers an evolutionarily conserved response, termed the “unfolded protein response (UPR)”. Three response pathways: IRE1, ATF6 and PERK, relieves ER stress by inducing genes such as ER chaperones to increase the protein-folding capacity of the ER, up-regulating components of ER-associated degradation (ERAD) pathway to enhance the clearance of unfolded proteins, and by inhibiting general protein translation to reduce the demand on the ER. It is known that ER stress and UPR are important features of a number of human diseases such as metabolic and neurological diseases, diabetes and cancer. These diseases states result from aberrant regulation of protein synthesis, so understanding the molecular basis and mechanisms of translational control is critical and further studies are needed to elucidate the exact role of this physiological mechanism and to provide new ways for potential therapies.

As first response to ER stress, PERK inhibits general protein translation through phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2 α), which is the the component of translation initiation ternary complex (eIF2–GTP–tRNA^{iMet}), on Serine 51 residue to prevent a further increase in protein-folding demand in the ER. Direct functional-genetic and biochemical evidence demonstrated that *N,N'*-diarylureas activate heme-regulated inhibitor kinase, thereby phosphorylating eIF2 α and reducing the abundance of the ternary complex, though global changes in protein expressions remain unknown.

In this study, four groups were used obtained by treating wild type (WT) or Serine 51 mutated (S51A) human prostate cancer (PC-3) cell lines either with active (1781) or inactive (1527) diarylurea compounds. Differences in protein expression levels among four groups were investigated by comparative two-dimensional gel electrophoresis (2DE) analysis. After comparative analysis, 17 proteins were identified by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometer from protein spots showing statistically significant differences in expression whose functions are connected with diverse biological processes such as metabolism, transcription, signal transduction, proteolysis and protein folding.

2016, 82 pages

Keywords: Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, cancer, diarylurea, proteome, two dimensional gel electrophoresis, MALDI-TOF MS.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmalarımnda her türlü desteği sağlayan sevgili danışman hocam Doç. Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP'e (Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği),

Tez çalışmasında kullanılan hücre örneklerini temin eden, bana laboratuvarını açan ve önerileri ile beni yönlendiren ikinci danışman hocam Doç. Dr. Bertal Hüseyin AKTAŞ'a (Harvard Tıp Fakültesi),

Laboratuvarda verimli ve huzur içinde, grup ruhuyla çalışmama olanak veren, gerektiğinde yardımlarını esirgemeyen "laboratuvardaki ailem"ın sevgili üyeleri Naşit İĞCİ, Beycan AYHAN, Seçil KARAHİSAR, Pınar BARKAN ve Hatice YILDIZHAN'a,

Eğitime ve bilime verdiği önemle ve dehasıyla beni yüreklendiren, attığım her adımı onayladığını hissettiğim merhum babam M. Selçuk PEKER'e, derin bilgisi ve sevgisi ile her zaman beni destekleyen şefkatli annem Ayfer PEKER'e, kıvrak zekası ve çözümleri ile yolumu aydınlatan sevgili ablam Evşen PEKER'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi 13L4143002 no'lu BAP projesi ve TÜBİTAK-BİDEB 2214/A-Yurt Dışı Araştırma Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM.....	4
2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUMDA PROTEİN KATLANMASI	4
2.2.1. GLUKOZ REGÜLE PROTEİN (GRP78)	5
2.2.2. GLUKOZ REGÜLE PROTEİN 94 (GRP 94).....	5
2.2.3. KALNEKSİN VE KALRETİKÜLİN	5
2.2.4. PROTEİN DİSÜLFİT İZOMERAZ.....	6
2.3. ER STRESİ VE KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI (UPR)	6
2.3.1. IRE1	7
2.3.2. ATF6	8
2.3.3. PERK	8
2.4. ER'DE PROTEİN YIKIMI	9

2.5. ER STRESİ İLE İNDÜKLENEN APOPTOZ	11
2.6. KANSER HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI.....	12
2.7. KANSER VE PROTEOMİKS.....	14
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	<u>18</u>
3.1. GEREKÇE.....	18
3.2. AMAÇ.....	19
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>21</u>
4.1. MATERYAL	21
4.1.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE ÖRNEKLERİ	21
4.1.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN DIARİLÜRE BİLEŞİKLER.....	21
4.1.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE CİHAZLAR	25
4.2. YÖNTEM.....	25
4.2.1. İNSAN PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDEN PROTEİN İZOLASYONU	25
4.2.2. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ.....	26
4.2.3. İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ	26
4.2.4. JELLERİN BOYANMASI VE GÖRÜNTÜLENMESİ	28
4.2.5. PDQUEST 8.0.1 PROGRAMI İLE JELLERİN KARŞILAŞTIRMALI İFADE ANALİZLERİ	28
4.2.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	28
4.2.7. PROTEİN SPOTLARININ JELDEN KESİLMESİ VE TRİPSİN ENZİMİ İLE PEPTİT İZOLASYONU 29	
4.2.8. MALDI-TOF KÜTLE SPEKTROMETRESİ İÇİN ÖRNEK HAZIRLAMA VE ÖLÇÜM.....	29
4.2.9. PEPTİT KÜTLE PARMAKİZİ (PMF) İLE BİYİNFORMATİK ANALİZ VE PROTEİN TANIMLANMASI	31
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>33</u>

5.1. İki BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI	33
5.2. İki BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ İLE PROTEİN PROFİL HARİTALARININ OLUŞTURULMASI.....	34
5.3. PROTEİN PROFİL HARİTALARININ PDQUEST 8.0.1 PROGRAMI İLE KARŞILAŞTIRMALI İFADE ANALİZLERİ	36
5.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	40
5.5. PEPTİT KÜTLE PARMAKİZİ (PMF) İLE BİYOİNFORMATİK ANALİZ VE PROTEİN TANIMLANMASI	42
<u>6. TARTIŞMA VE SONUC.....</u>	<u>51</u>
6.1. TARTIŞMA.....	51
6.2. SONUÇ.....	63
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>65</u>
<u>EKLER.....</u>	<u>74</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>78</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>80</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. UPR sinyal yolları	7
Şekil 2.2. Ubikitin-proteazom yolağının şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.3. ER homeostazının şematik gösterimi	11
Şekil 2.4. Bortezomib (Velcade)'in kimyasal yapısı.....	13
Şekil 4.1. PC-3 hücreleri ile muamele edilen a. 1527: İnaktif <i>N, N'</i> -diarilüre bileşik, 1-(2-chloro-5-nitrophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)urea (NCPdCPU), b. 1781: Aktif <i>N, N'</i> -diarilüre bileşik, 1-(benzo[<i>d</i>][1,2,3]thiadiazol-6-yl)-3-(3,4-dichlorophenyl) urea (BTdCPU) (18)	21
Şekil 4.2. Anti-kanser diarilüre bileşiğe (1781) ait HPLC pikleri.....	23
Şekil 4.3. Anti-kanser diarilüre bileşiğe (1781) ait LC-MS pikleri.....	24
Şekil 4.4. Karşılaştırmalı proteomik analizler için oluşturulan PC-3 hücre hattı grupları ..	25
Şekil 4.5. Örnek MALDI-TOF spektrumu (2)	31
Şekil 4.6. Mascot veritabanında PMF analizi ile protein tanımlama parametreleri	32
Şekil 5.1. pH 3-10, 17 cm uzunluğunda IPG strip kullanılarak elde edilen protein profil haritası (optimizasyon sonrası).....	33
Şekil 5.2. Her dört gruba ait 2D-PAGE teknik tekrarlarının PDQuest programına alındıktan sonraki görüntüsü	35
Şekil 5.3. Karşılaştırmalı jel analizleri için PDQuest programında kullanılan normalizasyon çeşitleri ve seçilen normalizasyonun gösterimi	36
Şekil 5.4. Çalışma grupları arasındaki eşleşen spot yoğunluk verilerine göre oluşturulmuş serpme çizim grafikleri.....	37
Şekil 5.5. (devam) Çalışma grupları arasındaki eşleşen spot yoğunluk verilerine göre oluşturulmuş serpme çizim grafikleri.....	38

Şekil 5.6. Dört grubun tüm teknik tekrarları dahil edilerek yapılan karşılaştırmalı matchset analizlerinde tüm jellerde eşleşen protein spotları	39
Şekil 5.7. Analizler sonucunda en az 2 grup arasında protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı değişim (artış/azalış) gösteren 56 protein spotunun referans jel üzerinde numaralandırılarak gösterimi.....	42
Şekil 5.8. Mascot veritabanında PMF analizi ile protein tanımlanması.....	43
Şekil 5.9. Tanımlanan proteinlerin spot numaraları, her bir gruba ait jellerde gösterimleri, isimleri ve yoğunluk bar grafi ortalamaları	45
Şekil 5.10. 1781 ve 1527 ile muamele edilen PC-3 hücrelerinde proteinler arasındaki tahmini sinyalizasyon ağları.	47
Şekil 5.11. MALDI-TOF MS ile tanımlanan proteinlerin GO (Gene Ontology) analizi ile moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılması (65-67)	48
Şekil 5.12. MALDI-TOF MS ile tanımlanan proteinlerin GO analizi ile dahil oldukları biyolojik süreçlere göre sınıflandırılması (65-67).....	48
Şekil 5.13. MALDI-TOF MS ile tanımlanan proteinlerin GO analizi ile protein sınıflarına göre sınıflandırılması (65-67).....	49
Şekil 5.14. MALDI-TOF MS ile tanımlanan proteinlerin GO analizi ile görev aldıkları yollara göre sınıflandırılması (65-67).....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 2.1. Kanser gelişimini engelleyen endoplazmik retikulum stres-/katlanmamış protein cevabı-hedefli ilaçlar	14
Tablo 4.1. MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonunda kullanılan peptitler ve kütleleri.....	30
Tablo 5.1. İstatistiksel analizler sonucunda protein ifadesinde anlamlı artış/azalış tespit edilen protein kümeleri ve <i>p</i> değerleri	41
Tablo 5.2. Peptit kütle parmakizi (PMF) ile tanımlanan proteinler ve ayrıntılı bilgileri	44
Tablo 6.1. Tanımlanan proteinlerin gen isimleri, kanserle ilişkileri ve gruplar arası kat artışları.....	53

SİMGELER DİZİNİ

1D SDS-PAGE	Bir boyutlu sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
2D-PAGE	İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
BİP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
BSA	Sığır serum albümini
°C	Santigrat derece
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
CHCA	<i>Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
CHOP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein</i>
cm	Santimetre
Da	Dalton
ddH ₂ O	Çift saflaştırılmış su
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
eIF2α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2alpha</i>
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
GDP	Guanozin difosfat

GTP	Guanozin trifosfat
GRP 78	Glukoz regüle protein 78
GRP 94	Glukoz regüle protein 94
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRI	<i>Heme-regulated inhibitor kinase</i>
IEF	İzoelektrik fokuslama
IPG	İmmobilize pH gradiyent
IRE	<i>Inositol requiring kinase 1</i>
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LC-MS	Likit Kromatografi-Kütle Spektrometresi
MALDI-TOF MS	Matriks Eşliğinde Lazer İyonlaştırıcı ve Uçuş Zamanıyla Ölçüm Yapan Kütle Spektrometresi
m/z	Kütle/yük
mg	Miligram
ml	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milimetre
MS	Kütle spektrometresi
Mw	Moleküler ağırlık
ng	Nanogram
<i>p</i>	İstatistiksel anlamlılık değeri
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PDI	Protein disülfid izomeraz
PERK	<i>Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>

pI	İzoelektrik nokta
PMF	Peptit kütle parmakizi
pmol	Pikomol
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
sa	Saat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SSP	<i>Sample spot protein</i>
tRNA	Transfer RNA
UPR	Katlanmamış protein cevabı, <i>Unfolded Protein Response</i>
V	Volt
XBP-1	<i>X-box binding protein-1</i>

1. GİRİŞ

Endoplazmik Retikulum (ER), bütün ökaryotik hücrelerde bulunan, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu düzenleyen, lipid biyosentezini sağlayan, salgı ve membran-ilişkili proteinlerin katlanmasında ve katlanma hatası olan proteinlerin yıkımında önemli rol oynayan karmaşık yapıda bir organeldir (1). Yeni sentezlenmiş bir polipeptit zincirinin biyolojik olarak aktif proteinlere dönüşebilmesi için ER’de katlanması ve translasyon sonrası değişikliklere uğrayarak özgül üç boyutlu yapısını kazanması gerekmektedir (2). ER, salgı yollarına gönderilecek proteinlerden yalnızca doğru katlanmış olanların golgiye geçişine izin vererek adeta bir “protein kalite kontrol merkezi” olarak görev yapar. Protein sentezinin ER katlama kapasitesini aştığı ya da sentezlenen proteinlerin örneğin mutasyondan dolayı katlanmaya uygun olmaması gibi durumlarda katlanamamış veya hatalı katlanmış proteinler ER lümeninde birikerek “Endoplazmik retikulum stresi” ne yol açarlar. ER stresi ise, evrimsel olarak korunmuş olan ve “katlanmamış protein cevabı (*Unfolded Protein Response*, UPR)” adı verilen bir reaksiyonu tetikler (3). UPR yolağında görevli üç transmembran protein; PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) ve IRE1 (*Inositol-requiring protein 1*) translasyonu azaltarak, katlanamamış ya da hatalı katlanmış proteinlerin yıkımını sağlayarak veya ER’nin proteinleri katlama kapasitesini artırarak, ER homeostazisinin yeniden sağlanmasına transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde yardımcı olur (4).

ER stresin ve UPR’nin Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların, obezite, diyabet gibi metabolik hastalıkların ve pek çok kanser türünün oluşumunda ve/veya gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (5-13). ER stresi ve UPR üzerinde yapılacak daha ileri çalışmalar bu fizyolojik mekanizmanın tam rolünü açıklamak için gereklidir ve potansiyel terapiler için yeni yollar sağlayacaktır (14). Çoğu normal hücre aktif stres yanıtına girmez ve UPR yolları bu hücrelerde pasif bir durumda kalır. Tümör hücreleri ile normal hücreler arasındaki bu fark, UPR’yi hedefleyen maddelere kanser tedavisinde özgüllük elde etmeleri için bir avantaj sağlar (15).

UPR yolağında ilk yanıt, PERK aracılığıyla eIF2 α (*Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha*)’nın fosforillenmesi ve böylece translasyon başlama hızının azaltılarak protein yükünün hafifletilmesidir. Translasyon başlama kaskadındaki anahtar düzenleyici basamak

eIF2, GTP (guanozin trifosfat) ve başlatıcı metiyonin tRNA (tRNA^{iMet})'den oluşan üçlü komplekstir. eIF2–GTP–tRNA^{iMet} üçlü kompleks 40S ribozomal alt ünite ile bağlanır ve diğer başlangıç faktörleriyle birlikte 43S ön-başlangıç kompleksini oluşturur. GTP'nin GDP (guanozin difosfat)'ye hidrolizi ve bundan kaynaklanan inorganik fosfat (Pi)'in kompleksten dışlanması ile protein sentezi başlar. Ortaya çıkan eIF2-GDP kompleksinin eIF2-GTP kompleksine evrilmesi bu başlangıç kompleksi için kritiktir ve yeni bir başlama kompleksi oluşumu için zorunludur. Bu evrilme GDP yerinden alınarak oraya GTP yerleştirilmesi ile mümkündür ve bu reaksiyonu eIF2 guanin nukleotid değiştirici faktör (*guanine nucleotide exchange factor*) olan eIF2B katalizler. eIF2B, beş proteinden oluşan bir enzim kompleksidir ve eIF2 α 'nın Serin 51 amino asidinin fosforilasyonu, eIF2B'nin guanin nukleotid değiştirici aktivitesini inhibe ederek üçlü kompleks oluşumunu engeller (16, 17). Hücre içinde eIF2B'den çok daha fazla eIF2 bulunduğu için, ve fosforile olan eIF2 α 'nın eIF2B'ye olan afinitesi fosforile olmayan eIF2 α 'nın afinitesinden çok daha fazla olduğu için, kısmi eIF2 α fosforilasyonu bile protein sentezini önemli ölçüde azaltabilir. Ökaryotik hücrelerde protein sentezinin eIF2 α fosforilasyonu ile kontrolü fizyolojik bir zorunluluktur. Nitekim, eIF2-GTP-tRNA^{iMet} üçlü kompleksin bolluğunun sürekli biçimde artırılması normal hücreleri dönüştürür ve kanser başlangıcına ve bazı anemilerin şiddetine katkıda bulunur. eIF2'nin aşırı ifadesi ve eIF2 kinazların inaktive edici mutasyonları çeşitli kanser türlerinde bildirilmiştir. Bu nedenle eIF2-GTP-tRNA^{iMet} üçlü kompleksinin miktarını değiştirecek kimyasal düzenleyiciler (*chemical modifiers*) insan hastalık patobiyolojilerindeki rollerinin çalışılması ve bu kompleksin farmakolojik tedavi edici amaçlar için hedeflenebilir olup olmadığının belirlenmesi için çok değerli araçlardır (18).

Böyle kimyasalların tespitinde, biyoloji ve kimya alanlarıyla ilgili bilimsel deneyler içerisinde özellikle ilaç keşfinde yüksek verimli tarama (*High-throughput screening*, HTS) yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek verimli tarama, robotik, veri işleme ve kontrol yazılımı, sıvı taşıma cihazları ve hassas dedektörler kullanarak, araştırmacının milyonlarca genetik, kimyasal ya da farmakolojik testi hızla yapmasına olanak sağlar. Bu süreç boyunca, belirli bir biyomoleküler yolağı modüle eden aktif bileşiklerin, antikörlerin veya genlerin hızlı bir şekilde belirlenmesi sağlanabilir. Bu deneylerin sonuçları, ilaç tasarımı ve belirli bir biyokimyasal sürecin biyolojideki etkileşimini ya da rolünü anlamak için başlangıç noktaları sağlar (19). Bu amaçla, bu tez çalışmasında ikinci danışman olarak

bulunan B. H. Aktaş ve arkadaşları tarafından, Harvard Tıp Fakültesi'nde R21AG032546 no'lu NIH (*National Institute of Health*) projesi kapsamında kanser tedavisi için entegre endoplazmik retikulum stres yanıtını hedefleyen kapsamlı bir çalışma gerçekleştirilmiş, ER stres yanıtının genetik ve kimyasal düzenleyicilerini belirlemek için yüksek verimli tarama analizleri kullanılarak tüm genom insan siRNA ve küçük kimyasal kütüphaneleri taranmıştır. Bu taramalar sonucunda, protein sentezinin başlangıcını kontrol eden PERK/eIF2 α fosforilasyon kolunu değiştiren, entegre ER stres yanıtı için eşsiz genetik ve kimyasal düzenleyiciler belirlenmiştir. Belirlenen bileşiklerden özellikle diarilüre sınıfının, eIF2 α fosforilasyonunu uyararak translasyon başlangıcını engellediği ve insan kanserinin ksenograft modellerinde tümör büyümesini ortadan kaldırdığı gösterilmiş ve verileri yayınlanmıştır (18).

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ve Harvard Tıp Fakültesi işbirliği ile gerçekleştirilen bu tez çalışmasında ise, daha önce genomik ve transkriptomik verileri yukarıda bahsedilen çalışmalarla elde edilen insan prostat kanser (PC-3) hücrelerinin Serin 51 mutant (S51A) ve yaban tiplerinin (WT) anti-kanser aktif (1781) veya onun inaktif analogu (1527) diarilüre bileşiklerle muamele edilmesi ile elde edilen dört hücre grubu kullanılmıştır. Anti-kanser aktif diarilüre bileşiğin, protein sentezinin başlangıcını kontrol eden PERK/eIF2 α fosforilasyon kolunu HRI (*heme regulated kinase*)'yı aktive etmek sureti ile değiştirdiği daha önce gerçekleştirilen direkt fonksiyonel genetik ve biyokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında ise bilinen bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmayı proteom ebadında daha detaylı inceleyebilmek amacıyla, 2DE tabanlı proteomik analizler gerçekleştirilmiş ve gruplar arasında farklı ifade olan proteinler Matriks Eşliğinde Lazer İyonlaştırıcılı ve Uçuş Zamanıyla Ölçüm Yapan Kütle Spektrometresi (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS) kullanılarak Peptit Kütle Parmakizi (*Peptide Mass Fingerprinting*, PMF) tekniği ile tanımlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM

Endoplazmik retikulum, hücre içi kalsiyum deposu olması ve sitozolik kalsiyum sinyallerini ayarlamasının yanında, salgı proteinleri ve transmembran proteinlerin sentez, katlanma, olgunlaşma ve hücre içinde işlev gösterecekleri bölgeye taşınmasından sorumlu membranöz ağ yapıda bir organeldir (20). Ökaryotik bir hücredeki ana protein katlama bölgesi ER, ikinci katlama bölgesi ise sitoplazmadır. Basit yapıli proteinler sitoplazmada katlanırken, zar ve salgı proteinleri gibi kompleks proteinler ER'de katlanır. Sitoplazmada protein katlanmasını düzenleyen birçok prensip ER'de de geçerlidir, ancak ER'deki protein katlanması pek çok translasyon sonrası modifikasyonu da içerdiğinden sitoplazmadaki protein katlanmasına göre çok daha komplekstir (21) ve dolayısıyla hata olasılığı daha yüksektir. ER, hücrede yeni sentezlenen proteinlerin doğru şekilde katlanmasını, yanlış bir katlanma oldu ise düzeltilmesini ve düzeltilemediği durumlarda yanlış katlanmış proteinlerin yıkıma gönderilmesini sağlayarak hücrede protein sentezi için adeta bir kalite kontrol merkezi olarak iş görür.

2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUMDA PROTEİN KATLANMASI

ER'ye giren yeni sentezlenmiş protein N-bağlı glikolizasyon, hidroksilasyon, lipidizasyon, disülfid bağ oluşumu gibi bir seri modifikasyona uğrar. ER içerisinde bir grup şaperon, yeni sentezlenen proteinin uygun şekilde katlanmasına ve sonrasında ER'den salınmasına yardımcı olur. Bu şaperonlar birkaç grupta toplanabilir;

- ❖ Genel şaperonlar: GRP78, GRP94, GRP170
- ❖ Lektin şaperonlar: Kalneksin ve kalretikülin
- ❖ Klasik olmayan moleküler şaperonlar: HSP47 ve Erp29
- ❖ Katlayıcı şaperonlar: Protein disülfid izomeraz, Peptidil prolin cis-trans-isomeraz (PPI), Erp57 (22, 23).

Bu şaperon proteinler içerisinde glukoz regüle protein 78 (GRP 78), glukoz regüle protein 94 (GRP94), kalretikülin (CRT) ve protein disülfid izomeraz (PDI) en bol bulunan ve en iyi karakterize edilmiş olanlarıdır (24).

2.2.1. GLUKOZ REGÜLE PROTEİN (GRP78)

Isı şok protein 70 (*Heat shock protein 70*, HSP70) ailesinin bir üyesi ve önemli ER şaperon proteinlerinden biri olan GRP 78 (diğer adıyla *binding immunoglobulin protein*, BiP) (24), 78 kilodalton (kDa) moleküler ağırlığa sahiptir ve glukoz regüle proteinler içinde en iyi tanımlanmış olanıdır.

1977 yılında keşfinden bu yana, GRP78/BiP'in yüksek miktarda ifadesi meme kanseri, hepatoselüler karsinoma ve prostat kanseri gibi çeşitli kanser tümörlerinde gösterilmiştir. Ön kanıtlar, prostat kanseri oranının ve ilerlemesinin strese neden olan bir dizi faktör ile ilişkili olduğunu göstermektedir (25). ER stresin, dolayısıyla UPR'nin esas düzenleyicisi olarak bilinen GRP78/BiP'in protein katlanması, kalite kontrolü ve yıkımı, kalsiyum bağlanması ve apoptozun düzenlenmesi gibi görevlerinin yanında embriyolojik gelişimde, kanser gelişiminde ve ilaç direncinde rol oynadığı bilinmektedir.

2.2.2. GLUKOZ REGÜLE PROTEİN 94 (GRP 94)

Isı şok protein 90 (*Heat shock protein 90*, HSP90) ailesinin bir üyesi olan GRP94, 94 kDa moleküler ağırlığa sahip dimerik bir proteindir. Protein katlanması, kalite kontrolü ve yıkımında, apoptozun düzenlenmesinde ve immünitede antijen sunumunda rol oynadığı bilinmektedir.

2.2.3. KALNEKSİN VE KALRETİKÜLİN

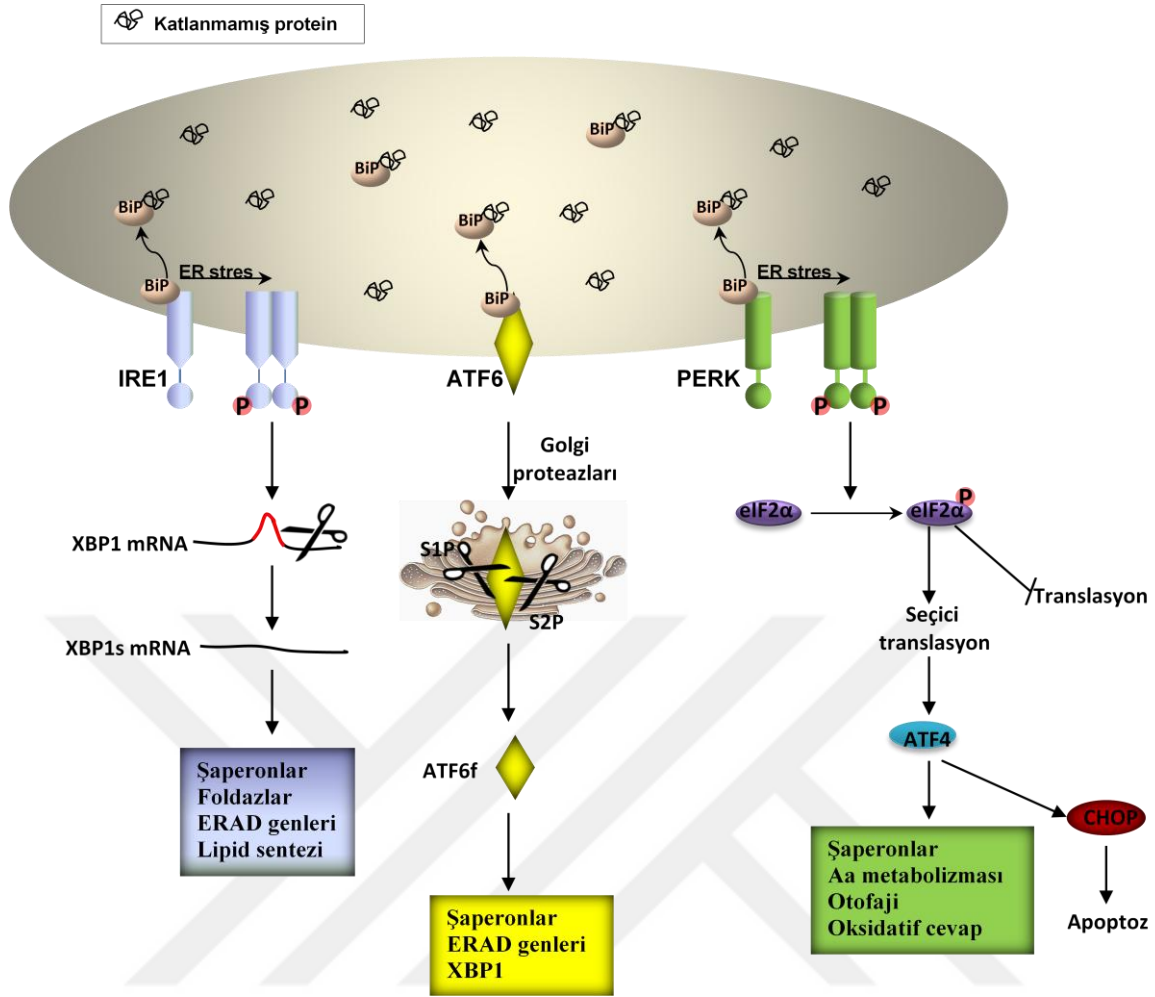
Kalneksin (CNX) ve kalretikulin (CRT), glikoproteinlerin kalite kontrolünden sorumlu lektin şaperonlardır. Kalneksin bir transmembran protein, kalretikulin ise onun lümende dolaşan çözünür homologudur. Kalretikülin, ER'de yeni sentezlenmiş glikoproteinlerin katlama ve kalite kontrolüne yardımcı olur (22). Kalneksin de kalretikülin ile aynı işi çözünür proteinler için gerçekleştirir. ER'de katlanacak olan proteinler glukoz ve mannoz gruplarının eklenmesi ile "N-bağımlı glikozilasyon" adı verilen bir modifikasyona uğrar. Bu modifikasyonlar sonucunda katlanacak proteinde kalretikülin ve kalneksin gibi şaperonların bağlanabileceği bir yüzey oluşur. Kalneksin ve kalretikülin, spesifik olarak bu glikolize olmuş proteinlerin katlanmasını teşvik eder, katlanmamış glikoproteinlerdeki monoglukozillenmiş glikanlar ile etkileşerek onları doğru katlanma gerçekleşene kadar ER içerisinde tutar (26).

2.2.4. PROTEİN DİSÜLFİT İZOMERAZ

Endoplazmik retikulumda bol bulunan bir enzim ve şaperon protein olan protein disülfid izomeraz (PDI), yeni sentezlenmiş polipeptitlerde disülfid bağı oluşumu, protein katlanması ve yeniden düzenlenmesini katalizler (23). Ayrıca katlanamayan proteinlerin tanınmasında ve yıkıma gönderilmesinde rol oynar.

2.3. ER STRESİ VE KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI (UPR)

Proteinler katlanamadıklarında veya hatalı katlandıklarında ER'den golgiye gönderilemez. Bu katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin ER'de birikmesi ile ER homeostazisi bozulur ve "Endoplazmik retikulum stresi" adı verilen bir durum ortaya çıkar. ER stresi ise evrimsel olarak korunmuş olan ve "katlanmamış protein cevabı (*Unfolded Protein Response, UPR*)" adı verilen bir hücrel reaksiyonu tetikler. UPR yolağında üç transmembran protein; ATF6, IRE1 ve PERK rol oynar ([Şekil 2.1](#)). Normal koşullarda, yani stres olmadığı durumda GRP78/BiP, bir ana düzenleyici olarak davranır ve her üç UPR sensörü ile doğrudan etkileşerek bu sensörleri inaktif formda tutar (24). Katlanmamış proteinler GRP78/BiP'e bağlanmak için PERK ve IRE1 ile rekabet ettiğinden, ER'de katlanmamış proteinlerin artması inaktif BiP/PERK ve BiP/IRE1 hetero-dimerlerinin bozulmasına, ve onların yerine aktif PERK/PERK ve IRE1/IRE1 homodimerlerinin oluşmasına sebep olur. ER stres durumunda her üç UPR sensörü GRP 78'den ayrılarak aktive olur ve translasyonu azaltarak, ER'de yerleşik şaperonları kodlayan genlerin ifadesini artırarak, ER kapasitesini genişleterek, ER-ilişkili degradasyon (ERAD) elementlerini aktive ederek mevcut stresi gidermeye çalışır (27-29).



Şekil 2.1. UPR sinyal yolları

2.3.1. IRE1

Hücrede stres olmadığı durumda GRP78/BiP ile bağlı inaktif halde bulunan IRE1, stres durumunda GRP78/BiP'den ayrılır, oligomerizasyona ve otofosforilasyona uğrayarak aktive olur. Serin treonin kinaz domaini ve endonükleaz domainine sahip çift aktiviteli bir tip I transmembran proteini olan XBP1, GRP78/BiP'den ayrıldığında endoribonükleaz aktivitesi ile XBP1'in mRNA'sında 26 nükleotitlik bir kısmı keserek intronları uzaklaştırır. Geriye kalan 5' ve 3' mRNA parçaları birleşerek çerçeve kayması sonucu büyük ölçüde yeni bir protein olan XBP1s (*XBP1 spliced*)'yi kodlar. Fonksiyonel bir transkripsiyon faktörü XBP1s, ER şaperonlarının ve protein degradasyonunda görevli faktörlerin sentezinde artışa yol açmak sureti ile ER stresi azaltmaya yardımcı olur (29, 30).

2.3.2. ATF6

Stres dışı durumda GRP78/BiP ile bağlı inaktif halde bulunan bir tip II transmembran proteini olan ATF6, ER stres durumunda GRP78/BiP tarafından serbest bırakılır ve ER'den golgiye geçer. Burada yerleşik bir serin proteaz olan bölge-1 proteaz (*site 1 protease*, S1P) ve bir metalloproteaz olan bölge-2 proteaz (*site 2 protease*, S2P) tarafından kısmi olarak kesilerek lösün fermuar içeren aktif transkripsiyon faktör domaini sitoplazmaya salınır. Serbest haldeki ATF6 hücre çekirdeğine göç ederek, UPR'de görev alan XBP-1'in ve hücre çekirdeğinde hatalı proteinlerin tamirinde görev alacak GRP78/BiP, GRP94 ve kalneksin gibi proteinlerin transkripsiyonunu uyarır. Ayrıca ATF6, uzun süreli kronik ER streste CHOP aktivasyonuna neden olarak hücre apoptozuna da katkıda bulunur (31-33).

2.3.3. PERK

ER lümeninde stres algılama domaini ve sitozolde kinaz domaini içeren tip I transmembran proteini olan PERK (24), hücre stres altında değilken GRP78/BiP ile bağlı inaktif heterodimerik durumdadır. Stres durumunda GRP78/BiP, PERK'den ayrılır ve katlanmaya yardımcı olmak üzere lümeneye gider. PERK ise otofosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlamak üzere dimerize olur. ER strese ilk yanıt olan PERK'in en önemli fonksiyonu, katlanmamış proteinlerin birikmesini önlemek amacı ile yeni proteinlerin sentezinin azaltılmasıdır. PERK, ökaryotik başlama faktörü olan eIF2 α 'nın fosforilasyonu ile eIF2-GTP-tRNA translasyon başlama üçlü kompleks miktarını azaltır ve böylece genel protein sentezini başlangıç noktasında durdurur.

Bilindiği gibi, eIF2-GTP-tRNA^{Met} üçlü kompleksinin oluşumu translasyon başlama kaskadındaki ilk kritik adımdır. Translasyonun başlaması için, inaktif durumdaki eIF2-GDP kompleksindeki GDP'nin, bir guanin nükleotit değiştirici faktör olan eIF2B tarafından salınıp yerine GTP bağlanması ve böylece aktif haldeki eIF2-GTP kompleksine dönüştürülmesi gerekir (20, 34). ER stres, PERK'in protein kinaz aktivitesinin artmasına, dolayısıyla eIF2 α fosforilasyonuna yol açar. Serin 51 amino asidinden fosforile olan eIF2 α (eIF2 α -P), eIF2B'ye yüksek bir afinite ile bağlandığı gibi, bu enzimin guanin nükleotit değiştirici aktivitesini de baskılar. GDP-GTP dönüşümünü engelleyen bu fosforilasyon, eIF2B'nin inhibisyonu, eIF2-GTP-tRNA^{Met} üçlü kompleks miktarının ve dolayısıyla

genel protein sentezi miktarının düşmesi ve ER'deki yükün azalması ile sonuçlanır (35-37).

PERK yolağında eIF2 α fosforilasyonu ile global protein sentezinin baskılanmasına karşın, ATF4 gibi 5' kodlanmayan bölgelerindeki (*untranslated region*, UTR) yukarı açık okuma çerçevelerinde (*upstream open reading frame*, uORF) düzenleyici sekanslar içeren mRNA'ların translasyonu artar. Seçici translasyon dediğimiz bu olay, bir transkripsiyon faktörü olan ATF4'ün ifadesini artırarak ER katlama kapasitesini ve strese adaptasyonu teşvik eden UPR hedef genlerinin ifadesini uyarır. Normal koşullar altında ATF4 translasyonunu önleyen bu yukarı ORF, yalnızca eIF2 α fosforile olduğunda aktive olur ve ATF4 translasyonu görülür (20, 24). UPR'nin PERK kolu, genel protein sentezini azaltırken adaptif cevap için önemli olan translasyon faktörlerinin miktarını bu şekilde seçici olarak artırması nedeniyle translasyon seviyesini ayarlayan önemli bir stres yanıtı olarak bilinmektedir. Pek çok kanser türünde, PERK ve eIF2 α 'yı takiben ATF4 ve CHOP anoksi ile uyarılır (38). PERK ile indüklenen apoptozun temel mekanizmasının ATF4/ATF3 aracılığında CHOP ifade artışı yoluyla olduğu düşünülmektedir. CHOP'un apoptozu nasıl indüklediğinin kesin mekanizması henüz belirlenememiştir (39).

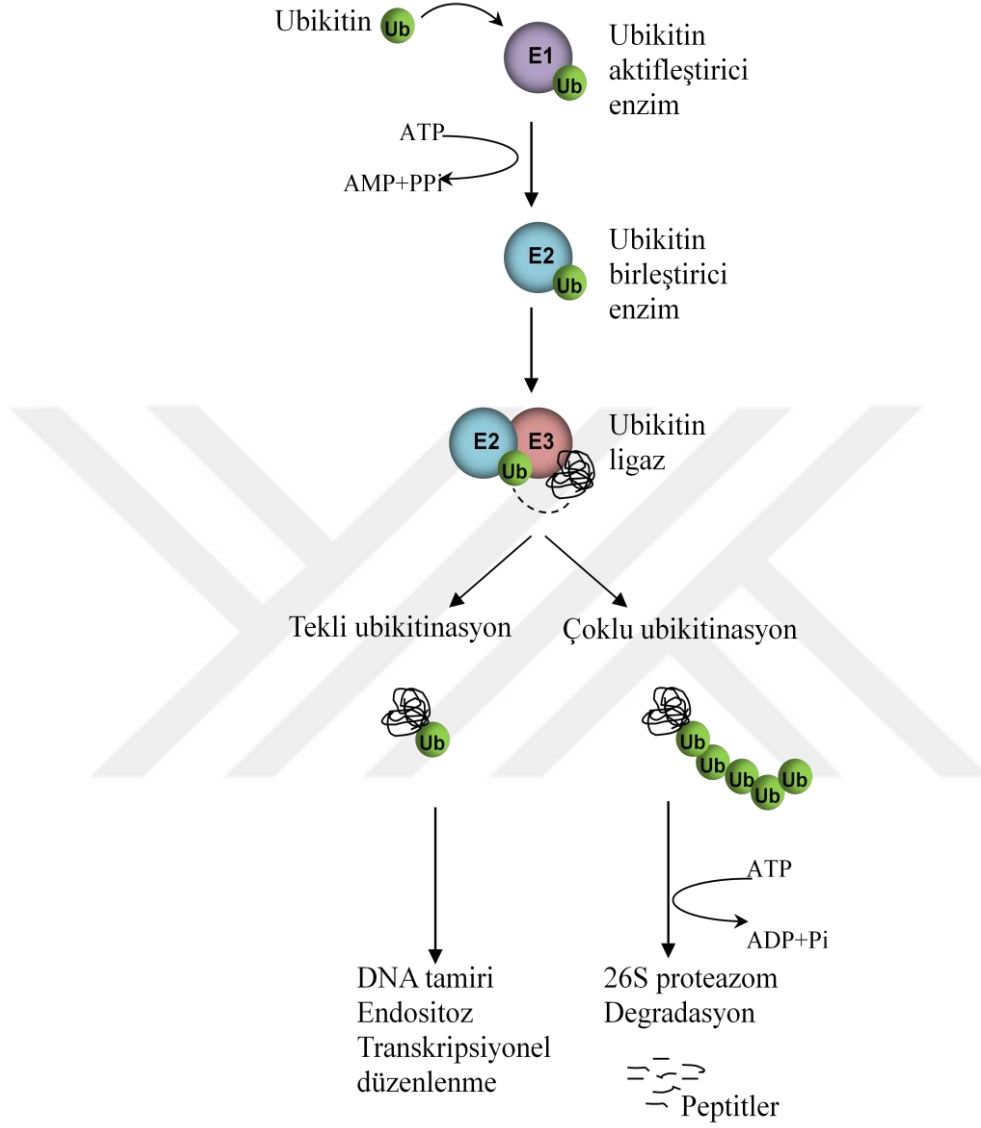
ER stresteki rolünün yanında PERK, besin yoksunluğu, hipoksi ve radyasyon sırasında hayatta kalma mekanizması olan otofaji aktivasyonunda da önemli rol oynar. Bu iki işlev PERK'in büyüme ve hayatta kalmayı düzenlemesine izin verir (5, 20, 40).

2.4. ER'DE PROTEİN YIKIMI

Katlanma hatası olan proteinlerin ortak özelliği, dış yüzeye çıkan hidrofobik amino asitlerin varlığıdır. Şaperonlar, proteinlerdeki hidrofobik amino asit tanıma kısaçları ile hatayı düzeltmeye çalışırlar. Hatayı düzeltemedikleri durumda lizin 48'den ubiquitinleyerek "proteazomal yıkım" veya lizin 63'den ubiquitinleyerek "lizozomal yıkım" (otofaji) gerçekleştirilir.

Serbest ubiquitin (Ub), bir kompleks oluşturmak için ubiquitin aktifleştirici enzim (E1) tarafından aktive edilir ve daha sonra birçok ubiquitin birleştirici enzimden birine (E2) transfer edilir. E2, hedef proteinlerin üzerinde bir veya birden fazla ubiquitin molekülünün polimerizasyonunu sağlayan ubiquitin ligaza (E3) katılır. Genellikle ubiquitin molekülleri bir

çoklu-ubikitin zinciri şeklinde bir substrata bağlanır. Çoklu ubikitinasyon, proteazom tarafından yıkım için substratı etiketler. Tekli-ubikitinasyon ise endositoz, DNA onarımı ve transkripsiyonel regülasyon gibi çeşitli süreçleri düzenler (41) ([Şekil 2.2](#)).

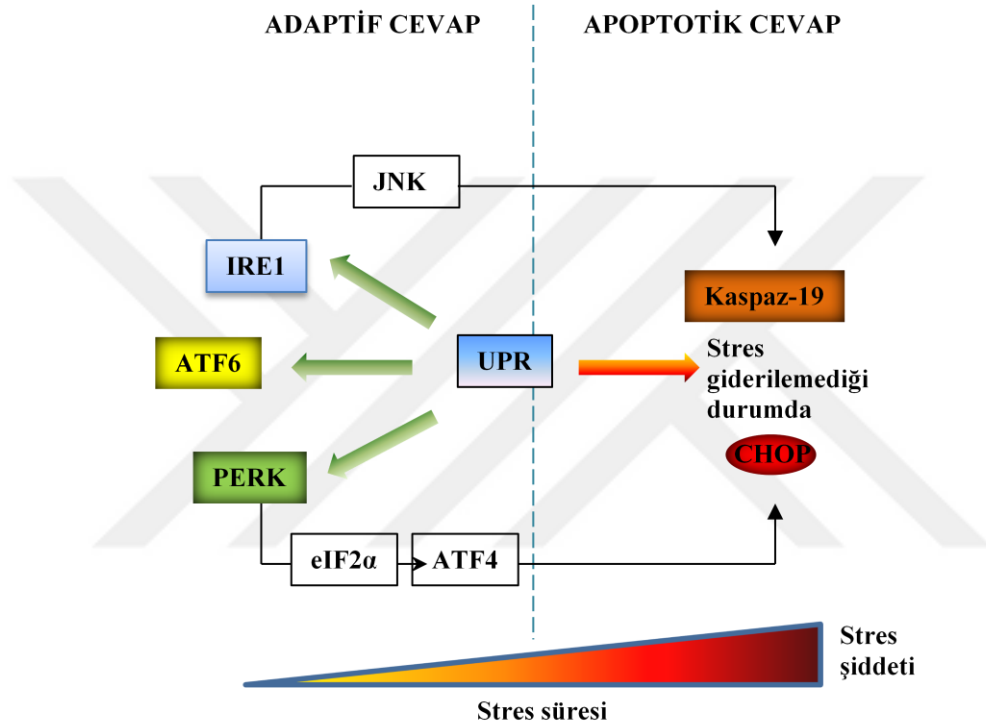


Şekil 2.2. Ubikitin-proteazom yolağının şematik gösterimi

Proteazomal yıkımın hedeflenmesi, çeşitli kanser tedavilerinde önemli ve kanıtlanmış bir yaklaşımdır. Proteazom inhibitörleri, yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonunu engelleyerek, ER stresi tetikleyerek ve apoptoz sinyallerini aktive ederek moleküler hedefli anti-kanser ilaçların yeni bir sınıfını teşkil etmektedir (7, 42).

2.5. ER STRESİ İLE İNDÜKLENEN APOPTOZ

Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi, ER stres durumunda biriken katlanamamış/hatalı katlanmış proteinlerin bertarafı veya tekrar katlanması ile homeostazinin yeniden sağlanması için, adaptif bir cevap olan UPR mekanizması kullanılır. Ancak UPR her zaman stresin giderilmesi için yeterli olmayabilir. Giderilemeyen veya uzayan stres durumunda hücre apoptoza gönderilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. ER homeostazının şematik gösterimi

Diğer adı “programlanmış hücre ölümü” olan apoptoz, ihtiyaç duyulmayan veya doğal dengesinin dışına çıkarak organizma için zararlı hale gelen hücrelerin bertarafını belirli moleküler işlemler serisini izleyerek gerçekleştiren, yaşam döngüsü için gerekli ve yararlı bir mekanizmadır. Organizmada hücrelerin mitozla yapımı ile apoptozla yıkımı arasında kontrollü bir denge vardır. Bu denge organizma için son derece önemli olup, dengenin bozulması pek çok hastalığın patogenezi için önemli katkıda bulunur (18, 43). Klasik olarak aşırı hücre proliferasyonunun malign hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Ancak aşırı proliferasyonun yanında, azalmış apoptoz hızı da malignite gelişimine katkıda bulunur. Gerekliğinde apoptoza gidemeyen ve böylece beklenenden daha uzun süre yaşayan

hücreler, mutasyonların etkisiyle malign hücelere dönüşme potansiyeli taşırlar (44). Dolayısıyla apoptoz bir denge içerisinde, kontrollü bir şekilde gerçekleşmelidir. Gereksiz yere gerçekleşen ya da olması gerekenden daha hızlı veya daha yavaş gerçekleşen apoptoz organizmayı tehlikeye sokar. AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C infeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar apoptozun gereksiz yere gerçekleştiği veya arttığı hastalıklara örnek olarak verilebilir. Azalmış veya yavaşlamış apoptoz ise otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve birçok kanser türü için karakteristiktir (43, 44).

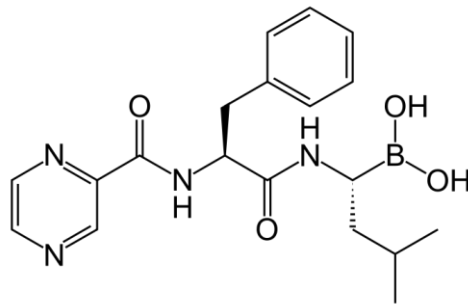
2.6. KANSER HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI

Bilindiği gibi kanser başta olmak üzere çok sayıda hastalık, protein sentezinin anormal düzenlenmesinin sonucudur (18). Kanser ilerlemesi, hızlı çoğalan ve dolayısıyla artan protein sentezine ihtiyaç duyan kanser hücreleri ile karakterize edilir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde membran ve salgı proteinlerinin katlanma, organize olma ve taşınmasını kolaylaştırmak için gelişmiş bir ER aktivitesi gereklidir (24). ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ile oluşan ER stresin, kanser hücrelerinin yayılması ve hayatta kalması üzerinde derin bir etkisi vardır (45). Doğrudan veya dolaylı olarak tümörü etkileyebilen ER stres ile ilişkili çeşitli anti-kanser maddeler yakın zamanda incelenmiştir. Ancak kanser hücrelerinin spesifik hedefleri henüz belirlenebilmiş değildir ve söz konusu maddelerin tümörleşme göstermeyen hücrelerdeki etkisi de halen araştırma konusudur. ER stres, gelecekte yapılacak çalışmalarda hipoksi, inflamasyon ve anjiyogeneze uyumu azaltmak için belirli sinyal yollarına müdahale ederek ve böylece ilaç direncini aşarak ilaç geliştirmek için potansiyel bir hedeftir (46).

ER stresin yanında UPR aktivasyonunun da birçok kanser türünün gelişimine katkıda bulunduğu ve kanser gelişiminde her yönüyle önemli rollere sahip olduğu kanıtlanmıştır (47). ER stresin süresine ve ciddiyetine bağlı olarak UPR, adaptif sinyalleri ve hayatta kalma sinyallerini etkinleştirebilir veya apoptotik hücre ölümünü uyarabilir (24). Kitle kanserleri genellikle stresli bir mikroçevrede geliştiği için, dönüşmüş (*transformed*) hücreler hayatta kalma stratejilerinden biri olarak UPR aktivasyonunu kullanabilir. Birçok çalışma tümör büyümesi ve kemoterapi direncinde UPR sinyalizasyonunun önemli rollerini göstermiştir (47).

Her üç UPR sinyal yolunun da tümör gelişimine katıldığı bilinmektedir. IRE1 α ve XBP1 kanser gelişimine katkıda bulunur. Meme kanseri, hepatosellüler karsinoma ve pankreatik adenokarsinoma gibi pek çok insan kanser türünde XBP1 seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Benzer şekilde, diğer bir sinyal yolu olan PERK/eIF2 α /ATF4'ün de kanser gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (46). Bu bağlamda bu sinyal yollarının birbirleriyle etkileşimlerinin, birbirlerini nasıl düzenlediklerinin ve aktivitelerine ne gibi etkilerde bulduklarının anlaşılması ve varsa sinyal yollarında rol alan yeni bileşenlerin aydınlatılması önemlidir (47).

Uzun yıllardır ER stres ve UPR yollarının çeşitli bileşenleri üzerine pek çok çalışma yapılarak kanser hücrelerinin oluşumu, çoğalması veya yayılmasını engelleyebilecek bazı stratejiler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu stratejilerin çoğu ne yazık ki etkili olmamakla beraber, az miktarda umut verici çalışma söz konusudur. Örneğin, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (*US Food and Drug Administration*, FDA) tarafından multipl miyelom için ilk basamak tedavi olarak onaylanmış, son derece seçici ve geri dönüşümlü bir proteazom inhibitörü olan bortezomib (ticari adı ile Velcade) ([Şekil 2.4](#)), PERK, ATF4 ve CHOP'u indükler, yanlış katlanmış proteinlerin ERAD tarafından bertarafını engeller ve ER stres-aracılı apoptoza neden olmak sureti ile miyeloma hücrelerinin ölümüne yol açar (46, 48, 49). Ayrıca yapılan in vitro çalışmalar, prostat, akciğer, meme ve kolon da dahil olmak üzere pek çok kanser hücresinde bortezomibin sitotoksik etkilerini doğrulamıştır (46, 50). FDA tarafından onaylı tek bileşik olan bortezomibin dışında onlarcasının da prelinik, faz II veya faz III çalışmaları devam etmektedir ([Tablo 2.1](#)).



Şekil 2.4. Bortezomib (Velcade)'in kimyasal yapısı

Özetle, ER homeostazının bozulması tümör gelişiminde kritik rol oynar ve ER ve/veya UPR bileşenlerinin tedavi edici düzenlemeleri potansiyel antitümör tedaviler sağlayabilir (24).

Tablo 2.1. Kanser gelişimini engelleyen endoplazmik retikulum stres-/katlanmamış protein cevabı-hedefli ilaçlar*

Terapötik ilaç	ER stres ile ilgili terapötik etkisi	Belirti
Irestatin	IRE1 α aktivitesini inhibe eder	Malign myeloma hücreleri
Honokiol (HNK)	ER stres indüksiyonu sonucunda GRP78'in katlanmamış ATPaz domainine bağlanır	Melanoma, glioblastoma
Bortezomib A	26S proteazomu inhibe etmek suretiyle ER stresi indükler ve böylece yanlış katlanmış proteinlerle ER-ilişkili yıkım yolunu aktive eder	Kanserin farklı türleri
Retaspimycin (IPI-504)	HSP-90 aktivitesini inhibe eder	Gastrointestinal stromal tümörler, küçük-olmayan hücreli akciğer, prostat
SNX-2112	HSP-90 aktivitesini inhibe eder	Gastrik kanser
MG-132	26S proteazomu inhibe eder	Kanserin farklı türleri
Ritonavir	HIV proteaz inhibitörü, CHOP ve GRP78 gibi bazı UPR bileşenleri aktive eder	Antikor cevabını artırır ve CD8 + T hücre aktivitesini inhibe eder
Epidermal büyüme faktörü (EGF)-SubA	GRP78 hedefli sitotoksin	Prostat tümörü
GSK2656157	PERK ve eIF2 α fosforilasyonunu, ATF4 translasyonu ve CHOP mRNA ekspresyonunu inhibe eder	Multiple myelom, pankreatik kanser
Brefeldin A (BFA)	ER'den golgi kompleksine protein transportunu inhibe eder	Kanser, lökemi
Delta(9)-tetrahidrokanabinol (THC)	eIF2 α fosforilasyonunu artırır ve ER stres cevabını aktive eder	Glioma hücreleri
Resveratrol	GRP78, CHOP, p-eIF2 α 'yi ve XBP1 uç-birleştirmesini uyarır	İnsan lökemi K562 hücre hattı
O(2)-[2,4-dinitro-5-(N-metil-N-4-karboksifenilamino)fenil]1-(N,N-metilamino) diazen-1-ium-1,2 diolat (PABA/NO)	PDI inhibitörü. PERK, eIF2 α , XBP1 uç-birleştirme, GRP78, PDI, GRP94 ve ERO1 aktivasyonuna yol açar	İnsan lökemi (HL60), over kanser hücreleri (SKOV3).

*Yadav ve arkadaşları'ndan (46) alıntılanarak Türkçeleştirilmiştir. Tablonun her satırı, bir ya da birden fazla çalışmayı temsil etmektedir. Tablonun tüm referansları içeren versiyonuna makalenin tam metninden erişilebilir.

2.7. KANSER VE PROTEOMİKS

Kanser, DNA hasarı sonucunda hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Tüm kanser tiplerinde bazı hücreler durmaksızın bölünmeye başlar ve çevre dokulara yayılır. Normal şartlarda vücudun ihtiyacına göre, yaşlanan veya zarar gören hücreler yok edilmekte, bu hücrelerin yerine yeni hücreler üretilmekte ve bölünüp çoğalmaktadır. Kanser durumunda bu mekanizma bozularak, ihtiyaç olmayan durumlarda

dahi sürekli bölünen hücreler oluşur. Dahası, kanser hücreleri belirgin olarak apoptozdan kaçtıkları için zarar görmüş ve organizmadan uzaklaştırılması gereken hücreler uzaklaştırılmaz ve bu ekstra hücreler tümör adı verilen yapılar oluşturur.

Kanser son derece karmaşık bir hastalıktır ve kanserleşmiş hücrelerin primer tümör bölgesinde büyüme ve hayatta kalmalarını, yeni damar oluşturmalarını ve dolaşım sistemi içerisinde hayatta kalmalarını, en sonunda da ana tümörden başka dokulara yayılmalarını içeren çok aşamalı bir biyolojik sürecin son ürününü temsil eder. Bu olaylardan bazılarında ait genetik mekanizmalar doku düzeyinde bilinmesine rağmen, kanseri oluşturan pek çok biyokimyasal mekanizma ve kanser oluşumunda ve yayılmasında rol oynayan sinyal yolları tam olarak açıklanmış değildir. 1976'da onkogenlerin ilk keşfi, onkogenler ve tümör supresör genler ile ilgili keşifleri tetiklemiştir. Takip eden yıllar boyunca da kemoterapik ilaçların yerini almak üzere onkogenleri hedefleyen ilaçlar (moleküler hedefli ilaçlar) üzerinde çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır (51). Bununla birlikte, kanser için mevcut tedavilerin hemen hiçbiri yeterince etkin değildir ve bu tedavilerin gösterecekleri etkiler tam olarak kestirilememektedir (52).

Son yirmi yılda genomik, transkriptomik ve proteomik yöntemlerdeki gelişmeler, kanserleri onların moleküler profillerinden belirlemeyi ve sınıflandırmayı kısmen de olsa sağlamıştır (53). Yine proteom ve genom çalışmaları, kanser tanısı, prognoz takibi ve tedavi planlanmasını aydınlatacak veriler sağlamıştır. Proteom teknolojisi ile kanser tanısı için yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasında ve bu biyobelirteç moleküllerinin analizi ile erken kanser tanısında önemli adımlar atılmıştır. Elde edilen tüm bu veriler umut verici olmakla beraber, bugüne kadar hiçbirinden tam bir prognostik belirteç modeli sağlamak mümkün olmamıştır (54, 55). Ayrıca benzer morfolojik özellikler gösteren tümörlerin bile farklı klinik sonuçlara sahip olabileceği bilinmektedir. Dolayısıyla kanserin moleküler seviyede doğru profillenmiş olması tedavi kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Kanser alt tiplendirmesine yardımcı olacak yeni moleküler belirteçlerin tanımlanması, doğru histolojik sınıflandırmalar yapmak sureti ile bu hastalığın tanı ve prognozunu iyileştirmek için yararlı olacaktır (52).

Genomik ve transkriptomik analizler çok önemli veriler sağlamakla beraber, translasyon düzeyleri ve proteinlerde translasyon sonrasında meydana gelen glikolizasyon,

ubikitinasyon, fosforilasyon gibi modifikasyonların seviyesini tahmin etmekte yetersiz durumdadır. Ayrıca mRNA seviyelerinden bağımsız olarak protein düzeylerini etkileyen translasyonel verimdeki değişkenlikler ve aynı mRNA'dan farklı proteinlerin sentezlenmesini sağlayan alternatif kesimleme (*alternative splicing*) gibi faktörler nedeni ile protein düzeyini tam olarak yansıtamamaktadır. Son yıllarda karşılaştırmalı genomik ve proteomik profillemesininin kullanıldığı pek çok yeni çalışmayla, çok sayıda genin mRNA ve protein düzeyleri arasında korelasyon eksikliği olduğu belgelenmiştir (56). Translasyon, genetik bilgi akışının son adımıdır ve proteomik stratejiler, biyolojik sistemler hakkında genom ya da mRNA ifade profillemesi ile elde edilemeyecek detaylı bilgiler sağlayarak kanserde tek başına DNA ve RNA temelli yöntemler ile aydınlatılamayacak biyobelirteçlerin tanımlanmasında güçlü bir tamamlayıcı olarak kullanılabilir (53).

Proteom; bir organel, hücre, doku veya organizmada mevcut bütün proteinler grubu anlamına gelir ve proteomiks farklı koşullara maruz kalmış hücre, doku, organ veya vücut sıvılarındaki proteinlerin kantitatif ve kalitatif analizlerini içeren büyük ölçekli bir çalışmayı ifade eder (2, 53). Kan, idrar ve doku gibi karmaşık biyolojik örnekleri tarayarak protein biyobelirteçleri tanımlamak, proteomik araştırma yöntemlerindeki son gelişmeler sayesinde giderek daha popüler hale gelmiştir. İnsan genom dizisinin tamamlanmasıyla beraber kütle spektrometresi ve biyoinformatik alanlarındaki gelişmeler, proteomik çalışmaları biyobelirteç keşif araştırmalarında önemli bir güç haline getirmiştir (57). Genomikle kıyaslandığında translasyon sonrası değişiklikleri ve çeşitli dinamik düzenlenmeleri de içeren güçlü bir araç olan proteomik, kompleks protein karışımları içerisindeki proteinlerin miktarının belirlenmesine ve bu proteinlerin tanımlanmasına izin verir (52, 55).

Proteomik çalışmaların ilk zamanlarında kompleks protein karışımlarını ayırmak için baskın olarak kullanılan iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE), klinik uygulamalar için bazı sınırlamaları olmakla beraber halen hücre lizatları ve biyolojik sıvıların protein profillerini oluşturmada güçlü bir araçtır (52). Gelişen teknolojiler ile birlikte 2D jeller ile ayrılmış proteinleri tanımlamak için kütle spektrometresi teknikleri kullanılmaya başlanmış ve proteomik, “-omik stratejiler” içerisinde önemli bir yer edinmiştir. Böylece "Proteomik" terimi 1990'ların sonlarında ilk kez ortaya konulduğundan bu yana, kütle spektrometresi-tabanlı proteomik, karmaşık insan

hastalıklarını anlamada klinik biyoloji ve sistem biyolojisi için vazgeçilmez bir araç olmuştur. Geçen yıllarda kayda değer bir yol kateden proteomik, yenilikçi deneysel yaklaşımlar, kütle analizörlerinin hassasiyeti, çözünürlüğü ve kesinliğindeki gelişmelerle hızla büyüyen bir alan konumundadır (57).

Kanserin etkileri her hastada ve ailede farklıdır. Genetik belirteçler tümör gelişimine yatkınlığı belirlemek için kullanılabilir, ancak hasta prognozunu iyileştirecek moleküler hedefli tedavi stratejileri pek çok kanser için yaygın olarak mevcut değildir. Ayrıca hala kişiye özel ilaç tedavilerinin anlaşılması ve temel bilim araştırmalarının klinik tedaviye uygulanarak geliştirilmesi gerekmektedir. Proteomiks, biyobelirteç ve terapötik hedeflerin keşfi için benzersiz araçlar sunduğundan, kanserin önlenmesinde ve tedaviye katkıda bulunmada büyük umut vadeder ve temel bilim keşiflerinin kişiselleştirilmiş ilaç klinik uygulamalarına çevrilmesine yardımcı olabilir (58).

Proteom alanındaki gelişmeler ve kanser oluşumundaki moleküler mekanizmaları anlama isteği, son yıllarda belirli bir kanser hücresi tarafından ifade edilen proteinlerin tamamının incelenmesini içeren “kansere proteom” alanını doğurmuştur. 2D-PAGE, çeşitli kütle spektrometresi teknolojileri ve protein mikrodizinin de dahil olduğu gelişmekte olan bu proteomik analiz platformları, kanser çalışmaları ve kanseri anlama yolunda güçlü araçları temsil etmektedir. Bu sistemler yalnızca kanser proteinlerini tespit etme, sınıflandırma ve karakterize etmede değil, bu proteinlerin tümör ilerlemesini etkileyecek ne gibi süreçlere dahil olduğunu da açıklayacak veriler elde etmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca, yakın zamanda çeşitli kanserler üzerinde yapılan çalışmalarla, kanserin erken tanısında ve ilaç keşfinde yararlı olabilecek yeni moleküler belirteçlerin tespiti konusunda umut verici sonuçlar ortaya çıkmıştır. Kanserin erken teşhisi, hastalığın başarılı tedavisi için son derece önemli olduğundan, kanser oluşumu ve tümör ilerlemesinin moleküler esaslarını anlayabilmek için pek çok bağlantılı sinyal yolunun kritik bileşeni olan proteinlerin detaylı bir şekilde çalışılması gerekmektedir (52).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

3.1. GEREKÇE

Günümüzde kanser tedavisi için cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemler yaygın olarak kullanılsa da tümör hücrelerinin yapısal farklılıkları nedeniyle bu yöntemlerin başarı oranı çoğunlukla oldukça düşüktür. Cerrahi müdahalede, çevre dokulara veya kritik organlara zarar verme riskinin yanında tümörlü dokuyu tam olarak temizleyememe gibi durumlar da söz konusu olabilmektedir. Ayrıca kemoterapi ve radyoterapinin kanser hücrelerine verdiği zarar, kanser hücrelerince hızla onarılabilmekte, dahası bu yöntemlerin pek çok istenmeyen yan etkisi bulunmaktadır. Tüm bu nedenler kanser tedavisinde alternatif arayışları doğurmuştur (59).

ER stres ve UPR'nin kanser dahil pek çok hastalığın gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu nedenle UPR ilişkili sinyal yollarının ve ilgili metabolik süreçlerin pek çok hastalığın tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir. Çoğu normal hücre aktif stres yanıtına girmez ve UPR yolları bu hücrelerde pasif bir durumda kalır. Tümör hücreleri ile normal hücreler arasındaki bu fark, UPR'yi hedefleyen maddelere kanser tedavisinde özgülük elde etmeleri için bir avantaj sağlar (15). Pek çok kanser türünde UPR bileşenlerinin aşırı ifadesi söz konusudur. Özellikle salgı hücresi kökenli kanserlerde (örneğin multipl miyelomda) UPR dengesi hayati bir rol oynamaktadır. Uzun yıllardır üzerinde pek çok çalışma yapılmasına ve bilgi birikimi olmasına rağmen, ER stres ve UPR mekanizmaları tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Dolayısıyla UPR bileşenlerinin modifikasyonu, anti-kanser özellikleri yönünden kapsamlı biçimde araştırılmalıdır (38).

UPR yolağında ilk yanıt, PERK aracılığıyla eIF2 α 'nın fosforillenmesi ve dolayısıyla translasyon başlama hızının azaltılmasıdır (38). Translasyon başlangıcı, hücre büyümesinin düzenlenmesinde ve tümör oluşumunda kritik rol oynar (34). Translasyon başlama kaskadındaki anahtar düzenleyici basamak eIF2, GTP ve başlatıcı metiyonin tRNA'dan oluşan üçlü komplekstir. eIF2-GTP-tRNA^{iMet} üçlü kompleksin bolluğunun sürekli biçimde artırılması normal hücreleri dönüştürür ve kanser başlangıcına katkıda bulunur (18). Küçük molekül ağırlıklı bileşikler ile eIF2 α fosforilasyonu indüklenerek eIF2-GTP-tRNA^{iMet} translasyon başlatma üçlü kompleksinin oluşumunun kısıtlanmasının, in vitro

kanser hücre çoğalmasını ve in vivo tümör büyümesini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Üçlü kompleks oluşumunun kısıtlanması, seçici olarak büyüme destekleyici proteinlerin ifadesini azaltır ve hem kanser hücrelerinde hem de insan kanser hayvan modellerinden veya kanser hastalarından çıkarılan tümörlerde ER stres yanıt genlerinin ifadesini artırır (34). Bu nedenle üçlü kompleksi değiştirecek kimyasallar (*chemical modifiers*) insan hastalık patobiyolojilerindeki rolünün çalışılması ve bu kompleksin farmakolojik tedavi edici amaçlar için hedeflenebilir olup olmadığının belirlenmesi için çok değerli araçlardır (18). Ayrıca translasyon başlatma faktörleri, anti-kanser madde geliştirilmesi için iyi birer hedefdir (34). Ancak eIF2 α fosforilasyonu yolu ile translasyon kontrolünün moleküler değiştiricileri ve etkileyicileri (*molecular modifiers and effectors*) tam olarak aydınlatılmış değildir (60).

Kanser ilerlemesinin hızlı çoğalan ve dolayısıyla artan protein sentezine ihtiyaç duyan hücreler ile karakterize edildiği düşünüldüğünde, proteinler ve onların translasyon sonrası modifikasyonlarının analizini içeren proteom çalışmalarının, kanser araştırmaları için önemli olduğu açıktır. Proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları, proteomun fonksiyonel çeşitliliğini artırır ve normal hücre biyolojisi ve patobiyolojisini hemen hemen her yönüyle etkiler. Kanser erken tanısı, onun kontrolünde ve önlenmesinde en önemli basamak olduğundan, proteomik çalışmalar ile proteinlerdeki ifade değişikliklerini belirlemenin ve anlamının, hücre biyolojisi çalışmalarında, hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde hayati rol oynadığı söylenebilir. Proteomik çalışmalar, kanserde potansiyel tanısal, prognostik ve iyileştirici sayısız veri seti yaratmıştır (61). Bu çalışmaları destekleyen iki temel teknoloji; iki boyutlu jel elektroforezi (2DE) ve kütle spektrometresi, yüksek verimli bir kanser proteom profil analizi için güçlü bir kombinasyondur (54). Bu teknolojiler biyobelirteç ve yeni terapötik hedeflerin keşfi için benzersiz araçlar sunar, kanserde rol alan proteinlerin tanımlanmasına olanak vererek kanserin önlenmesine veya tedavisine katkıda bulunabilir ve temel bilim keşiflerinin kişiselleştirilmiş ilaç klinik uygulamalarına çevrilmesine yardımcı olabilir (58).

3.2. AMAÇ

Bu çalışmada, gerekçe bölümünde ayrıntılarıyla bahsedilen ve kanser çalışmalarında aydınlatıcı bilgiler sağlayabileceği düşünülen iki önemli strateji; eIF2 α -GTP-tRNA^{Met} üçlü kompleksin hedeflenmesi ve proteomik stratejiler birlikte kullanılmıştır. NIH projesi

kapsamında Harvard Tıp Fakültesi'nde gerçekleştirilen çalışmalarla translasyon başlangıcını kontrol eden PERK/eIF2 α fosforilasyon kolunu HRI (heme regulated kinase)'yı aktive etmek sureti ile değiştirdiği direkt fonksiyonel genetik ve biyokimyasal çalışmalarla gösterilmiş anti-kanser aktif bir diarilüre bileşiğin, bu etkisinin altında yatan moleküler mekanizmaların ve ilişkili proteinlerin proteomik çalışmalar ile aydınlatılması amaçlanmıştır.

Özellikle hücre içi ortamlarda, genlerden ziyade proteinler önemli düzenleyicilerdir. Dolayısıyla proteinlerin incelenmesi, uygulanan ilacın mekanizmasını anlamak için önemli bir yardımcıdır. Söz konusu mekanizma genellikle tek bir proteinin değil birden fazla proteinin ifade değişikliklerini içerdiğinden, protein ifade değişikliklerinin global analizi ilacın etki mekanizmasını anlamak için değerli bilgiler sağlayabilir (62).

Harvard Tıp Fakültesi ve Ankara Üniversitesi işbirliği ile gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, insan prostat kanser (PC-3) hücrelerinin Serin 51 mutant (S51A) ve yaban tiplerinin (WT) eIF2 α -GTP-tRNA^{Met} üçlü kompleksi hedefleyen anti-kanser aktif (1781) veya –negatif kontrol olarak- inaktif (1527) bileşiklerle muamele edilmesi ile elde edilen dört grup hücre kullanılmıştır. Daha önce bu hücreler ile gerçekleştirilen genom ve transkriptom ebadındaki çalışmaların (18) bu doktora tezi çerçevesinde gerçekleştirilen proteom çalışmalarıyla desteklenmesi ile günümüzde “omik teknolojiler” olarak addedilen ve aslında birbirinin devamı ve bütünleyicisi olan çalışmalar tamamlanarak mutant veya yaban tip hücrelerde aktif veya inaktif bileşik uygulandığı durumlarda protein ifade profillerinde ne gibi farklılıklar oluştuğunun araştırılması amaçlanmıştır. Anti-kanser aktif bileşiğin PC-3 insan prostat kanseri hücre hatları üzerine olumlu etkisi altında yatan moleküler mekanizmayı daha detaylı inceleyebilmek amacıyla, 2DE tabanlı karşılaştırmalı proteomik analizler gerçekleştirilmiş ve gruplar arasında farklı ifade olan proteinlerin MALDI-TOF MS kullanılarak PMF tekniği ile tanımlanması amaçlanmıştır.

Anti kanser diarilüre bileşiğin PC-3 hücre hatlarındaki etkisinin belirlenmesi, daha etkin tedavi seçeneklerinin keşfine yol açabileceği gibi, ilaç uygulamalarından sonra ifadesi değişen proteinlerin tanımlanmasının kanserde rol alan sinyal yollarına ve proteinlere özgül olabilecek yeni moleküllerin tasarlanmasına ve kanser tedavisinde daha başarılı yaklaşımların ortaya çıkmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Proteobilim Birimi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan hücreler Harvard Tıp Fakültesi Translasyonel Araştırma Laboratuvarı'ndan, kullanılan diarilüre bileşikler Harvard Tıp Fakültesi Kimyasal Kütüphanesi'nden temin edilmiştir.

4.1.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE ÖRNEKLERİ

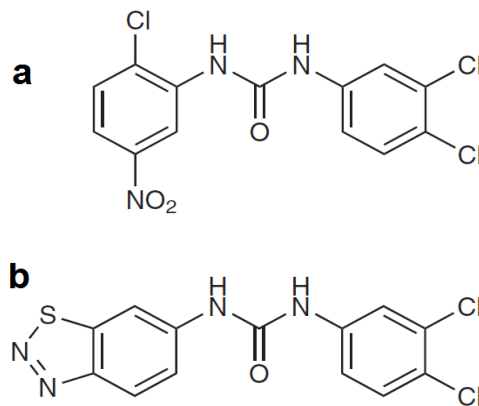
Çalışmada insan prostat kanser (PC-3) hücre hatları kullanılmış, diarilüre bileşikler eklenerek karşılaştırmalı proteomik analizleri yapılmak üzere PC-3 hücrelerinin Serin 51 mutant (51A) veya yaban tipleri (*Wild Type*, WT) oluşturulmuştur.

WT: Endojen eIF2 α , rekombinant yaban tip eIF2 α ile değiştirilmiş

51A: Endojen eIF2 α , fosforlanamayan eIF2 α mutanti ile değiştirilmiş

4.1.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN DİARİLÜRE BİLEŞİKLER

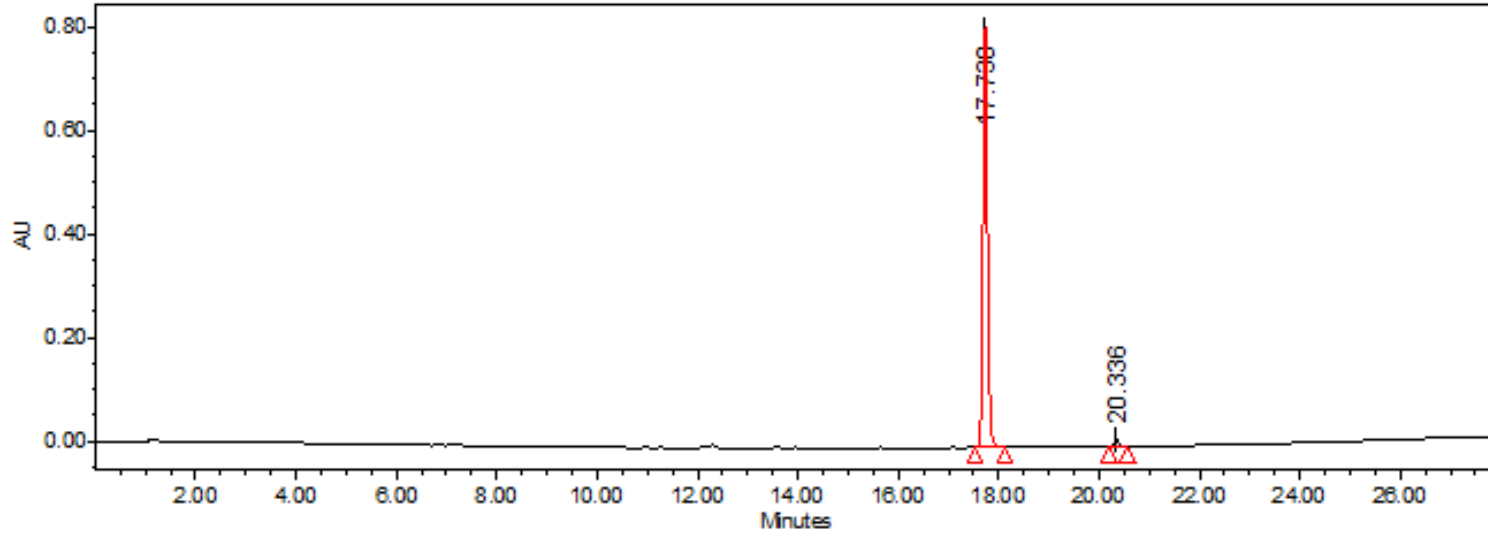
WT ve 51A PC-3 hücreleri, Şekil 4.1'de kimyasal yapıları ve ayrıntılı isimleri verilen anti-kanser aktif (1781) veya onun inaktif analogu (1527) bileşiklerle ([Şekil 4.1](#)) muamele edilerek dört grup elde edilmiştir.



Şekil 4.1. PC-3 hücreleri ile muamele edilen a. 1527: İnaktif *N, N'*-diarilüre bileşik, 1-(2-chloro-5-nitrophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)urea (NCPdCPU), b. 1781: Aktif *N, N'*-diarilüre bileşik, 1-(benzo[*d*][1,2,3]thiadiazol-6-yl)-3-(3,4-dichlorophenyl) urea (BTdCPU) (18)

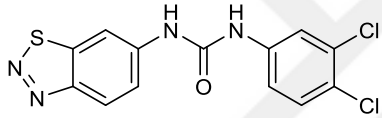
Öncelikle anti-kanser aktif bileşimin (1781) aktivitesini koruduğunun ve degrade olmadığını tayini için HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ve LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) ile saflık tayinleri gerçekleştirilmiş, analizler sonucunda 1781'in %98 saflıkta olduğu tayin edilmiştir ([Şekil 4.2](#), [Şekil 4.3](#)).



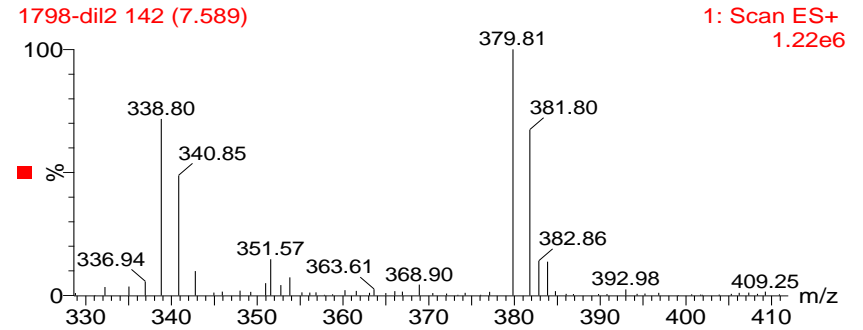
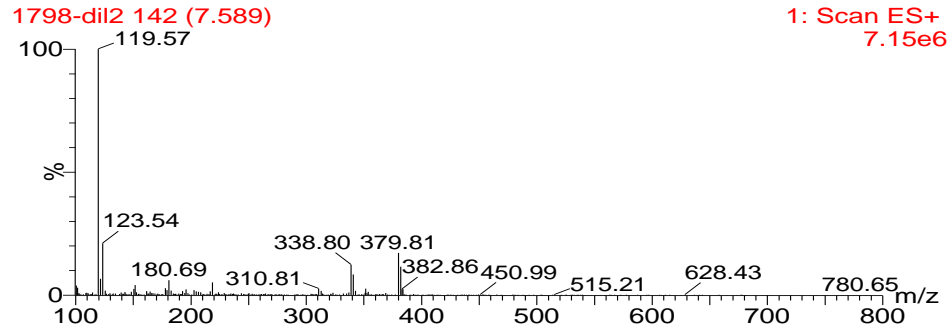
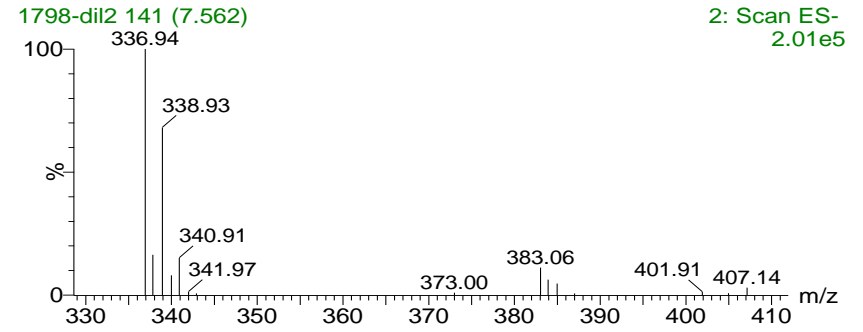
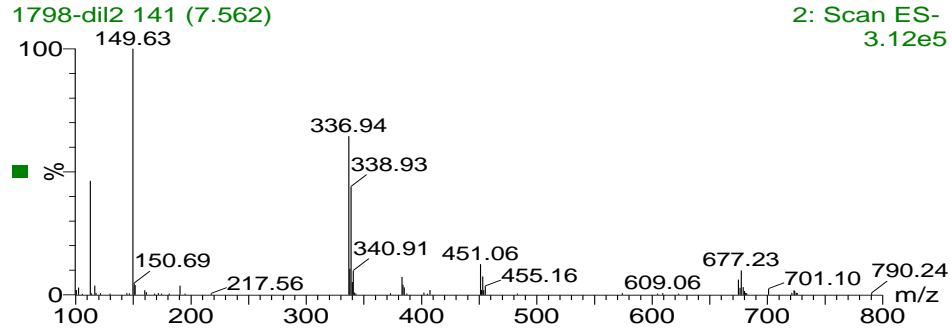


	Retention Time	% Area
1	17.730	98.34
2	20.336	1.66

Şekil 4.2. Anti-kanser diarilüre bileşiğe (1781) ait HPLC pikleri



Chemical Formula: C₁₃H₈Cl₂N₄OS
Exact Mass: 337.98



Şekil 4.3. Anti-kanser diarylüre bileşiğe (1781) ait LC-MS pikleri

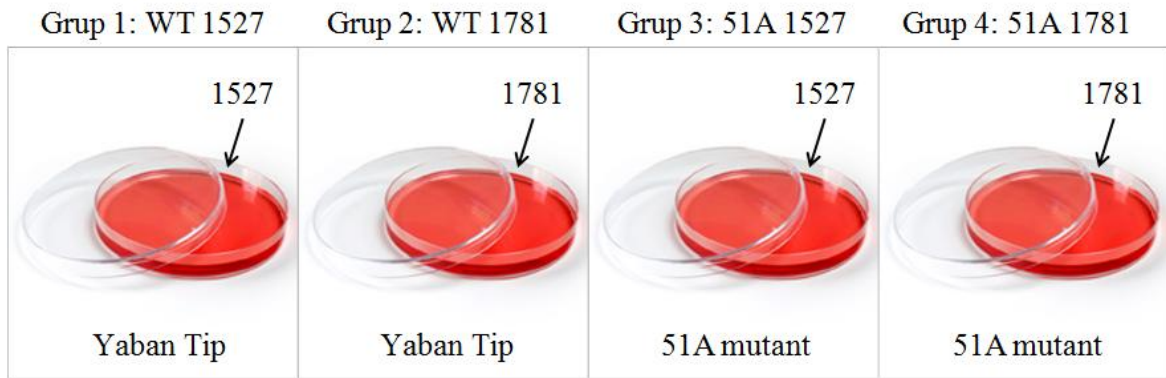
Daha sonra, WT ve 51A PC-3 hücrelerine aktif ve inaktif bileşik uygulanması ile dört grup elde edilmiştir ([Şekil 4.4](#)). Bu grupların kodları ve açıklamaları aşağıda verilmiştir;

Grup 1: WT 1527 (İnaktif bileşik uygulanmış yaban tip hücre hattı)

Grup 2: WT 1781 (Aktif bileşik uygulanmış yaban tip hücre hattı)

Grup 3: 51A 1527 (İnaktif bileşik uygulanmış mutant tip hücre hattı)

Grup 4: 51A 1781 (Aktif bileşik uygulanmış mutant tip hücre hattı)



Şekil 4.4. Karşılaştırmalı proteomik analizler için oluşturulan PC-3 hücre hattı grupları

4.1.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE CİHAZLAR

Kullanılan bütün kimyasallar moleküler biyoloji ve/veya proteomiks çalışmalarında kullanılmaya uygundur. Deneylerde kullanılan kimyasalların listesi [EK-1](#)'de verilmiştir. Cihazlar üreticilerinin talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan cihazların listesi ve hangi amaçlarla kullanıldığı [EK-2](#)'de verilmiştir. Tüm deneylerde Millipore (Milli-Q ve Elix filtreleri) saf su sisteminden elde edilen ddH₂O kullanılmıştır.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. İNSAN PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDEN PROTEİN İZOLASYONU

Endojen eIF2 α 'nın rekombinant yaban tip eIF2 α ile veya fosforlanamayan eIF2 α mutanıtı ile değiştirilmesi ile oluşturulmuş PC-3 hücrelerine anti-kanser aktif bileşik (1781) veya inaktif bileşik (1527) eklenmesi ile elde edilen dört grup hücre, soğuk PBS eşliğinde buz üzerinde kazınarak önceden soğutulmuş tüplere alınmış, santrifüj sonrasında süpernatant

atılarak pellet freeze dryer (Virtis, SP industries, USA) ile dondurularak kurutulmuştur. Laboratuvarımıza gönderilen bu hücrelere rehidrasyon tamponu (7 M üre, 2 M tiyoüre, %4 CHAPS, %1 amfolit, pH 3-10, 10 mM DTT, bromo fenol mavisini) eklenerek ultrasonik banyo ve tip sonikatör yardımı ile protein ekstraksiyonu sağlanmış, daha sonra santrifüj edilerek süpernatant kısmı (protein izolatu) temiz, etiketlenmiş tüplere alınmıştır.

4.2.2. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

Toplam dört gruptan elde edilen protein izolatlarının protein miktar tayinleri Bradford (mikro-Bradford) yöntemi kullanılarak (63) mikroluka okuyucu spektrofotometre (Victor 3, Perkin Elmer) cihazında yapılmıştır. Gerçekleştirilen Bradford miktar tayinine ait basamaklar aşağıdadır:

- Ölçüm için gerekli standart eğriyi çizmek için sığır serum albümini (*Bovine Serum Albumin*, BSA) kullanılmış, 200µg/ml, 400µg/ml, 600µg/ml, 800µg/ml ve 1000µg/ml BSA içeren standartlar hazırlanmıştır.
- Kör (*blank*) ve her bir BSA standartı mikroluka kuyucuklarına 5'er µl 3 tekrarlı olacak şekilde pipetlenmiştir.
- Her dört grubun protein izolatlarından 5'er µl örnek 3 tekrarlı olarak mikroluka kuyucuklarına pipetlenmiştir.
- BioRad Protein Assay Dye Reagent boyası (1X), protein konsantrasyonu ölçülecek örnek başına 245 µl olacak şekilde hesaplama yapılarak yeterli miktarda hazırlanmıştır.
- 245'er µl boya kuyulardaki standart ve örneklerin üzerine eklenmiştir.
- Yaklaşık 20 dakika inkübasyonun ardından mikroluka okuyucu spektrofotometre cihazı ile protein miktarları µg/ml cinsinden tayin edilmiştir.

4.2.3. İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ

Örnekler ölçülen protein miktarlarına göre 300µl total hacimde 175µg protein içerecek şekilde rehidrasyon tamponu ile karıştırılarak aktif rehidrasyon tepsilerine pipet yardımı ile çizgi halinde yüklenmiş, üzerlerine pH 3–10 aralıklı 17 cm'lik lineer immobilize pH gradiyent (IPG) şeritler (Bio-Rad) yerleştirilerek 50V'da 16 saat aktif rehidrasyon yapılmıştır.

Daha sonra IPG şeritler birinci boyut ayırım olan izoelektrik odaklama (*Isoelectric Focusing*, IEF) işlemi için temiz bir odaklama tepsisine alınmış ve IEF cihazına (Bio-Rad) yerleştirilerek izoelektrik noktalarına göre ayırım (15 dk. 250 V, 3 sa. 10 kV ve 60 kV/sa değerine ulaşana kadar 10 kV) sağlanmıştır.

Bu işlemin ardından IPG şeritler, moleküler ağırlıklarına göre ayrılacakları ikinci boyuta hazırlanmak üzere, çalkalayıcı üzerinde 15 dk. dengeleme tamponu I (6 M üre, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS, %20 gliserol, %2 DTT) ve 15 dk. dengeleme tamponu II (6 M üre, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS, %20 gliserol, %2.5 iyodoasetamid ve bromo fenol mavisi) ile muamele edilmiştir.

Yüklemeye hazır hale gelen IPG şeritler %4'lük toplama ve %12'lik ayırma jellerinden oluşan 1.5 mm kalınlığındaki Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) poliakrilamid jellere mekanik olarak yerleştirilmiştir. Yerleştirmenin kolay olabilmesi için tarak boşluğuna şeritleri yerleştirmeden önce ısıtılmış agar (%0.5) eklenmiştir.

Yürütme tamponu olarak TGS tampon (%3.03 Tris-base, %1.44 glisin, %1 SDS) kullanılmıştır. Jeller toplama jelinde hizalandıktan sonra (10 dk, 80 V) izleme boyası jelin altına ulaşınca kadar 120 V sabit voltajda yürütülmüştür. Böylece ikinci boyut ayırım gerçekleşmiştir.

Yukarıda bahsedilen işlemler ile protein profil haritalarının oluşturulmasında, 12 büyük (17-24 cm) jelin dikey elektroforezini aynı anda gerçekleştirmeye olanak sağlayan Protean plus Dodeca Cell (Bio-Rad) sistemi kullanılmıştır. 2D-PAGE çalışmalarında jellerdeki protein dağılımının standardizasyonu son derece önemlidir ve oluşturulan jellerdeki koşul farklılıkları yapılacak analizleri zorlaştırabilmekte ya da güvenilirliğini düşürebilmektedir. Bu nedenle, Dodeca Cell sistemi gibi çoklu jel yürütmeye imkan sağlayan sistemler karşılaştırmalı çalışmalarda standardizasyonun sağlanması açısından tercih edilmiştir. Her bir grup için protein profil haritaları en az üç teknik tekrarlı olarak hazırlanmış, bu jellerden analize en uygun olan üç tanesi karşılaştırmalı analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.2.4. JELLERİN BOYANMASI VE GÖRÜNTÜLENMESİ

Elektroforez işlemi sonrası jeller floresans özellikte bir boya olan Oriole (Bio-Rad) ile üreticinin talimatlarına göre boyanmıştır.

Boyanan jeller VersaDoc (Bio-Rad) görüntüleme sisteminde ultraviyole (UV) ışık altında görüntülenmiştir. Görüntülerin işlenmesi, değerlendirilmesi ve karşılaştırmalı analizleri PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad) programında gerçekleştirilmiştir.

4.2.5. PDQUEST 8.0.1 PROGRAMI İLE JELLERİN KARŞILAŞTIRMALI İFADE ANALİZLERİ

Oluşturulan protein profil haritalarının içerisinde her bir gruptan analize en uygun olduğu düşünülerek seçilen üçer teknik tekrar PDQuest 8.0.1 programı ile karşılaştırmalı analize (Matchset) tabi tutulmuştur. Seçilen jellerin ham görüntüleri PDQuest programında matchset analizine hazır hale getirilmek üzere eşit boy/piksel değerlerine sahip olacak şekilde ayarlanmış ve filtreleme işleminden geçirilmiştir. PDQuest programındaki normalizasyon parametreleri içerisinde mevcut çalışma ve analiz edilecek jeller için en uygun olan normalizasyon seçilerek, serpmeye dağılım grafikleri (*scatter plot*) ile normalizasyonun uygunluğu doğrulanmıştır.

Jeller üzerindeki protein spotlarının program tarafından diğer jellerle aynı koordinattaki noktalarla otomatik olarak eşleştirilmesinin ardından, eşleşen her bir protein spotu tek tek kontrol edilerek eşleştirmenin doğru bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. Otomatik olarak yanlış eşleştirilen spotlar analiz içerisinde doğru spotlarla eşleşecek şekilde manuel olarak düzeltilmiş, yine otomatik eşleştirmede eşleştirilmeyen, ancak jellerde varlığı görülen spotlar da analiz içerisinde manuel olarak eşleştirilmiştir.

4.2.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

PDQuest programı kendi içerisinde student's t-testi içermekte, ancak student's t-test birbirinden bağımsız iki grubun istatistiksel analizine olanak verdiğinden dört grup içeren bizim çalışmamız için uygun olmamaktadır. Bu nedenle, eşleşen spotlar için her bir grubun üç ayrı replikasına ait protein yoğunluk değerleri PDQuest programından .xml formatında alınarak SPSS 13.0 programında %95 güven aralığında ($p < 0.05$) ANOVA analizi

gerçekleştirilmiştir. Ayrıca varyans homojenliğini test etmek için Levene testi kullanılmış ve p değerleri bu sonuçlara göre seçilmiştir. ANOVA testinde eşit varyans varsayımı için Tukey, eşit olmayan varyans varsayımı için Tamhane's T2 karşılaştırma testleri kullanılmıştır. Ayrıca, yoğunluk değerleri logaritmik transformasyon yapılarak da istatistiksel analizlere tabi tutulmuş ve tüm sonuçlar birleştirilmiştir.

4.2.7. PROTEİN SPOTLARININ JELDEN KESİLMESİ VE TRİPSİN ENZİMİ İLE PEPTİT İZOLASYONU

Gerçekleştirilen analizler sonucunda, protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış/azalış belirlenen protein spotları, robotik bir sistem olan SpotCutter (Bio-Rad) cihazında 1.5 mm çaplı daire parçaları şeklinde kesilmiştir. Kesimi yapılan jel parçaları, her bir kuyucuğuna önceden 200'er µl ddH₂O konmuş 96 kuyucuklu V tabanlı plaka kuyucuklarına seçilen yön ve kuyuya göre aktarılmış ve ardından tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle amonyum bikarbonat ve asetonitril ile jel parçalarından boya uzaklaştırılmıştır (destaining). Daha sonra dithiothreitol (DTT) ile redükleme, iyodoasetamid ile alkilleme yapılmıştır. Bu işlemlerin ardından her bir kuyucuğa 30 µl 50 mM amonyum bikarbonat içinde 150 ng tripsin (Promega) enzimi koyularak, enzimin kendi kendini sindirmeden jele nüfuz etmesini sağlamak için 4°C'de 1 saat bekletilmiş ve enzimin jel-içi sindirim işlemini gerçekleştirebilmesi için de gece boyu 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra ekstraksiyon tamponu (%1 formik asit, %2 asetonitril) ile jel içinde sindirilmiş olan peptitler elde edilip temiz tüplere alınarak ~20 µl hacime düşene kadar SpeedVac cihazında tutulmuştur. Tripsinizasyon işleminin bütün basamakları laminar akışlı kabin içerisinde yapılmıştır.

4.2.8. MALDI-TOF KÜTLE SPEKTROMETRESİ İÇİN ÖRNEK HAZIRLAMA VE ÖLÇÜM

Uygun bir şekilde yıkanmış MALDI-TOF örnek yükleme plakasının (Waters) kuyucukları önce saf su, daha sonra asetonitril ile temizlenmiştir. İyonlaşmayı sağlayacak matriks olarak kullanılmak üzere rekristalize edilmiş alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matriks, mg başına 50 µl olacak şekilde matriks çözücü tamponunda (%75 asetonitril, %0.1 trifloro asetik asit) çözülmüştür. Temiz tüplerde yaklaşık 20 µl civarı

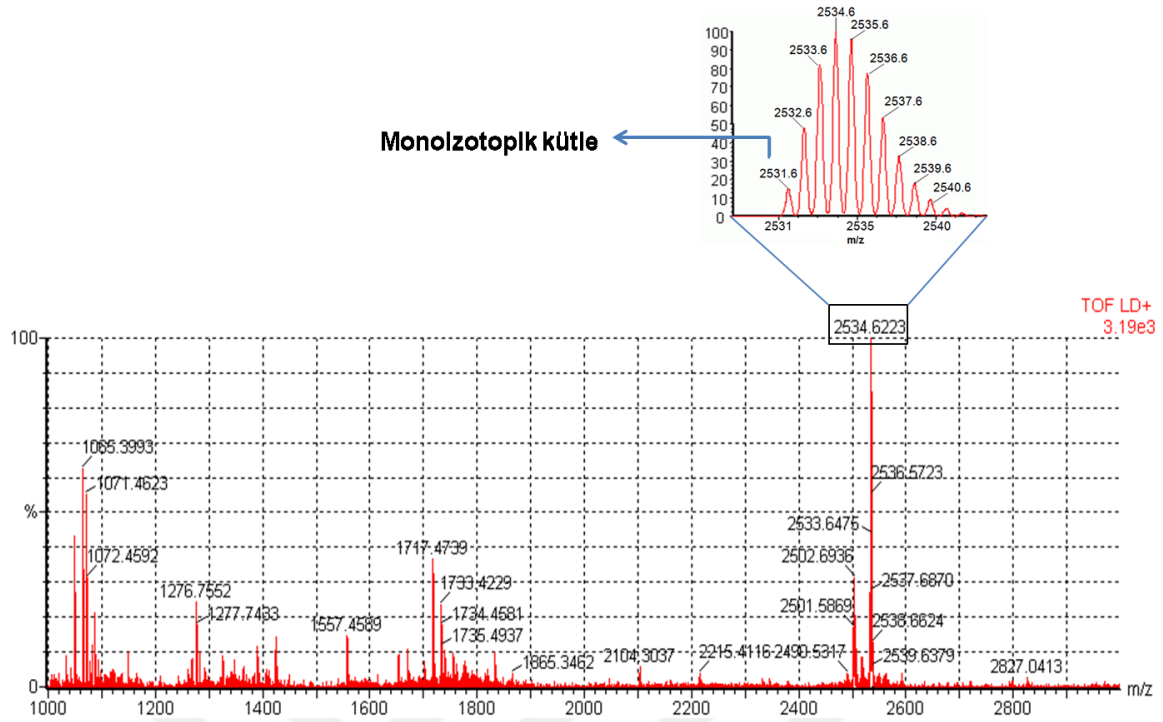
hacimde bulunan yüklenecek peptit örneklerine matriks tamponu 1:1 oranında eklenerek, örnek yükleme plakasının kuyucuklarına 1,5 µl 3 tekrarlı yükleme yapılmıştır.

MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonu, örnek yükleme plakasında bulunan “Lock Mass” kalibrasyon kuyucuklarına yüklenen ve moleküler ağırlıkları bilinen beş peptit karışımı ile yapılmıştır (dış kalibrasyon). Bu amaçla, adrenokortikotropik hormon (ACTH) 18-19, (Glu1)-fibrinopeptit B (Glu-Fib), substance P, renin-14 ve anjiyotensin 1 peptitleri son konsantrasyonları 10-40 pikomol olacak şekilde stok çözeltilerden örnek çözücü tamponuyla seyreltilerek kullanılmıştır. Yapılan kalibrasyon sonrası peptit karışımı tekrar okunarak ölçümün doğruluğu test edilmiştir.

Tablo 4.1. MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonunda kullanılan peptitler ve kütleleri

Peptidin adı	Kütlesi (Da)
ACTH 18-19	2465.1989
Glu-Fib	1570.6774
Substance P	1347.7360
Renin-14	1758.9326
Anjiyotensin 1	1286.6853

Tüm ölçümler Waters Micromass MALDI-TOF kütle spektrometresinde refletron pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. Her bir örneğe ait 3'er tekrarlı kuyucuklardan elde edilen spektrumların MassLynx 4.0 programında ortalaması alınıp birleştirilmiş (combine) ve arkaplan çıkarımı (subtract) işlemine tabi tutulmuştur ([Şekil 4.5](#)).



Şekil 4.5. Örnek MALDI-TOF spektrumu (2)

4.2.9. PEPTİT KÜTLE PARMAKİZİ (PMF) İLE BİYİNFORMATİK ANALİZ VE PROTEİN TANIMLANMASI

Yukarıda belirtilen ön işlemlere tabi tutulduktan sonra elde edilen spektrumlardan peptit kütle/yük (m/z) değerleri not edilmiştir. Peptit kütle parmakizi (PMF) ile protein tanımlama analizinde Mascot programı kullanılarak SwissProt protein veritabanında tarama yapılmıştır. MALDI-TOF spektrumlarından elde edilen m/z değerleri Mascot veritabanında taranırken, örneklere öncesinde iyodoasetamid ile alkilleme yapıldığı için sistein karbamidometillenmesi sabit modifikasyon olarak eçilmiştir. Çalışmada kullanılan hücreler insan kaynaklı olduğu için taksonomi bölümünde organizma *Homo sapiens* (Human) olarak seçilmiş, peptit toleransı ± 0.5 ile ± 1 Da aralığında tutulmuş ve en fazla 1 kaçırılan kesime (missed cleavages) izin verilmiştir (Şekil 4.6).

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name **Email**

Search title

Database(s)
NCBI nr
contaminants
cRAP

Enzyme

Allow up to missed cleavages

Taxonomy

Fixed modifications

Display all modifications

Variable modifications

Amidated (C-term)
Amidated (Protein C-term)
Ammonia-loss (N-term C)
Biotin (K)
Biotin (N-term)
Carbamyl (K)
Carbamyl (N-term)
Carboxymethyl (C)
Cation:Na (C-term)
Cation:Na (DE)
Crotonyl (K)

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

Mass values MH⁺ M_r M-H⁻ **Monoisotopic** **Average**

Data file

Query

```
1165.599600
1183.857400
1268.054200
1595.317400
1602.360800
1768.463400
1839.473600
```

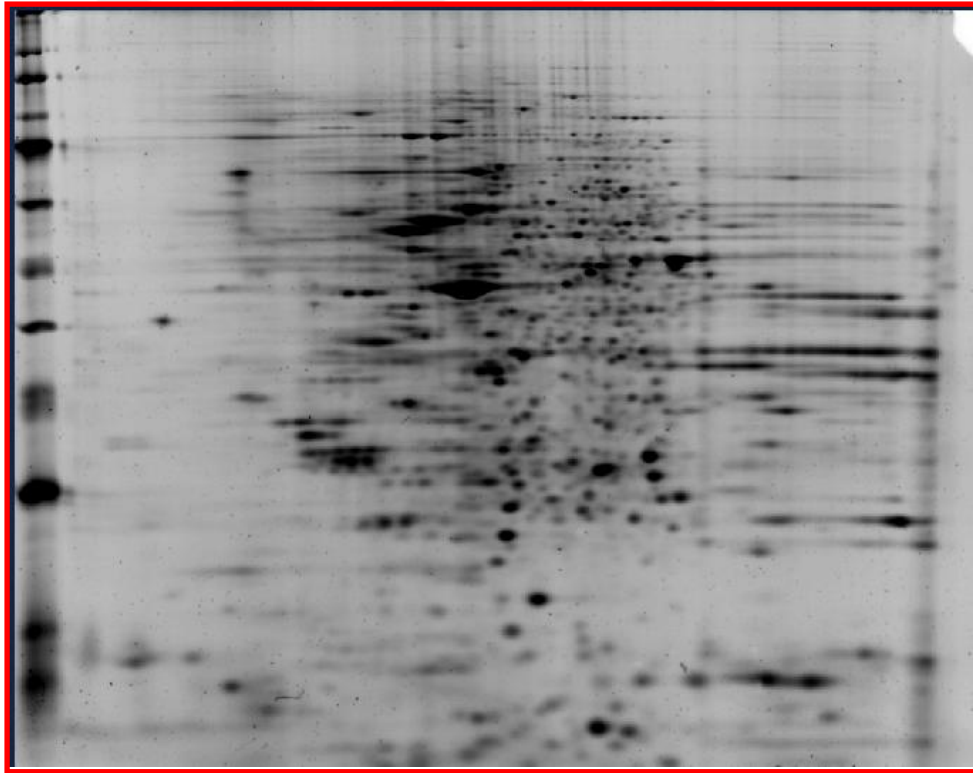
Decoy **Report top** hits

Şekil 4.6. Mascot veritabanında PMF analizi ile protein tanımlama parametreleri

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

Proteomik çalışmalarda kullanılan materyalin türü, iki boyutlu jel elektroforezi için uygunluğu ve elde edilen protein miktarı gibi parametreler son derece önemlidir. Bu tür çalışmalarda en az üç teknik tekrar yapılması önem arz ettiğinden, çalışmaya başlamadan önce materyalin proteomik çalışmalara uygunluğu, protein miktarının yeterliliği ve kalitesi, yapılacak ön çalışmalar ve optimizasyon çalışmaları ile belirlenmelidir. Bu amaçla, öncelikle hangi uzunlukta IPG stribin daha uygun olacağını tespit etmek için 7 cm ve 17 cm uzunluğunda stripler kullanılmış, jeldeki protein dağılımının daha etkin olduğu görülen 17 cm uzunluğunda IPG strip ile çalışmaya devam edilmesine karar verilmiştir. Yapılan ön çalışmalar ve optimizasyonlar sonucunda elde edilen temsili protein profil haritası [Şekil 5.1](#)'de verilmiştir.

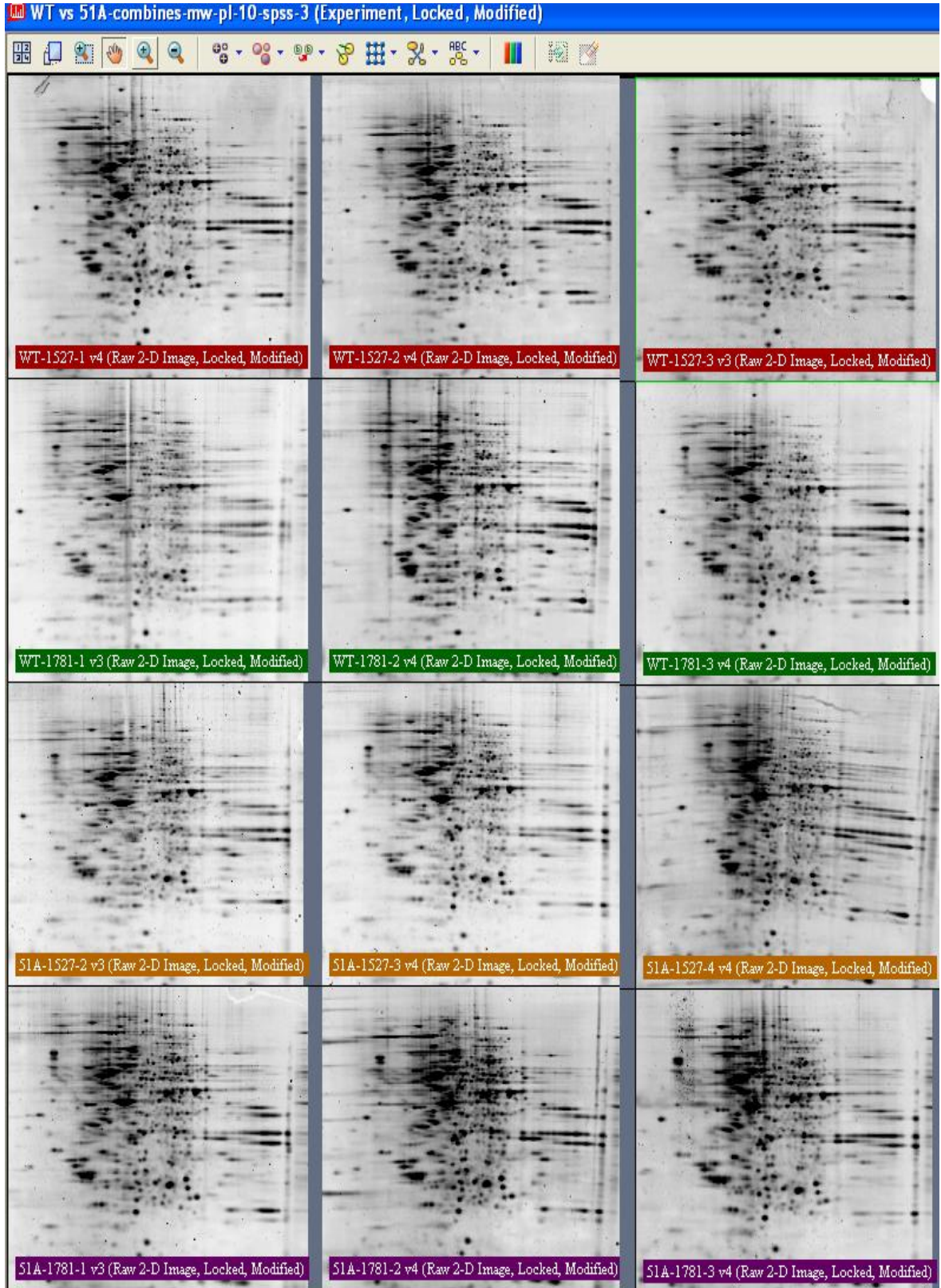


Şekil 5.1. pH 3-10, 17 cm uzunluğunda IPG strip kullanılarak elde edilen protein profil haritası (optimizasyon sonrası)

5.2. İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ İLE PROTEİN PROFİL HARİTALARININ OLUŞTURULMASI

Optimizasyon çalışmalarının ardından, yöntem bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanan ve yeterli miktarda çoğaltılan insan prostat kanser hücrelerinin her bir grubundan protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Protein miktar tayini sonucunda her bir grup için eşit miktarda protein içerecek şekilde IPG stripler hazırlanmış, poliakrilamid jellere yüklenerek her bir grup için en az üç protein profil haritası oluşturulmuş ve bunların içerisinde analiz için en uygun üç teknik tekrar seçilmiştir. Tüm gruplardan karşılaştırmalı analiz için seçilen üçer protein profil haritaları [Şekil 5.2](#)'de verilmiştir.





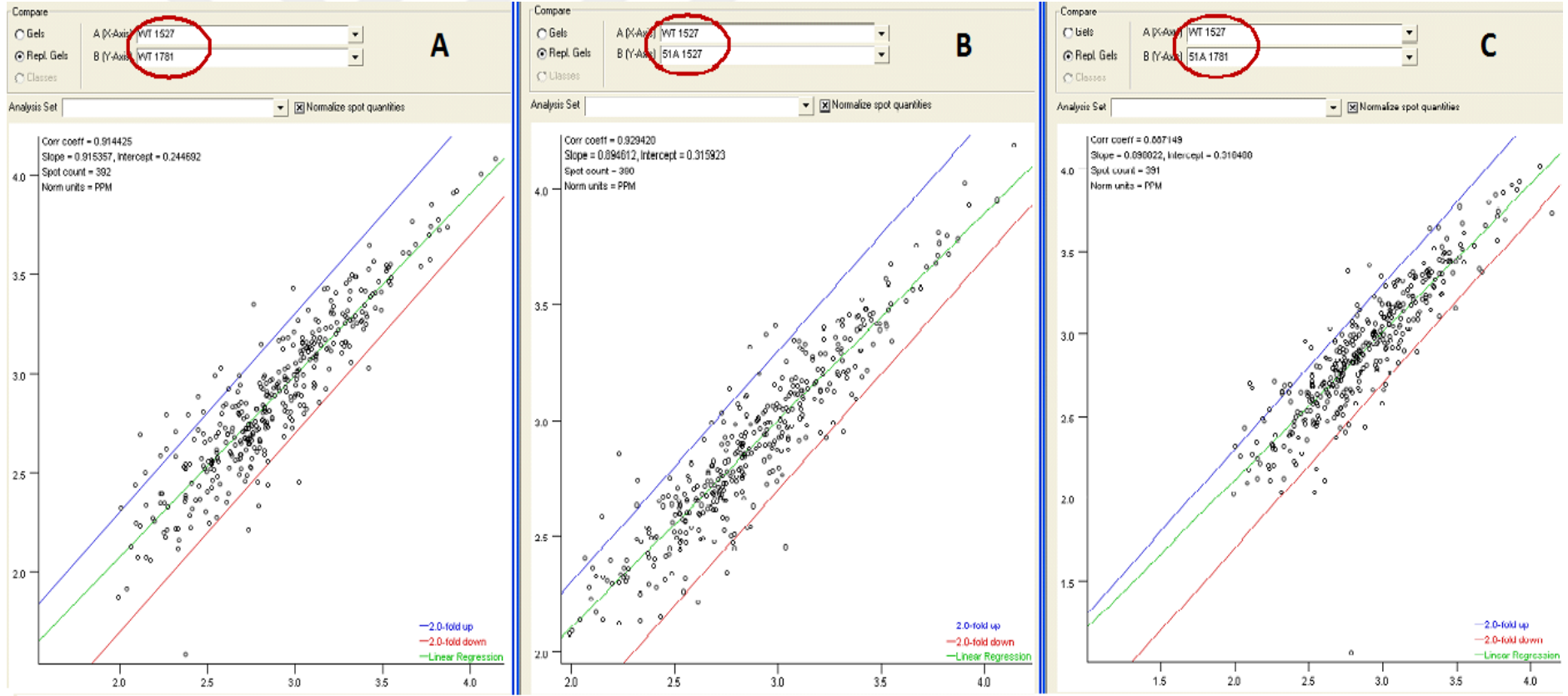
Şekil 5.2. Her dört gruba ait 2D-PAGE teknik tekrarlarının PDQuest programına alındıktan sonraki görüntüsü

5.3. PROTEİN PROFİL HARİTALARININ PDQUEST 8.0.1 PROGRAMI İLE KARŞILAŞTIRMALI İFADE ANALİZLERİ

Seçilen protein profil haritalarının karşılaştırmalı analizleri PDQuest 8.0.1 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Jellerin ham görüntüleri (toplam 4 x 3 = 12 jel) matchset analizine hazır hale getirilmek üzere PDQuest programında eşit boy/piksel değerlerine sahip olacak şekilde ayarlanmış, akabinde filtreleme ve kırpma işlemlerinden geçirilmiştir. PDQuest programındaki normalizasyon parametreleri içerisinde mevcut çalışma ve analiz edilecek jeller için en uygun olan normalizasyon (total density in gel image) seçilmiş (Şekil 5.3) ve PDQuest programında serpmeye dağılım grafikleri (scatter plot) ile normalizasyonun uygunluğu doğrulanmıştır. Her bir grubun diğer gruplarla karşılaştırılmasından elde edilen altı adet serpmeye dağılım grafiği Şekil 5.4 ve Şekil 5.5’de verilmiştir.

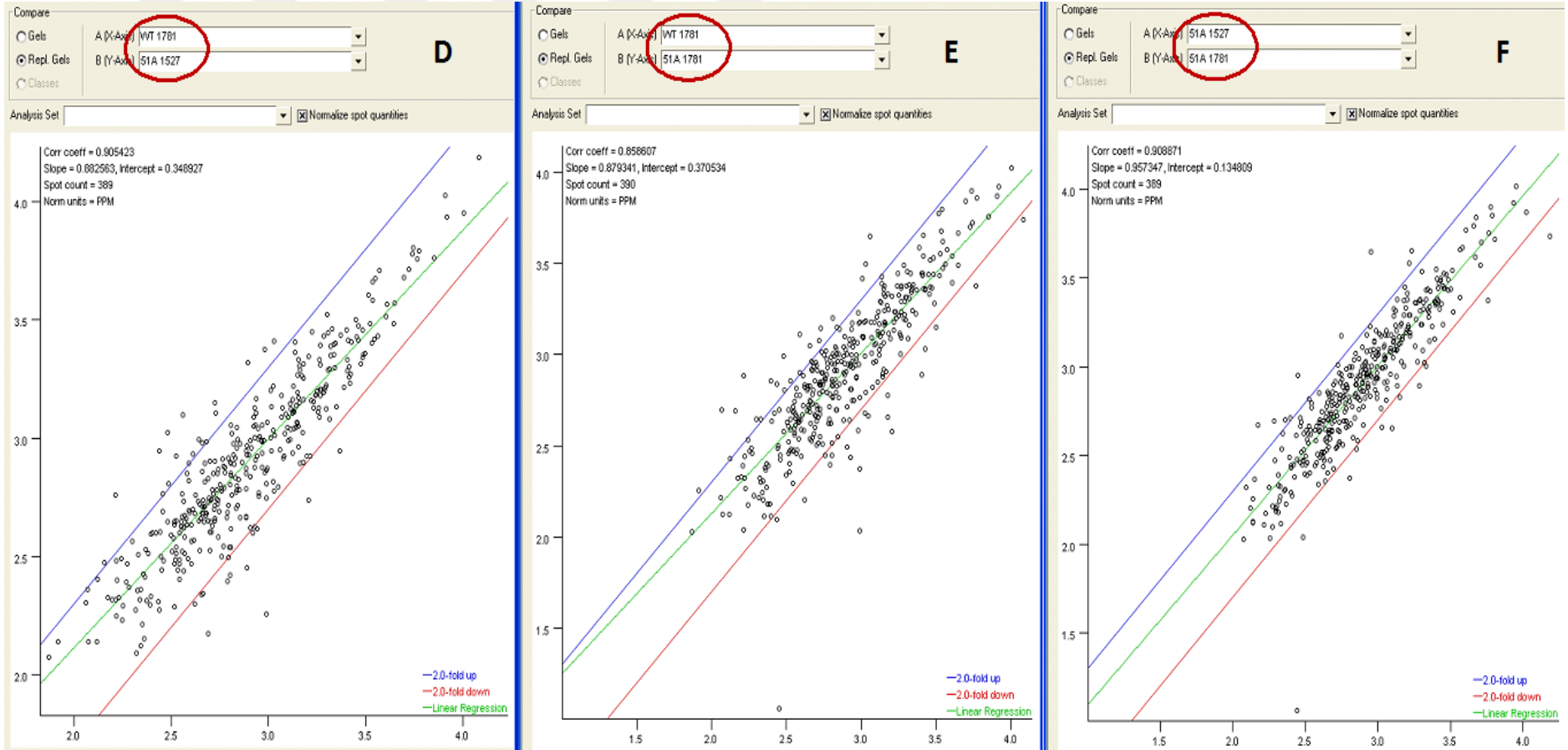
Gel Image Name	Pixel Count	Total Density
WT-1527-1	724449	519455872
WT-1527-2	724449	520756928
WT-1527-3	724449	547704128
WT-1781-1	724449	441731136
WT-1781-2	724449	590091712
WT-1781-3	724449	506580448
51A-1527-2	724449	281208064

Şekil 5.3. Karşılaştırmalı jel analizleri için PDQuest programında kullanılan normalizasyon çeşitleri ve seçilen normalizasyonun gösterimi



Şekil 5.4. Çalışma grupları arasındaki eşleşen spot yoğunluk verilerine göre oluşturulmuş serpmе çizim grafikleri.

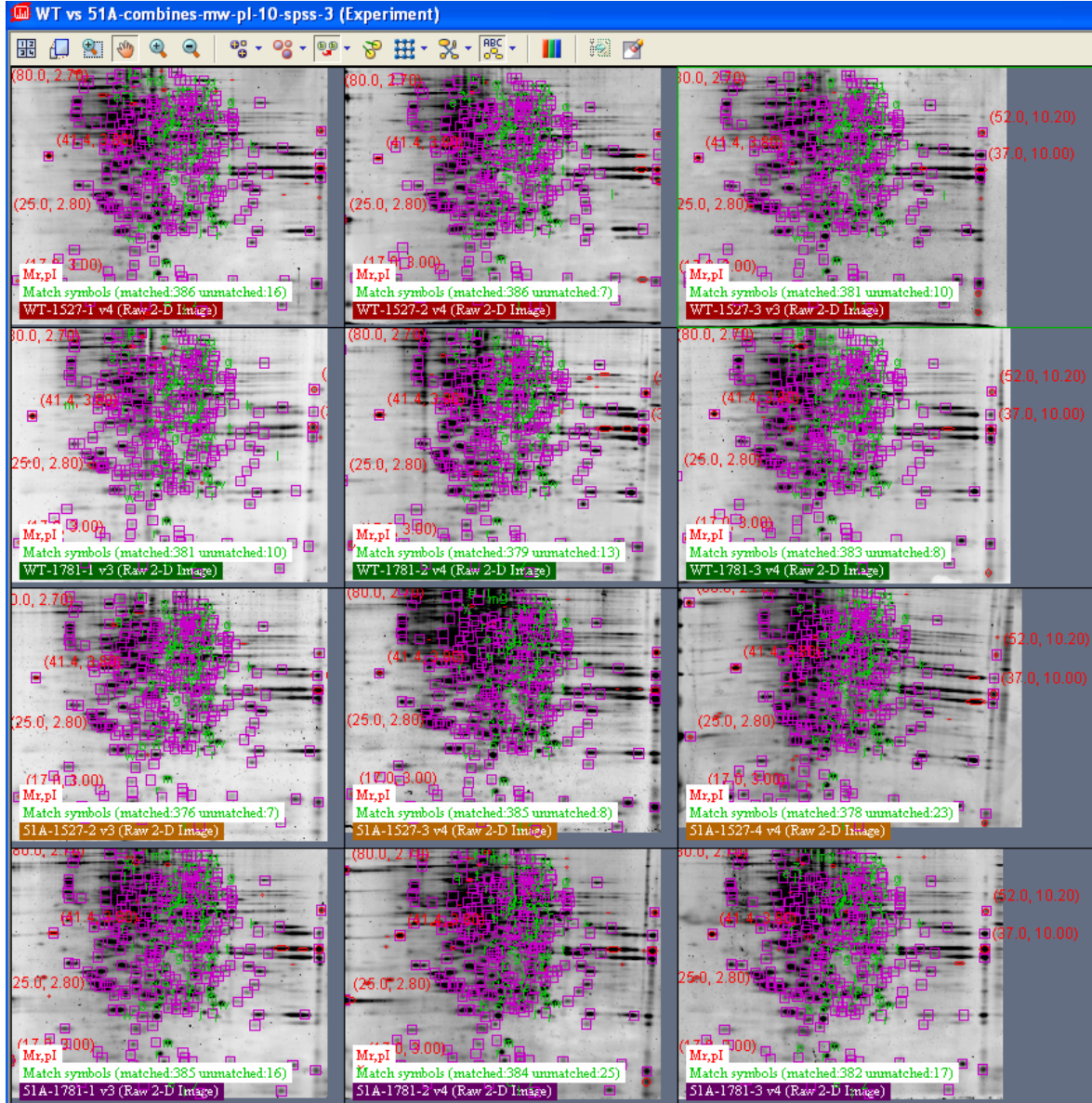
A: WT 1527 ve WT 1781 arasında, B: WT 1527 ve 51A 1527 arasında, C: WT 1527 ve 51A 1781 arasında. Her bir nokta, iki grup arasında eşleşen her bir spotun 3 teknik tekrarının ortalama yoğunluk değeri ifade etmektedir. Kırmızı ve mavi çizgilerin dışında kalan noktalar, iki grup arasında ifadesi en az iki kat artan veya azalan protein spotlarıdır



Şekil 5.5. (devam) Çalışma grupları arasındaki eşleşen spot yoğunluk verilerine göre oluşturulmuş serpmeye çizim grafikleri.

D: WT 1781 ve 51A 1527 arasında, E: WT 1781 ve 51A 1781 arasında, F: 51A 1527 ve 51A 1781 arasında. Her bir nokta, iki grup arasında eşleşen her bir spotun 3 teknik tekrarının ortalama yoğunluk değerini ifade etmektedir. Kırmızı ve mavi çizgilerin dışında kalan noktalar, iki grup arasında ifadesi en az iki kat artan veya azalan protein spotlarıdır

Karşılaştırmalı analizler sonucunda her grubun tüm teknik tekrarlarında bulunan ve doğrulanmış toplam 363 spot eşleşmesi (otomatik olarak eşleşen ve manuel olarak eşleştirilen spotlar) görülmüştür (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. Dört grubun tüm teknik tekrarları dahil edilerek yapılan karşılaştırmalı matchset analizlerinde tüm jellerde eşleşen protein spotları

5.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Eşleşen 363 spot için her bir grubun üç ayrı replikasına ait protein yoğunluk değerleri PDQuest programından xml formatında alınarak SPSS 13.0 programında %95 güven aralığında ($p < 0.05$) ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca varyans homojenliğini test etmek için Levene testi kullanılmış ve p değerleri bu sonuçlara göre seçilmiştir. ANOVA testinde eşit varyans varsayımı için Tukey, eşit olmayan varyans varsayımı için Tamhane's T2 karşılaştırma testleri kullanılmıştır. Ayrıca, yoğunluk değerleri logaritmik transformasyon yapılarak da istatistiksel analizlere tabi tutulmuş, ifade farklılığı açıkça görülen bazı protein kümeleri logaritmik düzeltmeden önce istatistiksel olarak anlamlı görülmezken, logaritmik düzeltme sonrası ifade farklılıkları anlamlı bulunmuş ve tüm sonuçlar birleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda, tüm jellerde eşleşen toplam 363 protein spotundan 56 tanesinin protein ifadesinin herhangi iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı artış-azalış gösterdiği belirlenmiştir. Bahsedilen 56 spot için istatistiksel verilerin ayrıntıları [Tablo 5.1](#)'de verilmiştir.

Tablo 5.1. İstatistiksel analizler sonucunda protein ifadesinde anlamlı artış/azalış tespit edilen protein kümeleri ve *p* değerleri

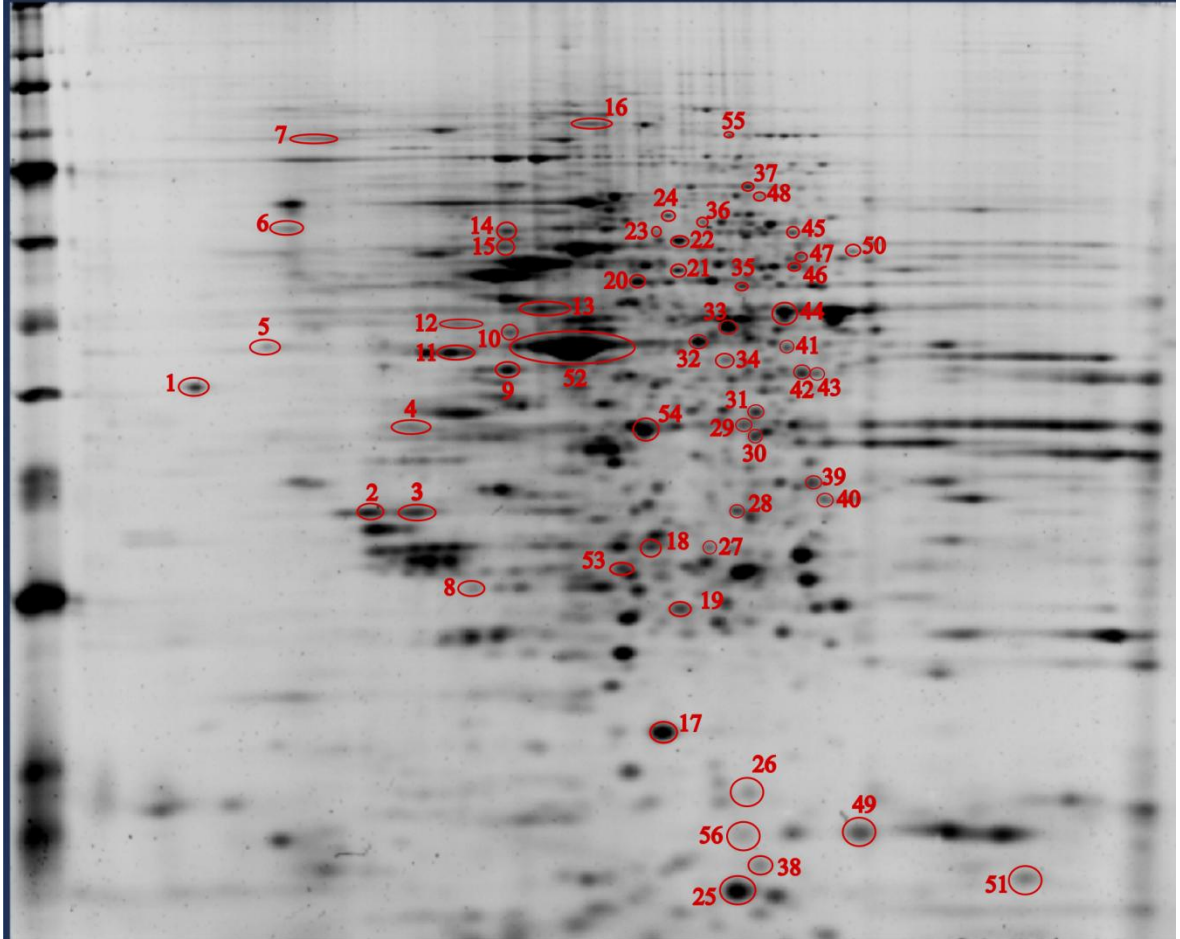
Spot No	SSP No	Gruplar arası anlamlı fark*	P değeri
1	306	1v3	0,049
2	1203	3v4	0,007
3	1206	1v3	0,014
		2v3	0,011
		3v4	0,005
4	1305	1v3	0,000
		2v3	0,010
		3v4	0,003
5	1422	2v4	0,041
		3v4	0,011
6	1603	1v4	0,000
		2v4	0,000
		3v4	0,007
7	1804	2v4	0,048
8	2103	1v2	0,017
		2v3	0,014
		2v4	0,023
9	2407	1v4	0,013
		2v4	0,040
		3v4	0,026
10	2409	1v3	0,003
		2v3	0,025
11	2410	3v4	0,029

12	2502	3v4	0,027
13	2507	2v3	0,048
14	2605	1v2	0,026
15	2607	2v3	0,035
16	3809	1v2	0,046
17	4004	2v3	0,031
18	4104	1v4	0,011
		2v3	0,019
		2v4	0,004
19	4109	2v3	0,023
20	4502	1v4	0,047
		2v4	0,006
21	4511	2v4	0,016
22	4604	2v4	0,028
23	4607	1v4	0,001
		2v4	0,001
		3v4	0,007
24	4704	1v2	0,048
		2v4	0,029
25	5002	1v4	0,011
		2v4	0,037
26	5003	1v4	0,004
27	5103	1v3	0,029
		1v4	0,005
28	5205	2v4	0,009
		3v4	0,028

29	5306	2v3	0,017
		2v4	0,007
30	5307	1v4	0,014
31	5308	1v4	0,004
		2v4	0,018
32	5401	1v2	0,006
		2v4	0,006
33	5405	2v4	0,035
34	5414	2v4	0,012
35	5507	2v3	0,047
		1v4	0,019
36	5701	2v4	0,005
		2v4	0,024
37	5711	2v4	0,024
		1v3	0,007
38	6001	2v3	0,003
		3v4	0,001
39	6206	1v4	0,038
40	6208	1v2	0,050
41	6406	1v4	0,022
		2v4	0,040
42	6407	1v4	0,045
43	6409	1v2	0,004
		1v3	0,000
		1v4	0,034
44	6503	3v4	0,012
44	6503	2v3	0,043

45	6608	1v4	0,020
		2v4	0,028
46	6609	3v4	0,046
		1v4	0,004
47	6610	1v4	0,004
		2v4	0,050
48	6701	1v2	0,002
		1v3	0,012
49	7001	2v4	0,046
50	7603	2v4	0,010
51	8010	1v3	0,040
		2v3	0,008
52	3402	3v4	0,018
		1v4	0,035
53	4112	3v4	0,035
		1v3	0,013
54	4301	2v3	0,002
55	5808	2v4	0,047
56	6005	1v2	0,035
56	6005	2v4	0,020

Gerçekleştirilen analizler sonucunda herhangi iki grup arasında protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış/azalış gösteren 56 protein spotu (Şekil 5.7) jellerden kesilerek yöntem bölümünde açıklandığı şekilde tripsinizasyon işlemine tabi tutulmuştur.



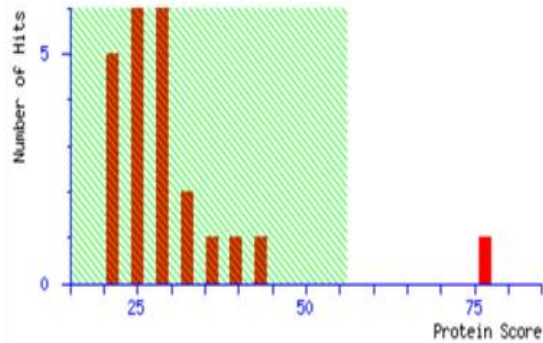
Şekil 5.7. Analizler sonucunda en az 2 grup arasında protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı değişim (artış/azalış) gösteren 56 protein spotunun referans jel üzerinde numaralandırılarak gösterimi

5.5. PEPTİT KÜTLE PARMAKİZİ (PMF) İLE BİYOİNFORMATİK ANALİZ VE PROTEİN TANIMLANMASI

Tripsinizasyon sonucunda 56 protein spotundan elde edilen peptitler üç tekrarlı olarak MALDI-TOF plakalarına yüklenerek MALDI-TOF MS ile analiz edilmiş ve PMF analizleri ile (Şekil 5.8) 56 spotun 12'sinden toplam 17 protein tanımlanmıştır (Tablo 5.2).

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As: Concise Protein Summary [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 50

Preferred taxonomy: All entries

[Re-Search All](#) [Search Unmatched](#)

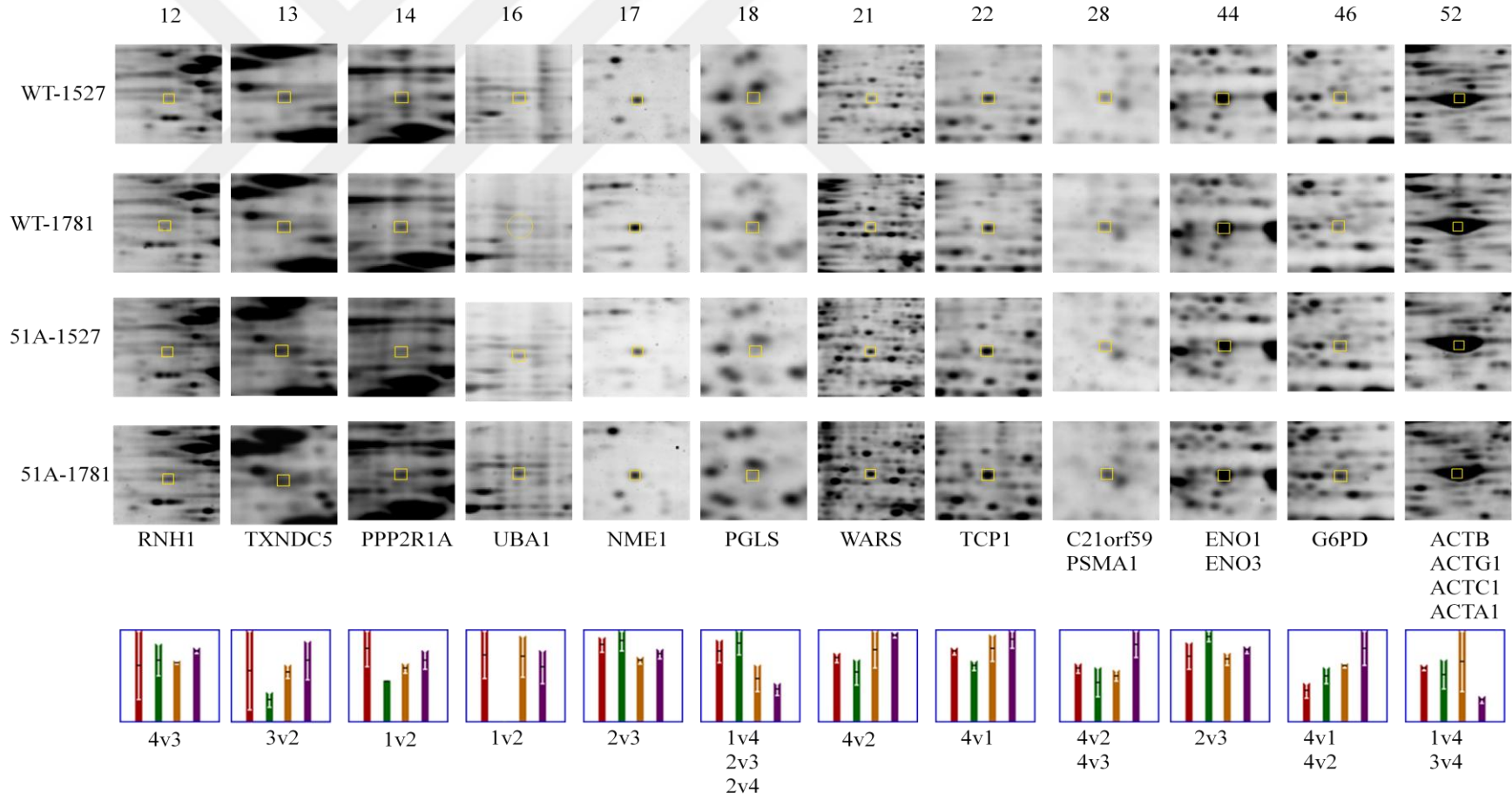
- [6PGL HUMAN](#) Mass: 27815 **Score: 76** Expect: 0.00045 **Matches: 5** ←
6-phosphogluconolactonase OS=Homo sapiens GN=PGLS PE=1 SV=2
- [XRCC3 HUMAN](#) Mass: 38282 Score: 35 Expect: 7 Matches: 3
DNA repair protein XRCC3 OS=Homo sapiens GN=XRCC3 PE=1 SV=1
- [RAB20 HUMAN](#) Mass: 26602 Score: 28 Expect: 34 Matches: 2
Ras-related protein Rab-20 OS=Homo sapiens GN=RAB20 PE=1 SV=1
- [RPR1A HUMAN](#) Mass: 35926 Score: 24 Expect: 83 Matches: 2
Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A OS=Homo sapiens GN=RPRD1A PE=1 SV=1
- [OCC1 HUMAN](#) Mass: 6460 Score: 20 Expect: 1.9e+02 Matches: 1
Overexpressed in colon carcinoma 1 protein OS=Homo sapiens GN=OCC1 PE=1 SV=2

- [GUC1C HUMAN](#) Mass: 23864 Score: 43 Expect: 0.97 Matches: 3
Guanylyl cyclase-activating protein 3 OS=Homo sapiens GN=GUCA1C PE=1 SV=3
- [KRT83 HUMAN](#) Mass: 55928 Score: 22 Expect: 1.4e+02 Matches: 2
Keratin, type II cuticular Hb3 OS=Homo sapiens GN=KRT83 PE=1 SV=2

Şekil 5.8. Mascot veritabanında PMF analizi ile protein tanımlanması

Tablo 5.2. Peptit kütle parmakızı (PMF) ile tanımlanan proteinler ve ayrıntılı bilgileri

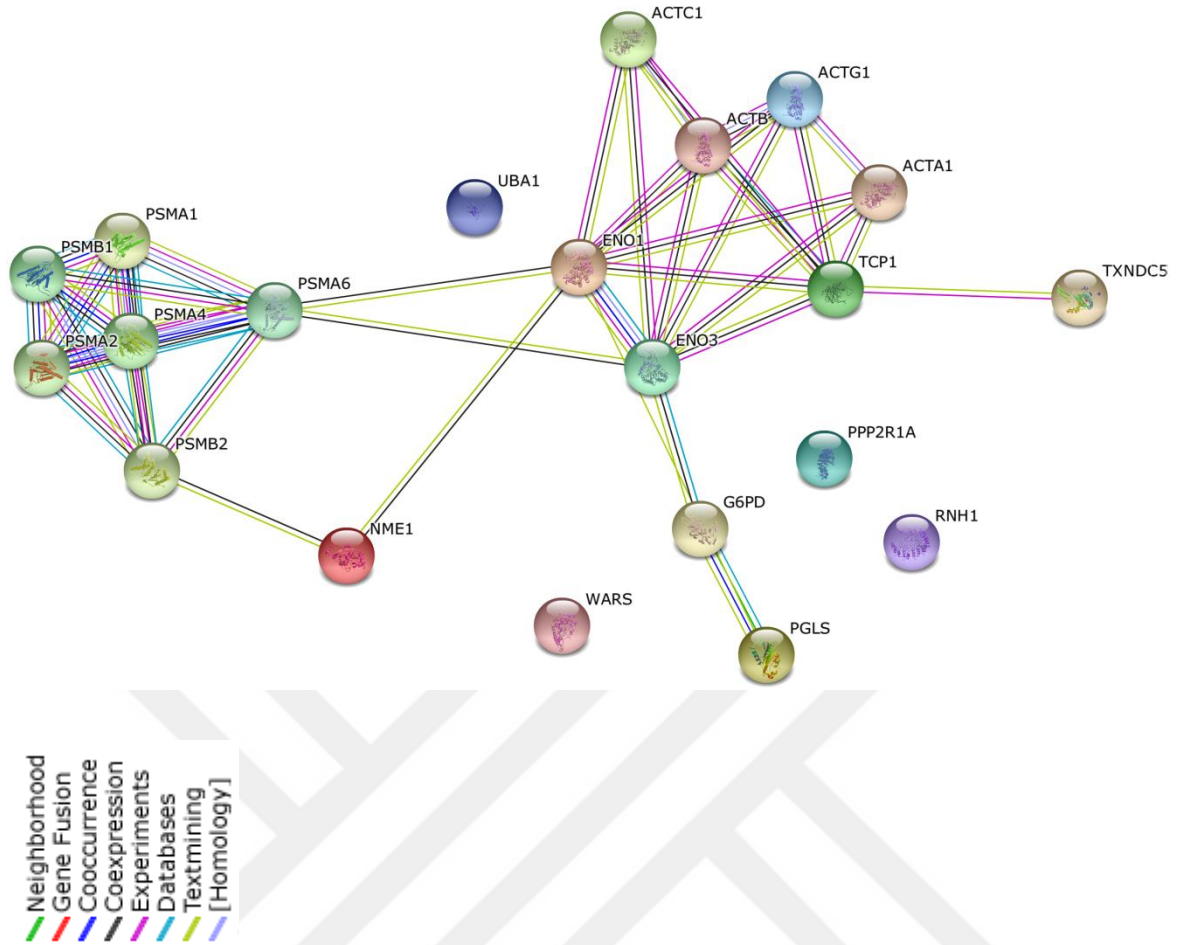
Spot No	Teorik Mw/pI	Gözlenen Mw/pI	Erişim No	Protein Adı	Gen Adı	Gruplar arası anlamlı fark*	Kat artışı	Mascot Skoru	Protein Sekans Örtüşme (%)
12	51.7/4.71	49.0/5.26	P13489	Ribonuclease inhibitor	RNH1	4v3	1,21	73	20%
13	48.2/5.63	50.7/5.64	Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	TXNDC5	3v2	2,40	58	19%
14	66.0/5	65.9/5.57	P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	1v2	1,78	66	11%
16	118.8/5.49	126.1/5.9	P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	1v2	(542,9 :0)	86	13%
17	17.3/5.83	19.3/6.48	P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	NME1	2v3	1,33	62	29%
18	27.8/5.7	27.8/6.41	O95336	6-phosphogluconolactonase	PGLS	1v4	2,19	76	27%
						2v3	1,79		
						2v4	2,43		
21	53.4/5.83	57.5/6.57	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase	WARS	4v2	1,78	61	15%
22	60.8/5.8	63.5/6.55	P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	4v1	1,46	66	14%
28	33.3/6.99	30.3/6.99	P57076	Uncharacterized protein C21orf59	C21orf59	4v2	1,98	56	25%
						4v3	1,67		
28	29.8/6.15	30.3/6.99	P25786	Proteasome subunit alpha type-1	PSMA1	4v2	1,98	56	17%
						4v3	1,67		
44	47.4/7.01	50.3/7.34	Q6GMP2	Alpha-enolase	ENO1	2v3	1,34	95	23%
44	47.3/7.59	50.3/7.34	P13929	Beta-enolase	ENO3	2v3	1,34	74	19%
46	59.6/6.39	58.3/7.43	P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	4v1	2,44	63	13%
						4v2	1,58		
52	42/5.29	45.5/5.90	Q96HG5	Beta-actin	ACTB	1v4	1,10	108	23%
						3v4	1,10		
52	42.1/5.31	45.5/5.90	P63261	Gamma-actin	ACTG1	1v4	1,10	108	23%
						3v4	1,10		
52	42.3/5.23	45.5/5.90	P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1	1v4	1,10	58	12%
						3v4	1,10		
52	42.3/5.23	45.5/5.90	P68133	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	1v4	1,10	58	12%
						3v4	1,10		
*Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4						
WT-1527	WT-1781	51A-1527	51A-1781						



Şekil 5.9. Tanımlanan proteinlerin spot numaraları, her bir gruba ait jellerde gösterimleri, isimleri ve yoğunluk bar grafi ortalamaları

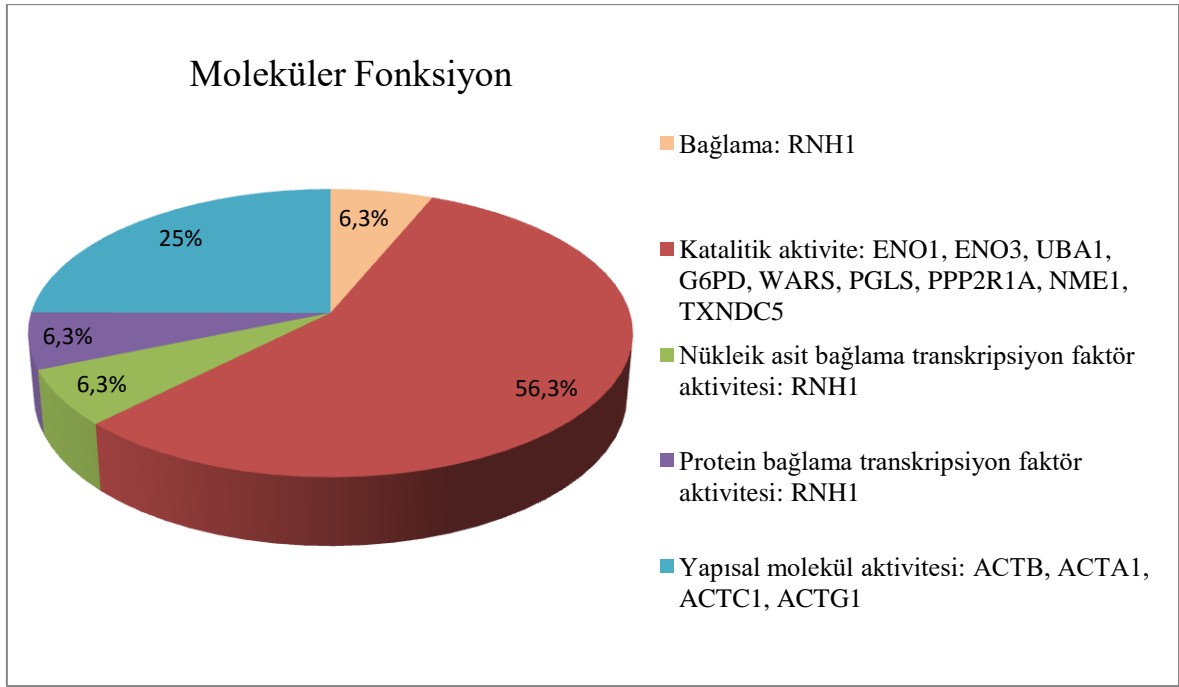
Ağ analizleri ve açıklamaları, günümüzde gittikçe önem kazanan sistem biyolojisi için önemli araçlar durumundadır. Bu analizler genlerin ve proteinlerin birbiri ile ilişkilerini, hücre içindeki ve hücreler arasındaki karmaşık ilişkileri özetlemek için kullanışlıdır ve yeni ilaç keşfi hedefleri için önemli ipuçları sağlayabilirler. Bu tez çalışması ile tanımlanan proteinlerin birbirleri ile ilişkisinin ve tahmini sinyalizasyon ağlarının belirlenmesi amacı ile STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) veritabanı kullanılmıştır (64). Bu ağda her bir küre proteinleri, çizgiler proteinler arasındaki tahmini fonksiyonel ilişkiyi, çizgi sayısı ise proteinler arasındaki tahmini fonksiyonel etkileşimin gücünü ifade etmektedir.

Analiz sonucunda genlerin iki ana merkezde (hub) toplandığı görülmüştür ([Şekil 5.10](#)). “Proteasome subunit alpha type-1” proteininin (PSMA1) diğer proteazom ilişkili proteinler ile kuvvetli bağları dikkat çekmiştir. Proteazom inhibitörlerinin kullanımı çeşitli kanser tedavileri için onaylanmış olduğundan, PSMA1 ve ilişkili olduğu diğer proteazom ilişkili proteinlerin yeni ilaç keşfi için önemli birer hedef teşkil edebileceği düşünülmektedir. NME1'nin hem proteazom ilişkili protein ailesiyle hem de enolaz ailesiyle komşuluğu ve ortak ifadesi görülmüştür. NME ailesine ait proteinlerin hücre adezyonu, hücre göçü ve farklılaşması, mikrotübül polimerizasyonu, sinyal iletim yolu, histidin bağımlı fosforilasyon, tümör hücre şekli ve apoptoz gibi birden fazla biyolojik süreçte rol oynuyor olması bu fonksiyonel etkileşimi açıklamaktadır. STRING analizi sonucunda aktin tipleri ile enolaz tipleri arasında güçlü sinyal ağları gözlenmiştir. Enolaz ve aktin'in kanser hücrelerinin anormal metabolizmasında rol oynadığı bilinmektedir. Aktin ve enolaz grupları ile aynı merkezde toplandığı gözlenen TCP1, bir moleküler şaperon olup, aktin ve tübülün katlanmasında rol oynadığı bilinmektedir.

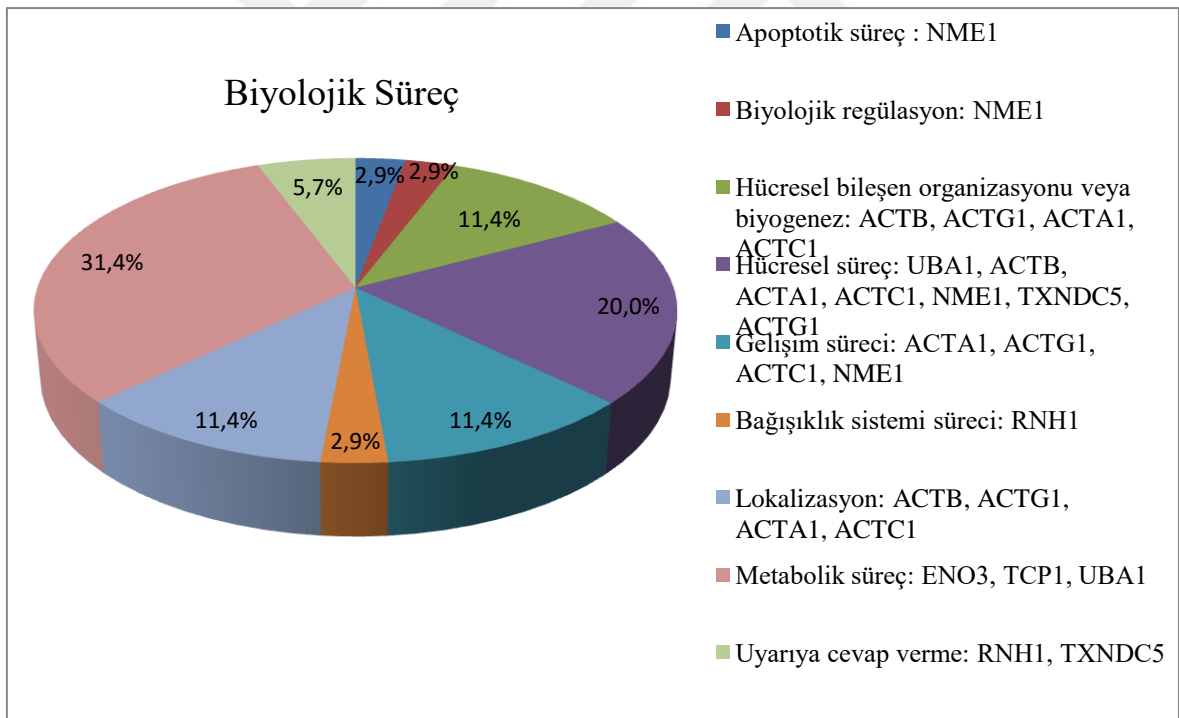


Şekil 5.10. 1781 ve 1527 ile muamele edilen PC-3 hücrelerinde proteinler arasındaki tahmini sinyalizasyon ağları.

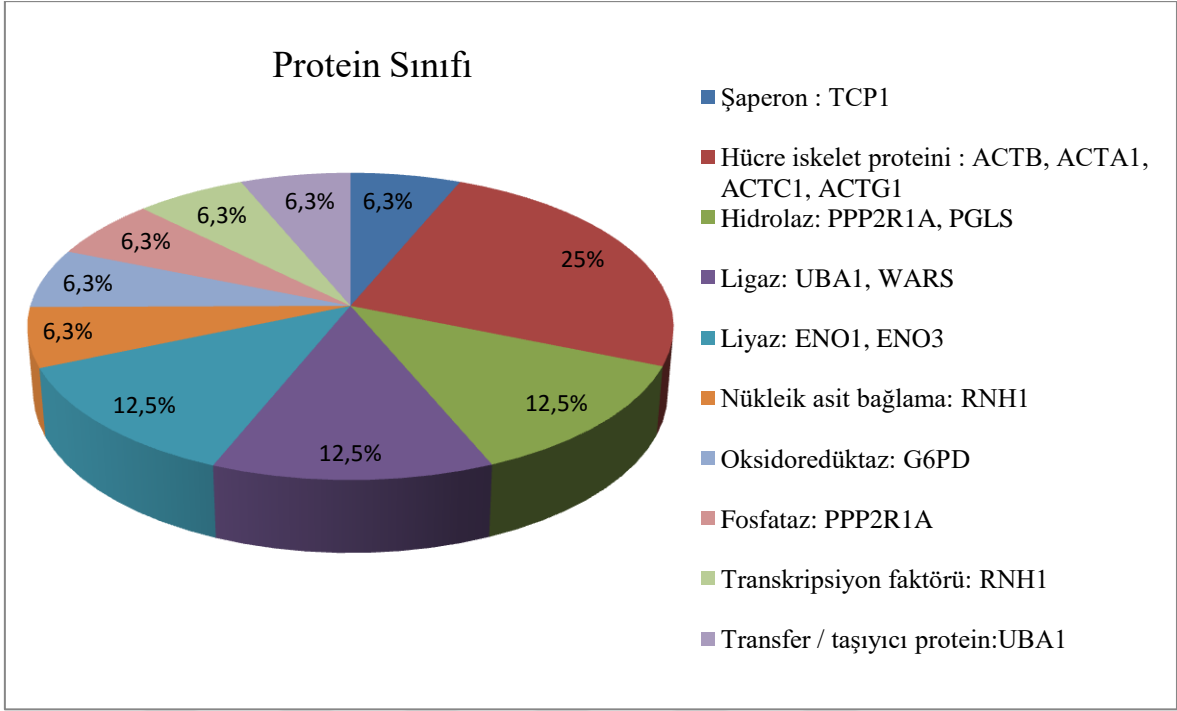
Tanımlanan proteinlerin sinyalizasyon ağları STRING veritabanı aracılığıyla analiz edildikten sonra her bir proteinin ait olduğu protein sınıflarını belirlemek amacı ile Gen Ontoloji Referans Genom Projesi'nin bir parçası olan ve proteinlerin yüksek verimli analizini kolaylaştırmak amacıyla proteinleri (ve onların genlerini) sınıflandırmak için tasarlanmış olan PANTHER (Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships) sınıflandırma sistemi kullanılmıştır. GO (Gen Ontoloji) veritabanlarındaki fonksiyonel bilgileri kullanarak, tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyonları, dahil oldukları biyolojik süreçler, protein sınıfları ve görev alınan yollar belirlenmiştir (65-67). Sınıflandırılan proteinler, elde edilen veriler ışığında Microsoft excel uygulaması ile yüzde oranlarını da yansıtacak şekilde pasta grafiklerine dönüştürülmüştür. Her bir sınıflandırmaya ait pasta grafiği Şekil 5.11-14'de verilmiştir.



Şekil 5.11. MALDI-TOF MS ile tanımlanan proteinlerin GO (Gene Ontology) analizi ile moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılması (65-67)

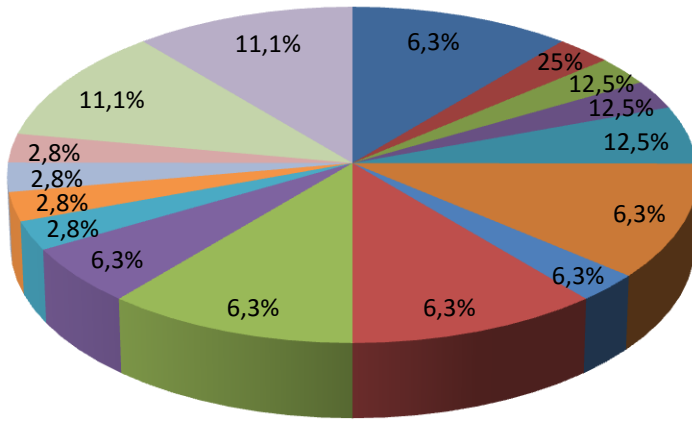


Şekil 5.12. MALDI-TOF MS ile tanımlanan proteinlerin GO analizi ile dahil oldukları biyolojik süreçlere göre sınıflandırılması (65-67)



Şekil 5.13. MALDI-TOF MS ile tanımlanan proteinlerin GO analizi ile protein sınıflarına göre sınıflandırılması (65-67)

Görev Alınan Yolaklar



- Kadherin sinyal yolağı: ACTB, ACTA1, ACTC1, ACTG1
- De novo pirimidin deoksiribonükleotid biyosentezi: NME1
- De novo pürin biyosentezi: NME1
- De novo pirimidin ribonükleotidlerin biyosentezi: NME1
- Integrin sinyal yolağı: ACTB, ACTG1
- Alzheimer hastalığı - presenilin yolağı: ACTB, ACTA1, ACTC1, ACTG1
- Übikitin proteazom yolağı: UBA1
- Kemokin ve sitokin sinyal yolu aracılığıyla enflamasyon: ACTB, ACTA1, ACTC1, ACTG1
- Huntington hastalığı: ACTB, ACTA1, ACTC1, ACTG1
- Wnt sinyal yolu: ACTA1, ACTC1
- Glikoliz: ENO1
- Parkinson hastalığı: PSMA1
- FGF sinyal yolu: PPP2R1A
- DNA replikasyonu: RNH1
- Rho GTPaz tarafından hücre iskeleti düzenlemesi: ACTB, ACTA1, ACTC1, ACTG1
- Nikotinik asetilkolin reseptör sinyal yolağı: ACTB, ACTA1, ACTC1, ACTG1

Şekil 5.14. MALDI-TOF MS ile tanımlanan proteinlerin GO analizi ile görev aldıkları yolaklara göre sınıflandırılması (65-67)

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Yeni sentezlenmiş bir polipeptit zincirinin biyolojik olarak aktif proteinlere dönüşebilmesi için katlanarak ve translasyon sonrası modifikasyonlara uğrayarak özgül üç boyutlu yapı kazanması gerekmektedir (2). Fosforilasyon, glikozilasyon, ubiquitinasyon, nitrozilasyon, metilasyon, asetilasyon, lipidasyon ve proteoliz gibi süreçleri içeren bu modifikasyonlar normal hücre biyolojisi ve patogenezini hemen hemen her yönüyle etkilediği gibi, proteomun fonksiyonel çeşitliliğini de artırır. Bu nedenle, hastalıklarla ilişkili proteinleri tanımlamak, onların translasyon sonrası modifikasyonlarını belirlemek ve anlamak hücre biyolojisi çalışmalarında, hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde önem arz etmektedir.

Homeostaziyi koruyan, hücre çoğalması, büyümesi, farklılaşması ve gelişimini düzenleyen temel hücrel bir süreç olan protein sentezinin, sentez sonrası katlanmanın ve modifikasyonların kontrolü ER tarafından sağlanır. Bu kontrol son derece önemli olup, ER’de katlanmamış proteinlerin birikmesiyle oluşan ER stresin ve strese cevap yollarının diyabet, obezite, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere pek çok hastalıkta aktif olduğu belirlenmiştir (68). ER stres durumunda hücrel adaptasyonun, çeşitli sinyal iletim yolları ve bu yollarda görevli bileşenleri içeren UPR’nin aktivasyonu ile sağlandığı bilinmektedir. Ancak ER stres durumunda tetiklenen bu hücrel yolları ve bunların birbirleriyle olan etkileşimlerini içeren bu karmaşık bulmaca, günümüze kadar yapılan araştırmalarla tam olarak çözülebilmemiş değildir. Hücrel yolların tanımlanmasında ER stresin yanında strese cevap proteinleri de son derece önemlidir. Hücreler, dengenin bozulması durumunda hücreyi normal yaşam koşullarına döndürebilmek için stres proteinlerinin ifadesini artırır. Ancak her hücrel stres durumunda aynı stres proteinleri aynı düzeyde aktif olmamaktadır. Farklı patolojik durumlar kendine özgü farklı sinyal yollarının tetiklenmesini sağlamaktadır (69).

Son yıllarda kanser alanında yapılan araştırmalar ER Stres ve UPR’nin çeşitli tümörlerde yüksek derecede uyarıldığını, kanser hücrelerinin hayatta kalması ve anti-kanser tedavilere direnci ile yakından ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Böylece malignitede aktive olan veya baskılanan UPR bileşenlerini tanımlamak ve UPR’yi hedefleyerek yeni kanser tedavi potansiyellerini keşfetmek önemli araştırma konuları haline gelmiştir (18, 30, 34, 70-73).

Dolayısıyla, kanser gibi ER stres ilişkili hastalıklarla mücadelede UPR bileşenlerinin ve sinyal yollarının hedeflenmesi iyi bir tedavi stratejisi olabilir (49).

Pek çok hastalık gibi kanser de, protein sentezinin anormal düzenlemesinin sonucudur ve yolunda gitmeyen bir translasyonel kontrol ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle translasyonel kontrolün moleküler temellerinin ve mekanizmasının derinlemesine anlaşılması önemlidir. UPR'nin üç sinyal yolundan biri olan PERK, eIF2 α fosforilasyonu ile translasyonel kontrolden ve genel protein sentezinin durdurulmasından sorumludur. PERK'in eIF2 α 'yı fosforillemesi ile translasyon başlama kaskadındaki ilk kritik adım olan eIF2-GTP-tRNA^{iMet} üçlü kompleksinin oluşumu engellenir ve böylece genel protein sentezi durdurulur. Translasyon başlangıcının aktivasyon mekanizmasının ve sinyal yollarının bileşenleri, kanser tedavisi için iyi hedefler oluştururlar. Bu bileşenlerin daha detaylı anlaşılması, gelecekte yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesine olanak sağlayacaktır (68).

Bu tez çalışması kapsamında, daha önce Harvard Tıp Fakültesi'nde NIH projesi kapsamında gerçekleştirilen ve yayınlanan (18) genomik ve transkriptomik verileri tamamlayacak nitelikte proteomik yaklaşımlar kullanılarak, eIF2-GTP-tRNA^{iMet} translasyon başlangıç üçlü kompleksi hedefli ilaç adayı moleküllerin neden olduğu moleküler mekanizmalar hakkında daha fazla bilgi edinilmesi sağlanmıştır. Western Blot uygulamalarındaki gibi tek bir proteinin değil, yüzlerce proteinin ifadesinin aynı anda analiz edilebilmesine izin veren iki boyutlu jel elektroforezi ile protein profil haritaları oluşturulmuş ve karşılaştırmalı analizleri gerçekleştirilmiştir. Eşleşen tüm spotlar içerisinden protein ifadesinde en az iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülen 56 protein spotu jellerden kesilerek ve peptit izolasyonu gerçekleştirilerek protein tanımlanması için MALDI-TOF analizlerine tabi tutulmuştur. Mevcut 56 spotun 12'sinden metabolizma, transkripsiyon, sinyal iletimi, proteoliz, apoptoz ve protein katlanması gibi çeşitli biyolojik süreçler ile bağlantılı toplam 17 protein tanımlanmıştır ([Tablo 5.2](#)). Böylece, hücreye uygulanan kimyasal molekül eIF2 α fosforilasyonunun yanında hangi proteinlerin ifadelerini artırmakta ya da azaltmaktadır sorusuna cevap aranmış, bu proteinlerin görevleri, kanser ile ilişkileri ve uygulanan kimyasal molekülün bu proteinler üzerindeki olası etkileri tartışılmıştır.

Tablo 6.1. Tanımlanan proteinlerin gen isimleri, kanserle ilişkileri ve gruplar arası kat artışları

Spot No	Gen Adı	Kanser	Gruplar arası anlamlı fark*	Kat artışı
12	RNH1↑	↓	4v3	1,21
13	TXNDC5↑	↑	3v2	2,40
14	PPP2R1A↑	↑	1v2	1,78
16	UBA1↑	↑	1v2	(542,9:0)
17	NME1↑	?	2v3	1,33
18	PGLS↑	↑	1v4	2,19
		↑	2v3	1,79
		↑	2v4	2,43
21	WARS↑	↓	4v2	1,78
22	TCP1↑	↑	4v1	1,46
28	C21orf59↑	?	4v2	1,98
		?	4v3	1,67
28	PSMA1↑	↑	4v2	1,98
		↑	4v3	1,67
44	ENO1↑	?	2v3	1,34
44	ENO3↑	?	2v3	1,34
46	G6PD↑	↑	4v1	2,44
		↑	4v2	1,58
52	ACTB↑	↑	1v4	1,10
		↑	3v4	1,10
52	ACTG1↑	↑	1v4	1,10
		↑	3v4	1,10
52	ACTC1↑	↑	1v4	1,10
		↑	3v4	1,10
52	ACTA1↑	↑	1v4	1,10
		↑	3v4	1,10

*Grup:	
1	WT-1527
2	WT-1781
3	51A-1527
4	51A-1781

12 no'lu spottan tanımlanan “Ribonuclease inhibitor” RNH1 geni tarafından kodlanan bir protein olup, anjiyogenez inhibitörüdür. Bilindiği gibi anjiyogenin (ANG), hücre büyümesini ve hayatta kalmasını teşvik eder. Son yıllarda yapılan çalışmalarla ANG'nin biyolojik aktivitelerine anjiyogenezi teşvik etmesi de eklenmiştir. Anjiyogenez solid tümör büyümesi ve metastazı için gereklidir. Anjiyogenez-bağımlı solid tümör gelişimi düşünüldüğünde anti-anjiyogenik gen terapileri önemli yan etkileri olmadan tümör büyümesinin ve metastazın sınırlandırılmasında önemli ve güçlü bir işlem olarak görülmektedir (74). Büyüme koşulları altında ANG çekirdeğe geçer ve çekirdekte birikerek ribozomal RNA (rRNA) transkripsiyonunu uyarır. Stres durumunda ise sitoplazmik bölmelerde birikir ve hayatta kalma mekanizmasında protein translasyonunu

yeniden düzenleyen “t-RNA’dan türetilmiş stresle-uyarılan küçük RNA (*tRNA-derived stress-induced small RNA, tiRNA*)” ların üretimine aracılık eder (75, 76). Stres altındaki hücrelerde çekirdekteki ANG, enzimatik aktivitenin inhibisyonuna ve gereksiz ribozomal RNA (rRNA) üretimine engel olarak anabolik enerji tasarrufu sağlamak üzere RNH1 ile ilişki içerisindedir. RNH1’in knockdown edilmesi ile ANG’nin stres-kaynaklı yer değiştirmesinin bozulduğu ve dolayısıyla hücre büyümesinin ve hayatta kalımının azaldığı görülmüştür. Dolayısıyla RNH1’nin önemli bir rolü ANG’nin hücresel lokalizasyonunu düzenlemek, böylece hücre büyümesini ve hayatta kalmasını kontrol etmektir (76).

Son yıllarda yapılan pek çok çalışma ile ribonükleaz inhibitörün kanser gelişimini baskılayıcı bir rol oynadığını gösterilmiştir. İfadesi artan ribonükleaz inhibitörün melanoma gelişimini inhibe ettiğini gösteren çalışmaların yanında, ifadesi azaltıldığında mesane kanser hücre büyümesinin anlamlı bir şekilde arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Dolayısıyla ribonükleaz inhibitörün yukarıda bahsedilen anjiyogenez düzenleyici etkisinin yanında büyüme ve metastazın baskılanmasını içeren anti-tümör bir etkisinin de olduğu ve tedavi edici hedef bir protein olarak önemli olabileceği belirlenmiştir (77-79).

Bizim çalışmamızda RNH1, 51A-1781 hücrelerinde 51A-1527 hücrelerine göre 1,2 kat daha fazla bulunmuştur. Anti-kanser aktivite gösteren 1781’in eklendiği hücre hattında inaktif 1527 eklenmiş hücrelere göre RNH1’in ifadesinin artması, 1781’in dolaylı yoldan da olsa hücre sağ kalımına pozitif bir etki gösterdiğini düşündürmektedir. Benzer bir ifade farklılığına diğer hücre hatları arasında rastlanmamıştır.

13 no’lu spottan tanımlanan “Thioredoxin domain-containing protein 5 (TXNDC5)”, diğer adı ile “Endoplasmic reticulum resident protein 46” son yıllarda keşfedilmiş bir protein olup, yeni bir ER bileşeni ve thioredoxin ailesi üyesi olarak tanımlanmış, ayrıca PDI benzeri aktivitesi olduğu belirlenmiştir (80, 81). TXNDC5 gen ifadesi hipoksi tarafından indüklenir ve rolünün hipoksik hücreleri apoptozdan korumak olabileceği düşünülmektedir. Hipoksi tarafından uyarılan TXNDC5, ekspresyonu, hücre proliferasyonu ve anjiyogenezi teşvik eder. Bilindiği gibi, artan hücre çoğalması, anjiyogenez ve hipoksi, tümör dokularının başlıca özellikleridir. Son yıllarda yapılan pek çok çalışma tümör hücrelerinin apoptozu engelleme mekanizmalarından birinin de

TXNDC5 proteinin ifadesinin artırılması olduğunu, TXNDC5'in tümör hücrelerinin proliferasyonuna ve göçlerine katkı sağlayan tümör arttırıcı bir gen olarak hareket ettiğini, serviks kanseri, özofagus kanseri, karaciğer kanseri ve kolorektal kanser riskine duyarlı olduğunu göstermektedir (82, 83). Protein katlanması ve şaperon aktivitesine katılan TXNDC5'in aşırı ekspresyonu pek çok malign tümörde bildirilmiş, yapılan proteomik çalışmalarda TXNDC5'in ifadesinin kanserli dokularda normal dokulara göre anlamlı şekilde arttığı gösterilmiş ve potansiyel bir biyobelirteç olarak kanser tespiti ve müdahalesinde kullanılabileceği öne sürülmüştür (84, 85).

Bulgularımızda TXNDC5 protein miktarı grup 3 (51A-1527)'de grup 2 (WT-1781)'ye göre yaklaşık 2,5 kat fazla bulunmuştur. 51A grubu hem fosforillenemeyen/mutant grup olduğu için hem de inaktif bileşikle muamele edildiğinden, yani fosforilasyonu zorlayan hiçbir ajan içermediğinden bu fark mantıklıdır. Yaban tip WT'da ise fosforilasyon gerçekleşecek, üstelik de eklenen aktif (anti-kanser) bileşik 1781 da bu fosforilasyonu bir eIF2 α kinaz olan HRI'yı aktive etmek ve böylece eIF2 α 'yı fosforile etmek sureti ile arttıracak, bunun sonucunda protein sentezinin seçici inhibisyonu gerçekleşecektir. Yapılan çalışmalarla kanser gelişimine katkıda bulunduğu ortaya konan TXNDC5'in protein ifadesinin anti-kanser bileşik eklenen hücre grubunda inaktif bileşik eklenen hücre grubuna göre daha az olması literatür ile uyumludur ve eklediğimiz anti-kanser bileşiğin TXNDC5'in ifadesini düşürecek yönde olumlu bir etki gösterdiğini düşündürmektedir.

14 no'lu spottan tanımlanan "Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform (PPP2R1A)" proteini, dört ana serin/treonin fosfatazdan biridir. Hücre büyümesi ve bölünmesinin negatif kontrolünde görev almasının yanında, kinazların ve fosforilazların etkilerine karşı doğrudan etkileri olduğundan birçok sinyal iletim yolunda önemli rolleri bulunmaktadır. PPP2R1A geni metabolizma, DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon, hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptoz dahil olmak üzere pek çok hücrenel süreçte rol alan PP2A enziminin yapısal alt birimini kodlar. PPP2R1A mutasyon bölgelerinin türler arasında korunmuş olduğu ve PP2A enzim düzenleyici alt birimler ile etkileşime girdiği bilinmektedir.

Jones ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği, yumurtalık berrak hücreli karsinoma (ovarian clear cell carcinoma, OCCC)'nin genetik orijinini araştırmak için yapılan bir çalışmada,

kanser hücrelerinin immünoafinite pürifikasyonu sonucunda 8 tümörün ekzomik sekansları belirlenmiştir. Aynı hastalarda, Jones ve ark normal hücrelerin karşılaştırmalı analizleri yoluyla en az 2 tümörde mutasyona uğratılmış 4 gen tespit etmiştir. Bu genlerden PIK3CA ve KRAS'ın OCCC ile ilişkisi daha önce bilinirken, ARID1A ve PPP2R1A bilinmiyordu. Sonuçta ARID1A tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanırken PPP2R1A onkogen olarak tanımlanmıştır (86). Takip eden yıllarda yapılan başka bir çalışmada, sekanslama ile OCCC 'de PPP2R1A geninde mutasyonlar belirlenmiş, benzer mutasyonlar rahim seröz karsinomda da yüksek frekansta görülmüş ve PPP2R1A'nın özellikle kadınlarda rahim kanserinin ölümcül seröz histolojik varyantına yönelik kişisel ilaç tedavileri için iyi bir aday olarak gösterilebileceği öne sürülmüştür (87).

Bizim sonuçlarımızda bu protein WT-1527 hücrelerinde WT-1781 hücrelerine göre 1,78 kat daha fazla bulunmuştur. Her iki hücre de WT hücre olduğundan, burada hücre kültürüne eklediğimiz anti-kanser 1781 bileşiğin onkogen PPP2R1A'nın miktarını azaltacak olumlu bir etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

16 no'lu spottan tanımlanan “Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1”, insanlarda UBA1 geni ile kodlanan bir enzim olup (88), yalnızca iki adet bulunan insan ubiquitin aktifleştirici enzimlerinden biridir (E1) ([Şekil 2.2](#)) ve bu nedenle insanlarda protein ubiquitinasyonundan büyük ölçüde sorumludur (41). Ubikitinasyon, protein katlanması ve yıkımındaki ana görevlerinin yanında hücre döngüsünün düzenlenmesi, endositoz, sinyal iletimi, apoptoz, DNA hasarı tamiri ve transkripsiyonel düzenleme gibi pek çok biyolojik süreçle ilişkilidir (89, 90).

Protein yıkımı hücrelerin değişen ortamlara yanıt vermesine izin verir. Aynı zamanda onların büyümesi ve bölünmesi konusunda sıkı bir kontrol sağlar. Denetimsiz büyüme kansere yol açabileceğinden, bu sürecin sıkı kontrolü çok önemlidir. Pek çok protein, hücre döngüsünü kontrol ederek hücrelerin yalnızca gerektiğinde bölünmesini sağlayan bir anahtar gibi çalışır, dolayısıyla hücre bölünmesi ancak bazı inhibitör proteinlerin proteazlar tarafından yıkımının ardından başlayabilir. Protein yıkımı proteozomal yolu, ubiquitinasyon ve yıkım olmak üzere iki ayrı adımdan oluşur. Yıkım sürecinde mayalardan insanlara kadar oldukça korunmuş, ubiquitin adı verilen 76 amino asitlik bir polipeptidin pek çok kopyası, yıkılacak olan proteinlere bağlanarak proteazomlar tarafından tanınmak üzere

işaretlenir. UBA1, hücrel proteinlerin ubikitin-proteazom sistemi aracılığıyla yıkımı için işaretlenmesinde ubikitin konjugasyonunun ilk adımını katalizler. Bu protein, X'e bağlı spinal kas atrofi tip 2, Parkinson, Alzheimer, amiotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli kanser tipleri ile bağlantılı bulunmuştur (91, 92). Bu bağlamda, ubikitin-proteazom sisteminin önemli bir bileşeni olan UBA1'in tümör gelişimini inhibe etmek için umut vadeden terapötik bir hedef olduğu düşünülmüş, ancak UBA1 birden fazla biyolojik süreçte yer aldığından, UBA1 inhibisyonunun normal hücrelere de zarar verebileceği endişesi gündeme gelmiştir. Ancak lösemili farelerde klinik öncesi testlerde UBA1 inhibitörünün normal hücrelere hiçbir ek toksik göstermemesi ve diğer UBA1 inhibitörü ilaçlarda görülen başarı, kanser tedavisi için güvenle kullanılabilirliği fikrini desteklemiştir (91, 92). Bir UBA1 inhibitörü olan Largazole ile onun keton ve ester türevlerinin, E1 yolunun adenilasyon aşaması esnasında Ub ve UBA1 ligasyonunu engelleyerek spesifik olarak normal hücreler yerine kanser hücrelerini hedeflediği gösterilmiştir (91).

Bizim çalışmamızda UBA1 proteini, WT-1527 hücrelerinde WT-1781 hücrelerine göre ciddi derecede fazladır. Her iki hücre de WT hücre olduğundan, yine burada hücre kültürüne eklenen anti-kanser 1781 bileşiğinin WT-1781'de UBA1 miktarını yadsınmaz derecede azaltacak, neredeyse ortadan kaldıracak olumlu bir etki gösterdiği düşünülebilir.

17 no'lu spottan tanımlanan "Nucleoside diphosphate kinase A", NM23 geni tarafından kodlanan, Nm23 ailesine ait bir proteindir. Bu aileye ait proteinler hücre adezyonu, hücre göçü ve farklılaşması, mikrotübül polimerizasyonu, sinyal iletim yolu, histidin bağımlı fosforilasyon, tümör hücre şekli ve apoptoz gibi birden fazla biyolojik süreçte rol oynarlar (93). Yüksek metastaz potansiyeline sahip bazı tümör hücrelerinde NM23 miktarı az bulunmakla beraber, nöroblastomada artan NME1 seviyeleri agresif tümör özellikleri ile ilişkili bulunmuştur. Nükleosit difosfat kinaz A'yı kodlayan NM23 geni, bir tümör metastazı baskılayıcı olarak önerilmiştir ancak tümör gelişimi ve ilerlemesindeki rolü halen belirsizdir. Bu güne kadar yayınlanan verilerden NM23 ile ilgili iki önemli özellik ortaya çıkmaktadır: 1. Melanoma, hepatosellüler karsinoma ve meme karsinoma üzerine yapılan çalışmalarda metastatik işgal ile nükleotit difosfat kinaz düzeyi arasında ters bir korelasyon görülmüştür 2. Pek çok solid tümörde normal çevre dokulara göre NM23'ün aşırı ifadesi gözlenmiştir ve nöroblastomalarda agresiflik ile ilişkili bulunmuştur. Bu bilgiler,

tümörlerde NM23 seviyesinin ve metastaz potansiyeline sahip olup olmasının kökeni dokuya bağlı olarak değiştiğini ve dokuya-özgü şekilde ifadesini değiştirerek kanser gelişimi veya agresifliğinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (94, 95). Dolayısıyla farklı tümör tiplerinde zıt veya farklı rolleri olabileceği düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda NM23 proteini WT-1781 hücrelerinde 51A-1527 hücrelerine göre 1,3 kat artmış bulunmuştur.

18 no'lu spottan tanımlanan ve PGLS geni tarafından kodlanan "6-phosphogluconolactonase (6PGL)" proteininin son yıllarda yapılan kapsamlı bir çalışmada (96) meme kanseri ve normal dokularda farklı olarak ifade edildiği gösterilmiş, meme kanserli dokularda ifadesinin normal dokulara göre daha yüksek olduğu görülen 6PGL'nin kanser biyobelirteci olma yolunda onaylanmış yeni bir aday gen olabileceği belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızda 6PGL ifadesi WT-1527 grubunda 51A-1781 grubuna göre yaklaşık 2,2 kat, WT-1781 grubunda 51A-1527 grubuna göre yaklaşık 1,8 kat 51A-1781 grubuna göre de 2,4 kat artmış bulunmuştur. Söz konusu ifade artışlarının hep WT'lerde görülmesi, Serin 51 mutan hücrelerde böyle bir farkın bulunmaması ilginçtir.

21 no'lu spottan tanımlanan "Tryptophanyl-tRNA synthetase" (TrpRS) WARS geni tarafından kodlanan ve aminoasil-tRNA sentetaz ailesine ait bir protein olup; protein sentezinde, RNA transkripsiyonu ve translasyonunun düzenlenmesinde, inflamatuvar ve anjiyogenik sinyal yollarında sitokin faaliyetlerinin düzenlenmesinde rol oynar. Yapılan bir çalışmada kolorektal kanserde (CRC) iyi prognozlu tümörlerde TrpRS ifade artışı görülürken kötü prognozlu tümörlerde ifade azalması gözlenmiş, CRC hastalarının tümör dokularında TrpRS'in düşük ifadesi nüks riskinin artması ve düşük sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur. Bu durumun, TrpRS'in anti-anjiyogenik özellikleri ile ilgili olabileceği ve TrpRS'in gelecekte CRC tedavisi için yeni ilaç geliştirilmesinde yardımcı olabilecek potansiyel bir prognostik belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (97). Ayrıca prostat kanser hücreleri ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada da prostat kanser hücrelerinde TrpRS protein ifadesi normal prostat hücrelerine göre azalmış bulunmuş, TrpRS'nin prostat kanseri prognozu için önemli olduğu ve metastaz tedavisi için yeni bir hedef olabileceği öne sürülmüştür (98).

Bizim çalışmamızda TrpRS'in tanımlandığı protein kümesinin ifadesi 51A-1781 grubunda WT-1781 grubuna göre yaklaşık 1,8 kat artmış bulunmuştur.

22 no'lu spottan tanımlanan "T-complex protein 1 subunit alpha" TCP1 geni tarafından kodlanan bir moleküler şaperon olup, aktin ve tübülün katlanmasında rol oynadığı bilinmektedir. Wu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yüksek metastazik ve düşük metastazik prostat kanser hücre hatları 2DE ve kütle spektrometresi ile analiz edilmiş, yüksek metastazik hücrelerin T-complex protein 1 subunit α protein ifadesinde düşük metastazik hücrelere göre anlamlı derecede artış gözlenmiştir (99). Başka bir çalışmada östrojen ile muamele edilmiş ve edilmemiş insan prostat kanser hücrelerinin (PC-3) iki boyutlu jel elektroforezi ile karşılaştırmalı analizleri ve kütle spektrometresi ile protein tanımlanması sonucunda T-complex protein 1 subunit α 'nın ifadesinin östrojen ile muamele edilen PC-3 hücrelerinde arttığı gözlenmiştir (100). Diğer bir çalışmada ise kolorektal kanser hastalarından alınan kolorektal tümör dokuları ile normal dokuların proteomik yöntemler ile karşılaştırmalı analizleri yapılmış, T-complex protein 1 subunit α 'nın ifadesi kanser dokularında normal dokulara göre artmış bulunmuştur. Bahsedilen çalışma ile ilk kez T-complex protein 1 subunit α 'nın kolon tümör ile normal dokular arasında farklı ifadelenmesi raporlanmıştır (101). 2015 yılında hücrede TCP1 Containing Ring Complex (TRiC) olarak bilinen bir protein şaperon kompleksinin, birisi TCP1 olmak üzere iki yeni üyesi tanımlanmış, bu iki üyenin onkogenlerle bağlantılı olduğu ve hayatta kalım için gerekli olduğu, meme kanser hücre çoğalmasını ve sağ kalımını belirlediği, bu üyelerin meme kanserinde yeni bir tedavi edici hedef oluşturduğu belirtilmiştir (102).

Bizim çalışmamızda T-complex protein 1 subunit α 'nın tanımlandığı protein kümesinin ifadesi, dördüncü grubu temsil eden 51A-1781 hücrelerinde birinci grubu temsil eden WT-1527 hücrelerine göre 1,4 kat artmış bulunmuştur.

28 no'lu spottan tanımlanan "Proteasome subunit alpha type-1" PSMA1 geni tarafından kodlanan bir protein olup, 20S proteazom kompleksinin oluşmasına katkıda bulunan 17 temel alt birimden biridir. Bilindiği üzere proteazomlar, ubiquitin-proteazom sisteminin bileşeni olmaları dışında hücresel protein kalite kontrolü için de önemli bileşenlerdir. Proteazom kompleksindeki aksaklıklar, hasarlı ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimine yol açar. Böyle bir protein birikimi, nörodejeneratif ve kardiyovasküler

hastalıkların yanı sıra pek çok kanser türünde de bildirilmiştir. Dolayısıyla bu proteinin hastalıkların patogenezi açısından önemli bir düzenleyici rolü bulunmaktadır.

Ubikitin proteazom yolağı, hücrede tümör hücre büyümesi ve hayatta kalması için de önemli olan pek çok sürecin düzenlenmesinde rol oynar. Dolayısıyla proteazom fonksiyonunun önlenmesi, anti-kanser terapiler için güçlü bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Proteazomu inhibe ederek protein yıkımının bloke edilmesinin biyolojik etkileri iyi tanımlanmış ve proteazom inhibitörleri (Bortezomib, ticari adıyla Velcade) multipl miyelom ve mantle cell lenfoma tedavileri için onaylanmıştır. Proteazomun bir terapötik hedef olarak kullanılabilirliğinin klinik doğrulamasının bortezomib ile elde edilmesi, daha gelişmiş farmakolojik özelliklere sahip proteazom inhibitörlerinin ikinci nesil gelişimini hızlandırmıştır (103, 104).

Bizim çalışmamızda bu proteinin tanımlandığı protein kümesinin ifadesi 51A-1781 grubunda WT-1781 grubuna göre yaklaşık 2 kat artmış bulunmuştur. Burada hücre kültürüne eklenen 1781 anti-kanser bileşiğin, etkisini eIF2 α fosforilasyonu üzerinden gösterdiği bilinmektedir. eIF2 α fosforilasyonu serin 51 bölgesinden olduğundan 1781, 51A grubunda eIF2 α fosforilasyonunu tetikleyemez, dolayısıyla fonksiyon görülmez. Proteasome subunit alpha type-1 proteinin tanımlandığı protein kümesinin ifadesinin 51A-1781 grubunda WT-1781 grubuna göre yaklaşık 2 kat artmış bulunması, diğer bir deyişle WT-1781 grubunda bu proteinin ifadesinin azalmış olması, eIF2 α 'in 1781 aracılığı ile fosforilasyonu sonucunda proteazom bileşeni olan bu proteinin ifadesini düşürecek olumlu bir etki gösterdiğini düşündürmektedir.

44 no'lu spottan alfa enolaz (Enolaz 1, ENO1) ve beta enolaz (ENO3) proteinleri tanımlanmıştır. Alfa enolaz, kilit bir glikolitik enzimdir ve hücrel enerji metabolizması için önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ENO1'in tümör gelişimi ve ilerlemesi sırasında kanser hücrelerinin anormal metabolizmasında rol oynadığı belirlenmiştir. Ancak, ENO1'in ifade ve salgı düzenleyici mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (105). Ayrıca tümör gelişimindeki rolü de tam olarak aydınlatılamamış, literatürde ENO1'in yüksek ifadenmesinin kansere katkısının olduğu ve düşük ifadesinin düşük sağ kalım ile ilişkili bulunduğu bilgileri ağırlıklı olmakla beraber, farklı çalışmalar ile ENO1'in taban tabana zıt rolleri bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, berrak hücreli renal hücreli

kanser (clear cell renal cell carcinoma , ccRCC) hastalarında düşük ENO1 ifadesi anlamlı derecede daha kısa sağkalım ile ilişkili bulunmuş, bu nedenle ENO1 downregülasyonunun ccRCC için kötü prognoz belirleyicisi ve potansiyel bir prognostik belirteç (marker) olabileceği belirtilmiştir (106). Küçük olmayan hücreli akciğer kanseri (non-small cell lung cancer, NSCLC) üzerine yapılan başka bir çalışmada da ENO1 downregülasyonunun yaygın olduğunu gösterilmiş, ENO1 downregülasyonunun akciğer tümörü oluşumunda önemli bir rol oynayabileceği belirtilerek düşük sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (107). Bunun aksine yine NSCLC hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada ENO1'in overekspresyonu bildirilmiştir (108). Endometrioid endometrial kanser üzerinde yapılan bir çalışmada ENO1 downregüle bulunmuş ve bu downregülasyon artmış proliferasyon ve yayılma ile ilişkilendirilmiştir (109) . Öte yandan glioma, akciğer, prostat, baş, boyun, prostat ve meme kanserinin büyümesi ve yayılmasında ENO1 aşırı ifadesinin etkili olduğunu, ENO1 ifadesi knock-down edildiğinde hücre büyümesi, göçü ve yayılmasının önlendiğini gösteren pek çok çalışma da mevcuttur (105, 110, 111). ENO1 karaciğer, beyin, böbrek, dalak ve diğer pek çok dokuda ifade edilir. ENO1'in anaerobik glikolize (Warburg etkisi) katılarak ve ATP sağlayarak, tümör gelişimini ve ilerlemesini teşvik ettiği düşünülmektedir (105). Farklı çalışmalar arasında görülen bütün bu farklılıklar, ENO1'in çok yönlü glikolitik bir enzim olmasından ve karmaşık yapısından, ayrıca kanser doku spesifitesi ve ifade paternleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Farklı kanser türlerinde ENO1'in tam işlevini açıklığa kavuşturmak için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır (110).

Bizim çalışmamızda ENO1 ve ENO3 proteinlerinin tanımlandığı protein kümesinin ifadesi, ikinci grubu temsil eden WT-1781 hücrelerinde üçüncü grubu temsil eden 51A-1527 hücrelerine göre artmış bulunmuştur.

46 no'lu spottan tanımlanan "Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PD)", temel görevi organizmaya nikotin adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve riboz fosfatları sağlamak olan pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve hız sınırlayan enzimidir. Metabolik yolları yeniden programlama, kanser hücrelerindeki patolojik değişikliklerin bir özelliğidir. Glikoliz, lipogenez ve nükleotit sentezi gibi önemli metabolik yolları kontrol eden bazı genlerin ekspresyonu, tümör hücrelerinin adaptasyonuna ve ilerleyerek daha agresif hale gelmelerine yol açacak şekilde düzensiz hale gelmiştir (112). Pek çok kanser türü ve tümör

hücre kültürlerinin yüksek G6PD aktivitesi göstermesi, G6PD aktivitesinin hücre büyümesinde ve çoğalmasında önemli olduğunu göstermiştir (113). Yapılan çalışmalarda, mide kanseri, karaciğer kanseri, rahim kanseri gibi pek çok kanser türünde aşırı G6PD ifadesinin kanser ilerlemesi ile yakından ilişkili olduğu ve kötü prognozun bir belirleyicisi olarak kabul edilebileceği belirtilmiş (114-116), pentoz fosfat yolunu kontrol etmenin yanında nükleotit ve lipid biyosentezinde de görev alan G6PD'in apoptoz ve anjiyogeneze de dahil olduğu son yıllarda belirlenmiş ve anti-kanser terapiler için faydalı olabileceği ortaya konmuştur (112). Dolayısıyla tıpkı anjiyogenez ve UPR inhibitörleri gibi, G6PD inhibitörleri de kanser tedavisi için bir araştırma konusu haline gelmiştir (117). Mevcut veriler G6PD'in kanser hücrelerinin yaşamlarını sürdürme, çoğalma ve yayılmasında önemli rol oynadığını göstermektedir ve güçlü ve seçici G6PD inhibitörlerinin geliştirilmesinin kanser tedavisi için yeni fırsatlar sağlayabileceği düşünülmektedir (112).

Bizim çalışmamızda dördüncü grubu temsil eden 51A-1781, birinci grubu temsil eden WT-1527'ye göre 2,4 kat, ikinci grubu temsil eden WT-1781'e göre de yaklaşık 1,6 kat artmış bulunmuştur.

52 no'lu spottan beta aktin (ACTB), gama aktin (ACTG1), alfa-kardiyak aktin (ACTC1) ve alfa aktin (ACTA1) tanımlanmıştır. Ökaryotik hücrelerde en yaygın bulunan ve türler arasında evrimsel olarak en iyi korunmuş proteinlerden biri olan aktin, hücreye mekanik destek sağlar, hücrenin şeklini belirler ve hücrenin hareket etmesine olanak sağlar. Tümör metastazı sırasında en önemli adımlardan biri, aktin hücre iskeletinin yeniden yapılanmasını gerektiren tümör hücre göçü ve istilasıdır (118).

Bir endojen housekeeping gen olarak kabul edilen beta aktin (ACTB), tümörlerde ifade seviyelerinin miktar tespiti amacıyla referans gen/protein olarak sıkça kullanılmıştır. Oysa ACTB çeşitli kanser türleri ile yakından ilişkilidir ve karaciğer, böbrek, kalın bağırsak, mide, pankreas, yemek borusu, akciğer, meme, prostat ve yumurtalık kanserlerinde, melanom, lösemi ve lenfomada ACTB'nin düzensizleştiğine dair artan kanıtlar mevcuttur. ACTB ifadesi pek çok tümör hücre ve dokularında artmış bulunmuştur ve ACTB'nin anormal ifadesi ve polimerizasyonu sonucunda oluşan hücre iskeleti değişikliklerinin kanser saldırganlığı ve metastazı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (119, 120).

Bizim çalışmamızda bu protein kümesinden tanımlanan tüm aktin tipleri, dördüncü grubu temsil eden 51A-1781'de birinci grubu temsil eden WT-1527 ve üçüncü grubu temsil eden 51A-1527'ye göre 1,1 kat artmış bulunmuştur.

6.2. SONUÇ

Kanser tüm dünyada en önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Bu nedenle kansere karşı ilaç keşfi ve geliştirilmesi günümüzde peşine düşülen en önemli hedefler arasındadır. Anti-kanser ilaçların çoğu proteinleri hedeflemesine rağmen, ilaç hedeflerinin tanımlanması, doğrulanması ve bunların düzenlediği yolların tespiti ilaç Ar-Ge süreçlerini darboğaza sokmaktadır. Neyse ki, gelişen teknolojiyle beraber proteomik stratejiler ve proteom çapında ilaç-protein etkileşimleri büyük ölçekli tanımlamalar için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmış ve kanserlere karşı ilaçların etkileri altında yatan karmaşık mekanizmaların aydınlatılmasında büyük umut vadetmiştir (121).

Gen ifadesinin translasyon seviyesinde düzenlenmesi, hala tam olarak anlaşılammış önemli bir kontrol mekanizmasıdır. Bununla birlikte translasyon düzenlenmesinin hücreye ortamdaki hızlı değişimlere yanıt vermek için gerekli esnekliği sağladığı ile ilgili kanıtlar giderek çoğalmaktadır. Hücrelerin karşılaştırmalı genomik ve proteomik profillemesininin kullanıldığı pek çok yeni çalışmayla, çok sayıda genin mRNA ve protein düzeyleri arasında korelasyon eksikliği olduğu belgelenmiştir. Bu da transkripsiyon sonrası kontrolün gen ifadesinin düzenlenmesindeki önemini göstermektedir (56). Düzenlenmelerin çoğu translasyon başlama aşamasında olduğundan, bu sürecin moleküler temeli üzerine yoğun çalışmalar yapılarak her potansiyel kontrol noktasının moleküler ayrıntılarını aydınlatmak amaçlanmaktadır (122). Translasyon, genetik bilgi akışının son adımıdır ve translasyon seviyesinde düzenlenme fizyolojik değişikliklere karşı ani ve hızlı bir yanıtı izin verir. Bu tip düzenlenmelerin önemi, özellikle ER stres ve apoptoz gibi protein seviyesinin hızlıca değişmesini gerektiren durumlarda artmaktadır. Strese yanıt olarak gerçekleşen translasyonel kontrole verilebilecek en önemli örneklerden biri, şüphesiz, eIF2 α fosforilasyonudur (56). eIF2 α 'nın fosforilasyonu ile eIF2-GTP-tRNA^{iMet} üçlü translasyon başlama kompleksi oluşumu azaltılarak global protein sentezi durdurulur. Ökaryotik translasyonel kontrol mekanizmasının temel elemanı olan eIF2-GTP-tRNA^{iMet} üçlü translasyon başlama kompleksi, normal fizyoloji için kritik rol oynar ve başta kanser olmak üzere pek çok hastalık patogeneğinde etkilidir. Bu nedenle bu

kompleksin miktarını değiştirecek kimyasal düzenleyiciler insan hastalık patobiyolojilerindeki rolünün çalışılması ve bu kompleksin farmakolojik tedavi edici amaçlar için hedeflenebilir olup olmadığının belirlenmesi için çok değerli araçlardır (18). l kompleks miktarını değiştirecek kimyasallar kadar, bu kimyasalların hangi proteinleri ve yolları etkilediği de önemli bir sorudur. Bilhassa hücre içi ortamlarda, genlerden ziyade proteinler önemli düzenleyiciler olduğundan, proteinlerin incelenmesi, uygulanan ilacın mekanizmasını aydınlatmak için için iyi bir yoldur. Söz konusu mekanizma genellikle tek bir proteinin değil, birden fazla proteinin ifade değişikliklerini içerdiğinden, protein ifade değişikliklerinin global analizi ilacın etki mekanizmasını anlamak için değerli bilgiler sağlayabilir (62). Bu tez çalışmasında, yüzlerce proteinin ifadesindeki değişimlerin aynı anda analiz edilebildiği karřılařtırılmalđ 2DE teknolojisi kullanılmıştır. Böylece, daha önce Harvard Tıp Fakültesi'nde NIH projesi kapsamında genom ve transkriptom ebadında gerçekleştirilerek verileri yayınlanan (18) alışmaların bu tez ile gerçekleştirilen proteom çalışmalarıyla desteklenmesi ile günümüzde “omik teknolojiler” olarak adlandırılan, ve aslında birbirinin devamđ ve tamamlayıcısı olan çalışmalar gerçekleştirilerek l kompleks oluşumu ve bu oluşumda görevli olan tüm faktörlere etkili olabilecek yeni ilaç etken maddelerinin etkilerinin global olarak araştırılması sağlanmıştır. Bu tez çalışması ile elde edilen veriler, gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalara da zemin hazırlamıştır. Özellikle genom ve transkriptom ebadında yapılan önceki çalışmaların ıktıları ile bu tez ile elde edilen proteomik çalışmaların ıktıları çakıştırıldığında, iki veri setinin de proteazom yolağında görevli ortak genler içerdiği belirlenmiş ve umut vadeden bu potansiyel biyobelirteç adayları gelecekte bu genler için yapılacak daha ileri analizlerle doğrulanma amacđ ile seçilmiştir. Bu alışmalar sonucunda belki de UPR yolağında görev alan, ancak henüz bu yolakta görev aldığı bilinmeyen yeni bir bileşenin keşfi söz konusu olabilecektir. Ayrıca, gelecekte bu tez çalışmasında kullanılan anti-kanser bileşiğe ek olarak, yine anti-kanser özellik gösterdiği belirlenen ve Harvard Tıp Fakültesi Kimyasal Kütüphanesi'nden seçilen diarilüre bileşiiklerin farklı kanser hücre hatlarına uygulanması ve proteomik analizlerinin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1 Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation research*. 2005 Jan 6;**569**(1-2):29-63.
- 2 Demiralp DÖ, İgci N, Peker S, Ayhan B. *Temel Proteomik Stratejileri 1st Edition ed: Ankara Üniversitesi Yayınevi (Ankara University Press); 2014.*
- 3 Pahl HL, Baeuerle PA. The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem Sci*. 1997 Feb;**22**(2):63-7.
- 4 Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002 Jun;**3**(6):411-21.
- 5 Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J*. 2005 Oct 5;**24**(19):3470-81.
- 6 Xu J, Wang G, Wang Y, et al. Diabetes- and angiotensin II-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death: metallothionein protection. *J Cell Mol Med*. 2009 Aug;**13**(8A):1499-512.
- 7 Verfaillie T, Salazar M, Velasco G, Agostinis P. Linking ER Stress to Autophagy: Potential Implications for Cancer Therapy. *International journal of cell biology*. 2010;**2010**:930509.
- 8 Ip SW, Wu SY, Yu CC, et al. Induction of apoptotic death by curcumin in human tongue squamous cell carcinoma SCC-4 cells is mediated through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways. *Cell Biochem Funct*. 2011 Dec;**29**(8):641-50.
- 9 Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine*. 2012 Jan;**18**(1):59-68.
- 10 Chen JY, Tang YA, Li WS, Chiou YC, Shieh JM, Wang YC. A synthetic podophyllotoxin derivative exerts anti-cancer effects by inducing mitotic arrest and pro-apoptotic ER stress in lung cancer preclinical models. *PloS one*. 2013;**8**(4):e62082.
- 11 Iwawaki T, Oikawa D. The role of the unfolded protein response in diabetes mellitus. *Seminars in immunopathology*. 2013 May;**35**(3):333-50.
- 12 Torres M, Matamala JM, Duran-Aniotz C, Cornejo VH, Foley A, Hetz C. ER stress signaling and neurodegeneration: At the intersection between Alzheimer's disease and Prion-related disorders. *Virus research*. 2014 Dec 31.
- 13 Mollereau B, Manie S, Napoletano F. Getting the better of ER stress. *Journal of cell communication and signaling*. 2014 Dec;**8**(4):311-21.
- 14 Seydel GŞ, Aksoy K. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi (Archives Medical Review Journal)*. 2012;**21**(4):221-35.

- 15 Li X, Zhang K, Li Z. Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *Journal of hematology & oncology*. 2011;**4**:8.
- 16 Shin BS, Kim JR, Walker SE, Dong J, Lorsch JR, Dever TE. Initiation factor eIF2gamma promotes eIF2-GTP-Met-tRNAⁱ(Met) ternary complex binding to the 40S ribosome. *Nature structural & molecular biology*. 2011 Nov;**18**(11):1227-34.
- 17 Denoyelle S, Chen T, Yang H, et al. Synthesis and SAR study of novel 3,3-diphenyl-1,3-dihydroindol-2-one derivatives as potent eIF2.GTP.Met-tRNAⁱMet ternary complex inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*. 2013 Nov;**69**:537-53.
- 18 Chen T, Ozel D, Qiao Y, et al. Chemical genetics identify eIF2alpha kinase heme-regulated inhibitor as an anticancer target. *Nature chemical biology*. 2011 Sep;**7**(9):610-6.
- 19 <https://en.wikipedia.org/>. 2015 [cited; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/High-throughput_screening
- 20 Bravo R, Parra V, Gatica D, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *International review of cell and molecular biology*. 2013;**301**:215-90.
- 21 Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry*. 2005;**74**:739-89.
- 22 Frickel EM, Riek R, Jelesarov I, Helenius A, Wüthrich K, Ellgaard L. TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Feb 19;**99**(4):1954-9.
- 23 Ruoppolo M, Orru S, Talamo F, et al. Mutations in domain a' of protein disulfide isomerase affect the folding pathway of bovine pancreatic ribonuclease A. *Protein Sci*. 2003 May;**12**(5):939-52.
- 24 Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*. 2013 Feb 14;**32**(7):805-18.
- 25 Daneshmand S, Quek ML, Lin E, et al. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival. *Human pathology*. 2007 Oct;**38**(10):1547-52.
- 26 Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*. 2009 Aug;**14**(8):996-1007.
- 27 Wang M, Ye R, Barron E, et al. Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2010 Mar;**17**(3):488-98.

- 28 E. Duffee L, L. Boatwright J, H. Pacha F, M. Shockley J, M. Pajerowska-Mukhtar K, Shahid Mukhtar M. Eukaryotic Endoplasmic Reticulum Stress-Sensing Mechanisms. *Advances in Life Sciences*. 2013;**2**(6):148-55.
- 29 Karam R, Lou CH, Kroeger H, Huang L, Lin JH, Wilkinson MF. The unfolded protein response is shaped by the NMD pathway. *EMBO reports*. 2015 Mar 25.
- 30 Cojocari D, Vellanki RN, Sit B, Uehling D, Koritzinsky M, Wouters BG. New small molecule inhibitors of UPR activation demonstrate that PERK, but not IRE1alpha signaling is essential for promoting adaptation and survival to hypoxia. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2013 Sep;**108**(3):541-7.
- 31 Haze K, Okada T, Yoshida H, et al. Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J*. 2001 Apr 1;**355**(Pt 1):19-28.
- 32 Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Nov;**110**(10):1389-98.
- 33 Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends in Cell Biology*. 2004;**14**(1):20-8.
- 34 Aktas BH, Qiao Y, Ozdelen E, et al. Small-Molecule targeting of translation initiation for cancer therapy. *Oncotarget*. 2013 Oct;**4**(10):1606-17.
- 35 Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000 May;**5**(5):897-904.
- 36 Harding HP, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes*. 2002 Dec;**51 Suppl 3**:S455-61.
- 37 Klann E, Dever TE. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Dec;**5**(12):931-42.
- 38 Nagelkerke A, Bussink J, Sweep FC, Span PN. The unfolded protein response as a target for cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2014 Dec;**1846**(2):277-84.
- 39 Vincenz L, Jager R, O'Dwyer M, Samali A. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response: targeting the Achilles heel of multiple myeloma. *Molecular cancer therapeutics*. 2013 Jun;**12**(6):831-43.
- 40 Blais JD, Addison CL, Edge R, et al. Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. *Mol Cell Biol*. 2006 Dec;**26**(24):9517-32.
- 41 Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002 Feb;**3**(2):112-21.

- 42 Matsumura K, Sakai C, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Inhibition of cancer cell growth by GRP78 siRNA lipoplex via activation of unfolded protein response. *Biol Pharm Bull.* 2014;**37**(4):648-53.
- 43 Kosova F, Arı Z. Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations.* 2011; **2**(1):124-31.
- 44 Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. 2003.
- 45 Clarke HJ, Chambers JE, Liniker E, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer cell.* 2014 May 12;**25**(5):563-73.
- 46 Yadav RK, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and cancer. *Journal of cancer prevention.* 2014 Jun;**19**(2):75-88.
- 47 Wang M, Kaufman RJ. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2014 Sep;**14**(9):581-97.
- 48 Maly DJ, Papa FR. Druggable sensors of the unfolded protein response. *Nature chemical biology.* 2014 Nov;**10**(11):892-901.
- 49 Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annual review of pathology.* 2015;**10**:173-94.
- 50 Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer research.* 1999 Jun 1;**59**(11):2615-22.
- 51 Van Drie JH. Protein folding, protein homeostasis, and cancer. *Chin J Cancer.* 2011 Feb;**30**(2):124-37.
- 52 Alessandro R, Fontana S, Kohn E, De Leo G. Proteomic strategies and their application in cancer research. *Tumori.* 2005 Nov-Dec;**91**(6):447-55.
- 53 Yeat NC, Lin C, Sager M, Lin J. Cancer proteomics: developments in technology, clinical use and commercialization. *Expert Rev Proteomics.* 2015 Jul 4:1-15.
- 54 Mori-Iwamoto S, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, et al. Proteomics finding heat shock protein 27 as a biomarker for resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *International journal of oncology.* 2007 Dec;**31**(6):1345-50.
- 55 Alkatout I, Friemel J, Sitek B, et al. Novel prognostic markers revealed by a proteomic approach separating benign from malignant insulinomas. *Mod Pathol.* 2015 Jan;**28**(1):69-79.
- 56 Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2005 Apr;**6**(4):318-27.
- 57 Goo YA, Goodlett DR. Advances in proteomic prostate cancer biomarker discovery. *J Proteomics.* 2010 Sep 10;**73**(10):1839-50.

- 58 Koomen JM, Haura EB, Bepler G, et al. Proteomic contributions to personalized cancer care. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Oct;**7**(10):1780-94.
- 59 Institute NNC. [cited; Available from: <http://www.cancer.gov>
- 60 Peker S, Ozel Demiralp D, Aktas B. Proteomic Approach to Understanding the Mechanism of Action of New Pharmaceutical Molecules That Impinge on the Eukaryotic Translational Control. *The FASEB Journal*. 2015 April 1, 2015;**29**(1 Supplement).
- 61 Reymond MA, Schlegel W. Proteomics in cancer. *Adv Clin Chem*. 2007;**44**:103-42.
- 62 Pang CY, Chiu SC, Harn HJ, Zhai WJ, Lin SZ, Yang HH. Proteomic-based identification of multiple pathways underlying n-butylidenephthalide-induced apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2013 Sep;**59**:281-8.
- 63 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;**72**:248-54.
- 64 Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;**43**(Database issue):D447-52.
- 65 Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000 May;**25**(1):25-9.
- 66 Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;**41**(Database issue):D377-86.
- 67 Consortium GO. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;**43**(Database issue):D1049-56.
- 68 Meric F, Hunt KK. Translation initiation in cancer: a novel target for therapy. *Molecular cancer therapeutics*. 2002 Sep;**1**(11):971-9.
- 69 Gündeşli H, Diñer P. Endoplazmik retikulum stresinin moleküler mekanizması ve kas patolojisi arasındaki ilişki. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2008;**39**:109-14.
- 70 Fels DR, Koumenis C. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer biology & therapy*. 2006 Jul;**5**(7):723-8.
- 71 Wang G, Yang ZQ, Zhang K. Endoplasmic reticulum stress response in cancer: molecular mechanism and therapeutic potential. *Am J Transl Res*. 2010;**2**(1):65-74.
- 72 Backer MV, Backer JM, Chinnaiyan P. Targeting the unfolded protein response in cancer therapy. *Methods in enzymology*. 2011;**491**:37-56.

- 73 Bhavya BC, Indira D, Seervi M, et al. Endoplasmic reticulum-targeted Bcl-2 inhibitable mitochondrial fragmentation initiates ER stress-induced cell death. *Adv Exp Med Biol.* 2012;**749**:83-95.
- 74 Fu P, Chen J, Tian Y, Watkins T, Cui X, Zhao B. Anti-tumor effect of hematopoietic cells carrying the gene of ribonuclease inhibitor. *Cancer Gene Ther.* 2005 Mar;**12**(3):268-75.
- 75 Li S, Hu GF. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *J Cell Physiol.* 2012 Jul;**227**(7):2822-6.
- 76 Pizzo E, Sarcinelli C, Sheng J, et al. Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival. *J Cell Sci.* 2013 Sep 15;**126**(Pt 18):4308-19.
- 77 Chen J, Ou-Yang X, Gao J, Zhu J, He X, Rong J. Knockdown of ribonuclease inhibitor expression with siRNA in non-invasive bladder cancer cell line BIU-87 promotes growth and metastasis potentials. *Mol Cell Biochem.* 2011 Mar;**349**(1-2):83-95.
- 78 Pan X, Xiong D, Yao X, Xin Y, Zhang L, Chen J. Up-regulating ribonuclease inhibitor inhibited epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in murine melanoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Jun;**44**(6):998-1008.
- 79 Xiong D, Liou Y, Shu J, Li D, Zhang L, Chen J. Down-regulating ribonuclease inhibitor enhances metastasis of bladder cancer cells through regulating epithelial-mesenchymal transition and ILK signaling pathway. *Exp Mol Pathol.* 2014 Jun;**96**(3):411-21.
- 80 Knoblach B, Keller BO, Groenendyk J, et al. ERp19 and ERp46, new members of the thioredoxin family of endoplasmic reticulum proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2003 Oct;**2**(10):1104-19.
- 81 Alberti A, Karamessinis P, Peroulis M, et al. ERp46 is reduced by high glucose and regulates insulin content in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Sep;**297**(3):E812-21.
- 82 Chang X, Xu B, Wang L, Wang Y, Wang Y, Yan S. Investigating a pathogenic role for TXNDC5 in tumors. *International journal of oncology.* 2013 Dec;**43**(6):1871-84.
- 83 Duivenvoorden WC, Paschos A, Hopmans SN, Austin RC, Pinthus JH. Endoplasmic reticulum protein ERp46 in renal cell carcinoma. *PLoS one.* 2014;**9**(3):e90389.
- 84 Wang Y, Ma Y, Lu B, Xu E, Huang Q, Lai M. Differential expression of mimecan and thioredoxin domain-containing protein 5 in colorectal adenoma and cancer: a proteomic study. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007 Oct;**232**(9):1152-9.
- 85 Wang L, Song G, Chang X, et al. The role of TXNDC5 in castration-resistant prostate cancer-involvement of androgen receptor signaling pathway. *Oncogene.* 2014 Dec 15.

- 86 Jones S, Wang TL, Shih Ie M, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science*. 2010 Oct 8;**330**(6001):228-31.
- 87 Nagendra DC, Burke J, 3rd, Maxwell GL, Risinger JI. PPP2R1A mutations are common in the serous type of endometrial cancer. *Mol Carcinog*. 2012 Oct;**51**(10):826-31.
- 88 Kudo M, Sugasawa K, Hori T, Enomoto T, Hanaoka F, Ui M. Human ubiquitin-activating enzyme (E1): compensation for heat-labile mouse E1 and its gene localization on the X chromosome. *Experimental cell research*. 1991 Jan;**192**(1):110-7.
- 89 Hershko A, Ciechanover A. Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Annual review of biochemistry*. 1982;**51**:335-64.
- 90 Leidecker O, Matic I, Mahata B, Pion E, Xirodimas DP. The ubiquitin E1 enzyme Ube1 mediates NEDD8 activation under diverse stress conditions. *Cell cycle*. 2012 Mar 15;**11**(6):1142-50.
- 91 Ungermannova D, Parker SJ, Nasveschuk CG, et al. Largazole and its derivatives selectively inhibit ubiquitin activating enzyme (e1). *PloS one*. 2012;**7**(1):e29208.
- 92 Correale S, de Paola I, Morgillo CM, et al. Structural model of the hUbA1-UbcH10 quaternary complex: in silico and experimental analysis of the protein-protein interactions between E1, E2 and ubiquitin. *PloS one*. 2014;**9**(11):e112082.
- 93 Prabhu VV, Siddikuzzaman, Grace VM, Guruvayoorappan C. Targeting tumor metastasis by regulating Nm23 gene expression. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;**13**(8):3539-48.
- 94 Lacombe ML. Nucleoside diphosphate kinase/Nm23 and metastatic potency. *Bull Cancer*. 1993 Aug;**80**(8):717-22.
- 95 Hartsough MT, Steeg PS. Nm23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers. *J Bioenerg Biomembr*. 2000 Jun;**32**(3):301-8.
- 96 Ou K, Yu K, Kesuma D, et al. Novel breast cancer biomarkers identified by integrative proteomic and gene expression mapping. *J Proteome Res*. 2008 Apr;**7**(4):1518-28.
- 97 Ghanipour A, Jirstrom K, Ponten F, Glimelius B, Pahlman L, Birgisson H. The prognostic significance of tryptophanyl-tRNA synthetase in colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009 Nov;**18**(11):2949-56.
- 98 Nagano K, Masters JR, Akpan A, et al. Differential protein synthesis and expression levels in normal and neoplastic human prostate cells and their regulation by type I and II interferons. *Oncogene*. 2004 Mar 4;**23**(9):1693-703.
- 99 Wu M, Bai X, Xu G, et al. Proteome analysis of human androgen-independent prostate cancer cell lines: variable metastatic potentials correlated with vimentin expression. *Proteomics*. 2007 Jun;**7**(12):1973-83.

- 100 Chen J, Huang P, Kaku H, et al. A comparison of proteomic profiles changes during 17beta-estradiol treatment in human prostate cancer PC-3 cell line. *Cancer Genomics Proteomics*. 2009 Nov-Dec;**6**(6):331-5.
- 101 Hamelin C, Cornut E, Poirier F, et al. Identification and verification of heat shock protein 60 as a potential serum marker for colorectal cancer. *FEBS J*. 2011 Dec;**278**(24):4845-59.
- 102 Guest ST, Kratche ZR, Bollig-Fischer A, Haddad R, Ethier SP. Two members of the TRiC chaperonin complex, CCT2 and TCP1 are essential for survival of breast cancer cells and are linked to driving oncogenes. *Experimental cell research*. 2015 Mar 15;**332**(2):223-35.
- 103 Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Journal of cell communication and signaling*. 2011;**5**(2):101-10.
- 104 Xu W, Lukkarila JL, da Silva SR, Paiva SL, Gunning PT, Schimmer AD. Targeting the ubiquitin E1 as a novel anti-cancer strategy. *Curr Pharm Des*. 2013;**19**(18):3201-9.
- 105 Yu L, Shi J, Cheng S, et al. Estrogen promotes prostate cancer cell migration via paracrine release of ENO1 from stromal cells. *Mol Endocrinol*. 2012 Sep;**26**(9):1521-30.
- 106 White-Al Habeeb NM, Di Meo A, Scorilas A, et al. Alpha-enolase is a potential prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2015 Jun 3.
- 107 Chang YS, Wu W, Walsh G, Hong WK, Mao L. Enolase-alpha is frequently down-regulated in non-small cell lung cancer and predicts aggressive biological behavior. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003 Sep 1;**9**(10 Pt 1):3641-4.
- 108 Huang LJ, Chen SX, Luo WJ, Jiang HH, Zhang PF, Yi H. Proteomic analysis of secreted proteins of non-small cell lung cancer. *Ai Zheng*. 2006 Nov;**25**(11):1361-7.
- 109 Lomnytska MI, Becker S, Gemoll T, et al. Impact of genomic stability on protein expression in endometrioid endometrial cancer. *Br J Cancer*. 2012 Mar 27;**106**(7):1297-305.
- 110 Tsai ST, Chien IH, Shen WH, et al. ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction. *Eur J Cancer*. 2010 Jun;**46**(9):1712-23.
- 111 Altenberg B, Greulich KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*. 2004 Dec;**84**(6):1014-20.
- 112 Zhang C, Zhang Z, Zhu Y, Qin S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a biomarker and potential therapeutic target for cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014 Feb;**14**(2):280-9.

- 113 Tian WN, Braunstein LD, Pang J, et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Apr 24;**273**(17):10609-17.
- 114 Hu T, Li YS, Chen B, et al. Elevated glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in the cervical cancer cases is associated with the cancerigenic event of high-risk human papillomaviruses. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015 Oct;**240**(10):1287-97.
- 115 Hu H, Ding X, Yang Y, et al. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase expression results in altered behavior of HBV-associated liver cancer cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2014 Sep 15;**307**(6):G611-22.
- 116 Wang J, Yuan W, Chen Z, et al. Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer. *Tumor Biol*. 2012 2012/02/01;**33**(1):95-101.
- 117 Lartigue Jd. *Cancer Research Moves Beyond the Original Hallmarks of Cancer*. Onclive. 2012.
- 118 Huang FK, Han S, Xing B, et al. Targeted inhibition of fascin function blocks tumour invasion and metastatic colonization. *Nat Commun*. 2015;**6**:7465.
- 119 Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis*. 2009;**26**(4):273-87.
- 120 Guo C, Liu S, Wang J, Sun MZ, Greenaway FT. ACTB in cancer. *Clin Chim Acta*. 2013 Feb 18;**417**:39-44.
- 121 Liu Y, Guo M. Chemical proteomic strategies for the discovery and development of anticancer drugs. *Proteomics*. 2014;**14**(4-5):399-411.
- 122 Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*. 2009 2/20/;**136**(4):731-45.

EKLER

EK-1. Kullanılan Sarf ve Kimyasalların Listesi

Kimyasalın adı	Markası	Katalog No
Agar	Amresco	J234-256
Akrilamit/Bisakrilamit (%40)	Thermo Fisher Scientific	83380
Amfolit	Bio-Rad	163-1113
Amonyum persülfat	Applichem	A2941,0500
Amonyum bikarbonat	Thermo Fisher Scientific	BP2413-500
Asetik asit	Sigma-Aldrich	27225
Asetonitril	Merck	1424030814
Bradford boyası	Bio-Rad	5000205
Bromofenol mavisi	Bio-Rad	161-0406
BSA	Pierce	23209
CHAPS	AppliChem	A1099,0005
CHCA	Sigma	C8982
DTT	Bio-Rad	210005866
Etanol	Merck	1.00986.2500
Formik asit	Fluka	56302
Gliserol	Thermo Fisher Scientific	17904

Glisin	Bio-Rad	161-0718
Hidroklorik asit	Riedel-de-Haën	07102
İyodoasetamit	Molekula	M15172327
Metanol	Merck	1.06009.2511
Mineral yağı	Thermo Fisher Scientific	BP2629-1
Protein marker	New England BioLabs	P7703S
Sodyum dodesil sülfat	Bio-Rad	161-0302
Oriole protein boyası	Bio-Rad	161-0497
TEMED	Sigma	T7024-25ML
Tiyoüre	Applichem	A3568,0500
Trifloro asetik asit	Sigma	T6508
Tripsin	Promega	V542A
Trizma-Base	Sigma	10708976001
Üre	Bio-Rad	161-0731

EK-2. Kullanılan Makine-Teçhizat ve Programların Listesi

Cihazın adı/modeli	Markası	Kullanım amacı
Protean IEF Cell	Bio-Rad	2 boyutlu jel elektroforezinde birinci boyutu oluşturan izoelektrik odaklama işlemi için
Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad	İki boyutlu jel elektroforezinde 2. boyutu oluşturan moleküler ağırlığa göre ayırımın gerçekleştirilmesi için
Elektroforez güç kaynağı (PowerPac 1000)	Bio-Rad	Elektroforetik sistemlerde güç kaynağı olarak
MALDI-TOF kütle spektrometresi (Micromass M@LDI)	Waters	2 Boyutlu jel elektroforezi sonrası elde edilecek protein kümelerinin jelden kesilip tripsine edildikten sonra protein tanımlaması yapmak amacıyla m/z değerlerini elde etmek
Mikroplaka okuyucu (Victor 3)	Perkin Elmer	Protein miktar tayini için
VersaDoc jel görüntüleme sistemi	Bio-Rad	Jellerin görüntülenmesi ve fotoğraflarının çekilmesi için
Proteome Works Spot Cutter	Bio-Rad	Kütle spektrometresi analizleri için jellerden ilgililenen bölgeleri kesmek için
Hassas tartı	Schimadzu	Örnek ve kimyasal hazırlanmasında
-30 C derin dondurucu	Sanyo	Deneylerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit ve örneklerin saklanması için
-80 C derin dondurucu	Sanyo	Deneylerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit, IPG şerit ve örneklerin saklanması için
+4 C buzdolabı	Sanyo	Deneylerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit ve örneklerin saklanması için
Otomatik pipet seti	Gilson	Örnek hazırlanması ve reaksiyonların kurulmasında gerekli olan pipetlemelerin yapılması için
Otomatik elektronik çok kanallı pipet seti	Gilson	Tripsinizasyon işleminde
Saf su sistemi	Millipore	Moleküler analizlerde kullanılan solüsyonları

		hazırlamak üzere kullanılacak ultra saf suyun elde edilmesi için
Manyetik karıştırıcı	Cimarec	Deneylerde kullanılacak tamponların ve çeşitli çözeltilerin hazırlanmasında
Ultrasonik su banyosu	Elma	MALDI-TOF plakalarının yıkanmasında, MALDI-TOF ölçümleri için matriks hazırlanmasında ve analizlerde kullanılacak bazı solüsyonların hazırlanmasında
Çalkalayıcı	Finepcr	IPG şeritlerin dengeleme tamponu ile muamelesinde, jellerin fiksasyonu ve boyanması aşamasında
PDQuest 8.0.1	Bio-Rad	Jel fotoğraflarının çekimi ve ifade analizlerinin yapılmasında
MassLynx 4.0	Waters	MALDI-TOF kütle spektrumlarının elde edilmesi ve analizinde

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Selen PEKER

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 21.12.1980

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce (İleri seviye)

Fransızca (Orta seviye)

Eğitim Durumu

- 2009-2011 Ankara Üniversitesi – Temel Biyoteknoloji, Tezli Yüksek Lisans
- 2005-2007 Gazi Üniversitesi - Biyoloji Öğretmenliği, Tezsiz Yüksek Lisans
- 1999-2004 Ankara Üniversitesi- Biyoloji, Lisans

İş Tecrübesi

Kurumu: Ankara Üniversitesi BAP 13L4143002

Ökaryotik translasyonel kontrol mekanizmasının oluşumunda görevli EIFII alfa fosforilasyonunu etkileyen yeni ilaç etken maddelerinin proteom ve metabolom ebadında araştırılması.

Görevi: Yardımcı Yürütücü

Yılları: 2013-2015

Kurumu: TUBİTAK 113Z124

Amfibi ve Memeli Örneklerinde Çeşitli Siyatik Sinir Hasarları Sonrası Rejenerasyonda Protein Cevapları ve Davranışsal, Elektrofizyolojik İncelemeler

Görevi: Proje Bursiyeri

Yılları: 2015-2016

Kurumu: Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi & Brigham Kadın Hastanesi

Görevi: Kısa dönem araştırmacı

Yılları: 2014

Kurumu: TUBİTAK 111T338

Türkiye'de Yayılış Gösteren Bazı Engerek Zehirlerinin Protein Özellikleri ve Sitotoksiteleri ile Koagülasyona Etkilerinin Araştırılması ve Biyoteknolojik Potansiyellerinin Değerlendirilmesi

Görevi: Proje Bursiyeri

Yılları: 2011-2013

Kurumu: TUBİTAK 209T146

Meme Kanserli Olguların Proteomik Yöntemler ile Protein Profillerinin Değerlendirilmesi

Görevi: Tam Zamanlı Proje Bursiyeri

Yılları: 2010-2011

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Aktas BH, Bordelois P, **Peker S**, Merajver S, Halperin JA. Depletion of eIF2·GTP·Met-tRNA_i translation initiation complex up-regulates BRCA1 expression in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2015 Mar 30;6(9):6902-14.

Doktora Öncesi Yayınlar

Altinkaynak C, **Peker S**, Ozdemir N, Yildiz O. G, Ozel Demiralp, D. (2016). Comparison of Serum Protein Profiles by Mass Spectrometry-Based Analysis in Breast Cancer. *Accounts of Biotechnology Research*. Volume 3, Issue 2, Pages 047-056

Altuntaş EG, Ayhan K, **Peker S**, Ayhan B, Demiralp DO. (2014). Purification and mass spectrometry based characterization of a pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* 13. *Mol Biol Rep*. Oct;41(10):6879-85. doi: 10.1007/s11033-014-3573-z. Epub 2014 Jul 12.

Demiralp DO, **Peker S**, Turgut B, Akar N. (2012). Comprehensive identification of erythrocyte membrane protein deficiency by 2D gel electrophoresis based proteomic analysis in hereditary elliptocytosis and spherocytosis. *Proteomics Clin Appl*. 6(7-8):403-11. doi: 10.1002/prca.201200010

Peker S, Demiralp DO, Akar N.(2011). Proteomic Identification of Erythrocyte Membrane Protein Deficiency in Hereditary Spherocytosis. *Mol. Biol. Rep* 39(3):3161-7

KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLERİ

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

4th International Congress of the Molecular Biology Association, November 27-29, 2015, METU, Ankara, Turkey. Hatice Yıldızhan, Seçil Karahisar Turan, Nezahat Pınar Barkan, Beycan Ayhan, Naşit İğci, **Selen Peker**, Aynur Karadağ, Günseli Çubukçuoğlu Deniz, Serkan Durdu, A. Rüçhan Akar, Duygu Özel Demiralp. Investigation Of The Cardiomyocyte Differentiation Of Human Mesenchymal Stem Cells Cocultured With Ac16 Cell Line Using Bottom-up Proteomic Strategies (Poster sunumu)

Experimental biology 2015, March 28-April 1, Boston Convention & Exhibition Center. **Selen Peker**, Bertal Huseyin Aktas, Duygu Ozel Demiralp. Proteomic Approach to Understanding the Mechanism of Action of New Pharmaceutical Molecules That Impinge on the Eukaryotic Translational Control (Poster sunumu/Basılı bildiri; April 2015 The FASEB Journal vol. 29 no. 1 Supplement 619.10)

20th International Symposium on Electro-and Liquid Phase- Separation Techniques, October 6-9, 2013, Canary Island, Spain. A Preliminary Study Of Differently Damaged Sciatic Nerve Tissues Of A Newt, *Triturus karelinii*, By Bottom- Up Proteomic Strategies. Seçil Karahisar, **Selen Peker**, Ali Demirsoy, Duygu Ozel Demiralp (Poster sunumu).

12th Congress of the Cell Transplant Society, July 7-11, 2013, University of Milan, Italy. Comparison of pancreatic islet protein profiles by mass spectrometry-based analysis. **Selen Peker**, Duygu Ozel Demiralp, Sercan Mercan, Ferda Alpaslan Pinarli, Ersin Fadillioglu, Tuncay Delibasi (Poster sunumu).

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Ulusal Proteomik Kongresi, 20-21 Kasım 2014, Belek/Antalya. Özel Demiralp, F. D., **Peker**, S., Ayhan, B., İğci, N. (2014). Hematolojik hastalıklarda proteomiks stratejilerinin kullanımı. Bildiri Kitabı pp. 15. (Sözlü Bildiri)

39. Ulusal Hematoloji Kongresi, 23-26 Ekim 2013, Antalya. **Selen Peker**, Duygu Ozel Demiralp, Nejat Akar Herediter sferositoz ve --^{Med}/αα taşıyıcısı olan bir olgunun proteomik incelenmesi (Poster Sunumu).

XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011, Antalya. Duygu Özel Demiralp, Şeyda Andaç Kılıçoğlu, Başak Çınar, **Selen Peker**, Arzu Yılmaz, Sergin Akpek, A. Yusuf Öner. Megalosefali olmaksızın bilateral temporal lobda kistlerle seyreden lökoensefalopati: 5 olgu sunumu/Leukoencephalopathy with bilateral temporal lobe cysts without megalencephaly: 5 case reports. (Poster sunumu)

37. Ulusal Hematoloji Kongresi, 19-22 Ekim 2011, Ankara. Duygu Ozel Demiralp, **Selen Peker**, Burhan Turgut, Nejat Akar. Herediter sferositoz ve eliptositozda protein profil haritalarının karşılaştırılması ve proteomik analizler ile değerlendirilmesi. (Poster sunumu, En güzel Türkçe ödülü)

36. Ulusal Hematoloji Kongresi, 3-7 Kasım 2010, Gloria Kongre Merkezi, Belek/ANTALYA.
Selen Peker, Nejat Akar, Duygu Ozel Demiralp. Herediter sferositozda membran protein eksikliklerinin elektroforetik ve spektrometrik yöntemler ile araştırılması. (Poster Sunumu).

