

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN VE KEÇİ KOLOSTRUM WHEY FRAKSİYONU ORTAK  
PROTEİNLERİNİN MALDI-TOF/TOF YÖNTEMİ İLE  
BELİRLENMESİ**

CANSU AKIN  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN  
PROF. DR. AYSEL ÖZPINAR

İSTANBUL-2014

## TEZ ONAYI

Kurum : Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ( )

Anabilim Dalı : Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı

Tez Sahibi : Cansu Akın

Tez Başlığı : İnsan Ve Keçi Kolostrum Whey Fraksiyonu Ortak Proteinlerinin MALDI-TOF/TOF Yöntemi İle Belirlenmesi

Sınav Yeri : Acıbadem Üniversitesi, Kerem Aydınlar Kampüsü

Sınav Tarihi : 18 Eylül 2014 10:00

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Danışman (Ünvan, Adı, Soyadı)**

Prof. Dr. Aysel Özpınar

**Kurumu**

Acıbadem Üniversitesi

**İmza**

**Sınav Jüri Üyeleri (Ünvan, Adı, Soyadı)**

Prof. Dr. Mustafa Serteser

Acıbadem Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Ster Irmak

Bilgi Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 22... / 09 / 2014 tarih ve 08. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Mert Ülgen

*Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili*

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

05.09.2014

Cansu AKIN

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bilim dünyasında yenidoğanlar için önerilen en iyi besin maddesinin anne sütü olduğu bilinmektedir. Anne sütüne en yakın içeriğe sahip sütün bilinmesi amacıyla proteomik teknolojilerinden yararlanılarak farklı türler arası protein profillerinin ortaya çıkarılması; farklılıklarının ve benzerliklerinin ortaya konmasına yönelik çalışmalar hız kazanmaktadır. Bu çalışmada da bir pilot çalışma olarak keçi sütünün insan sütü ile benzerliklerini proteomik alanındaki en ileri teknikleri kullanarak araştırmayı hedefledik.

Bu araştırma COST'a bağlı Farm Animal Proteomics grubu 050514-042577 no'lu STSM projesi ile desteklenmiştir. Proje, Lüksemburg CRP Gabriel Lippmann araştırma merkezi proteomiks platformuna bağlı laboratuvarlarda hayata geçirilmiştir. Laboratuvar çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Dr. Jenny Renaut ve Msc. Sebastien Planchton'a;

Örneklerimin toplanmasında katkıda bulunan Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Sağlığı Araştırma Hastanesinin değerli personeline,

Tecrübesi, bilgi birikimi ve iş disiplini ile bu çalışmanın hayata geçmesini sağlayan, yaşam değerleriyle örnek aldığım ve yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli tez danışmanım Prof. Dr. Aysel Özpınar'a,

İstatistiki çalışmalardaki çok değerli desteğinden dolayı Prof. Dr. Uğur Sezerman'a,

Eğitimimde büyük emeği geçen Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Eğitim hayatım boyunca bana maddi ve manevi her zaman destek olan, aldığım kararlara saygı duyup daima yanımda olan aileme ve beni motive eden arkadaşlarıma en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

CANSU AKIN

## İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR ve SİMGELER .....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vi
EKLER LİSTESİ .....	vii
ÖZET .....	1
SUMMARY .....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER .....	8
2.1. Süt ve Kolostrumun Önemi.....	8
2.1.1. Süt ve kolostrum sentezi .....	9
2.1.2. Süt ve kolostrum içeriğini etkileyen faktörler.....	12
2.1.3. Süt ve kolostrum kompozisyonu.....	13
2.2. Süt Protein Fraksiyonları .....	20
2.2.1. HAP (high abundant proteinler).....	21
2.2.2 LAP (low abundant proteinler) .....	23
2.3. Sütteki Proteinlerin Tanımlanması ve Analizi için Kullanılan Proteomik Teknikler .	28
2.3.1. Sütün fraksiyonlara ayrılma metodları.....	28
2.3.2. İki boyutlu elektroforez (2-DE) .....	30
2.3.3. Kütle spektrometrisi.....	32
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Örneklerin Toplanması .....	34
3.2. Protein Ekstraksiyonu ve İşaretleme.....	35
3.3. Proteomik Analiz .....	37
3.3.1. İki boyutlu difference jel elektroforezi (2-DIGE).....	37
3.3.2. MALDI - TOF/TOF .....	41
3.3.3. Biyoistatistik değerlendirme .....	41
4. BULGULAR.....	43
1,89E-06.....	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	51
6. KAYNAKLAR .....	57

7. EKLER.....	78
EK 1 .....	78
EK 2 .....	79
EK 3 .....	83
EK 4 .....	86
EK 5 .....	88
8. ÖZGEÇMİŞ .....	100
<b>Kurum</b> .....	100

## KISALTMALAR ve SİMGELER

<b>PIT</b>	: Pasif İmmün Transfer/Passive Immun Transfer
<b>LAP</b>	: Minör Proteinler/Low Abundant Proteins
<b>HAP</b>	: Majör Proteinler/High Abundant Proteins
<b>2-DIGE</b>	: İki Boyutlu Difference Jel Elektroforezi/Two-dimensional difference gel electrophoresis
<b>MALDI-TOF/TOF</b>	: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
<b>IEF</b>	: İzoelektrik Fokuslama/Isoelectric Focusing
<b>IPG</b>	: Immobilized pH gradient
<b>MS/MS</b>	: Mass spectrometry, kütle spektrometresi
<b>Av.Rat.</b>	: Ortalama Oran/Average Ratio
<b>Fold Change</b>	: Değişim Katsayısı

## TABLolar LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 1.</b> İnsan, keçi ve inek sütü besin içerikleri	15
<b>Tablo 2.</b> İnsan, keçi ve inek kolostrum ve sütünde bulunan immünoglobulin miktarları	19
<b>Tablo 3.</b> Whey protein ve kazein oranları	20
<b>Tablo 4.</b> Farklı çalışmalardaki santrifüj uygulamaları	35
<b>Tablo 5.</b> Farklı çalışmalardaki ultrasantrifüj uygulamaları	36
<b>Tablo 6.</b> İnsan ve keçi örnekleri işaretleme grupları	37
<b>Tablo 7.</b> İnsan kolostrumu PANOGA analizi	47
<b>Tablo 8.</b> Keçi kolostrumu PANOGA analizi	47
<b>Tablo 9.</b> İnsan kolostrumu pathway analizi (DAVID)	48
<b>Tablo 10.</b> Keçi kolostrumu pathway analizi (DAVID)	48
<b>Tablo 11.</b> İnsan Kolostrumu Domain Analizi (DAVID)	49
<b>Tablo 12.</b> Keçi Kolostrumu Domain Analizi (DAVID)	50



## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 1.Süt ve Kolostrumda bulunan ve doğal bağışıklıkta rol alan majör proteinlerin şematik gösterimi	10
Şekil 2.Whey proteinlerinin elde edilmesini anlatan iş akışı	34
Şekil 3. Ettan IPGphor IEF (izoelektrik fokuslama sistemi)	38
Şekil 4. HPE™ FlatTop Tower (Horizontal elektroforez sistemi)	39
Şekil 5.DeCyder veritabanı iş akışı	40
Şekil 6. Master jel üzerinde tespit edilen majör proteinlerin dağılımı	44
Şekil 7.İnsan kolostrumu 2-DIGE jel görüntüsü ve bazı minör proteinler	45
Şekil 8. Keçi kolostrumu 2-DIGE jel görüntüsü ve bazı minör proteinler	46

## **EKLER LİSTESİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>EK 1.</b> İnsan kolostrumunda yüksek oranda tespit edilen proteinler	78
<b>EK 2.</b> Keçi kolostrumunda yüksek oranda tespit edilen proteinler	79-82
<b>EK 3.</b> İnsan kolostrumu DAVID küme analizi	83-85
<b>EK 4.</b> Keçi kolostrumu DAVID küme analizi	86-87
<b>EK 5.</b> Tespit edilen kolostrum protein listesi ve gen karşılıkları	88-99

## ÖZET

Anne sütü, yenidoğanlar için en önemli besin kaynağı olmanın yanında sindirilebilir aminoasit kaynağı, immunolojik koruma ve gelişimsel fonksiyonların desteklenmesini sağlamaktadır. Anne sütünün yenidoğanın gelişmesindeki rolü, sütün farklı fraksiyonlarında bulunan whey proteinleri ve kazeinlerden oluşan skim milk proteinleri ve MFGM proteinleri (milk fat globule membrane) tarafından sağlanmaktadır. İnsan sütünün farklı türlerin sütünden en büyük farklılığı, whey fraksiyonunun majör protein kaynağı olmasıdır. Bu nedenle, whey proteinlerinin belirlenebilmesi için yapılan çalışmalar, süt biyogenezinin anlaşılması ve süt protein fonksiyonlarının belirlenebilmesi için önem arz etmektedir. Çalışmada proteomik yöntemler kullanarak insan ve keçi kolostrumunun skim fraksiyonundaki ortak whey proteinlerini belirlemek ve kıyaslamak amaçlanmıştır; insan sütünün yerine kullanılacak alternatiflerin protein içeriklerinin belirlenmesine katkı sağlamak hedeflenmiştir. Bu amaçla, laktasyonun başlangıcındaki (12-24 saat) sağlıklı insan (n=6) ve keçi (n=6) kolostrum örnekleri toplanarak, 2-DIGE (two dimensional differential gel electrophoresis) jel görüntülerindeki insan ve keçi kolostrumuna ait çakışan spotlar kesilip tripsin ile digest edilip MALDI-TOF/TOF (matrix assisted laser desorption ionization) kütle spektrometrisi yöntemiyle tanımlama yapılmıştır. Kütle spektrometri analizi sonuçlarına göre, insan ve keçi kolostrumunun whey proteinlerini içeren örneğinin bulunduğu master jelde çakışan 422 spot bulunmuştur. Bu spotlarda hem insan hem de keçi örnekleri için 270 adet farklı protein saptanmıştır. Bu proteinlerden; immüoglobulin, kazein, albümin, laktoferrin, laktotransferrin, laktoglobulin ve laktalbumin kökenli proteinler spotlarda en fazla görünen (HAP) majör proteinlerdir. Ayrıca  $\alpha$ 1-antitripsin, integrin, katherisidin, galaktin-3-binding protein, laktadherin, tenascin ve apolipoprotein J gibi minör proteinlerde (LAP) tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, keçi ile insan kolostrumunda bulunan ortak proteinlerin profillerinin belirlenmesi için öncü nitelik taşımasına rağmen; özellikle insan sütüne

alternatif formüllerin geliştirilmesi göz önüne alındığında, insan ve keçi kolostrumuna ait proteomik profillerinin detaylıca incelenmesi ve ortak olmayan proteinlerin profil farklılıklarının belirlenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** 2-DIGE, insan kolostrumu, keçi kolostrumu, MALDI-TOF/TOF, whey proteinleri

## SUMMARY

### **Detection of Whey Fraction Common Proteins of Human and Goat Colostrum by MALDI-TOF/TOF**

Human milk is an important source for the breastfed infants as it provides a digestible source of amino acids to infants and also has an immunological protection and assist in developmental functions as well. Therefore, the role of human milk in infant development is well established due to the presence of proteins that are found in different fractions of human milk, which are milk fat globule membrane (MFGM) proteins and skimmed colostrum proteins composed of whey proteins and caseins. One of the main difference observed in human milk when compared with other species' milk is that the whey fraction of the skim milk is the major protein source. Therefore, it is important to determine the proteomic profile of the whey fraction in order to better understand milk biogenesis and milk protein functions. The aim of this study is to determine shared whey proteins in the skim fraction of human and goat colostrums via proteomic analysis in the field of contributing towards determining the protein contents of a human milk substitute. In order to assess the proteomic differences and/or similarities between human and goat colostrum, the samples from healthy mothers (n=6) and healthy goats (n=6), collected at early stages of lactation (i.e. 12-24 hours postpartum) were analyzed using DIGE electrophoresis. Master images constructed from both sample groups were compared to differentially expressed proteins, which were then be excised from the gels, trypsin digested and run on MALDI-TOF/TOF mass spectrometer for identification. According to the data obtained from MALDI-TOF/TOF mass spectrometry analysis, 422 overlapped spots were found on the selected master gel of human colostrum and goat colostrum. According to the mass spectrometry data, 270 different proteins were detected in both human and goat colostrum samples. As for the overlapped spots; immunoglobulin, casein, lactoferrin, lactoglobulin, albumin lactotransferrin and lactalbumin originated proteins were mostly identified high abundant proteins. In addition, low abundant proteins such as  $\alpha$ 1-antitrypsin, integrin,

cathelicidin, galectin-3-binding protein, lactadherin, tenascin ve apolipoprotein J were also identified. The results obtained from this study represent an important concept as goat's kolostrum might be considered as an alternative substitute of human milk in the future. Although further studies are required to establish the proteomic profile differences seen in human and goat colostrums, this preliminary study underlies the importance of manufacturing high quality dairy products or infants formulas.

**Key Words:** 2-DIGE, goat colostrum, human colostrum, MALDI-TOF/TOF, whey proteins.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anne st proteinleri mineraller, znmeyen vitaminler, lipit miselleri ve doğal ya da edinilmiş bağışıklık sistemi bileşenlerinin taşıyıcılığını yaparak geniş bir yelpazede fonksiyon göstermektedir. Ayrıca sütün diğer bileşenleriyle yenidoğanın bağırsak mikrobiyomunun oluşturulmasına yardımcı olmaktadır. Memelilerin süt proteomu ilk süt olan kolostrumdan olgun süte doğru köklü bir değişime uğramaktadır.

Anne sütü ve kolostrumun içerdiği proteinler, gösterdiği antimikrobiyal etki ve immunostimulatr özelliği ile yenidoğanın gelişimi için önemli biyolojik aktiviteleri desteklemeleri ve yeterli miktarda esansiyel aminoasit sağlaması bakımından yenidoğanlar için önerilen en önemli besin kaynağıdır. Anne sütünün yenidoğanın gelişmesindeki rolü, sütün farklı fraksiyonlarında yerleşmiş olan proteinlerin aracılığıyla olmaktadır. Bu proteinler MFGM proteinleri ve whey proteinleri ile kazeinden oluşan skim milk proteinleridir. İnsan kolostrumdaki whey proteinlerinin toplam protein içeriğine oranı %80 olduğundan bu fraksiyonun aydınlatılması önem kazanmaktadır.

Yenidoğanın anne sütü ile beslenemediği, yetersiz beslendiği ya da annenin HIV ve benzeri alerjenler içermesi durumlarında anne sütü yerine geçebilecek, benzer besin içeriğini sağlayabilecek, hipoalerjik ve lezzetli bir alternatif bulunması önem içermektedir. Dünya genelinde en yaygın olarak tüketilen süt olan inek sütü insanların beslenmelerinde uzun srelerdir yer almaktadır. İnek sütü ya da inek sütü bazlı mama kullanımı sonucunda sık görülen bebek rahatsızlıkları ve hatta ileri yaşlarda da insan sağlığını etkileyebilecek yan etkilerle karşılaşılmaktadır. Bunların başında inek sütü alerjisi gelmektedir. İnek sütüne bağlı besin alerjiside çocuklukta % 2-6 oranıyla en yaygın olarak görülen sağlık problemidir. İnek sütü ile beslenen yenidoğanlarda immünoglobulin E (IgE) deri, solunum, mide-bağırsak reaksiyonları ve bazı durumlarda anaflaktik şoka kadar uzanan durumlarda majör rol oynamaktadır. İnek, keçi ve koyun sütü total süt tüketiminin %87 sini oluşurmaktadır. Ancak keçi ve inek süt kompozisyonları arasında dikkat çekici farklar bulunmaktadır. Keçi sütünün bileşimine ilişkin özellikleri incelendiğinde, keçi sütü proteinlerinin daha sindirebilir ve daha az

alerjenik olduğu, benzer şekilde lipidlerin daha sindirilebilir olduğu, çeşitli metabolik süreçlerde ve hastalıklarla mücadelede enerji kaynağı oluşturduğu belirtilmiştir. Mineral bileşimi ile ilgili olarak, ölçülen temel elementler ve bunların gıdasal kullanımında keçi sütünün inek sütünden daha kaliteli olduğu gözükmeştir. (2). İnek sütü alerjisi gösteren yenidoğanlara keçi sütü tedavisi uygulanarak iyileşme sağlandığı belirtilmiştir. (3-5). Keçi sütü, inek sütüne alerji gösteren insanlarda inek sütü yerine tavsiye edilmektedir (6). İnek sütü alerjisi bulunan insanların %40-100 kadarı keçi sütü ile beslendiğinde, iyileşme gözlenmiştir. Bazı keçi sütü proteinleri inek sütü proteinleriyle immünolojik olarak çapraz reaksiyon verdiği halde, inek sütünden kaynaklı mide-bağırsak alerjisi ve kronik enteropati sorunu yaşıyan yenidoğanlara keçi sütü verilmesi iyileşme sağladığı belirtilmiştir. (6). Bu sebeplerle keçi sütünün eşsiz ve kompleks protein içeriğinin proteomik yaklaşımla analiz edilmesi, keçi sütü ve insan sütü benzerliklerinin ortaya çıkarılması önem kazanmaktadır. Bu alanda yapılacak çalışmalarla anne sütüne alternatif olan ticari bebek mamalarında inek sütünden daha uygun bir ham madde arayışı sağlanacaktır. Kapsamlı insan süt protein profili araştırmalarında, süt biyogenezinin ve fonksiyonlarının anlaşılmasının yanısıra daha benzer protein içerikleri kullanılarak bebek formüllerinin geliştirilmesi planlanmaktadır.

Proteomik bilindiği gibi genom tarafından eksprese edilen bütün proteinlerin bilimsel analizidir ve gen fonksiyonunun protein düzeyinde anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Biyokimya için çok önemli olan proteinlerin fonksiyonunu anlama ve anlamlandırmada bir devrim olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla 2D elektroforez (two dimensional electrophoresis) ve kütle spektrometresi (MS) gibi teknolojiler kullanılarak sütteki proteinleri tanımlamak ve karakterizasyonunu sağlamak önem kazanmıştır. Bu çalışmanın temel amacı, 2-DIGE (iki boyutlu jel elektroforez) ve sonrasında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometresi yöntemlerini kullanarak insan ve keçi kolostrumunun skim fraksiyonundaki ortak whey proteinlerini belirlemek ve kıyaslamaktır.

Öte yandan sütün protein içeriği beslenmeye bağlı olarak değişmektedir. Farklı ülke beslenme koşullarında çalışmak bu açıdan büyük önem arz etmektedir. Spesifik olarak;



- 1- Türk populasyonlarına ait kolostrumunun skim fraksiyonunda whey proteinlerinin belirlenmesi,
- 2- Sütte güvenilir proteomik analiz metodunun (ayırıştırma, tanımlama, ölçüm ve biyoinformatik) gelişmesine katkı sağlanması,

Bunların yanında; Bu çalışma insan kolostrumu hakkında temel bilgiler oluşturmasına katkı sağlaması beklenmektedir. Bu çalışma ile insan sütünün keçi sütüne göre proteomik kompozisyonunun nasıl benzerliklerinin olduğunu ortaya koyacak bilgilere ışık tutmak amaçlanmaktadır. Bu sayede bulunacak ortak proteinlerin anne sütünde keçi sütüne göre göreceli farklılıkların sağlanması, anne veya keçi sütünde üstünlük sağlayan spesifik proteomların araştırılması ayrıca yenidoğan sağlığı açısından kısa ve uzun dönem faydalarının açıklanmasına yardımcı olacak bilgiler bulunması amaçlanmaktadır.. Öte yandan sütün protein içeriği beslenmeye bağlı olarak değişmektedir. Türkiye'ye ait beslenme koşullarında çalışmak bu açıdan büyük önem arz etmektedir. Ayrıca insan ve keçi kolostrumunda bulunan ortak proteinlere ait genlerin tespit edilerek metabolizmadaki yolların biyoinformatik açıdan incelenmesi hedeflenmektedir. Proteomik çalışmaları uzun soluklu araştırmalardır. Projemizin bu alandaki çalışmalarımızın motor gücünü oluşturmasını amaçlamaktayız.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Süt ve Kolostrumun Önemi

Süt, tüm memelilerde yenidoğanın yaşamının ilk döneminde beslenme, büyüme ve gelişme gibi gereksinimlerinin sağlanması amacıyla anne meme bezinden salınan immün öğeleri, enfeksiyon önleyici faktörleri ve metabolik enzimleriyle kompleks içeriğe sahip eşsiz bir biyolojik sıvıdır. Süt içeriğinde yenidoğanı patojenlerden koruyan, bilişsel gelişimi ve bağırsak mikroflorasının oluşumu sağlayan makro ve mikro yapı maddeleri bulunmaktadır (7). Yenidoğan, emzirme ile bioaktif süt proteinleri elde etmektedir. Bu proteinler kısa ve uzun vadede metabolizmaya yararlı katkılar sağlamaktadır (8, 9).

Anne sütüyle beslenen yenidoğanların ilerleyen yaşlarda obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklara yakalanma olasılıklarının düşük olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Dünya genelinde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde (10) yenidoğanlar üzerinde yapılan araştırmalarda anne sütüyle beslenmenin bakteriyel menenjit, bakteriyemi (kanda bakteri bulunması), ishal, solunum yolu enfeksiyonu, mide-bağırsak sorunları (nekrotizan enterokolit), orta kulak iltihabı, idrar yolu enfeksiyonu, geç başlangıçlı yenidoğan sepsisi gibi yaygın görülen şiddetli enfeksiyon hastalıklarının görülme sıklığını düşürdüğü kanıtlanmıştır. Yenidoğanların ilk yılında görülen ani bebek ölümü sendromu hızının azaldığı, insüline bağlı (tip 1) ve insülin bağımsız (tip 2) diabetes mellitus, lenfoma, lösemi, Hodgkin hastalığı, fazla kilo alma, obezite, hiperkolestrol, astım görülme sıklığının anne sütüyle beslenen çocuk ve yetişkinlerde anne sütüyle beslenmeyenlere oranla düştüğü kanıtlanmıştır. Ayrıca Amerikan Pediatri Akademisi özellikle erken doğmuş (preterm) bebekler için, sepsis ve diğer enfeksiyonlara karşı güçlü koruma sağlaması nedeniyle anne sütü kullanımını önermektedir. Anne sütü ile beslenmenin yenidoğanların bilişsel gelişimine yarar sağladığı çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir. Ayrıca anne sütünün topuk testi yenidoğan taraması gibi ağırlı bir işlemde sırasında anne sütünün çocuğa analjezik etki sağladığı belirtilmiştir (11).

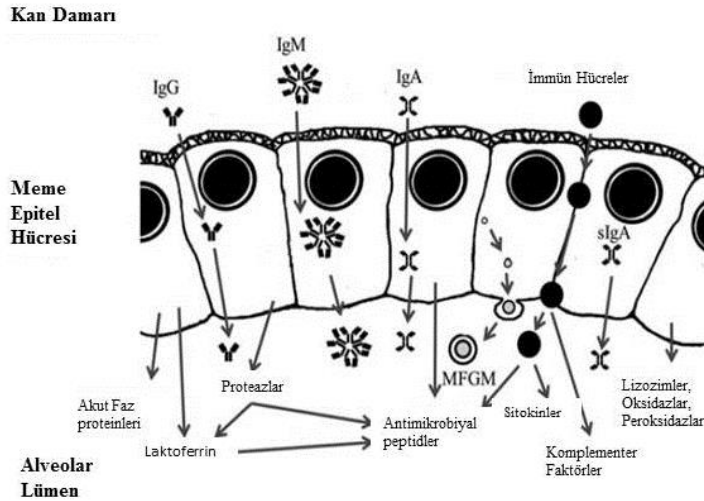
Yenidoğanlar için ilk kolostrum alımı temel biyolojik fonksiyonların oluşumu, anneden yenidoğana immunoglobulin geçişi ve yenidoğanın enfeksiyonlara karşı korunmasını sağladığı için son derece kritiktir (12). Bunun sebebi doğum sonrası ilk 48 saatte kolostrum içeriklerinin mide-bağırsak kanalında avantajlı olarak düşük proteolitik aktiviteye maruz kalmalarıdır. Böylelikle büyük moleküller kolostrumun yapısında bulunan tripsin inhibitörleri sayesinde kolaylıkla absorblanarak pasif immün transferin (PIT) başarılı bir biçimde başlaması sağlanır. İlk 48 saat içinde bu etki azalarak seyrederek ve dolayısıyla da yenidoğanın bu süreçte yeteri miktarda immünoglobulin (IgG) alması çok önemlidir (10). Chigerwe ve arkadaşları'nın (2009) (13) buzağularla ilgili bir çalışmada, doğumdan sonraki ilk 4 saat içinde ve 4-12. saatler arasında kolostrum ile beslenen yenidoğanlarda yeterli pasif immün transferin (PIT) gerçekleştiği bildirilmiştir. Ancak ilk beslenmesi 4-12. Saatler arasında gerçekleşen yenidoğanlara verilen kolostrumun yüksek IgG içerdiği belirtilmiştir. Ayrıca, doğumdan sonraki ilk saatlerde kolostrum ile beslenmeyen ruminantlarda (geviş getiren hayvanlar), hastalıklara yakalanma ve ölüm oranlarında artış olduğu belirlenmiştir (14, 15).

Kolostrumun içeriğinde bulunan çeşitli anti-mikrobiyal ve anti-inflamatuar ajanlar, gastrointestinal gelişimi sağlayan büyüme faktörleri, sitokinler, enzimler ve çok sayıda peptit ayrıca biyolojik olarak aktif whey ve MFGM proteinlerinin kolostrumda süte oranla çok daha fazla bulunması, kolostrum tüketiminin yenidoğan için ne kadar önemli olduğunun altını çizmektedir (16),(17).

### **2.1.1. Süt ve kolostrum sentezi**

Kolostrum sentezi süt bezlerinin gelişim evrelerinden mamogenezin ardından gerçekleşmekte ve en genel tanımıyla immünoglobulinlerin maternal dolaşımdan süt bezlerine taşınması olarak tanımlanmaktadır (18). Ayrıca immünoglobulin transferinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği belirtilmiştir (19). Özellikle, insan ve farelerin kompleks plasenta yapıları düşünüldüğünde yenidoğana Immunoglobulin (Ig) geçişinde kısıtlamalar olmaktadır (20-23). Bu nedenle, yenidoğanlarda gelişen agammaglobulinemia ve geçici hipogammaglobulinemia gibi immün hastalıkların önüne geçebilmek adına pasif immün transferde görevli olan immunoglobulinlerin önemi

büyüktür (24-27). Pasif immün transfer, plasentadan immünoglobulin geçişi ya da kolostrumda var olan ile immünoglobulinler ile sağlanmaktadır. (28). Protein emilimi temelde Ig'lere (IgG, IgM ve en çok IgA) dayanmasına rağmen, kolostrumdan yenidoğan kanına geçen non-immünoglobulin proteinler de pasif immün transferin sağlanmasında görevlidir (29). Kolostrumun yüksek miktarda mononükleer lökosit sağlayıcısı olduğundan mononükleer lökositlerin, maternal immünitinin yenidoğana bağırsak yoluyla taşınmasına katkıda bulunduğu belirtilmiştir (30). Kolostrogenizin regülasyonunda özellikle östrojen ve progesteron hormonlarının görev aldığı belirtilmektedir (19).



**Şekil 1:** Süt ve kolostrumda bulunan ve doğal bağışıklıkta rol alan majör proteinlerin şematik gösterimi (31, 32).

### 2.1.1.1 Nöroendokrin sistem bağlantısı

Meme bezinin yapısı, özellikleri ve süt salgılanmasının sağlanması nöroendokrin sistem tarafından yönetilmektedir. Bu fonksiyonun çalışması için iki sistem beraber çalışır, endokrin sistem memenin gelişimi ve memelilerin üreme dönemine gelmesinde major rol oynar. Sinir sistemi ise süt salınım mekanizmasını başlatmakta görevlidir. Söz konusu 2 sistem hipotalamus – hipofiz axis ile bağlantılıdır. Prolaktin, oksitosin, büyüme hormonu gibi endokrin salgılar ve yumurtalıklar, plasenta, meme bezi gibi

endokrin salgılama yapan organlar mekanizmada görevlidir (33, 34). Üreme dönemlerini değiştiren ve meme bezi üzerinde direkt etkisi bulunan hormonlar; oksitosin, prolaktin, progesteron, östrojen ve plasental laktojendir (33, 35). Gebelik sırasında laktasyona hazırlık olarak, östrojen ve progesteron meme kanallarının ve lobüllerinin farklılaşmasını stimüle eder. Doğum sonrası progesteron seviyesi düşerek, süt proteinlerinin prolaktin-kaynaklı transkripsiyonu önündeki gebelik blokajı ortadan kalkar. Östrojen seviyesi de doğum sonrası süt üretimin başlaması için düşüş göstermektedir. Ayrıca hipotalamus-hipofiz-yumurtalık axis'ini baskılaması sebebiyle laktasyon boyunca da düşük kalmaktadır. Farmakolojik dozlarda östrojen bile süt üretimini inhibe edebilmektedir (36).

Prolaktin ve oksitosin laktasyon için olmazsa olmaz peptid hormonlarıdır. Prolaktin, hipofiz ön bezinden ya da adenohipofizden laktogenesisi başlatmak ve laktasyonu sağlamak için salgılanır (37). Prolaktin, kortizol ve insülin'in ortak etkisiyle süt proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadır. (38) Prolaktinin bazal seviyesi gebelikte yükselerek östrojenin artan seviyesiyle hipofiz bezi üzerinde etki gösterirler. Doğum sonrasında östrojen seviyesi hızla düşerken, prolaktin seviyesi bir kaç hafta içinde kademeli olarak azalır. Meme bezi gelişiminde görevli plasental laktojen yapısal olarak prolaktine benzemektedir, ayrıca türlere göre değişmekle beraber büyüme faktörüyle de ilişkilidir (39).

Anne sütünün salgılanması yenidoğanın memeden ilk defa süt emmesiyle başlamaktadır. Dokusal reseptörlerinin uyarılmasıyla meme ucundan önce omuriliğe oradan da hipotalamustaki salgısal oksitosinergik nöronlara impuls iletilir. Süt salgılanması esnasında, memeden hipotalamusa artan, hipofiz hormonlarından (özellikle oksitosin) memeye azalan bir nöronal yansıma gözükmemektedir. Oksitosin sağlayan nöronlar hipofizin arka lobundaki paraventricüler nükleusta ve hipotalamik supraoptik nükleusta bulunurlar. Memenin uyarılmasıyla oksitosin kana salgılanır ve meme alveollerini çevreleyen mioepitel hücreler kasılmaya başlar, meme alveollerinde depolanan süt salgılanması gerçekleşir (40).

### 2.1.2. Süt ve kolostrum içeriğini etkileyen faktörler

Sütün kompozisyonunda; laktasyon dönemine, yaş, tür, beslenme şekli, enerji dengesi ve meme bezinin genel sağlık durumu ve çevresel faktörler gibi birçok duruma bağlı olarak değişebilmektedir (16, 41). Laktasyon dönemi anne sütünün etkileyen faktörlerden biridir. Laktasyonun başlangıcındaki sütün içeriği, laktasyonun ilerleyen dönemlerindeki göre özellikle yağ, protein ve pek çok mineral yönünden zengindir (42).

Örneğin, Swanson ve arkadaşları (43, 44) tarafından yürütülen bir çalışmada gebelik süresi kısa olan koyunların kolostrumlarında daha düşük oranda IgG (99.9 mg/ml) bulunduğu, ancak normal gebelik süresi geçiren koyunların kolostrumlarında IgG oranlarının çok daha yüksek (127.7 mg/ml) olarak bulunduğu bildirilmiştir. Kolostrum sentez mekanizmasının detayları hala tam olarak bilinmiyor olsa da, kolostrumun hamileliğin son evresinde sentezlendiği ve süt bezlerinde depo edildiği bildirilmiştir (33). Ayrıca gebeliğin ilerleyen dönemlerindeki maternal beslenme ve meme bezinin gelişimi ile doğum sonrasındaki kolostrum içeriği ve üretilme hacmi arasında ilişki olduğunun altı çizilmektedir (45). Bu sebeplerle doğum öncesi dönemin iyi bir şekilde geçirilmesinin önemli olduğu (19), dengeli beslenen memelilerin kolostrum üretiminin, yetersiz beslenenlere göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (32).

Kolostrum mevcut immün içeriklerine bakıldığında, bazı bileşenlerin konsantrasyonunun değişiklik gösterdiği bu sebeple de yenidoğanın gereksinimlerine göre de değiştiği belirtilmiştir (32). Awadeh ve ark.larının (46, 47) yaptığı bir çalışmada, ineklerde gebeliğin son döneminde selenyum takviyesi ile IgG konsantrasyonunda artış görülmüştür. Fakat Swanson ve arkadaşlarının (43) (44) yaptığı çalışmada koyunlara yine gebeliğin son döneminde yapılan bir selenyum takviyesiyle kolostrum veriminde ya da IgG konsantrasyonunda bir artış görülememiştir.

Yenidoğan sayısının kolostrum içeriğini etkileyip etkilemediği de çok tartışmalı bir konudur. Csapo ve arklarının (1994) (41) yaptığı bir çalışmada IgG konsantrasyonun beyaz macar keçisi ve macar merino koyunu ikiz yenidoğanlarında, tek yenidoğanlara kıyasla daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Fakat argüello ve ark.larının (2006) (48)

yaptığı çalışmada kolostrum IgG konsantrasyonunun majorera keçileri arasında yenidoğan sayısına göre değişiklik göstermemiştir.

### **2.1.3. Süt ve kolostrum kompozisyonu**

Anne sütü, önemli bir aminoasit kaynağıdır. Yapısındaki süt proteinleri, sindirimin hızlanması ve yenidoğanın diğer besin içeriklerine ulaşması, yenidoğan sağlığının korunması gibi birçok konuda görev almaktadır. Safra tuzu-uyarılmış lipaz ve amilaz yağ ve karbonhidratların sindirimini sağlar,  $\beta$  – kazein, laktoferrin, haptocorrin gibi proteinler kalsiyum (Ca), demir (Fe) ve B – 12 vitaminin emilimine aracılık eder. Patojen bakteri, virüs ve mayalara karşı anti-mikrobiyal faaliyetlerin sağlanması (secretory IgA, lactoferin, lizozim, kappa kazein ve laktoperoksidaz), immün fonksiyonun artırılması (sitokinler ve lactoferin), ve bağırsak gelişiminin sağlanması (k casein ve lactoferin) gibi çok çeşitli fizyolojik etkileri bulunmaktadır (9).

Bunlarla beraber insan süt proteinleri leptin, ghirelin ve adiponektin gibi çeşitli peptid hormonlarını içermektedir. Tüm bunlar besin alımının düzenlenmesi, enerji dengesi, hücre farklılaşması, büyümenin düzenlenmesi ve neonatal dönemde gelişimin sağlanmasına katkı sağladığı kadar, uzun vadede yaşamın ilerleyen kısımlarında metabolik yararlar göstermektedir. (38)

Kolostrum hacim, görüntü ve kompozisyon olarak anne sütünden daha farklıdır (38). Kolostrum içerdiği IgA, laktoferrin, lökositler gibi yoğun immünolojik bileşenler ve epidermal büyüme faktörü gibi yenidoğanın gelişimi ile ilgili bileşenler nedeniyle yenidoğanın sağlığı ve gelişimi için önem arz etmektedir (49). Ayrıca kolostrum içerdiği yağ, laktoz, vitamin ve minareller nedeniyle besin değeri yüksek bir bileşimdir (16). Kolostrumdaki sodyum, klor, magnezyum miktarının anne sütüne göre daha yüksek, potasyum ve kalsiyum miktarının ise anne sütüne göre daha az olduğu da belirtilmektedir (36).

Kolostrum her ne kadar vitamin, hormon, sitokin, enzim ve alveolar epitel hücrelerden köken alan metabolitler bakımından zengin olsa da, yenidoğanın patojenlerden korunmasında önemli görevleri olan immünoglobulinler kolostrumun en

çok araştırılan bileşenlerindendir (27). Kolostrumun immüoglobulin içeriği türler arasında değişiklik göstermektedir ancak IgG, IgM ve IgA gibi immüoglobulinler farklı türlerin kolostrumlarında en fazla bulunanlardır (33). Kolostrumun içeriğinde farklı bileşenler bulunmasına rağmen, bu bileşenler genel olarak meme bezlerinden direk salgılananlar, kan dolaşımından transfer olanlar ya da her iki mekanizmanın da kullanılması şeklinde sınıflandırılırlar (Patton 1975). Örneğin yapılan bir çalışmada, IgG'nin kan dolaşımından süt bezine transfer edildiği buna karşın IgA'nın meme plazma hücrelerinden süt bezlerine salgılandığı belirtilmektedir (31).

Anne sütü içeriği anneye ve laktasyon dönemine göre değişiklik göstermektedir. Maternal beslenme seviyeleri değişiklik gösterse bile popülasyonlar arasında eşsiz biçimde korunmuştur (50). Anne sütü besin içeriğinin; BMI, protein alımına, doğum sayısına, menstrasyona geri dönme süresine ve doğum sıklığına bağlı olduğu bildirilmiştir (38). Ayrıca yüksek miktarlarda süt üreten kadınlarda sütün yağ ve protein içeriğinin düşük, laktoz içeriğinin yüksek olduğu görülmektedir. Anne sütü protein konsantrasyonunun BMI ile artarken, annenin süt üretim artışına göre azalmaktadır (51).

### **2.1.3.1. Makro- ve mikrobeyinler**

Süt proteinleri, temel olarak whey proteinleri, kazeinler ve MFGM olmak üzere anne sütünün 3 fraksiyonu vardır. En çok bulunan proteinler ise, kazein,  $\alpha$  – laktalbumin, laktoferrin, salgısal immüoglobulin IgA, lizozim ve serum albümindir. (50, 52). Anne sütünde yüksek miktarda bulunan proteinler, majör (HAP – high abundant protein) ve düşük miktarda bulunan minör proteinler (LAP – low abundant protein) ileleyen bölümlerde detaylı incelenecektir.

Anne sütünün gerçek protein içeriği laktasyonun başlangıç döneminde 14 – 16 g/L, laktasyonun 3 – 4. aylarında 8 – 10 g/L, 6. Aydan sonra ise 7 – 8 g/L olarak belirlenmiştir (9). Normal dönemde doğum yapan insan sütü içeriği; 0.9 – 1.2 g/dL protein, 3.2 – 3.6 g/dL lipid, 6.7 – 7.8 g/dL laktoz olarak bildirilmektedir (38). Bauer&gerss'in (53, 54) yaptığı çalışmada term doğum yapan (38-41.h) annelerin protein içeriklerinin preterm doğum yapanlara göre anlamlı derecede düşük olduğu



belirtilmiştir. Ayrıca doğum zamanına bağlı olmaksızın ilk 4-6 haftadan sonra anne sütü protein içeriğinin azalmakta olduğu bildirilmiştir.

Keçi kolostrumunun içeriği (0-2. Gün) %7.7-6.26 yağ, %10.47-5.73 protein ve %2.44-4.15 laktoz, keçi sütü besin içeriği (90. Gün) ise, %4.31 yağ, %3.36 protein ve %5.44 laktoz şeklindedir (55). Keçi ile ve inek sütünün kompozisyonu söz konusu türe bağlı olarak değişmekte az yada çok farklılık gösterse de birbirine oldukça benzemektedir. Haenlain (1996) (4), tarafından yapılan çalışmayla keçi sütünün protein, yağ ve minerallerden oluşan toplam katı madde içeriği inek sütüne göre daha yüksek olduğu belirlenmiş ve daha sonra yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. (2, 4, 56-58). Genelde keçi sütü kazein içeriğinin düşük olmasından dolayı serum proteinleri konsantrasyonu nispi olarak daha yüksek olarak görülmektedir (57, 59). Ceballos ve ark.ları tarafından 2009'da (2) yapılan bir araştırmaya göre keçi sütü ve inek sütü protein, yağ, laktoz içerikleri bakımından kıyaslanmıştır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre keçi/inek değerleri sırasıyla %3.48/2.82, %5.23/3.42, %4.11/4.47'dir. Keçi sütü ortalama protein içeriği inek sütüne kıyasla yüksek olmasına rağmen (60) birbirine yakın olduğu tablo 1'de gösterilmektedir. Ayrıca Greppi ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınladıkları verilere göre insan sütüne ait protein yağ ve lipit içerikleri tabloda gösterilmektedir (61)(Tablo1).

**Tablo 1.** İnsan, keçi ve inek sütü besin içerikleri

	Süt		
	İnsan	Keçi	İnek
Protein (ug/uL)	9-15	34.8	28.2
Yağ (ug/uL)	38-41	52.3	34.2
Laktoz (ug/uL)	70-72	41.1	44.7

İki cins sütte de protein içerikleri ve kompozisyonları cinse, emzirme dönemine, beslenmeye, iklime, doğum sayısı ve dönemine bağlı biçimde yaygın olarak değişebilmektedir. İnek süt kompozisyonunda cins değişiminin etkisi keçi sütüne göre daha az belirgindir. Keçi ve inek sütleri major proteinlerinde ( $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin,  $\kappa$ -kazein,  $\alpha$ S1-kazein) aminoasit kompozisyonu bakımından yüksek

homoloji (%84-95) göstermektedirler. Bu durum ruminantlara (geviş getirenler) ait olmalarıyla açıklanmaktadır. Ayrıca laktoferrin, transferrin ve prolaktin gibi minör proteinlerin de inek ve keçi sütünde benzerlik gösterdiği belirtilmektedir (60).

Süt içeriğindeki, protein olmayan azot-içeren bileşikler, üre, ürik asit, kreatin, kreatinin, aminoasitler ve nükleotidler, total süt azotunun %25 ini oluştururlar (38).

Anne sütü lipidleri, yüksek oranda palmitik ve oleik asit içermektedir. Sütte en değişken makrobesin içeriğini lipitler oluşturur. Laktasyon, foremilkten (kolostrum) protein içeriği düşük olan ve son süt olarak tanımlanan hindmilk'e doğru ilerledikçe lipid miktarı 2, 3 kat artmaktadır (62). Ayrıca Kent ve ark'larının (2006) , gün içinde emzirme sıklığına bağlı lipit içeriğinin değişimini incelediği çalışmaya göre sütün lipit içeriği gece ve sabah emzirmelerinde, öğleden sonra ve akşam emzirmelerine göre anlamlı olarak daha az görülmektedir (63). Anne sütü yağ asit profili, maternal beslenmeyle ilişkili olarak değişmektedir. Özellikle uzun zincir çoklu doymamış yağ asidi (LCPUFAs), omega 3' ün yetersiz alındığı durumlarda omega 6'ya dönüşür (Batı ülkelerinde). Dokosaheksanoik asit (DHA) içeriği ise, kuzey Amerika popülasyonlarında düşüklük göstermektedir (64, 65).

İnsan sütü karbonhidrat içeriğini laktoz oluşturmaktadır. Laktoz konsantrasyonu, sütün en az değişim gösteren makrobesinidir. Ancak yüksek laktoz konsantrasyonu içeren sütler, annenin yüksek miktarda süt ürettiğini göstermektedir (51).

Mikrobesinler, anne sütü yenidoğan için gerekli besin içeriğini sağlamaktadır. Bir çok mikrobesin ve A, B1, B2, B6, B12, D vitaminleri ve iyodin, maternal beslenmeye ve bünyeye göre değişim göstermektedir (38). K vitamininin anne sütünde oldukça düşük miktarda bulunduğu bilinmektedir. Amerikan Pediatri Derneği bu sebeple yenidoğanda oluşabilecek hemorajik hastalığına tedbir olarak K vitamini iğnesi önermektedir. (66). Ayrıca D vitamini de anne sütünde düşük miktarda bulunmaktadır, bu durum özellikle maternal dönemde düşük güneş ışığı almaya bağlıdır ve popülasyonlara göre değişiklik göstermektedir. (67).

Kök hücreler anne sütünün bir bileşenidir. Indumathi ve arkadaşlarının (2012) (68) doğum sonrası 3- 7. günlerde toplanan anne sütünde yaptıkları çalışmada, anne sütünün mezenkimal ve hematopoietik kök hücreler içerdiği belirtilmiş ve yenidoğanın immün ihtiyacını karşılamaya yönelik yüksek miktarda immün komponent ata hücreleri tespit edilmiştir. Kök hücrelerin yenidoğan hastalıkları üzerindeki iyileştirici etkisini araştıran çalışmalar son yıllarda hızlanmaktadır (38).

### **2.1.3.2. Büyüme faktörleri ve hormonlar**

Vücuttaki biyolojik süreçleri etkileyen biyoaktif bileşenler büyüme faktörleri ve hormonlardan oluşmaktadır. (38). Epidermal büyüme faktörü (EGF), amniyotik sıvıda ve anne sütünde bulunmaktadır. Bağırsak kanalında olgunlaşma ve tamirde görevlidir. Düşük pH ve sindirim enzimlerine karşı koruma sağlar (69, 70). Nöronal büyüme faktörlerinden BDNF (brain-derived neurotrophic factor), pre-term dönemde sık sık fonksiyonu bozulan bağırsak perispaltik hareketini düzenlemektedir. BDNF, GDNF (glial-cell line derived neurotrophic factor) ve bunlarla ilişki CNTF (ciliary neurotrophic factor) anne sütünde ilk 90 gün, enteral sinir sistemi (ENS) büyüme ve gelişmesinde rol oynar (71-73). İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IGF-I, IGF-II, IGF-bağlayıcı proteini ve IGF-spesifik proteaz anne sütünde bulunmaktadır. En yüksek miktarları kolostrumda görülür, laktasyon boyunca sürekli düşüş gösterir. Ayrıca oksidatif stresten kaynaklı bağırsak hasarlarına katkı sağlamaktadır (74-79). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), kan damar oluşumu (anjyogenez), temel olarak VEGF ekspresyonuyla düzenlenmektedir. Kolostrumda konsantrasyonu çok yüksektir (38).

Süt yapısında birçok hormon bulunmaktadır. Örneğin, eritropoietin (Epo), sütte önemli miktarda bulunan, kırmızı kan hücrelerin (eritrosit) sayısını artırmakla görevli hormon olup bağırsak gelişiminden sorumlu olduğu ve anemiye karşı koruyucu görevi olduğu bildirilmiştir (38). Arsenault ve ark.larının 2010'da yaptığı bir çalışmada Epo'nun HIV (human immunodeficiency virus)'in anneden çocuğa geçmesini önleyici olabileceği belirtilmiştir. Buna ek olarak süt içeriğinde, gelişimi düzenlemekle görevli olarak somatostatin ve kalsitonin hormonunun prekürsörü olan prokalsitonin yüksek miktarlarda bulunmaktadır (38). Sütte yüksek miktarda bulunan diğer bir hormon

adiponektin olup metabolizmayı düzenlemek ve inflamasyonu baskılamak gibi özelliklere sahip, fonksiyonel bir hormondur. Adiponektin, bağırsak bariyerini geçerek yenidoğan metabolizmasını düzenlemekte görevlidir (80, 81). Metabolizmayı ve enerji döngüsünü düzenleyen, ayrıca besin kontrolünün sağlanmasında önemli rol oynayan leptin, rezistin, ghrelin gibi hormonlar da anne sütünde bulunmaktadır (38).

### **2.1.3.3. İmmünolojik faktörler**

İnsan sütün yapısı makrofajlar, t-hücreleri, kök hücreler ve lenfositler gibi enfeksiyonlara ve inflamatuarlara karşı koruyucu pek çok hücre tipini içermektedir (38). Laktasyonun başında anne sütü ile beslenen yenidoğanlar günde yaklaşık  $10^{10}$  maternal lökosit alırlar (82). Bu miktar anneye göre değişmekte ve yenidoğan alerjisi de buna bağlı olarak gelişebilmektedir. İlk anne sütündeki hücrelerin % 80'ini makrofajlar oluşturmaktadır (68, 82-87). Kan dolaşımında bulunan makrofajların meme bezi makrofajlarına dönüşümü ve t-hücrelerinin aktivasyonu ile yenidoğanların kendi immün sistemleri gelişinceye kadar patojenlere karşı güçlü bir koruma sağlanmaktadır. Ancak bunun negatif bir sonucu olarak, HIV-1 ve HTLV-1 taşıyan kadınların yenidoğanlarına, süt ile viral geçiş olduğu bildirilmiştir (38).

Anne sütünde ayrıca hücreler arasında haberleşmeyi sağlayan sitokin ve kemokinler bulunmaktadır. Sitokinler çok işlevli peptidler olarak hem otokrin hem de parakrin etki gösterirler. Kemokinler; sitokinlerin içerisinde özel bir gruptur ve diğer hücrelerin hareketlerini teşvik etmektedirler. Anne sütünde bulunan sitokinler bağırsak duvarını geçerek immün aktiviteyi etkileyen diğer hücrelerle temasa geçebilirler (88). Örneğin, İnflamasyonu düzenleyen, yara onarımı ve allerjik hastalıklara karşı koruma sağlayan TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) (89), bağırsak gelişimi ve sepsis tedavisinde etki gösteren G-CSF (Granülosit-koloni stimule faktör) (90) anne sütünde bulunan en önemli sitokinlerdendir. Ayrıca pro-inflamuar etkisi bilinen TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha), IL-6 (Interleukin 6), IL8 (Interleukin 8) ve IFN $\gamma$  (Interferon gamma) anne sütünde düşük seviyelerde bulunmaktadır (91).

**Tablo 2.** İnsan, keçi ve inek kolostrum ve sütünde bulunan immünoglobulin miktarları

	Kolostrum			Süt		
	İnsan	Keçi	İnek	İnsan	Keçi	İnek
IgA (ug/uL)	17.35	0.86-0.24	3.90	1	0.1-0.07	0.14
IgM (ug/uL)	1.59	3.8-0.7	4.2	0.10	0.18-0.2	0.05
IgG (ug/uL)	0.43	32.9-8.2	-	0.04	0.8-0.88	-
IgG1 (ug/uL)	-	-	47.60	-	-	0.59
IgG2 (ug/uL)	-	-	2.90	-	-	0.02

Immünoglobulinler, immün sistemin bir bileşeni olarak süt ve kolostrumda bulunmaktadır. Anneden yenidoğana pasif immün transferin sağlanmasında temel immünolojik bağlantıyı oluşturmaktadırlar (92). Kan ve mukozal salgıda bulunduğu kadar kolostrum ve sütte de bulunan koruyucu immünoglobulinler genel olarak IgM, IgA, IgG, IgE ve IgD şeklinde sınıflanmaktadır ancak memelilerde majör olarak bulunanlar IgG, IgA, IgM'dir. IgM'ler organizmanın bir antijenle ilk defa karşılaştığı zaman ortaya çıkar (birincil enfeksiyon). Düşük spesifiteye sahip olduğundan enfeksiyonla mücadelede düşük potensiyel göstermektedir. IgA mukozal salgılarda majör immünoglobulin olarak bulunarak mukozal enfeksiyonlara karşı koruma sağlar. (by agglutinating microbes) IgG ise, inek kolostrum ve sütünde temel immünoglobulindir. IgG1 ve IgG2 olarak iki alt grup halinde bulunur. Kolostrum ve sütte bulunan immünoglobulin içeriği türe yüksek derecede bağımlı olarak değişim göstermektedir. Farklı türlerde değişen oranlarda bulunmaktadır (Tablo 2). Türler 3 gruba ayrılırlar. (43) immünoglobulinlerin direkt olarak plasentadan fetusa aktarılmasını sağlayanlar (insan, tavşan), (43) yenidoğanın agammaglobulinemik olarak doğduğu ve meme salgısıyla immünoglobulin aktarımını sağlayanlar (inek, keçi, domuz ve at), (3) immünoglobulinlerin hem meme salgısıyla hemde plasenta ile aktarılanlar (sıçan, fare ve köpek). Bu farklılıklar immünoglobulin kompozisyonunda farklılıklar oluşturmaktadır. İnsanlarda yenidoğanın mide-bağırsak kanalının daha çok korunması sağlanmaktadır. Bu durum insan kolostrumunun diğer türlere göre total immünoglobulin içeriğinin düşük olmasına dayanmaktadır. Örneğin IgG içeriği keçi ve inek kolostrumunda %75 iken, insanda bu oran %2 leredir. İnekte kolostrumda bulunan IgG miktarı ardışık sağimlarla

birlikte hızla düşer. Genel olarak insan immünoglobulin içeriği kolostrum ve sütte benzerdir. IgA ikisinde de çok yüksek oranlarda bulunur (%88-90). (60, 92)

## 2.2. Süt Protein Fraksiyonları

Süt proteinleri kazeinler, whey proteinleri ve musin (MFGM) olmak üzere 3 ana fraksiyona dağılmıştır. Kazeinler ve whey proteinleri kolostrumun skim milk denilen en büyük kısmını kapsamaktadır. Laktasyon dönemi boyunca süt içeriği, büyüyen yenidoğanın ihtiyaçlarıyla uyumlu bir şekilde, besin ihtiyacındaki değişen miktarlarının sağlanmasına, doğal ya da edinilmiş immün yanıt oluşumuna, büyüme ve gelişime yönelik değişimler gösterir (50). Musin fraksiyonu, sütteki lipidlerin etrafını çevirmektedir, protein içeriğinin küçük bir kısmını oluşturur (93). Anne sütü musin fraksiyonu da laktasyon boyunca değişiklik göstermez (9). Buna karşın memedeki whey protein ve kazein içeriği sürekli bir değişim gösterir. Kazein sentezi doğumla birlikte düzenli biçimde artar, laktasyonun ilk günlerinde az miktarda olan kazein konsantrasyonu ilerleyen dönemlerde yükseltirken, süt hacminin artışına bağlı olarak whey protein konsantrasyonu azalmaktadır (94, 95). Laktasyonun başlangıcında 80:20 olan whey protein:kazein oranı, laktasyonun ortalarında 60:40, laktasyonun son dönemlerinde 50:50 şeklindedir. Kazein ve whey proteinleri aminoasit bileşimi bakımından farklılık gösterdiğinden anne sütü aminoasit içeriği laktasyon boyunca değişir (9). Farklı memeli türlerine ait canlılarda whey protein/kazein oranı değişiklik göstermektedir. İneklere ve keçilerde bu oran 20:80 şeklindedir (53, 96), Tay 2011). (Tablo 3)

**Tablo 3.** Whey protein ve kazein oranları

	Süt		
	İnsan	Keçi	İnek
Whey Protein (%)	60	20	20
Kazein (%)	40	80	80

### 2.2.1. HAP (high abundant proteinler)

Kazein,  $\alpha$ -laktalbumin, laktotransferrin, IgA, salgısal bileşenler ve HSA (human serum albümin) anne sütündeki en yüksek miktarda bulunan proteinleri (HAP) oluşturmaktadır. HAP'lar insan total süt proteinlerinin %90'ını oluşturmaktadır (Mange 2008). Sütün 3 fraksiyonunda da yer alan HAP proteinlerinden bazıları aşağıda ayrı ayrı açıklanacaktır. Bu fraksiyonlardan biri olan MFGM proteinleri, kompleks membrane üzerine yerleşmiştir ve etrafı triaçilgliserol damlacıklarıyla çevrilidir (97). Genellikle, pek çok MFGM çalışması inek (98-100), keçi (101), koyun gibi günlük süt üretimi olan hayvanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Mather ve ark.larının 2000'de (99) yaptığı bir çalışmada, MFGM'da 7 HAP proteinin bulunduğu bahsedilmiştir. Bu 7 adet proteinden 2'si immüniteyle alakalı önem teşkil eden mucin-1 (MUC-1) ve xanthine dehydrogenase/oxidase (XDH/XO) proteinleridir. MUC-1 glikoprotein yapılı bir protein olup, farklı organların (örneğin, akciğer, mide, bağırsak ve diğerleri) epitel hücrelerinin apikal yüzeylerinde bulunmaktadır (102). Bu protein insandaki MFGM (729-805 mg/L) (103) ile kıyaslandığında, sığırdaki düşük konsantrasyonda bulunduğu görülmektedir. (40mg/L) (104). XDH/XO, meme bezinden salgılanan hamileliğin sonunda ve doğumun hemen sonrasında en yüksek değerlerine ulaşan bir proteindir (32). Bu protein, inek, keçi ve koyunda belirlenmesine rağmen aralarındaki farklılık ölçülmemiştir. Bu proteinin işlevleri tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, MFGM proteinlerin oluşmasına yapısal ve fonksiyonel katkı sağladığı (105), süt ve kolostrumda antibakteriyel etkinlik gösterdiği, laktoperoksidaz için hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) sağladığı düşünülmektedir (38). Ayrıca doku yaralanması, inflamatuvar cevap ve gen kodlama ekspresyonunu uyarması ile immün sistem üzerinde immünomodülatör olarak görev aldığı belirtilmiştir (99).

Kolostrumda bulunan önemli bir protein grubu skim milk içeriğindeki whey proteinleridir. İnek sütünü referans olarak alındığında  $\beta$  – laktoglobulin,  $\alpha$  – laktalbumin, bovine serum albümin (BSA), immüoglobulinler ve laktoferrin majör bileşenleri olmak üzere whey proteinlerinin 200'den fazla farklı protein içerdiği bulunmuştur. Bu protein grubundan immüoglobulinler doğal immün transferi sağlamada önemli rol

oyunmaktadır, ayrıca  $\alpha$  – laktalbumin ve laktoferrin önemli immün fonksiyon gösteren diğer proteinlerdendir.  $\alpha$  – laktalbumin, temel olarak laktoz üretiminin düzenlenmesinde görevlidir. Ayrıca bu protein inek ve insan ve keçi kolostrum ve sütünde immünomodülatör olarak görev almaktadır (106). Keçi ve inek türleri arasında bu proteinin belirgin bir konsantrasyon farkı (2,77 / 2 mg/mL) görülmemektedir (107). Laktoferrin; yüksek konsantrasyonlarda bulunan, enfeksiyonlara karşı immün cevap veren, demir (Fe) iyonlarını bağlama ve taşımada görevli bir proteindir. Ayrıca inek ve keçi kolostrumunda bu protein konsantrasyonunun değiştiğini gösterilmektedir (0,84 / 3,09 mg/mL).(32) Laktoferrinin çok çeşitli biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır, meme bezinden sentezlenen doğal immün bir faktördür. Bakterisit veya fungusit olarak davranarak anne ve yenidoğana antimikrobial etki sağlar. İnflamatuar reaksiyon ve bazı viral enfeksiyonlarda konsantrasyonunun artış göstermesinden dolayı akut-faz proteini olarak sınıflandırılmıştır (108).

Skim milk grubuna ait diğer bir üye olan kazeinin temel olarak 4 tipi bulunmaktadır. ( $\alpha$ 1,  $\alpha$  2,  $\beta$  ve  $\kappa$ ) Kazeinler, iyon (kalsiyum, fosfat, demir, bakır, çinko gibi) taşıyıcı olarak önemli biyolojik olaylara katılır ayrıca biyoaktif peptid prekürsörü ve/veya immünomodülatör olarak görev yaparlar (109). Kazeinin, proteolitik kısımlarının antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle bağışıklık sisteminde rol oynadığı düşünülmektedir (110). Ayrıca peptidlerden elde edilen kazeinler, insanlar için yararlı biyolojik aktiviteler sağlamaktadır. Örneğin, laktasyon başlamadan önceki süreçte memeyi enfeksiyona karşı korur ve meme bezinde doğal bağışıklığı stimüle etmektedirler (111, 112).

Süt, memelilerin farklı türleri arasında, protein içeriği bakımından önemli farklar göstermektedir. Farklı türlerin yenidoğanlarında, whey proteinleri beslenme ve fizyolojik yönden karakteristik özellikler göstermektedir. İki temel whey proteini olan  $\alpha$ -laktalbumin ve  $\beta$ -laktoglobulin, türler arasında ciddi farklılık göstermektedir. İnsan sütü whey proteini çalışmaları bağışıklık sistemi immünomodülatörlerini de kapsamaktadır, bu sebeple konuyla alakalı pek çok çalışma yürütülmektedir (113). Majör proteinlerle ilgili bir diğer çalışma Tay ve ark.ları (53) tarafından yapılmıştır. Keçi, inek ve insan



sütü örnekleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada insan sütünün %30 oranında kazein ve %70 oranında whey protein (%24  $\alpha$ -laktalbumin, %15 karboksil ester lipaz, %13 serum albümin, %8 immunoglobulin, %8 lizozim, %1 laktoferrin ve %1 mannoz reseptör) içerdiği belirtilmiştir. İnsan sütü ve ruminant sütü arasındaki temel fark  $\beta$ -laktoglobulinde görülmüştür.  $\beta$ -laktoglobulin inek sütü içinde en yüksek oranda bulunan whey protein olmakla birlikte alerjilere sebep olduğu bilinmektedir. Keçi sütü içeriğinde de  $\beta$ -laktoglobulin'in yüksek oranda bulunması benzer alerjik sorunların keçi sütünde de görülebileceğini vurgulamaktadır (114). Bellioni-Businco ve ark.larının (1999) (115) yaptıkları bir çalışmada IgE 'nin bir inek alerjisi bulunan çocuklara keçi sütünün, faydası olmadığı belirtilmiştir. Bunun nedeni allerjenin hem inek hemde keçi sütünde bulunan  $\alpha$ s1-kazein olması ve insan sütünde  $\alpha$ s1 kazein bulunmamasıdır (53).

### **2.2.2 LAP (low abundant proteinler)**

Süt içeriğinin büyük çoğunluğu oluşturan HAP'lardan geriye kalan %10 luk kısım minör proteinlerden (LAP) oluşmaktadır (116). Anne sütü, whey veya MFGM tabakasına yerleşmiş %5'lik bir LAP içeriğinden oluşmaktadır (106). Kolostrumdaki LAP'ların insan ve hayvan metabolizmasındaki biyolojik rolünün öğrenilmesi hakkındaki çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır(117-119). LAP proteinlerinin tanımlanması ve fonksiyonları tam olarak aydınlatılmadığı halde büyümenin düzenlenmesi, besin transportu ve pasif immün transferin sağlanması gibi önemli görevlere katıldığı düşünülmektedir (32). Ruminantlarda MFGM ve whey fraksiyonlarında bulunan minör proteinlerin içeriği ve fonksiyonları hala tam olarak bilinmemektedir fakat bu proteinlerin birçoğu tanımlanamamış biyolojik özelliklere sahiptirler (117, 120, 121). Tamamlayıcı faktörler, akut faz proteinleri, anti-mikrobiyal proteinler, peptidler ve sitokinler LAP proteinleri kapsamındadır. Yenidoğanın patojenlere ve diğer çevresel güçlüklerle karşı korunmasını sağlarlar (122). Murakami ve ark.larının 1998'de (123) yaptıkları bir çalışmada insan kolostrumunda (doğum sonrası 2-5. günler), 400 protein gözlemlenmiş fakat kolostrum proteomunun büyük bir kısmının açıklanmamasından dolayı 28 spotta 22 protein tespit edildiği belirtilmiştir.

Palmer ve ark'larının 2006 (124) yılında yaptığı bir çalışmada 151 farklı protein insan sütünün whey fraksiyonunda belirlenmiştir. Bu çalışmada öncelikli olarak, whey fraksiyondaki majör proteinler belirlenmiş (Ig  $\alpha$  zinciri, Ig hafif zinciri, Ig J zinciri, Lactoferrin,  $\alpha$ -laktalbumin, HSA), ardından ise majör proteinleri ortamdan uzaklaştırma amacı ile bu proteinlere yüksek afinite ile bağlanan antikorlar kullanılmıştır. Bu çalışmada belirlenen proteinlerden, 83 adet proteinin insan kolostrumunda daha önce tanımlanmadığı, 76 adet proteinin ise diğer türlerde bulunmadığı sadece insana özgü olduğu belirtilmektedir. Kolostrumda yeni tanımlanan bu proteinlerin, kolostrum için önemli görevleri olduğu ve özellikle bağışıklıkta görev aldığı ayrıca belirtilmektedir. Bu çalışmada ilk kez tanımlanan ve bağışıklık sistemi ile ilgisi olan proteinler; kompleman sistemden C1r-benzer proteinaz, kompleman faktör I, kalgranulin A, kalgranulin B, sisteinden zengin secretory protein-3, mucin 5B, nötrofil gelatinase associated lipocalin ve uteroglobulin related protein 2 olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada, daha önce insan kolostrumunda tanımlanmayan proteinler arasında büyüme ile ilişkili proteinlerin de var olduğu belirtilmektedir. Bu proteinlerden; kök hücre büyüme faktörü, büyüme inhibitörü stanniocalcin 2, follistatin-related protein 1 ve neurophilin 1 proteinlerinin insan kolostrumunun whey fraksiyonundaki varlığı ilk defa bu çalışma ile belirlenmiştir. (124)

İnsan kolostrumu ile insan sütünün proteomik profilinin gerek total protein miktarı gerekse protein kompozisyonu açısından farklılık gösterdiği literatürde belirtilmektedir (8). Liao ve arkadaşları (53) tarafından yapılan çalışmada, insan kolostrum ve insan sütünün proteomik profillerinin araştırılması amacı ile whey fraksiyonunda az olarak bulunan proteinler belirlenmiştir. Bu çalışmada da, whey fraksiyonunda yüksek oranda bulunan laktoferrin gibi majör proteinlerin ortamdan elimine edilmesinin ardından, insan kolostrumunda 115 proteinin tanımlandığı ve tanımlanan bu proteinlerin 17.4%'sinin sinyal ileti minde, 2.6%'sinin nükleik asit regülasyonunda, 34.8%'sinin bağışıklık sistemi cevaplarında, 5.2%'sinin hücre büyümesinde, 12.6%'sinin transportta, 7.85%'sinin protein metabolizmasında ve 16.5%'sinin ise metabolizmada görevli olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada tespit edilen proteinlerden; gelsolin, cofilin-1,  $\beta$  - acting-like protein 2, chordin-like protein 2

ve retrotransposon-like protein 1 proteinleri insan sütünde yeni tanımlanan proteinlerdendir. Ayrıca lipit metabolizmasına katkıda bulunan 13 protein belirlenmiştir. (Apolipoprotein A-I, A-II ve D, butrophilin subfamily 1 member A1, karboksil ester lipaz (bile salt activated lipaz), yağ asidi bağlayıcı protein, lipoprotein lipaz, perilipin-2,3, triosefosfat isomeras, zinc- $\alpha$ 2-glikoprotein ve xanthine dehidrogenaz. Bunlardan perilipin-2,3, triosefosfat isomeras ve yağ asidi bağlayıcı proteini ilk defa anne sütünde bulunmuştur. Ek olarak enerji metabolizmasında görevli çok çeşitli proteinlerde anne sütünde tespit edilmiştir. Proaktivatör peptid, alkoldehidrogenaz,  $\alpha$ -enolaz, fruktoz bisülfat adolaz A, L-laktat dehidrogenaz B chain, UTP-glikoz-1-fosfat uridiltransferaz, glikoz metabolizmasına katılan enerji üretimi yolağında görevli proteinlerdir. Nükleik asit, nükleotid ve nükleik asit metabolizmasında görevli bulunan proteinler; histoneH2B type 1-D,RNA-binding protein with serine rich domain1, lizin-spesifik histone demetilaz1A şeklindedir. Son olarak protein metabolizmasında görevli proteinler; peptidil-prolil cis-transizomeras A ve B, protein disülfid izomeras A1 ve A4, sistatin C, 60S asidik ribozomal protein P1'dir. Tüm bu minor whey proteinlerinin arasında kolostrumda süte nazaran daha fazla bulunan proteinler şöyle belirtilmiştir. $\alpha$ -1 antitripsin,  $\alpha$ -laktalbumin, karbonik anhidraz 6, chordin-like protein 2, galectin 3 binding protein, lactadherin, laktoferrin, prolaktin inducible protein ve tenascin.(8)

Molinari ve arkadaşları tarafından (2012) (125) yürütülen çalışmada 28 ile 32. Haftada doğum yapan anneler (preterm) ve 38 ile 41. Haftada doğum yapan annelerin (postterm) sütü skim milk proteomik profilleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmaya göre, preterm ve postterm süt örneklerinin proteomik profilleri özellikle çok bulunan proteinler göz önüne alındığında birbirlerine benzer olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada toplamda 415 protein, iki örnek grubu olan preterm ve postterm insan kolosturumunda tanımlandığı ve 261 proteinin daha önce insan sütünde yapılan çalışmalarda tanımlanmadığı ilk olarak bu çalışma ile tanımlandığı belirtilmektedir. Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, tanımlanan proteinlerin 28%'si hücre metabolizmasında görevli olduğu ve özellikle glikoliz, pentoz fosfat, sitrat, karbohidrat metabolizmasında görevli proteinlerin yüksek oranda tanımlandığı belirtilmektedir.

Çalışmada tanımlanan diğer proteinler ise; 24% bağışıklık sisteminde, 9% lipid metabolizması ve transport, 7% besin dağıtımı, 16% protein metabolizması, 8% sinyal yolları, 7% doku gelişiminde rol oynadığı belirtilmektedir. Tespit edilenler arasındaki 80 protein HAP olarak tanımlanmıştır (125).

Yamada ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada kolostrum ve süt whey proteomu incelenmiş ve gelsolin, chitinaz-benzeri protein, apolipoprotein H, complement C3, ve fibrinojen  $\beta$ -zinciri proteinlerinin sadece kolostrumda bulunduğu ve bu LAP'ların yenidoğanların sağlığı ve gelişimi için önemli olduğu belirtilmiştir (119). 2012 yılında Nissen ve ark.larının yaptıkları bir çalışmada inek kolostrumuyla yaptıkları çalışmada 882 adet protein bulunmuştur. Bunan proteinlerin 42 tanesi sadece whey fraksiyonunda tespit edilen proteinlerdir (28). Yine Nissen ve ark.larının 2013 yılında (126) sütü fraksiyonlara ayırmadan yaptıkları analizde 366 adet protein tespit edilmiştir. Bunlardan 93'ü whey protein fraksiyonuna aittir.

### **2.2.2.1. Önemli LAP'lar ve immün sistem ile ilişkisi**

Anne ve yenidoğanda immün sisteme destek vermekte olan belirtilen başlıca LAP'lar plazmin proteini, serum amiloid A, fibrinojenler, tripsin inhibitörü, liposakkarit bağlacı protein ve anti-mikrobiyal peptittir (32).

Plazmin proteini, kan pıhtılarının çözülmesinin sağlayarak trombozu önleyen önemli bir fibrinolitik enzimdir (127). Plazmin sadece kan, süt ve kolostrumda tespit edilmiştir. (7) Ayrıca inek kolostrumunun, sütüne kıyasla 10 kat daha fazla plazmin içerdiği belirtilmiştir (46). Plazminin immünolojik aktivitesi, vücutta bir enfeksiyon oluştuğunda nötrofil göçüne katkı sağlamasıyla ortaya çıkmıştır (128).

Serum Amiloid A (62), proteini temel olarak lipoprotein komplekslerinde bulunur. İnflamasyonun akut fazında görevli ve doğal immün sistemin bir elemanı olduğu için yüksek oranda korunmuş bir proteindir (129, 130). SAA, insan dahil olmak üzere bir çok canlı türünde kolostrumda bulunur (7, 131). Bu akut faz proteininin bir alt grubu olan SAA-3, mastisit sırasında patojenler ve patojen-kaynaklı lipoteikoik aside immün cevap oluşturmak üzere süt ve kolostruma eksprese olmaktadır (132). McDonald

ve ark.larının (2001) (133) yaptığı çalışmada SAA-3 inek kolostrumunda süte göre çok daha fazla bulunduğu (267.45 / 2.63 µg/mL), ayrıca SAA-3 ün koyun kolostrumu konsantrasyonunun ve ineğe göre daha düşük olduğu (62.83 / 267.45 µg/mL) belirtilmiştir. SAA proteinlerinin çok çeşitli proinflammatuar işlevleri bulunmaktadır. Bunlar genel olarak, nötrofil, monosit ve T-lenfositlere karşı kemoatraktan görevi yapma, lökositin süzülmesini (infiltrasyon) sağlama nötrofilin endotelial hücelere yapışmasını teşvik etme, ayrıca sitokin ve metalloproteinazları serbest bırakmak için nötrofil ve monositleri uyarma başlıca görevleridir (32).

Fibrinojenler, kan pıhtılaşmasında görevli fibrinin prekürsürüdür. Fibrinojenlerin konsantrasyonunun, akut-faz reaksiyonları sırasında yükselmesi koruyucu fonksiyonunu ortaya çıkarmaktadır (134, 135). Yamada ve ark.ları 2002'de inek kolostrumu ve sütü arasında LAP farklılıkları hakkında yaptıkları çalışmayla, fibrinojenin sadece kolostrum içeriğinde bulunduğunu ortaya çıkarmışlardır (119).

Tripsin inhibitörü (TI), ( $\alpha$ 1-antitripsin), proteolitik bölünmeye karşı koruyuculuğu bilinen proteindir. Bu protein çeşitli çalışmalarda 2-DE jel elektroforezi ve LC-MS/MS ile inek kolostrumunda tespit edilmiştir (28, 119). TI'nın, kolostrumda sütün 100 katı kadar fazla bulunduğu ve immün bileşenlerin bozulmadan absorplanmasını sağladığı bildirilmiştir (32).

Liposakkarit bağlayıcı protein (LBP), Gram negatif bakterilerinden kaynaklı gelişen enfeksiyonlarda en çok üretilen proteinlerden olmakla beraber gram pozitif bakterilerden kaynaklı enfeksiyonlarda da aktif biçimde rol almaktadır (136). Bu protein inek kolostrumunda 2D-LC-MS/MS kullanılarak tespit edilmiştir (28). Bakteriyel liposakkaritlere (LPS) bağlanarak eksprese olur, bakterinin hücre duvarından girerek LPS taşıyıcısı gibi davranır. Bu şekilde LPS – bağımlı monosit cevabını kontrol altında tutulmasına yardımcı olur (122).

Anti-mikrobiyal peptid (AMP's), hızlıca enfeksiyon ajanlarını (mikrobiyal membranların bütünlüğünü bozarak) inaktif etmekle görevlidir (137). Memelilerde görünen iki ana grubu defensin ve katelisinler temsil eder. Defensinler, edinilmiş

immün cevap ile bağlantılı küçük antimikrobiyal peptid gruplarıdır (138). Yapısal olarak, mikrobiyal ürünlere ya da inflamatuvar sonrası sitokinlere cevap üretilebilirler (139-141). Özellikle  $\beta$ -defensin ailesine üye olan proteinlerin mastisit sırasında meme epitel hücrelerinden eksprese oldukları bildirilmiştir(142, 143). Ayrıca insan kolostrumunda yüksek seviyelerde gözlemlenmiştir (144). Katelisidinler, agresif bakteri enfeksiyonuna karşı doğal bağışıklık sistemi içerisinde yer alan bir peptid grubudur (145). Mikrobiyal yüzeylerdeki moleküler desenlerin tanınmasıyla işleyen bir sistemi olduğu belirtilmektedir. Sistem temel olarak elektrostatik etkileşime dayanmaktadır, katyon durumundaki peptidler ve anyon durumundaki bakteriler, lipid tabakasının içine yerleşerek, mikrobiyal bütünlüğü bozmaktadırlar (146). Katelisidin sığır, keçi ve koyunda hem kolostrumda hem sütte tespit edilmiştir (122).

### **2.3. Sütteki Proteinlerin Tanımlanması ve Analizi için Kullanılan Proteomik Teknikler**

Süt proteinleri yaklaşık 50 yıldır derinlemesine çalışılan bir konudur. Proteomik ve ona bağlı gelişen teknolojiler, proteinlerinin tespit edilmesi, tanımlanması ve nitelendirilmesini sağlayan yöntemler geliştirmektedir (147). Süt/kolostrum protein konsantrasyonunun geniş bir aralıkta olması ve subcelluler düzeyde yerleşmeden dolayı, tüm kolostrum proteomuna ait genel bir protokol oluşturulamamıştır (32). Bu nedenle kompleks süt içeriği proteomik analizlerden önce fraksiyonlarına ayrılmaktadır (148). Proteinlerin tespiti 4 aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar; (43) proteinlerin ayrılması, (43) proteinlerin parçalanması, (3) peptidlerin MS analizi ve (43) bulunan peptidlerin veritabanında karşılaştırılmalarıdır.

#### **2.3.1. Sütün fraksiyonlara ayrılma metodları**

Kolostrum proteinleri buldukları fraksiyonlara göre 3 ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar, kazeinler, whey proteinleri ve MFGM proteinleridir. Çözünebilen süt proteinleri whey fraksiyonunda, miseller formda olanlar ise kazein fraksiyonunda bulunmaktadır. Toplam protein içeriğinin bir kısmı da MFGM da bulunmaktadır. Çiğ sütün bu farklı fraksiyonlarını elde etmek için ilk aşama olarak düşük hızda bir santrifüj ile MFGM

proteinlerinin ayrılması, ardından ultrasantrifüj ile kazeinlerin uzaklaştırılması sağlanması yaygın kullanılan yöntemdir.

#### **2.3.1.1. HAP'ların analizi**

Süt proteomiks çalışmalarının en basit analizleri yüksek miktarda bulunan proteinleri (HAP) tanımlamaktır. Kazeinler ve majör whey protein içerikleri yüksek seviyelerde bulduklarından kolayca tespit edilebilmektedir (147). Galvani ve ark.larının 2000 ve 2001'de yaptıkları bir çalışmada 2-D PAGE ve ardında MALDI-MS kullanılarak süt proteinleri araştırılmıştır. Süt proteinlerinin kompleks heterojen yapısı sebebiyle yüzlerce proteinden sadece dominant olan kazein,  $\beta$ -immünoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbumin proteinleri tespit edilebilmektedir (147).

#### **2.3.1.2. LAP'ların analizi**

Proteomik çalışmalarda en yüksek miktarda bulunan proteinlerin (HAP'ların) ortadan kaldırılması, identifikasyon ve ayırımın daha detaylı yapılabilmesi için çok önemlidir. Kolostrumdaki (HAP) yüksek miktarda bulunan proteinler (transferrin, plasmin, lipoprotein lipaz, alkalın fosfataz ve diğer immünoglobulinler vb.), düşük miktarda bulunanlarla (LAP) benzer izoelektrik nokta ve moleküler ağırlığa sahip olduklarında 2-D jel üzerinde aynı bölgeye yerleşmektedirler (120). Bu sebeple, kolostrumda HAP'ların (özellikle Ig'lerin) LAP'ları maskeleymesini önlemek amacıyla ayrılması gerekmektedir (147).

İmmünopresipitasyon, spesifik proteinlerin çöktürülmesine (uzaklaştırılmasına) olanak sağlar. Fakat süt proteinlerine karşı kullanılan antikorlar masraflı olabilmektedir. Ayrıca HAP'ların uzaklaştırılmasında, microscale solution IEF (İzoelektrik fokuslama), afinite etiketleme (affinity tagging), yarı bağlanmış iyon (anyon ve katyon) değişim kromatografisi gibi yöntemlerde kullanılmıştır (32).

HAP'ların uzaklaştırılması için pek çok ticari kit üretilmiştir. Golinelli ve arkadaşları (53) tarafından whey HAP proteinlerinin kolostrumdan uzaklaştırılmasını sağlamak ve karşılaştırmak amacıyla albumin ve IgG uzaklaştırma kiti (GE healthcare Life Sciences,UK) ve Vivaspın 500 ultrafiltrasyon kartuşu (GE healthcare Life

Sciences,UK) kullanılmıştır. Bu çalışma ile albumin ve IgG uzaklaştırma kitinin inek kolostrumu whey proteinleri üzerinde etkisiz olduğu belirtilmiştir. Albumin ve IgG kit içeriğinin, insan proteinlerine karşı agoroz bloke edici anti-IgG olduğu bilinmektedir. IgG tespitindeki bu başarısızlığın inek kolostrumu whey proteinlerinin, inek proteinleriyle çapraz reaktivitesinden olabileceği atfedilmiştir. Ayrıca aynı araştırmada, Vivaspin 500, IgG ve IgA'ların ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamış, LAP'ların tespitini mümkün kılmıştır (118).

LAP'ların tespitini sağlayan bir diğer teknik aptamer teknolojisiyle üretilen ProteoMiner kiti (Bio-rad, USA). Aptamer bir sekans havuzundan hedef moleküle (nükleik asit veya protein) özgü olarak seçilen dizidir (149). ProteoMiner, farklı miktarlarda bulunan proteinlere (yani hem HAP hem de LAP'lara) eşit kapasiteyle bağlanarak bir hexapeptid kütüphanesi oluşturur (150). Bu sebeple, kompleks protein karışımı ligand kütüphanesiyle karşılaştığında, her bir protein damlacığı yüksek affiniteyle hızlı bir biçimde doymuş hale gelir. Majör proteinlerin büyük çoğunluğu bağlanmamış olarak kalırken, LAP'lara karşılık gelen damlacıklar doyurulmayacağından hepsi yakalanır ve bu şekilde LAP'ların miktarında kademeli bir artış sağlanır (151, 152).

Fraksiyonlarına ayırma prosedürüyle birleştirilen diğer tekniklerde desalting, disülfid bağlarının kırılması ve proteinlerin alkilenmesi gibi yöntemleri uygulanmaktadır. Aseton çöktürmesiyle %22 kadar protein kaybedilir (153). Sütün genel protein konsantrasyonu çok yüksek olduğundan bu sayı önemsiz sayılabilese bile final protein profilinde risk oluşturmaktadır. Bir çalışmada çöktürme yapılan ve yapılmayan iki örnek grubu fraksiyonlarına ayrılmış ve 2-DE analizi yapılmıştır. Ultrasontrifüj ile birleştirilen bu metod bir miktar konsantrasyon azalmasına yol açsada, daha iyi bir görüntüleme elde edilmiştir (154)

### **2.3.2. İki boyutlu elektroforez (2-DE)**

2-Boyutlu elektroforez (two-dimensional electrophoresis), O'Farrell ve Klose tarafından 1975 yılında geliştirilen biyokimyasal bir ayırma tekniğidir (155). Günümüzde hücreler, dokular ve diğer biyolojik örneklerdeki kompleks protein



karışımlarının analizinde kromatografi veya kütle spektrometre yöntemleriyle beraber yaygın biçimde kullanılmaktadır. Ayrıca görüntü analizleri ve protein karakterizasyonu ile giderek daha önemli hale gelmiştir. Bu teknik proteinleri iki aşamada farklı niteliklerine göre ayırmaktadır. Birinci boyut, İsoelektrik fokuslama (IEF), proteinleri izoelektrik noktalarına (pI) göre ayırmaktadır. İkincisi boyutta ise, SDS-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile moleküler ağırlıklarına (MW) göre yüksek çözünürlükte bir ayırım gerçekleştirir (149). 2-DE jel metodu (two-dimensional gel electrophoresis) özellikle LAP'ların süt ve kolostrumda tanımlanmasında çok kullanılan tekniktir (119, 147, 156).

2-DE ile izoelektrik nokta ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılan ve jel görüntüsü üzerinde dağılım gösteren proteinlerin varsayımsal tanımlanması gerçekleştirilebilmektedir. Jel üzerinde beliren protein spotları kesilip çıkarıldıktan sonra peptid analizi gerçekleştirilmektedir. Sonrasında ise kütle spektrometri analizleri yapılarak genom sekans veritabanlarına göre kimliklendirilmektedir. Ayrıca süt proteinlerinde kromatografik ayırma metodları da kullanılmaktadır. Triptik peptidler kullanılarak gerçekleştirilen kromatografik analiz pek çok avantaj içermektedir. 2-DE bazlı metodlar büyük veya küçük proteinlerin ve hidrofobik ve izoelektrik noktası uç değerlerde olan proteinler için ayırım sağlamaktadır. İntakt proteinlerin 1 veya 2 boyutlu elektroforez ile ayrılması ardından kromatografik ayırımın sağlanması çok iyi bir proteomik kapsam oluşturmaktadır, Molinari ve arkaları (2012), ProteoMiner kullanıldıktan sonra 2D-LC analizi ile yapılan çalışmada daha önce anne sütünde (skim milk) tespit edilemeyen 261 protein tanımlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada Proteominer'in etkinliğini artıran iTRAQ protokolü kullanıldığı da belirtilmiştir (125, 149).

Temel 2-D analizinde jeldeki örneklerin karşılaştırılması için çok güçlü bir istatistik analiz gerekmektedir. Karşılaştırmalı proteomik analiz farklı proteomların birlikte değerlendirilmesi için bir araçtır. Bununla birlikte zahmetli ve deneysel hata eğilimli bir yöntem için alternatif sağlamaktadır (156). Bu tekniklerin çoğu protein ya da peptid seviyesinde ayırıcı bir etiketleme sağlar. 2-D'nin bir varyantı olan iki boyutlu difference jel elektroforezi (2-D DIGE), örneklerin farklı renkte floransan boyalarla

(Cy3, Cy5, Cy2) kovalent bağlarla bağlanmasına olanak vermektedir ve jellerin çoklu tekrara uygun olmasını sağlaması bakımından önem göstermektedir. 2 – DIGE ile iki örnek ve IS'ın (internal standart) aynı jel üzerinde çalışılması sağlanmaktadır. Farklı boya ile etiketli örnek grupları farklı uyarılma göstererek farklı emisyon spektrumu oluştururlar. Ayrıca aynı kökenden gelen proteinler, jel üzerinde benzer floresan sinyal vererek spot şeklinde belirginleşmektedirler. Bu şekilde tam bir ayırım sağlanmaktadır (125, 157). 2-DIGE haricinde karşılaştırmalı proteomikse ait kromatografi ve kütle spektrometresi gibi izotopik etiketlerin kullanılmasını içeren metodlar bulunmaktadır. Bu yöntemler şöyledir; ICAT (Isotope Coded Affinity Tagging), O18 labelling, dimetil labelling, iTRAQ (isotope tagging for relative absolute quantitation) ve label-free quantitation (direct quantitation by comparison of ion abundance) (149). Günümüzde 2-DE ile karşılaştırıldığında daha az örnek miktarıyla daha çok protein tanımlayabilen veya tekrarlanabilir sonuçlar oluşturabilen özellikle iTRAQ ya da label-free yöntemleri süt proteomiksinde de kullanılmaktadır. iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation) olarak bilinen yöntem kompleks vücut sıvılarının proteomlarının daha yüksek doğrulukla çalışmasını sağlamıştır, ancak cihaz, ekipman ve reaktiflerin oldukça pahalı olması ve çoğu laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaması bu metodların dezavantajı olarak görülmektedir (32, 125).

### **2.3.3. Kütle spektrometrisi**

Proteomik çalışmaların hızlanmasıyla proteinlerin tespiti ve kapsamlı olarak karakterize edilmesi kütle spektrometrisi ile gerçekleştirilmektedir (147). Bu alandaki gelişmeler, büyük moleküllerin iyonizasyonu için, Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) gibi günümüzde en çok kullanılan yöntemlerden birinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur (158). Kütle spektrometresi basitçe kütle analizörüne bağlı olan bir iyon kaynağıdır. Bu tip cihazlarda dedektör olarak basit quadropole (Q), time of flight (TOF) ya da daha karmaşık cihazlar için fourier transform ion-cyclotron resonance (FTICR) analizörleri kullanılmaktadır. Kütle spektrometrisi (Mass Spectrometry, MS), hem kütle, hemde protein sekansına ilişkin büyük miktarda veri ortaya çıkarma kapasitesine sahiptir. Kütleyle ilişkin bilgiler basit MS'lerle sağlanırken, sekans bilgileri

tandem kütle spektrometrisi ile (MS/MS) sağlanmaktadır. Bunun için çoğunlukla başlangıçta spesifik bir iyon seçilir, bir sonraki bölmede parçalanır ve ikinci kütle analizöründe analiz edilir (147).

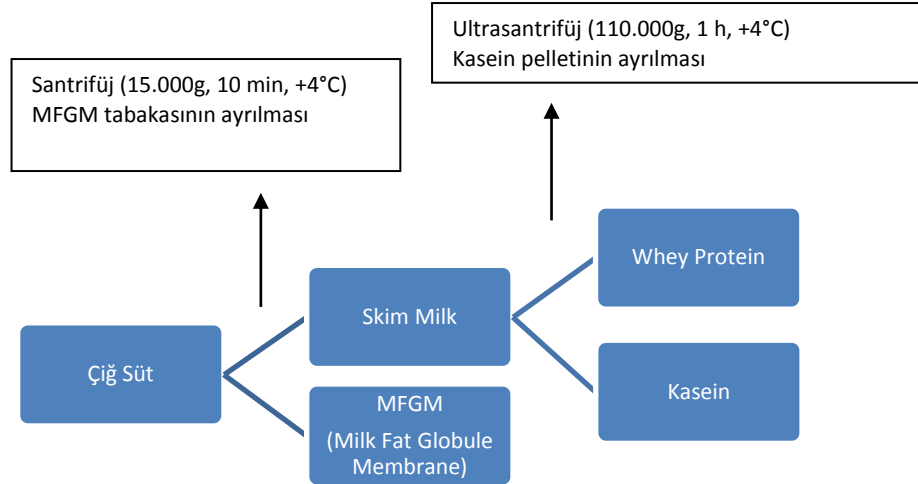
Peptid dizi analizleri, protein identifikasyonu ve haritalama, moleküler kütle ve özellikle post-translasyonel modifikasyonların belirlenmesi amacıyla en yaygın kullanılan sistem MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) dur [3]. MALDI-TOF/TOF MS ise, kompleks proteinlerin analizinde tercih edilen bir metod haline gelmiştir. Sağlam, hassas ve nispeten ucuz bir yöntemdir. Bu yöntem ile literatüre çok daha fazla tanımlanan protein eklenmiştir (Webster 2012).

iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantification), anında tespit edilmesini sağlayan yüksek verimlilikte bir kantitatif proteomik metoddur. Ayrıca MS/MS'deki röportör iyonların pik yoğunlukları ile peptidlerin ölçümünü sağlar (159).

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Örneklerin Toplanması

Araştırma dahilinde Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma hastanesinde 38-42. haftalarında (term) doğum yapan annelerden kolostrum örnekleri toplanmıştır. Herhangi bir hastalığı (kalıtsal ya da dönemsel) bulunan veya ikiz bebek doğuran anneler çalışma dışında bırakılmıştır. Kolostrum örnekleri laktasyon başlangıcından itibaren 12 – 24 saat içinde el ile sağma yöntemiyle 50 ml'lik polipropilen kaplarda toplanmıştır. Keçi kolostrumları ise, İzmirde bir aile çiftliğindeki sağlıklı, laktasyonun başlangıcındaki annelerden el ile sağma yöntemiyle 50 ml'lik polipropilen kaplarda toplanmıştır. Bütün kolostrum örnekleri 2 ml'lik kapaklı mikrotüplere porsiyonlanarak analizlere kadar  $-80^{\circ}\text{C}$  'lik dondurucularda muhafaza edilmiştir.



Şekil 2. Whey proteinlerinin elde edilmesini anlatan iş akışı.

### 3.2. Protein Ekstraksiyonu ve İşaretleme

Whey proteinlerinin elde edilmesi işleminin başlangıcı MFGM fraksiyonunun ayrılması ile gerçekleşir. Bu amaç ile 6 insan ve 6 keçi kolostrumu (1.5ml) +4°C'da, 15.000 g.'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmında kalan kremi yağ tabaka uzaklaştırılarak skim milk süpernatant olarak elde edilmiştir. Ardından tüm örnekler proteaz inhibitör karışımı (100X, (GE Healthcare Bio-sciences corp.) eklenmiştir. Örnekler sabit açılı rotor (SW40ti) kullanılarak, +4°C 'da 110.000g'de 1 sa, ultrasantrifüj (Beckman Coulter optima L-90K ultracentrifuge) edilmiştir. Süpernatant durumundaki whey fraksiyonu, pellet halinde tüpün dip kısmına çöken kasein fraksiyonundan uzaklaştırılmıştır. Ayırma işlemindeki farklı uygulamalar tablo 4 ve tablo 5'de gösterilmektedir.(32)

**Tablo 4.** Farklı çalışmalardaki santrifüj uygulamaları

Tür	Santrifüj			Referans
	Hız (g)	Zaman (dk.)	Sıcaklık (°C)	
İnek	5,000	15	4	(160)
İnek	15,000	15	10	(120)
İnek	10,000	15	4	(117)
İnsan*	1,500	20	25	(93)
İnsan	4,000	30	4	(97)
Koyun	1,500	20	25	(161)
İnsan**	15.000	10	4	-
Keçi**	15.000	10	4	-

\*100mL süte 5g sükröz eklenmiştir.

\*\*Bizim çalışmamızdaki uygulama

**Tablo 5.** Farklı çalışmalardaki ultrasantrifüj uygulamaları

Tür	Ultrasantrifüj			Asit ile Çöktürme	Referans
	Hız (g)	Zaman (dk.)	Sıcaklık (°C)		
İnek	16,500	30	4	C2H4O2 (1N)	(118)
İnek	-	-	-	C2H4O2 (30% V/V, pH 4.6)	(43, 160)
İnek	15,000	15	10	HCL (1M, pH 4.6)	(120)
İnek *	44,000	30	4	-	(162)
İnek	100,000	60	4	-	(7)
İnsan*	13,000	30	4	HCL (1M, pH 4.6)	(8)
İnsan*	189,000	60	4	HCL (1M, pH 4.3)	(163)
İnek	1,500	10	5	C2H4O2 (1N) + CH3COONa (1N)	(164, 165)
İnek	100,000	60	4	-	(164)
İnsan	10,000	15	4	HCL (1M, pH 4.6)	(97)
İnsan**	110,000	60	4	-	-
Keçi**	110,000	60	4	-	-

\*\*Bizim çalışmamızdaki uygulama

Hem insan hemde keçi kolostrum örnekleri total protein miktarını tayin etmek için önce BSA (bovine serum albumin) ile Bradford metodu kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu, Bradford metodunda çok yüksek çıkması sebebiyle ikinci bir yöntem olarak 2-D Quant kit (166) kullanılarak saptanmıştır. Absorbans ölçümü DU 800, Beckman – Coulter spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir.

Örnekler, kit protokolüne uygun olarak CyDye fluorasan boyaları ile işaretlenmiştir. İnternal standart (IS), tüm keçi (n=6) ve insan (n=6) örneklerinin içinde bulunduğu bir havuzu temsil etmektedir ve Cy2 ile boyanmıştır. Örnekler 2 grup halinde Cy3 ve Cy5 ile işaretlenmiştir. İlk grup H1, H2, H3 insan örnekleri ve G4, G5, G6 keçi örneklerinden oluşmaktadır ve Cy3 ile boyanmıştır. İkinci grup ise, H4, H5, H6 insan örnekleri ve G1, G2, G3 keçi örneklerinden oluşmaktadır ve Cy5 ile boyanmıştır. Sonuç olarak 6 tane jel, her birinde 1 adet Cy3 işaretli örnek, 1 adet Cy5 işaretli örnek ve 1 adet internal standart bulunacak şekilde dizayn edilmiştir. (Tablo 6)

**Tablo 6.** İnsan ve Keçi örnekleri işaretleme grupları

Jel	Cy3	Cy5
1	H-1	G-1
2	H-2	G-2
3	H-3	G-3
4	G-4	H-4
5	G-5	H-5
6	G-6	H-6

### 3.3. Proteomik Analiz

#### 3.3.1. İki boyutlu difference jel elektroforezi (2-DIGE)

##### 3.3.1.1. İzoelektrik fokuslama (IEF)

İzoelektrik fokuslama, proteinleri yükleri temel alınarak ayırım sağlar. Analizin ilk adımı olan rehidrasyon için IPG stripler (Immobilized pH gradient, non-lineer 3-10) üzerindeki plastik bant çıkarılarak, rehidrasyon tablasının içinde 3ml Destreak rehidrasyon solüsyonu (GE Healthcare) ve 15µl Servalytes 3-10 iso-dalt (167) karışımı ile yaklaşık 16 sa (overnight) muamele edilmiştir.

Rehidrasyondan sonra IPG stripleri, IEF için Ettan IPGphor3 cihazındaki çok kuyucuklu manifold tablasına jel kısımları yukarıya bakacak şekilde yerleştirilmektedir. İşaretlenen örnekler ve Lysis buffer (7M Ure, 2M Triure, 0.5% CHAPS, 0.6% Destreak Agent ve 2% Servalytes) strip başlarına yerleştirilen örnek koyma kaplarına konulmuştur. Strip yüzeyleri jellerin kurummasını önleyici sıvıyla kaplandıktan sonra (Drystrip cover fluid). Elektroforez yaklaşık 21 sa, 90kVbs'da çalışmıştır.

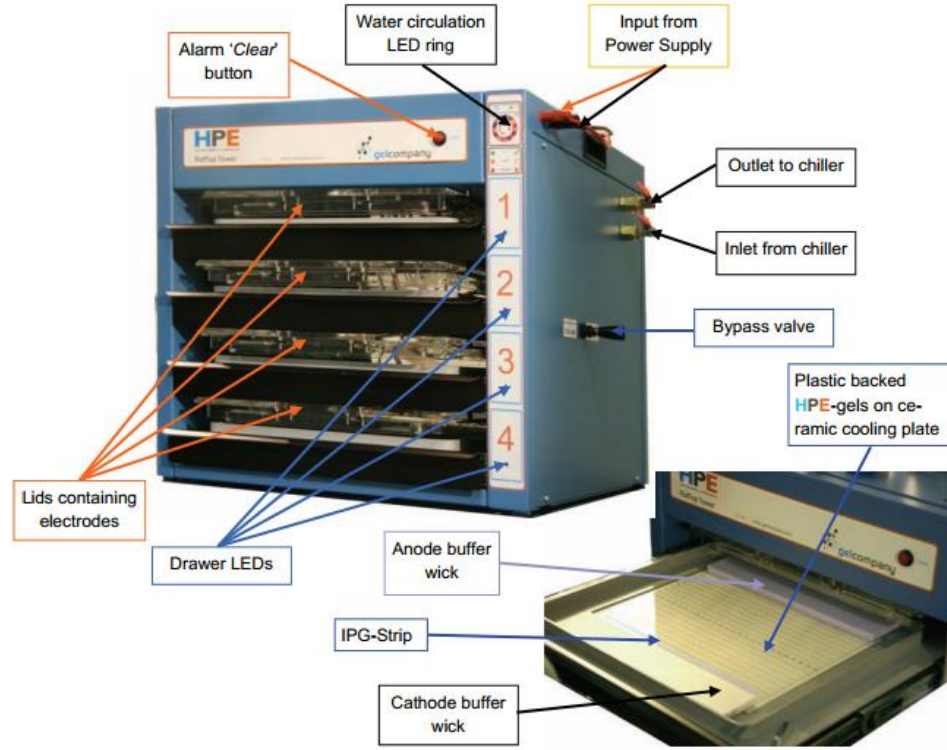


**Şekil 3.** Ettan IPGphor 3 IEF (isoelektrik fokuslama) Sistemi (166)

### **3.3.1.2. İkinci boyut analizi**

İkinci boyut analizleri için HPE (High Performance Electrophoresis) Flat-Top Tower kullanılmıştır. Bu teknik çoklukla kullanılan dikey değil yatay bir elektroforez sistemidir. Bu yatay sistem, soğutulan bir plaka üzerinde jelin üst yüzeyi açık kalacak şekilde yerleştirilerek elektrot bağlantılı şeffaf kapaklarla kapatılmaktadır. Raf sistemi şeklinde olması sayesinde 4 jelin aynı anda çalışılması sağlanır (şekil 4). İşlem sırasında running buffer ve equilibration solüsyonu için hazır buffer kitleri (167) kullanılmıştır. IPG striplerin dengelenmesini (equilibration) sağlamak için üre, DTT (Dithiothreitol) ve IAA (iodoacetamide) kullanılmıştır. 2-D için non-fluorasan 12,5% büyük boy jeller (24cm), soğuk plaka üzerine yerleştirildikten sonra, stripler uzun kenarındaki yuvaya jel kısmı aşağı bakacak şekilde konulmuştur. Sistem öncelikle 15°C’de yükselen voltajda (100V, 30dk ;200V, 30 dk; 300V, 10dk) çalıştıktan sonra, striplerin çıkarılması için durdurulmuş, sonrasında 220V’da gece boyu ve 1000V’da 3saat çalışarak işlem tamamlanmıştır.

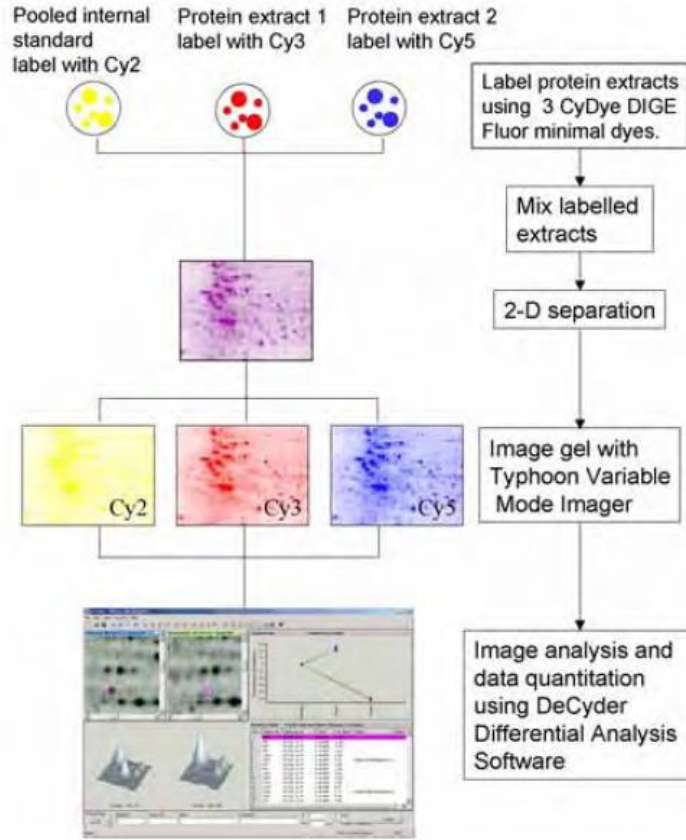




**Şekil 4.** HPE™-FlatTop Tower Elektroforez sistemi (167)

### 3.3.1.3. Jellerin görüntülenmesi

Florasan boyalarla işaretlenmiş proteinlerin görüntülenmesi lazer okuyucularla gerçekleştirilmiştir (Typhoon FLA 9500 Gel Imaging Scanner ,GE Healthcare). Cihazın 3'lü lazer sistemi sayesinde 2 – DIGE işleyişine göre Cy2, Cy3 ve Cy5 ile boyanmış örnekler için 3 ayrı spot görüntüsü alınmıştır. Çalışmamızda tüm jeller 100 µm/pixel çözünürlükte taranmıştır. Jel dışında kalan ekstra alanlar, Image-Quant kullanılarak kesilmiştir. Jel görüntüleri DeCyder 2D version 7.0 (166) veritabanına aktarılarak işlenilmiş ve florasan sinyalleri temel alınarak göreceli ekspresyon analizi yapılmıştır. 2-DIGE görüntüleri, Differential in-Gel Analysis (DIA) denilen workspace'e aktarılarak spotların tespiti ve kantitatif analizi gerçekleştirilmiştir. Ardından DIA workspace'leri, Biological Variation Analysis (BVA)'e aktarılmıştır ve jeller tek bir workspace içerisinde toplanarak analize devam edilmiştir (Şekil 4). En yüksek spot sayısı olan jel, master jel olarak belirlenerek diğer 5 tanesi, ona taslak oluşturacak şekilde eşleştirmeler yapılmıştır.



**Şekil 5.** DeCyder veritabanı iş akışı(168)

### 3.3.1.4. Protein spotlarının Kesilmesi

DeCyder veritabanında seçilen master jel üzerinden kesilmek üzere bir spot listesi oluşturulmuştur. Robot sistemi kullanılarak (Ettan Spot Picker, GE Healthcare), veritabanındaki koordinatlarına göre protein spotları kesildikten sonra barkodlu 96'lı well-platelere aktarılmıştır. Jel digestion, tripsin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 4 mikroplate Gel plug and liquid-handling system (TECAN) ile otomatik analiz edilirken, 1 mikroplate manuel olarak çalışılmıştır. Spotlar 2 kere 20'şer dk 100 ul 50 mM amonyum bikarbonat / 50 % metanol ile yıkanmıştır. Daha sonra 2 kere 20'şer dk, 75% acetone ile kurutulup, 8ul trypsin (5ng/ul in 20 mM amonyum bikarbonat) ile 37 °C'de gece boyunca (otomatik sistemde 6 sa) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından peptidler mikroplatelerden 50% acetone/0.1% TFA ile ekstrakte edilip yeni

mikroplatelere aktarılmıştır. Böylelikle peptitler jelden ayrıştırılıp bir sonraki aşama olan MS (mass spektrometri) analizine hazırlanmıştır.

### **3.3.2. MALDI - TOF/TOF**

MALDI TOF/TOF, (Matrix assisted laser desorption/ionization time – of – flight MS) ile peptid fragmentasyonu gerçekleştirilmektedir. Spotlar, peptid ekstraktlarının 2 ul 50% acetonitrile/0.1% TFA ile çözülmesiyle 0.7 µl MALDI hedefi üzerine yerleştirilmiştir. Son olarak hedef üzerine 0.7 µl matris karışımı (7 mg/ml alfa cyano 4 hydroxycinnamic acid / 50% acetonitrile / 0.1% TFA) eklenerek, örnekle karıştırılmış, hedef kurumaya bırakılmıştır. Kütle spektrumu, 5800 MALDI TOF/TOF (AB sciex) analizör cihazında pozitif reflektör modunda çalıştırılarak elde edilmiştir. MALDI-TOF/TOF spektrumları Protein Pilot (ABsciex) ile MASCOT (Matrix Science, Boston, MA) arama motoru kullanılarak, NCBI nr veritabanı (The National Center for Biotechnology Information, non-redundant) memeli taksinomisinde taranmıştır. Kullanılan enzim trypsin, maksimum miscleavage sayısı 2, peptid kütle toleransı ±100 ppm, fragment kütle toleransı ±0.5Da olarak belirlenmiştir. Karbamidometil (C) sabit modifikasyon olarak ve Dioksidasyon (W), Oksidasyon (73), Oksidasyon (M) ve Trp->Kynurenin (W) değişken modifikasyonlar olarak tanımlanmıştır.

MASCOT'un protein tanımlaması tek tek kontrol edilip ve jeldeki spotların herbiri için MASCOT arama sonucunda belirlenen peptidlerin m/z (kütle / yük) değerine göre eşleştirilmiş ve rapor edilmiştir. Bir proteinin raporlanması için anlamlı sonuç vermesi gerekmektedir. Ve bir proteinin anlamlı sonuç vermesi için tek bir peptid skoru veriyorsa en az 75 'in üstünde ve / veya 2 ayrı peptidinin skoru veriyorsa 2'sinin de en az 30'un üstünde olması gerekmektedir.

### **3.3.3. Biyoistatistik değerlendirme**

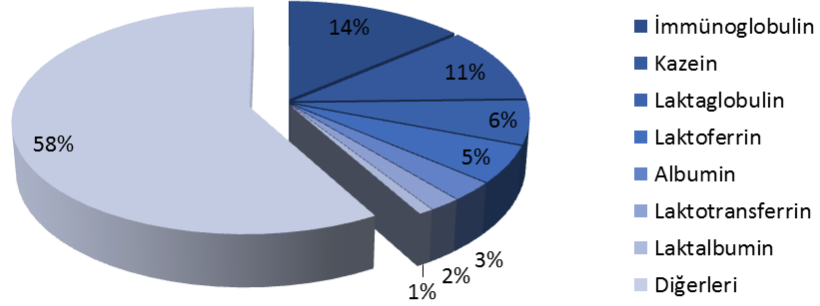
Biyoistatistik değerlendirme DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) ve PANOGA (Pathway and Network Oriented GWAS (Genome-Wide Association Study) Analysis) araçlarıyla yapılmıştır. İnsan ve keçi kolostrumunda ortaya çıkarılan proteinlerin biyoinformatik analizinde DAVID

veritabanı kullanılarak bir sınıflandırma yapılmıştır. Bu analize göre proteinlerin oluşumunu eksprese eden genler ve metabolizmada yer aldığı yollar (Go Term) belirlenerek genel bir bakış açısı geliştirilmektedir. PANOGA fonksiyonel olarak önem içeren yolların tanımlanmasında kullanılmaktadır (169). PANOGA'da KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ile biyolojik yollar, hastalıklar, ilaçlar ve kimyasal maddeler ile ilgili olarak tanımlamalar gerçekleştirilmektedir.

## 4. BULGULAR

İki boyutlu difference jel elektroforezi ile elde edilen 6 jel arasından en çok sayıda ve en belirgin spotlara sahip olması nedeniyle bir master jel belirlenmiştir. Master jel üzerinde insan ve keçi proteinlerinden çakışan spotların ileri analizleri MALDI-TOF/TOF MS ile yapıldı. Bu çakışan bölgelerde hem insan hemde keçi kolostrumuna ait 422 spot bulunmuştur. Her bir spottaki insan örnekleri ve keçi örneklerinin karşılaştırılması için T-test ve ortalama oranları hesaplanmıştır. Ortalama oranlar, DeCyder veritabanında otomatik biçimde hesaplanmıştır. Bu hesaplamaların formülü  $[\log_{10}(\text{miktar} = \text{değişim katsayısı})]$  şeklindedir. Bulunan 422 spotun herbiri için  $p < 0.01$ 'dir. Ortalama oran değerleri (-332.6) ve (2011.4) arasında bulunmuştur. Bu değer nispi olarak keçi ve insan proteinlerinin birbirlerine oranlarına ifade etmektedir. Keçi/insan olarak hesaplanan değerler, pozitif sonuçların keçi kolostrumuna negatif sonuçların insan kolostrumuna aitliğini temsil etmektedir. MASCOT veritabanı arama motoruna göre, 422 insan ve keçi kolostrumuna ait spotlarda, 270 farklı protein tespit edilmiştir. Bu 270 proteinin 80 tanesini predicted (tahmini) proteinler, 14 tanesi de isimlerini UniProt Konsorsiyumu tarafından önerilen (RecName) proteinler oluşturmaktadır. 10 adet protein ise isimsiz protein ürünü olarak belirtilmektedir.

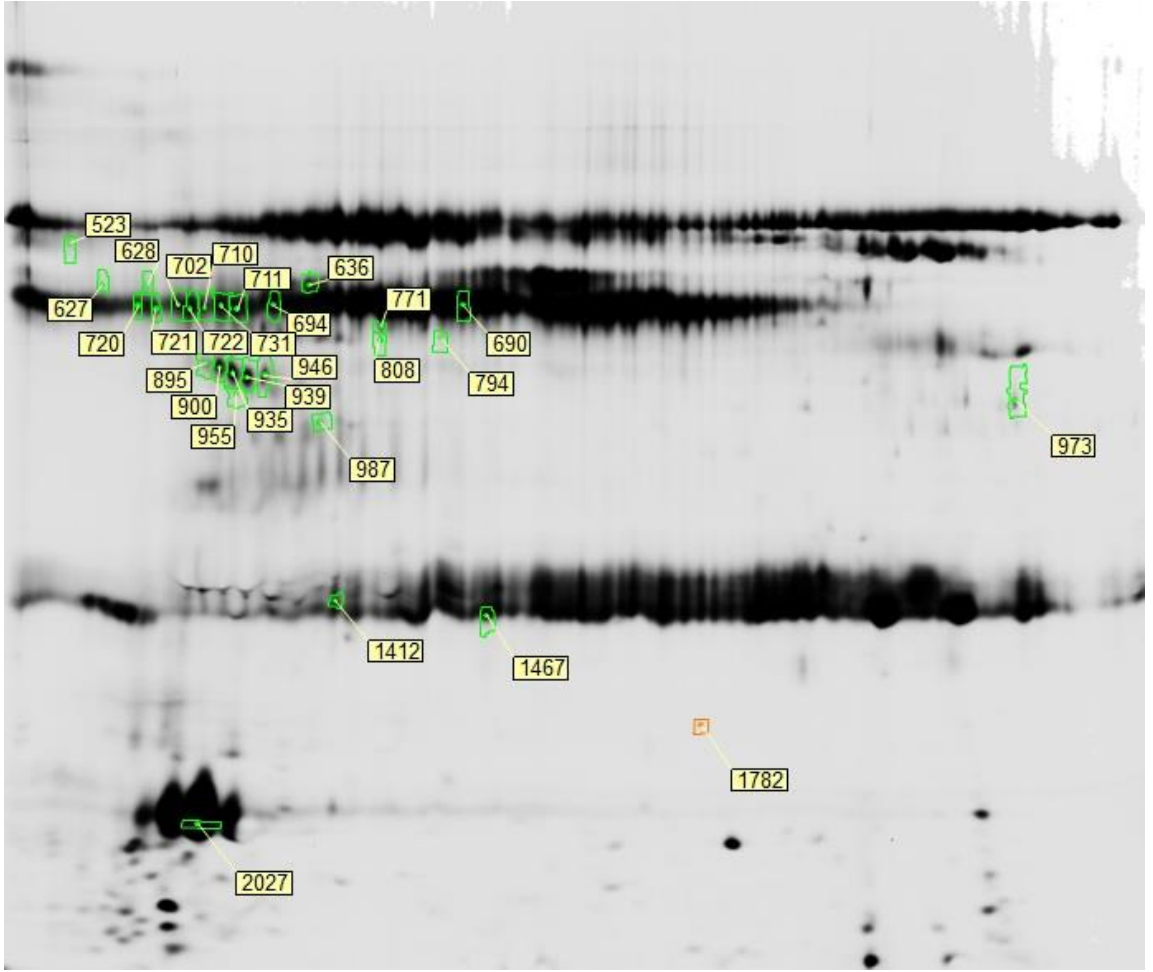
MALDI-TOF/TOF spektrumları, Protein Pilot (ABsciex) ile MASCOT (Matrix Science, Boston, MA) arama motoru kullanılarak, NCBI veritabanı memeli taksinomisinde taranmıştır. Çakışan spotlara göre, immüoglobulin (n= 25), kasein (n=20), albumin (n=9), laktoferrin (n=8), laktotransferrin (n=6), laktoglobulin (n=4) ve laktalbumin (n=4) kökenli proteinler en yüksek miktarda bulunan majör protein (HAP) gruplarını oluşturmaktadır (Şekil 6).



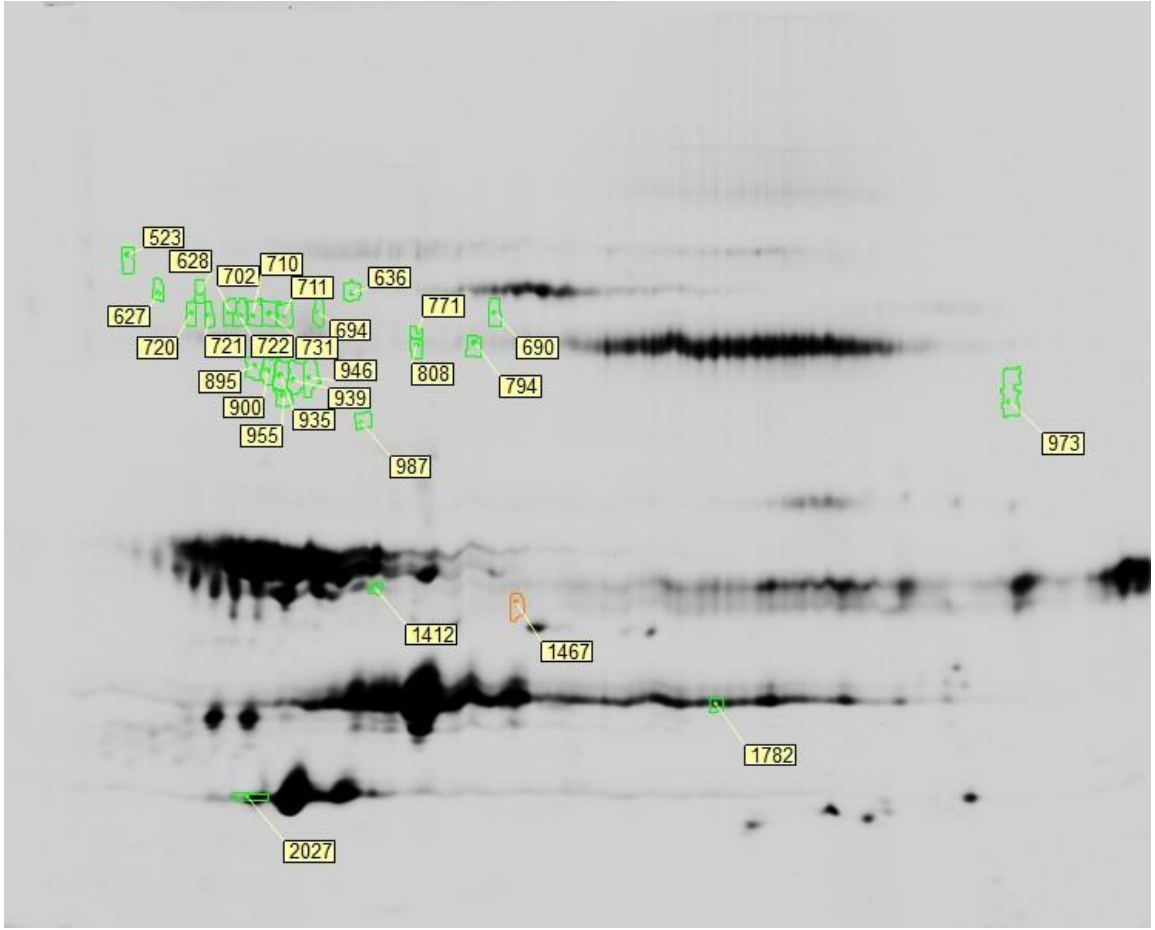
**Şekil 6.** Master jel üzerinde tespit edilen majör proteinlerin dağılımı.

İnsan ve keçi proteinleri ayrı biçimde değerlendirildiğinde, İnsan kolostrumunda değişim katsayısı 50 olarak yapılan değerlendirme sonucunda, laktoferrin ve laktotransferrin yüksek biçimde vurgulanan proteinlerdir (Ek 1). Keçi kolostrumunda ise, değişim katsayısı 50 olarak belirlenip değerlendirme yapıldığında yüksek biçimde vurgulanan proteinler kazein ve laktaglobulinler olmuştur (Ek 2). İnsan proteinlerinde nispi fazlalık gösteren proteinlerden en belirgin farka sahip olanlar laktoferrin ve laktatransferrin, keçi proteinlerinde nispi fazlalık gösteren proteinlerden en belirgin farka sahip olanlar kazein, laktaglobulin ve laktalbumindir.

Ayrıca çeşitli minör proteinlerde (LAP) tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları,  $\alpha$ 1-antitripsin, integrin, kathelisidin, galaktin-3-binding protein, laktadherin, tenascin ve apolipoprotein J'dir. Şekil 7 ve Şekil 8'de sırasıyla insan ve keçi kolostrumunda çakışan bu LAP'ların spot numaralarına göre jel görüntüleri aşağıdaki gibidir.



Şekil 7. İnsan Kolostrumu 2-DIGE jel görüntüsü ve bazı minör proteinler\*



**Şekil 8.** Keçi kolostrumu 2-DIGE jel görüntüsü ve bazı minör proteinler\*

\* **(523)** PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: galectin-3-binding protein [Pongo abelii]; **(627)**, PREDICTED: galectin-3-binding protein isoform 1 [Gorilla gorilla gorilla]; **(690, 720, 1412, 1467)** galectin-3-binding protein precursor [Homo sapiens]; **(636)**, PREDICTED: tenascin isoform X3 [Homo sapiens]; **(771)** PREDICTED: tenascin isoform X4 [Homo sapiens] **(794,808)** tenascin [Homo sapiens]; **(628,694, 702, 710, 711, 720, 721, 722, 731)** Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins; **(895, 900,935,939, 946)** Chain A, Cleaved Alpha-1-Antitrypsin Polymer; **(955)** pre-alpha-1-antitrypsin [Homo sapiens]; **(955,987)** apolipoprotein J precursor [Homo sapiens]; **(973)** RecName: Full=Lactadherin; **(1412)** cathelicidin-1 precursor [Bos taurus]; **(1782)** PREDICTED: integrin beta-4 isoform 1 [Cavia porcellus]; **(2027)** integrin alpha L [Mus musculus]

PANOĞA sonuçlarına göre genel olarak insan sütünde nöronların yıpranmasını engelleyen ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyuculuk görevi sağlayan APO ve APP genleri yer almaktadır (Tablo 7, Ek 5). Ayrıca yapılan PANOĞA analizi



sonuçlarına göre özellikle CD226 ve IL12B genlerinin yaygın olarak keçi sütünde ise kansere karşı koruyucu etki sağlayan genler arasında yer aldığı görülmektedir (Tablo 8, EK 5) . Ancak bu gen yolaklarının mutasyona uğraması, yetersiz veya çok beslenme gibi durumlarda ilgili hastalıklara yol açabileceği de belirtilmektedir.

**Tablo 7.** İnsan Kolostrumu PANOGA Analizi

<b>KEGG:01510</b>	Nörodejeneratif Hastalıklar
<b>KEGG:05010</b>	Alzheimer's Hastalığı
<b>KEGG:05060</b>	Prion Hastalığı
<b>KEGG:04950</b>	Erken Başlangıçlı diyabet
<b>KEGG:03022</b>	Bazal Transkripsiyon Faktörleri

**Tablo 8.** Keçi Kolostrumu PANOGA Analizi

<b>KEGG:05213</b>	Endometriyal kanser
<b>KEGG:05221</b>	Akut miyeloid lösemi
<b>KEGG:05223</b>	(Non-small cell) Akciğer Kanseri
<b>KEGG:05211</b>	Böbrek hücreli karsinom
<b>KEGG:05216</b>	Tiroit Kanseri

DAVID sonuçlarına göre, 97 insan ve 67 keçi metabolizma yolağı belirlenmiştir. Bu yolakların güvenilirliği FDR (false discovery rate) tarafından derecelendirilmiştir. FDR değeri 1'in altında olan yolaklar için doğruluk oranı %99 olarak kabul edilmektedir. İnsana ait 97 yolaktan 7'sinin (immün cevap, homeostatik denge, akut inflammatuar cevap, savunma cevabı, kimyasal hemostasis, inflammatuar cevap ve hücre düzeyinde kimyasal cevap) ve keçiye ait 67 GO (gen ontolojisi) yolaktan 5'inin ( lökosit aracılı, lenfosit aracılı pozitif immün regülasyonu, immune efektör sürecinin pozitif regülasyonu, lenfosit aracılı ve lökosit aracılı immün regülasyon) geçerliği %99 olarak belirlenmiştir. Bu yolaklarda görevli proteinleri eksprese eden genler tekrar sayısına göre Tablo 9 ve 10' da gösterilmektedir.

**Tablo 9.** İnsan Kolostrumu Pathway Analizi (DAVID)

Yolak	Tekrar Sayısı	İlgili Gen	FDR
<b>GO:0006955~ İmmün yanıt</b>	12	CIITA, C3, CLU, IGHM, B2M, AZGP1, IFNG, IGHA1, LTF, IGHA2, IGH@, IGKC, IGLC3	0.0022402
<b>GO:0042592~ Homeostatik süreç</b>	12	APOA2, APP, NPC2, GCK, TFRC, SAA1, RPS14, IFNG, SERPINA3, LTF, ITPR3, EIF2B2	0.0051192
<b>GO:0002526~ Akut inflamatuvar yanıt</b>	6	APOA2, TFRC, C3, SAA1, CLU, SERPINA3	0.0102995
<b>GO:0006952~ Savunma yanıtı</b>	10	LALBA, CIITA, APOA2, TFRC, C3, SAA1, CLU, IFNG, SERPINA3, LTF	0.0488581
<b>GO:0048878~ Kimyasal hemostasi</b>	9	APOA2, APP, NPC2, GCK, TFRC, SAA1, LTF, ITPR3, EIF2B2	0.091973
<b>GO:0006954~ İnflamatuvar yanıt</b>	7	CIITA, APOA2, TFRC, C3, SAA1, CLU, SERPINA3	0.3583992
<b>GO:0055082~ Hücre temelli kimyasal homeostasi</b>	7	APP, GCK, TFRC, SAA1, LTF, ITPR3, EIF2B2	0.824977

**Tablo 10.** Keçi Kolostrumu Pathway Analizi (DAVID)

Yolak	Tekrar Sayısı	İlgili Gen	FDR
GO:0002705~ Lökosit aracılı pozitif immün regülasyon	4	C3, IL12B, CD226, B2M	0.102694156
GO:0002708~ Lenfosit aracılı pozitif immün regülasyon	4	C3, IL12B, CD226, B2M	0.102694156
GO:0002699~ İmmün reflektör sürecinin pozitif immün regülasyonu	4	C3, IL12B, CD226, B2M	0.223537642
GO:0002706~ Lenfosit aracılı immün regülasyon	4	C3, IL12B, CD226, B2M	0.411620661
GO:0002703~ Lökosit aracılı immün regülasyon	4	C3, IL12B, CD226, B2M	0.590084936

İnsan ve keçi kolostrumunda birbirinden oldukça farklı GO term'lerin elde edilmesi farklı analizlerin yapılması gerekliliğini doğurmuştur. DAVID veritabanında yapılan küme analizine göre, 25 adet insan, 19 adet keçi grubu belirlenmiştir. Bu kümeler hem kendi içlerinde hem de kümeler arasından enrichment skorlarına göre dizilenmiştir. Küme analizi ile iki tür arası pathway analiziyle görülemeyen benzerlikler yakalanmıştır. Ancak bu benzerlikler FDR sıralamasında geçerlilik kazanmamıştır. İnsan

ve keçi kolostrumunda salgılama, sinyalizasyon, disülfid bağlanma ve immünoglobulinler ile ilgili kümeler ortak olarak gözükmektedir. FDR değerleri sonuçlarına göre anlamlı kabul edilenler Ek 3 ve Ek 4’te gösterilmektedir. %99 anlamlı kabul edilen bu sonuçlara göre, İnsan kolostrumunda 6, keçi kolostrumunda 3 ana küme belirlenmiştir. Yine DAVID veritabanında yapılan domain analizine göre keçi ve insan kolostrumunda yaygın olarak immünoglobulinlerin ortak olduğu görülmektedir (Tablo 11 ve 12).

**Tablo 11.** İnsan Kolostrumu Domain Analizi (DAVID)

Term	Tekrar Sayısı	İlgili Genler	FDR
<b>IPR003597:Immunoglobulin C1-set</b>	8	AZGP1, IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, B2M, IGLC3	1,89E-06
<b>IPR003006:Immunoglobulin/major histocompatibility complex, conserved site</b>	8	AZGP1, IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, B2M, IGLC3	1,09E-05
<b>IPR003596:Immunoglobulin V-set, subgroup</b>	5	IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, IGLC3	0,12058
<b>IPR007110:Immunoglobulin-like</b>	9	AZGP1, IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, PIGR, IGKC, IGHM, B2M, IGLC3	0,17653
<b>IPR013783:Immunoglobulin-like fold</b>	9	AZGP1, IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, PIGR, IGKC, IGHM, B2M, IGLC3	0,34531

**Tablo 12.** Keçi kolostrumu Domain Analizi (DAVID)

Term	Tekrar Sayısı	İlgili Genler	FDR
<b>IPR007110:Immunoglobulin-like</b>	9	SEMA3G, IGHD, IGK@, IGH@, KIT, IL12B, CD226, B2M, IGLC3	0,02012
<b>IPR003597:Immunoglobulin C1-set</b>	5	IGHD, IGK@, IGH@, B2M, IGLC3	0,02204
<b>IPR003006:Immunoglobulin/major histocompatibility complex, conserved site</b>	5	IGHD, IGK@, IGH@, B2M, IGLC3	0,05833
<b>IPR013783:Immunoglobulin-like fold</b>	8	IGHD, IGK@, IGH@, KIT, IL12B, CD226, B2M, IGLC3	0,30644

Ayrıca tüm bulgular ve biyoistatistik çalışmamız sonucunda keçi ve insan kolostrumundaki ortak whey proteinlerine ait protein listesi ve ilgili genler EK 5 'de verilmektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan ve keçi kolostrumundaki ortak whey proteomunun saptanmasına yönelik olarak dizayn edilen bu çalışmada, insan (n=6) ve keçi (n=6) kolostrum örnekleri önce fraksiyonlarına ayrılmış, ardından 2-DIGE ve MALDI-TOF/TOF MS proteomik analizleri gerçekleştirilmiştir. İnsan kolostrumu whey protein profili hakkında daha önce proteomik çalışmalar bulunmasına rağmen bu çalışma keçi kolostrumu whey protein profilinin belirlenmesi ve insan kolostrumuyla karşılaştırmalı proteomik analizi hakkındaki ilk çalışmadır. Ayrıca insan sütünün protein profili konusunda yapılan çalışmalar olmasına rağmen kendi popülasyonumuz için de yapılan ilk çalışmadır. Keçi ve insan whey kolostrumunda saptanan ortak ve birbirinden farklı 270 protein; immünoglobulin, kazein, albümin, laktoferrin, laktotransferrin, laktoglobulin ve laktalbumin gibi majör protein aileleri ayrıca  $\alpha$ 1-antitripsin, integrin, kathelisidin, galaktin-3-binding protein, laktadherin, tenascin ve apolipoprotein J gibi minör proteinlerden oluşmaktadır. Ayrıca nispi değişim katsayısı 50 olarak belirlendiğinde insan kolostrumu için, laktoferrin ve laktotransferrin, keçi kolostrumu içinse, kazein ve laktoglobulin ilişkili proteinler spesifik olarak saptanmıştır.

Palmer ve ark.larının 2006 yılında insan kolostrumunda yaptıkları çalışma ile IgA, laktoferrin ve HSA (human serum albümin) proteinlerinin major proteinler olarak skim milk'te bulunduğunu bildirmektedir (124). Yaptığımız araştırmanın sonuçlarına göre bu majör proteinler hem insan ve hem keçi kolostrum örneklerine ait ortak whey proteinleri arasında saptanmıştır. Bu proteinler inek sütünde de bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda keçi ve inek sütü proteinlerinin genel sınıflandırılmasında iki türe ait kazein ve  $\alpha$ -laktalbuminlerin de benzerlik gösterdiği belirtilmektedir. Ancak keçi sütünün inek sütüne göre yüksek protein içeriğine sahip olmasına rağmen belirtilmiş ve birçok durumda inek sütü alerjilerine karşı keçi sütü kullanımının bir alternatif sağladığı bildirilmiştir (3-5, 56).

Bu çalışmada tespit edilen  $\alpha$ -1 antitripsin,  $\alpha$ -laktalbumin, karbonik anhidraz 6, kordin benzeri protein 2, galektin-3- binding protein, laktadherin, laktoferrin, prolaktin-uyarıcı protein ve tenascin gibi majör ve minör proteinler, Liao ve ark.larının 2011'de yaptığı insan sütü proteomik analizinde de saptanmış, ve kolostrumda süte kıyasla fazla bulunan proteinler olarak belirlenmiştir. Bu proteinlerin keçi kolostrumunda da yer alması önem içermektedir. İnek sütü çalışmalarında karbonik anhidraz-6 , galektin 3-binding protein, kordin benzeri protein 2, prolaktin uyarıcı protein ve tenascin proteinleri tespit edilememiştir. Ayrıca yapılan çalışmada tespit edilen integrin,  $\alpha$ -1 antitripsin proteininin de inek sütü çalışmalarında belirtilmediği görülmüştür (28, 126).

Fruktoz-bifosfat Adolaz A proteininin insan skim kolostrum çalışmasıyla kolostrumda 2-5. günlere kıyasla 1-2. günlerinde daha az miktarda bulunduğu belirtilmiştir (124). Skim kolostrumun içeriğine ait insan ve keçi kolostrumunda bulunan ortak whey proteinlerini tespit ettiğimiz çalışmamızda bu protein bulunamamıştır. Bulunamayışının nedeninin protein ayırma yönteminden ya da keçide bulunmayan bir protein olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

$\beta$ -laktoglobulin insan sütünde bulunmayan ancak inek sütünde bulunan ve allerjiye neden olan bir proteindir (6). Çalışmamızda ortak proteinler arasında saptanmıştır ancak keçi kolostrumunda çok yüksek düzeyde bulunmuştur. Bunun yanında bilindiği gibi  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 ve  $\kappa$ -kazein ruminantlarda olan proteinler olmasına rağmen beklenmeyen şekilde minör oranlarda çalışmamızda ortak proteinler arasında yer almışlardır. Bu gelişen tekniklerle daha hassas bir ölçümle ortaya çıktığı ya da bizim popülasyonumuza özgü olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan whey protein çalışmasında beklenmedik şekilde kaseinlerin tespit edilmesi özellikle LAP'ların belirlenmesinde metodun yeterince hassas olmadığını göstermektedir. LAP ların tam olarak tesbit edilebilmesi için bugüne kadar pek çok yöntem denenmiştir. Liao ve arkadaşları (53), insan kolostrum ve süt örneklerinin analizinde ProteoMiner kullanmasının LAP'ların miktarı yükselttiğini, bazı HAP'ların miktarını da azalttığını bildirmektedir. Ayrıca bu çalışmada ProteoMiner'ın whey fraksiyonunda kazein kalıntılarının giderilmesi üzerinde de bir miktar etki

gösterdiğinden bahsedilmiştir (8). Yine aynı şekilde yürütülen başka bir çalışmada ProteoMiner kit, inek sütü whey proteinlerinin ayrıştırılmasında LAP'ların ortaya çıkılışına destek olduğu bildirilmiştir (152). Ancak, yapılan bir başka çalışmada ise LAP zenginleştirici bu kitin, whey HAP ve kazein proteinlerini ortadan kaldırıcı bir etki göstermediği, bu majör proteinlerin işlem sonrasında hala tespit edildiği de belirtilmiştir (32). Başka bir araştırma grubu kazeinin whey fraksiyonundan ayrılması için düşük pH'da (pH 4.6) ultrasantrifüj ile yüksek miktarda bulunan proteinlerin 5 kat azaltılabildiği rapor edilmiştir (147). Murakami ve arkadaşlarının 1998 yılında (123) yaptığı bir çalışmada ise ultrasantrifüj ile kazein çöktürülmüş ve ardından HAP whey proteinleri olan  $\alpha$ -laktalbumin, secretory immünooglobulin A ve laktoferin immünoabsorbsiyon ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Yamada ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada, 2 adet önemli HAP ( $\beta$ -kazein ( $\beta$ -CN) ve IgG), immünoabsorbsiyon ile inek sütü ve kolostrumundan uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırma işleminde immobilize anti - IgG ve anti -  $\beta$ CN kolonları kullanılarak, tespit edilemeyen düşük miktarda bulunan proteinler ortaya çıkarılmıştır (119). HAP'ların uzaklaştırılması için aseton ile çöktürme metodunun ultrasantrifüj analiziyle birleştirildiği çalışmalar da mevcuttur ancak aseton çöktürmesiyle %22 kadar protein kaybedilebilmektedir (153). Sütün genel protein konsantrasyonu çok yüksek olduğundan bu sayı önemsiz sayılabilir bile final protein profilinde risk oluşturmaktadır. Buna karşın aseton çöktürülmesi ile daha iyi görüntüleme elde edildiği de bildirilmiştir (154). Çalışmamızda ise santrifüj ve ultrasantrifüj yöntemi kullanılmıştır. Keçi kolostrumunun kazein düzeyinin çok yüksek oluşu proteinlerin uzaklaştırılmasını zorlaştırmıştır. ProteoMiner, immünoabsorbsiyon yöntemlerinin kullanılmaması ve düşük pH'da ultrasantrifüj uygulanmaması araştırmanın limitasyonlarını oluşturmaktadır.

Yine aynı şekilde HAP ların yeterince ortamdan uzaklaştırılmayışının bir nedeninin de DIGE metodundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Araştırmamızda DIGE metodunun aynı jel üzerinde 3 farklı örnek grubunun çalışılmasına olanak sağlaması nedeniyle karşılaştırmalı analizlerde tercih edilen bir yöntem olmasına karşın, insanlarda ve ruminantlarda uzaklaştırması zor olan majör proteinlerin aynı MW ve pH aralığına

denk düşen minör proteinlerin comigrasyonu kantifikasyon doğruluğunu olumsuz etkilediğinden proteinlerin bloklanmış olduğu düşünülmektedir (156).

Sütün içeriğinde yer alan bu proteinlerin fonksiyon ve biyolojisi hakkında öğrenilecek pek çok şey bulunmaktadır. Araştırma bulgularımızda çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak gen pathway analizleri ile proteinlerin daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır. Çalışmada gen ontolojisi (GO) ve yolak (network, pathway) analizi gibi gelişen biyoinformatik araçlar kullanılarak sütteki proteinlerin rolü ve etkileşimlerinin anlaşılmasına çalışılmıştır. Bu amaçla proteinler, biyolojik süreçlere katılma, hücrenel bileşenleri ve moleküler özelliklerine göre DAVID (database for annotation, visualization and integred discovery) ve fonksiyonel önem içeren biyolojik yollar ve hastalıkların yolaklarının tanımlanmasında kullanılan PANOGA (Pathway and Network Oriented GWAS (Genome-Wide Association Study) Analysis) ile biyoistatistik değerlendirme yapılmıştır. (170) (149).

PANOGA biyoistatistik sonuçlarına göre (Tablo 8) keçi kolostrumunun özellikle CD226 ve IL12B genleri ile kanser oluşumuna yola açabilecek etkiye sahip olduğunu ortaya çıkmaktadır. Bu bulgu Yang ve ark.larının 2013 yılında yaptığı çalışma sonuçlarını desteklemektedir. Yang ve arkadaşları 2-DE LC-MS/MS analizi ile iTRAQ kullanılarak yaptığı bir çalışmada, inek, bufalo, keçi ve deve sütü whey fraksiyonlarında tespit edilen 211 proteinde GO (gene ontology) term analizi yapıldığında farklı türler için önemli whey protein fonksiyonları belirlemiştir. Bu sonuçlarda dikkat çekici olan biglycan proteinlerinin nispi olarak keçi sütünde daha yüksek miktarda bulunması ve biglycan proteininin overekspresyonunun tümör oluşuma yol açmasıdır (159). Çalışmamızda insan kolostrumu analizinde (Tablo 7) ise nörodejeneratif hastalıklara yol açabilecek APP geni ön plana çıkmaktadır. Bu genlerin normal dönemlerde koruyucu etki göstermekle birlikte overekspresyon veya hücre farklılaşmasıyla beraber hastalıklara sebebiyet verebilmektedirler .

Çalışmamızda ayrıca DAVID biyoistatistik aracı ile Go term, domain ve küme analizleri de yapılmıştır. Domain analizine göre hem insan hem de keçi kolostrumunda yenidoğanın ilk gereksinimi olarak kabul edilebilecek immünoglobulinlerin varlığı



görülmektedir. Domain analizinde yakalanan benzerlik diğer analizlerde yerini farklılıklara bırakmaktadır. Özellikle Go Term analizinde insan kolostrumunda yaygın varlığı görülen homeostatik dengenin sağlanmasına yönelik yolakların keçi kolostrumunda görülmemektedir. Buna rağmen küme analizinde keçi kolostrumunda insana göre düşük FDR seviyelerinde de olsa homeostasis yolağıyla ilişki kurulduğu tespit edilmiştir. Ancak %99 geçerliliğine sahip kümeler arasında bulunmamaktadır. Keçi ve diğer ruminantlara ait sütlerde yaşanan alerjenite sorunlarının oluşmasında bu homeostatik denge yolağının etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu hipotezimiz ileri ki çalışmalarla araştırılmalıdır. Küme analizine baktığımızda sekresyon, sinyalizasyon, disülfid bağlanma ve immünoglobulin kümelerinin iki kolostrum tipi için ortak olduğu tespit edilmektedir. İnsan kolostrumunda anlamlı kabul edilen kümelerde ayrıca akut yanıt, savunma yanıtı, inflamatuvar yanıt, homeostasis ve protein processing gibi özellikler görülürken keçi kolostrumunda bağışıklığın düzenlenmesine yönelik özellikler yer almaktadır.

Sonuç olarak;

1. Bu çalışma keçi ile insan kolostrumunda bulunan ortak whey proteinlerin belirlenmesi için öncü nitelik taşımasına rağmen; özellikle insan sütüne alternatif formüllerin geliştirilmesi göz önüne alındığında, insan ve keçi sütünün proteomik profillerinin örneklem sayısının artırılarak özellikle low abundant proteinlerin detaylıca incelenmesi ve ortak olmayan insan ve keçi kolostrum proteinlerinin de belirlenmesi gerekmektedir.
2. Keçi ve insan kolostrumundaki ortak proteinlerin nispi farklılıkları temel alınarak yapılan PANOGA biyoistatistiği sonucunda keçi kolostrumunun kanser yolaklarında, insan kolostrumunda ise nörodejeratif hastalıklarla ilgili yolaklarla ilişkili olduğu belirlenmiştir.
3. Yine nispi farklılıklara göre DAVID biyoistatistiği sonucunda insan kolostrumunda homeostatik dengenin sağlanmasında görevli yolakların keçi kolostrumunda güvenilir düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Bu durumun keçi ve tüm diğer

ruminantlara ait sütlerin yenidoğanlar üstünde gösterebildiği alerjik etkinin sebebi olduğunu düşündürmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Affolter M, Grass L, Vanrobaeys F, Casado B, Kussmann M. Qualitative and quantitative profiling of the bovine milk fat globule membrane proteome. *J Proteomics*. 2010;73(6):1079-88.
2. Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, Castro JD, Martínez LP, Sampelayo MRS. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009;22(4):322-9.
3. Jenness R. Composition and characteristics of goat milk: Review 1968–1979. *Journal of Dairy Science*.63(10):1605-30.
4. Haenlein GF. Status and prospects of the dairy goat industry in the united states. *J Anim Sci*. 1996;74(5):1173-81.
5. Haenlein GF. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J Dairy Sci*. 2001;84(9):2097-115.
6. Park YW. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*.14(2):151-9.
7. Le A, Barton LD, Sanders JT, Zhang Q. Exploration of bovine milk proteome in colostral and mature whey using an ion-exchange approach. *J Proteome Res*. 2011;10(2):692-704.
8. Liao Y, Alvarado R, Phinney B, Lonnerdal B. Proteomic characterization of human milk fat globule membrane proteins during a 12 month lactation period. *J Proteome Res*. 2011;10(8):3530-41.

9. Lonnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(6):1537s-43s.
10. Moore M, Tyler JW, Chigerwe M, Dawes ME, Middleton JR. Effect of delayed colostrum collection on colostrum concentration in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;226(8):1375-7.
11. Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, Eidelman AI. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2005;115(2):496-506.
12. Kramer MS, Chalmers B, Hodnett ED, Sevkovskaya Z, Dzikovich I, Shapiro S, Collet JP, Vanilovich I, Mezen I, Ducruet T, Shishko G, Zubovich V, Mknuk D, Gluchanina E, Dombrovskiy V, Ustinovitch A, Kot T, Bogdanovich N, Ovchinnikova L, Helsing E. Promotion of breastfeeding intervention trial (probit): A randomized trial in the republic of belarus. *Jama.* 2001;285(4):413-20.
13. Chigerwe M, Tyler JW, Summers MK, Middleton JR, Schultz LG, Nagy DW. Evaluation of factors affecting serum igg concentrations in bottle-fed calves. *J Am Vet Med Assoc.* 2009;234(6):785-9.
14. Nóbrega Jr JEd, Riet-Correa F, Nóbrega RS, Medeiros JMd, Vasconcelos JSd, Simões SVD, Tabosa IM. Mortalidade perinatal de cordeiros no semi-árido da paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2005;25:171-8.
15. Nowak R, Poindron P. From birth to colostrum: Early steps leading to lamb survival. *Reprod Nutr Dev.* 2006;46(4):431-46.
16. Ontsouka CE, Bruckmaier RM, Blum JW. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *J Dairy Sci.* 2003;86(6):2005-11.

17. Pakkanen R, Aalto J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *International Dairy Journal*. 1997;7(5):285-97.
18. Barrington GM, McFadden TB, Huyler MT, Besser TE. Regulation of colostrogenesis in cattle. *Livestock Production Science*. 2001;70(1-2):95-104.
19. Castro N, Capote J, Bruckmaier RM, Argüello A. Management effects on colostrogenesis in small ruminants: A review. *Journal of Applied Animal Research*. 2011;39(2):85-93.
20. Wildman DE, Chen C, Erez O, Grossman LI, Goodman M, Romero R. Evolution of the mammalian placenta revealed by phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3203-8.
21. Padua MB, Kowalski AA, Canas MY, Hansen PJ. The molecular phylogeny of uterine serpins and its relationship to evolution of placentation. *Faseb j*. 2010;24(2):526-37.
22. Wooding FB, Flint AP, Heap RB, Morgan G, Buttle HL, Young IR. Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats. *J Reprod Fertil*. 1986;76(2):499-512.
23. Chucrí TM, Monteiro JM, Lima AR, Salvadori ML, Kfoury JR, Jr., Miglino MA. A review of immune transfer by the placenta. *J Reprod Immunol*. 2010;87(1-2):14-20.
24. Argüello A, Castro N, Capote J, Tyler JW, Holloway NM. Effect of colostrum administration practices on serum igtg in goat kids. *Livestock Production Science*. 2004;90(2-3):235-9.

25. Castro N, Capote J, Alvarez S, Arguello A. Effects of lyophilized colostrum and different colostrum feeding regimens on passive transfer of immunoglobulin g in majorera goat kids. *J Dairy Sci.* 2005;88(10):3650-4.
26. Castro N, Capote J, Morales-Delanuez A, Rodriguez C, Arguello A. Effects of newborn characteristics and length of colostrum feeding period on passive immune transfer in goat kids. *J Dairy Sci.* 2009;92(4):1616-9.
27. Moreno-Indias I, Sánchez-Macías D, Castro N, Morales-delaNuez A, Hernández-Castellano LE, Capote J, Argüello A. Chemical composition and immune status of dairy goat colostrum fractions during the first 10 h after partum. *Small Ruminant Research.* 2012;103(2–3):220-4.
28. Nissen A, Bendixen E, Ingvarsten KL, Rontved CM. In-depth analysis of low abundant proteins in bovine colostrum using different fractionation techniques. *Proteomics.* 2012;12(18):2866-78.
29. Smith GW, Foster DM. Short communication: Absorption of protein and immunoglobulin g in calves fed a colostrum replacer. *J Dairy Sci.* 2007;90(6):2905-8.
30. Reber AJ, Lockwood A, Hippen AR, Hurley DJ. Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;109(1-2):139-50.
31. Wheeler TT, Hodgkinson AJ, Prosser CG, Davis SR. Immune components of colostrum and milk--a historical perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2007;12(4):237-47.

32. Hernandez-Castellano LE, Almeida AM, Castro N, Arguello A. The colostrum proteome, ruminant nutrition and immunity: A review. *Curr Protein Pept Sci*. 2014;15(1):64-74.
33. Lerias JR, Hernandez-Castellano LE, Suarez-Trujillo A, Castro N, Poulis A, Almeida AM. The mammary gland in small ruminants: Major morphological and functional events underlying milk production - a review. *J Dairy Res*. 2014;81(3):304-18.
34. Klein B. *Cunningham's text book of veterinary physiology*,. 2013; 5th edition.
35. Ellis S MTAR. Prepubertal ovine mammary development is unaffected by ovariectomy. *Domestic Animal Endocrinology*. 1998;15:217-25.
36. Pang WW, Hartmann PE. Initiation of human lactation: Secretory differentiation and secretory activation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2007;12(4):211-21.
37. Ostrom KM. A review of the hormone prolactin during lactation. *Prog Food Nutr Sci*. 1990;14(1):1-43.
38. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(1):49-74.
39. Tucker HA. Hormones, mammary growth, and lactation: A 41-year perspective. *J Dairy Sci*. 2000;83(4):874-84.
40. Tsingotjidou AS, Papadopoulos GC. The milk-ejection reflex in the sheep: An anatomical study on the afferent pathway. *Anat Histol Embryol*. 2008;37(4):245-50.

41. Csapó J, Csapó-Kiss Z, Martin TG, Szentpeteri J, Wolf G. Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins. *International Dairy Journal*. 1994;4(5):445-58.
42. Anifantakis EMK, J. G. . Contribution to the study of the composition of goat's milk. *Milchwissenschaft*. 1980;35:617-9.
43. Mier MPI, R.; Ortiz, I. . , 2008, 40(2), 304-311. Influence of process variables on the production of bovine milk casein by electro dialysis with bipolar membranes. *Biochem Eng J*. 2008;40(2):304-11.
44. Swanson TJ, Hammer CJ, Luther JS, Carlson DB, Taylor JB, Redmer DA, Neville TL, Reed JJ, Reynolds LP, Caton JS, Vonnahme KA. Effects of gestational plane of nutrition and selenium supplementation on mammary development and colostrum quality in pregnant ewe lambs. *J Anim Sci*. 2008;86(9):2415-23.
45. Mellor DJ, Murray L. Effects of maternal nutrition on udder development during late pregnancy and on colostrum production in scottish blackface ewes with twin lambs. *Res Vet Sci*. 1985;39(2):230-4.
46. Dupont D, Remond, B., Collin, J.C. (1998). , 53 (2), 66-69. Elisa determination of plasmin and plasminogen in milk of individual cows managed without the dry period. *Milchwissenschaft*. 1998;53(2):66-9.
47. Awadeh FT, Kincaid RL, Johnson KA. Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows and calves. *J Anim Sci*. 1998;76(4):1204-15.
48. Argüello A, Castro N, Álvarez S, Capote J. Effects of the number of lactations and litter size on chemical composition and physical characteristics of goat colostrum. *Small Ruminant Research*. 2006;64(1-2):53-9.



49. Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Perez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, Lopez-Sabater MC, Franch A. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr.* 2011;141(6):1181-7.
50. Prentice ANN. D - regional variations in the composition of human milk. In: Jensen RG, editor. *Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press; 1995. p. 115-221.
51. Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lonnerdal B, Dewey KG. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: The darling study. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(2):457-65.
52. Lonnerdal B. Human milk proteins: Key components for the biological activity of human milk. *Adv Exp Med Biol.* 2004;554:11-25.
53. Eek-Poei Tay L-HGV, 2011. Proteomics of human and the domestic bovine and caprine milk *AsPac J Mol Biol Biotechnol.* 2011;19(1).
54. Bauer J, Gerss J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin Nutr.* 2011;30(2):215-20.
55. Sanchez-Macias D, Moreno-Indias I, Castro N, Morales-Delanuez A, Arguello A. From goat colostrum to milk: Physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum. *J Dairy Sci.* 2014;97(1):10-6.
56. Haenlein GFW. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research.* 2004;51(2):155-63.
57. Park YW. Goat milk-chemistry and nutrition. *Handbook of milk of non-bovine mammals: Blackwell Publishing Professional;* 2008. p. 34-58.

58. Sanjeev Kumar BK, Rajesh Kumar, Suryamani Kumar, Sunil K. Khatkar and S. K. Kanawjia. Nutritional features of goat milk - a review. *Indian J Dairy Sci.* 2012;64((4)).
59. Patton S, Jensen RG. Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. *Prog Chem Fats Other Lipids.* 1975;14(4):163-277.
60. EFSA. Scientific opinion on the suitability of goat milk protein as a source of protein in infant formulae and in follow-on formulae. *EFSA Journal.* 2012;10((3)):2603.
61. G. F. Greppi PRaRF. Protein components of goat's milk. *Dairy Goats Feeding and Nutrition* 2008.
62. Saarela T, Kokkonen J, Koivisto M. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta Paediatr.* 2005;94(9):1176-81.
63. Kent JC, Mitoulas LR, Cregan MD, Ramsay DT, Doherty DA, Hartmann PE. Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. *Pediatrics.* 2006;117(3):e387-95.
64. Valentine CJ, Morrow G, Fernandez S, Gulati P, Bartholomew D, Long D, Welty SE, Morrow AL, Rogers LK. Docosahexaenoic acid and amino acid contents in pasteurized donor milk are low for preterm infants. *J Pediatr.* 2010;157(6):906-10.
65. Valentine CJ, Morrow G, Pennell M, Morrow AL, Hodge A, Haban-Bartz A, Collins K, Rogers LK. Randomized controlled trial of docosahexaenoic acid supplementation in midwestern u.S. Human milk donors. *Breastfeed Med.* 2013;8(1):86-91.

66. Greer FR. Do breastfed infants need supplemental vitamins? *Pediatr Clin North Am.* 2001;48(2):415-23.
67. Dawodu A, Zalla L, Woo JG, Herbers PM, Davidson BS, Heubi JE, Morrow AL. Heightened attention to supplementation is needed to improve the vitamin d status of breastfeeding mothers and infants when sunshine exposure is restricted. *Matern Child Nutr.* 2012;10(3):383-97.
68. Indumathi S, Dhanasekaran M, Rajkumar JS, Sudarsanam D. Exploring the stem cell and non-stem cell constituents of human breast milk. *Cytotechnology.* 2013;65(3):385-93.
69. Hirai C, Ichiba H, Saito M, Shintaku H, Yamano T, Kusuda S. Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;34(5):524-8.
70. Wagner CL, Taylor SN, Johnson D. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008;34(2):191-204.
71. Rodrigues DM, Li AY, Nair DG, Blennerhassett MG. Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23(2):e44-56.
72. Li R, Xia W, Zhang Z, Wu K. S100b protein, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor in human milk. *PLoS One.* 2011;6(6):e21663.
73. Fichter M, Klotz M, Hirschberg DL, Waldura B, Schofer O, Ehnert S, Schwarz LK, Ginneken CV, Schafer KH. Breast milk contains relevant neurotrophic factors and cytokines for enteric nervous system development. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(10):1592-6.

74. Blum JW, Baumrucker CR. Colostral and milk insulin-like growth factors and related substances: Mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets. *Domest Anim Endocrinol.* 2002;23(1-2):101-10.
75. Burrin DG. Is milk-borne insulin-like growth factor-i essential for neonatal development? *J Nutr.* 1997;127(5 Suppl):975s-9s.
76. Philipps AF, Kling PJ, Grille JG, Dvorak B. Intestinal transport of insulin-like growth factor-i (igf-i) in the suckling rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;35(4):539-44.
77. Milsom SR, Blum WF, Gunn AJ. Temporal changes in insulin-like growth factors i and ii and in insulin-like growth factor binding proteins 1, 2, and 3 in human milk. *Horm Res.* 2008;69(5):307-11.
78. Prosser CG. Insulin-like growth factors in milk and mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1996;1(3):297-306.
79. Elmlinger MW, Hochhaus F, Loui A, Frommer KW, Obladen M, Ranke MB. Insulin-like growth factors and binding proteins in early milk from mothers of preterm and term infants. *Horm Res.* 2007;68(3):124-31.
80. Newburg DS, Woo JG, Morrow AL. Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J Pediatr.* 2010;156(2 Suppl):S41-6.
81. Martin LJ, Woo JG, Geraghty SR, Altaye M, Davidson BS, Banach W, Dolan LM, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(5):1106-11.
82. Jarvinen KM, Suomalainen H. Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow's milk-allergic infants. *Pediatr Allergy Immunol.* 2002;13(4):243-54.

83. Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhonde R. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell*. 2010;23(2):35-40.
84. Ichikawa M, Sugita M, Takahashi M, Satomi M, Takeshita T, Araki T, Takahashi H. Breast milk macrophages spontaneously produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and differentiate into dendritic cells in the presence of exogenous interleukin-4 alone. *Immunology*. 2003;108(2):189-95.
85. Riskin A, Almog M, Peri R, Halasz K, Srugo I, Kessel A. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatr Res*. 2012;71(2):220-5.
86. Sabbaj S, Ibegbu CC, Kourtis AP. Cellular immunity in breast milk: Implications for postnatal transmission of hiv-1 to the infant. *Adv Exp Med Biol*. 2012;743:161-9.
87. Yagi Y, Watanabe E, Watari E, Shinya E, Satomi M, Takeshita T, Takahashi H. Inhibition of dc-sign-mediated transmission of human immunodeficiency virus type 1 by toll-like receptor 3 signalling in breast milk macrophages. *Immunology*. 2010;130(4):597-607.
88. Garofalo R. Cytokines in human milk. *J Pediatr*. 2010;156(2 Suppl):S36-40.
89. Penttila IA. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. *J Pediatr*. 2010;156(2 Suppl):S21-5.
90. Gilmore WS, McKelvey-Martin VJ, Rutherford S, Strain JJ, Loane P, Kell M, Millar S. Human milk contains granulocyte colony stimulating factor. *Eur J Clin Nutr*. 1994;48(3):222-4.

91. Ustundag B, Yilmaz E, Dogan Y, Akarsu S, Canatan H, Halifeoglu I, Cikim G, Aygun AD. Levels of cytokines (il-1beta, il-2, il-6, il-8, tnf-alpha) and trace elements (zn, cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. *Mediators Inflamm.* 2005;14(6):331-6.
92. Hurley WL, Theil PK. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients.* 2011;3(4):442-74.
93. Patton S, Huston GE. A method for isolation of milk fat globules. *Lipids.* 1986;21(2):170-4.
94. Kunz C, Lonnerdal B. Human-milk proteins: Analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. *Am J Clin Nutr.* 1990;51(1):37-46.
95. Kunz C, Lonnerdal B. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatr.* 1992;81(2):107-12.
96. Artym J, Zimecki M. Milk-derived proteins and peptides in clinical trials. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013;67:800-16.
97. Lonnerdal B, Forsum E. Casein content of human milk. *Am J Clin Nutr.* 1985;41(1):113-20.
98. Fong BY, Norris CS, MacGibbon AKH. Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal.* 2007;17(4):275-88.
99. Mather IH. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J Dairy Sci.* 2000;83(2):203-47.

100. Bianchi L, Puglia M, Landi C, Matteoni S, Perini D, Armini A, Verani M, Trombetta C, Soldani P, Roncada P, Greppi G, Pallini V, Bini L. Solubilization methods and reference 2-de map of cow milk fat globules. *J Proteomics*. 2009;72(5):853-64.
101. Cebo C, Caillat H, Bouvier F, Martin P. Major proteins of the goat milk fat globule membrane. *J Dairy Sci*. 2010;93(3):868-76.
102. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: Protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):45-60.
103. Peterson JA, Patton S, Hamosh M. Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. *Biol Neonate*. 1998;74(2):143-62.
104. Patton S, Gendler SJ, Spicer AP. The epithelial mucin, mucl, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1241(3):407-23.
105. Ishii T, Aoki N, Noda A, Adachi T, Nakamura R, Matsuda T. Carboxy-terminal cytoplasmic domain of mouse butyrophilin specifically associates with a 150-kda protein of mammary epithelial cells and milk fat globule membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1245(3):285-92.
106. Roncada P, Piras C, Soggiu A, Turk R, Urbani A, Bonizzi L. Farm animal milk proteomics. *J Proteomics*. 2012;75(14):4259-74.
107. Leveux D, Morgan F, Geneix N, Masle I, Bouvier F. Caprine immunoglobulin g, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *J Dairy Res*. 2002;69(3):391-9.

108. Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA. Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry*. 2001;66(1):1-7.
109. Korhonen H, Pihlanto A. Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Curr Pharm Des*. 2007;13(8):829-43.
110. Lahov E, Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol*. 1996;34(1):131-45.
111. Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*. 2006;16(11):1315-23.
112. Silanikove N, Shapiro F, Shamay A, Leitner G. Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and no in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: Manipulation with casein hydrolyzates. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(9):1139-51.
113. Senda A, Fukuda K, Ishii T, Urashima T. Changes in the bovine whey proteome during the early lactation period. *Anim Sci J*. 2011;82(5):698-706.
114. de Wit JN. Marschall rhone-poulenc award lecture. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J Dairy Sci*. 1998;81(3):597-608.
115. Bellioni-Businco B, Paganelli R, Lucenti P, Giampietro PG, Perborn H, Businco L. Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(6):1191-4.



116. Mangé A, Bellet V, Tuailon E, Van de Perre P, Solassol J. Comprehensive proteomic analysis of the human milk proteome: Contribution of protein fractionation. *Journal of Chromatography B*. 2008;876(2):252-6.
117. Reinhardt TA, Lippolis JD. Developmental changes in the milk fat globule membrane proteome during the transition from colostrum to milk. *J Dairy Sci*. 2008;91(6):2307-18.
118. Golinelli LP, Conte-Junior CA, Paschoalin VMF, Silva JT. Proteomic analysis of whey from bovine colostrum and mature milk. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2011;54:761-8.
119. Yamada M, Murakami K, Wallingford JC, Yuki Y. Identification of low-abundance proteins of bovine colostrum and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by microsequencing and mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2002;23(7-8):1153-60.
120. Fong BY, Norris CS, Palmano KP. Fractionation of bovine whey proteins and characterisation by proteomic techniques. *International Dairy Journal*. 2008;18(1):23-46.
121. Rusu D, Drouin R, Pouliot Y, Gauthier S, Poubelle PE. A bovine whey protein extract can enhance innate immunity by priming normal human blood neutrophils. *J Nutr*. 2009;139(2):386-93.
122. Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT. Immune components of bovine colostrum and milk. *J Anim Sci*. 2009;87(13 Suppl):3-9.
123. Murakami K, Lagarde M, Yuki Y. Identification of minor proteins of human colostrum and mature milk by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998;19(14):2521-7.

124. Palmer DJ, Kelly VC, Smit AM, Kuy S, Knight CG, Cooper GJ. Human colostrum: Identification of minor proteins in the aqueous phase by proteomics. *Proteomics*. 2006;6(7):2208-16.
125. Molinari CE, Casadio YS, Hartmann BT, Livk A, Bringans S, Arthur PG, Hartmann PE. Proteome mapping of human skim milk proteins in term and preterm milk. *J Proteome Res*. 2012;11(3):1696-714.
126. Nissen A, Bendixen E, Ingvarsen KL, Rontved CM. Expanding the bovine milk proteome through extensive fractionation. *J Dairy Sci*. 2013;96(12):7854-66.
127. Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Shima M. Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: A crucial role of coagulation factors v and viii. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2010;21(6):568-76.
128. Renckens R, Roelofs JJ, Florquin S, van der Poll T. Urokinase-type plasminogen activator receptor plays a role in neutrophil migration during lipopolysaccharide-induced peritoneal inflammation but not during escherichia coli-induced peritonitis. *J Infect Dis*. 2006;193(4):522-30.
129. Eckersall PD, Young FJ, Nolan AM, Knight CH, McComb C, Waterston MM, Hogarth CJ, Scott EM, Fitzpatrick JL. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of staphylococcus aureus subclinical mastitis. *J Dairy Sci*. 2006;89(5):1488-501.
130. Pyorala S, Hovinen M, Simojoki H, Fitzpatrick J, Eckersall PD, Orro T. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. *Vet Rec*. 2011;168(20):535.

131. Kumon Y, Yasuoka Y, Yamanaka S, Wada A, Takeuchi H, Sugiura T. Acute-phase serum amyloid a is present in human colostrum and milk. *Amyloid*. 2011;18 Suppl 1:11-3.
132. Larson MA, Weber A, Weber AT, McDonald TL. Differential expression and secretion of bovine serum amyloid a3 (saa3) by mammary epithelial cells stimulated with prolactin or lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;107(3-4):255-64.
133. McDonald TL, Larson MA, Mack DR, Weber A. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid a 3 (m-saa3) into colostrum. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001;83(3-4):203-11.
134. Tamzali Y, Guelfi JF, Braun JP. Plasma fibrinogen measurement in the horse: Comparison of millar's technique with a chronometric technique and the qbc-vet autoreader. *Res Vet Sci*. 2001;71(3):213-7.
135. Ganheim C, Hulten C, Carlsson U, Kindahl H, Niskanen R, Waller KP. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or mannheimia haemolytica. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2003;50(4):183-90.
136. Weber JR, Moreillon P, Tuomanen EI. Innate sensors for gram-positive bacteria. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(4):408-15.
137. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415(6870):389-95.
138. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: More than just microbicidal. *Trends Immunol*. 2002;23(6):291-6.

139. Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol.* 1998;10(1):41-4.
140. Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol.* 1999;11(1):23-7.
141. Schroder JM. Epithelial antimicrobial peptides: Innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci.* 1999;56(1-2):32-46.
142. Swanson K, Gorodetsky S, Good L, Davis S, Musgrave D, Stelwagen K, Farr V, Molenaar A. Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infect Immun.* 2004;72(12):7311-4.
143. Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(1):174-85.
144. Armogida SA, Yannaras NM, Melton AL, Srivastava MD. Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. *Allergy Asthma Proc.* 2004;25(5):297-304.
145. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, Pestonjamas V, Piraino J, Huttner K, Gallo RL. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature.* 2001;414(6862):454-7.
146. Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2000;55(1):31-49.

147. O'Donnell R, Holland JW, Deeth HC, Alewood P. Milk proteomics. *International Dairy Journal*. 2004;14(12):1013-23.
148. Gagnaire V, Jardin J, Jan G, Lortal S. Invited review: Proteomics of milk and bacteria used in fermented dairy products: From qualitative to quantitative advances. *J Dairy Sci*. 2009;92(3):811-25.
149. Roncada P, Stipetic LH, Bonizzi L, Burchmore RJ, Kennedy MW. Proteomics as a tool to explore human milk in health and disease. *J Proteomics*. 2013;88:47-57.
150. Bandhakavi S, Van Riper SK, Tawfik PN, Stone MD, Haddad T, Rhodus NL, Carlis JV, Griffin TJ. Hexapeptide libraries for enhanced protein ptm identification and relative abundance profiling in whole human saliva. *J Proteome Res*. 2011;10(3):1052-61.
151. Boschetti E, Righetti PG. The proteomimer in the proteomic arena: A non-depleting tool for discovering low-abundance species. *J Proteomics*. 2008;71(3):255-64.
152. D'Amato A, Bachi A, Fasoli E, Boschetti E, Peltre G, Senechal H, Righetti PG. In-depth exploration of cow's whey proteome via combinatorial peptide ligand libraries. *J Proteome Res*. 2009;8(8):3925-36.
153. Chen CP, Hsu CC, Yeh WL, Lin HC, Hsieh SY, Lin SC, Chen TT, Chen MJ, Tang SF. Optimizing human synovial fluid preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteome Sci*. 2011;9(65):1477-5956.
154. Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A*. 2004;16(2):317-20.

155. Klose J. From 2-d electrophoresis to proteomics. *Electrophoresis*. 2009;30 Suppl 1:S142-9.
156. Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF. Comparative study of three proteomic quantitative methods, dige, cicat, and itraq, using 2d gel- or lc-maldi tof/tof. *J Proteome Res*. 2006;5(3):651-8.
157. Rukmangadachar LA, Kataria J, Hariprasad G, Samantaray JC, Srinivasan A. Two-dimensional difference gel electrophoresis (dige) analysis of sera from visceral leishmaniasis patients. *Clin Proteomics*. 2011;8(1):4.
158. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 1988;60(20):2299-301.
159. Yang Y, Bu D, Zhao X, Sun P, Wang J, Zhou L. Proteomic analysis of cow, yak, buffalo, goat and camel milk whey proteins: Quantitative differential expression patterns. *J Proteome Res*. 2013;12(4):1660-7.
160. Zhang LYW, J.Q.; Yang, Y.X.; Bu, D.P.; Li, S.S.; Zhou, L.Y. . Comparative proteomic analysis of changes in the bovine whey proteome during the transition from colostrum to milk. *Asian Austral J Anim*. 2011;24(2):272-8.
161. Martini MA, I.; Pesi, R.; Tozzi, M.G.; Salari, F. Fat globule membranes in ewes' milk: The main enzyme activities during lactation. *Int Dairy J*. 2013;28(1):36-9.
162. Boehmer JL, Bannerman DD, Shefcheck K, Ward JL. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine milk during experimentally induced escherichia coli mastitis. *J Dairy Sci*. 2008;91(11):4206-18.
163. Kunz C, Lonnerdal B. Human milk proteins: Separation of whey proteins and their analysis by polyacrylamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography

- (fplc) gel filtration, and anion-exchange chromatography. *Am J Clin Nutr.* 1989;49(3):464-70.
164. Jensen HBP, N.A.; Moller, H.S.; Stensballe, A.; Larsen, L.B. Comparative proteomic analysis of casein and whey as prepared by chymosin-induced separation, isoelectric precipitation or ultracentrifugation. *J Dairy Res.* 2012;79(4):451-8.
165. Fox PF. Milk proteins: General and historical aspects. In *Advanced dairy Chemistry*, 3rd ed. 2003;1:1-41.
166. Ettan IPGphor 3 Instrument User Manual GH.
167. HPE™-FlatTop Tower User Manual SE.
168. DeCyder 2D Differential Analysis Software v7.0 Data file 28-4015-43 AC GH.
169. Bakir-Gungor B, Egemen E, Sezerman OU. Panoga: A web server for identification of snp-targeted pathways from genome-wide association study data. *Bioinformatics.* 2014;30(9):1287-9.
170. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using david bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.
171. Colgrave ML, Xi L, Lehnert SA, Flatscher-Bader T, Wadensten H, Nilsson A, Andren PE, Wijffels G. Neuropeptide profiling of the bovine hypothalamus: Thermal stabilization is an effective tool in inhibiting post-mortem degradation. *Proteomics.* 2011;11(7):1264-76.

## 7. EKLER

### EK 1: İnsan kolostrumunda yüksek oranda tespit edilen proteinler

Target No	T-test Değeri	Ort. Oran*	Protein Adı
367	4.60E-05	-332.6	Chain A, Crystal Structure Of Human Seminal Lactoferrin At 3.4 A Resolution
542	1.70E-06	-188.02	Chain A, Crystal Structure Of Human Seminal Lactoferrin At 3.4 A Resolution
391	6.40E-05	-156.91	Chain A, Crystal Structure Of Human Seminal Lactoferrin At 3.4 A Resolution
538	5.00E-06	-111.6	lactotransferrin isoform 2 [Homo sapiens]
532	2.30E-05	-104.51	Lactotransferrin [Homo sapiens]
371	0.00019	-85.18	Chain A, Crystal Structure Of Human Seminal Lactoferrin At 3.4 A Resolution
426	0.0003	-60.7	Chain A, Crystal Structure Of Human Seminal Lactoferrin At 3.4 A Resolution
533	3.50E-05	-52.2	Chain A, Crystal Structure Of Human Seminal Lactoferrin At 3.4 A Resolution

\*Ortalama oran, ortak proteinlerde miktara göre (Keçi/İnsan), nispi fazlalıkları ifade etmektedir. Pozitif değerler keçi, negatif değerler insanı temsil eder.



**EK 2: Keçi kolostrumunda yüksek oranda tespit edilen proteinler**

Target No	T-test Değeri	Ort. Oran*	Protein Adı
1173	4.80E-06	50.02	kappa casein [Capra hircus], as1-casein [Capra hircus]
1317	4.20E-07	51.09	beta-casein [Capra hircus],kappa casein [Capra hircus]
1255	2.20E-06	54.08	beta-casein [Capra hircus],kappa casein [Capra hircus]
1338	2.00E-06	58.58	beta-casein [Capra hircus],kappa casein [Capra hircus]
2035	0.00037	63.94	Chain A, Alpha-Lactalbumin, kappa-casein [Homo sapiens], PREDICTED: serine/arginine repetitive matrix protein 4 [Heterocephalus glaber], TNK2 protein [Homo sapiens], PREDICTED: BUD13 homolog [Echinops telfairi]
1337	2.50E-06	70.09	immunoglobulin lambda light chain F7-299 [Capra hircus], PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: importin-13 [Cavia porcellus]
2039	0.0001	73.41	Chain A, Alpha-Lactalbumin, PREDICTED: serine/arginine repetitive matrix protein 4 [Heterocephalus glaber]
1660	6.20E-07	87.56	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
1328	7.30E-07	87.63	kappa casein [Capra hircus],beta-casein [Capra hircus]
1696	2.30E-07	89.72	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
1262	4.20E-07	108.33	beta-casein [Capra hircus]
1662	3.20E-07	108.49	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
1705	5.70E-07	129.53	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
1711	2.20E-08	135.16	Chain A, Mutant Human Lysozyme With Foreign N-Terminal Residues, RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor, Ig alpha-1 chain C region - gorilla (fragment) HRPE773 [Homo sapiens], PREDICTED: autism susceptibility gene 2 protein

			[Echinops telfairi]
<b>1247</b>	1.80E-06	137.32	beta-casein [Capra hircus]
<b>1698</b>	8.10E-07	143.25	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor, RecName: Full=Beta-casein; Flags: Precursor
<b>1258</b>	1.60E-07	153.33	beta-casein [Capra hircus], kappa casein [Capra hircus]
<b>1682</b>	1.40E-07	158.32	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1670</b>	2.90E-07	166.12	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor, PREDICTED: phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 5 [Cavia porcellus]
<b>1675</b>	1.40E-07	175.96	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor, PREDICTED: e3 ubiquitin-protein ligase RBBP6-like [Monodelphis domestica]
<b>1687</b>	1.40E-07	177.87	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1254</b>	1.40E-07	180.42	kappa casein [Capra hircus], alpha s1 casein variant precursor [Ovis aries], beta-casein [Capra hircus], PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: tetratricopeptide repeat protein 24 [Ceratotherium simum simum]
<b>1724</b>	1.40E-07	187.94	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1702</b>	1.40E-07	190.28	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1741</b>	2.80E-07	196.43	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1672</b>	2.20E-08	200.47	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1870</b>	1.40E-06	200.92	Beta-lactoglobulin, malate dehydrogenase precursor (EC 1.1.1.37), partial [Sus scrofa]
<b>1663</b>	3.30E-07	219.42	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1242</b>	7.40E-07	226.31	beta-casein [Capra hircus], kappa casein [Capra hircus]
<b>1694</b>	6.20E-07	232.97	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1271</b>	2.10E-07	244.98	beta-casein [Capra hircus], kappa casein [Capra hircus], as1-casein

			[Capra hircus]
<b>1658</b>	1.60E-07	265.84	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1746</b>	1.60E-07	316.65	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1749</b>	3.00E-07	330.48	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1745</b>	5.80E-07	334.86	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor, PREDICTED: semaphorin-3G isoform 1 [Dasypus novemcinctus]
<b>1787</b>	2.00E-07	389.52	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor, RecName: Full=Haptoglobin; AltName: Full=Zonulin; Contains: RecName: Full=Haptoglobin alpha chain; Contains: RecName: Full=Haptoglobin beta chain; Flags: Precursor RecName: Full=Peptidoglycan recognition protein 1; Flags: Precursor
<b>1757</b>	1.40E-07	394.99	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1752</b>	1.60E-07	429.4	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor, PREDICTED: e3 ubiquitin-protein ligase RBBP6-like [Monodelphis domestica]
<b>1783</b>	1.60E-07	431.31	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1751</b>	2.00E-06	447.32	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1782</b>	1.60E-07	495.02	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor, PREDICTED: integrin beta-4 isoform 1 [Cavia porcellus]
<b>1775</b>	4.60E-07	498.73	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1742</b>	3.30E-07	552.05	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1760</b>	9.10E-08	554.84	beta-lacto-globulin [Ovis aries]
<b>1781</b>	5.70E-07	663.21	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1627</b>	2.00E-07	718.5	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor

<b>1792</b>	4.00E-07	738.81	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1736</b>	5.70E-07	1020.4 9	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1726</b>	1.00E-06	1181	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1733</b>	3.30E-07	1251.1	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1657</b>	4.20E-07	1681.8 2	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor
<b>1789</b>	3.00E-07	2011.4	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor

\*Ortalama oran, ortak proteinlerde miktara göre (Keçi/İnsan), nispi fazlalıkları ifade etmektedir. Pozitif değerler keçi, negatif değerler insanı temsil eder.

### EK 3: İnsan kolostrumu DAVID küme analizi

<b>Küme 1</b>		<b>Enrichment Score: 6.092307611213138</b>	
<b>Term</b>	<b>İlgili Genler</b>	<b>FDR</b>	
Secreted	KLK6, LALBA, TF, C3, CLU, PIGR, IGHM, CSN1S1, B2M, AMBP, LAMA2, AZGP1, APOA2, TFRC, SAA1, ALB, IGHD, IFNG, SERPINA3, SCG3, LTF, IGH@, PCSK1N, CSN3	4,76E-07	
GO:0005576~extracellular region	LALBA, TF, C3, CLU, IGHM, B2M, AZGP1, APP, APOA2, SAA1, ALB, IFNG, SERPINA3, SCG3, LTF, IGKC, KLK6, PIGR, CSN1S1, AMBP, LAMA2, TFRC, IGHD, IGH@, PCSK1N, CSN3, IGLC3	2,03E-06	
disulfide bond	LALBA, TF, C3, GABRB2, CLU, IGHM, B2M, OS9, AZGP1, APP, APOA2, ALB, IGHA1, IGHA2, LTF, IGKC, KLK6, PIGR, CSN1S1, AMBP, LAMA2, TFRC, IGHD, IGH@, CSN3, IGLC3	5,32E-04	
signal	LALBA, TF, C3, GABRB2, CLU, IGHM, B2M, OS9, AZGP1, APP, APOA2, SAA1, ALB, IFNG, SERPINA3, SCG3, LTF, IGKC, KLK6, PIGR, CSN1S1, AMBP, LAMA2, KIAA1199, IGH@, PCSK1N, CSN3	9,24E-04	
signal peptide	LALBA, TF, C3, GABRB2, CLU, IGHM, B2M, OS9, AZGP1, APP, APOA2, SAA1, ALB, IFNG, SERPINA3, SCG3, LTF, IGKC, KLK6, PIGR, CSN1S1, AMBP, LAMA2, KIAA1199, IGH@, PCSK1N, CSN3	0,001147	
disulfide bond	KLK6, LALBA, TF, C3, GABRB2, CLU, PIGR, IGHM, B2M, AMBP, LAMA2, AZGP1, APOA2, APP, TFRC, ALB, IGHD, IGHA1, IGHA2, LTF, IGH@, IGKC, IGLC3	0,023393	
glycoprotein	LALBA, TF, SLC5A5, C3, GABRB2, CLU, IGHM, B2M, OS9, AZGP1, APP, GALNTL5, ALB, IFNG, SERPINA3, IGHA1, IGHA2, LTF, KLK6, PIGR, AMBP, LAMA2, TFRC, KIAA1199, IGHD, SPTBN1, IGH@, CSN3	0,052933	
<b>Küme 2</b>		<b>Enrichment Score: 5.189334744917408</b>	
<b>Term</b>	<b>Genes</b>	<b>FDR</b>	

immunoglobulin c region	IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, IGLC3	2,49E-08
SM00407:IGc1	AZGP1, IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, B2M, IGLC3	6,36E-07
IPR003597:Immunoglobulin C1-set	AZGP1, IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, B2M, IGLC3	1,89E-06
IPR003006:Immunoglobulin/major histocompatibility complex, conserved site	AZGP1, IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, B2M, IGLC3	1,09E-05
immunoglobulin	IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, IGLC3	3,20E-05
GO:0006955~immune response	CIITA, C3, CLU, IGHM, B2M, AZGP1, IGHD, IFNG, KRT1, IGHA1, IGHA2, LTF, IGH@, IGKC, IGLC3	2,67E-04
GO:0003823~antigen binding	IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, IGLC3	0,00148
heterotetramer	IGHD, KRT1, IGHA1, IGH@, IGKC, IGHM, IGLC3	0,001948
SM00406:IGv	IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, IGLC3	0,063681
IPR003596:Immunoglobulin V-set, subgroup	IGHA1, IGHA2, IGH@, IGKC, IGHM, IGLC3	0,120583
IPR007110:Immunoglobulin-like	AZGP1, IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, PIGR, IGKC, IGHM, B2M, IGLC3	0,176527
IPR013783:Immunoglobulin-like fold	AZGP1, IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, PIGR, IGKC, IGHM, B2M, IGLC3	0,345308
Immunoglobulin domain	IGHD, IGHA1, IGHA2, IGH@, PIGR, IGKC, IGHM, B2M, IGLC3	0,458847
<b>Küme 3</b>	<b>Enrichment Score: 5.020279573335584</b>	
	<b>Term</b>	<b>FDR</b>
	GO:0002526~acute inflammatory response	TF, APOA2, TFRC, C3, SAA1, CLU, SERPINA3, KRT1
	GO:0006952~defense response	LALBA, CIITA, TF, APOA2, TFRC, C3, SAA1, IFNG, CLU, SERPINA3, KRT1, LTF
	GO:0006954~inflammatory response	CIITA, TF, APOA2, TFRC, C3, SAA1, CLU, SERPINA3, KRT1
	GO:0009611~response to wounding	KLK6, CIITA, TF, APOA2, TFRC, C3, SAA1, CLU, SERPINA3, KRT1
<b>Küme 4</b>	<b>Enrichment Score: 3.4526820210401046</b>	
	<b>Term</b>	<b>FDR</b>

GO:0002526~acute inflammatory response TF, APOA2, TFRC, C3, SAA1, CLU, SERPINA3, KRT1 4,09E-05

<b>Küme 5</b>			
<b>Enrichment Score: 2.011578813202159</b>			
<b>Term</b>	<b>İlgili Genler</b>	<b>FDR</b>	
GO:0042592~homeostatic process	KLK6, TF, ITPR3, APP, APOA2, TFRC, GCK, SAA1, RPS14, IFNG, SERPINA3, LTF, EIF2B2	0,005033	
GO:0055082~cellular chemical homeostasis	KLK6, TF, APP, GCK, TFRC, SAA1, LTF, ITPR3, EIF2B2	0,041492	
GO:0048878~chemical homeostasis	KLK6, TF, APOA2, APP, GCK, TFRC, SAA1, LTF, ITPR3, EIF2B2	0,050821	
GO:0019725~cellular homeostasis	KLK6, TF, APP, GCK, TFRC, SAA1, LTF, ITPR3, EIF2B2	0,174882	
GO:0006873~cellular ion homeostasis	KLK6, TF, APP, TFRC, SAA1, LTF, ITPR3, EIF2B2	0,291318	
GO:0006953~acute-phase response	TF, TFRC, SAA1, SERPINA3	0,458807	
GO:0050801~ion homeostasis	KLK6, TF, APP, TFRC, SAA1, LTF, ITPR3, EIF2B2	0,502625	
<b>Küme 6</b>			
<b>Enrichment Score: 1.9572378103402226</b>			
<b>Term</b>	<b>İlgili Genler</b>	<b>FDR</b>	
GO:0016485~protein processing	KLK6, C3, CLU, KRT1, PCSK1N	0,735766	

## EK 4 : Keçi kolostrumu DAVID küme analizi

<b>Küme 1</b>		<b>Enrichment Score: 4.977505743849939</b>	
<b>Kategori</b>	<b>Term</b>	<b>Genes</b>	<b>FDR</b>
	disulfide bond	LALBA, OR1K1, C3, ITGB4, OR4K17, PGLYRP1, CST1, HP, MFGE8, KIT, CSN1S1, B2M, SEMA3G, IGHD, PIP, LTF, IGH@, IL12B, CD226, CSN3, IGLC3	1,77E-04
	Secreted	LALBA, C3, PGLYRP1, HP, MFGE8, CST1, CSN1S1, B2M, SEMA3G, IGHD, PIP, LTF, IGH@, IL12B, CSN3, CSN2	5,23E-04
	disulfide bond	LALBA, OR1K1, C3, OR4K17, PGLYRP1, ITGB4, CST1, HP, MFGE8, KIT, B2M, SEMA3G, IGHD, PIP, LTF, IGH@, IL12B, CD226, IGLC3	0,00363
	signal	LALBA, C3, PGLYRP1, ITGB4, CST1, HP, MFGE8, KIT, CSN1S1, B2M, EPHB2, GLYCAM1, SEMA3G, PIP, LTF, IGH@, IL12B, CD226, CSN3, CSN2	0,005221
	signal peptide	LALBA, C3, PGLYRP1, ITGB4, CST1, HP, MFGE8, KIT, CSN1S1, B2M, EPHB2, GLYCAM1, SEMA3G, PIP, LTF, IGH@, IL12B, CD226, CSN3, CSN2	0,006176
	GO:0005576~extracellular region	LALBA, C3, PGLYRP1, CST1, HP, MFGE8, KIT, CSN1S1, B2M, SEMA3G, IGHD, PIP, LTF, IGH@, IL12B, CSN3, CSN2, IGLC3	0,009764
	glycoprotein	LALBA, OR1K1, C3, ITGB4, OR4K17, PGLYRP1, HP, MFGE8, KIT, B2M, EPHB2, SEMA3G, IGHD, PIP, LTF, IGH@, IL12B, CD226, CSN3	1,057706
<b>Küme 2</b>		<b>Enrichment Score: 3.4500781703540286</b>	
<b>Term</b>	<b>Genler</b>	<b>FDR</b>	
heterotetramer	IGHD, KRT14, HP, IGH@, IGLC3	0,013467	
IPR007110:Immunoglobulin-like	SEMA3G, IGHD, IGK@, IGH@, KIT, IL12B, CD226, B2M, IGLC3	0,020119	
IPR003597:Immunoglobulin C1-set	IGHD, IGK@, IGH@, B2M, IGLC3	0,022037	
SM00407:IGc1	IGHD, IGK@, IGH@, B2M, IGLC3	0,024841	
Immunoglobulin domain	SEMA3G, IGHD, IGH@, KIT, IL12B, CD226, B2M, IGLC3	0,046122	
IPR003006:Immunoglobulin/major histocompatibility complex, conserved site	IGHD, IGK@, IGH@, B2M, IGLC3	0,05833	



immunoglobulin c region	IGHD, IGH@, IGLC3	0,169535
IPR013783:Immunoglobulin-like fold	IGHD, IGK@, IGH@, KIT, IL12B, CD226, B2M, IGLC3	0,306441
<b><i>Küme 3</i></b>	<b>Enrichment Score: 2.850052295790771</b>	
<b>Term</b>	<b>Genler</b>	<b>FDR</b>
GO:0002705~positive regulation of leukocyte mediated immunity	C3, IL12B, CD226, B2M	0,102694
GO:0002708~positive regulation of lymphocyte mediated immunity	C3, IL12B, CD226, B2M	0,102694
GO:0002699~positive regulation of immune effector process	C3, IL12B, CD226, B2M	0,223538
GO:0002706~regulation of lymphocyte mediated immunity	C3, IL12B, CD226, B2M	0,411621
GO:0002703~regulation of leukocyte mediated immunity	C3, IL12B, CD226, B2M	0,590085

**EK 5: Tespit edilen kolostrum protein listesi ve gen karşılıkları**

No	Gen isimleri	Protein İsimleri	NCBI	Fonksiyonları
1	Igh-VJ558	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345	
2	Abcg311	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ATP-binding cassette sub-family A member 3-like [Felis catus]	gi 410985519	
3	Abcg311	Chain A, Human Kallikrein 6 (Hk6) Active Form With Benzamidine Inhibitor	gi 21465970	
4	ACSM2A	PREDICTED: acyl-coenzyme A synthetase ACSM1, mitochondrial-like [Dasypus novemcinctus]	gi 488537977	
5	ACTB	mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]	gi 28336	
6	AHSG FETU A	alpha-2-HS-glycoprotein precursor [Ovis aries]	gi 57526674	
7	alb	albumin precursor [Capra hircus]	gi 193085052	
8	ALB	albumin	gi 229552	
9	ALG1	PREDICTED: chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase [Felis catus]	gi 410985260	
10	AMBP	Ig heavy chain precursor (B/MT.4A.17.H5.A5) - bovine	gi 108750	
11	An04g03380	hypothetical protein [Homo sapiens]	gi 31874206	
12	APOA2	apolipoprotein J precursor [Homo sapiens]	gi 178855	
13	App	Family with sequence similarity 19, member A4 [Mus musculus]	gi 58477582	Encodes a cell surface receptor
14	ARHGEF35	PREDICTED: rho guanine nucleotide exchange factor 5-like [Sus scrofa]	gi 335295703	
15	as1-casein	as1-casein [Capra hircus]	gi 954	
16	ASP	RecName: Full=Complement C3; Contains: RecName: Full=Complement C3 beta chain; Contains: RecName: Full=Complement C3 alpha chain; Contains: RecName: Full=C3a anaphylatoxin; Contains: RecName: Full=Acylation stimulating protein; Short=ASP; AltName: F	gi 124056491	
17	AUTS2	PREDICTED: autism susceptibility gene 2 protein [Echinops telfairi]	gi 507660025	
18	Avil	PREDICTED: advillin [Monodelphis domestica]	gi 126343810	
19	AZGP1	Zn-alpha2-glycoprotein [Homo sapiens]	gi 38026	

20	AZGP1	zinc-alpha2-glycoprotein precursor [Homo sapiens]	gi 220151	
21	B2M	beta-2-microglobulin [Ovis aries]	gi 145207027	
22	B2M	B2M [Homo sapiens]	gi 48146249	
23	B2M	Chain A, The Double Mutant Of Beta-2 Microglobulin K58p-W60g	gi 301015783	
24	BAG6	PREDICTED: BAG family molecular chaperone regulator 5-like [Ornithorhynchus anatinus]	gi 149441871	
25	BLG	beta-lactoglobulin [Capra hircus]	gi 183186230	
26	BLG	Beta-lactoglobulin	gi 125912	
27	BRCA1	breast cancer 1 protein, partial [Blarinella griselda]	gi 300486803	
28	BUD13	PREDICTED: BUD13 homolog [Echinops telfairi]	gi 507690468	
29	C3	PREDICTED: complement C3 [Ochotona princeps]	gi 504172699	
30	C3	PREDICTED: complement C3-like, partial [Ovis aries]	gi 426258629	
31	C3	prepro complement component C3 [Bos taurus]	gi 83764016	
32	C3	complement component C3 [Homo sapiens]	gi 179665	
33	C3	PREDICTED: complement C3, partial [Macaca mulatta]	gi 297275935	
34	C3	Chain B, Human Complement Component C3c	gi 78101270	
35	c3b	beta-casein [Capra hircus]	gi 443345	
36	c3b	beta-casein [Homo sapiens]	gi 317455056	
37	c3b	Chain A, Alpha1-Antitrypsin	gi 78101267	
38	CATHL1	cathelicidin-1 precursor [Bos taurus]	gi 27807341	
39	CB1_0001720_53	PREDICTED: sodium/iodide cotransporter-like [Macaca mulatta]	gi 297276472	
40	CD226	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3 [Nomascus leucogenys]	gi 303228093	Megakaryocytic cell maturation
41	CD300A	poly-Ig receptor, partial [Homo sapiens]	gi 514366	
42	CIITA	Chain B, Crystal Structure Of Mhc Class I Hla-A2.1 Bound To A Photocleavable Peptide	gi 290560013	
43	CLDN22	PREDICTED: claudin-22 [Condylura cristata]	gi 507947588	
44	CLU	PREDICTED: clusterin isoform 2 [Pan paniscus]	gi 397521527	
45	CLU	clusterin preproprotein [Bos taurus]	gi 27806907	
46	CLU	sulfated glycoprotein-2, partial [Homo sapiens]	gi 338057	

47	CLUAP1	PREDICTED: clusterin isoform 2 [Gorilla gorilla gorilla]	gi 426359207
48	co3	RecName: Full=Complement C3; Contains: RecName: Full=Complement C3 beta chain; Contains: RecName: Full=Complement C3 alpha chain; Contains: RecName: Full=C3a anaphylatoxin; Contains: RecName: Full=Acylation stimulating protein; Short=ASP; AltName: F	
49	CSCN1	CSCN1 [Capra hircus]	gi 37962703
50	CSN1S1	alpha s1 casein variant precursor [Ovis aries]	gi 213391437
51	CSN1S1	alpha s1 casein [Capra hircus]	gi 394997385
52	CSN1S1	alpha S1-casein [Homo sapiens]	gi 1359714
53	CSN1S2	alpha-S2-casein precursor [Ovis aries]	gi 57164371
54	CSN1S2	alpha-s2-casein [Ovis aries]	gi 284025662
55	CSN1S2	alpha s2-casein C [Capra hircus]	gi 707034
56	CSN2	PREDICTED: beta-casein [Papio anubis]	gi 402869645
57	CSN2	beta-casein precursor [Capra hircus]	gi 15425980
58	CSN2	beta-casein [Capra hircus]	gi 49781319
59	CSN2	beta-casein [Homo sapiens]	gi 29674
60	CSN3	kappa-casein, partial [Oryx gazella]	gi 14572687
61	CSN3	kappa casein [Capra hircus]	gi 117958741
62	CSN3	RecName: Full=Kappa-casein; Short=Kappa-CN; Flags: Precursor	gi 115669
63	CSN3	kappa-casein [Homo sapiens]	gi 186655
64	CST1	cathelicidin-1 precursor [Bos taurus]	gi 399124842
65	D623_100103 31	Hypothetical protein D623_10010331 [Myotis brandtii]	gi 521021727
66	D623_100238 68	Tau-tubulin kinase 2 [Myotis brandtii]	gi 521022227
67	DYNLT1	Chain A, Crystal Structure Of Human Seminal Lactoferrin At 3.4 A Resolution	gi 28948741
68	DYNLT1	nuclear mitotic apparatus protein 1 precursor [Bos taurus]	gi 329664652
69	E2F6	PREDICTED: transcription factor E2F6- like [Ornithorhynchus anatinus]	gi 345304921
70	EGK_01520	hypothetical protein EGK_01520 [Macaca mulatta]	gi 355558651
71	EIF4E2	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: eukaryotic translation initiation factor 4E-like [Callithrix jacchus]	gi 390474846

72	EIF4E2	Chain A, Human Lactoferrin, N-terminal Lobe Mutant With Arg 121 Replaced By Ser (r121s)	gi 157834115	
73	EIF4E2	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: eukaryotic translation initiation factor 4E-like [Callithrix jacchus]	gi 390474846	
75	Eif2b5	initiation factor-2Be [Rattus norvegicus]	gi 924597	
76	EPHB2	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101966053 [Ictidomys tridecemlineatus]	gi 532093271	
78	FAM217B	PREDICTED: protein FAM217B [Octodon degus]	gi 507699927	
79	FCAR	Beta-lactoglobulin	gi 31615935	
80	Flt3	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3 [Microtus ochrogaster]	gi 532000481	
81	Gck	hexokinase type II, partial [Rattus norvegicus]	gi 204615	Catalyzes the initial step in utilization of glucose
82	GGT3P	PREDICTED: putative gamma-glutamyltranspeptidase 3-like, partial [Pan troglodytes]	gi 114685042	
83	GHDC	GH3 domain-containing protein isoform 1 precursor [Homo sapiens]	gi 14210490	
84	GIG25	growth-inhibiting protein 25 [Homo sapiens]	gi 46981961	
85	gld-3	Chain B, Crystal Structure Of Germ-line Precursor Of Nih45-46 Fab	gi 469474709	
86	GLYCAM1	glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 [Capra hircus]	gi 147744650	
87	GLYCAM1	RecName: Full=Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1; Short=GlyCAM-1; AltName: Full=28 kDa milk glycoprotein PP3; AltName: Full=Lactophorin; AltName: Full=Proteose-peptone component 3; Short=PP3; Flags: Precursor	gi 22096365	
88	GM4976	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101989810 [Microtus ochrogaster]	gi 532049661	
89	GW7_02064	PREDICTED: putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like protein 5 [Heterocephalus glaber]	gi 512813136	
90	GW7_02660	Serine/threonine-protein kinase Nek11 [Heterocephalus glaber]	gi 351695211	
91	GW7_06202	Lupus La protein [Heterocephalus glaber]	gi 351711764	
92	GW7_13573	Protein KIAA1199 [Heterocephalus glaber]	gi 351704930	

93	HLA-DPA1	Ig gamma-1 chain C region, partial [Bos grunniens mutus]	gi 440891567
94	hp	haptoglobin [Rupicapra rupicapra]	gi 307742657
95	HP	RecName: Full=Haptoglobin; AltName: Full=Zonulin; Contains: RecName: Full=Haptoglobin alpha chain; Contains: RecName: Full=Haptoglobin beta chain; Flags: Precursor	gi 226709030
96	HRNR	hornerin [Homo sapiens]	gi 28557150
97	I79_017031	PREDICTED: double homeobox protein 4-like protein 4-like [Cricetulus griseus]	gi 354482239
98	I79_019209	PREDICTED: putative phospholipase B-like 2 [Cricetulus griseus]	gi 354497505
99	IFNG	breast cancer 1 protein, partial [Blarinella griselda]	gi 203282277
100	IGG	Ig alpha-1 chain C region - gorilla (fragment)	gi 86666
101	IGGL	Ig L-chain V-region [Homo sapiens]	gi 27552515
102	IGH@	Chain A, Crystal Structure Of Complement C3b In Complex With Factors B And D	gi 317455056
103	IGH@	IGH@ protein [Homo sapiens]	gi 41351320
104	IGHA1	Ig H-chain V-region (DP-38) [Homo sapiens]	gi 32897
105	IGHA1	PREDICTED: immunoglobulin J chain isoform 3 [Gorilla gorilla gorilla]	gi 426344566
106	IGHA2	immunoglobulin alpha-2 heavy chain [Homo sapiens]	gi 184761
107	IGHD	Ig heavy chain C region - sheep (fragment)	gi 109029
108	Ighg	unnamed protein product [Mus Musculus]	gi 28071026
109	IGHM	Chain A, Crystal Structure Of Copper-And Oxalate-Substituted Human Lactoferrin At 2.0 Angstroms Resolution	gi 157831776
110	IGHM	immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Homo sapiens]	gi 392576
111	IGHM	immunoglobulin A heavy chain variable region, partial [Homo sapiens]	gi 519672850
112	Ighv1	Ig heavy chain V region (30p1) - human	gi 106396
113	IGHV4OR15-8	immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]	gi 247424136
114	IGHV4OR15-8 VSIG6	immunoglobulin G heavy chain variable region [Homo sapiens]	gi 371446908
115	IGJ	Ig J-chain, partial [Homo sapiens]	gi 532598

116	IGK@	Chain L, Crystal Structure Of The Broadly Neutralizing Anti-Hiv Fab F105	gi 75765276	
117	IGKC	immunoglobulin kappa light chain variable region [Homo sapiens]	gi 27368992	
118	IGKC	Ig kappa chain C region (allotype Inv(1,2)) - human (fragment)	gi 106529	
119	IGLC3	Ig lambda chain C region - sheep (fragment)	gi 109030	
120	IGLC3	Ig lambda chain C region - chimpanzee (fragment)	gi 7439133	
121	IPLL	immunoglobulin light chain [Homo sapiens]	gi 149673887	
122	IPLL1	Chain A, Crystal Structure Of The Rabbit Igg Fc Fragment	gi 203282277	
123	IPLL1	immunoglobulin lambda light chain [Homo sapiens]	gi 33700	
124	IPLL1	PREDICTED: immunoglobulin lambda-like polypeptide 5-like [Papio anubis]	gi 402883739	
125	IPLL1	immunoglobulin heavy chain [Homo sapiens]	gi 1200067	
126	IPLL1	immunoglobulin light chain [Homo sapiens]	gi 149673887	
127	IGM	beta-lacto-globulin [Ovis aries]	gi 10835792	
128	IGSF1	immunoglobulin variable region [Homo sapiens]	gi 323432599	
129	IL12B	immunoglobulin gamma 2 heavy chain constant region [Capra hircus]	gi 147744654	A cytokine that acts on T and natural killer cells
130	IMPAD1	PREDICTED: inositol monophosphatase 2-like [Cricetulus griseus]	gi 354485660	
131	IPO13	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: importin-13 [Cavia porcellus]	gi 348552222	
132	Itga7	PREDICTED: laminin subunit alpha-2 isoform X1 [Ictidomys tridecemlineatus]	gi 532099566	
133	Itgal	integrin alpha L [Mus musculus]	gi 4587848	
134	ITGB4	PREDICTED: integrin beta-4 isoform 1 [Cavia porcellus]	gi 348551298	
135	ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-interacting protein-like 2 precursor [Homo sapiens]	gi 77798169	
136	KCAS	kappa-casein [Nanger dama]	gi 353526169	
137	KIT	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100924770 [Sarcophilus harrisii]	gi 395539785	
138	Kiss1r	PREDICTED: kiSS-1 receptor [Saimiri boliviensis boliviensis]	gi 403308169	
139	KRT14	Keratin 14 [Homo sapiens]	gi 12803709	

140	KRT2	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 6B [Pan troglodytes]	gi 114644570
141	KRT2	epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens]	gi 181402
142	KRT81	keratin 1 [Homo sapiens]	gi 7331218
143	LACT	unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 193787568
144	LALBA	B2M [Homo sapiens]	gi 2392356
145	LALBA	PREDICTED: alpha-lactalbumin [Nomascus leucogenys]	gi 332206362
146	LALBA	RecName: Full=Alpha-lactalbumin; AltName: Full=Lactose synthase B protein; Flags: Precursor	gi 125998
147	LALBA	Chain A, Alpha-Lactalbumin	gi 21465970
148	LALBA	RecName: Full=Alpha-lactalbumin; AltName: Full=Lactose synthase B protein	gi 126004
149	LGAL	PREDICTED: galectin-3-binding protein isoform 1 [Gorilla gorilla gorilla]	gi 426346505
150	LGAL	galectin-3-binding protein precursor [Homo sapiens]	gi 5031863
151	LGALS3BP	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: galectin-3-binding protein [Pongo abelii]	gi 395749542
152	LGB	beta-lacto-globulin [Ovis aries]	gi 1279615
153	LGB	lactoglobulin beta	gi 223780
154	LGB1	RecName: Full=Beta-lactoglobulin; Short=Beta-LG; Flags: Precursor	gi 125912
155	LILRB1	PREDICTED: immunoglobulin-like domain-containing receptor 2 [Jaculus jaculus]	gi 507535497
156	LOC10029574 1	HRPE773 [Homo sapiens]	gi 37183160
157	LOC10065324 5	Ig heavy chain V-III region (TD-Vp) - human (fragment)	gi 87858
158	LOC10092692 0	PREDICTED: alpha-1D adrenergic receptor [Sarcophilus harrisii]	gi 395508862
159	LOC10156770 4	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101567704 [Octodon degus]	gi 507630038
160	LOC10201346 2	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102013462 [Chinchilla lanigera]	gi 533115110
161	LOC10201518 2	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102015182 [Chinchilla lanigera]	gi 533125538
162	LOC793540	anti-Bacillus anthracis toxin immunoglobulin kappa variable region [Mus musculus]	gi 100289114



163	LRG1	PREDICTED: leucine-rich alpha-2-glycoprotein [Pongo abelii]	gi 297703177
164	LTF	beta-casein precursor [Capra hircus]	gi 157831776
165	LTF	PREDICTED: lactotransferrin isoform 8 [Pan troglodytes]	gi 114586532
166	LTF	Chain A, Structure Of Human Apolactoferrin At 2.0 A Resolution.	gi 4699853
167	LTF	PREDICTED: lactotransferrin [Papio anubis]	gi 402860314
168	LTF	lactoferrin [Capra hircus]	gi 556807
169	LTF	PREDICTED: lactotransferrin isoform 3 [Pan troglodytes]	gi 114586534
170	LTF	truncated lactoferrin [Homo sapiens]	gi 186927721
171	LTF	beta-lactoglobulin [Capra hircus]	gi 28948741
172	LTF	lactoferrin [Homo sapiens]	gi 2104522
173	LTF	Chain X, Structure Of Recombinant Human Lactoferrin Produced In The Milk Of Transgenic Cows	gi 75766355
174	LTF	Lactotransferrin [Homo sapiens]	gi 18490850
175	LTF	lactotransferrin isoform 2 [Homo sapiens]	gi 312433998
176	LTF	Chain A, Cleaved Alpha-1-Antitrypsin Polymer	gi 157834115
177	LYPD3	PREDICTED: ly6/PLAUR domain-containing protein 3 [Sorex araneus]	gi 505856120
178	LYZ	Chain A, Mutant Human Lysozyme With Foreign N-Terminal Residues	gi 5821956
179	map34-A	MAP34-A protein [Capra hircus]	gi 5139359
180	MCM10	PREDICTED: protein MCM10 homolog [Microtus ochrogaster]	gi 532023126
181	MDH1	malate dehydrogenase precursor (EC 1.1.1.37), partial [Sus scrofa]	gi 164541
182	MFGE8	milk fat globule EGF factor 8 protein, partial [Capra hircus]	gi 347803266
183	MPHOSPH8	PREDICTED: M-phase phosphoprotein 8 isoform 2 [Sus scrofa]	gi 311266603
184	MT3	alloalbumin Venezia [Homo sapiens]	
185	MT3	Alpha-protein kinase 3, partial [Bos grunniens mutus]	gi 440913170
186	NPC2 HE1	Chain A, Solution Structure Of Human Secretory Component	gi 146387599
187	OR1F1	Chain N, Crystal Structure Of Antibody 1f1 Bound To The 1918 Influenza Hemagglutinin	gi 430800984

188	OR1K1	PREDICTED: olfactory receptor 1K1-like [Pongo abelii]	gi 395755639	
189	OR4K17	PREDICTED: olfactory receptor 4K17-like [Ochotona princeps]	gi 504144991	
190	OS9	PREDICTED: osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum lectin [Oryctolagus cuniculus]	gi 291409376	
191	ovar	immunoglobulin alpha heavy chain [Ovis aries]	gi 2582411	
192	P/X	kappa casein, partial [Capra hircus]	gi 17939669	
193	PAL_GLEAN 10004704	OTU domain-containing protein 7A [Pteropus alecto]	gi 431917328	
194	PAL_GLEAN 10005088	Keratin, type II cytoskeletal 1 [Pteropus alecto]	gi 431921648	
195	PAN3	PREDICTED: uncharacterized protein LOC737791 [Pan troglodytes]	gi 332831092	
196	PAN3	RecName: Full=Alpha-S2-casein; Short=Alpha-S2-CN; Flags: Precursor	gi 416751	
197	PANDA_0027 23	hypothetical protein PANDA_002723 [Ailuropoda melanoleuca]	gi 281350888	
198	PANDA_0035 61	hypothetical protein PANDA_003561 [Ailuropoda melanoleuca]	gi 281348421	
199	PBX	Chain L, Crystal Structure Of A Chimeric Fab' Fragment Of An Antibody Binding Tumour Cells	gi 493869	
200	Pesk1n	protein Len,Bence-Jones	gi 229528	
201	PGLYRP1	PREDICTED: peptidoglycan recognition protein 1 [Ovis aries]	gi 426243041	
202	PGLYRP1	RecName: Full=Peptidoglycan recognition protein 1; Flags: Precursor	gi 223635600	
203	PIGR	PREDICTED: polymeric immunoglobulin receptor isoform X1 [Homo sapiens]	gi 530366266	
204	PIGR	polymeric immunoglobulin receptor precursor [Homo sapiens]	gi 31377806	
205	PIGR	immunoglobulin lambda light chain F7-299 [Capra hircus]	gi 61378762	
206	PIK3CG	PREDICTED: phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 5 [Cavia porcellus]	gi 348560953	Modulator of extracellular signals
207	PIP	prolactin-inducible protein precursor [Homo sapiens]	gi 4505821	
208	PIP	prolactin-induced protein [Homo sapiens]	gi 116642261	
209	Ptgr2	zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing protein 2 [Rattus norvegicus]	gi 157817316	
210	Ptgr2	PREDICTED: prostaglandin-E(43) 9-reductase-like [Sorex araneus]	gi 505789077	

211	RAVER1	PREDICTED: ribonucleoprotein PTB-binding 2 [Pan paniscus]	gi 397470819
212	RBPJ	immunoglobulin J chain precursor [Bos taurus]	gi 32401410
213	RBPJ	immunoglobulin J chain precursor [Pongo abelii]	gi 197098320
214	RET	PREDICTED: proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret [Ochotona princeps]	gi 504179829
215	Rev	Chain L, Crystal Structure Of Rv144-elicited Antibody Ch59 In Complex With V2 Peptide	gi 448262584
216	RPS14	40S ribosomal protein S14 [Cricetulus griseus]	gi 344248795
217	RSAD2	Chain C, Crystal Structure Of Mj5 Fab, A Germline Antibody Variant Of Anti-Human Cytomegalovirus Antibody 8f9	gi 218681905
218	SAA1	Chain A, Structure Of Human Serum Albumin With S-Naproxen And The Ga Module	gi 168988718
219	SAA1	serum albumin precursor [Ovis aries]	gi 57164373
220	Sare_2610	Ig mu chain C region, secreted splice form - human	gi 7428607
221	SCAMP3	transmembrane secretory component [Homo sapiens]	gi 238236
222	Scg3	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: secretogranin-3 [Felis catus]	gi 410961231
223	SCGB1D2	secretoglobin family 1D member 2 precursor [Homo sapiens]	gi 5729909
224	SCRN1	PREDICTED: secernin-1 [Jaculus jaculus]	gi 507537605
225	SEMA3G	PREDICTED: semaphorin-3G isoform 1 [Dasypus novemcinctus]	gi 488545924
226	SERPINA1	alpha-one antitrypsin, AT (171) [human, Peptide Partial, 20 aa]	gi 393350
227	SERPINA1	beta-2-microglobulin [Ovis aries]	gi 7245932
228	SERPINA1	as1-casein [Capra hircus]	gi 157831596
229	SERPINA1	Chain A, Interactions Causing The Kinetic Trap In Serpin Protein Folding	gi 28948408
230	SERPINA1	pre-alpha-1-antitrypsin [Homo sapiens]	gi 177822
231	SERPINA3	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119601993
232	SLCO4A1	PREDICTED: solute carrier organic anion transporter family member 2A1-like [Ornithorhynchus anatinus]	gi 345323402

233	SMURF2	PREDICTED: e3 ubiquitin-protein ligase RBBP6-like [Monodelphis domestica]	gi 334333427
234	SORCS2	PREDICTED: VPS10 domain-containing receptor SorCS2 [Otolemur garnettii]	gi 395853443
235	spas	PREDICTED: spastin [Octodon degus]	gi 507630779
236	SPTBN1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: spectrin beta chain, non-erythrocytic 5 [Tursiops truncatus]	gi 470628454
237	SPTY2D1	PREDICTED: protein SPT2 homolog [Jaculus jaculus]	gi 507533600
238	SRRM2	PREDICTED: serine/arginine repetitive matrix protein 4 [Heterocephalus glaber]	gi 512962998
239	TEX10	PREDICTED: testis-expressed sequence 29 protein [Pan troglodytes]	gi 332841653
240	tf1	PREDICTED: serotransferrin [Ovis aries]	gi 426218284
241	TFRC	Transferrin [Homo sapiens]	gi 37747855
242	TFRC	transferrin	gi 37747855
243	Timd2	T-cell receptor beta chain V region PHDS203 [Myotis brandtii]	gi 521023796
244	TNC	PREDICTED: tenascin isoform 2 [Gorilla gorilla gorilla]	gi 426362836
245	TNC	TNC protein [Homo sapiens]	gi 156229767
246	TNK2	TNK2 protein [Homo sapiens]	gi 14250828
247	TNXB	PREDICTED: tenascin isoform X3 [Homo sapiens]	gi 530391087
248	TNXB	PREDICTED: tenascin isoform X4 [Homo sapiens]	gi 530391089
249	TPA	TPA: hypothetical protein BOS_21073 [Bos taurus]	gi 296474912
250	TREES_T100002555	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-2 [Tupaia chinensis]	gi 444731258
251	TRERF1	transcriptional regulating factor 1, isoform CRA_a [Mus musculus]	gi 148691602
252	TRPM8	PREDICTED: transient receptor potential cation channel subfamily M member 1 [Dasypus novemcinctus]	gi 488594977
253	TRPM8	PREDICTED: transient receptor potential cation channel subfamily M member 6 isoform 1 [Nomascus leucogenys]	gi 332236554
254	TTC7B	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: tetratricopeptide repeat protein 24 [Ceratotherium simum simum]	gi 478524156

255	TTN	PREDICTED: nuclear mitotic apparatus protein 1 [Sarcophilus harrisii]	gi 395521298
256	VH	immunoglobulin mu heavy chain variable region [Homo sapiens]	gi 7018324
257	VH26	Ig VH,anti-Rh(c)	gi 227168
258	WDR12	WD repeat-containing protein 60 [Camelus ferus]	gi 528769581
259	ZNF224	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein 774 [Saimiri boliviensis boliviensis]	gi 403258161
260		kappa-casein, partial [Litocranius walleri]	gi 14572709
261		RecName: Full=Beta-casein; Flags: Precursor	gi 416752
262		albumin, isoform CRA_h [Homo sapiens]	gi 119626071
263		rCG30195 [Rattus norvegicus]	gi 149048969
264		Chain L, Ch04hCH02L P212121	gi 358439917

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Cansu	Soyadı	Akın
Doğum Yeri	Bakırköy	Doğum Tarihi	26.06.1989
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	47029192576
E-mail	cansu.akin@acibadem.edu.tr	Tel	05382800920

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Acibadem Üniversitesi	2014
Lisans	Marmara Üniversitesi	2011
Lise	Buca Anadolu Lisesi	2007

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
--------	-------	------------------

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

\* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
		5.5						

# Başarılımış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

# KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	78		

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi
Protein Pilot	Orta
Decyder	Orta

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

