

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPG2, CACO-2 VE HT-29 KANSER HÜCRELERİNDE
2D JEL ELEKTROFOREZ VE MALDI-TOF/TOF-MS İLE
ANKAFERD HEMOSTAT' IN İN-VİTRO ANTİNEOPLASTİK ETKİSİNİN
PROTEOMİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI

Ecz. Merve NENİ

Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2019

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPG2, CACO-2 VE HT-29 KANSER HÜCRELERİNDE 2D JEL
ELEKTROFOREZ VE MALDI-TOF/TOF-MS İLE
ANKAFERD HEMOSTAT' IN İN-VİTRO ANTİNEOPLASTİK ETKİSİNİN
PROTEOMİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI

Ecz. Merve NENİ

Analitik Kimya Programı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ

ANKARA

2019

ONAY SAYFASI**HEPG2, CACO-2 VE HT-29 KANSER HÜCRELERİNDE 2D JEL ELEKTROFOREZ VE
MALDI-TOF/TOF-MS İLE ANKAFERD HEMOSTAT'IN İN-VİTRO ANTİNEOPLASTİK
ETKİSİNİN PROTEOMİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI****Ecz. Merve Nenni****Danışman: Prof. Dr. İncilay Süslü**

Bu tez çalışması 07.01.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Analitik Kimya Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:*Prof. Dr. İbrahim Celalettin Haznedaroğlu**(Hacettepe Üniversitesi)***Üye:***Prof. Dr. Sacide Altınöz**(Hacettepe Üniversitesi)***Üye:***Prof. Dr. Nursabah Elif Başçı**(Hacettepe Üniversitesi)***Üye:***Doç. Dr. Gürler Akpınar**(Kocaeli Üniversitesi)***Üye:***Doç. Dr. İsmail Murat Palabıyık**(Ankara Üniversitesi)*

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

29 Ocak 2019

*Prof. Dr. Diclehan ORHAN***Enstitü Müdürü**

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾


07/01/2019

Merve NENİ

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
- Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir
- * Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



07/01/2019

Ecz. Merve NENİ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi ve hazırlanması süresince bana her zaman destek olan, bilgilerinden, önerilerinden ve birikimlerinden sürekli yararlandığım çok değerli danışman hocam Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İncilay Süslü' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında destek veren Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Sacide Altınöz' e, Doç. Dr. Mustafa Çelebier' e, Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül Doğan' a ve ayrıca Dr. Kim. Engin Koçak' a ve Uzm. Kim. Ozan Kaplan' a teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde bulunan ve değerli katkılar veren Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nursabah Elif Başçı' ya teşekkürlerimi sunarım. Hem tez izleme komitesinde bulunan hem de tez çalışması kapsamında nicel anlamda miktarı değişen spotların tanımlanmasında değerli katkıları olan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı' ndan Doç. Dr. Gürler Akpınar' a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın gerçekleşmesinde değerli katkıları olan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İbrahim Celalettin Haznedaroğlu'na ve Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Ayşe Ercan' a ve Araştırma Görevlisi Dr. Bio. Selin Öncül' e teşekkürlerimi sunarım.

114S500 no' lu projeye bilimin ve bilim insanının destekçisi olan TÜBİTAK' a teşekkür ederim. 17656 no' lu BAB projesiyle destekleri için Hacettepe Üniversitesi' ne teşekkür ederim.

Analitik Kimya Anabilim Dalı' nın Öğretim Üyelerine, teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler, bilgi ve birikimime sağladıkları katkılar, gösterdikleri yakınlık, ilgi, samimiyet ve yardımları için teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağladıkları için sevgili babam Süleyman, annem Tülay ve teyzem Hülya, Kıymet ve Semra' ya minnettarlığımı sunarım. Sevgili abim Furkan, ablam Tuğba, kardeşim Duha, kuzenim Asude ve Mustafa' ya her zaman üzerimde hissettiğim destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Nenni, M. HepG2, Caco-2 ve HT-29 Kanser Hücrelerinde 2D Jel Elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS) ile Ankaferd Hemostat' ın İn-Vitro Antineoplastik Etkisinin Proteomik Açından Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2019. Yaşam bilimlerinde çığır açan keşiflerden biri insan genom projesinin tamamlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Ancak tüm genom haritasının oluşturulması, bilim adamları için zorlu bir görevi de beraberinde getirmiştir. Bu görev insan proteomunun karakterizasyonudur. Proteomik araştırmalar, moleküler seviyede değişim gösteren proteomların analizinin yapıldığı çalışmalardır. Onkoproteomik, kanser hücresindeki protein etkileşimlerini içeren proteomik teknolojilerin kullanıldığı proteomiklerin bir koludur. Kanser patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamak, tanı için yeni tümör biyobelirteçleri geliştirmek ve örneklerin proteom profili kullanılarak erken tespit ve teşhisi sağlamak için onkoproteomik çalışmalar yapılmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri ve HepG2 karaciğer kanseri hücre hatları, Ankaferd Hemostat (ABS; Ankaferd Blood Stopper®) ile farklı sürelerde muamele edilmiştir. ABS ile muamele edilen hücreler (işlenmiş, T grubu) ve muamele edilmeyen hücreler (kontrol, C grubu) üzerinde karşılaştırmalı proteomik çalışmalar yapılmıştır. Proteomik çalışmalarda, 2 boyutlu jel elektroforezle ayrılan C ve T gruplarına ait proteinler için imaj analizi çalışmaları yapılmıştır. C ve T grupları karşılaştırıldığında, nicel anlamda en az 2 kat farklılaşan proteinler, MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilmiş ve peptid dizileme çalışmalarıyla tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinler Uniprot ve SwissProt gibi veri tabanlarında taranıp yapıları, fonksiyonları, gen adları ve protein-protein etkileşimleri belirlenmiştir. String veri tabanı aracılığıyla da ABS' nin, kanser hücrelerinde etkilediği biyolojik süreçler ve yollar tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Proteomik, Kolon kanseri, Karaciğer kanseri, İki boyutlu (2D) jel elektroforez, MALDI-TOF/TOF-MS, Protein etkileşimleri, Ankaferd Hemostat.

Bu tez çalışması 114S500 no' lu TUBİTAK projesi ve 17656 no'lu Hacettepe BAB Projesi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Nenni, M. Proteomic Investigation of In-Vitro Antineoplastic Effect of Ankaferd Hemostat with 2D Gel Electrophoresis and MALDI-TOF/TOF-MS in HepG2, Caco-2 and HT-29 Cancer Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Analytical Chemistry Program PhD Thesis, Ankara, 2019. One of the breakthroughs in life sciences has been accomplished through the completion of the human genome project. However, the compose of the entire genome map has also brought a tough task for scientists. This task is the characterization of human proteome. Proteomic investigations are studies of the analysis of proteomes that change at the molecular level. Oncoproteomic is a branch of proteomics where proteomic technologies involving protein interactions in cancer cells are used. Oncoproteomic studies are being conducted to provide better understanding of cancer pathogenesis, to develop new tumor biomarkers for diagnosis and to provide early detection and diagnosis of samples using proteomic profiles. Within the scope of this thesis, Caco-2 and HT-29 colon cancer and HepG2 liver cancer cell lines were treated at different times by Ankaferd Hemostat (ABS; Ankaferd Blood Stopper®). Comparative proteomic studies were performed on cells treated with ABS (treated, T group) and untreated cells (control, C group). In proteomic studies, image analysis studies were performed for proteins belonging to groups C and T separated by two dimensional gel electrophoresis. Proteins that differed quantitatively by at least 2-fold when compared to groups C and T were analyzed by MALDI-TOF/TOF-MS and identified by peptide sequencing studies. Identified proteins were scanned in databases such as Uniprot and SwissProt, its functions, gene names, protein-protein interactions. Through the database of String, the biological processes and pathways that the ABS has affected in cancer cells have been identified.

Key words: Proteomics, Colon cancer, Liver cancer, Two dimensional (2D) gel electrophoresis, MALDI-TOF/TOF-MS, Protein interactions, Ankaferd Hemostat.

This thesis was supported by TUBITAK Project No. 114S500 and Hacettepe University BAB Project No. 17656.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Proteom ve Proteomik	5
2.2. Proteomik Araştırma Stratejileri	11
2.3. Proteom Araştırmasında Kullanılan Teknikler	12
2.4. Jel Temelli Ayırma Yaklaşımları	13
2.5. Elektroforez ve Türleri	15
2.5.1. 2 Boyutlu (2D) Jel Elektroforez	16
2.6. Proteomik Çalışmalarda Kütle Spektrometresinin Yeri ve Önemi	21
2.6.1. Kütle Spektroskopisi	21
2.6.2. Geçmişten Günümüze Proteomik Analizlerde Kütle Spektroskopisi	22
2.6.3. İyonlaştırma Yöntemleri	24
2.6.4. MALDI (Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon)	25
2.6.5. Peptid Dizileme Çalışmaları ve De Novo Dizileme	28
2.6.6. Veri Bankalarının Araştırılması ve Protein Modifikasyonları	31
2.7. Kanser ve Proteomik	31
2.7.1. Kolon Kanseri	33
2.7.2. Karaciğer Kanseri	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	43
3.2. Sitolitik Fraksiyon Eldesi	44
3.3. Protein Miktar Tayini	44
3.4. Proteinlerin Çöktürülmesi	45
3.5. Proteinlerin IPG Şeride Yüklenmesi	45
3.6. IEF Uygulaması (1. Boyut)	47
3.7. SDS - PAGE Uygulaması (2. Boyut)	49
3.8. Jellerin Boyanması ve Görüntülenmesi	53
3.8.1. Coomassie Mavisi ile Boyama İşlemi	53
3.8.2. SYPRO - Ruby ile Boyama İşlemi	54
3.9. İmaj Analizi Çalışmaları	55
3.10. Spot Kesimi, Jelden Spotların Elüsyonu ve Proteinlerin Peptidlerine Parçalanması	56
3.11. Proteinlerin MALDI-TOF/TOF-MS ile Analizi ve Peptid Dizileme ile Proteinlerin Tanımlanması	56
3.12. Farklılaşan Proteinlerin Fonksiyonu ve Protein - Protein Etkileşimi	57
4. BULGULAR	58
4.1. Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Bulgular	58
4.2. Protein Miktar Tayini	58
4.3. Caco-2 Kolon Kanseri Hücrelerinde Proteomik Çalışma Bulguları	59
4.3.1. İmaj Analizi Çalışmaları	59
4.3.2. Peptid Dizileme ile Proteinlerin Tanımlanması	76
4.4. HT-29 Kolon Kanseri Hücrelerinde Proteomik Çalışma Bulguları	79
4.4.1. İmaj Analizi Çalışmaları	79
4.4.2. Peptid Dizileme ile Proteinlerin Tanımlanması	101
4.5. HepG2 Karaciğer Kanseri Hücrelerinde Proteomik Çalışma Bulguları	104
4.5.1. İmaj Analizi Çalışmaları	104
4.5.2. Peptid Dizileme ile Proteinlerin Tanımlanması	114
4.6. Peptid Dizileme ve De Novo ile Proteinlerin Tanımlanması	116
5. TARTIŞMA	119

5.1. Caco-2 Kolon Kanseri Hücrelerinde ABS Etkisiyle Farklılaşan Proteinlerin Saptanması	127
5.2. Caco-2 Kolon Kanseri Hücrelerinde Farklılaşan Proteinlerin Yapıları, Fonksiyonları ve Protein - Protein Etkileşmeleri	130
5.3. HT-29 Kolon Kanseri Hücrelerinde ABS Etkisiyle Farklılaşan Proteinlerin Saptanması	142
5.4. HT-29 Kolon Kanseri Hücrelerinde Farklılaşan Proteinlerin Yapıları, Fonksiyonları ve Protein - Protein Etkileşmeleri	144
5.5. HepG2 Karaciğer Kanseri Hücrelerinde ABS Etkisiyle Farklılaşan Proteinlerin Saptanması	154
5.6. HepG2 Karaciğer Kanseri Hücrelerinde Farklılaşan Proteinlerin Yapıları, Fonksiyonları ve Protein - Protein Etkileşmeleri	155
5.7. Caco-2, HT-29 ve HepG2 Hücre Hatlarında ABS' nin Antineoplastik Etkisinin İncelenmesi	160
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	165
7. KAYNAKLAR	168
8. EKLER	
Ek-1: ABS Muamelesiyle HepG2 Hücrelerinde Peptid Dizileme ve De Novo ile Farklılaşan Proteinlerin Tanımlanması	
Ek-2: Ankaferd Blood Stopper®' in Ruhsat Belgesi	
Ek-3: Orjinallik Raporu	
Ek-4: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

2D	2 boyutlu
ABS	Ankaferd Hemostat (Ankaferd Blood Stopper®)
CE	Kapiler elektroforez
CID	Düşük enerjili çarpışma kaynaklı ayrışma
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	DL-Ditiyotritol
EPCR	Endotelial protein C reseptörü
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
fmol	Femtomol
GN	<i>Gene name</i> , gen adı
GO	Gen ontolojisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IAA	İyodoasetamid
IEF	İzoelektrik odaklama
IEX	İyon değişim kromatografisi
IMAC	İmmobilize metal afinite kromatografisi
IPG	İmmobilize pH gradyan
LC	Sıvı kromatografisi
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi
m/z	Kütle/yük
MALDI	Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon
MALDI-TOF/TOF-MS	Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon, uçuş zamanlı kütle spektrometrisi
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MS	Kütle spektrometrisi
MS/MS	Tandem kütle spektrometrisi
NP	Normal faz kromatografisi
OS	<i>Organism Name</i> , organizma adı
PE	<i>Protein Existence</i> , protein varlığı
pI	İzoelektrik nokta
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitörü- 1
PMF	Peptid dizileme yöntemi
pmol	Pikomol
PTM	Translasyon sonrası modifikasyon
RP	Ters faz kromatografi
RPLC	Ters faz sıvı kromatografisi

SCX	Boyut dışlama kromatografisi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS - PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEC	Boyut-eleme kromatografisi
SSP	Seçilmiş spot pozisyonu
SV	<i>Sequence Version</i> , dizi sürümü
TCA	Triklorasetik asit
TOF	Time of flight, uçuş zamanlı kütle analizörü
vb.	ve benzeri
WAX	Zayıf anyon değişimi



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1.1. Protein sentez yolu.	2
2.1. Peptid bağı oluşumu.	5
2.2. Amino asit yan zincirleri ve protein konformasyonu arasındaki ilişki.	7
2.3. Proteinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı.	8
2.4. Proteomik stratejileri : Aşağıdan yukarıya, ortadan aşağıya ve yukarıdan aşağıya.	11
2.5. Örneklerin 2D jel elektroforez ile ayırımının şematik gösterimi.	15
2.6. IEF tekniğinin şematik gösterimi.	19
2.7. Bir MS' in bileşenleri.	22
2.8. MALDI lazer desorpsiyon süreci.	27
2.9. MALDI-TOF/TOF-MS' in şematik diyagramı.	27
2.10. Peptid omurgasının parçalanması; b ve y iyonları.	30
2.11. ANELLVVK peptidinin Tandem MS ile analizi sonucunda elde edilen b ve y iyonlarını gösteren spektrum.	30
2.12. Düşük ve yüksek çözünürlükteki Caco-2 kolon kanseri hücre görüntüleri.	35
2.13. Düşük ve yüksek çözünürlükteki HT-29 kolon kanseri hücre görüntüleri.	36
2.14. Düşük ve yüksek çözünürlükteki HepG2 karaciğer kanseri hücre görüntüleri.	38
3.1. Numunenin IPG şerit tablaya tatbiki.	46
3.2. IPG şerit üzerinden koruyucu bandının çıkarılması ve tablaya uygulanması.	47
3.3. <i>Gel-Side Down</i> yöntemi işlem basamakları.	48
3.4. Bio-Rad marka PROTEAN IEF sistemi.	49
3.5. SDS - PAGE jellerin elektroforez hücresine yerleştirilmesi.	51
3.6. IPG şeridin yerleştirilmesi, marker ilavesi ve sıcak agaroz jelin uygulanması.	52
3.7. Elektroforez hücresi ve güç kaynağı.	53
4.1. Bio-Rad TM protein miktar tayini kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	58
4.2. C ve T grubuna ait tekrarlı jel görüntüleri (24 saatlik Caco-2 hücreleri).	60
4.3. 24 saatlik C grubu Caco-2 hücrelerine ait görüntü.	61
4.4. 24 saatlik T grubu Caco-2 hücrelerine ait görüntü.	62
4.5. 2801 numaralı spota ait görüntü.	62

4.6.	3801 numaralı spota ait görüntü.	63
4.7.	5701 numaralı spota ait görüntü.	63
4.8.	6601 numaralı spota ait görüntü.	64
4.9.	7001 numaralı spota ait görüntü.	64
4.10.	3404 numaralı spota ait görüntü.	65
4.11.	4501 numaralı spota ait görüntü.	65
4.12.	9003 numaralı spota ait görüntü.	66
4.13.	9303 numaralı spota ait görüntü.	66
4.14.	9804 numaralı spota ait görüntü.	67
4.15.	9901 numaralı spota ait görüntü.	67
4.16.	C ve T grubuna ait tekrarlı jel görüntüleri (72 saatlik Caco-2 hücreleri).	68
4.17.	72 saatlik C grubu Caco-2 hücrelerine ait görüntü.	69
4.18.	72 saatlik T grubu Caco-2 hücrelerine ait görüntü.	70
4.19.	1002 numaralı spota ait görüntü.	70
4.20.	1506 numaralı spota ait görüntü.	71
4.21.	6101 numaralı spota ait görüntü.	71
4.22.	7104 numaralı spota ait görüntü.	72
4.23.	9210 numaralı spota ait görüntü.	72
4.24.	3002 numaralı spota ait görüntü.	73
4.25.	4504 numaralı spota ait görüntü.	73
4.26.	4701 numaralı spota ait görüntü.	74
4.27.	5503 numaralı spota ait görüntü.	74
4.28.	5602 numaralı spota ait görüntü.	75
4.29.	6603 numaralı spota ait görüntü.	75
4.30.	6703 numaralı spota ait görüntü.	76
4.31.	C ve T grubuna ait tekrarlı jel görüntüleri (24 saatlik HT-29 hücreleri).	80
4.32.	24 saatlik C grubu HT-29 hücrelerine ait görüntü.	81
4.33.	24 saatlik T grubu HT-29 hücrelerine ait görüntü.	81
4.34.	5405 numaralı spota ait görüntü.	82
4.35.	7506 numaralı spota ait görüntü.	82
4.36.	1201 numaralı spota ait görüntü.	83
4.37.	1801 numaralı spota ait görüntü.	83

4.38.	2901 numaralı spota ait görüntü.	84
4.39.	2902 numaralı spota ait görüntü.	84
4.40.	3604 numaralı spota ait görüntü.	85
4.41.	4803 numaralı spota ait görüntü.	85
4.42.	5803 numaralı spota ait görüntü.	86
4.43.	6001 numaralı spota ait görüntü.	86
4.44.	6302 numaralı spota ait görüntü.	87
4.45.	7801 numaralı spota ait görüntü.	87
4.46.	9201 numaralı spota ait görüntü.	88
4.47.	9503 numaralı spota ait görüntü.	88
4.48.	C ve T grubuna ait tekrarlı jel görüntüleri (72 saatlik HT-29 hücreleri).	89
4.49.	72 saatlik C grubu HT-29 hücrelerine ait görüntü.	90
4.50.	72 saatlik T grubu HT-29 hücrelerine ait görüntü.	91
4.51.	7406 numaralı spota ait görüntü.	91
4.52.	7803 numaralı spota ait görüntü.	92
4.53.	8408 numaralı spota ait görüntü.	92
4.54.	0102 numaralı spota ait görüntü.	93
4.55.	0502 numaralı spota ait görüntü.	93
4.56.	0513 numaralı spota ait görüntü.	94
4.57.	2404 numaralı spota ait görüntü.	94
4.58.	2603 numaralı spota ait görüntü.	95
4.59.	2801 numaralı spota ait görüntü.	95
4.60.	2803 numaralı spota ait görüntü.	96
4.61.	2901 numaralı spota ait görüntü.	96
4.62.	2903 numaralı spota ait görüntü.	97
4.63.	3001 numaralı spota ait görüntü.	97
4.64.	4801 numaralı spota ait görüntü.	98
4.65.	4804 numaralı spota ait görüntü.	98
4.66.	6206 numaralı spota ait görüntü.	99
4.67.	7702 numaralı spota ait görüntü.	99
4.68.	7801 numaralı spota ait görüntü.	100
4.69.	7901 numaralı spota ait görüntü.	100

4.70.	C ve T grubuna ait tekrarlı jel görüntüleri (HepG2 hücreleri).	105
4.71.	C grubu HepG2 hücrelerine ait görüntü.	106
4.72.	T grubu HepG2 hücrelerine ait görüntü.	107
4.73.	0101 numaralı spota ait görüntü.	107
4.74.	0802 numaralı spota ait görüntü.	108
4.75.	1201 numaralı spota ait görüntü.	108
4.76.	1503 numaralı spota ait görüntü.	109
4.77.	2101 numaralı spota ait görüntü.	109
4.78.	4802 numaralı spota ait görüntü.	110
4.79.	5304 numaralı spota ait görüntü.	110
4.80.	6003 numaralı spota ait görüntü.	111
4.81.	7602 numaralı spota ait görüntü.	111
4.82.	4101 numaralı spota ait görüntü.	112
4.83.	5303 numaralı spota ait görüntü.	112
4.84.	6302 numaralı spota ait görüntü.	113
4.85.	7406 numaralı spota ait görüntü.	113
4.86.	Glukozidaz 2 subunite beta proteininin AQREQELAADAFK peptidine ait tüm iyonlar ile b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu.	116
4.87.	Glukozidaz 2 subunite beta proteinin AQREQELAADAFK peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi.	117
4.88.	Glukozidaz 2 subunite beta proteinine ait MS spektrumu.	117
4.89.	1448.68 m/z değerli precursor iyonuna ait MS/MS spektrumu.	118
4.90.	1448.68 m/z değerine sahip precursor iyonuna ait De Novo amino asit dizisi.	118
5.1.	Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde ABS' nin etkisiyle farklılaşan proteinlerin birbirleriyle etkileşimi.	138
5.2.	Fagositoz yolağı.	140
5.3.	Ara bağlantılardan geçiş yolağı.	141
5.4.	Endoplazmik retikulumda protein işleme yolağı.	142
5.5.	HT-29 kolon kanseri hücrelerinde ABS' nin etkisiyle farklılaşan proteinlerin birbirleriyle etkileşimi.	152
5.6.	HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde ABS' nin etkisiyle farklılaşan proteinlerin birbirleriyle etkileşimi.	159

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Amino asit tablosu.	29
2.2. Caco-2 kolon kanseri hücre hattı ile ilgili genel bilgiler.	34
2.3. HT-29 kolon kanseri hücre hattı ile ilgili genel bilgiler.	35
2.4. HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı ile ilgili genel bilgiler.	38
3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre hatları.	39
3.2. Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar.	39
3.3. Tez çalışması kapsamında satın alınan hazır tampon çözeltiler.	40
3.4. Tez çalışması kapsamında hazırlanan çözeltiler.	40
3.5. Tez çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeler.	41
3.6. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar.	41
3.7. Tez çalışması kapsamında kullanılan yazılımlar ve veri tabanları.	42
3.8. İzoelektrik odaklamada pH 4 - 7 ve pH 5 - 8 IPG şeritler için uygulanan program.	49
4.1. Bio-Rad™ protein miktar yöntemi tayini kullanılarak C ve T grubunda bulunan protein miktarları (mg/mL).	59
4.2. 24 saat ABS ile muamele sonucunda Caco-2 hücrelerinde nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler.	77
4.3. 72 saat ABS ile muamele sonucunda Caco-2 hücrelerinde nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler.	78
4.4. 24 saat ABS ile muamele sonucunda HT-29 hücrelerinde nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler.	102
4.5. 72 saat ABS ile muamele sonucunda HT-29 hücrelerinde nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler.	103
4.6. ABS ile muamele sonucunda HepG2 hücrelerinde nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler.	115
5.1. ABS' nin kanser ile ilgili kaynak verileri.	123
5.2. Çalışılan hücrelerin 24 ve 72 saat ABS ile muamelesi sonucu tanımlanan kümelerdeki ve MALDI-TOF/TOF-MS analizi için belirlenen spot sayıları.	126
5.3. Caco-2 kolon kanseri hücrelerine 24 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.	131
5.4. Caco-2 kolon kanseri hücrelerine 72 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.	134

- 5.5.** HT-29 kolon kanseri hücrelerine 24 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu. 145
- 5.6.** HT-29 kolon kanseri hücrelerine 72 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu. 148
- 5.7.** HepG2 karaciğer kanseri hücrelerine ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu. 156



1. GİRİŞ

'Omik' kelimesi, Yunanca 'ome' (tüm, her şey, bütün ya da tam anlamıyla) ekinden türetilmiş olup yaşam ve bütünsel varlığın örgütlenmesini anlayabilmek için biyolojik sistemler hakkında küresel bir bakış açısını amaçlayan, moleküler biyolojideki bilimsel alanlara atıfta bulunmaktadır. 1990' ların ortalarında, genomlar (bir organizmanın tam genetik dizisi) ile ilgili büyüyen bilgi birikimi ve evrimi, "omik" yaklaşımlarının (genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve yakın zamanlarda da degradomik, lipidomik, interaktomik, bakteriyomik, ökaryomik, glikomik vb.) tüm çeşitlerinin hızlı bir şekilde gelişmesine yol açmaktadır. Biyolojik örnek sınıflandırma ve yüksek verimli tarama teknolojilerindeki bu metodolojiler, aşağıdaki soruların cevaplarını almayı sağlar:

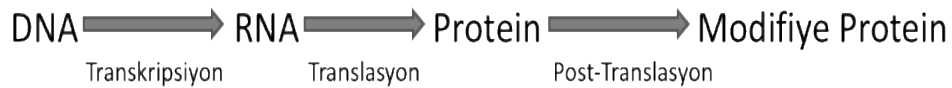
- Hücre/organ/doku içinde neler oluyor?
- Biyolojik süreçte çalışılan anahtar bileşen nedir?
- Biyomoleküller neden bu kadar farklı davranıyor?
- Bu bilgilerden yeni ne öğrenilebilir?

'Omik' yaklaşımları, genellikle farklı popülasyonlardan veya farklı fizyolojik durumlardan (örneğin, hasta-sağlıklı, tedavi edilmemiş-tedavi edilmiş, stresli-stressiz... gibi) toplanan örnekleri araştırmak için uygulanır ve bu gruplar arasında farklılık gösteren molekülleri bulmayı amaçlar. Farklılaştığı tespit edilen biyobelirteçler (genler, transkriptler, proteinler veya metabolitler) karakterize edildikten sonra, örneklerin farklılaşması ve sınıflandırması için veya bilimsel araştırmada yer alan süreçleri gösterecek moleküller olarak gelecekte kullanılabilir (1, 2).

"Proteom" terimi, genom tarafından ifade edilen protein tamamlayıcısı anlamına gelir (3). Genom, nispeten canlı bir organizmanın ömrü boyunca aynı kalırken, proteom sürekli olarak değişmekte, iç ve dış uyaranlarla modifikasyonlara uğrar. Proteom sadece genomun ekspresyon kısmını değil, aynı zamanda tek bir gen için proteinlerin çeşitli aktif formlarının ve translasyon (çevirim) sonrası modifikasyon (PTM)' larının varyasyonunu da temsil eder. Bu durum; proteom çalışmalarını, genomdaki gen sayısına göre beklenenden daha karmaşık hale getirir. Gen, kromozom içinde belirli bir kısmı oluşturan nükleik asit dizisidir. Genler organizmanın yönetici molekülleri olup, organizmanın özelliklerini, organizma içerisinde hangi olayların gerçekleştiğini ve organizmanın hastalıklarda dahil

olmak üzere hangi koşulda nasıl eğilim gösterdiklerini belirlemektedir. Bir gen birden fazla biyolojik işleve sahip farklı genleri kodlamakta ve bu proteinler translasyon sonrası değişimlere uğramaktadır. Çoğu durumda bu değişimler genin işlevinden bağımsız olarak da ilerlemektedir.

Genetik bilgi deoksiribonükleik asit (DNA)' den transkripsiyon yoluyla mesajcı ribonükleik asit (mRNA)' e aktarılır (Transkripsiyon: DNA' yı oluşturan nükleotid dizisinin RNA polimeraz enzimiyle bir RNA dizisi halinde kopyalanması sürecidir). Translasyon, transkripsiyon sonucu oluşan mRNA' lardaki koda uygun olarak ribozomlarda gerçekleştirilen aminoasit zinciri (polipeptid) sentezi sürecidir. Daha sonra üretilen polipeptid, PTM aracılığıyla uygun bir şekilde katlanarak etkin bir protein haline gelir (Şekil 1.1.) (4).



Şekil 1.1. Protein sentez yolu.

Aynı zamanda, hücrelerdeki mRNA seviyeleri ve karşılık gelen protein seviyeleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi, çeşitli çalışmalarda prokaryotlar için çoğunlukla bir tutarlılık olsa da ökaryotlar için çok zayıf bir korelasyon olduğunu göstermektedir (5). Bu süreçler hakkında hala az şey bilinmektedir ve genomik çalışmalar, tüm sorulara cevap veremediğinden; proteomik, bilgiyi yaşam bilimlerine aktarmak için mükemmel bir tamamlayıcı araçtır.

Proteomik, bir hücre veya doku içindeki biyolojik süreçlerin bir sonucu olarak, protein ve protein varyasyonlarının büyük bir ölçekte niteliksel ve niceliksel çalışmasını içermektedir. “Proteomik, sadece proteinlerin tanımlanmasını ve miktarının belirlenmesini değil, aynı zamanda yerleşimlerini, değişimlerini, diğer protein ve makro moleküllerle etkileşimlerini, aktivitelerini ve nihayetinde işlevlerini belirlemektedir” - Stan Fields (6) 2001'de proteomik kavramını bu şekilde ifade etmiştir.

Genom yapısının aydınlatılması genomiktir (DNA' nın moleküler yapısının aydınlatılmasıdır). Genomik sonrası çalışmalar (post genomik çalışmalar) proteomik ve metabolomik olarak devam etmiştir. Genomik çalışmalar, organizma içinde neler olabileceğini; post-genomik çalışmalar neler olduğunu gösterir. İnsan genom projesiyle insan

genomunun tüm haritası çıkartılmaya çalışılmıştır. Post genomik çağda genlerin translasyonu, genom-proteom ilişkileri, genom-metabolom ilişkileri araştırılmıştır.

Proteom analizi, 1975' te Klose (7) ve O'Farrell (8) tarafından iki boyutlu (2D) jel elektroforezine dayalı tekniklerle başlamıştır ve sıvı kromatografisi - kütle spektrometrisi (LC-MS) gibi jel içermeyen tekniklerin uygulanmasıyla genişletilmiştir. Jel bazlı ve jel içermeyen yöntemlerin her ikisi de göreceli güçlü ve zayıf yönleri sahiptir ve tercih edilen stratejinin seçimi değişmektedir. Jel bazlı proteomik çalışmalar, zaman alıcı ve uygulaması güç olmakla birlikte (protein saptamasının sınırlı bir aralığa sahip olmasının yanı sıra membran proteinlerinin ayrılmasında kısıtlı yeteneğe sahiptir), aynı zamanda binlerce biyolojik proteinin, karmaşık biyolojik sistemlerde eş zamanlı olarak karşılaştırılması için etkili bir analitik araçtır. Başarılı bir proteomik analiz için ön fraksiyon ve tüketme/yoğunlaştırma işlemleri geliştirilmiştir. Cihazlardaki gelişmeler (analizlerin çözünürlüğünü arttıran dar aralıklı immobilize pH gradient jellerinin uygulanması; floresan görüntüleme, kütle spektrometrisi), metodolojiler (MS temelli yöntemler, kromatografi) ve biyoinformatikler, proteomik araştırmaların uygulamasını genişletmiştir.

Genomik, proteomik, metabolomik gibi çalışmalarını içeren "Omik" yaklaşımlarının temel gücü, yeni hipotezlerin üretimi ve test edilmesine dayanmaktadır. Bu tez kapsamında, birkaç yeni hipotez bir araya getirilerek ve analiz edilmeye çalışılacaktır. Bunlar:

- Ankaferd Hemostat (ABS; Ankaferd Blood Stopper®)' in çeşitli kanser hücrelerinde herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığı araştırılacaktır.

- Bu tez çalışmasının amacı; Caco-2, HT-29 kolon kanseri ve HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde ABS' nin moleküler düzeydeki antineoplastik etkisi, karşılaştırmalı proteomik çalışmalarla incelenecektir.

- Bu amaçla, omik çalışmalardan "proteomik analiz", proteomik çalışmalardan ise "2D jel elektroforez yöntemi" kullanılacaktır.

- Çalışmada Caco-2, HT-29 kolon kanseri hücre hatları ve HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı kullanılmıştır. ABS ile muamele edilen hücreler, işlenmiş (T) grubu ve muamele edilmeyen hücreler ise kontrol (C) grubu olarak tanımlanacaktır.

- Bu yaklaşımla C ve T grupları karşılaştırıldığında, yüksek riskli kolon ve karaciğer kanserinde düşük ve yüksek miktardaki proteinler saptanacaktır.

- 2D jel elektroforez yöntemi ile C ve T grubuna ait proteinler ayrılıp, imaj analiz çalışmaları yapılacaktır. Nicel anlamda en az 2 kat azalan veya artan yani farklılaştığı saptanan proteinler MALDI-TOF/TOF-MS ve peptid dizileme yöntemi ile analiz edilecektir. ABS' nin bu kanser hücreleri üzerinde hangi yolları etkilediği araştırılacaktır. Veri tabanlarından yararlanılarak tanımlanan bu proteinlerin yapıları, fonksiyonları, gen adları ve protein-protein etkileşimleri araştırılacaktır.

- Ayrıca farklı veri tabanları aracılığıyla ABS' nin, kolon ve karaciğer kanser hücrelerinde etkilediği biyolojik süreçler ve yollar tespit edilecektir.

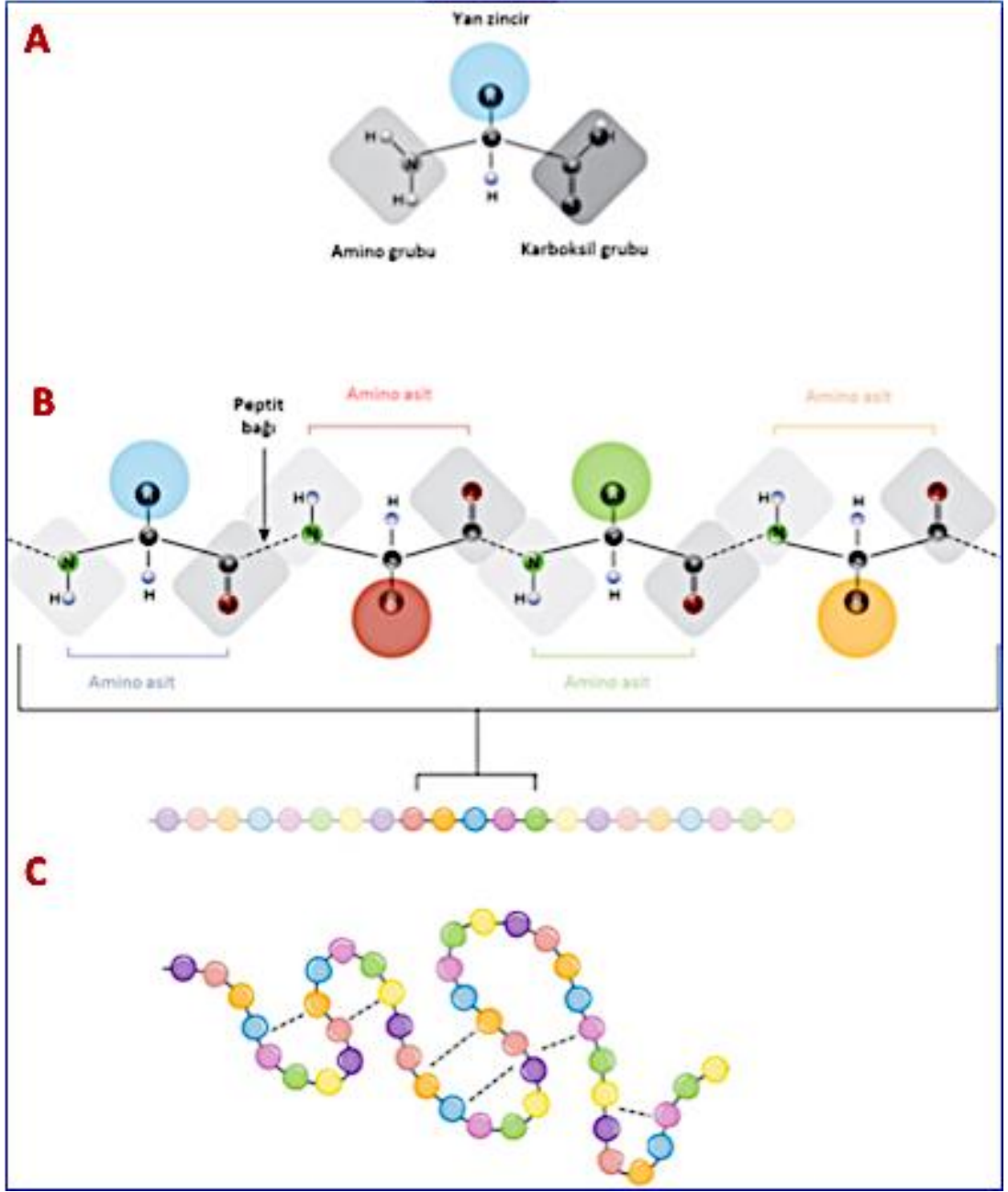
- Bu tez çalışması ile antikanser aktivitesi araştırılan ABS' nin kolon ve karaciğer kanseri üzerindeki iyileştirici etkisi ilk defa moleküler düzeyde incelenmiş olacaktır. Antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinen ABS'nin antineoplastik etkisinin olup olmadığı araştırılarak ve bu etkinin hangi proteinlerden ileri geldiği saptanacaktır.

ABS, HT-29 kolorektal karsinoma ve HepG2 hepatosellüler karsinoma hücre hatlarına ilk defa uygulanmıştır ve bu çalışma ile 2D jel elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS yöntemleri uygulanan ilk proteomik çalışmadır.

yan zincirlere sahipken, diğlereri kutuplu fakat yüksüz yan zincirlere sahiptir. Amino asit yan zincirlerinin kimyası, protein yapısının oluşmasında kritik bir rol alır, çünkü bu yan zincirler, sadece belirli bir şekil veya konformasyonda birbirleriyle bağlanabilir. Yüklü amino asit yan zincirleri iyonik bağ oluşturabilirken, polar amino asitler hidrojen bağları oluşturabilir. Hidrofobik yan zincirler birbirleriyle zayıf Van der Waals etkileşimleriyle girer. Bu yan zincirlerin oluşturduğu bağların büyük çoğunluğu kovalent bağlı değildir. Ayrıca sisteinler, özel yan zincirleriyle kovalent bağları oluşturabilen tek amino asitlerdir. Yan zincir etkileşimleri nedeniyle, belirli bir protein içindeki amino asitlerin dizisi ve konumu, proteinde bükülmeler ve kıvrımların meydana geleceği yerleri işaret eder (Şekil 2.2.). Amino asitler bir dizi peptid bağı ile birbirine bağlandığında polipeptid oluşturur. Polipeptid, daha sonra amino asit yan zincirleri arasındaki etkileşimlere bağlı olarak belirli bir konformasyona göre katlanır (10).

Tüm amino asitler tarafından paylaşılan temel kimyasal yapı, bir şemada gösterilmiştir (Şekil 2.2.):

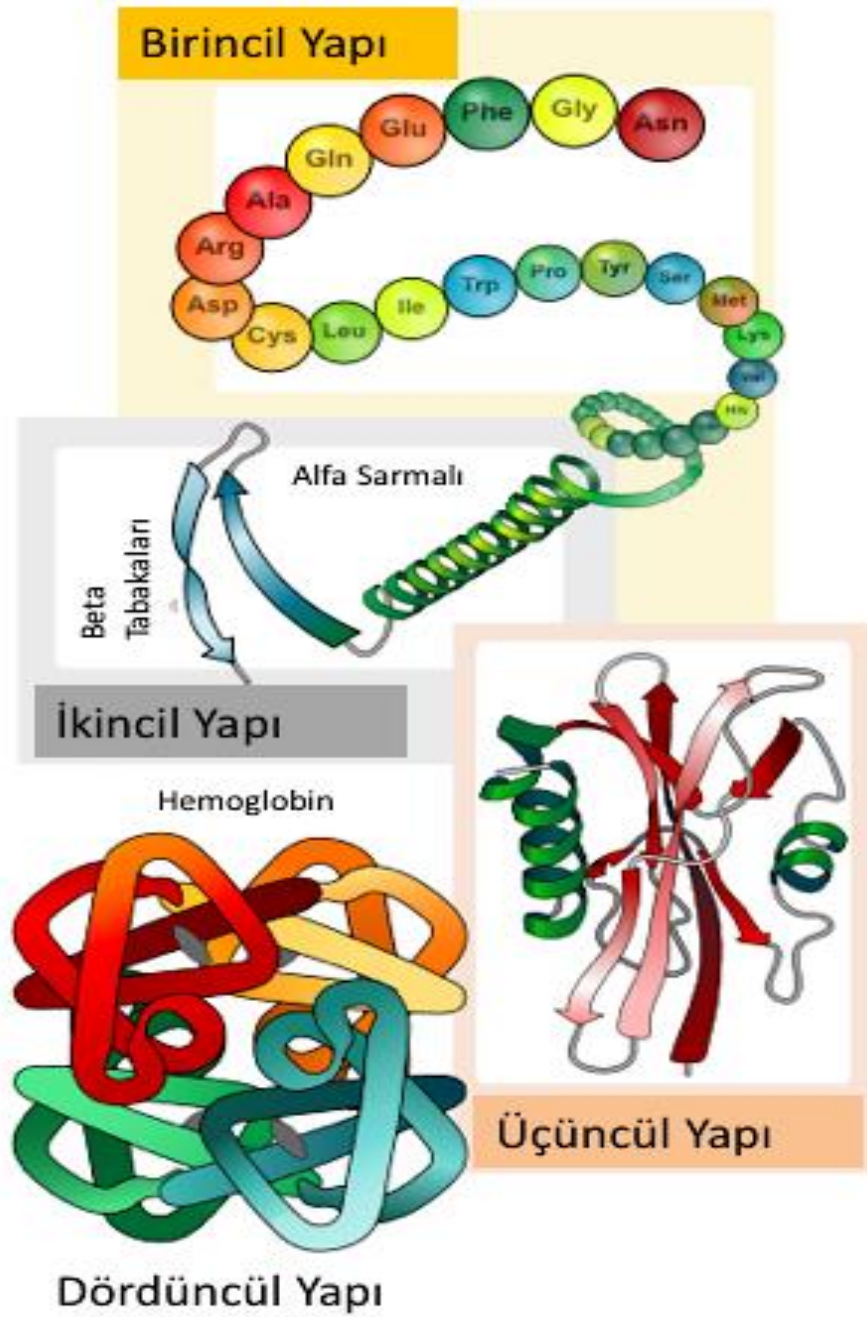
A kısmı, mavi renkli daire, her bir amino asidin benzersiz kimliğini belirleyen R grubunu veya yan zinciri temsil eden "R" ile gösterilmiştir. R grubu bir merkezi karbon (C) molekülüne bağlanır. Üç ek molekül, merkezi karbonu ayırır: İlki 2 hidrojen (H) atomuna bağlı bir nitrojen (N) atomu olarak gösterilen bir amino grubudur; ikincisi tek bir hidrojen atomudur, üçüncüsü ise, bir oksijen atomuna bir çift bağ ile ve bir hidroksil grubuna (OH) tek bir bağ ile bağlı bir karbon olarak gösterilen bir karboksilik asit grubudur. B kısmı, bir polipeptid zinciri oluşturmak için peptid bağları ile bağlanan dört amino asidi göstermektedir (Şekil 2.2.). Her bir peptid bağı kesikli bir çizgi ile temsil edilir ve polipeptid daha sonra amino asit yan zincirleri arasındaki etkileşimlere bağlı olarak belirli bir konformasyona katlanır. C kısmı, her biri uzun bir polipeptid zinciri oluşturmak üzere bağlanmış, renkli dairelerle gösterilen 42 amino asidi göstermektedir (Şekil 2.2.). Farklı renkli daireler farklı bir amino asit tipini gösterir (10).



Şekil 2.2. Amino asit yan zincirleri ve protein konformasyonu arasındaki ilişki (10).

Proteinlerde, birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuarterner) yapı olmak üzere 4 yapı tanımlanır (Şekil 2.3.). Bir proteinin amino asit dizisi, yani birincil yapısı, proteinin eşsiz 3 boyutlu şeklini belirleyen doğrusal amino asit zincirinin katlanma ve molekül içi bağlanmasını yönlendirir. Protein zincirinin komşu bölgelerindeki amino grupları ve karboksil grupları arasındaki hidrojen bağı, belli katlanma kalıplarının meydana gelmesine neden olur. α sarmalları ve β tabakaları olarak bilinen bu sabit katlanma

modelleri, bir proteinin ikincil yapısını oluşturur. Çoğu protein çok sayıda helezon ve tabaka içerir. Polipeptidler, bir proteinin üçüncül (tersiyer) yapısını oluşturur. Bir proteinin dördüncül (kuarterner) yapısı, çoklu polipeptid zincirleri veya alt birimleri olan makro moleküllere karşılık gelir (10).



Şekil 2.3. Proteinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı (11).

"Proteom" terimi ilk defa 1994' de yapılan sempozyumda Marc Wilkins ve ark. (12) tarafından önerilmiş ve kabul görmüştür ve 1995 yılında ise doktora tezinin parçası olarak literatüre kazandırılmıştır. Proteom, protein sentezi kodunun, genlerde yer aldığını vurgulamak için protein ve genom (hücre veya doku tarafından belirli bir zamanda ifade edilen tüm proteinler) kelimelerinden türetilmiştir.

Proteinler fonksiyonları, kararlılıkları ve 3 boyutlu yapıları açısından büyük farklılıklar gösterirler ve çoğu genin son gen ürünü olarak kabul edilirler (13). İnsan genomu binlerce gen içerirken, insan vücudundaki proteom çok daha karmaşıktır ve yaklaşık milyonlarca farklı protein içerir (3, 14).

"Proteom" teriminin bir başka ifadesi de bir genom tarafından kodlanan toplam proteinleri tanımlar. Proteomik, bir hücre veya organizmanın tüm protein içeriğinin incelenmesini sağlar. Proteomik, belirli bir yerde ve belirli bir zamanda bulunan tüm proteinlerin yapılarını, miktarlarını, yerleşimlerini, transkripsiyon sonrası değişimlerini, diğer proteinler ve makro moleküllerle olan etkileşimlerini inceler. "Belirli bir yer" terimi, farklı proteinlerin hücrenin farklı bölümlerinde ve farklı hücre tiplerinde ifadesini, "belirli bir zamanda" terimi ise farklı gelişim evrelerinde, farklı çevresel koşullar, yaşlılık, çeşitli hastalıklar gibi süreçleri ifade eder (15). Proteinlerin aktivitesi ile birlikte seviyesini de izlemek gereklidir (16). Genom, nükleotid dizisi tarafından belirlenirken proteom, yalnızca proteinlerin amino asit dizilimleri ile sınırlanamaz. Çünkü proteom, farklı protein yapıları ve fizyokimyasal özellikleri hakkında bilgi gerektirir. Proteinlerin büyüklüğü, şekli ve fonksiyonları, bazı fonksiyonel grupların PTM' lerinden sonra değişmektedir (17). Fosforilasyon (18), glikozilasyon (19), asetilasyon gibi çeşitli tiplerde PTM' ler bilinmektedir (20).

Proteomikle ilgili araştırmalar, protein çalışmaları ile başlamış olup yöntem olarak kökeni 1975' li yıllara uzanmaktadır. Proteomik alanında hızlı ilerlemeler 2000' den bu yana kaydedilmiş ve 96.000'in üzerinde yayınlanmış makale bulunmaktadır (19).

Kiernan' a göre, "Proteomik, biyolojik süreçleri (örneğin hastalık süreçleri ve ilaç etkileri) karakterize etmek ve gen ekspresyonu kontrol mekanizmalarını deşifre etmek için gen ekspresyonunun kantitatif protein seviyesi ölçümlerinin kullanılmasıdır" (21) şeklinde ifade edilmiştir.

Genom projesinin 2003 yılında tamamlanması ile hücrelerde gerçekleşen biyolojik süreçler tam olarak anlaşılammış ve buna bağlı olarak da hastalıkları oluşturan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Daha sonra hücrede gerçekleşen olaylar protein ve metabolit düzeyinde incelenerek genomik veriler bütün olarak değerlendirilmeye başlanmıştır. Bu sayılar, yeni biyoteknolojilerin odağını, tek bir gen veya proteinlerin karakterizasyonuna olanak sağlayan yöntemlerden, yaşayan bir organizmada bulunan tüm olası proteinlerin hızlı bir şekilde izlenmesini sağlayan yöntemlere kaydırmıştır (22).

İnsan dâhil olmak üzere birçok organizmanın tam genom dizileri günümüzde bilinmekle birlikte, genlerin çoğunun işlevleri belirsiz kalmıştır. Bu yeni keşfedilmemiş verilerin varlığı, bazı bilim adamları tarafından 21. yüzyılın; post-genomik veya proteomik dönem olarak adlandırılmasına yol açmıştır (16).

Proteomik alanı, protein ekspresyonu ve fonksiyonunun analizi için yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanması hedefleriyle ortaya çıkmıştır. Günümüzde proteomik araştırmalar çeşitlidir ve çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda proteinlerin sistematik olarak belirlenmesine yöneliktir (23).

Proteinlerin hızlı ve aynı anda analizi için etkili metodolojilerin oluşturulmasıyla çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisine yönelik, yeni biyobelirteçler ve terapötik hedeflerin keşfine olanak sağlaması ve genellikle biyolojik süreçlerin mekanik işleyişinin anlaşılması beklenmektedir (24).

Proteomik veriler, hastalık halindeki hücrelerin ve dokuların sınıflandırılmasında ve farklı biyolojik mekanizmaların anlaşılmasında son derece yararlıdır. Hücreler ve organizmalar içindeki tüm proteinlerin yapısı, etkileşimleri ve fonksiyonları, çeşitli yöntemler kullanılarak tanımlanabilir. Bu alan, kanserli hastanın dinamik biyolojisini anlamada klinisyenlere ve bilim adamlarına yardımcı olmak için biyobelirteçler şeklinde önemli biyolojik bilgiler elde etmek amacıyla serum ve dokuya uygulanabilen teknolojiler içermektedir (22).

Belli bir zamanda hücrenin fizyolojik durumu için kanser safhasının ve ilerlemesinin önemli bir biyolojik göstergesi olan biyobelirteçler, kanserin seyrini izlemek ve yeni terapötik ajanların etkinliğini ve güvenliğini ölçmek için en önemli araçlardır (25). Bu biyobelirteçlerin tanımlanması, spesifik protein yollarını hedeflenmesi ve sağlık hizmetlerinin daha iyileştirilmesi için gerekli bilgi proteomik veriler ile sağlanacaktır (16).

Genel olarak, proteomik alanı 3 bölümden oluşmaktadır: Biyolojik numunelerden proteinlerin tanımlanması ve nicel analizi ile ilgili profil oluşturma, yapısal ligand etkileşimleri aracılığıyla tanımlandığı fonksiyonel proteomik ve PTM çalışmalarını içermektedir. Bir protein kompleksinin tüm bileşenlerini tahmin etmek ve belirlemek çok zordur (26). Proteomiklerin amacı, bir organizma veya bir doku tarafından ifade edilen tüm proteinleri tanımlamak ve karakterize etmek, ayrıca spesifik hastalıklarla ilgili biyobelirteçlerin ne olduğunu araştırmaktır. Biyolojik belirteç araştırmasının amacı, hastalık tanısında hedef protein olarak kullanılabilen belirli bir proteini bulmaktır (27).

2.2. Proteomik Araştırma Stratejileri

Kompleks protein karışımlarının kalitatif ve kantitatif analizi, dünya çapında birçok laboratuvarında çalışılan ana konulardan biri haline gelmiştir. Proteomik çalışmalarda, aşağıdan yukarıya (*bottom-up*), yukarıdan aşağıya (*top-down*) ve daha yakın zamanlarda ortaya çıkarılan ortadan-aşağıya (*middle-down*) proteomik de dâhil olmak üzere çeşitli stratejiler kullanılmıştır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Proteomik stratejileri : Aşağıdan yukarıya, ortadan aşağıya ve yukarıdan aşağıya (28).

"Aşağıdan yukarıya" proteomik, kütle spektrometresi (MS) kullanılarak proteolitik parçalamayla amino asit sekanslarının karakterizasyonu aracılığıyla protein tanımlama yöntemidir. Burada ilk olarak, biyolojik örnek, proteinlerin peptid zincirini parçalayan proteolitik enzim (örn. tripsin) tarafından peptid karışımları oluşturmak için tanımlanan bölgelerinden (lizin veya arjinin) parçalanır. Elde edilen karışım, sıvı kromatografisi (LC) ile bileşenlerine ayrılır ve tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ile karakterize edilir (29) 2D jel elektroforez ile yapılan analiz, "Aşağıdan yukarıya" proteomik çalışma stratejisinin örneklerinden biridir; bununla birlikte, protein hakkında daha fazla yapısal bilgi elde etmek ve PTM kombinasyonlarını tespit etmek için, kütle spektrometresi (MS) ile birlikte kullanılır.

5 - 15 kDa aralığındaki büyük peptid fragmanları, nadiren eksprese edilen amino asitlerin veya amino asit kalıntılarının kombinasyonlarının bölünmesiyle üretildiğinde, bu yaklaşım "ortadan aşağı" proteomik olarak adlandırılır. Parçalanma, tripsinden daha az sıklıkta kesen enzim kullanılarak ya da kimyasal parçalama ya da mikrodalga destekli asit hidrolizi gibi yöntemlerle yapılabilir (30, 31).

"Yukarıdan aşağıya" proteomik adı verilen diğer bir strateji ise, herhangi bir parçalama olmaksızın, kompleks biyolojik örneklerden parçalanmamış proteinleri peptidlere ayırmak için kütle spektrometresi temelli analizler kullanır. Bu yaklaşım proteoformların, yani spesifik genetik veya kimyasal modifikasyonlara sahip bir protein formunun tanımlanmasını sağlayabilir (32).

2.3. Proteom Araştırmasında Kullanılan Teknikler

Karmaşıklıklarından dolayı bir seferde tam bir protein setini tanımlayabilen ve miktarı tespit edebilen tek bir metodun bulunmaması, çok hassas ayırma yöntemlerinin MS ile birleşmesi, çoğu proteomik çalışmada bir gerekliliktir. Yüksek ayırımı 2D jel elektroforezi ve ardından yüksek duyarlılıklı MS, son 20 yıldır proteomike en güçlü stratejilerden biridir (33). Bu yaklaşım, 1. boyuta izoelektrik odaklama (IEF) ile izoelektrik noktalarına (pI) göre ve 2. boyutta ise moleküler ağırlıklarına göre proteinlerin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS - PAGE) ile ayrılmasına dayanmaktadır (34). Proteinler ayrıldıktan sonra, farklı boyama protokolleri (Coommassie mavisi, gümüş veya SYPRO - Ruby boyama) ile görselleştirilerek jelden kesilip, parçalanır ve MS ile analiz edilebilir (35).

Tüm proteomun yani proteinin pI dağılımı, moleküler ağırlığına karşı proteinlerin pI'sı çizilerek, sanal 2D jeller olarak ifade edilir. Tüm proteinlerde 2D jel haritası, pI 7.0 civarında bimodal olarak görünür. Çünkü proteinlerin düşük çözünürlüğü ve doğal olarak oluşan amino asitler ile bu pI değerinde proteinin elde edilme olasılığının düşük olmasıdır (36).

Elektroforetik ve kromatografik teknikler, proteomik çalışmalarda kompleks örnekleri ayırmada temel araçlardır. Peptid karışımları, temel olarak farklı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) teknikleri normal faz kromatografisi (NP), iyon değişim kromatografisi (IEX), boyut eleme kromatografisi (SCX), afinite veya ters faz kromatografisi (RP), nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kapiler elektroforez (CE) ile ayrılır. Elektroforetik ve kromatografik tekniklerin kullanılmasının bir avantajı, kompleks protein/peptid karışımlarının fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılmasıdır (37).

Çoğu HPLC ve CE gibi çok boyutlu yaklaşımlarda; proteinler, örnekteki türlerin sayısını arttırmak için geniş bir çözücü yelpazesinde çözündürülüp analizden önce parçalanır. LC bazlı ayırma teknikleri, MS ve yüksek pik kapasitesi ile tercih edilen tekniklerdendir. Ficarro ve arkadaşları, immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) kullanımını ve ardından tüm hücre lizatının tanımlanması için LC-MS' i önermiştir. Bu yöntem kullanılarak 1000'den fazla fosfopeptid tanımlanmıştır. Zayıf anyon değişimi (WAX) kromatografisi ve bunu takiben LC-MS analizleri ile 11000 civarında fosfopeptid tespit edilmiştir. Ayrıca nano ölçekli LC' lerin avantajları aracılığıyla nano-LC-ESI-MS-MS cihazları ile yüksek hassasiyette ve doğrulukta analizler yapılabilmektedir. Boyut - eleme kromatografisi (SEC), ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) ve matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon, uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF/MS), E. coli' den bilinen iki proteinin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılmıştır (38-40).

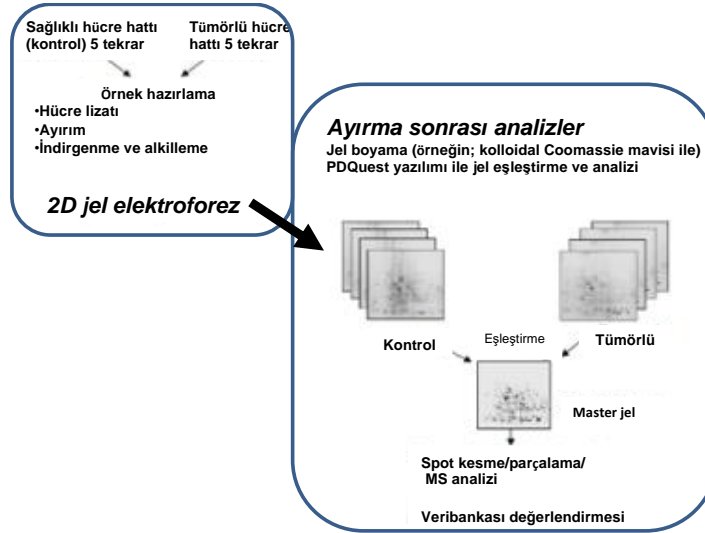
2.4. Jel Temelli Ayırma Yaklaşımları

Tiselius (41) 1937' de, proteinlerin elektroforezini incelemek için yeni bir cihazın kullanıldığı bir çalışma yayınlamıştır. Önerilen cihaz, bir tampon çözeltisine ve her bir ucuna yüklenen elektrotlara sahip U şeklinde bir hücreden oluşmaktadır. Uygulanan numune, yüklü bileşiklerin herhangi bir karışımı olabilir. Elektrik alanı uygulandıktan sonra iyonlar yüklerine bağlı olarak anot veya katoda ilerlemişlerdir. Bu öncü çalışmaya göre, elektroforetik

hareketlilik ve ortamın direnci gibi proteinlerin ayrılması için kullanılan 2 ana parametre ile farklı elektroforez türleri kullanılmıştır (41). Smities ve Poulik (42) 1956'ya kadar, 15' den fazla bileşenin aynı anda görülebileceği iki elektroforetik sürecin birleşimini önermiştir. 1. boyut, serum proteinlerini serbest çözelti hareketliliği ile ayıran bir filtre kâğıdı üzerinde ve 2. boyut ise bir nişasta jeline molekül ağırlığına göre gerçekleştirilmiştir. Ashton (43), serum proteinlerini ayırmak için 1. boyutta agar ve 2. boyutta ise nişasta jeli kullanmıştır.

Raymond ve Aurell (44) 1962'de, serum proteinlerinin ayırımı için farklı derişimlerde akrilamid jeli kullanmışlardır. "Ortogonal jel elektroforezi" olarak adlandırılan akrilamid jelleri 1964' te, şimdiye kadar 2D jel elektroforezde kullanılmıştır. Halen, 2D jel elektroforezi, proteomik çalışmalarda en önemli ve yüksek verimli tekniklerden biridir (45).

Her ne kadar 2D jel elektroforez emek yoğunluğu, düşük verim ve nispeten yüksek miktarda örnek gerektiren bir teknik olarak tanımlansa da çoğu güncel literatür, karmaşık protein karışımlarının ayrılması için hala tercih edildiğini göstermektedir. Aslında, bu teknik şu anda mümkün olan en iyi çözünürlüğü sunar, çünkü proteinleri 2 bağımsız fizikokimyasal parametreye göre ayırır: pI ve kütle. Hatta jeller protein moleküllerini depolayan etkili bir fraksiyon toplayıcısı olarak da görev yapar. Kanser araştırmalarında 2D jel elektroforez şu biçimde uygulanmaktadır. Her bir numune için bir minimum sayı (3 ile 5) 2D jel harita kopyası üretilerek, protein ifadesi 2 farklı numunede (örneğin biri normal ve diğeri patolojik) karşılaştırılır. Boyama ve optik yoğunluk taramasının ardından çalışmaya PDQuest™, Z3, Z4000, Phoretix ve Progenesis gibi ticari olarak mevcut istatistiksel paketlerden biri ile devam edilir. Bu analizlerle, normal ve patolojik numune için 1 tane sanal ana (master) 2D harita üretilir. Aynı yazılım tarafından yapılan analizler, yoğunluklarında ölçülebilir düşük ve yüksek miktarda ifade edilmiş proteinleri tanımlamak için karşılaştırır. Bu protokolda, ana adımlar Şekil 2.5.' de (örneklerin hazırlanması, kontrol ve kanser hücrelerinin analizi 2D jel elektroforez ile ayırımı için örnek hazırlanması, ayrılması, karşılaştırılması, eşleştirilmesi, PDQuest™ yazılımı kullanılarak jel haritalarının oluşturulması ve proteinlerin MS ile karakterizasyonları) şematize edilmiştir (46).



Şekil 2.5. Örneklerin 2D jel elektroforez ile ayırımının şematik gösterimi (46).

2.5. Elektroforez ve Türleri

Elektroforez yöntemi, elektrik akımıyla ve uygun pH' daki tampon çözeltilerde, amino asitlerin, proteinlerin, nükleik asit ve nükleotidlerin; elektrik yüküne, molekül büyüklüğüne ve şekillerine göre ayırımına dayanır (47). Elektroforez, kısaca moleküllerin birbirinden ayrılmasında kullanılan bir tekniktir. Protein çalışmalarında 1937'de ilk kez kullanılan elektroforez yöntemi, serbest çözelti elektroforezi veya frontal elektroforez olarak adlandırılmıştır ve Tiselius (41) tarafından tanımlanmıştır. Günümüzde hala elektroforetik hareketlilikte ve protein - protein etkileşimiyle ilgili araştırmalarda kullanılmaktadır.

Elektroforez yönteminin kullanım alanları; molekül ağırlığı saptama, saflaştırma, saflık kontrolü, genetik hastalıkları saptama, enzim tayini, immünoloji ve moleküler biyolojidir. Popülasyonlardaki genetik varyasyonların hesaplanması, canlılarda çeşitli enzim ve protein seviyeleri, farklı elektroforez türleri ile analiz edilebilmektedir (48). Başlıca 4 çeşit elektroforez türü vardır. Bunlar:

- Kâğıt Elektroforezi
- Selüloz Asetat Elektroforezi
- Jel Elektroforezi
 - Poliakrilamid Jel elektroforezi (PAGE)
 - Agaroz Jel Elektroforezi
- Kapiler Elektroforez

Proteom analizinde 3 ana adım bulunmaktadır: Kompleks protein karışımlarının ayrılması, ayrılan polipeptidlerin karakterizasyonu ve veri tabanı araştırmasıdır. Kompleks protein karışımlarının ayrılması için 2D elektroforez, günümüzde yüzlerce hatta binlerce proteini ayırabilen tek tekniktir. Ancak, proteomik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için birkaç koşulun sağlanması gerekmektedir. Bunlar;

- Belirli bir hücre, doku veya sıvının proteom ekspresyonundaki değişikliklerin güvenilir şekilde saptanmasında 2D referans jel haritalarının oluşturulması ve protein veri tabanlarının oluşturulması için 2D jel haritalarının maksimum tekrarlanabilir olması,
- Maksimum spot sayısını tespit etmek ve bir spottaki çoklu proteinlerin birikmesini veya 2D jellerde spotların çapraz kontaminasyonunu önlemek için optimum ayırıcılık parametrelerinin sağlanması,
- Proteinlerin mikropreparatif ayırma ve saflaştırılması için maksimum yükleme kapasitesi,
- Proteinlerin yüksek verimli analizleri için basitleştirilmiş işlemlerin olması gereklidir.

2.5.1. 2 Boyutlu (2D) Jel Elektroforez

Ayırma işlemlerinde, karmaşık örnekleri analiz edebilmek için daima yüksek duyarlılıkta ayırımlara doğru bir eğilim vardır. Biyolojik örnekler çoğu zaman çok karmaşık olabilmektedir. Proteinler de güçlü bir çökme eğilimine sahip olmaları nedeniyle çok karmaşık analitlerdir.

1970' li yılların başında, 2 yüksek performanslı elektroforetik protein ayırımı mevcuttur:

1. Laemmli (49) tarafından geliştirilen ve SDS varlığında proteinlerin ayrılmasında hala sıklıkla kullanılan zon elektroforez tekniği,
2. Gronow ve Griffith (50) tarafından geliştirilen IEF tekniğidir.

Bu 2 teknikte, tamamen bağımsız ayırma parametreleri kullanıldığından (sırasıyla, moleküler kütle ve pI) kısa bir süre sonra bu teknikler birleştirilmiştir.

İlk başarılı çalışma, 1974' de neredeyse fark edilmemiştir (51). Çünkü IEF jelinde, karışık ve zor bir örnekleme yöntemi kullanılmış ve jeller diğer boyama yöntemlerine göre daha duyarsız olan Coomassie mavisi ile boyanmış ve jelde sadece birkaç nokta gözlenmiştir.

Ancak, O'Farrell' in (8) geliştirdiği teknik 1975' de, yani bir sonraki çalışmada durum tamamen değişmiştir. O'Farrell tekniğinde, proteinlerin 2D-PAGE ile ayrılması için bir teknik geliştirilmiştir. Çözünürlük ve hassasiyet nedeniyle, bu teknik, karmaşık biyolojik kaynaklardan gelen proteinlerin analizi ve tespiti için gülü bir araçtır. Proteinler pI' larına göre 1. boyutta izoelektrik odaklama ile 2. boyutta molekül boyutuna göre sodyum dodesil sülfat (SDS) elektroforezi ile ayrılır. Bu iki parametrenin bağımsız olması nedeniyle, bir jel boyunca neredeyse homojen bir protein lekesi dağılımı elde etmek mümkündür. Bu çalışmada, katodik numune uygulaması yöntemi ve 35-S etiketli proteinlerin oto radyografisi (Özel maddelerle boyanmış moleküllerin ya da molekül parçalarının röntgen ışınlarıyla incelenmesi) kullanılarak yüzlerce farklı nokta gözlenmiştir. Ayrım, IEF (7) veya zon elektroforez (52) vb. kullanılan tek boyutlu tekniklerden çok daha fazladır. Aslında, O'Farrell tekniğinin sonuçları o kadar etkileyici olmuştur ki, birçok biyokimyager bu teknik üzerinde çalışmalarını yoğunlaştırmış ve "İnsan Proteom Projesi" olarak bilinen araştırmaların temelleri atılmıştır (53). Ancak, geliştirilen bu teknikte, tekrarlanabilirlik sorunları gözlenmiştir. Katodik numune uygulamasında, kullanılan taşıyıcı amfolitlerle IEF' de tekrarlanabilirlik düşüktür (54). Bu nedenle tekrarlanabilirliği arttırmak için art arda birkaç jel ile çalışılabilen yöntemler geliştirilmiştir ve günümüzde hala yaygın olarak kullanılmaktadır (55, 56).

Elektroforez yönteminde, moleküllerin elektriksel yüklerinden yararlanır. Bir elektrik alanı altında büyüklük ve yüklerine göre ayrılır. Bir karışım içindeki moleküle etki eden kuvvet (F), molekülün net yükü (q) ve elektriksel alan (E) ile doğru orantılıdır (Formül 2.1.).

$$F = q \cdot E \quad (2.1.)$$

Net yük arttıkça molekülü hareket ettiren kuvvet artacaktır. Aynı kütleye sahip iki molekülden yükü fazla olan elektrik alan altında bulunduğu ortam içerisinde daha hızlı hareket edecektir. Ancak her iki molekül de aynı yüke sahipse sürtünme kuvveti sebebi ile 2 molekülden kütlesi daha büyük olan daha yavaş hareket edecektir. Sürtünme kuvveti, jelin viskozite, porozite gibi fiziksel özelliklerine bağlı bir sürtünme katsayısı (ζ) ile ifade edilebilir.

Moleküllerin kütleleri arttıkça büyüklükleri de artmaktadır ve büyüklüğu artan molekül ilerlerken moleküle etki eden sürtünme kuvveti de artacaktır ve molekülün göç

hızına negatif yönde etki edecektir. Moleküle ait elektroforetik hareketlilik (μ) ve elektrik alanın büyüklüğüne bağlı göç hızı (v) Formül 2.2. ve 2.3.' de verilmiştir:

$$\mu = q / \zeta \quad (2.2.)$$

$$v = E \cdot \mu \quad (2.3.)$$

Molekülün elektroforetik hareketliliği molekülün yük/kütle oranına bağlıdır. Aynı yük/çap oranına sahip 2 farklı molekül, molekül yapısından gelen etkiler ihmal edilirse buldukları ortam içerisinde bir elektrik alan varlığında aynı hızda ilerleyeceklerdir.

Elektroforez ile ayırımın yapılabilmesi için elektrik alanda ilerlemesini engellemeyen ve örnekle reaksiyon vermeyen zemin (jel) seçimi yapılmalıdır (57).

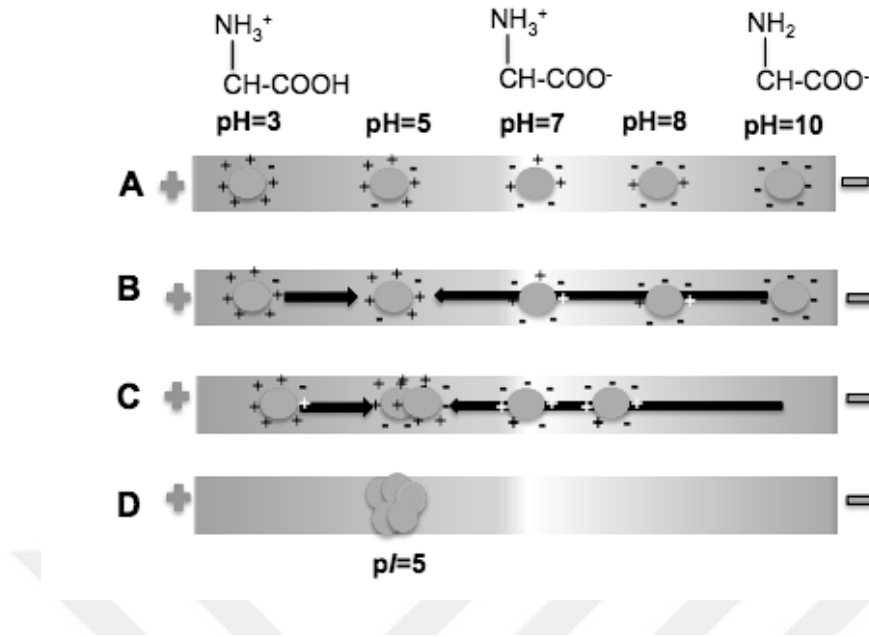
Bir taşıyıcı amfolit tarafından üretilen pH gradyanları ile klasik 2D jel elektroforezi, çözünürlük, tekrar üretilebilirlik ve protein yükleme kapasitesi ile sınırlıdır (7, 8).

Buna karşılık, 2D jel elektroforezdeki immobilize pH gradyan (IPG)' larının, proteom analizinin gerekliliklerine sahip olduğu kanıtlanmıştır. Proteinler ilk olarak pI ' larına göre ve daha sonra Dalton' la ölçülen molekül ağırlığına göre ayrılırlar (58).

'1D' İzoelektrik Odaklama (IEF)

Proteinler aminoasitlerden oluşmaktadır ve dolayısıyla aminoasit zincirlerinin üzerinde bulunan yan gruplar proteinlerin asidik ortamda katyonik yapıda, bazik ortamda ise anyonik yapıda davranmalarına sebep olurlar. Ancak proteinlerin hem anot hem de katot tarafından eşit olarak çekildikleri bir nokta vardır ki bu noktada aminoasit yan zincirlerinin üzerindeki iyonlaşabilen gruplar en üst düzeyde iyonlaştığı halde proteinin toplamına ait net yük sıfırdır. Bu noktadaki pH değeri proteinin pI ' sıdır. Proteinler pI 'larında iken elektrik alan altında hareket etmezler. Bir pH gradienti oluşturulduğunda ortamda, numune içindeki proteinler elektriksel alan altında her biri kendine ait pI ' ya kadar göç eder ve sonra hareketsiz kalır. Bu yöntemde IPG şeritler kullanılır.

IEF, sabit bir pH gradyan ortamında, bir elektrik alanı uygulanarak amfoterik türlerin pI 'larına göre ayrılmasına dayanmaktadır (54). Bir proteinin pI değeri hem net yükün hem de proteinin elektroforetik hareketliliğinin sıfır olduğu pH' dır. Numune, elektrik alanın uygulandığı jel ortamına yerleştirilir. Yüküne bağlı olarak moleküller, pI noktalarına ulaşana kadar jelin içinde göç etmeye başlarlar (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. IEF tekniğinin şematik gösterimi (59).

IEF tarafından ayrılan örnekler başlıca peptidler ve proteinlerdir. Ayrıca, bakteri hücreleri veya amfoterik nanopartiküller gibi diğer yapılar da IEF ile ayrılabilir (60). Kararlı bir pH gradyan ortamına bir protein veya peptid karışımı uygulandığında, jelin pH'ına, elektrolitik ayrışmaya sahip fonksiyonel gruplarına ve diğer moleküller veya iyonlarla etkileşimine bağlı olarak her protein için spesifik bir net yük oluşturulur. Başka bir deyişle, belirli bir pH'da bir proteinin net yükü, protein içindeki mevcut iyonlaşabilir gruplardan gelen tüm yüklerin toplamıdır ve Formül 2.4. ile hesaplanabilir (61):

$$z(\text{pH}) = - \sum_{i \in A^-} \frac{1}{1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{K_i}} + \sum_{i \in A^+} \frac{1}{1 + \frac{K_i}{10^{-\text{pH}}}} \quad (2.4.)$$

Bu denklemde K_i , amino asidin iyonlaşan grubunun iyonlaşma sabitini, A^- ve A^+ ise amino asitlerin negatif ve pozitif yükünü gösterir. Pozitif yük, histidin (H), arjinin (R) ve lizinin (K) N-terminalinin amino asit kalıntıları ile sağlanabilir. Negatif yükler ise aspartik asit (D), sistein (C), tirozin (Y) ve glutamik asidin (E) C-terminalinin amino asit kalıntıları ile verilir.

Proteinin net yükü ve buna karşılık gelen pI'sı, mevcut amino asit kalıntıları (örneğin asitlik veya bazlık ayrışma sabiti) veya asitlik kuvvetine ve protein dizisi içindeki başka amino asitlerle etkileşimlerine bağlıdır. Bir protein bir pH gradyan ortamına yerleştirildiğinde,

elektrik alan varlığında, yüklü proteinler, pH gradyanı boyunca zıt yüklü elektroda göç etmeye zorlanır. Proteinin net yükü, pH gradyentine bağlı olarak göçü sırasında değişir. pI sine eşit bir pH değerine sahip bir ortama ulaşıldığında, protein artık elektrik alanın altında göç etmez (62).

'2D' Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS - PAGE)

2 organik monomer, akrilamid ve çapraz bağlayıcı ajan, N,N'-metilenbisakrilamidin çapraz bağlanmış polimerizasyonu ile oluşturulan bir jel, elektrofrez için uygun bir ortam olarak gösterilmiştir (63). SDS gibi denatüre edici ajanlar, proteinlerin jel elektrofrez ile ayrılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. SDS, proteinler için yüksek afiniteye sahiptir ve protein denatürasyonunu teşvik eder. Ayrıca, negatif yüklü deterjan molekülleri, proteinleri kaplamakta ve doğal yüklerini maskeleymektedir. Bu nedenle, SDS - PAGE ile ayrılan proteinler, yüküne bakmaksızın moleküler ağırlıklarına göre göç eder. SDS - PAGE, büyük ölçekli proteom analizlerinde ayırım açısından yetersizdir. Bu nedenle, başka bir ayırma tekniği olan jel elektrofrezden önce gerçekleştirilir. Protein ayırımını arttırmak için 2D SDS - PAGE geliştirilmiştir (8) ve iki ayırma mekanizmasının birleşiminden oluşmaktadır. Bu teknikte; IEF, proteinlerin ayrılmasının ilk basamağıdır ve 90 derecelik yönde SDS - PAGE ise ikinci basamaktır. Ancak protein tanımlama ve birlikte göç eden proteinlerin analizi hala sınırlıdır. Günümüzde, protein lekesi yani spotlar MS kullanılarak tanımlanmaktadır. IEF' de pH gradyanları ile düşük tekrarlanabilirlik ve zayıf örnek yükleme kapasitesi bir başka sınırlamadır. Bununla birlikte, 1. boyut için sabitlenmiş pH gradyanının (IPG) kullanımı, çözünürlük, tekrarlanabilirlik ve yükleme kapasitesini artırmıştır (64).

Proteinlerin görselleştirilmesindeki (boyama) çeşitli yaklaşımlar, amaca göre optimize edilmiştir. Proteinlerin jellerde görselleştirilmesi için en çok Coomassie mavis ve gümüş boyama gibi kolorimetrik yöntemler kullanılır. Floresan boyalarla daha yüksek hassasiyet ve daha geniş doğrusallık aralığı elde edilebilir (65, 66).

2D görüntü analizi, protein noktalarının istatistiksel değerlendirmesini sağlar. Numuneler arasındaki protein ekspresyonunun farklılığını değerlendirmek için desenleri ve spot yoğunluklarını incelemek için yüksek kalitede ve tekrarlanabilir 2D jeller gereklidir.

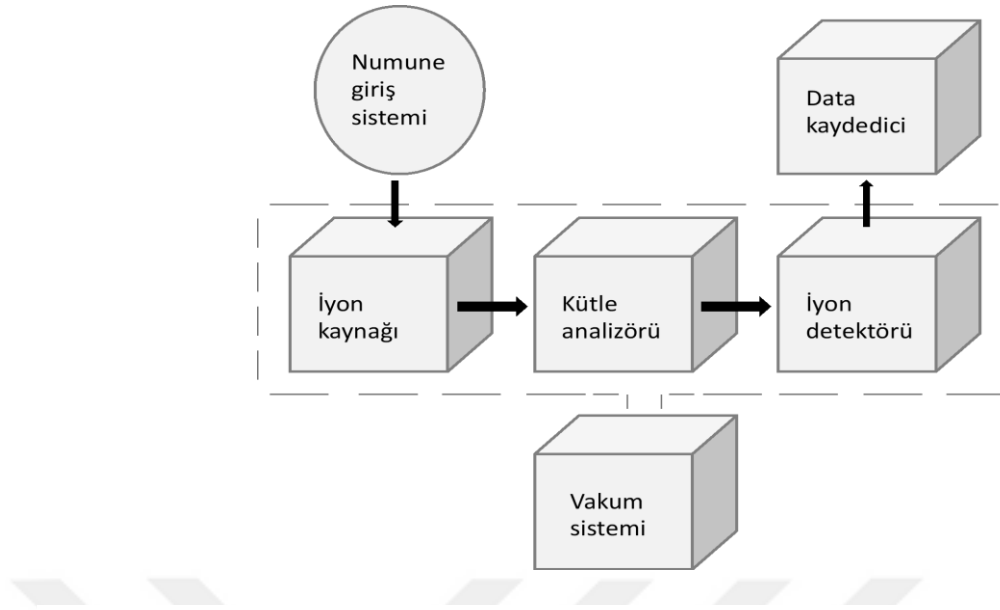
Yazılım otomatik veri işleme için tasarlanmış olsa da, kullanıcı tarafından düzeltme yapılması da gereklidir (67).

2.6. Proteomik Çalışmalarda Kütle Spektrometresinin Yeri ve Önemi

2.6.1. Kütle Spektroskopisi

Kütle spektroskopisi, gaz fazındaki iyonları, kütle analizöründe kütle/yük (m/z) oranına göre ayıran ve her m/z değerindeki iyon sayısını bir dedektör yardımı ile kaydeden analitik bir tekniktir. Moleküller ilk olarak iyonize forma getirilir ve kütle analizörü ile ayrılmadan önce bir iyon kaynağında gaz fazına dönüştürülür (68).

Kütle spektroskopisi, maddelerin elementel bileşimlerinin belirlenmesinde; biyolojik, organik ve inorganik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında; karışım numunelerinin nitel ve nicel analizlerinde, numunedeki atomların izotopik oranlarının saptanmasında kullanılan bir yöntemdir. MS' in kimyasal analizlerde rutin olarak ilk kullanılmaları, 1940' lı yıllarda petrokimya endüstrisinde hidrokarbonların nicel analiziyle başlamıştır. Daha öncelerde bu analiz damıtma ve sonrasında da ayrılan bileşenlerin kırılma indisleri ölçülerek yapılmıştır ve bu analiz, yaklaşık 200 saat gibi bir süre gerektirmektedir. MS ile benzer şekilde yapılan analizler ise birkaç saat gibi bir sürede gerçekleştirilir. Ticari MS' lerin hızla gelişmesinde ve yaygınlaşmasında süre konusu etkili olmuştur. 1950' li yıllarda ticari MS' ler kimyagerler tarafından çoğu organik maddelerin yapı tayininde ve teşhisinde kullanılmıştır. MS' ler, nükleer manyetik rezonans ve infrared spektrometreleri ile birleştirilerek organik maddelerin teşhisinde ve yapı tayininde kullanılmaktadır. 1980' li yıllarda termal olarak kararsız ve uçucu olmayan maddeleri iyonlaştırmak için geliştirilen teknikler de bulunmaktadır. 1990' lı yıllardan beri yeni iyonlaştırma teknikleri geliştirilerek biyolojik materyallerde MS' lerin kullanımı artmıştır. Günümüzde proteinlerin ve polipeptidlerin aydınlatılmasında da MS' ler kullanılmaktadır. Moleküler kütle spektroskopisinde ölçümler için birkaç çeşit cihaz kullanılabilir ve örnek olarak kuadrupol ve uçuş zamanlı spektrometreler verilebilir. MS' in şematik olarak gösterimi Şekil 2.7.' de gösterilmiştir. Giriş sisteminde, μmol düzeyinde numune MS' e verilir ve burada numune, gaz halindeki iyonlara dönüştürülür (69).



Şekil 2.7. Bir MS' in bileşenleri.

2.6.2. Geçmişten Günümüze Proteomik Analizlerde Kütle Spektroskopisi

Kütle spektroskopisi yöntemi analitik teknikler arasında özel bir yere sahiptir, çünkü bir molekülün kütlesini çok yüksek hassasiyetle ölçer ve bu nedenle geniş bir uygulama alanına sahiptir. MS kullanımı, 1980' li yıllarda kullanımına başlanılmış olsa da özellikle 1990' lı yıllardan sonra biyolojik bilimlerde giderek artan bir öneme sahiptir. Kullanımının bu kadar uzun sürmesinin temel nedeni MS ile analiz için yüklü gaz moleküllerinin olması gerekliliğidir (70). Gelişmiş MS teknolojileri, kimya alanında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bu teknik, 1990'ların başlarına kadar peptidler ve proteinler dâhil olmak üzere büyük biyomoleküllerin analizinde etkin bir şekilde kullanılmıyordu. Bu durum ile ilgili asıl soru; kararsız, uçucu olmayan, büyük moleküllerin gaz fazına geçirilmesi ve herhangi bir parçalanma olmadan iyonize forma dönüştürülmesidir (68).

Biyomoleküller büyük ve kutupsal olmakla birlikte, kolayca gaz fazına geçemezler ve iyonize olamazlar. Peptid ve protein analizlerinde duyarlılık, MS kullanımı ile bir pmol (10^{-12} mol) ve fmol (10^{-15} mol) seviyesine kadar artmıştır. Ayrıca yüksek duyarlılık ile birlikte, kütleleri 100 kDa' ya kadar büyük polipeptidlerin analizi de yapılmaktadır (68, 71). Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve MALDI, birçok alanda kullanılan iyonizasyon teknikleridir (70, 71). Kuadrupol, iyon tuzağı, fourier-dönüşüm iyon siklotron rezonansı, orbitrap ve uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF) gibi kütle analizörüne bağlanan her 2 iyon kaynağı (ESI veya

MALDI) proteomik analizlerde önemli hale gelmiştir. MS' ler, birden fazla analizörle, örneğin üçlü kuadropol, kuadropol - TOF ve Tandem TOF ile donatılabilir (68, 72).

Bir protein için elde edilen kütle spektrometrik veriler ile giderek artan popülasyonun gen dizilimlerinin korelasyonunu sağlayan yazılım algoritmaları 1993' den itibaren yayınlanmıştır. Bu gelişmeler ile MS' in fonksiyonel bir genomik teknik haline dönüşmesini sağlamıştır. Son birkaç yıl, protein karakterizasyonu için daha güçlü cihaz ve algoritmalar geliştirilmiştir. Aynı zamanda yüksek duyarlılık için moleküler biyolojinin taleplerini karşılamak üzere MS geliştirilmiş ve proteomik kavramı da popüler hale gelmiştir (26). Bu alanda saflaştırılmış proteinleri incelemek için esas cihaz MS' dir. Proteomik tarihi 1970' li yıllara, yüzlerce ya da binlerce proteinin tek bir jel üzerinde ilk uygulanmasını sağlayan 2D jellerin keşfine dayanır (7, 8). Jeller üzerinde ayrılan lekelerin tanımlanması, zahmetli bir çalışma olmaya 1990' lı yıllarda MS' in yeterince hassas ve sağlam bir teknik haline gelmesine kadar devam etmiştir.

Günümüzde, MS' in proteomik analizlerde 3 ana alanda kullanımı mevcuttur: Biyoteknoloji alanında önemli bir görev olan rekombinant proteinlerin ve diğer makro moleküllerin karakterizasyonu ve kalite kontrolü için tercih edilen tekniktir. Aynı zamanda, proteinlerin tanımlaması için yaygın olarak kullanılır. MS, proteinin moleküler ağırlığını ölçtüğü için, PTM' lerin tespiti ve karakterizasyonu için tercih edilen bir yöntemdir ve potansiyel olarak bir proteinin kütlelerini değiştiren herhangi bir kovalent modifikasyonu tanımlayabilir (69).

Şimdiye kadar proteinler, zaman alıcı bir yöntem olan otomatik Edman yıkımı ile dizilenmiştir (73). Peptid dizileme yöntemi (PMF)' nin gelişimi, protein analizinin hızını önemli ölçüde artırmıştır. Analiz edilen protein, spesifik bir proteaz ile proteolizden sonra, protein amino asit dizisine göre bir peptid seti üretir. Bu peptidler daha sonra bir dizi veri tabanından türetilen teorik kütleler ile karşılaştırılır. Bu yaklaşımın avantajı, analiz için çok az miktarda materyale ihtiyaç duyulması ve proteinlerin çok hızlı tanımlanmasının mümkün olmasıdır. Ancak protein dizisinin, yaygın olarak kullanılan yazılım (örneğin MASCOT) tarafından belirlenecek veri tabanında bulunması ve protein karışımının analizi karmaşık hale getirmesi nedeniyle protein numunesinin nispeten homojen olması gerekmektedir (74).

Seçilen peptidlerin parçalanma spektrumları, iki analizör (*tandem-in-space MS*) içeren Tandem MS ile verilir. Birinci kütle analizörü, bir çarpışma hücresinde parçalanmış olan bir öncül iyonunu ayırır. Parçalanma ürünleri kütle analizi için ikinci bir analizöre iletilir. Tandem MS, üçlü kuadropol, kuadropol-TOF ve Tandem TOF cihazları ile analiz gerçekleştirilir. Düşük enerjili çarpışma kaynaklı ayrışma (CID), amid bağında yarıma sonucu oluşan peptid fragmanlarını oluşturmak için en sık kullanılan bir yöntemdir. CID' deki parçalanma, bir çarpışma hücresinde helyum veya argon gibi inert bir gazın atomları ile öncü iyonlarının çarpışmalarıyla gerçekleştirilir. Elektron transferi ayrışması, kullanılan anyon moleküllerinin (antrasen gibi) reaksiyona girdiği ve bir elektronu peptid iyonuna transfer ettiği başka bir ayrışma tekniğidir. Aktarılan elektron, peptid omurgasının rastgele ayrışmasına neden olur (75). Peptidlerin parçalanma spektrumları, çeşitli veri tabanlarındaki parçalanma modelleri ile karşılaştırılır. Tandem MS kullanımı, kompleks karışımlardaki proteinlerin tanımlanmasını sağlar. Yüksek kaliteli MS/MS spektrumları ile bilinmeyen proteinin tanımlanması De Novo peptid dizilemesi ile mümkündür (68, 76).

2.6.3. İyonlaştırma Yöntemleri

Numune sisteme giriş yaptıktan sonra ilk gerçekleşen işlem, iyonlaştırma işlemidir. İyon kaynakları, analiz edilecek maddenin türüne ve analizde istenilen bilgilere göre seçilmektedir. İyonlaştırma farklı kaynaklarla sağlanabilmektedir. Bunlar iyonlaştırma türüne göre elektriksel ark (kıvılcım), elektronlar, fotonlar, ısı veya kimyasal reaksiyonlar olabilir.

İyon kaynakları, gaz faz ve desorpsiyon iyon kaynakları şeklinde 2 grupta incelenebilir. Gaz fazlı iyon kaynaklarında, önce numune buharlaştırılır sonra iyonize edilir. Desorpsiyon iyon kaynaklarında ise sıvı veya katı haldeki numune direkt gaz fazında iyonlara dönüştürülür. Elektron bombardımanı, kimyasal iyonlaştırma, alan iyonizasyonu gaz fazında iyon kaynaklarına sınıfına girerken; alan desorpsiyonu, ESI, MALDI, hızlı atom bombardımanı, termosprey iyonizasyonu ise desorpsiyon iyon kaynaklarına sınıfına girmektedir. Uçucu olmayan ve ısıya dayanıksız bileşiklere kolaylıkla uygulanabilen desorpsiyon kaynakları, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında büyük bir avantaja sahiptir (77).

Bu iyon kaynaklarından ESI' in kullanımı oldukça yaygındır. Omiks çalışmalarda oligonükleotidlerin, polipeptitlerin, proteinlerin ve metabolitlerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. MALDI, nispeten diğer iyonlaştırma yöntemlerine göre daha yeni olup, peptid ve proteinlerin analizinde kullanılmaktadır (78, 79).

ESI, büyük polar moleküllerin parçalanmadan iyonlaştırılmasında kullanılan yumuşak (*soft*) iyonizasyon tekniğidir. Bu iyonizasyon tekniğinde, üzerine potansiyel uygulanan çok küçük metal bir kapilerden çözeltinin sabit bir hacimde geçmesi sağlanır. Çıkış yönündeki levha ile kapiler arasında yüksek bir potansiyel fark oluşturulur. Elektriksel alan ile yüklü sıvı kapilerin ucunda Taylor konisi adı verilen bir koni oluşturur. Koninin ucunda oluşan damlacıklar, MS' in girişine taşınırlar. Bu damlacıklar kendilerine doğru gelen azot gazı ile karşılaşarak buharlaşırlar. Küçülen taneciklerdeki moleküller birbirlerini iterek daha küçük tanecikler oluşturur. Nihayetinde çözücü tamamen buharlaştığında, taneciğin üzerindeki yük moleküllere aktarılır ve iyonlar kütle analizörüne doğru hareket ederler.

2.6.4. MALDI (Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon)

MALDI - MS, gaz fazında protonlanmış iyonlar üreten ve analitin moleküler ağırlığını tayin etmek için kullanılan bir tekniktir. MALDI, yumuşak bir iyonizasyon tekniği olarak kabul edilir, yani analit moleküllerinden az sayıda fragment (parçalanma ürünü) oluşumu ile analizi sağlar. Bu nedenle, nükleik asitler ve proteinler gibi biyomoleküller dahil olmak üzere çok çeşitli numunelerin analizi için yaygın bir teknik haline gelmiştir. MALDI' nin TOF ile birleşimi ile oluşan MALDI-TOF-MS sistemi, genomik ve proteomik araştırmalar için basit, duyarlı ve hızlı bir tekniktir (80).

Karas & Hillenkamp (81) tarafından 1980'lerin sonunda geliştirilen MALDI, 2 "yumuşak iyonizasyon" yönteminden biridir. Gaz fazı, protonlanmış moleküller üretmek için, matriks materyali ve analit molekülleri içeren karışımın bir miktarı, metal bir plaka üzerine pipetlenir ve kristalizasyonu sağlanır. Daha sonra, nano saniye lazer darbeleriyle (genellikle 337 nm dalga boyuna sahip küçük nitrojen lazerler kullanılır) peptidler iyonize edilerek gaz fazına geçer. Tipik olarak kullanılan matriks, lazerin dalga boyunda absorbanı olan küçük bir organik moleküldür. Biyomoleküller ile çalışıldığında α -siyano-4-hidroksisinnamik asit veya dihidrobenzoik asit matriksleri kullanılır. Matriksler, desorpsiyon ve iyonizasyon sırasında

biyomoleküllere verdikleri enerji miktarına ve dolayısıyla neden oldukları parçalanma derecesine göre değişir (82).

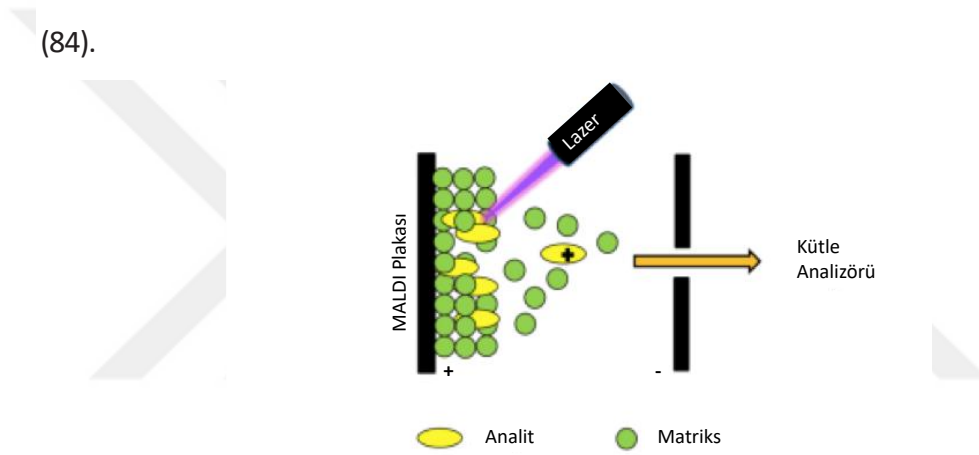
MALDI' de iyonizasyon işleminin kesin doğası hala büyük ölçüde bilinmemektedir ve sinyal yoğunlukları peptidlerin kristallere dahil edilmesine, desorpsiyon işlemi sırasında bir protonun yakalanma ihtimaline ve peptid karışımlarında baskılayıcı etkileri dâhil olmak üzere bir dizi başka faktöre bağlıdır. Peptid karışımlarında örneğin; bir C-terminali arjinine sahip peptidler, genellikle bir C-terminali lizin ile peptidlerden daha yüksek sinyallere yol açar. Bu nedenlerden dolayı, bir iç standart kullanılmadıkça peptid pik yüksekliğini mevcut örnek miktarı ile ilişkilendirmek zordur (83).

MALDI deneylerinde numune, matriks ile karıştırılır. Sıvı matriks - numune karışımı, Şekil 2.8.' de gösterildiği gibi, çelik MALDI plakası üzerine tatbik edilir ve hava ile kurutulur. Çoğu MALDI matriksi, kullanılan lazerin optimal ışık emilimini gösteren konjuge zayıf organik asitlerdir (84). Yaygın MALDI-MS lazerleri ultraviyole bölgede farklı dalga boylarında (örneğin 337 nm' de azot lazerler, 355 nm' de Nd YAG lazerler gibi) veya yaklaşık 3 µM dalga boyunda infrared kullanılmıştır (85). Numune lazer kullanılarak birkaç nano saniyede bir seferde ışınlanır. Matriks, lazer ışığını elektronik geçişlerle absorbe eder ve bu da hızlı ısınmaya neden olup matriks - numune karışımının gaz fazına dönüşmesine neden olur (86). Matriksin 2 temel görevi vardır: Desorpsiyonu sağlamak için lazer enerjisini emerken; diğer görevi ise iyonizasyon için numuneye aktarılan bir H⁺ iyonları kaynağı olmaktır. İyonlar, farklı kütledeki iyonların, iyon kaynağından dedektöre ilerleme sürelerini ölçen bir TOF kütle analizörüne girer. Genellikle iyonlar, iyon kaynağı ve dedektör arasındaki eşit potansiyel farkı kullanılarak hızlandırılır. İyonlara itme gücü, hızlanma potansiyeli farkı ile verildiğinden, benzer iyonlar benzer kinetik enerji kazanır ve iyonların hızı, bu nedenle, m/z oranı ile belirlenir. Bu tez çalışması kapsamında kullanılan MALDI-TOF/TOF-MS cihazının şematik diyagramı Şekil 2.9.' da gösterilmiştir.

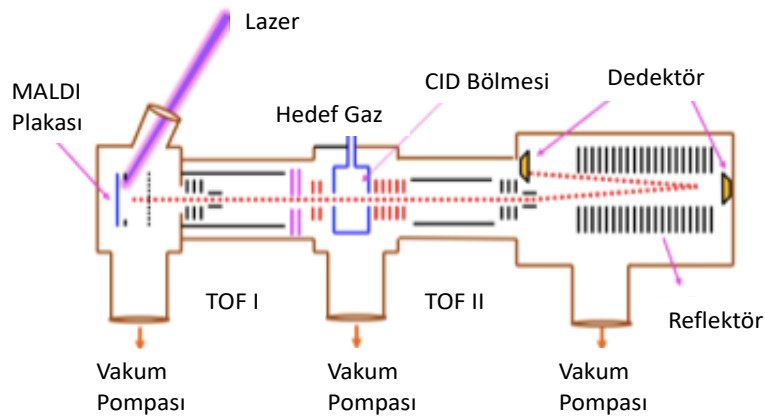
Cihazda daha hafif iyonlar daha hızlı ilerler ve dedektöre ağır iyonlardan daha erken ulaşırlar. Dedektöre ulaşmak için belirli bir m/z değerindeki iyonunun aldığı zaman daha sonra bir kütleyle dönüştürülür ve iyonların sayı/şiddeti değerine karşı grafiğe geçirilir. Bununla birlikte, bazı durumlarda, iyon kaynağında üretilen ve TOF analizöründe hızlanan aynı m/z değerindeki iyonlar, tam olarak aynı zamanda harekete başlamayabilir ve aynı

kinetik enerjilere sahip olmayabilir. Bu durum, aynı m/z değerindeki iyonların dedektöre farklı zamanlarda ulaşması ile sonuçlanır, pik genişlemesine ve düşük ayırım gücüne yol açar.

Bu farklılıkları önlemek için reflektör gibi çeşitli çözümler geliştirilmiştir. Reflektör, uçuş borusunda uçuş yönünde hareket eden iyonları, uçuş yolunun tersine çeviren, artan elektrik alanlı bir dizi levhadan oluşan uçuş tüpünün sonunda bir optik iyon "aynası" dır. Farklı kinetik enerjilerle sahip aynı m/z değerindeki iyonlar, yansıtıcıya farklı derinliklere nüfuz eder, ilk önce yansıtıcıya gelen ve iyonlardan daha derine giren yüksek kinetik enerji iyonları daha az kinetik enerjiye sahip olur. Yüksek kinetik enerji iyonlarının artan uçuş yolu, aynı m/z değerindeki iyonlarının ve farklı başlangıçtaki kinetik enerjilerin hareket etmesine ve dedektöre aynı anda ulaşmasına izin vererek, kütle çözünürlüğünü etkin bir şekilde artırır (84).



Şekil 2.8. MALDI lazer desorpsiyon süreci (87).



Şekil 2.9. MALDI-TOF/TOF-MS' in şematik diyagramı (87).

2.6.5. Peptid Dizileme Çalışmaları ve De Novo Dizileme

Proteomik çalışmalarda, tripsinle parçalanmış proteinlerden elde edilen peptidlerin kütlesi MALDI-TOF-MS veya ESI-TOF-MS ile tespit edilir. Peptidlere ait kütle değerleri proteinlerle ilgili veri tabanlarında bilinen proteinlerin peptidlerine ait değerleri ile karşılaştırarak protein analizlerinin gerçekleştirilmesine peptid dizileme çalışmaları kütle parmak izi denilmektedir.

Bu yöntemde, enzimatik olarak parçalanmış bir proteinden bir "kütle parmak izi" tripsin gibi bir dizi spesifik proteaz ile elde edilir. Tipik olarak MALDI-TOF ile elde edilen bu kütleler kümesi, daha sonra veri tabanındaki her bir giriş için teorik olarak beklenen triptik peptid kütleleri ile karşılaştırılır. Proteinler, peptid eşleşmelerinin sayısına göre sıralanabilir. Daha karmaşık skorlama algoritmaları, kütle doğruluğunu ve protein dizisinin yüzdesini hesaba katmakta ve analiz için bir güven düzeyi hesaplamaya çalışmaktadır (88-90).

Peptid kütesinin ölçümünde elde edilen doğruluk, araştırmanın özgünlüğünü büyük ölçüde etkiler (82, 91). Yüksek kütle hassasiyeti (10 - 50 ppm) elde edildiğinde, kural olarak en az 5 peptid kütesinin proteine eşleşmesi ve protein dizisinin % 15' nin net bir tanımlamayı kapsamaması gerekir. Bir eşleşme bulunmasından sonra, muhtemel modifikasyonları dikkate alarak, kalan peptidleri veri tabanı sırası ile ilişkilendirmek için bir 2. geçiş araştırması gerçekleştirilir. Kütle parmak izi ayrıca, kabaca benzer miktarda birkaç proteinden oluşan basit protein karışımlarını da çözebilir. Örneğin, veri tabanları ile kesin olmayan bir eşleşme ile ilişkili peptidler tekrar araştırılabilir (92). Genel olarak, tek bir protein bileşeninin hızlı bir şekilde tanımlanması için peptid parmak izi kullanılır.

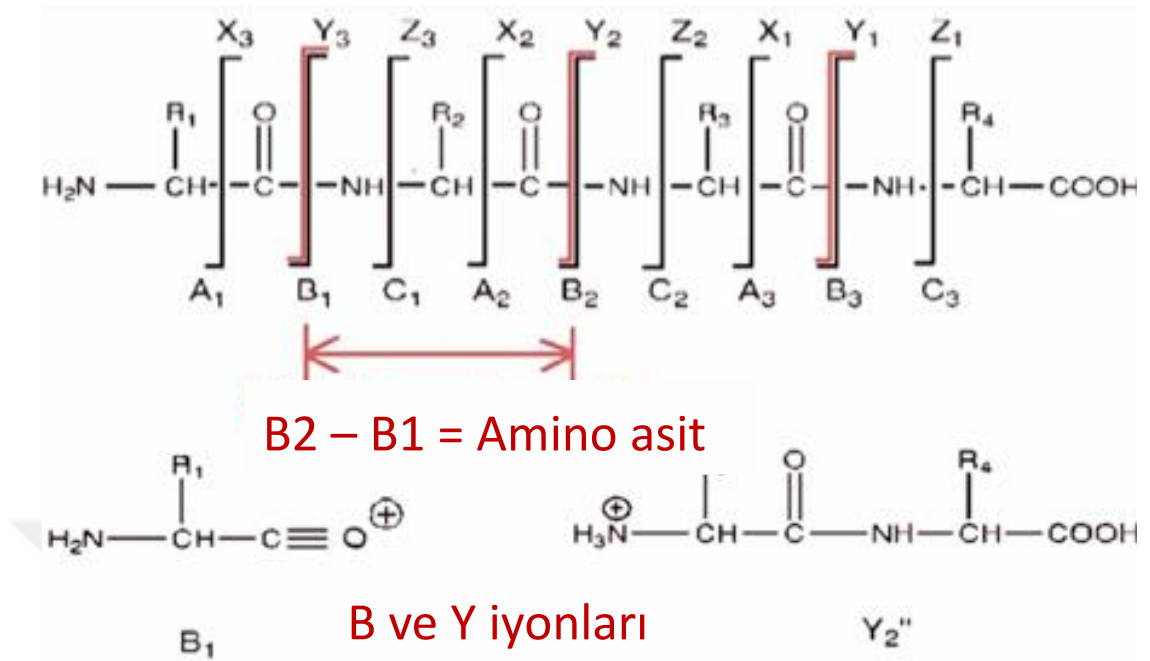
De Novo peptid dizilimi genellikle Tandem MS gerektirir. Bu teknikte, belirli bir parent (*precursor*) iyonu bir MS'de seçilir ve daha sonra çarpışmalarla ayrılır. Ortaya çıkan ürün (*doughter, product*) iyonları için m/z değerleri ikinci bir MS' de ölçülür (93).

Proteinler ve peptidler ($\text{NH}_2\text{-C}\alpha\text{RH-COOH}$), iki amino asit arasındaki peptid bağları (C-N bağları) ile birleştirilen amino asit zincirleridir. MS/MS'de parçalanma, 3 bileşenli omurga bağlarından birini veya daha fazlasını hedefler: C-N (peptid bağı), $\text{C}\alpha\text{-C}$ ve N- $\text{C}\alpha$. MS/MS spektrumlarının yorumlanması, esas olarak, bu bağların parçalanmasıyla oluşturulan diziyeye spesifik fragman iyonlarının analizine dayanır. Fragman iyon tipi, parçalanmış omurga bağının tipine ve fragmanın içerdiği terminale bağlı olarak bir harf ile tanımlanır (93).

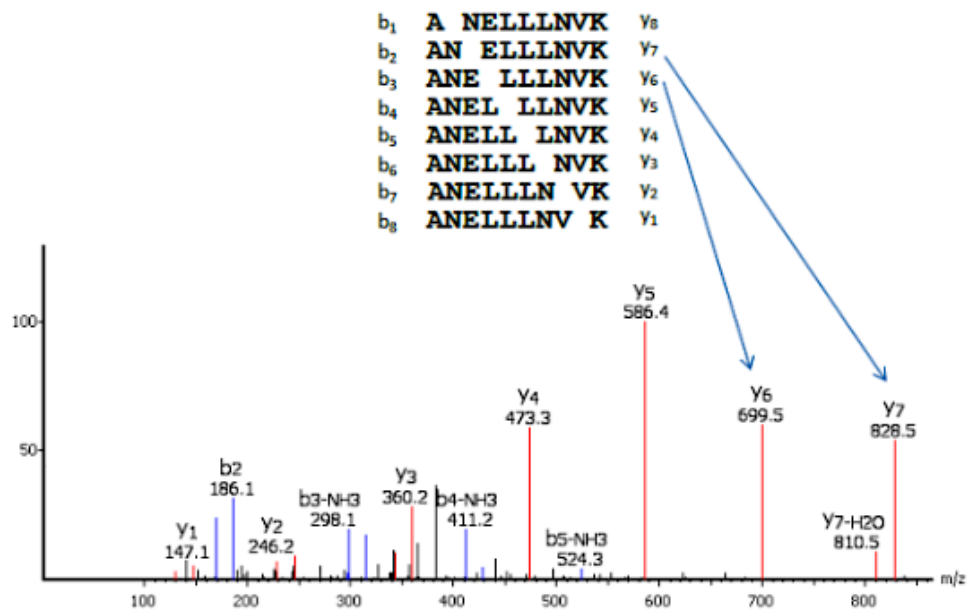
Her bir bağ kırılması, biri nötr diğeri yüklü olan 2 türe neden olur ve sadece yüklü türler MS ile saptanır. Yük, her 2 türün kimyasına ve proton afinitesine bağlı olarak kalabilir. Bu nedenle, her bir amino asit kalıntısı için 6 olası parçalanma iyonu vardır ve bunlar Şekil 2.10.' da olduğu gibi etiketlenir. N - terminal fragmanında tutulan yüke sahip olan a, b ve c iyonları ve C-terminal fragmanında tutulan yüke sahip olan x, y ve z iyonlarıdır. En yaygın ayrılma bölgeleri b veya y iyonlarına yol açan CO-NH bağlarında bulunur. Bitişik iki b veya y iyon arasındaki kütle farkı, R ile gösterilen 20 çeşit amino asitten (Tablo 2.1.) birini gösterir. ANELLVNK peptidinin Tandem MS ile analizi sonucunda elde edilen b ve y iyonlarını gösteren spektrum Şekil 2.11.' de verilmiştir (93).

Tablo 2.1. Amino asit tablosu (93).

Amino Asit	Tek Harfli Sembol	Üç Harfli Sembol	Kapalı Formül	Kütle (Da)
Alanin	A	Ala	-NH.CH.(CH ₃).CO-	71.0
Arjinin	R	Arg	-NH.CH.[(CH ₂) ₃ .NH.C(NH).NH ₂].CO-	156.1
Asparagin	N	Asn	-NH.CH.(CH ₂ CONH ₂).CO-	114.0
Aspartik asit	D	Asp	-NH.CH.(CH ₂ COOH).CO-	115.0
Sistein	F	Cys	-NH.CH.(CH ₂ SH).CO-	103.0
Glutamik asit	E	Gln	-NH.CH.(CH ₂ CH ₂ CONH ₂).CO-	128.1
Glutamin	Q	Glu	-NH.CH.(CH ₂ CH ₂ COOH).CO-	129.0
Glisin	G	Gly	-NH.CH ₂ .CO-	57.0
Histidin	H	His	-NH.CH.(CH ₂ C ₃ H ₃ N ₂).CO-	137.1
İzolösin	I	Ile	-NH.CH.[CH.(CH ₃)CH ₂ .CH ₃].CO-	113.1
Lösin	L	Leu	-NH.CH.[CH ₂ CH(CH ₃) ₂].CO-	113.1
Lizin	K	Lys	-NH.CH.[(CH ₂) ₄ NH ₂].CO-	128.1
Metiyonin	M	Met	-NH.CH.[(CH ₂) ₂ .SCH ₃].CO-	131.0
Fenilalanin	F	Phe	-NH.CH.(CH ₂ Ph).CO-	147.1
Pirolin	P	Pro	-NH.(CH ₂) ₃ .CH.CO-	97.1
Serin	S	Ser	-NH.CH.(CH ₂ OH).CO-	87.0
Treonin	T	Thr	-NH.CH.[CH(OH)CH ₃].CO-	101.0
Triptofan	W	Trp	-NH.CH.[CH ₂ .C ₈ H ₆ N].CO-	186.1
Tirozin	Y	Tyr	-NH.CH.[(CH ₂).C ₆ H ₄ .OH].CO-	163.1
Valin	V	Val	-NH.CH.[CH(CH ₃) ₂].CO-	99.1



Şekil 2.10. Peptid omurgasının parçalanması; b ve y iyonları (93).



Şekil 2.11. ANELLLVNK peptidinin Tandem MS ile analizi sonucunda elde edilen b ve y iyonlarını gösteren spektrum (94).

2.6.6. Veri Bankalarının Araştırılması ve Protein Modifikasyonları

Peptid dizileme ve De Novo dizileme çalışmalarında kullanılmak üzere geliştirilmiş birçok ticari yazılım ve internet üzerinden erişilebilen veri tabanları bulunmaktadır. SwissProt, UniProt, NCBI, MASCOT gibi veri tabanları proteomik çalışmalarda kullanılmaktadır.

Protein modifikasyonları tanımlanmaya engel teşkil etmez. Triptik parçalanma ile oluşturulan peptid karışımından sadece birkaçı modifiye edilir. Özellikle Tandem MS' den gelen veriler söz konusu olduğunda, veri tabanında benzersiz bir eşleşme için sadece az sayıda peptid gereklidir ve veri bankaları ile tarama yapılırken modifikasyonlar da bulunabilir. Örneğin bir fosfopeptid, veri bankasındaki bir peptid dizisine, fosfo grubu (80 Da) ilavesiyle ek bir kütle artışı oluşabilir (89).

2.7. Kanser ve Proteomik

Kanser, DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Hücre veya doku seviyelerinde genetik, genomik ve epigenetik değişikliklerin neden olduğu proliferasyon (çoğalma) ve apoptoz (programlı hücre ölümü) gibi hücre davranışlarını kontrol eden normal hücresel sinyal ağlarının düzensizleşmesinden kaynaklanan çok yönlü bir hastalıktır (95).

Günümüzde pek çok kanser türü mevcuttur. Kanser akciğerlerde, memede, kolonda ve hatta kanda başlayabilir. Kanser türleri bazı açılardan aynı olmalarına rağmen büyüdüklerinde ve yayıldıklarında farklılaşırlar.

Vücudumuzdaki her bir hücrenin belirli bir işlevi vardır. Normal hücreler düzenli bir şekilde bölünürler. Yıprandıklarında veya hasar gördüklerinde ölürler ve yeni hücreler oluşur. Kanser, hücrelerin kontrolden çıkmaya başladığında ortaya çıkar. Kanser hücreleri büyümeye ve yeni hücreler oluşturmaya devam edip normal hücreleri dışlarlar. Böylece kanserin başladığı bölgede sorunlar oluşur. Kanser hücreleri ayrıca başladığı bölge dışındaki vücudun diğer bölgelerine de yayılabilir. Örneğin, akciğerdeki kanser hücreleri kemiklere gidebilir ve orada büyüyebilir. Kanser hücrelerinin yayılmasına "metastaz" denir. Akciğer kanseri kemiklere yayıldığında, buna hala akciğer kanseri denir. Bazı kanserler diğerlerine göre daha hızlı büyür, yayılır ve tedaviye farklı yollarla cevap verirler. Bazı kanser türleri ameliyatla tedavi edilirken diğerleri kemoterapi denilen ilaçlarla veya radyoterapi ile tedavi edilir (96).

Her yıl on bir milyondan fazla kişiye kanser teşhisi konmaktadır ve 2020 yılına kadar her yıl on altı milyon yeni vaka olacağı tahmin edilmektedir. 2005 yılında dünya çapında toplam elli sekiz milyon ölümün, % 13' ü kanser nedenlidir. Dünyada kanser kaynaklı ölümlerin artmaya devam edeceği tahmin edilmektedir (25).

Kanser nedeniyle ölüm, aslında mevcut ilaçların yokluğundan kaynaklanmaz, çok gecikmiş evrelerde kanser tanısının konmasından kaynaklanır (97). Erken teşhis ve tedavi, onkologların ve kanser biyologlarının amaçlarından biridir (98). Hücresel davranışı genler kontrol etse de proteinler de bu mekanizmalar üzerinde etkilidir, ayrıca protein ifadesi ve aktivitesi, sağlık ya da hastalığın moleküler temelini içerir. Spesifik olarak kanser ile ilgili olarak tanımlanan proteinler, tümörün büyümesini, yayılmasını (invazyonu), metastazı, çevreleyen hücrelerle etkileşimi ve tedaviye yanıtı yönlendirir (99). Kanserdeki hücre döngüsü, gen ağı da dahil olmak üzere protein sinyal ağındaki değişikliklerin ortaya çıkarılması, karsinogenezin, kanser ilerlemesinin ve metastazın moleküler mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olur ve böylece farklı kanserler ve spesifik kanser alt tipleri için benzersiz olan karakteristik sinyalleşme ağını tanımlar. Sinyal ağı değişiklikleri, genetik, epigenetik ve çevresel değişikliklerden kaynaklanan karsinogenezin her aşamasında birikmekte ve çok aşamalı bir karsinogenez modeli olarak görülmektedir (95).

Onkoproteomik, kanser hücresindeki protein etkileşimlerini inceleyen proteomik teknolojilerin kullanıldığı proteomiklerin bir koludur. Kanser patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamak, tanı için yeni tümör biyobelirteçleri geliştirmek, proteomik veriler aracılığıyla hastalığın erken tespit ve tanısını sağlamak proteomik uygulamalardaki amaçlardır. Onkoproteomik, kanserle ilgili tüm protein ağı, terapötik etkinliğin ve toksisitenin gerçek zamanlı değerlendirmesi, prognoz ve ilaç direnci ile ilişkili kanser-protein ağındaki değişikliklere dayalı tedaviyi hedefleyerek, terapötik kombinasyonların seçimini bireyselleştiren, kanser teşhisi ve histopatolojisinin tamamlayıcısı olan proteomik çalışmalar klinik çalışmalarda önemli bir yere sahiptir (25).

Kansellere yönelik mevcut olan tarama testlerinin çoğu, genel popülasyonun taranmasında yararlı olacak yüksek duyarlılık ve spesifiktikten yoksundur, bu yüzden bazı iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) tümörler arasındaki farklılaşma, hala klinik bir sorundur. Onkoproteomiğin ortaya çıkışı ile tarama, erken tanı ve tedaviye cevabın

öngörülmesinde kullanılmak üzere yeni biyobelirteçleri keşfetme umudu sağlanmıştır. Normal hücreler gibi, çoğu kanser hücresi hayatta kalabilmek için kritik olan fonksiyonlarının bakım ve canlılığını sağlamak için çoklu hücre içi sinyal yollarını kullanır. Bu nedenle, hücre fonksiyonuna, hayatta kalmaya, proliferasyona ve reseptör ekspresyonuna entegre olan hücresel yollar, terapötik müdahale için potansiyel hedeflerdir. Klinisyenler, bireysel olarak hastanın proteomik profili temelinde, moleküler hedefli ajanların ve diğer tedavilerin kombinasyonlarını önerebilirler (25).

2.7.1. Kolon Kanseri

Kolon ve rektum, sindirim sisteminin parçalarıdır. Kolon, besin bileşenlerini artıklardan ayırarak (su ve mineralleri alınan gıdalardan ayırır), atıkları feçes ile atılincaya kadar depolama işlevine sahiptir (100). Uzun tüp şeklinde kas yapısına sahip, bu 2 kısım kalın bağırsağı oluşturmaktadır. Rektumun son 20 cm' lik kısmı olan kolon ise ince bağırsaklara kadar olan kısımdır. Kolonun boyu yaklaşık 180 - 190 cm, rektumun boyu ise yaklaşık 20 - 25 cm' dir.

Kolorektal kanser bir kalın bağırsak hastalığı olup erkekler ve kadınlarda en sık karşılaşılan kanserler arasında yer almaktadır. (100).

Kanser, yaşamın temel birimi olan hücrede başlar. Sağlıklı insanlarda, hücrelerin büyümesi ve çoğalması vücudun ihtiyaçlarına göre kontrol altındadır. Bu süreç yaşamın sağlıklı bir şekilde sürmesini sağlamaktadır. Bazen hücreler kontrol dışı bir şekilde büyümeye ve çoğalmaya başlar. Bu durumda büyüme ve çoğalmanın bulunduğu bölgelerde anormal bir oluşum görülür, buna "tümör" denir. Kolonda başlayan kansere kolon kanseri, rektumda başlayan kansere ise rektum kanseri denir. Kolon veya rektumda oluşan tümörlere kolorektal kanser de denilmektedir (100).

Kolorektal kanserlerin en sık görülen belirtileri şunlardır;

- Bağırsakların çalışma düzeninde ishal-kabızlık gibi değişikliklerin ortaya çıkması ve bu değişikliklerin 1-2 günden uzun sürmesi,
- Bağırsakta tam boşalmama hissi,
- Dışkıda kan (koyu ya da parlak kırmızı) veya dışkı renginde koyulaşma,
- Karında kramp tarzında ağrı, şişkinlik veya gaz şikâyeti,

- Sebebi bilinmeyen kilo kaybı,
- Sürekli yorgunluk.

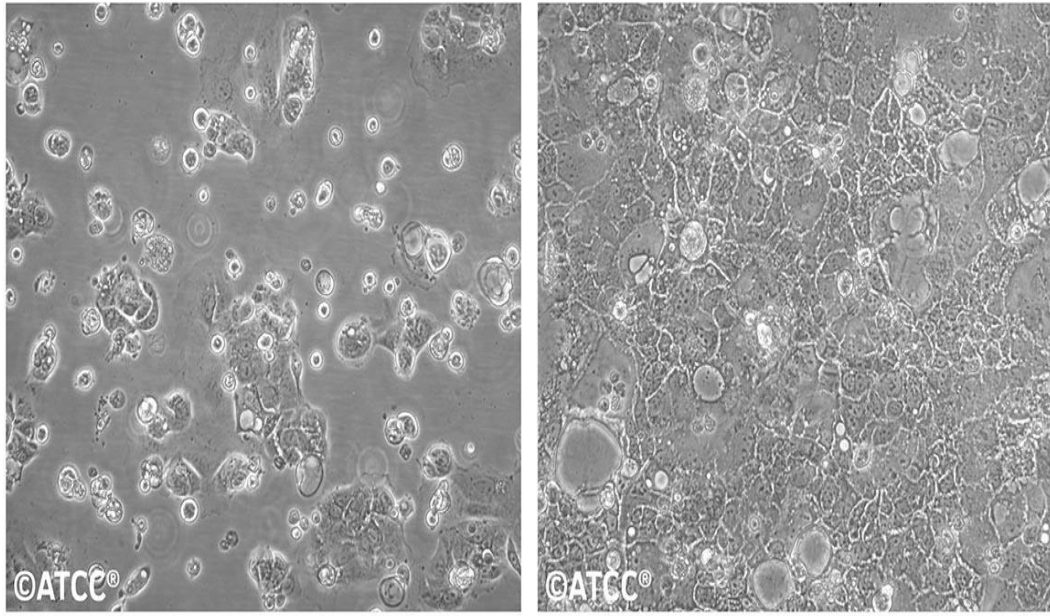
Diğer kanserlerde olduğu gibi kolon kanserleri de iyice büyüyene kadar belirti vermezler. Bu nedenle amaç, daha kanserde belirti yokken tümörü belirlemek olmalıdır. Taramada ülkemizde “gizli kan testi” uygulanmakta ve bu testi, 50 - 69 yaş arasındaki herkesin 2 yılda bir yaptırması önerilmektedir (96, 101-103).

Bu tez çalışması kapsamında Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücreleri ile çalışılmıştır. Kanser tedavisinde kullanılacak bitkisel temelli kemoterapotik ilaç olarak düşünülen ABS’ nin hastalara veriliş yolları araştırılmış, invaziv ve oral yolla olabileceği düşünülmüştür. ABS’ nin enterik kaplı kapsül dozaj şeklinin geliştirilmesi ile kanser hastaları hastaneye gitmeden oral yoldan kolaylıkla alabileceklerdir. Enterik kaplı kapsül, hedef organ olan bağırsakta açıldığı için kolon kanseri hücreleri üzerinde etki gösterebilecektir. Ayrıca solid kanser türünden olan kolon kanseri tedavisinde operasyonel işlemlerde invaziv olarak direk kitle içine enjekte edilebilecektir. Bu nedenlerle ABS’ nin antineoplastik etkisinin araştırılması için kolon kanseri hücreleri seçilmiştir. Kolon kanseri hücrelerinden de ABS’ nin cinsiyete bağlı bir etkisinin olup olmadığını araştırmak içinde erkek kanser hücrelerinde Caco-2 ve dişi kanser hücrelerinden HT-29 hücre hatları kullanılmıştır.

Caco-2 kolon kanseri hücre hattı ile ilgili genel bilgiler Tablo 2.2’ de bulunmaktadır. Caco-2 kolon kanseri hücrelerine ait düşük ve yüksek çözünürlük görüntüleri Şekil 2.12.’ de verilmiştir.

Tablo 2.2. Caco-2 kolon kanseri hücre hattı ile ilgili genel bilgiler.

Organizma	:	Homo sapiens, insan
Doku	:	Kolon
Hücre tipi	:	Epitel hücreleri
Hastalık	:	Kolorektal adenokarsinom
Yaş	:	72
Cinsiyet	:	Erkek
Etnik köken	:	Kafkas



Düşük çözünürlük

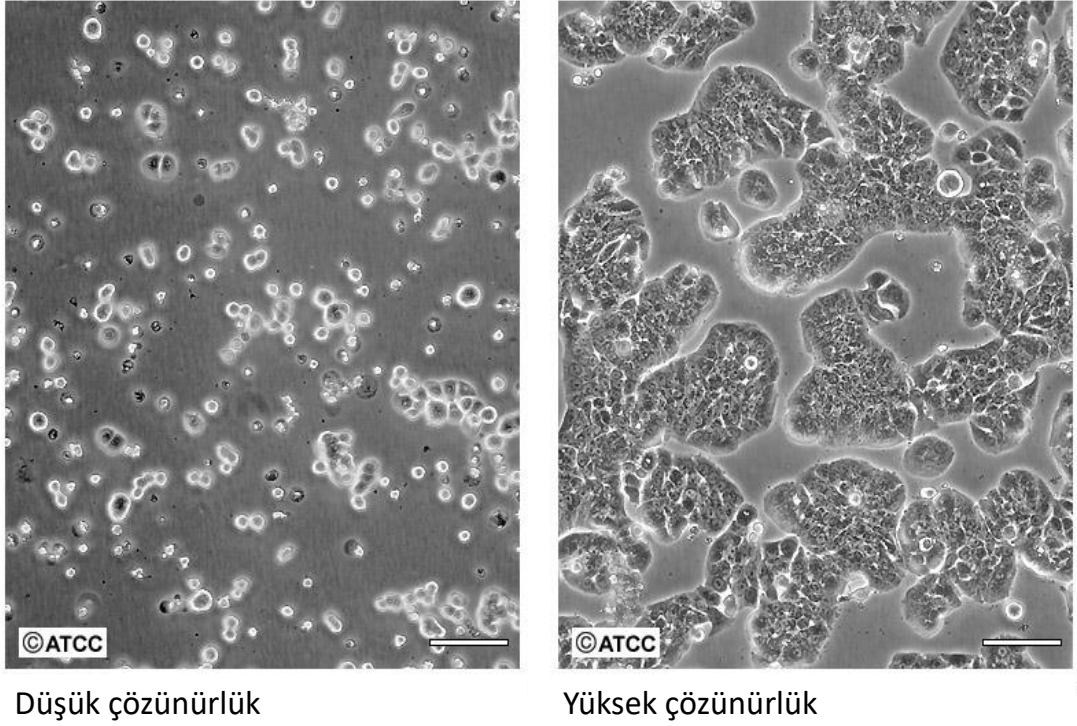
Yüksek çözünürlük

Şekil 2.12. Düşük ve yüksek çözünürlükteki Caco-2 kolon kanseri hücre görüntüleri (104).

HT-29 kolon kanseri hücre hattı ile ilgili genel bilgiler Tablo 2.3.' de bulunmaktadır. HT-29 kolon kanseri hücrelerine ait düşük ve yüksek çözünürlük görüntüleri Şekil 2.13.' de verilmiştir.

Tablo 2.3. HT-29 kolon kanseri hücre hattı ile ilgili genel bilgiler.

Organizma	:	Homo sapiens, insan
Doku	:	Kolon
Hücre tipi	:	Epitel hücreleri
Hastalık	:	Kolorektal adenokarsinom
Yaş	:	44
Cinsiyet	:	Kadın
Etnik köken	:	Kafkas



Şekil 2.13. Düşük ve yüksek çözünürlükteki HT-29 kolon kanseri hücre görüntüleri (105).

2.7.2. Karaciğer Kanseri

Hepatosellüler karsinom, hepatositlerden köken alan ve en sık rastlanan karaciğer primer malign tümördür. En sık görülen 5. kanserdir. Kanserle ilişkili morbidite ve mortalite oranları her geçen gün artmaya devam etmektedir. Hepatosellüler karsinom, karaciğer kanserlerinin % 90' ından fazlasını temsil etmektedir ve dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Hepatosellüler karsinom insidansı 70 yaşlarında en fazla görülmektedir. Siroz, hepatosellüler karsinomun en büyük risk faktörüdür. Ülkemizde sirozun en sık rastlanan nedenleri alkol ve viral hepatitler (HBV, HCV) olup diğer faktörler arasında erkek cinsiyet, şeker hastalığı, sigara kullanımı, alkolden bağımsız (non-alkolik) karaciğer yağlanması, alfa-1-antitripsin eksikliğidir (106).

Hepatosellüler karsinom gelişimindeki asıl sebep karaciğerdeki rejenerasyondur. Karaciğerde etken ne olursa olsun ilk önce inflamasyon görülür. İnflamasyon sonrasında sırayla nekrozis, fibrozis ve rejenerasyon gelişmektedir. Sirozun en önemli patofizyolojik

göstergeleri fibrosiz ve rejenerasyondur. Rejenerasyon nodüllerinden erken ve mutlak hepatoma gelişebilir (107).

Hepatosellüler karsinom hastalarının yaklaşık % 30' u, karaciğer nakli veya ameliyat gibi iyileştirici tedaviler için uygundur (108). Ameliyata uygun olmayan ileri evre hepatosellüler karsinom hastalarının yaşam beklentisi 11 ay civarındadır (109).

Hepatit B, hepatit C veya sirozlu hastalarda gelişen tümörler karaciğer kanseridir.

Karaciğer kanseri erken dönemde genellikle bulgu vermemektedir. Tümörün çapı büyüdükçe karının sağ tarafında yaygın bir ağrıyla belirti vermektedir. İleri evrede, şiddetli karın ağrısı, kilo kaybı ve karında şişlik gözlenmektedir.

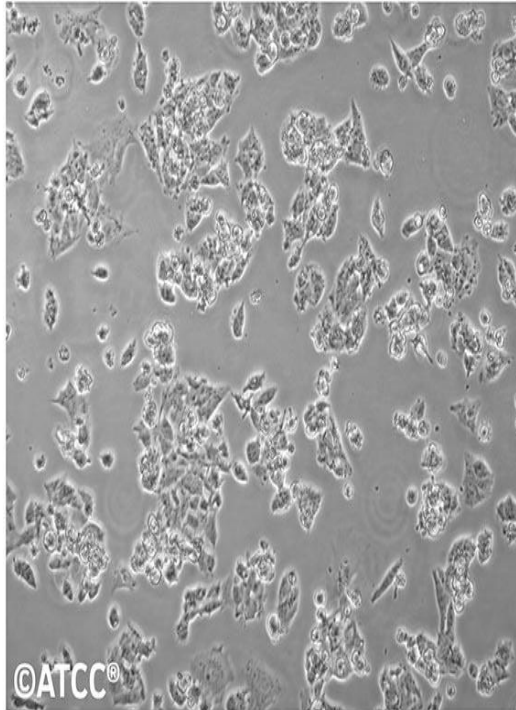
Hastalığın tanısında, görüntüleme yöntemleriyle ile ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi cihazlarla karaciğerdeki tümör saptanır. Ayrıca kanda alfa-fetoprotein düzeyi bakılmaktadır (110).

Bu tez çalışması kapsamında HepG2 karaciğer kanseri hücreleri ile çalışılmıştır. Kanser tedavisinde kullanılabilecek, bitkisel temelli kemoterapotik ilaç olarak düşünülen ABS' nin hastalara veriliş yolları araştırılmış, invaziv ve oral yolla olabileceği düşünülmüştür. ABS' nin kapsül dozaj şeklinin geliştirilmesi ile kanser hastaları hastaneye gitmeden oral yoldan kolaylıkla alabileceklerdir. Kapsül, midede açılıp presistemik eliminasyonla hedef organ olan karaciğere geçip etkisini gösterebilecektir. Ayrıca solid kanser türünden olan karaciğer kanseri tedavisinde operasyonel işlemlerde invaziv olarak direk kitle içine enjekte edilebilecektir. Bu nedenlerle ABS' nin antineoplastik etkisini karaciğer kanseri hücreleri seçilmiştir.

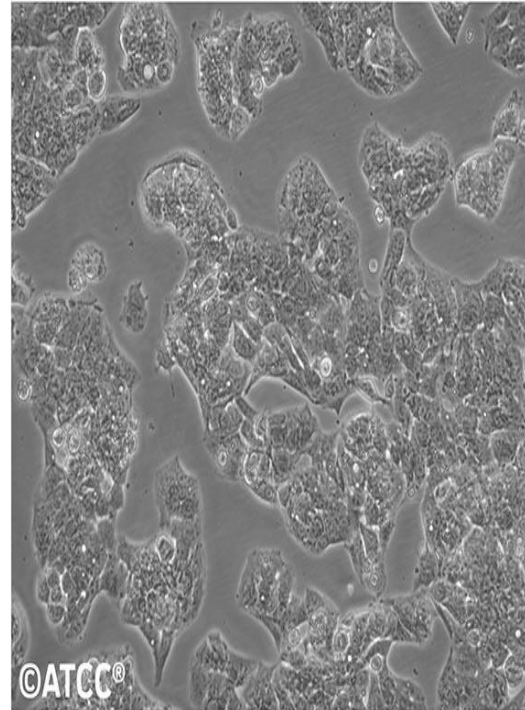
HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı ile ilgili genel bilgiler Tablo 2.4.' de bulunmaktadır. HepG2 karaciğer kanseri hücrelerine ait düşük ve yüksek çözünürlük görüntüleri Şekil 2.14.' de verilmiştir.

Tablo 2.4. HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı ile ilgili genel bilgiler.

Organizma	:	Homo sapiens, insan
Doku	:	Karaciğer
Hücre tipi	:	Epitel hücreleri
Hastalık	:	Hepatosellüler karsinoma
Yaş	:	15 yaş (adolesan)
Cinsiyet	:	Erkek
Etnik köken	:	Kafkas



Düşük çözünürlük



Yüksek çözünürlük

Şekil 2.14. Düşük ve yüksek çözünürlükteki HepG2 karaciğer kanseri hücre görüntüleri (111).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre hatları (Tablo 3.1.), kimyasallar (Tablo 3.2.), hazır alınan tampon çözeltiler (Tablo 3.3.), hazırlanan çözeltiler (Tablo 3.4.), kullanılan sarf malzemeler (Tablo 3.5.), cihazlar ve ekipmanlar (Tablo 3.6.) ve imaj analizi çalışmalarında yararlanılan yazılım ve veri bankaları (Tablo 3.7.) aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre hatları.

Hücre Hattı	Firma	Kullanım Amacı
Caco-2	ATCC	Hücre kültürü çalışmalarında sitozolik fraksiyon eldesinde
HT-29	ATCC	Hücre kültürü çalışmalarında sitozolik fraksiyon eldesinde
HepG2	ATCC	Hücre kültürü çalışmalarında sitozolik fraksiyon eldesinde

Tablo 3.2. Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Firma	Kullanım Amacı
Aseton	Sigma-Aldrich	Proteinlerin çöktürülmesinde
Metanol	Lab-Scan	Jelleri yıkamak için
Etanol	Sigma-Aldrich	Görüntüleme cihazını temizlemek için
Glasiyel Asetik asit	Sigma-Aldrich	Jelleri yıkamak için
Triklorasetik asit (TCA)	Merck	Proteinlerin çöktürülmesinde
DL-Ditiyotreitil (DTT)	Fluka	Proteinlerin çöktürülmesinde
Protein yöntem standardı II (sığır serum albümin, 1.44 mg/mL)	Bio-Rad	Protein miktar tayininde standart olarak
Konsantre protein boyama çözeltisi	Bio-Rad	Protein miktar tayininde
Mineral Yağı	Bio-Rad	IEF (1. boyut)
Agaroz (1x Tris-Glisin-SDS, % 0.5 eritilmiş agaroz ve % 0.001 bromfenol mavisi içeren)	Bio-Rad	SDS - PAGE (2. boyut)
İyodoasetamid (IAA)	Sigma-Aldrich	Alkilleyici ajan
% 30' luk ultra saf gliserol	Bio-Rad	Dengeleme tamponlarının hazırlanmasında
Precision Plus Protein All Blue Standard	Bio-Rad	SDS - PAGE (2. boyut) için marker olarak
Precision Plus Protein Unstained Standard	Bio-Rad	SDS - PAGE (2. boyut) için marker olarak
Bio-Safe Coomassie G-250 stain boya	Bio-Rad	Jelleri boyamak için
SYPRO - Ruby Gel stain floresan boya	Bio-Rad	Jelleri boyamak için

Tablo 3.3. Tez çalışması kapsamında satın alınan hazır tampon çözeltiler.

Tampon Çözeltiler	Firma	Kullanım Amacı
Homojenizasyon çözeltisi (5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, pH: 7.4)	Bio-Rad	Sitozolik fraksiyon eldesinde
Yükleme tamponu (50 mM DTT, 8 M üre, % 2 CHAPS, % 0.001 bromofenol mavisi, % 0.2 Bio-Lyte 3/10 amfolit)	Bio-Rad	Çöktürülen proteinleri tekrar çözerek IPG şeritlere yüklemeye
Dengeleme tamponu 1 (375 mM Tris-HCl, 6 M Üre, % 2 DTT, % 2 SDS, pH: 8.8)	Bio-Rad	IEF (1. boyut) sonrasında 2. boyut için IPG şeritlerini şartlandırmada
Dengeleme tamponu 2 (375 mM Tris-HCl, 6 M Üre, % 2 SDS, pH: 8.8)	Bio-Rad	IEF (1. boyut) sonrasında SDS - PAGE (2. boyut) için IPG şeritleri şartlandırmada
Criterion XT MOPS tamponu (20x)	Bio-Rad	SDS-PAGE (2. boyut) Criterion™ Cell hücrelerinde kullanılmak üzere

Tablo 3.4. Tez çalışması kapsamında hazırlanan çözeltiler.

Çözeltiler	Hazırlama	Kullanım Amacı
20 mM DTT, % 10 (a/h) TCA içeren aseton çözeltisi	0.1234 g DTT ve 4.00 g TCA tartılmış, üzerine bir miktar aseton yavaş yavaş ilave edilip çözdürülmüş ve hacim 40 mL' ye asetonla tamamlanmıştır.	Proteinlerin çöktürülmesinde
IAA içeren dengeleme tamponu 2	0.0875 g IAA tartılmış, üzerine 3.5 mL dengeleme tamponu 2 ilave edilerek karıştırılmış ve taze hazırlanmıştır.	IEF (1. boyut) sonrasında 2. boyut için IPG şeritleri şartlandırmada
Protein boyama çözeltisi	Konsantre protein boyama çözeltisi ultra saf su ile 5 kat seyreltilerek ve PTFE (0.45 µm) filtreden süzölmüştür.	Protein miktar tayininde
Sığır serum albümin standartları	100 µL suda, 0.2 - 0.9 mg/mL derişim aralığında 6 nokta olacak şekilde, stok sığır serum albümin çözeltisinden uygun miktarlarda alınarak hazırlanmıştır.	Protein miktar tayininde
Criterion XT MOPS tamponu (1x)	Criterion XT MOPS tamponu (20x) ultrasaf su ile 20 kat dilue edilip magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.	SDS - PAGE (2. Boyut) Criterion™ Cell hücrelerinde kullanılmak üzere
Saklama çözeltisi	% 0.5 (h/h) asetik asit içeren sulu çözeltidir. 100 mL' lik çözelti için 100 mL' lik balon jöjeye bir miktar saf su eklenmiş, üzerine 500 µL glasiyel asetik asit ilave edilip ultra saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.	Jellerin MALDI-TOF/TOF-MS analizine kadar saklanmasında

Tablo 3.5. Tez çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeler.

Malzeme	Firma	Kullanım Amacı
Mikropipet (10 - 100 - 1000 µL)	Gilson	Çözeltilerin hazırlanmasında
Mikrospatül	Isolab	Çözeltilerin hazırlanmasında
Mezür (25 - 100 - 1000 L)	Isolab	Çözeltilerin hazırlanmasında
IPG şerit numune yükleme tablası	Bio-Rad	Proteinlerin IPG şeritlere yüklenmesinde
Ready Strip IPG şerit pH 4 - 7, 11 cm	Bio-Rad	IEF (1. boyut)
Ready Strip IPG şerit pH 5 - 8, 11 cm	Bio-Rad	IEF (1. boyut)
Elektrot kâğıdı	Bio-Rad	IEF (1. boyut)
Criterion TGX jel % 4 - 12 Bis-Tris IPG 1 Well Comb, 11 cm, 1.0 mm	Bio-Rad	SDS - PAGE (2. boyut)
Jel kazıyıcı	Bio-Rad	SDS - PAGE (2. boyut)

Tablo 3.6. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar.

Cihaz	Firma	Kullanım Amacı
MALDI-TOF/TOF-MS	Absciex 5800	Proteinlerin tanımlanmasında
UV - görünür bölge spektrofotometresi	Agilent	Protein miktar tayini için
Soğutmalı santrifüj cihazı	Hettich	Proteinlerin çöktürülmesinde
Ultrasantrifüj cihazı	Hettich	Sitozolik fraksiyon eldesinde
Homojenizatör	Schütt Homgen	Sitozolik fraksiyonun homojenizasyonunda
Çalkalamalı İnkübatör	Nitta	Çöktürülen proteinlerin yükleme tamponunda çözünmesinde
PROTEAN IEF Sistem	Bio-Rad	IEF (1. boyut)
Orbital karıştırıcı	IKA®KS 130 Basic	IPG şeritlerin dengeleme tamponlarıyla karıştırılarak dengelenmesi ve jellerin boyanması için
Criterion™ Cell (midi)	Bio-Rad	SDS - PAGE (2. boyut)
PowerPac HC güç kaynağı	Bio-Rad	SDS - PAGE (2. boyut)
Universal Hood II (Görüntüleme cihazı)	Bio-Rad	Jellerin görüntülenmesinde
Milli - Q sistem ultra saf su cihazı	Millipore	Çözeltilerin hazırlanması ve jellerin yıkanması için
Manyetik karıştırıcı	IKA	Çözeltilerin hazırlanmasında
Vorteks	IKA® Vortex Genius 3	Karıştırma işleminin yapılmasında

Tablo 3.7. Tez çalışması kapsamında kullanılan yazılımlar ve veri tabanları.

Yazılım/ Veri Tabanı	Kullanım Amacı
PDQuest™ 2D Analysis Software (versiyon 8.0,	İmaj analizinde (internet üzerinden ücretsiz bir şekilde kullanılabilir)
Image Lab (Bio-Rad)	Görüntüleme cihazında kullanılan program
MASCOT	Proteinlerin tanımlanması ve nicel analizinde
UniProt	Protein yapısı ve fonksiyonunu belirlemede
SwissProt	Protein yapısı ve fonksiyonunu belirlemede
String	Protein-protein etkileşimi analizinde
QuickGO	Yolak analizinde
KEGG	Yolak analizinde

Tez kapsamında Caco-2, HT-29 ve HepG2 hücre hatlarına uygulanan Ankaferd Hemostat (ABS; Ankaferd Blood Stopper®), içerisinde bulunan 5 tane bitki ekstresinin sinerjik etkisinden dolayı hemostatik ajan olarak da kullanılmaktadır. Tek kullanımlık ampul, tampon ve sprey formunda bulunan ABS içerisinde ısırgan otu (*Urtica dioica*) bitkisinin kurutulmuş kök ekstresi, asma (*Vitis vinifera*) bitkisinin kurutulmuş yaprak ekstresi, meyan (*Glycyrrhiza glabra*) bitkisinin kurutulmuş yaprak ekstresi, havlican (*Alpinia officinarum*) bitkisinin kurutulmuş yaprak ekstresi ve kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin kurutulmuş yaprak ekstresi bulunmaktadır. Bu bitkilerin her biri tek başına endotel, kan hücreleri, hücre üreme, damar oluşumu (anjyogenezis) ve mediyatörler üzerinde etkilidir. ABS, kanama durdurucu olarak kullanılan hemostatik ajandır. Ara ürün kategorisinde, insanların dış tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca ABS' nin insanlarda topikal kullanımıyla ilgili faz I klinik çalışmaları 2008 yılında sonuçlandırılmıştır (112). Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı tarafından EN ISO 10993-1; 2006 "Tıbbî cihazların biyolojik değerlendirilmesi", ISO 10993-10; 2002 "İrritasyon ve Gecikmiş Tipte Hipersensitivite Testleri" ve ISO 10993-10; 2002 "Sitotoksikite Testleri, İn-Vitro Metodlar" kılavuzlarına uygun şekilde yapılan iritasyon, duyarlılık ve sitotoksikite testlerinde, ABS' nin iritasyon ve ciltte reaksiyon oluşturmadığı ve sitotoksik olmadığı belirtilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında, proteomik çalışmalar için Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri ve HepG2 karaciğer kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücre hattı ile çalışmalara başlanmış olup ABS ile hücrelerin muamele süreleri 24 ve 72 saat

olarak belirlenmiştir. İn-vitro hücre kültürü çalışmalarında ABS' nin kolon ve karaciğer hücrelerine muamelesi söz konusudur. İn-vitro hücre çalışmalarında, dışarıdan bir muamele olduğunda stress proteinleri devreye girer. Bu nedenle ABS' nin 72 saatlik maruziyeti de çalışılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde 24 saatlik proteomik çalışmalarda sadece stress proteinleri saptanmamıştır. Bu ABS' nin bilinen antioksidan etkisinin yanında çeşitli etkilere de sahip olduğunu gösterir ve bu nedenle ABS, HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanmıştır. ABS ile muamele edilen hücreler (T grubu) ve muamele edilmeyen hücreler (C grubu) olarak tanımlanmıştır. Bu hücrelerden elde edilen sitozolik fraksiyonlardaki proteinler önce pI değerlerine, sonra kütlelerine göre 2D jel elektroforez ile ayrılıp imaj analiz çalışmaları yapılmıştır. C ve T grupları için düşük miktarda ifade edilen (down-regulated) ve yüksek miktarda ifade edilen (up-regulated) proteinlerin karşılaştırılmasıyla proteom düzeyinde meydana gelen değişimler tanımlanmıştır (57). Farklılaştığı tespit edilen proteinlerin yapıları, MALDI-TOF/TOF-MS cihazı ve PMF aracılığıyla analiz edilerek aydınlatılmıştır.

Çelebier' in (57) 2013 yılında yapmış olduğu "HT29 ve K562 kanser hücrelerinde protein ve metabolitlerin analizi için çeşitli analitik yöntemlerin geliştirilmesi" başlıklı doktora tez çalışmasında, biberiye ekstraktları HT-29 ve K562 kanser hücrelerine uygulanmış ve antikanser aktivitenin olup olmadığı 2D jel elektroforezle araştırılmıştır.

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu tez çalışması kapsamında 3 farklı hücre hattı kullanılmıştır. 114S500 no' lu TUBİTAK 1001 projesi kapsamında Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinin hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Caco-2 ve HT-29 hücreleri, ABS ile 24 ve 72 saat muamele edilerek sitozolik fraksiyonlar elde edilmiştir.

HepG2 hepatosellüler karsinoma hücreleri için hücre kültürü çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı' ndan Doç. Dr. Ayşe Ercan ve Dr. Bio. Selin Öncül tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla HepG2 hücreleri, ABS ile 24 saat muamele edilerek sitozolik fraksiyonlar elde edilmiştir.

Çalışma kapsamında kanser hücrelerine uygulanacak en uygun ABS derişiminin belirlenmesi amacıyla hücre kültürü çalışmalarında kullanılan siğir serum albüminin yüzdesi düşürülerek sitotoksisite testlerinden olan MTT testi yapılmıştır (113). Yapılan çalışmalar

sonucunda ABS' nin istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkisinin gözlemlendiği en düşük dozu 8 µL/mL (ABS/Besi ortamı) olarak saptanmıştır.

3.2. Sitolizik Fraksiyon Eldesi

C ve T gruplarına ait Caco-2, HT-29 ve HepG2 hücreleri, soğuk DPBS (10 mM Na₂HPO₄, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH: 7.4, Sigma-Aldrich) çözeltisi ile 2 kez yıkanarak, hazır satın alınan homojenizasyon tamponu içerisinde homojenizatör cihazı kullanılarak parçalanmıştır ve homojenize edilmiştir. Örnekler, 14 dakika, 4 °C' de, 14000 g'de, santrifüjlenmiştir. Oluşan nükleer ve mitokondriyal fraksiyonları içeren çökelek atılmış, elde edilen süpernatant ise 1 saat, 4 °C ve 100000 g' de, ultrasantrifüj cihazı kullanılarak tekrar santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant yani sitozolik fraksiyon toplanmıştır ve - 80 °C' de kullanılacağı zamana kadar 500 µL' lik fraksiyonlar halinde saklanmıştır.

3.3. Protein Miktar Tayini

Sitolizik fraksiyonlardaki protein miktarının tayini için "Bio-Rad™ Protein Assay" yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, "Bradford Protein Assay" yöntemini temel alan ve çözünebilir proteinlerin miktar tayininde kullanılan doğru ve basit bir yöntemdir (114). Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri ve HepG2 karaciğer kanserinden elde edilen C ve T gruplarına ait sitozolik fraksiyonlar, - 80 °C' den çıkartılıp oda sıcaklığında çözünene kadar bekletilmiştir ve ardından protein miktar tayini yapılmıştır. Protein miktar tayini basamakları aşağıda verilmiştir (n=3).

1. 6 tane test tüpüne derişimi 0.2 ile 0.9 mg/mL olacak şekilde sığır serum albümin standartlarından 100 µL alınmıştır. Derişimi ölçülmek istenilen numunelerden 100 µL ayrı bir tüpe alınmıştır. Ayrıca homojenizasyon tamponundan 100 µL kör çözelti hazırlanması için alınmıştır.

2. Her bir tüpe taze hazırlanmış protein boyama çözeltisinden 5 mL alınıp vortekslenmiştir.

3. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 595 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı ile 1 saat içinde absorbansı okunmuştur.

4. Elde edilen absorbanans değerleri siğir serum albümin standartlarının derişimine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

5. Numune çözeltilerinin absorbanansı, elde edilen regresyon denkleminde yerine konarak numunelerdeki protein miktarları hesaplanmıştır.

3.4. Proteinlerin Çöktürülmesi

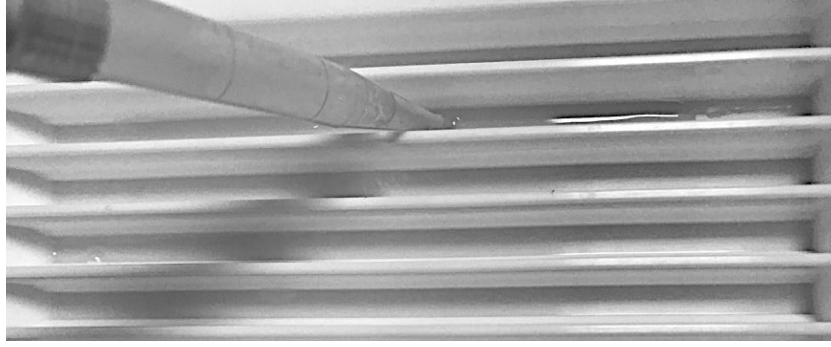
Caco-2, HT-29 ve HepG2 hücrelerine ait C ve T gruplarındaki protein miktarları belirlendikten sonra her bir grup için 3 tekrarlı olmak üzere (3 tane C grubu, 3 tane T grubu olmak üzere her bir hücre hattı için toplam 6 tane) numunelerden (her bir tüpte 250 µL' de 1.5 mg/mL olacak şekilde hesaplama yapılmış ve numunelerden uygun miktarda alınmıştır) alınıp 2 mL' lik eppendorf tüplere konmuştur. Her bir eppendorf tüpe 20 mM DTT, % 10 (a/h) TCA içeren ve -20 °C' de bekletilmiş soğuk aseton çözeltilisinden 1.5 mL eklenmiş ve proteinlerin çöktüğünün gözlenmesiyle vortekslenmiş, - 20 °C' de 24 saat bekletilmiş ve çöken protein pelletleri gözlemlenmiştir. Bu aşamada, proteinlerin geri kazanımının en üst seviyede olması amaçlanmaktadır. Soğutmali santrifüj cihazı kullanılarak 10 dakika, 14000 dev/dak (rpm)' de, 8 °C' de santrifüj edilmiştir. Elde edilen santrifügat atılmıştır. Pelletler, 1 kere 0.75 mL ve 2 kere 0.5 mL, -20 °C' de bekletilmiş soğuk asetonla yıkanmıştır. Pelletlerde kalan aseton vakum santrifüjde oda sıcaklığında uçurulmuştur. Tamamen kuruyan eppendorf tüplerdeki her bir pelletin üzerine satın alınan hazır yükleme tamponunda 250 µL (C ve T grubu için son derişim 250 µL' de 1.5 mg/mL olmuştur, n=3) ilave edilmiş ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda karıştırılarak inkübe edilmiştir.

3.5. Proteinlerin IPG Şeride Yüklmesi

Hücre hatlarında bulunan proteinlerin pI değerleri, proteinlerde gözlenen varyasyon nedeniyle farklılık göstermektedir. Bu nedenle 2D jel elektroforez çalışmalarının 1. boyutunda kullanılacak olan IPG şeritlerin, proteinlerin pI değerlerine göre uygun olması gerekir. Bu nedenle örneklerle ön çalışmalar yapılmış ve her hücre hattı için uygun pH değerleri saptanmıştır. 24 ve 72 saatlik Caco-2 ve HT-29 hücreleri için pH 4 - 7 IPG şeritler, 24 saatlik HepG2 hücreleri için pH 5 - 8 IPG şeritler kullanılmıştır. IPG şeritlerin pH değerlerindeki farklılık, analiz basamaklarından sadece IEF basamağında uygulanacak olan

programın değişmesine neden olmuştur. Proteinlerin IPG şeritlere yüklenmesi aşığıda basamaklar halinde anlatılmıştır:

1. 250 µL yükleme tamponunda çözünmüş 375 µg protein çözeltilisi, mikropipet yardımıyla IPG şerit tablasındaki kanal boyunca, kanalın başına ve sonuna temas etmeyecek şekilde yayılmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Numunenin IPG şerit tablaya tatbiki.

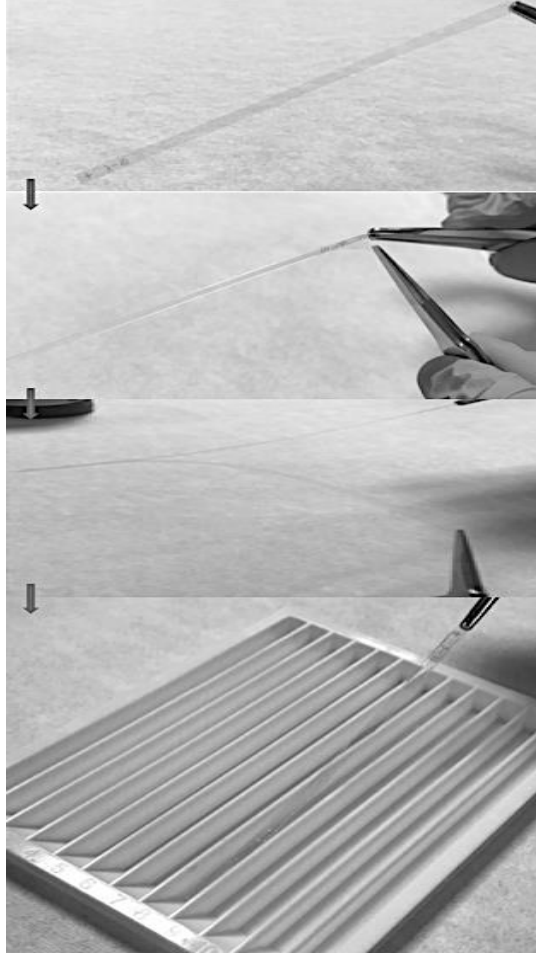
2. IPG şeritler, - 20 °C' de saklanmışır ve deney sırasında çıkarılıp oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. IPG şerit üzerinde bulunan jeli koruyan film, pens yardımıyla el değmeden ayrılmıştır (Şekil 3.2.).

3. IPG şeridin jel kısmı, IPG şerit tablasına bakacak şekilde ve numune ile nüfus edecek şekilde bir pens yardımıyla el değmeden dikkatlice yerleştirilmiştir (Şekil 3.2.).

4. IPG şeridin jel yüzeyinin numune ile arasında hava kabarcığı kalmaması ve numune ile tamamının temas etmesi için pens, IPG şeridin üzerinde baskı uygulamadan ve numuneyi dışarı taşırmadan gezdirilmiştir.

5. IPG şerit tablasının kapağı kapatılarak 2 saat bekletilmiş, sonra da 2 mL mineral yağ ilave edilip 3 saat bekletilmiştir.

6. IPG şerit, ucundan pens yardımıyla kaldırılarak tablada numune çözeltilisinin kalıp kalmadığı kontrol edilmiş, numune çözeltilisinin IPG şeritteki jel tarafından neredeyse tamamen absorplandığı görülmüştür.



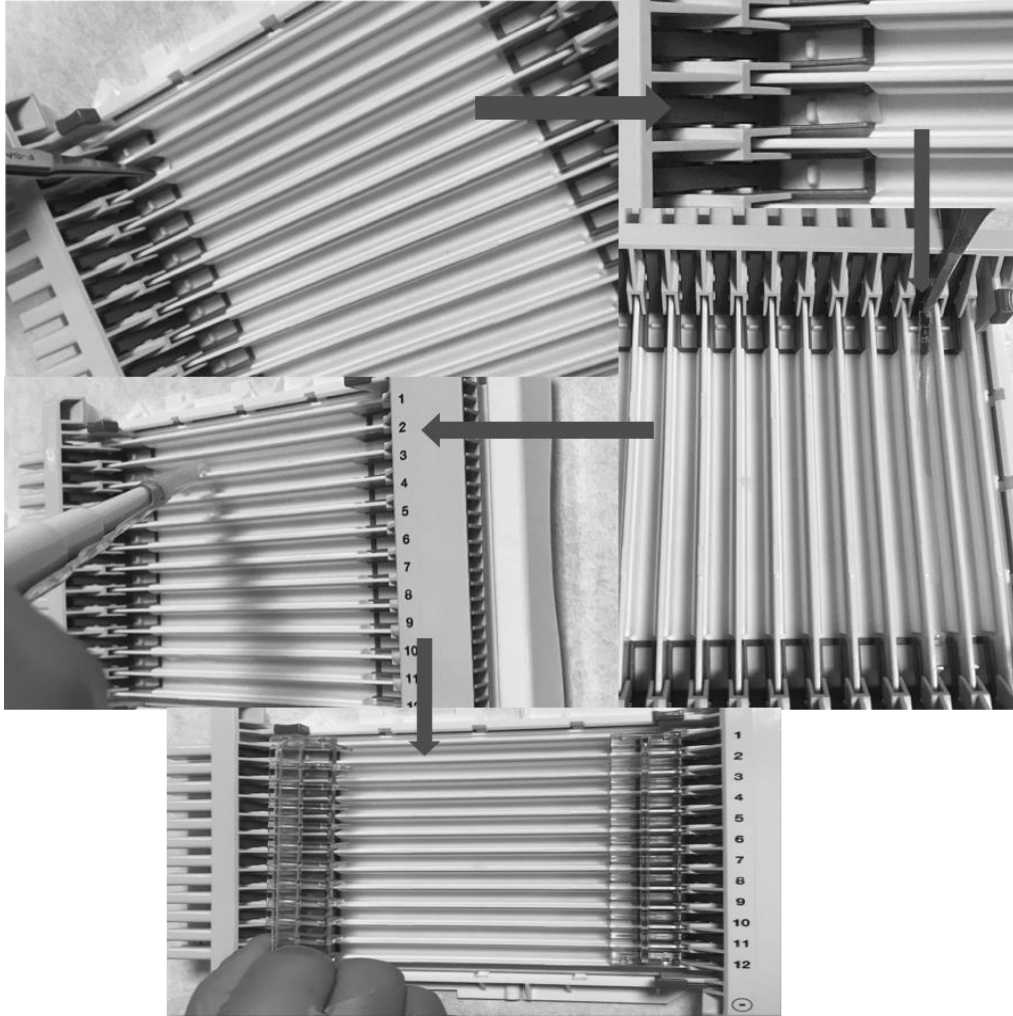
Şekil 3.2. IPG şerit üzerinden koruyucu bandının çıkarılması ve tablaya uygulanması.

3.6. IEF Uygulaması (1. Boyut)

pH 4 - 7 IPG şeritler, 24 ve 72 saatlik Caco-2 ve HT-29 hücreleri için kullanılmış, pH 5 - 8 IPG şeritler ise 24 saatlik HepG2 hücreleri için kullanılmıştır. IPG şeritlerin pH değerlerindeki farklılık, analiz basamaklarından sadece IEF basamağında uygulanacak olan programın değişmesine neden olmuştur.

IEF cihazının 12 kanaldan oluşan odaklama tablasının 2 ucunda elektrik akımının geçmesine yarayan teller bulunmaktadır. Teller ile IPG şerit arasındaki elektrik akımı, elektrot kâğıdı denilen ıslatılmış kâğıtlarla sağlanmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, jel kısmı aşağıya bakan anlamına gelen "*Gel-Side Down Assembly*" IEF yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin analiz basamakları aşağıda anlatılmıştır:

1. Odaklama tablasındaki tellerin üzerine küçük dikdörtgen şeklindeki elektrot kâğıtları dikkatli bir şekilde katlamadan ve parçalamadan yerleştirilir (Şekil 3.3.).
2. Elektrot kâğıtlarının her biri 5 μ L ultra saf su ile ıslatılır (Şekil 3.3.).
3. IPG şeritler bir pens yardımıyla IPG şerit tablasından alınmıştır (Şekil 3.3.).
4. IPG şeridin pozitif ve negatif uçları, odaklama tablasının pozitif ve negatif elektrotlarına dikkat edilerek, jel kısmı aşağıya yani tablaya değecek şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.3.).
5. 2.5 mL mineral yağ, IPG şeridin üzerine ilave edilmiştir (Şekil 3.3.).
6. Elektrot kâğıtları ile IPG şeridin temasını sağlandığından emin olunması için odaklama tablasının IPG şeritlerin uç kısmına konan elektrot ağırlıkları yerleştirilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Gel-Side Down yöntemi işlem basamakları.

7. IEF cihazına odaklama tablası yerleştirilmiştir.

8. Odaklama tablası IEF cihazına (Şekil 3.4.) yerleştirilmiş ve IEF için Tablo 3.8. 'de verilen program 1 gece (yaklaşık 10 saat) boyunca uygulanmıştır. IEF cihazı ile yapılan odaklama işlemi sırasında uygulanan programların voltaj ve akım değerleri izlenerek kontrol edilmiştir.

9. İşlem sonunda kontrol edilen toplam volt x saat değerleri kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.4. Bio-Rad marka PROTEAN IEF sistemi.

Tablo 3.8. İzoelektrik odaklamada pH 4 - 7 ve pH 5 - 8 IPG şeritler için uygulanan program.

11 cm IPG şerit	Voltaj	Zaman	Volt x Saat	µAmp	Mod
1. Basamak	250 V	20 dakika	----	50	Hızlı
2. Basamak	8000 V	1 saat	----	50	Gradient
3. Basamak	8000 V	----	26000 V x saat	50	Hızlı
4. Basamak	750 V	----	----	50	Hold

3.7. SDS - PAGE Uygulaması (2. Boyut)

2D jel elektroforez çalışmalarında önce pI değerine göre sonrada kütlelerine göre ayrılan proteinlerin boyanıp jel haritaları görüntülenip imaj analiz çalışmalarının yapılması gerekir. Çeşitli jel boyama teknikleri bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, Commassie mavisini ve SYPRO - Ruby boyama teknikleri olmak üzere 2 farklı boyama yöntemi kullanılmıştır. Farklı boyama teknikleri kullanıldığı zaman 2. boyutta kullanılan marker olarak adlandırılan işaretleyiciler boyama tekniklerine uygun olmalıdır. 24 saatlik Caco-2 hücrelerine ait C ve T grupları Commassie mavisini ile boyanıp marker olarak "Protein All Blue Standard" kullanılmış;

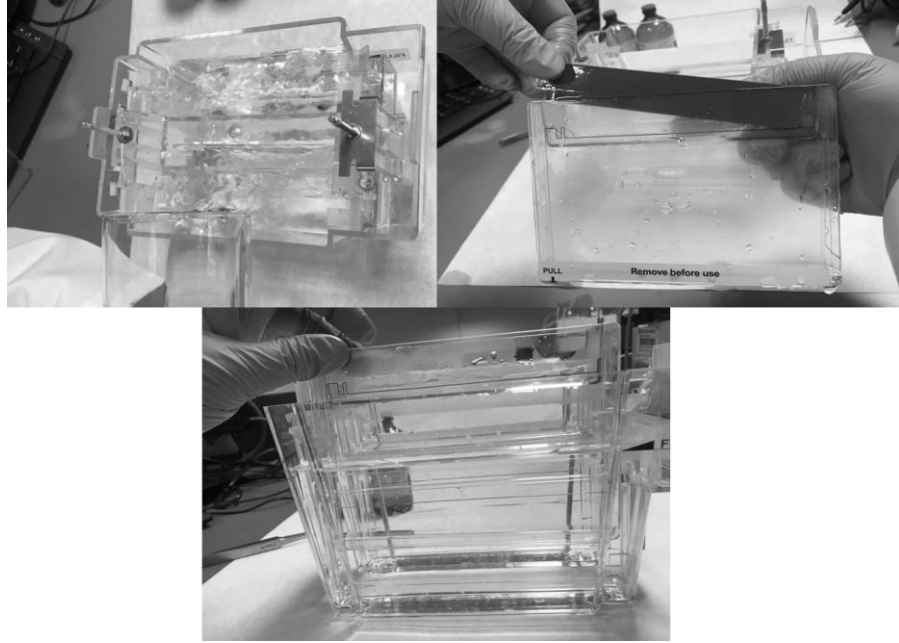
72 saatlik Caco-2 hücreleri, 24 ve 72 saatlik HT-29 hücreleri ve 24 saatlik HepG2 hücrelerine ait C ve T grupları SYPRO - Ruby ile boyanıp marker olarak "*Protein Unstained Standard*" kullanılmıştır. Proteinlerin 1. boyutta pI değerlerine göre (IEF (1. boyut)) ayrıldıktan sonra kütlelerine göre ayrılması için uygulanan SDS - PAGE (2. boyut) analizi, aşağıda basamaklar halinde anlatılmıştır:

1. IPG şeritler odaklama tablasından çıkartılıp, temiz bir süzgeç kâğıdı üzerine jel kısmı kâğıda değmeyecek şekilde konmuştur. IPG şerit üzerindeki mineral yağ alınabildiği kadar uzaklaştırılmıştır.

2. IPG şeritler, IPG şerit tablasına jel kısmı yukarı doğru bakacak şekilde yerleştirilmiştir. IPG şeritlerin her birinin üzerine 3.5 mL "dengeleme tamponu 1" ilave edilip, orbital karıştırıcıda 15 dakika hareket ettirilmiştir.

3. IPG şeritler dengeleme tamponu 1' den çıkartılıp süzümüştür. Yine IPG şerit tablasına jel kısmı yukarı doğru bakacak şekilde yerleştirilip IPG şeritlerin her birinin üzerine 3.5 mL "dengeleme tamponu 2" ilave edilip, orbital karıştırıcıda 15 dakika hareket ettirilmiştir.

4. Dengeleme tamponu 2' den çıkartılmış IPG şeritler, hazırlanan "*Criterion XT MOPS Buffer (1x)*" tamponu (SDS - PAGE için katot ve anot tamponu olarak kullanılır) içeren 25 mL' lik bir mezürün içine daldırılıp üzerindeki tampondan uzaklaştırılır. Hazırlanan "*Criterion XT MOPS Buffer (1x)*" tamponu ile elektroforez hücresi (*Criterion™ Cell*) doldurulmuştur (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. SDS - PAGE jellerin elektroforez hücresine yerleştirilmesi.

5. SDS - PAGE hazır jel (*Criterion XT jel % 4-12 Bis-Tris IPG 1 Well Comb, 1.0 m, 11 cm*) 4 °C' de muhafaza edilmiştir. Jelin üzerindeki yeşil renkli tarak alındığında, jelin üzerinde IPG şeridi yerleştirmek için bir yuva ve marker için hazırlanmış daha küçük bir yuva bulunmaktadır. Jel, şeffaf bir kaset içinde yer almaktadır. Kasetler, her bir elektroforez hücresine karşılıklı olarak ikişer tane yerleştirilmiştir.

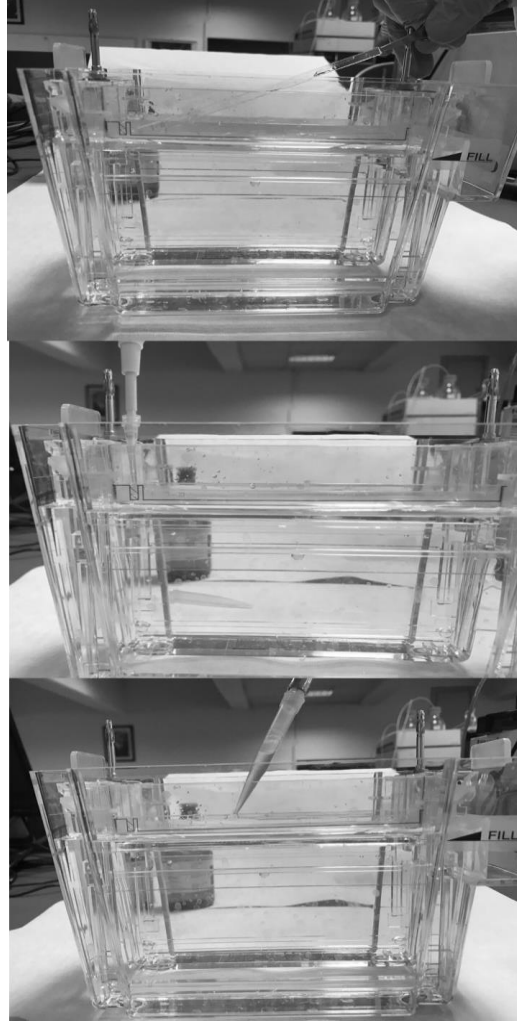
6. "*Criterion XT MOPS Buffer (1x)*" olarak adlandırılan tampona daldırılıp çıkartılmış IPG şeritlerin pozitif ve negatif uçlarına dikkat edilerek ve jel kısmı dışa doğru bakacak şekilde jel üzerindeki yuvasına yerleştirilmiştir (Şekil 3.6.).

7. Marker, kendi yuvasına bir mikropipet aracılığıyla 6 µL hacimde ilave edilmiştir (Şekil 3.6.).

8. Agaroz çözeltisi 40 °C' de ısıtmalı manyetik karıştırıcı kullanılarak akışkan bir hal alana kadar karıştırılmıştır. Jel kaseti içinde bulunan IPG şerit ve marker yuvasının üzerine sıcak agaroz çözeltisi bir pipet yardımıyla ilave edilmiştir (Şekil 3.6.).

9. Jel kasetindeki yuvasında bulunan IPG şerit, ince düz bir spatül yardımıyla jelle teması sağlanmış ve jelle şerit arasında bulunan hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır.

10. Elektroforez hücresinde belirtilen çizgiye kadar, anot ve katot haznelere SDS - PAGE tamponu doldurulmuştur.



Şekil 3.6. IPG şeridin yerleştirilmesi, marker ilavesi ve sıcak agaroz jelin uygulanması.

11. 3 tane elektroforez hücresi (her bir hücrede C ve T grubuna ait birer jelin olduğu toplam 6 jelin elektroforezinin yapıldığı sistem) çok çıkışlı güç ünitesine bağlanarak jel başına 1 saat boyunca 50 V, elektroforez bitinceye kadar (yaklaşık 2 saat) 75 V voltaj uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.7).

12. Agaroz çözeltisi içinde yer alan bromfenol mavisine ait şerit, elektroforez süresince jel üstünde doğrusal ve nizami bir biçimde ilerleyişi izlenerek elektroforezin kontrolü sağlanmıştır. Mavi şerit jelin en altına geldiğinde elektroforezin tamamlandığı anlaşılıp ve güç kaynağı kapatılmıştır. Her hücredeki elektroforezin tamamlanma süresi yaklaşık 195 dakika sürmüştür.

13. SDS - PAGE işlemi sonrasında jel kasetleri elektroforez hücresinden çıkartılıp, jelin muhafaza edildiği kaset jel kazıyıcı yardımıyla jel kasetlerinin ucu kırılmıştır.



Şekil 3.7. Elektroforez hücresi ve güç kaynağı.

14. Piset yardımıyla saf su ile yıkanan jeller, jel kazıyıcı ile dikkatlice yuvasından çıkarılmış ve içinde saf su bulunan plastik kaplara konmuştur.

3.8. Jellerin Boyanması ve Görüntülenmesi

24 saatlik Caco-2 hücrelerine ait C ve T grupları Commassie mavisi ile boyanmış; 72 saatlik Caco-2 hücreleri, 24 ve 72 saatlik HT-29 hücreleri ve 24 saatlik HepG2 hücrelerine ait C ve T grupları SYPRO - Ruby ile boyanmıştır.

3.8.1. Coomassie Mavisi ile Boyama İşlemi

1. Kasetlerinden ayrılan her jel, farklı plastik kaplarda saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminde jeller, 3 kere 200 mL' lik saf su ile 15' er dakika, daha sonra 100 mL su ile 24 saat orbital karıştırıcıda hareket ettirilerek yıkanmıştır.

2. 24 saatin sonunda plastik kaplarda bulunan yıkama suyu atılmış, Coomassie G-250 boyama çözeltisinden 50 mL (jel yüzeyini kaplayacak şekilde) ilave edilmiştir. Plastik kaplar alüminyum folyoyle sarılarak ışıktan korunmuş ve 24 saat orbital karıştırıcıda hareket ettirilerek jeldeki proteinlerin boyanması sağlanmıştır.

3. 24 saatin sonunda boya çözeltisi atılmış ve 3 kere 200 mL' lik saf su ile 15' er dakika, daha sonra 100 mL su ile 24 saat orbital karıştırıcıda karıştırılarak jeller yıkanmıştır.

4. Saf su kullanılarak imaj görüntüleme cihazının tablası sert olmayan ve partikül bırakmayan bir peçete yardımıyla temizlenmiştir.

5. Görüntüleme cihazında iyi bir görüntü elde edebilmek için objektif yakınlaştırılmış modda (zoom) çalıştırılmış, Image Lab yazılımı aracılığıyla Commassie mavisi için uygun parametreler seçilip jel görüntüleri TIFF ve JPEG uzantılı resim dosyası olarak kaydedilmiştir.

6. Jeller MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilinceye kadar 40 mL saklama çözeltisinde, plastik kabın tamamı hava geçirmeyecek şekilde temiz streç film ile sarılarak 4 °C' de buzdolabında saklanmıştır.

3.8.2. SYPRO - Ruby ile Boyama İşlemi

1. Kasetlerinden ayrılan her jel farklı plastik kaplarda saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminde jeller, 3 kere 200 mL' lik saf su ile 15' er dakika orbital karıştırıcıda hareket ettirilerek yıkanmıştır.

2. % 7 asetik asit ve % 10 metanol içeren yıkama çözeltisinden 100 mL ilave edilmiş ve orbital karıştırıcıda 24 saat hareket ettirilerek jellerin fiksleme işlemi yapılmıştır.

3. 24 saatin sonunda sabitleme çözeltisi atılmış ve jeller 2 kere 100 mL' lik saf su ile 15' er dakika orbital karıştırıcıda hareket ettirilerek yıkanmıştır.

4. Yıkama suyu atılıp SYPRO - Ruby yani floresans boyama çözeltisinden jel yüzeyini kaplayacak şekilde 50 mL ilave edilmiştir. Plastik kaplar önce streç film ile sarılıp hava ile teması engellenmiş sonra da alüminyum folyoyla sarılarak ışıktan korunmuştur.

5. 24 saat orbital karıştırıcıda hareket ettirilmiş sonrasında jel yüzeyi değiştirilip 24 saat daha jeller orbital karıştırıcıda hareket ettirilmiştir (jeller toplam 48 saat boyama çözeltisi ile temasta bulunmuştur).

6. Saf su kullanılarak imaj görüntüleme cihazının tablası sert olmayan ve partikül bırakmayan bir peçete yardımıyla temizlenmiştir.

7. Görüntüleme cihazında iyi bir görüntü elde edebilmek için objektif yakınlaştırılmış modda (zoom) çalıştırılmış, Image lab yazılımı aracılığıyla SYPRO - Ruby boyama işlemi için uygun parametreler seçilip jel görüntüleri TIFF ve JPEG uzantılı resim dosyası olarak kaydedilmiştir.

8. Jeller MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilinceye kadar 40 mL saklama çözeltisinde, plastik kabın tamamı hava geçirmeyecek şekilde temiz streç film ile sarılarak 4 °C' de buzdolabında saklanmıştır.

3.9. İmaj Analizi Çalışmaları

1. Resim dosyası olarak kaydedilen jel görüntüleri, imaj analiz programı olan PDQuest™ yazılımına yüklenmiştir. PDQuest™ programı jel haritalarının belirlenmesi ve farklılaşan spotların tespiti amacıyla kullanılmıştır.

2. C ve T grubuna ait 3' er tane jel görüntüleri bütün spotları kapsayacak şekilde PDQuest™ programı yardımıyla eşit boya getirilmiştir.

3. Gözle görünebilecek en küçük, en büyük ve en saydam spot işaretlenmiş ve program ile spot olabilecek bütün noktalar otomatik olarak bulunmuştur.

4. Program tarafından bulunan bütün noktaların ve otomatik olarak işaretlenen noktaların jel görüntüleri teker teker yaklaştırılarak taranmış ve her bir jel için koordinatları eşleştirilmiştir. Jel görüntüleri üzerinde, program tarafından bulunamayan spotlar jel görüntüleri yaklaştırarak, jel görüntüleri üzerinde adım adım ilerleyerek manuel olarak bulunmaya çalışılıp her bir jel için koordinatları eşleştirilmiştir.

5. Her bir jel için bütün spotlar eşleştirildiğinde ve spotların koordinatları belirlendiğinde analiz kümeleri tanımlanmıştır.

6. Bütün spotlar her bir jel için eşleştirildiğinde ve koordinatları belirlendiğinde, spotlar arasından intensiteleri (yoğunlukları) grup içinde birbiriyle istatistiksel olarak % 95 güven seviyesinde örtüşenler "*Statistic*" adı verilen bir analiz kümesinde toplanmıştır.

7. "*Quant*" adı verilen analiz kümesinde, C ve T grupları arasında intensitelerinde en az 2 kat farklılaşma olanlar yani örtüşenler toplanmıştır.

8. "*Booln*" adı verilen küme ise *Statistic* ve *Quant* kümelerinin kesişim kümesidir. Yani *Booln* kümesi, grup içinde % 95 güven seviyesinde intensiteleri uyuyurken, gruplar arasında intensiteleri en az 2 kat farklılaşan spotlardan oluşmaktadır.

9. *Booln* kümesindeki spotların koordinatları saptanmış ve spotlar tekrar tek tek taranarak bir hata olup olmadığı kontrol edilmiştir.

10. Farklılaştığı tespit edilen ve MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilecek spotlar, C ve T grupları için ayrı ayrı tablolandırılmıştır.

3.10. Spot Kesimi, Jelden Spotların Elüsyonu ve Proteinlerin Peptidlerine Parçalanması

Jeldeki proteinlerin kesilmesi, tripsin enzimi ile peptidlerine parçalanması, MALDI-TOF/TOF-MS ile analizi ve PMF ile proteinlerinin tanımlanması çalışmaları, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı'nda, 114S500 no'lu TÜBİTAK 1001 projesi ile hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

2D jel elektroforez çalışmalarıyla farklılaştığı saptanan spotların kesimi, Spot-cutter robotu (Bio-Rad) ile yapılmıştır. Protein spotlarından peptidlerin elde edilebilmesi için proteinlerin jel içerisinde peptidlerine ayrılması ve ardından s jelden izole edilmeleri gerekmektedir. Bu işlem için spot örnekleri % 50 asetonitril ve % 50 25 mM amonyum bikarbonat çözeltisi ile destain edilerek çalkalamalı karıştırıcıda yıkanmıştır. Yıkama sonunda örnekler, 25 mM amonyum bikarbonat içerisinde % 10 TCEP olacak şekilde 60°C' de 10 dakika disülfid bağlarının kırılması sağlanarak indirgenmiştir. Daha sonra son derişimi 100 mM iyodaasetamit (IAA) olan 25 mM amonyum bikarbonat içerisinde oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekletilerek indirgenmiş olan sistein yan zincirleri metillenmiştir (alkilasyon). Bu işlemin sonunda önce spotlar asetonitril içerisine alınmış ve sonra asetonitril uçurularak uzaklaştırılmıştır. Son derişimi 10 ng/µL olan tripsin ile 30 °C' de gece boyu peptidlerine parçalanmıştır. Zip - Tip pipet uçları önce asetonitril ve % 0.1 triflorik asit ile dengelenip sonra her numune 25 - 30 defa pipetlendikten sonra MALDI matris ile MALDI plaka üzerine elüsyonu yapılmıştır (115).

3.11. Proteinlerin MALDI-TOF/TOF-MS ile Analizi ve Peptid Dizileme ile Proteinlerin Tanımlanması

Jeldeki proteinlerin kesilmesi, tripsin enzimi ile peptidlerine parçalanması, MALDI-TOF/TOF-MS ile analizi ve PMF ile proteinlerin tanımlanması çalışmaları Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Zip - Tip (Milipore C18 pipet ucu) sonrası MALDI plakasına yerleştirilen örneklerin, MALDI-TOF/TOF-MS cihazında analizleri yapılmıştır. Yöntemde lazer ışığı kullanarak iyonize olan peptidlerin, vakumlu bir tüp içerisinde ayrıldıktan sonra m/z değerlerine göre peptidlerin amino asit dizilimleri tanımlanmaya çalışılmıştır. MALDI kalibrasyonu, eksternal

veya internal kalibrant kullanılarak yapılmış, her bir spektrum için ortalama 200 lazer darbesi kullanılmıştır. Elde edilen tüm spektrumlar, arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, fiksed modifikasyon olarak karbamidometil (sistein), değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, peptid yükü + 1, monoizotopik kütle değerleri, peptid kütle toleransı ± 50 ppm, fragment kütle toleransı ± 0.25 Da olarak belirlenerek MASCOT veri bankasında analiz edilmiştir (115). Cihazdan elde edilen verilerin, on-line MASCOT veri bankasından "*Protein Pilot*" programı kullanılarak hangi proteine ait oldukları belirlenmiştir.

3.12. Farklılaşan Proteinlerin Fonksiyonu ve Protein - Protein Etkileşimi

Kolon ve karaciğer kanseri hücrelerinde farklılaştığı saptanan proteinler arasındaki biyolojik ilişkiyi ortaya koymak ve hücresel yolları belirlemek için SwissProt, UniProt, String, QuickGO ve KEGG programları kullanılmıştır.



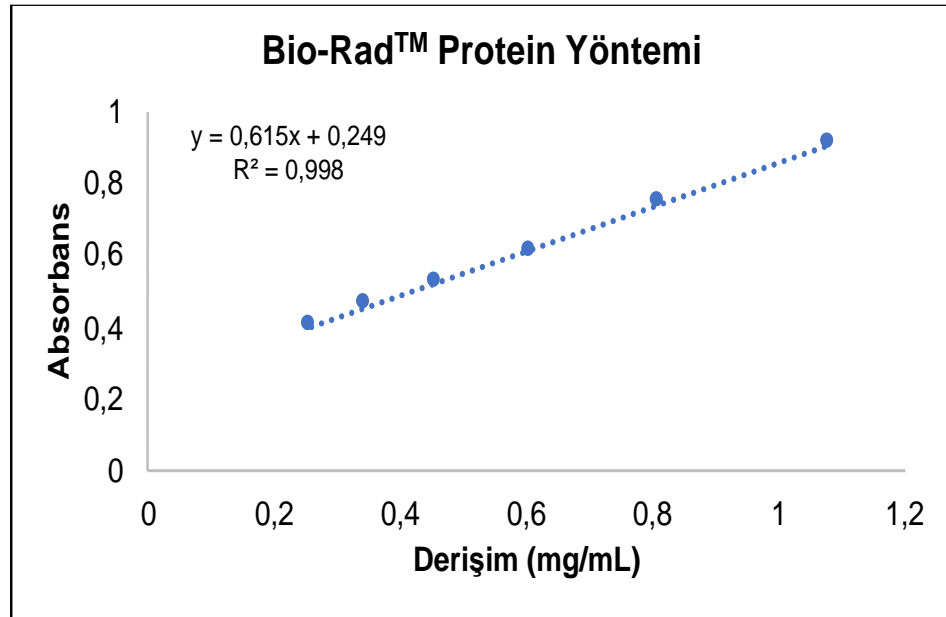
4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Bu tez çalışması kapsamında 3 farklı kanser hücre hattı kullanılmıştır. ABS ile Caco-2 ve HT-29 hücreleri 24 ve 72 saat, HepG2 hücreleri ise 24 saat muamele edilerek sitozolik fraksiyonlar elde edilmiştir.

4.2. Protein Miktar Tayini

Proteinlerin 2D jel elektroforez ile ayırımının yapılabilmesi için öncelikle elde edilen sitozolik fraksiyonlardaki protein miktarı, "Bio-Rad™ Protein Assay" yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde sığır serum albümin standartları kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş ve sitozolik fraksiyonlardaki protein miktarları regresyon denklemleri kullanılarak bulunmuştur. Protein miktar tayini sonuçları Şekil 4.1. ve Tablo 4.1.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Bio-Rad™ protein miktar tayini kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.1. Bio-Rad™ protein miktar yöntemi tayini kullanılarak C ve T grubunda bulunan protein miktarları (mg/mL).

Hücre	Saat	C Grubu	T Grubu
Caco-2	24 saat	1.53	1.52
	72 saat	3.04	2.75
HT-29	24 saat	2.51	1.74
	72 saat	1.30	1.44
HepG2	24 saat	1.96	1.78

4.3. Caco-2 Kolon Kanseri Hücrelerinde Proteomik Çalışma Bulguları

Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde, C ve T gruplarından elde edilen sitozolik fraksiyonlardaki protein miktarları belirlendikten sonra fraksiyonlardaki proteinler çöktürülmüştür. Çöktürülen proteinler yükleme tamponunda çözülüp pH 4 - 7 ve pH 5 - 8 IPG şeritlere yüklenmiştir. Jellerde gözlenen spot miktarının pH 4 - 7' de daha fazla olması ve spotların birbirinden daha iyi ayrılması nedeniyle pH 4 - 7 IPG şeritlerle çalışmaya devam edilmiştir. Proteinlerin pI' larına göre ayrılabilmesi için farklı IEF programları denenmiş, bkz. Tablo 3.8.' de verilen optimum koşullar belirlenmiştir. İyi bir ayırım yanında ayrılan proteinlerin iyi bir biçimde boyanarak imaj analizi çalışmalarında yoğunluklarının (intensitelerinin) en doğru şekilde karşılaştırılması, yapılan çalışmanın sağlıklı sonuçlar verebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla Commassie mavisini ve SYPRO - Ruby ile boyama tekniği denenmiştir. 24 saatlik Caco-2 hücreleri Commassie mavisini ile boyanırken 72 saatlik Caco-2 hücreleri SYPRO - Ruby ile boyanmış ve boyama işlemi sonucunda SYPRO - Ruby floresan boyası kullanılarak gözlenen spot sayısı, Commassie mavisini ile boyama sonucunda gözlenen spot sayısının yaklaşık 3 katı olduğu bulunmuştur. 24 saatlik Caco-2 hücrelerinde Commassie mavisini ile boyama yapılmış, 72 saatlik Caco-2 hücrelerinde SYPRO - Ruby ile boyama yapılmıştır (Bkz. Bölüm 3.8.1. ve 3.8.2.) .

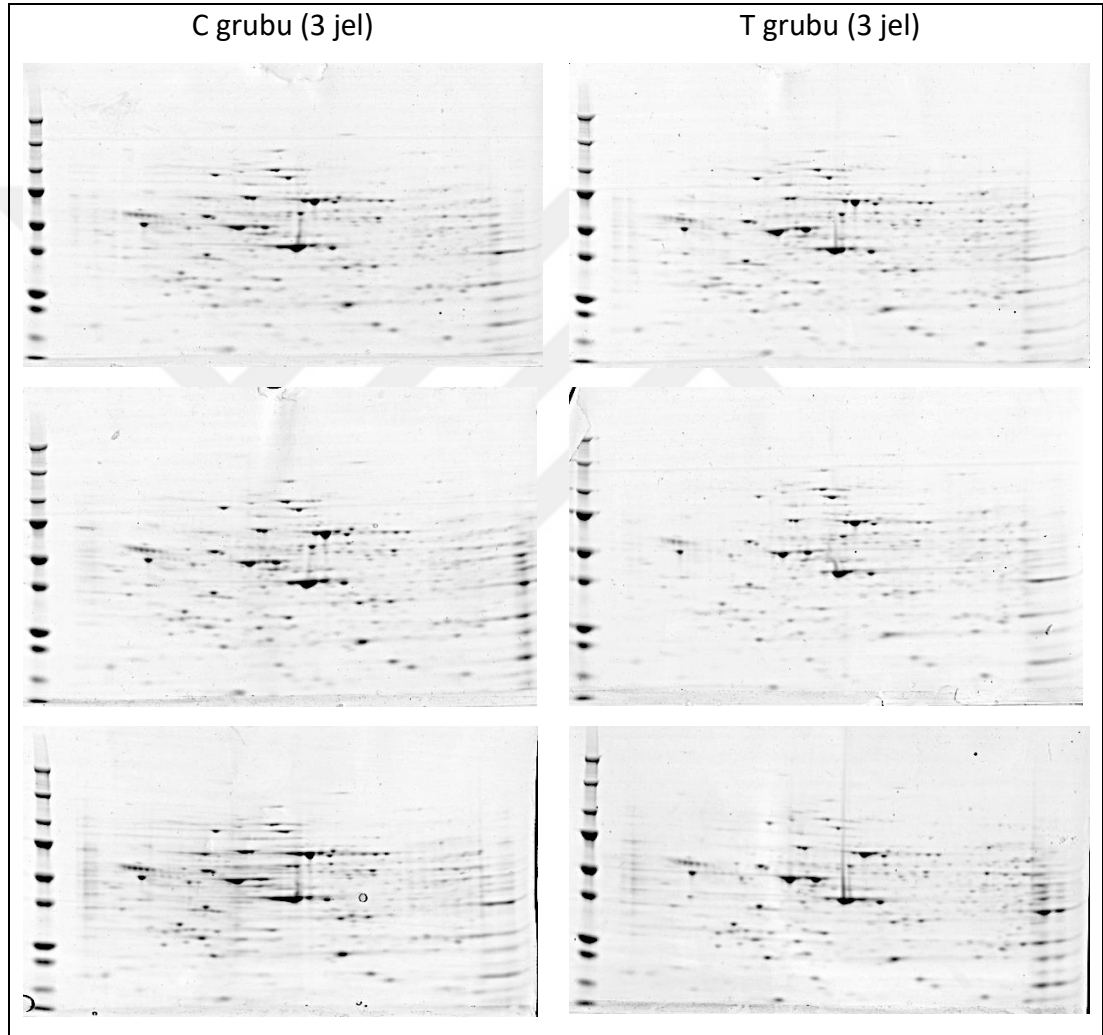
4.3.1. İmaj Analizi Çalışmaları

Proteinlerin 2D jel elektroforez ile ayırımı sonrası jeller boyanıp görüntüleme cihazı aracılığıyla jel görüntüleri alınmıştır. Elde edilen jel görüntülerinin imaj analiz çalışmaları,

PDQuest™ yazılımı aracılığıyla yapılmıştır. C ve T grupları arasında saptanan düşük veya yüksek miktarda ifade edilen proteinler saptanmıştır.

24 Saatlik Caco-2 Hücrelerine Ait İmaj Analizi Çalışmaları:

24 saatlik Caco-2 hücrelerinin C ve T grubuna ait proteinler, 2D jel elektroforez ile ayrılmış, jeller Commassie mavisini ile boyanıp görüntüleme cihazı aracılığıyla jel görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.2.).

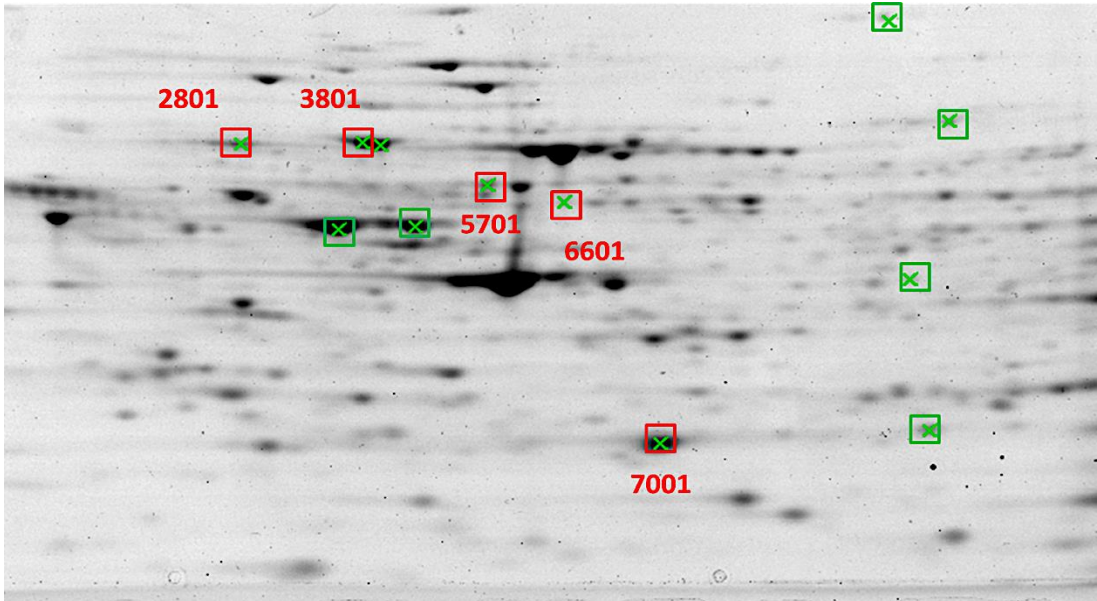


Şekil 4.2. C ve T grubuna ait tekrarlı jel görüntüleri (24 saatlik Caco-2 hücreleri).

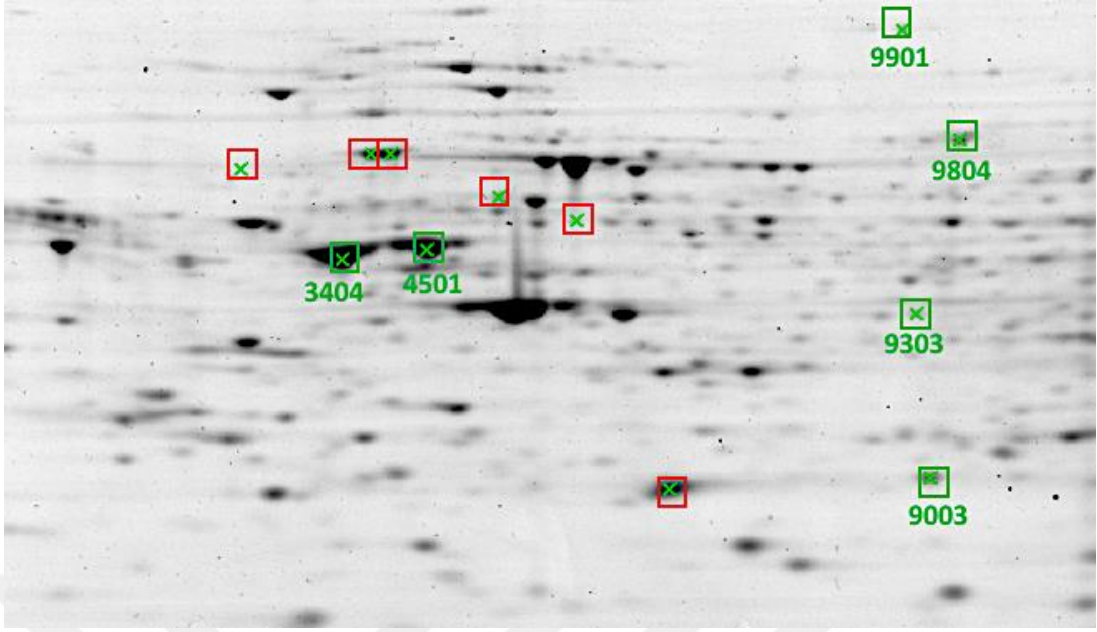
PDQuest™ programı ile C ve T gruplarına ait 3 tekrarlı jellerin karşılaştırılması sonrasında program tarafından verilen sanal jel haritaları üzerinde Caco-2 hücre hattı için 165 tane spot tespit edilmiştir. Tespit edilen spotların tamamı program tarafından bulunduğu koordinata göre SSP (SSP: Seçilmiş spot pozisyonu) numaraları verilerek numaralandırılmıştır.

Farklılaşan spotların tespiti, sadece gözle takip edilerek yapılırsa hatalara sebebiyet vermesi nedeniyle Bkz. Bölüm 3.9.' da anlatıldığı gibi PDQuest™ programında 3 tane küme tanımlanmıştır. C ve T grupları arasında intensitelerinde en az 2 kat farklılaşma saptanan spotlardan oluşan analiz kümesine Quant adı verilmiş ve 22 tane spot saptanmıştır. C ve T gruplarının kendi içinde istatistiksel olarak % 95 güven seviyesinde intensiteleri aynı olduğu saptanmış spotlardan oluşan analiz kümesine Statistic adı verilmiş ve 35 tane spot saptanmıştır. Booln adı verilen küme ise Statistic ve Quant kümelerinin kesişim kümesi olup; grup içinde % 95 güven seviyesinde intensiteleri uyuşurken, gruplar arasında en az 2 kat intensiteleri farklılaşan spotlardan oluşan 19 tane spot saptanmıştır. Saptanan 19 tane spot görüntüleri tekrar incelendiğinde bazı spotların birbirlerine çok yakın oldukları gözlenmiştir. Bu spotların aynı protein ailesine ait olabileceği literatürlerde yer almaktadır. Bu nedenle içlerinden en yüksek değişime sahip olanlar seçilerek analiz edilmiştir.

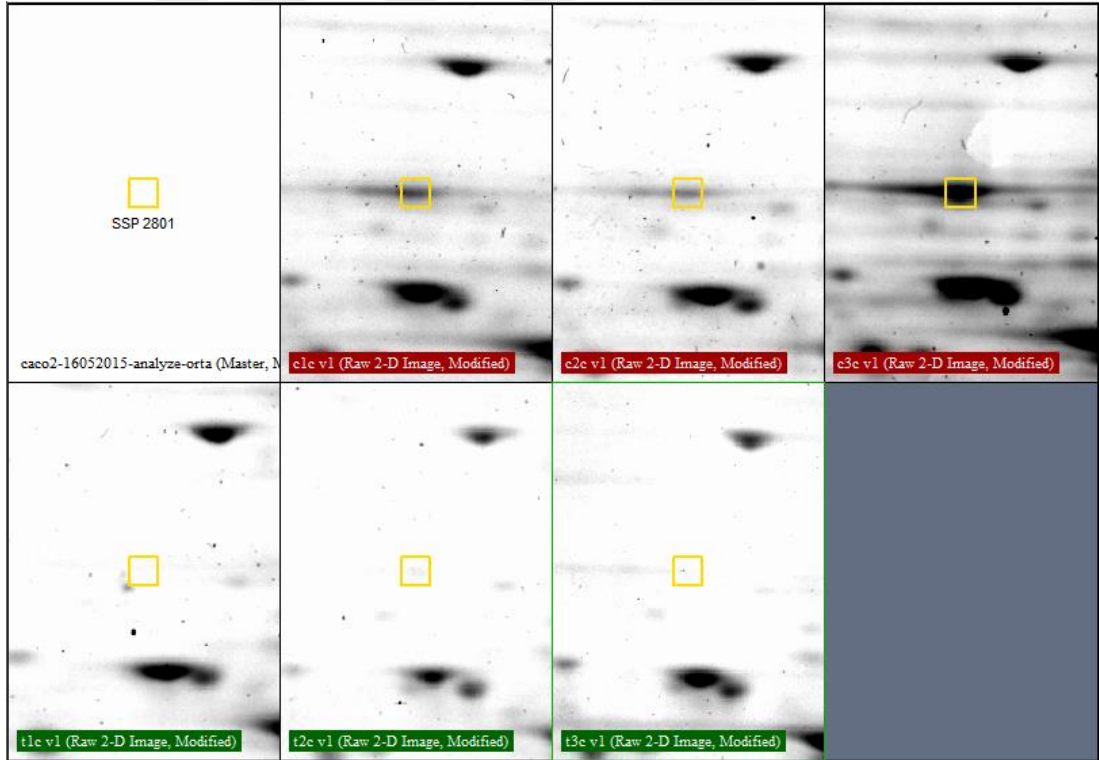
19 spottan 11 tanesi MALDI-TOF/TOF-MS analizi için seçilmiş (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.) ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı' nda kesilerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.' de verilen ilgili spotların yakın görüntüleri Şekil 4.5. - 4.15.' de sunulmuştur (Kırmızı ile işaretlenen protein ABS' nin etkisiyle azalmış (*under expressed*), yeşil ile işaretlenen protein spotları ise ABS' nin etkisiyle artmış (*over expressed*)' tir). ABS' nin etkisiyle azalan proteinler (5 tane) Şekil 4.5.- 4.9.' da ve ABS' nin etkisiyle artan proteinler (6 tane) Şekil 4.10. - 4.15.' de verilmiştir.



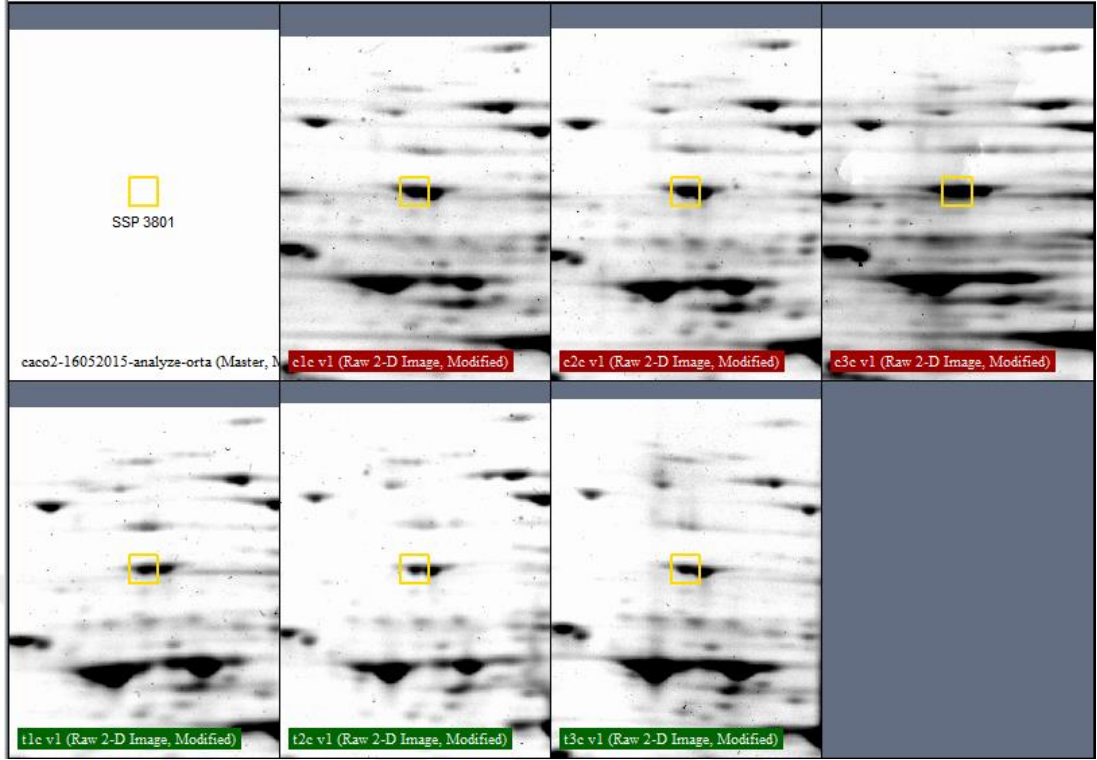
Şekil 4.3. 24 saatlik C grubu Caco-2 hücrelerine ait görüntü.



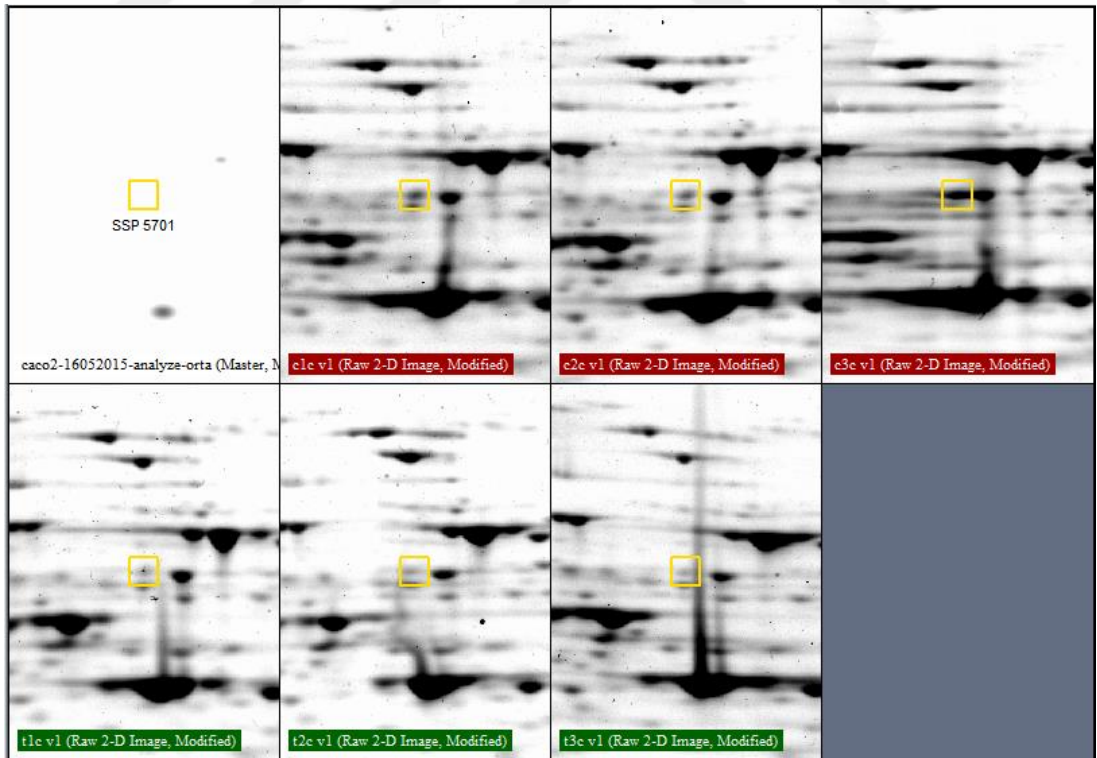
Şekil 4.4. 24 saatlik T grubu Caco-2 hücrelerine ait görüntü.



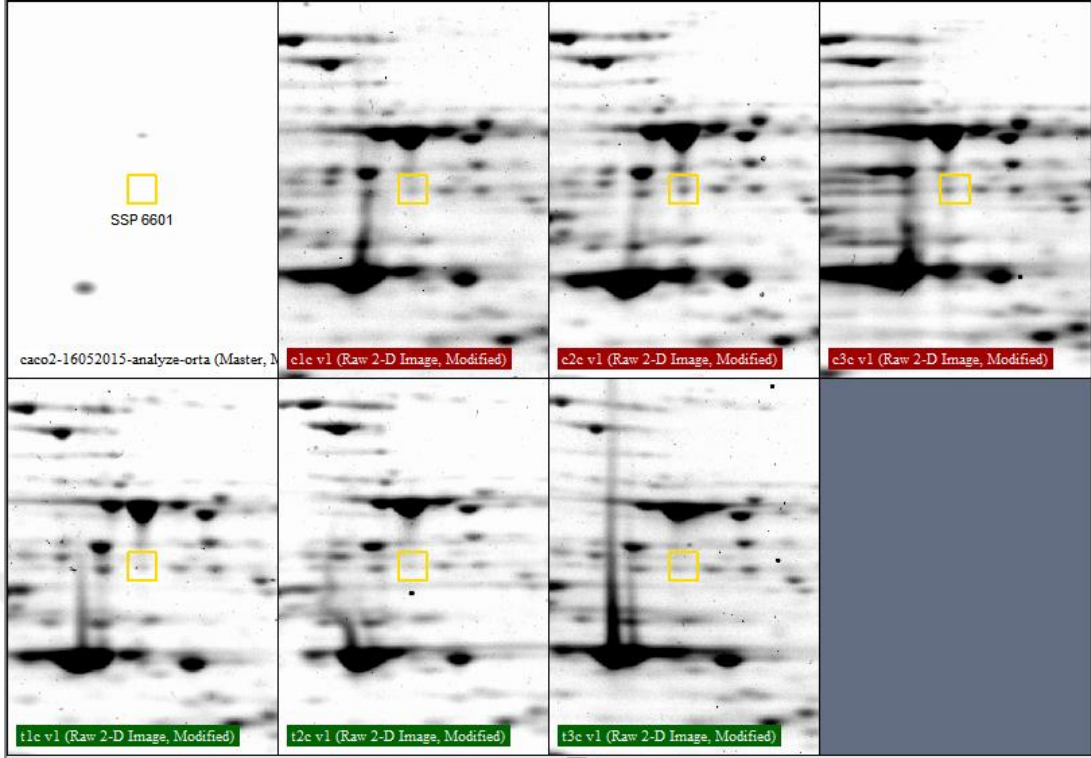
Şekil 4.5. 2801 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.6. 3801 numaralı spota ait görüntü.



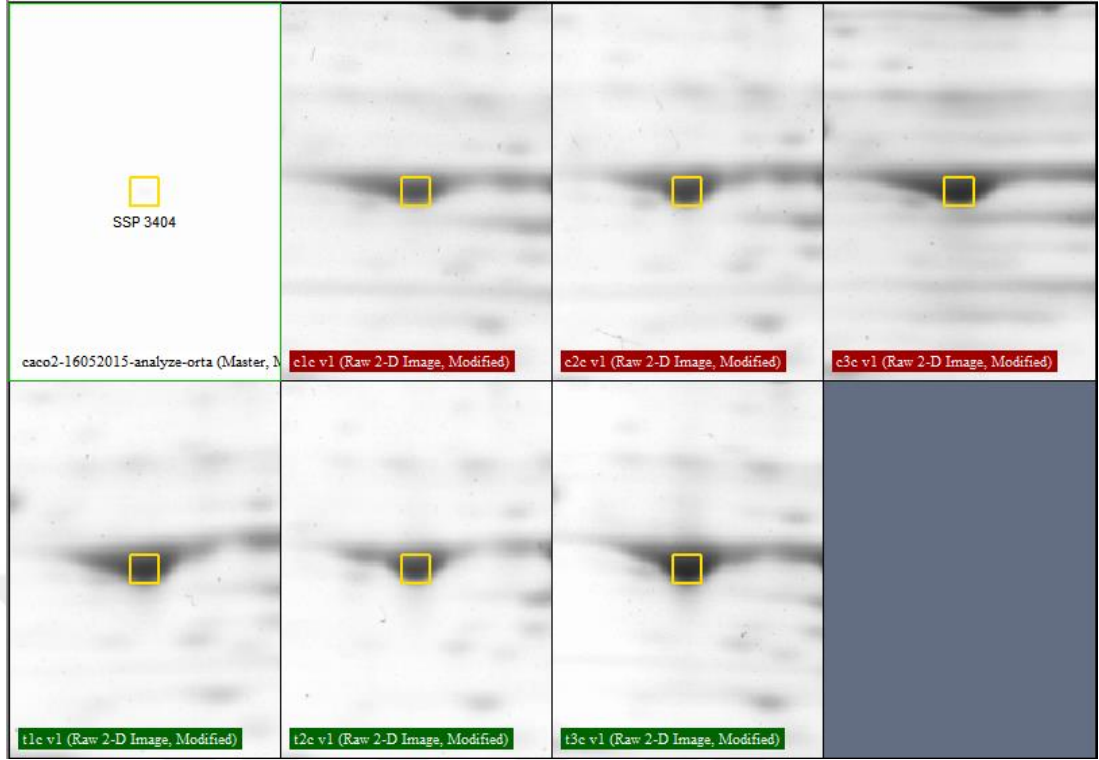
Şekil 4.7. 5701 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.8. 6601 numaralı spota ait görüntü.



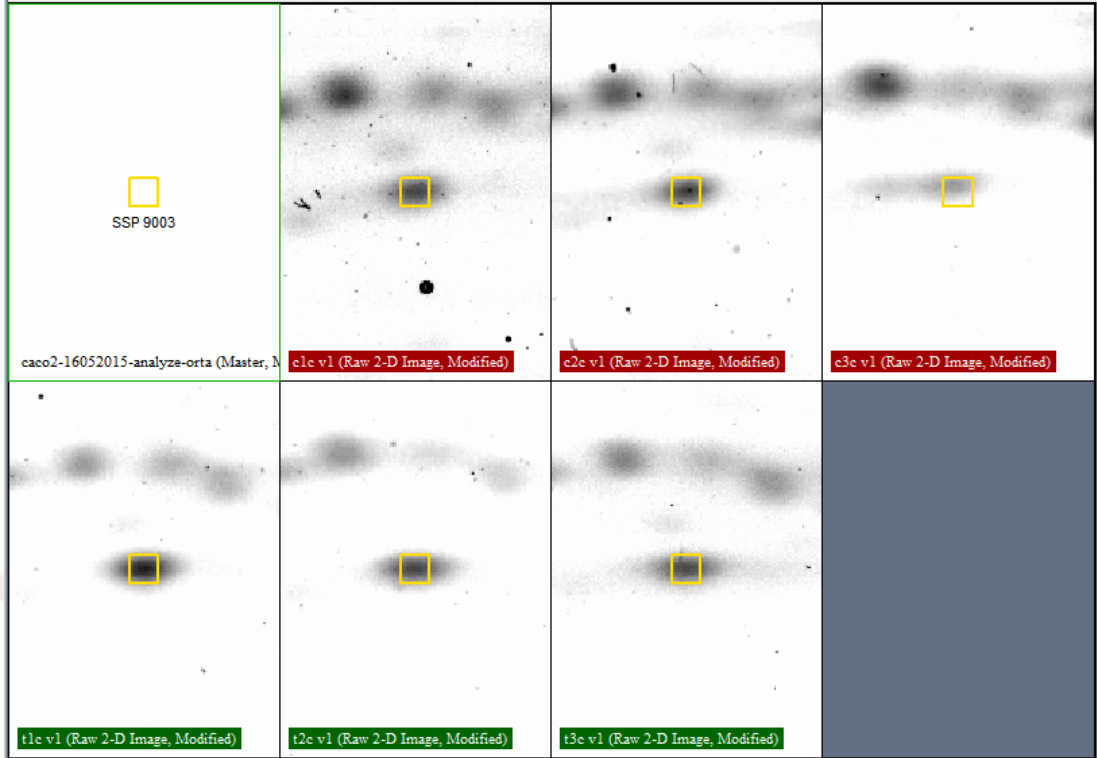
Şekil 4.9. 7001 numaralı spota ait görüntü.



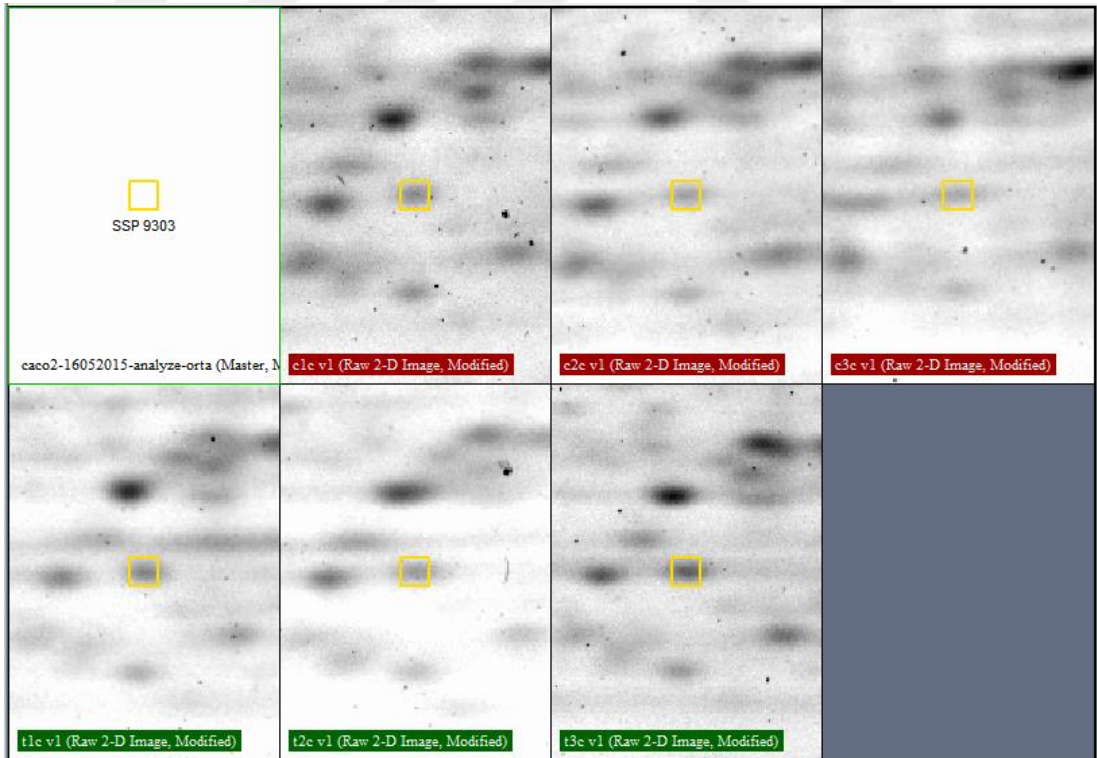
Şekil 4.10. 3404 numaralı spota ait görüntü.



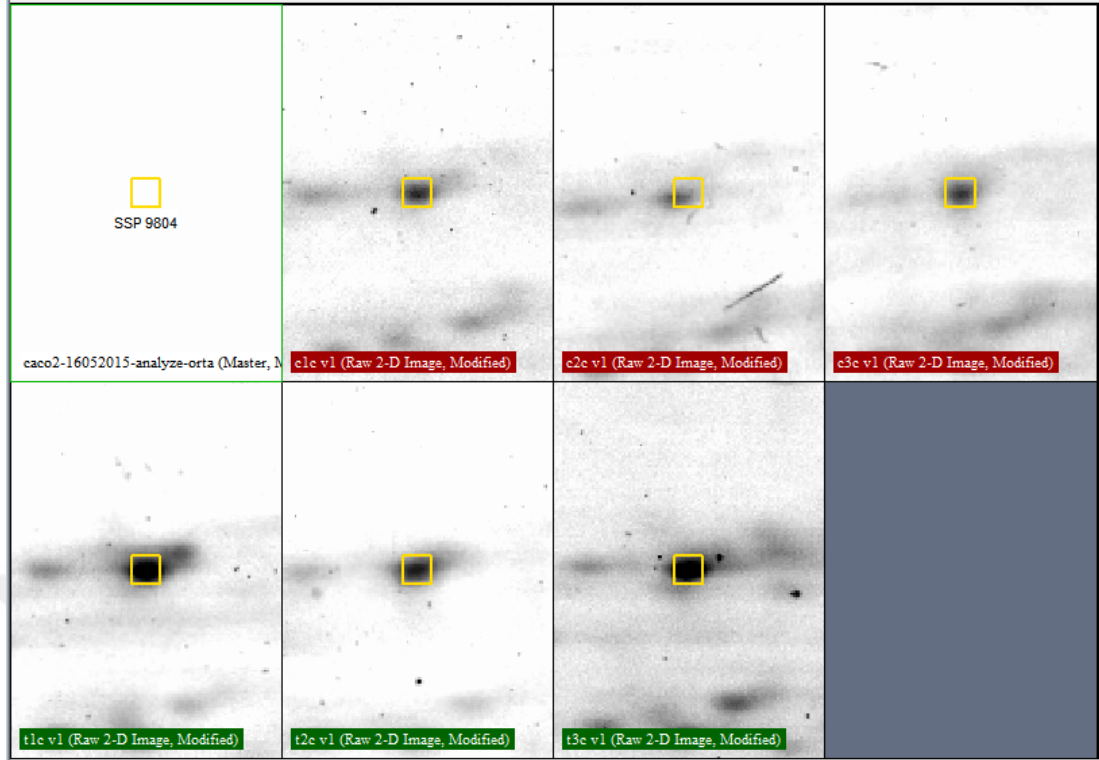
Şekil 4.11. 4501 numaralı spota ait görüntü.



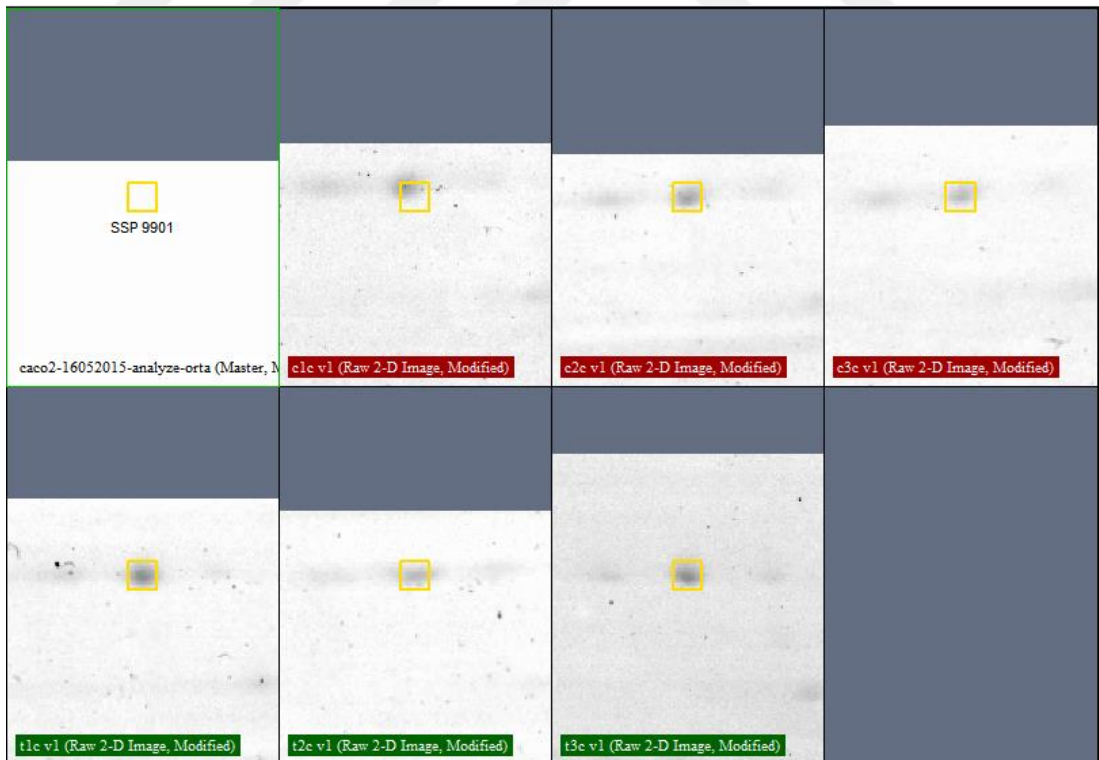
Şekil 4.12. 9003 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.13. 9303 numaralı spota ait görüntü.



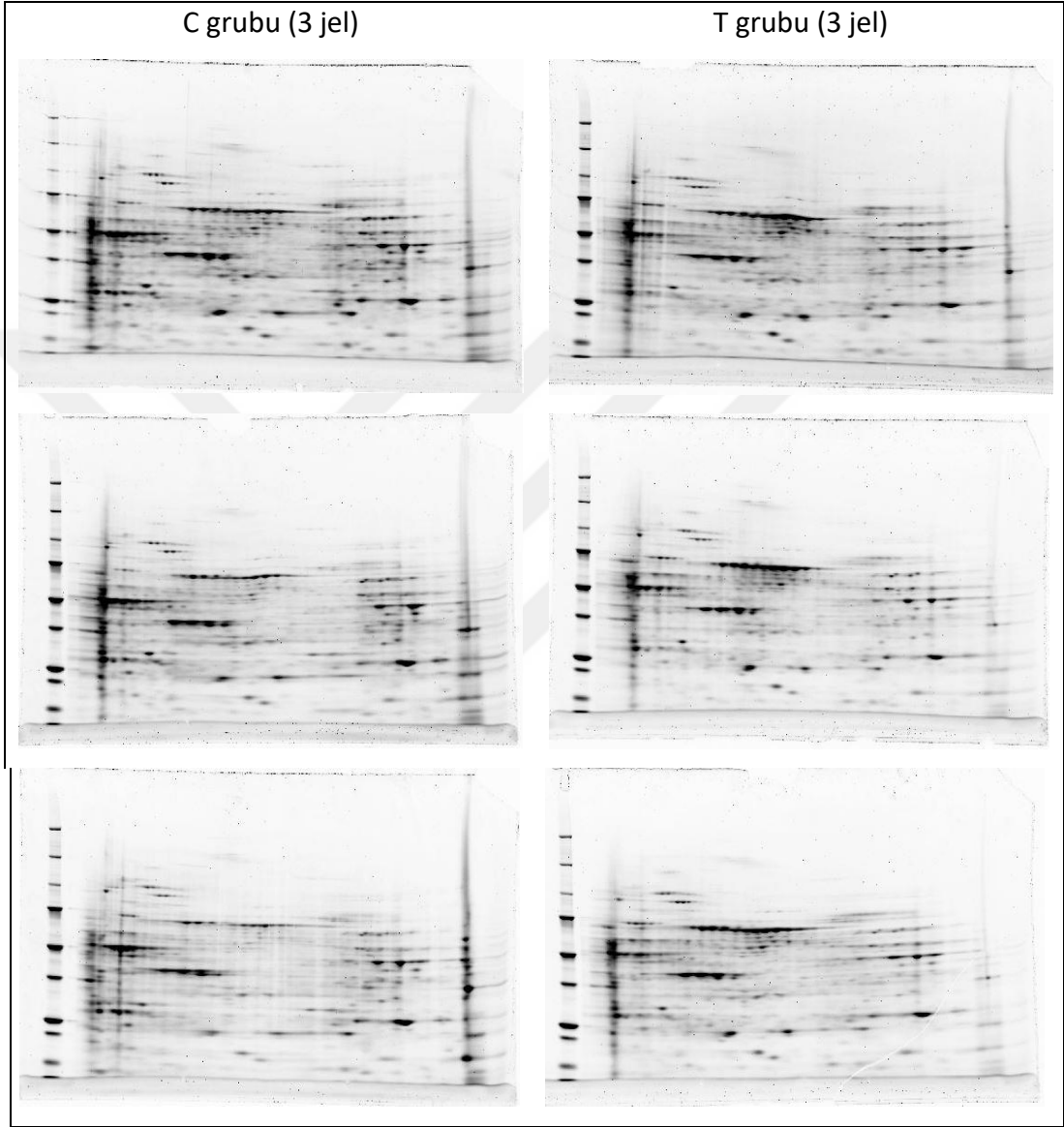
Şekil 4.14. 9804 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.15. 9901 numaralı spota ait görüntü.

72 Saatlik Caco-2 Hücrelerine Ait İmaj Analizi Çalışmaları:

72 saatlik Caco-2 hücrelerinin C ve T grubuna ait proteinler, 2D jel elektroforez ile ayrılmış, jeller SYPRO - Ruby ile boyanıp görüntüleme cihazı aracılığıyla jel görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.16.).

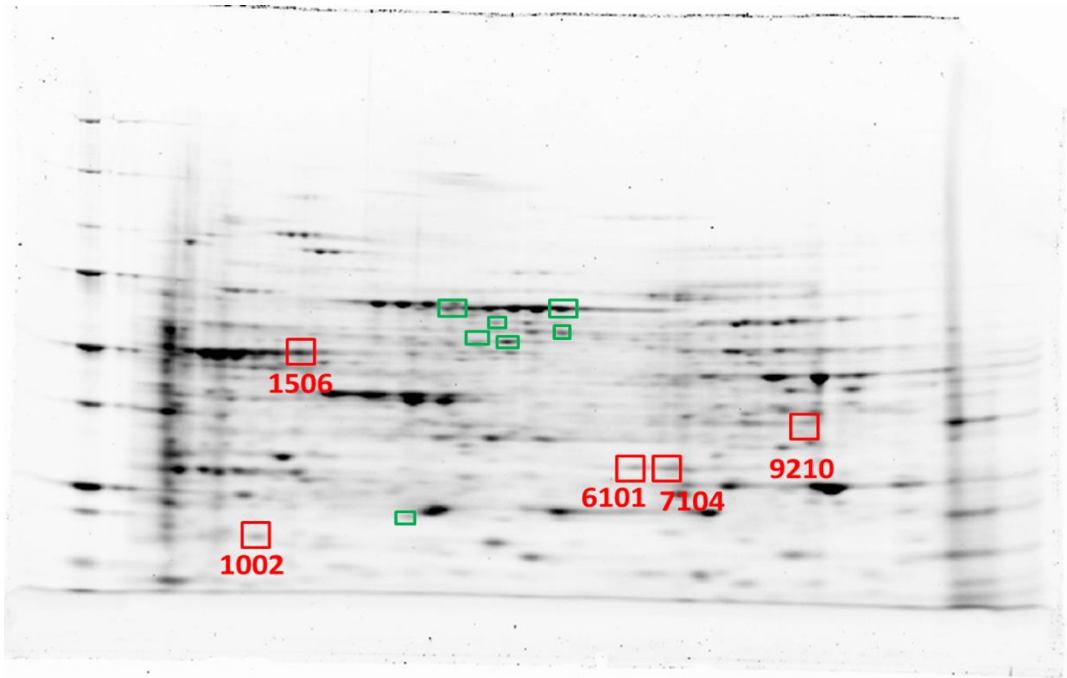


Şekil 4.16. C ve T grubuna ait tekrarlı jel görüntüleri (72 saatlik Caco-2 hücreleri).

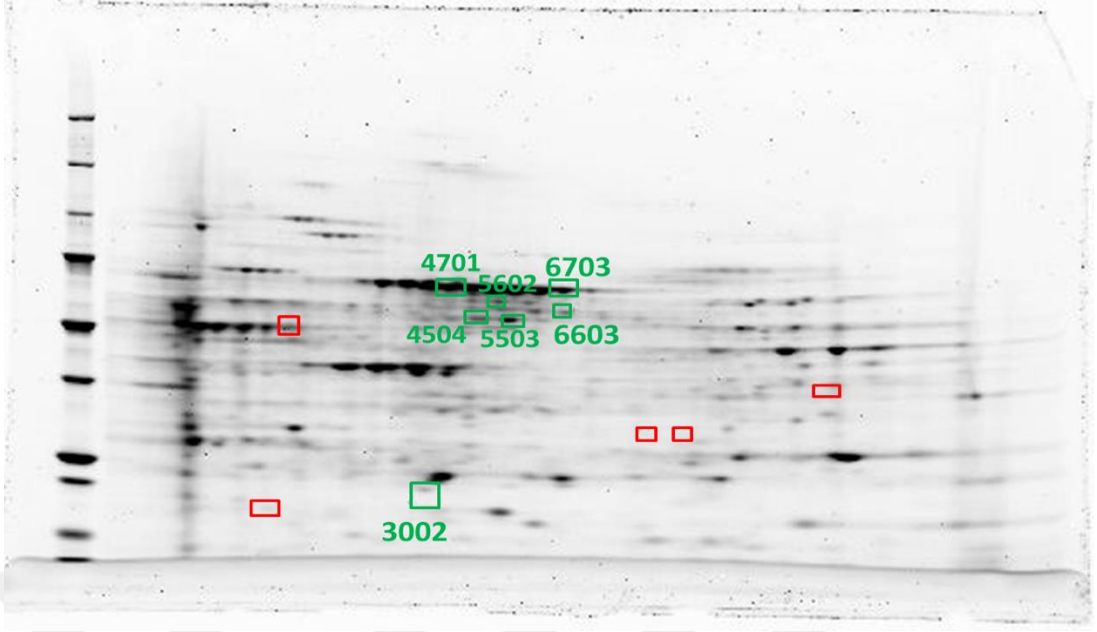
PDQuest™ programı ile C ve T gruplarına ait 3 tekrarlı jellerin karşılaştırılması sonrasında program tarafından verilen sanal jel haritaları üzerinde Caco-2 hücre hattı için 368 tane spot tespit edilmiştir. Tespit edilen spotların tamamı program tarafından bulunduğu koordinata göre SSP numaraları verilerek numaralandırılmıştır. Farklılaşan spotların tespiti, sadece gözle takip edilerek yapılırsa hatalara sebebiyet vermesi nedeniyle Bkz. Bölüm 3.9.'

da anlatıldığı gibi PDQuest™ programında 3 tane küme tanımlanmıştır. C ve T grupları için Quant kümesinde 116 tane spot, Statistic kümesinde 126 tane spot ve her 2 kümenin kesişim kümesi olan Booln kümesinde ise 78 tane spot saptanmıştır. Saptanan 78 tane spot görüntüleri tekrar incelendiğinde bazı spotların birbirlerine çok yakın oldukları gözlenmiştir ve içlerinden en yüksek değişime sahip olanlar seçilerek analiz edilmiştir.

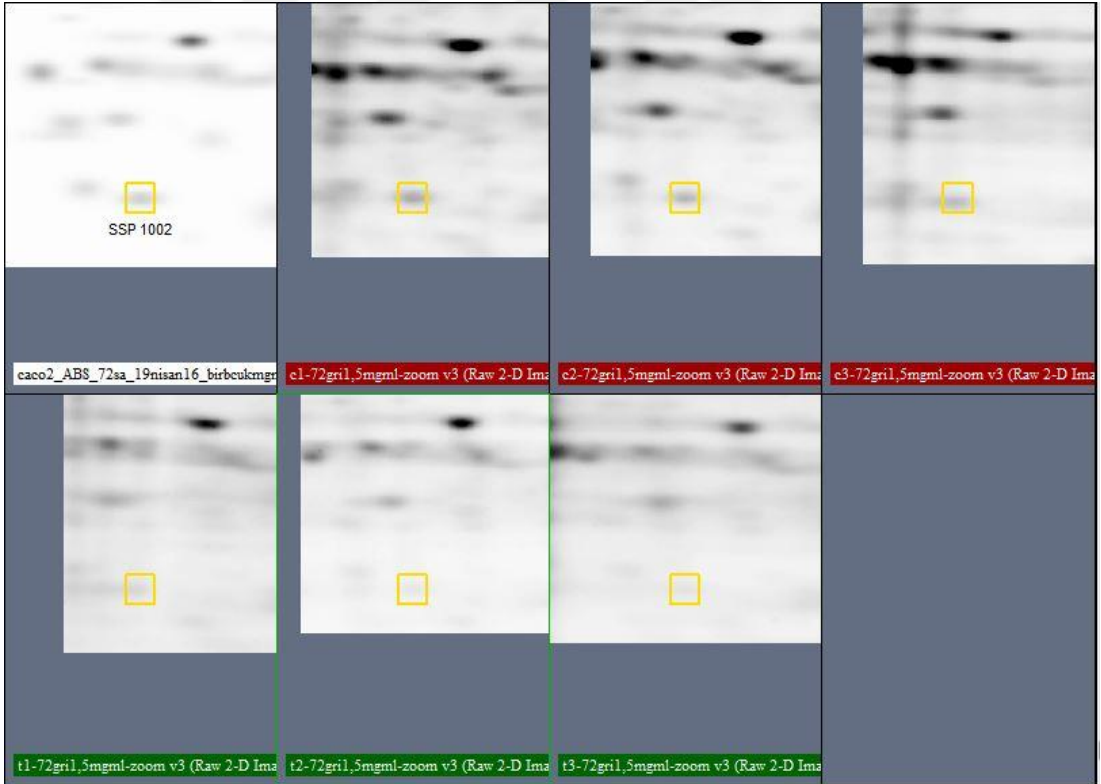
78 spottan 12 tanesi MALDI-TOF/TOF-MS analizi için seçilmiş (Şekil 4.17. ve Şekil 4.18) ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.' de verilen ilgili spotların yakın görüntüleri Şekil 4.19 - 4.30.' da sunulmuştur (Kırmızı ile işaretlenen protein ABS etkisiyle azalmış, yeşil ile işaretlenen protein spotları ise ABS' nin etkisiyle artmıştır). ABS' nin etkisiyle azalan proteinler (5 tane) Şekil 4.19. - 4.23.' de ve ABS' nin etkisiyle artan proteinler (7 tane) Şekil 4.24.- 4.30.' da verilmiştir.



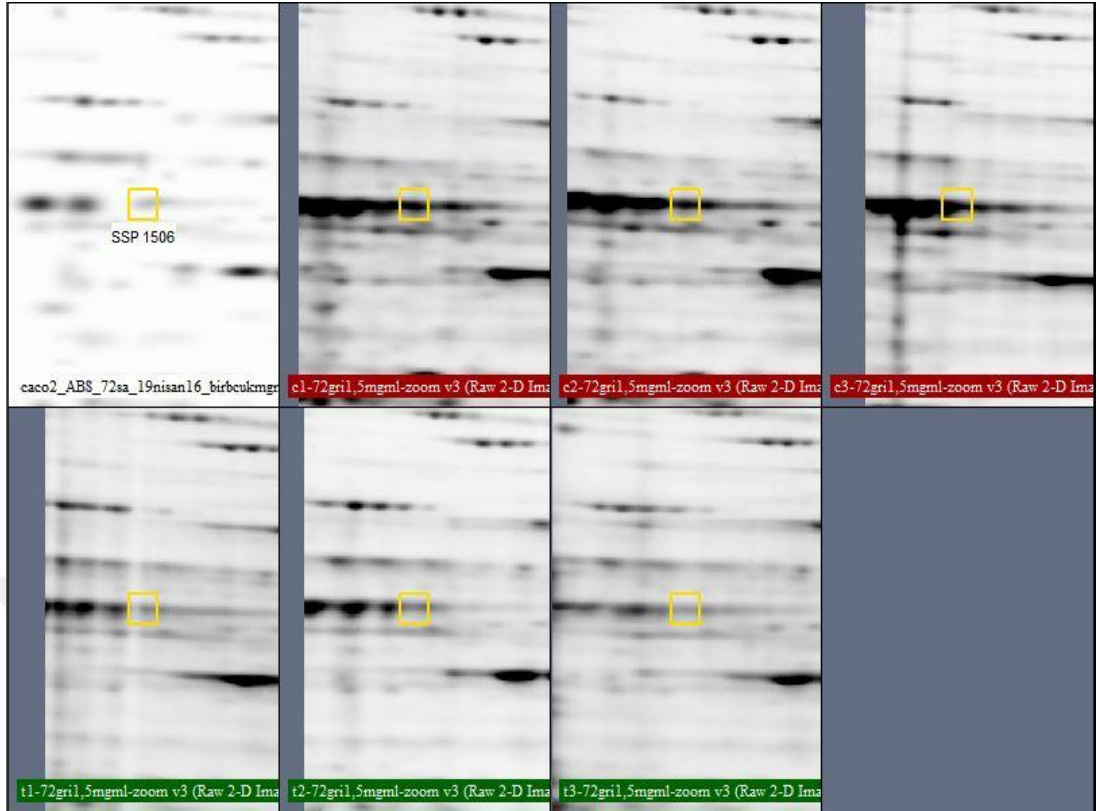
Şekil 4.17. 72 saatlik C grubu Caco-2 hücrelerine ait görüntü.



Şekil 4.18. 72 saatlik T grubu Caco-2 hücrelerine ait görüntü.



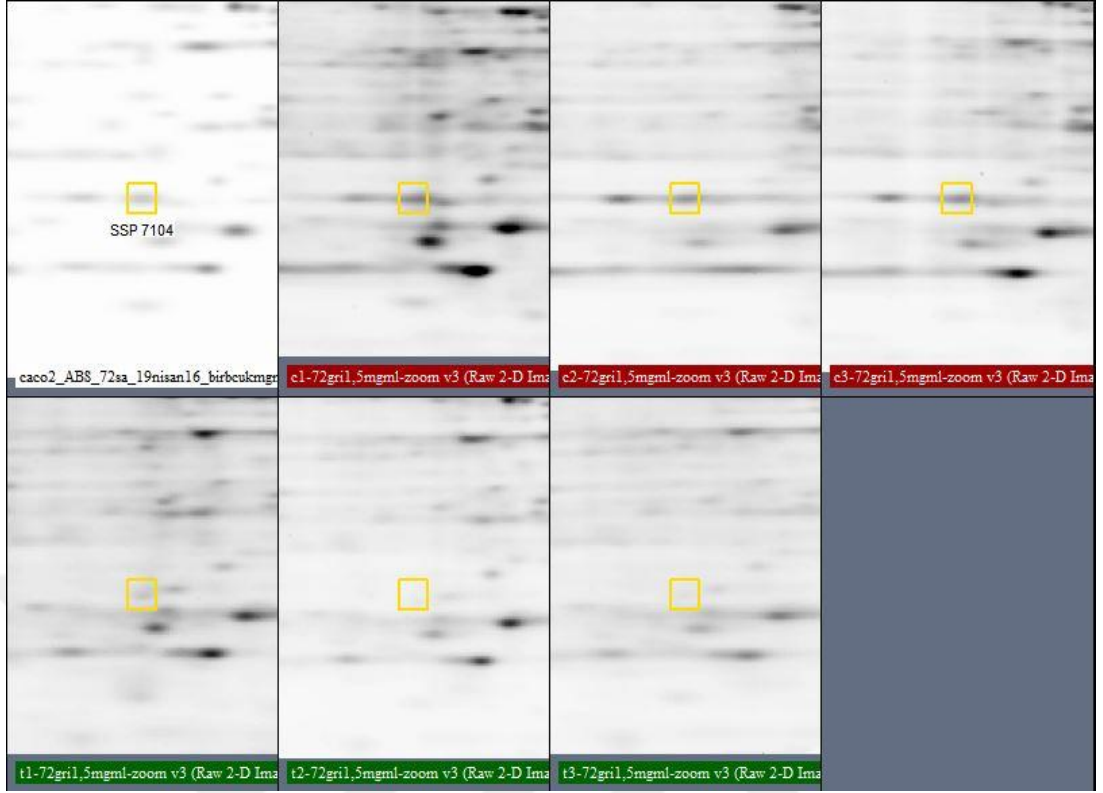
Şekil 4.19. 1002 numaralı spota ait görüntü.



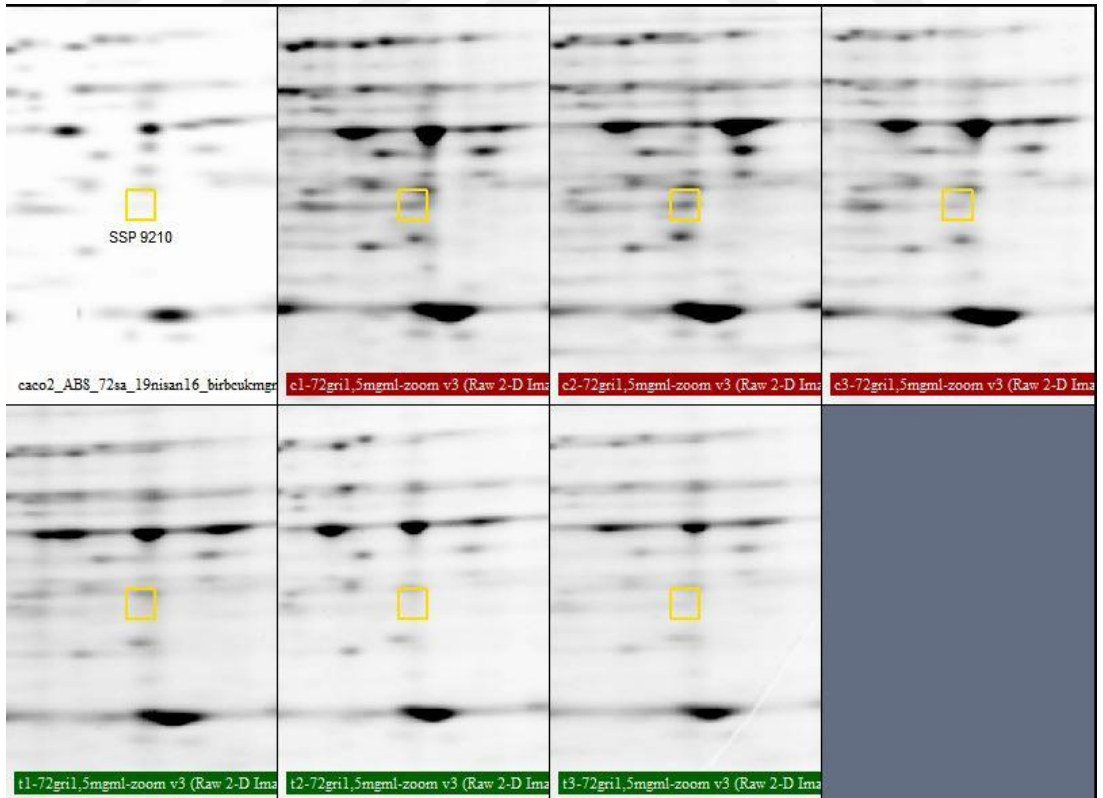
Şekil 4.20. 1506 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.21. 6101 numaralı spota ait görüntü.



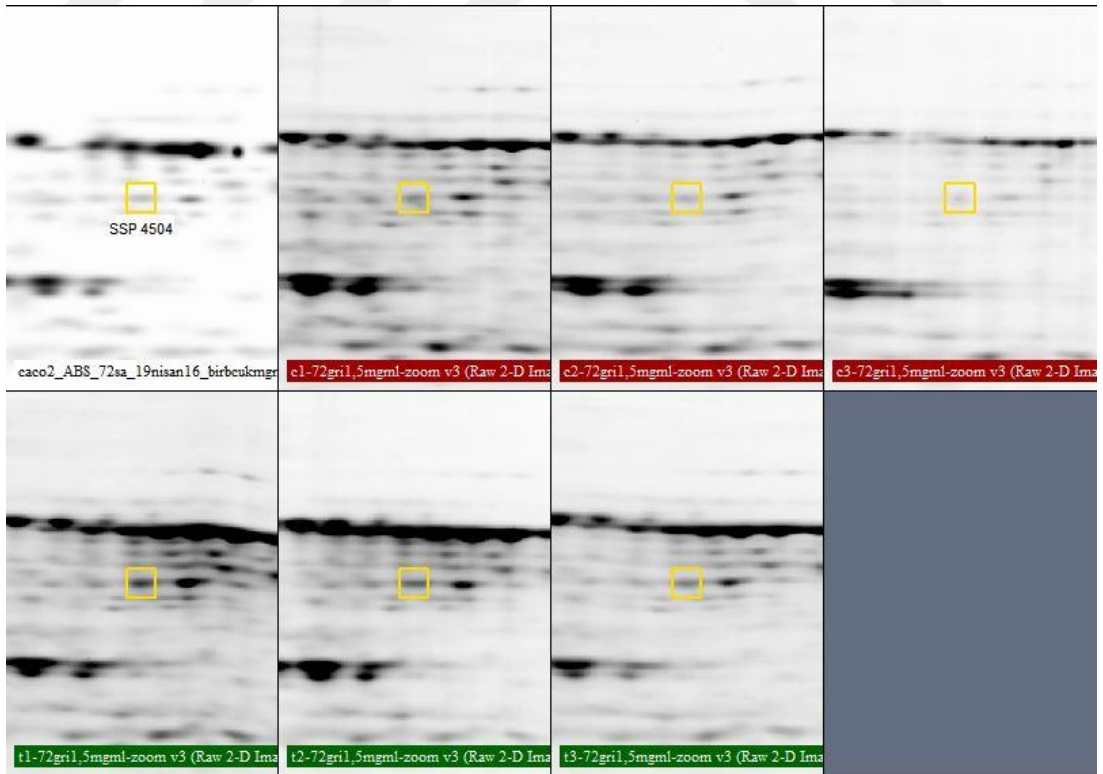
Şekil 4.22. 7104 numaralı spota ait görüntü.



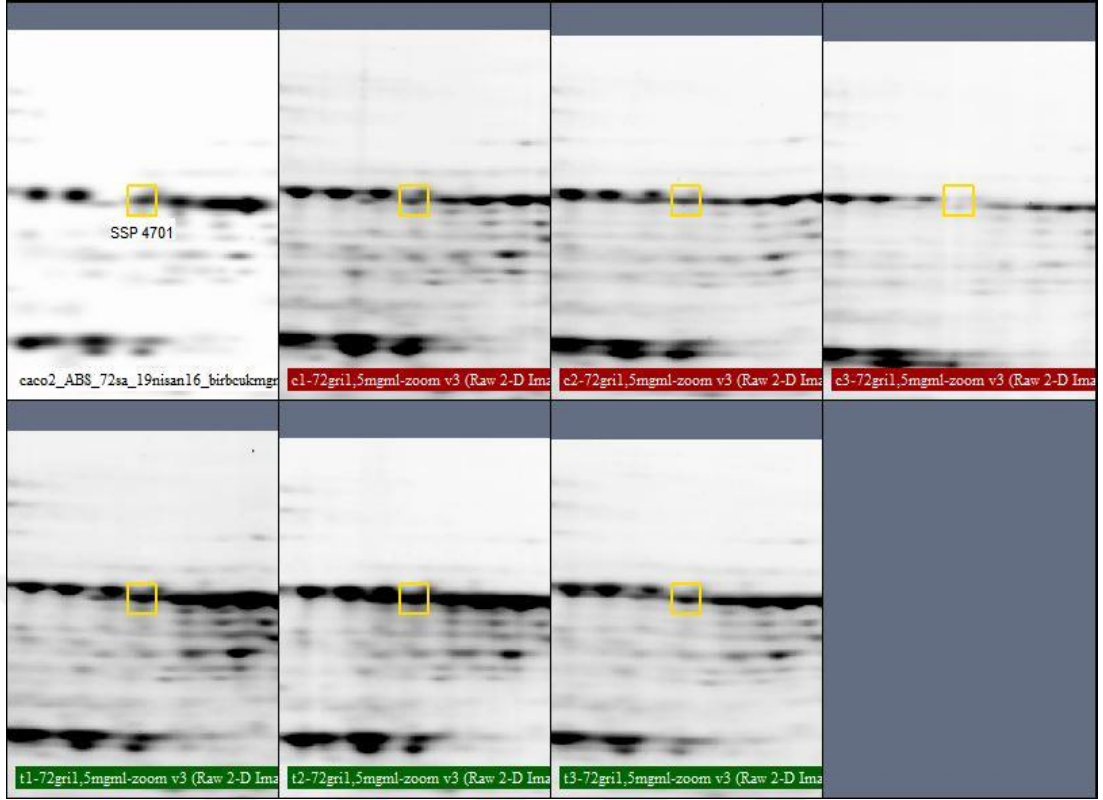
Şekil 4.23. 9210 numaralı spota ait görüntü.



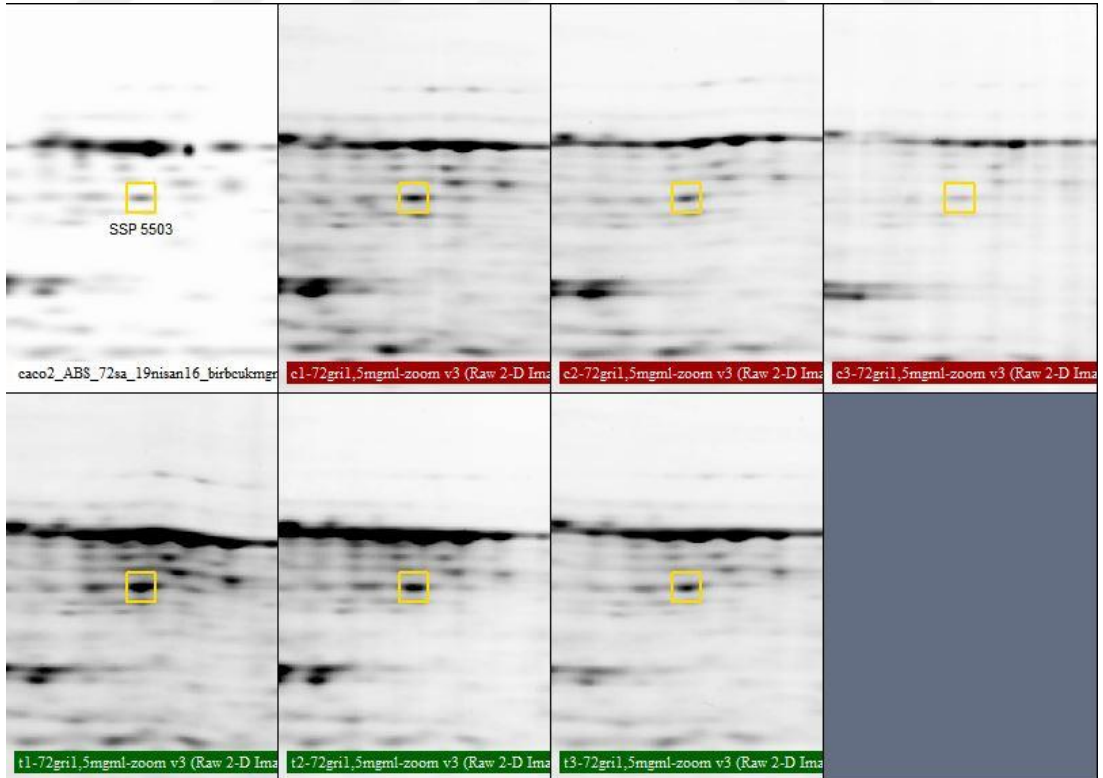
Şekil 4.24. 3002 numaralı spota ait görüntü.



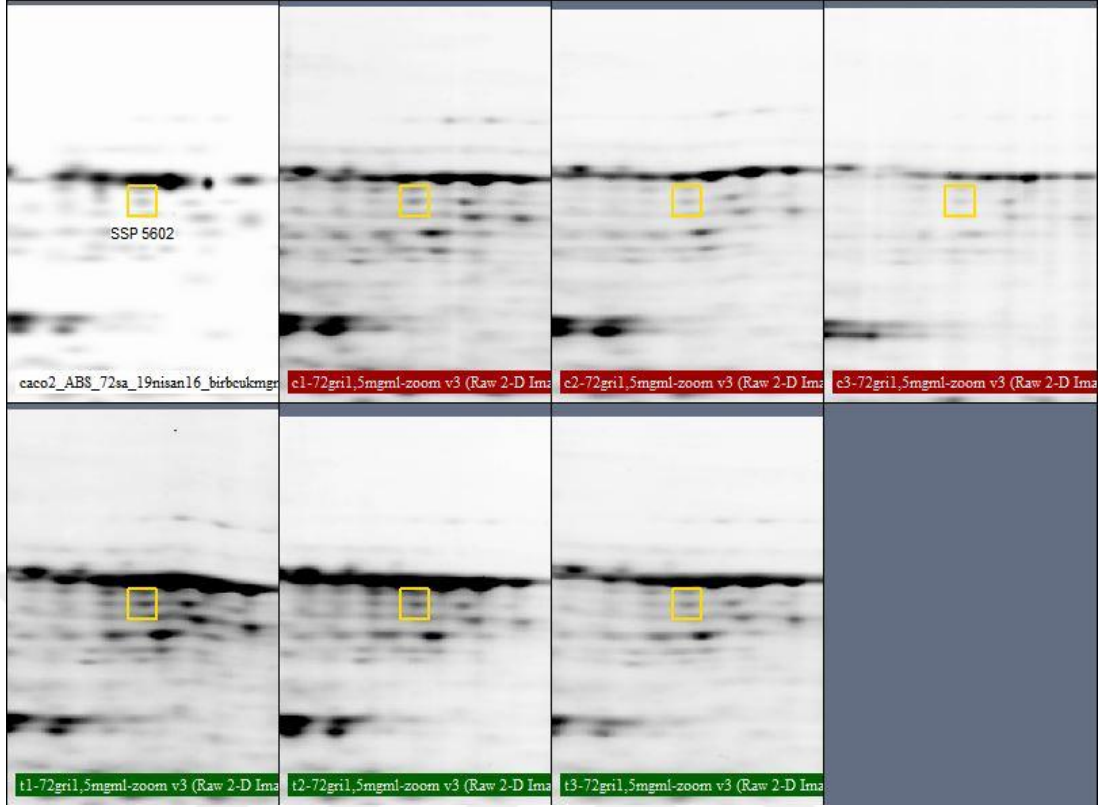
Şekil 4.25. 4504 numaralı spota ait görüntü.



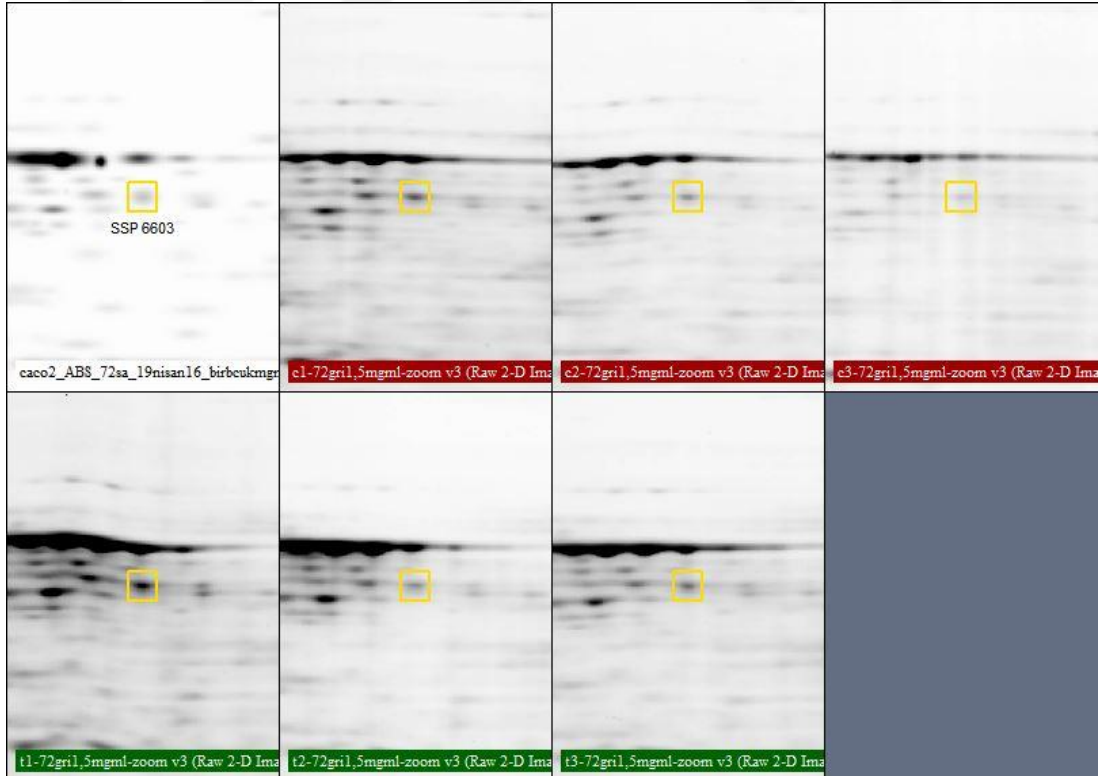
Şekil 4.26. 4701 numaralı spota ait görüntü.



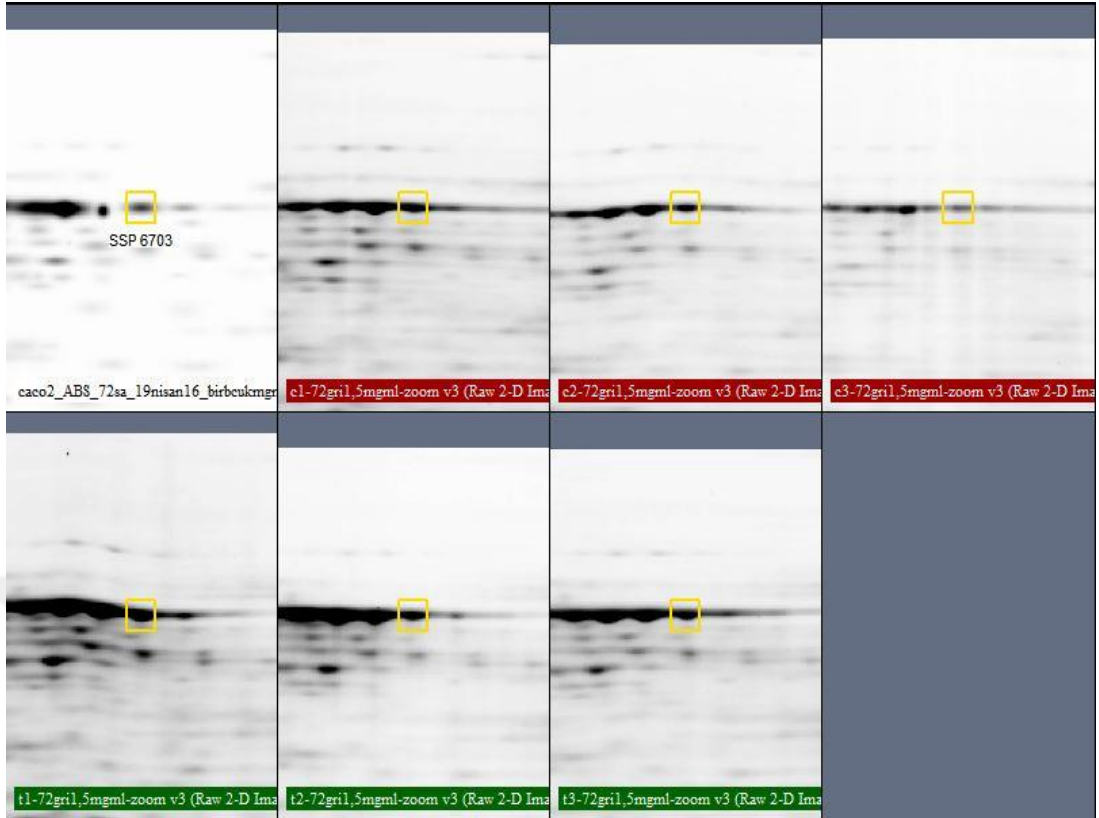
Şekil 4.27. 5503 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.28. 5602 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.29. 6603 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.30. 6703 numaralı spota ait görüntü.

4.3.2 Peptid Dizileme ile Proteinlerin Tanımlanması

En üst düzeyde farklılaşan spotlardan, Caco-2 hücre hattının 24 saatlik C ve T grupları için 11 tane spot (SSP No: 2801, 3801, 5701, 7001, 6601, 3404, 4501, 9003, 9303, 9804 ve 9901); Caco-2 hücre hattının 72 saatlik C ve T grupları için 12 tane spot (SSP No: 1002, 1506, 6101, 7104, 9210, 3002, 4504, 4701, 5503, 5602, 6603 ve 6703) Kocaeli Üniversitesi Proteomik Laboratuvarı'nda jelden kesilmiş, tripsin ile peptidlerine parçalanarak jelden ekstre edilmiştir. Ekstre edilen proteinler MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilmiş ve veri bankaları kullanılarak tanımlanmıştır. PMF için MASCOT programı ve De Novo peptid dizileme (Bkz. Bölüm 4.5.) yöntemleri kullanılmış, Caco-2 kolon kanseri hücrelerine ABS'nin muamelesi sonucunda nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler tanımlanmıştır (Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.).

Tablo 4.2. 24 saat ABS ile muamele sonucunda Caco-2 hücrelerinde nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler.

24 Saat ABS ile Muamele (Caco-2)				
SSP No	C Ortalama	T Ortalama	Değişim (C/T – T/C Oranı)	Protein Adı
ABS' nin etkisi ile azalan				
2801	4.1	0.2	17.6	Çinko parmak protein MYM-tip 4 (<i>Zinc finger MYM-type protein 4</i>) OS=Homo sapiens GN=ZMYM4 PE=1 SV=1
3801	7.8	3.5	2.2	Glukoz regüle protein-78 (<i>78 kDa Glucose-regulated protein</i>) OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2
5701	3.4	0.4	8.5	60 kDa ısı şok proteini (<i>60 kDa heat shock protein</i>), mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2
7001	13.9	11.0	1.3	Glutasyon S-transferaz P (<i>Glutathione S-transferase P</i>) OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2
6601	0.9	0.4	2.3	<i>Differentially expressed in FDCP 6 homolog</i> OS=Homo sapiens GN=DEF6 PE=1 SV=1
ABS' nin etkisi ile artan				
3404	16.1	46.8	2.9	Tubulin beta zinciri (<i>Tubulin beta chain</i>) OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2
4501	9.3	24.5	2.6	Tubulin alfa-1B zinciri (<i>Tubulin alpha-1B chain</i>) OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1
9003	2.0	4.0	2.0	Protein DJ-1 OS=Homo sapiens GN=PARK7 PE=1 SV=2
9303	0.5	1.0	1.9	Galaktokinaz (<i>Galactokinase</i>) OS=Homo sapiens GN=GALK1 PE=1 SV=1
9804	0.8	2.3	2.7	Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR PE=1 SV=4
9901	0.2	0.6	2.4	Vinculin OS=Homo sapiens GN=VCL PE=1 SV=4

Tablo 4.3. 72 saat ABS ile muamele sonucunda Caco-2 hücrelerinde nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler.

72 Saat ABS ile Muamele (Caco-2)				
SSP No	C Ortalama	T Ortalama	Değişim (C/T - T/C Oranı)	Protein Adı
ABS' nin etkisi ile azalan				
1002	2991	863	3.5	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 5A-1 (<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1</i>) OS=Homo sapiens GN=EIF5A PE=1 SV=2
1506	13766	3401	4.0	Tubulin alfa-1A zinciri (<i>Tubulin alpha-1A</i>) chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1
6101	4922	20	246.1	Yüksek hareketlilik grubu protein B1 (<i>High mobility group protein B1</i>) OS=Homo sapiens GN=HMGB1 PE=1 SV=3
7104	6501	314	20.7	Yüksek hareketlilik grubu protein B1 OS=Homo sapiens GN=HMGB1 PE=1 SV=3
9210	3389	1265	2.7	PDZ ve LIM domain protein 1 OS=Homo sapiens GN=PDLIM1 PE=1 SV=4
ABS' nin etkisi ile artan				
3002	75	1946	25.9	Ferritin hafif zinciri (<i>Ferritin light chain</i>) OS=Homo sapiens GN=FTL PE=1 SV=2
4504	1725	5039	2.9	Protein disülfid-izomeraz A3 (<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>) OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4
4701	3648	10098	2.8	70 kDa ısı şok proteini 1A/1B (<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>) OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5
5503	2965	6447	2.2	Protein disülfid-izomeraz A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4
5602	722	2354	3.3	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2
6603	2004	4738	2.4	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2
6703	6033	14471	2.4	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2

4.4. HT-29 Kolon Kanseri Hücrelerinde Proteomik Çalışma Bulguları

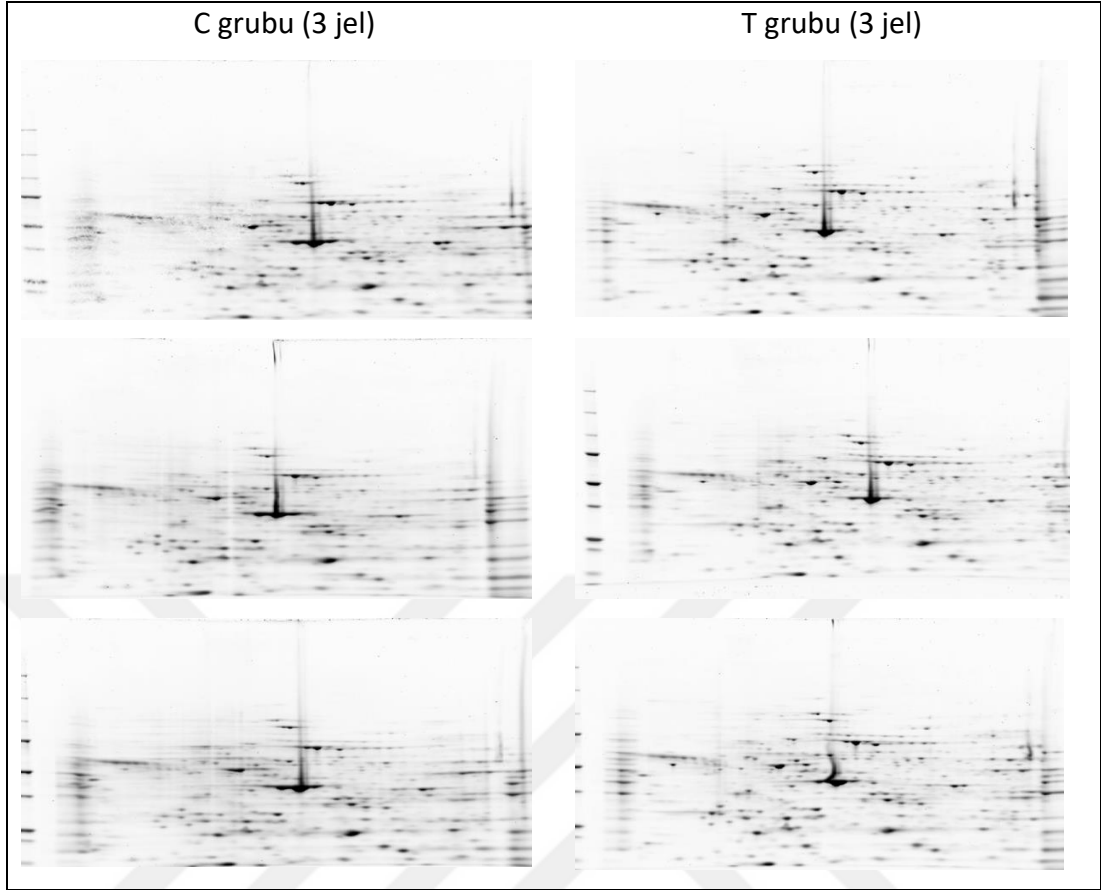
HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, ABS ile muamele edilen hücreler T grubu, muamele edilmeyen hücreler C grubu olarak adlandırılmıştır. Elde edilen sitozolik fraksiyonlardaki protein miktarı belirlendikten sonra fraksiyonlardaki proteinler çöktürülmüştür. Çöktürülen proteinler yükleme tamponunda çözülüp pH 4 - 7 şeritlere yüklenmiştir. Proteinlerin pI' larına göre ayrılabilmesi için Bkz. Tablo 3.8.' de verilen optimum koşullar uygulanmıştır. 24 ve 72 saatlik HT-29 hücrelerinde SYPRO - Ruby ile boyama yapılmıştır.

4.4.1. İmaj Analizi Çalışmaları

Proteinlerin 2D jel elektroforez ile ayrımı sonrası jeller boyanıp görüntüleme cihazı aracılığıyla jel görüntüleri alınmıştır. Elde edilen jel görüntülerinin imaj analiz çalışmaları, PDQuest™ yazılımı aracılığıyla yapılmıştır. C ve T grupları arasında saptanan düşük veya yüksek miktarda ifade edilen proteinler saptanmıştır.

24 Saatlik HT-29 Hücrelerine Ait İmaj Analizi Çalışmaları:

24 saatlik HT-29 hücrelerinin C ve T grubuna ait proteinler, 2D jel elektroforez ile ayrılmış, jeller SYPRO - Ruby ile boyanıp görüntüleme cihazı aracılığıyla jel görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.31.).

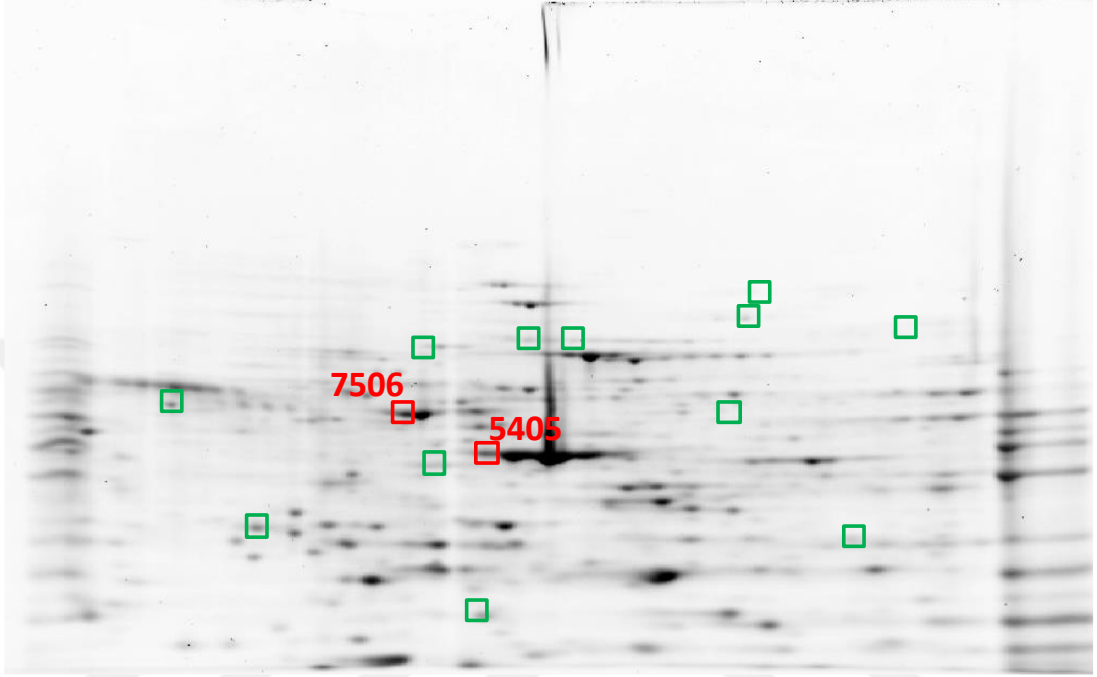


Şekil 4.31. C ve T grubuna ait tekrarlı jel görüntüleri (24 saatlik HT-29 hücreleri).

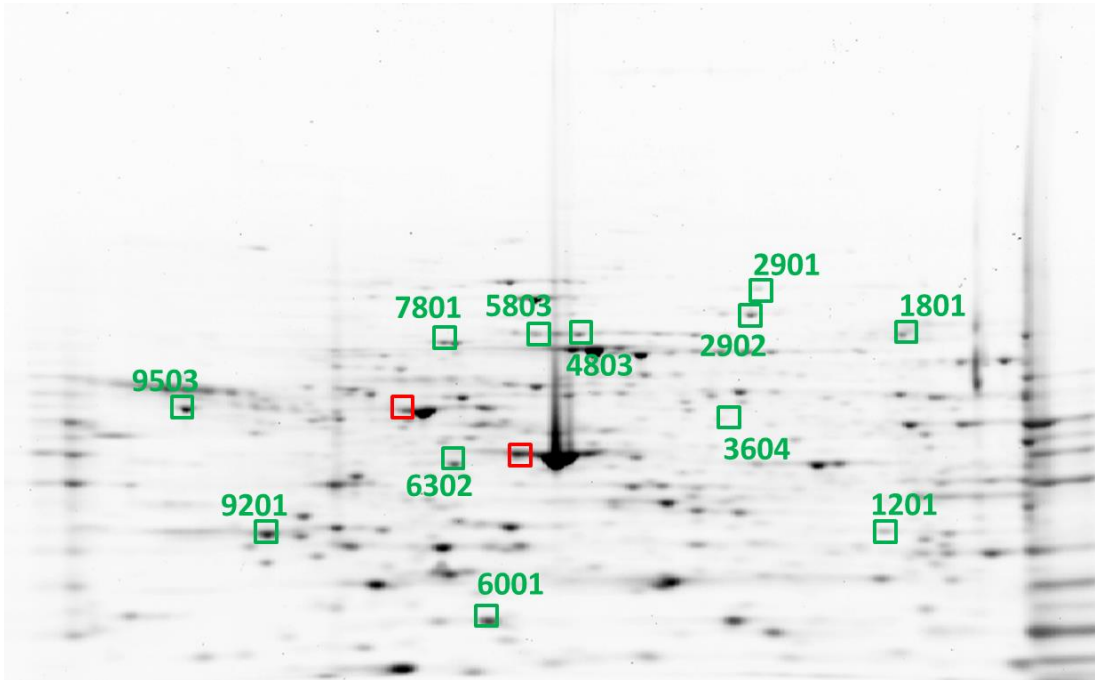
PDQuest™ programı ile C ve T gruplarına ait 3 tekrarlı jellerin karşılaştırılması sonrasında program tarafından verilen sanal jel haritaları üzerinde HT-29 hücre hattı için 277 tane spot tespit edilmiştir. Tespit edilen spotların tamamı program tarafından bulunduğu koordinata göre SSP numaraları verilerek numaralandırılmıştır. Farklılaşan spotların tespiti, sadece gözle takip edilerek yapılırsa hatalara sebebiyet vermesi nedeniyle Bkz. Bölüm 3.9.' da anlatıldığı gibi PDQuest™ programı 3 tane küme tanımlanmıştır. C ve T grupları için Quant kümesinde 47 tane spot, Statistic kümesinde 111 tane spot ve her 2 kümenin kesişim kümesi olan Booln kümesinde ise 40 tane spot saptanmıştır. Saptanan 40 tane spot görüntüleri tekrar incelendiğinde bazı spotların birbirlerine çok yakın oldukları gözlenmiştir ve içlerinden en yüksek değişime sahip olanlar seçilerek analiz edilmiştir.

40 spottan 14 tanesi MALDI-TOF/TOF-MS analizi için seçilmiş (Şekil 4.32. ve Şekil 4.33.) ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.32. ve Şekil 4.33.' de verilen ilgili spotların yakın görüntüleri Şekli 4.34.- 4.47.' de sunulmuştur (Kırmızı ile işaretlenen protein

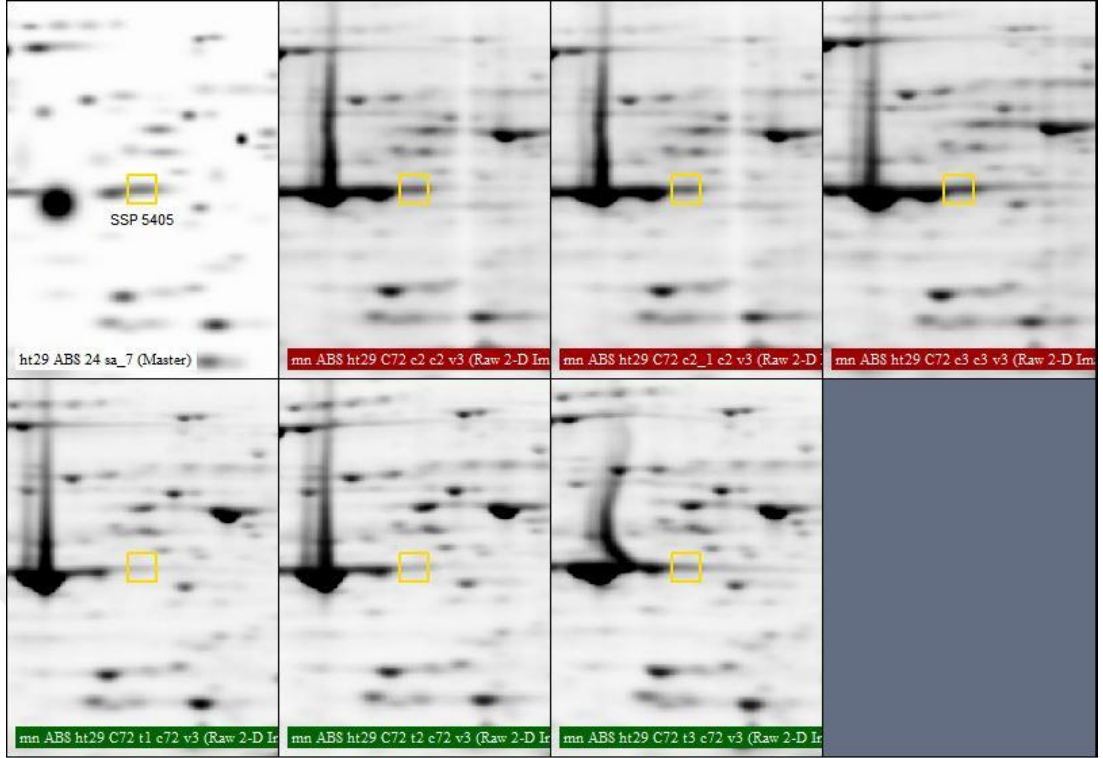
ABS' nin etkisiyle azalmış, yeşil ile işaretlenen protein spotları ise ABS' nin etkisiyle artmıştır). ABS' nin etkisiyle azalan proteinler (2 tane) Şekil 4.34. ve Şekil 4.35.' de ve ABS' nin etkisiyle artan proteinler (12 tane) Şekil 4.36.- 4.47.' de verilmiştir.



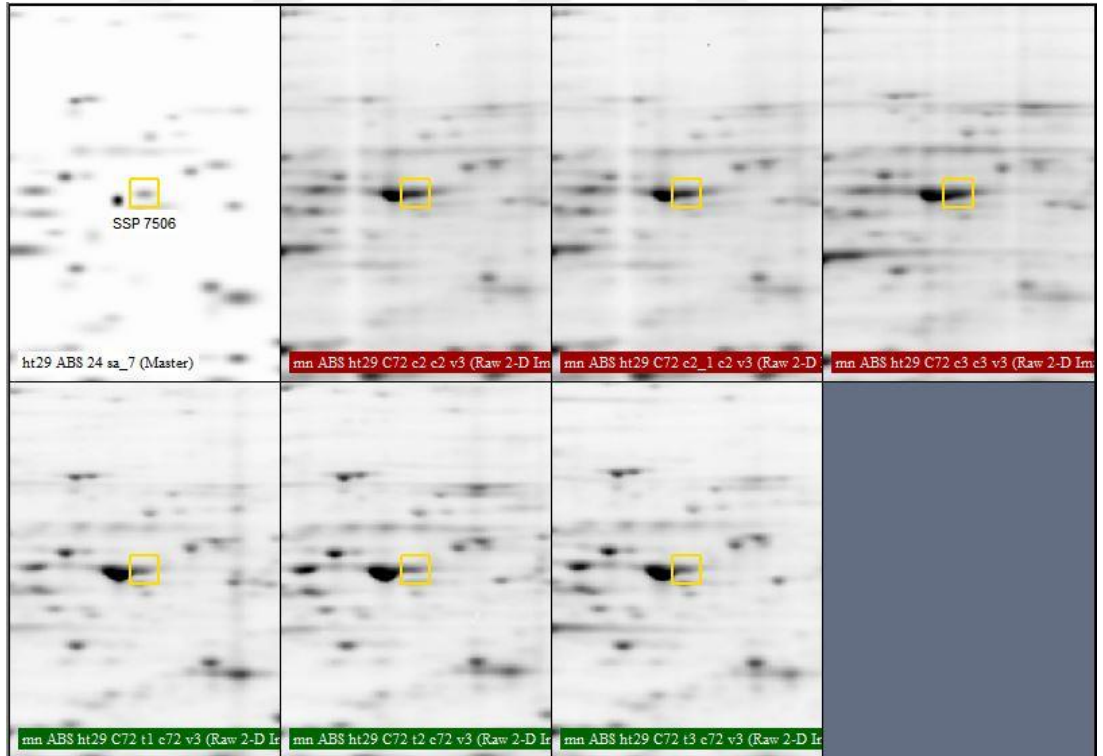
Şekil 4.32. 24 saatlik C grubu HT-29 hücrelerine ait görüntü.



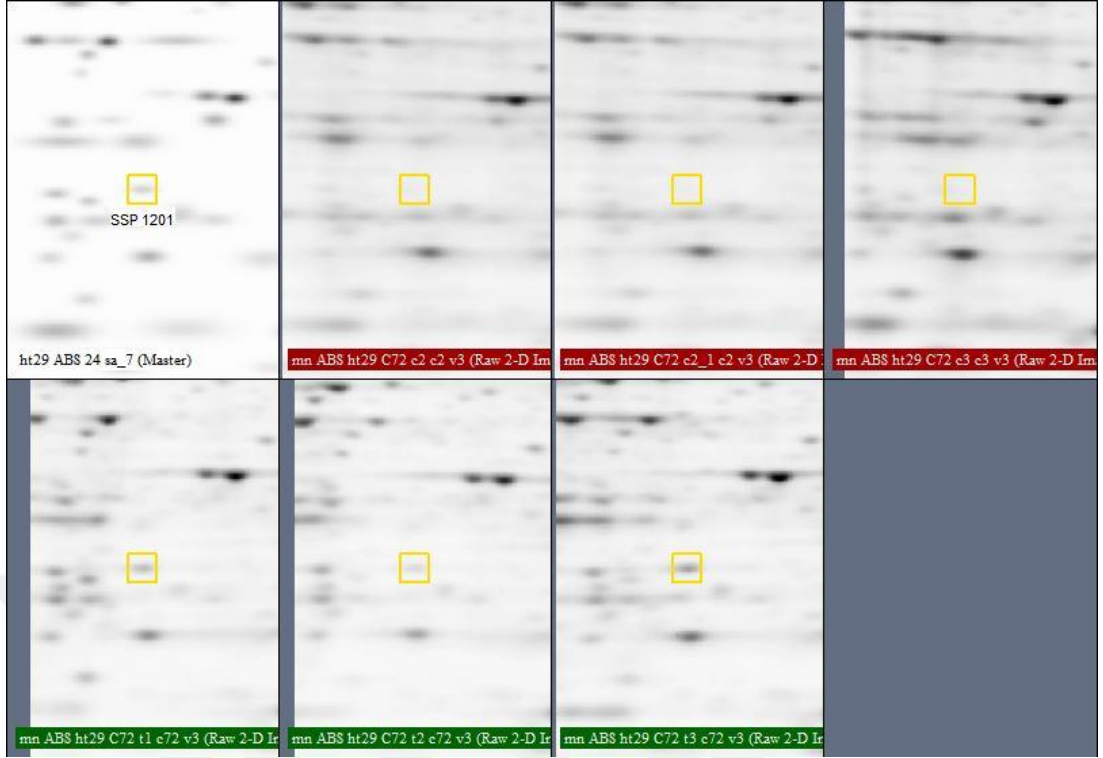
Şekil 4.33. 24 saatlik T grubu HT-29 hücrelerine ait görüntü.



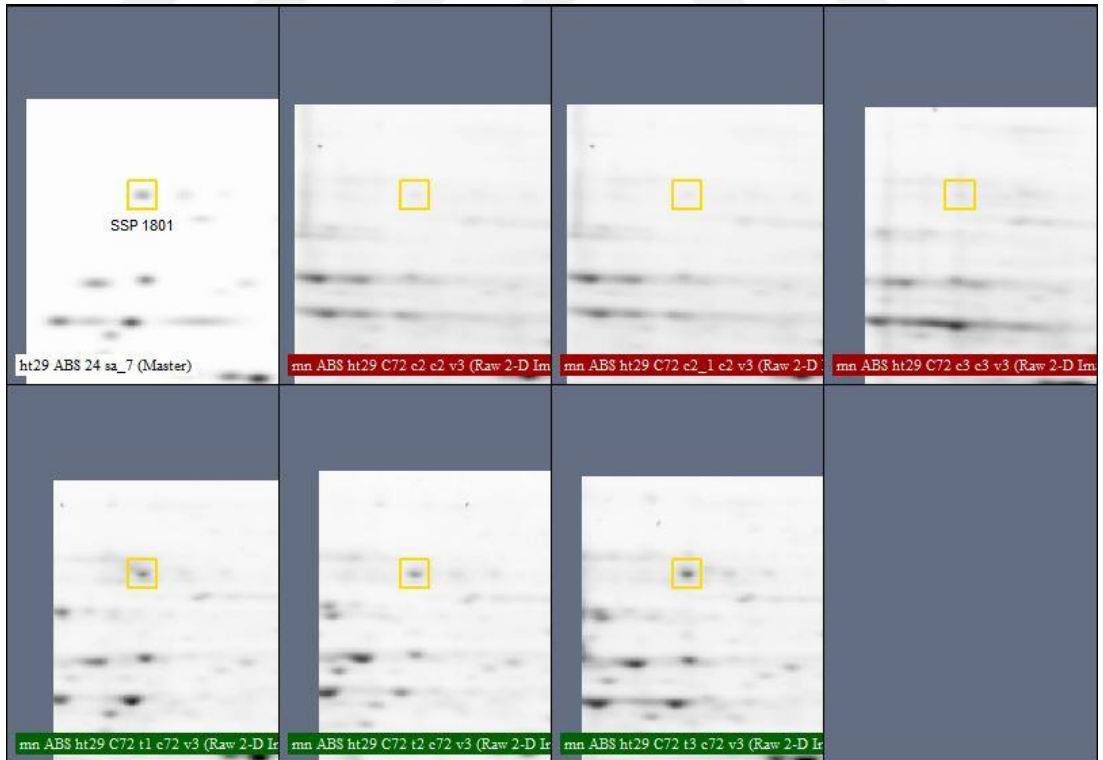
Şekil 4.34. 5405 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.35. 7506 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.36. 1201 numaralı spota ait görüntü.



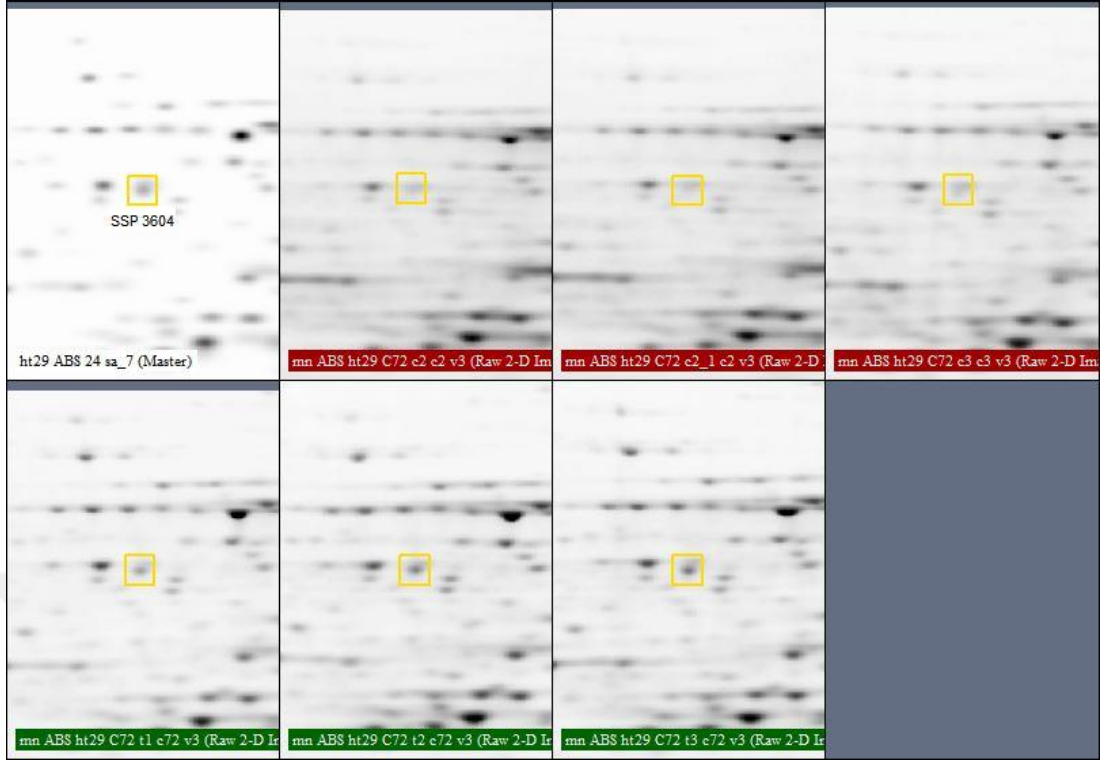
Şekil 4.37. 1801 numaralı spota ait görüntü.



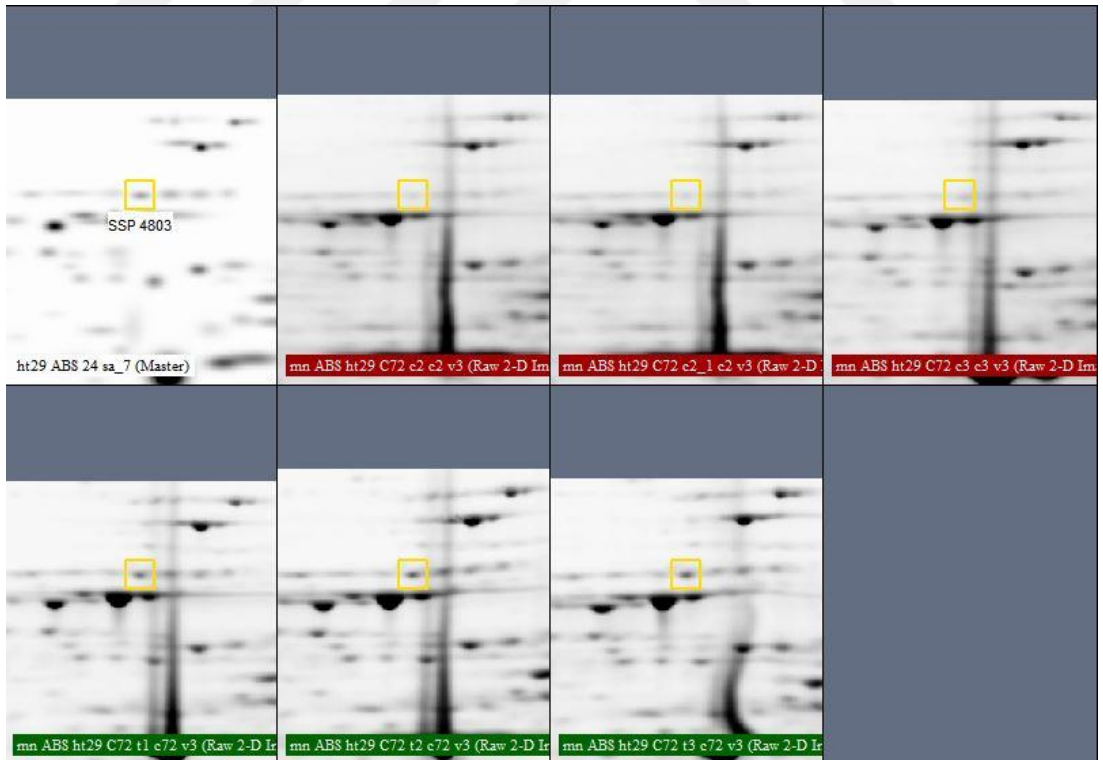
Şekil 4.38. 2901 numaralı spota ait görüntü.



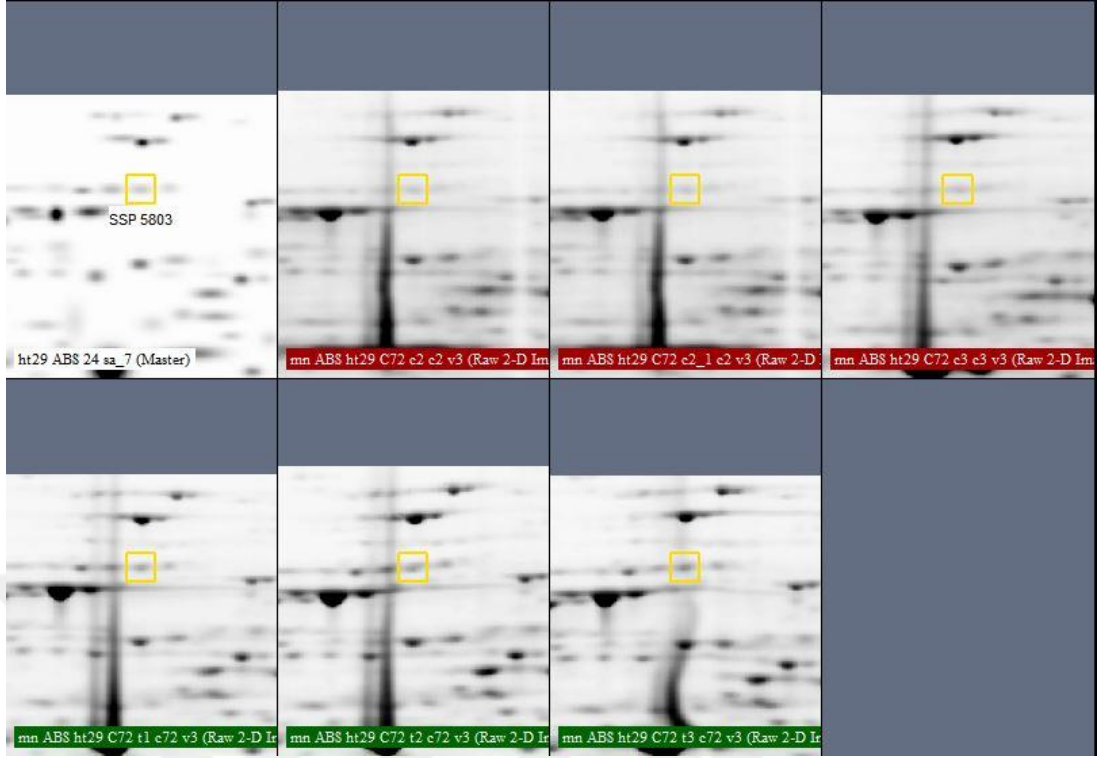
Şekil 4.39. 2902 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.40. 3604 numaralı spota ait görüntü.



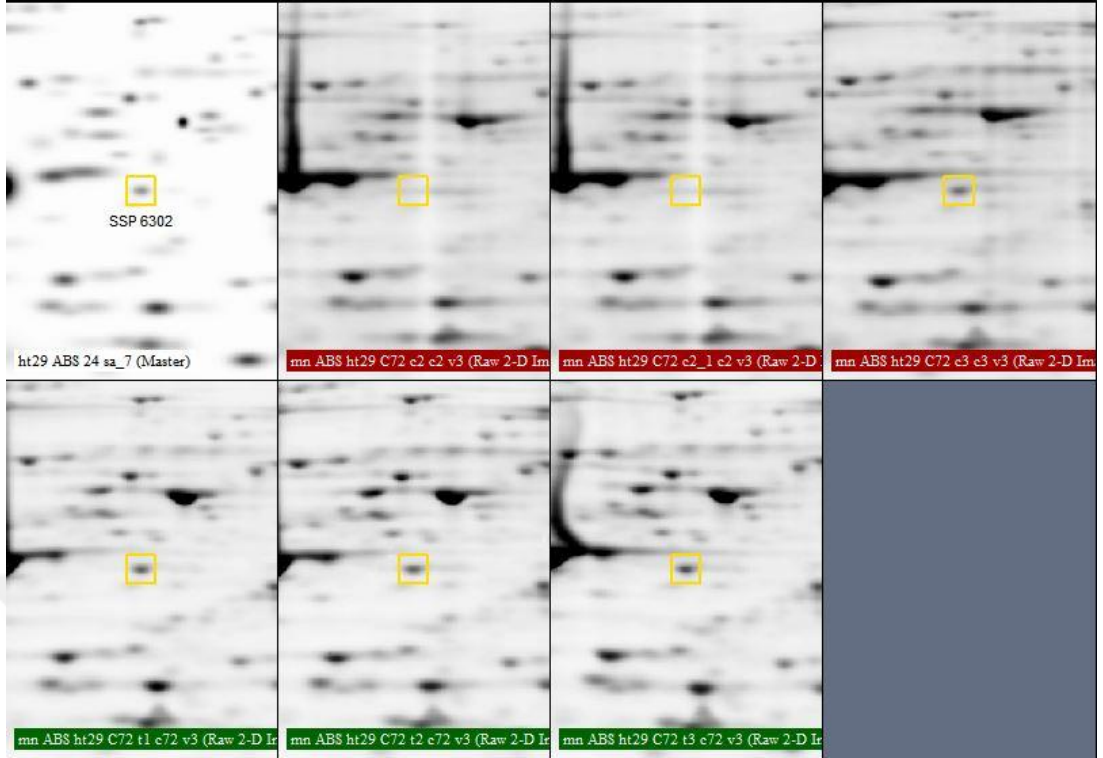
Şekil 4.41. 4803 numaralı spota ait görüntü.



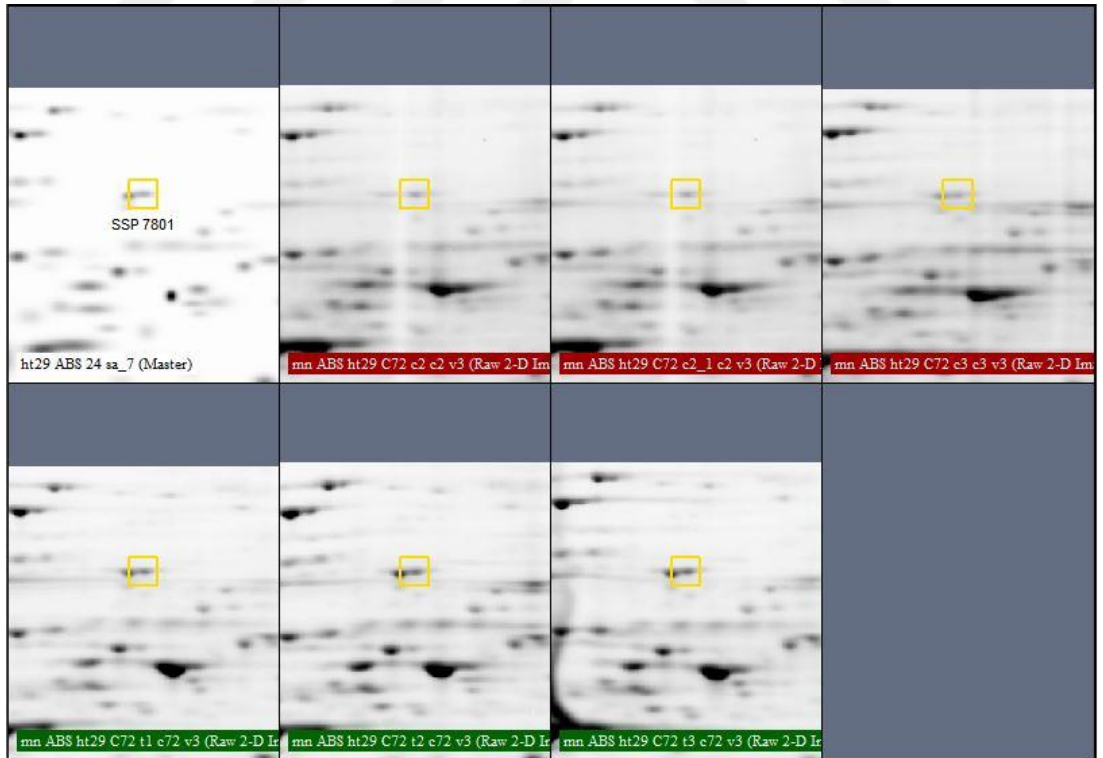
Şekil 4.42. 5803 numaralı spota ait görüntü.



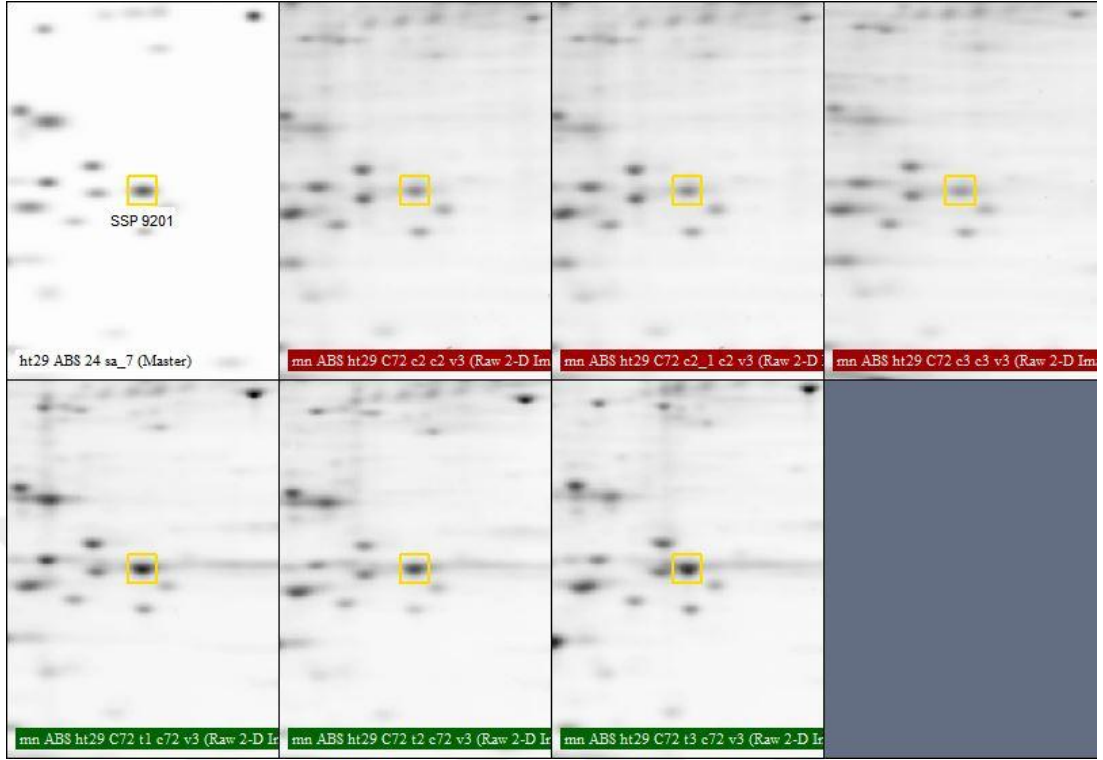
Şekil 4.43. 6001 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.44. 6302 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.45. 7801 numaralı spota ait görüntü.



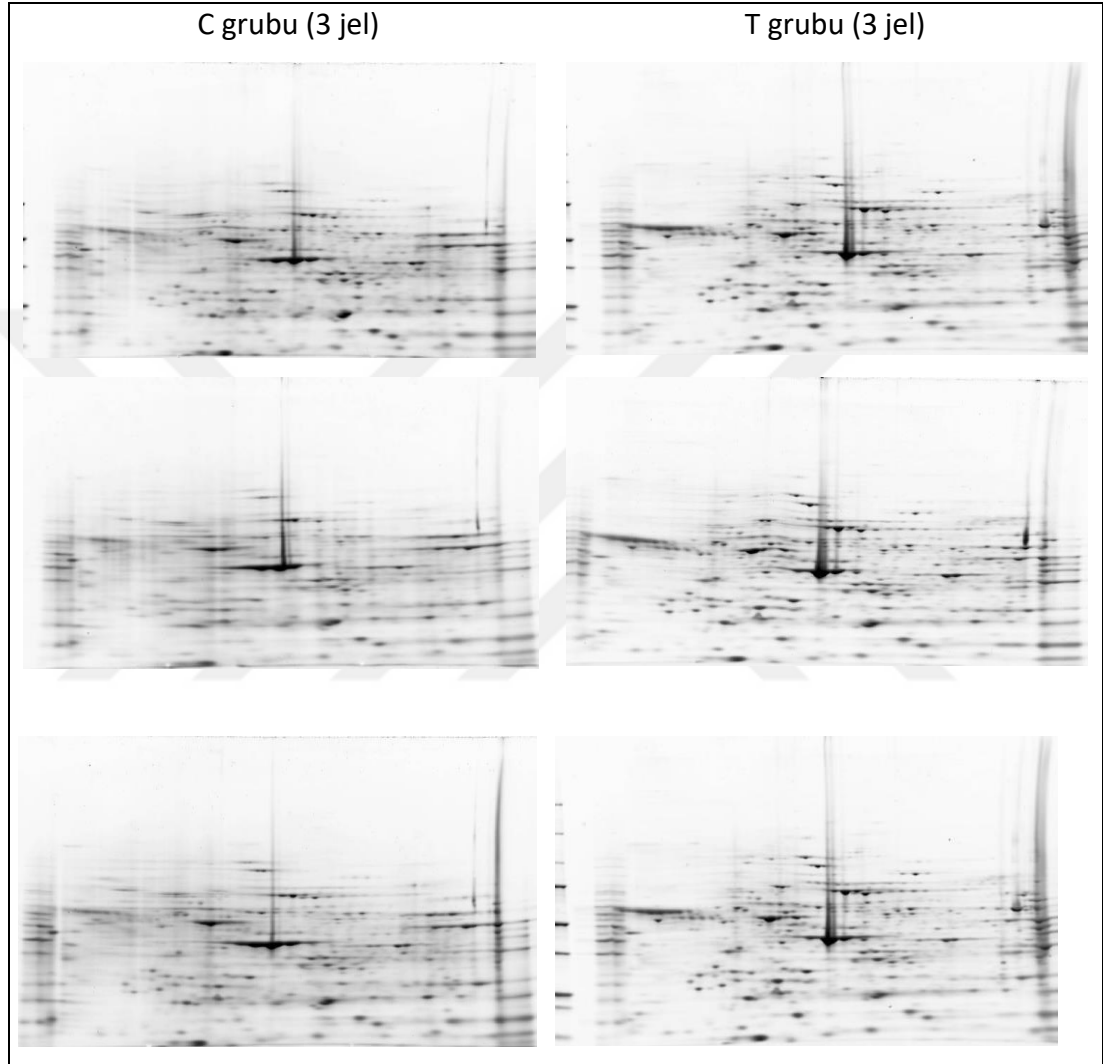
Şekil 4.46. 9201 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.47. 9503 numaralı spota ait görüntü.

72 Saatlik HT-29 Hücrelerine Ait İmaj Analizi Çalışmaları:

72 saatlik Caco-2 hücrelerinin C ve T grubuna ait proteinler, 2D jel elektroforez ile ayrılmış, jeller SYPRO - Ruby ile boyanıp görüntüleme cihazı aracılığıyla jel görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.48.).

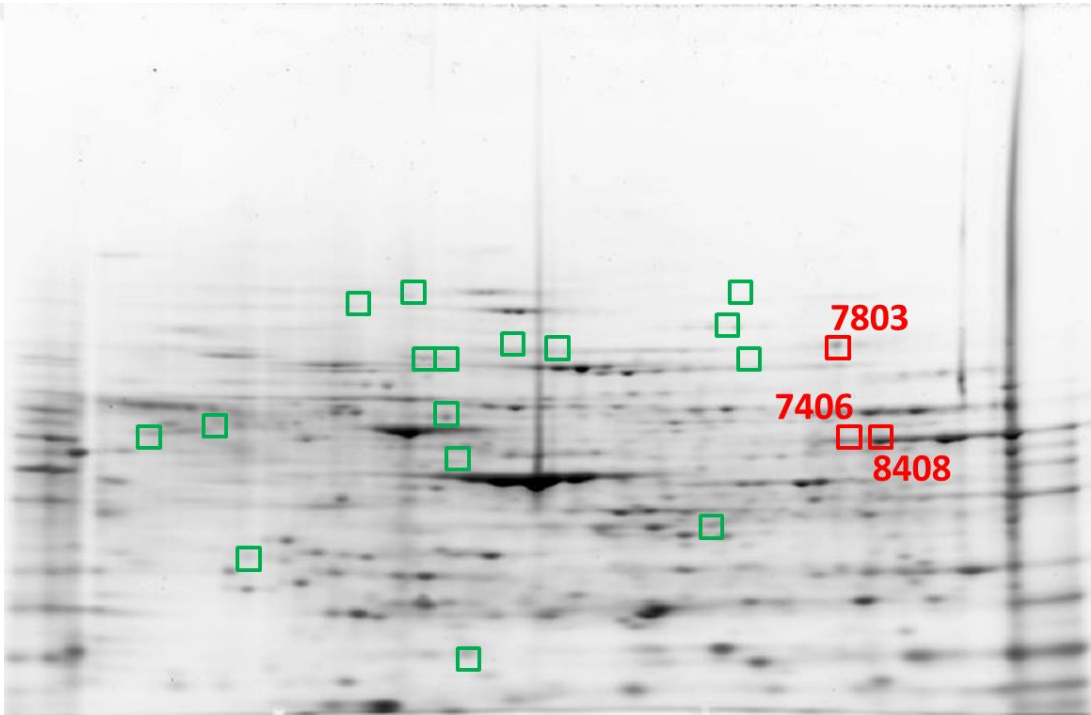


Şekil 4.48. C ve T grubuna ait tekrarlı jel görüntüleri (72 saatlik HT-29 hücreleri).

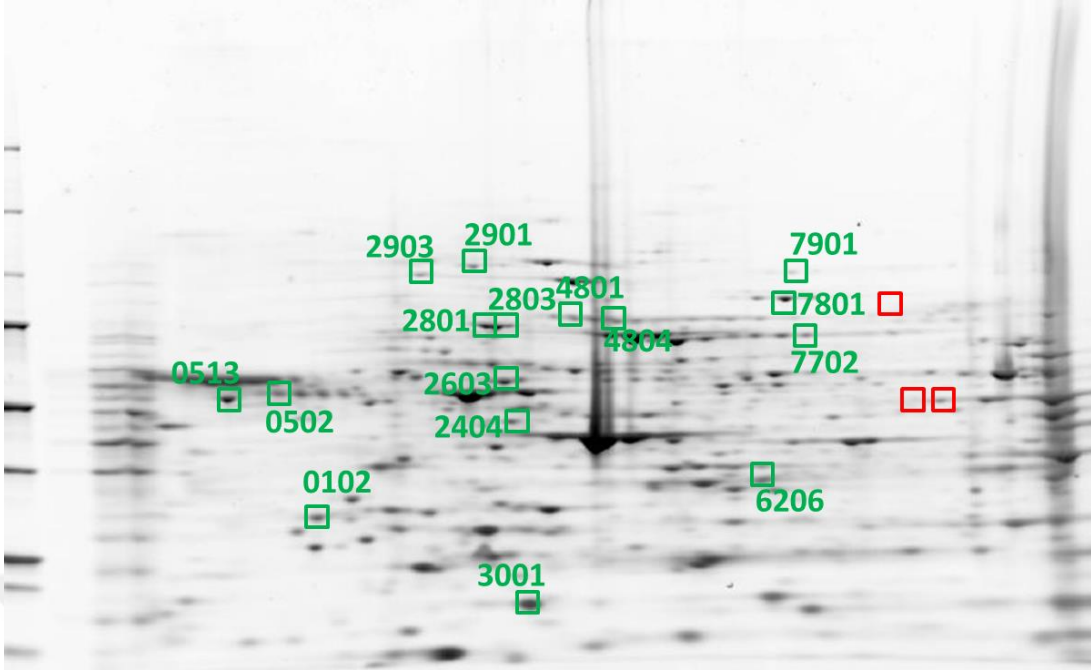
PDQuest™ programı ile C ve T gruplarına ait 3 tekrarlı jellerin karşılaştırılması sonrasında program tarafından verilen sanal jel haritaları üzerinde HT-29 hücre hattı için 234 tane spot tespit edilmiştir. Tespit edilen spotların tamamı program tarafından bulunduğu koordinata göre SSP numaraları verilerek numaralandırılmıştır. Farklılaşan spotların tespiti, sadece gözle takip edilerek yapılırsa hatalara sebebiyet vermesi nedeniyle Bkz. Bölüm 3.9.' da anlatıldığı gibi PDQuest™ programı 3 tane küme tanımlanmıştır. C ve T grupları için

Quant kümesinde 68 tane spot, Statistic kümesinde 125 tane spot ve her 2 kümenin kesişim kümesi olan Booln kümesinde ise 60 tane spot saptanmıştır. Saptanan 60 tane spot görüntüleri tekrar incelendiğinde bazı spotların birbirlerine çok yakın oldukları gözlenmiştir ve içlerinden en yüksek değişime sahip olanlar seçilerek analiz edilmiştir.

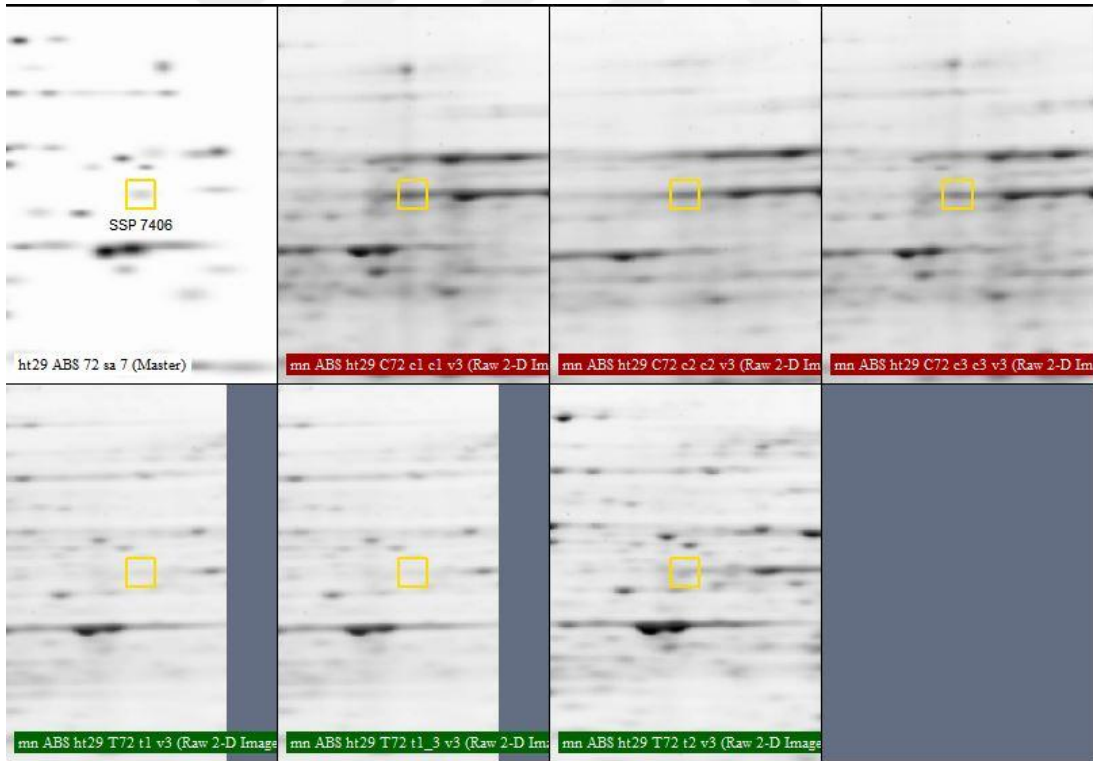
60 spottan 19 tanesi MALDI-TOF/TOF-MS analizi için seçilmiş (Şekil 4.49. ve Şekil 4.50.) ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.49. ve Şekil 4.50.' de verilen ilgili spotların yakın görüntüleri Şekli 4.51.- 4.69.' da sunulmuştur (Kırmızı ile işaretlenen protein ABS' nin etkisiyle azalmış, yeşil ile işaretlenen protein spotları ise ABS' nin etkisiyle artmıştır). ABS' nin etkisiyle azalan proteinler (3 tane) Şekil 4.51.- 4.53.' de ve ABS' nin etkisiyle artan proteinler (16 tane) Şekil 4.54.- 4.69.' da verilmiştir.



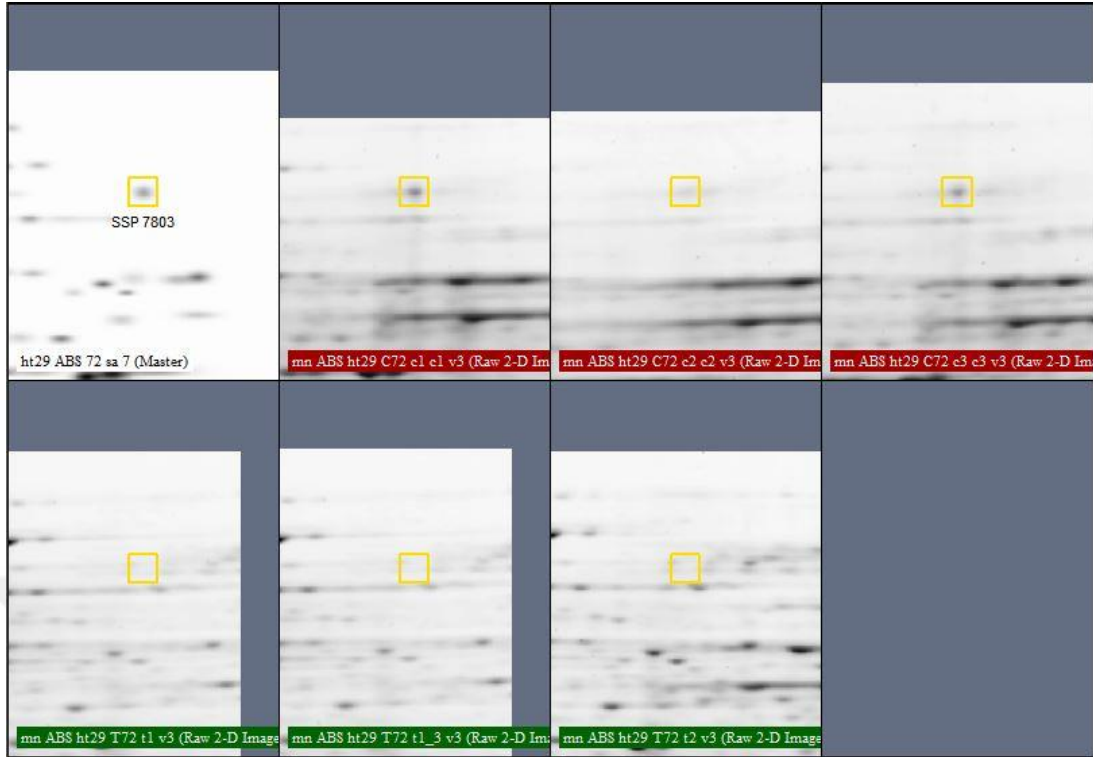
Şekil 4.49. 72 saatlik C grubu HT-29 hücrelerine ait görüntü.



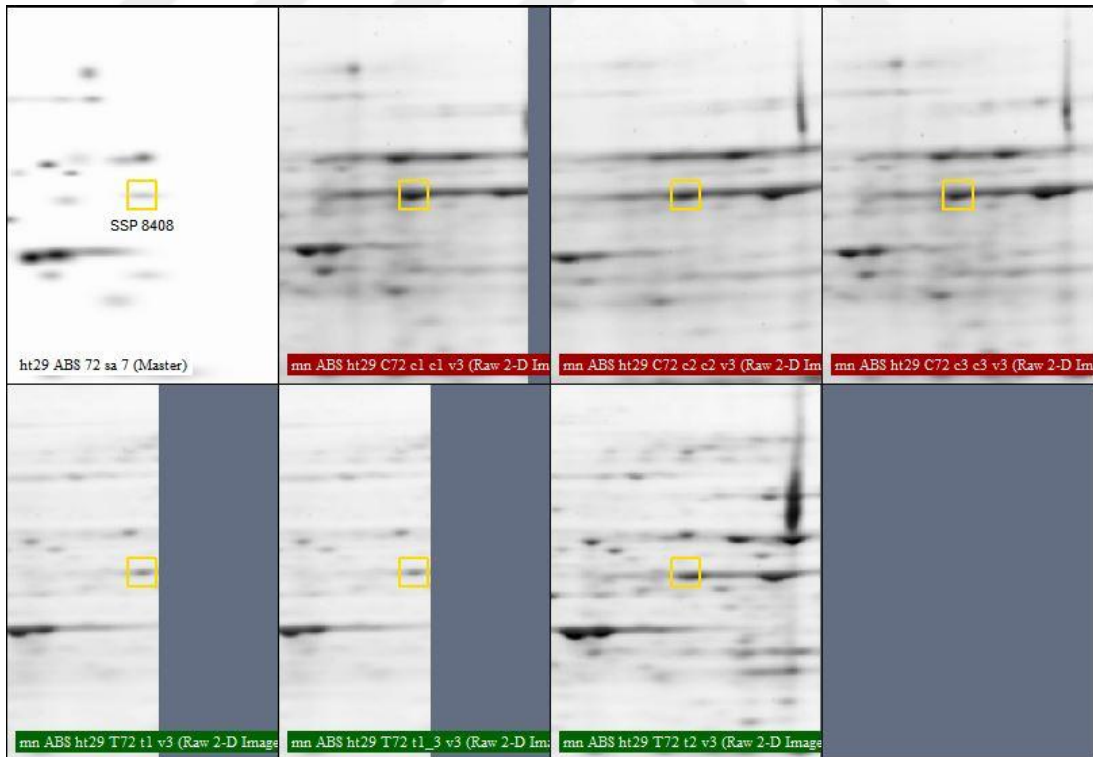
Şekil 4.50. 72 saatlik T grubu HT-29 hücrelerine ait görüntü.



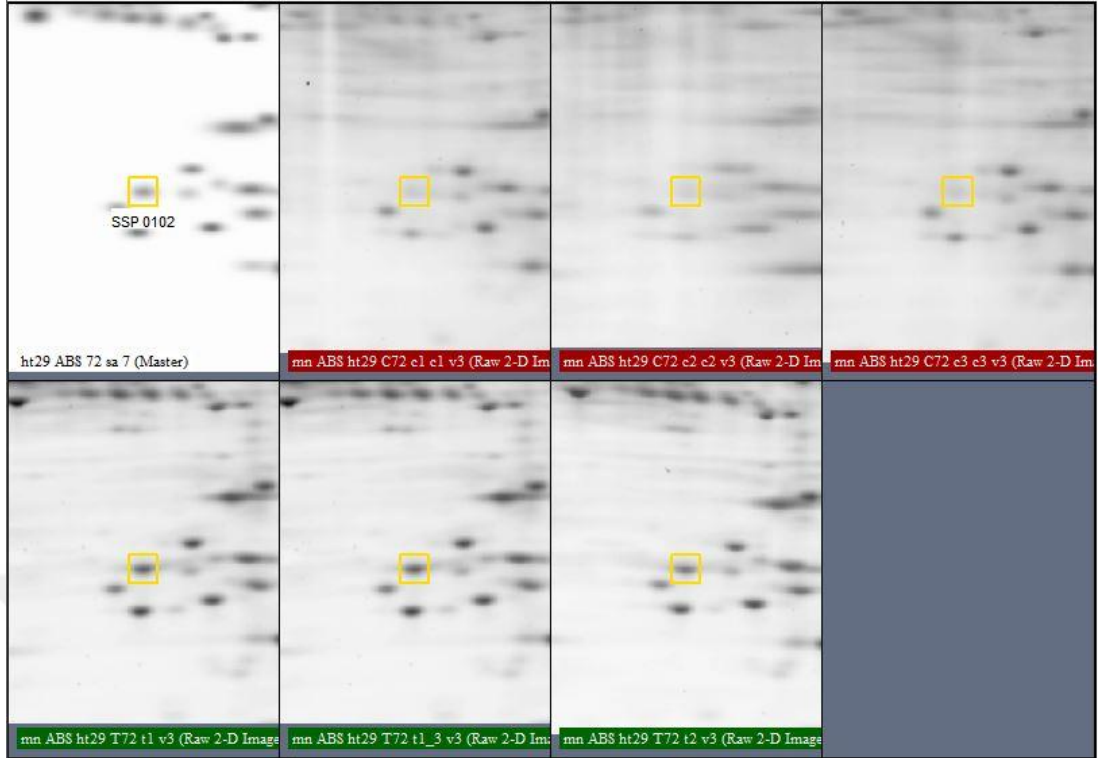
Şekil 4.51. 7406 numaralı spota ait görüntü.



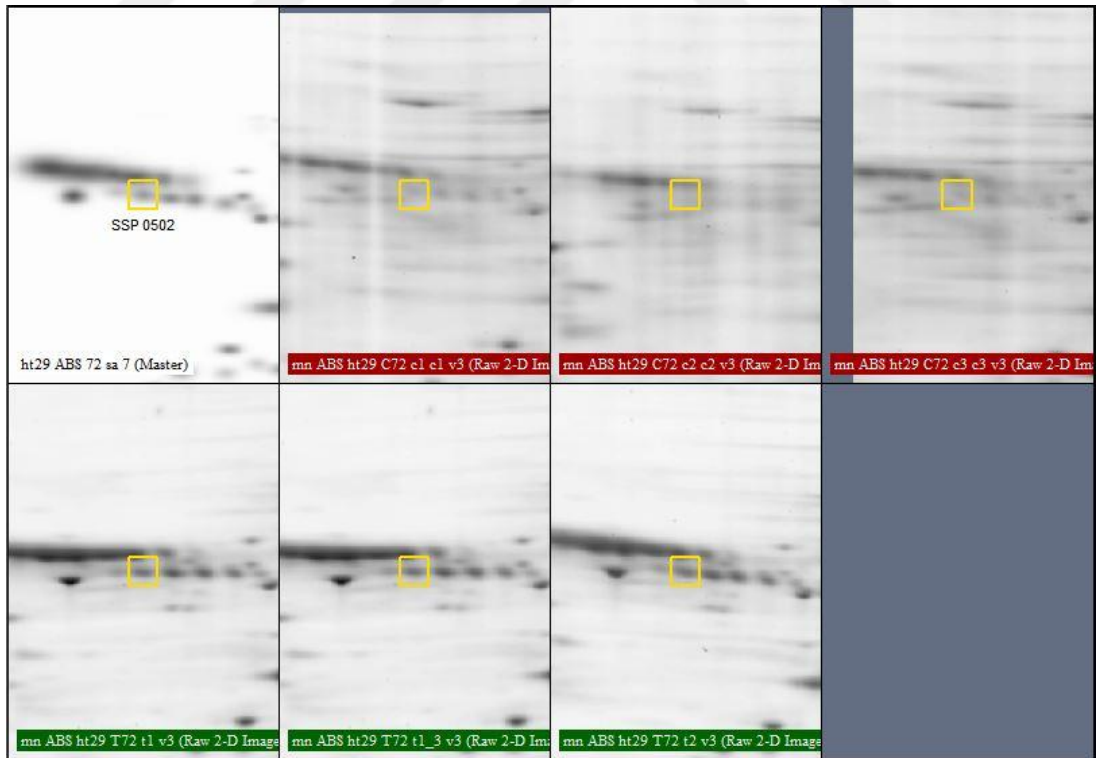
Şekil 4.52. 7803 numaralı spota ait görüntü.



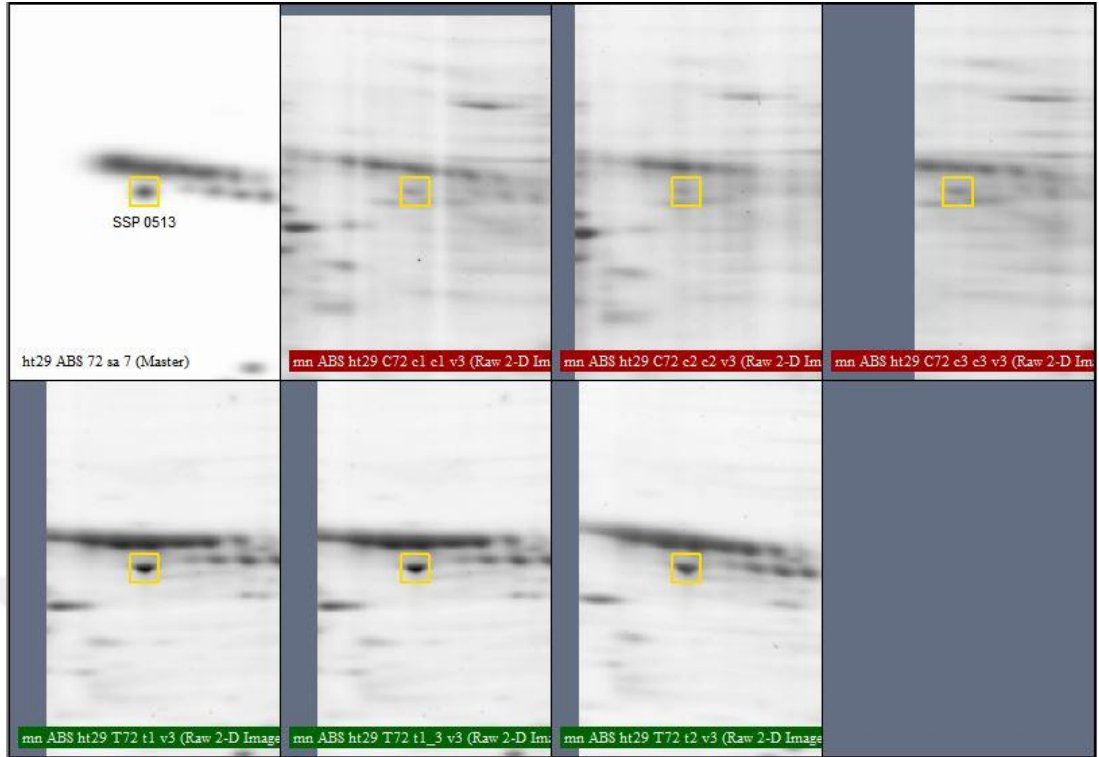
Şekil 4.53. 8408 numaralı spota ait görüntü.



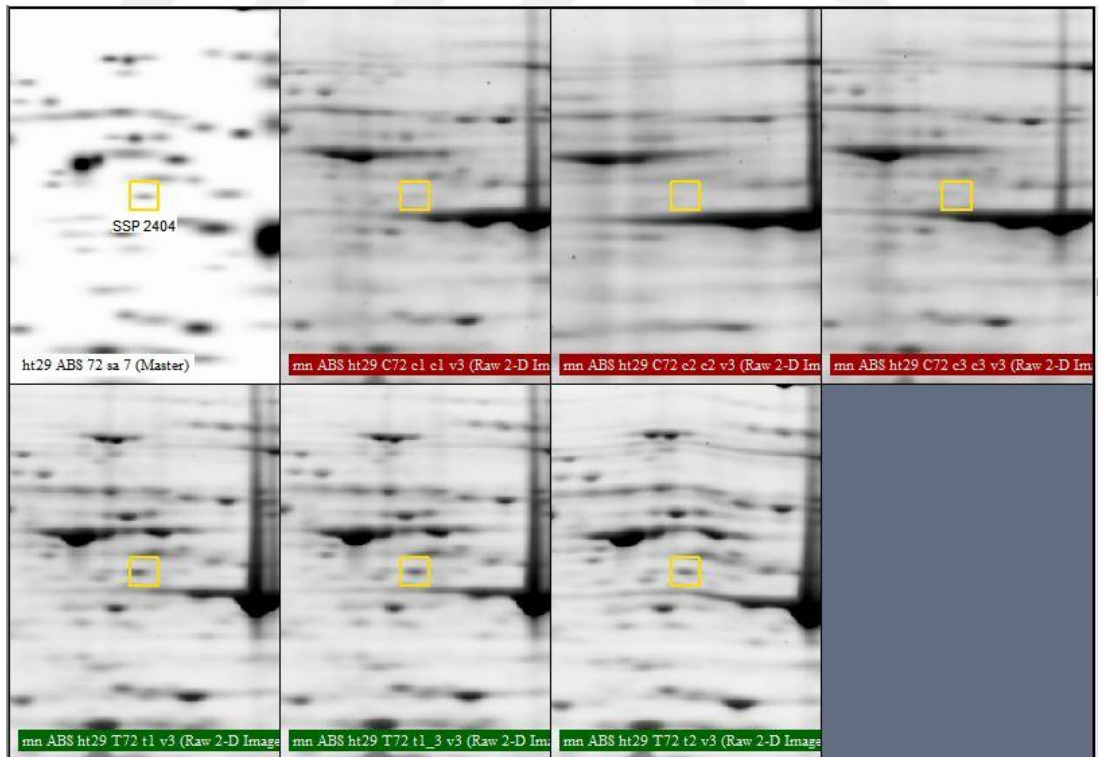
Şekil 4.54. 0102 numaralı spota ait görüntü.



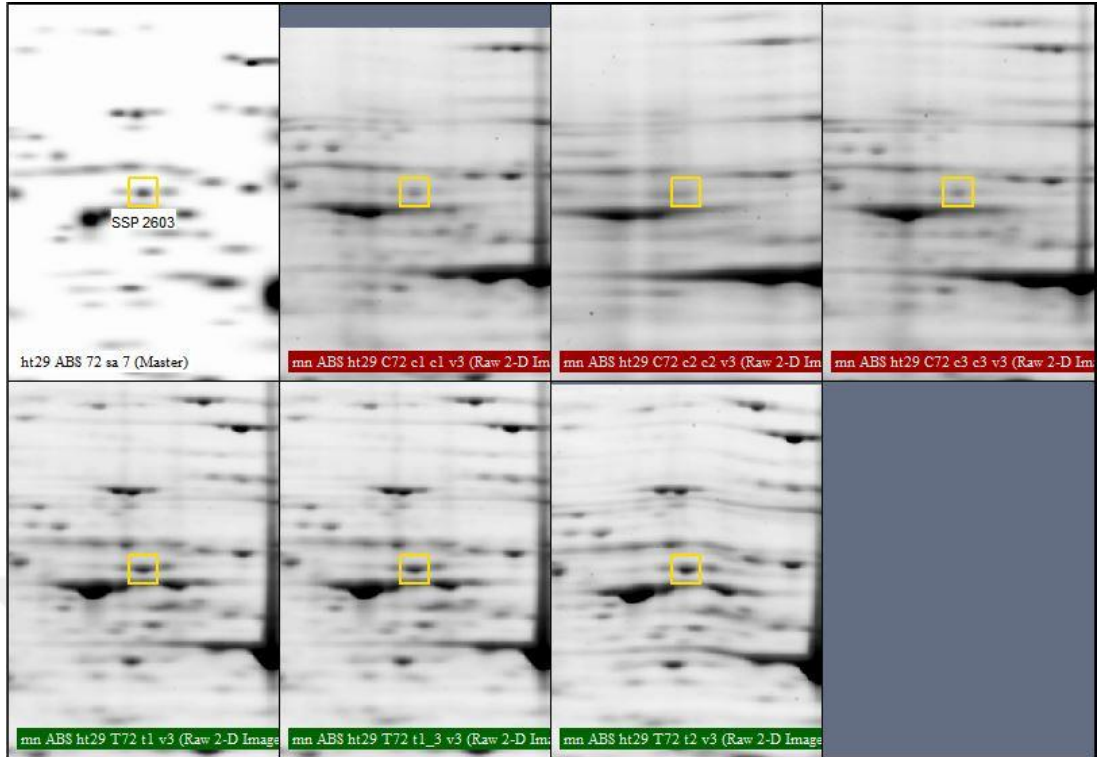
Şekil 4.55. 0502 numaralı spota ait görüntü.



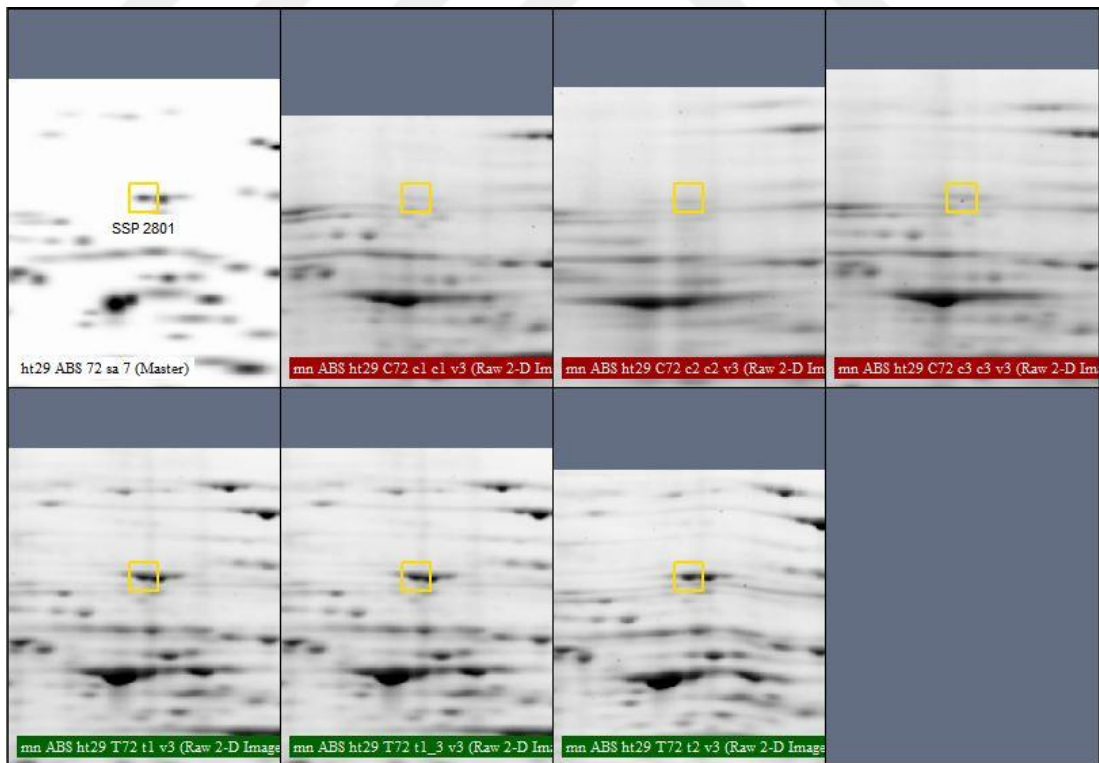
Şekil 4.56. 0513 numaralı spota ait görüntü.



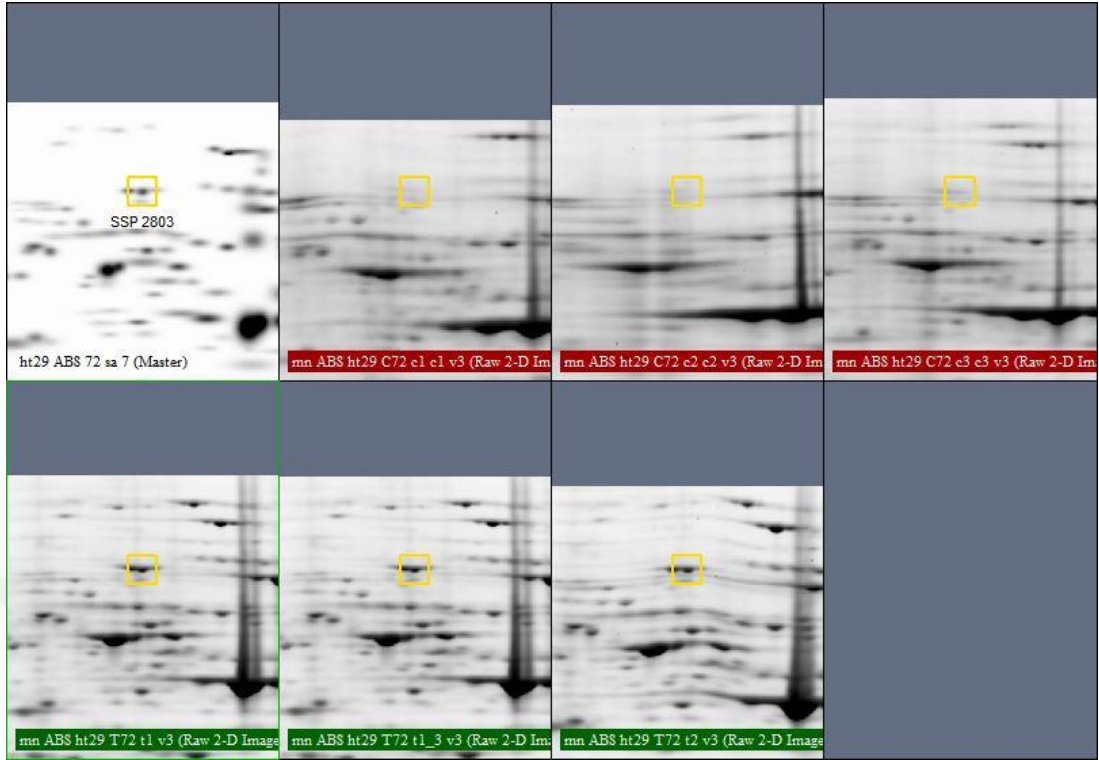
Şekil 4.57. 2404 numaralı spota ait görüntü.



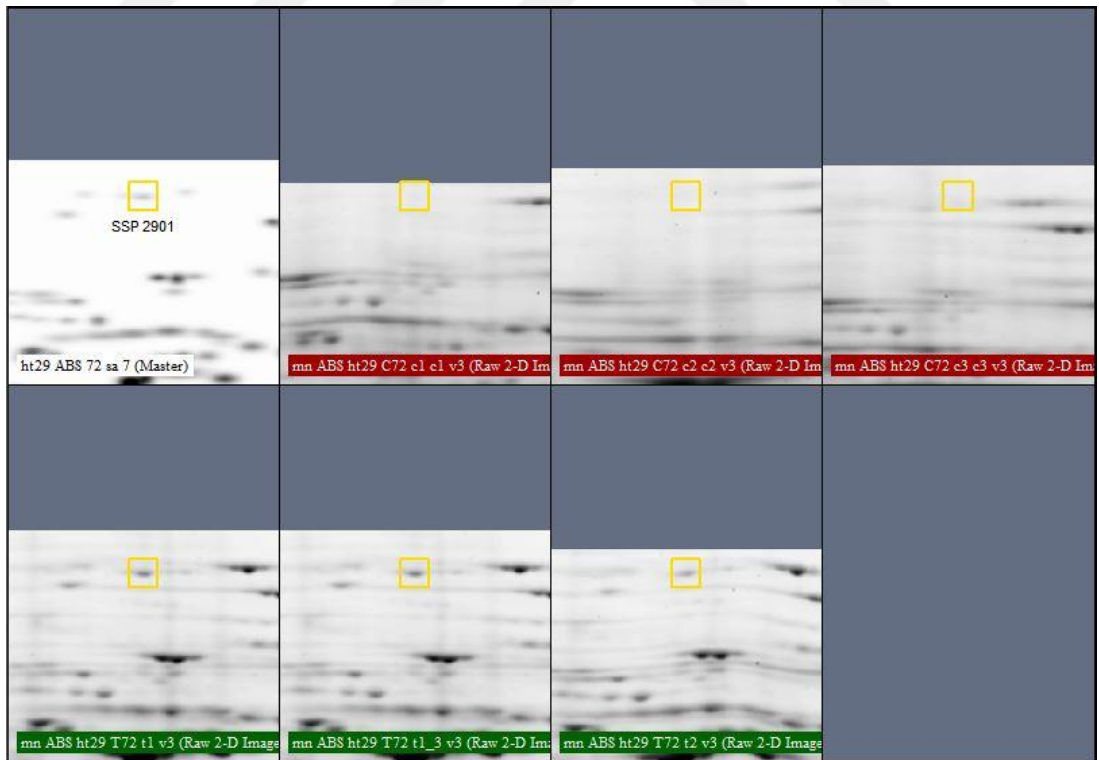
Şekil 4.58. 2603 numaralı spota ait görüntü.



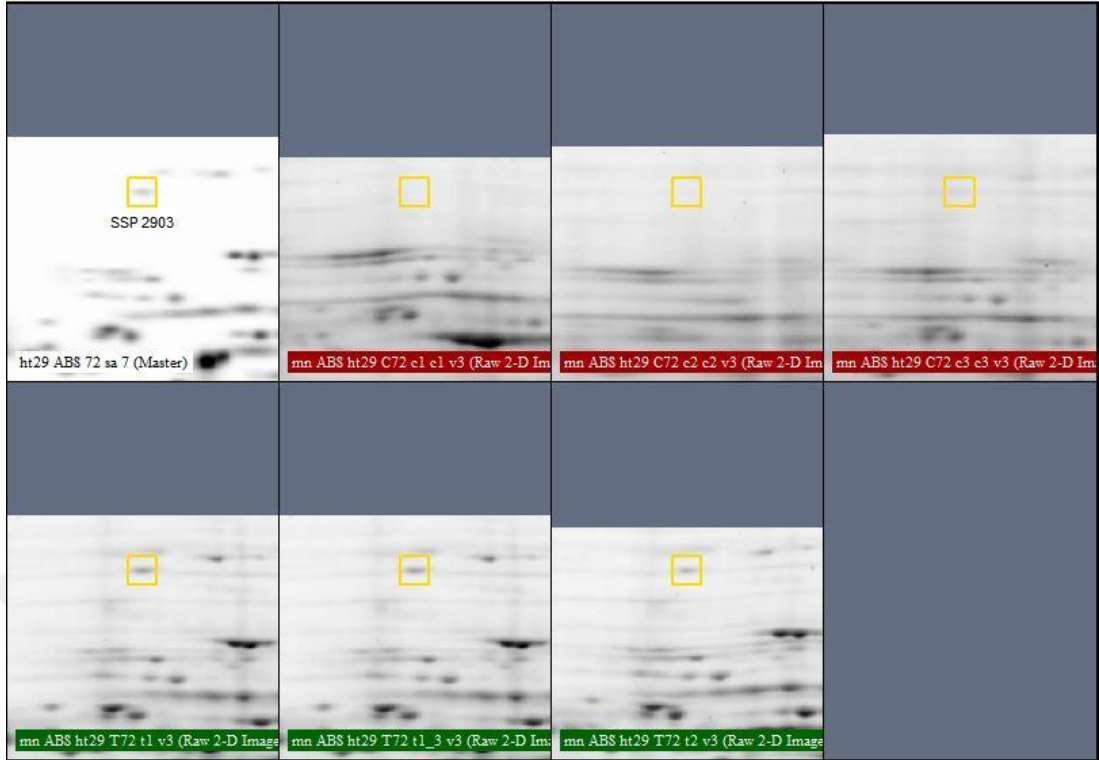
Şekil 4.59. 2801 numaralı spota ait görüntü.



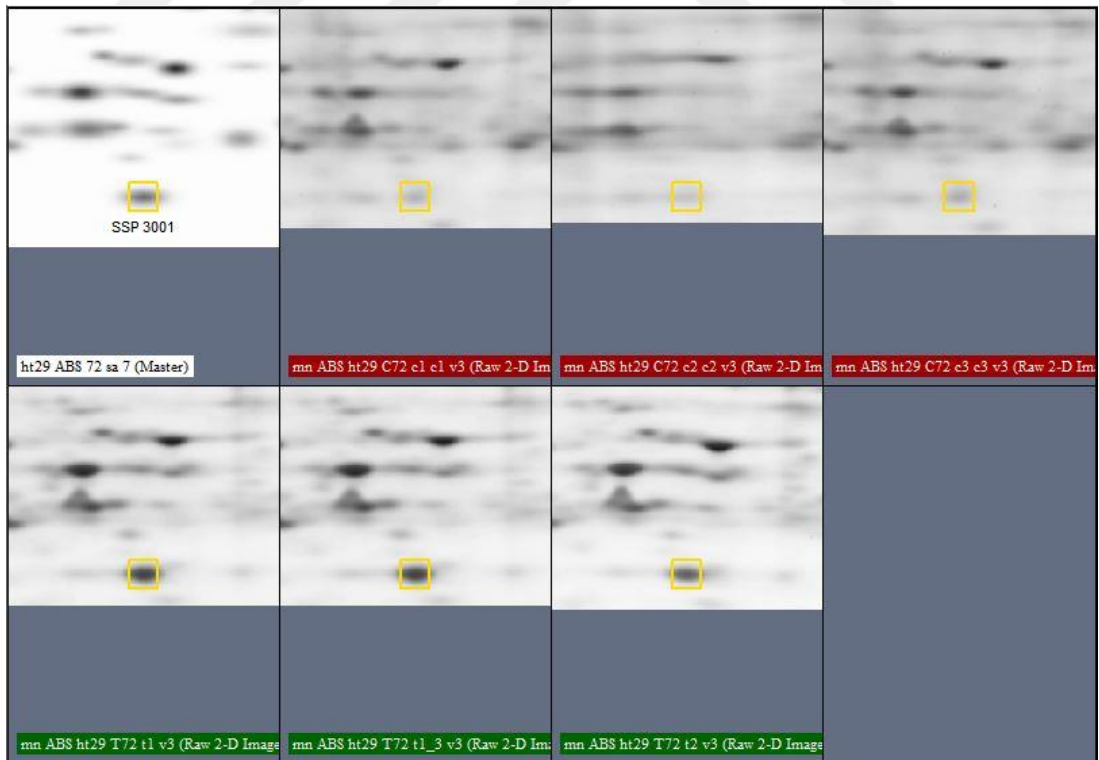
Şekil 4.60. 2803 numaralı spota ait görüntü.



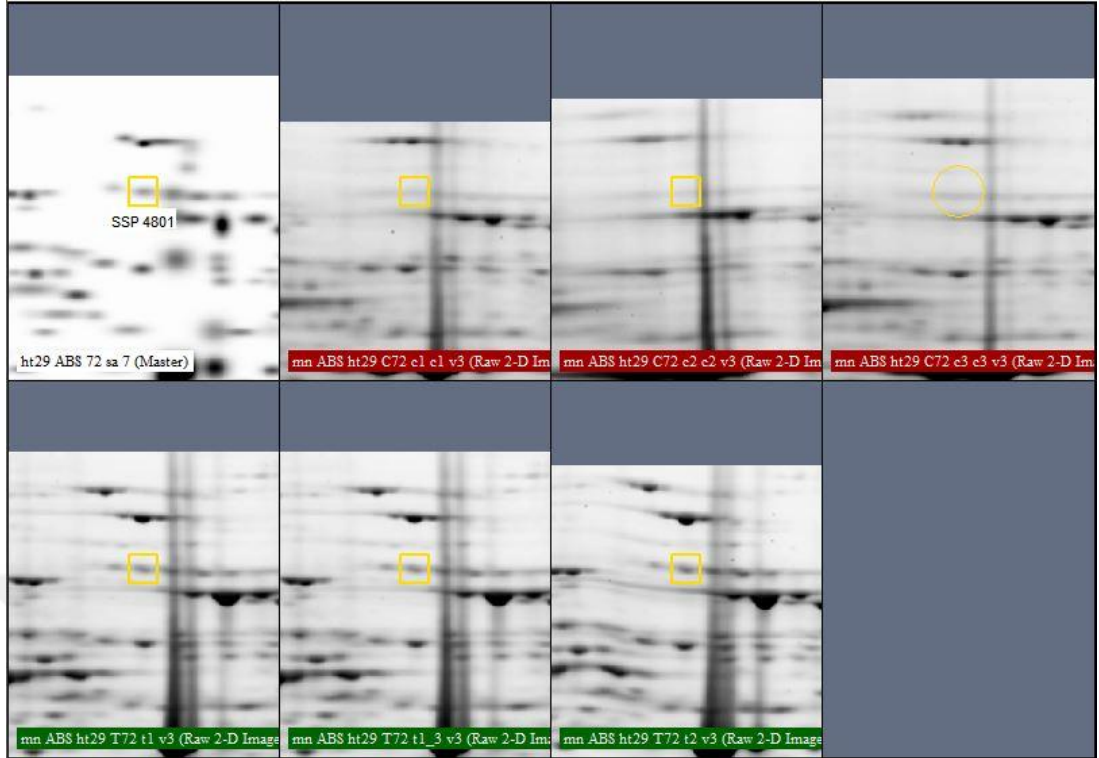
Şekil 4.61. 2901 numaralı spota ait görüntü.



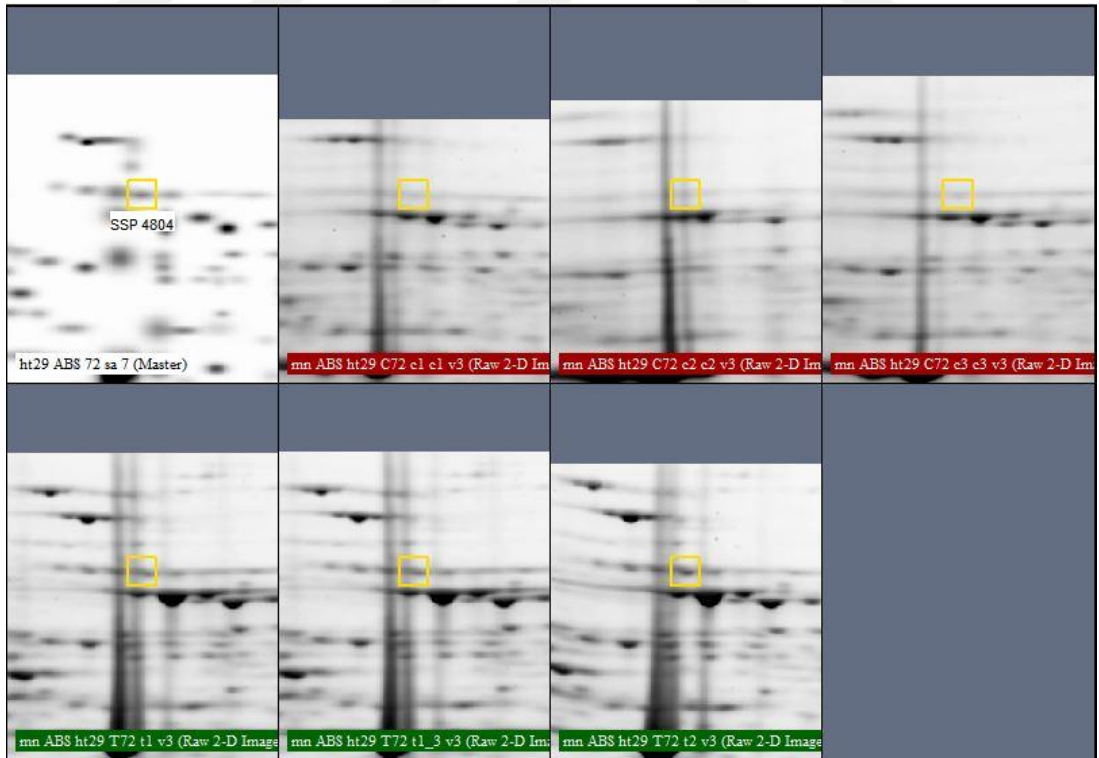
Şekil 4.62. 2903 numaralı spota ait görüntü.



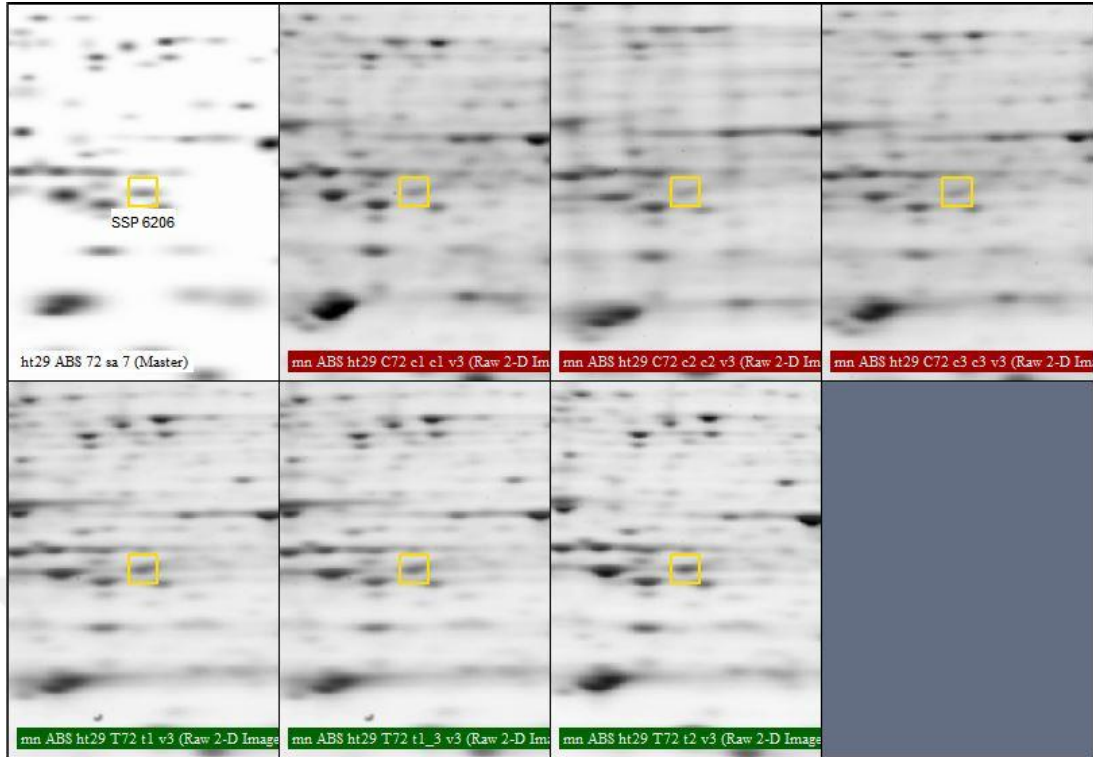
Şekil 4.63. 3001 numaralı spota ait görüntü.



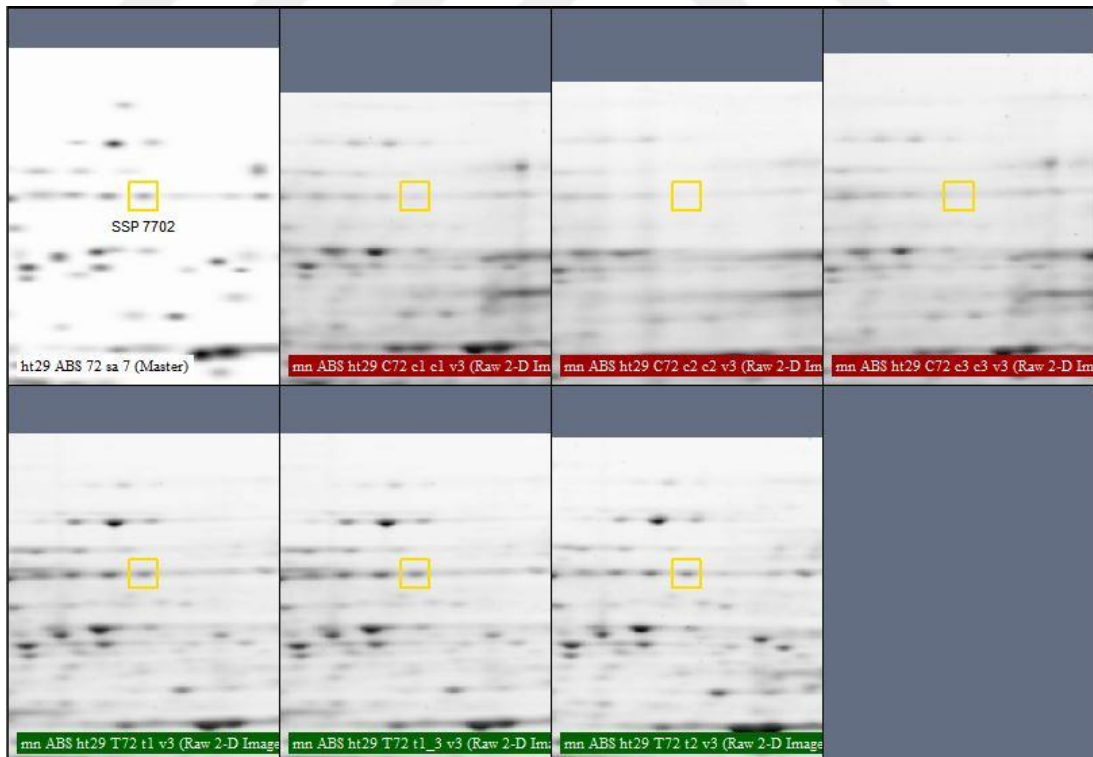
Şekil 4.64. 4801 numaralı spota ait görüntü.



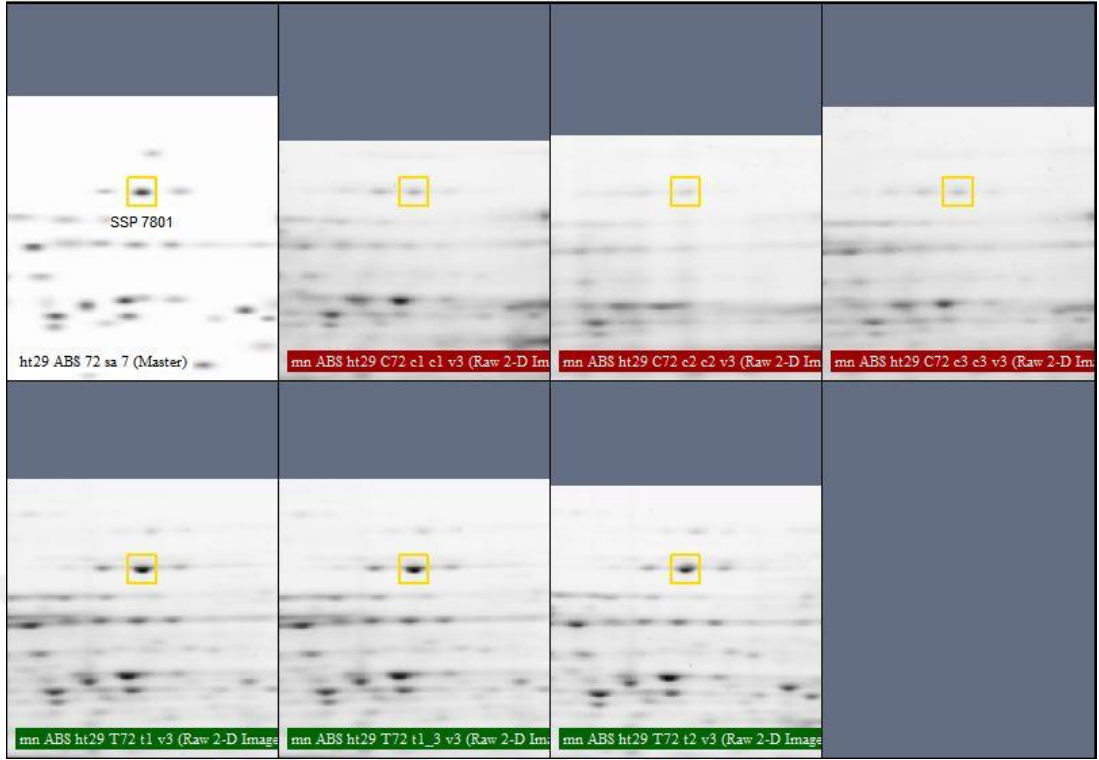
Şekil 4.65. 4804 numaralı spota ait görüntü.



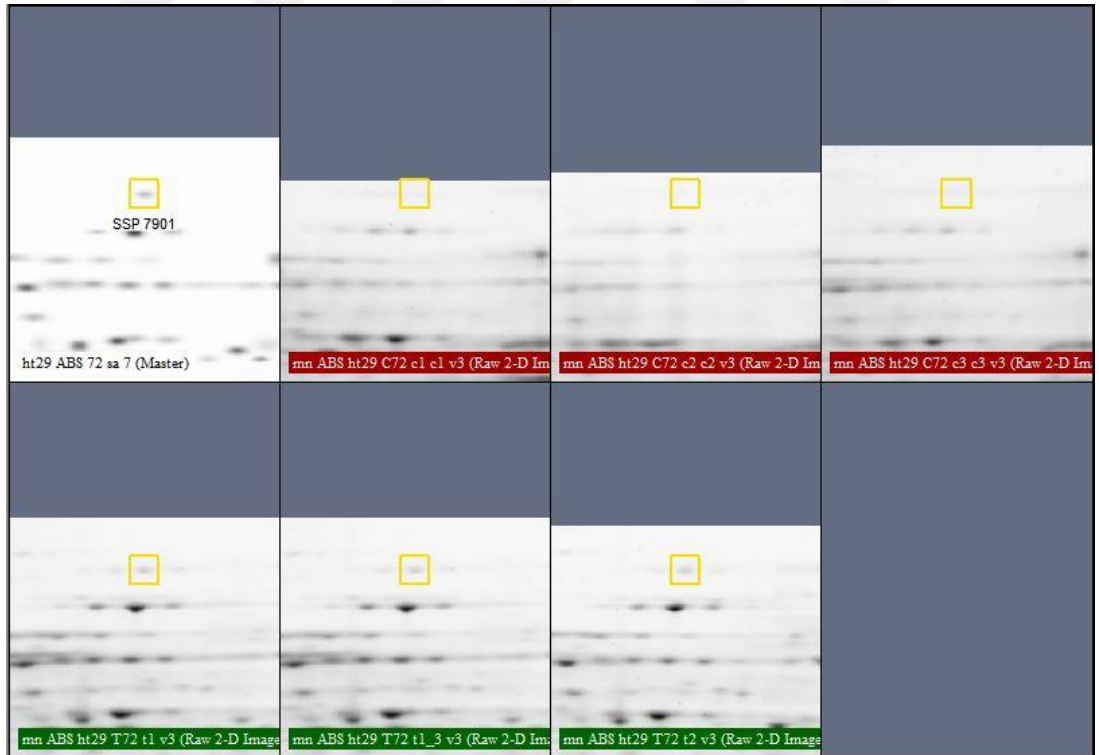
Şekil 4.66. 6206 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.67. 7702 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.68. 7801 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.69. 7901 numaralı spota ait görüntü.

4.4.2. Peptid Dizileme ile Proteinlerin Tanımlanması

En üst düzeyde farklılaşan spotlardan, HT-29 hücre hattının 24 saatlik C ve T grupları için 14 tane spot (SSP No: 5405, 7506, 1201, 1801, 2901, 2902, 3604, 4803, 5803, 6001, 6302, 7801, 9201 ve 9503); HT-29 hücre hattının 72 saatlik C ve T grupları için 19 tane spot (SSP No: 7406, 7803, 8408, 0102, 0502, 0513, 2404, 2603, 2801, 2803, 2901, 2903, 3001, 4801, 4804, 6206, 7702, 7801 ve 7901) Kocaeli Üniversitesi Proteomik Laboratuvarı'nda jelden kesilmiş, tripsin ile peptidlerine parçalanarak jelden ekstre edilmiştir. Ekstre edilen proteinler MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilmiş ve veri bankaları kullanılarak tanımlanmıştır. PMF için MASCOT ve De Novo protein bankası kullanılmış, HT-29 kolon kanseri hücrelerine, ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler tanımlanmıştır (Tablo 4.4. ve Tablo 4.5.).

Tablo 4.4. 24 saat ABS ile muamele sonucunda HT-29 hücrelerinde nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler.

24 Saat ABS ile Muamele (HT-29)				
SSP No	C Ortalama	T Ortalama	Değişim (C/T - T/C Oranı)	Protein Adı
ABS' nin etkisi ile azalan				
5405	10925	4312	2.5	Sitoplazmik Aktin 1 (<i>Actin. cytoplasmic 1</i>) OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
7506	9876	3672	2.7	Tubulin beta zinciri OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2
ABS' nin etkisi ile artan				
1201	62	2254	36.6	Yüksek hareketlilik grubu protein B1 OS=Homo sapiens GN=HMGB1 PE=1 SV=3
1801	245	2496	10.2	Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR PE=1 SV=4
2901	193	663	3.4	70 kDa ısı şok proteini 4L (<i>Heat shock 70 kDa protein 4L</i>) OS=Homo sapiens GN=HSPA4L PE=1 SV=2
2902	862	2530	2.9	Keratin. tip II sitoskeletal 1 (<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>) OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
3604	1039	2395	2.3	Koronin-1B (<i>Coronin-1B</i>) OS=Homo sapiens GN=CORO1B PE=1 SV=1
4803	624	2694	4.3	Src substratı kortaktin (<i>Src substrate cortactin</i>) OS=Homo sapiens GN=CTTN PE=1 SV=2
5803	1060	2656	2.5	Src substratı kortaktin OS=Homo sapiens GN=CTTN PE=1 SV=2
6001	5086	11733	2.3	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 5A-1 OS=Homo sapiens GN=EIF5A PE=1 SV=2
6302	2031	4222	2.1	Serin-treonin reseptör kinaz (<i>Serine-threonine kinase receptor-associated protein</i>) OS=Homo sapiens GN=STRAP PE=1 SV=1
7801	1347	2722	2	Glukoz regüle protein-78 OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2
9201	4607	10364	2.2	Uzama faktörü beta-1 (<i>Elongation factor 1-beta</i>) OS=Homo sapiens GN=EEF1B2 PE=1 SV=3
9503	2516	5505	2.2	Kalretikulin (<i>Calreticulin</i>) OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1

Tablo 4.5. 72 saat ABS ile muamele sonucunda HT-29 hücrelerinde nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler.

72 Saat ABS ile Muamele (HT-29)				
SSP No	C Ortalama	T Ortalama	Değişim (C/T - T/C Oranı)	Protein Adı
ABS' nin etkisi ile azalan				
7406	6955	797	8.7	Alfa-enolaz (<i>Alpha-enolase</i>) OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2
7803	2097	27	77.7	Zyxin OS=Homo sapiens GN=ZYX PE=1 SV=1
8408	11960	1992	6	Alfa-enolaz OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2
ABS' nin etkisi ile artan				
0102	1197	4474	3.7	Uzama faktörü beta-1 OS=Homo sapiens GN=EEF1B2 PE=1 SV=3
0502	372	4926	13.2	Kalretikulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1
0513	2284	6293	2.8	Keratin, tip I sitoskeletal 10 (<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i>) OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
2404	261	1893	7.3	NSFL1 kofaktör p47 (<i>NSFL1 cofactor p47</i>) OS=Homo sapiens GN=NSFL1C PE=1 SV=2
2603	1707	3511	2.1	Drebrin benzer protein (<i>Drebrin-like protein</i>) OS=Homo sapiens GN=DBNL PE=1 SV=1
2801	394	4086	10.4	Glukoz regüle protein-78 OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2
2803	590	2794	4.7	Glukoz regüle protein-78 OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2
2901	149	1289	8.7	Keratin, tip I sitoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
2903	170	1274	7.5	Keratin, tip I sitoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
3001	3936	13756	3.5	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 5A-1 OS=Homo sapiens GN=EIF5A PE=1 SV=2
4801	346	2291	6.6	Src substratı kortaktin OS=Homo sapiens GN=CTTN PE=1 SV=2
4804	1073	3913	3.6	Src substratı kortaktin OS=Homo sapiens GN=CTTN PE=1 SV=2
6206	1918	5617	2.9	İnorganik pirofosfataz (<i>Inorganic pyrophosphatase</i>) OS=Homo sapiens GN=PPA1 PE=1 SV=2
7702	385	1646	4.3	Keratin, tip I sitoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
7801	861	3065	3.6	Keratin, tip II sitoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
7901	98	490	5	70 kDa ısı şok proteini 4L OS=Homo sapiens GN=HSPA4L PE=1 SV=2

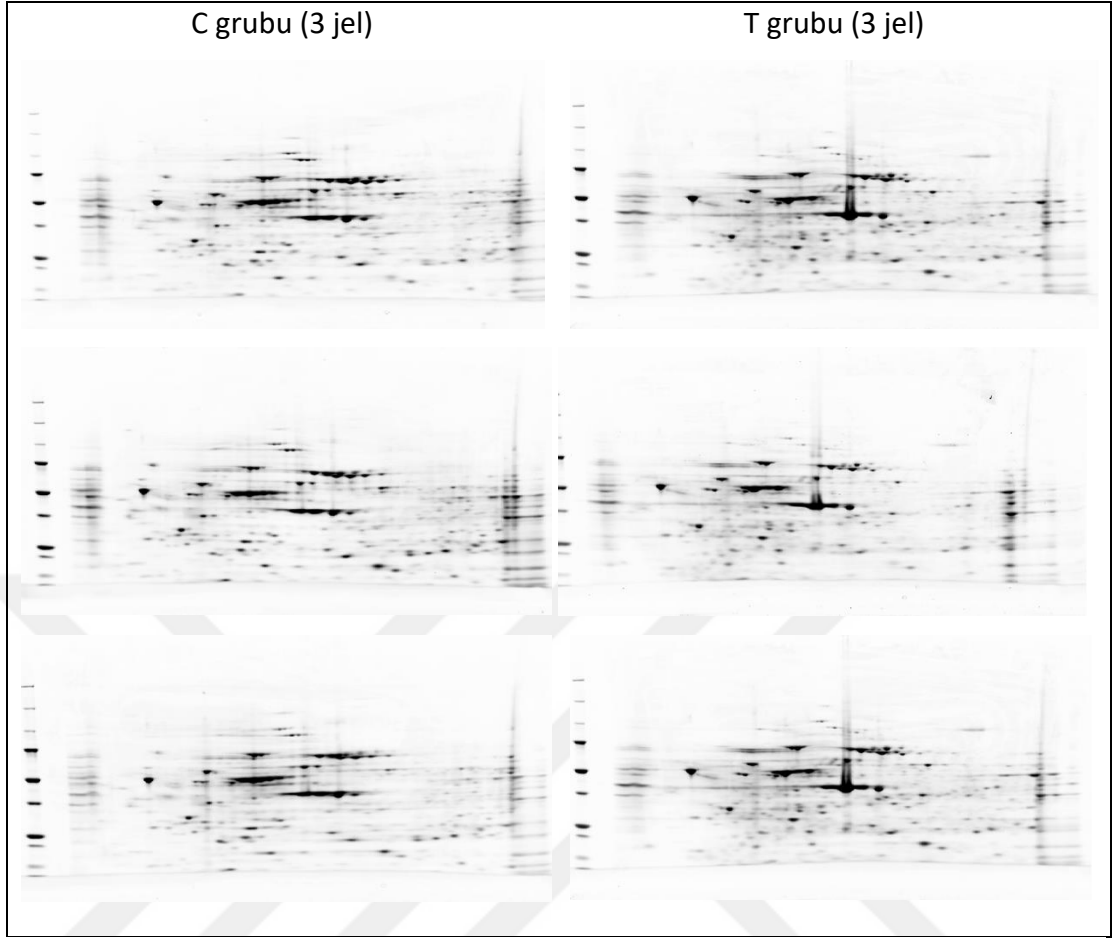
4.5. HepG2 Karaciğer Kanseri Hücrelerinde Proteomik Çalışma Bulguları

HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde, ABS ile muamele edilen hücreler T grubu, muamele edilmeyen hücreler C grubu olarak adlandırılmıştır. Elde edilen sitozolik fraksiyonlardaki protein miktarı belirlendikten sonra fraksiyonlardaki proteinler çöktürülmüştür. Çöktürülen proteinler yükleme tamponunda çözülüp pH 5 - 8 IPG şeritlere yüklenmiştir. Proteinlerin pI'larına göre ayrılabilmesi için Bkz. Tablo 3.8.'de verilen optimum koşullar uygulanmış ve SYPRO - Ruby ile boyama yapılmıştır.

4.5.1. İmaj Analizi Çalışmaları

Proteinlerin 2D jel elektroforez ile ayrımı sonrası jeller boyanıp görüntüleme cihazı aracılığıyla jel görüntüleri alınmıştır. Elde edilen jel görüntülerinin imaj analiz çalışmaları, PDQuest™ yazılımı aracılığıyla yapılmıştır. C ve T grupları arasında saptanan düşük veya yüksek miktarda ifade edilen proteinler saptanmıştır.

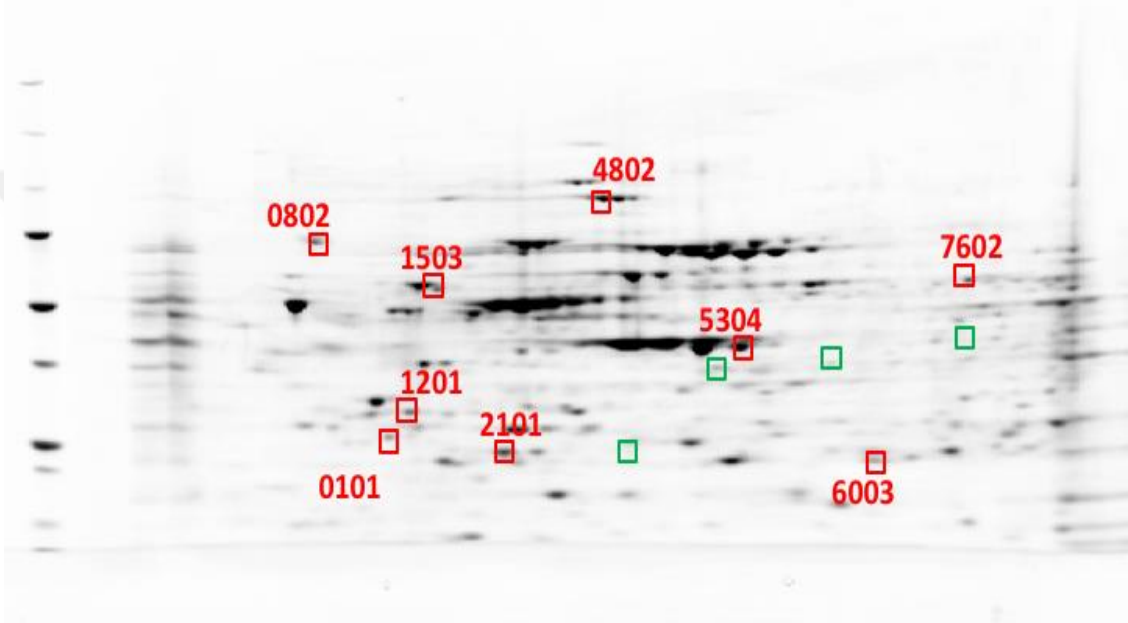
HepG2 hücrelerinin C ve T grubuna ait proteinler, 2D jel elektroforez ile ayrılmış, jeller SYPRO - Ruby ile boyanıp görüntüleme cihazı aracılığıyla jel görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.70.).



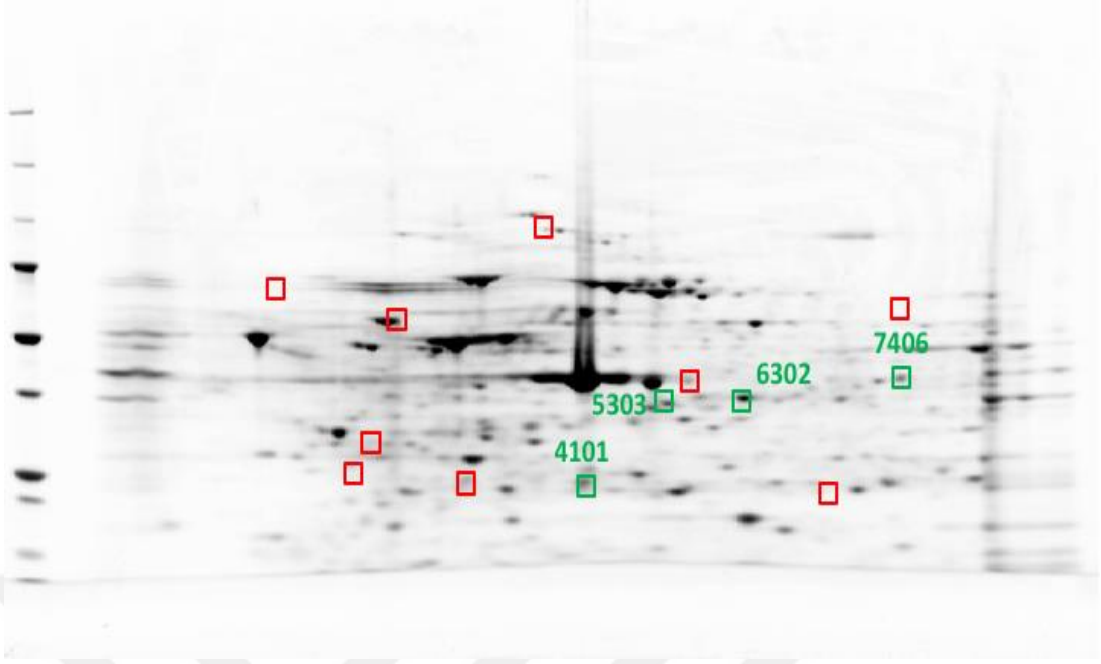
Şekil 4.70. C ve T grubuna ait tekrarlı jel görüntüleri (HepG2 hücreleri).

PDQuest™ programı ile C ve T gruplarına ait 3 tekrarlı jellerin karşılaştırılması sonrasında program tarafından verilen sanal jel haritaları üzerinde HepG2 hücre hattı için 224 tane spot tespit edilmiştir. Tespit edilen spotların tamamı program tarafından bulunduğu koordinata göre SSP numaraları verilerek numaralandırılmıştır. Farklılaşan spotların tespiti, sadece gözle takip edilerek yapılırsa hatalara sebebiyet vermesi nedeniyle Bkz. Bölüm 3.9.' da anlatıldığı gibi PDQuest™ programı 3 tane küme tanımlanmıştır. C ve T grupları için Quant kümesinde 70 tane spot, Statistic kümesinde 97 tane spot ve her 2 kümenin kesişim kümesi olan Booln kümesinde ise 60 tane spot saptanmıştır. Saptanan 60 tane spot görüntüleri tekrar incelendiğinde bazı spotların birbirlerine çok yakın oldukları gözlenmiştir ve içlerinden en yüksek değişime sahip olanlar seçilerek analiz edilmiştir.

60 spottan 13 tanesi MALDI-TOF/TOF-MS analizi için seçilmiş (Şekil 4.71. ve Şekil 4.72.) ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.71. ve Şekil 4.72.' de verilen ilgili spotların yakın görüntüleri Şekli 4.73 - 4.85' de sunulmuştur (Kırmızı ile işaretlenen protein ABS' nin etkisiyle azalmış, yeşil ile işaretlenen protein spotları ise ABS' nin etkisiyle artmıştır). ABS' nin etkisiyle azalan proteinler (9 tane) Şekil 4.73.- 4.81.' de ve ABS' nin etkisiyle artan proteinler (4 tane) Şekil 4.82. - 4.85.' de verilmiştir.



Şekil 4.71. C grubu HepG2 hücrelerine ait görüntü.



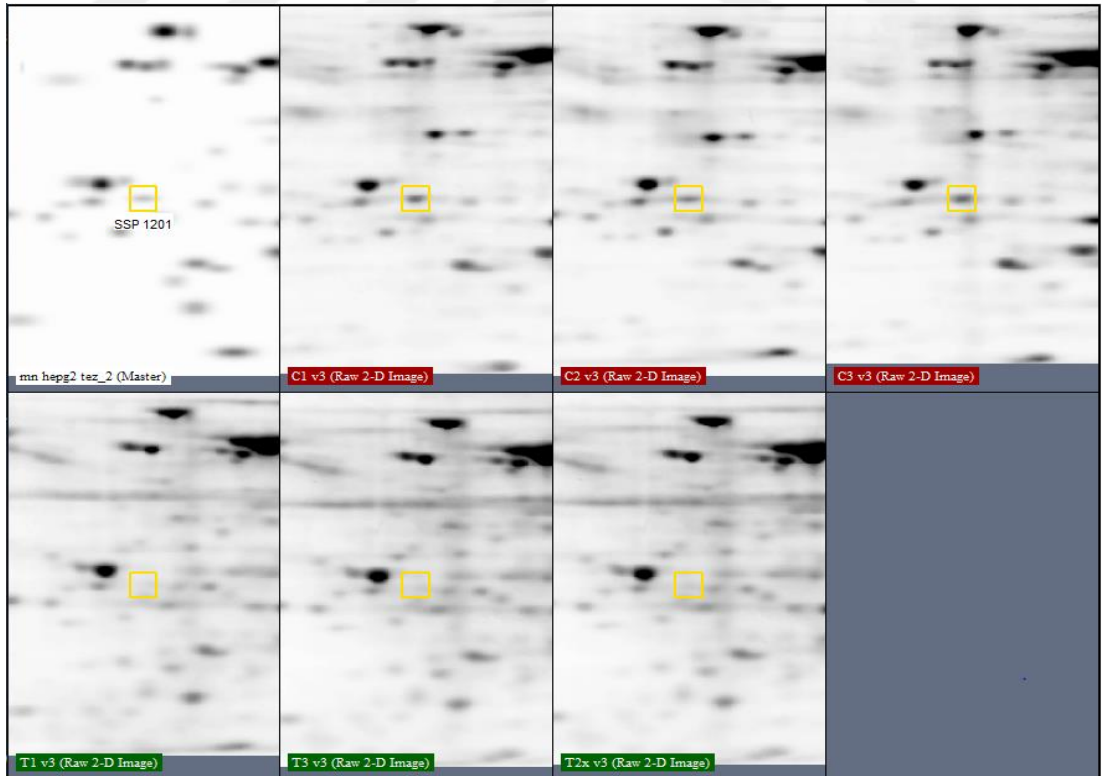
Şekil 4.72. T grubu HepG2 hücrelerine ait görüntü.



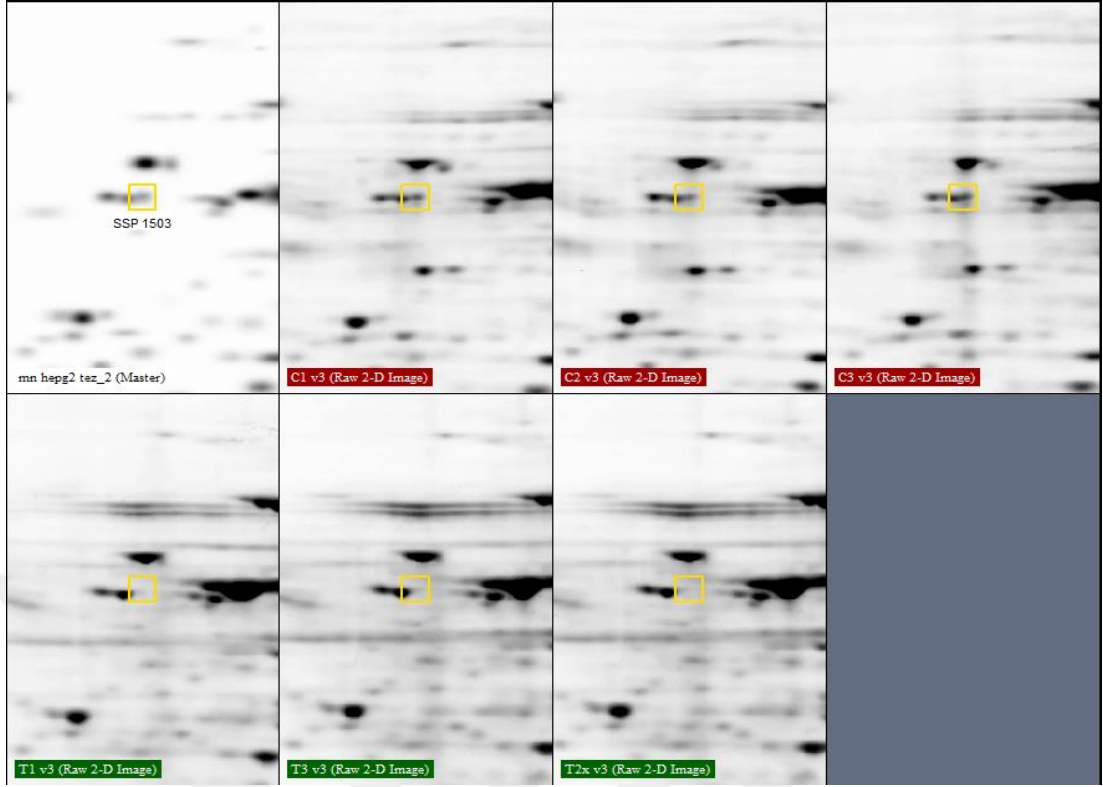
Şekil 4.73. 0101 numaralı spota ait görüntü.



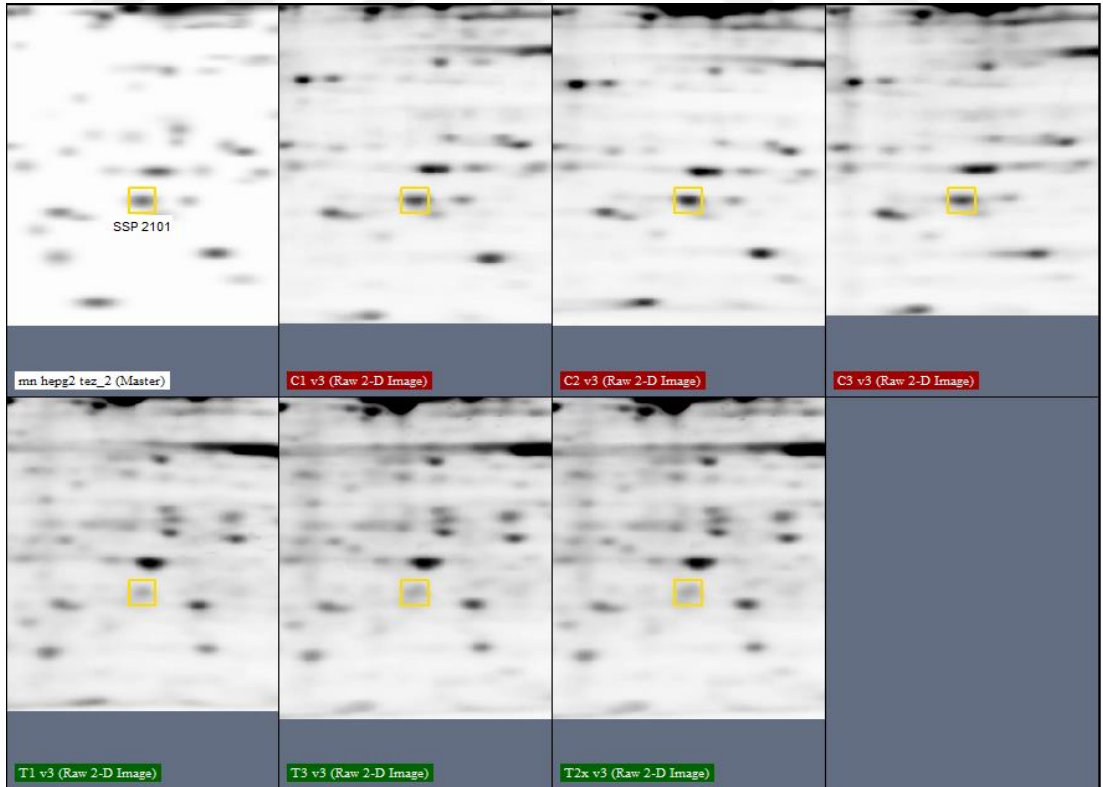
Şekil 4.74. 0802 numaralı spota ait görüntü.



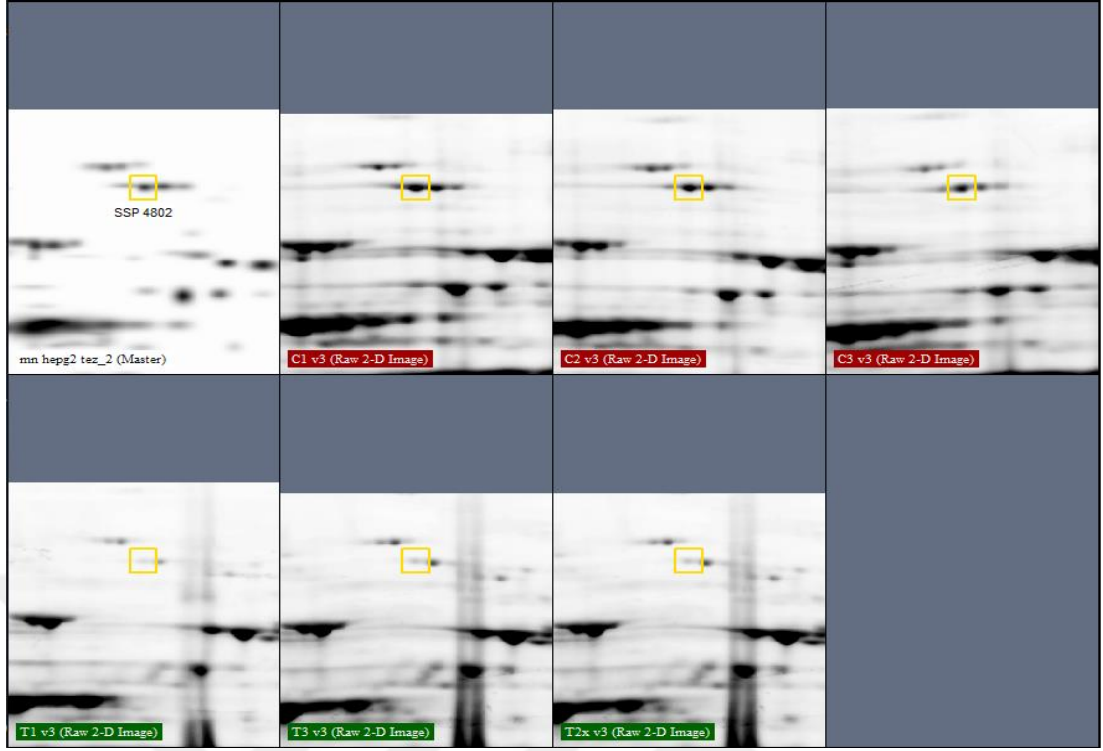
Şekil 4.75. 1201 numaralı spota ait görüntü.



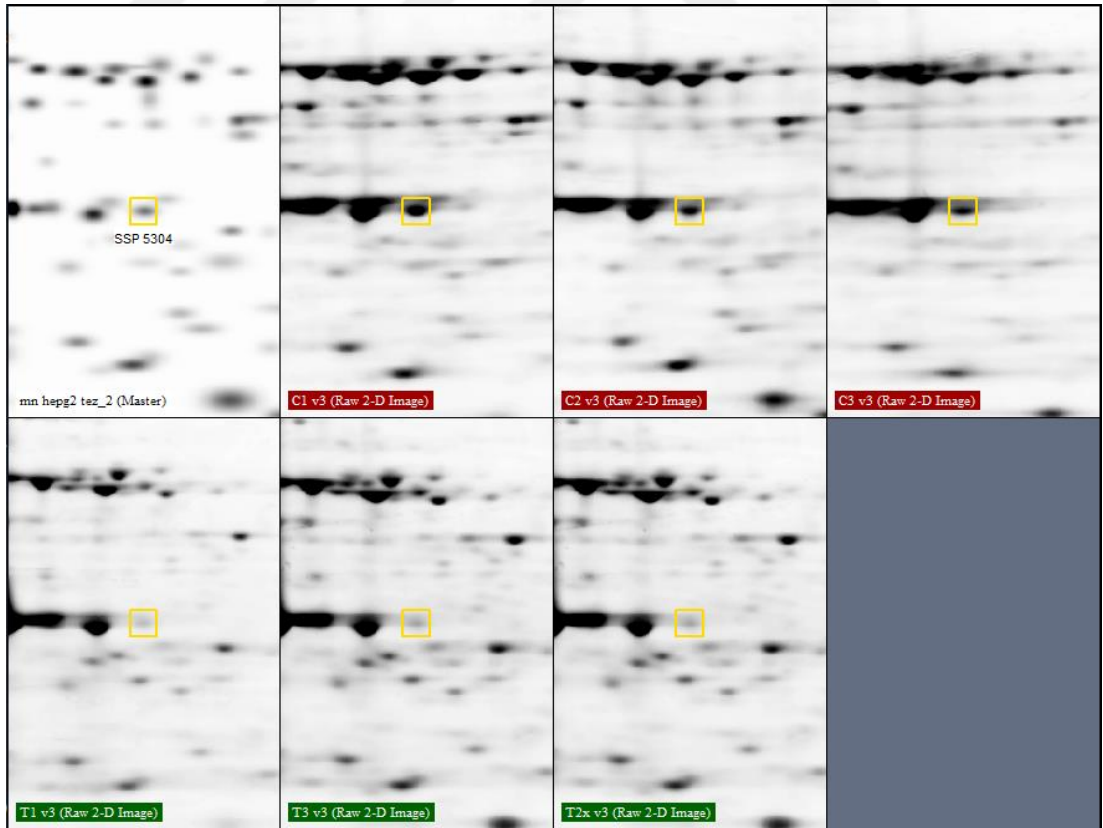
Şekil 4.76. 1503 numaralı spota ait görüntü.



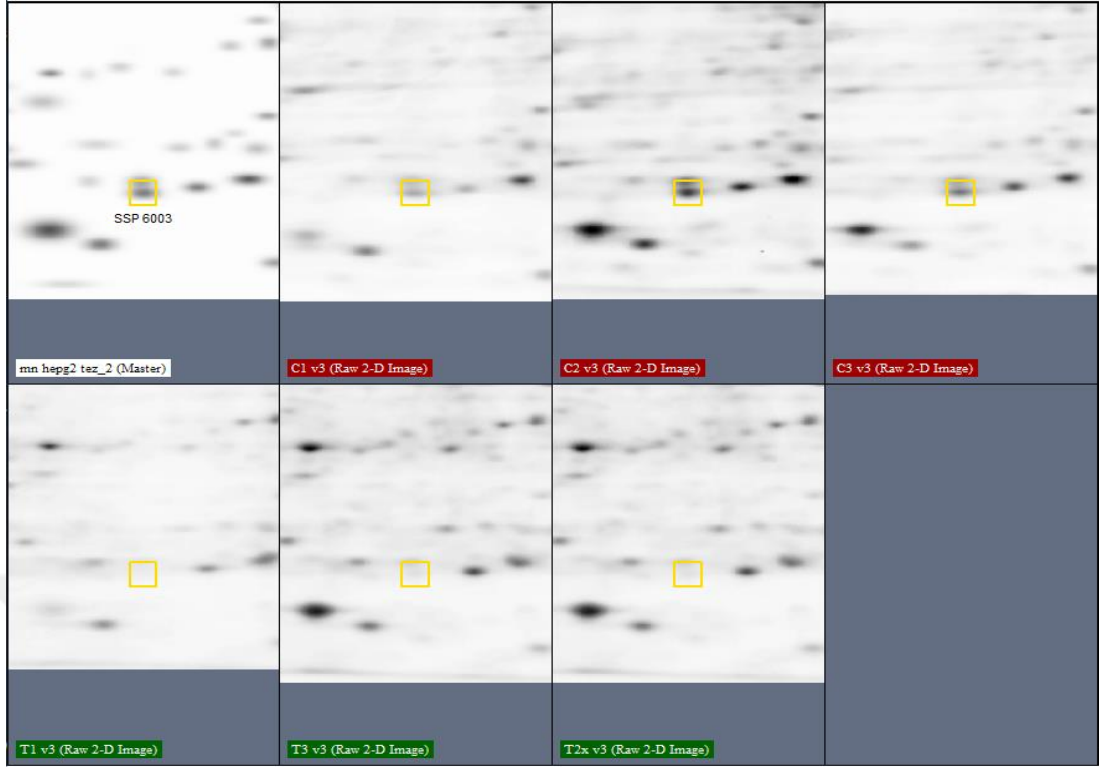
Şekil 4.77. 2101 numaralı spota ait görüntü.



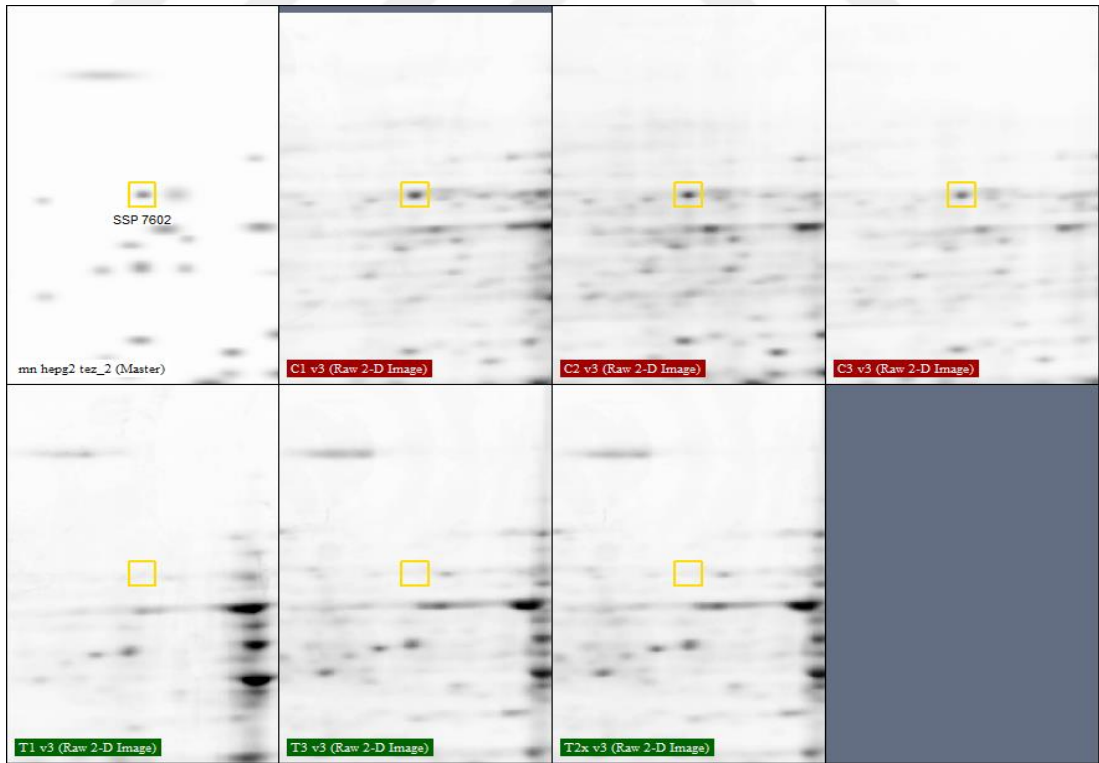
Şekil 4.78. 4802 numaralı spota ait görüntü.



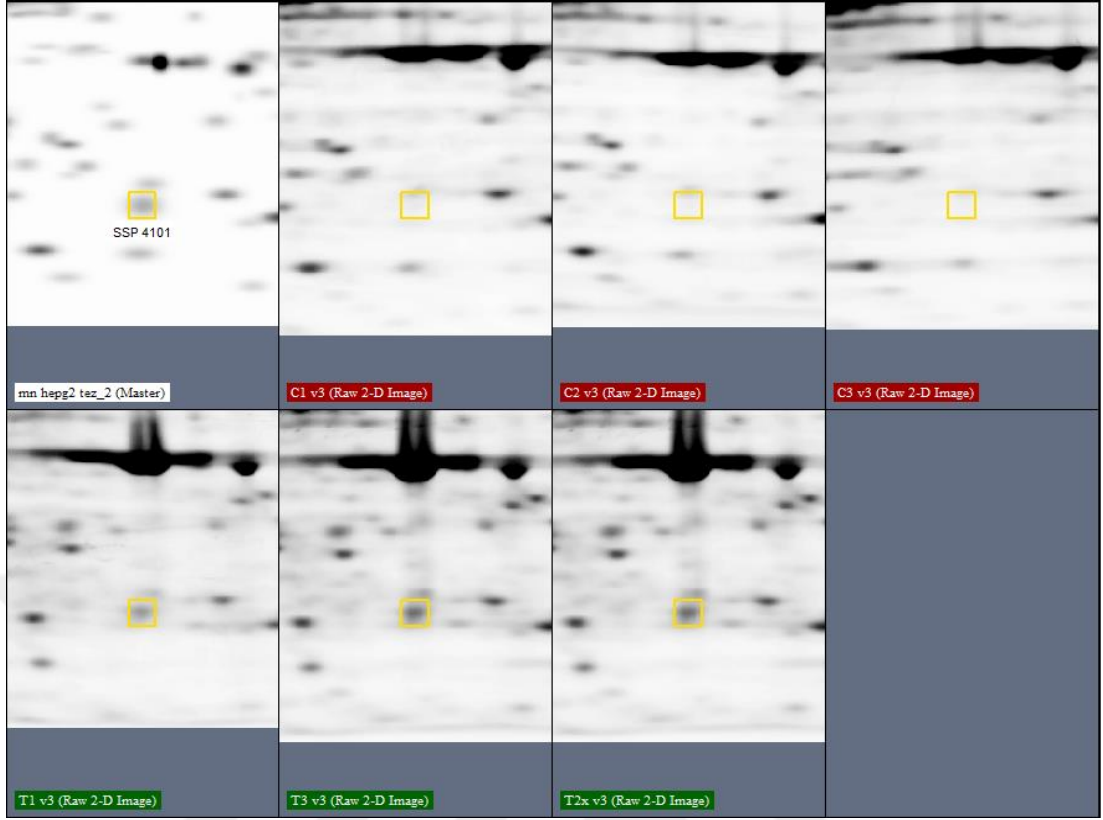
Şekil 4.79. 5304 numaralı spota ait görüntü.



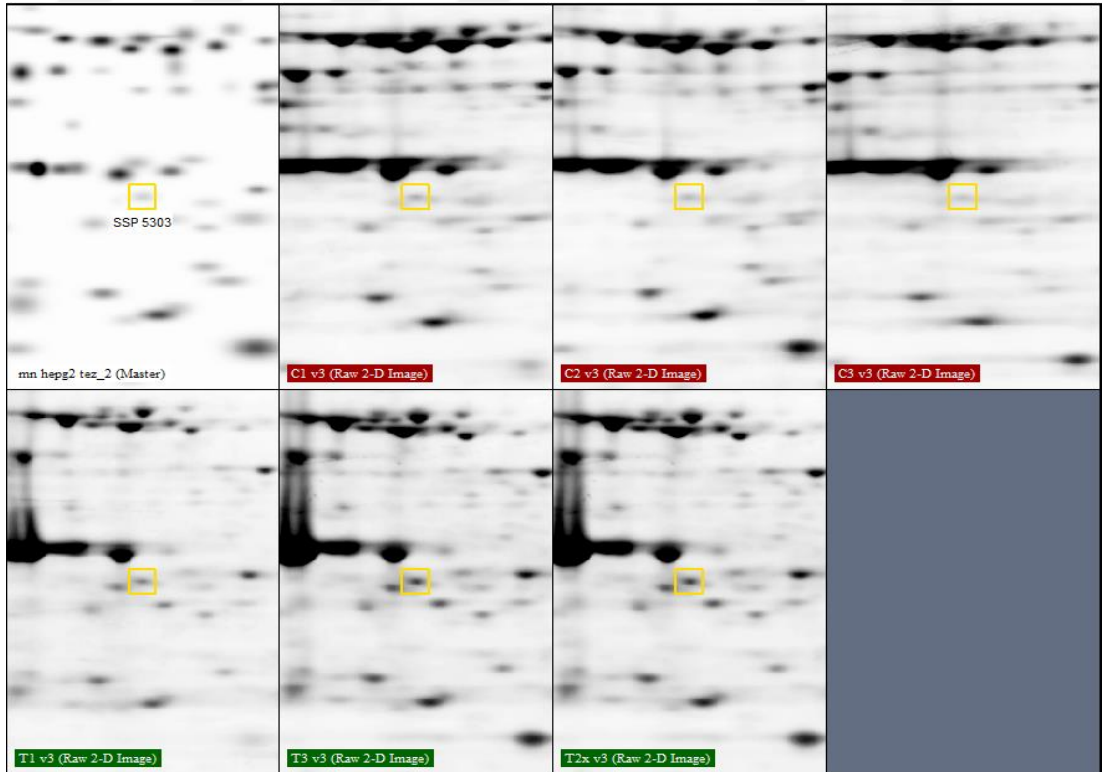
Şekil 4.80. 6003 numaralı spota ait görüntü.



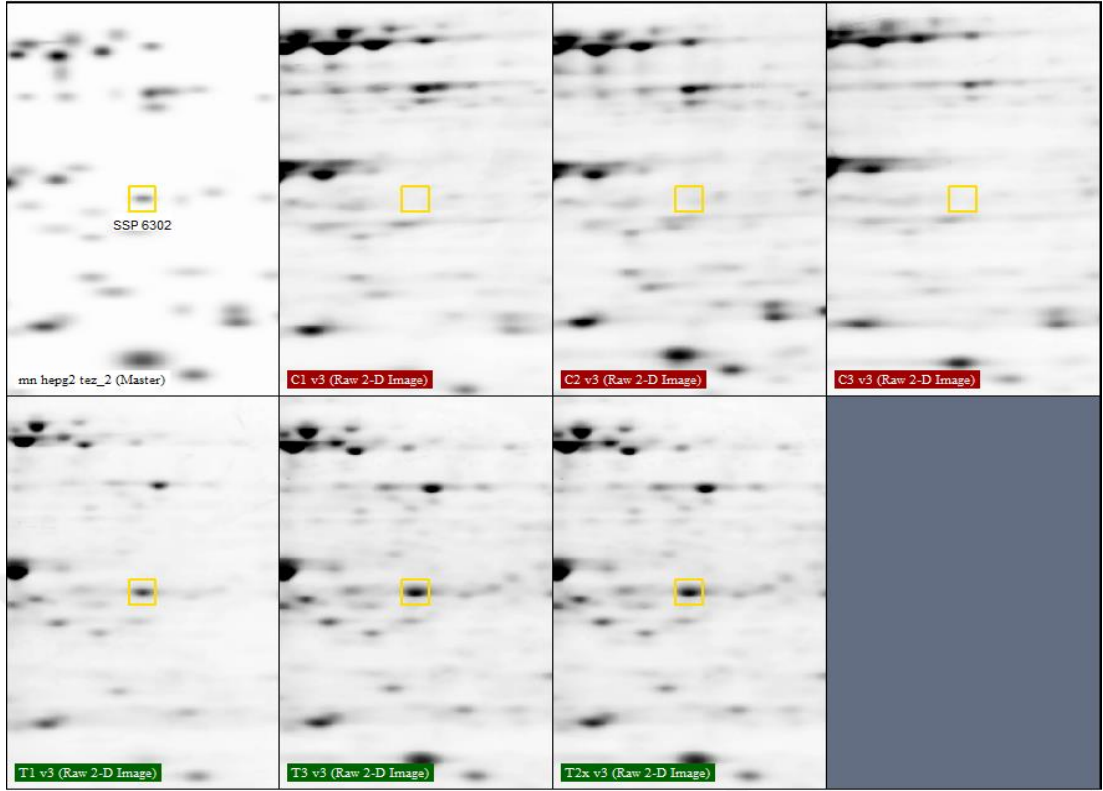
Şekil 4.81. 7602 numaralı spota ait görüntü.



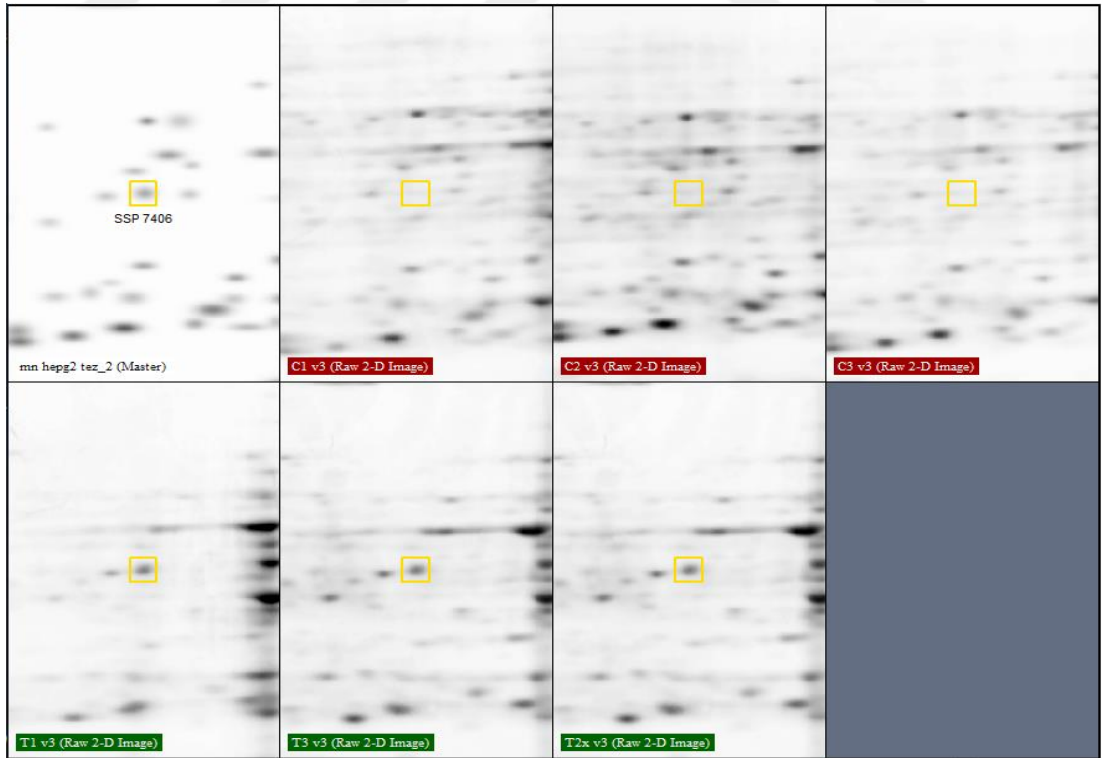
Şekil 4.82. 4101 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.83. 5303 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.84. 6302 numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.85. 7406 numaralı spota ait görüntü.

4.5.2 Peptid Dizileme ile Proteinlerin Tanımlanması

En üst düzeyde farklılaşan spotlardan, HepG2 hücre hattının C ve T grupları için 13 tane spot (SSP No: 0101, 0802, 1201, 1503, 2101, 4802, 5304, 6003, 7602, 4101, 5303, 6302 ve 7406) Kocaeli Üniversitesi Proteomik Laboratuvarı'nda jelden kesilmiş, tripsin ile peptidlerine parçalanarak jelden ekstre edilmiştir. Ekstre edilen proteinler MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilmiş ve veri bankaları kullanılarak tanımlanmıştır. PMF için MASCOT ve De Novo protein bankası kullanılmış, HepG2 karaciğer kanseri hücrelerine ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler tanımlanmıştır (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. ABS ile muamele sonucunda HepG2 hücrelerinde nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler.

24 Saat ABS ile Muamele (HepG2)				
SSP No	C Ortalama	T Ortalama	Değişim (C/T – T/C Oranı)	Protein Adı
ABS' nin etkisi ile azalan				
0101	1868898	495336	3.8	Uzama faktörü 2 (<i>Elongation factor 2</i>) OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4
0802	3975406	16310	243.7	70 kDa ısı şok proteini 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5
1201	1988056	86970	22.9	Proteazom subuniti, alfa tip-5 (<i>Proteasome subunit alpha type-5</i>) OS=Homo sapiens GN=PSMA5 PE=1 SV=3
1503	2263849	192949	11.7	Glukozidaz 2 subuniti beta (<i>Glucosidase 2 subunit beta</i>) OS=Homo sapiens GN=PRKCSH PE=1 SV=2
2101	6515852	2701061	2.4	Tropomiyosin alfa-3 zinciri (<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>) OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=1 SV=1
4802	3139688	438803	7.2	UV eksizyon tamir proteini RAD23 homolog B (<i>UV excision repair protein RAD23 homolog B</i>) OS=Homo sapiens GN=RAD23B PE=1 SV=1
5304	4105637	1210836	3.4	Laktoylglutasyon liyaz (<i>Lactoylglutathione lyase</i>) OS=Homo sapiens GN=GLO1 PE=1 SV=4
6003	3922215	442182	8.9	Geçişli endoplazmik retikulum ATPaz (<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>) OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4
7602	1814983	91261	19.9	Kreatin kinaz tip-B (<i>Creatine kinase B-type</i>) OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1
ABS' nin etkisi ile artan				
4101	438281	9244496	21.1	Ig gama-1 zincirinin C bölgesi (<i>Ig gamma-1 chain C region</i>) OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1
5303	1191980	2890768	2.4	Tubulin beta zinciri OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2
6302	45529	3613506	79.4	Heterojen nükleer ribonükleoprotein F (<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F</i>) OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3
7406	272228	2606190	9.6	Keratin, tip I sitoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6

4.6. Peptid Dizileme ve De Novo ile Proteinlerin Tanımlanması

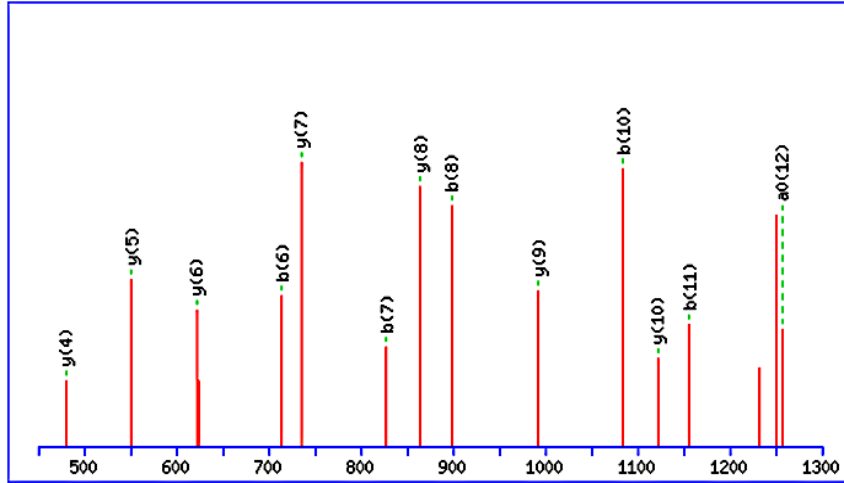
Caco-2, HT-29 ve HepG2 hücrelerinin ABS ile muamele edilmesi sonucunda farklılaştığı saptanan her bir spot, MASCOT programı ile analiz edilmiş ve analiz sonucunda en yüksek skora sahip peptid ve bu peptide ait aminoasit dizisi bulunmuştur. HepG2 hücre hattı ile yapılan MASCOT analizleri sonucunda farklılaştığı tespit edilen proteinlerden "Glukozidaz 2 subunite beta" proteininin AQQEQLAADAFK peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu ve m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi, MASCOT programı ile yapılan analizlerin anlaşılması için Şekil 4.86. ve Şekil 4.87.' de örnek olarak verilerek görselleştirilmiştir.

MS/MS Fragmentation of **AQQEQLAADAFK**
 Found in **GLU2B_HUMAN**, Glucosidase 2 subunit beta OS=Homo sapiens GN=PRKCSH PE=1 SV=2
 Match to Query 72: 1447.673754 from(1448.681030,1+) intensity(0.0000) index(7)
 Title: Locus:1.P7.2.1.8

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1447.6943

Ions Score: 61 Expect: 3.8e-005

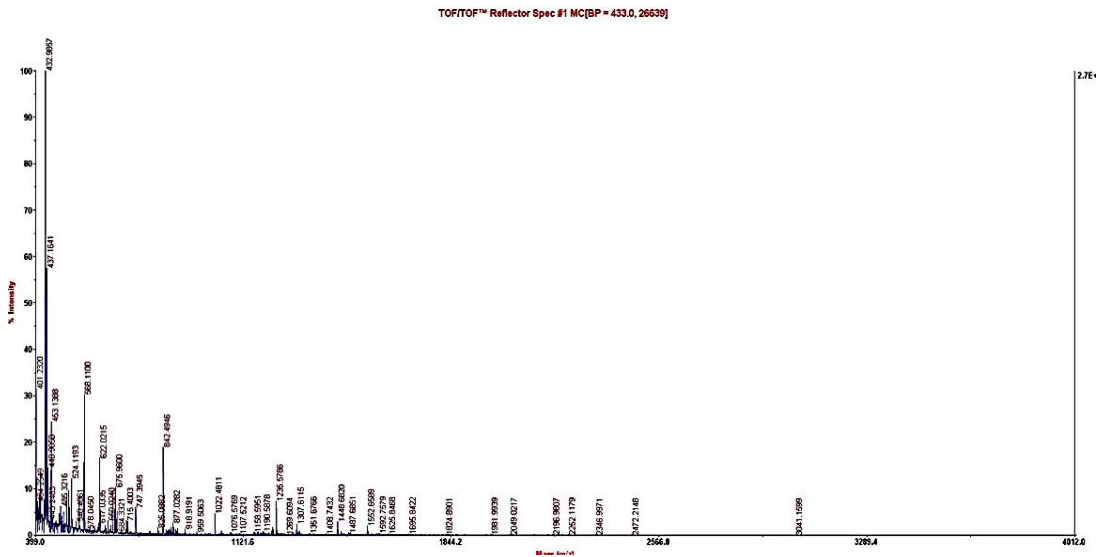
Matches : 13/191 fragment ions using 16 most intense peaks [\(help\)](#)

Şekil 4.86. Glukozidaz 2 subunite beta proteininin AQQEQLAADAFK peptidine ait tüm iyonlar ile b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu.

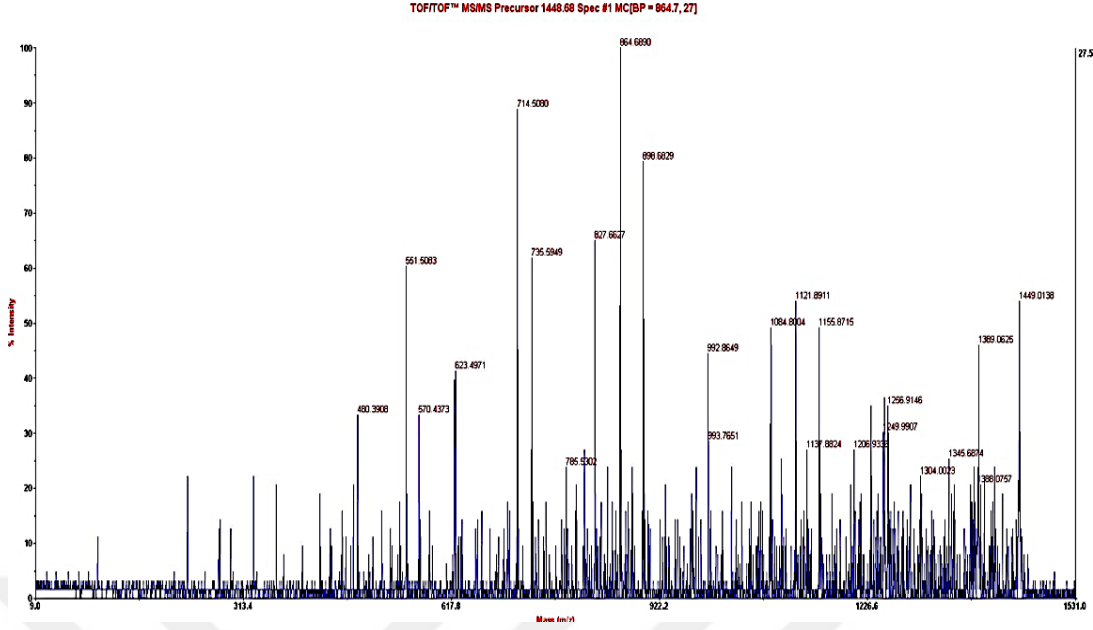
#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	y	y*	y ⁰	#
1	44.0495	44.0495			72.0444			A				13
2	101.0709	172.1081	155.0815		200.1030	183.0764		Q	1377.6645	1360.6379	1359.6539	12
3	101.0709	300.1666	283.1401		328.1615	311.1350		Q	1249.6059	1232.5794	1231.5953	11
4	102.0550	429.2092	412.1827	411.1987	457.2041	440.1776	439.1936	E	<i>1121.5473</i>	1104.5208	1103.5368	10
5	101.0709	557.2678	540.2413	539.2572	585.2627	568.2362	567.2522	Q	<i>992.5047</i>	975.4782	974.4942	9
6	102.0550	686.3104	669.2838	668.2998	<i>714.3053</i>	697.2788	696.2947	E	<i>864.4462</i>	847.4196	846.4356	8
7	86.0964	799.3945	782.3679	781.3839	<i>827.3894</i>	810.3628	809.3788	L	<i>735.4036</i>	718.3770	717.3930	7
8	44.0495	870.4316	853.4050	852.4210	<i>898.4265</i>	881.3999	880.4159	A	<i>622.3195</i>	605.2930	604.3089	6
9	44.0495	941.4687	924.4421	923.4581	969.4636	952.4371	951.4530	A	<i>551.2824</i>	534.2558	533.2718	5
10	88.0393	1056.4956	1039.4691	1038.4851	<i>1084.4905</i>	1067.4640	1066.4800	D	<i>480.2453</i>	463.2187	462.2347	4
11	44.0495	1127.5327	1110.5062	1109.5222	<i>1155.5277</i>	1138.5011	1137.5171	A	365.2183	348.1918		3
12	120.0808	1274.6012	1257.5746	1256.5906	1302.5961	1285.5695	1284.5855	F	294.1812	277.1547		2
13	101.1073							K	147.1128	130.0863		1

Şekil 4.87. Glukozidaz 2 subunite beta proteinin AQQEQELAADAFK peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi.

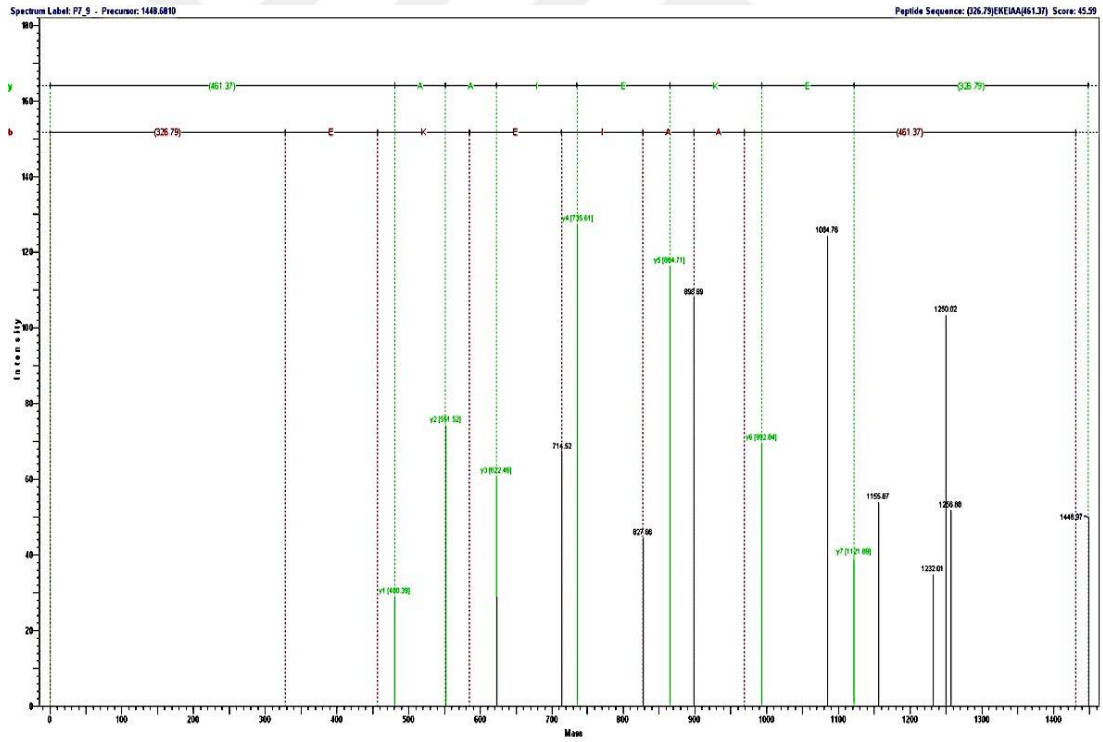
Farklılaştığı saptanan spotlar De Novo dizilimi yapılarak saptanabilmektedir. Ancak bu yöntem herhangi bir program kullanılmadan yapıldığında uzun süren zahmetli bir yöntemdir. HepG2 hücre hattı ile yapılan analizler sonucunda farklılaştığı tespit edilen proteinlerden Glukozidaz 2 subunite beta proteinine ait MS spektrumu, seçilen precursor iyonuna ait MS/MS spektrumu ve amino asit dizisi, De Novo dizileme ile yapılan analizlerin anlaşılması için Şekil 4.88.- 4.90.' da örnek olarak verilerek görselleştirilmiştir.



Şekil 4.88. Glukozidaz 2 subunite beta proteinine ait MS spektrumu.



Şekil 4.89. 1448.68 m/z değerli precursor iyonu ait MS/MS spektrumu.



Şekil 4.90. 1448.68 m/z değerine sahip precursor iyonu ait De Novo amino asit dizisi.

5. TARTIŞMA

Sağlıklı bir kişide hücreler (sinir hücreleri hariç) yaşamsal fonksiyonlarının devamlılığı için bölünebilme yeteneğine sahiptir. Ölen hücreler yenilenebilir ve çeşitli yaralanmalara uğrayan dokular onarılabilir. Sağlıklı bir hücre sonsuza kadar bölünmeye devam edemez, sınırlı sayıda bölünmeye uğrar ve buna apoptoz denir. Dünyada teşhis ve tedavisi en zor ölümcül hastalıklardan biri olan kanserde, hücreler bölünme kontrolünü kaybederek kontrolsüz biçimde bölünmeye başlarlar ve birikerek tümörleri (kitleleri) oluştururlar. Bunlar da normal dokulara çeşitli şekillerde zarar verip onları tahrip ederler. Kanser türlerinin gelişimleri ve süreçleri birbirinden farklıdır ve bu nedenle de farklı tedaviler uygulanmaktadır.

1990' lı yıllarda başlayan "İnsan Genom Projesi" nin amacı, insan DNA' sında yer alan genleri tanımlamak, tedavisi olmayan genetik hastalıklara yatkınlığı belirlemek, bu hastalıklarla ilgili genlerin yapılarını aydınlatıp, yerlerini belirleyerek tanı ve tedaviyi olanaklı hale getirmektir. İnsan Genom Projesi' nin tamamlanmasından sonra tıp uygulamaları, kanserin ortaya çıkması, ilerlemesi ve tedavisinde dahil olan genlerin (genomik) tanımlanması, bu spesifik genlerin ne cevap verdiği ve iletişim ağlarında (fonksiyonel genomik) nasıl etkileştiği ve moleküler yollarda protein ürünlerinin (proteom) rolleri temelden değiştirilecektir. Kemoterapötik ilaçların geliştirilmesi ve erken teşhiste kullanılacak moleküllerin araştırılması dahil olmak üzere birçok çalışmalar yapılmaktadır, fakat halen klinik olarak kullanımda olan çok az sayıda biyobelirteç bulunmaktadır. Proteomik, kanser araştırmalarına yaklaşımları hızla değiştiren teknolojilerden biridir. Konvansiyonel proteomik, yüksek ayırımı 2D jel elektroforezi ve kütle spektrometrisi kullanılarak protein tanımlamasıdır (116). Proteomik sonuçlar hem hücre üzerindeki genetik etkiyi hem de ortamın etkisini ifade eder ve bu yüzden biyobelirteçlerin belirlenmesi çok değerlidir. Günümüzde proteinler genlerin temel fonksiyonel çıktılarıdır.

Proteomik ve genomik çalışmaların amacı, insan DNA' sında yer alan, organizma içerisinde kromozomun belirli bir kısmını oluşturan genleri tanımlamaktır. Binlerce hücrelerden oluşan vücudumuzun yaşamsal fonksiyonlarının devamı için gerekli yapı taşlarından olan proteinler, genler tarafından sentezlenmektedir. Genler tarafından katlanan

bütün proteinler proteom adı verilen yapıyı oluştururlar ve proteom içerisindeki bu proteinler proteomik çalışmalarla incelenmektedir.

Kıyaslamalı (ekspresyon) proteomik ise 2 farklı koşulda toplam protein ekspresyonunun nitel ve nicel analizidir. Kıyaslamalı proteomik çalışma alanında, belirli bir hastalık durumunda hücrede değişime uğrayan proteinlerin belirlenmesi, bir fiziksel veya kimyasal uyarıcı ile karşılaşılması durumunda bu durumdan etkilenen proteinlerin incelenmesi yer almaktadır. Örneğin, bir kanser hastasına ait hücre numunesi ve sağlıklı bireye ait hücre numunesi protein ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla 2D jel elektroforez ve kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilebilmektedir. Bu yöntemle, kanserli hücrelerde bulunmayan ve kanserli hücrelerde bulunan proteinler; eksik veya fazla miktardaki proteinler tespit edilebilmektedir ve sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirilmektedir. Kıyaslamalı proteomik ile elde edilen bulgular, hastalıklarda ilaç tedavilerinin potansiyelinin tespitini ve işleyişinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (57). Proteomik çalışmalar, kanserin gelişmesi, ilerlemesi aşamaları ile ilgili hücresel olayların moleküler düzeyde incelenmesinde önemlidir (117, 118). Klinik tümör örnekleri ile yapılan çalışmalar, kansere özgü protein markerlarının tanımlanmasına yol açmış, erken tanı ve teşhisi için yeni yöntemler geliştirilmiş, kanserin temeli ve ilerlemesinin moleküler karakterizasyonunu anlamak için ipuçları vermiştir (119).

Gen Ontolojisi (GO), gen fonksiyonlarıyla ilgili kavramların tamamını ve bu işlevlerin birbirleriyle nasıl ilişkili olduğunu tanımlar. Biyolojik bilgi biriktikçe GO sürekli gözden geçirilir ve genişletilir. GO, gen işlevini 3 açıdan ele alır:

- Moleküler fonksiyon (gen ürünleri tarafından gerçekleştirilen moleküler düzeydeki aktiviteler),
- Hücresel bileşen (bir gen ürününün bir işlevi gerçekleştirdiği hücresel yapılara göre konumlar),
- Biyolojik süreçtir (daha büyük süreçler ya da çoklu moleküler faaliyetlerle gerçekleştirilen biyolojik programlar) (120).

ABS, Türk hekimliğinde hemostatik ajan olarak kullanılan ve *Urtica dioica*, *Vitis vinifera*, *Glycyrrhiza glabra*, *Alpinia officinarum* ve *Thymus vulgaris* bitkilerinin standardize karışımından oluşan bitkisel bir ekstraktır. Bu bitkilerin hepsi endoteller, kan hücreleri,

hücrel üreme, damar oluşumu ve mediyatörler üzerinde etkilere sahiptir. Kaynaklarda bu bitkilerin tek başlarına farklı aktivitelere sahip olduklarıyla ilgili de veriler bulunmaktadır. *Thymus vulgaris'* in yapraklarının, antioksidan etkisi kanıtlanmış olan alfatokoferol ve butil hidroksitoluenle kıyaslanabilecek düzeyde antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (121). *Thymus vulgaris* antispazmodik, karminatif, terletici, balgam söktürücü ve sedatif özelliklere de sahiptir. Kekiğin ekstraktları veya infüzyonları sık sık boğaz ve bronş hastalıklarında ve ayrıca ishal, kronik gastrit ve iştahsızlıkta kullanılmaktadır (122). *Glycyrrhiza glabra'* nin köklerinin, in-vitro hücre kültürü çalışmalarında antianjiyonik, antiinflamatuvar, antioksidan, antitrombotik, antiaterosklerotik, antiplatelet ve antitümöral etkilerinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (123-125). Özellikle *Vitis vinifera'* nin tohum ekstraktının, antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal aktivitelerin yanı sıra kardiyoprotektif, hepatoprotektif ve nöroprotektif etkilere sahip olması gibi geniş bir farmakolojik ve terapötik etki spektrumuna sahip olduğu belirtilmiştir (126). *Alpinia officinarum'* un liposakkaridlerle aktive edilen fare makrofajında nitrik oksit üretimini inhibe eder. *Alpinia officinarum'* un romatizma, bronş nezlesi, ağız kokusu, ülser, çocuklarda öksürük boğmaca, boğaz enfeksiyonları ve idrar kaçırmayı kontrol altında tutmak gibi kullanımları mevcuttur (127). *Urtica dioica'* nin sıçanlarda, nitrik okside bağlı olarak endotel kaynaklı hipotansif yanıt oluşturmaktadır ve bununla birlikte antifungal, antiviral etkilerinden söz edilmektedir. *Urtica dioica'* nin ekstraktlarının diüretik, hipotansif ve kardiyovasküler etkisi olduğu ve insan lenfositlerinin çoğalmasını uyarabildiği bildirilmiştir (128-130).

ABS' nin etkisinin temel prensibi, canlı eritrositlerden kapsüllenmiş bir protein ağının oluşturulmasına dayanmaktadır. ABS' nin neden olduğu protein ağ oluşumu kan hücrelerinden özellikle eritrositleri bir araya getirerek oluşur, ancak bu ağ oluşurken organizmanın bireysel fizyolojik pıhtılaşma sistemlerini etkilemez (125). ABS' nin damarlar ve dokulardaki etkilerine yönelik deneyler yapılmıştır ve deneysel majör arteriyel damar yaralanmalarına uygulanan ABS' nin normal ve yüksek arter içi kan basıncı koşullarında, kanama süresini ve kan kaybını azalttığı tespit edilmiştir. Çoğu hasta için, diş çekimi ve periodental cerrahi sırasında kanamanın kontrolü için kullanılmakta ve 1 veya 2 mL ABS yeterli olmaktadır (131). Ciddi kanama durumlarında, ABS renal tübüler hücrel mikrobiyolojik ortamda topikal bir biyolojik yanıt değiştirici olarak işlev görebilir.

ABS, apoptotik moleküllerin düzenlenmesini (regülasyonlarını) uyarır (132). ABS, burun, tiroid, bademcik ve geniz eti hatta varis kanamasına bağlı tedavide hastalarda güvenle kullanılmıştır (132-136). Ek olarak, ABS, üst gastrointestinal kanamayı, sindirim kanalında hayati tehlikeye sokan arteriyel kanamayı ve soliter rektal ülser nedeniyle oluşan kanamayı kontrol etmek için kullanılmıştır (137-139). Ayrıca, pıhtılaşma faktörleri II, V, VIII, IX, X, XI ve XII düzeyleri ABS' den etkilenmemiştir ve bu nedenle, primer hemostaz eksikliği olan hastalarda kullanılabilir (140). Biyomalzemelerin biyolojik ve toksikolojik özellikleri klinik kullanımları için önemlidir ve biyoyumluluğun birincil faktörü olarak in-vitro sitotoksik tarama hücre kültürü ile belirlenir. Bu nedenle Mihmanli ve arkadaşları (141) ABS' nin sitotoksik etkisini gözlemlemek için laktat dehidrojenaz deneyi, hücre çoğalması deneyi ve hemolitik deneylerini gerçekleştirmişlerdir.

ABS, hemostatik etkilerinin yanı sıra çok sayıda hücre fonksiyon üzerinde rol oynar ve vasküler endotel hücrelerindeki endotel protein C reseptörü (EPCR) ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), konsantrasyonuna bağlı olarak farklı dinamik tersinir etkilere sahiptir. Bu bulgulara dayanarak, ABS' nin ani antihemorajik etkinliği, prohemostatik PAI-1 ve aşağı-regüle (*down-regulate*) edilmiş antikoagülan EPCR' nin ekspresyonunun arttırılmasına bağlanmıştır. Bu durum ABS' nin benzersiz hemostatik etkileriyle sonuçlanmaktadır. Bu mekanizma, ABS' nin verilen bir dokudaki etkilerini aydınlatmak için de önemli olabilir (132, 142). ABS' nin sıçanlarda ototoksik yan etkileri bulunduğu belirtilmiştir (143).

ABS' nin neden olduğu eritroid-protein ağının önemli proteomik bileşenleri, Demiralp ve ark. (144) tarafından ortaya konmuştur. ABS' deki bitki kökenli proteinler, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) bağımlı malik enzim, ribüloz bifosfatkarboksilaz-büyük zincir, maturaz K, adozin trifosfat (ATP) sentaz alt birimi-β, ATP sentaz alt birimi-a, kalkon-flavanon izomeraz-1, kalkon-flavanon izomeraz-2 ve aktin-depolimerize edici faktörlerdir. Fonksiyonel proteomik çalışmalar, ATP sentaz, dynactin 5, nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) dehidrojenaz (ubiquinone) 1-a-subcomplex, mitokondriyal NADP (+) bağımlı malik enzim 3 ve nükleer faktör 1B-tip dahil olmak üzere ABS içindeki insan peptidlerine benzeyen 35 farklı protein olduğu ortaya konmuştur (144).

İnsanlarda ölüm, teknoloji ve kültürdeki gelişmeler nedeniyle değişime uğramaktadır. Artan sanayileşme nedeniyle, kimyasal kanserojenlere maruz kalma da

artmaktadır (145). Bu nedenle bu tez çalışmasında, hemostatik ajan olarak kullanılan ve kaynaklarda yer alan hemostatik etki mekanizmalarının dışında kolon ve karaciğer kanserlerinde antineoplastik etkisinin olup olmadığını araştırmak ve böyle bir etki varsa hangi genler, proteinler veya yolaklar üzerinden bu etkiye sahip olduğunu saptamak için 2D jel elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS ile proteomik analizler gerçekleştirilmiştir.

ABS uygulanarak displazi (anormal hücre - doku büyümesi) ve kanser hücrelerinde gerçekleştirilen klinik çalışmalar kaynaklarda yer almaktadır ve Tablo 5.1.' de sunulmuştur.

Tablo 5.1. ABS' nin kanser ile ilgili kaynak verileri.

Organizma/Hücre/ Doku/Patoloji	Etki Mekanizması/ Sonuç	Referans
Sıçanlarda, 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) kaynaklı oral epitelyal displazi	ABS' nin DMBA' nın neden olduğu oral epitelyal displaziye karşı kemopreventif etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, DMBA' nın neden olduğu oral epitelyal displazide ABS' nin kemopreventif potansiyelinin kesin moleküler mekanizmasını netleştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.	(146)
İnsanlarda kolon kanserine bağlı alt gastrointestinal kanamalar (LGIB)	LGIB' in nedenlerinden biride kolon kanseridir. LGIB' i durdurmak için ABS kullanılan çalışmalar bulunmaktadır. ABS uygulamasının teknik olarak ulaşılması zor olan bölgelere kolay bir şekilde yapılabildiğinden bahsedilmiştir. ABS' nin herhangi bir yan etkisinin olmaması nedeniyle tekrar tekrar kullanılabileceğinden, bununla birlikte antikoagülan ve antitrombotik ilaç kullananlarında rahatça bunu kullanılabileceğinden bahsedilmiştir. Cerrahi müdahalelere göre daha az maliyet gözlemlenmiştir.	(147-151)
Çocuklarda, çocukluk çağı kanserlerinde oluşan oral mukozitler	Çalışmada çocukluk çağı kanserlerinde kemoterapiye bağlı ikincil oral mukozitlerin profilaksisinde ve tedavisinde ABS' nin etkili olduğunu gösteren ileriye dönük ve klinik bir çalışmadır. Standart oral bakıma ABS eklenerek, plazma sitrülün seviyelerindeki azalma sınırlandırılmıştır. Daha büyük numunelerle yapılacak olan randomize çalışmalar ile, ABS' nin oral mukozit profilaksisinde ve tedavi protokollerinde kullanılmasını sağlayacağını ortaya çıkarmıştır.	(152)
40 yaşında kaynak işçisi	Akciğer kanseri, mesleki astım ve pnömokonyoz gibi birçok akciğer hastalığı literatürde kaynak dumanı ile ilişkilendirilmiştir. Bu vaka raporu, masif hemoptizi ile ortaya çıkan kaynak dumanlarına bağlı alveoler kanamanın ilk vakasıdır. Bronkoskop probu ile akciğer loblarına buzlu salin ve ABS lavajı yapılmıştır. Hemoptizi günden güne azalmış ve 6. günde kaybolmuştur.	(153)
10 yaşındaki erkek çocukta, primer özofagus adenokarsinom	Yutma güçlüğü ve kanamalı kusma şikayetiyle gelen çocuk hastaya topikal olarak ABS uygulanan vaka raporudur. Bu çalışma pediatrik bir hastada topikal özofageal ABS uygulaması yapılan ilk klinik uygulama olmuştur. Topikal ABS uygulamasının neoplastik gastrointestinal kanamayı kontrol etmek için alternatif bir yöntem olabileceği ileri sürülmüştür.	(150)
89 yaşında kadında, rektal karsinom	Rektal karsinomun mezorektal eksizyon tekniği ile cerrahi müdahalesi sırasında 15 dakika ABS ile tampon yapılarak kanamanın durdurulduğunu ifade eden bir vaka raporudur.	(154)

Tablo 5.1. (Devam) ABS' nin kanser ile ilgili kaynak verileri.

Organizma/Hücre/ Doku/Patoloji	Etki Mekanizması/ Sonuç	Referans
Kanamalı gastrointestinal karsinomlar	Topikal ABS uygulaması ile kanamalı gastrointestinal karsinomlar tümör vaskülarizasyonunu azaltıldığıyla ilgili bir vaka raporudur.	(151)
Melanom hücre hatları (SK-MEL-10, SK-MEL-9, A2058 ve MeWo hücre hatları)	ABS' nin farklı derişim ve farklı zamanlardaki etkisi araştırılmıştır ve hücre büyümesi üzerinde önemli bir inhibitör etkisinin olup olmayacağını belirlemek için t testi kullanılmıştır. Uygulanan doza ve tedavi edilen hücrelerin farklı süre maruziyetine bağlı olarak hücreler, ABS' ye karşı farklı dirençler göstermiştir. ABS' nin derişimi ve inkübasyon süresinin hücrelerin canlılığı arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir. ABS' nin derişimi ve inkübasyon süresi arttıkça hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir.	(155)
Saos-2 osteosarkom ve Caco-2 kolorektal karsinoma hücre hattı	ABS' nin antineoplastik etkisi ilk önce Saos-2 osteosarkom hücreleri üzerinde araştırılmıştır. ABS 2, 4, 6, 8 ve 10 µL/mL derişimlerinde besi ortamına ilave edilerek hücrelere uygulanmıştır. Hücre proliferasyonunda doza bağlı bir azalma olduğu gözlenmiş ve Saos-2 hücrelerinin canlılığında belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Caco-2 hücre hattında da aynı derişimlerde ABS uygulanmış ve 2 µL/mL derişimde azalma gözlenmeye başlanmış ve 10 µL/mL' de daha belirgin hale gelmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı ölüm gözlenmiştir.	(156)
B-CLL ve RAJI lösemi ve lenfoid tümör hücre hattı	ABS' nin deneysel antineoplastik aktiviteleri lösemi ve lenfoid neoplastik hücre hatlarında gösterilmiştir. 0.5, 1 ve 2 µg/mL derişimlerde çalışmalar yapılmıştır. Yüksek dozlarda (> 0.5 µg/mL) antineoplastik etkileri, düşük dozlarda (< 0.5 µg/mL) ise hücreler farklılaşmanın uyarıldığı için ipuçlarını vererek neoplastik kanamaların tedavisinde öncül gelişmeler sunmuştur.	(157)
K-562 and Jurkat lösemi hücre hattı	ABS' nin PAR1, EPCR ve p21' in ekspresyon analizleri, gerçek zamanlı (<i>real time</i>) PCR ile yapılmıştır. Apoptozis tespiti için <i>Annexin V</i> yöntemi kullanılmıştır. ABS, lösemi hücrelerinde apoptoz stimülasyonunda PAR1 ve p53 bağımsız p21 tutulumunu düzenleyerek apoptoza neden olduğu saptanmıştır.	(158)
İnsan dental pulpa fibroblastı hücre hattı	ABS' nin sitotoksitesi in-vitro insan pulpa fibroblastları üzerinde değerlendirilmiştir. MTT deneyi ile sitotoksik aktivitesinin derişime bağlı olduğu saptanmıştır.	(159)
-	ABS' nin hemostaz üzerindeki etki mekanizmasını anlamak için 2D jel elektroforez ve kütle spektrometre yöntemleri kullanılarak ilk proteomik analizleri yapılmıştır. ABS' nin içeriğinde pek çok bitkisel proteinler ve koagülasyon için oldukça önemli insan proteinleri benzerleri proteinler de tanımlanmıştır.	(144)
İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC), endotel hücreleri ve eritrosit membranı	Kandan eritrosit membranı izole edilmiş ve tripsin muamelesinden sonra SDS-PAGE ile proteinler gözlemlenmiştir. Transkripsiyon faktörlerinden AP2, AR, CRE/ATF1, CREB, E2F1-5, E2F6, EGR, GATA, HNF-1, ISRE, Myc-Max, NF-1, NFkB, p53, PPAR, SMAD 2/3, SP1, TRE/AP1, YY1'in aktivasyonlarında artış gözlenmiştir. Bu verilere göre ABS' nin kanamaları durdururken çok hızlı ve sağlam bir ağ oluşturduğu ve uygulandığı bölgedeki hücrelerin içinde de etkili olup transkripsiyon faktörleri seviyelerini de etkileyerek birçok biyolojik mekanizmalar üzerinde etkili olabileceği saptanmıştır.	(160)

Tablo 5.1. (Devam) ABS' nin kanser ile ilgili kaynak verileri.

Organizma/Hücre/ Doku/Patoloji	Etki Mekanizması/ Sonuç	Referans
Caco-2 hücre hattı	Bitkisel kaynaklı hemostatik ajan kullanılarak Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde ultra performanslı sıvı kromatografisi - kütle spektroskopisi bazlı proteomik çalışmalar yapılmıştır.	(161)

Bu tez çalışması kapsamında, incelenen Caco-2 ve HT-29 kolorektal ve HepG2 hepatosellüler karsinoma hücre hatlarının ABS ile muamelesi sonucunda 2D jel elektroforez tekniği ile proteinler ayrılıp MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilip her bir hücre hattına ait düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler tespit edilmiştir. Proteinler ayrılarak değerlendirildikten sonra elde edilen bulgular verilen kaynaklarda karşılaştırılarak ABS' nin antikanser aktivitesinin etki mekanizması moleküler düzeyde açıklanmaya çalışılmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı ABS' nin Caco-2, HT-29 ve HepG2 kanser hücreleri üzerindeki antineoplastik etkisinin araştırılmasıdır. Bu nedenle proteomik çalışmalar için ABS, Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerine 24 ve 72 saat uygulanmış, HepG2 karaciğer kanseri hücrelerine ise 24 saat uygulanmıştır. ABS ile muamele edilen hücreler (T grubu) ve muamele edilmeyen hücrelerden (C grubu) sitozolik fraksiyonlar elde edilmiştir. Sitozolik fraksiyonlardaki protein miktarları "Bio-Rad™ Protein Assay" yöntemi ile belirlenmiş (Bkz. Şekil 4.1.) ve protein miktarları Bkz. Tablo 4.1.' de verilmiştir. Kıyaslamalı proteomik çalışmalarda; IPG şeritlere yüklenecek protein miktarları C ve T grubunda aynı olmalıdır. Bu şeritlere proteinlerin yüklenebilmesi için proteinler çöktürülerek homojenizasyon tamponundan uzaklaştırılmış ve yükleme tamponunda tekrar çözülmüştür. Uygun pH aralığındaki IPG şeritlere yüklenen proteinler, IEF cihazında Tablo 3.8.' de verilen program ile pI değerlerine göre ayrılmış daha sonra kütlelerine göre SDS - PAGE jelde kütlelerine göre ayrılmıştır. C ve T grubundaki jellere yüklenen toplam protein miktarı aynı olmasına rağmen gruplardaki protein dağılımı ve intensiteleri farklıdır. Miktarı değişen proteinlerin saptanabilmesi için spotlar 2 farklı yöntemle boyanmıştır. Commassie mavis ve SYPRO - Ruby floresan boya ile boyanmış jeller karşılaştırıldığında, floresan boyama ile boyanmış jellerde gözlenen spot miktarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Görüntüleri alınan jellere ait haritalar, PDQuest™ yazılımı aracılığıyla analiz edilmiş, ABS' nin etkisiyle % 95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı ve miktarı en az 2 kat artan ya da azalan proteinler

tespit edilmiştir. Booln kümesinde (Statistic ve Quant kümelerinin kesişim kümesi olup; Statistics kümesinde grup içinde % 95 güven seviyesinde intensiteleri uyuşan, Quant kümesinde ise gruplar arasında en az 2 kat intensiteleri farklılaşan spotlardan oluşur.) saptanan spot görüntüleri tekrar incelendiğinde bazı spotların birbirlerine çok yakın oldukları gözlenmiştir. Bu spotların aynı protein ailesine ait olabileceği kaynaklarda yer almaktadır. Bu nedenle içlerinden en yüksek değişime sahip olanlar seçilerek analiz edilmiştir (Tablo 5.2.). Farklılaştığı saptanan proteinler jelden kesilip, tripsin ile parçalanmış ve MALDI-TOF/TOF-MS cihazı ve MASCOT programı ve De Novo peptid dizileme yöntemleri kullanılarak farklılaşan proteinler analiz edilmiştir. Farklılaşan proteinlerin 3 boyutlu yapıları, fonksiyonları, gen adları ve amino asit dizileri UniProt, SwissProt gibi veri tabanları ile bulunmuştur. Farklılaşan proteinlerin hangi yolaklarda görev yaptığı ve kanserle olan ilişkileri String, QuickGO ve KEGG veri tabanları kullanılarak açıklanmaya çalışılmıştır.

Tablo 5.2. Çalışılan hücrelerin 24 ve 72 saat ABS ile muamelesi sonucu tanımlanan kümelerdeki ve MALDI-TOF/TOF-MS analizi için belirlenen spot sayıları.

Hücre Hatları	Muamele Zamanı	Toplam Spot	Statistic	Quant	Booln	Analiz için Seçilen Spot Sayısı
Caco-2	24 Saat	165	35	22	19	11
	72 Saat	368	126	116	78	12
HT-29	24 Saat	277	111	47	40	14
	72 Saat	234	125	68	60	19
HepG2	24 Saat	224	97	70	60	13

Bkz. Tablo 5.1.' den de anlaşılacağı gibi ABS, kanserin sebep olduğu kanamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Melanom, osteosarkom, kolorektal, lösemi, lenfoid ve dental pulpa hücre hatlarında ABS' nin sitotoksik etkisi olup olmadığı in-vitro hücre kültürü çalışmaları ile incelenmiştir. İn-vitro hücre kültürü çalışmaları ile ABS' nin antiproliferatif ve sitotoksik etkisi kanıtlanmıştır. ABS' nin içinde yer alan bitkisel proteinleri ve insan proteinlerine benzer proteinleri saptamak amacıyla proteomik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar ABS' nin farklı kanser hücre hatları üzerinden çoğalmayı önleyici etkisi olduğu ile ilgili çalışmalar bulunsa da bu çalışmalar içerisinde kolon ve karaciğer kanserine karşı çoğalmayı önleyici etkisini moleküler düzeyde açıklayan bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, ABS' nin bilinen hemostatik ve antioksidan etkisinin dışında, kolon ve karaciğer kanserinde muhtemel antikanser aktivitesini moleküler düzeyde açıklamak için hangi proteinleri veya yolları etkilediğini bulmak amacıyla 2D jel elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS ile proteomik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, 3 farklı kanser hücre hattında (Caco-2, HT-29 ve HepG2), ABS' nin antikanser aktivitesini moleküler düzeyde proteomik çalışmalarla (2D jel elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS) ortaya koyan ilk çalışmadır. Çalışmada ABS tarafından, % 90 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı ve nicel olarak en az 2 kat değişen 69 tane protein analiz edilerek tanımlanmıştır (Bkz. Tablo 5.2.). Tanımlanan bu proteinlerin özellikle kanser hücresinde proteinlerin katlanmasında, kanser hücresinin iskeletini oluşturmada, kanser hücresinin metastazının gerçekleştirilmesinde önemli görevlere sahip olduğu belirlenmiştir (Bkz. Bölüm 5.2., 5.4., 5.6. ve 5.7.). Elde edilen bu veriler vücut dışı yaralanmalar, travmatik kesikler, diş operasyonları, spontan ya da cerrahi girişimler sonrası oluşan minör ve majör kanamaların durdurulmasında kullanılan, herhangi bir toksik etkisi bulunmayan milli bir ürün olan ABS' nin antineoplastik ajan olarak kanser tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir.

5.1. Caco-2 Kolon Kanseri Hücrelerinde ABS Etkisiyle Farklılaşan Proteinlerin Saptanması

Caco-2 kolon kanseri hücrelerine ait hücre kültürü çalışmaları 114S500 no' lu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. İn-vitro hücre kültürü çalışmalarında dışarıdan uygulanan ABS ile stress devreye girer. Bu nedenle ABS ile hücreler, ayrı ayrı 24 ve 72 saat muamele edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 24 saatlik proteomik çalışmalarda sadece stress proteinleri saptanmamıştır. Bu ABS' nin bilinen antioksidan etkisinin yanında çeşitli etkilere de sahip olduğunu göstermektedir. ABS, Caco-2 hücrelerine 24 ve 72 saat muamele edilerek sitozolik fraksiyonlar Bkz. Bölüm 3.2.' de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde, ABS ile muamele edilen hücreler T grubu, muamele edilmeyen hücreler C grubu olarak adlandırılmıştır. Proteinlerin 2D jel elektroforez yöntemi ile ayrımları yapılmıştır. Jel üzerinde ayrılan proteinlerin imaj çalışmaları süresince görüntülenebilmesi için öncelikle boyanması ve jellerin görselleştirilmesi gerekmektedir.

Proteinler iyi bir biçimde boyanmamışsa jel üzerinde gözlenebilen protein sayısı ve fotoğraflama koşulları iyi bir sonuç vermeyecektir. Proteinlerin boyanması sonucu jel üzerinde gözlenen spotun yoğunluğu protein miktarı ile doğru orantılıdır.

2D jel elektroforez ile kıyaslamalı (ekspresyon) proteomik çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için sitozolik fraksiyonlarda bulunan protein miktarı "Bio-Rad™ Protein Assay" yöntemi kullanılarak bulunmuş ve Bkz. Tablo 4.1.' de sunulmuştur. 24 ve 72 saatlik Caco-2 hücrelerinin sitozolik fraksiyonlarından elde edilen her bir C ve T grupları için 2D jel elektroforez çalışmaları 3' er tekrarlı olmak üzere çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sonrasında proteinler, her bir jele 1.5 mg/mL protein yüklemesi yapılabilmesi için - 20 °C' de bekletilmiş TCA ve DTT içeren aseton çözeltisi ile çöktürülmüş daha sonrasında çöktürülen proteinler yükleme tamponunda çözülerek IPG şeritlere yüklenmiştir. Ön çalışmalarda farklı pH aralığına sahip IPG şeritleri denenmiş, spot dağılımı ve ayırımın en yüksek olduğu şerit olarak pH 4 - 7 IPG şeritleri olduğu tespit edilmiş ve deneylere pH 4 - 7 IPG şeritlerle devam edilmiştir. IPG şeritlere yüklenen proteinler önce IEF cihazında Bkz. Tablo 3.8.' de verilen odaklama programıyla pI değerlerine göre birbirinden ayrılmıştır. IPG şeritler sırasıyla dengeleme tamponu 1 ve 2 ile muamele edilerek proteinlerin SDS ile kompleks oluşturması sağlanmıştır. Dengeleme tamponu 1' de DTT bulunmaktadır ve DTT, proteinlerin disülfid bağlarını koparmaktadır. Böylece proteinler SDS ile kolayca etkileşebilecektir. Dengeleme tamponu 2 ise IAA içerir ve IAA, açıkta kalan -SH gruplarını alkilleyerek SDS - PAGE' de bulunan akrilamit yapısı ile etkileşime girmesini önlemektedir. IPG şeritler daha sonra elektroforez hücrelerine yerleştirilerek proteinlerin kütlelerine göre ayrılmaları sağlanmıştır. SDS-PAGE' in analiz öncesi raf ömrü yaklaşık 1 yıl kadardır. Protein yüklenmiş jeller, + 4 °C' de saklama çözeltisinde (% 0.5 (h/h) oranında asetik asit içeren ultra saf su) en fazla 15 gün içinde analiz edilmiştir.

1. boyutta pI' larına, 2. boyutta kütlelerine göre ayrılan proteinlerin imaj analiz çalışmalarının yapılabilmesi için boyama işlemi Bkz. Bölüm 3.8.' de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik Caco-2 hücrelerine ait C ve T grupları Commassie mavisini ile boyanmış; 72 saatlik Caco-2 hücreleri ait C ve T grupları SYPRO - Ruby ile boyanmıştır. Bölüm 4.3.1.' de anlatıldığı gibi imaj analiz çalışmaları yapılmıştır. Bu iki boyama yöntemi karşılaştırıldığında ise Commassie mavisini ile boyama yönteminde 165 tane spot, SYPRO - Ruby ile boyama yönteminde ise 368 tane spot tespit edilmiştir. SYPRO - Ruby ile

boyama yönteminde daha fazla sayıda spot tespit edilmesi nedeniyle daha sonraki jellerin analizlerinde SYPRO - Ruby ile boyama yöntemi kullanılmıştır.

İmaj analiz programlarının çoğunda jel görüntüleri üzerinde toplam spot intensitesine bağlı olarak görüntünün kontrastını ayarlama durumu bulunmaktadır. Farklı 2 grup için farklı miktarlarda proteinin ayırımı, karşılaştırma yapılabilmesi açısından doğru bir yaklaşım değildir. Yüksek miktarda proteinin izoelektrik odaklamasında çıkan en büyük problem odaklamanın tam olarak gerçekleşmemesi ve bunun sonucunda oluşan yatay çizgilerdir.

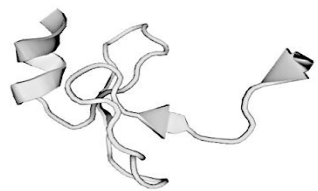
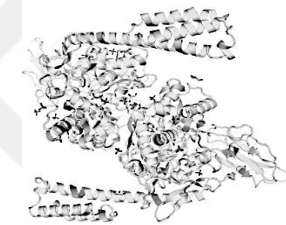

İmaj analizlerinin ilk basamağını görüntüleme çalışmaları oluşturmaktadır. Bu nedenle görüntüleme cihazı aracılığıyla jel haritaları çıkartılmıştır (Bkz. Şekil 4.2. ve Şekil 4.16.). Jel haritalarında 24 saatlik Caco-2 hücrelerine ait 165 tane spot, 72 saatlik Caco-2 hücrelerine ait ise 368 tane spot saptanmıştır. Gözle takip edilerek yapılan çalışmalarda hatalar meydana gelebileceği için farklılaşan spotların tespitinde PDQuest™ programı kullanılmıştır. Ancak programın otomatik olarak saptama yapması, spot olmayan lekeleri de spot olarak verebilme ihtimali nedeniyle programın bulduğu her bir spot tek tek incelenmiş, tespit edilen hatalar düzeltilmiştir. Daha sonra, Bkz. Bölüm 3.9.' da anlatıldığı gibi PDQuest™ programı tarafından 3 tane küme tanımlanmıştır (Statistic, Quant ve Booln). Statistic, Quant ve Booln kümelerinde 24 saatlik Caco-2 hücrelerinde sırasıyla 35, 22 ve 19 tane spot bulunurken, 72 saatlik Caco-2 hücrelerinde sırasıyla 126, 116 ve 78 tane spot bulunmuştur (Bkz. Bölüm 4.3.1.). 24 saatlik Caco-2 hücrelerine ait Booln kümesinde bulunan 19 spottan 11 tanesi MALDI TOF/TOF-MS analizi için seçilmiş (Bkz. Şekil 4.3. ve 4.4.) ve kesilerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. ABS' nin etkisiyle azalan proteinlerin (5 tane) jel üzerindeki yakın görüntüsü Şekil 4.5. - 4.9. ve ABS' nin etkisiyle artan proteinlerin (6 tane) jel üzerindeki yakın görüntüsü Şekil 4.10. - 4.15.' de verilmiştir. 72 saatlik Caco-2 hücrelerine ait Booln kümesinde bulunan 78 spottan 12 tanesi MALDI-TOF/TOF-MS analizi için seçilmiş (Bkz. Şekil 4.17. ve 4.18.) ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı'nda kesilerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. ABS' nin etkisiyle azalan proteinlerin (5 tane) jel üzerindeki yakın görüntüsü Şekil 4.19. - 4.23. ve ABS' nin etkisiyle artan proteinlerin (7 tane) jel üzerindeki yakın görüntüsü Şekil 4.24. - 4.30.' da verilmiştir.

Caco-2 hücrelerinin için 24 ve 72 saatlik C ve T grupları karşılaştırılarak % 95 güven seviyesinde en az 2 kat farklılaşan sırasıyla 11 ve 12 tane spot Kocaeli Üniversitesi Proteomik Laboratuvarı'nda jelden kesilmiş, tripsin ile peptidlerine parçalanarak jelden ekstre edilmiş, ekstre edilen proteinler MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilmiştir ve veri bankaları kullanılarak tanımlanmıştır. PMF için MASCOT programı ve De Novo peptid dizileme (Bkz. Bölüm 4.6.) yöntemleri kullanılmıştır. Caco-2 kolon kanseri hücrelerine ABS' nin muamelesi sonucunda, nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler tanımlanmış ve değişim oranları Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.'de verilmiştir.

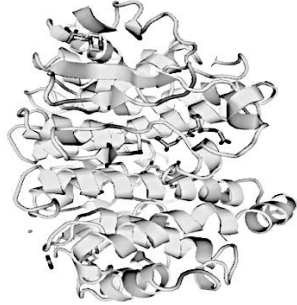

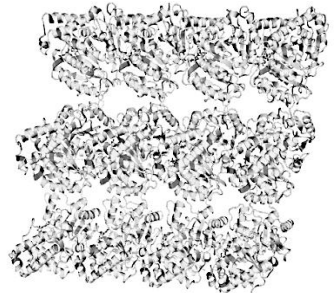
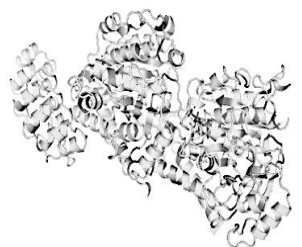
5.2. Caco-2 Kolon Kanseri Hücrelerinde Farklılaşan Proteinlerin Yapıları, Fonksiyonları ve Protein - Protein Etkileşmeleri

Caco-2 kolon kanseri hücre hattının 24 ve 72 saat ABS ile muamelesi sonucunda miktarı azalan veya artan proteinlerin yapısı, gen adı ve fonksiyonu; UniProt, SwissProt programı aracılığıyla saptanmıştır (Tablo 5.3. ve Tablo 5.4.).

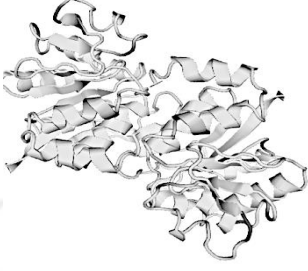
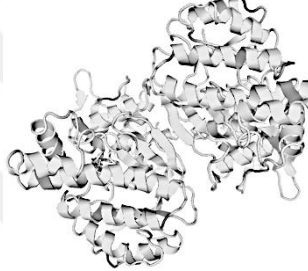
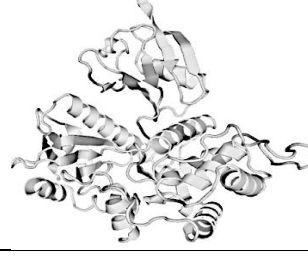
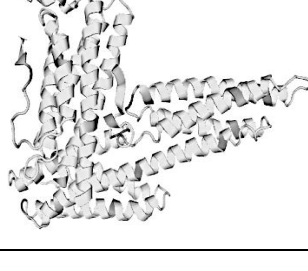
Tablo 5.3. Caco-2 kolon kanseri hücrelerine 24 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

24 Saat ABS ile Muamele (Caco-2)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile azalan			
Çinko parmak protein MYM-tip 4	ZMYM4	Hücre morfolojisi ve sitoskeletal organizasyonunun düzenlenmesinde rol oynar.	
Glukoz regüle protein-78	HSPA5	Endoplazmik retikulum lümeninde protein katlanması ve kontrolünde anahtar rol oynayan endoplazmik retikulum şaperonudur.	
60 kDa ısı şok proteini	HSPD1	Şaperonin mitokondriyal protein taşınması ve makromoleküler yapımında rol oynar. HSP10 ile birlikte, proteinlerin doğru katlanmasını kolaylaştırır. Aynı zamanda yanlış katlanmayı da önleyebilir ve mitokondriyal matriste stres koşulları altında üretilen katlanmamış polipeptidlerin yeniden katlanmasını ve uygun şekilde düzenlenmesini destekleyebilir.	

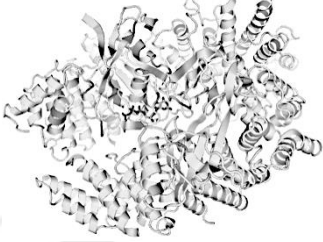
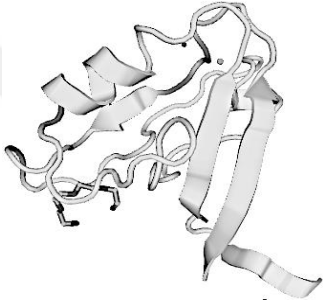
Tablo 5.3. (Devam) Caco-2 kolon kanseri hücrelerine 24 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

24 Saat ABS ile Muamele (Caco-2)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile azalan			
Glutasyon S-transferaz P	GSTP1	Glutasyonun konjugasyon miktarını azaltarak çok sayıda ekzojen ve endojen hidrofobik elektrofiller sağlar. Nörodejenerasyonun önlenmesi için p25/p35 translokasyonu yoluyla negatif CDK5 aktivitesini düzenler.	
Differentially expressed in FDCP 6 homolog	DEF6	Rho GTPaz RAC1, RhoA ve CDC42'nin aktivasyonunda rol oynayan fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat-bağımlı guanin nükleotid değişim faktörüdür (GEF). Aktive RAC1 ile hücre morfolojisini düzenleyebilir. Th2 (T yardımcı hücreler) aktivasyonunda rol oynar.	
ABS' nin etkisi ile artan			
Tubulin beta zinciri	TUBB	Tubulin mikrotübüllerin ana bileşenidir. Biri beta zincirindeki değiştirilebilir bir bölgede ve biri alfa zincirinde değiştirilemeyen bir bölgede olmak üzere iki mol GTP'yi bağlar.	
Tubulin alfa-1B zinciri	TUBA1B	Tubulin mikrotübüllerin ana bileşenidir. Biri beta zincirindeki değiştirilebilir bir bölgede ve biri alfa zincirinde değiştirilemeyen bir bölgede olmak üzere iki mol GTP'yi bağlar.	


Tablo 5.3. (Devam) Caco-2 kolon kanseri hücrelerine 24 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

24 Saat ABS ile Muamele (Caco-2)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile artan			
Protein DJ-1	PARK7	Serbest nükleotid havuzunda (GTP, GDP, GMP, dGTP) ve DNA ve RNA'da glisinlenmiş guanini tamir edebilen bir nükleotid deglizaz olarak işlev görür.	
Galaktokinaz	GALK1	Galaktoz metabolizması için önemli bir enzimdir.	
Ezrin	EZR	Muhtemelen büyük sitoskeletal yapıların plazma membranına bağlanmasıyla ilişkilidir. Epitel hücrelerinde, apikal kutupta mikrovillus ve membran ruffles oluşumu için gereklidir.	
Vinculin	VCL	Aktin filamanı bağlayıcı protein hücre-matriks ve hücre-hücre adezyonunda rol oynar. Hücre yüzeyindeki E-cadherin ekspresyonunu düzenler. Ayrıca hücre morfolojisi ve hareketliliğinde önemli rol oynar.	

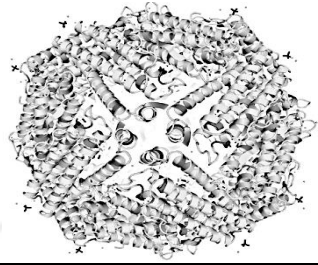



Tablo 5.4. Caco-2 kolon kanseri hücrelerine 72 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

72 Saat ABS ile Muamele (Caco-2)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile azalan			
Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 5A-1	EIF5A	Tranlasyon uzamasına katılan mRNA bağlayıcı proteindir. TNF-alfa aracılı apoptozu düzenler. Poliaminlerin nöronal süreçteki etkilerini araştırır. Beyin gelişimi ve işlevinde ve iskelet kası kök hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynayabilir.	
Tubulin alfa-1A zinciri	TUBA1A	Bkz. Tablo 5.3.	
PDZ ve LIM domain protein 1	PDLIM1	Hücre iskeletine diğer proteinleri getiren bir adaptör olarak davranan sitoskeletal proteindir. Fibroblastlarla gerilim liflerinin bir araya getirilme mekanizmasında yer alır. ACTN1 ve PALLD'nin stres liflerine lokalizasyonu için gereklidir. Hücre migrasyonu ve fibroblastların hücre polaritesini muhafaza etmek için gereklidir.	

Tablo 5.4. (Devam) Caco-2 kolon kanseri hücrelerine 72 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

72 Saat ABS ile Muamele (Caco-2)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile azalan			
Yüksek hareketlilik grubu protein B1	HMGB1	<p>Farklı hücrel bölmelerde, çeşitli rollere sahip çok fonksiyonlu redoks duyarlı proteindir. Çekirdeğinde önemli kromatin ilişkili histonik proteinler biridir ve replikasyon, transkripsiyon, kromatin yeniden biçimlenmesi, V (D) J rekombinasyonu, DNA onarımı ve genom stabilitesi ile ilgili bir DNA şaperonu olarak görev yapar. Nükleik asitler için evrensel bir biyosensör olması önerilir. Steril ve enfeksiyöz sinyallere konakçı inflamatuvar cevabı teşvik eder ve doğuştan gelen ve immün yanıtların koordinasyonuna ve entegrasyonuna katılır. Sitoplazmada TLR9 aracılı immün yanıtların aktivasyonunu gösteren immünojenik nükleik asitler için sensör ve / veya şaperon olarak işlev görür ve otofajiye aracılık eder. Doku hasarı sırasında bağışıklık yanıtlarını güçlendiren DAMP molekülü olarak davranır. Fosfatidilserine ve fosfatidiletanolamide bağlanır. RAGE'ye bağlı nöronal büyüme için sinyalizasyona aracılık eder. Huntingtin veya TBP gibi genişletilmiş poliglutamin proteinlerinin birikmesinde rol oynayabilir.</p>	

Tablo 5.4. (Devam) Caco-2 kolon kanseri hücrelerine 72 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

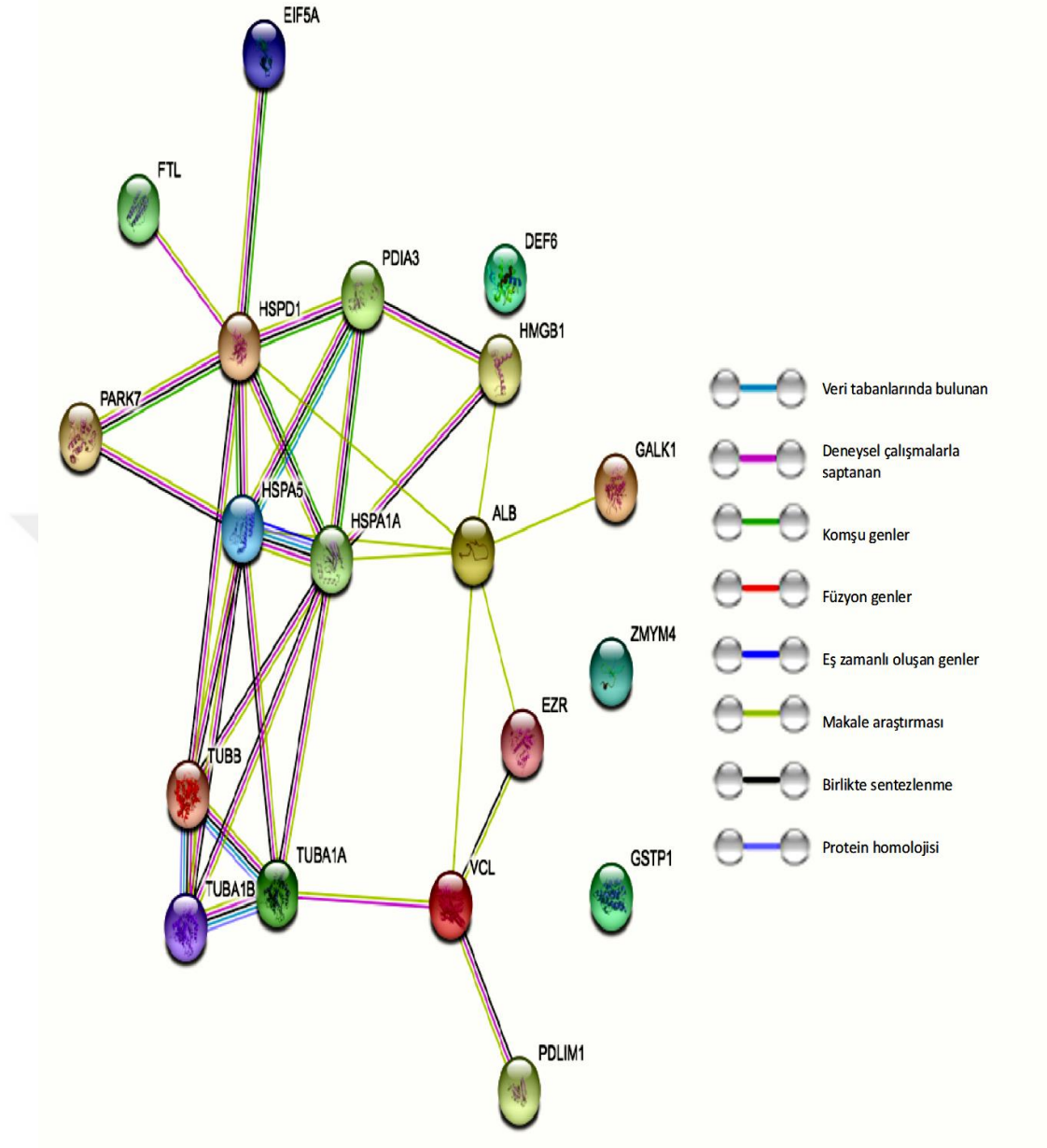
72 Saat ABS ile Muamele (Caco-2)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile artan			
Ferritin hafif zinciri	FTL	Çözünür, toksik olmayan, kolayca elde edilebilen bir formda demir depolar. Demir homeostazı için önemlidir. Gelişmekte olan böbreğin kapsül hücrelerinde demir alımına aracılık eder.	
Protein disülfid-izomeraz A3	PDIA3	Proteinlerde -S-S- bağlarının yeniden düzenlenmesini katalize eder.	
70 kDa ısı şok proteini 1A/1B	HSPA1A	Bir nükleotid ile seçici ve nonkovalent bir şekilde etkileşime girerek, nükleotid bağlayan bileşiktir. ATP, adenosin 5'-trifosfat, evrensel olarak önemli bir koenzim ve enzim düzenleyici ile seçici ve kovalent olmayan bir şekilde etkileşime girmektedir.	
Serum albumin	ALB	Plazma ana proteini olan serum albumin, su, Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , yağ asitleri, hormonlar, bilirubin ve ilaçlar için iyi bir bağlanma kapasitesine sahiptir. Ana işlevi koloidal ozmotik kan basıncının düzenlenmesidir. Plazmada başlıca çinko taşıyıcı olarak görev yapar ve toplam plazmadaki çinkonun yaklaşık % 80' ini bağlar.	

Farklılaşan her bir protein UniProt programı aracılığıyla incelenmiş ve önemli fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Hücre içi ya da hücreler arasında bulunan bir proteinin tek bir fonksiyonu olmadığı gibi diğer proteinlerle birlikte çeşitli yollarda da görev almaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, ABS' nin Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde etkili olan

proteinler saptanmış, bu proteinlerin fonksiyonları verilmiş ve aynı zamanda bir bütün halinde de ele alınarak hangi biyolojik yolları etkilediği bulunmuştur. Farklılaşan proteinlerin gen adları kullanılarak String programı yardımıyla protein - protein etkileşim ağ haritası oluşturulmuştur (Şekil 5.1.). String programı aracılığıyla saptanan biyolojik süreçler ve moleküler fonksiyonlar (162) GO numaraları aracılığıyla QuickGO ve KEGG veri tabanlarında araştırılmıştır.

String programı aracılığıyla ABS' nin etkisiyle Caco-2 hücrelerinde değişen proteinlerin atlası Şekil 5.1.' de verilmiştir. Protein atlası incelendiğinde EIF5A, HSPD1, PDIA3, HSPA5 ve HSPA1A ile ifade edilen genler komşu genlerdir. String programında gen ismi ile ifade edilen proteinler arasındaki ilişkiler farklı renklerde verilerek ortaya konmaya çalışılmıştır. Gözlemlenen protein atlası ile birlikte ABS'nin ara bağlantılar, endoplazmik retikulumda protein işleme yolağı ve fagositoz yolağıyla hücre içerisinde gerçekleşen biyosüreçleri etkilediği gözlemlenmiştir.





Şekil 5.1. Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde ABS' nin etkisiyle farklılaşan proteinlerin birbirleriyle etkileşimi.

Biyolojik süreçlerde HSPD1, HSPA5, PDIA3, TUBA1A ve TUBA1B, GO: 0006457 numaralı yolak olan protein katlanmasında görev alır. Protein katlanması, tek zincirli polipeptidlerin veya komplekslerinin kovalent ve nonkovalent bağlarla üçüncül yapıya dönüşme sürecidir (163).

Biyolojik süreçlerde ALB, EZR, HSPA5 ve PDIA3, GO: 0051651 numaralı yolak olan hücre konumunun düzenlenmesi görev alır. Hücre konumunun düzenlenmesi, bir maddenin

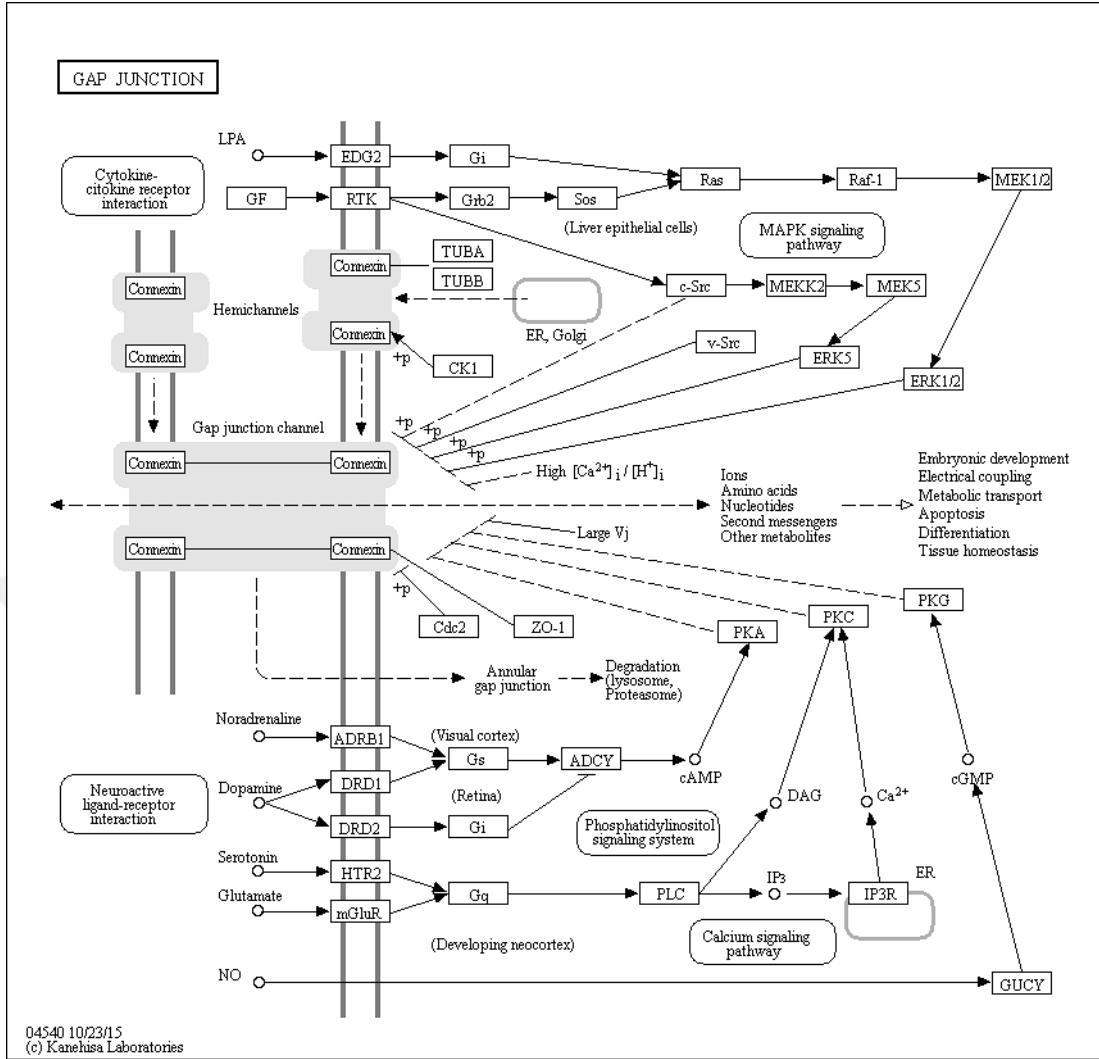
veya hücrel varlığın, bir hücrenin içinde veya zarının belirli bir yerinde tutulduğu ve başka bir yere taşınmasının engellendiği herhangi bir işlemdir (163).

Biyolojik süreçlerde HSPD1, TUBA1A ve TUBA1B, GO: 0051084 numaralı yolak olan De Novo posttranslasyonel protein katlanmasında görev alır. De Novo posttranslasyonel protein katlanması, yeni oluşan polipeptidlerin veya polipeptidlerin katlanma ara maddelerinin doğru kovalent olmayan katlanmasına yardımcı olma sürecidir. Ayrıca bu süreç birkaç ATP hidrolizi döngüsünü içerebilir (163).

Biyolojik süreçlerde HSPA5 ve PDIA3, GO: 0034975 numaralı yolak olan endoplazmik retikulumda protein katlanmasında görev alır. Endoplazmik retikulumda protein katlanması endoplazmik retikulumda yer alan bir protein katlama işlemidir. Plazma zarı ve organel proteinler endoplazmik retikulumda katlanır (163).

Biyolojik süreçlerde ALB, EIF5A, FTL, HSPA5, TUBA1A, TUBA1B, PDIA3 ve EZR, GO: 0051641 numaralı yolak olan hücrel lokalizasyon görev alır. Bir protein kompleksi, organel gibi bir madde veya hücrel bileşenin, hücre membranı da dahil olmak üzere hücre içinde belirli bir yere nakledildiği bir hücrel lokalizasyon işlemidir (163).

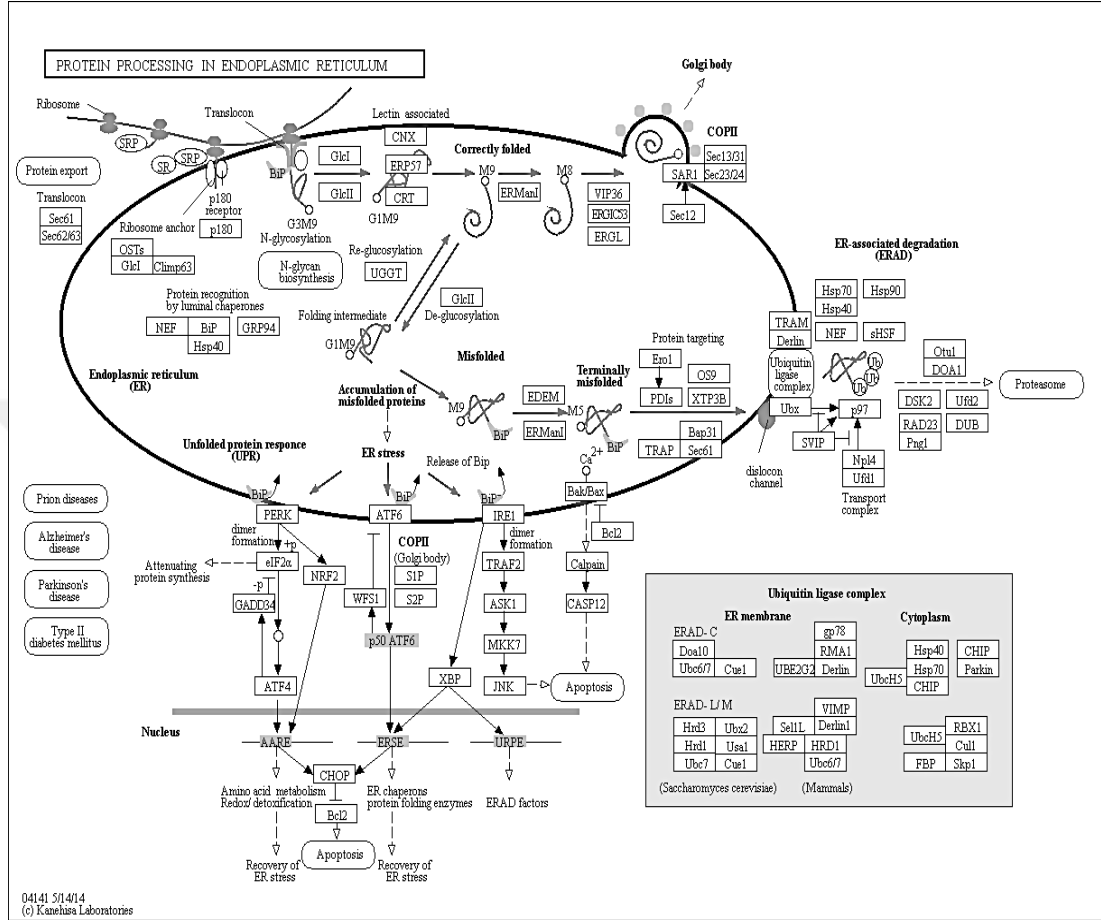
KEGG yolak analizi veri tabanı aracılığıyla fagositoz yolağındaki (Şekil 5.2.) TUBB, TUBB1A ve TUBB1B' nin, ABS' nin etkisiyle farklılaştığı bulunmuştur. Fagositoz, hücre tarafından büyük partiküllerin hücre içine alınma işlemidir ve dokunun yeniden şekillenmesinde, inflamasyonda ve enfeksiyöz ajanlara karşı savunmada merkezi bir mekanizmadır. Fagosit yüzeyindeki spesifik reseptörler partikül yüzeyindeki ligandları tanıdığında bir fagozom oluşur. Daha sonra fagozomlar giderek sindirimsel özellikler kazanır. Fagozomların ve lizozomların füzyonu, çoğu endojen veya endojen olmayan yapıları parçalara ayıran ürünler salgılar (164).



Şekil 5.3. Ara bağlantılardan geçiş yolağı (164).

KEGG yolak analizi veri tabanı aracılığıyla endoplazmik retikulumda protein işleme yolağındaki (Şekil 5.4.) HSPA1A, HSPA5 ve PDIA3' ün ABS' nin etkisiyle farklılaştığı bulunmuştur. Endoplazmik retikulum bir hücre organelidir. Yeni sentezlenen peptidler, endoplazmik retikulum içine girer ve glikozillenir. Doğru şekilde katlanmış proteinler, veziküllere aktarılıp golgi aygıtına aktarılır. Yanlış katlanmış proteinler, moleküler şaperonlarla kompleks halinde endoplazmik retikulumda lümen içinde tutulur. Yanlış katlanmış olan proteinler, endoplazmik retikulumla ilişkili bozulma (ERAD) adı verilen bir işlemde proteazom aracılığıyla bozulur. Endoplazmik retikulumda yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi endoplazmik retikulum stresine neden olur ve katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan bir sinyal yolunu aktive eder. Bununla birlikte, bazı ciddi

durumlarda, UPR tarafından aktive edilen koruyucu mekanizmalar, normal endoplazmik retikulum fonksiyonunu ve apoptotik hücreleri geri getirmek için yeterli değildir (164).



Şekil 5.4. Endoplazmik retikulumda protein işleme yolağı (164).

5.3. HT-29 Kolon Kanseri Hücrelerinde ABS Etkisiyle Farklılaşan Proteinlerin Saptanması

HT-29 kolon kanseri hücrelerine ait hücre kültürü çalışmaları 114S500 no' lu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. ABS, HT-29 hücrelerine 24 ve 72 saat muamele edilerek sitozolik fraksiyonlar Bkz. Bölüm 3.2.' de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, ABS ile muamele edilen hücreler T grubu, muamele edilmeyen hücreler C grubu olarak adlandırılmıştır.

2D jel elektroforez ile kıyaslamalı proteomik çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi için sitozolik fraksiyonlarda bulunan protein miktarı "Bio-Rad™ Protein Assay" yöntemi

kullanılarak bulunmuş ve Bkz. Tablo 4.1.' de sunulmuştur. 24 ve 72 saatlik HT-29 hücrelerinin sitozolik fraksiyonlarından elde edilen her bir C ve T grupları için 2D jel elektroforez çalışmaları 3' er tekrarlı olmak üzere çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sonrasında proteinler, her bir jelle 1.5 mg/mL protein yüklemesi yapılabilmesi için - 20 °C' de bekletilmiş TCA ve DTT içeren aseton çözeltisi ile çöktürülmüş daha sonrasında çöktürülen proteinler yükleme tamponunda çözülerek IPG şeritlere yüklenmiştir. Ön çalışmalarda farklı pH aralığına sahip IPG şeritleri denenmiş, spot dağılımı ve ayırımın en yüksek olduğu şerit olarak pH 4 - 7 IPG şeritleri olduğu tespit edilmiş ve deneylere pH 4 - 7 IPG şeritlerle devam edilmiştir. IPG şeritlere yüklenen proteinler önce IEF cihazında Bkz. Tablo 3.8.' de verilen odaklama programıyla pI değerlerine göre birbirinden ayrılmıştır. IPG şeritler sırasıyla dengeleme tamponu 1 ve 2 ile muamele edilerek proteinlerin SDS ile kompleks oluşturması sağlanmıştır. Daha sonra elektroforez hücrelerine IPG şeritler yerleştirilerek proteinlerin kütlelerine göre ayrılmaları sağlanmıştır.

1. boyutta pI' larına, 2. boyutta kütlelerine göre ayrılan proteinlerin imaj analiz çalışmalarının yapılabilmesi için boyama işlemi Bkz. Bölüm 3.8.2.' de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. 24 ve 72 saatlik HT-29 hücrelerine ait C ve T grupları SYPRO - Ruby ile boyanmıştır.

İmaj analizlerinin ilk basamağını görüntüleme çalışmaları oluşturmaktadır. Bu nedenle görüntüleme cihazı aracılığıyla jel haritaları çıkartılmıştır (Bkz. Şekil 4.31. ve Şekil 4.48.). 24 saatlik HT-29 hücrelerinin jel haritalarında 277 tane, 72 saatlik HT-29 hücrelerinin jel haritalarında 234 tane spot saptanmıştır. PDQuest™ programı tarafından tanımlanan Statistic, Quant ve Booln kümelerinde 24 saatlik HT-29 hücrelerinde sırasıyla 111, 47 ve 40 tane spot bulunurken, 72 saatlik HT-29 hücrelerinde sırasıyla 125, 68 ve 60 tane spot bulunmuştur (Bkz. Bölüm 4.4.1.). 24 saatlik HT-29 hücrelerine ait Booln kümesinde bulunan 40 spottan 14 tanesi MALDI-TOF/TOF-MS analizi için seçilmiş (Bkz. Şekil 4.32. ve 4.33.) ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı' nda kesilerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. ABS' nin etkisiyle azalan proteinlerin (2 tane) jel üzerindeki yakın görüntüsü Şekil 4.34. - 4.35. ve ABS' nin etkisiyle artan proteinlerin (12 tane) jel üzerindeki yakın görüntüsü Şekil 4.36. - 4.47.' de verilmiştir. 72 saatlik HT-29 hücrelerine ait Booln kümesinde bulunan 60 spottan 19 tanesi MALDI-TOF/TOF-MS analizi için seçilmiş

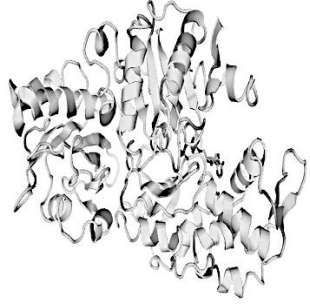
(Bkz. Şekil 4.49. ve 4.50.) ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı'nda kesilerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. ABS' nin etkisiyle azalan proteinlerin (3 tane) jel üzerindeki yakın görüntüsü Şekil 4.51. - 4.53. ve ABS' nin etkisiyle artan proteinlerin (16 tane) jel üzerindeki yakın görüntüsü Şekil 4.54. - 4.69.'da verilmiştir.

HT-29 hücrelerinin için 24 ve 72 saatlik C ve T grupları karşılaştırılarak % 95 güven seviyesinde en az 2 kat farklılaşan sırasıyla 14 ve 19 tane spot Kocaeli Üniversitesi Proteomik Laboratuvarında jelden kesilmiş, tripsin ile peptidlerine parçalanarak jelden ekstre edilmiş, ekstre edilen proteinler MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilmiştir ve veri bankaları kullanılarak tanımlanmıştır. PMF için MASCOT programı ve De Novo peptid dizileme (Bkz. Bölüm 4.6.) yöntemleri kullanılmıştır. HT-29 kolon kanseri hücrelerine ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler tanımlanmış ve değişim oranları Tablo 4.4. ve Tablo 4.5.'de verilmiştir.

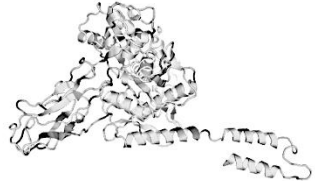

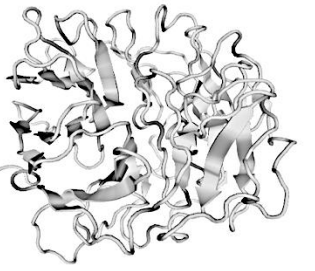

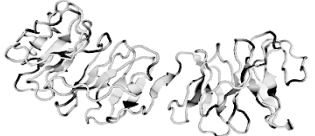
5.4. HT-29 Kolon Kanseri Hücrelerinde Farklılaşan Proteinlerin Yapıları, Fonksiyonları ve Protein - Protein Etkileşmeleri

HT-29 kolon kanseri hücre hattının 24 ve 72 saat ABS ile muamelesi sonucunda miktarı azalan veya artan proteinlerin yapısı, gen adı ve fonksiyonu; UniProt ve SwissProt programı aracılığıyla saptanmıştır (Tablo 5.5. ve Tablo 5.6.).

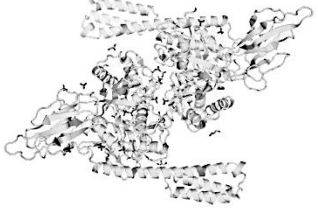
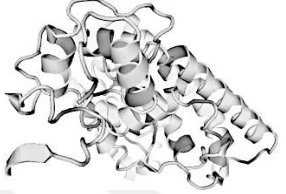

Tablo 5.5. HT-29 kolon kanseri hücrelerine 24 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

24 Saat ABS ile Muamele (HT-29)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile azalan			
Sitoplazmik Aktin 1	ACTB	Aktinler, çeşitli hücre hareketliliğine katılan ve tüm ökaryotik hücrelerde bulunan proteinlerdir.	
Tubulin beta zinciri	TUBB	Bkz. Tablo 5.3.	
ABS' nin etkisi ile artan			
Yüksek hareketlilik grubu protein B1	HMGB1	Bkz. Tablo 5.4.	
Ezrin	EZR	Bkz. Tablo 5.3.	

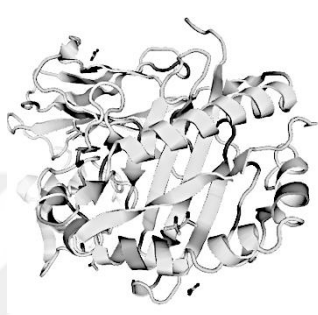
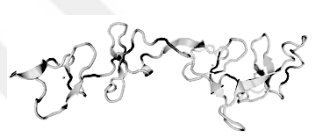

Tablo 5.5. (Devam) HT-29 kolon kanseri hücrelerine 24 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

24 Saat ABS ile Muamele (HT-29)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile artan			
70 kDa ısı şok proteini 4L	HSPA4L	Sitrat sentezini inhibe ettiği in-vitro şaperon aktivitesine sahiptir.	
Keratin, tip II sitoskeletal 1	KRT1	Saç oluşumunda merkezi bir rol oynar. Saç folikülünün iç kök kılıfında (IRS) keratin ara filamentlerinin temel bileşenidir.	
Koronin-1B	CORO1B	Fibroblastların yapısal dinamiklerini ve hücre hareketliliğini düzenler. Sitokinaz ve sinyal iletiminde de etkili olduğu düşünülür.	
Src substratı kortaktin	CTTN	Aktin ve hücre şeklinin organizasyonuna katkıda bulunur. Lamellipodia oluşumunda ve hücre göçünde rol oynar. Nöron morfolojisi, akson büyümesi ve nöronal büyümede rol oynar.	
Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 5A-1	EIF5A	Bkz. Tablo 5.4.	
Serin-treonin reseptör kinaz	STRAP	SMN kompleksi, küçük nükleer ribonükleoproteinlerin (snRNP'ler), spliceosome'un yapı taşlarının yapımında katalizör rolü oynar. Bu nedenle, hücresel pre-mRNA' ların birleştirilmesinde önemli bir rol oynar.	

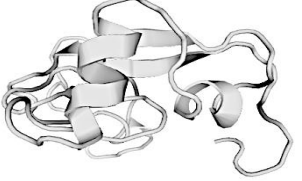
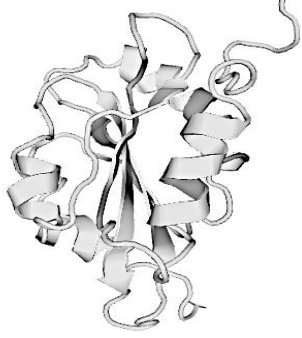
Tablo 5.5. (Devam) HT-29 kolon kanseri hücrelerine 24 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

24 Saat ABS ile Muamele (HT-29)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile artan			
Glukoz regüle protein-78	HSPA5	Endoplazmik retikulum lümeninde protein katlanması ve kalite kontrolünde anahtar rol oynayan endoplazmik retikulum şaperonudur. Proteinlerin doğru katlanması ve yanlış katlanmış proteinlerin DNAJC10 / ERDJ5 ile etkileşimi yoluyla bozunması, muhtemelen DNAJC10 / ERDJ5'in substrattan salınmasını kolaylaştırır.	
Uzama faktörü beta-1	EEF1B2	EF-1-beta ve EF-1-delta, EF-1-alpha GTP'ye bağlı GSYIH dönüşümünü etkiler.	
Kalretikulin	CALR	Kalsiyum bağlama kapasitesine sahiptir. Spermatogenez sırasında şaperon görevi görür.	

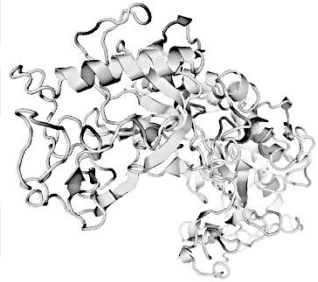
Tablo 5.6. HT-29 kolon kanseri hücrelerine 72 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

72 Saat ABS ile Muamele (HT-29)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile azalan			
Alfa-enolaz	ENO1	MBP1 MYC promotörüne bağlanır ve transkripsiyon baskılayıcı olarak davranır. Bir tümör baskılayıcı olabilir. Glikolizdeki büyüme kontrolü, hipoksi toleransı ve alerjik yanıtlar gibi çeşitli süreçlerde rol oynayan çok fonksiyonlu enzimdir. Aynı zamanda, lökositler ve nöronlar gibi çeşitli hücre tiplerinin hücre yüzeyinde bir reseptör ve plazminojen aktivatörüdür. İnvasküler ve periküler hücre fibrinolitik sisteminde işlev görür. İmmüoglobulin üretimini uyarır.	
Zyxin	ZYX	Adezyon plak proteinidir. Alfa-aktinin ve CRP proteinini bağlar. Gen ifadesinde adezyon uyarımlı değişikliklere aracılık eden bir sinyal iletim yolunun bir bileşeni olabilir.	
ABS' nin etkisi ile artan			
Uzama faktörü beta-1	EEF1B2	Bkz. Tablo 5.5.	
Kalretikulin	CALR	Bkz. Tablo 5.5.	
Keratin, tip I sitoskeletal 10	KRT10	Cilt üzerinde epidermal bariyerin kurulmasında rol oynar.	

Tablo 5.6. (Devam) HT-29 kolon kanseri hücrelerine 72 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

72 Saat ABS ile Muamele (HT-29)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile artan			
NSFL1 kofaktör p47	NSFL1C	VCP'nin ATPase aktivitesini azaltır. Mitoz sırasında olgi yığınlarının parçalanması ve mitoz sonrası Golgi yığınlarının VCP aracılı olarak yeniden birleştirilmesi için gereklidir.	
Drebrin benzer protein	DBNL	F-aktini ve DNM1'i bağlayan reseptör aracılı endositozda rol oynayan bağlayıcı proteindir. Aktin sitoskeletonunun yeniden düzenlenmesi, nöron morfojeninde ve sinaps oluşumunda rol oynar. Lökositlerde antijen reseptörü sinyal yollarında rol alır. T hücre aktivasyonunu düzenleyen immünolojik bir anahtardır.	
Glukoz regüle protein-78	HSPA5	Bkz. Tablo 5.5.	

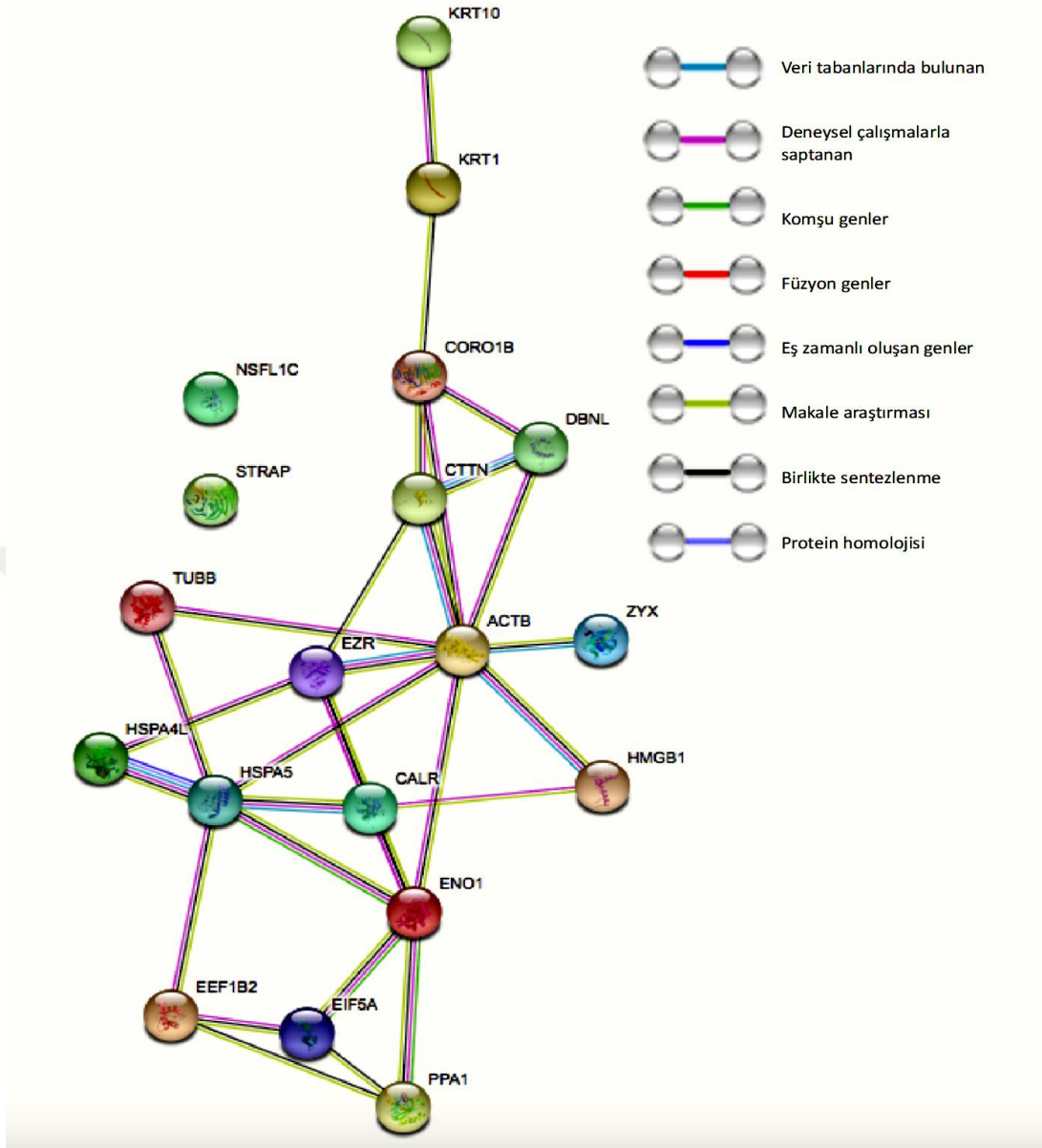
Tablo 5.6. (Devam) HT-29 kolon kanseri hücrelerine 72 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

72 Saat ABS ile Muamele (HT-29)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile artan			
Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 5A-1	EIF5A	Bkz. Tablo 5.4.	
Src substratı kortaktin	CTTN	Bkz. Tablo 5.5.	
İnorganik pirofosfataz	PPA1	Kofaktör olarak görev yapar.	
Keratin, tip II sitoskeletal 1	KRT1	Bkz. Tablo 5.5.	
70 kDa ısı şok proteini 4L	HSPA4L	Bkz. Tablo 5.4.	

Farklılaşan her bir protein UniProt programı aracılığıyla incelenmiş ve önemli fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, ABS' nin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde etkili olan proteinler saptanmış, bu proteinlerin fonksiyonları verilmiş ve aynı zamanda bir bütün halde ele alınarak hangi biyolojik yolları etkilediği bulunmuştur. Farklılaşan proteinlerin gen adları kullanılarak String programı yardımıyla protein - protein etkileşim ağ haritası oluşturulmuştur (Şekil 5.5.). String programı aracılığıyla saptanan biyolojik süreçler ve moleküler fonksiyonlar (162) GO numaraları aracılığıyla QuickGO ve KEGG veri tabanlarında araştırılmıştır.

String programı aracılığıyla ABS' nin etkisiyle HT-29 hücrelerinde değişen proteinlerin atlası Şekil 5.5.' de verilmiştir. Protein atlası incelendiğinde HSPA5, ENO1, EIF5A ve PPA1 ile ifade edilen genlerin komşu genlerdir; PPA1, EIF5A, EEF1B2, ENO1, CALR, HMGB1, HSPA5, HSPA4L, TUBB, EZR, ACTB, ZYX, CTTN, DBNL, CORO1B, KRT1 ve KRT10' un kaynaklarda ilişkisi açıklanmış olup ve birlikte sentezlenmekte olduğu verilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarla gözlemlenen protein atlası ile birlikte ABS' nin endoplazmik retikulumda protein işleme yolağı ve fagositoz yolağıyla hücre içerisinde gerçekleşen biyosüreçleri etkilediği gözlemlenmiştir.





Şekil 5.5. HT-29 kolon kanseri hücrelerinde ABS' nin etkisiyle farklılaşan proteinlerin birbirleriyle etkileşimi.

Biyolojik süreçlerde ACTB, CALR, HSPA4L ve HSPA5, GO: 0006457 numaralı yolak olan protein katlanmasında görev alır. Protein katlanması, tek zincirli polipeptidlerin veya komplekslerinin kovalent ve nonkovalent bağlarla üçüncül yapıya dönüşme sürecidir (163).

Biyolojik süreçlerde CALR, CTTN, EZR ve DBNL, GO: 0006898 numaralı yolak olan reseptör aracılı endositozda görev alır. Reseptör aracılı endositoz, hücre yüzey reseptörlerinin transportun sağladığı bir endositoz sürecidir. Hücre yüzeyindeki spesifik bir reseptör, tanıdığı hücre dışı makromoleküle (ligand) sıkı bir şekilde bağlanır; reseptör-ligand

kompleksini içeren plazma - membran bölgesi daha sonra endositoza uğrar, reseptör-ligand kompleksini içeren ve diğer birçok plazma - membran proteinlerini içermeyen bir kesecik oluşturur (163).

Biyolojik süreçlerde CORO1B, CTTN, EZR ve ZYX, GO: 0007015 numaralı yolak olan aktin filamentlerinin organizasyonunda görev alır. Hücre seviyesinde gerçekleştirilen aktin filamentlerinin aracı olduğu hücre iskelet yapılarının birleştirilmesi veya ayrılması sürecidir. Filamentlerin ağ örgülerine, demetlerine veya diğer yapılara çapraz bağlanması, düzenlenmesi gibi aktin filamanların dağılımını kontrol eden süreçleri içerir (163).

Biyolojik süreçlerde CALR ve HSPA5, GO: 0034975 numaralı yolak olan endoplazmik retikulumda protein katlanmasında ve GO: 0036500 numaralı yolak olan ATF6 aracılı katlanmamış protein cevabında görev alır. Endoplazmik retikulumda protein katlanması, endoplazmik retikulumda yer alan bir protein katlama işlemidir. Plazma zarı ve organel proteinleri endoplazmik retikulumda katlanır. ATF6 aracılı katlanmamış protein yanıtı, endoplazmik retikulum membran sensörü ATF6' nın aracılık ettiği bir dizi moleküler sinyalizasyon sürecidir. ATF6' nın aktivasyonu ile başlayan ve hücrenel işleminin regülasyonu ile sona eren transkripsiyon gibi sentezleri kapsar (163).

Biyolojik süreçlerde ACTB, CALR, CORO1B, CTTN, DBNL, EZR, HMG1B, STRAP ve ZYX, GO: 0043933 numaralı yolak olan makromoleküler komplekslerin alt birim organizasyonunda görev alır. Makromoleküler komplekslerin alt birim organizasyonu, makro moleküllerden bir protein kompleksi oluşumu, yıkımı veya değiştirilmesi ile sonuçlanan, ayrıştıran ya da modifiye edilen işlemler sürecidir (163).

Biyolojik süreçlerde ACTB, CALR, CORO1B, CTTN, DBNL, ENO1, EZR, HMG1B, HSPA4L, HSPA5, KRT1, KRT10, NSFL1C, STRAP ve ZYX, GO: 0050896 numaralı yolak olan fiziksel uyarılara yanıtta görev alır. Fiziksel uyarılara yanıt, bir uyarının sonucu olarak hücrenin veya organizmanın hareket, salgılama, enzim üretimi, gen ekspresyonu vs. durum veya aktivitesinde değişime yol açan işlemler sürecidir (163).

Biyolojik süreçlerde CORO1B, EZR ve ZYX, GO: 0051017 numaralı yolak olan aktin filament demeti oluşturmada görev alır. Aktin filament demetleri montajı; aktin filamentleri aynı eksen üzerindedir, fakat karşıt polaritelerle yönlendirilebilir ve farklı sıklık seviyelerinde birleştirilebilme sürecidir (163).

CALR, EEF1B2, EIF5A, ENO1, EZR, HMG1B, STRAP ve ZYX, RNA bağlama (GO: 0003723) moleküler fonksiyonuna sahiptir. RNA molekülüyle veya bunun bir kısmı ile seçici ve nonkovalent bir şekilde etkileşime girerler (163).

KEGG yolak analizi veri tabanı aracılığıyla fagositoz yolağındaki (Bkz. Şekil 5.2.) ACTB, CALR ve TUBB' un ABS' nin etkisiyle farklılaştığı bulunmuştur (164).

KEGG yolak analizi veri tabanı aracılığıyla endoplazmik retikulumda protein işleme yolağındaki (Bkz. Şekil 5.4.) CALR, HSPA4L, HSPA5 ve NSFL1C' nin, ABS' nin etkisiyle farklılaştığı bulunmuştur (164).

5.5. HepG2 Karaciğer Kanseri Hücrelerinde ABS Etkisiyle Farklılaşan Proteinlerin

Saptanması

HepG2 hepatosellüler karsinoma hücrelerinin kültür çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı' ndan Doç. Dr. Ayşe Ercan ve Dr. Bio. Selin Öncül tarafından gerçekleştirilmiştir. ABS, HepG2 hücrelerine 24 saat muamele edilerek sitozolik fraksiyonlar Bkz. Bölüm 3.2.' de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. HepG2 kolon kanseri hücrelerinde, ABS ile muamele edilen hücreler T grubu, muamele edilmeyen hücreler C grubu olarak adlandırılmıştır.

2D jel elektroforez ile kıyaslamalı proteomik çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için sitozolik fraksiyonlarda bulunan protein miktarı "Bio-Rad™ Protein Assay" yöntemi kullanılarak bulunmuş ve Bkz. Tablo 4.1.' de sunulmuştur. 24 saatlik HepG2 hücrelerinin sitozolik fraksiyonlarından elde edilen C ve T grupları için 2D jel elektroforez çalışmaları 3' er tekrarlı olmak üzere çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sonrasında proteinler, her bir jele 1.5 mg/mL protein yüklemesi yapılabilmesi için - 20 °C' de bekletilmiş TCA ve DTT içeren aseton çözeltisi ile çöktürülmüş daha sonrasında çöktürülen proteinler yükleme tamponunda çözülerek IPG şeritlere yüklenmiştir. Ön çalışmalarda farklı pH aralığına sahip IPG şeritleri denenmiş, spot dağılımı ve ayırımın en yüksek olduğu şerit olarak pH 5 - 8 IPG şeritleri olduğu tespit edilmiş ve deneylere pH 5 - 8 IPG şeritlerle devam edilmiştir. IPG şeritlere yüklenen proteinler önce IEF cihazında Bkz. Tablo 3.8.' de verilen odaklama programıyla pI değerlerine göre birbirinden ayrılmıştır. IPG şeritler sırasıyla dengeleme tamponu 1 ve 2 ile muamele edilerek proteinlerin SDS ile kompleks oluşturması sağlanmıştır.

Daha sonra elektroforez hücrelerine IPG şeritler yerleştirilerek proteinlerin kütlelerine göre ayrılmaları sağlanmıştır.

1. boyutta pI' larına, 2. boyutta kütlelerine göre ayrılan proteinlerin imaj analiz çalışmalarının yapılabilmesi için boyama işlemi Bkz. Bölüm 3.8.2' de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. HepG2 hücrelerine ait C ve T grupları SYPRO - Ruby ile boyanmıştır.

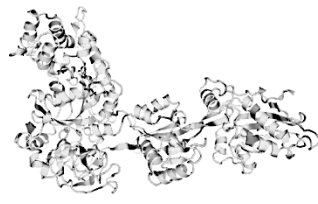


İmaj analizlerinin ilk basamağını görüntüleme çalışmaları oluşturmaktadır. Bu nedenle görüntüleme cihazı aracılığıyla jel haritaları çıkartılmıştır (Bkz. Şekil 4.70.). HepG2 hücrelerinin jel haritalarında 224 tane spot saptanmıştır. PDQuest™ programı tarafından tanımlanan Statistic, Quant ve Booln kümelerinde HepG2 hücrelerinde sırasıyla 97, 70 ve 60 tane spot bulunmuştur (Bkz. Bölüm 4.5.1.). HepG2 hücrelerine ait Booln kümesinde bulunan 60 spottan 13 tanesi MALDI-TOF/TOF-MS analizi için seçilmiş (Bkz. Şekil 4.71. ve 4.72.) ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı' nda kesilerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. ABS' nin etkisiyle azalan proteinlerin (9 tane) jel üzerindeki yakın görüntüsü Şekil 4.73. - 4.81. ve ABS' nin etkisiyle artan proteinlerin (4 tane) jel üzerindeki yakın görüntüsü Şekil 4.82. - 4.85.' de verilmiştir.

HepG2 hücreleri için C ve T grupları karşılaştırılarak % 95 güven seviyesinde en az 2 kat farklılaşan sırasıyla 13 tane spot Kocaeli Üniversitesi Proteomik Laboratuvarında jelden kesilmiş, tripsin ile peptidlerine parçalanarak jelden ekstre edilmiş, ekstre edilen proteinler MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilmiştir ve veri bankaları kullanılarak tanımlanmıştır. PMF için MASCOT programı ve De Novo peptid dizileme (Bkz. Bölüm 4.6.) yöntemleri kullanılmıştır. HepG2 karaciğer kanseri hücrelerine ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler tanımlanmış ve değişim oranları Tablo 4.6.' da verilmiştir.


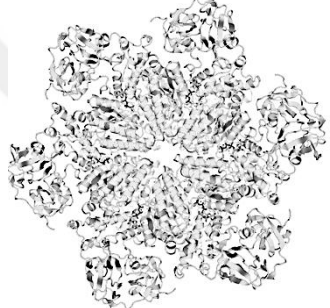
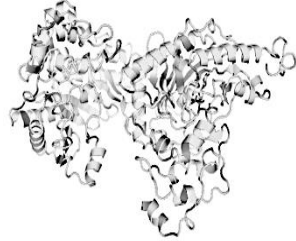
5.6. HepG2 Karaciğer Kanseri Hücrelerinde Farklılaşan Proteinlerin Yapıları, Fonksiyonları ve Protein - Protein Etkileşmeleri

HepG2 karaciğer kanseri hücre hattının 24 saat ABS ile muamelesi sonucunda miktarı azalan veya artan proteinlerin yapısı, gen adı ve fonksiyonu; UniProt, SwissProt programı aracılığıyla saptanmıştır (Tablo 5.7.).

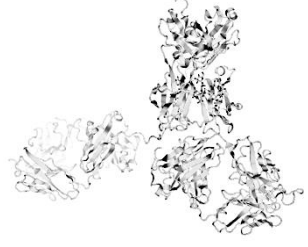
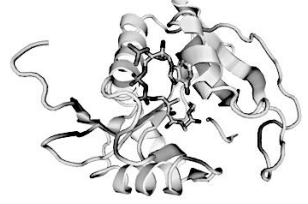
Tablo 5.7. HepG2 karaciğer kanseri hücrelerine ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

24 Saat ABS ile Muamele (HepG2)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile azalan			
Uzama faktörü 2	EEF2	GTP bağımlı ribozomal translokasyon adımını katalize eder. İki tRNA molekülünün koordineli hareketini, mRNA'yı ve ribozomdaki konformasyonel değişiklikleri katalize eder.	
70 kDa ısı şok proteini 1A/1B	HSPA1	Bkz. Tablo 5.4.	
Proteazom subunite, alfa tip-5	PSMA5	Hücre içi proteinlerin çoğunun proteolitik bozunmasında yer alan 20S çekirdek proteazom kompleksinin bileşenidir. Bu kompleks, farklı düzenleyici parçacıklar ile ilişkilendirilerek hücre içinde çok sayıda önemli rol oynar.	
Glukozidaz 2 subunite beta	PRKCSH	Glikosidaz II'nin düzenleyici alt birimidir, olgunlaşmamış glikoproteinlerden glikoz tortularını ayırır.	
Tropomiyosin alfa-3 zinciri	TPM3	Kas ve kas olmayan hücrelerde filamentleri aktive eder. Omurgalı çizgili kas kasılmasının kalsiyum bağımlı regülasyonunda troponin kompleksinde rol oynar. Kas dışı hücrelerde, hücre iskeleti aktin filamanlarının stabilize edilmesinde rol oynar.	
UV eksizyon tamir proteini RAD23B homolog B	RAD23B	Multiubiquitin zincir reseptörü, proteazomal degradasyonun modülasyonunda rol oynar. PNGase ile bağlantılı olarak yanlış katlanmış glikoproteinlerin endoplazmik retikulum ilişkili bozulmasında (ERAD) ve proteozomda deglikosizil proteinlerin verilmesinde rol oynar.	

Tablo 5.7. (Devam) HepG2 karaciğer kanseri hücrelerine ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

24 Saat ABS ile Muamele (HepG2)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile azalan			
Laktoylglutatyon liyaz	GLO1	Metilglüksal ve glutatyondan oluşan hemimkaptalın, S-laktoylglutatyona dönüşümünü katalize eder. Normal osteoklastogenez için gereklidir.	
Geçişli endoplazmik retikulum ATPazı	VCP	Mitoz sırasında Golgi yığınlarının parçalanması ve mitozdan sonra yeniden bir araya getirilmesi için gereklidir. Endoplazmik retikulumun (tER) oluşumunda yer aldı. UFD1, VCP ve NPLOC4 içeren üçlü kompleks, ubikastine edilmiş proteinleri bağlar ve yanlış katlanmış proteinlerin ER'den sitoplazmaya, proteazom tarafından parçalandıkları yere aktarılması için gereklidir. NPLOC4-UFD1-VCP kompleksi, mitoz sonunda nükleer zarfın oluşturulması için gereklidir. RNF19A'nın E3 ubiquitin-protein ligaz aktivitesini düzenler. HMGCR'nin sterol aracılı ubiquitinasyon ve endoplazmik retikulum ilişkili bozulmasının (ERAD) son aşamasında yer alan VCP / p97-AMFR / gp78 kompleksinin bileşenidir.	
Kreatin kinaz tip-B	CKB	ATP ve çeşitli fosfogenler (örn., Kreatin fosfat) arasındaki fosfat transferini tersine çevirir. Kreatin kinaz izoenzimleri, iskelet kası, kalp, beyin ve spermatozoa gibi büyük dokularda enerji iletiminde merkezi bir rol oynamaktadır.	

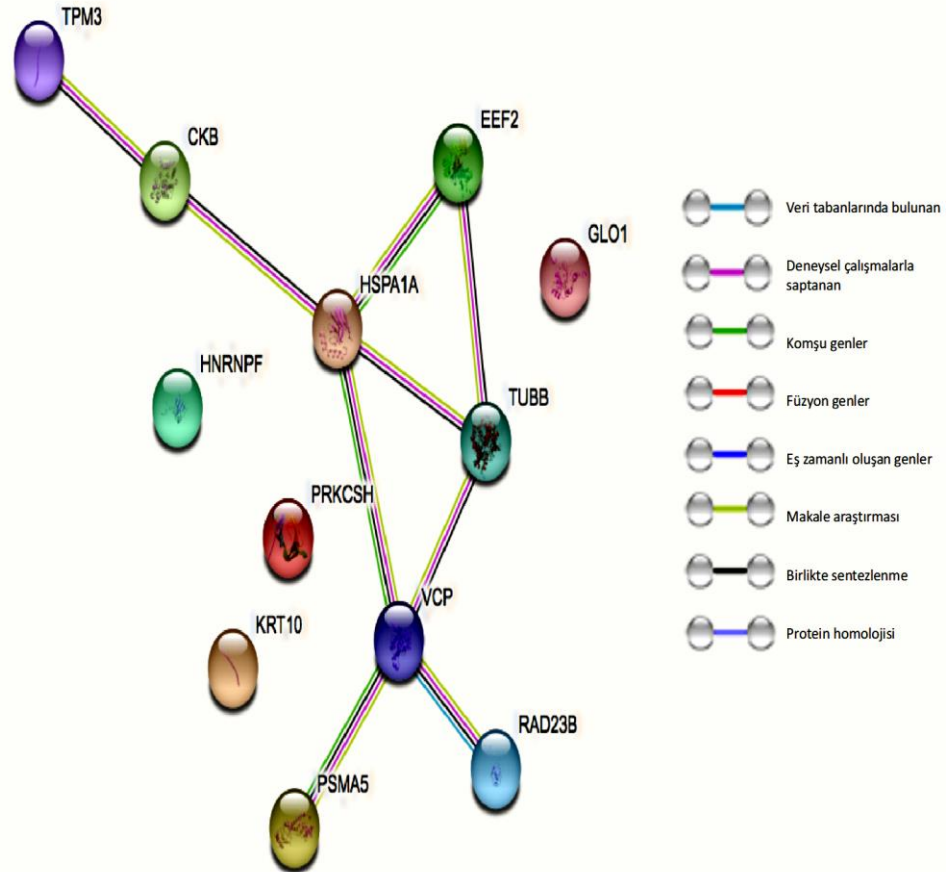
Tablo 5.7. (Devam) HepG2 karaciğer kanseri hücrelerine ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapısı ve fonksiyonu.

24 Saat ABS ile Muamele (HepG2)			
Protein Adı	Gen	Protein Fonksiyonu	Protein Yapısı
ABS' nin etkisi ile artan			
Ig gama-1 zincirinin C bölgesi	IGHG1	İmmüoglobulin ağır zincirlerinin sabit bölgesidir. Antikorlar olarak da bilinen immüoglobulinler, B lenfositleri tarafından üretilen membrana bağlı veya salgılanmış glikoproteinlerdir. Hümorale immünitinin tanınması aşamasında, membrana bağlı immüoglobulinler, spesifik bir antijenin bağlanması üzerine, B lenfositlerinin immüoglobulinleri salgılayan plazma hücrelerine klonal genişlemesini ve farklılaşmasını tetikleyen reseptörler olarak hizmet ederler. Salgılanmış immüoglobulinler, bağlanan antijenlerin ortadan kaldırılmasıyla sonuçlanan humoral bağışıklığın efektör fazına aracılık eder.	
Tubulin beta zinciri	TUBB	Bkz. Tablo 5.3.	
Heterojen nükleer ribonükleoprotein F	HNRNPF	Pre-mRNA'ların, sitoplazmada fonksiyonel, çevrilebilir mRNA'lar haline gelmeden önce gerçekleşen olaylar için substratı sağlayan heterojen nükleotid ribonükleoprotein (hnRNP) komplekslerinin bileşenidir. Alternatif yapıştırma olaylarının düzenlenmesinde rol oynar.	
Keratin, tip I sitoskeletal 10	KRT10	Bkz. Tablo 5.6.	

Farklılaşan her bir protein UniProt programı aracılığıyla incelenmiş ve önemli fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, ABS' nin HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde etkili olan proteinler saptanmış, bu proteinlerin fonksiyonları

verilmiş ve aynı zamanda bir bütün halde ele alınarak hangi biyolojik yolları etkilediği bulunmuştur. Farklılaşan proteinlerin gen adları kullanılarak String programı yardımıyla protein-protein etkileşim ağ haritası oluşturulmuştur (Şekil 5.6.). String programı aracılığıyla saptanan biyolojik süreçler ve moleküler fonksiyonlar GO numaraları aracılığıyla QuickGO ve KEGG veri tabanlarında araştırılmıştır (162).

String programı aracılığıyla ABS' nin etkisiyle HepG2 hücrelerinde değişen proteinlerin atlası Şekil 5.6.' da verilmiştir. Protein atlası incelendiğinde *EEF2*, *HSPA1A*, *VCP* ve *PSMA5* ile ifade edilen genlerin komşu genlerdir; *TPM3*, *CKB*, *HSPA1A*, *EEF2*, *TUBB*, *VCP*, *PSMA5* ve *RAD23B*' ün kayalarda olan ilişkisi açıklanmış ve birlikte sentezlenmektedirler. Bu tez çalışmasında deneylerde gözlemlenen protein atlası ile birlikte ABS' nin endoplazmik retikulumda protein işleme yolağıyla hücre içerisinde gerçekleşen biyosüreçleri etkilediği gözlemlenmiştir.



Şekil 5.6. HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde ABS' nin etkisiyle farklılaşan proteinlerin birbirleriyle etkileşimi.

Ayrıca çalışmalarda KEGG yolak analizi veri tabanı aracılığıyla endoplazmik retikulumda protein işleme yolağındaki (Bkz. Şekil 5.4.) HSPA1A, RAD23B ve VCP' nin, ABS' nin etkisiyle farklılaştığı bulunmuştur (164).

5.7. Caco-2, HT-29 ve HepG2 Hücre Hatlarında ABS' nin Antineoplastik Etkisinin İncelenmesi

ABS' nin etkisiyle Caco-2, HT-29 ve HepG2 hücre hatlarında nicel olarak farklılaştığı saptanan proteinlerin yapıları, fonksiyonları, birbirleriyle ilişkisi ve yer aldıkları biyolojik süreçler ve yollar Bkz. Bölüm 5.2., Bölüm 5.4. ve Bölüm 5.6.' da verilmiştir. Değişim gözlenen proteinler String protein atlası programı ile değerlendirilmiştir. ABS' nin etkisi ile azalan ve artan proteinler incelendiğinde, Bkz. Şekil 5.1., 5.5. ve 5.6.' da görüldüğü gibi miktarında değişim gözlemlenen proteinlerin çeşitli yollarla birbirine bağlı olduğu görülmektedir. Bu durum ABS' nin çoğalmayı önleyici etki mekanizmasının spesifik yollar üzerinden gerçekleşmiş olduğuna en büyük işaretlerden birisidir. Gözlemlenen protein haritası ile birlikte ABS'nin spesifik yollarla hücre içerisinde gerçekleşen biyosüreçleri etkilediği gözlemlenmiştir. Özellikle kanser oluşum mekanizmasında etkili vinculin, HMGB1 gibi proteinlerin bu harita içerisinde bulunması ve bunlara bağlı diğer proteinlerin ABS ile miktarlarının değişmesi, ABS' nin kanser oluşumuna karşı protein seviyesinde etkin olduğunu göstermektedir. Miktarında değişim gözlenen bu proteinler tek başına dahi değerlendirildiğinde önemli bulgulara ulaşılmaktadır. Vinculinin kolon kanserinde bir biyobelirteç olduğu 2013 yılında Sun ve ark. (165) tarafından gerçekleştirilen çalışmada sunulmaktadır. HMGB1 in kanser ile olan ilişkisi de halihazırda bilinmektedir. Bu bölümde kanser hücrelerinde yer alan bu proteinlerin antineoplastik etkisi incelenmiştir.

Bir hücrenin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesi için hücre morfolojisinin bozulmaması gereklidir. Hücre morfolojisinin bütünlüğünün devam ettirilmesinde genler, proteinler, çeşitli kofaktörler, hücre iskeletini oluşturan bileşenler, membranda bulunan lipitler, fosfolipitler, glikoproteinler gibi birçok etkenin rolü vardır. ABS' nin kanser hücreleri ile muamele edilmesinden sonra nicel olarak miktarı değişen proteinlerden bazıları, hücre yapısının oluşturulmasında, korunmasında ve yenilenmesinde yer almaktadır. Caco-2 (Tubulin beta zinciri, Tubulin alfa-1B zinciri ve Ezrin) ve HT-29 kolorektal karsinoma

hücrelerinde (Koronin-1B, Src substratı kortaktin ve Drebrin benzer protein) ABS' nin etkisiyle miktarı artan proteinlerin fonksiyonları, Uniprot veri bankası ile araştırılmış; sitoskeletal yapıların plazma membranına bağlanması, mikrotübüllerin ana bileşeni olma, fibroblastların yapısal dinamikleri, hücre hareketliliğini düzenleme, aktin ve hücre şeklinin organizasyonuna katkıda bulunma gibi hücre morfolojisinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Bkz. Tablo 5.3., 5.5. ve 5.6.). Hücre morfolojisinde etkisi olan bazı proteinlerin ABS' nin etkisiyle arttığı gözlenmiştir. Bu durum ABS ile muamele sonrasında kanser hücrelerinin bozulan morfolojisini düzeltmek için yani savunma amaçlı bahsi geçen proteinleri daha fazla eksprese ettiği düşünülmektedir. Caco-2 kolorektal karsinoma hücrelerinde (Çinko parmak protein MYM-tip 4, *Differentially expressed in FDCP 6 homolog*, PDZ ve LIM domain protein 1 ve Tubulin alfa-1A zincir proteini), HepG2 hepatosellüler karsinoma hücrelerinde (Tropomiyosin alfa-3 zinciri) ABS' nin etkisiyle miktarı azalan proteinlerin fonksiyonları, Uniprot veri bankası ile araştırılmış; sitoskeletal organizasyonunun düzenlenmesinde, mikrotübüllerin ana bileşeni olma gibi hücre morfolojisinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Bkz. Tablo 5.3., 5.4. ve 5.7). ABS' nin antineoplastik etki mekanizmasının, bu proteinlerin baskılanması veya inhibisyonu ile hücre morfolojisini bozarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Doğada işleyen birçok denge kanunlarında olduğu gibi proteinlerin sentezlenip, işlevlerini gerçekleştirebilmesinde hücre çekirdeğinden başlayan protein sentez ve parçalanmasıyla biten bir protein döngüsü vardır. Protein sentezi genlerde başlayan bir süreç olup DNA' dan transkripsiyonla RNA sentezi, sonrasında RNA' dan translasyonla protein sentezi ve daha sonrasında hücre içinde çeşitli organellerde ya da sitoplazmada modifikasyonlarla modifiye proteinler elde edilir. ABS' nin kanser hücreleri muamele edilmesinden sonra nicel olarak miktarı değişen bazı proteinler, nükleotid bazlarının sentezlenmesinde, transkripsiyonda (RNA sentezlenmesinde) ve proteinlerin sentezlenmesi, katlanması ve onarımında yer almaktadır. Caco-2 (Protein disülfid-izomeraz A3 ve 70 kDa ısı şok proteini 1A/1B) ve HT-29 kolorektal karsinoma hücrelerinde (Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 5A-1, Serin-treonin reseptör kinaz ve Glukoz regüle protein-78), HepG2 hepatosellüler karsinoma hücrelerinde (Heterojen nükleer ribonükleoprotein F) ABS' nin etkisiyle miktarı artan proteinlerin fonksiyonları, Uniprot veri bankası ile araştırılmış; Proteinlerde -S-S- bağlarının yeniden düzenlenmesini kataliz etmede, translasyon uzamasına

katılan mRNA bağlanmasında, hücrel pre-mRNA' ların birleştirilmesinde ve endoplazmik retikulum lümeninde protein katlanması gibi protein sentezinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Bkz. Tablo 5.3., 5.4., 5.5. ve 5.7.). Protein sentez yolağında etkisi olan bazı proteinlerin ABS' nin etkisiyle arttığı gözlenmiştir. Bu durum ABS ile muamele sonrasında kanser hücrelerinin bozulan protein sentezini düzeltmek için yani savunma amaçlı bahsi geçen proteinleri daha fazla eksprese ettiği düşünülmektedir. Caco-2 (Glukoz regüle protein-78, 60 kDa ısı şok proteini ve ökaryotik çeviri başlatma faktörü 5A-1) ve HT-29 kolorektal karsinoma hücrelerinde (Alfa-enolaz), HepG2 hepatosellüler karsinoma hücrelerinde (Uzama faktörü 2, Proteazom subuniti, alfa tip-5, UV eksizyon tamir proteini RAD23 homolog B, Geçişli endoplazmik retikulum ATPaz) ABS' nin etkisiyle miktarı azalan proteinlerin fonksiyonları, Uniprot veri bankası ile araştırılmış; tranlasyon uzamasında mRNA bağlanmasında, mRNA' yı ve ribozomdaki konformasyonel değişikliklerin kataliz edilmesinde, mitokondriyal protein taşınmasında, makromoleküler protein yapımında, proteinlerin doğru katlanmasında, proteinlerin yanlış katlanmasını önlemede, endoplazmik retikulum lümeninde protein katlanması protein sentezinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Bkz. Tablo 5.3., 5.4., 5.6. ve 5.7.). ABS' nin antineoplastik etki mekanizmasının, bu proteinlerin baskılanması veya inhibisyonu ile protein sentezini transkripsiyon basamağından başlayarak protein sentezi ve modifikasyonunu bozarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Caco-2 hücrelerinde ABS' nin etkisiyle yaklaşık 250 katlık bir azalış gösteren yüksek hareketlilik grubu protein B1 (HMGB1), kolon kanser hücrelerinde üretilmektedir. HMGB1, kırk yıl önce dana timusunda keşfedilmiştir ve poliakrilamid jellerdeki elektroforetik hareketliliğine göre adlandırılmıştır. HMGB1 çift işleve sahip bir protein olup hücrenin içinde, bir DNA şaperonu olarak görev yapan bir kromozomal proteindir. HMGB1 hücrenin dışında, sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri ile etki gösteren prototipik hasarla ilişkili moleküler bir modeldir. Tümör gelişimi sırasında ve kanser tedavisinde, HMGB1' in, iltihaplanma, bağışıklık, genom stabilitesi, çoğalma, metastaz, metabolizma, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere birçok sinyal yolunu düzenleyerek hem hücrenin hayatta kalmasını hem de ölümünü teşvik etmede rol oynadığı bildirilmiştir (166). HMGB1, makrofajlarda

büyüme inhibisyonunu ve apoptozu RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) hücre içi sinyal yolağı üzerinden indüklediğı kaynaklarda gösterilmiştir (167).

Nekroz dışında hücre çekirdeğinden sitoplazmaya ve hücre dışı boşluğa salınan HMGB1 aktif olup hücre çoğalmasının (proliferasyon) artmasından (168), damar oluşumunun (anjiojenezis) aktivasyonundan (169), artan hücre hareketliliğinden ve inflamatuvar koşulların uyarılmasından sorumludur (170). HMGB1, aşırı ekspresyonu, sınırsız çoğalma kabiliyeti, anjiyogenez, apoptoza direnç, hücrelerin kendi büyüme faktörlerinin üretimi, büyüme inhibitörlerine duyarlılık, inflamatuvar durum ve metastaz yapma gibi kanser özelliklerine bağı olan bir proteindir. Bu nedenle, nekrotik hücre ölümünü indükleyen ilaçlarla tedavi sırasında HMGB1 aktivitesinin inhibisyonu, antitümör tedavisini olumlu yönde etkileyebilir (171).

Gastrointestinal kanserden kaynaklanan en önemli ölüm nedeni, tedaviye dirençli olan metastazların progresif büyümesidir. Metastaz, bir dizi ardışık ve birbirine bağı adımdan oluşan oldukça seçici bir işlemdir (172). Kanserde, antikanser özelliklerine sahip olan makrofajların aktivasyonu baskılanır ve tümör teşvik edici aktiviteye sahip olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) (173) ve trombosit kaynaklı endotel hücre büyüme faktörü (174) üretilir. Makrofajların, HMGB1 seviyelerinin yükseldiğı metastatik kolon kanserinde önemli ölçüde azaldığını bildirilmiştir (175). Bu veriler ışığında HMGB1' in metastazda önemli bir rol oynadığı gözlenmektedir (176). Caco-2 kolorektal karsinoma hücrelerinde, ABS' nin antineoplastik etkisini metastaza neden olan HMGB1 proteinini baskılayarak gösterdiği düşünülmektedir.

1979' da keşfedilen vinculin, 15' den fazla protein için bağlayıcı bölgelere sahip bir adaptör proteindir (177). Biyokimyasal ve yapısal analizler, potansiyel bağlayıcı ortaklar hakkında ayrıntılı bilgiye ve bunların bağlanması nasıl düzenlenebileceğinin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Bütün bu bilgilere rağmen, vinculinin hücrelerde nasıl etki ettiğinin ve çok çeşitli sinyalleri kontrol altında tutmasının moleküler temeli belirsiz kalmaktadır. Vinculinin bir sinyal ağı koordinasyonunda nasıl yer aldığı açıklanması gerekmektedir (178).

Malign neoplazmların (oluşan yeni dokular) invaziv veya metastatik bir fenotip oluşumu, genellikle hücresel adhezyonun (yapışkanlık, yüzeye tutunma) azalması ile ilişkilidir.

Hücre adhezyonunun altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasındaki son gelişmeler, dönüştürülmüş fenotipin kazanılmasında rol oynayabilecek olası moleküler hedeflere çok fazla ışık tutmuştur (179). Kanseri hücrelerinin yapışmasının azalması ile ilişkili olabilecek alternatif bir mekanizma, vinculin de dahil olmak üzere, adhezyonla ilişkili proteinlerin farklı ekspresyonudur. Malign değişiklikler genellikle bu tip proteinlerin düşük ekspresyonunun neden olduğu azaltılmış hücresel adhezyonla ilişkilendirilmiştir. Bu proteinlerin düşük ekspresyonu ile, malign hücrelerin primer tümörlerden ayrılması, komşu dokuları istila etmesi, kan damarı ve lenflere nüfuz etmesi ve hedef organlarda metastaz oluşturmak için damar dışına sızma eğilimi gibi malign değişikliklerden sorumlu olduğu öne sürülmüştür (179-183). Kanseri hücrelerinin adhezyon özelliklerinde meydana gelen değişikliklerle, kanseri hücrelerinin karakteristik özelliklerinin azalmasına katkıda bulunulabilmektedir. Caco-2 kolorektal karsinoma hücrelerinde, ABS' nin vinculin ekspresyonunu artırıp metastaz oluşumuna engel olarak antineoplastik etkisini gösterdiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser, DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin, kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Kanser, günümüzde insanları gerek sosyal gerekse ekonomik anlamda tehdit eden en ölümcül hastalıkların başında gelmektedir ve kanser tedavisinde kullanılan ve onay almış ruhsatlı ilaçların büyük bir kısmının bitkisel kaynaklı olduğu belirtilmektedir.

Kanser sonucu tümör gelişiminde hücrede gerçekleşen fizyolojik değişiklikler sırasıyla; büyümede kendi kendine yeterlilik, büyüme inhibisyonuna duyarsızlık, programlı hücre ölümünden kurtulma, sınırsız çoğalma potansiyeli, yeni damarların oluşumu ve gelişmesi ve sıçrama yani çevre dokulara yayılma olaylarıdır. Kanser teşhis ve tedavisinde gelişme sağlayabilmek için bu fizyolojik değişiklikler ile ilgili mekanizmaların oluşumlarını moleküler düzeyde açıklamak gerekmektedir. Çok farklı tipleri olan ve ölümcül bir hastalık türü olan kansere yönelik proteomik çalışmalar çok önemlidir. Kanser etki mekanizmasının ve ilaçla tedavilerin etki mekanizmalarının aydınlatılmasında ve yeni biyobelirteçlerin keşfinde, proteomik analizler önemli bir yere sahiptir.

Her hücrede bulunan ve genetik programı oluşturan genom, genom tarafından kodlanan proteinleri tanımlayan proteom düzeyinde antikanser aktivite sonucu gerçekleşen olayları açıklamak gerekmektedir.

Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik tekniklerin tamamını kapsayan omik yaklaşımlar, ileri analitik teknikler kullanarak antikanser aktiviteyi moleküler düzeyde incelemek amacıyla kullanılmaktadır.

Proteom, genom tarafından kodlanan proteinleri tanımlar. Bir hücrenin, organın veya organizmanın belirli bir zaman ve mekânda sahip olduğu tüm proteinlerin bir toplamıdır ve sadece genler tarafından kodlanan polipeptid yapıları değildir. “Mekân” terimi farklı proteinlerin hücrenin farklı bölümlerinde ve farklı hücre tiplerinde ifadesini, “zaman” terimi ise farklı gelişim evrelerinde farklı çevresel koşullar, yaşlılık ve çeşitli hastalıklar gibi süreçleri ifade eder. Ayrıca proteom, hücreden hücreye farklılık gösterir. Hastalık durumlarında, stres altında hatta günün saatine bağlı olarak bile proteom, genomun aksine değişiklik göstermektedir. Proteom analizine proteomik denilmektedir. Proteomik; belli bir zamanda

belli bir yerde bulunan tüm proteinlerin yapılarını, yerleşimlerini, miktarlarını, translasyon sonrası değişimlerini, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşimlerini inceler.

Kıyaslamalı proteomik, iki farklı koşul altında toplam protein ifadesinin (ekspresyonunun) nitel ve nicel analizinin yapılmasıdır. Hücrede belirli bir hastalık durumunda değişime uğrayan proteinlerin belirlenmesi ya da bir ilaç, kimyasal veya fiziksel stimüle edici ile karşılaşma durumunda etkilenen proteinlerin incelenmesi kıyaslamalı proteomik çalışma alanında yer almaktadır. Bu tez kapsamında kıyaslamalı proteomik çalışmaları 2D jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, 2 ayırma tekniği kullanılarak binlerce proteinin tek adımda ayrılması sağlanır. 1. boyutta bir karışım içindeki proteinler, pI'larına göre IPG şeritler üzerinde ayrılır, 2. boyutta ise SDS-PAGE tekniği ile proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Böylece SDS - PAGE jel üzerinde bantlar (spotlar) halinde proteinler birbirinden ayrılmış olur. Böylece örneklere ait protein profili çıkarılarak farklı koşullarda ifade edilen proteinler tespit edilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, proteomik çalışmalar için Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri ve HepG2 karaciğer kanseri hücre hatları kullanılmıştır ve ABS' nin, Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri ve HepG2 karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkisi kıyaslamalı proteomik çalışmalarla incelenmiştir. 2D jel elektroforez yöntemi ile proteomik çalışmalar gerçekleştirilmiş ve miktarı değişen proteinler imaj analizi çalışmalarıyla saptanmıştır. Farklılaştığı tespit edilen proteinlerin yapıları, MALDI-TOF/TOF-MS cihazı ve PMF aracılığıyla ile aydınlatılmıştır. Daha sonra String, QuikGO ve KEGG gibi veri tabanları aracılığıyla belirlenen proteinlerin çeşitli biyolojik yollarda ve süreçlerde görev aldığı, hangi biyolojik süreçleri ve moleküler fonksiyonu etkilediği tespit edilmiştir.

Bu çalışma, 3 farklı kanser hücre hattında (Caco-2, HT-29 ve HepG2), ABS' nin antikanser aktivitesini moleküler düzeyde proteomik çalışmalarla (2D jel elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS) ortaya koyan ilk çalışmadır. Çalışmada ABS tarafından, % 90 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı ve nicel olarak en az 2 kat değişen 69 tane protein analiz edilerek tanımlanmıştır.

ABS' nin etkisi ile azalan ve artan proteinler incelendiğinde, Şekil 5.2 - 5.4.' de görüldüğü gibi miktarında değişim gözlemlenen proteinlerin çeşitli yollarla birbirine bağlı olduğu görülmektedir. Bu durum ABS' nin kanser üzerine etki mekanizmasının spesifik

yolaklar üzerinden gerçekleşmiş olduğunu göstermektedir. Gözlemlenen protein haritası ile birlikte ABS' nin spesifik yolaklarla hücre içerisinde gerçekleşen biyosüreçleri etkilediği gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada, farklılaştığı saptanan proteinler kıyaslamalı proteomik çalışmalarla bulunmuştur. Saptanan proteinlere ait genomik, metabolomik ve transkriptomik gibi omik teknikler de kullanılarak ABS' nin etkisi, moleküler düzeyde bir bütün olarak değerlendirilmelidir ve omik tekniklerden elde edilen sonuçların birlikte değerlendirilmesi sonucu antikanser aktivitenin, hangi metabolik yolaklar üzerinde etki sonucu oluştuğu hakkında önemli verilere ulaşılabileceği düşünülmektedir.

ABS' nin kolon ve hepatosellüler kanser hücrelerinde çoğalmayı önleyici (antiproliferatif) etkisinin olduğu saptanmıştır. Ancak sağlıklı kolon ve karaciğer hücreleriyle çalışmalar yapılarak da herhangi bir yan etkinin olup olmadığı incelenmelidir.

ABS' nin kolon ve karaciğer kanseri hücrelerine ait numunelerdeki proteinlerin belirlenmesi amacıyla 2D jel elektroforez ve kütle spektrometrisi yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler kullanarak, sağlıklı kolon ve karaciğer hücrelerine ait numunelerdeki protein ifadelerinin belirlenip kanserli hücrelerde bulunan veya kanserli hücrelerde bulunmayan proteinler kıyaslamalı proteomik çalışmalarla tespit edilebilir.

Kanser tedavisinde çeşitli terapötik ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak ilaçların yan etkilerinin çok olması nedeniyle tedavide yüksek dozlar kullanılamamaktadır. Terapötik ilaçlarla birlikte ABS' nin kullanılmasıyla sinerjik etki oluşturup oluşturmadığı deneylerle ortaya konmalıdır.

Bu tez çalışmasıyla in-vitro hücre kültürü deneyleri gerçekleştirilmiş ve 2D jel elektroforez ile MALDI-TOF/TOF-MS ile nicel anlamda farklılaştığı saptanan proteinler analiz edilmiştir. Tanımlanan bu proteinlerin analizi Western Blot, eş zamanlı (real time) PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemleri ile çalışılıp gen düzeyinde de bu proteinlerin miktarının değişip değişmediği araştırılmalıdır.

ABS' nin daha büyük organizmalarda da aynı biyolojik yolaklarda ve süreçlerde yer alıp almayacağı yani aynı etkiyi verip vermeyeceği bilinmemektedir. Bu nedenle ABS' nin etkisinin deneysel canlılar (fare, sıçan, tavşan, vb.) üzerinde araştırılarak yani in-vivo çalışmalar yapılarak aynı etkiye sahip olup olmadığı incelenmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Kell DB. The virtual human: towards a global systems biology of multiscale, distributed biochemical network models. *IUBMB life*. 2007;59(11):689-95.
2. Westerhoff HV, Palsson BO. The evolution of molecular biology into systems biology. *Nature Biotechnology*. 2004;22(10):1249-52.
3. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 1995;16(1):1090-4.
4. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature*. 1970;227(5258):561-3.
5. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*. 1999;19(3):1720-30.
6. Fields S. Proteomics in genomeland. *Science*. 2001;291(5507):1221-4.
7. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik*. 1975;26(3):231-43.
8. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1975;250(10):4007-21.
9. Protein. 2018. Erişim adresi: http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/finansci/Ders_Notlari/AA-Proteinler.pdf.
10. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential cell biology*: Garland Science; 2013.
11. Protein structure. 2018. Erişim adresi: https://www.wikizero.com/simple/Protein_structure.
12. Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics: International Edition*. 2002;2(1):3-10.
13. Clark D, Pazdemik N.J. *Molecular Biology* 2nd ed. Sydney: Elsevier; 2005.
14. Bauer A, Kuster B. Affinity purification-mass spectrometry: Powerful tools for the characterization of protein complexes. *European Journal of Biochemistry*. 2003;270(4):570-8.
15. Başaran E, Aras S, Cansaran-duman D. Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2010;67(2):85-96.
16. Pierce JD, Fakhari M, Works KV, Pierce JT, Clancy RL. Understanding proteomics. *Nursing & Health Sciences*. 2007;9(1):54-60.
17. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*. 2003;21(3):255-61.

18. Walaas SI, Greengard P. Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacological Reviews*. 1991;43(3):299-349.
19. Tobolkina E. New analytical tools combining gel electrophoresis and mass spectrometry. *Laboratory of Physical and Analytical Electrochemistry*; 2014.
20. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009;325(5942):834-40.
21. Kiernan UA. Biomarker rediscovery in diagnostics. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*. 2008;2(12):1391-400.
22. Patricelli MP. Activity-based probes for functional proteomics. *Briefings in Functional Genomics*. 2002;1(2):151-8.
23. Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics*. 2003;33:311-23.
24. Aebersold R, Cravatt BF. Proteomics—advances, applications and the challenges that remain. *Trends in Biotechnology*. 2002;20(12):s1-s2.
25. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Molecular Cancer*. 2007;6(1):25.
26. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405(6788):837-46.
27. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2010;5(6):463-6.
28. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek M-C, Yates III JR. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews*. 2013;113(4):2343-94.
29. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*. 1999;17(7):676-82.
30. Wu C, Tran JC, Zamdborg L, Durbin KR, Li M, Ahlf DR, et al. A protease for 'middle-down' proteomics. *Nature Methods*. 2012;9(8):822-24.
31. Taouatas N, Drugan MM, Heck AJ, Mohammed S. Straightforward ladder sequencing of peptides using a Lys-N metalloendopeptidase. *Nature Methods*. 2008;5(5):405-7.
32. Tran JC, Zamdborg L, Ahlf DR, Lee JE, Catherman AD, Durbin KR, et al. Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature*. 2011;480(7376):254-8.
33. Issaq HJ. The role of separation science in proteomics research. *Electrophoresis*. 2001;22(17):3629-38.
34. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *Journal of Proteomics*. 2010;73(11):2064-77.

35. Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1994;28(3):239-42.
36. Kiraga J, Mackiewicz P, Mackiewicz D, Kowalczyk M, Biecek P, Polak N, et al. The relationships between the isoelectric point and: length of proteins, taxonomy and ecology of organisms. *BMC genomics*. 2007;8(1):163.
37. Lescuyer P, Hochstrasser DF, Sanchez JC. Comprehensive proteome analysis by chromatographic protein prefractionation. *Electrophoresis*. 2004;25(7-8):1125-35.
38. Opiteck GJ, Ramirez SM, Jorgenson JW, Moseley III MA. Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping. *Analytical Biochemistry*. 1998;258(2):349-61.
39. Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, et al. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology*. 2002;20(3):301-5.
40. Hennrich ML, Groenewold V, Kops GJ, Heck AJ, Mohammed S. Improving depth in phosphoproteomics by using a strong cation exchange-weak anion exchange-reversed phase multidimensional separation approach. *Analytical Chemistry*. 2011;83(18):7137-43.
41. Tiselius A. Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochemical Journal*. 1937;31(9):1464-77.
42. Smithies O, Poulik M. Two-dimensional electrophoresis of serum proteins. *Nature*. 1956;177(4518):1033.
43. Ashton G. Serum protein differences in cattle by starch gel electrophoresis. *Nature*. 1957;180(4592):917-9.
44. Raymond S, Nakamichi M, Aurell B. Acrylamide gel as an electrophoresis medium. *Nature*. 1962;195(4842):697-98.
45. Raymond S. Acrylamide gel electrophoresis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1964;121(2):350-65.
46. Hamdan MH, Righetti PG. Proteomics today: protein assessment and biomarkers using mass spectrometry, 2D electrophoresis, and microarray technology. New Jersey: John Wiley & Sons; 2005.
47. Shaw CR, Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*. 1970;4(2):297-320.
48. Telman Ç. Kapiler Elektroforezin İlaç Analizlerine Uygulanması. Kayseri: Erciyes Üniversitesi; 2017.
49. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.

50. Gronow M, Griffiths G. Rapid isolation and separation of the non-histone proteins of rat liver nuclei. *Febs Letters*. 1971;15(5):340-4.
51. Macgillivray AJ, Wood DR. The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography. *European Journal of Biochemistry*. 1974;41(1):181-90.
52. Orrick LR, Olson MO, Busch H. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973;70(5):1316-20.
53. Taylor J, Anderson N, Scandora Jr A, Willard K, Anderson N. Design and implementation of a prototype human protein index. *Clinic Chemistry*. 1982;28(4 Pt 2):861-6.
54. Ek K, Bjellqvist B, Righetti PG. Preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients. I. General principles and methodology. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1983;8(2):135-55.
55. Anderson NG, Anderson NL. Analytical techniques for cell fractions: XXI. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: Multiple isoelectric focusing. *Analytical Biochemistry*. 1978;85(2):331-40.
56. Anderson NL, Anderson NG. Analytical techniques for cell fractions: XXII. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: multiple gradient-slab gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 1978;85(2):341-54.
57. Çelebier M. Ht29 ve K562 Kanser Hücrelerinde Protein ve Metabolitlerin Analizi İçin Çeşitli Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2013.
58. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*. 2000;21(6):1037-53.
59. Koshel BM, Wirth MJ. Trajectory of isoelectric focusing from gels to capillaries to immobilized gradients in capillaries. *Proteomics*. 2012;12(19-20):2918-26.
60. Suchkov S, Nikol'skaia I, Debov S. Isoelectric focusing of DNA-methylases from *Shigella sonnei* 47. *Voprosy meditsinskoi khimii*. 1983;29(4):117-22.
61. Lam H-T, Josserand J, Lion N, Girault H. Modeling the isoelectric focusing of peptides in an OFFGEL multicompartiment cell. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(5):1666-76.
62. Girault HH. *Analytical and physical electrochemistry*. New York: EPFL press; 2004.
63. Raymond S, Weintraub L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*. 1959;130(3377):711.

64. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1982;6(4):317-39.
65. Harris LR, Churchward MA, Butt RH, Coorsen JR. Assessing detection methods for gel-based proteomic analyses. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(4):1418-25.
66. Miller I, Crawford J, Gianazza E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics*. 2006;6(20):5385-408.
67. Penque D. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. *Proteomics–Clinical Applications*. 2009;3(2):155-72.
68. Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in Functional Genomics*. 2006;4(4):295-320.
69. Bull P, Morgan R, Sagovsky A, Hughes G. The transfer and persistence of trace particulates: experimental studies using clothing fabrics. *Science and Justice*. 2006;46(3):185-95.
70. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
71. Chaurand P, Luetzenkirchen F, Spengler B. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1999;10(2):91-103.
72. Gygi SP, Aebersold R. Mass spectrometry and proteomics. *Current opinion in Chemical Biology*. 2000;4(5):489-94.
73. Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(21):10035-8.
74. Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003;14(9):931-42.
75. Matthiesen R. *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*. Humana Press, Totowa, New Jersey. (ISBN 978-1-58829-563-7). *Journal of Mass Spectrometry*. 2007;42(4):545.
76. Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chemical reviews*. 2001;101(2):269-96.
77. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Instrumental analysis: Brooks/Cole*, Cengage Learning Belmont; 2007.
78. Lifshitz C. Basic aspects and principles of mass spectrometry applied to biomolecules. *Mass Spectrometry Reviews*. 2003;22(3):157.

79. BİBEROĞLU G. Kütle spektrometresi ve tıp alanında kullanımı. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2003;23(6):491-8.
80. Garcia BA, Heaney PJ, Tang K. Improvement of the MALDI-TOF analysis of DNA with thin-layer matrix preparation. *Analytical Chemistry*. 2002;74(9):2083-91.
81. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*. 1988;60(20):2299-301.
82. Jensen ON, Podtelejnikov A, Mann M. Delayed extraction improves specificity in database searches by matrix-assisted laser desorption/ionization peptide maps. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1996;10(11):1371-8.
83. Krause E, Wenschuh H, Jungblut PR. The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Analytical Chemistry*. 1999;71(19):4160-5.
84. Aitken A. *The Proteomics Protocols Handbook*. Hatfield: Humana Press; 2005. Identification of proteins by MALDI-TOF MS. p. 319-24.
85. Niu S, Zhang W, Chait BT. Direct comparison of infrared and ultraviolet wavelength matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1998;9(1):1-7.
86. Beavis RC, Chait BT, Standing K. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1989;3(12):436-9.
87. Wambua DM. *Mass spectrometric methods and bioinformatics tools for accurate identification of microrna biomarkers*. Greensboro: The University of North Carolina at Greensboro; 2012.
88. Berndt P, Hobohm U, Langen H. Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*. 1999;20(18):3521-6.
89. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*. 1999;20(18):3551-67.
90. Eriksson J, Chait BT, Fenyö D. A statistical basis for testing the significance of mass spectrometric protein identification results. *Analytical Chemistry*. 2000;72(5):999-1005.
91. Clauser KR, Baker P, Burlingame AL. Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Analytical Chemistry*. 1999;71(14):2871-82.
92. Jensen ON, Podtelejnikov AV, Mann M. Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching. *Analytical Chemistry*. 1997;69(23):4741-50.

93. Ashcroft Alison. An Introduction to Mass Spectrometry. 2018. Erişim adresi: <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>.
94. De novo Peptide Sequencing. 2018. Erişim adresi: <http://www.bioinfor.com/de-novo-sequencing/>.
95. Zhang DY, Ye F, Gao L, Liu X, Zhao X, Che Y, et al. Proteomics, pathway array and signaling network-based medicine in cancer. Cell division. 2009;4(1):20- 36.
96. Kanser Nedir? 2018. Erişim adresi: <https://kanser.org/saglik/toplum/pdf/knedir.pdf>.
97. Veenstra TD, Prieto DA, Conrads TP. Proteomic patterns for early cancer detection. Drug discovery today. 2004;9(20):889-97.
98. Posadas E, Simpkins F, Liotta L, MacDonald C, Kohn E. Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer—realistic hope? Annals of oncology. 2005;16(1):16-22.
99. Shruthi BS, Palani Vinodhkumar S. Proteomics: A new perspective for cancer. Advanced Biomedical Research. 2016;5- 12.
100. Kolon kanseri. 2018. Erişim adresi: <http://www.rocheilac.com.tr/home/faaliyet-alanlari/onkoloji---hematoloji/solid-kanserler/kolorektal-kanser.html>.
101. Colorectal Cancer Risk Factors. 2018. Erişim adresi: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>.
102. Colorectal Cancer Signs and Symptoms. 2018. Erişim adresi: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-and-symptoms.html>.
103. Kalın Bağırsak Kanseri. 2018. Erişim adresi: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-turleri/kanser-turleri/363-kal%C4%B1n-ba%C4%9F%C4%B1rsak-kanseri-kolorektal-kanser.html>
104. Caco-2 hücre hattı. 2018. Erişim adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx?geo_country=tr#characteristics.
105. HT-29 hücre hattı. 2018. Erişim adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx?geo_country=tr#characteristics.
106. Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. Gastroenterology. 2004;127(5):5-16.
107. Taş A. Hepatosellüler Karsinom Tanı ve Tedavisi. 2018. Erişim adresi: <http://www.guncel.tgv.org.tr/journal/34/pdf/362.pdf>.
108. Liver EAFTSOT. EASL–EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. Journal of Hepatology. 2012;56(4):908-43.

109. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(4):378-90.
110. Karaciğer kanseri. 2018. Erişim adresi: <http://www.guncel.tgv.org.tr/journal/34/pdf/362.pdf>.
111. HepG2 hücre hattı. 2018. Erişim adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=tr#characteristics.
112. Fırat HC ve Haznedaroğlu iC. *Kanıt ve Gelenek*. İstanbul: İmmun; 2017.
113. Morgan DMI. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. In: *Polyamine protocols*. Humana Press, 1998;(79):179-184.
114. Bio-Rad protein assay. 2018. Erişim adresi: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf>.
115. Akpınar G, Kasap M, Canturk NZ, Zulfigarova M, ISLEK EE, Guler SA, et al. Proteomics analysis of tissue samples reveals changes in mitochondrial protein levels in parathyroid hyperplasia over adenoma. *Cancer Genomics-Proteomics*. 2017;14(3):197-211.
116. Hahn GM, van Kersen I. Isolation and initial characterization of thermoresistant RIF tumor cell strains. *Cancer Research*. 1988;48(7):1803-7.
117. Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *The Journal of Pathology*. 2000;192(3):280-8.
118. Nooter K, Stoter G. Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Pathology-Research and Practice*. 1996;192(7):768-80.
119. Laszlo A, Venetianer A. Heat resistance in mammalian cells: Lessons and challenges. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;851(1):169-78.
120. Geneontology. 2018. Erişim adresi: <http://geneontology.org/page/ontology-documentation>.
121. Lee S-J, Umano K, Shibamoto T, Lee K-G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. 2005;91(1):131-7.
122. Behnia M, Haghighi A, Komeylizadeh H, Tabaei S-JS, Abadi A. Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on in vitro growth of *Entamoeba histolytica*. *The Korean Journal of Parasitology*. 2008;46(3):153-6.
123. Mauricio I, Francischetti B, Monteiro RQ, Guimarães JA. Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;235(1):259-63.
124. Sheela M, Ramakrishna M, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *International Immunopharmacology*. 2006;6(3):494-8.

125. Goker H, Haznedaroglu I, Ercetin S, Kirazli S, Akman U, Ozturk Y, et al. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper®. *Journal of International Medical Research*. 2008;36(1):163-70.
126. Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive constituents: an update. *Phytotherapy Research*. 2016;30(9):1392-403.
127. Srividya A, Dhanabal S, Misra V, Suja G. Antioxidant and antimicrobial activity of *Alpinia officinarum*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;72(1):145-8.
128. Wagner H, Willer F, Kreher B. Biologically active compounds from the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Planta Medica*. 1989;55(5):452-4.
129. Tahri A, Yamani S, Legssyer A, Aziz M, Mekhfi H, Bnouham M, et al. Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;73(1-2):95-100.
130. Testai L, Chericoni S, Calderone V, Nencioni G, Nieri P, Morelli I, et al. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L.(Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002;81(1):105-9.
131. Ercetin S, Haznedaroglu IC, Mevlut K, AKTAS A, GOKER H, OZDEMIR O, et al. Safety and efficacy of Ankaferd Blood Stopper in dental surgery. *International Journal of Hematology and Oncology*. 2010;27(4):001-5.
132. Huri E, Haznedaroglu IC, Akgul T, Astarci M, Ustun H, Germiyanoulu C. Biphasic effects of ankaferd blood stopper on renal tubular apoptosis in the rat partial nephrectomy model representing distinct levels of hemorrhage. *Saudi Medical Journal*. 2010;31(8):864-8.
133. Teker AM, Korkut AY, Gedikli O, Kahya V. Prospective, controlled clinical trial of Ankaferd Blood Stopper in children undergoing tonsillectomy. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2009;73(12):1742-5.
134. Teker AM, Korkut AY, Kahya V, Gedikli O. Prospective, randomized, controlled clinical trial of Ankaferd Blood Stopper in patients with acute anterior epistaxis. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2010;267(9):1377-81.
135. Kelles M, Kalcioglu MT, Samdanci E, Selimoglu E, Iraz M, Miman MC, et al. Ankaferd Blood Stopper is more effective than adrenaline plus lidocaine and gelatin foam in the treatment of epistaxis in rabbits. *Current Therapeutic Research*. 2011;72(5):185-94.
136. Iynen I, Bozkus F, San I, Alatas N. The hemostatic efficacy of Ankaferd Blood Stopper in adenoidectomy. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2011;75(10):1292-5.

137. Kurt M, Disibeyaz S, Akdogan M, Sasmaz N, Aksu S, Haznedaroglu İC. Endoscopic application of ankaferd blood stopper as a novel experimental treatment modality for upper gastrointestinal bleeding: a case report. *The American Journal of Gastroenterology*. 2008;103(8):2156-8.
138. Kurt M, Kacar S, Onal I, Akdogan M, Haznedaroglu I. Ankaferd Blood Stopper as an effective adjunctive hemostatic agent for the management of life-threatening arterial bleeding of the digestive tract. *Endoscopy*. 2008;40(2):E262.
139. Ibis M, Kurt M, Onal IK, Haznedaroglu IC. Successful management of bleeding due to solitary rectal ulcer via topical application of Ankaferd blood stopper. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2008;14(9):1073-4.
140. Cipil HS, Kosar A, Kaya A, Uz B, Haznedaroglu IC, Goker H, et al. In vivo hemostatic effect of the medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper in rats pretreated with warfarin. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2009;15(3):270-6.
141. Mihmanli A, Ulker Z, Alpsoy L, Ezirganli S. Evaluation of cytotoxicity of a new hemostatic agent Ankaferd Blood Stopper® using different assays. *Human & Experimental Toxicology*. 2012;31(8):780-7.
142. Karabiyik A, Yilmaz E, Güleç Ş, Haznedaroğlu İ, Akar N. The dual diverse dynamic reversible effects of Ankaferd blood stopper on EPCR and PAI-1 inside vascular endothelial cells with and without LPS challenge. *Turkish Journal of Haematology*. 2012;29(4):361-6.
143. Kalcioğlu MT, Bayindir T, Iraz M, Kaya S, Can S. The Effects of a New Hemostatic Agent on Hearing in Rats. *Journal of International Advanced Otolaryngology*. 2010;6(2):155-9.
144. Demiralp DÖ, Haznedaroğlu İC, Akar N. Functional proteomic analysis of Ankaferd Blood Stopper. *Turkish Journal of Hematology*. 2010;27(2):70-77.
145. Villa A, Villa C, Abati S. Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians. *Australian Dental Journal*. 2011;56(3):253-6.
146. Ozle M, Çankal DAU, İlhan M, Keleş H, Akkol EK. Evaluation of the chemopreventive effects of Ankaferd Bloodstopper in 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced oral epithelial dysplasia. *Clinical Oral Investigations*. 2018;1-6.
147. Mourad FH, Leong RW. Role of hemostatic powders in the management of lower gastrointestinal bleeding: A review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018.
148. Chen Y-I, Barkun AN, Soulellis C, Mayrand S, Ghali P. Use of the endoscopically applied hemostatic powder TC-325 in cancer-related upper GI hemorrhage: preliminary experience (with video). *Gastrointestinal Endoscopy*. 2012;75(6):1278-81.

149. Kurt M, Akdogan M, Onal IK, Kekilli M, Arhan M, Shorbagi A, et al. Endoscopic topical application of Ankaferd Blood Stopper for neoplastic gastrointestinal bleeding: A retrospective analysis. *Digestive and Liver Disease*. 2010;42(3):196-9.
150. Zulfikar OB, Emiroglu HH, Kebudi R. Nasogastric application of topical Ankaferd Blood Stopper for bleeding from primary esophageal adenocarcinoma in a child with disseminated intravascular coagulation. *Digestive and Liver Disease*. 2011;43(3):247-8.
151. Turhan N, Kurt M, Shorbagi A, Akdogan M, Haznedaroglu IC. Topical Ankaferd Blood Stopper administration to bleeding gastrointestinal carcinomas decreases tumor vascularization. *The American Journal of Gastroenterology*. 2009;104(11):2874-7.
152. Patiroğlu T, Şahin NE, Ünal E, Kendirci M, Karakükcü M, Özdemir MA. Effectiveness of Ankaferd BloodStopper in Prophylaxis and Treatment of Oral Mucositis in Childhood Cancers Evaluated with Plasma Citrulline Levels. *Turkish Journal of Hematology*. 2018;35(1):75-93.
153. Uzun O, İnce O, Bakalov V, Tuna T. Massive hemoptysis due to welding fumes. *Respiratory Medicine Case Reports*. 2012;5:1-3.
154. Karaman K, Bostanci EB, Ercan M, Kurt M, Teke Z, Reyhan E, et al. Topical Ankaferd application to presacral bleeding due to total mesorectal excision in rectal carcinoma. *Journal of Investigative Surgery*. 2010;23(3):175.
155. Turk S, Malkan UY, Ghasemi M, Hocaoglu H, Mutlu D, Gunes G, et al. Growth inhibitory activity of Ankaferd hemostat on primary melanoma cells and cell lines. *SAGE Open Medicine*. 2017;5:1-7.
156. Goker H, Cetinkaya D, Kilic E, Haznedaroglu I, Kirazli S, Firat H. Anti-cancer activity of ankaferd blood stopper on osteosarcom (SAOS-2) cell lines in vitro. *Ankaferd: Scientific perspectives and basic-clinical data Istanbul, Naviga Publications*. 2008;109.
157. Akalin I, Fatma V, Haznedaroglu IC, Sayinalp N, Salih A, Buyukasik Y, et al. Acute in vitro effects of ABS (Ankaferd Hemostat) on the lymphoid neoplastic cells (B-CLL and RAJI tumor cell lines). *International Journal of Hematology and Oncology*. 2014;27(4):253-9.
158. Mumcuoglu M, Akin DF, Ezer U, Akar N. Ankaferd Blood Stopper induces apoptosis and regulates PAR1 and EPCR expression in human leukemia cells. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2015;16(1):19-27.
159. Odabaş ME, Ertürk M, Çınar Ç, Tüzüner T, Tulunoğlu Ö. Cytotoxicity of a new hemostatic agent on human pulp fibroblasts in vitro. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2011;16(4):e584-7.
160. Yılmaz E, Güleç Ş, Torun D, Haznedaroglu İC, Akar N. The effects of Ankaferd® Blood Stopper on transcription factors in HUVEC and the erythrocyte protein profile. *Turkish Journal of Hematology*. 2011;28(4):276-85.

161. Koçak E. Caco2 Kolon Kanseri Hücrelerinde Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-kütle Spektroskopisi Bazlı Proteomik Çalışmalar. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2017.
162. String. 2018 . Erişim adresi:
<https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=rO2JnMROj8pv>.
163. Qucikgo 2018. Erişim adresi: <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>.
164. Kegg. 2018 . Erişim adresi:
https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map04145
165. Sun Z, Liu F. Association of Nox1 and vinculin with colon cancer progression. *Cancer Investigation*. 2013;31(4):273-8.
166. Kang R, Zhang Q, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? *Clinical Cancer Research*. 2013;19(15):4046-57.
167. De Visser KE, Coussens LM. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Infection and Inflammation: Impacts on Oncogenesis*. 13: Karger Publishers; 2006:118-37.
168. Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *The Journal of Cell Biology*. 2004;164(3):441-9.
169. Schlueter C, Weber H, Meyer B, Rogalla P, Röser K, Hauke S, et al. Angiogenic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenic switch molecule. *The American Journal of Pathology*. 2005;166(4):1259-63.
170. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005;78(1):1-8.
171. Tang D, Kang R, Zeh III HJ, Lotze MT. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2010;1799(1-2):131-40.
172. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(6):453-8.
173. Barbera-Guillem E, Nyhus JK, Wolford CC, Friece CR, Sampsel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Research*. 2002;62(23):7042-9.
174. Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(16):1146-51.

175. Kuniyasu H, Sasaki T, Sasahira T, Ohmori H, Takahashi T. Depletion of tumor-infiltrating macrophages is associated with amphoterin expression in colon cancer. *Pathobiology*. 2004;71(3):129-36.
176. Moriwaka Y, Luo Y, Ohmori H, Fujii K, Tatsumoto N, Sasahira T, et al. HMGB1 attenuates anti-metastatic defense of the lymph nodes in colorectal cancer. *Pathobiology*. 2010;77(1):17-23.
177. Geiger B. A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell*. 1979;18(1):193-205.
178. Carisey A, Ballestrem C. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *European Journal of Cell Biology*. 2011;90(2-3):157-63.
179. Lifschitz-Mercer B, Czernobilsky B, Feldberg E, Geiger B. Expression of the adherens junction protein vinculin in human basal and squamous cell tumors: relationship to invasiveness and metastatic potential. *Human Pathology*. 1997;28(11):1230-6.
180. Lafrenie RM, Buchanan MR, Orr FW. Adhesion molecules and their role in cancer metastasis. *Cell Biophysics*. 1993;23(1-3):3-89.
181. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annual Review of Cell Biology*. 1993;9(1):541-73.
182. Ben-Ze'ev A, Fernández JLR, Glück U, Salomon D, Geiger B. Changes in adhesion plaque protein levels regulate cell motility and tumorigenicity. *Actin*: Springer; 1994. p. 147-57.
183. Kemperman H, Driessens M, La GR, Meijne A, Roos E. Adhesion mechanisms in liver metastasis formation. *Cancer Surveys*. 1995;24:67-79.

8. EKLER

Ek-1. Ankaferd Hemostat' in Muamelesiyle HepG2 Hücrelerinde Peptid Dizileme ve De Novo ile Farklılaşan Proteinlerin Tanımlanması

Heterojen nükleer ribonükleoprotein F proteininin HSGPNSADSANDGFVR peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu

MS/MS Fragmentation of **HSGPNSADSANDGFVR**

Found in **HNRPF_HUMAN**, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3

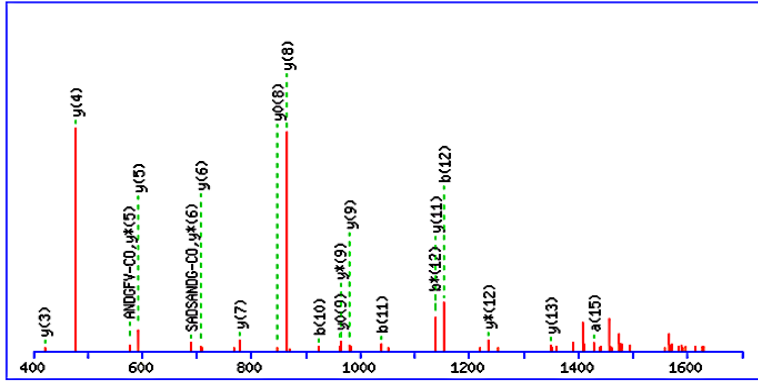
Match to Query 67: 1629.749194 from(1630.756470,1+) intensity(0.0000) index(9)

Title: Locus:1.P2.2.1.10

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Monoisotopic mass of neutral peptide $M_r(\text{calc})$: 1629.7132

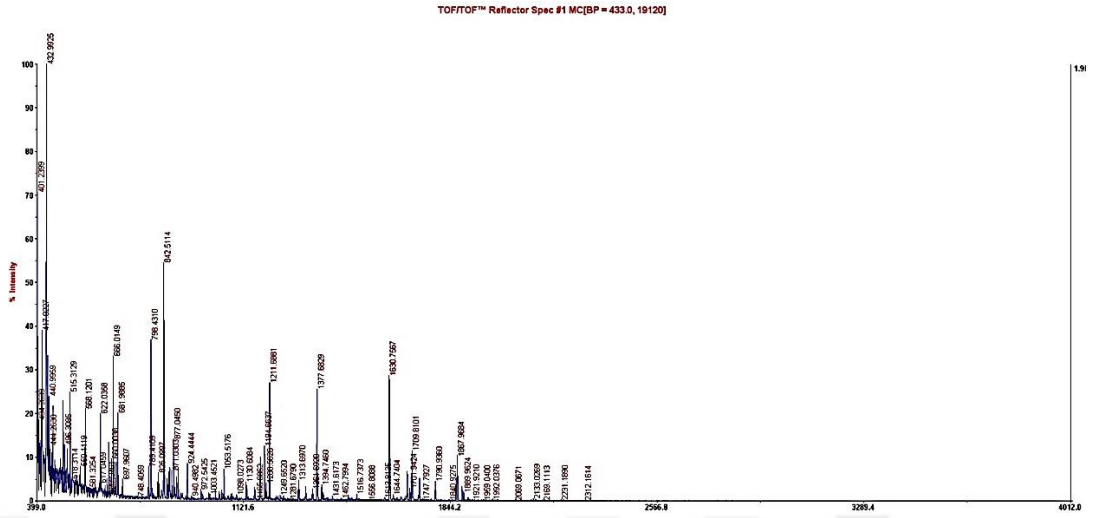
Ions Score: 52 Expect: 0.00023

Matches : 22/288 fragment ions using 37 most intense peaks [\(help\)](#)

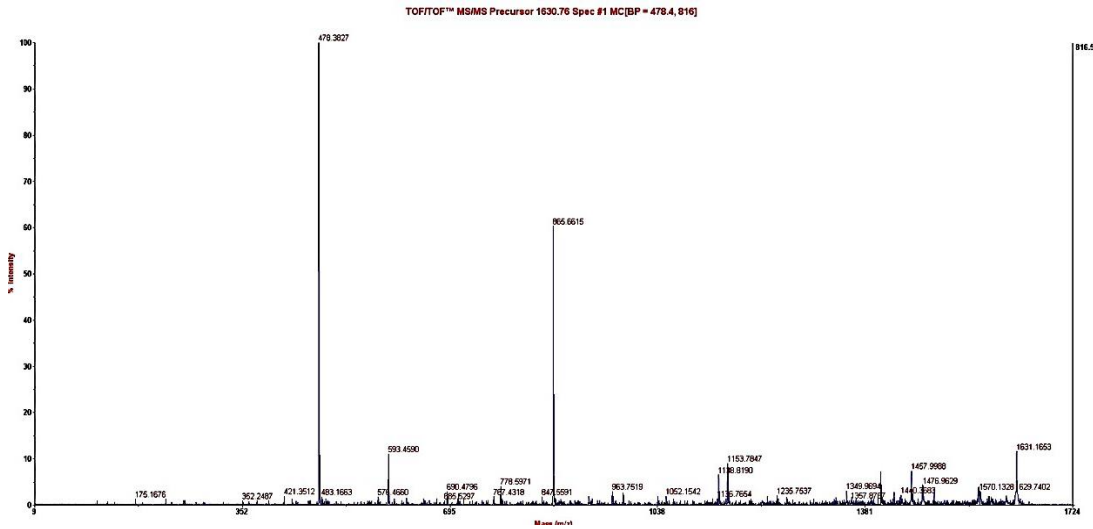
Heterojen nükleer ribonükleoprotein F proteininin HSGPNSADSANDGFVR peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	w	y	y*	y ⁰	#
1	110.0713	110.0713			138.0662			H						16
2	60.0444	197.1033		179.0927	225.0982		207.0877	S	1461.6353	1460.6401	1493.6615	1476.6350	1475.6510	15
3	30.0338	254.1248		236.1142	282.1197		264.1091	G			1406.6295	1389.6029	1388.6189	14
4	70.0651	351.1775		333.1670	379.1724		361.1619	P	1307.5611	1306.5658	<i>1349.6080</i>	1332.5815	1331.5975	13
5	87.0553	465.2205	448.1939	447.2099	493.2154	476.1888	475.2048	N	1193.5182	1192.5229	1252.5553	1235.5287	1234.5447	12
6	60.0444	552.2525	535.2259	534.2419	580.2474	563.2209	562.2368	S	1106.4861	1105.4909	<i>1138.5123</i>	1121.4858	1120.5018	11
7	44.0495	623.2896	606.2630	605.2790	651.2845	634.2580	633.2739	A	1035.4490		1051.4803	1034.4538	1033.4697	10
8	88.0393	738.3165	721.2900	720.3060	766.3115	749.2849	748.3009	D	920.4221	919.4268	<i>980.4432</i>	963.4167	962.4326	9
9	60.0444	825.3486	808.3220	807.3380	853.3435	836.3169	835.3329	S	833.3900	832.3948	<i>865.4163</i>	848.3897	847.4057	8
10	44.0495	896.3857	879.3591	878.3751	<i>924.3806</i>	907.3540	906.3700	A	762.3529		<i>778.3842</i>	761.3577	760.3737	7
11	87.0553	1010.4286	993.4021	992.4180	<i>1038.4235</i>	1021.3970	1020.4130	N	648.3100	647.3148	<i>707.3471</i>	690.3206	689.3365	6
12	88.0393	1125.4556	1108.4290	1107.4450	<i>1153.4505</i>	1136.4239	1135.4399	D	533.2831	532.2878	<i>593.3042</i>	576.2776	575.2936	5
13	30.0338	1182.4770	1165.4505	1164.4665	1210.4719	1193.4454	1192.4614	G			<i>478.2772</i>	461.2507		4
14	120.0808	1329.5454	1312.5189	1311.5349	1357.5403	1340.5138	1339.5298	F	329.1932		<i>421.2558</i>	404.2292		3
15	72.0808	1428.6138	1411.5873	1410.6033	1456.6088	1439.5822	1438.5982	V	230.1248	243.1452	274.1874	257.1608		2
16	129.1135							R	74.0237	73.0284	175.1190	158.0924		1

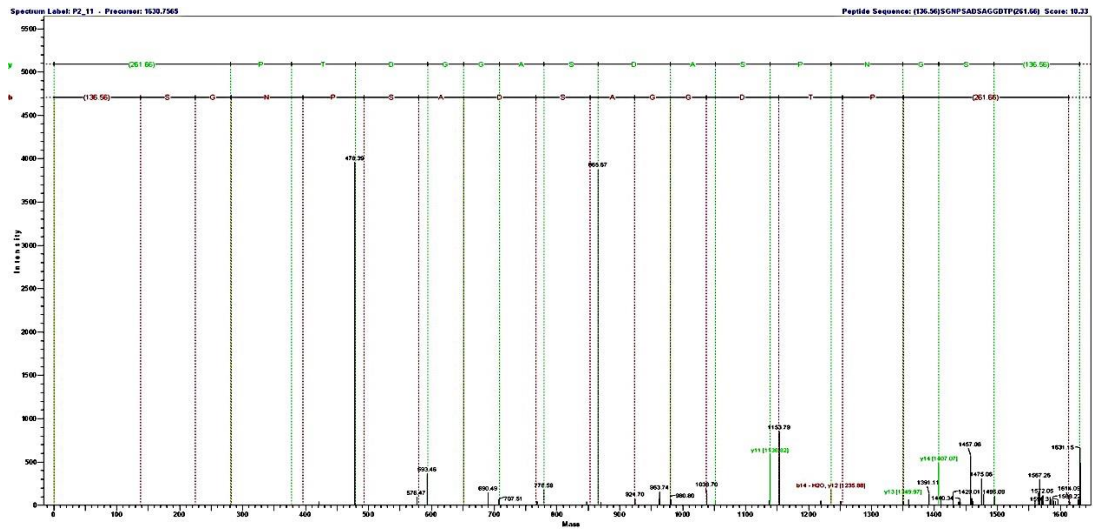
Heterojen nükleer ribonükleoprotein F proteinine ait MS spektrumu



1630.76 m/z değerli precursor iyonuna ait MS/MS spektrumu



1630.76 m/z değerli precursor iyonuna ait De Novo amino asit dizisi



Keratin tip I sitoskeletal 10 proteininin LKYENEVALR peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu

MS/MS Fragmentation of **LKYENEVALR**

Found in **K1C10_HUMAN**, Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6

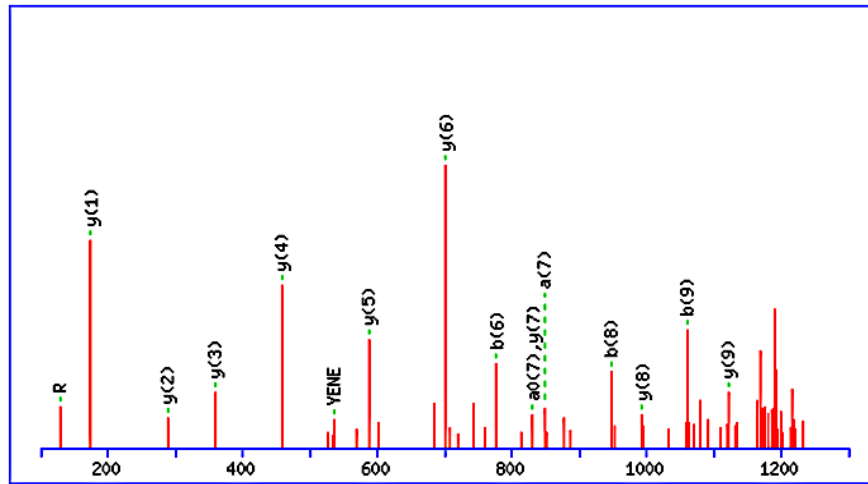
Match to Query 37: 1233.667774 from(1234.675050,1+) intensity(0.0000) index(8)

Title: Locus:1.P3.2.1.9

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Monoisotopic mass of neutral peptide $M_r(\text{calc})$: 1233.6717

Ions Score: 73 Expect: 2.7e-006

Matches : 16/142 fragment ions using 22 most intense peaks ([help](#))

Keratin tip I sitoskeletal 10 proteininin LKYENEVALR peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	w	y	y*	y ⁰	#
1	86.0964	86.0964			114.0913			L						10
2	101.1073	214.1914	197.1648		242.1863	225.1598		K	1048.5058	1047.5106	1121.5949	1104.5684	1103.5844	9
3	136.0757	377.2547	360.2282		405.2496	388.2231		Y	885.4425		993.5000	976.4734	975.4894	8
4	102.0550	506.2973	489.2708	488.2867	534.2922	517.2657	516.2817	E	756.3999	755.4046	830.4367	813.4101	812.4261	7
5	87.0553	620.3402	603.3137	602.3297	648.3352	631.3086	630.3246	N	642.3570	641.3617	701.3941	684.3675	683.3835	6
6	102.0550	749.3828	732.3563	731.3723	777.3777	760.3512	759.3672	E	513.3144	512.3191	587.3511	570.3246	569.3406	5
7	72.0808	848.4512	831.4247	830.4407	876.4462	859.4196	858.4356	V	414.2459	427.2663	458.3085	441.2820		4
8	44.0495	919.4884	902.4618	901.4778	947.4833	930.4567	929.4727	A	343.2088		359.2401	342.2136		3
9	86.0964	1032.5724	1015.5459	1014.5619	1060.5673	1043.5408	1042.5568	L	230.1248	229.1295	288.2030	271.1765		2
10	129.1135							R	74.0237	73.0284	175.1190	158.0924		1

Uzama faktörü 2 proteininin CLYASVLTAQPR peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu

MS/MS Fragmentation of **CLYASVLTAQPR**

Found in **EF2_HUMAN**, Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4

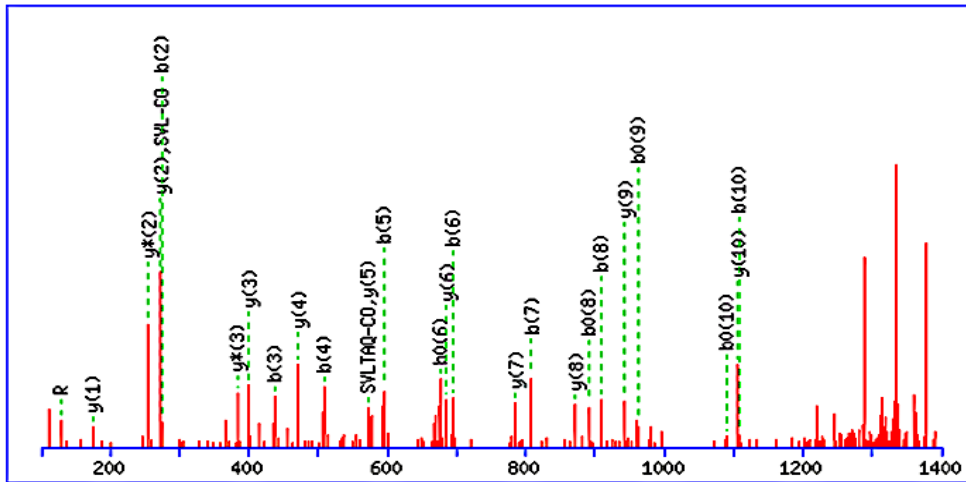
Match to Query 56: 1377.729664 from(1378.736940,1+) intensity(0.0000) index(9)

Title: Locus:1.P4.2.1.10

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Monoisotopic mass of neutral peptide $M_r(\text{calc})$: 1377.7075

Variable modifications:

C1 : Carbamidomethyl (C)

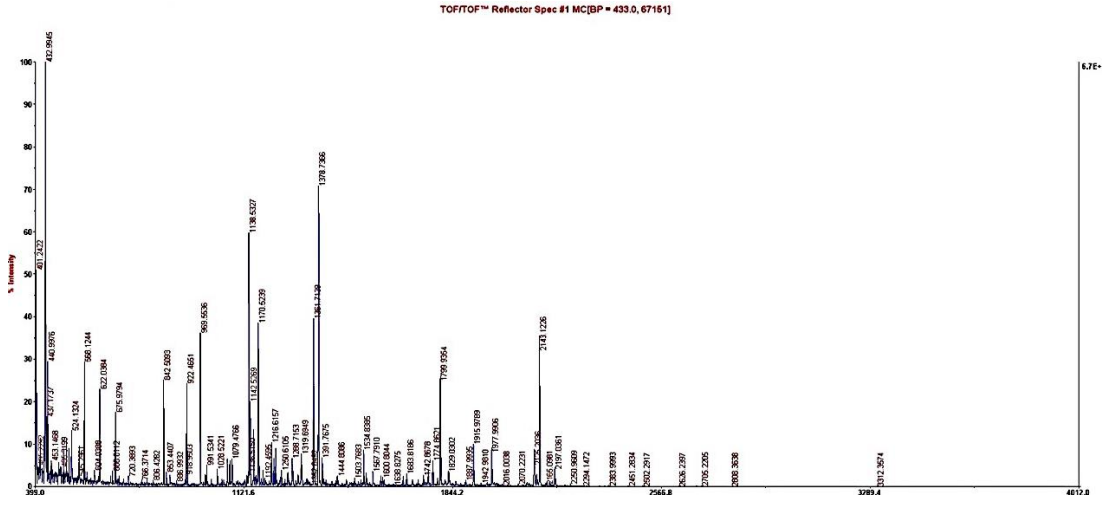
Ions Score: 74 Expect: 1.9e-006

Matches : 27/176 fragment ions using 39 most intense peaks ([help](#))

Uzama faktörü 2 proteinin CLYASVLTAQPR peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	w	w'	y	y*	y ⁰	#
1	133.0430	133.0430			161.0379			C							12
2	86.0964	246.1271			274.1220			L	1160.6058	1159.6106		1218.6841	1201.6576	1200.6735	11
3	136.0757	409.1904			437.1853			Y	997.5425			1105.6000	1088.5735	1087.5895	10
4	44.0495	480.2275			508.2224			A	926.5054			942.5367	925.5102	924.5261	9
5	60.0444	567.2595		549.2490	595.2545		577.2439	S	839.4734	838.4781		871.4996	854.4730	853.4890	8
6	72.0808	666.3280		648.3174	694.3229		676.3123	V	740.4050	753.4254		784.4676	767.4410	766.4570	7
7	86.0964	779.4120		761.4015	807.4069		789.3964	L	627.3209	626.3257		685.3992	668.3726	667.3886	6
8	74.0600	880.4597		862.4491	908.4546		890.4441	T	526.2732	539.2936	541.2729	572.3151	555.2885	554.3045	5
9	44.0495	951.4968		933.4863	979.4917		961.4812	A	455.2361			471.2674	454.2409		4
10	101.0709	1079.5554	1062.5288	1061.5448	1107.5503	1090.5238	1089.5397	Q	327.1775	326.1823		400.2303	383.2037		3
11	70.0651	1176.6082	1159.5816	1158.5976	1204.6031	1187.5765	1186.5925	P	230.1248	229.1295		272.1717	255.1452		2
12	129.1135							R	74.0237	73.0284		175.1190	158.0924		1

Uzama faktörü 2 proteinine ait MS spektrumu



Isı şok proteini 70 kDa 1A / 1B proteininin IINEPTAAAIAYGLDR peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu

MS/MS Fragmentation of **IINEPTAAAIAYGLDR**

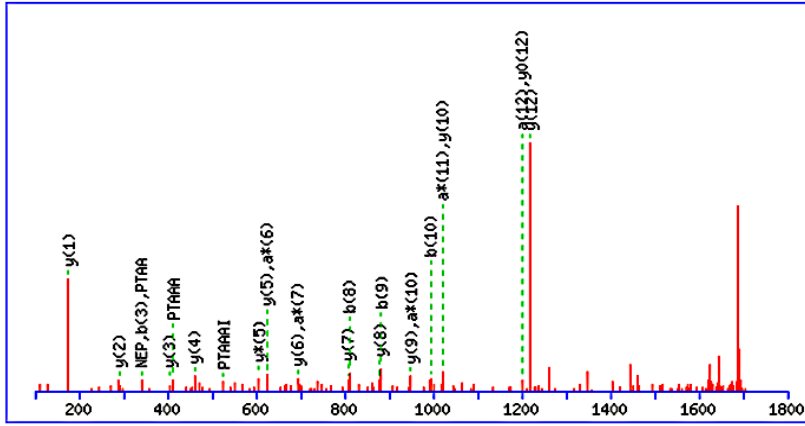
Found in **HSP71_HUMAN**, Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5

Match to Query 70: 1686.902394 from(1687.909670,1+) intensity(0.0000) index(8)
Title: Locus:1.P5.2.1.9

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Monoisotopic mass of neutral peptide $M_r(\text{calc})$: 1686.8940

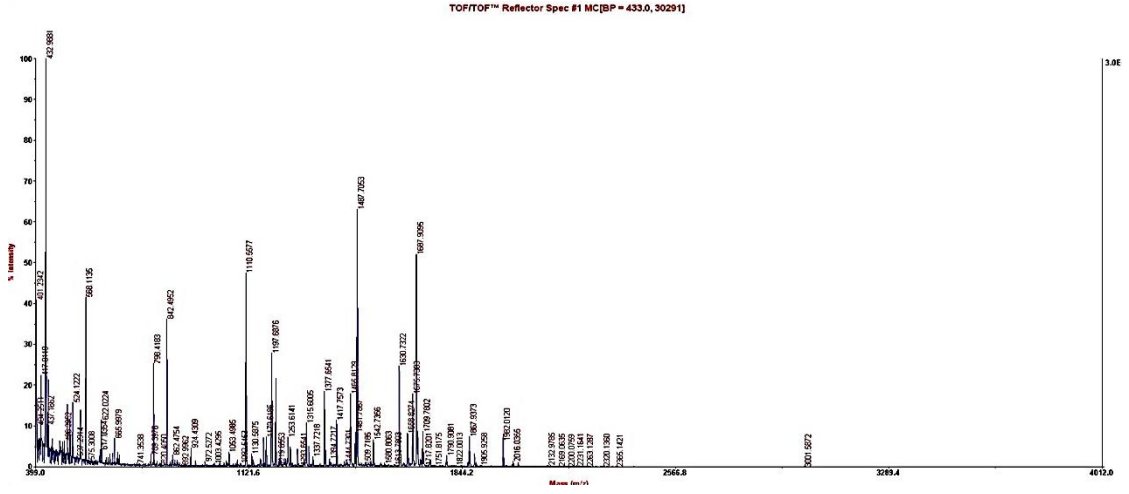
Ions Score: 82 Expect: 3.5e-007

Matches : 26/293 fragment ions using 32 most intense peaks [\(help\)](#)

Isı şok proteini 70 kDa 1A / 1B proteinin IINEPTAAAIAYGLDR peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	w	w'	y	y*	y ⁰	#
1	86.0964	86.0964			114.0913			I							16
2	86.0964	199.1805			227.1754			I	1516.7390	1529.7595	1543.7751	1574.8173	1557.7908	1556.8067	15
3	87.0553	313.2234	296.1969		341.2183	324.1918		N	1402.6961	1401.7009		1461.7332	1444.7067	1443.7227	14
4	102.0550	442.2660	425.2395	424.2554	470.2609	453.2344	452.2504	E	1273.6535	1272.6583		1347.6903	1330.6638	1329.6797	13
5	70.0651	539.3188	522.2922	521.3082	567.3137	550.2871	549.3031	P	1176.6008	1175.6055		1218.6477	1201.6212	1200.6371	12
6	74.0600	640.3665	623.3399	622.3559	668.3614	651.3348	650.3508	T	1075.5531	1088.5735	1090.5528	1121.5950	1104.5684	1103.5844	11
7	44.0495	711.4036	694.3770	693.3930	739.3985	722.3719	721.3879	A	1004.5160			1020.5473	1003.5207	1002.5367	10
8	44.0495	782.4407	765.4141	764.4301	810.4356	793.4090	792.4250	A	933.4789			949.5102	932.4836	931.4996	9
9	44.0495	853.4778	836.4512	835.4672	881.4727	864.4462	863.4621	A	862.4417			878.4730	861.4465	860.4625	8
10	86.0964	966.5619	949.5353	948.5513	994.5568	977.5302	976.5462	I	749.3577	762.3781	776.3937	807.4359	790.4094	789.4254	7
11	44.0495	1037.5990	1020.5724	1019.5884	1065.5939	1048.5673	1047.5833	A	678.3206			694.3519	677.3253	676.3413	6
12	136.0757	1200.6623	1183.6358	1182.6517	1228.6572	1211.6307	1210.6467	Y	515.2572			623.3148	606.2882	605.3042	5
13	30.0338	1257.6838	1240.6572	1239.6732	1285.6787	1268.6521	1267.6681	G				460.2514	443.2249	442.2409	4
14	86.0964	1370.7678	1353.7413	1352.7573	1398.7627	1381.7362	1380.7522	L	345.1517	344.1565		403.2300	386.2034	385.2194	3
15	88.0393	1485.7948	1468.7682	1467.7842	1513.7897	1496.7631	1495.7791	D	230.1248	229.1295		290.1459	273.1193	272.1353	2
16	129.1135							R	74.0237	73.0284		175.1190	158.0924		1

Isı şok proteini 70 kDa 1A / 1B proteinine ait MS spektrumu



Proteazom subunit alfa tip 5 proteininin LFQVEYAIEAIK peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu

MS/MS Fragmentation of **LFQVEYAIEAIK**

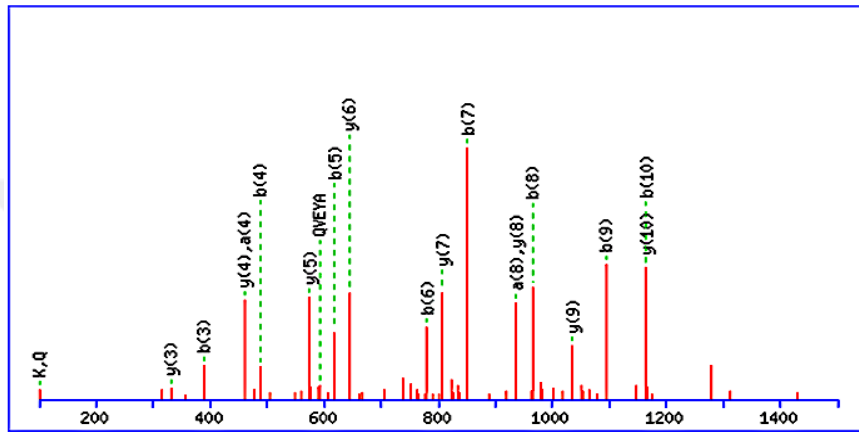
Found in **PSA5_HUMAN**, Proteasome subunit alpha type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMA5 PE=1 SV=3

Match to Query 65: 1422.756514 from(1423.763790,1+) intensity(0.0000) index(7)
Title: Locus:1.P6.2.1.8

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1422.7758

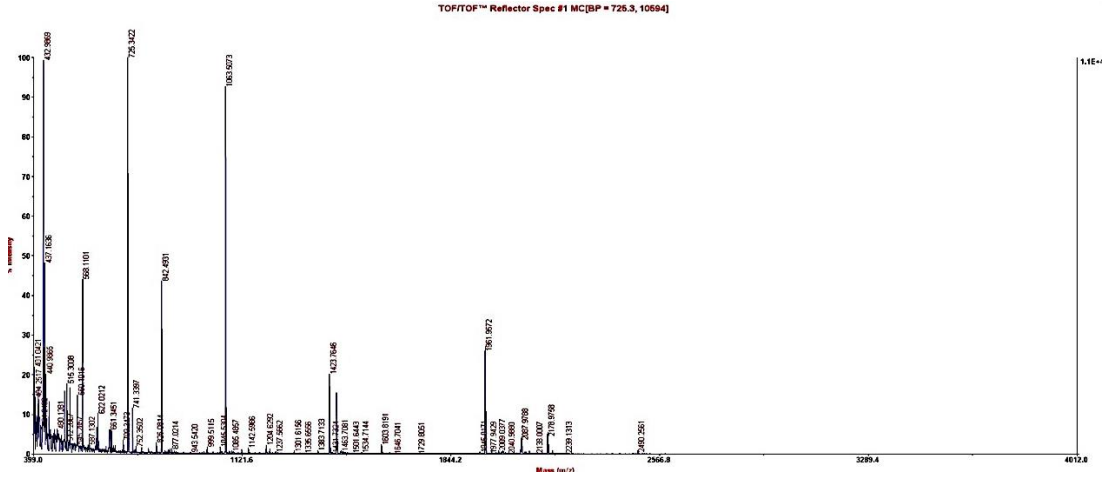
Ions Score: 82 Expect: 3.2e-007

Matches: 21/162 fragment ions using 21 most intense peaks [\(help\)](#)

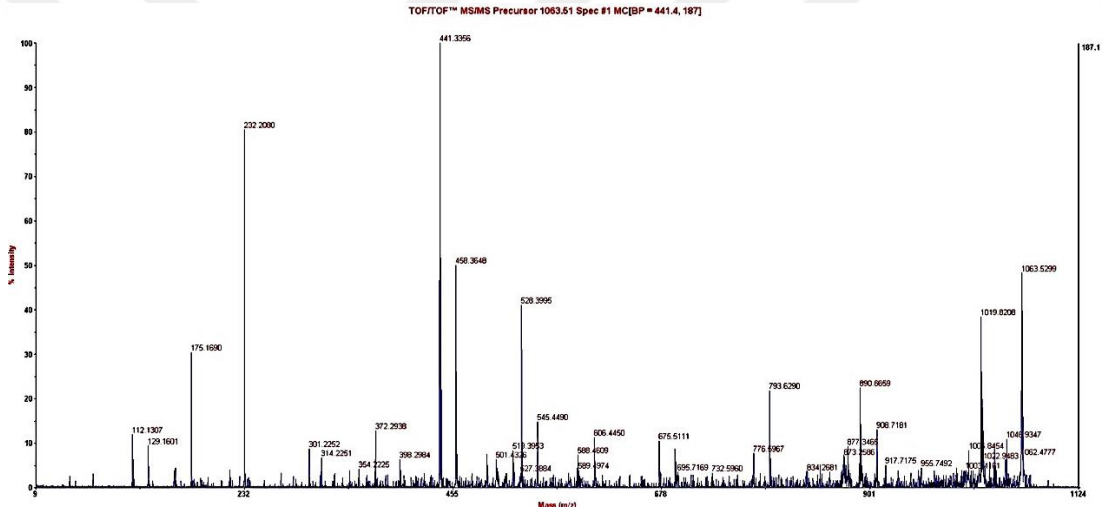
Proteazom subunit alfa tip 5 proteinin LFQVEYAIEAIK peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	y	y*	y ⁰	#
1	86.0964	86.0964			114.0913			L				12
2	120.0808	233.1648			261.1598			F	1310.6991	1293.6725	1292.6885	11
3	101.0709	361.2234	344.1969		389.2183	372.1918		Q	1163.6307	1146.6041	1145.6201	10
4	72.0808	460.2918	443.2653		488.2867	471.2602		V	1035.5721	1018.5455	1017.5615	9
5	102.0550	589.3344	572.3079	571.3239	617.3293	600.3028	599.3188	E	936.5037	919.4771	918.4931	8
6	136.0757	752.3978	735.3712	734.3872	780.3927	763.3661	762.3821	Y	807.4611	790.4345	789.4505	7
7	44.0495	823.4349	806.4083	805.4243	851.4298	834.4032	833.4192	A	644.3978	627.3712	626.3872	6
8	86.0964	936.5189	919.4924	918.5084	964.5138	947.4873	946.5033	I	573.3606	556.3341	555.3501	5
9	102.0550	1065.5615	1048.5350	1047.5510	1093.5564	1076.5299	1075.5459	E	460.2766	443.2500	442.2660	4
10	44.0495	1136.5986	1119.5721	1118.5881	1164.5936	1147.5670	1146.5830	A	331.2340	314.2074		3
11	86.0964	1249.6827	1232.6562	1231.6721	1277.6776	1260.6511	1259.6671	I	260.1969	243.1703		2
12	101.1073							K	147.1128	130.0863		1

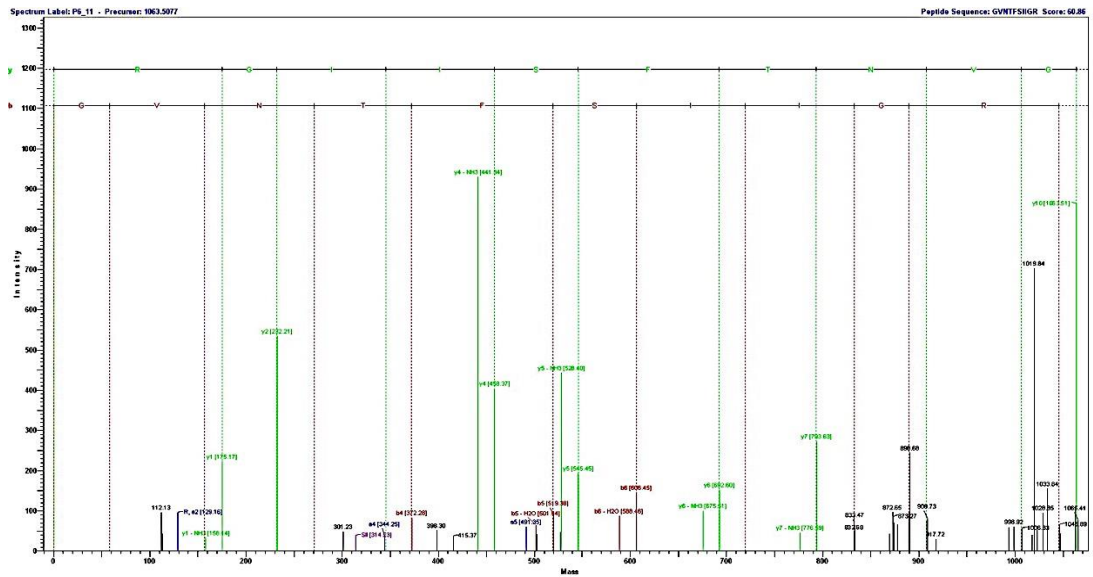
Proteazom subunité alfa tip 5 proteinine ait MS spektrumu



1063.51 m/z değerli precursor iyonu ait MS/MS spektrumu



1063.51 m/z değerli precursor iyonu ait De Novo amino asit dizisi



Tropomiyosin alfa-3 zinciri proteininin IQLVEEELDR peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu

MS/MS Fragmentation of **IQLVEEELDR**

Found in **TPM3_HUMAN**, Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=1 SV=1

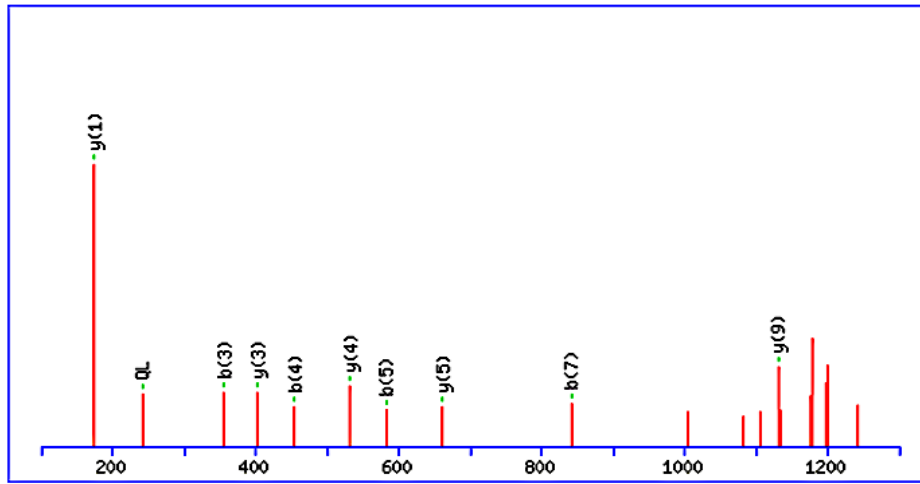
Match to Query 60: 1242.626754 from(1243.634030,1+) intensity(0.0000) index(9)

Title: Locus:1.P8.2.1.10

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Monoisotopic mass of neutral peptide $M_r(\text{calc})$: 1242.6456

Ions Score: 50 Expect: 0.00051

Matches : 11/144 fragment ions using 14 most intense peaks ([help](#))

Tropomiyosin alfa-3 zinciri proteininin IQLVEEELDR peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	w	y	y*	y ⁰	#
1	86.0964	86.0964			114.0913			I						10
2	101.0709	214.1550	197.1285		242.1499	225.1234		Q	1057.5160	1056.5208	1130.5688	1113.5422	1112.5582	9
3	86.0964	327.2391	310.2125		355.2340	338.2074		L	944.4320	943.4367	1002.5102	985.4837	984.4997	8
4	72.0808	426.3075	409.2809		454.3024	437.2758		V	845.3636	858.3840	889.4262	872.3996	871.4156	7
5	102.0550	555.3501	538.3235	537.3395	583.3450	566.3184	565.3344	E	716.3210	715.3257	790.3577	773.3312	772.3472	6
6	102.0550	684.3927	667.3661	666.3821	712.3876	695.3610	694.3770	E	587.2784	586.2831	661.3151	644.2886	643.3046	5
7	102.0550	813.4353	796.4087	795.4247	841.4302	824.4036	823.4196	E	458.2358	457.2405	532.2726	515.2460	514.2620	4
8	86.0964	926.5193	909.4928	908.5088	954.5142	937.4877	936.5037	L	345.1517	344.1565	403.2300	386.2034	385.2194	3
9	88.0393	1041.5463	1024.5197	1023.5357	1069.5412	1052.5146	1051.5306	D	230.1248	229.1295	290.1459	273.1193	272.1353	2
10	129.1135							R	74.0237	73.0284	175.1190	158.0924		1

UV eksizyonu onarım proteininin NFVVVMVTKPK peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu

MS/MS Fragmentation of **NFVVVMVTKPK**

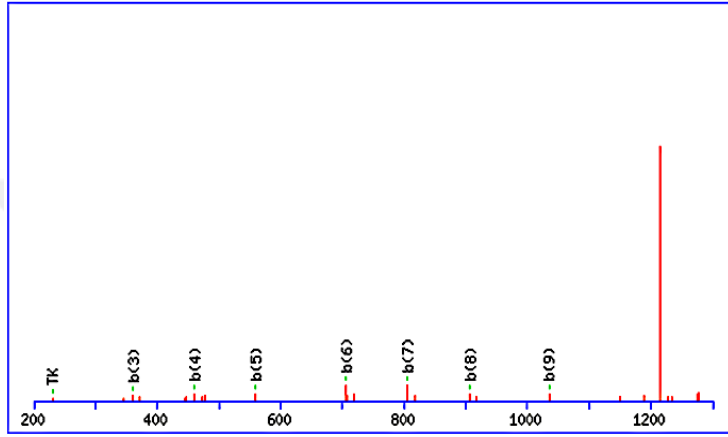
Found in **RD23B_HUMAN**, UV excision repair protein RAD23 homolog B OS=Homo sapiens GN=RAD23B PE=1 SV=1

Match to Query 64: 1276.694874 from(1277.702150,1+) intensity(0.0000) index(1)
Title: Locus:1.P9.2.1.2

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1276.7213

Variable modifications:

M6 : Oxidation (M), with neutral losses 0.0000 (shown in table), 63.9983

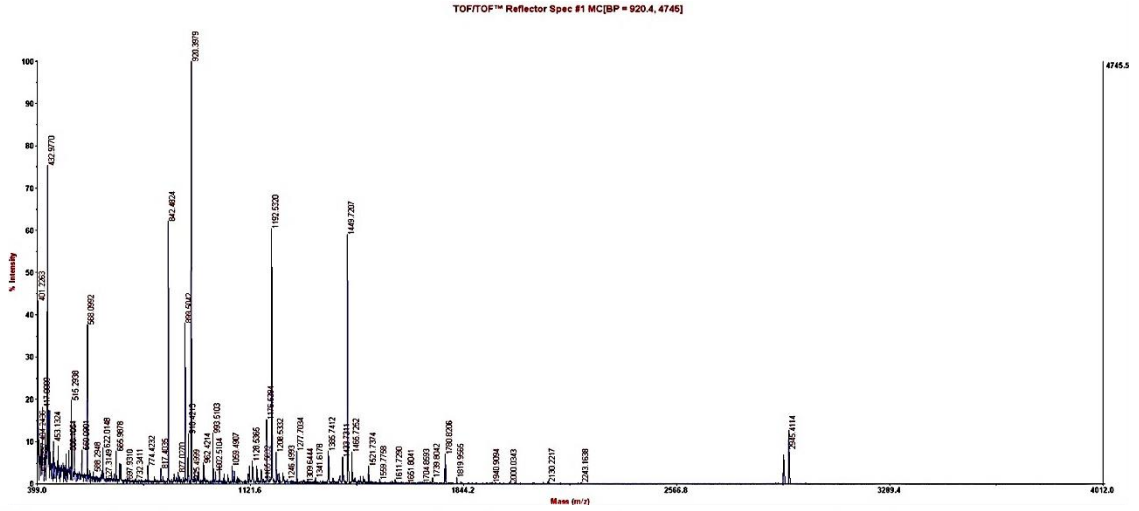
Ions Score: 58 Expect: 7e-005

Matches : 8/222 fragment ions using 10 most intense peaks ([help](#))

UV eksizyonu onarım proteininin NFVVVMVTKPK peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	y	y*	y ⁰	#
1	87.0553	87.0553	70.0287		115.0502	98.0237		N				11
2	120.0808	234.1237	217.0972		262.1186	245.0921		F	1163.6857	1146.6591	1145.6751	10
3	72.0808	333.1921	316.1656		<i>361.1870</i>	344.1605		V	1016.6173	999.5907	998.6067	9
4	72.0808	432.2605	415.2340		<i>460.2554</i>	443.2289		V	917.5489	900.5223	899.5383	8
5	72.0808	531.3289	514.3024		<i>559.3239</i>	542.2973		V	818.4804	801.4539	800.4699	7
6	120.0478	678.3643	661.3378		<i>706.3593</i>	689.3327		M	719.4120	702.3855	701.4015	6
7	72.0808	777.4328	760.4062		<i>805.4277</i>	788.4011		V	572.3766	555.3501	554.3661	5
8	74.0600	878.4804	861.4539	860.4699	<i>906.4754</i>	889.4488	888.4648	T	473.3082	456.2817	455.2976	4
9	101.1073	1006.5754	989.5489	988.5648	<i>1034.5703</i>	1017.5438	1016.5598	K	372.2605	355.2340		3
10	70.0651	1103.6282	1086.6016	1085.6176	1131.6231	1114.5965	1113.6125	P	244.1656	227.1390		2
11	101.1073							K	147.1128	130.0863		1

UV eksizyonu onarım proteinine ait MS spektrumu



Laktolglutasyon liyaz proteininin SLDFYTR peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu

MS/MS Fragmentation of **SLDFYTR**

Found in **LGUL_HUMAN**, Lactoylglutathione lyase OS=Homo sapiens GN=GLO1 PE=1 SV=4

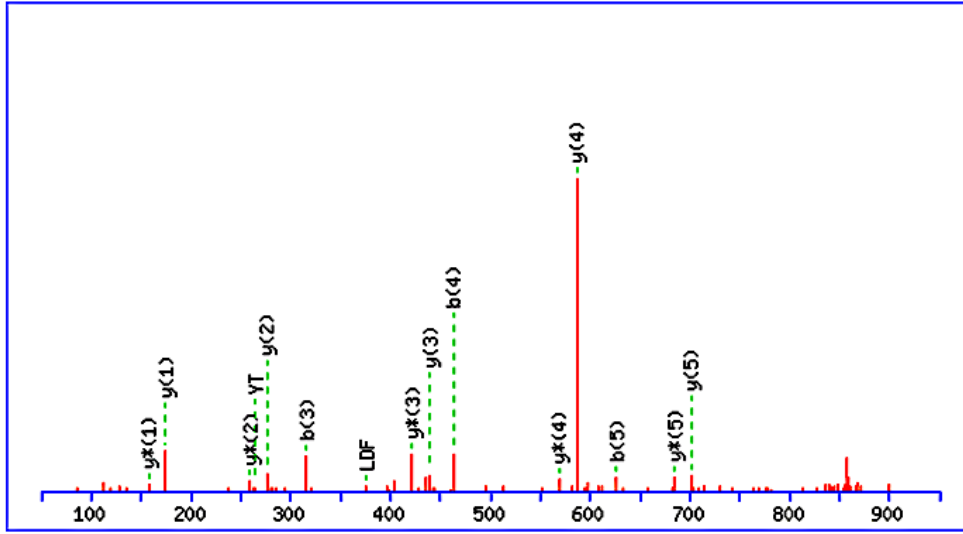
Match to Query 60: 900.417524 from(901.424800,1+) intensity(0.0000) index(7)

Title: Locus:1.P10.2.1.8

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Laktolglutasyon liyaz proteininin SLDFYTR peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi

#	Immon.	a	a ⁰	b	b ⁰	Seq.	v	w	w'	y	y*	y ⁰	#
1	60.0444	60.0444	42.0338	88.0393	70.0287	S							7
2	86.0964	173.1285	155.1179	201.1234	183.1128	L	756.3311	755.3359		814.4094	797.3828	796.3988	6
3	88.0393	288.1554	270.1448	316.1503	298.1397	D	641.3042	640.3089		701.3253	684.2988	683.3148	5
4	120.0808	435.2238	417.2132	463.2187	445.2082	F	494.2358			586.2984	569.2718	568.2878	4
5	136.0757	598.2871	580.2766	626.2821	608.2715	Y	331.1724			439.2300	422.2034	421.2194	3
6	74.0600	699.3348	681.3243	727.3297	709.3192	T	230.1248	243.1452	245.1244	276.1666	259.1401	258.1561	2
7	129.1135					R	74.0237	73.0284		175.1190	158.0924		1

Geçişel endoplazmik retikulum proteininin GILLYGPPGTGK peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu

MS/MS Fragmentation of **GILLYGPPGTGK**

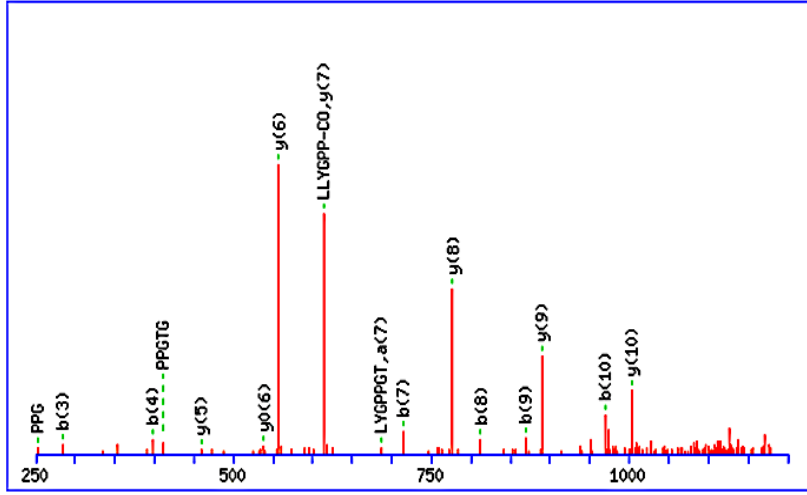
Found in **TERA_HUMAN**, Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4

Match to Query 63: 1171.625534 from(1172.632810,1+) intensity(0.0000) index(3)
Title: Locus:1.P11.2.1.4

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Geçişel endoplazmik retikulum proteininin GILLYGPPGTGK peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi

#	Immon.	a	a ⁰	b	b ⁰	Seq.	y	y*	y ⁰	#
1	30.0338	30.0338		58.0287		G				12
2	86.0964	143.1179		171.1128		I	1115.6459	1098.6194	1097.6354	11
3	86.0964	256.2020		284.1969		L	1002.5619	985.5353	984.5513	10
4	86.0964	369.2860		397.2809		L	889.4778	872.4512	871.4672	9
5	136.0757	532.3493		560.3443		Y	776.3937	759.3672	758.3832	8
6	30.0338	589.3708		617.3657		G	613.3304	596.3039	595.3198	7
7	70.0651	686.4236		714.4185		P	556.3089	539.2824	538.2984	6
8	70.0651	783.4763		811.4713		P	459.2562	442.2296	441.2456	5
9	30.0338	840.4978		868.4927		G	362.2034	345.1769	344.1928	4
10	74.0600	941.5455	923.5349	969.5404	951.5298	T	305.1819	288.1554	287.1714	3
11	30.0338	998.5669	980.5564	1026.5619	1008.5513	G	204.1343	187.1077		2
12	101.1073					K	147.1128	130.0863		1

Kreatin kinaz B tipi proteininin LAVEALSSLDGDLAGR peptidine ait b ve y iyon fragmentlerinin spektrumu

MS/MS Fragmentation of **LAVEALSSLDGDLAGR**

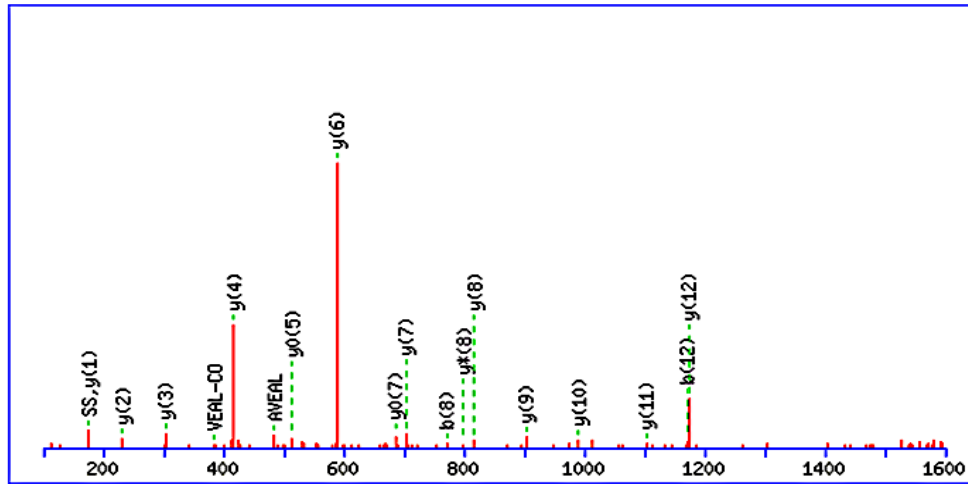
Found in **KCRB_HUMAN**, Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1

Match to Query 58: 1585.821944 from(1586.829220,1+) intensity(0.0000) index(7)
Title: Locus:1.P12.2.1.8

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

Label all possible matches Label matches used for scoring



Monoisotopic mass of neutral peptide $M_r(\text{calc})$: 1585.8311

Ions Score: 87 Expect: 1e-007

Matches : 21/258 fragment ions using 29 most intense peaks ([help](#))

Kreatin kinaz B tipi proteinin LAVEALSSLDGDLAGR peptidine ait b ve y iyonlarını m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi

#	Immon.	a	a ⁰	b	b ⁰	Seq.	v	w	y	y*	y ⁰	#
1	86.0964	86.0964		114.0913		L						16
2	44.0495	157.1335		185.1285		A	1457.7231		1473.7544	1456.7278	1455.7438	15
3	72.0808	256.2020		284.1969		V	1358.6546	1371.6751	1402.7172	1385.6907	1384.7067	14
4	102.0550	385.2445	367.2340	413.2395	395.2289	E	1229.6121	1228.6168	1303.6488	1286.6223	1285.6383	13
5	44.0495	456.2817	438.2711	484.2766	466.2660	A	1158.5749		1174.6062	1157.5797	1156.5957	12
6	86.0964	569.3657	551.3552	597.3606	579.3501	L	1045.4909	1044.4956	1103.5691	1086.5426	1085.5586	11
7	60.0444	656.3978	638.3872	684.3927	666.3821	S	958.4588	957.4636	990.4851	973.4585	972.4745	10
8	60.0444	743.4298	725.4192	771.4247	753.4141	S	871.4268	870.4316	903.4530	886.4265	885.4425	9
9	86.0964	856.5138	838.5033	884.5088	866.4982	L	758.3428	757.3475	816.4210	799.3945	798.4104	8
10	88.0393	971.5408	953.5302	999.5357	981.5251	D	643.3158	642.3206	703.3369	686.3104	685.3264	7
11	30.0338	1028.5623	1010.5517	1056.5572	1038.5466	G			588.3100	571.2835	570.2994	6
12	88.0393	1143.5892	1125.5786	1171.5841	1153.5735	D	471.2674	470.2722	531.2885	514.2620	513.2780	5
13	86.0964	1256.6733	1238.6627	1284.6682	1266.6576	L	358.1833	357.1881	416.2616	399.2350		4
14	44.0495	1327.7104	1309.6998	1355.7053	1337.6947	A	287.1462		303.1775	286.1510		3
15	30.0338	1384.7318	1366.7213	1412.7268	1394.7162	G			232.1404	215.1139		2
16	129.1135					R	74.0237	73.0284	175.1190	158.0924		1

Ek-2. Ankaferd Blood Stopper®' in Ruhsat Belgesi



Ek-3. Orjinallik Raporu

HEPG2, CACO-2 VE HT-29 KANŞER HÜCRELERİNDE 2D JEL ELEKTROFOREZ VE MALDI-TOF/TOF-MS İLE ANKAFERD HEMOSTAT' IN İN-VİTRO ANTİNEOPLASTİK ETKİSİNİN PROTEOMİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%7 BENZERLİK ENDEKSİ	%6 İNTERNET KAYNAKLARI	%4 YAYINLAR	%4 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	elifsciences.org İnternet Kaynağı	%1
2	www.astbury.leeds.ac.uk İnternet Kaynağı	%1
3	biotek.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	bayburtism.saglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.mcponline.org İnternet Kaynağı	<%1
6	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	<%1
7	www.yenitip.org İnternet Kaynağı	<%1
8	www.dovepress.com	

Ek-4. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: **Merve Nenni**
Ödev başlığı: **HEPG2, CACO-2 VE HT-29 KANSE...**
Gönderi Başlığı: **HEPG2, CACO-2 VE HT-29 KANSE...**
Dosya adı: **MN_phd_tez_turnitin_ic_in_son_27..**
Dosya boyutu: **28.78M**
Sayfa sayısı: **170**
Kelime sayısı: **29,351**
Karakter sayısı: **190,288**
Gönderim Tarihi: **28-Oca-2019 11:26AM (UTC+0300)**
Gönderim Numarası: **1069497368**



9. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Mersin' de doğdum. Ankara Anadolu Lisesi' ni bitirdikten sonra 2006 yılında girdiğim Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' nden 2012 yılında mezun oldum. 2013 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimine başladım. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı' nda Araştırma Görevlisi olarak atandım. 2014 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı' nda doktora eğitimime başladım. Halen Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı' nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

