

T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI VE MEME KANSERİ HASTASI KADINLARIN
(TEDAVİ ALMAMIŞ, TEDAVİ ALAN VE TEDAVİ OLMUŞ)
SERUM PROTEİNLERİ DEĞİŞİMİNİN 2-D (İKİ BOYUTLU)
ELEKTROFOREZ İLE TESPİTİ

Tezi Hazırlayan
Cevahir ALTINKAYNAK

Tezi Yöneten
Yrd. Doç.Dr Nalan ÖZDEMİR
Yrd. Doç.Dr F. Duygu ÖZEL DEMİRALP

Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2010
KAYSERİ

T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI VE MEME KANSERİ HASTASI KADINLARIN
(TEDAVİ ALMAMIŞ, TEDAVİ ALAN VE TEDAVİ OLMUŞ)
SERUM PROTEİNLERİ DEĞİŞİMİNİN 2-D (İKİ BOYUTLU)
ELEKTROFOREZ İLE TESPİTİ

Tezi Hazırlayan
Cevahir ALTINKAYNAK

Tezi Yöneten
Yrd. Doç.Dr Nalan ÖZDEMİR
Yrd. Doç.Dr F. Duygu ÖZEL DEMİRALP

Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
B-927 kodlu proje ile desteklenmiştir.

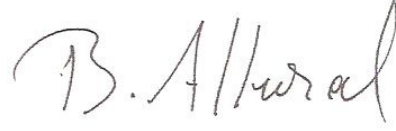
Ocak 2010
KAYSERİ

Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR ve Yrd. Doç. Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP danışmanlığında Cevahir ALTINKAYNAK tarafından hazırlanan “Sağlıklı ve Meme Kanseri Hastası Kadınların (Tedavi Almamış, Tedavi Alan Ve Tedavi Olmuş) Serum Proteinleri Değişiminin 2-D (İki Boyutlu) Elektroforez İle Tespiti” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

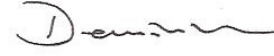
12.01.2010

JÜRİ:

Başkan : Prof.Dr. Behzat ALTURAL



Üye : Prof.Dr. İlhan DEMİRHAN



Üye : Doç.Dr. Handan YAVUZ



Üye : Yrd. Doç. Dr F. Duygu ÖZEL DEMİRALP



Üye : Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR

**ONAY :**

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 26/01/2010 tarih ve 2010/04-03. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

26 / .01/ 2010


Enstitü Müdürü
Prof.Dr. Nusret AYYILDIZ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi hususunda gerekli iş birliklerini sağlayıp, çalışmamın her aşamasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan ve yönlendiren, bu yolda ufkumu açan, desteğini gördüğüm ve her zaman yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Yrd. Doç.Dr. Nalan ÖZDEMİR' e,

Bütün laboratuvar imkânlarını sunarak yüksek lisans eğitimime çok büyük katkılar yapmış, tüm bildiği laboratuvar prensiplerini ve tekniklerini benimle paylaşmış, proteomik teknolojisine olan ilgimi desteklemiş, farklı konularda da bilgi sahibi olmamı sağlamış, enerjisi ve güler yüzü hiç bitmeyen değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP' e maddi ve manevi bütün desteği için,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım arkadaşlarım Buket GÜLTEKİN ve Çağrı GÜMÜŞTEKİN' e yardımları için,

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Proteom Bilim laboratuvarında bulunduğum süre içinde birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım; güler yüzlü, dinamik ve paylaşımcı olan diğer değerli arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan ve beni umutlandıran sevgili arkadaşım Gönül BAMBAL' a, derinliğini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, sevgili arkadaşım Ali Önder AYDIN' a,

Bu araştırmayı destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmadan bütün imkânlarını sunan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı' na,

Ayrıca eğitimim süresince maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili kardeşlerim Kürşad, Seyfettin ve Oğuzhan ALTINKAYNAK' a ve beni bu günlere usanmadan sergiledikleri sabırlı davranışları ile getiren annem Fatma ve babam Osman ALTINKAYNAK' a sonsuz bir teşekkürü borç bilerek, saygı ve sevgilerimi sunarım.

**SAĞLIKLI VE MEME KANSERİ HASTASI KADINLARIN (TEDAVİ
ALMAMIŞ, TEDAVİ ALAN VE TEDAVİ OLMUŞ) SERUM PROTEİNLERİ
DEĞİŞİMİNİN 2-D (İKİ BOYUTLU) ELEKTROFOREZ İLE TESPİTİ**

Cevahir ALTINKAYNAK
Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2010
Tez Danışmanları : Yrd. Doç.Dr. Nalan ÖZDEMİR
Yrd. Doç.Dr. F.Duygu ÖZEL DEMİRALP

ÖZET

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen hastalıktır. Mamografi ve ultrasonografi, meme kanseri taraması ve tanısında en sık kullanılan görüntüleme yöntemleridir. Meme kanseri teşhisinde özellikle ilerlemiş safhadaki lezyonların görüntülenmesinde çok geniş çaplı kullanılan mamografi erken teşhis için yetersizdir. Erken safhada teşhis edilen meme kanseri hastalarının yaşama şansları daha geç (daha ilerlemiş safhada) teşhis edilen hastalara göre daha fazladır. Bu nedenle meme kanserinin erken teşhis ve tedavisi için yeni stratejilerin benimsenmesine ve yeni biyolojik belirteçlerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Meme kanserinin teşhisi amacıyla önerilen moleküller özellikle ilerlemiş durumlar için geçerli olabilecek moleküllerdir. Ancak hastalığın ileri safhalarında dahi doğru ve güvenilir sonuç veren tek bir belirteç yoktur. Bu durumun sebepleri arasında hastalığın çok genli bir hastalık olması ve literatürde verilen çalışmalarda bir standardizasyonunun olmaması sayılabilir. Dolayısıyla meme kanseri tedavisinde var olanların dışında moleküler düzeyde yeni hedeflerin arayışı devam etmektedir.

Bu çalışmada; meme kanserinin gelişim özellikleri proteomik yöntemler kullanılarak moleküler düzeyde ve protein profillenmesi ile değerlendirilip hastalıkla ilişkili protein ve protein değişikliklerinin saptanması amaçlanmıştır. Ailesinde meme kanseri olan hastaların meme kanserine yatkınlıkları daha önceki çalışmalarda kanıtlandığı için bu çalışmada özellikle sporadik olarak kanser geliştiren bireyler değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmada kontrol, tedavi almamış, tedavi alan ve tedavi olmuş olmak üzere dört grup değerlendirilmeye alınmıştır. Protein düzeyindeki değişikliklerin kapsamlı bir şekilde geniş veri tabanları kullanılarak araştırılmasının, yeni proteinlerin ve yeni biyolojik belirteçlerin (işaretlerin) bulunmasına aracılık edeceği düşünülmektedir. Bunun için öncelikle serumda oldukça yüksek konsantrasyonda bulunan bol (abundant) proteinlerin bir kısmı filtrelenmiş ve daha sonra toplam protein miktarı $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak

hesaplanmıştır. İki boyutlu elektroforez sonrası Maldi-Tof kütle spektrometresi ile proteinlerin tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında abundant proteinler azaltılmadan da araştırma planlanmış farklanmalar tespit edilmiştir.

Yapılan subtraktif analizler sonrası tedavi almamış grupta kontrol grubuna göre albümin, haptoglobin, apolipoprotein A-I, Complement C-4 beta, IgG hafif ve ağır zincir abundant proteinlerinin serum ekspresyon düzeyleri fazla bulunmuştur. Yine abundant proteinler incelendiğinde kontrol, tedavi alan ve tedavi olmuş gruplarda ekspresyonlarının birbirlerine yakın olduğu bu çalışmada tespit edilmiştir. Haptoglobin proteini tedavi almamış grupta evre I' de bulunan hasta serumuna göre evre II' de bulunan hasta serumunda ekspresyonu fazla bulunmuştur. Tedavi alan grupta yapılan değerlendirmeler sonucu 15 Da civarında yer alan Haptoglobin serileri de evre I' de bulunan hasta serumuna göre evre IIB' de bulunan hasta serumunda daha yoğun bulunmuştur.

Çalışma sonucu belirtilen protein profil farklılıklarının meme kanserinin oluşum süreci ile ilişkili moleküler değişikliklerin anlaşılmasında, hastalığın oluşum sürecine etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde, yeni hedef moleküllerin bulunmasına ve çoklu biyobelirteç geliştirilmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Proteomiks, Serum, Depletion, İki Boyutlu Jel Elektroforezi.

**DETECTION WITH TWO DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS THE
CHANGE OF SERUM PROTEINS IN BREAST CANCER PATIENTS (THE
UNTREATED GROUP, THE TREATED GROUP AND THE CURED GROUP)
AND HEALTHY WOMEN**

Cevahir ALTINKAYNAK

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M.Sc. Thesis, January 2010

Thesis Supervisors: Assistant Prof.Dr. Nalan ÖZDEMİR

Assistant Prof.Dr. F.Duygu ÖZEL DEMİRALP

ABSTRACT

The breast cancer is the most common diseases in women. Mamography and ultrasonography are often used way in scanning and diagnosis of breast cancer. At breast cancer diagnosis, mamography is often used to determine spread lesions but it is not sufficient to recognize earlier stage. Early diagnosed breast cancer patients have a big chance to survive in comparison with patients diagnosed at later stages of the cancer. So there is needed to find new strategies and to introduce biomarker for earlier diagnosis and treatment of breast cancer. The molecules, are suggested the aim of breast cancer diagnosis, are for patients in spreaded stage of the cancer. But there isn't a right and reliable marker to give a result for spread stage of the illness. The reasons of this situation are may be multiple genes of the illness and no standardization of studies given at literature. At the treatment of breast cancer, the search of new targets, except known methods, is going on at molecular stage.

In this study, it was aimed to determination of the development of breast cancer characteristics using proteomics method in molecular level and whether to be assessed by proteomic profile in the changes of protein and disease related protein. The breast cancer patients with family history are more susceptible to this cancer was proved before, and so in this study, the people who become especially cancer as sporadic will be evaluated. In this study; we were performed to investigate differential serum proteins of the control group, the untreated group, the treated group and cured group. It is thought that the determination of protein changes extensively by using large data base will help to proteom profiling of new proteins and to find new (biological signs) biomarkers. Firstly, twenty abundant proteins that are highly expressed in serum will filtered and then total protein quantity will be calculated as $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. After two dimensions gel electrophoresis, the identification of proteins will be evaluated by

MALDI-TOF mass spectrometry. In this study was also planned besides without reduction of abundant proteins and was detected of differences.

After the subtractive analyses, it was found the expression levels in serum of abundant proteins albumin, haptoglobin, apolipoprotein A-I, Complement C-4 betha, light and heavy chain of IgG were high in the did not received treatment group than control group. Abundant proteins were examined again, it was also detected the expression levels as close to each other in the control, received treatment, was treated groups in this study. Haptoglobin protein was found more according to stage II than stage I in did not received treatment. As a result of the assessments in treated group, the series of haptoglobin located in vicinity 15 Da were also found more intense in stage IIB than stage I.

Study results indicated differences in protein profiles are thought to contribute in understanding the molecular changes in breast cancer associated with the formation process, the development of treatment approaches effective in the formation process of the disease, the availability of new target molecules and the development of multiple biomarker.

Keywords: Breast Cancer, Proteomics, Serum, Depletion, Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
1. BÖLÜM	
GİRİŞ.....	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Proteinlerin Yapısı.....	6
2.1.1. Primer Yapı.....	9
2.1.2. Sekonder Yapı.....	10
2.1.3. Tersiyer Yapı.....	12
2.1.4. Kuartern Yapı.....	14
2.2. Kanser.....	14
2.3. Proteomiks Teknolojisi.....	16
2.4. Meme Kanseri ve Meme Kanserine Proteomik Yaklaşımlar.....	27
2.4.1. Serum Proteinleri.....	39
2.4.2. Serumun Lipid ve Lipoproteinlerden arındırılması.....	42
2.4.3. Serumda bol bulunan (abundant) proteinlerin azaltılması.....	42
2.5. İki Boyutlu Elektforez.....	44
2.5.1. İzoelektrik Odaklama.....	44
2.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektforezi.....	48
3. BÖLÜM	
MATERYALLER VE YÖNTEMLER.....	49
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	49
3.2. Deneylerde Kullanılan Araç ve Cihazlar.....	49
3.3. Deneylerde Kullanılan Yöntemler.....	50
3.3.1. Örneklerin Elde Edilmesi.....	50
3.3.2. Serumun Lipidlerden Arındırılması.....	51

3.3.3. Serumdaki Abundant Proteinlerin Azaltılması.....	51
3.3.4. Bradford Protein Miktar Tayini.....	55
3.3.4.1. SmartSpec 3000 Spektrofotometresi ile Bradford Protein Miktar Tayini.....	55
3.3.4.2. ELISA Spektramax-M2 ile Bradford Protein Miktar Tayini.....	56
3.3.5. Rehidratasyon.....	57
3.3.6. İzoelektrik Odaklama.....	58
3.3.7. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi.....	59
3.3.8. Boyama ve Görüntüleme.....	61
3.3.9. Jellerin Değerlendirilmesi.....	61
3.3.10. Spot Kesimi	62
3.3.11. Tripsin Enzimi ile Muamele.....	62
3.3.12. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu ile Protein Analizi.....	64
3.3.13. Proteinlerin Tanımlanması.....	68
4. BÖLÜM	
BULGULAR.....	69
4.1. Grup İçinde Yapılan Değerlendirmeler.....	70
4.1.1. Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması.....	70
4.1.2. Tedavi Almamış Grupların Karşılaştırılması.....	71
4.1.3. Tedavi Alan Grupların Karşılaştırılması.....	71
4.1.4. Tedavi Olmuş Grupların Karşılaştırılması.....	72
4.2. Gruplar Arasında Yapılan Değerlendirmeler.....	73
4.2.1. Abundant Proteinler Azaltılmadan Elde Edilen Grupların Karşılaştırılması.....	73
4.2.2. Kolon 1 Kullanımı Sonucu Elde Edilen Grupların Karşılaştırılması.....	95
4.2.3. Kolon 2 Kullanımı Sonucu Elde Edilen Grupların Karşılaştırılması.....	102
4.3. Setler Arasından Yapılan Değerlendirmeler.....	109
4.4. Proteinlerin Tanımlanması.....	111
4.4.1. MALDI-TOF Kütle Spektrometresinin Kalibrasyonunun Yapılması.....	111
4.4.2. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Tanımlanan Proteinlerin Spektrumları.....	112
5. BÖLÜM	
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	122
KAYNAKLAR.....	125
EKLER.....	133
ÖZGEÇMİŞ.....	135

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2D	: İki boyutlu
2-DE	: İki boyutlu jel elektroforezi
3D	: Üç boyutlu
ACN	: Asetonitril
ACTH	: Adrenokortikotropin hormon
BBF	: Bromofenol mavisi
BSA	: Bovin serum albumin
CHAPS	: 3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonyum]-1-propansülfonat
DTT	: Diklorodifeniltrikloroetan
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
HCl	: Hidroklorik asit
IEF	: İzoelektrik fokuslama
LM	: Luck Mass
MALDI	: Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionlaşma
M_A	: Moleküler ağırlığı
MS	: Kütle spektrometresi
NH₄HCO₃	: Amonyum bikarbonat
pI	: İzoelektrik noktası
PTM	: Post-translasyonel modifikasyon
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TFA	: Trifloroasetik asit
TOF	: Doğrusal-uçuş-zamanı
UV	: Ultraviyole
SSP	: Örnek spot proteini (Sample Spot Protein)
H	: Hidrojen
O	: Oksijen
aa	: Aminoasit
APS	: Amonyum Per Sülfat
PZR	: Poli Zincir Reaksiyon
DNA	: Deoksiribonükleik asit

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. :	Hastaların prognostik özellikleri.....	3
Tablo 2.1. :	Bening ve Malign tümörlerin bazı özellikleri.....	15
Tablo 2.2. :	Post Translasyonel Modifikasyonlar.....	18
Tablo 2.3. :	UV lazerli MALDI’ de başlıca kullanılan matriksler.....	23
Tablo 2.4. :	Farklı tipteki MALDI MS’ lerin karşılaştırılması.....	25
Tablo 2.5. :	2D-Elektroforetik haritaların veri tabanları.....	25
Tablo 2.6. :(a)	Meme kanserinde klinik TNM evrelemesi.....	28
(b)	TNM evre grupları.....	29
Tablo 2.7. :	Kolon 1’ in duyarlı olduğu 20 tane abundant protein.....	43
Tablo 2.8. :	Proteinler için PAGE sisteminde uygulama sınırları.....	49
Tablo 3.1.:	SmartSpec 3000 spektrofotometresi ile Bradford protein miktar tayini değerleri.....	56
Tablo 3.2. :	ELISA spektramax-M2 (kuyucuklu plaka) ile Bradford protein miktar tayini değerleri.....	57
Tablo 4.1. :	I. SET PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları.....	76
Tablo 4.2. :	I. SET Analizi.....	78
Tablo 4.3. :	I.SET Kontrol, Tedavi Almamış, Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları.....	77
Tablo 4.4. :	II. SET PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları.....	84
Tablo 4.5. :	II. SET Analizi.....	84
Tablo 4.6. :	II.SET Kontrol, Tedavi Almamış Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları.....	85
Tablo 4.7. :	III. SET PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları.....	91
Tablo 4.8. :	III. SET Analizi.....	92
Tablo 4.9. :	III. SET Kontrol, Tedavi Almamış Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları.....	92
Tablo 4.10. :	IV. SET PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları.....	98
Tablo 4.11. :	IV. SET Analizi.....	98
Tablo 4.12.:	IV. SET Kontrol, Tedavi Almamış Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları.....	99
Tablo 4.13. :	V. SET PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları.....	105
Tablo 4.14. :	V. SET Analizi.....	105

Tablo 4.15. : V.SET Kontrol, Tedavi Almamış Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları.....	106
Tablo 4.16. : PDQuest jel spot analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	109
Tablo 4.17. : PDQuest jel kantitatif analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	110
Tablo 4.18. : Albümin proteini için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri.....	113
Tablo 4.19. : Haptoglobin proteini için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri....	115
Tablo 4.20.: Immunoglobulin proteini için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri.....	117
Tablo 4.21.: Apolipoprotein A-I proteini için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri.....	119
Tablo 4.22.: Komplement C4- β proteini için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri.....	121
Tablo 4.23.: Sağlıklı ve meme kanserli kadınlarda Maldi-Tof kütle spektrometresi ile ortak olarak tespit edilen ilişkili proteinlerin pI ve Mr değerlerinin karşılaştırılması.....	121

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.: Aminoasitlerin genel yapısı.....	6
Şekil 2.2.: L-formundaki Alanin amino asiti.....	7
Şekil 2.3.: R grubu iyonlaşmayan bir amino asit için iyonlaşma dengeleri.....	7
Şekil 2.4.: Peptid bağı oluşumu.....	8
Şekil 2.5.: Peptid bağının üç boyutlu görüntüsü.....	8
Şekil 2.6.: Bir peptit biriminin N-terminal ve C-terminal uçları.....	9
Şekil 2.7.: Ribonükleaz A enziminin primer yapısı.....	9
Şekil 2.8.: α -heliks yapısı.....	10
Şekil 2.9.: İpek iplikçığı modeli.....	11
Şekil 2.10.: β -tabakalı yapı.....	11
Şekil 2.11.: İki aminoasit arasında iyonik bağı oluşumu.....	12
Şekil 2.12.: İki aminoasit arasındaki hidrojen bağı oluşumu.....	12
Şekil 2.13.: Van der Waals bağı oluşumu.....	13
Şekil 2.14.: Disülfid bağı oluşumu.....	13
Şekil 2.15.: Hemoglobin yapısı.....	14
Şekil 2.16.: Normal bir hücrenin kanserli hücreye dönüşmesi.....	16
Şekil 2.17.: Protein ürünlerinin oluşması için genomik bilgi akışı.....	18
Şekil 2.18.: (a) 2-DE sonrası kütle spektrometresi ile proteinlerin tanımlanması.....	20
(b) MS analizli proteomik çalışmalarının genel özeti.....	21
Şekil 2.19.: MALDI lazer ışınının katı matriksi uyarması ve iyonize etmesi.....	22
Şekil 2.20.:ESI' ın solüsyondaki peptidleri ve proteinleri iyonize etmesi ve buharlaştırması.....	23
Şekil 2.21.: a) Time-of-flight kütle analizörlü MALDI.....	24
b) TOF ve TOF reflektörlü MALDI.....	24
Şekil 2.22.: Dedektöre çarpan farklı kütlelerdeki iyonlar.....	24
Şekil 2.23.: ExPASy Proteomik tarayıcı internet ana sayfası görünümü.....	26
Şekil 2.24.: Veri tabanında Haptoglobin proteini için peptid dizileri, kütleleri, pI ve Ma değerleri.....	26
Şekil 2.25.:Meme kanserinde tümör büyümesi ile birlikte semptomların teşhisinin zamanla değişim grafiği.....	28
Şekil 2.26.: Kan plazma proteinlerinin 2-DE jel haritası.....	36
Şekil 2.27.: IEF pH odaklama haznesi.....	37

Şekil 2.28.: Kan plazması içeriği ve yüzdeleri.....	39
Şekil 2.29.: Kolon içerisinde gerçekleşen antijen/antikor ilişkisi.....	43
Şekil 2.30.: Proteinlerin izoelektrik noktalarına göre pH gradientinde sürüklenmesi....	45
Şekil 2.31.: (a) Aktif rehidratasyonda ve izoelektrik odaklamada kullanılan anot/katot telli tabla.....	45
(b) Pasif rehidratasyonda kullanılan telsiz tabla.....	46
Şekil 2.32.: Disülfid bağlarının kırılması.....	47
Şekil 2.33.: Akrilamid ve N, N'-MetilenBis-Akrilamid' in polimerleşmesi.....	48
Şekil 3.1.: Rehidratasyon tamponunun tabla kanalı boyunca uygulanması.....	57
Şekil 3.2.: Tablanın kanallarına wicks kağıdının uygulanması.....	58
Şekil 3.3.: Jel dökme aparatı.....	59
Şekil 3.4.: (a) Toplama jeli üzerine agar ilavesi.....	60
(b)Şeritlerin toplama jeline kadar itilerek sabitlenmesi.....	60
Şekil 3.5. MALDI kütle spektrometresi hazırlık şeması.....	64
Şekil 4.1.: Kan serumlarının standardizasyon çalışmaları sırasında elde edilen ilk 2-DE görüntüleri.....	70
Şekil 4.2.: Kontrol grubu jellerinde abundant proteinler ve grup içi standardizasyonu.	70
Şekil 4.3.: Tedavi almamış grubu jellerinde abundant proteinler ve grup içi standardizasyonu	71
Şekil 4.4.: Tedavi alan grubu jellerinde abundant proteinler ve grup içi standardizasyonu	72
Şekil 4.5.: Tedavi olmuş grubu jellerinde abundant proteinler ve grup içi standardizasyonu	73
Şekil 4.6.: I. SET deney gruplarının protein profilleri üzerinde bulunan spotlar.....	73
Şekil 4.7.: I. SET Kontrol grubu jelinin 3D örnekleri.....	74
Şekil 4.8.: I.SET Tedavi Almamış grubu jelinin 3D örnekleri.....	75
Şekil 4.9.: I.SET Tedavi Alan grubu jelinin 3D örnekleri.....	75
Şekil 4.10.: I.SET Tedavi Olmuş grubu jelinin 3D örnekleri.....	76
Şekil 4.11.: I.SET Kontrol-Tedavi Almamış gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri.....	78
Şekil 4.12.: I.SET Kontrol-Tedavi Alan gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	78

Şekil 4.13.: I.SET Kontrol-Tedavi Olmuş gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	79
Şekil 4.14.: I.SET spot dağılım grafikleri.....	79
Şekil 4.15.: I. SET tüm gruplarında ortak olarak yer alan spotlar.....	80
Şekil 4.16.: II. SET deney gruplarının protein profilleri üzerinde bulunan spotlar.....	81
Şekil 4.17.: II. SET Kontrol grubu jelinin 3D örnekleri.....	82
Şekil 4.18.: II. SET Tedavi Almamış jelinin 3D örnekleri.....	82
Şekil 4.19.: II. SET Tedavi Alan jelinin 3D örnekleri.....	83
Şekil 4.20.: II. SET Tedavi Olmuş jelinin 3D örnekleri.....	83
Şekil 4.21.: II. SET Kontrol-Tedavi Almamış gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	85
Şekil 4.22.: II. SET Kontrol-Tedavi Alan gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	86
Şekil 4.23.: II. SET Kontrol-Tedavi Olmuş gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	86
Şekil 4.24.: II. SET spot dağılım grafikleri.....	87
Şekil 4.25.: II. SET tüm gruplarında ortak olarak yer alan spotlar.....	88
Şekil 4.26.: III. SET deney gruplarının protein profilleri üzerinde bulunan spotlar.....	89
Şekil 4.27.: III. SET Kontrol grubu jelinin 3D örnekleri.....	89
Şekil 4.28.: III. SET Tedavi Almamış jelinin 3D örnekleri.....	90
Şekil 4.29.: III. SET Tedavi Alan jelinin 3D örnekleri.....	90
Şekil 4.30.: III. SET Tedavi Olmuş jelinin 3D örnekleri.....	91
Şekil 4.31.: III. SET Kontrol-Tedavi Almamış gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	93
Şekil 4.32.: III. SET Kontrol-Tedavi Alan gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	93
Şekil 4.33.: III. SET Kontrol-Tedavi Olmuş gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	94
Şekil 4.34.: III. SET tüm gruplarında ortak olarak yer alan spotlar.....	94
Şekil 4.35.: III. SET spot dağılım grafikleri.....	95
Şekil 4.36.: IV. SET deney gruplarının protein profilleri üzerinde bulunan spotlar.....	95
Şekil 4.37.: IV. SET Kontrol grubu jelinin 3D örnekleri.....	96
Şekil 4.38.: IV. SET Tedavi Almamış jelinin 3D örnekleri.....	96

Şekil 4.39.: IV. SET Tedavi Alan grubu jelinin 3D örnekleri.....	97
Şekil 4.40.: IV. SET Tedavi Olmuş grubu jelinin 3D örnekleri.....	97
Şekil 4.41.: IV. SET Kontrol-Tedavi Almamış gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	99
Şekil 4.42.: IV. SET Kontrol-Tedavi Alan gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	100
Şekil 4.43.: IV. SET Kontrol-Tedavi Olmuş gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	100
Şekil 4.44.: IV. SET tüm gruplarında ortak olarak yer alan spotlar.....	101
Şekil 4.45.: IV. SET spot dağılım grafikleri.....	102
Şekil 4.46.: V. SET deney gruplarının protein profilleri üzerinde bulunan spotlar.....	102
Şekil 4.47.: V.SET Kontrol grubu jelinin 3D örnekleri.....	103
Şekil 4.48.: V.SET Tedavi Almamış jelinin 3D örnekleri.....	103
Şekil 4.49.: V.SET Tedavi Alan jelinin 3D örnekleri.....	104
Şekil 4.50.: V.SET Tedavi Olmuş jelinin 3D örnekleri.....	104
Şekil 4.51.: V.SET Kontrol-Tedavi Almamış gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	106
Şekil 4.52.: V.SET Kontrol-Tedavi Alan gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	107
Şekil 4.53.: V.SET Kontrol-Tedavi Olmuş gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların histogram grafikleri	107
Şekil 4.54.: V.SET tüm gruplarında ortak olarak yer alan spotlar.....	108
Şekil 4.55.: V.SET spot dağılım grafikleri.....	108
Şekil 4.56.: I., II. ve III. setlerin ortalama ve standart hata çizgilerini içeren histogram grafiği.....	109
Şekil 4.57.: Maldı kalibrasyon spektrumu.....	111
Şekil 4.58.: Albümin proteini için elde edilmiş kütle spektrumu.....	112
Şekil 4.59.: Haptoglobulin proteini için elde edilmiş kütle spektrumu.....	114
Şekil 4.60.: Immunoglobulin proteini için elde edilmiş kütle spektrumu.....	116
Şekil 4.61.: Apolipoprotein A-I proteini için elde edilmiş kütle spektrumu.....	118
Şekil 4.62.: Komplement C4- β zincir proteini için elde edilmiş kütle spektrumu.....	120

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Tüm yaşamları boyunca; her 2 kadından biri herhangi bir meme hastalığı için doktora başvurmakta; her 4 kadından birine meme biyopsisi yapılmakta ve her 9 kadından biri meme kanserine yakalanmaktadır. Çeşitli ülkelerde görülme insidansları arasında 4–5 kat farklılık izlense de dünya genelinde kadınlarda en sık teşhis edilen ve ölüm oranı en fazla olan kanser türlerinden biridir. Mamografi ve ultrasonografi, meme kanseri taraması ve tanısında en sık kullanılan görüntüleme yöntemleridir. Buna karşın her iki yöntemde de benign ve malign lezyonlar benzer görünümde olabilmekte ve bu da gereksiz ve fazla sayıda negatif biyopsi alınmasına sebep olmaktadır. Meme kanseri teşhisinde özellikle ilerlemiş safhadaki lezyonların görüntülenmesinde çok geniş çaplı kullanılan mamografi erken teşhis için yetersiz kalmaktadır. Aynı zamanda tecrübe gerektiren mamogramları okuma ve değerlendirme işlemini hastalığın tümör oluştuktan sonra en kısa zamanda teşhisi için daha büyük hastanelerde deneyimli doktorların yapması gerekmektedir. Bu da her zaman mümkün olamamaktadır. Hastalık teşhisi konduktan sonra ilerlemiş safhadaki hastaların büyük bir çoğunluğunun tedavisi ise cerrahi rezeksiyon ve kemoterapi, hormonoterapi ve radyoterapi kombinasyonu ile yapılmaktadır ki bunlar oldukça pahalı ve hastalar için zahmetli tedavilerdir.

Meme kanseri poligenik bir hastalıktır. Meme kanserinin başlaması, ilerlemesi veya şiddeti ile ilişkili olabilecek 62 veya daha fazla gen olmasına rağmen, bunların büyük bir çoğunluğu tarafından oynanan spesifik roller henüz protein seviyesinde aydınlatılamamıştır. Meme kanseri ile ilgili olarak gen ve transkripsiyon düzeyindeki çalışmalar oldukça yoğun olmakla birlikte protein düzeyinde kapsamlı çalışmalar yetersizdir. Bu çalışmada, kontrol grubu (sağlıklı) ve meme kanserli (tedavi almamış, tedavi alan ve tedavi olmuş) olguların farklı tedavi aşamalarında serum proteinlerinin karşılaştırmalı proteom analizinin yapılması amaçlanmış ve bu karşılaştırma sonucu

meme kanserinin gelişim özelliklerinin protein düzeyinde araştırılması ile hastalıkla ilişkili protein ve protein değişikliklerinin saptanması amaçlanmıştır. Protein düzeyindeki değişikliklerin kapsamlı bir şekilde geniş veri tabanları kullanılarak araştırılmasının, yeni proteinlerin ve yeni biyolojik belirteçlerin (işaretlerin) bulunmasına aracılık edeceği düşünülmektedir. Kontrol ve hastalık grupları ile yapılan subtraktif proteom analizleri biyomedikal alanda çok büyük önem taşımaktadır.

Çalışmada; hastalıkla ilişkili protein ve protein değişikliklerinin saptanmasıyla ailesinde meme kanseri geçmişi bulunmayan sporadik olarak gelişen meme kanserinde erken teşhiste kullanılabilecek biyobelirteç araştırılması için ön çalışma niteliğinde bilinen abundant(bol) protein değişkenliği değerlendirilmiştir. Hastalık spesifik proteinlerin tespiti yapılarak öncelikle teşhis amacıyla, ileri aşamalarda ise yeni ilaç ve tedavilerin geliştirilmesinde farklı protein kimliklerinden faydalanılabileceği düşünülmektedir. Bu sayede; farmakoproteomik olarak kişiye özel tedavi geliştirilebilecektir.

Çalışmaya dâhil edilen sağlıklı grup; son 5 yıl içerisindeki mamogramları negatif olan ve düzenli bir ilaç kullanmayan bayanlardan oluşmaktadır. Meme kanserli grup ise tedavi almamış, tedavi alan ve tedavi olmuş olmak üzere üç ana kısma ayrılmaktadır. Bu sayede; tedavinin farklı aşamalarında protein profil farklılıkları daha doğru izlenebilecek ve daha doğru değerlendirilebilecektir. Tedavi almamış grup mamogram sonucu pozitif olan ve kemoterapi/radyoterapiye maruz kalmamış bayanlardır. Tedavi alan grup kemoterapisi bitmiş radyoterapiye devam eden hastalardır. Tedavi olmuş grup ise son 2 yıldır herhangi bir hastalık belirtisi olmayan rutin kontrollerine gelen bayanlardır. Toplamda çalışılmış grup sayısı ve bayanların prognostik özellikleri Tablo 1.1' de verilmiştir.

Çalışmaya dâhil edilen bireyler ailede meme kanseri öyküsü olup olmadığı, sürekli kullanılan bir ilacın olup olmadığı ve yaş aralıkları dikkate alınarak gruplandırılmıştır. Ailesinde meme kanseri olan hastaların meme kanserine yatkınlıkları daha önceki çalışmalarda kanıtlandığı için bu çalışmada özellikle sporadik olarak kanser gelişen bireyler değerlendirmeye alınmıştır. Tedavi alan grubun incelenmesi kanser tedavisinde alınan hormonoterapinin, kemoterapinin ve radyoterapinin hastalığın gerilemesinde veya durdurulmasında ki etkisinin ne ölçüde protein değişikliklerine neden olduğunun gösterilmesini sağlayacaktır.

Tablo 1.1. Hastaların prognostik özellikleri

HASTA DEĞERLENDİRME FORMU									
KODU	GRUBU	EVRE	TNF	YAŞ	BOY	KİLO	TEDAVİ TÜRÜ	SPORADİK	
SET 1	1A	KONTROL	-	-	54	1,65	65	-	-
	1B	TED ALMAMIŞ	EVRE I	T ₁ N ₀ M ₀	42	1,60	79	-	√
	1C	TED ALAN	EVRE I	T ₁ N ₀ M ₀	38	1,52	53	KT+RT	√
	1D	TED OLMUŞ	EVRE IIA	T ₂ N ₀ M ₀	46	1,55	75	KT+RT	√
SET 2	2A	KONTROL	-	-	26	1,65	56	-	-
	2B	TED ALMAMIŞ	EVRE I	T ₁ N ₀ M ₀	52	1,58	89	-	√
	2C	TED ALAN	EVRE I	T ₁ N ₀ M ₀	28	1,55	60	KT+RT	√
	2D	TED OLMUŞ	EVRE IIA	T ₂ N ₀ M ₀	42	1,60	82	KT+RT	√
SET 3	3A	KONTROL	-	-	46	1,65	80	-	-
	3B	TED ALMAMIŞ	EVRE IIA	T ₂ N ₀ M ₀	26	1,55	55	-	√
	3C	TED ALAN	EVRE IIB	T _{1b} N ₀ M ₀	52	1,60	75	KT+RT	√
	3D	TED OLMUŞ	EVRE IIA	T ₃ N ₀ M ₀	51	1,58	49	KT+RT	√
SET 4: KİT 1 KULLANILDIKTAN SONRA									
4A-SD	KONTROL	-	-	54	1,65	65	-	-	-
4B-SD	TED ALMAMIŞ	EVRE IIA	T ₂ N ₀ M ₀	26	1,55	55	-	-	√
4C-SD	TED ALAN	EVRE IIB	T _{1b} N ₀ M ₀	52	1,60	75	KT+RT	-	√
4D-SD	TED OLMUŞ	EVRE IIA	T ₃ N ₀ M ₀	51	1,58	49	KT+RT	-	√
SET 5: KİT 2 KULLANILDIKTAN SONRA									
5A-AD	KONTROL	-	-	54	1,65	65	-	-	-
5B-AD	TED ALMAMIŞ	EVRE IIA	T ₂ N ₀ M ₀	26	1,55	55	-	-	√
5C-AD	TED ALAN	EVRE IIB	T _{1b} N ₀ M ₀	52	1,60	75	KT+RT	-	√
5D-AD	TED OLMUŞ	EVRE IIA	T ₃ N ₀ M ₀	51	1,58	49	KT+RT	-	√

Tedavi olmuş grubun çalışma programına alınması ise kanser tedavisi bittikten sonra uygulanan tedavinin etkilerinin ne kadar süre vücudun olağan protein yoğunluğunu farklı kılıp kılmadığını araştırmaktır. Aynı zamanda kanser geçmişi olan bireyle olmayan sağlıklı bireyin protein yoğunluklarının veya farklarının araştırılması da rutin kontroller için önem teşkil etmektedir. Araştırma için kan alınmış bireyler Kayseri ilinde ikamet eden, mümkün olduğunca aynı yaşam biçimini benimsemiş bayanlar ve en önemlisi daimi bir ilaç kullanımı olmayan (tedavi alan grup hariç) bayanlardır.

Meme kanserinin teşhis ve tedavisi ile ilgili her geçen gün yeni yöntemler ve teknikler geliştirilmektedir, ancak hala çok fazla sayıda meme kanseri teşhisinde geç kalınmaktadır. Bunun sebebi büyük oranda bu hastalığın spesifik belirteçlerinin yetersizliğinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle daha iyi bir biyobelirteç ve tedavi şekli bulmak için proteomik yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda gerek transkripsiyon gerekse protein düzeyinde tüm moleküllerin taranabilmesine olanak sağlayan yöntemlerin uygulanabilirliğinin artması, önemi yeterince bilinmeyen yeni moleküllerin bulunması sürecini kolaylaştırmakta ve hız kazandırmaktadır. Bu bağlamda; meme kanserinin erken teşhisinde kullanılabilirliği araştırılan biyobelirteçler ve konuyla ilgili pek çok çalışma yayınlanmasına rağmen, çok az bir kısmı yeterli seviyede güvenilir sonuçlara izin vermektedir. Şimdiye kadar rapor edilen belirteçlerin büyük bir kısmının metastazik hastalığın veya hastalığın ilerlemesi ve/veya tekrarlaması bakımından bütün hasta grupları arasında büyük risk altında olan hastaların saptanması amacıyla kullanılması tavsiye edilmektedir. Ancak; bu amaçla kullanımı için dahi yeterli tahmin gücü olan tek bir biyobelirteç şimdiye kadar rapor edilmemiştir. Hastalığın heterojenitesi göz önüne alındığında meme kanserinin önceden tahmini ve hastalığın yönetimi, çoklu belirteçlerin kullanımının geliştirilmesi ile olacaktır ki bu anlamda literatürde ciddi bir boşluk vardır. Bu nedenle kullanışlı patojenik belirteçlerin tanımlanmasına büyük bir ihtiyaç ve ilgi vardır. Yeni belirteçlerin bulunması hem hastalığın daha erken safhada teşhisinde hem de tedavisinin tayininde yardımcı olacaktır.

Çalışma; serum örneklerinin abundant proteinlerinden filtrelenerek ekspresyonu az olan proteinlerin görünür hale getirilmesi ve iki boyutlu elektroforez sonrası MALDI-TOF kütle spektrometresi ile proteinlerin tanımlanması açısından özgündür. Son yıllarda gerek transkripsiyon gerekse protein düzeyinde tüm moleküllerin taranabilmesine olanak sağlayan yöntemlerin uygulanabilirliğinin artması, önemi yeterince bilinmeyen yeni moleküllerin bulunması sürecini kolaylaştırmakta ve hız kazandırmaktadır. Bu nedenle; sağlıklı (kontrol) ve meme kanserli (tedavi almamış, tedavi alan ve tedavi olmuş) hastaların proteom analizi verileri; klinik kanser araştırmaları için gerçekleştirilecek çalışmalar ve farmakoproteomik olarak geliştirilecek tedaviler açısından da kapsamlı bir referans niteliği taşıyacaktır.

Günümüzde meme kanserinde hastalığın sistemik kontrolünü sağlamak amacıyla kemoterapi, lokal kontrolünü artırmak amacıyla radyoterapi kullanılmaktadır. Tedavi kombinasyonlarına tümörün evresi, lenf nodu tutulumu, östrojen ve progesteron gibi hormon reseptörü durumu, yaş, uzak metastaz olup olmaması gibi prognostik özellikler göz önüne alınarak karar verilir. Bu tedaviler yüksek maliyetli ve toksik uygulamalar olduğundan dolayı farmakoproteomik çalışmaların tedavi yönetiminde kullanılmak üzere geliştirilmesi nitelik kazanmaktadır. Ayrıca cerrahi operasyonlar sonrası (özellikle mastektomi) hastalarda psikolojik çöküntülere sebep olmaktadır. Bu noktada hastalığın erken teşhisi hastalığın tedavi sürecinde önemli bir parametredir. Ayrıca erken safhada teşhis edilen meme kanseri hastalarının hayatta kalma süreleri daha geç teşhis edilen hastalara göre daha fazladır. Bu nedenle çalışma sonucu üretilmiş bilgiler ışığında biyobelirteç olarak kullanılabilirliği araştırılması amaçlanan yeni hedef protein, proteinler veya protein gruplarının tespitinin gerekliliği ortaya koyulmaya çalışılmıştır.

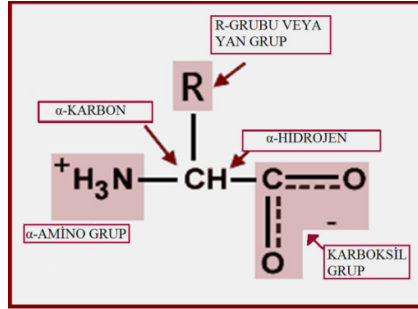
Çoklu belirteçler serumda kanser teşhisi ve tedavisinde pek çok aşamada faydalı olabilir. Örneğin; kanser olmayan bireyler için, belirteç hastalığın oluşma riskinin tayininde ve/veya hastalığın izlenmesinde faydalı olabilir. Bir anormallik tespit edildiğinde ise belirteç benign ve malign prosesler arasındaki veya malign prosesler arasındaki farklılığı ayırt etmeye yardımcı olacaktır. Kanser oluşumunun tespitinden sonra ise, tümör belirteç tedavi sırasında ve sonrasında hastalığın takibinde yardımcı olacaktır, belirteçler aynı zamanda tedaviden bağımsız olarak prognoz tayini ve tedaviye verilen cevabın tayininde yardımcı olacaktır.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Proteinlerin Yapısı

Tüm proteinler ve peptidler aminoasitlerin polimerleridirler. Tüm proteinlerde kimyasal yapıyı oluşturan en küçük birimler α -amino asitlerdir. Peptid ve proteinlerin yapısına giren α -aminoasitler fonksiyonel grup olarak aynı “C” a (α -Karbonu) bağlı bir -COOH ve -NH₂ grubu taşırlar (Şekil 2.1). Fizyolojik pH’ da (yaklaşık pH=7,4) karboksil grubu dissosiyasyon olarak negatif yüklü (-COO⁻) iyonunu oluşturur ve amino grubu protonlanır (-NH₃⁺) [1] .

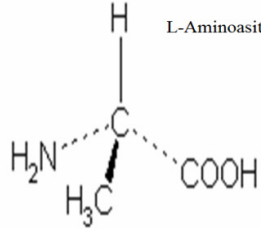


Şekil 2.1. Aminoasitlerin genel yapısı

Memeli proteinlerinin yapısına giren 20 aminoasit vardır (Ek 1). Aminoasitler yapılarında bulunan -R grubu veya bağlı diğer yan gruplar sayesinde;

- ⌘ Değişik yapılara,
- ⌘ Farklı elektrik yüküne ve
- ⌘ Suda değişik oranlarda çözünürlüklere, sahip olurlar.

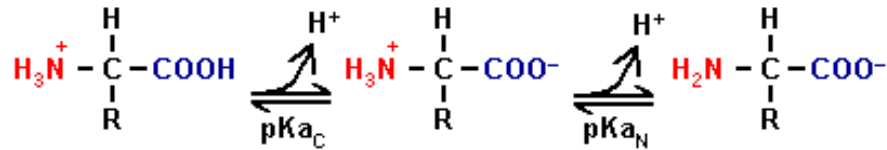
Birbirinden, aminoasitlerin sudaki çözünürlüğünü etkileyen elektrik yükü, büyüklük ve yapısal yönden farklı olan yan zincirleri veya R gruplarıyla ayrılır [2]. Protein yapısına giren tüm aminoasitler L-formundadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. L-formundaki Alanin amino asiti

Organizmada sentezlenmeyen, diyetle alınmak zorunda olan aminoasitler de vardır, bunlara *Esansiyel Aminoasitler* denir. Memeliler aminoasitlerin yarısını diyetle almak zorundadırlar. Bunlar; arginin, histidin, izolösin, lösin, lisin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valin' dir.

Aminoasitler hem asit hemde baz gibi davranabilirler. Tek bir $-NH_2$ ve tek bir $-COOH$ grubu içeren aminoasitler fizyolojik pH (~ 7.4)'da, karboksil grupları deprotone, amino grupları ise protone halde bulunur (dipolar iyon) [2]. Aminoasitlerin bu dipolar iyon şekillerine “zwitterion” denir. Bu çift yönlü yapıya sahip maddeler amfoterik özelliktedir (Şekil 2.3).

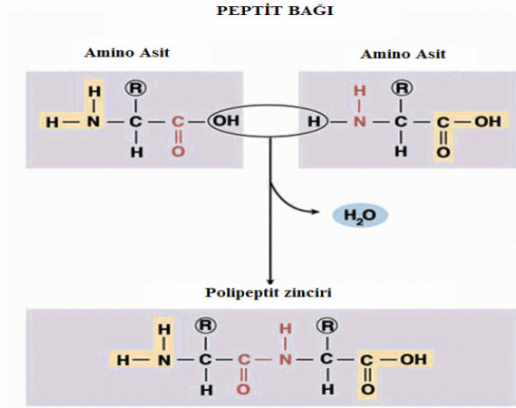


Şekil 2.3. R grubu iyonlaşmayan bir aminoasit için iyonlaşma dengeleri

Bir aminoasidin, peptidin ya da proteinin net yükü (yükli grupların yüklerinin cebirsel toplamı) ortamın pH' ına bağlıdır. Ortam pH' ı değıştikçe aminoasit ya da proteinin net yükü değışir. Bu olay her hangi bir aminoasit ya da proteinin titrasyonunda görölür. Bir

aminoasit ya da proteinin net yükünün sıfır olduğu pH değerine *izoelektrik nokta (pI)* denir.

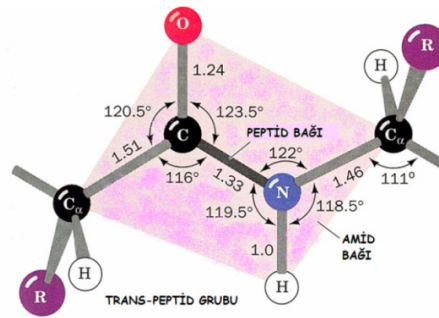
Aminoasitler “Peptid bağları” ile birleşerek polimerleşirler. Bir aminoasidin α -NH₂ grubu ile diğerinin α -COOH grubu arasında bir su (H₂O) çıkışı ile oluşan bağdır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Peptid bağı oluşumu

(<http://bill.srn.arizona.edu/classes/182/peptidebond.htm>) web adresinden yararlanılmıştır.

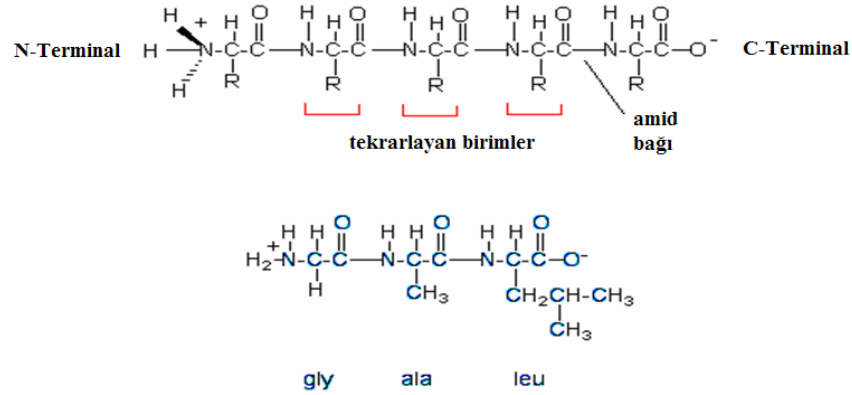
Kondenzasyon tepkimesi ile oluşan peptid bağı (C-N) uzunluk olarak normal amid bağından %10 daha kısadır. Bağda oluşan rezonans nedeniyle peptid bağı kısmi çift bağ karakterindedir. Peptid bağı aynı düzlem üzerindedir ve tercihen “trans” konfigürasyonundadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Peptid bağının üç boyutlu görüntüsü, peptid ünitesi aynı düzlemindedir.

(http://xray.bmc.uu.se/~kurs/BiostrukturfunkX2/practicals/practical_1/practical_1.html) adresinden yararlanılmıştır.

Aminoasitler peptid bağları ile birleşerek; sırasıyla dipeptidleri (2aa), tripeptidleri (3aa), tetrapeptidleri(4aa)... ve polipeptidleri/proteinleri (çok sayıda aa) meydana getirirler. Bir peptidde serbest α -amino grubunu içeren aminoasit kalıntısı amino-terminal (N-terminal), diğer uçtaki serbest karboksil grubu içeren kalıntı ise karboksil-terminal(C-terminal) kalıntısıdır (Şekil 2.6).



C. Ophardt, c. 2003

Şekil 2.6. Bir peptit biriminin N-terminal ve C-terminal uçları

Proteinler; hücrede, yapılanma ve enerji depolanmasında rol oynayan karbonhidrat ve lipidlerden farklı olarak çok değişik görevler üstlenirler. Bu görevleri nedeniyle kimlik belirleyici rolleri vardır. Proteinler, mikro çevrenin etkisiyle sürekli konformasyonel değişikliklere uğrayan dinamik yapılardır. Proteinlerin 4 tür yapısından söz edilir.

2.1.1. Primer Yapı (Birincil Yapı)

Kovalent bağlarla bağlanmış aminoasit kalıntılarının oluşturduğu polipeptit zinciri birincil yapısıdır (Şekil 2.7).



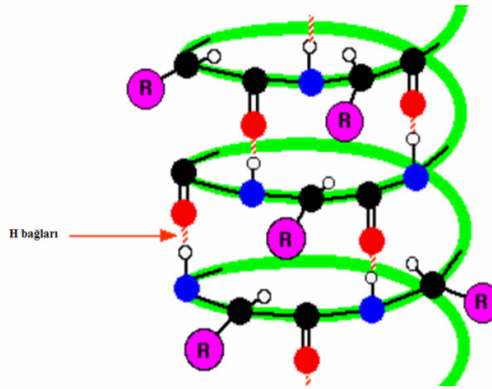
Şekil 2.7. Ribonükleaz A enziminin primer yapısı

2.1.2. Sekonder Yapı (İkincil Yapı)

Bu yapıda uzun protein zinciri içerisinde bazı bölgelerde zincirin alfa-heliks (α -Heliks) ya da beta- düzlemsel (β -Sheet) yapı şekillerinde katlanarak düzenli yapılar oluşturduğu gözlenir. Bu yapılara proteinlerin sekonder yapısı denir. Bu yapı hidrojen(H) bağları ile stabilize edilir. Proteinlerin sekonder yapısında başlıca 2 yapı görülmektedir.

a) α - Heliks:

Saç ve deri gibi dokuların ana bileşenidir, sertlikleri yapılarındaki polipeptid zincir arasındaki disülfid bağlarının sayısına bağlıdır [1]. Bu yapıda polipeptidin omurgası saat yönünde kıvrılarak bir spiral oluşturur. Heliksin bir dönüşünde $\sim 3,6$ aminoasit vardır ve bir dönüş uzunluğu $5.4\text{\AA}$ dur (Şekil 2.8). R grupları sarmaldan dışa doğru yönelmiştir. Bu yapı peptid bağının N' una bağlı H atomu ile 4. aminoasitin karbonil O atomu arasında bulunan H bağıyla sabitlenmektedir. α -heliks yapısı globüler proteinlerde görülür.

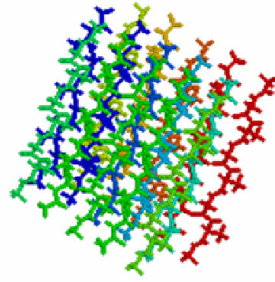


Şekil 2.8. α -heliks yapısı

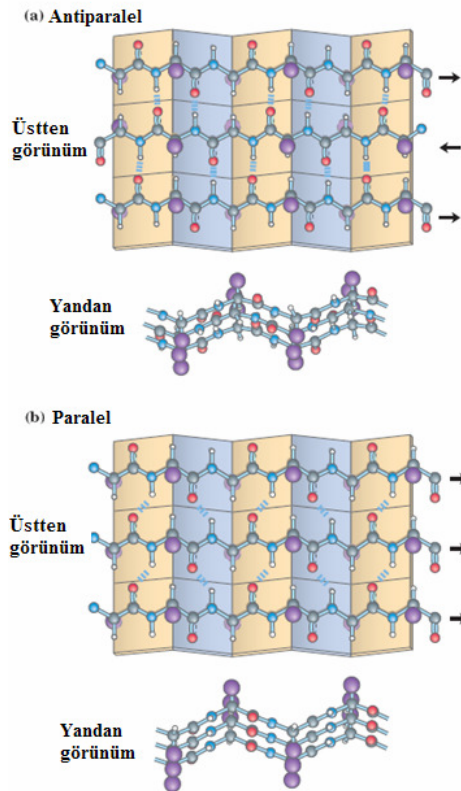
Prolin, imino grubu α -heliksin sağ-el sarmalına geometrik olarak uyuşmadığı için, α -heliksi bozar; ayrıca, zincirde bir dönüş neden olarak düzenli helikal yapıyı bozar. Çok sayıda yüklü aminoasit de iyonik bağ oluşturarak veya birbirini elektrostatik olarak iterek heliksi bozar. Triptofan gibi geniş yer kaplayan yan zinciri olan aminoasitler ve valin veya izolösin gibi β -karbonundan (R-grubundaki α -karbonuna komşu olan ilk karbon) dallanmış aminoasitler çok sayıda olduklarında α -heliks oluşumunu engellerler [1].

b) β -Düzlemsel Yapı:

Bu yapıda H bağları polipeptid zincirinin farklı bölgeleri arasında ya da iki ayrı polipeptid zinciri arasında kurulmuştur. Bu yapı genelde ipek iplikçığı gibi fibröz proteinlerde görülür (Şekil 2.9). β - tabakalı yapı paralel ya da anti-paralel olabilir (Şekil 2.10).



Şekil 2.9. İpek iplikçığı modeli



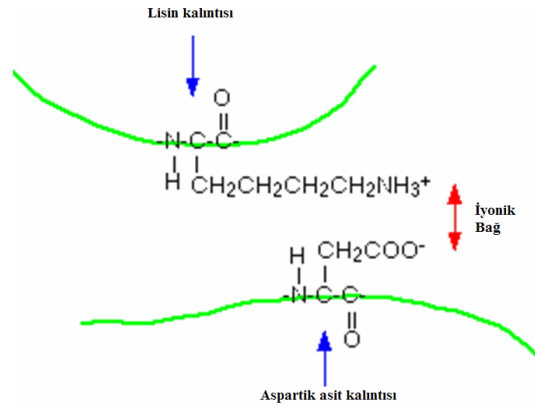
Şekil 2.10. β -tabakalı yapı gösterimi

2.1.3. Tersiyer Yapı (Üçüncül Yapı)

Polipeptidin kendi etrafında katlanarak, oluşturduğu üç boyutlu yapıyı ifade eder. Bu yapı, aminoasit yan zincirleri (R grupları) arasındaki etkileşimlerle bir arada tutulur. Tersiyer yapının oluşumundan sorumlu bağlar;

İyonik Bağlar

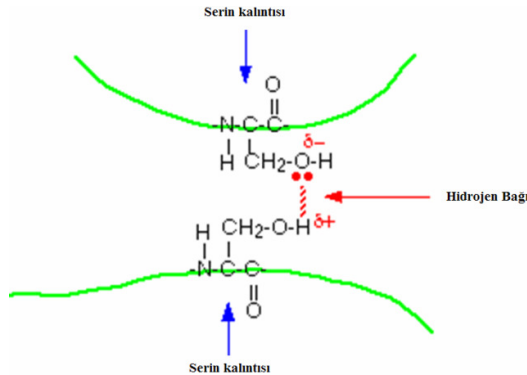
Aspartat veya glutamatın yan zincirindeki COO^- karboksil grupları gibi $-$ yüklü gruplar ile lizinin yan zincirindeki amino (NH_3^+) grubu gibi $+$ yüklü grupların birbirlerine yakın iseler oluşturdukları iyonik bağdır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. İki aminoasit arasındaki iyonik bağ oluşumu

Hidrojen Bağları

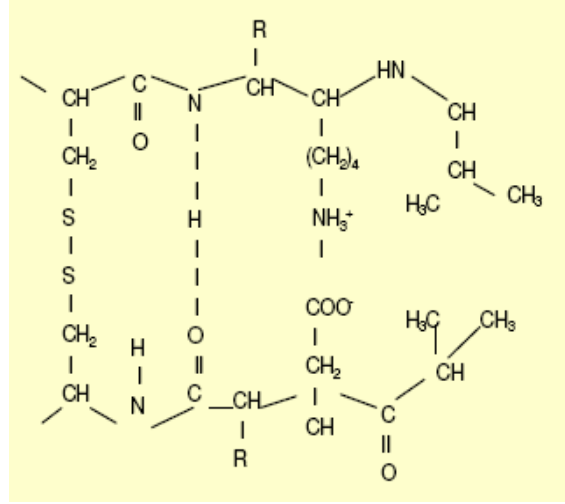
Burada söz edilen aminoasit yan zincirleri arasındaki hidrojen (H) bağlarıdır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. İki aminoasit arasındaki hidrojen bağ oluşumu

Van der Waals (Hidrofovik) Bağları

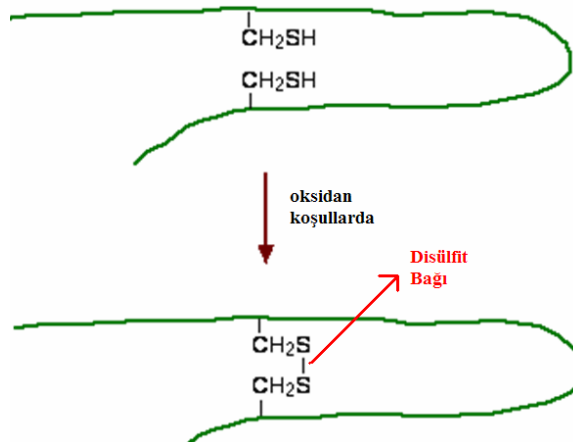
Poliipeptid zincirinde yer alan aminoasitlerden uzun alifatik yan zincir ya da aromatik yan zincir içerenler arasında oluşan etkileřimlerdir (şekil 2.13).



şekil 2.13. Van der Waals bağı oluşumu

Disülfid Bağları

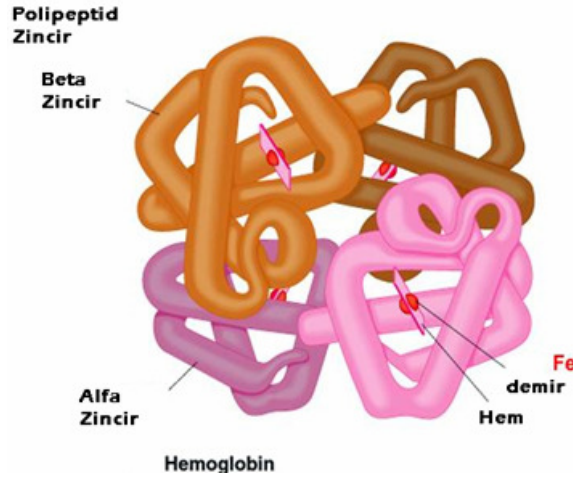
İki sistein kalıntısının sülfidril (-SH) gruplarının sistin kalıntısı oluşturacak şekilde kovalent olarak bağlanmasıdır (şekil 2.14).



şekil 2.14. Disülfid bağı oluşumu

2.1.4. Kuarterner Yapı (Dördüncül yapı)

İkiden fazla polipeptid zincirinin non-kovalent interaksiyonlar ile bir araya gelerek oluşturdukları daha büyük yapılardır. Örneğin; Hemoglobin $2\alpha+2\beta$ zincirinden meydana gelmiş bir tetramerdir. Kuarterner yapıya sahip hemoglobinin dördüncül yapısı şekil 2.15' de gösterilmiştir.



Şekil 2.15. Hemoglobin yapısı
(themedicalbiochemistrypage.org)adresinden yararlanılmıştır.

Proteinlerin Denatürasyonu ve Renatürasyonu

Proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarını kaybetmeleri denatürasyon olarak adlandırılır. Bu olay genelde proteinin aktivitesinin kaybı ile sonuçlanır. Sıcaklık, aşırı pH düzeyleri, mekanik ajitasyon, deterjanlar, inorganik tuzlar, organik solventler ve kurşun, civa ve gümüş gibi ağır metaller denatürasyona neden olurlar.

Denatüre edici maddelerle denatüre edilmiş bazı küresel proteinler, doğal konformasyonlarının kararlı olduğu şartlara konulduklarında doğal yapı ve biyolojik aktivitelerini yeniden kazanırlar. Bu olay renatürasyondur.

2.2. Kanser

Kanser; ölümcül hastalıklar arasında önde gelen üzerinde birçok çalışma yapılmış ve yapılmakta olan mekanizması hala tam olarak aydınlatılmamış sağlık problemleri

arasındadır. Kanser kimyasal, fiziksel, viral veya hormonal faktörlerin etkisiyle hücrenin normal döngüsünü kaybederek, kontrol edilemeyen bir şekilde uygunsuz bölünmesidir. Bu durumun sonucunda ortaya çıkan tümörler ikiye ayrılır. İlk grup sınırlandırılmış lokal bir bölgede gelişen benign tümörlerdir. İkinci grup ise metastaz denen bir prosesle vücudun farklı bölümlerine yayılan kan dolaşımına giren ve dokuyu istila eden malign tümörlerdir [3,4].

Tablo 2.1. Benign ve Malign tümörlerin bazı özellikleri [5].

	Benign	Malign
Büyüme Özelliği	Sadece lokal	İstila ve metastazla yayılır.
Yaşam tehdidi	Nadiren	Sık sık
Büyüme oranı	Yavaş	Hızlı
Farklılaşma durumu	İyi huylu	Çeşitli

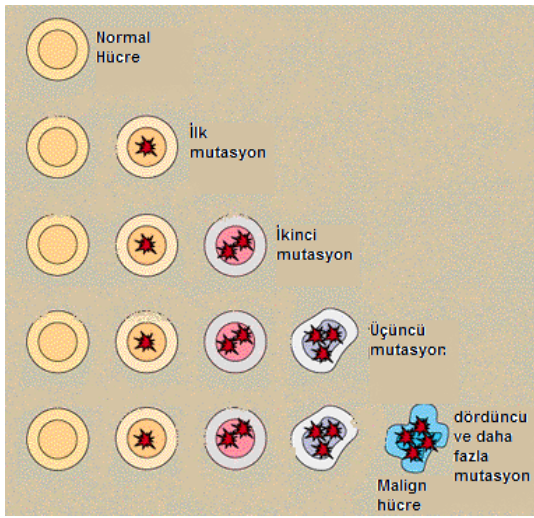
Kanserin sebebi tam olarak belirlenememesine rağmen ortaya çıkışında etkili risk faktörleri belirlenebilmiştir. Risk faktörleri yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete ve aile öykülerine göre değişiklik gösterir. Bunun yanında bazı çevresel faktörlerde kanser oluşumunu tetiklemektedir. Bunlar;

- ❖ Hava kirliliği
- ❖ Radyasyona maruz kalma
- ❖ Güneş ışığına aşırı maruz kalma
- ❖ Röntgen ışınına aşırı maruz kalma
- ❖ Bazı kimyasal maddeler
- ❖ Bazı virüsler
- ❖ Sigara, alkol kullanımı ve
- ❖ Kötü beslenme alışkanlığıdır.

Kanser genetik bir hastalıktır. Bu hastalıkla ilişkili mutasyonlar iki ana gen sınıfını etkilemektedir. Bunlardan birincisi; protoonkogenlerdir, ikincisi ise tümör baskılayıcı genlerdir [5]. Protoonkogenler normal hücrelerde büyüme ve farklılaşmayla ilgili veya diğer biyokimyasal olayları yönlendiren proteinleri şifreleyen genlerdir [6]. Virüs genleri bazı genlere veya protoonkogenlere katılarak malign hücre oluşumuna sebep olurlar [7]. Tümör baskılayıcı gen ise normalde hücre bölünmesine engel olan genler olup, bu genlerin hasarı sonucunda hücre kontrolsüz büyümeye başlar. Bunun

sonucunda kanser meydana gelir. Tümör baskılayıcı genlerden bazıları; p53, Rb, APC, CD95' dir [8]. Bu proteinler hücre siklusunu kontrol ederler. Eğer DNA' da bir hasar var ise hücre bölünmesi oluşur. Bazı ekstrem durumlarda hücreyi apoptoza götürür.

Bir hücrenin kanserli hücreye dönüşmesi için tek bir mutasyon yeterli değildir. Normal bir hücrenin dokulara yayılmış bir kanser hücresine dönüşmesi için en az 6-7 mutasyon gereklidir [6,9] (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Normal bir hücrenin kanserli hücreye dönüşmesi
(<http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/NIH/images/gene-s-cancer.gif>) web adresinden yararlanılmıştır.

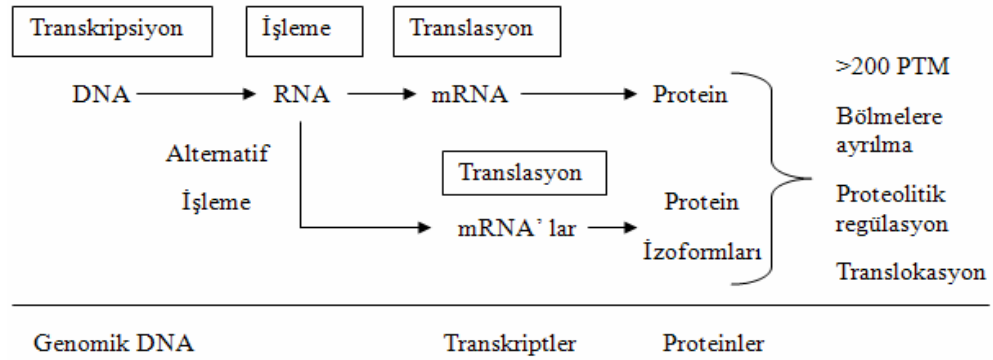
Bütün kanser türleri arasında deri kanseri en yaygın görülen türdür. Deri kanserini, prostat, meme, bağırsak ve kolon kanseri takip etmektedir. Bunun yanında; kanser türleri arasında en çok mortaliteye sahip olan ise akciğer kanseridir. Bunu; kolon, meme, pankreas, prostat, lenfoma, lösemi ve deri kanseri takip etmektedir.

2.3. Proteomiks teknolojisi

Proteomiks terimi, proteom (bir organizmanın eksprese olmuş protein grubu) çalışmasında artan bir ilgi alanı olarak 1997'de tanımlanmıştır [10]. Proteomiks bir hücreden, dokudan veya organizmadan eksprese olan proteinlerin tespit edilmesini ve ayırtılmasına, ko-translasyonel ve post-translasyonel olarak modifiye olmuş proteinlerin ve alternatif olarak uç birleştirme (splice) olan varyantlarının

tanımlanmasına olanak sağlayan yöntemdir [11,12]. Post-translasyonel modifikasyonlar (PTM) çoğu ökaryot proteinlerin aktivitelerini düzenler. Bu modifikasyonlar analizi çok zor olan sorunlar göstermektedir ancak bunların belirlenmesi biyolojik fonksiyonun anlaşılabilmesi için gereklidir [13]. Gen ekspresyon çalışmalarında oligonükleotid çipler (transkriptomiks) çalışılırken, proteomiks çalışmaları direkt olarak belirli bir hücredeki gen ürünlerinin düzeylerini göstermektedir hatta protein aktivitelerini, etkileşimlerini, subsellüler dağılımlarını da nitelendirmektedir [14]. Ancak genomun aksine proteom özel yerleşim gösteren ve sürekli olarak değişim gösteren moleküllerin etkin bir dizisinden oluşmaktadır. Oysa insan genomunun protein üretimi esnasında meydana gelen posttranslasyonel modifikasyonlar, dizi silinmeleri, alternatif yapıştırma nedeniyle yaklaşık olarak 32.000 farklı geni içerdiği tahmin edilirken, total proteomun proteom olarak tanımlanan bir milyonu aşkın farklı protein türlerini içerdiği tahmin edilmektedir [15]. Bu şekilde proteinlerin geniş bir aralıktaki modifikasyonları DNA dizilerinden tümüyle tahmin edilememektedir. Genom projesinden elde edilen verilerden genom tarafından kodlanan genlerin yaklaşık sayısını tahmin etmekteyiz. Ancak bunun asıl sayısını tahmin etmek birkaç nedenden dolayı zordur. Birinci olarak, ekson-intron' lar genomik DNA'dan doğru olarak tahmin edilememektedir dolayısıyla genomik bilginin belirli bir genin varlığının protein çalışmalarından elde edilen bilgiler ile entegre edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İkinci olarak ise transkriptin alternatif splicingi bir protein ürününden daha fazla ürün vermektedir. Bu nedenlerden dolayı mRNA veya genomun direkt analizi bir hücredeki protein ürünlerinin tam sayısını yansıtmamaktadır. Üçüncü olarak da bölmelere ayrılma (kompartimentalizasyon) ve yer değiştirme (translokasyon)'den dolayı, aynı proteinin farklı özelliklerinin ve farklı fonksiyonlarının farklı yerlerde olabileceği bulunmuştur [16] (Şekil 2.17).

Protein aktivitesi sadece protein biyosentezi ve protein yıkımı oranları tarafından kontrol edilmeyip, aynı zamanda proteinin lokalizasyonunun ve dayanıklılığının, moleküler etkileşimlerinin düzenleyicileri olan belirli ve seçici kovalent işlemler (PTM' lar) ile de kontrol edilmektedir [17]. PTM' lar bir proteinin proteolitik ayrılma özelliklerinin değişmesi veya bir veya daha fazla aminoaside modifiye eden bir grubun eklenmesi ile oluşan kovalent işlemlerdir (Tablo 2.2).



Şekil 2.17. Protein ürünlerinin oluşması için genomik bilgi akışı

Bir proteinin PTM' ları, proteinin aktivite durumu, lokalizasyonu, turnoveri ve diğer proteinlerle etkileşimi olarak değerlendirilmektedir [13]. Proteinlerin fosforilasyon, ubiquitinasyon ve glikozilasyon gibi PTM' leri proteinlerin ilişkilerini, yerleşimlerini, aktivitelerini ve fonksiyonlarını düzenleyen önemli biyolojik anahtarlardır [18]. Örneğin, protein fosforilasyonun hücrede sinyal transdüksiyon yolağında kritik bir rol oynadığı bilinmektedir [19]. Ubikuitinasyon; proteinin kararlılığında, hücreSEL lokalizasyonunda ve biyolojik aktivitesinde değişikliklerle sonuçlanabilmektedir. Ubikuitinasyon/deubikuitinasyon yolunu içeren genlerdeki mutasyonlar veya ubiquitinasyon sisteminin fonksiyonundaki bozukluk; metabolik hastalıklar, nörodejenerasyon ve çeşitli kanser tipleri gibi çok farklı hastalıklarla ilişkili olarak bulunmuştur [20]. Glikolizasyonun ise proteinin katlanmasını, lokalizasyonunu ve hareketini, çözünürlüğünü, antijenitesini, biyolojik aktivitesini ve yarılanma ömrü gibi hücre-hücre etkileşimlerini etkilediği bilinmektedir [21].

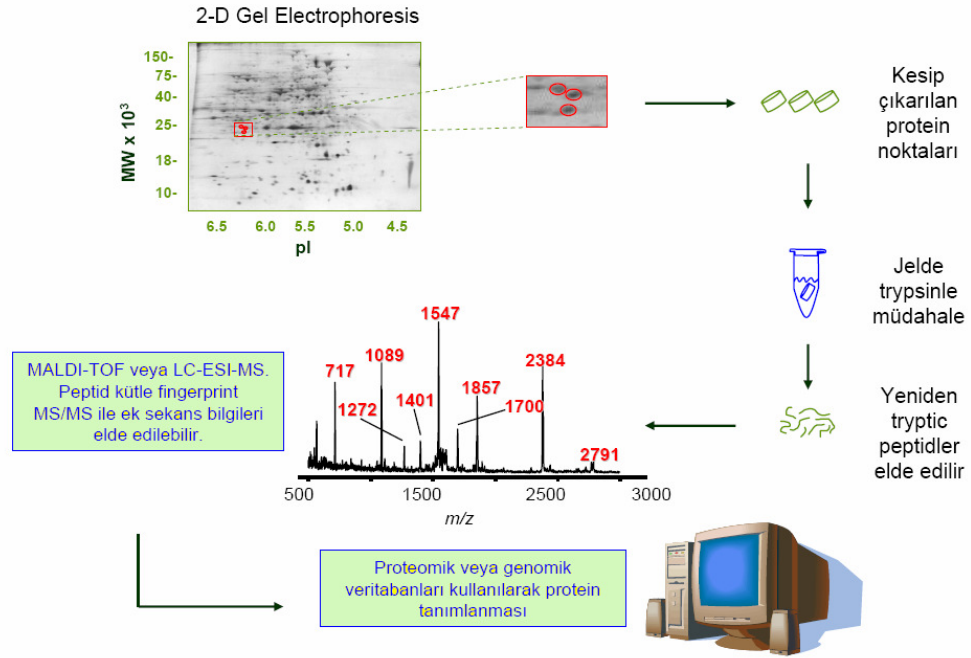
Tablo 2.2. Post Translasyonel Modifikasyonlar (PTM)

PTM tipi	Fonksiyonu
Fosforilasyon	Geriye dönüşümlü, enzim aktivitesinin aktivasyonu/inaktivasyonu, moleküler etkileşimlerin modülasyonu
Asetilasyon	Protein kararlılığı, N ucunun korunması, protein-DNA etkileşiminin düzenlenmesi
Metilasyon	Gen ekspresyonunun düzenlenmesi
Glikozilasyon	Geriye dönüşümlü, hücre-hücre tanınması/sinyal, vücuttan salınan proteinler, düzenleyici fonksiyonlar
Ubikuitinasyon	Sinyal yokluğu

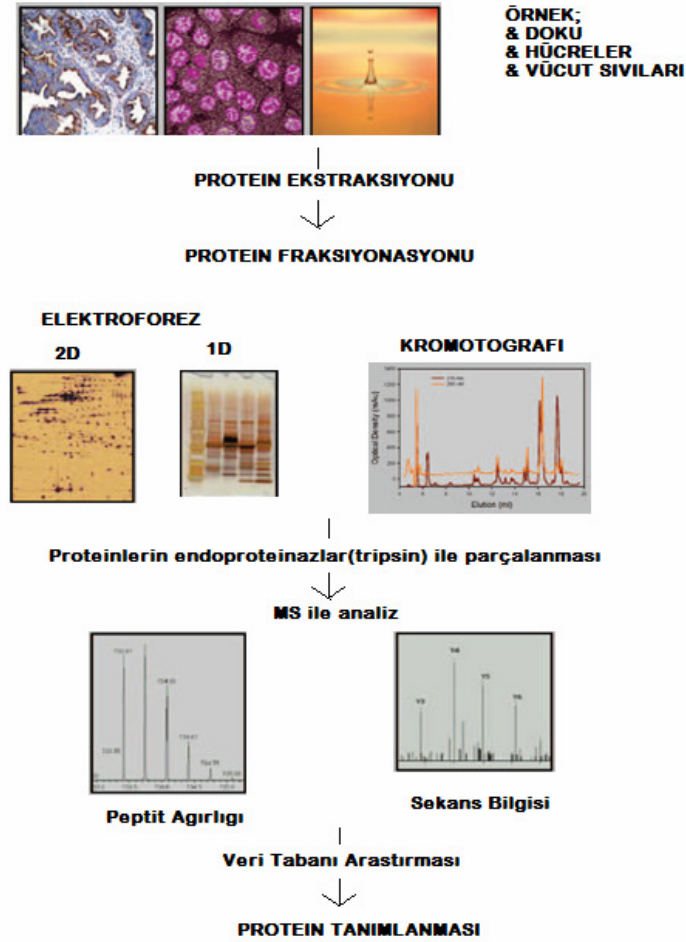
Teknik olarak üç çeşit proteomiks sınıflandırılabilir. İlki örnekler arasında protein ifadelerin kantitatif çalışması olan ve hastalığa spesifik biyobelirteçlerin de tespit edilebileceği protein ekspresyon proteomiksidir. İkinci tipi yapısal proteomiksidir. Bu yaklaşımın temel amacı, protein komplekslerinin veya subsellüler lokalizasyonda veya organelde bulunan proteinlerin yapılarını ayrıntılarıyla göstermektir. Transkripsiyon esnasında çok büyük bir kompleks olarak iş yapan birçok proteinin olduğu transkriptom gibi bir kompleksde protein-protein etkileşimlerini veya nükleus ve kloroplast, mitokondri gibi bir kompartman içindeki tüm yapısal proteinleri veya protein türlerini tanımlayabilir. Üçüncüsü ise fonksiyonel proteomiksidir. Subsellüler alanlarda protein profillerinin analizi, moleküler düzeyde hücrelerin fonksiyonel organizasyonunu anlamamızı sağlayan önemli bir yaklaşımdır. Bir proteinin subsellüler lokalizasyonunun bilgisi, proteinin fonksiyonunu açıklamamıza yardımcı olabilir [16].

Proteomiks teknolojileri serumda, plazmada, idrarda, dokuda ve diğer biyolojik örneklerde hastalıklara özgün biyobelirteçlerin keşfi için çok büyük veri toplama yetenekleri göstermektedir [22]. Bir proteomda ayrılmış olarak gözüken proteinlerin iki boyutlu dizilimini gösteren en kolay ve en eski method iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE)' dir. En çok yaygın olan bu teknik, izoelektrik fokuslama (IEF) ve protein karışımlarını birinci boyutta izoelektrik noktalarına (pI) ve ikinci boyutta ise moleküler ağırlıklarına ayırımını gerçekleştiren denatüre edici sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezini (SDS-PAGE) birleştirmektedir [20]. 2-DE çalışmalarında iki örnekteki boyanan proteinler karşılaştırılır ve artarak veya azalarak regüle olan proteinler saptanır [14]. 2-DE ayırma, olağanüstü çözülme gücü ve artmış hassasiyeti, tekrarlanabilirliği, proteom analizinin verimliliği ve kantitatif analize izin veren çeşitli boyaların kullanılabilirliği ile dikkat çekmektedir [18]. 2-D jel proteomiksin problemlerine gelince; komigrasyon (boyanmış bir spot, altında birden daha fazla protein içerebilmektedir), kimyasal heterojenite (membran ve nükleer protein gibi zayıf suda çözünebilir protein sınıflarının örnek olarak seçilmesi gibi), zaman alıcı işlemlerin olması, 10 kDa'dan daha küçük olan protein/polipeptidler için uygulanabilir olmaması ve yüksek hidrofobik proteinler için kullanımının hala sınırlı olması karşımıza çıkmaktadır [23]. Proteinlerin 2-DE ile ayrılmalardan sonra her bir jeldeki protein spotlarının miktarı yoğunluklarına göre hesaplanır [24]. Proteinler tripsin veya diğer endoproteinazlar (kimotripsin, endoproteinaz-GluC, vs.) ile kütle spektrometresi (MS)

analizi öncesi parçalanmaktadır [25]. Tripsin karboksil ucundaki arginin ve lizin aminoasidinden ayırmaktadır [26]. Proteolizisi takiben, ayrılan peptidler jeldeki spotlardan geri alınır ve tanımlanmak üzere MS analizi yapılır (Şekil 18a) [24,27]. MS analizli proteomik çalışmalarının genel özeti Şekil 2.18b' de gösterilmektedir [25].



Şekil 2.18. (a) 2-DE sonrası kütle spektrometresi ile proteinlerin tanımlanması



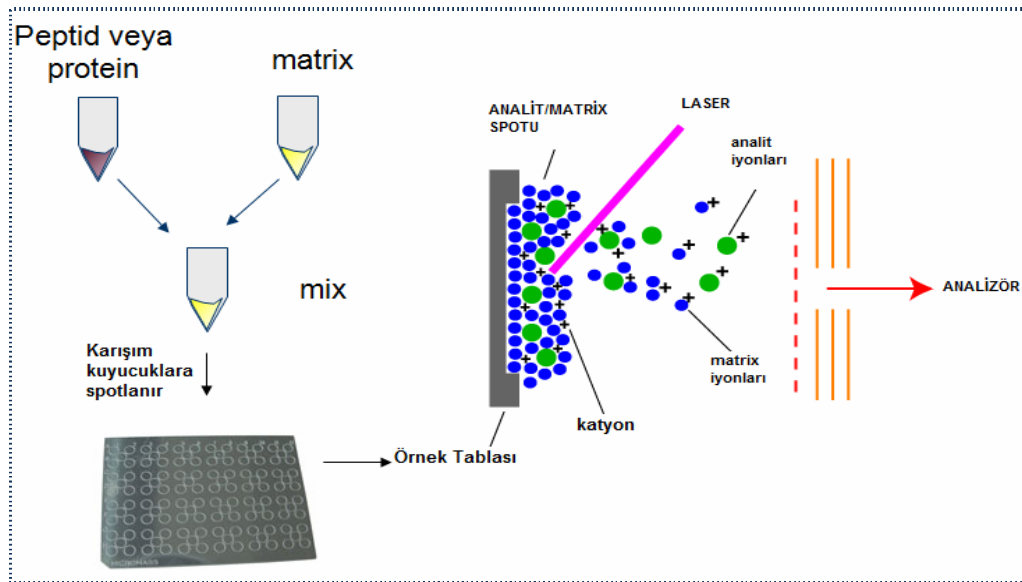
Şekil 2.18: (b) MS analizli proteomik çalışmalarının genel özeti

MS hassasiyet, yüksek dinamik aralık, yüksek çözünürlük ve tüm yaşam bilim alanlarını kapsayan geniş bir spektrum için çok güçlü analitik bir araç olarak çok yönlü olarak kullanılabilen bir dizi özelliğe sahiptir [28]. MS teknolojisi proteinlerin uzamsal lokalizasyonlarını korumakla birlikte, yaklaşık olarak 2000-70.000 kütle aralığından daha fazla olan 100' den daha fazla proteinin belirlenmesine rutin olarak olanak sağlamaktadır [29].

Esasen, MS gaz fazındaki iyonların kütle/yük (m/z) oranını ölçmektedir. MS analit molekülleri gaz fazındaki iyonlara dönüştüren bir iyon kaynağından, iyonize olmuş analitleri m/z oranına göre ayıran bir kütle çözümleyicisi ve iyonları her bir m/z değerine göre numaralandırıp kaydeden bir detektörden oluşmaktadır [30]. MS ölçümleri, solüsyondan moleküllere ya da bu evrede solid faza transfer eden bir metot ile gaz

fazındaki iyonize olmuş analitler ile gerçekleştirilmektedir. En çok kullanılan iki teknik; matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonlaşma (MALDI) ve elektrosprey iyonizasyon (ESI)'dur [11]. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil değildir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır ve yüklerini kaybederler. Oluşan her bir iyon spesifik bir moleküler kütleye ve yüke sahiptir ve m/z değerlerinin yoğunluğa karşı gösterildiği bir spektrum ile bileşik tanımlanmaktadır. Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir [31].

MALDI lazer radyasyonlu bir matriks ile ko-kristalize olmuş proteinleri ve peptidleri iyonize etmektedir (Şekil 2.19) [25]. Çoğu proteinleri, 10 ng (50 kDa' luk bir protein için 200 fmol), güvenilir bir şekilde MALDI tespit edebilmektedir [32]. Endüstriyel MALDI-TOF MS' ler emisyon kaynağı olarak ultraviyole (336 nm) veya infrared lazer ile donatılmışlardır. UV lazerli bir MALDI' de başlıca kullanılan matriksler tablo 2.3' de özetlenmiştir [33].



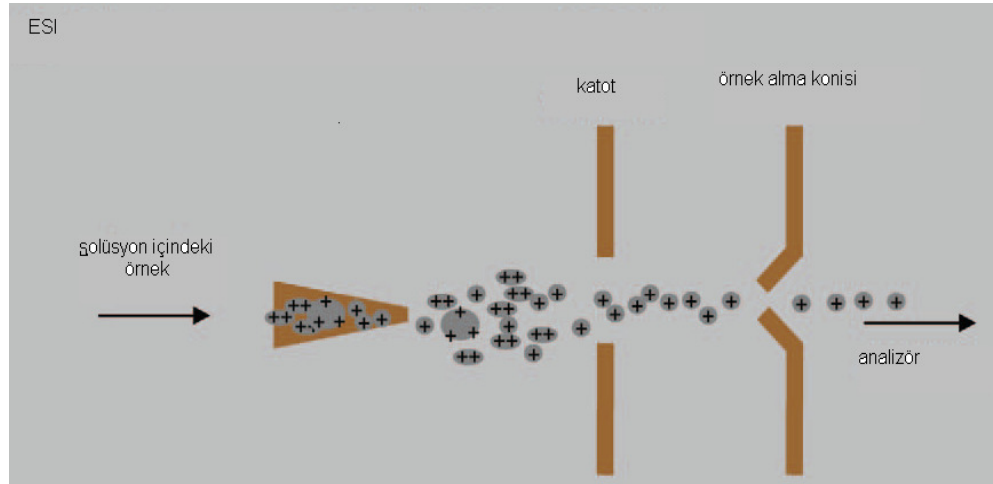
Şekil 2.19. MALDI lazer ışınının katı matriksi uyarması ve analitleri iyonize etmesi (<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/maldi-mechanism.gif>) web adresinden uyarlanmıştır.

Tablo 2.3. UV lazerli MALDI' de başlıca kullanılan matriksler

Matriksler

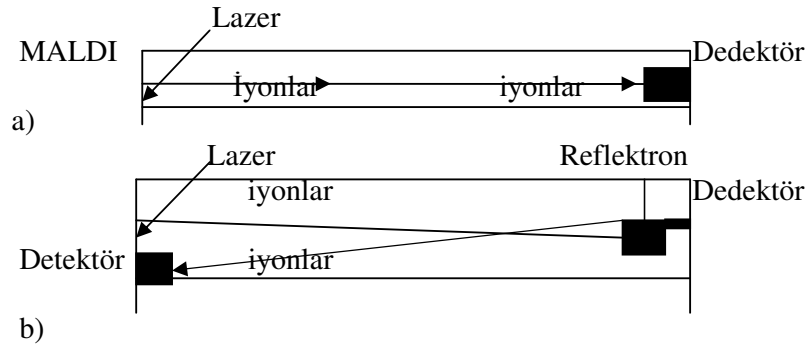
Alfa- siyano-4-hidroksisinnamik asit
 Alfa- siyano-4-hidroksisinnamik asit-metil ester
 Orto-aminobenzoik asit
 Salisilamit
 2,3,4-Trihidroksiasetofenon
 2,4,6-Trihidroksiasetofenon
 3-metoksi-4-hidroksisinnamik asit
 3-hidroksipikolinik asit
 Pikolinik asit
 6-Aza-2-tiothimin

ESI bir solüsyonun dışındaki peptid ve proteinleri iyonize etmektedir (Şekil 2.20) [25]. Her iki metoddan, hedef moleküllerin bütünlüğü yüksek doğruluklu kütle analizi ile korunabilmektedir [34]. Peptid/protein analizinde en sık kullanılan matriksler küçük peptidler için alfa siyano-4 hidroksi-sinnamik asit ve daha büyük peptidler ve proteinler için 3,5-dimethoksi-4-hidroksi-sinnamik asittir. Matriks analit karışımı hedef plakaya uygulanır. Çözücü buharlaşır ve matriks ve analitler hedefde ko-kristalize olurlar. 337 nm’ de bir lazer ışını (genellikle azot lazer), aromatik matriks moleküller tarafından emilen ışık sağlar. Enerji daha sonra gaz fazı içine desorbe olan analite aktarılır [35].



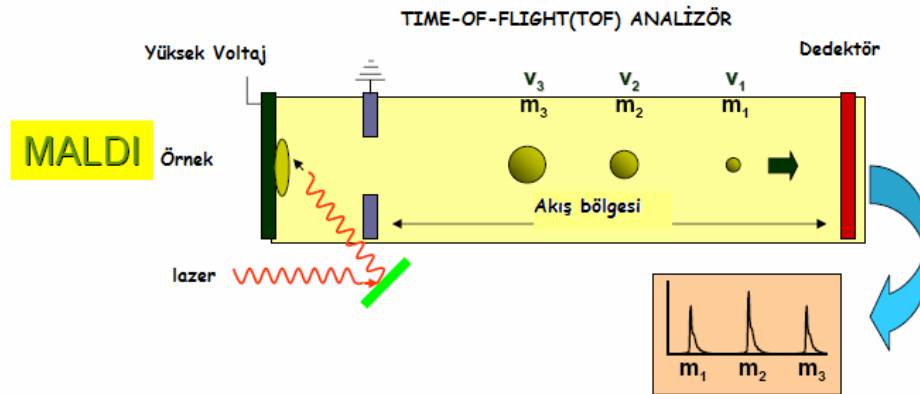
Şekil 2.20. ESI’ ın solüsyondaki peptidleri ve proteinleri iyonize etmesi ve buharlaştırması

MALDI' de iyonizasyon kaynağı olarak kullanılan üç çeşit kütle çözümleyicisi bulunmaktadır: bir doğrusal-uçuş-zamanı (Time of flight), bir TOF reflektör, fourier kütle analizörü dönüşümü (Şekil 2.21 a,b) [19]. (TOF) MS esasen 35-40 kDa üzerindeki peptidlerin spektrası için kullanılmaktadır [36].



Şekil 2.21. a) Time-of-flight kütle analizörlü MALDI
b) TOF ve TOF reflektörlü MALDI

Doğrusal TOF kütle analizörü üç cihazın en basit olanıdır ve MALDI icadı ile bir rönesans kazanmıştır. TOF analizi, iyonların tümüne aynı miktarda enerjinin verildiği bir dedektöre doğru hızlanan bir dizi iyonla dayanmaktadır. Ancak iyonlar aynı enerjiye sahip olmalarına rağmen farklı kütlelerde olduğundan dedektöre ulaşma zamanları farklıdır. En küçük iyonlar hızlarının fazla olmasından dolayı dedektöre ilk ulaşırken daha büyük olan iyonlar daha büyük olan kütleleri yüzünden dedektöre daha geç ulaşmaktadırlar (Şekil 2.22).



Şekil 2.22. Dedektöre çarpan farklı kütlelerdeki iyonlar

Çözümleyiciye TOF denilmesinin sebebi kütlelerin iyonların uçuş zamanı ile belirlenmesidir. Fourier kütle dönüştürücüsü (FTMS), bir manyetik alan varlığında bir yörüngede dönen yüklü bir atomun prensibine dayanmaktadır. Farklı tipteki MALDI MS' lerin karşılaştırılması tablo 2.4' de gösterilmektedir [19].

Tablo 2.4. Farklı tipteki MALDI MS' lerin karşılaştırılması

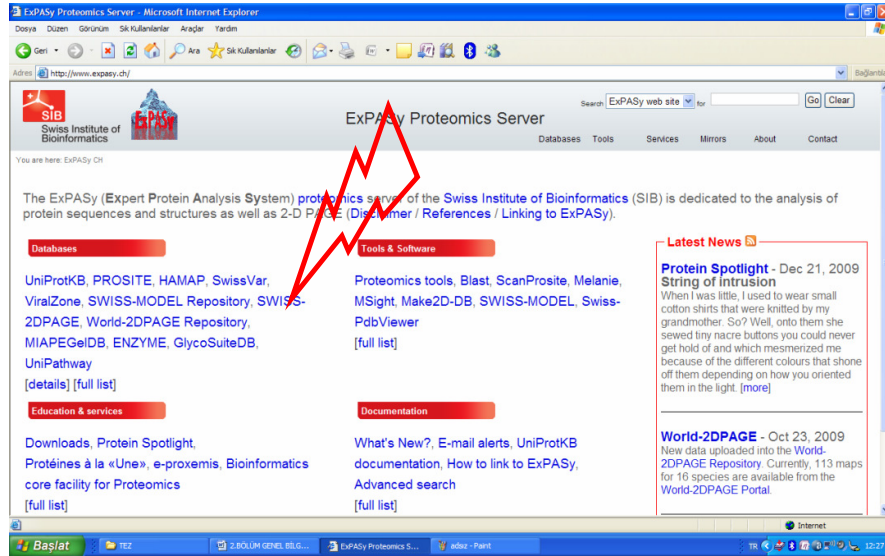
	TOF	TOF Reflektron	FTMS
Doğruluk	0.05–0.2% (50–200 ppm)	0.03% (30 ppm)	0.005% (5 ppm)
Rezolüsyon	2000	10000	100000
m/z oranı	>300 000	10000	10000
Tarama Hızı	ms	ms	s

Kantitatif proteomiks teknolojisi hızlı bir şekilde gelişmektedir ve biyolojik süreçlerin dinamik yapısını çalışmak için güçlü imkânlarla sahiptir [37]. Aslında proteomiks araştırmacılarının aktif olarak kapsamlı fonksiyonel analiz ve kompleks veri topluluklarının sistematik bilgisinin ortaya çıkarılması için biyoinformatikçilerle iş birliği içinde olmaları gerekmektedir [38]. MS (MALDI-TOF, MS/MS, MALDI-TOF-TOF) verileri elde edildikten sonra proteinlerin tanımlanması Mascot, Proteome Discoverer, Swiss-Prot gibi veri tabanları (Tablo 2.5) aracılığı ile yapılmaktadır [25, 36, 39, 40].

Tablo 2.5. 2D-Elektroforetik haritaların veri tabanları

İsim	Var olan Örnek jel görüntüleri
SWISS_2DPAGE	İnsan karaciğer, plazma, plateletler, böbrek, vs
NIMH_NCI Protein Disease Database (PDD)	Plazma, idrar, serebrospinal sıvı
Argonne Protein	Fare karaciğer, meme bezi hücre serisi, kanser vs. Mapping Group (PMG)
HEART_2DPAGE	İnsan kalbi
HSC_2DPAGE	İnsan, fare ve sıçan kalbi
Mito_pick	İnsan mitokondri
Yeast 2D_PAGE	S. cerevisiae
2D PAGE, Max_Planck_Institute	Mycobacterium tuberculosis, Helicobacter pylori, Chlamydia pneumoniae

Swiss 2D-PAGE; (<http://www.expasy.ch>) tarama adresiyle tüm veri tabanlarını bünyesinde toplayan bir veri tabanıdır. Bu veri tabanlarına internet kullanıcıları rahatlıkla ulaşabilmektedir (Şekil 2.23). Veri tabanında haptogloblin proteininin peptid dizileri, kütleleri, pI ve Ma değerleri Şekil 2.24’ de gösterilmiştir.



Şekil 2.23. ExPASy Proteomik tarayıcı internet ana sayfası görünümü.

You have selected HPT_HUMAN (P00738) from UniProtKB/Swiss-Prot:

Haptoglobin precursor [Contains: Haptoglobin alpha chain; Haptoglobin beta chain]
Signal in positions 1-18 has been removed.

- Chain Haptoglobin at positions 19-406 [Theoretical pI: 6.13 / Mw (average mass): 43349.01 / Mw (monoisotopic mass): 43321.52]

mass	position	#MC	modifications	peptide sequence
3817.6486	346-379	0		YGEDTCYGDAGSAFAVHDL E DTWYATGILSFDK
3292.5174	19-49	0		VDSGNDVTDIADDDGCPKPPE IAHGYVEHSVR
2848.3028	83-108	0		LPECEADDGCPKPPEIAHGY VEHSVR
2679.3923	179-202	0		MVSHHNLTTGATLINEQWLL TTA K
2115.0361	326-345	0		SPVGVQPILNEHTFCAGMSK
1795.0112	236-251	0		VVLHPNYSQVDIGLIK
1650.7978	298-311	0		YVMLPVADQDQCIR
1458.7335	203-215	0		NLFLNHSENATAK
1439.6648	119-131	0		TEGDGVYTLNNEK
1311.6063	60-71	0		TEGDGVYTLNDK
1290.7303	216-227	0		DIAPTLTLVVGK
1288.6242	380-391	0		SCAVAEYGVYVK
1273.6279	142-153	0		LPECEAVCGKPK
1203.6368	392-401	0		VTSIQDWVQK
1146.5425	312-321	0		HYEGSTVPEK
987.5365	262-270	0		VMPICLP SK
980.4948	278-286	0		VGYYSGWGR
923.5308	162-170	0		ILGGHLD AK
920.4624	171-178	0		GSFPWQAK
895.4744	154-161	0		NPANPVQR
858.4931	229-235	0		QLVEIK
809.3788	271-277	0		DYAEVGR
760.3988	292-297	0		FTDHLK
703.3733	256-261	0		VSVNER
688.3777	73-77	0		QWINK
688.3777	132-136	0		QWINK
593.3042	287-291	0		NANFK
587.2824	54-57	0		NYK
587.2824	113-116	0		NYK

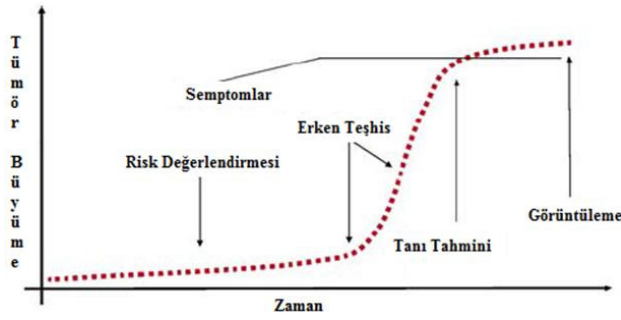
Şekil 2.24. Veri tabanında Haptogloblin proteini için peptid dizileri, kütleleri, pI ve Ma değerleri

2.4. Meme Kanseri ve Meme Kanserine Proteomik Yaklaşımlar

Meme kanseri; kadınlar arasında en yaygın kanser türüdür ve dünya çapında kanserle ilgili ölümlerde ikinci sırayı almaktadır [41, 42, 43, 44]. Amerika Birleşik Devletlerinden örnek verilecek olursa, ABD’ de 2004 yılında 200.000 kadında meme kanseri teşhis edilmiştir [45,46] yine ABD de yılda ortalama 40.000 kadın meme kanseri sebebiyle ölmektedir [46, 47] ve gelişmekte olan ülkelerde görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır [48]. Kanserle ilgili hastalık ve ölümlerden dolayı insan kaybını; özellikle hastanın ailesinin ve arkadaşlarının dalgalanma etkisini de düşünürsek tahmin etmek çok zordur [49]. Bu sebepten hastalığa bağlı ölüm oranı gelişen teknoloji ile erken teşhisi ve hastalığın gelişen tedavi şekillerinin bir kombinasyonu ile azaltılmaya çalışılmaktadır [45]. Erken tanı günümüzde düzenli aralıklarla fiziki inceleme ve mamografi çekilmesi ile sağlanabilmektedir. Bu hastalarda uygulanan cerrahiye bağlı olarak organ kaybı ve psikolojik sorunlar oluşmaktadır. Bu yüzden meme kanserinin erken teşhisi oluşabilecek bu sorunların önüne geçilmesini sağlayacaktır.

Meme kanseri; malign tümör oluşturmaları ve geliştirmesi hormonları, genetik mutasyonları ve çeşitli fiziksel, kimyasal ve çevresel organik etkenleri içeren son derece karmaşık bir olaydır. Bu kanser türü son yıllarda büyük oranda çalışılmasına rağmen moleküler mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır [43]. Tümör hücreleri, tümör spesifik antijenler, otoantijenler, tümör RNA ve DNA kandan temin edilebilir ki bu eğer doğru test uygulanabilir ise kanser türlerini belirlemede yaygın olarak kullanılabilir [49]. Kanser gibi hastalıkların moleküler temelini bilmemiz büyük bir avantaj sağlamasına rağmen var olan eksiklikler hem hastalığın patojenezinde hem de erken teşhis ve tedavi için etkili stratejilerin geliştirilmesinde yeterli gelmemektedir [50]. Semptomları temel alan tanımlar kanser için kabul edilebilir değildir çünkü semptomlar; tümörler yeterince büyük olduğunda açığa çıkarlar (Şekil 2.25) [49].

Farklı biyobelirteçler farklı görevler için önemlidir. Örneğin; CA125 yumurtalık kanseri hastaları için faydalı bir serum biyobelirtecidir. Diğer yandan prostat spesifik antijen hem prostat kanserinin erken teşhisi için hem de ameliyat sonrası hastalığın seyrini izlemek için iyi bir biyobelirteçdir.



Şekil 2.25. Meme kanserinde tümör büyümesi ile birlikte semptomların teşhisinin zamanla değişim grafiği [49].

Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program of The National Cancer Institute kanser tümörü teşhis edildikten sonra deri kanseri hastalarının aşağı yukarı % 95' inin, meme kanseri hastalarının % 90 ila % 75' inin bunun yanında akciğer kanseri hastalarının % 15' inin ve pankreatik kanser için % 6' sının beş yıl boyunca hayatta kalabildiklerini ifade etmiştir. Kanser erken teşhis edildiğinde hastaların sağ kalım süresi artmaktadır, daha az kapsamlı tedavi gerekmektedir ve genelde hastalığı ilerlemiş olanlara göre hastalığı erken teşhis edilen hastaların yüz ifadesi daha iyi olmaktadır [49, 51]. Meme tümörlerini belirlemede kullanılan yaygın metot klinik semptomlar gözükmeden önce etkili görüntüleme metodu olan mamografiyi temel almaktadır [52].

Meme kanseri; standart klinik ve patolojik bir yaklaşım olan AJCC (American Joint Committee on Cancer) evrelendirmesine göre tümör boyutu, lenf nodu tutulumu ve uzak/yakın metastaz dereceleri göz önüne alınarak sınıflandırılır (Tablo 2.6 a,b).

Tablo 2.6 . (a) Meme kanserinde klinik TNM evrelemesi

Primer tümör: T

TX: Primer tümör değerlendirilememiş

TO: Primer tümör bulgusu yok

Tis: Tümör bulgusu olmayan Paget hastalığı veya in situ tümör

T1: Tümör 2 cm veya daha küçük

T1a: Tümör 0.5 cm veya daha küçük

T1b: Tümör 0.5 cm'den büyük, fakat 1 cm'yi aşmamış

T1c: Tümör 1 cm'den büyük; fakat 2 cm'yi aşmamış

T2: Tümör 2 cm'den büyük; fakat 5 cm'yi aşmamış

T3: Tümör 5 cm'yi aşmış

T4: Tümörün boyutu ne olursa olsun deri ya da toraks duvarına doğrudan ulaşmış

T4a: Toraks duvarına ulaşmış

T4b: Meme derisindeki ödem (Peau d'orange dahil), ülserasyon, tümörlü memede

satellit deri lezyonları

T4c: T4a+ T4b

T4c: İnflamatuvar kanser: Klinikopatolojik bir bulgudur, deride yaygın endurasyon ile erizipeloid görünüm vardır. Genellikle ele kitle gelmez. Radyolojik olarak kitle olabilir ve meme üzerindeki deride karakteristik bir kalınlaşma vardır. Bu klinik görünüm dermal lenfatiklerde tümör embolisi ile oluşmaktadır. Paget hastalığında kitle varsa T' yi kitlenin büyüklüğü tayin eder. T ölçümünde tümörün en büyük boyutu göz önüne alınır.

Bölgesel lenf bezleri: N

NX: Bölgesel lenf bezleri değerlendirilememiş (örn. daha önce çıkarılmıştır.)

NO: Bölgesel lenf metastazı yoktur.

N1: Aynı taraf koltuk altında bir ya da fazla mobil lenf bezinde metastaz

N2: Aynı taraf koltuk altında bir ya da fazla lenf bezinde metastaz; fakat bu lenf bezleri birbirlerine ya da etraf dokulara yapışık; paket oluşturmuştur.

N3: Tümörün bulunduğu taraftaki mammaria interna lenf bezi grubuna metastaz

Uzak metastazlar: M

MX: Uzak metastazların varlığı değerlendirilememiş

Mo: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var (supraklaviküler lenf bezlerindeki metastazlarda uzak metastaz olarak nitelenir.

Tablo 2.6. (b) TNM evre grupları

<i>Evre 0</i>	Tis	No	Mo
<i>Evre I</i>	T ₁	N ₀	M ₀
<i>Evre IIA</i>	T ₀	N ₁	M ₀
	T ₁	N ₁	M ₀
	T ₂	N ₀	M ₀
<i>Evre IIB</i>	T ₂	N ₁	M ₀
	T ₃	N ₀	M ₀
<i>Evre IIIA</i>	T ₀	N ₂	M ₀
	T ₁	N ₂	M ₀
	T ₂	N ₂	M ₀
	T ₃	N ₁	M ₀
	T ₃	N ₂	M ₀
<i>Evre IIIB</i>	T ₄	Herhangi N	M ₀
	Herhangi T	N ₃	M ₀
Evre IV T ve N ne olursa olsun M ₁ içeren tüm hastalar			

Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü de meme kanseri teşhisinde kullanılan diğer değerlerdir [46]. Mamogramları okuma ve değerlendirme yüksek oranda subjektiftir. Büyük hastanelerdeki deneyimli radyologlar daha iyi başarıya ve çalışma arkadaşları ile daha fazla pratik yaparak karşılaştırma imkânına sahiptirler. Tümörün belirlenmesini temel alan görüntülemeler (mamogramlar) belli bir yerdeki tümör hücrelerinin hacmine bağlıdır. Bu tümörler çok küçük olabilir, teşhis için gereken boyut oluşmamış olabilir veya belli bir bölgede konsantrasyonu olmayan dağılmış bir tümör olabilir, bu gibi durumlar mamografiyi sınırlandırmaktadır [49].

Kanser kemoterapisi çeşitli sebeplerden dolayı başarısız olabilir. Bunlar arasında ilaç direnci en önemli olanıdır. İlaç direnci gösteren hücreler genetik mutasyona uğramış mutant hücrelerdir [53]. Uygulanan tedavi sırasında kullanılan kemoterapinin hastalar üzerindeki direnci veya hassasiyeti araştırılmış ve dikkate değer bir belirtiye ulaşılamamıştır. Buna rağmen; timidilat sentaz, timidin kinaz, C- erbB-2, multidrug resistance-associated protein ve p53 gibi bazı belirteçler dirence karşı gösterilmiştir [44]. Bunlarda meme kanserinin teşhisi için çok geç kalınmış anlamına gelmektedir. Dolayısıyla bu hastalığın sadece teşhisine yardım eden faydalı patolojik belirteçleri belirlemeye değil aynı zamanda hastalığın türü ve tedavisi için de faydalı patolojik belirteçleri belirlemeye ihtiyaç vardır [42].

Yapılan çalışmalar sonucu meme kanseri gelişiminde etkili risk faktörleri belirlenebilmiştir. Bunlar;

➤ **Cinsiyet ve yaş;**

Meme kanseri erkeklere oranla kadınlarda yüz kat daha fazla görülmektedir. Bu kadınlarında %80' i ortalama 50 yaş üzerindedir ve hastalık çoğunlukla postmenapozal dönemde görülmektedir.

➤ **Aile öyküsü;**

Ailesinde meme kanseri olanlarda hastalığa yakalanma riski vardır, özellikle birinci derece akrabalarında meme kanseri olanlarda bu risk iki kat artmaktadır [54]. Meme kanseri tedavisinde kullanılan Tamoxifen bu riskleri % 50 oranında azaltmaktadır. Artış ise 17. kromozomdaki BRCA-1 yada BRCA-2 genlerinin mutasyonu ile ilgilidir. Meme kanserinin yaklaşık olarak %10'u bu genlerdeki kalıtsal mutasyonla ilgili aile hastalığıdır.

➤ **Menarş ve menapoz yaşı;**

Erken yaşta menstruasyona girmiş veya geç yaşta menapoza girmiş kadınlarda meme kanserine yakalanma riski fazladır. Meme kanseri riski menarşın geciktirildiği her yıl % 20 oranında azalmaktadır.

➤ **İlk doğum yaşı;**

Çocuksuz veya 30 yaşından sonra çocuk sahibi olmuş kadınlarda risk fazladır.

➤ **Uzun süreli oral kontraseptif kullanımı;**

Yüksek dozajda östrojen içeren oral kontraseptifleri kullanan kadınlar risk altındadır. Bunun yanında menapoz sonrası dönemde ki kullanımlarda riski artırmaktadır.

➤ **Alkol kullanımı, obezite ve hareketsizlik** risk faktörleri arasındadır.

➤ **Çevre kirliliği;**

Östrojenin fonksiyonuna benzeyen pestisitleri içeren çevre kirliliğinin de meme kanseri gelişimine etkisi olduğu gözlenmiştir.

Meme kanserinin ilk semptomu kendi kendine muayene sırasında belirlenen şişliktir. Açıklanamayan meme büyümesi, sertleşme, deri iritasyonları, hassasiyet, meme başı ağrısı ve diğer memenin sütüne göre oluşmuş değişiklikler kanser göstergeleri arasındadır.

Meme kanseri teşhisinde kullanılabilecek çok yeni teknikler de mevcuttur. Bunlar;

- Mikroarray analizleri
- Doku mikroarrayleri
- Kantitatif ters transkriptaz ve
- Proteomik analizler olarak sıralanabilir [55].

Sıralanan bu teknikler arasında özellikle mikroarray teknikler, tümörün moleküler profilinin tayininde etkin olarak kullanılan ancak oldukça pahalı tekniklerdir. Ayrıca özel kullanma prosedürlerine ihtiyaç duyması ve bir standardizasyonlarının olmaması dezavantajlarıdır [55]. Gen mikroarrayleri bir hücredeki genlerin bir kısmı ya da hepsinin ekspresyonunun hızlı bir şekilde elde edilmesini sağlamaktadır. Ancak mRNA'nın düzeyi bir hücrede yerine geçen proteinin düzeyinin tahmininde yeterli değildir. mRNA stabilizesinde ki farklılıklar ve translasyon etkinliğindeki farklılıklar yeni proteinlerin üretimini etkilemektedir. mRNA düzeyleri; aktiviteleri ve fonksiyonları

birtakım iç posttranslasyonel modifikasyonlara ve çevresel ajanlar tarafından diğer modifikasyonlarla belirlenen yerlerine geçen proteinlerin düzenleyici durumu hakkında hiçbir şey söylememektedir. Memenin duktal karsinomunda yapılan mikroarray çalışmaları sayesinde en az 5 alt tümör sınıfı belirlenmiştir. Bunlar normal meme benzeri, bazal benzeri, ERBB2, luminal tür A ve B' dir. BRCA-1 mutasyonlarını taşıyan tümörler bazal benzeri alt sınıfı ile ilgilidir [56].

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (ERBB1) ve ilgili aile üyesi HER-2/neu (ERBB2) sıklıkla kötü huylu meme kanserlerinde görülür ve bunların görülmesi zayıf prognozla ilgilidir. ERBB inhibitörlerini kullanarak yapılan klinik çalışmalar meme tümör büyüme etkisi üzerine odaklanmaktadır. Yapılan çalışmada in vivo ortamda klinik olarak ilgili küçük molekül inhibitörleri kullanılarak meme tümör hücresinin hareketliliği ve intravazasyonu üzerine ERBB' nin inhibisyon etkisini değerlendirmek amaçlanmış sonuç olarak; ERBB1 ve ERBB2' nin inhibisyonu tümör hücrelerinin invazif özelliklerini hızlıca bloke ettiği kanıtlanmıştır [57]. Yine 1994 ve 1995 yıllarında yapılan bir çalışmada BRCA1 ve BRCA2 [58] genlerinde ki mutasyonların meme kanseri oluşumuna sebep olması ile ilişkilendirilmiştir [59].

Pek çok proteomiks çalışma normal ve hastalıklı numuneler arasındaki proteinlerin farklılaşmasını tanımlamayı amaçlamaktadır. Bu açıdan bakıldığında, 2-DE referans haritalarının ve veritabanlarının kuruluşu, sağlıklı ve hastalıklı durumların proteomiks karşılaştırmaları ile özel fonksiyonel proteinlerin karakterizasyonudur [59]. Bu yüzden; proteomiks protein profil farklılıklarındaki her ayrıntıyı görebilmemizi ve değerlendirebilmemizi sağlaması açısından daha güvenilir bir yöntemdir. Bunun yanında proteomiks ile elde edilen verilerin konformasyon eksiklerinin olduğu bir durumda mikroarray sonuçları ile tamamlanması gerekir. Ancak bu kısım ilerde daha küçük bir projede geliştirilebilir. Meme kanserinin teşhisinde kullanılan bu yeni tekniklerin hepsinde ortak amaç, hastalığın erken teşhisine yardımcı bir belirteç bulabilmektir.

Meme kanserinin teşhisinde kullanılabilir düşüncesi ile pek çok biyolojik molekül sınıfı (lipitler, karbohidratlar, poliaminler, proteinler, RNA ve DNA) potansiyel belirteç olarak araştırılmıştır. Bunlar arasında ilk üç sırada sayılanlarla ilgili çalışmalar bu

anlamda pek gelişme gösterememiştir. Ancak nükleik asitler ve özellikle proteinler potansiyel meme kanseri belirteci olarak çok yoğun bir şekilde çalışılmaktadır [49].

En çok rapor edilen ve değerlendirilen meme kanseri belirteçleri;

- Hormon reseptör, hücre döngü düzenlenmesi, hücreler arası matriks modifikasyon, hücre proliferasyon, tümör baskılama ile ilişkili,
- Onkogenler veya proto-onkogenler,
- Kalıtsal meme kanseri ile bağlantılı,
- Kritik kanser ilişkili, biyolojik mekanizmaları da içeren proteinlerdir [47].

Kanser proteomiks çalışmalarının amacı ise tümörlerin moleküler sınıflandırılmalarının iyileştirilmesi, hastalık prognozları ve tedavi tahminleri için daha duyarlı belirteçlerin keşfidir [60]. Bir belirtecin en önemli özelliği ölçüm kaynağının tipi (doku, serum, plazma, idrar, tükürük) dikkate alınmaksızın duyarlılık ve kesinliğin iyi olmasıdır [47].

ASCO (American Society of Clinical Oncology) ilk defa 1996’ da meme kanseri için tavsiye edilebilecek tümör belirteçlerini bir liste halinde yayınlamış ve daha sonra bu listeyi 2001 yılında yenilemiştir. ASCO panelinde meme kanseri için MUC-1 protein ((Cancer Antigen) CA15.3 ve CA27.29), karsinoembriyonik antijen (CEA) ve ekstrasellülerde sirküle olan Her2/neu’ da içeren çoklu serum belirteçleri değerlendirilmiştir. Panelde bu belirteçlerin hiçbirisi hastalık saptanması, izlenmesi, teşhisi, evresinin tespiti veya gözetimi için önerilmemiştir. Bununla birlikte; palyatif tedavi gören hastaların MBC (minimal bakterisidal konsantrasyon) değerleri ile CA15.3 veya CA27.29 ve/veya CEA ölçümü önerilmiştir [45].

Bu listede çoklu doku belirteçlerinin rutin ölçümü de tartışılmıştır. Panel Östrojen Reseptör ve Progesteron (ER ve PgR) reseptörlerinin ölçümünü erken metastatik hastalık durumunda ve endokrin terapinin uygulanacağı hastayı tayin edebilmek için önerilmiştir. Meme kanserinin önceden tahmininde, teşhisinde ve tedaviye vereceği cevabın tahmininde kullanılabilecek belirteçler arasında ER ve PgR’ in özellikle hormonal tedavi alacak hastaların tayininde faydalı olacağı belirtilmiştir [61]. Bu nedenle son dönemde, Östrojen Reseptör (ER), Progesteron Reseptör (PgR), İnsan Epidermal Büyüme Faktörü (Human Epidermal Growth Factor, HEGF) gibi, yeni bazı tahmin faktörleri de prediktif faktörler olarak kullanılmaktadır [46].

Meme kanseri belirteci olarak HER-2/neu onkoprotein ve tümör spesifik glikoproteinlerdir [61] ve Cdk6, ileri düzey meme kanseri teşhisi için serum CA 15-3 gösterilebilmektedir [62]. Metastatik meme kanseri için protein kinaz C' de belirteç olarak gösterilebilmektedir [63]. 1965 yılında tanımlanan karsinoembriyonik antijen (CEA) ilk tümör antijenleri arasındadır [49]. CEA, immünoglobülin ailesine ait olan bir glikoproteindir ve kanser hastalarının serumlarında radyoimmünoassay veya ELISA yöntemi ile tespit edilmektedir. CEA' nın klinik değerinin tayini normal popülasyonda yüksek pozitif yanılma oranından ve düşük tedavi duyarlılığı ve düşük spesifikliğı sebebiyle sınırlıdır [49].

Protein C3a, kanser antijen (CA) 15-3, karsinoembriyonik antijen (CEA), MUC glikoproteinleri, otoantikor, sialik asit seviyesi ve sitokinlerin ekspresyon farklılıkları geleneksel proteomik olarak yaklaşıldığında meme kanseri hastalarında gözlenmiştir. Serum ve doku sialidaz (nöraminidaz) seviyesi evre I, II ve III tümör boyutlu meme kanserli grupta kontrol gruplarında bulunandan özellikle daha fazladır [64]. Hâlihazırda meme kanseri teşhisinde kullanılabilirliğı araştırılan serum belirteçlerinden biri olan CA 15.3 yeterli duyarlılığı ve spesifikliğı sahip bir belirteç değildir. FDA (Food and Drug Administration) CA 15.3 ve CA 27.29 gibi tümör belirteçleri yalnızca ilerlemiş seviyedeki meme kanserinin takibinde önerilmektedir [65].

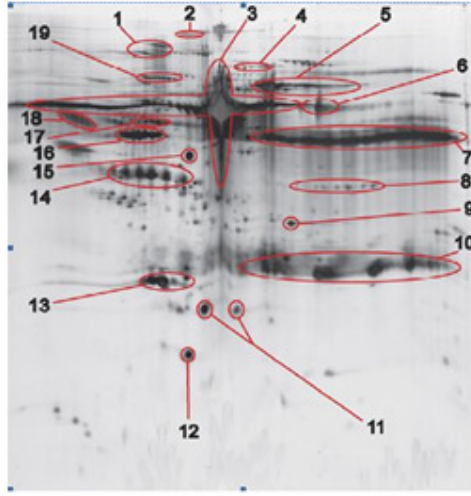
SELDI-TOF MS sistemi, sağlıklı ve hasta dokular arasında, protein düzeyindeki farklılıkları ortaya koyarak ayrımlarını sağlayabilir. SELDI-TOF analizleri tümörlü hücrelerin analizinde kullanılmaktadır ve klinik belirteç çalışmaları için uygun olabilmektedir [64]. Meme kanseri için potansiyel tümör belirteç araştırması olarak yapılan çalışmada 169 serum örneğı (103'ü farklı safhalardaki meme kanserli hastadan, 41'i sağlıklı ve 25' i ise iyi huylu benign tümörü olan kadınlardan olmak üzere) SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization) kullanarak incelenmiş, moleküler ağırlığı 4,3 kDa, 8,1 kDa ve 8.9 kDa olan üç belirteç belirlenmiştir [66]. Bu proteinler; kontrol serum örnekleri ile evre 0-I olan kanser hastaları arasında farklanmış, evre II-III' de belirlenmeye çalışılmıştır [67]. Yine yapılan bir çalışmada meme kanseri teşhisinde SELDI-TOF-MS (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time-of-flight- Mass) ile proteomik ve bioinformatik çalışmaları birleştirilmiştir [68]. SELDI-TOF-MS protein çip kullanarak 49 meme kanserli hasta ve 51 sağlıklı kadının serum protein paternlerini oluşturmuşlardır [68].

SELDI-MS kromatografik olarak aktif yüzeyleri temel almaktadır. Biyolojik bir numuneden elde edilen protein ve peptitler anyonik, katyonik, hidrofobik, metal kısıkaç veya afinite özelliklerine göre bu yüzeylere bağlanırlar. Proteinler bağlandıktan sonra kirlilikler ve istenmeyen peptid ve proteinler yıkama ile giderilebilmesi için akabinde matrikse başvurulur ve örnek TOF-MS ile analiz edilir. Bundan dolayı; SELDI-MS, MALDI-MS' i temel almaktadır. SELDI bütün proteomun % 1' inden daha azını belirleyebilir ve doku gibi karmaşık örneklerin proteom analizleri için uygun değildir [69]. Serumunda karmaşık bir numune olmasına dikkat çekerek MALDI-TOF analizlerinin bu çalışma için daha uygun olduğunu kabul edebiliriz.

Karmaşık örneklerin; iki boyutlu elektroforez ve DPD (dihydropyrimidine dehydrogenase) veya MUDPIT (Multidimensional protein identification technology) gibi LC-MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry) teknikleri gibi yüksek ayırma kapasitesine sahip metotlar ile analiz edilmesi gerekir [70]. Bunun yanı sıra; SELDI hızlı ve kolay temin edilir bir yöntem olmasından dolayı klinik çalışmalarda bilinen peptid veya protein belirteçlerini tespit etmede tercih edilebilir [69]. 81 tane yüksek riskli EBC (Early Breast Cancer) hastalardan kemoterapi tedavisi almaya başlanmadan önce alınan serumlar SELDI-TOF-MS teknolojisi kullanılarak protein profili çıkarılmıştır. Bu çalışmada metastazı olanlar ile olmayanlar ve hormonal tedavi alanlar ve almayanlar karşılaştırılmıştır [71].

Serum ve plazma vücutta üretilen bütün proteinlerin elementlerini içermektedir ve birçok çalışma plazma ve serumdaki protein ve peptidlerin düşük molekül ağırlığının patolojik koşullarla ilişkili olduğunu önermektedir [72]. Kan plazma proteinleri 2D-PAGE kullanılarak resmedilmiş ve çok heterojen halde bulunduğu kanıtlanmıştır (Şekil 2.26) [73].

Yapılan literatür araştırmalarına göre tümör doku ve hücrelerini içeren birçok doku ve biyolojik sıvı proteomik çalışmalarda kullanılmıştır [74]. Kanseri belirteçleri için plazma ve serumun özellikle kaynak vaat ettiği düşünülmektedir [75]. Maalesef; potansiyel belirteç olabilen proteinler serumda çok düşük konsantrasyonlardadırlar [76] ve bu konsantrasyonun ng/mL düzeyinde var olduğu belirtilmektedir [73]. Albümin, IgG, IgA, α 1-antitripsin, transferrin ve haptoglobulin gibi yüksek bolluktaki (abundant) proteinler çoklu afinite kolonları ile filtrelenebilir [37].



Şekil 2.26. Kan plazma proteinlerinin 2-DE jel haritası

1: seruloplasmin, 2: α -2 makroglobin, 3: albümin, 4: komplement faktör B, 5: Transferin, 6: komplement c3, 7 ve 8: immünoglobulin ağır zincir γ , 9: c4 komplement, 10: immünoglobulin hafif zincir, 11 ve 14: haptogloblin, 12: prealbümin, 13: apolipoprotein A, 15: fibrinojen, 16: α -1 antitripsin, 17: α -1 antikimotripsin, 18: immünoglobulin ağır zincir α , 19: secretory immünoglobulin zincir α .) [73].

Sağlıklı bir kişinin plazmasında yer alan abundant proteinler Ek 2' de listelenmiştir [78]. Serumun plazmadan farkı koagülasyon faktörlerini içermemesidir. Serum tanı analizleri için kullanılabilir bir kaynaktır, fakat hastalık spesifik serum biyobelirteçlerinin tanımlanmasına insan serum albümin ve immünoglobülinlerin baskılaması engel olmaktadır [79]. Dolayısıyla; yapılan tez çalışmasından serumdaki bol bulunan proteinlerin filtrelenmesi ile yapılan kısım da denenmiş ve saflaştırma sonucu ekspresyonu düşük olan birçok protein dikkate değer sayıda fark edilmiştir.

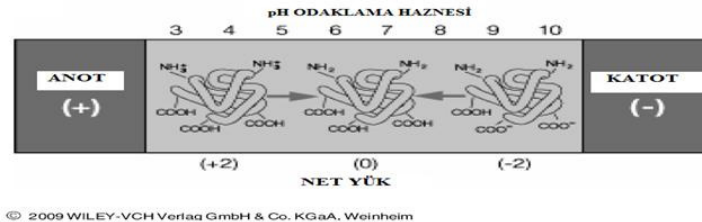
Proteomik çalışmalarda numune hazırlama protokolü, özellikle normal ve hastalıklı örneklerin yaygın kullanımında sonuçları direkt etkilemektedir [73]. Yapılan ön çalışmalarda farklı serum ayırma protokolleri denenmiş en iyi görüntünün alındığı yöntem materyal metotda açıklanmıştır. Numune hazırlamanın proteomik çalışmalar için son derece önem teşkil ettiği göz önüne alındığında -80°C ' den çıkarılmış kan serumlarının 10 dakika buz içerisinde konarak oda sıcaklığına getirilmeye çalışılmasıyla numunede hiçbir değişiklik meydana gelmemektedir [80].

Serum; trigliserit, fosfolipid ve steroller gibi lipid türlerini farklı konsantrasyonlarda içermektedir. Lipidler immünoazaltma ve 2-DE prosedürlerini etkilediği için numune hazırlama işleminde serumun yağlarından arındırılması (delipidation) gerekmektedir [79]. Bu işlem protein kaybı kabul edilebilir düzeyde 4 farklı şekilde yapılmaktadır. İlki bütanol/di-izopropil ether karışımı [81] kullanılarak, ikincisi metanol/klorofom karışımı [82], üçüncüsü PHM-L LOPOSORB™ absorbent, (EMB Biosciences, an affiliate of Merck, San Diego, CA, USA) kiti ile ve sonuncusu en kolay uygulananı ise serumun 15 000 x g de 15 dakika santrifüj [79] edilmesidir.

Çalışmada yapılması planlanan 2D-PAGE meme kanseri literatüründe en çok kullanılan [46] ve binlerce proteini tek bir deamidasyon sonucunda oluşan izoformları birbirinden ayıracak kadar hassas çözünürlükte ve bu işlemi tek bir matrikste gerçekleştirebilecek [53] bir proteomik ayırım tekniği olmasından dolayı benimsenmiştir. 2D-PAGE’ de proteinler birbirinden bağımsız iki fiziksel ve kimyasal parametreye göre ayrılır.

- 1) Proteinlerin İzoelektrik noktasını temel alan izoelektrik odaklamadır.
- 2) Proteinlerin molekül ağırlığını temel alan PAGE’ dir [46].

Tek boyutlu jel elektroforezinde (1D-PAGE); protein örneği DTT gibi indirgeyici ve SDS içeren yükleme tampon ile muamele edilirler [46]. Birinci boyut yani izoelektrik odaklamada proteinler; izoelektrik noktası farklarına göre ayrılırlar (Şekil 2.27). İkinci boyut yani SDS-PAGE de ise proteinler molekül ağırlığı farklarına göre ayrılırlar. Molekül ağırlığı büyük olanlar küçük olanlara göre jelde daha yavaş yürüdüğü için protein profilinin üst kısmında yer alırlar. Molekül ağırlığı düşük olanlar ise haritanın alt kısımlarında konumlanırlar.



Şekil 2.27. IEF pH odaklama haznesi

Meme kanserinde 51 tane serum örneğinden abundant proteinler filtrelenerek yapılmış bir çalışmada ekspresyon haritaları sağlanmış ve bu haritalar “zoom” lanmış jeller

olarak tanımlanmıştır. pH 3-10 aralığında filtreleme işlemi yapılmadan ~700, yapılıncı ~1000 protein görülmüştür. Fakat; üç farklı pH aralığında zoomlanmış jeller değerlendirildiğinde ~2000 protein görünür hale getirilmiştir [83]. Bu çalışmada; bulunan proteinler tanımlanmış olsaydı hastalık spesifik proteinler belirteç olarak kabul edilebilirdi.

Meme kanserli ve normal meme dokusu temel alınarak yapılan karşılaştırmalı proteom analizi çalışmasında, 2-DE (pH 5-8) ve MALDI-Tof devamında SIENA-2DPAGE veritabanları kullanılmış ve 15 farklı spot bulunmuştur. Bunların 5 tanesi (serum albümin, IgG ağır zincir, IgG hafif zincir, apoA-I, α -1-antitripsin gibi) meme kanserli dokuda ekspresyonu az çıkmıştır. 10 tanesi (78 kDa Glukoz-regüle protein(GRP78), süperoksit dismutaz (SOD), Prealbümin (TBPA), Transgelin 2, Elongation faktör 1-beta(EF-1-beta), Cathepsin D, TCTP, SMT3A, RPS12 ve PSMA 1) fazla çıkmıştır. Çalışmanın sonucunda alpha-1-antitripsin, EF-1-beta, Cathepsin D, TCTP, SMT3A, RPS12 ve PSMA1 belirteçleri ilk defa bu çalışmada meme kanseri için ifade edilmiştir [43]. Peroxiredoxin, HSP70, Enolaz, protein disülfid izomeras ve α -1-antitripsin gibi proteinlerin ekspresyon farklılıklarının da meme kanseri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [84].

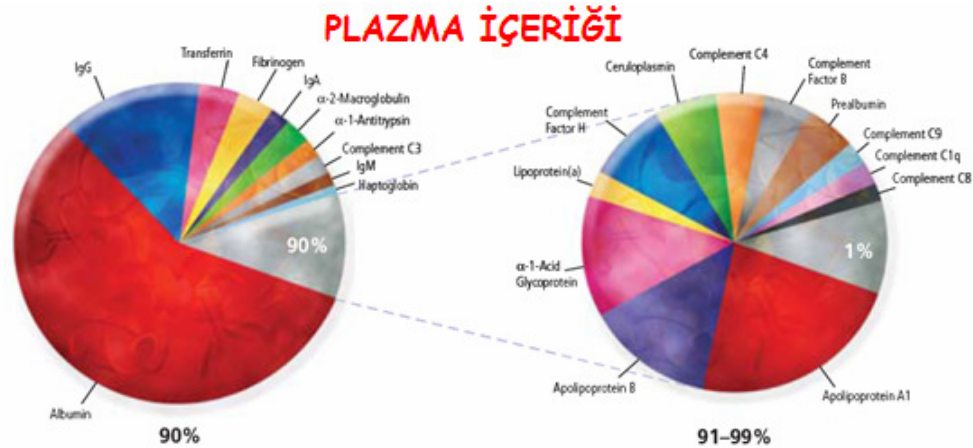
T47D meme kanseri hücrelerinde 2-DE kullanılarak yapılan bir çalışma sonucu ise 17 β -estradiol, 4-hidroksitamoksifen, EM-652, calreticulin, SYAP1, CDBP2, NAP1L1, 3-PHGDH, tarafından regüle edilebilen altı farklı protein bulunmuştur [85]. Annexin-5 ve 1, LDH-B, GST-pi ve COMT metastatik meme kanseri göstergesi olabildiği ve UCH-L1 invazif meme kanseri göstergesi olabildiği de yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir [86]. Meme kanserli (DCIS ve IDCA) ve normal meme dokusunda yapılan çalışma sonucu L-plastin, Annexin V ve 78 kDa glukozla ilgili proteinin (GRP78) ekspresyonları farklı bulunmuştur [46].

Meme kanseri için CA 15-3, BR 27.29 (CA27.29), karsinoembriyonik antijen (CEA), doku polipeptit antijen, doku polipeptit spesifik antijen ve HER-2 gibi çoklu serum temelli tümör belirteçleri de tanımlanmıştır. Bunlardan en çok kullanılanı CA 15-3 ve CEA' dır. En az kullanılanı ise CA27.29 (BR 27.29), doku polipeptit antijen (TPA), doku polipeptid spesifik antijen (TPS) ve HER-2' dir. Erken hastalık teşhislerindeki tekrarlanabilirlik meme kanserinin erken teşhisi için serum belirteci kullanımını

azaltmaktadır [87]. Örneğin; CA 15-3 konsantrasyonu evre I hastasında % 10, evre II' de % 20, evre III' de % 40 ve evre IV hastasında % 75 artmaktadır. American Society of Clinical Oncology (ASCO)' ya göre CA 15-3 konsantrasyonu 5-10 kat artarsa metastatik bir hastalık alarm vermektedir. Fakat düşük konsantrasyonları metastaz oluşturmamaktadır [88].

2.4.1. Serum Proteinleri

Kan; atardamar, toplardamar ve kılcal damarlardan oluşan damar ağının içinde dolaşan; akıcı plazma ve hücrelerden (alyuvar, akyuvar ve kan pulcukları) meydana gelmiş kırmızı renkli hayati bir sıvıdır. Kan plazması, kanın %55'ini oluşturan sıvı kısımdır. Kan plazmasının ise %90'ını su ve %10'unu suda çözünmüş katı maddeler oluşturur. Kan plazmasındaki çözünmüş katı maddelerin büyük çoğunluğu proteinlerden meydana gelmiştir. Sağlıklı erişkin bir insanda kan plazma ve serumunun total protein düzeyi ortalama 7 g/100 ml kadardır ki bunun 3,5-5,0 g/100 ml kadarını serum albümin, 2,5-3,2 g/100 ml kadarını globülinler oluşturur. Plazmada bulunan antikoagülanların deney sonuçlarını bazen etkilemesinden dolayı birçok testte serum tercih edilmesine rağmen plazma serumdan daha stabil gözükmektedir [89]. Plazma ve serumda yoğun olarak bulunan ve düşük molekül ağırlıklı proteinleri baskılayan bol proteinler (abundant) mevcuttur. Bu proteinler şekil 2.28' de gösterilmiştir.



Şekil 2.28. Kan plazması içeriği ve yüzdeleri [90].

Bu baskın proteinlerden bazılarının açıklamaları aşağıdadır.

Serum Albümin:

Serum proteinlerinin en yüksek konsantrasyona sahip olan 585 aminoasit kalıntısından oluşmuş, molekül ağırlığı 69 000 (69 kDa) olan proteindir. Karaciğer parankim hücrelerinin pürüklü endoplazmik retikulumlarındaki ribozomlarda sentezlenir; sentez hızı diyet proteini ve serum albümin seviyesi ile düzenlenir. Taşıyıcı bir protein olan serum albümin, karbonhidrat içermez. Albümin kanın viskozitesini etkileyen ve onkotik basıncın devamlılığını sağlayan proteindir. Alkol, kronik hepatit ve protein malnütrisyonu, serum albümin sentezini azaltır [91, 92].

İmmünoglobülinler:

Bütün memelilerin serum ve doku sıvılarında bulunan % 3-15 oranında karbonhidrat içeren glikoprotein yapısındaki proteinlerdir. Vücuda giren yabancı maddelere yanıt olarak B lenfositlerinde veya plazma hücreleri denen türevlerinde sentezlenirler. İmmünoglobülinlerin moleküler yapılarındaki polipeptit kısmı antikor molekülleri ile ilişkili tüm biyolojik özellikleri içermektedir. Bu proteinlerin bazıları hücrelerin yüzeylerinde bulunurlar ve reseptör görevini yaparlar; diğerleri kan ve vücut sıvılarında serbest halde bulunurlar. Ağır ve hafif zincirler olmak üzere iki türü vardır. Kronik karaciğer hastalığı olanlarda, akut hepatitte ve sirozu olanlarda IgG seviyeleri yüksektir. Mesane tümörlü hastalar temel alınarak yapılan bir çalışmada serum immünoglobülin protein düzeyleri 20 tümörlü hasta ve 41 kontrol grubu değerlendirilerek çalışılmış ve IgA, IgG, IgE, IgM düzeylerinin belirlenmesi primer mesane kanserinin tanı ve takibinde faydasız olduğu görülmüştür [93].

Prealbümin:

Serum protein elektroforezinde anoda albüminden önde göçen fraksiyondur. Karaciğerde sentezlenmektedir. Malign tümörlerde, oral kontraseptif kullananlarda, gebelerde, inflamatuvar olaylarda, malnütrisyonda, karaciğer hastalıklarında serum prealbümin düzeyi azalır [91].

α_1 -Antitripsin:

Karaciğer parankim hücreleri, mononükleer seri hücreler ve alveoler makrofajlarda sentezlenen önemli bir serin proteaz inhibitörüdür. 394 aminoasitten oluşmuş tek bir polipeptit zinciri vardır, moleküler ağırlığı 55 kDa kadardır. Oral kontraseptif kullananlarda, gebelikte, inflamasyonda, akciğer, kolon, rektum ve mide kanserlerinde serum düzeyi artar [91].

α 1-Antikimotripsin:

Molekül ağırlığı 68 kDa kadar olan önemli bir proteaz inhibitörüdür. Hızlı cevap veren akut faz reaktantıdır [91].

 α 1-Asit Glikoprotein:

Karaciğerde ve karaciğer dışı dokularda özellikle bazı tümörlerde sentezlenen, molekül ağırlığı 40 kDa kadar olan ve karbonhidrat içeriği %40-45 olan bir glikoproteindir. Akut inflamatuvar hastalıklar, yüksek ateş halleri, ameliyat sonrası, metastaz yapmış neoplazmlarda serum α ₁-asit glikoprotein düzeyi artar. Albüminin azaldığı durumlarda da bu proteinin düzeyi azalır [91].

Seruloplazmin:

%10 civarında karbonhidrat içeren bakırlı bir proteindir, yapısında tek bir polipeptit zinciri bulunan proteinin molekül ağırlığı 90 kDa kadardır. Organizmada antioksidan olarak görev almaktadır [91, 92].

 α 2-makroglobülin:

Karaciğerde ve retiküloendoteliyal sistem hücrelerinde sentez edilen proteinin karbonhidrat içeriği %10' dan azdır. Mol ağırlığı 95 kDa kadardır. Önemli proteaz inhibitörlerinden biridir [91].

Haptogloblin:

Karaciğerde sentezlenen ve eritrosit dışındaki serbest hemoglobini bağlayan plazma glikoproteindir. Damar içi hemoliz ve yaygın karaciğer harabiyeti durumlarında serum düzeyi azalır [91].

Hemopeksin:

Karaciğerde sentezlenen bu protein yüksek miktarda tirozin ve triptofan içeren tek bir polipeptit zinciri halindedir. %20 oranında karbonhidrat içeren bir glikoproteindir [91].

Transferrin:

Tek bir polipeptit zincirinden oluşmuş, molekül ağırlığı 77 kDa olan bir glikoproteindir. Vücutta serbest halde toksik etkili olan demir, organizmada gerek duyulan dokulara taşınmak üzere transferin ile birleşir ve toksisitesi azalır. Karaciğerde, az miktarda da retiküloendoteliyal sistemde, testis ve overlerde sentezlenir [91].

Apolipoproteinler:

Kan dolaşımında yağları taşıyan lipoprotein yapısındaki proteinlerdir. Lipitler tek başlarına suda çözünmezler, buna karşın apolipoproteinler hem lipitlere bağlanabilirler hem de suda çözünebilirler. İnce bağırsakta sentezlenen apolipoproteinlerin düzenlenmesi başlıca besindeki yağ miktarıyla ilişkilidir. Karaciğerde apolipoprotein sentezi ise çok çeşitli etmenlere bağlıdır: gıda içeriği, hormonlar (insülin, glukagon, tiroksin, östrojenler ve androjenler), alkol kullanımı ve çeşitli ilaçlar bunların başlıcalarıdır [91, 92].

2.4.2. Serumun lipid ve lipoproteinlerden arındırılması

Serumun oda sıcaklığında 15000 g' de 15 dakika santrifüj edilmesi sonucu lipidler atılmak üzere bir katman oluşturur. Santrifüj işlemi; trigliserit-zengin şilomikronları ve düşük yoğunluktaki lipoproteinleri gidermektedir [94]. Bu prosedür; protein ayırım metotlarında lipidlerin bozucu etkisini azaltmada etkilidir.

2.4.3. Serumda bol bulunan (Abundant) proteinlerin azaltılması

Serum ve plazmada bol bulunan proteinlerin azaltılması için kullanılan ticari olarak temin edilebilen iki farklı kit deneyimizde kullanılmıştır.

Bunlar;

Kolon 1: “SIGMA PROT20 ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion Kit”

Kolon 2:“BIORAD Aurum™ Serum Protein Mini Kit” isimli immüno-azaltma kitleridir.

Kolon 1; 20 tane bol (abundant) proteine duyarlıdır ve bunlar Tablo 2.7’ de listelenmiştir. Kolon 2 ise; sadece albümin ve immunoglobülinlere duyarlıdır.

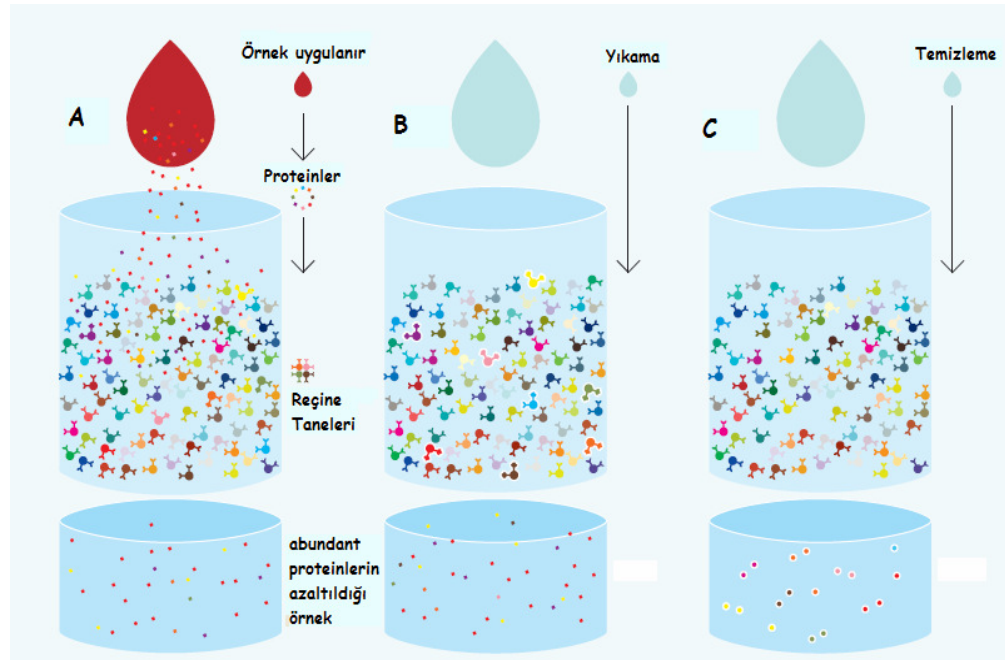
Kolon 1' de ki; kolon içerisinde yer alan reçine, serumda bulunan 20 abundant (bol) proteini antijen/antikor ilişkisi ile tutmaktadır ve serumdaki miktarları azaltılmaktadır. Şekil 2. 29A’ da gösterildiği gibi serum örneği reçine dolu kolona ilave edilip 20 dakika inkübasyon sonrası santrifüj edilmektedir, böylece arındırılmış örnek alt kısma geçirilmektedir. Bol (abundant) proteinler reçine taneleri tarafından tutulmuştur. Şekil 2.29B’ de gösterildiği gibi yıkama solüsyonu aracılığıyla reçineye tutunmamış kolonda asılı kalan proteinler alt kısma geçirilmektedir. Böylece serum abundant (bol)

proteinlerinden % 97 oranında verim sağlanarak arındırılmış olmaktadır. Şekil 2.29C’ de gösterildiği gibi temizleme solüsyonu aracılığıyla kolondaki reçineye tutunmuş olan abundant (bol) proteinler de başka bir tüpe aktarılmaktadır. İstenilirse bu kısımda da inceleme işlemleri uygulanabilmektedir.

Tablo 2.7. Kolon 1’ in duyarlı olduğu 20 tane bol (abundant) protein

Albümin	IgAs	Komplement C3	Apolipoprotein B	Komplement C1q
IgGs	α -2-Makroglobülin	Haptoglobülin	Asit-1 Glikoprotein	IgDs
Transferrin	IgMs	Apolipoprotein A1	Seruloplasmin	Prealbumin
Fibrinojen	α -1-Antitripsin	Apolipoprotein A2	Komplement C4	Plasminojen

Kolon 2’ de aynı prensiple çalışmaktadır, tek farkı sadece albümin ve immunoglobülinlere duyarlı reçine taneleri içermesidir.



Şekil 2.29. Kolon içerisinde gerçekleşen antijen/antikor ilişkisi

2.5. İki Boyutlu Elektroferez

2D-Elektroferez her tip hücre proteinlerinde kullanılabilir (bitki, mikroorganizma, hayvan, hücre, doku kültürleri vb.). Genel olarak;

- ➔ Bir adımda protein izolasyonu
- ➔ Kompleks protein karışımlarının ayrılması
- ➔ Kompleksliğin derecesinin belirlenmesi (heterojenlik)
- ➔ Genetikçe polimorfik materyallerin belirlenmesi
- ➔ İzoelektrik nokta ve molekül kütlesi belirlenmesi
- ➔ Kalite kontrol ve protein saflığının analizi amacıyla kullanılır.

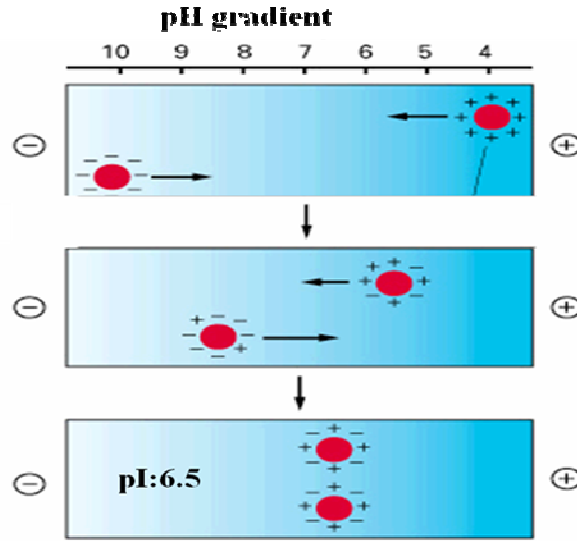
İki yönlü elektroferez (2-DE) prensipte iki önemli ayırma tekniğinin kombinasyonudur.

1. Boyut; IEF, pH gradientinde yüke bağımlı ayırma ve 2.boyut ise moleküler kütleye bağımlı bir ayırma tekniği olan SDS-PAGE' dir. Her bir teknik kendi başına 100 bileşiği ayırma kapasitesine sahipken, birleştiklerinde ayırma teorik olarak 10^4 polipeptiddir.

2.5.1. İzoelektrik Odaklama (IEF) (Birinci Boyut)

İzoelektrik odaklama proteinlerin sürekli bir pH gradientinde izoelektrik noktası farkına göre ayrılması temeline dayanır. Bunun için; “Immobilize pH Gradient (IPG)” şeritlerin kullanımı yaygındır. pH gradienti poliakrilamid matriks fiberlerine kopolimerizasyon ile oluşturulur. Bu işlem “immobiline” adı verilen bir seri zayıf asit ve bazın tampon olarak kullanılması ile gerçekleştirilir. Amfolitler polimerizasyon öncesi asetat üzerindeki jel solüsyonuna karıştırılırlar ve polimerizasyondan sonra jel içinde gelişigüzel dağılırlar. Elektriksel alan uygulanmasıyla proteinlere bağlı olarak küçük amfolitler yüklerine göre uygun elektroda doğru hareket ederken karışımdaki her protein kendi izoelektrik noktasına kadar jel üzerinde sürüklenir ve durur (Şekil 2.30).

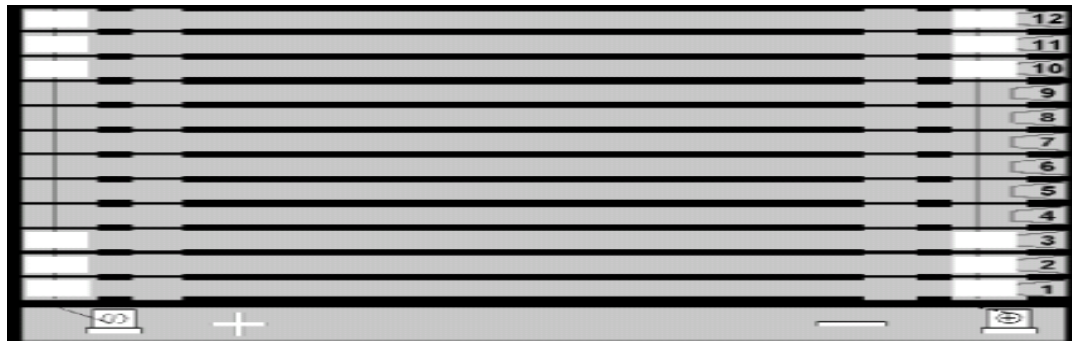




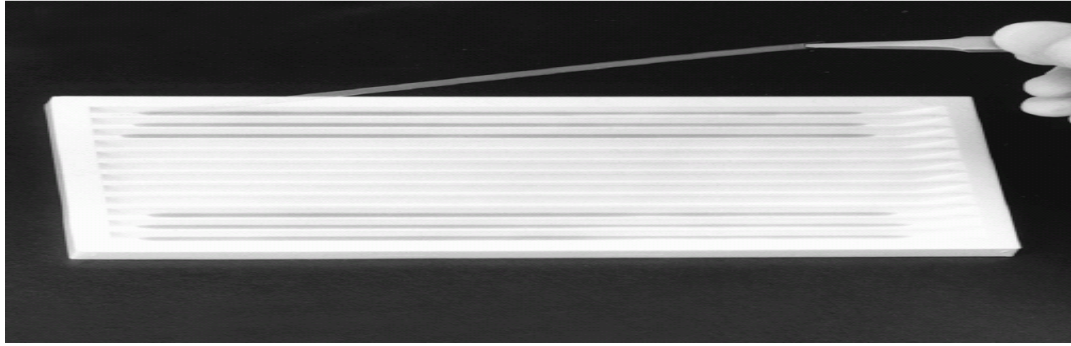
Şekil 2.30. Proteinlerin izoelektrik noktalarına göre pH gradientinde sürüklenmesi

IPG' lerin kullanılması yüksek rezolüsyon, tekrarlanabilirlik ve fazla miktarlarda proteinlerin uygulanması açısından önerilmektedir. IPG şeritler farklı pH aralıklarında ticari olarak temin edilebilmektedir. (3–10, 3–6, 4–7, 5–8, 7–10, 3.9–5.1, 4.7–5.9, 5.5–6.7 ve 6.3–8.3)

Kuru IPG jel şeritleri uygulama öncesi; 7M üre, 2M tiyoüre, %4 CHAPS, %1 Amfolit, 10mM DTT ve BBF içeren solüsyonda rehidratasyona bırakılmaktadırlar. Rehidratasyon işlemi aktif veya pasif olarak yapılabilir. Aktif rehidratasyon anot/katot telli tablalarda 50 V' luk sabit akım geçirilerek gerçekleştirilir. Pasif rehidratasyon ise telsiz tablalarda oda sıcaklığında gerçekleştirilir (Şekil 2.31 a, b).



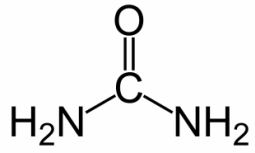
Şekil 2.31. (a) Aktif rehidratasyonda ve izoelektrik odaklamada kullanılan anot/katot telli tabla



Şekil 2.31: (b) Pasif rehidratasyonda kullanılan telsiz tabla

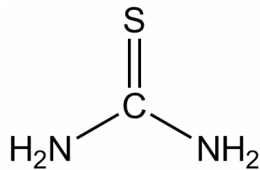
Rehidratasyon basamağında kullanılan kimyasalların proteinler üzerindeki etkileri aşağıda verilmektedir.

ÜRE:



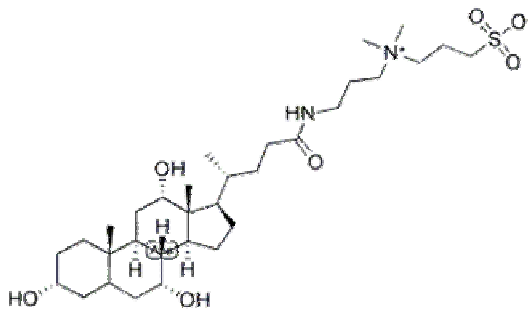
Proteinlerin denatüre edilmesi ya da denatüre olmuş veya çözülebilir proteinler için yumuşak bir çözücüdür. Hidrofobik ilişkileri kırmaktan çok hidrojen bağlarını kırmada etkilidir.

TİYOÜRE:



Konformasyon değiştirici güçlü denatüranttır. Proteinlerin çözünürlüğünü ve geri dönüşümünü arttırmaktadır. Aynı zamanda çözünürlüğünü azaltmaktadır.

CHAPS; 3-([3-cholamidopropyl]dimethylammonium)-1-propanesulfonate:

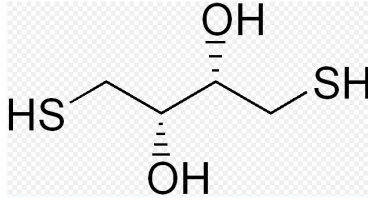


Deterjanlar moleküllerin hidrofobik uçlarına ve diğer bağlar üzerindeki polar uçlara misel oluşturacak şekilde etkimektedir. CHAPS; zwitter iyonik bir deterjandır. Membran proteinlerin çözünmesini sağlamaktadır. Proteinlerin hidrofobik yüzeylerini maskeleyerek

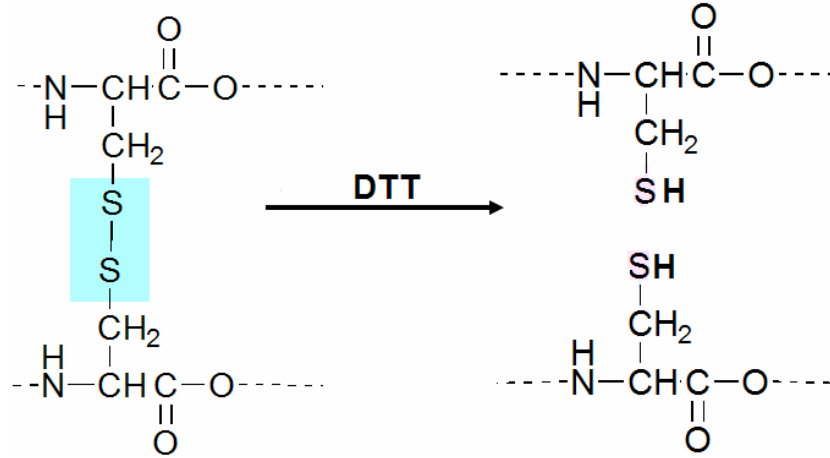
aralarındaki ilişkilerin oluşmasını engellemek ve proteinlerin kendi izoelektrik noktalarında çözünürlüğünü artırmak için eklenmektedir.

AMFOLİT:

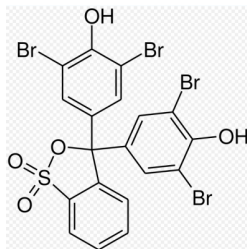
Amfolitler hem asit hem baz gibi davranabilen maddelerdir. Jelde gradient oluşmasına yardımcı olmaktadır.

DTT; Ditiyoeritritol:

Moleküler formülü $C_4H_{10}O_2S_2$ olan indirgeyici bir ajandır. Proteinlerin sistein kalıntıları arasında oluşan disülfid bağlarının indirgenmesinden sorumludur (Şekil 2.32).



Şekil 2.32. Disülfid bağlarının kırılması

BBF; Bromofenol blue(3',3'',5',5''-tetrabromophenolsulfonphthalein):

BBF, agaroz jel elektroforezi ve poliakrilamid jel elektroforezinin görüntülenmesinde bir renk belirteci olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda elektroforezin kolay izlenebilmesini sağlamaktadır.

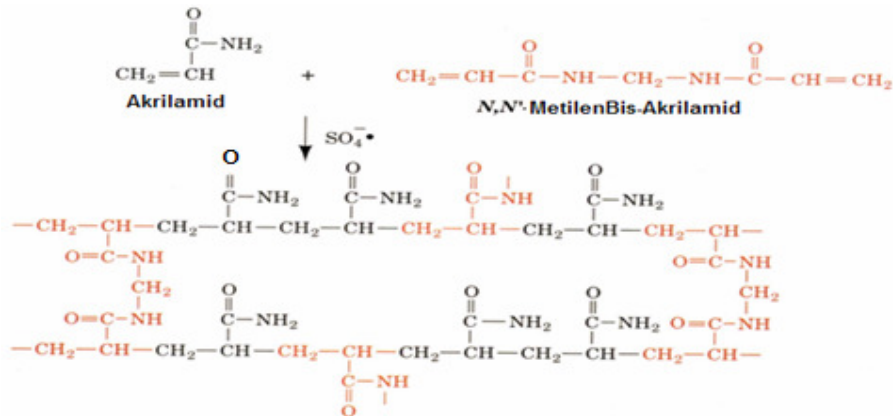
2.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) (İkinci Boyut)

Elektrofrez; ortam pH' sına göre, (+) ya da (-) olarak yüklenen kolloid taneciklerin, bir elektrik alanında, kendi net yüklerine zıt yük taşıyan anot veya katoda doğru farklı hızlarda sürüklenmeleri prensibine dayalı bir tekniktir. SDS-PAGE sırasında proteinler uygulandıkları bölgede hiçbir odaklama olmaksızın hareket ederler. Elektrofrez, genellikle poliakrilamid jel üzerinde yapılmaktadır. Kullanılan poliakrilamid jel konsantrasyonu etkin ayırmayı sağlayan olgudur (Tablo 2.8).

Tablo 2.8. Proteinler için PAGE sisteminde uygulama sınırları

Jel Yüzdesi	Ayrıştırma Kapasitesi (KDalton)
% 8	24 - 205
% 10	14 - 205
% 12	14 - 210

Jel sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur ve örnekler bu jel üzerinde yürütülür. Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yan yana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur. Böylece ağımsı bir yapı meydana gelmektedir (Şekil 2.33). Polimerleşme derecesi; sıcaklık, pH, amonyum per sülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) miktarına göre farklılık göstermektedir. Polimerleşme için serbest radikal oluşumuna sebep olan APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak rol oynamaktadır.



Şekil 2.33. Akrilamid ve N,N'-MetilenBis-Akrilamid' in polimerleşmesi

3. BÖLÜM

MATERYALLER VE YÖNTEMLER

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Bio-Rad, Merck, Fluka, Sigma, Applichem, Amresco, Molekula ve Fermentas gibi firmaların maddeleridir. Arındırma kolonu, dengeleme tamponu ve yıkama tamponu bol (abundant) proteinleri azaltma işleminde kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallardan; BSA protein miktar ölçüm tayininde; üre, tiyoüre, CHAPS, amfolit, DTT ve BBF rehidratasyon tamponunda; üre, Tris-HCl, SDS, gliserol, DTT ve iyodoasetamit dengeleme tamponlarında; HCl, akrilamid, SDS, ultra saf su, amonyum persülfat ve TEMED; SDS-PAGE jel dökümünde; tris baz, glisin ve SDS ise SDS-PAGE tamponunda; asetik asit, methanol ve saf su fiksatif solüsyonunda; Sypro-Ruby boyası jel boyama işleminde; asetonitril, amonyumbikarbonat, formik asit ve tripsin enzimi proteinlerin peptid kesimlerinde kullanılmıştır.

3.2. Deneylerde Kullanılan Araç ve Cihazlar

Deney ve analizlerde kullanılan araç ve cihazlar aşağıda verilmiştir.

- ❖ İmmüno-azaltma kit 1(SIGMA PROT20 ProteoPrep®20 Plasma Immunodepletion Kit)
- ❖ İmmüno-azaltma kit 2 (BIORAD Aurum™ Serum Protein Mini Kit)
- ❖ Protein Miktar Ölçüm Spektrometresi (BIO-RAD SmartSpec 3000)

- ❖ Protein Miktar Ölçüm Spektrometresi, V-tabanlı plakalarda (ELISA spektramax-M2)
- ❖ İzoelektrik odaklama, IEF (BIO-RAD Protean IEF cell)
- ❖ Elektroforez tankı, büyük jel için (BIO-RAD; Protean Plus Dodeca Cell)
- ❖ Güç Kaynağı (BIO-RAD Powerpac 1000)
- ❖ Dodeca sirkülasyon pompası (BIO-RAD variable speed pump)
- ❖ Dodeca soğutucu (POLYSCIENCE su banyosu)
- ❖ Görüntüleme sistemi(BIO-RAD VersaDoc)
- ❖ Protein spot kesim robotu (BIO-RAD, Spot Cutter)
- ❖ Maldi-TOF kütle spektrometresi (Waters)

Ayrıca deneyler süresince;

- ReadyStrip IPG Strip Instruction Manual (BIO-RAD)
- Wicks Kâğıdı (BIO-RAD)
- Jel dökme aparatı (BIO-RAD Protean Plus multi-casting Chamber)
- Çalkalayıcı (HEIDOLPH unimax 1010)
- İnkübatör (MAJOR SCIENCE dry both)
- Mikropipet (GILSON)
- Vortex (LABNET)
- Santrifüj (BECKMAN COULTER microfuge 18 centrifuge)
- Soğutmalı santrifüj (SIGMA)
- Dondurucu, -20°C, -80°C (SANYO) kullanılmıştır.

3.3. Deneylerde Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Örneklerin elde edilmesi

Erciyes Üniversitesi Mehmet Kemal Dedeman Onkoloji Hastanesi Radyasyon Onkolojisi bölümünden alınan meme kanseri teşhisi konmuş tedavi almayan, tedavi alan ve tedavi olmuş kadınlardan ve meme kanseri teşhisi konmamış ailesinde ve kendisinde meme kanseri öyküsü olmayan sağlıklı grup kadınlardan 5 ml kan ağzı kapalı katkısız tüplere alındı. Kanlar iki saat buz içerisinde pıhtılaşması beklenildikten sonra 1000g (3000 rpm)’

de 30 dakika +4°C' de santrifüj edilerek serum elde edildi. 100 µl' lik kısımlara ayrılan örnekler; -20°C' de dondurulduktan sonra soğuk zincir bozulmadan kuru buz içerisinde Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarına iletildi. Örnekler kullanıma kadar -20°C' de muhafaza edildi.

3.3.2. Serumun lipidlerden arındırılması (Delipidation)

-20°C' den çıkarılan serum örnekleri buz içerisine konduktan sonra oda sıcaklığına getirilmesi sağlandı. Ardından 15 000 g' de 15 dakika santrifüj edildi. Sıvının üst kısmında toplanmış olan lipid tabakası kenarından ince pipet ucu ile girildikten sonra alt kısımdaki berrak serum temiz bir tüpe alındı. Bu işlem ile kan serumu lipidlerinden arındırılmıştır.

3.3.3. Serumdaki abundant proteinlerin azaltılması

Kolon 1 kullanım protokolü:

HAZIRLIK:

- € Dengeleme ve yıkama tamponlarını koyacağımız beherlerin çok temiz olması gerektiğinden Alconox ile birkaç defa yıkadıktan sonra saf su, ardından ultra saf su ile durulandı.
- € Abundant proteinlerin azaltılması işlemi boyunca bütün solüsyonlar ve örnekler buz içerisinde muhafaza edildi.
- +4°C' deki dengeleme tamponu kit içerisinde 10X halde bulunur, kullanım öncesinde 1X' e seyreltildi. (9 kısım ultra saf su/ 1 kısım 10X Tampon)
- Her serum örneği için gerekli son dengeleme tamponu hacmi 5 mL' dir.
- +4°C' deki yıkama tamponu da 10X halde bulunduğu için 1X' e seyreltildi. (9 kısım ultra saf su/ 1 kısım 10X Tampon)
- Her serum örneği için gerekli son yıkama tamponu hacmi 2 mL' dir.

PROSEDÜR:

a) Numune Hazırlama (oda sıcaklığında):

Çalışmada gerekli olan protein miktarı dikkate alınarak, örnekler 1X dengeleme tamponu ile 12.5:1 oranında seyreltildi. Deneyimizde; 64 µL örnek ve 736 µL 1X dengeleme tamponu ile seyreltme sonucu elde edilen son ürün hacmi yeterli geldiği için bu oranda başlanmıştır.

b) Spin X Filtre Temizleme (oda sıcaklığında):

Kolona; 200–250 µL dengeleme tamponu eklendikten sonra, 5000 rpm’ de 30s santrifüjlendi. Ardından; altta toplanan kısım atılmıştır.

c) Numunenin Spin X Filtrelenmesi (oda sıcaklığında):

Tek kullanımlık filtre üzerine (maksimum 500 µL olmak üzere) 400 µL seyreltilmiş örnek ilave edildikten sonra 1000–2000 g’ de 30s santrifüj edildi. Spin X filtreden süzülerek ependorf tüpünün alt kısmına toplanan örnek bu işlemle kolona uygulanmaya hazır hale getirilmiştir.

d) Kolonun Hazırlanması (oda sıcaklığında):

Kolonun; üst kısmındaki vida kapak gevşetildikten sonra altındaki tıpa dikkatlice açılmıştır. (Not: Vida kapak gevşetilmezse kolon materyalinin akmasını önleyen koruyucu madde çıkabilir. Kolonun vida kapağı çalışma süresince sıkı kapatılmaz.) Kolon; 1 haftadan uzun süre kullanılmayacak ise parazit oluşumunu önlemek için içerisine ilave edilmiş olan 300 µL 1X dengeleme tamponundan arındırma amaçlı 1000 g’ de 30s santrifüj edilmiştir. Ardından; kit içerisinde kolona uyumlu vida kapaklı adaptörlü enjektör içerisine 4mL 1X dengeleme tamponu çekildi ve belirli bir hızda kolondan geçirildi. Kolon; 5000 rpm’ de 20s süreyle santrifüjlendikten sonra alt kısım döküldü.

e) Kolona Numune ekleme (oda sıcaklığında):

Temiz bir 2 mL' lik ependorf tüp içerisine yerleştirilen kolona filtre edilmiş örnekten 100µL alınarak pipetlendikten sonra, 20 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır.(Kolonun içerisinde serumda bol bulunan 20 proteine özgü antikorlar bulunur. 20 dakikalık bekleme süresi boyunca bu 20 protein kolonda tutulmakta, diğer proteinler ise serbest halde bulunmaktadır.) Süre sonunda 5000 rpm' de 20s santrifüj işlemi yapıldı.

f) Kolonun yıkanması (oda sıcaklığında):

Kolonda kısmi olarak tutulmuş proteinleri alabilmek amacıyla 2 defa 100' er µL 1X dengeleme tamponu ilave edilerek aynı şekilde santrifüjlendi. Sonuçta; ependorf tüpümüzde 300 µL örnek toplandı. (Tüp, örnek kaybını önlemek amacıyla artık değiştirilmez.)

g) Kolonun Temizlenmesi (oda sıcaklığında):

Kolonda tutulan proteinleri uzaklaştırmak amacıyla 2 mL yıkama tamponu kolondan enjektör yardımıyla belirli bir hızda geçirildi.

h) Kolonun Tekrar Hazırlanması (oda sıcaklığında):

Kolon temizlendikten sonra 4 mL 1X dengeleme tamponu kolondan belirli bir hızda geçirildi. Kolon, 5000 rpm' de 20 s süreyle santrifüjlendikten sonra alt kısım döküldü. Böylece kolon filtre edilmiş örnek ilave edilerek işleme başlanması için hazır hale getirilmiştir. (Her filtre edilmiş 100 µL' lik örnek için e.f.g.h. basamakları tekrarlanır.)

i) Serumda bol bulunan proteinler %95 oranında azaltılmıştır:

Ependorfta toplanmış olan ilk 300 µL' lik kısım %95 arındırılmış kısımdır.

j) Konsantre arındırılmış Serum (2-8°C):

Yoğunlaştırma işleminin yapıldığı 5000 Da MWCO filtre öncelikle 300 µL kadar ultra saf su ile 14000 g' de 15 dakika +4°C' de santrifüj edildi. Ardından; gliserol gibi maddelerden

arındırmak amacıyla yaklaşık 200 µL kadar 1X dengeleme tamponu ile 14000 g' de 45 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Konsantrasyon tüplerine maksimum 500 µL olmak üzere numune eklendi ve yine 45 dakika +4°C' de 14000 g' de santrifüj işlemi uygulandı. İki parçadan oluşan bu filtre sisteminde üst kısımdaki haznede proteinler toplanmıştır.

k) Son Arındırma (oda sıcaklığında):

Konsantre edilmiş serum e.f.g.h. basamakları tekrarlanarak son arındırma işlemine tabi tutulmuşlardır.

l) Arındırılmış Serum (%97 oranında):

% 97 oranında arındırılmış serum örneğinden direkt protein analizine geçilmiştir.

Kolon 2 kullanım protokolü:

- A.** Kolonun kapağı yavaşça açıldıktan sonra alt tıpası dikkatlice kırıldı.
- B.** Kolon 12*75 mm test tüpü içerisine yerleştirildi, 2 dakika akışın bitmesi beklendi.
- C.** Kolona 1 ml bağlama tamponu ilave edildi, akışın bitmesi beklendi ve işlem 2 defa tekrarlandı.
- D.** Kolon boş bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi, 20 saniye 10 000 g' de santrifüj edildi ve toplama tüpü çıkarıldı.
- E.** Kolonun ucuna sarı tıpa takıldı, 2 ml temiz toplama tüpü içerisine kondu. Bu tüpün üzerine "Bağlanmayan (unbound)" yazıldı.
- F.** Örnekten 60 µl ve bağlama tamponundan 180 µl olacak şekilde numune seyreltildi.(Toplam hacim 200 µl olmaktadır.)
- G.** Bu dilüe örnek kolona 200 µl olacak şekilde ilave edildi.
- H.** Kolon hafifçe vortekslendi. 5 dakika sonra tekrar vortekslendi, 5 dakika sonra bir kez daha vortekslendi. En son 5 dakika sabit bekletildi. (toplamda 15 dakika sürmektedir.)
- İ.** Kolonun ucundan sarı tıpa çıkarıldı, bağlanmayan (unbound) yazdığımız toplama tüpüne kolon yerleştirildi ve 20 saniye 10 000 g' de santrifüj edildi.

- J.** Santrifüjden alınan kolon üzerine reçineyi yıkamak için 200 µl bağlama tamponu ilave edildi.
- K.** Tekrar 20 s 10 000 g' de santrifüj edildi.
- L.** Albümin ve IgG' leri içermeyen bağlanmayan (unbound) yazılı tüp arındırılmış örneğimizdir. Diğer toplama tüpümüzde Albümin ve IgG' ler mevcuttur.
- M.** Arındırılmış örnek hacmi fazla olduğundan 5000 Da MWCO filtre tüpleri yardımıyla numune içerisindeki protein konsantrasyonu artırılmıştır.

% 90 oranında albümin ve immünoglobülinlerden arındırılmış serum örneğinden direkt protein analizine geçilmiştir.

3.3.4. Bradford protein miktar tayini

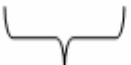
Bio-Rad SmartSpec 3000 (küvetli) ve ELISA spektramax-M2 (kuyucuklu tabakalı) spektrofotometreleri sonuçları karşılaştırmalı olarak kullanılmak amacı ile numunedeki toplam protein miktarı tayininde kullanıldı.

3.3.4.1. SmartSpec 3000 spektrofotometresi ile Bradford protein miktar tayini

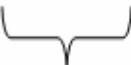
Bovine serum albumin (BSA) ile çeşitli oranlarda standartlar hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bunun için; standartlar 1 mL' sinde 250, 500, 750 ve 1000 µg protein içerecek şekilde ultra saf su ile hazırlandı (stok olarak hazırlanıp, +4°C' de muhafaza edilebilir). 5X halde bulunan protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad, ABD) boya 1X haline dönüştürüldü (örnek sayısına göre miktar belirlenir), 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Örneklerin içerdiği protein yoğunluğuna göre çeşitli konsantrasyonlarda stok örnekler hazırlandı (1:1, 1:5, 1:10, 1:30, 1:50, ..., 1:100, 1:200, ..., 1:500, 1:800). İçerisinde hiç protein bulunmayan kör (blank) suyla hazırlandı. Stok örneklerden ve kördan 10' ar µl alınarak üzeri etiketlenen temiz ependorf tüplere alındı. Ardından üzerlerine hazırlanan 1X boyadan 490' ar µl konuldu (Tablo 3.1). Örneğin boya ile etkileşmesi için 5 dakika beklenildikten sonra Bio-Rad (ABD) Smartspec 3000 spektrofotometrede tek kullanımlık plastik küvetlerde 595 nm' de absorbanslarına göre protein miktarları ölçüldü.

Tablo 3.1. SmartSpec 3000 spektrofotometresi ile Bradford protein miktar tayini değerleri

Kör	Standartlar($\mu\text{g/ml}$)				Örnek dilüsyonları			
Saf su	250 μg	500 μg	750 μg	1000 μg	1/1	1/10	1/50	1/200
10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl
+								
490 μl	490 μl	490 μl	490 μl	490 μl	490 μl	490 μl	490 μl	490 μl
=								
500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl



Daha açık mavi
(az protein)



Daha koyu mavi
(çok protein)

3.3.4.2. ELISA spektramax-M2 (kuyucuklu plaka) ile Bradford protein miktar tayini

Bovine serum albumin (BSA) ile çeşitli oranlarda standartlar hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bunun için; standartlar 1 mL' sinde 250, 500, 750 ve 1000 μg protein içerecek şekilde ultra saf su ile hazırlandı (stok olarak hazırlanıp, $+4^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edilebilir). 5X halde bulunan protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad, ABD) boya 1X haline dönüştürüldü (örnek sayısına göre miktar belirlenir), 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Örneklerimizin içerdiği protein yoğunluğuna göre çeşitli konsantrasyonlarda stok örnekler hazırlandı (1:1, 1:5, 1:10, 1:30, 1:50, ..., 1:100, 1:200, ..., 1:500, 1:800). İçerisinde hiç protein bulunmayan kör (blank) suyla hazırlandı. Stok örneklerden ve kördan 5' er μl alınarak kuyucuklu plakaya alındı. Ardından üzerlerine hazırlanan 1X boyadan 245' er μl konuldu (Tablo 3.2). Örneğin boya ile etkileşmesi için 5 dakika beklenildikten sonra ELISA spektramax (M2) spektrofotometresinde tek kullanımlık plastik kuyucuklu plakalarda 595 nm' de absorbanslarına göre protein miktarları ölçüldü.

Tablo 3.2. ELISA spektramax-M2 (kuyucuklu plaka) ile Bradford protein miktar tayini değerleri

Kör	Standartlar (µg/ml)				Örnek Dilüsyonları			
Saf su	250 µg	500 µg	750 µg	1000 µg	1/1	1/10	1/50	1/200
5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
+								
245 µl	245 µl	245 µl	245 µl	245 µl	245 µl	245 µl	245 µl	245 µl
=								
250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl



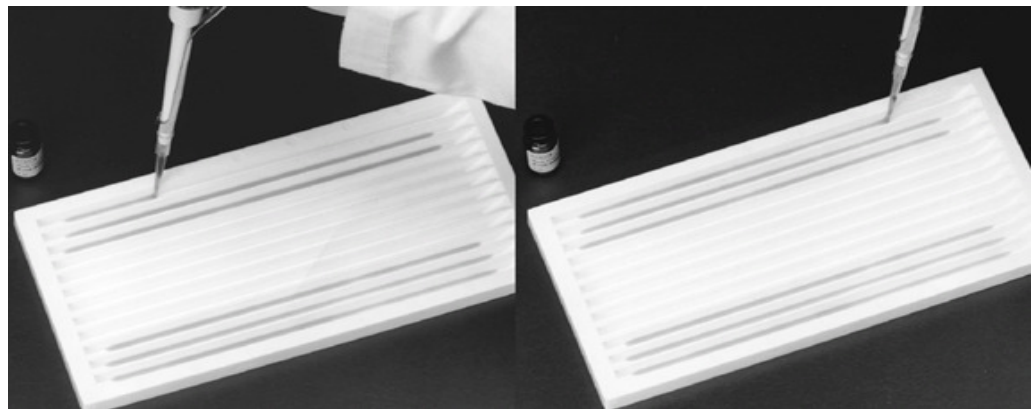
Daha açık mavi
(az protein)



Daha koyu mavi
(çok protein)

3.3.5. Rehidratasyon

Deneyde pH 3–10 aralıklı 17 cm’ lik lineer immobilize pH gradient (IPG) şeritler kullanılarak aktif rehidratasyon işlemi yapıldı. Kullanıma başlamadan önce şeritler oda sıcaklığında 15–20 dakika bekletildi. Alconox ile temizlenmiş 17 cm’ lik anot/katot telli tablanın kanalları iyice kurulandı. Protein miktar tayininin ardından şerit uzunluğuna göre rehidratasyon tamponu ile orantılı olarak örnek karıştırıldı. Deneyde; örnekler 200 µg protein içerecek hacimde şeritlere rehidratasyon tamponu ile karıştırıldıktan sonra kanal köşesinden pipet yardımıyla tek bir çizgi halinde çekildi (Şekil 3.1).

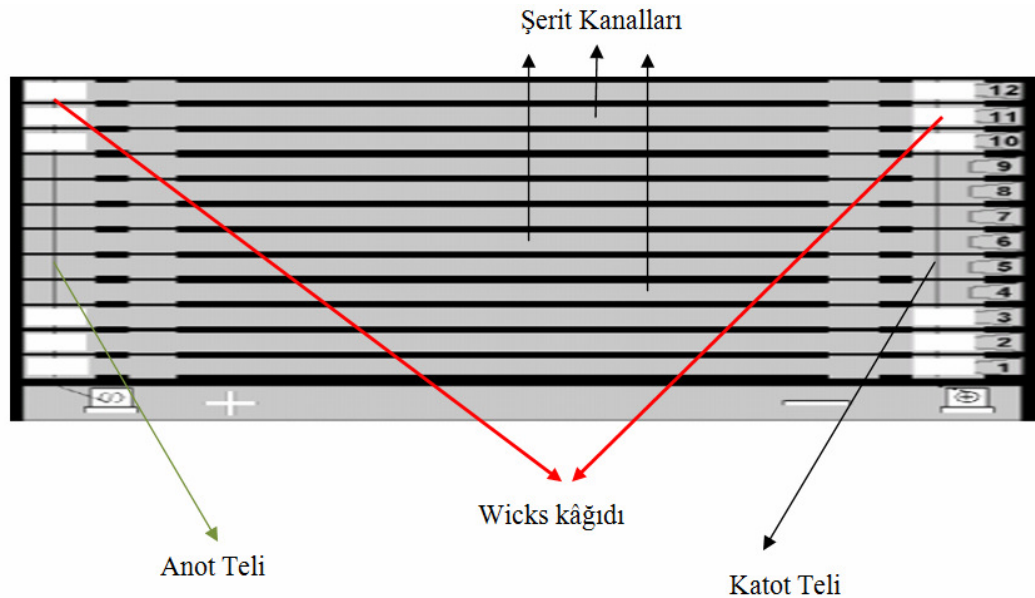


Şekil 3.1. Rehidratasyon tamponunun tabla kanalı boyunca uygulanması

Üzerine; kullanıma hazır olan şeritlerin koruyucu bandı çıkarıldıktan sonra jel kısmı altta olacak şekilde yerleştirildi. Burada; anot/katot yönlenmesine dikkat edildi. Şeritlerin altında baloncuk kalmadığından emin olunduktan sonra buharlaşmayı önlemek amacıyla şeritlerin üzeri kapanacak kadar (3–4 ml) mineral yağ ilave edildi. Aktif rehidratasyon; IEF cihazında 20°C’ de, 50 V’ luk akım altında 12–16 saat sürdü.

3.3.6. İzoelektrik odaklama (IEF) (1. Boyut)

Rehidratasyonu biten örnekler IEF cihazından alındı, buharlaşmayı önlemek için kullanılan mineral yağı süzüldü. Temiz anot/katot telli bir tabla alınarak, akımın düzenli olması ve jeli yakmaması için tellerin üzerine Wicks kağıdı (ince uzun parçalara ayrılmış Whatman kağıdı) konuldu (Şekil 3.2). Wicks kâğıtları 10 µl ultra saf su ile ıslatıldı. Mineral yağından iyice temizlenmiş şeritler jel kısmı altta olacak şekilde anot/katot yönlenmelerine dikkat edilerek tablanın kanallarına yerleştirildi. Yine buharlaşmayı önlemek için şeritlerin üzeri mineral yağ ile kaplandı. Tablanın kapağı kapatılıp, IEF cihazına yerleştirildi. İzoelektrik odaklama; 17 cm’ lik şerit için 20°C’ de akım 250 V’ dan başlayarak, 3 saatte 10000 V’ a, 12- 14 saat içerisinde de 60000 V’ a çıkararak toplamda 15–17 saat kadar sürdü.

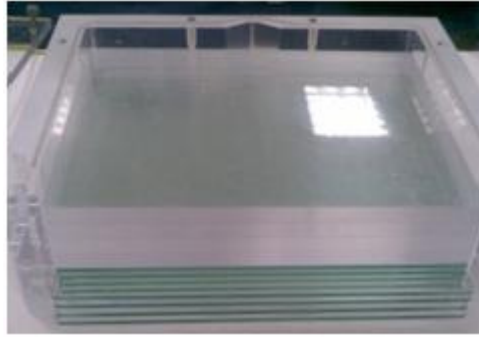


Şekil 3.2. Tablanın kanallarına wicks kağıdının uygulanması

3.3.7. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) (2.Boyut)

İkinci boyuta hazırlamak için izoelektrik odaklaması biten şeritlerin mineral yağı süzüldü. Ardından dengeleme tamponu I (1,5M Tris-HCl pH 8.8, 6M Üre, %20 v/v Gliserol, %2 w/v SDS, %2 DTT) 17 cm' lik şerit başına 6 ml olacak şekilde ilave edilip 15 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Süre bitiminde dengeleme tamponu I süzüldü, şeritler temiz bir kanala alınarak üzerine yine 17 cm' lik şerit başına 6 ml olacak şekilde dengeleme tamponu II (1,5M Tris-HCl pH 8.8, 6M Üre, %20 v/v Gliserol, %2 w/v SDS, %2.5 İyodoasetamid ve iz miktarda BBF) ilave edildi. Dengeleme tamponu II ışığa duyarlı olduğundan tablanın üzeri alüminyum folyo ile kaplandı, 15 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Süre bitiminde dengeleme tamponu II süzülerek, şeritlerin ikinci boyuta hazır hale gelmesi sağlandı.

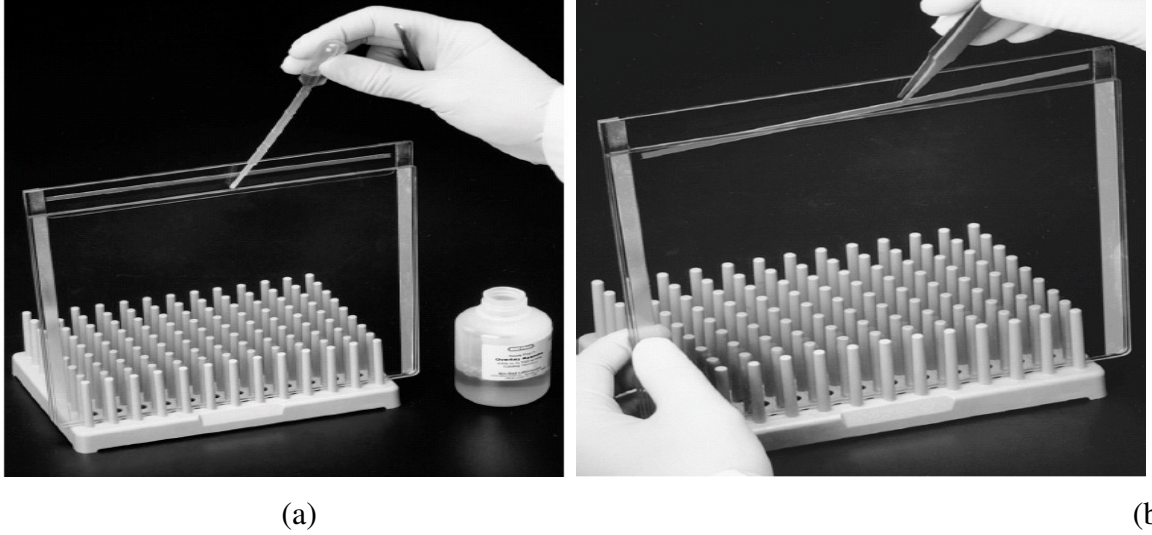
Deneyde; Protean Plus Dodeca Cell, Bio-Rad (ABD) elektroforez tankı ile yürütme yapıldı. Bu amaçla; jel dökme aparatı, camları ve camlar arasına yerleştirilen asetatlar %70 (v/v)' lik etil alkol ile iyice Whatman kâğıdı yardımıyla silindi. Whatman kâğıdının tüy bırakmaması için mümkün olduğunca katlanmadan kullanıldı. Jel dökme aparatı içerisine camlar düzgün bir şekilde yerleştirildikten sonra aparatın kapağı iyice sıkıştırıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Jel dökme aparatı

Daha önce hazırlıklarına başlanmış olan; ayrılma jeli (1.5M Tris-HCl pH 8.8, %40' lık Akrilamid, %10 w/v SDS, ultra saf su, %10 w/v Amonyumpersülfat, Temed) %12' lik

olacak şekilde hazırlanarak yavaşça fazla baloncuk oluşturmada camlar arasına döküldü. Jel üzerindeki hava kabarcıklarını almak için %20 (v/v)' lik izopropilalkol ilave edildi. Polimerleşme için 3–4 saat beklenildi. Whatman kâğıdı ile ayrılma jeli üzerindeki izopropilalkol temizlendi. Üzerine % 4' lük toplama jeli (0.5M Tris-HCl pH 6.8, %40' lık Akrilamid, %10 w/v SDS, ultra saf su, %10 w/v Amonyumpersülfat, Temed) dökülüp, taraklar yerleştirildi. 1–2 saat kuruduktan sonra jel kullanıma hazır hale getirilmiştir. Taraklar çıkarıldıktan sonra açılmış olan protein belirteç kuyucuğuna 10 µl protein belirteci (Fermentas Unstain Marker, ABD) yüklendi. Ardından % 0,5 (w/v)' lik agar (içinde bir miktar izleme boyası-BBF içerir) yardımı ile şeritler toplama jelinin başlangıç kısmına kadar itilerek yerleştirildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. (a) Toplama jeli üzerine agar ilave edilmesi
(b) Şeritlerin toplama jeline kadar itilerek, sabitlenmesi

Agar donduktan sonra camlar Protean Plus Dodeca Cell, Bio-Rad (ABD) cihazına yerleştirildi. 1X SDS tamponu (10X SDS-PAGE yürütme tamponu 250 mM Tris, 192 mM Glisin, 10 g SDS 1L' ye tamamlanarak hazırlanır.) içerisinde 11°C' de 120 V' da 17 saat yürütme yapılarak ikinci boyut ayırım gerçekleştirildi.

3.3.8. Boyama ve Görüntüleme

Proteinlerin iki boyutlu elektroforez sonrası izoelektrik noktası ve moleköl ağırlığı farkına göre ayrıldığını görebilmek için boyama işlemi yapıldı. Jelleri boya ile muamele etmeden önce proteinlerin jele daha iyi tutunması ve jelin daha iyi boyanması için fiksasyon tamponu (%10 (v/v) Methanol, %7 (v/v) Asetik Asit, Ultra Saf Su) ile muamele edildi. Fiksasyon tamponu; 17 cm' lik jele 250 ml tampon olacak şekilde ilave edilip iki saat soğuk bir odada çalkalayıcı üzerinde bekletildi, süre bitiminde fiksasyon tamponu süzöldü. Fiksasyon tamponundan alınan jel üzerine 250 ml Sypro-Ruby boyası, Bio-Rad (ABD) ilave edilip soğuk odada çalkalayıcı üzerinde dört buçuk saat bekletildi. Süre bitiminde Sypro-ruby boyası süzöldü, boyamayı durdurmak ve sabitlemek için tekrardan 250 ml fiksasyon tamponunda 30 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Bu aşamadan sonra saf su içerisine alınan jel kesim aşamasına kadar kontamine olmadan saklanabilmesi için bir damla asetik asit ilave edilerek ağzı kapalı kapta karanlık ve soğuk bir ortamda saklandı.

Boyaması biten jel Bio-Rad VersaDoc görüntöleme cihazına kondu. Bio-Rad PDQuest programı aracılığıyla jelin görüntüsü alındı. Görüntü alımında dikkat edilmesi gereken; jelin alt sınırına konan cetvelin sayılarının rahat okunabilir düzeyde olmasıdır. Ardından; en iyi görüntünün alındığı kamera ayarları ve ışığa maruziyet süresi not edilerek, bütün jellerin görüntülerinin aynı ayarlarda alınması sağlandı.

3.3.9. Jellerin Değerlendirilmesi

Görüntüleri alınan jellerin karşılaştırmalı proteom analizinin yapıldığı kısımdır. Değerlendirme hem görsel hem de bilgisayar programı yardımıyla yapılmıştır. PDQuest 8.0 yazılımı kullanılarak yapılan analizlerde öncelikle jellerin aynı ayarda görüntüsünün alınıp alınmadığı kontrol edildikten sonra jel görüntülerinin aynı parlaklık ve seçicilikte olması sağlandı. Görülen jel resimlerinin aynı boyutta olması sağlanarak homojen bir analize zemin oluşturuldu. Jel görüntülerinde ki zemin ve lekelerin düzeltilmesi işleminden sonra analize hazır hale gelindi. Her bir örnek setinin kendi içinde yapılan analizlerinde otomatik olarak referans jel seçimi yapıldı. Jeller arasında yapılan kantitatif analizle aynı protein spotlarının yoğunluk farklanmaları tespit edildi. Kalitatif analizle jeller arasındaki farklı protein spotları tespit edildi. Elde edilen verilerde bütün protein spotlarının tek tek üzerine

gidilerek üç boyutlu görüntüleri incelendi. Aynı anda karşılaştırılan dört jeldeki spotların yoğunluk farklanmaları tek bir grafikte histogramları oluşturularak gösterildi. Yazılım sayesinde yapılan regresyon analizi dağılım grafikleri yardımıyla miktarı azalan ve artan protein sayıları belirlendi. Diferansiyel protein dağılımı grafikleri ile jel üzerindeki protein dağılım seviyeleri belirlendi. pI ve molekül kütle kalibrasyonu ile spotların pI ile M_A 'sı belirlendi. Bütün yapılan analizler için yüksek jel kalitesi, optimize edilmiş spot dedeksiyon parametreleri ve iç etkileşim değişimlerinin olasılığı otomatik değerlendirmenin kullanımı için gereklidir.

3.3.10. Spot Kesimi

Yapılan subtraktif analiz sonucu hedeflenen protein spotları tespit edildikten sonra seçilen proteinlerin tanımlanabilmesi için jelden çıkarım aşamasıdır. Bu aşamada; öncelikle jel spot kesim cihazına (Spot Cutter, Bio-Rad, ABD) yerleştirildi. PDQuest yazılımı yardımıyla jelin kesim cihazında tekrar görüntüsü alındı. Alınan görüntü üzerinden otomatik veya elle işaretleme yöntemiyle cihaza kesim yerlerinin komutları verildi. Tripsin ile muamelede peptid kaybı yaşanması nedeniyle seçilen proteinlerden fazla nokta kesimi yapıldı. Örneğin; insan serum albümini olduğu düşünülen protein spotu üzerindeki alandan on nokta spot kesimi yapıldı. 96 kuyucuklu temiz V-tabanlı plaka alındı, ultra saf su ile yıkandıktan sonra içerisine 200' er µl olacak şekilde ultra saf su (Merck) konuldu. Plaka cihazda ki yerine yerleştirildikten sonra cihaza uygulaması için verilmiş olan komutlar başlatıldı. Cihaz tarafından kesilen spotlar komut verilirken ki işaretleme sırasına göre kuyucuklu plakaya A1→A12, B1→B12,.....,H1→H12 sırası temel alınarak yerleştirildi. Çalışmada bilinen serum proteinlerinin doğrulanması hedeflendiği için spot kesimleri yaklaşık 2–3 saat sürdü. Jelden yapılan kesim sayısına göre bu süre değişebilmektedir. Hemen tripsin ile muameleye başlanmayacak ise kuyucuklu plaka streç film ile kaplanarak +4°C' de muhafaza edildi.

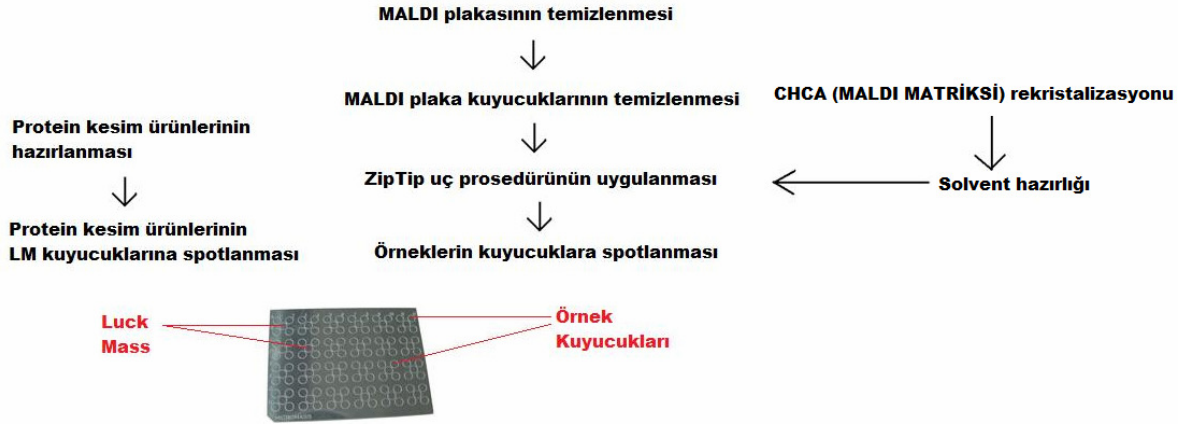
3.3.11. Tripsin Enzimi ile Muamele

V-tabanlı plaka buzdolabında muhafaza edilmiş ise oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Tripsin ile muamele sırasında kullanılan bütün çözeltiler kullanılmadan önce 37°C' de ön ısıya tabi tutuldu. Tripsinizasyon protokolünde çok dikkatli olunmalıdır çünkü jel parçaları

pipet ucuna bulaşarak kaybedilebilir. Bu dezavantaj dikkate alınarak çoklu elektronik pipet yardımıyla kuyucuklardaki su dikkatli bir şekilde çekildi. Kuyucuklar üzerine 50 µl 100 mM NH_4HCO_3 ve 50 µl ACN (Asetonitril) çözeltisi ilave edildi. 10 dakika 37°C’ de inkübasyona bırakıldı. Konulan solüsyonlar pipetle geri çekildi. Aynı işlem bir kez daha tekrar edildi. 50 µl ACN kuyucuklara ilave edildikten sonra 5 dakika 37°C’ de inkübasyona bırakıldı. ACN pipetle geri çekildi. 10 dakika 37°C’ de plaka bekletildi. 50 µl 10 mM DTT (taze hazırlanmış) ve 50 mM NH_4HCO_3 (50:50) karışımından ilave edilip 30 dakika 37°C’ de inkübasyonu sağlandı. 50 µl 55 mM iyodoasetamid(taze hazırlanmış) ve 50 mM NH_4HCO_3 (50:50) karışımından ilave edilip 20 dakika 37°C’ de inkübasyona bırakıldı. Üzerlerine 100 µl ACN eklendi. 5 dakika 37°C’ de bekletildi. Kuyucuklardaki tüm sıvı geri çekildi. 50 µl 100mM NH_4HCO_3 kuyucuğa ilave edildi. 10 dakika 37 °C’ de bekletildi. 50 µl ACN kuyucuklara eklendi, 5 dakika 37 °C’ de bekletildi. Konulmuş olan solüsyonlar pipetle geri çekildi ve plaka 15 dakika oda ısısında bekletildi. 50 mM NH_4HCO_3 içerisinde 5 ng/µl tripsin olacak şekilde çözelti hazırlandı. Her kuyucuğa 30 µl bu çözeltiden ilave edilip 30 dakika oda sıcaklığında beklendi. Plaka üzeri streç film ile kaplandıktan sonra 37°C’ de en az 4,5 saat en fazla 12 saat olmak üzere bekletildi. İşlem sonrası plaka 15–30 dakika soğuması için dışarı çıkarıldı. % 1 (v/v) formik asit ve % 2 (v/v) ACN olacak şekilde ekstraksiyon tamponu hazırlandı. Bu tampondan 30 µl kuyucuklara ilave edildi. Kapağı kapalı bir şekilde 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra kısa süreli bir santrifüj yapıldı. Sıvı faz temiz PZR plakasına çeker ocak altında aktarıldı. 12 µl ekstraksiyon tamponu ve 12 µl ACN kuyucuklara tekrardan eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra sıvı faz yine çeker ocak altında PZR plakasına ilave edildi. Liyofilizatörde ağzı açık bir şekilde PZR plakası 3–4 saat kurutmaya bırakıldı.

3.3.12. Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI) ile protein analizi

MALDI kütle spektrometresi hazırlık şeması aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 3.5. MALDI kütle spektrometresi hazırlık şeması

MALDI plakasının temizlenmesi

MALDI plakasına örnek yüklenmeden önce plakanın çok iyi bir şekilde temizlenmiş olması gerekmektedir.

Yıkama Basamakları:

- 4 adet temiz ve plaka için uygun büyüklükteki beher hazırlandı.
 - 1. Behere % 3-4' lük 100 ml amonyum hidroksit çözeltisi kondu.
 - 2. Behere 100 ml ultra saf su kondu.
 - 3. Behere 100 ml metanol kondu.
 - 4. Behere ise 100 ml asetonitril kondu.
- Plaka 1. beher içerisine kondu (solüsyonun plakayı örtmesi gerekmektedir). En az 5 dk ultrasonik banyoda bekletildi.
- Süre bitiminde plaka 2. behere alındı, en az 5 dk ultrasonik banyoda bekletildi.
- Ardından plaka 3. beher içerisine alındı, ultrasonik banyoda 5 dk bekletildi.
- Son olarak plaka 4. beher içerisine alınarak ultrasonik banyoda 5 dk bekletildi.
- Süre bitiminde ağzı kapaklı bir kutuda kurumaya bırakıldı.

MALDI plaka kuyucuklarının temizlenmesi

Plaka üzerine yükleme yapılacağında kuyucuklar öncelikle (pipet yardımıyla) 3-4 μ l ultra saf su ile yıkandı. Su uzaklaştırıldıktan sonra kurumayı hızlandırmak amacı ile tüm kuyucuklar 1-1.5 μ l asetonitril ile yıkandı.

CHCA(MALDI MATRİKSİ) rekristalizasyonu

Önceden Hazırlanacak Kimyasallar:

- ➔ CHCA, α - siyano-4-hidroksisinamik asit 99% (Sigma Aldrich).
- ➔ %37' lik HCl: 100 ml' lik sigma şişesine 40-50 mL kondu.
- ➔ 0,1 N HCL: 207 μ L %37' lik HCl' den çekildi 25 mL' ye ultra saf su ile tamamlandı.
- ➔ %25'lik Amonyum hidroksit: 100 ml' lik sigma şişesine 40-50 mL kondu.
- ➔ Asetonitril

PROTOKOL (100 mg CHCA için)

1. 100 mg CHCA 1 mL asetonitril içinde çözüldü. Vortekslendi ve ardından 14000 rpm' de 3-5 dakika santrifüj edildikten sonra ACN atıldı.
2. 100 mg CHCA üzerine 10 mL ultra saf su eklendi.
3. 30-60 saniye ultrasonik banyoda sonike edildi.
4. Çözünmesine bağlı olarak 35-60 μ L arasında %25' lik Amonyum hidroksit kondu.
5. 30 s ultrasonik banyoda inkübe edildi.
6. 500-1000 g arasında 10-15 dakika santrifüj edildi.
7. Elde edilen pellet ileride tekrar kullanılmak üzere (üzerine rekristalize edilecek yazılır) için -20°C' ye kaldırıldı. Süpernatant temiz tüpe alındı.
8. Süpernatant üzerine 1.5 damla %36-37' lik HCl asit damlatıldı. 1000 rpm' de santrifüj edildi. Çökme iyi ise süpernatant atıldı. Çökme iyi değil ise tekrar birkaç damla HCl ilave edilip santrifüj edilip, süpernatant atıldı.
9. Pellet üzerine 10 mL 0.1 N HCl ilave edilip, 1000 rpm' de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
10. Pellet üzerine 2. kez 10 mL 0.1 N HCl ilave edilip 1000 rpm' de santrifüj edildi, süpernatant atıldı.

11. Pellete 3-5 mL asetonitril ilave edilip çözüldü Çözünmesi için vortekslendi (sıcak sulu ultrasonik banyo çözünmeyi hızlandırır).
12. Çözünme işleminden sonra çözelti (Darası önceden alınmış) ependorflara 250 µL olacak şekilde alikuatlarına ayrıldı.
13. Ependorflar ağzı açık biçimde 60-80 °C sıcaklıktaki etüve kondu. Sıvı tamamen buharlaşıncaya kadar 30 dakikada bir kontrol ederek kurutma yapıldı.
14. Ependorflar tekrar tartıldı ve matriks miktarları ependorflar üzerine not edilerek -20°C' de saklandı.

Solvent hazırlığı

% 50 ACN, % 50 su ve % 0,1 TFA çözeltisi rekristalize edilmiş CHCA matriksi üzerine 1 mg/ 50 µl olacak şekilde ilave edilerek maldi plakasına peptid yüklenmesi sırasında kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

Protein kesim ürünlerinin hazırlanması

MALDI kütle spektrometresinin kalibrasyonunun yapılmasında molekül ağırlığı bilinen peptid karışımları kullanılabilir. Bunun için; Angiotensin, Substance P, Glu Fib, Renin-14 ve ACTH-18,39 (Adrenokortikotropin hormon) peptitleri kullanılmıştır. Aşağıdaki tabloda peptidlerin molekül ağırlıkları gösterilmiştir. Bu peptitler 1 mg/ml stoklar halinde bulunmaktadır. Bu stok çözeltilerden 10-50 pmol peptid içerecek şekilde karışım hazırlandı ve solvent ile (1:1) oranında karıştırıldıktan sonra MALDI plakasının Luck Mass (LM)' lerine spotlandı.

5 PEPTİD KARIŞIMI	KÜTLE-Da
ANGİOTENSİN	1296,6853
SUBSTANCE P	1347,7360
Glu Fib	1570,6774
Renin-14	1758,9326
ACTH-18,39	2465,1989

ZipTip uç prosedürünün uygulanması

MALDI kütle spektrometresinde yapılacak ölçümlerde kirlilikler önem kazanmaktadır. Dolayısıyla plakaya yükleyeceğimiz örneklerin kirliliklerinden ZipTip (Millipore) uç kullanılarak arındırılmış olması ölçümlerde avantaj sağlamaktadır. Deneyde sadece 5 peptit karışımının yüklenmesi sırasında ZipTip uçlar kullanılmıştır.

ZipTip_{C18} (Millipore) Protokol

SOLÜSYON TÜRÜ	ZipTip Solüsyonları
Hazırlama Solüsyonu	%100 ACN
Numune Hazırlama Solüsyonu	%0,1 TFA in ddH ₂ O (pH<4)
Dengeleme Solüsyonu	%0,1 TFA in ddH ₂ O
Yıkama Solüsyonu	%0,1 TFA in ddH ₂ O (elektrosprey MS için %5 methanol ilave edilebilir)
Temizleme Solüsyonu	%0,1 TFA/ %50 ACN/%50 su (matriksli veya matriksiz)*

*Deneyde matriksli solvent kullanılmıştır.

Protokol

1. Ziptip uç pipete takıldı, 10 µl' ye ayarlandı.
2. Bu uç hazırlama solüsyonu ile 2 defa pipetlenerek yıkandı.
3. Ziptip uç dengeleme solüsyonu ile 2 defa pipetlenerek yıkandı.
4. Spotlanacak 5 peptit karışımının 10 µl' si temiz bir ependorfa pipetle kondu.
5. Ziptip pipet ucu bu ependorfa batırılıp 7-10 defa pipetlenerek, proteinlerin ziptip içerisinde tutulması sağlandı.
6. Yıkama solüsyonunun 10 µl' si standart pipetle temiz bir tüpe kondu.
7. Ziptip uç yıkama solüsyonuna batırılıp 4 defa pipetlenerek kirlilikler yıkandı.
8. 1-5 µl kadar temizleme solüsyonu standart pipetle temiz bir tüpe kondu.
9. Ziptip uç temizleme solüsyonu içerisine batırıldı, kabarcık oluşmayacak şekilde 3 defa pipetlendi.
10. Temizleme solüsyonuna aktarılan peptitler spotlanmaya hazır hale getirilmiştir.

3.3.13. Proteinlerin Tanımlanması

MALDI kütle spektrometresinden alınan m/z değerlerine uyan peptid kütleleri Mascot ve Aldente veri analiz tabanları aracılığıyla tanımlandı. Bu verilerden eşleştiği söylenen proteinlerin veri tabanında verilen moleköl ağırlığı ve pI değerleri 2-DE jelle de karşılaştırılarak tanımlamanın doğruluğu tespit edilerek sonuca ulaşıldı.

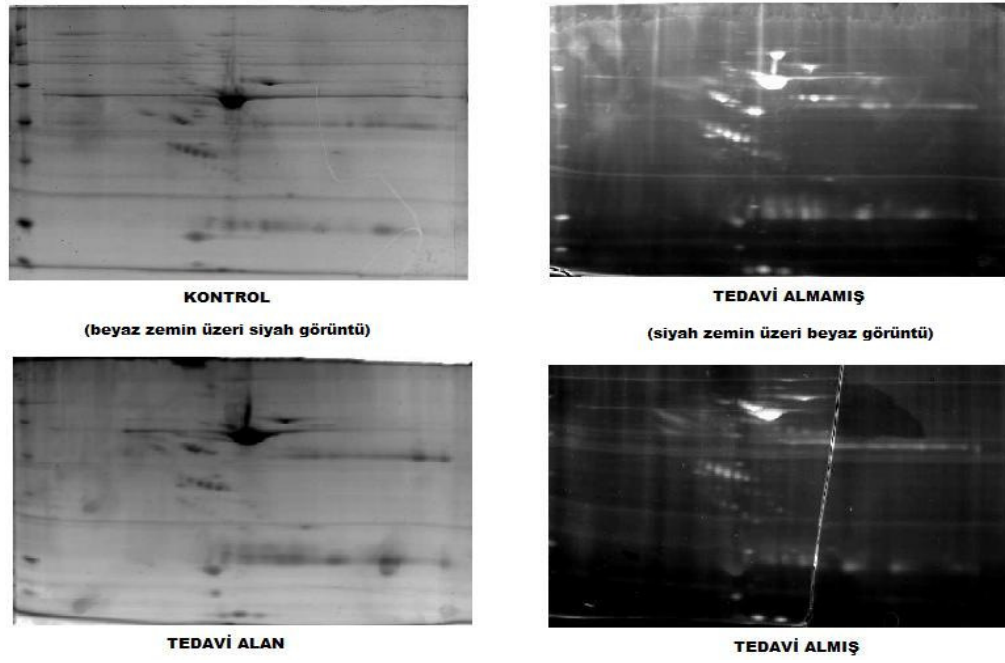
4. BÖLÜM

BULGULAR

Proteomiks çalışmalarının hassas olması ve birçok parametrenin protein profili elde edilmesinde etkili olduğu göz önüne alındığında standardizasyon çalışmalarının gerekliliği bir kez daha bu çalışmada da kanıtlanmıştır. Deneyde; 2-DE sonrası kullanılabilir bir protein profili elde edilmesinde en önemli basamak örneğin yani numunenin optimizasyonu olmuştur.

İlk olarak; Kayseri Erciyes Üniversitesi Mehmet Kemal Dedeman Onkoloji Hastanesi Radyasyon Onkolojisi bölümünden alınan kanların pıhtılaşması beklenildikten sonra santrifüj edilerek serumları elde edilmiş sonra dondurularak soğuk zincir bozulmadan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü merkez laboratuvarına gönderilmiştir. Bu şekilde sağlanan serumların 2-DE sonrası protein profilleri amaçlandığı şekilde gösterilememiştir (Şekil 4.1). Optimizasyon için serumların bozulmuş olabileceği, IPG şeritlere yüklenen protein miktarı ile ilişkili, SDS yürütme tamponu ile ilgili veya kullanılan kimyasallar ile alakalı problemler olabileceği düşünülmüş ve her parametre farklı şekilde çalışılarak tekrar protein profilleri elde edilmeye çalışılmıştır fakat optimizasyon koşulları oluşturulamamıştır.

Literatür araştırmaları sonucu serumun elde ediliş biçiminin protein çalışmalarında etkili olduğu görülmüş ve farklı yöntemler denenmiştir. Yapılan denemeler sonucu en iyi protein profilinin elde edildiği yöntem materyal ve yöntem kısmında ayrıntılı açıklanmıştır. Daha sonra deneye dâhil edilen hasta grubu serumları açıklandığı şekilde elde edilmiştir.

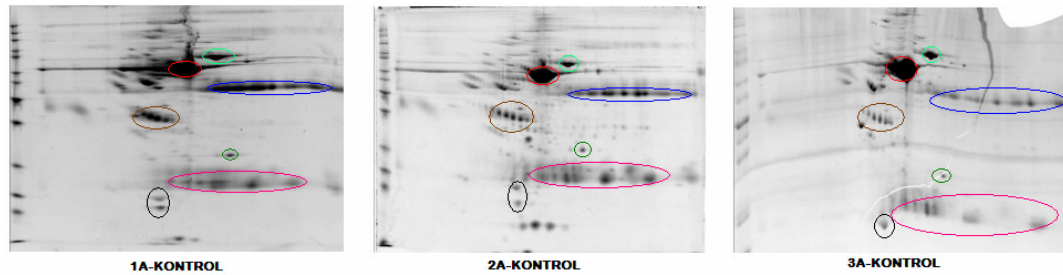


Şekil 4.1. Serumların standardizasyon çalışmaları sırasında elde edilen ilk 2-DE görüntüleri

4.1. GRUP İÇİNDE YAPILAN DEĞERLENDİRMELER

4.1.1. Kontrol gruplarının karşılaştırılması

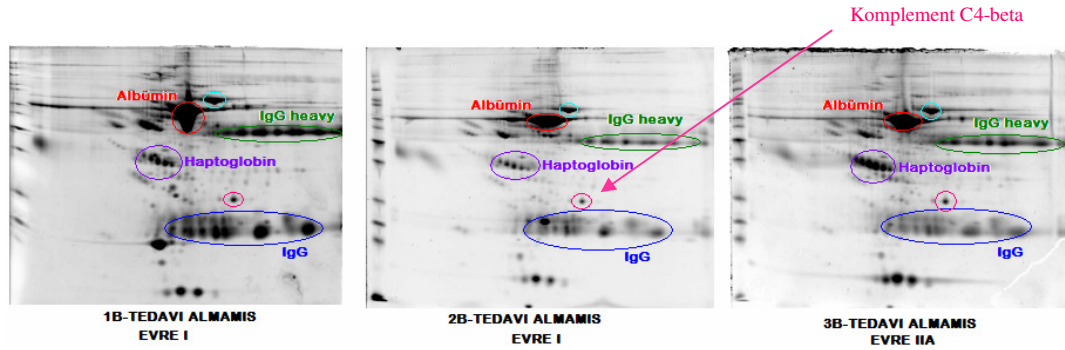
Aynı işlemlere tabi tutulmuş olan 1A, 2A ve 3A kodlu Kontrol grubu jelleri protein profili açısından abundant proteinler dikkate alınarak değerlendirildiğinde kendi içlerinde standardizasyon sağlanmıştır (Şekil 4.2). Yapılan analizlerde de 1A, 2A ve 3A' da sırasıyla 304, 326 ve 266 protein spotu bulunmuştur. Bireysel farklanmaların var olduğunun görüntülerden ve spot sayılarından görülmesi ile kişiye özel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin önemi de gösterilmektedir.



Şekil 4.2. Kontrol grubu jellerinde abundant proteinler ve grup içi standardizasyonu

4.1.2. Tedavi Almamış grupların karşılaştırılması

Aynı işlemlere tabi tutulmuş olan 1B, 2B ve 3B kodlu Tedavi Almamış grubu jelleri protein profili açısından abundant proteinler dikkate alınarak değerlendirildiğinde kendi içlerinde standardizasyon sağlanmıştır (Şekil 4.3). Yapılan analizlerde de 1B, 2B ve 3B’ da sırasıyla 381, 379 ve 365 protein spotu bulunmuştur. Bireysel farklanmaların var olduğu 1B ve 2B jelleri incelendiğinde de görülmektedir her iki hastanın hastalık evresi I olmasına rağmen abundant proteinlerden IgG’ lerin ve albüminin yoğunluk farklılıkları göze çarpmaktadır. Haptogloblin abundant proteini incelendiğinde evre IIA da bulunan 3B kodlu tedavi almamış grupta bu protein grubu daha yoğun bulunmuştur. Evre I ve II erken evre meme kanseri olarak değerlendirilmelerinden dolayı kendi içlerinde standardizasyon sağlayacağı düşünülerek gruba dâhil edilmiştir. Ancak deney sonucu elde edilen protein profillerine göre bazı abundant proteinler açısından farklanmaların olduğu da böylelikle gösterilmiştir.



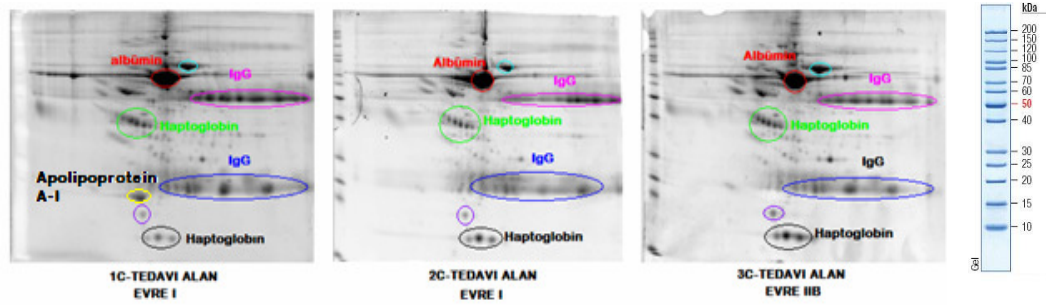
Şekil 4.3. Tedavi almamış grubu jellerinde abundant proteinler ve grup içi standardizasyonu

4.1.3. Tedavi Alan grupların karşılaştırılması

Aynı işlemlere tabi tutulmuş olan 1C, 2C ve 3C kodlu Tedavi Alan grubu jelleri protein profili açısından abundant proteinler dikkate alınarak değerlendirildiğinde kendi içlerinde standardizasyon sağlanmıştır (Şekil 4.4). Yapılan analizlerde de 1C, 2C ve 3C’ da sırasıyla 349, 351 ve 358 protein spotu bulunmuştur. Bireysel farklanmaların var olduğu 1C ve 2C jelleri incelendiğinde de görülmektedir her iki hastanın hastalık evresi I olmasına rağmen abundant proteinlerden IgG’ lerin yoğunluk farklılıkları göze çarpmaktadır. Bunun yanında yine abundant proteinlerden olan Apolipoprotein A-I’ de 1C tedavi alan jelinde var iken 2C tedavi alan jelinde yer almamaktadır. Bunun bireysel

farklılıklardan veya alınan tedavi kür sayısının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

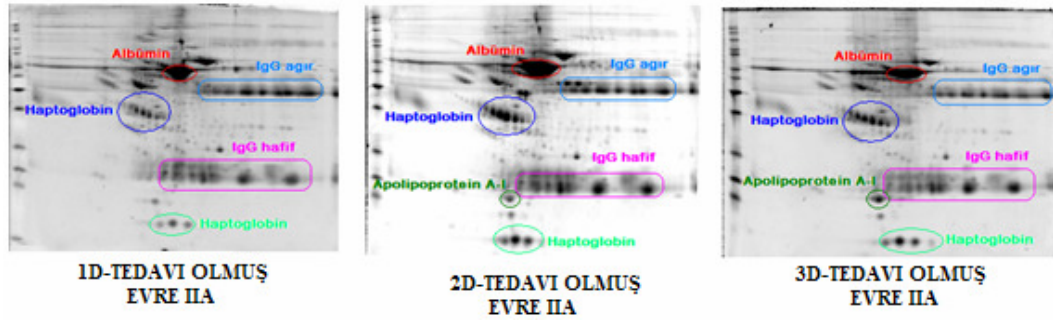
40 Da civarında yer alan Haptoglobin abundant proteini incelendiğinde tedavi alan grup için evre farklılığının yoğunluk açısından bir değişikliğe sebep olmadığı görülmüştür. Evre I ve II erken evre meme kanseri olarak değerlendirilmelerinden dolayı kendi içlerinde standardizasyon sağlayacağı düşünüldüğü için bu gruba da dâhil edilmiştir. Deney sonucu elde edilen protein profillerine göre abundant proteinlerin yoğunluğunun yoğunluk açısından bir fark gözetmediği görülmüştür. 15 Da civarında yer alan Haptoglobin proteini ise evre I' e göre Evre IIB' de ekspresyonu daha fazla (up-regüle) bulunmuştur.



Şekil 4.4. Tedavi alan grubu jellerinde abundant proteinler ve grup içi standardizasyonu

4.1.4. Tedavi Olmuş grupların karşılaştırılması

Aynı işlemlere tabi tutulmuş olan 1D, 2D ve 3D kodlu Tedavi Olmuş grubu jelleri protein profili açısından abundant proteinler dikkate alınarak değerlendirildiğinde kendi içlerinde standardizasyon sağlanmıştır (Şekil 4.5). Yapılan analizlerde de 1D, 2D ve 3D' de sırasıyla 356, 329 ve 338 protein spotu bulunmuştur. Bireysel farklanmaların var olduğu 2D ve 3D tedavi olmuş jelleri incelendiğinde apolipoprotein A-I proteini yer almakta iken 1D tedavi olmuş jelinde görülmemektedir. Bunun bireysel farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.



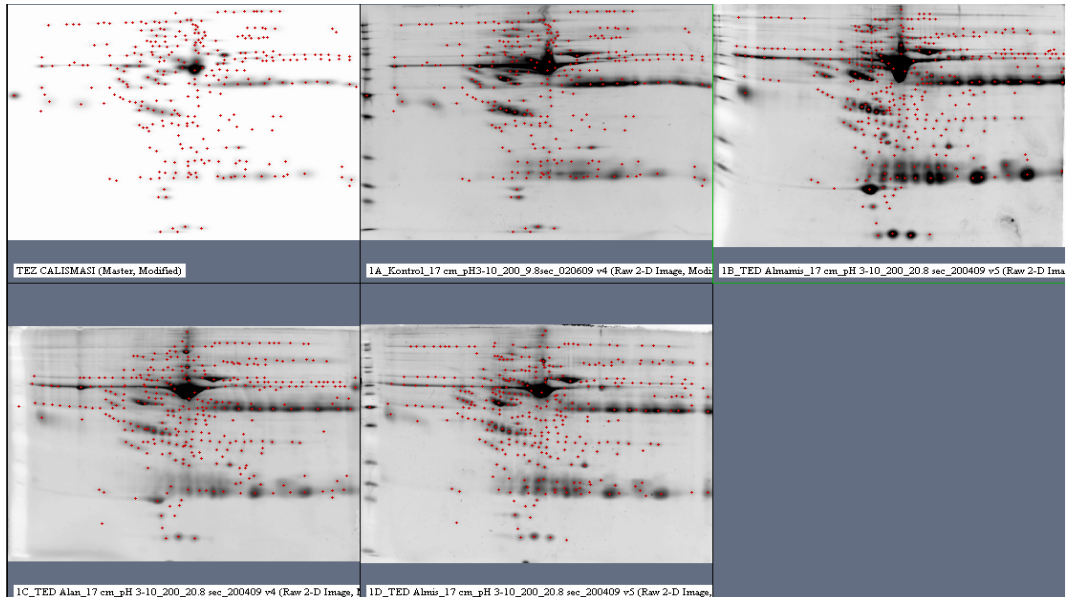
Şekil 4.5. Tedavi olmuş grubu jellerinde abundant proteinler ve grup içi standardizasyonu

4.2. GRUPLAR ARASINDA YAPILAN DEĞERLENDİRMELER

4.2.1. Abundant proteinler azaltılmadan elde edilen grupların karşılaştırılması

1.Set Verileri:

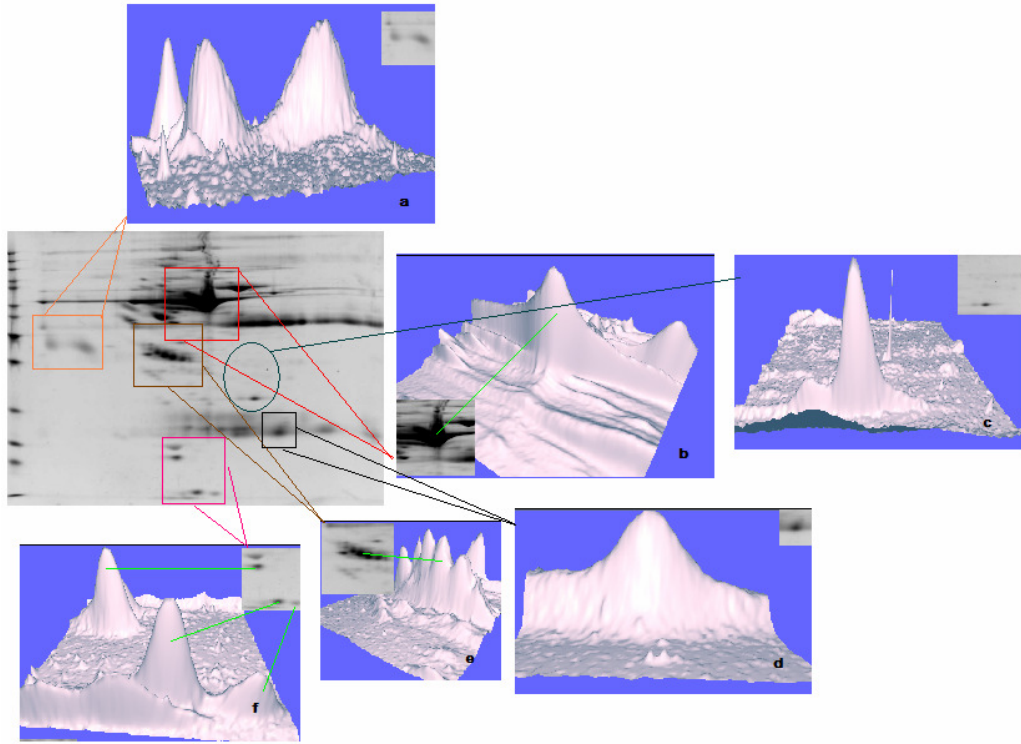
Gruplar arası yapılan değerlendirmeler sonucu tespit edilmiş olan proteinler Şekil 4.6’da gösterilmektedir.



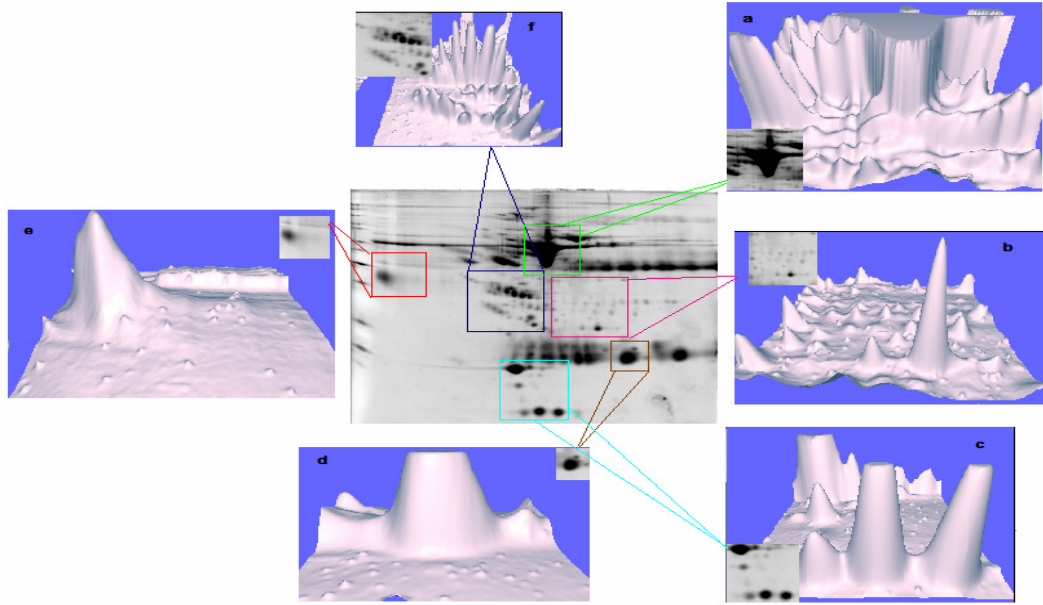
Şekil 4.6. I. SET deney gruplarının protein profilleri üzerinde bulunan spotlar

Protein profilleri üç boyutlu olarak incelendiğinde abundant proteinlerin ekspresyon farklılıkları daha net görülmektedir. Gruplar arası yapılan değerlendirmeler sonucu

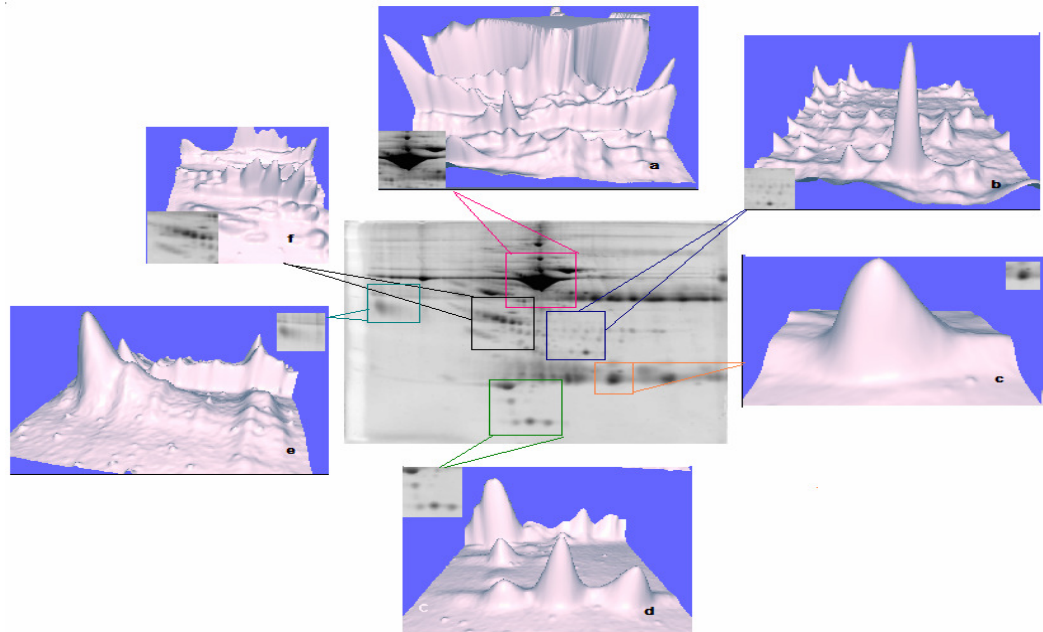
tedavi almamış grupta albümin, haptoglobin, apolipoprotein A-I, IgG ağır zincir, IgG hafif zincir ve Komplement C4- β proteinlerinin ekspresyonları kontrol grubuna göre fazla bulunmuştur. Tedavi alan grupta abundant proteinlerin yoğunlukları kontrol grubu ile denk bulunmuştur. Bunun sebebinin uygulanan tedavinin etkisiyle oluştuğu düşünülmektedir. Tedavi olmuş grup yani tedavi sonrası rutin kontrollerine gelen bayanların protein profili incelendiğinde abundantların ekspresyonunun kontrol grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir. Kontrol, tedavi almamış, tedavi alan ve tedavi olmuş grupların abundant proteinlerinin üç boyutlu görüntüleri Şekil 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10' da ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



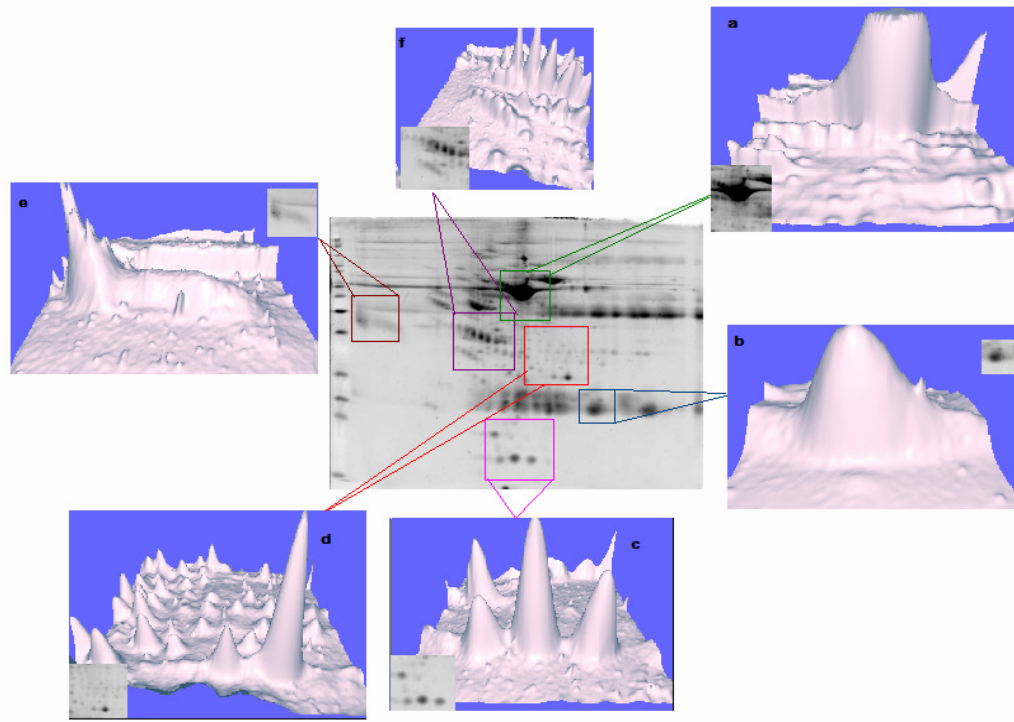
Şekil 4.7. I. SET Kontrol grubu jelinin 3D örnekleri (a)Tanımlanmamış proteinler, (b)Albümin, (c)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplement C4-Beta zincir proteini, (d)IgG hafif zincir , (e)Haptoglobin, (f)Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptoglobin.



Şekil 4.8. I.SET Tedavi Almamış grubu jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini, (c)Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I, ve Haptoglobin, (d)IgG hafif zincir, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptoglobin.



Şekil 4.9. I.SET Tedavi Alan grubu jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini, (c) IgG hafif zincir, (d) Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptoglobin, (e) Tanımlanmamış proteinler, (f) Haptoglobin.



Şekil 4.10. I.SET Tedavi Olmuş grubu jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b) IgG hafif zincir, (c) Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptogloblin, (d)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini, (e) Tanımlanmamış proteinler, (f) Haptogloblin.

Tablo 4.1. I. SET PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları

Grup	Toplam spot sayısı	Referans Jelde		
		Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı	Eşleşme %
Kontrol*	304	304	0	100
Tedavi Almamış	381	201	180	52
Tedavi Alan	349	193	156	55
Tedavi Olmuş	356	192	164	53

*Referans jel olarak seçilmiştir.

PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları incelendiğinde de tedavi almamış grupta kontrol grubuna göre daha fazla protein spotu tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Kontrol grubu jeli referans jel olarak seçilip incelendiğinde eşleşme oranının ortalama % 65 olduğu görülmüştür.

Tablo 4.2. I. SET Analizi

Veri A	Veri B	Tür	Sayı	Metot
Kontrol	Tedavi Almamış	NİTEL	97	A' da olan B' de olmayan
Kontrol	Tedavi Alan		103	
Kontrol	Tedavi Olmuş		102	
Tedavi Almamış	Tedavi Alan		38	
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş		35	
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş		37	

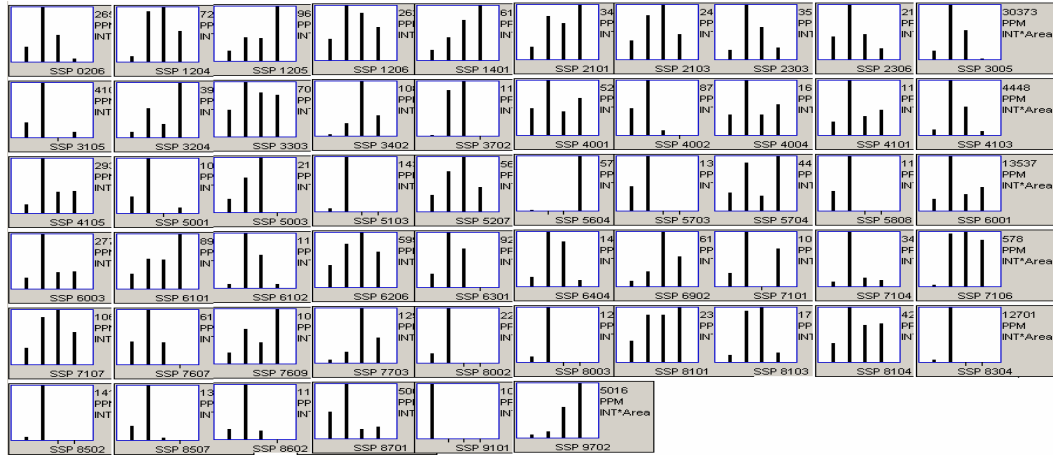
Yapılan analizler sonucu oluşturulmuş olan tablo 4.2' de görüldüğü gibi kontrol grubu ile tedavi almamış grup karşılaştırıldığında kontrol grubunda olup da diğer grupta olmayan protein spot sayısı 97 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuyla tedavi alan ve tedavi olmuş grup karşılaştırıldığında kontrolde olup da diğer gruplarda olmayan protein spot sayısı ise sırayla 103 ve 102 olarak bulunmuştur. Tedavi almamış grup tedavi alan ve tedavi olmuş grupla karşılaştırıldığında ise tedavi almamış grupta olup da diğer grup da olmayan protein spot sayısı ise sırayla 38 ve 35' dir. Tedavi alan grupta olup da tedavi olmuş grup da olmayan protein spot sayısı ise 37 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.3. I.SET Kontrol, Tedavi Almamış, Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları

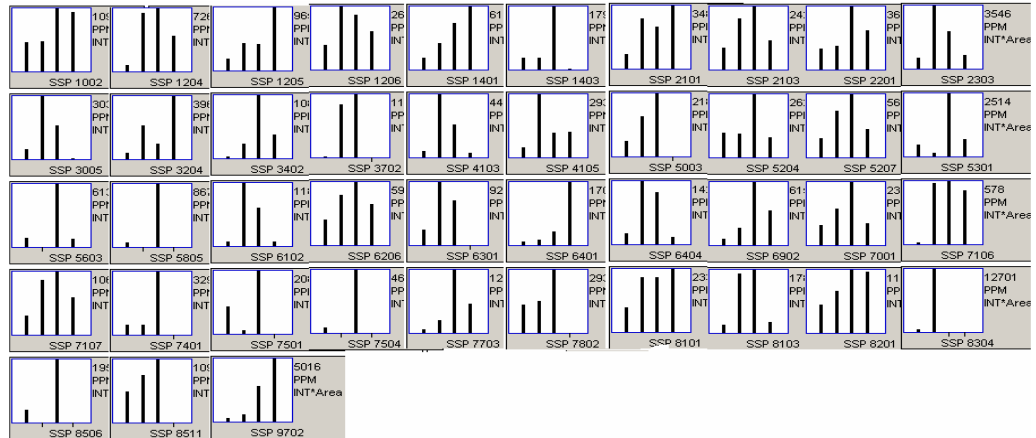
Karşılaştırılan grup		Spot Sayısı		
		En az 2 kat artan	En az 2 kat azalan	Ortak
Kontrol	Tedavi Almamış	56	58	114
Kontrol	Tedavi Alan	43	62	94
Kontrol	Tedavi Olmuş	40	53	107
Tedavi Almamış	Tedavi Alan	29	37	101
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş	30	30	101
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş	31	31	100
Bütün gruplarda				147

PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları Tablo 4.3' de listelenmiştir. Bu tabloya göre gruplar arasında ekspresyonu en az 2 kat artan, en az 2 kat azalan ve ortak protein spot sayıları verilmektedir.

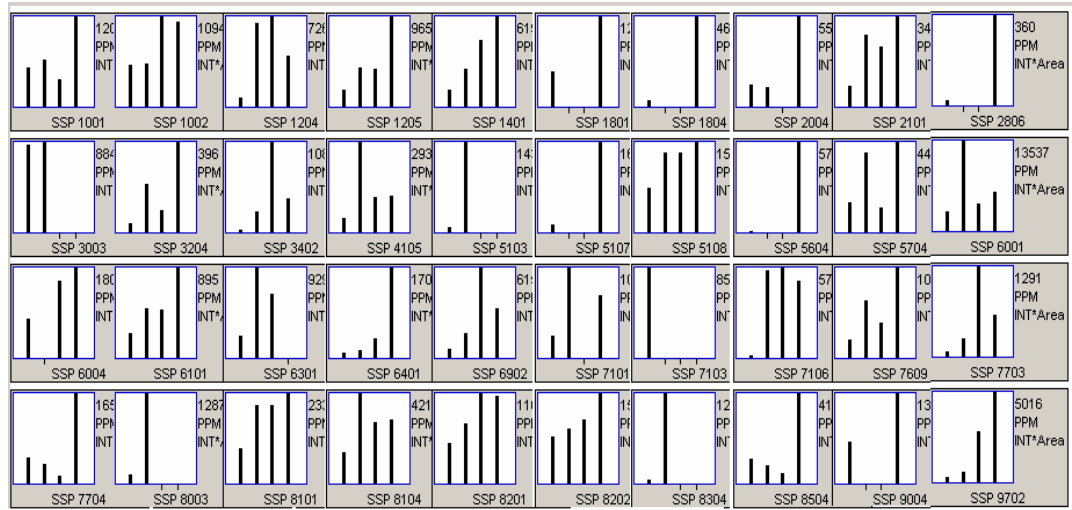
PDQuest programı jel görüntüsü alındıktan ve yapılan piksel ayarlarından sonra aynı noktada yer alan spotlara aynı numarayı yani aynı SSP numarasını vermektedir. Tablo 4.3’ de listelenmiş olan en az 2 kat artan farklanmaların kanıtı olarak SSP numaralarını da içeren histogram grafikleri Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13’ de gösterilmiştir. Bu grafiklere göre ilk sütun kontrol grubunu ikinci sütun tedavi almamış grubu, üçüncü sütun tedavi alan ve son sütun tedavi olmuş grubu temsil etmektedir.



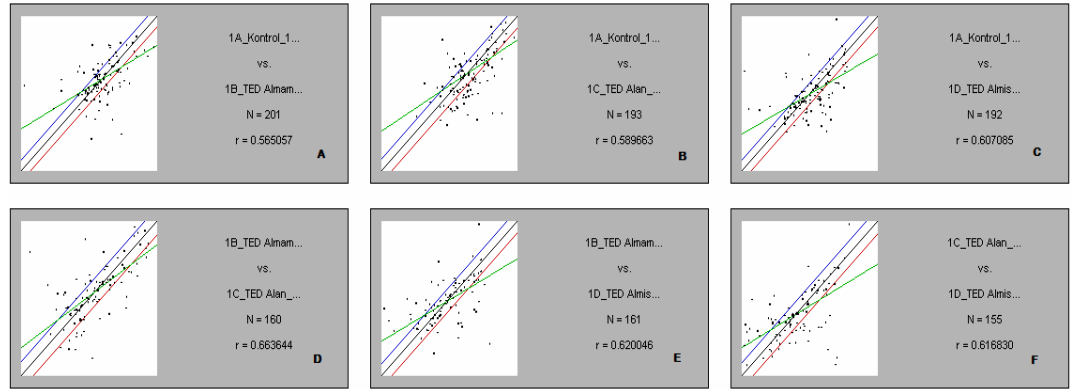
Şekil 4.11. I.SET Kontrol-Tedavi Almamış gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



Şekil 4.12. I.SET Kontrol-Tedavi Alan gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



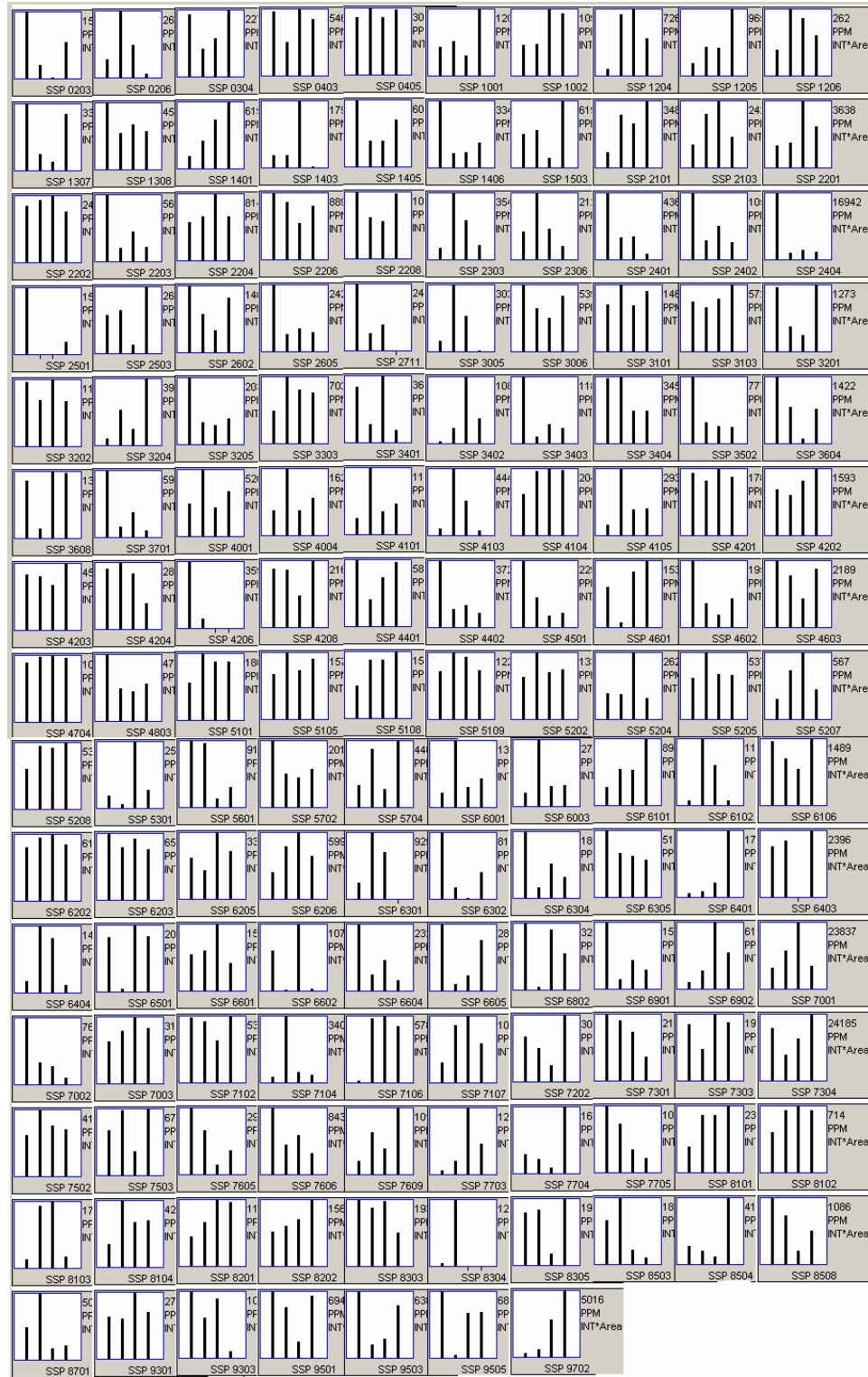
Şekil 4.13. I.SET Kontrol-Tedavi Olmuş gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



Şekil 4.14. I.SET A) Kontrol ve Tedavi Almamış B) Kontrol ve Tedavi Alan C) Kontrol ve Tedavi Olmuş D) Tedavi Almamış ve Tedavi Alan E) Tedavi Almamış ve Tedavi Olmuş F) Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların karşılaştırılması sonucu elde edilen spot dağılım grafikleri

Bütün karşılaştırma parametreleri dikkate alınarak yapılan analizler sonucu oluşan spot dağılım grafikleri Şekil 4.14' de gösterilmektedir.

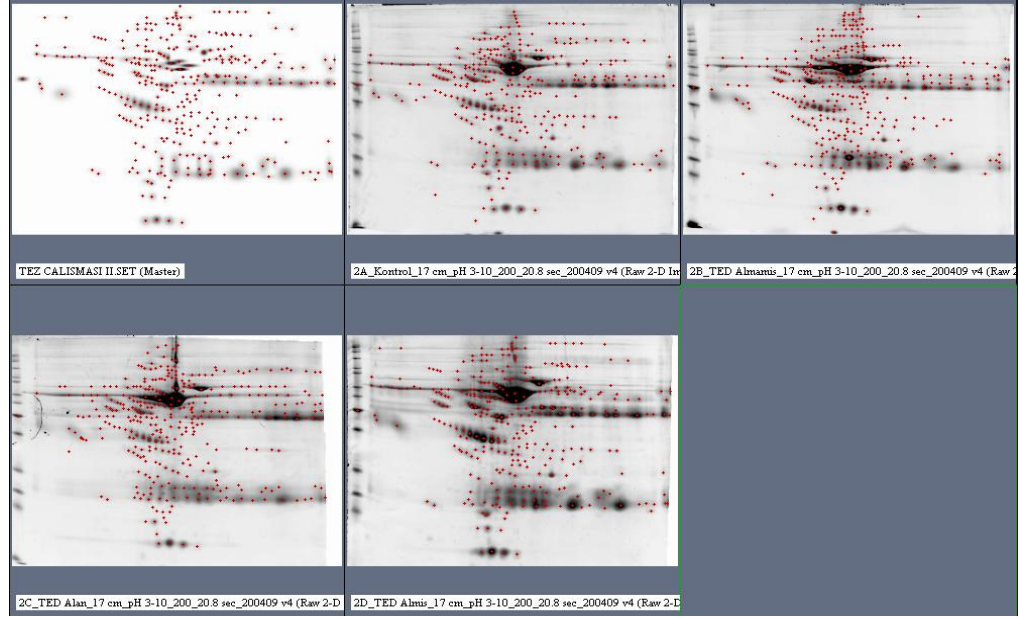
Bütün gruplarda ortak olarak bulunan 147 protein spotu SSP numaraları ile birlikte Şekil 4.15' de histogram grafikleri ile birlikte gösterilmiştir.



Şekil 4.15. I. SET tüm gruplarında ortak olarak yer alan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri

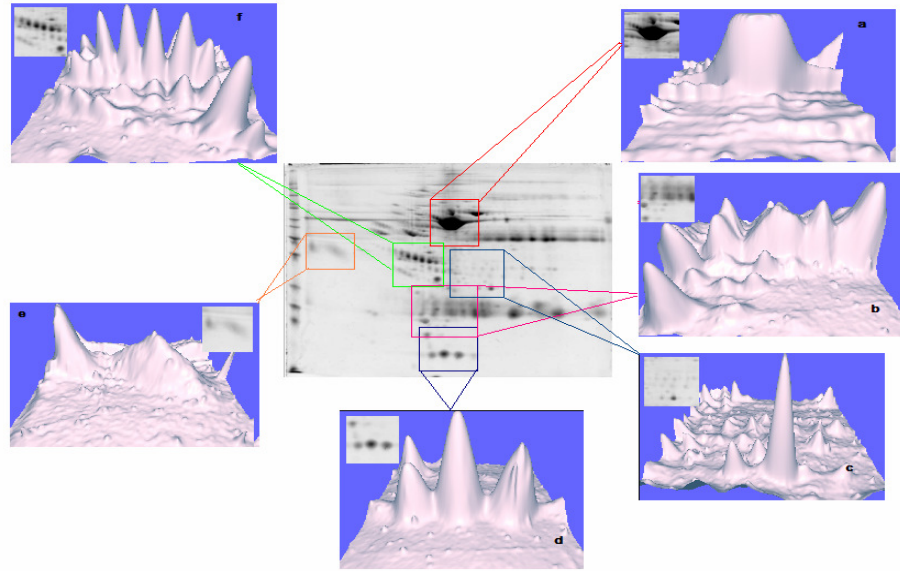
2.Set Verileri

Gruplar arası yapılan değerlendirmeler sonucu tespit edilmiş olan proteinler Şekil 4.16’ de gösterilmektedir.

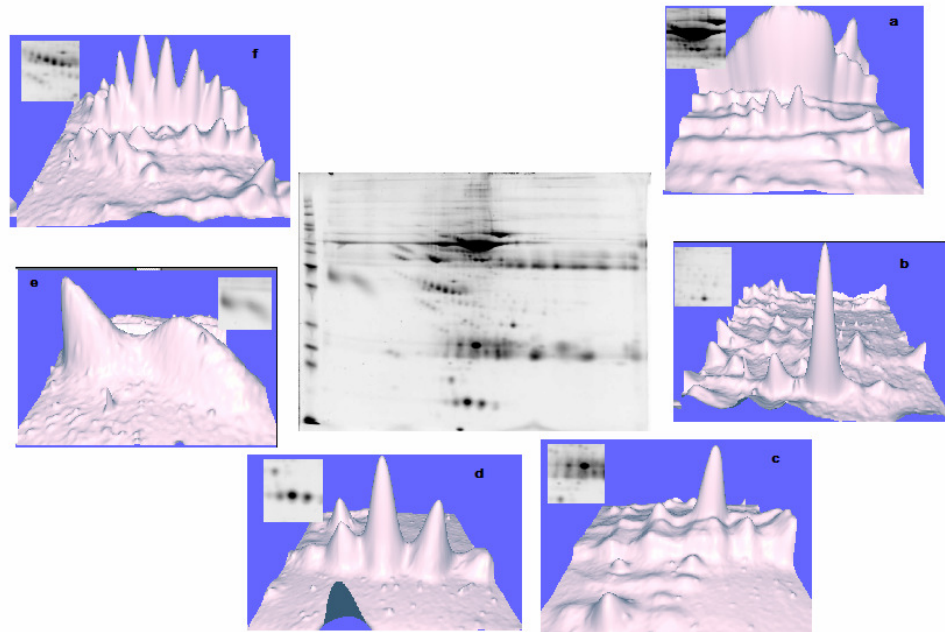


Şekil 4.16. II. SET deney gruplarının protein profilleri üzerinde bulunan spotlar

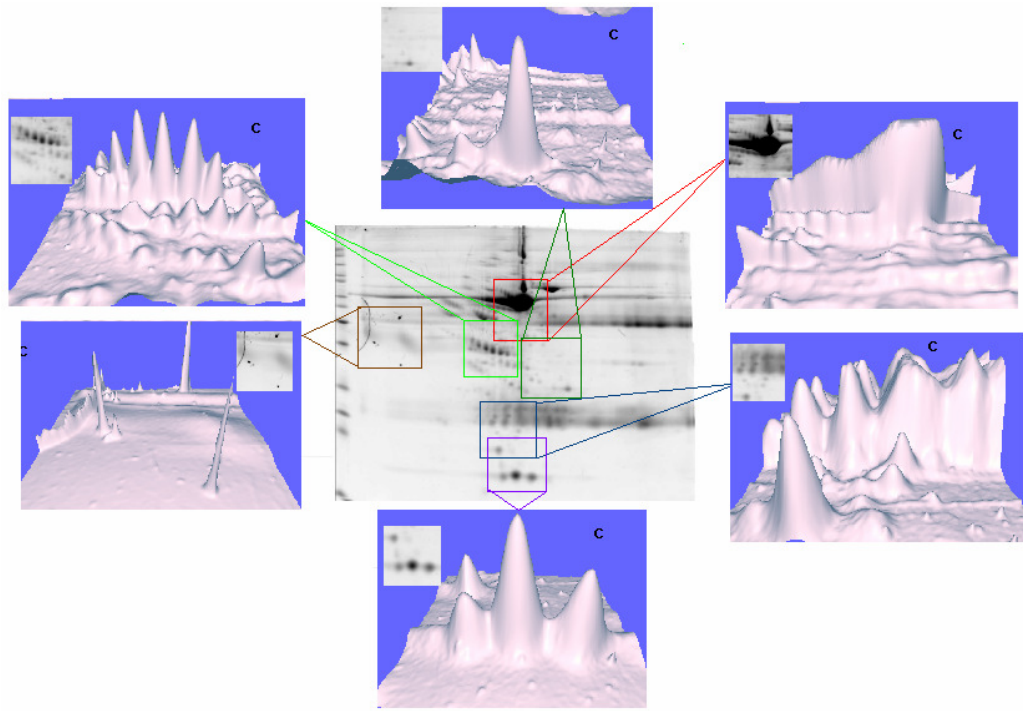
Protein profilleri üç boyutlu olarak incelendiğinde aynı şekilde I. Sette görülen farklanmalar II. sette de tespit edildi. Bulunan farklanmaları üç boyutlu olarak incelediğimizde de ekspresyon farklılıkları Şekil 4.17, 4.18, 4.19 ve 4.20’ de gösterilmektedir.



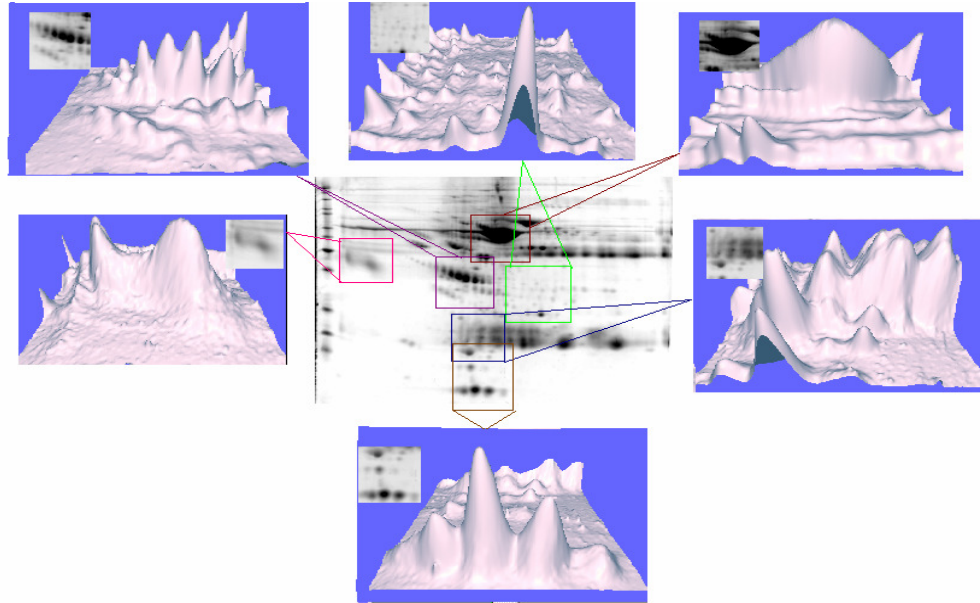
Şekil 4.17. II. SET Kontrol grubu jelinin 3D örnekleri (a)Tanımlanmamış proteinler, (b)Albümin, (c)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini, (d) IgG hafif zincir, (e)Haptoglobin, (f) Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptoglobin.



Şekil 4.18. II. SET Tedavi Almamış jelinin 3D örnekleri (a)Albümin (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini, (c) Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptoglobin,(d)IgG hafif zincir, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f) Haptoglobin.



Şekil 4.19. II. SET Tedavi Alan jelinin 3D örnekleri (a)Albümin (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini, (c)IgG hafif zincir, (d) Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptoglobin, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f) Haptoglobin.



Şekil 4.20. II. SET Tedavi Olmuş jelinin 3D örnekleri (a)Albümin (b)IgG hafif zincir (c)Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptoglobin, (d)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptoglobin.

Tablo 4.4. II. SET PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları

Grup	Toplam spot sayısı	Referans Jelde		
		Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı	Eşleşme %
Kontrol	326	200	126	61
Tedavi Almamış	379	194	185	51
Tedavi Alan	351	170	181	48
Tedavi Olmuş*	329	328	1	99

*Referans jel olarak seçilmiştir.

PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları incelendiğinde de tedavi almamış grupta kontrol grubuna göre daha fazla protein spotu tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Tedavi olmuş grubu jeli referans jel olarak seçilip incelendiğinde eşleşme oranının ortalama % 65 olduğu görülmüştür.

Tablo 4.5. II. SET Analizi

Veri A	Veri B	Tür	Sayı	Metot
Kontrol	Tedavi Almamış	NİTEL	33	A' da olan B' de olmayan
Kontrol	Tedavi Alan		35	
Kontrol	Tedavi Olmuş		0	
Tedavi Almamış	Tedavi Alan		61	
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş		1	
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş		1	

Yapılan analizler sonucu oluşturulmuş olan Tablo 4.5' de görüldüğü gibi kontrol grubu ile tedavi almamış grup karşılaştırıldığında kontrol grubunda olup da diğer grupta olmayan protein spot sayısı 33 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuyla tedavi alan ve tedavi olmuş grup karşılaştırıldığında kontrolde olup da diğer gruplarda olmayan protein spot sayısı ise sırayla 35 ve 0 olarak bulunmuştur. Tedavi almamış grup tedavi alan ve tedavi olmuş grupla karşılaştırıldığında ise tedavi almamış grupta olup da diğer

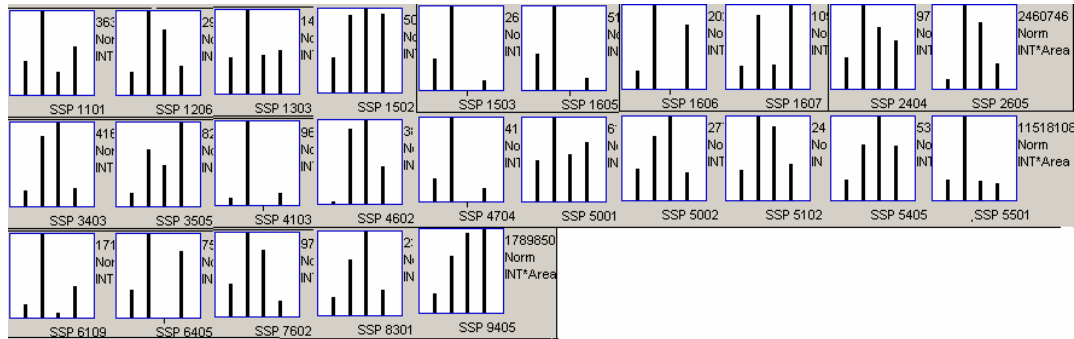
grup da olmayan protein spot sayısı ise sırayla 61 ve 1' dir. Tedavi alan grupta olup da tedavi olmuş grup da olmayan protein spot sayısı ise 1 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.6. II. SET Kontrol, Tedavi Almamış Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları

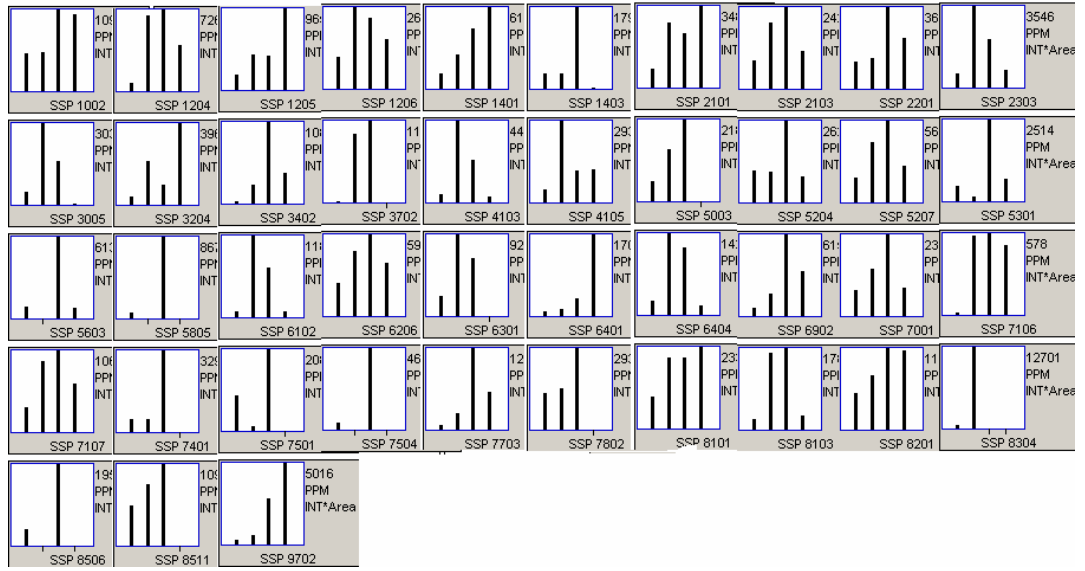
Karşılaştırılan grup		Spot Sayısı		
		En az 2 kat artan	En az 2 kat azalan	Ortak
Kontrol	Tedavi Almamış	25	15	107
Kontrol	Tedavi Alan	21	13	101
Kontrol	Tedavi Olmuş	25	34	140
Tedavi Almamış	Tedavi Alan	20	15	98
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş	28	33	132
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş	33	38	98
Bütün grupta				116

PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları Tablo 4.6' da listelenmiştir. Bu tabloya göre gruplar arasında ekspresyonu en az 2 kat artan, en az 2 kat azalan ve ortak protein spot sayıları gösterilmektedir.

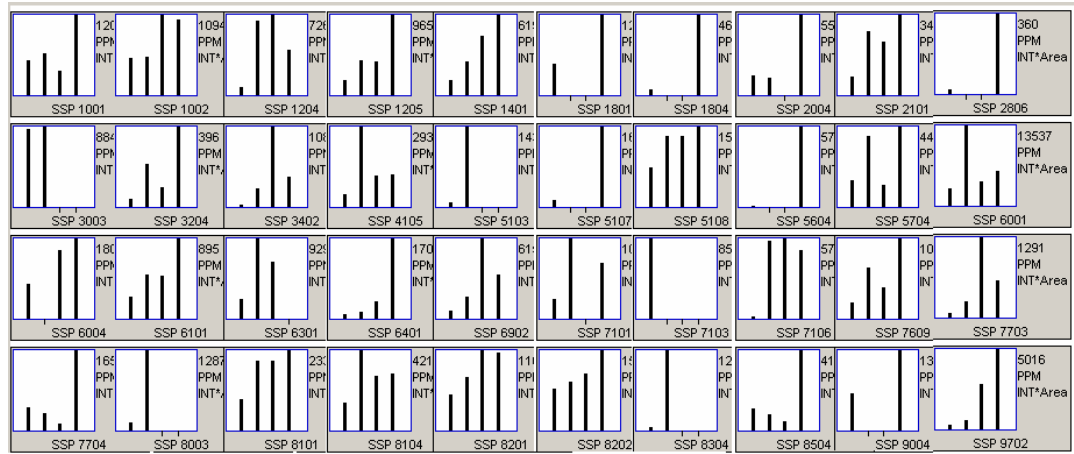
Tablo 4.6' da listelenmiş olan en az 2 kat artan farklanmaların kanıtı olarak SSP numaralarını da içeren histogram grafikleri Şekil 4.21, 4.22 ve 4.23' de gösterilmiştir.



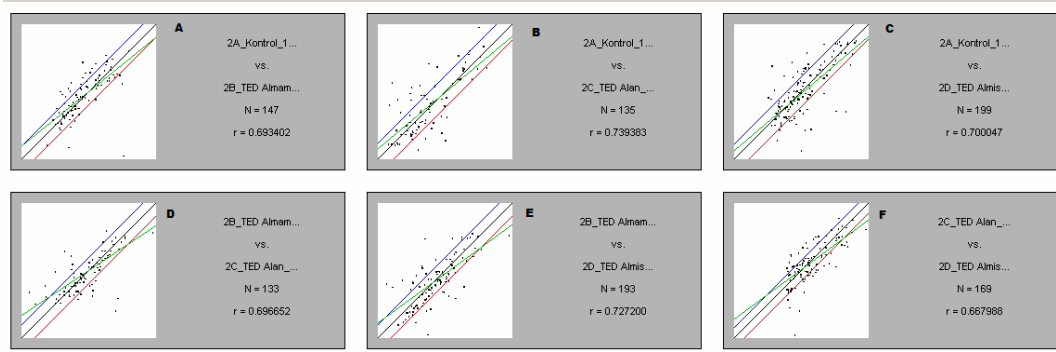
Şekil 4.21. II. SET Kontrol-Tedavi Almamış gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



Şekil 4.22. II. SET Kontrol-Tedavi Alan gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



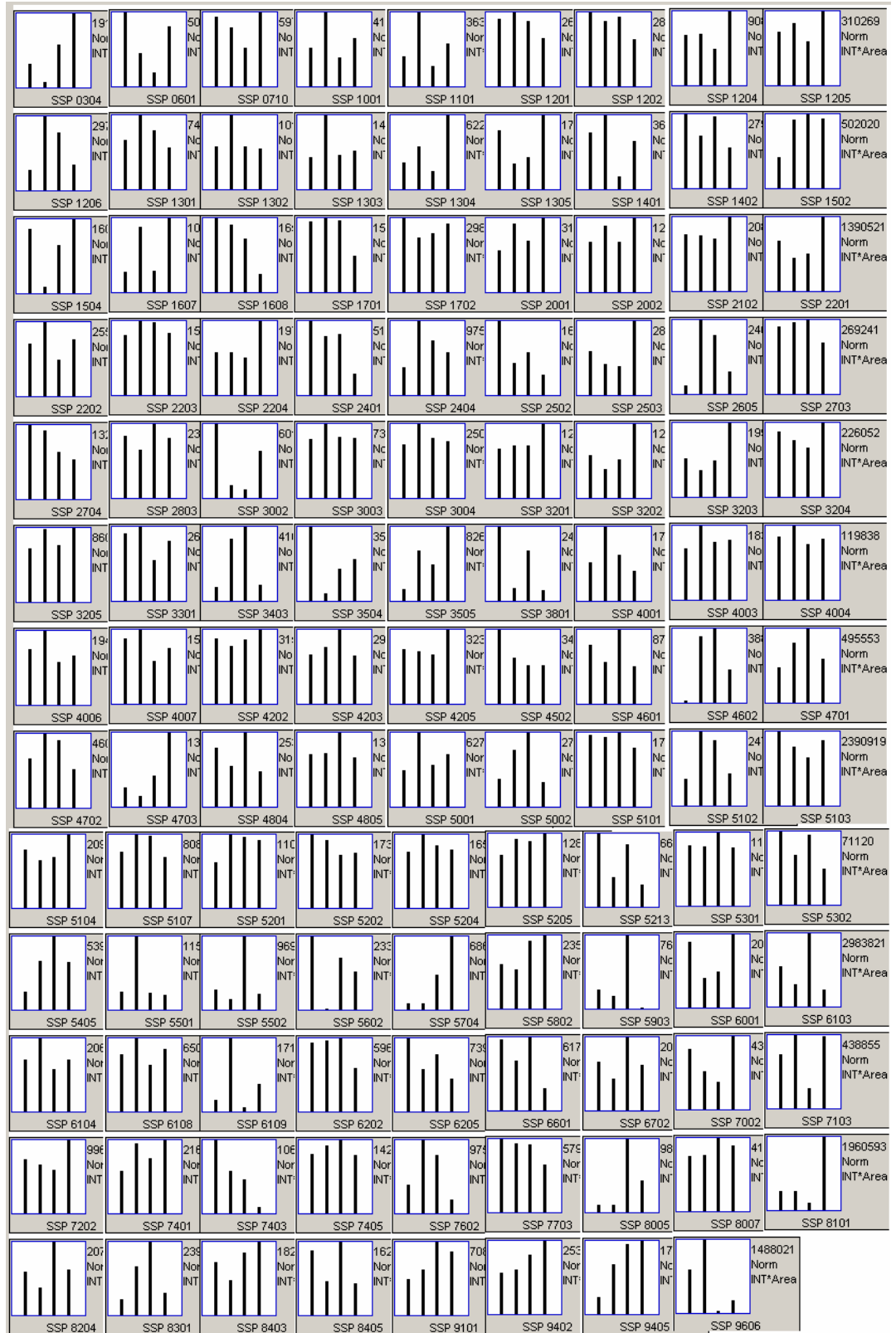
Şekil 4.23. II. SET Kontrol-Tedavi Olmuş gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



Şekil 4.24. II. SET A) Kontrol ve Tedavi Almamış B) Kontrol ve Tedavi Alan C) Kontrol ve Tedavi Olmuş D) Tedavi Almamış ve Tedavi Alan E) Tedavi Almamış ve Tedavi Olmuş F) Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların karşılaştırılması sonucu elde edilen spot dağılım grafikleri

Bütün karşılaştırma parametreleri dikkate alınarak yapılan analizler sonucu oluşan spot dağılım grafikleri Şekil 4.24' de gösterilmektedir.

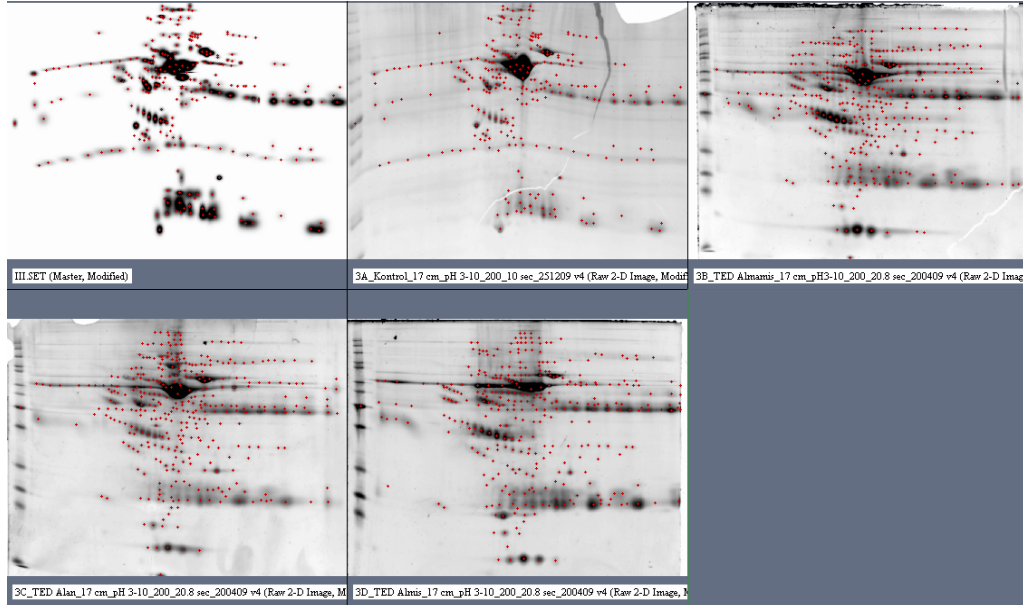
Bütün gruplarda ortak olarak bulunan 116 protein spotu SSP numaraları ile birlikte Şekil 4.25' de histogram grafikleri ile birlikte gösterilmiştir.



Şekil 4.25. II. SET tüm gruplarında ortak olarak yer alan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri

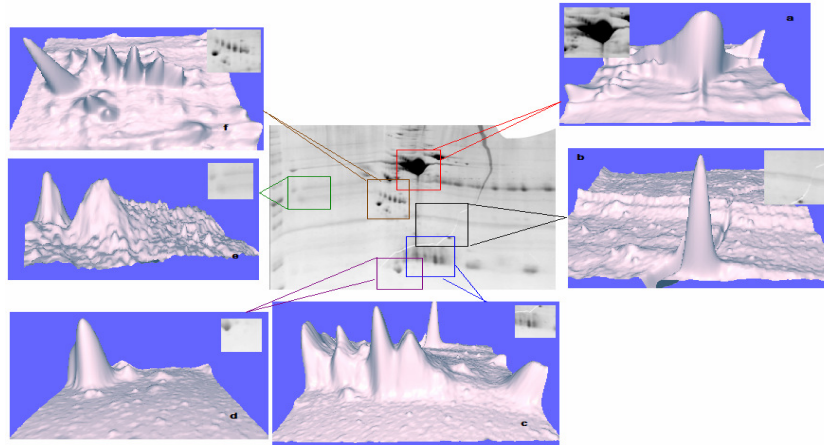
3.Set Verileri:

Gruplar arası yapılan değerlendirmeler sonucu tespit edilmiş olan proteinler Şekil 4.26’ da gösterilmektedir.



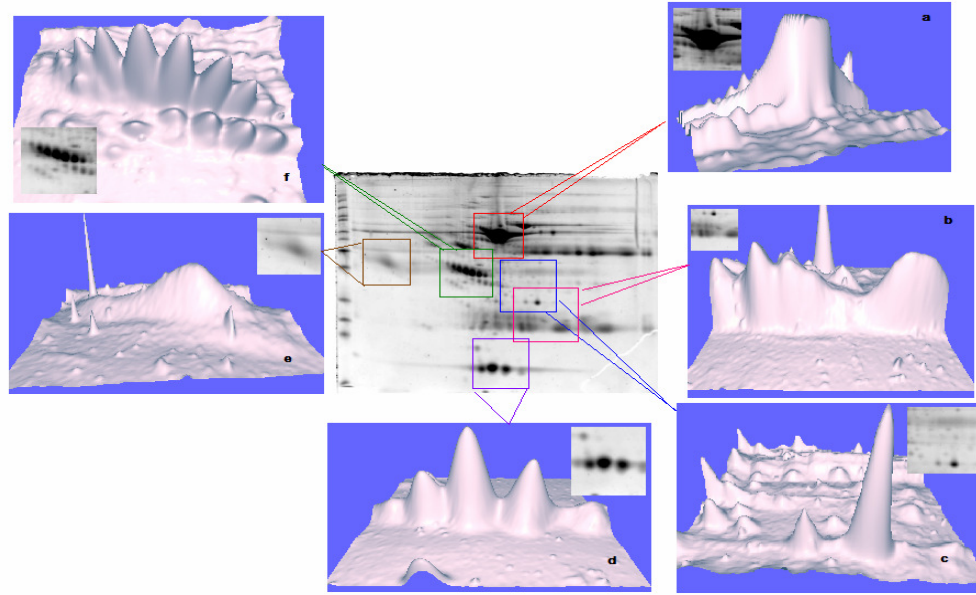
Şekil 4.26. III. SET deney gruplarının protein profilleri üzerinde bulunan spotlar

Protein profilleri üç boyutlu olarak incelendiğinde aynı şekilde I. ve II sette görülen farklanmalar III. sette de tespit edildi. Bulunan farklanmaları üç boyutlu olarak incelediğimizde de ekspresyon farklılıkları Şekil 4.27, 4.28, 4.29 ve 4.30’ da gösterilmektedir.

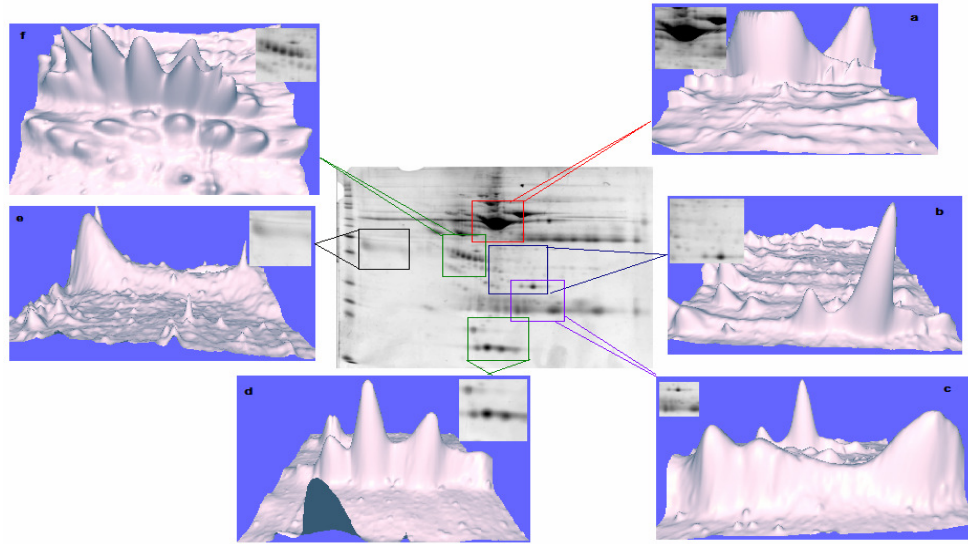


Şekil 4.27. III. SET Kontrol grubu jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini,

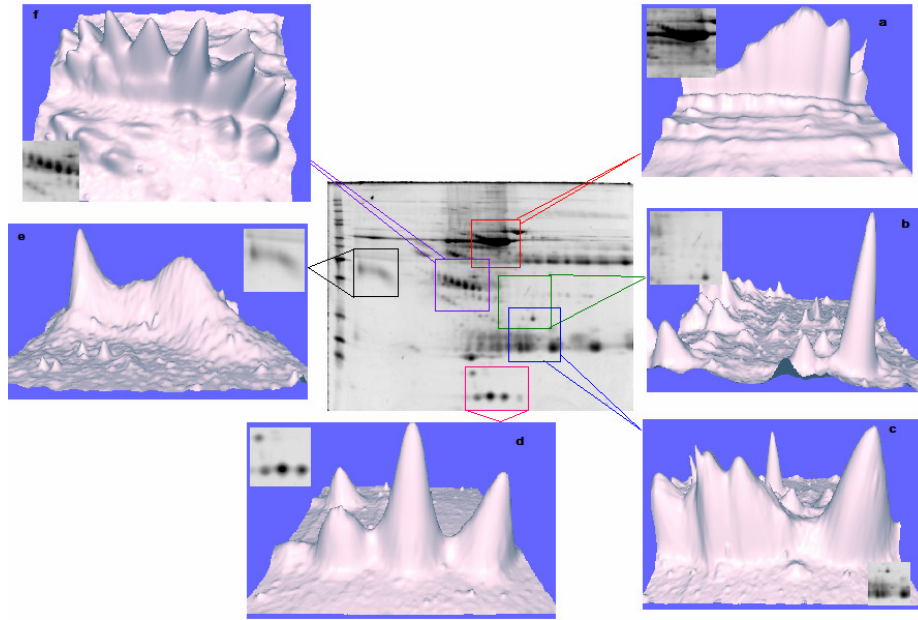
(c) IgG hafif zincir, (d)Tanımlanmamış protein, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptogloblin.



Şekil 4.28. III. SET Tedavi Almamış jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b)IgG hafif zincir (c)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplement C4-Beta zincir proteini, (d)Tanımlanmamış protein ve Haptogloblin, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptogloblin.



Şekil 4.29. III. SET Tedavi Alan jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplement C4-Beta zincir proteini, (c)IgG hafif zincir, (d)Tanımlanmamış protein ve Haptogloblin, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptogloblin.



Şekil 4.30. III. SET Tedavi Olmuş jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplement C4-Beta zincir proteini, (c)IgG hafif zincir, (d) Tanımlanmamış protein ve Haptoglobin, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptoglobin.

Tablo 4.7. III. SET PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları

Grup	Toplam spot sayısı	Referans Jelde		
		Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı	Eşleşme %
Kontrol*	266	266	0	100
Tedavi Almamış	365	144	221	39
Tedavi Alan	358	154	204	43
Tedavi Olmuş	338	155	183	45

*Referans jel olarak seçilmiştir.

PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları incelendiğinde de tedavi almamış grupta kontrol grubuna göre yine daha fazla protein spotu tespit edilmiştir (Tablo 4.7). Kontrol grubu jeli referans jel olarak seçilip incelendiğinde eşleşme oranının ortalama % 57 olduğu görülmüştür.

Tablo 4.8. III. SET Analizi

Veri A	Veri B	Tür	Sayı	Metot
Kontrol	Tedavi Almamış	NİTEL	143	A' da olan B' de olmayan
Kontrol	Tedavi Alan		125	
Kontrol	Tedavi Olmuş		125	
Tedavi Almamış	Tedavi Alan		28	
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş		28	
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş		0	

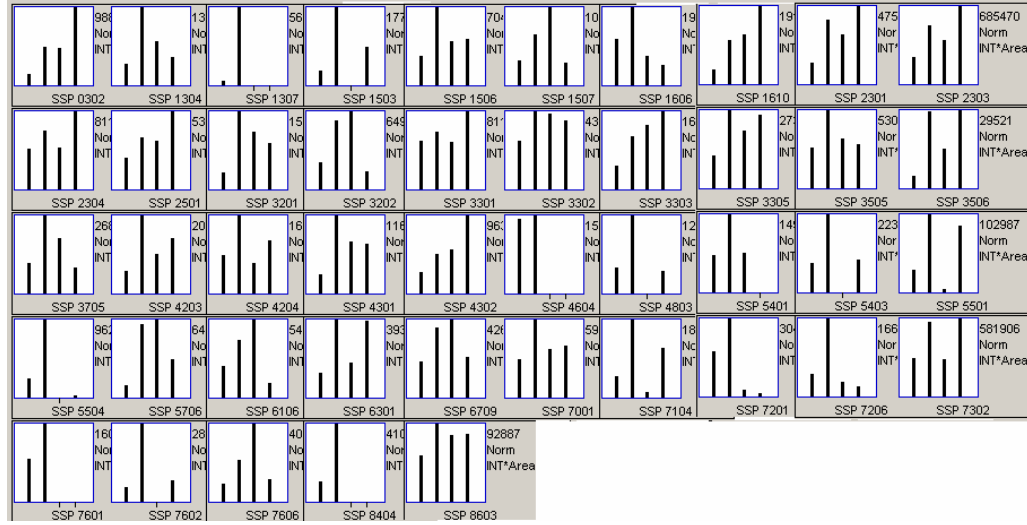
Yapılan analizler sonucu oluşturulmuş olan Tablo 4.8' de görüldüğü gibi kontrol grubu ile tedavi almamış grup karşılaştırıldığında kontrol grubunda olup da diğer grupta olmayan protein spot sayısı 143 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuyla tedavi alan ve tedavi olmuş grup karşılaştırıldığında kontrolde olup da diğer gruplarda olmayan protein spot sayısı ise 125 olarak bulunmuştur. Tedavi almamış grup tedavi alan ve tedavi olmuş grupla karşılaştırıldığında ise tedavi almamış grupta olup da diğer grup da olmayan protein spot sayısı 28' dir. Tedavi alan grupta olup da tedavi olmuş grup da olmayan protein spot sayısı bulunamamıştır.

Tablo 4.9. III. SET Kontrol, Tedavi Almamış Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları

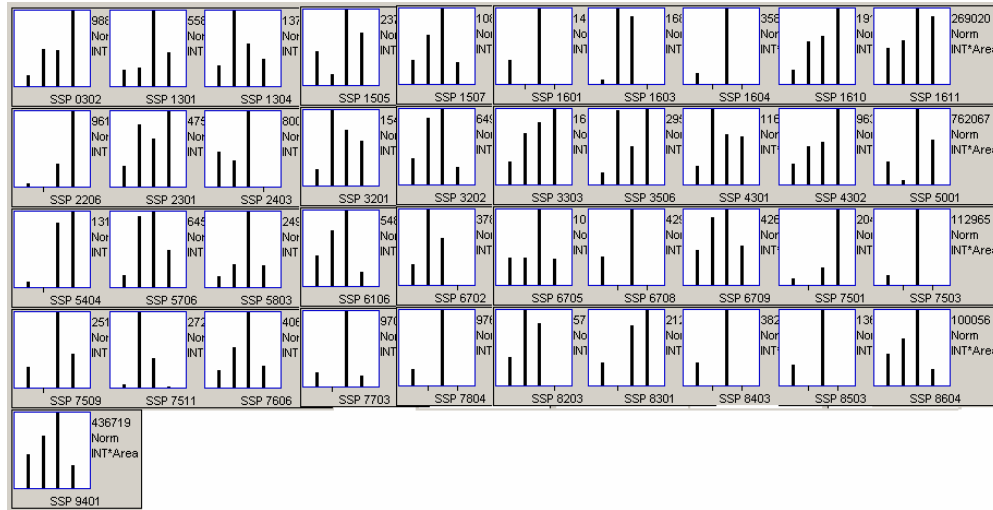
Karşılaştırılan grup		Spot Sayısı		
		En az 2 kat artan	En az 2 kat azalan	Ortak
Kontrol	Tedavi Almamış	44	25	52
Kontrol	Tedavi Alan	48	30	61
Kontrol	Tedavi Olmuş	30	33	76
Tedavi Almamış	Tedavi Alan	17	20	57
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş	10	37	47
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş	9	30	64
Bütün gruplarda				80

PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları Tablo 4.9' da listelenmiştir. Bu tabloya göre gruplar arasında ekspresyonu en az 2 kat artan, en az 2 kat azalan ve ortak protein spot sayıları gösterilmiştir.

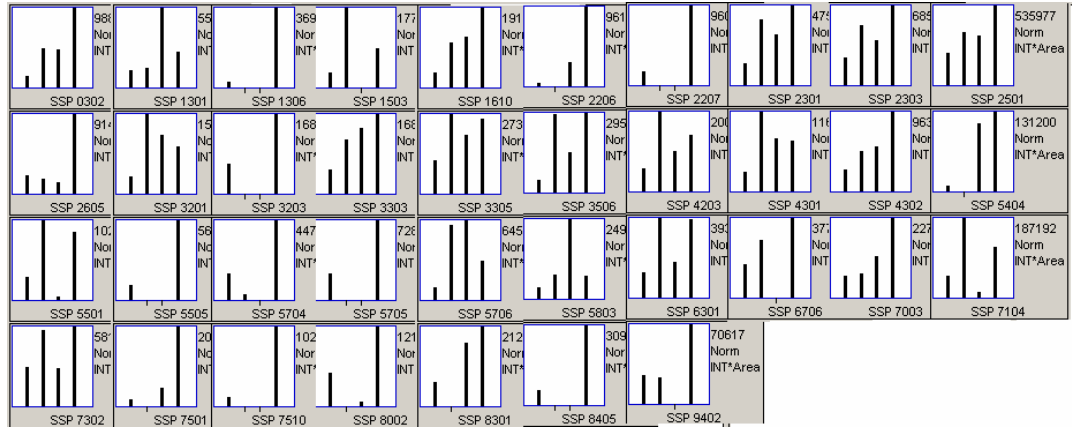
Tablo 4.9’ da listelenmiş olan en az 2 kat artan farklanmaların kanıtı olarak SSP numaralarını da içeren histogram grafikleri Şekil 4.31, 4.32 ve 4.33’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. III. SET Kontrol-Tedavi Almamış gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



Şekil 4.32. III. SET Kontrol-Tedavi Alan gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



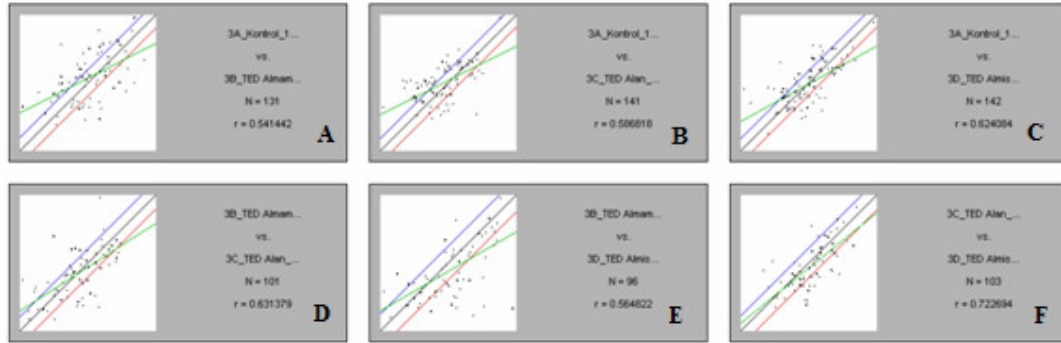
Şekil 4.33. III. SET Kontrol-Tedavi Olmuş gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



Şekil 4.34. III. SET tüm gruplarında ortak olarak yer alan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri

Bütün gruplarda ortak olarak bulunan 80 protein spotu SSP numaraları ile birlikte Şekil 4.34' de histogram grafikleri ile birlikte gösterilmiştir.

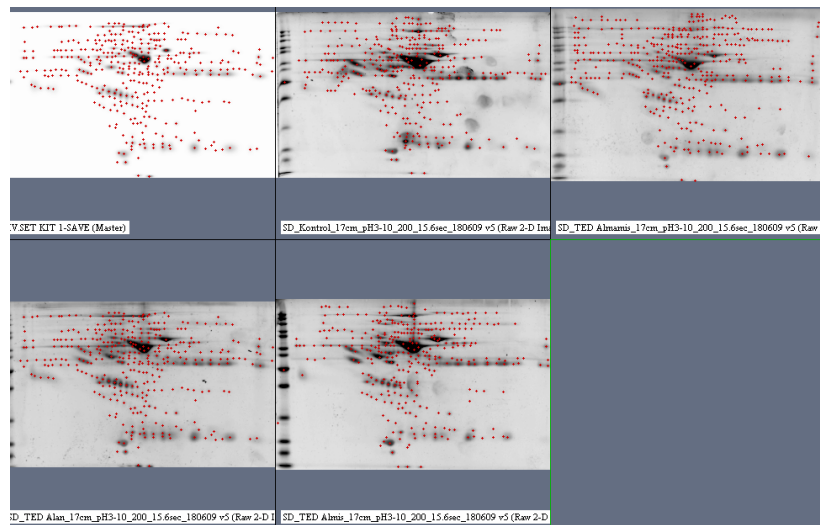
Bütün karşılaştırma parametreleri dikkate alınarak yapılan analizler sonucu oluşan spot dağılım grafikleri Şekil 4.35' de gösterilmektedir.



Şekil 4.35. III. SET A)Kontrol ve Tedavi Almamış B)Kontrol ve Tedavi Alan C)Kontrol ve Tedavi Olmuş D)Tedavi Almamış ve Tedavi Alan E)Tedavi Almamış ve Tedavi Olmuş F)Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların karşılaştırılması sonucu elde edilen spot dağılım grafikleri

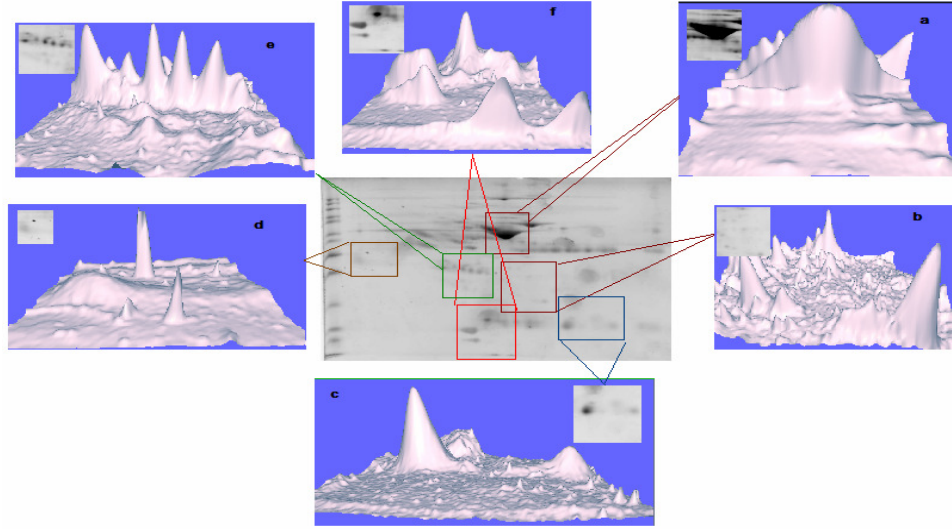
4.2.2. Kolon 1 kullanımı sonucu elde edilen grupların karşılaştırılması

Kolon 1 kullanımı sonucu gruplar arası yapılan değerlendirmelerle tespit edilmiş olan proteinler şekil 4.36' da gösterilmektedir.

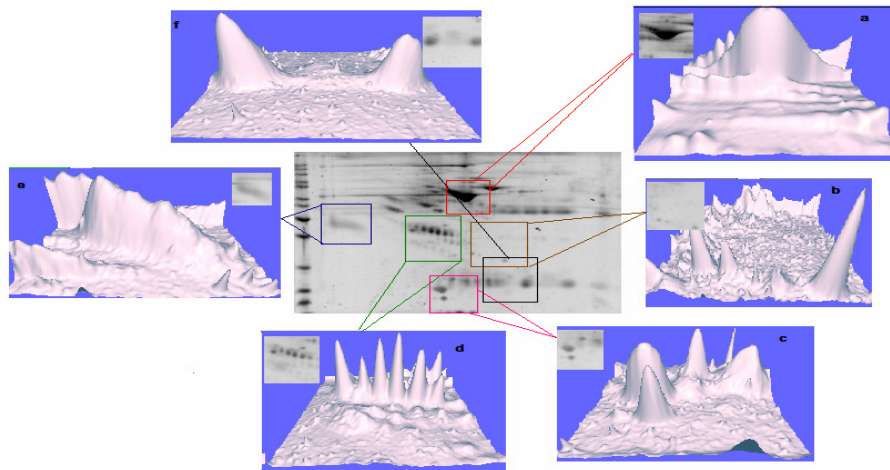


Şekil 4.36. IV. SET deney gruplarının protein profilleri üzerinde bulunan spotla

Protein profilleri üç boyutlu olarak incelendiğinde aynı şekilde I, II ve III. sette görülen farklanmalar IV. sette de tespit edildi. Bulunan farklanmaları üç boyutlu olarak incelediğimizde de ekspresyon farklılıkları Şekil 4.37, 4.38, 4.39 ve 4.40’ da gösterilmektedir. 20 adet abundant proteinin arındırılması sonucu elde edilen protein profillerinde ekspresyonu az olan birçok protein görünür hale getirilmiştir.

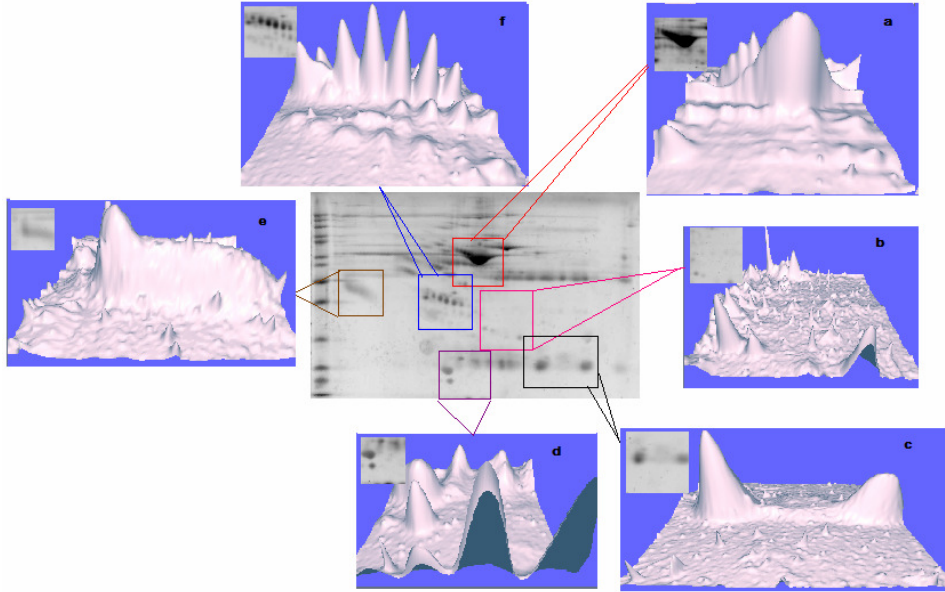


Şekil 4.37. IV. SET Kontrol grubu jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini, (c)IgG hafif zincir, (d)Tanımlanmamış proteinler, (e)Haptoglobin, (f)Apolipoprotein A-I, Tanımlanmamış protein ve Haptoglobin.

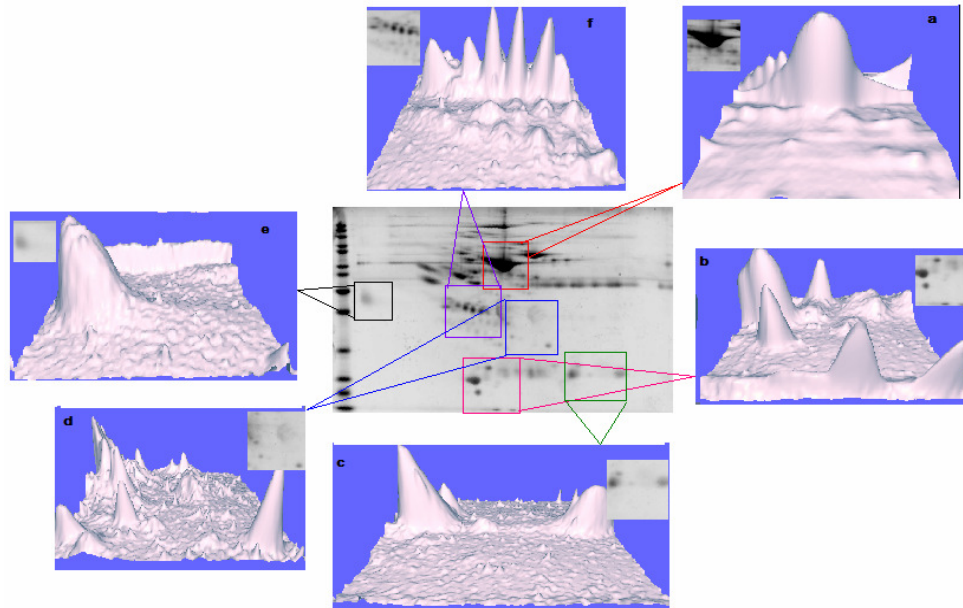


Şekil 4.38. IV. SET Tedavi Almamış jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini, (c)Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I, ve, (d) Tanımlanmamış proteinler, (e) Haptoglobin, (f) Apolipoprotein A-I, Tanımlanmamış protein ve Haptoglobin.

Haptoglobin, (d)Haptoglobin, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)IgG hafif zincir.



Şekil 4.39. IV. SET Tedavi Alan grubu jelinin 3D örnekleri, (a)Albümin, (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteinini, (c)IgG hafif zincir, (d) Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptoglobin, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptoglobin.



Şekil 4.40. IV. SET Tedavi Olmuş grubu jelinin 3D örnekleri, (a)Albümin, (b) Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptoglobin, (c) IgG hafif

zincir, (d)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplement C4-Beta zincir proteini, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptoglobin.

Tablo 4.10. IV. SET PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları

Grup	Toplam spot sayısı	Referans Jelde		
		Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı	Eşleşme %
Kontrol	342	195	147	57
Tedavi Almamış	400	212	188	53
Tedavi Alan*	358	354	4	98
Tedavi Olmuş	331	192	139	58

*Referans jel olarak seçilmiştir.

PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları incelendiğinde tedavi almamış grupta kontrol grubuna göre yine daha fazla protein spotu tespit edilmiştir (Tablo 4.10). Tedavi Alan grubu jeli referans jel olarak seçilip incelendiğinde eşleşme oranının ortalama % 66 olduğu görülmüştür.

Tablo 4.11. IV. SET Analizi

Veri A	Veri B	Tür	Sayı	Metot
Kontrol	Tedavi Almamış	NİTEL	56	A' da olan B' de olmayan
Kontrol	Tedavi Alan		2	
Kontrol	Tedavi Olmuş		68	
Tedavi Almamış	Tedavi Alan		2	
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş		64	
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş		161	

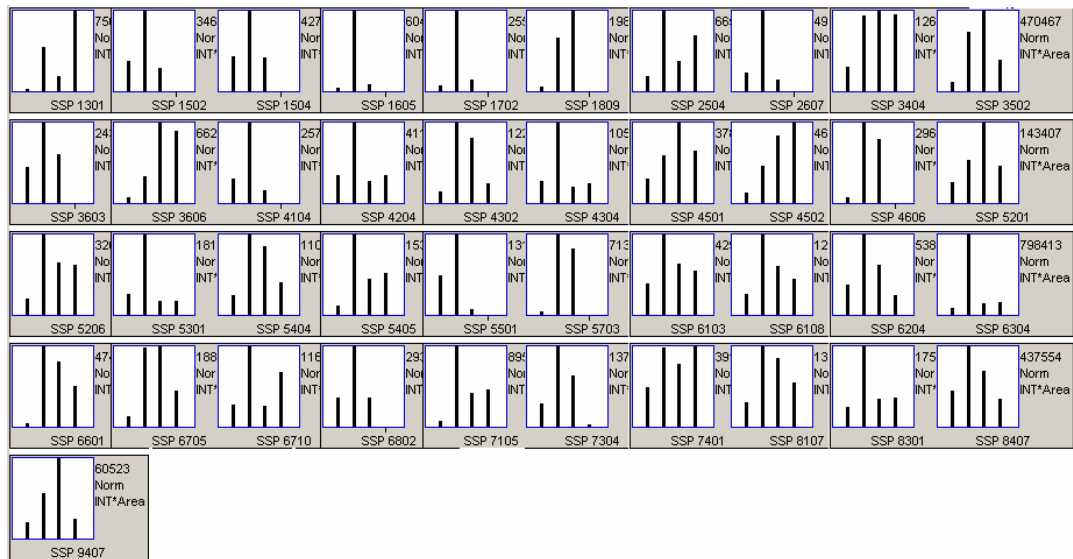
Yapılan analizler sonucu oluşturulmuş olan tablo 4.11' de görüldüğü gibi kontrol grubu ile tedavi almamış grup karşılaştırıldığında kontrol grubunda olup da diğer grupta olmayan protein spot sayısı 56 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuyla tedavi alan ve tedavi olmuş grup karşılaştırıldığında kontrolde olup da diğer gruplarda olmayan protein spot sayısı ise sırayla 2 ve 68 olarak bulunmuştur. Tedavi almamış grup tedavi alan ve tedavi olmuş grupla karşılaştırıldığında ise tedavi almamış grupta olup da diğer

grup da olmayan protein spot sayısı sırayla 2 ve 64' dir. Tedavi alan grupta olup da tedavi olmuş grup da olmayan protein spot sayısı ise 161 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.12. IV. SET Kontrol, Tedavi Almamış Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları

Karşılaştırılan grup		Spot Sayısı		
		En az 2 kat artan	En az 2 kat azalan	Ortak
Kontrol	Tedavi Almamış	37	26	66
Kontrol	Tedavi Alan	47	46	100
Kontrol	Tedavi Olmuş	29	29	69
Tedavi Almamış	Tedavi Alan	35	46	129
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş	23	41	84
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş	27	50	114
Bütün gruplarda				106

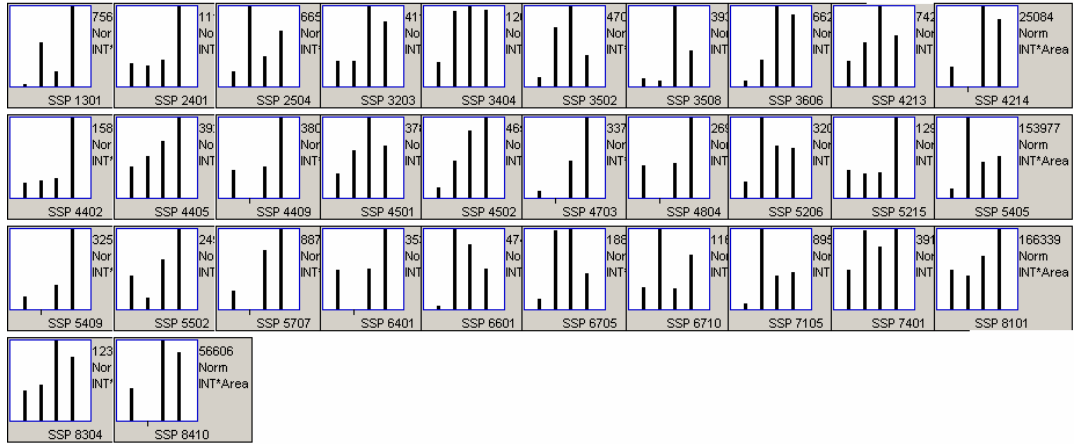
PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları Tablo 4.12' de listelenmiştir. Bu tabloya göre gruplar arasında ekspresyonu en az 2 kat artan, en az 2 kat azalan ve ortak protein spot sayıları listelenmiştir. Tablo 4.12' de listelenmiş olan en az 2 kat artan farklanmaların kanıtı olarak SSP numaralarını da içeren histogram grafikleri Şekil 4.41, 4.42 ve 4.43' de gösterilmiştir.



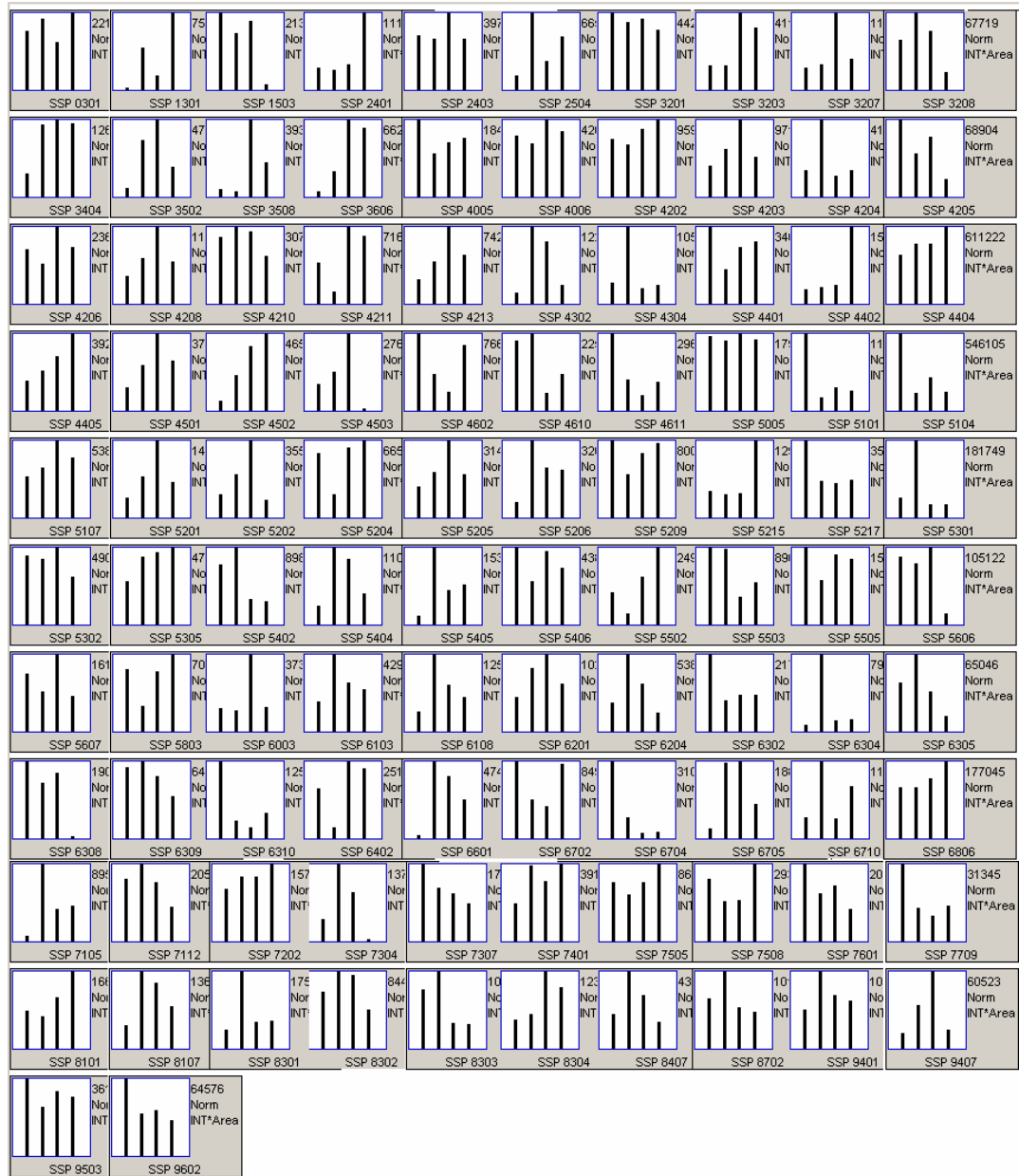
Şekil 4.41. IV. SET Kontrol-Tedavi Almamış gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



Şekil 4.42. IV. SET Kontrol-Tedavi Alan gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



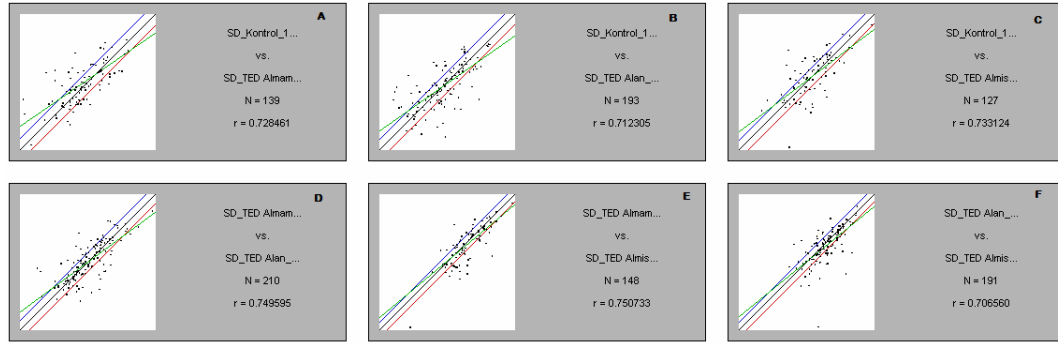
Şekil 4.43. IV. SET Kontrol-Tedavi Olmuş gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



Şekil 4.44. IV. SET tüm gruplarında ortak olarak yer alan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri

Bütün gruplarda ortak olarak bulunan 106 protein spotu SSP numaraları ile birlikte Şekil 4.44’ de histogram grafikleri ile birlikte gösterilmiştir.

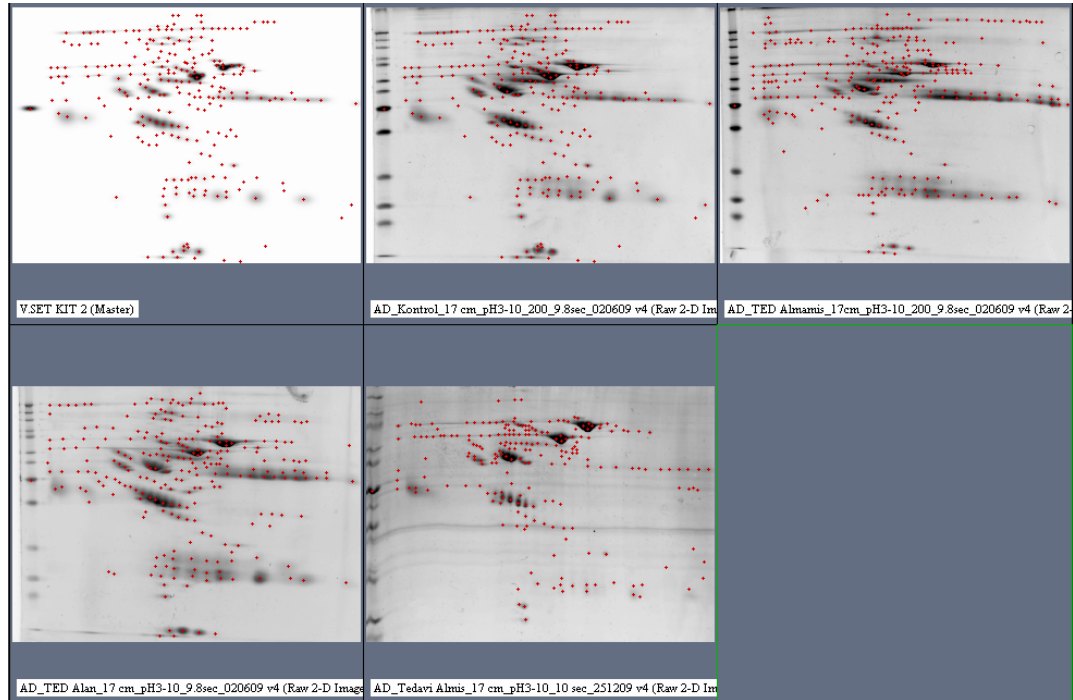
Bütün karşılaştırma parametreleri dikkate alınarak yapılan analizler sonucu oluşan spot dağılım grafikleri Şekil 4.45’ de gösterilmektedir.



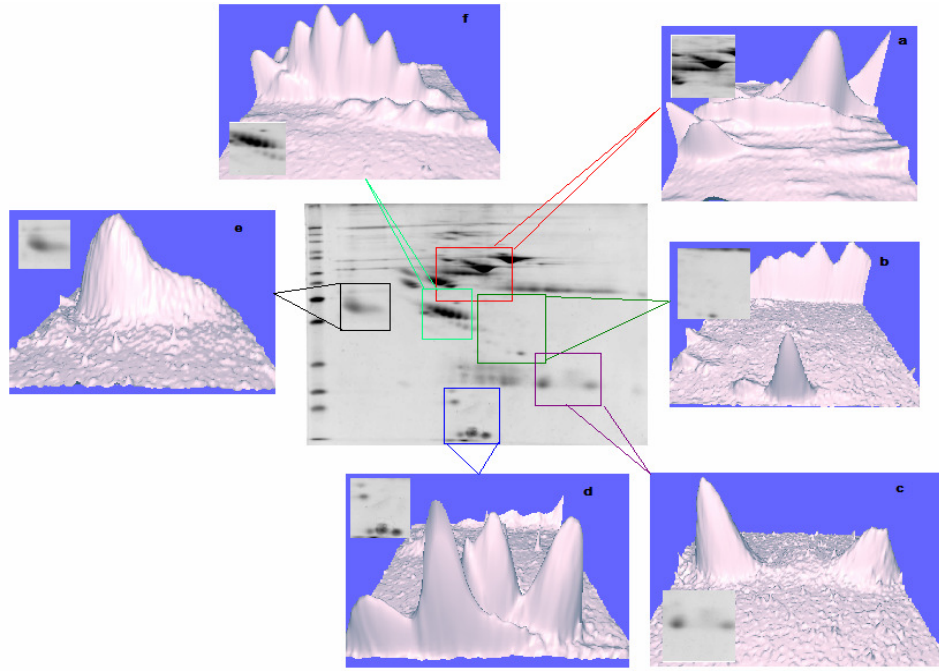
Şekil 4.45. IV. SET A)Kontrol ve Tedavi Almamış B)Kontrol ve Tedavi Alan C)Kontrol ve Tedavi Olmuş D)Tedavi Almamış ve Tedavi Alan E)Tedavi Almamış ve Tedavi Olmuş F)Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların karşılaştırılması sonucu elde edilen spot dağılım grafikleri

4.2.3. Kolon 2 kullanımı sonucu elde edilen grupların karşılaştırılması

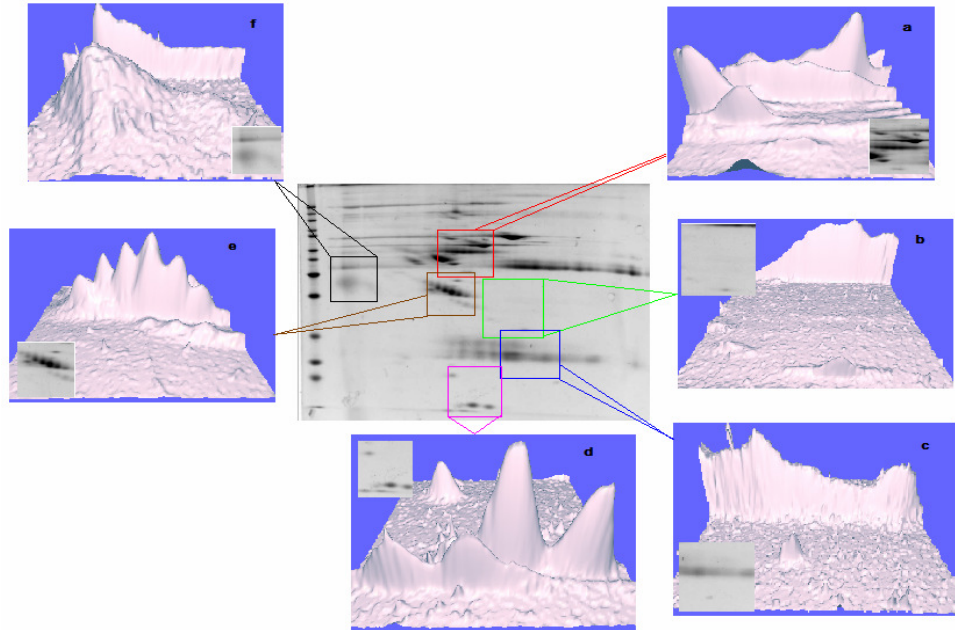
Kolon 2 kullanımı sonucu gruplar arası yapılan değerlendirmelerle tespit edilmiş olan proteinler Şekil 4.46' da gösterilmektedir.



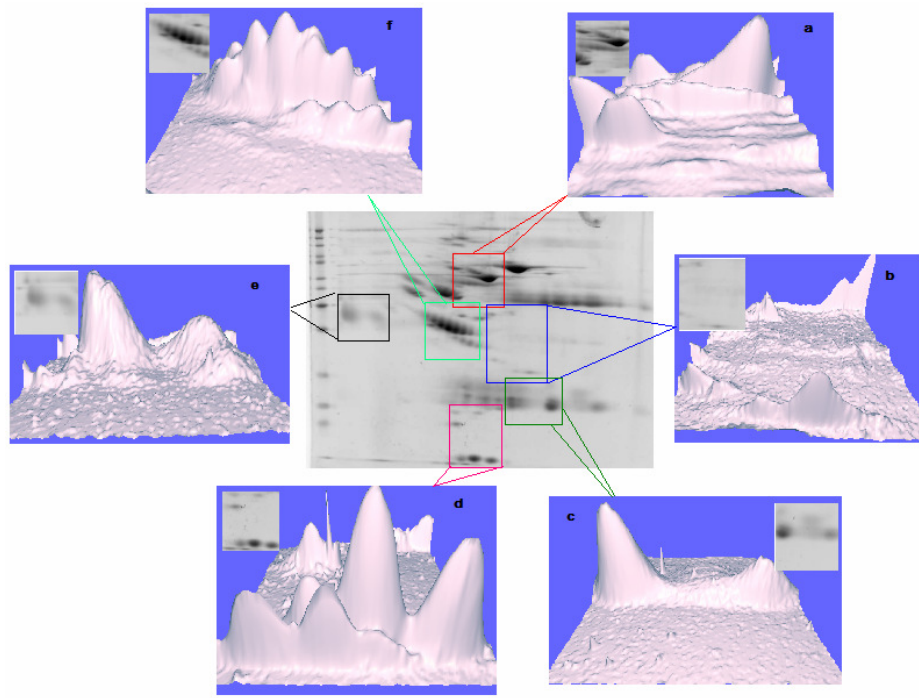
Şekil 4.46. V. SET deney gruplarının protein profilleri üzerinde bulunan spotlar



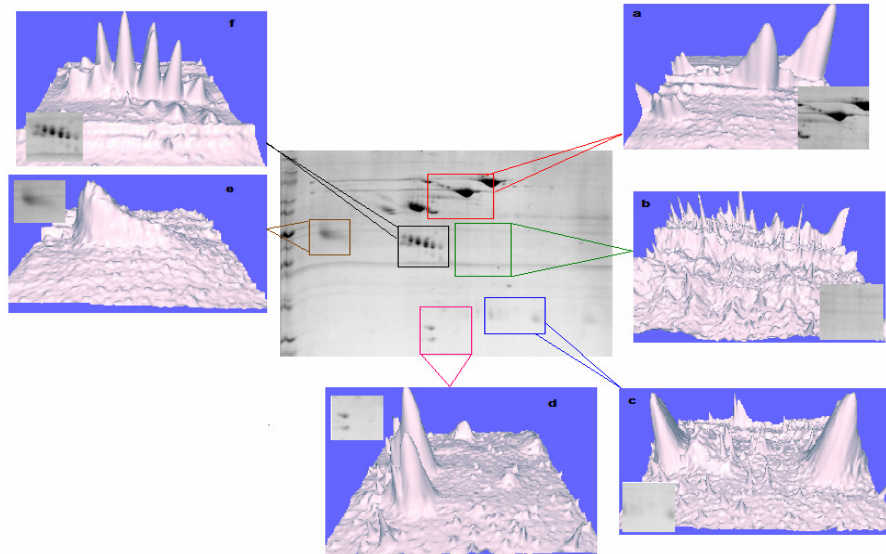
Şekil 4.47. V.SET Kontrol grubu jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplement C4-Beta zincir proteini, (c)IgG hafif zincir, (d)Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptoglobin, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptoglobin.



Şekil 4.48. V.SET Tedavi Almamış jelinin 3D örnekleri (a)Albümin (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler, (c)IgG hafif zincir, (d)Tanımlanmamış protein ve Haptoglobin, (e)Haptoglobin (f)Tanımlanmamış proteinler.



Şekil 4.49. V.SET Tedavi Alan jelinin 3D örnekleri (a)Albümin (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler ve Komplemant C4-Beta zincir proteini, (c)IgG hafif zincir, (d)Tanımlanmamış protein, Apolipoprotein A-I ve Haptoglobin, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptoglobin.



Şekil 4.50. V.SET Tedavi Olmuş jelinin 3D örnekleri (a)Albümin, (b)Ekspresyonu az olan tanımlanmamış proteinler, (c)IgG hafif zincir, (d)Tanımlanmamış protein ve Apolipoprotein A-I, (e)Tanımlanmamış proteinler, (f)Haptoglobin.

Tablo 4.13. V. SET PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları

Grup	Toplam spot sayısı	Referans Jelde		
		Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı	Eşleşme %
Kontrol*	251	251	0	100
Tedavi Almamış	298	139	159	46
Tedavi Alan	258	134	124	51
Tedavi Olmuş	218	89	129	40

*Referans jel olarak seçilmiştir.

PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları incelendiğinde tedavi almamış grupta kontrol grubuna göre yine daha fazla protein spotu tespit edilmiştir (Tablo 4.13). Kontrol grubu jeli referans jel olarak seçilip incelendiğinde eşleşme oranının ortalama % 60 olduğu görülmüştür.

Tablo 4.14: V. SET Analizi

Veri A	Veri B	Tür	Sayı	Metot
Kontrol	Tedavi Almamış	NİTEL	111	A' da olan B' de olmayan
Kontrol	Tedavi Alan		117	
Kontrol	Tedavi Olmuş		161	
Tedavi Almamış	Tedavi Alan		37	
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş		68	
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş		54	

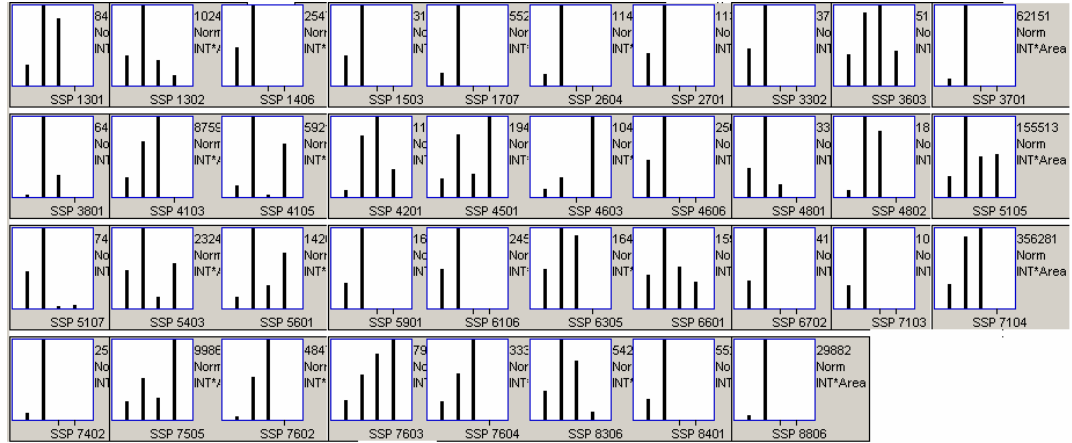
Yapılan analizler sonucu oluşturulmuş olan Tablo 4.14' de görüldüğü gibi kontrol grubu ile tedavi almamış grup karşılaştırıldığında kontrol grubunda olup da diğer grupta olmayan protein spot sayısı 111 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuyla tedavi alan ve tedavi olmuş grup karşılaştırıldığında kontrolde olup da diğer gruplarda olmayan protein spot sayısı ise sırayla 117 ve 161 olarak bulunmuştur. Tedavi almamış grup tedavi alan ve tedavi olmuş grupla karşılaştırıldığında ise tedavi almamış grupta olup da diğer grup da olmayan protein spot sayısı sırayla 37 ve 68' dir. Tedavi alan grupta olup da tedavi olmuş grup da olmayan protein spot sayısı ise 54 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.15. V.SET Kontrol, Tedavi Almamış Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları

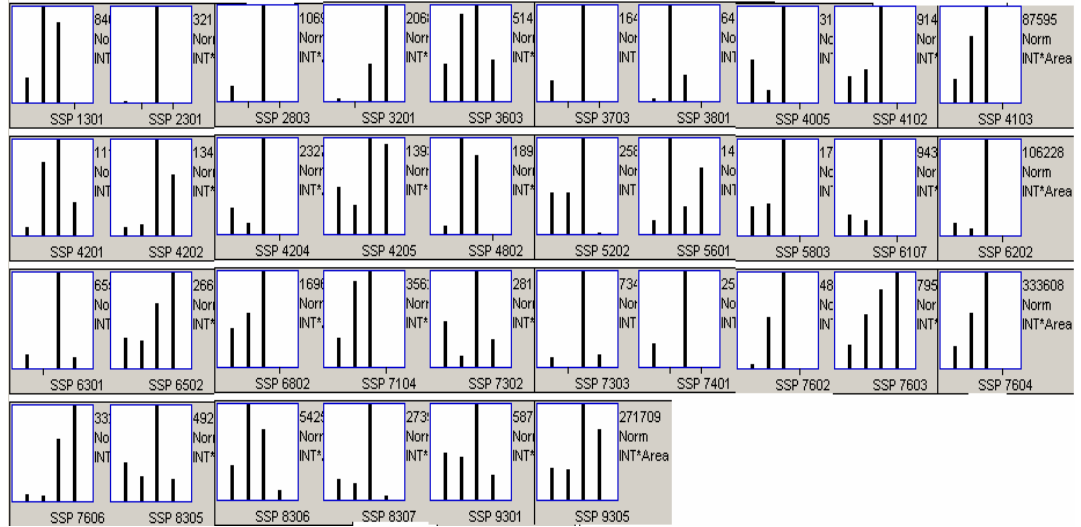
Karşılaştırılan grup		Spot Sayısı		
		En az 2 kat artan	En az 2 kat azalan	Ortak
Kontrol	Tedavi Almamış	38	26	75
Kontrol	Tedavi Alan	36	29	69
Kontrol	Tedavi Olmuş	24	23	42
Tedavi Almamış	Tedavi Alan	28	21	53
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş	21	20	30
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş	18	21	41
Bütün gruplarda				69

PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları Tablo 4.15’ de listelenmiştir. Bu tabloya göre gruplar arasında ekspresyonu en az 2 kat artan, en az 2 kat azalan ve ortak protein spot sayıları listelenmiştir.

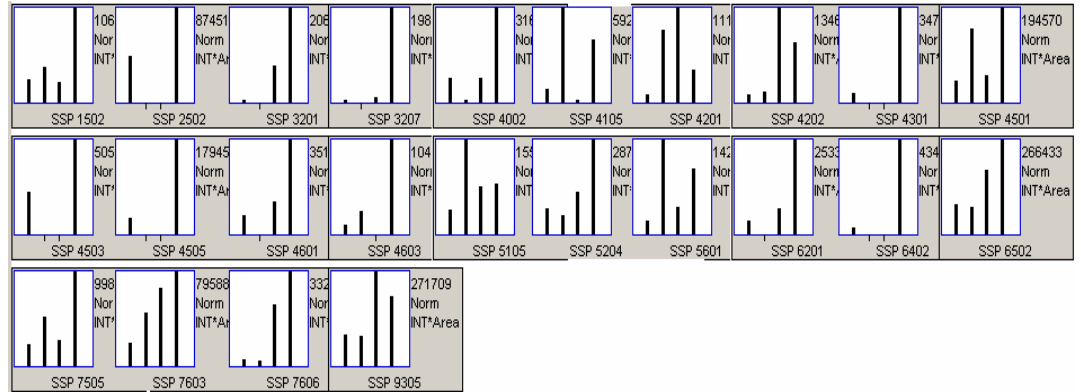
Tablo 4.15’ de listelenmiş olan en az 2 kat artan farklıların kanıtı olarak SSP numaralarını da içeren histogram grafikleri Şekil 4.51, 4.52 ve 4.53’ de gösterilmiştir.



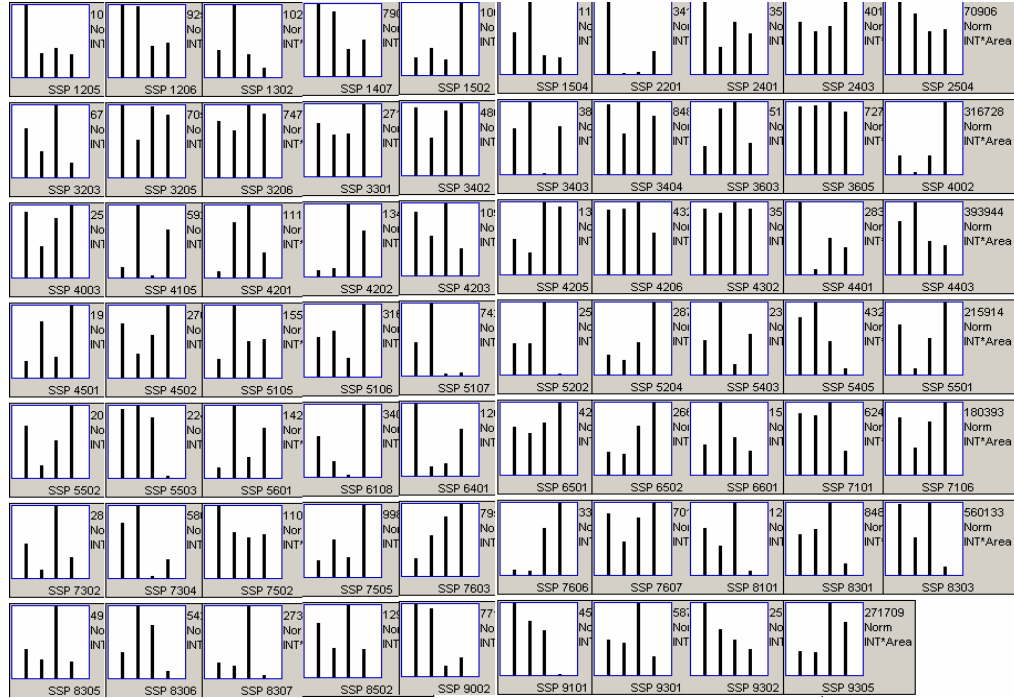
Şekil 4.51. V.SET Kontrol-Tedavi Almamış gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



Şekil 4.52. V.SET Kontrol-Tedavi Alan gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



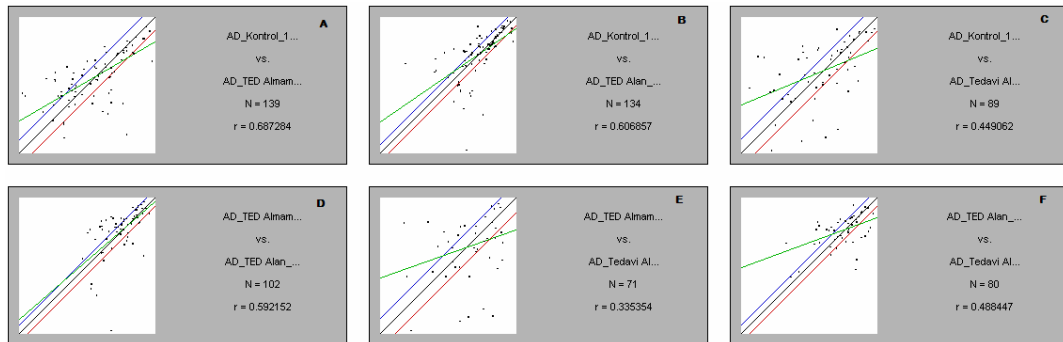
Şekil 4.53. V.SET Kontrol-Tedavi Olmuş gruplar arasında ekspresyonu 2 kat ve daha fazla artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri



Şekil 4.54. V.SET tüm gruplarında ortak olarak yer alan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri

Bütün gruplarda ortak olarak bulunan 69 protein spotu SSP numaraları ile birlikte Şekil 4.54' de histogram grafikleri ile birlikte gösterilmiştir.

Bütün karşılaştırma parametreleri dikkate alınarak yapılan analizler sonucu oluşan spot dağılım grafikleri Şekil 4.55' de gösterilmektedir.



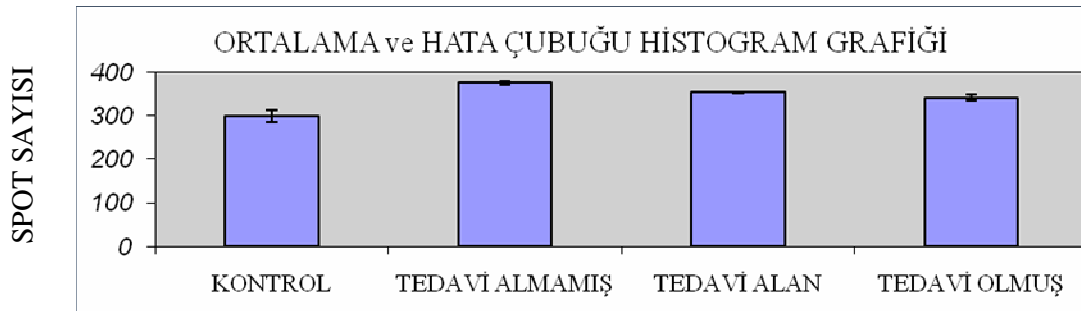
Şekil 4.55. V.SET A) Kontrol ve Tedavi Almamış B) Kontrol ve Tedavi Alan C) Kontrol ve Tedavi Olmuş D) Tedavi Almamış ve Tedavi Alan E) Tedavi Almamış ve Tedavi Olmuş F) Tedavi Alan ve Tedavi Olmuş grupların karşılaştırılması sonucu elde edilen spot dağılım grafikleri

4.3. SETLER ARASINDA YAPILAN DEĞERLENDİRMELER

Tablo 4.16. PDQuest jel spot analiz sonuçlarının karşılaştırılması

SETLER	KONTROL	TEDAVİ ALMAMIŞ	TEDAVİ ALAN	TEDAVİ OLMUŞ
I. SET	304	381	349	356
II. SET	326	379	351	329
III. SET	266	365	358	338
Ortalama($\bar{x}$)	298,77±30.35	375±8.72	352,77±4.73	341±13.75
Standart Hata	13,58	3,90	2,11	6,15
IV. SET	342	400	358	331
V.SET	251	298	258	218

Tablo 4.16’ da bütün setlerin protein spot sayısı verilmektedir. İlk üç set aynı prosedürün uygulandığı gruplar olmasından dolayı ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Protein profilinde gördüğümüz farklanmaları Şekil 4.56 da verilmiş olan histogram grafiğine çevirdiğimizde de tedavi almamış grubun protein spot sayısının fazla olduğunu görmekteyiz. Şekil 4.56’ yı genel olarak incelediğimizde meme kanserli grubun spot sayısının kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu görmekteyiz. Bunun yanında standart hatanın kontrol grubunda fazla çıkmış olması sağlıklı bireylerde dahi birçok parametrenin etkisinden dolayı proteom profilinin farklı çıkabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.56. Abundant proteinler azaltılmadan elde edilmiş I., II. ve III. setlerin ortalama ve standart hata çizgilerini içeren histogram grafiği

Tablo 4.16 incelendiğinde 20 adet abundant proteine duyarlı olan kolon 1 kullanımı sonrası elde edilmiş olan protein haritalarına (set IV) göre daha fazla sayıda ekspresyonu az olan protein görünür hale getirilmiş dolayısıyla spot sayısı fazla çıkmıştır. Albümin ve IgG' lere duyarlı olan kit 2 kullanımı sonrası elde edilmiş olan protein haritalarına(set V) göre ise mevcutta yer alan ekspresyonu az olan birçok protein kaybedilmiş bunun yanında albüminin altında yer alan birçok protein de görünür hale getirilmiştir.

Tablo 4.17. PDQuest jel kantitatif analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Karşılaştırılan grup		En az 2 kat artan spot sayısı				
		I.SET	II. SET	III. SET	IV. SET	V.SET
Kontrol	Tedavi Almamış	56	25	44	37	38
Kontrol	Tedavi Alan	43	21	48	47	36
Kontrol	Tedavi Olmuş	40	25	30	29	24
Tedavi Almamış	Tedavi Alan	29	20	17	35	28
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş	30	28	10	23	21
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş	31	33	9	27	18
		En az 2 kat azalan spot sayısı				
Kontrol	Tedavi Almamış	58	15	25	26	26
Kontrol	Tedavi Alan	62	13	30	46	29
Kontrol	Tedavi Olmuş	53	34	33	29	23
Tedavi Almamış	Tedavi Alan	37	15	20	46	21
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş	30	33	37	41	20
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş	31	38	30	50	21
		Ortak spot sayısı				
Kontrol	Tedavi Almamış	114	107	52	66	75
Kontrol	Tedavi Alan	94	101	61	100	69
Kontrol	Tedavi Olmuş	107	140	76	69	42
Tedavi Almamış	Tedavi Alan	101	98	57	129	53
Tedavi Almamış	Tedavi Olmuş	101	132	47	84	30
Tedavi Alan	Tedavi Olmuş	100	98	64	114	41

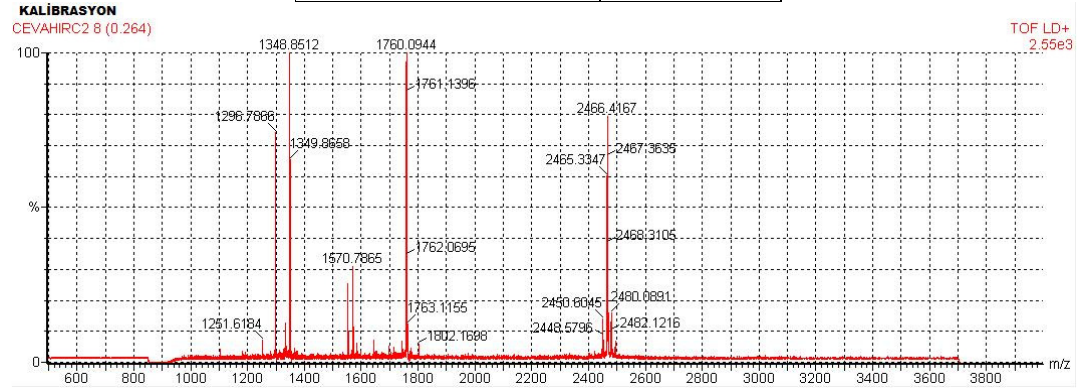
Tablo 4.17' de bütün grupların kantitatif analiz sonuçları karşılaştırılmış ve genel olarak incelendiğinde kolon kullanımı ile kantitatif değişiklik oluşturan spotlarda farklanmalar görülmüştür.

4.4. PROTEİNLERİN TANIMLANMASI

4.4.1. MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonunun yapılması

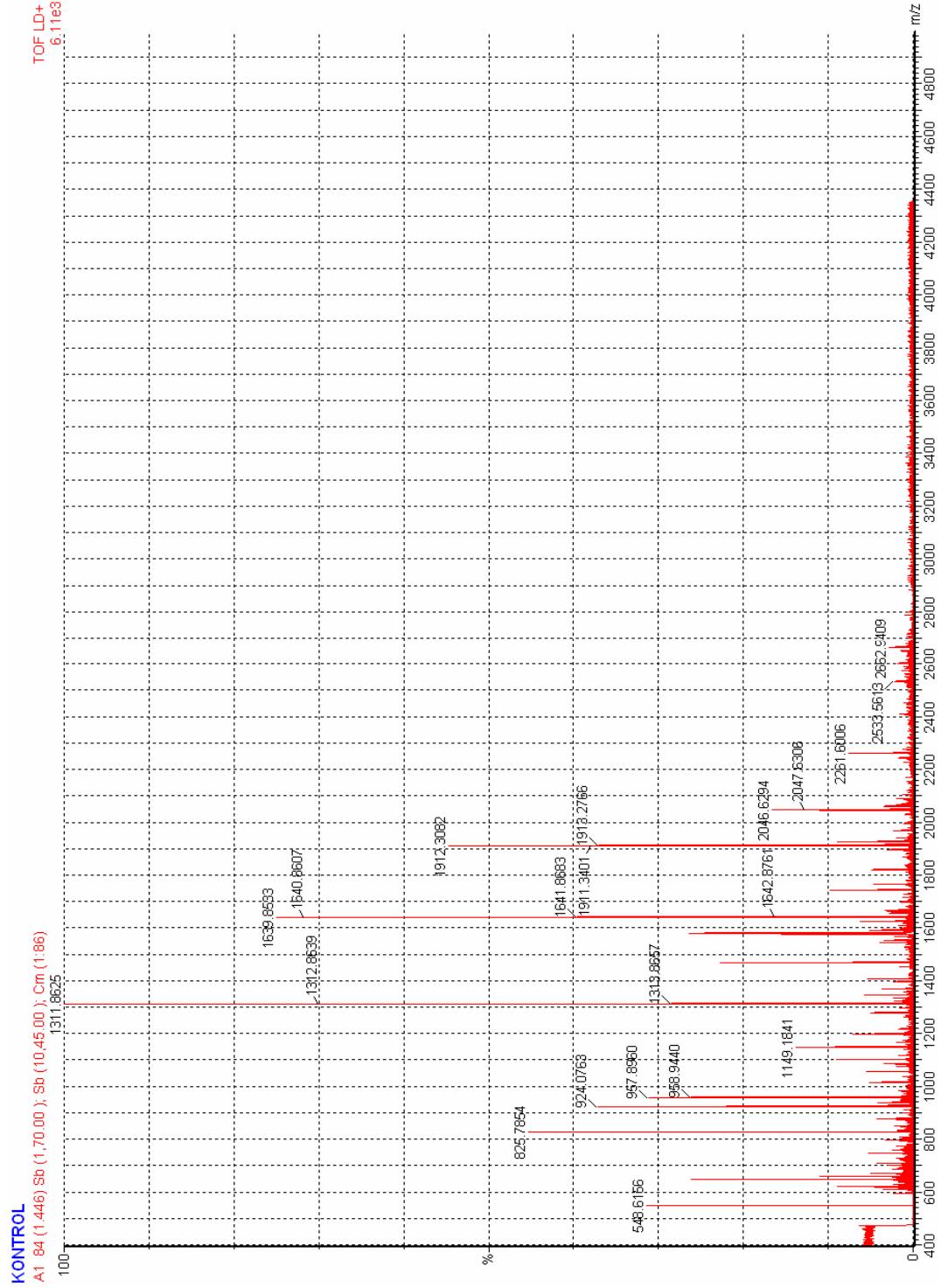
MALDI plakalarının Luck Mass kuyucuklarına spotlanan ve cihazın kalibrasyonunun yapılmasında kullanılan 5 adet peptit karışımı ile elde edilmiş olan spektra aşağıda yer almaktadır.

5 PEPTİD KARIŞIMI	KÜTLE-Da
ANGİOTENSİN	1296,6853
SUBSTANCE P	1347,7360
Glu Fib	1570,6774
Renin-14	1758,9326
ACTH-18,39	2465,1989



Şekil 4.57. Maldi kalibrasyon spektrumu

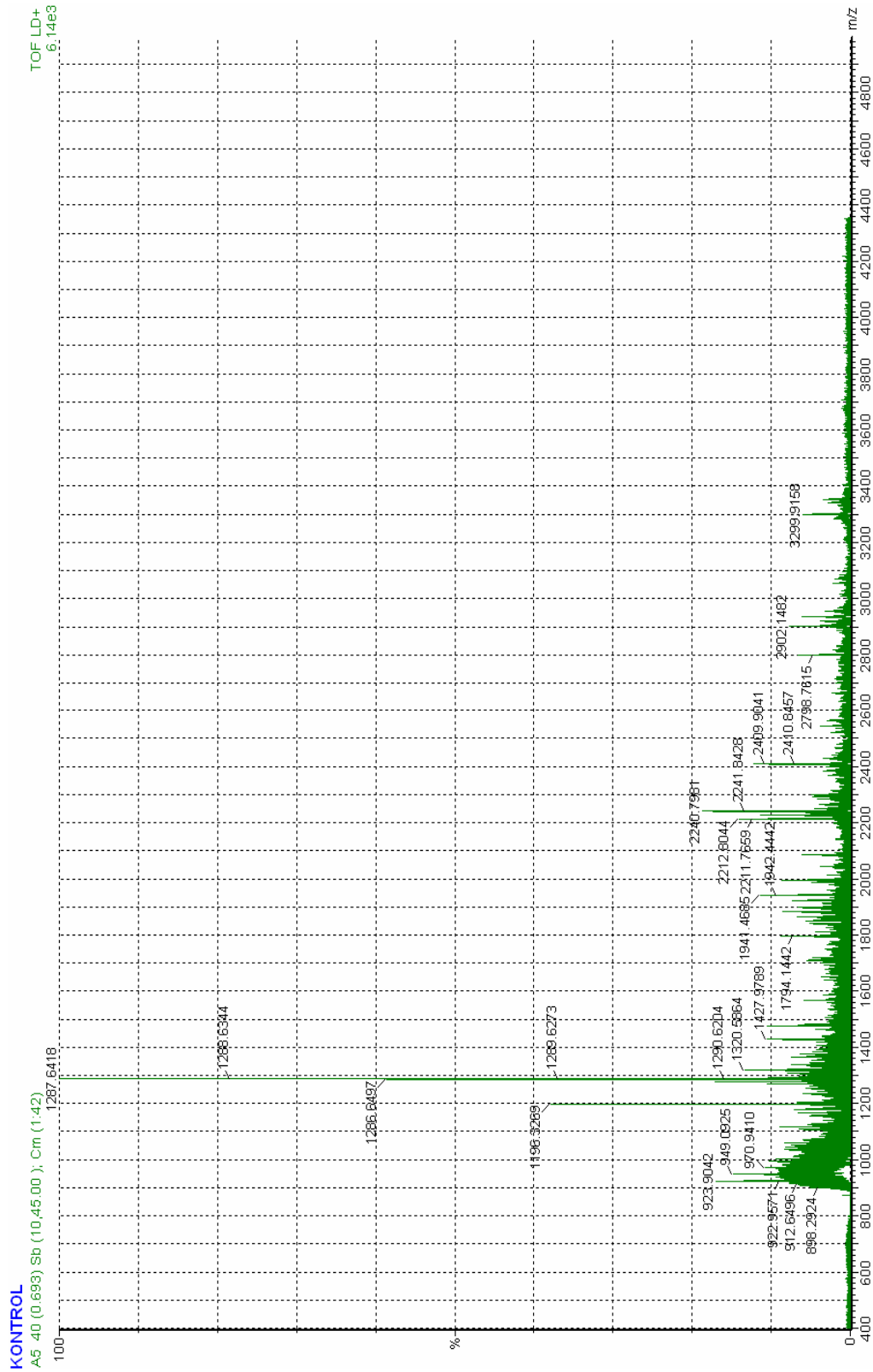
4.4.2. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin spektrumları



Şekil 4.58. Albümin proteini için elde edilmiş kütle spektrogramu

Tablo 4.18. Albümin proteini için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri

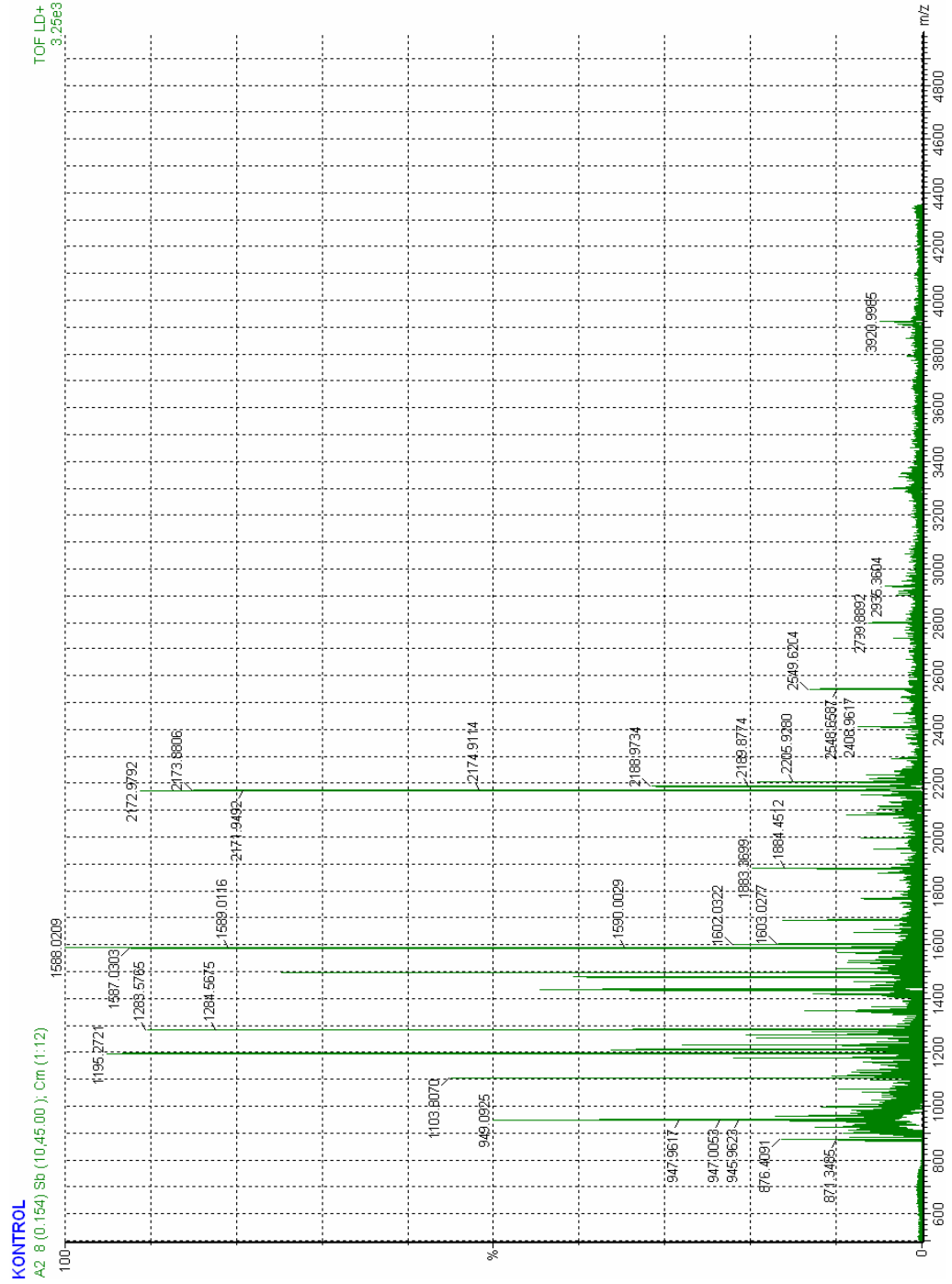
KÜTLE	MODİFİKASYON	PEPTİD DİZİSİ
2917.3229		SHCIAEVENDEMPADLPSLA ADFVESK
2593.2425		LVRPEVDVMCTAFHDNEETF LK
2433.2635		ALVLIAFAQYLQQCPFEDHV K
2404.1709		MPCAEDYLSVVLNQLCVLHE K
2203.0012		EFNAETFTFHADICTLSEK
2045.0953		VFDEFKPLVEEPQNLIK
1915.7731		VHTECCHGDLLECADDR
1853.9102		RPCFSALEVDETYVPK
1742.8940		HPYFYAPELLFFAK
1623.7875		DVFLGMFLYEYAR
1600.7312		QNCSELFQLGEYK
1511.8427	PHOS: 443, 444,446	1751.7417 VPQVSTPTLVEVSR
1386.6206	PHOS: 294, 297	1546.5532 YICENQDSISSK
1384.5355	PHOS: 82	1464.5018 TCVADESAENCDK
1381.5333		CCAAADPHECYAK
1342.6347		AVMDDFAAFVEK
1320.4905		ETYGEMADCCAK
1311.7419		HPDYSVLLLR
1257.5238		AAFTECCQAADK
1191.5748		ECCEKPLLEK
1149.6150		LVNEVTEFAK
1024.4550		CCTESLVNR
1018.4775		NECFLQHK
1017.5363		SLHTLFGDK
1013.5989		LVAASQAALGL
1013.4244		ETCFAEEGK
1000.6037		QTALVELVK
984.4884		TYETTLEK
960.5625		FQNALLVR
951.4418		DLGEENFK
940.4483		DDNPNLPR
927.4934		YLYEIAR
880.4410		AEFAEVSK
876.4971		LCTVATLR
789.4716		LVTDLTK
715.4171		AACLLPK
698.3580		SEVAHR
695.3359		NYAEAK
674.3468		TPVSDR
673.3780		AWAVAR
658.3155		QEPER
649.3338		CASLQK
645.3566		LDELK
581.3042		HPEAK
517.2980		EQLK
517.2980		ADLAK
509.3194		HKPK
508.2514		FGER
503.2936		LSQR



Şekil 4.59. Haptoglobin proteini için elde edilmiş kütle spektrumu

Tablo 4.19. Haptoglobin proteini için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri

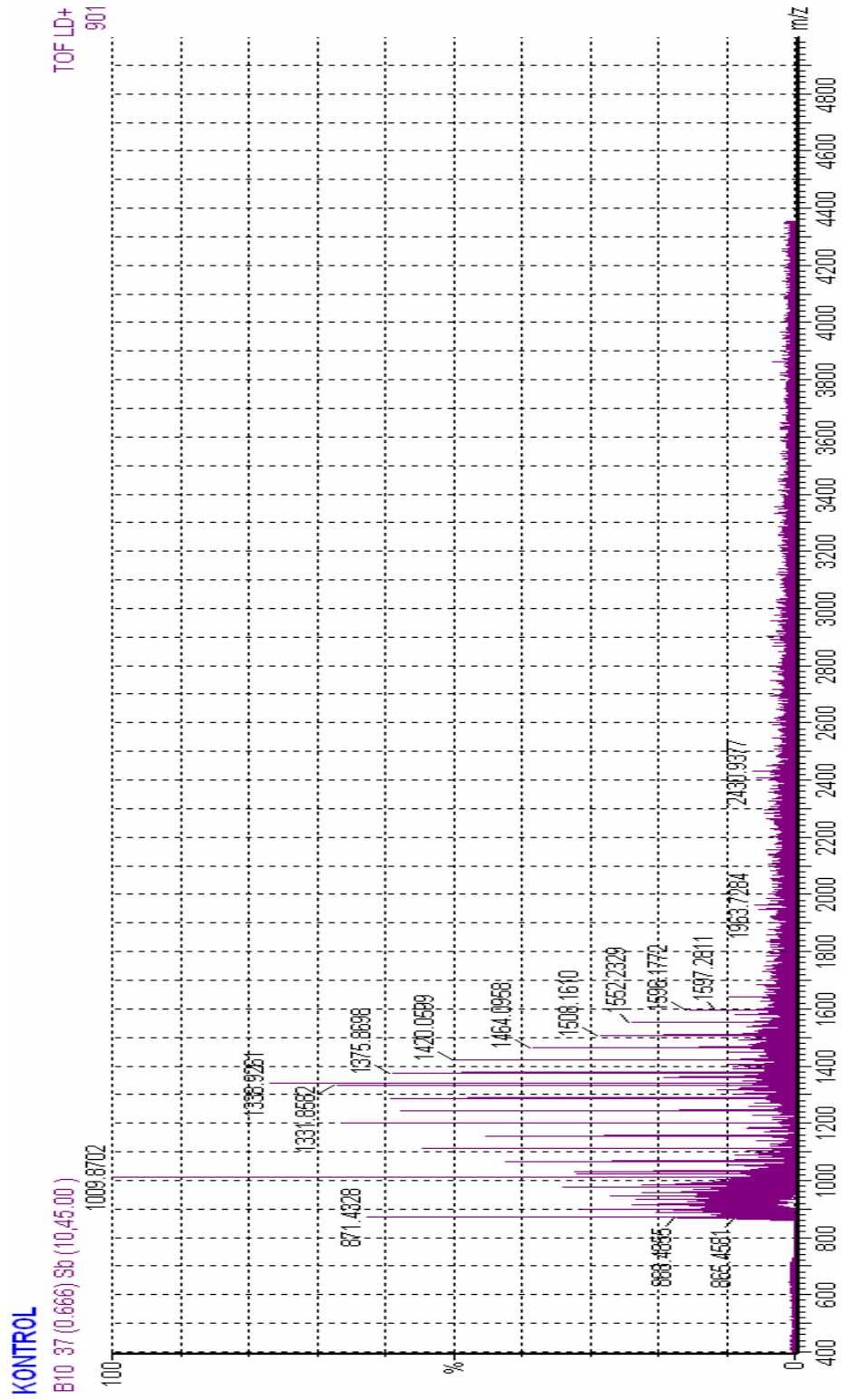
KÜTLE	PEPTİT DİZİSİ
3817.6486	YQEDTCYGDAGSAFAVHDLE EDTWYATGILSFDK
3292.5174	VDSGNDVTDIADDGCPKPPE IAHGYVEHSVR
2848.3028	LPECEADDGCPKPPEIAHGY VEHSVR
2679.3923	MVSHHNLTGTGATLINEQWLL TTAK
2115.0361	SPVGVQPILNEHTFCAGMSK
1795.0112	VVLHPNYSQVDIGLIK
1650.7978	YVMLPVADQDQCIR
1458.7335	NLFLNHSENATAK
1439.6648	TEGDGVYTLNNEK
1311.6063	TEGDGVYTLNDK
1290.7303	DIAPTLTLYVGK
1288.6242	SCAVAIEYGVYVK
1273.6279	LPECEAVCGKPK
1203.6368	VTSIQDWVQK
1146.5425	HYEGSTVPEK
987.5365	VMPICLPSK
980.4948	VGIVSGWGR
923.5308	ILGGHLDK
920.4624	GSFPWQAK
895.4744	NPANPVQR
858.4931	QLVEIEK
809.3788	DYAEVGR
760.3988	FTDHLK
703.3733	VSVNER
688.3777	QWINK
688.3777	QWINK
593.3042	NANFK
587.2824	NYK
587.2824	NYK
547.2722	TIAEN
541.2439	YQCK
541.2439	YQCK



Şekil 4.60. Immünoglobulin proteini için elde edilmiş kütle spektrumu

Tablo 4.20. İmmünoglobulin proteini için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri

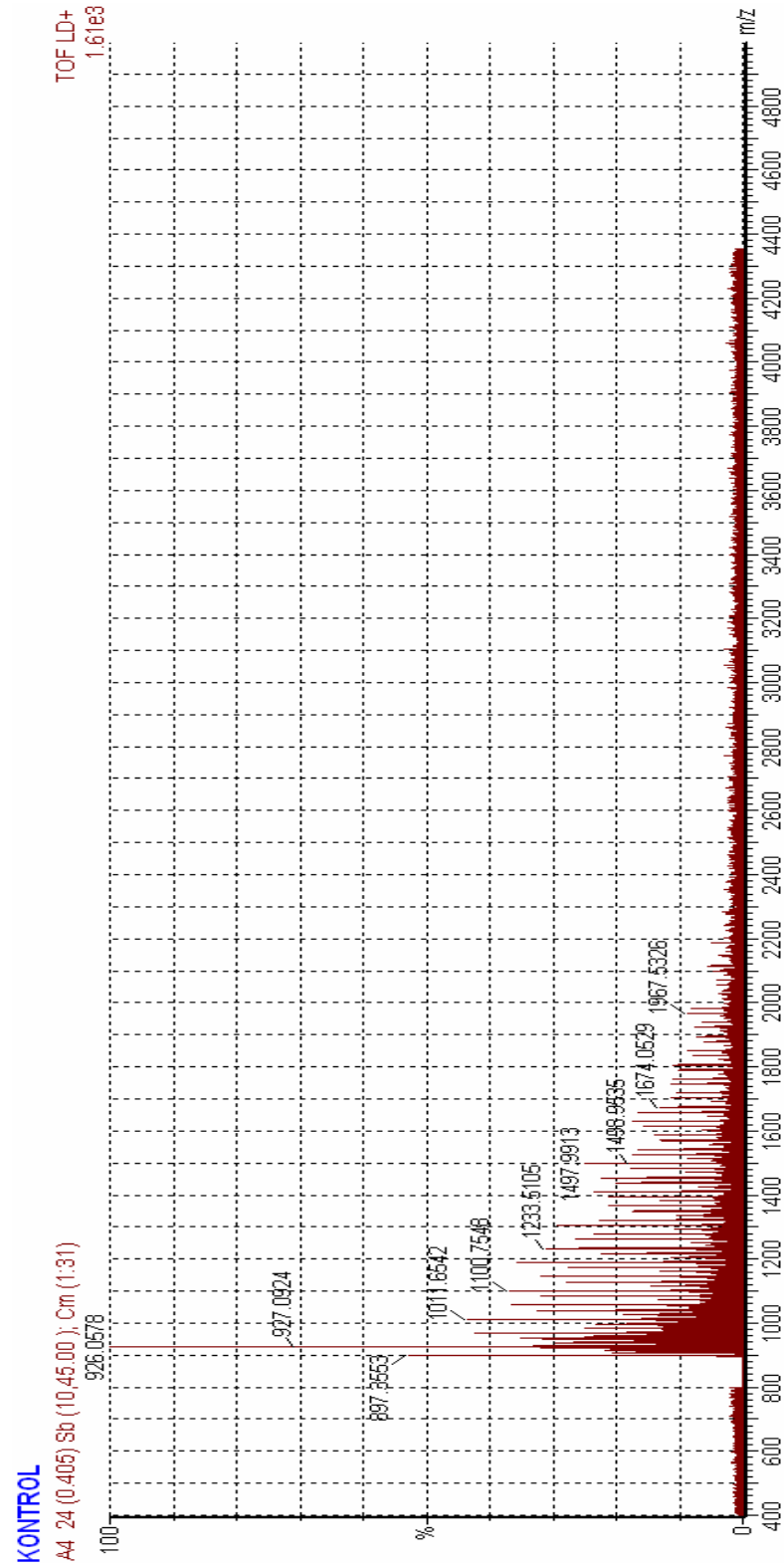
KÜTLE	PEPTİT DİZİSİ
4398.1155	GSASAPTLFPLVSCENSPSD TSSVAVGCLAQDFLPDSITL SWK
3567.6485	YFAHSILTVSEEEWNTGETY TCVAHEALPNR
3461.4934	THTNISESHPNATFSAVGEA SICEDDWNSGER
2686.3003	ESATITCLVTGFSPADVQ WMQR
2308.0835	STGKPTLYNVSLVMSDTAGT CY
2288.1478	LTCLVTDLTYSVTISWTR
2282.0540	GLTFQQNASSMCVPDQDTAI R
1774.0122	GVALHRPDVYLLPPAR
1659.8410	FTCTVTHTDLPSPK
1637.9301	VFAIPPSFASIFLTK
1617.8078	QVGSGVTDDQVQAEAK
1600.7788	YVTSAPMPEPQAPGR
1559.6617	ESDWLGQSMFTCR
1460.6508	DVMQGTDEHVCK
1386.8355	NVPLPVIAELPPK
1277.7099	YAATSQVLLPSK
1192.6143	LICQATGFSPR
1029.5840	QIQVSWLR
993.4596	NNSDISSTR
909.4213	DGFFGNPR
900.5301	VSVFVPPR
893.4588	VQHPNGNK
882.4203	ESGPTTYK
862.5244	VTSTLTIK
855.4570	GQPLSPEK
829.4890	QTISRPK
775.4461	GFPSVLR
772.4312	EQLNLR
745.3839	QNGEAVK
526.2732	VDHR
504.2776	VTER



Şekil 4.61. Apolipoprotein A-I proteini için elde edilmiş kütle spektrumu

Tablo 4.21. Apolipoprotein A-I proteini için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri

KÜTLE	PEPTİT DİZİSİ
1932.9337	EQLGPVTQEFWDNLEK
1612.7853	LLDNWDSVTSTFSK
1400.6692	DYVSQFEGSALGK
1386.7151	VSFLSALEEYTK
1301.6484	PHOS: 191 1381.6147 THLAPYSDEL R
1283.5725	WQEEMEL YR
1252.6208	VQPYLDDFQK
1235.6881	DLATVYVDVLK
1230.7092	QGLLPVLESFK
1226.5436	DEPPQSPWDR
1215.6215	ATEHLSTLSEK
1031.5190	LSPLGEEMR
1012.5785	AKPALEDLR
896.4836	LHELQEK
873.4424	AELQEGAR
831.4359	LAEYHAK
781.4315	AHVDALR
732.3774	DLEEVK
704.3573	ETEGLR
622.2865	QEMSK
615.3824	QLNLK
613.3668	VEPLR
603.2845	ENG GAR
573.3606	LEALK



Şekil 4.62. Komplement C4- β zincir proteini için elde edilmiş kütle spektrumu

Tablo 4.22. Komplement C4- β proteini için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri

KÜTLE	PEPTİT DİZİSİ
4537.1874	APVDLLGVAHNNLMAMAQET GDNLYWGSVTGSQSNVSPSPT PAPR
4036.0483	SMQGGLVGNDETVALTAFVT IALHHGLAVFQDEGAEPK
3326.7241	NPSDPMPQAPALWIETTAYA LLHLLHEGK
3097.5337	LQETSNWLLSQQQADGSFQD LSPVIHR
2778.3580	STQDTVIALDALSAWIAH TTEER
2551.1769	TLEIPGNSDPNMIPDGFNS YVR
2483.2987	VTASDPLDTLGSEGALSPGG VASLLR
2071.1545	ASAGLLGAHAAITAYALSL TK
1881.9197	GCGEQTMILAPTAAASR
1541.8169	VLSLAQEQVGGSPK
1449.6791	AEMADQASAWLTR
1416.7005	TEQWSTLPPETK
1367.7205	DSSTWLTAFVLK
1196.5694	ADGSYAAWLSR
1104.6007	GLNVTLSSTGR
1038.5578	DHAVDLIKK
983.4693	QGSFQGGFR
865.4414	ANSFLGEK
733.4090	VEASISK
691.3886	IQQFR
538.2871	YLDK
526.2442	GYMR

Tablo 4.23. Sağlıklı ve meme kanserli kadınlarda Maldi-Tof kütle spektrometresi ile ortak olarak tespit edilen ilişkili proteinlerin pI ve Mr değerlerinin karşılaştırılması

Protein Adı	Erişim No	Teorik pI/Mr	Ölçülen pI/Mr
Serum Albümin	P02768	5.8/67000	5.9/66900
Immunoglobülin ağır zincir	P99006	6.76/50792	6.7/49500
Immunoglobulin hafif zincir	Q0KK16	Tanımlanmamış	6.89/23915
Haptoglobin	P00738	5.6/40342	5.6/40000
Apolipoprotein A-I	P02647	5.12/22873	5.9/22800
Komplement C4- β zincir	P0C0L5	5.03/40595	5.7/42000

Peptid eşlenmeleri, iki boyutlu jel elektroforezi analizleri ile pI ve moleküler ağırlıklar açısından da tekrar kontrollü olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.23).

5. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Evre I ve II erken evre meme kanseri olarak kabul edilmektedirler ve tümör boyutları 2 cm' den az olmasından dolayı hasta üzerindeki etkileri çok farklı değildir. Ancak akut faz proteinlerinden olan Haptoglobin proteini bu çalışmada tedavi almamış grupta evre I' e göre evre II' de ekspresyonu fazla bulunmuştur. Tedavi alan grupta yapılan değerlendirmeler sonucu 15 Da civarında yer alan Haptoglobin serileri de evre I' e göre evre IIB' de daha yoğun bulunmuştur. Literatürde de, haptoglobin ve α 1-AT proteinlerinin ekspresyonları meme kanseri evresi I, II ve III' de bulunan kadınlara göre sağlıklılara nazaran fazla ifade olduğu görülmüş ve meme kanserinin gelişimi için yeni ve faydalı bir biyobelirteç sayılabileceği belirtilmiştir [42].

Literatüre göre Haptoglobin ve alfa-1 antitripsin inflamasyon biyobelirteci olarak görülen polimorfik akut faz proteinleridir. Bu proteinlerin serum konsantrasyonlarının artışı kanser tanısı için spesifik sayılmamaktadır çünkü belirtilen farklanma aterosklerosis, eklem iltihabı ve kalple ilgili hastalıklarda da teşhis edilmiştir [95]. Kanserde ise bu akut faz proteinlerinin artışı tümör nekroz ve kan kaybına karşılık bir non spesifik inflamatuvar olmasından dolayı da görülebilmektedir [42]. Bundan dolayı meme kanseri için tek bir biyobelirteç geliştirmek güç görülmektedir. Çoklu biyobelirteç geliştirmek bu kanser türü için daha doğru sayılabilmektedir.

Gruplarda görülen bireysel farklanmaların etkisinin minimum düzeyde olabilmesi için aynı işlemlere tabi tutulmuş olan grupların standardizasyonları yapılmış ortalama değerleri üzerinden gruplar arası karşılaştırma yapılmıştır. Buna göre çalışmada; tedavi almamış grupta kontrol grubuna göre albümin, haptoglobin, apolipoprotein A-I, IgG hafif ve ağır zincir, Komplemant C-4 beta abundant proteinlerinin serum ekspresyon düzeyleri fazla bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmaya göre de serum albümin, immunoglobülin hafif ve ağır zincir, transferrin ve haptoglobin gibi abundant proteinlerin ekspresyonları kontrol grubuna göre daha yoğun bulunmuştur [83].

Meme kanserli dokuda da protein ekspresyon değişiklikleri meme kanserinin tümörjenezinde önemli rol oynayabilir. Meme kanserli ve normal meme dokusunda yapılan bir çalışmada karşılaştırmalı proteom analizi gerçekleştirilmiş, 2-DE (pH 5-8) ve MALDI-Tof devamında SIENA-2DPAGE veritabanları kullanılmış sonuçta 15 farklı spot bulunmuştur, bunların 5 tanesinin (serum albumin, IgG ağır zincir, IgG hafif zincir, apoA-I, alpha-1-antitripsin gibi) meme kanserli dokuda ekspresyon ifadesinin azaldığı gösterilmiştir [42].

Abundant proteinlerden olan apolipoprotein A-I proteini çalışmada tedavi alan grupta her iki hasta da evre I' de bulunmasına rağmen birinde görülmemiştir. Bu durumun tedavi alımında uygulanan farklı kür çeşitleri ve sayısından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Proteomik çalışmaların hassas olmasından dolayı sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu amaçla yapılan çalışmada; hastalıkla ilişkili protein ve protein değişikliklerinin saptanmasıyla ailesinde meme kanseri geçmişi bulunmayan sporadik olarak gelişen meme kanserinde erken teşhiste kullanılabilecek biyobelirteç araştırılması için ön çalışma niteliğinde bilinen abundant(bol) protein değişkenliğinin değerlendirilmesi sağlanarak iki boyutlu jel elektroforezi ile proteinler tespit edilmiş, abundant proteinlerden bazılarının da tanımlanması sağlanmıştır.

Yine abundant proteinler incelendiğinde kontrol, tedavi alan ve tedavi almış gruplarda ekspresyonlarının birbirlerine yakın olduğu bu çalışmada tespit edilmiştir. Kemoterapi sonrası radyoterapi tedavisi alan meme kanserli kadınların serum abundant protein düzeylerinin tedavinin etkisiyle kontrol grubuna yani sağlıklı bireyle aynı duruma getirilmek olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada biyobelirteç olabilecek ekspresyonu az olan birçok proteininin görünürlüğünü azalttığı düşünülen abundant proteinlerin azaltılması(deplete)nda iki farklı kolon kullanılmıştır. Bu kolonlardan ilki yani 20 adet abundant proteine duyarlı kolon kullanımı sonrası ekspresyonu az olan birçok protein görünür hale getirilmiş ve

bu proteinlerin de hastalık tanısında, tedavinin sürecinde, takibinde ve hatta hastalık erken teşhisinde faydalı bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Bu kolonlardan ikincisi yani 2 adet abundant proteine yani albümin ve immunoglobulinlere duyarlı olan kolon kullanımı ile normalde var olan ekspresyonu az olan birçok protein kaybedilmiştir. Bunun yanında bu iki abundant proteinin altında var olan bilinmeyen proteinlerde görünür hale getirilmiştir. 2 adet abundant proteine duyarlı kolon kullanımı sayesinde serumda en yoğun bulunan albumin ve immunoglobulinin altında kalan ekspresyonu az proteinler görünür hale getirilmiştir. Bu ön çalışma verileri sayesinde yeni bir biyobelirteç geliştirebilmek için kullanılan iki kolonun da etkisinin birleştirilmesi gerekmektedir. Çünkü; 20 adet abundant protein azaltıldığında ekspresyonu az olan bir çok protein görünür hale gelmektedir, ancak albumin gibi serumda çok yoğun miktarda bulunan abundant proteinlere has bir kolon olmadığı sürece albuminin altında kalan ekspresyonu az proteinler fark edilememektedir. Bu proteinlerin de hastalık teşhisinde, tedavisinde ve takibinde kullanılabilir bir parametre olabileceği düşünülmektedir.

Çalışma sonucu belirtilen protein profil farklılıklarının: meme kanserinin oluşum süreci ile ilişkili moleküler değişikliklerin anlaşılmasında, hastalığın oluşum sürecine etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde, yeni hedef moleküllerin bulunmasına ve çoklu biyobelirteç geliştirilmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu ulaşılan bilgiler ışığında verilerin kabul edilebilirliğinin artırılması veya doğruluğunun kanıtlanması için daha fazla hasta sayısı üzerinden bir çalışma planlanmaktadır. Bu kapsamda özellikle üzerinde durulması gereken nokta olarak aynı hastanın tedavi öncesinde, tedavi sırasında ve tedavi sonrasındaki protein profillerinin takip edilmesi ile hastalığın gelişim yollarına açıklık getirilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Bu çalışmanın; meme kanserinin başlaması, ilerlemesi veya şiddeti ile ilişkili olabilecek genlerin büyük bir çoğunluğu tarafından oynanan spesifik rollerin protein seviyesinde aydınlatılmasında da yararlı olacağı düşünülmektedir.”

KAYNAKLAR

1. Champe, P.C., Biyokimya, Lippincott's Illustrated reviews serisi, İkinci Baskı, 1997.
2. Nelson, D. L., Cox, M.M., Lehninger Biyokimya, Üçüncü Baskı, 2007.
3. Bush H., The final common pathway of cancer: presidential address. Cancer research 50: 4830–4838, 1990.
4. Sharp, P.A., Biology, Oncology and RNA Splicing, Cancer. 59: 1697–1708, 1987.
5. Kleinsmith, L. J., Principles of cancer biology, Pearson International Edition, 2005.
6. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., Molecular biology of the cell, 3. edition Garland Publishing, Inc. New York & London, 1994.
7. Rowley, J.D., Sklar, J.L., Brodeur, G.M., Cavenee, W.K., Emanuel, B.F., Korsmeyer, S.J., Pinkel, D., Slamon, D.J., Stass, S.A., Strong, L.C., Advances in understanding genetic changes in cancer: impact on diagnosis and treatment decisions in the 1990s., National academy press Washington D.C, 1992.
8. <http://tr.wikipedia.org/wiki/gen>
9. Strachan, T., Read, A.P., Human Molecular Genetics, 2, 2nd Edition, Garland Science, BIOS Scientific Publishers, USA, 1999.
10. Rampitsch, C., Bykova, N.V., Methods for functional proteomic analyses, Methods Mol Biol, 513: 93–110. 2009.
11. Guerrero, I.C., Kleiner, O., Application of mass spectrometry in proteomics, Biosci Rep, 25 (1-2):71-93. 2005.
12. Brea, D., Cristobo, I., Sobrino, T., Rodríguez-González, R., Mosquera, E., Moldes, O., Castillo, J., Application of proteomics to neurological diseases. Neurologia, 22(3):170–9. 2007.
13. Mann, M., Jensen, O.N., Proteomic analysis of post-translational modifications, Nat Biotechnol, 21(3):255-61, 2003.
14. Ong, S.E., Mann, M., Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative, Nat Chem Biol, 1(5):252-62, 2005.
15. Ferrer-Alcón, M., Arteta, D., Guerrero, M.J., Fernandez-Orth, D., Simón, L., Martínez, A., The use of gene array technology and proteomics in the search of new targets of diseases for therapeutics. Toxicol Lett, 186(1):45–51. 2009.

16. Lau, AT., He, QY., Chiu, JF., Proteomic technology and its biomedical applications., 35(11):965-75. 2003.
17. Jensen, ON., Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry., *Curr Opin Chem Biol.* 8(1):33–41. 2004.
18. Shi, M., Caudle, WM., Zhang, J., Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Neurobiol Dis*, 35(2):157–64. 2009.
19. Lewis, J. K., Wei, J., Siuzdak, G., Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis, *Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers (Ed.) pp. 5880–5894. 2000.
20. Choo, YS., Zhang, Z., Detection of protein ubiquitination, *J Vis Exp.*, (30). 2009.
21. Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., Brunak, S., Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence., *Proteomics.* 4(6):1633–49. 2004.
22. Mauri, P., Scigelova, M., Multidimensional protein identification technology for clinical proteomic analysis., *Clin Chem Lab Med*, 47(6):636-46. 2009.
23. Thongboonkerd, V., Practical points in urinary proteomics, *J. Proteome Res.* 6, 3881–3890. 2007.
24. Yan, W., Chen, SS., Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling, *Brief Funct Genomic Proteomic*, 4(1):27-38. 2005.
25. Wiśniewski, JR., Mass spectrometry-based proteomics: principles, perspectives, and challenges. *Arch Pathol Lab Med*, 132(10):1566–9. 2008.
26. Olsen, JV., Ong, SE., Mann, M., Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues, *Mol Cell Proteomics*, 3(6):608-14. 2004.
27. Locke, D., Bian, S., Li, H., Harris, AL., Postranslational modifications of connexin26 revealed by mass spectrometry, *Biochem J.* 2009.
28. Francese, S., Dani, FR., Traldi, P., Mastrobuoni, G., Pieraccini, G., Moneti, G., MALDI mass spectrometry imaging, from its origins up to today: the state of the art. *Comb Chem High Throughput Screen*, 12(2):156–74. 2009.
29. Reyzer, ML., Caprioli, RM., MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: a new tool for biomarker discovery, *J Proteome Res*, 4(4):1138-42, 2005.
30. Han, X., Aslanian, A., Yates, JR., Mass spectrometry for proteomics, *Curr Opin Chem Biol*, 12(5):483-90, 2008.

31. Biberoğlu, G., Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı, T Klin J Med Sci, 23:491-498, 2003.
32. He, QY., Chiu, JF., Proteomics in biomarker discovery and drug development, J Cell Biochem, 89(5):868-86. 2003.
33. Sauer, S., Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications, Clin Chim Acta, 363(1-2):95-105, 2006.
34. Liu, X., Wen, F., Yang, J., Chen, L., Wei, YQ., A review of current applications of mass spectrometry for neuroproteomics in epilepsy, Mass Spectrom Rev, 13, 2009.
35. Jonsson, AP., Mass spectrometry for protein and peptide characterisation, Cell Mol Life Sci. 58(7):868-84, 2001.
36. Govorun, VM., Archakov, AI., Proteomic technologies in modern biomedical science, Biochemistry (Mosc), 67(10):1109-23, 2002.
37. Abu-Farha, M., Elisma, F., Zhou, H., Tian, R., Zhou, H., Asmer, MS., Figeys, D., Proteomics: from technology developments to biological applications, Anal Chem, 81(12):4585-99, 2009.
38. Kumar, C., Mann, M., Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. FEBS Lett, 583(11):1703-12, 2009.
39. Bairoch, A., Boeckmann, B., The SWISS-PROT protein sequence data bank: current status, Nucleic Acids Res, 22(17):3578-80, 1994.
40. Lubec, G., Afjehi-Sadat, L., Yang, JW., John, JP., Searching for hypothetical proteins: theory and practice based upon original data and literature, Prog Neurobiol, 77(1-2):90-127, 2005.
41. Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., Thun, M., Cancer Statistics. CA Cancer J Clin; 52:23-47, 2002.
42. Hamrita, B., Chahed, K., Trimeche, M., Guillier, C.L., Hammann, P., Chaieb, A., Korbi, S., Chouchan, L., Proteomics-based identification of α 1-antitrypsin and haptoglobin precursors as novel serum markers in filtrating ductal breast carcinomas.; Clinica Chimica Acta- January 2009.
43. Deng, S., Xing, T., Zhou, H., Xiong, R., Lu, Y., Wen, B., Liu, S., Yang, H., Comparative Proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human, Geno. Prot.Bioinfo. vol.4 no 3, 2006.

44. Nimeus, E., Malmström, J., Johnsson, A., Marko-Varga, G., Fernö, M., Proteomic analysis identifies candidate proteins associated with distant recurrences in breast cancer after adjuvant chemotherapy; *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis* 43, 1086-1093, 2007.
45. Henry, L. N., Hayes, D. F., Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer, *The Oncologist*, 11: 541- 551, 2006.
46. Somiari, R. I., Somiari, S., Russell, S., Shriver, C. D., Proteomics of breast carcinoma, *Journal of Chromatography B*, 815, 215–225, 2005.
47. Alaiya , A. A., Roblick, U. J., Franze'n, B., Bruch, H., Auer, G., Protein expression profiling in human lung, breast, bladder, renal, colorectal and ovarian cancers, *Journal of Chromatography B*, 787, 207–222, 2003.
48. Bertucci, F., Bachelot, T., Hermitte, F., Jacquemier, J., Treilleux, I., MacGrogan, G., Genève, J., Birnbaum, D., Viens, P., Identification and validation of a genomic predictor to distinguish classes of patients with distinct outcomes among poor prognosis breast tumors after anthracycline-based adjuvant therapy, *European Journal of Cancer Supplements*, Volume 4, Issue 2, , Page 50, March 2006.
49. Levenson, V.V., Biomarkers for early detection of breast cancer: What, when, and where? *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 847–856. 2007.
50. Hanash, S., Disease Proteomics, *Nature*, vol 422,:226-232. 13 March 2003.
51. Ou, K., Yu, K., Kesuma, D., Hooi, M., Huang, N., Chen, W., et al., Novel Breast Cancer Biomarkers Identified by Integrative Proteomic and Gene Expression Mapping;; *Journal of proteom research*, , 7 (4), 1518-1528, 2008.
52. Brenner, DJ., Sawant, SG., Hande, MP., Miller, RC., Elliston, CD., Fu, Z., Randers-Pehrson, G., Marino, SA., Routine screening mammography: how important is the radiation-risk side of the benefit-risk equation? *Int J Radiat Biol.*; 78(12):1065-7. Dec.2002.
53. Righetti, P.G., Castagna, A., Antob-nucci, F., Piubelli, C., Cecconi, D., Campostrini, N., Rustichelli, C., Antonioli, P., Zanusso, G., Monaco, S., Lomas, L., Boschetti, E., Proteome analysis in the clinical chemistry laboratory: Myth or reality?, *Clinica Chimica Acta* 357, 123-139, 2005.
54. Henderson, I.C., What can a woman do about her risk of dying of breast cancer? *Curr Probl Cancer*,14: 165–230,1990.

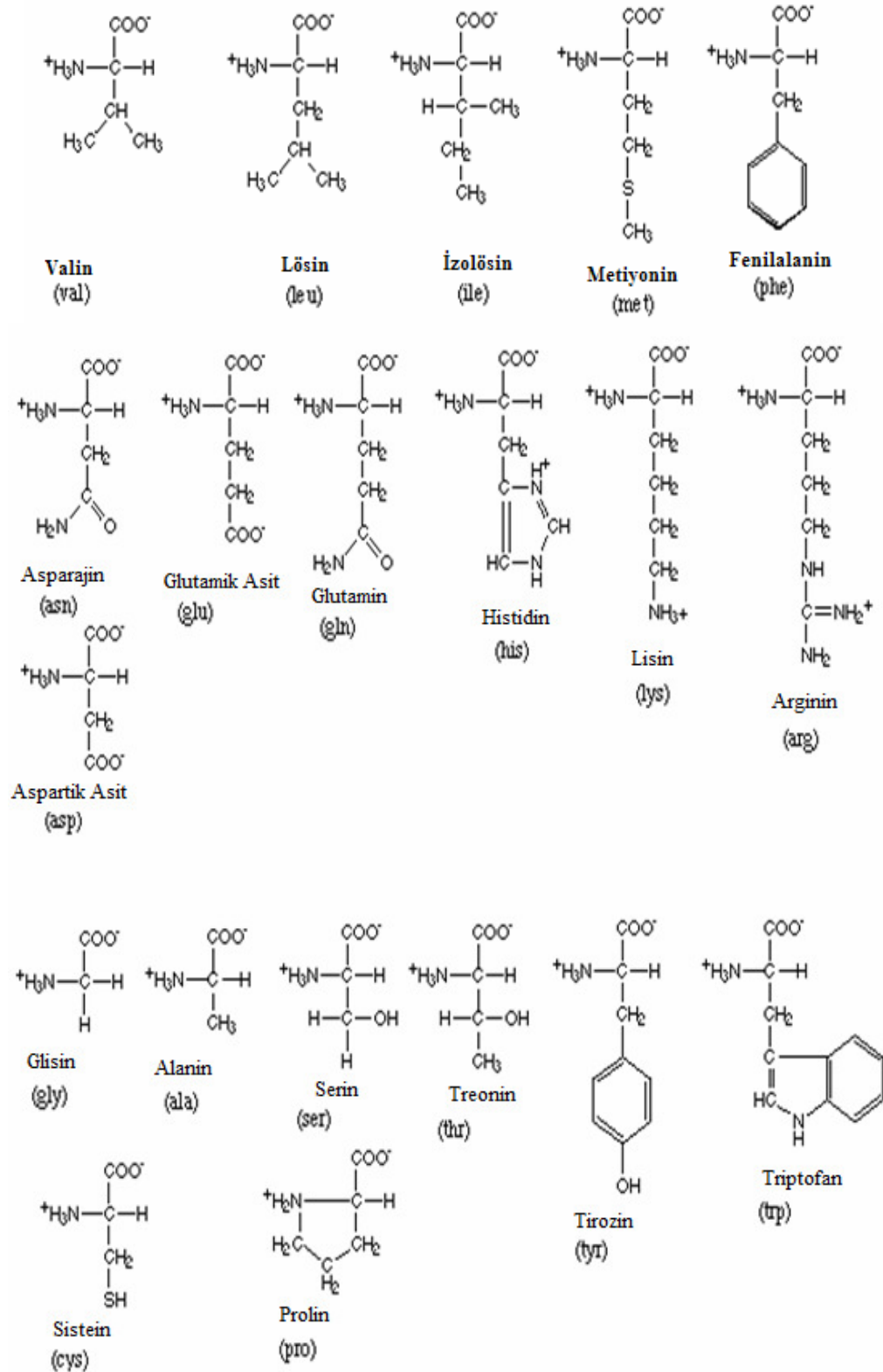
55. Barginear, M.F., Bradley, T., Shapira, I., Bumdan, D.R., Implications of applied research for prognosis and therapy of breast cancer, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 65, 223–234, 2008.
56. Espinosa, E., Redondo, A., et al., High-throughput techniques in breast cancer: A clinical perspective; *European journal of Cancer* 42, 598-607, 2006.
57. Kedrin, D., Wyckoff, J., Boimel, P.J., Coniglio, S.J., Hynes, N.E., Arteaga, C.L., Segall, J.E., ERBB1 and ERBB2 Have Distinct Functions in Tumor Cell Invasion and Intravasation; *Clin Cancer Res*, May 19, 2009.
58. Hu, Y., Zhang, S., Yu, J., Liu, J., Zheng, S., SELDI-TOF-MS: the proteomics and bioinformatics approaches in the diagnosis of breast cancer, *The Breast*, Volume 14, Issue 4, Pages 250-255, 2005.
59. Crockett, D.K., Lin, Z., Vaughn, C.P., Lim, M.S., *Proteomics* 4,1741–1753, 26 *Future Medicine*, 2005.
60. Hamrita, B., Chahed, K., Kabbage, M., Guillier, C. L., Trimeche, M., Chaïeb, A., Chouchane, L., Identification of tumor antigens that elicit a humoral immune response in breast cancer patients' sera by serological proteome analysis (SERPA), *Clinica Chimica Acta* 393, 95–102, 2008.
61. Osman, I., Mikhail, M., Shuch, B., Clute, M., Cheli, C., Ghani, F., Thiel, R., Taneja, S., Serum Levels Of Shed HER2/NEU Protein In Men With Prostate Cancer Correlate With Disease Progression, *The Journal of Urology*, Volume 174, Issue 6, Pages 2174-2177, 2005.
62. Lumachi, F., Ermani, M., Cristofaro, L.D., Basso, U., Long-term follow-up study of serum tumor markers CEA and CA 15-3 in patients with breast cancer, *European Journal of Surgical Oncology*, Volume 32, Supplement 1, , Pages S109-S110, November 2006.
63. Ways, D.K., Kukoly, C.A., Vente, J.D., Hooker, J.L., Bryant, W.O., Posekany, K.J., Fletcher, D.J., Cook, P.P., Parker, P.J., MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C-alpha exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype, *J Clin Invest.*; 95(4): 1906–1915, April 1995.
64. Wulfschuh, J.D., Mclean, K.C., Pawletz C.P., et al., New approaches to proteomic analysis of breast cancer; *Proteomics* 1, 1205-1215, 2001.
65. Sönmez, H., Süer, S., Güngör, Z., Baloglu, H., Kökoğlu, E.; Tissue and serum

- sialidase levels in breast cancer; *Cancer Letters* 16 75-78, 1999.
66. Li, J., Zhang, Z., Rosenzweig, J., et al., Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin. Chem*; 48:1296-1304, 2002.
 67. Li, J., Zhang, Z., Rosenzweig, J., Wang, Y.Y., Chan, D.W., Proteomics and Bioinformatics Approaches for Identification of serum Biomarkers to Detect Breast Cancer;; *Clinical Chemistry* 48:8 1296-1304, 2002.
 68. Hu, Y., Zhang, S., Yu, J., Liu, J., Zheng, S., SELDI-TOF-MS: the proteomics and bioinformatics approaches in the diagnosis of breast cancer; *The Breast* 14, 250-255, 2005.
 69. Traub, F., Feist, H., Kreipe, H.H., Pich, A., SELDI-MS-based expression profiling of ductal invasive and lobular invasive human breast carcinomas; *Pathology-Research and Practice* 201, 763-770., 2005.
 70. McDonald, W.H., Yates, J.R., Shotgun proteomics and biomarker discovery, *Dis. Markers* 18, 99-105., 2002.
 71. Gonçalves, A., Esterni, B., Bertucci, F., Souvan, R., et al., Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy; *Oncogene* 25, 981-989, 2006.
 72. Luque-Garcia, J.L., Neubert, T.A., Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1153, 259-276, 2007.
 73. Zolotarjova, N., Mrozinski, P., Chen, H., Martosella, J., Combination of affinity depletion of abundant proteins and reversed-phase fractionation in proteomic analysis of human plasma/serum, *Journal of Chromatography A*, 1189, 332-338, 2008.
 74. Aldred, S., Grant, M.M., Griffiths, H.R., The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research; *Clinic. Biochem* 943, 2004.
 75. Hoffman, S.A., Joo, W., Echan, L.A., Speicher, D.W., Higher dimensional (Hi-D) separation strategies dramatically improve the potential for cancer biomarker detection in serum and plasma yayın adı *Journal of Chromatography B*, 849, 43-52, 2007.
 76. Aresta, A., Calvano, C.D., Palmisano, F., Impact of sample preparation in peptideprotein profiling in human serum by MALDI-TOF mass spectrometry,

Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis 46, 157-164, 2008.

77. Björhall, K., Miliotis, I., Davidsson, P., Proteomics-driven cancer biomarker discovery: looking to the future, *Proteomics* 5, 307, 2005.
78. Ahmed, F.E., Sample preparation and fractionation for Proteome analysis and cancer biomarker discovery by mass spectrometry, *J.Sep.Sci.*, 32, 771-798, 2009.
79. Fu, Q., Garnham, C.P., Elliott, S.T., Bovenkamp, D.E., Van Eyk, J.E., A robust, streamlined, and reproducible Method for proteomic analysis of serum by delipidation, albumin and IgG depletion, and two-dimensional gel electrophoresis, *Proteomics* 5, 2656-2664, 2005.
80. Hsieh, S.Y., Chen, R.K., Pan, Y.H., Lee, H.L., Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling, *Proteomics* 6, 3189, 2006.
81. Cham, B. E., Knowles B., A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation, *J. Lipid Res.* 17, 176-181, 1976.
82. Stark, M., Jornvall, H., Johansson, J., Eur. Isolation and characterization of lipid-associated and neurosecretory polypeptides, *J. Biochem.*, 266, 209-214, 1999.
83. Kennedy, S., Proteomic profiling from human samples: The body fluid alternative; *Toxicology Letters* 120, 379-384, 2001.
84. Somiari, R.I., Sullivan, A., Russell, S., Somiari, S., Hu, H., Jordan, R., et al., High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics* 3:1863-73, 2003.
85. Al-Dhaheeri, M.H., Shah, Y.M., Basrur, V., Pind, S., Rowan, B., Identification of novel proteins induced by estradiol, 4-hydroxytamoxifen and acolbifene in T47D breast cancer cells, *Steroids* 71, 966-978, 2006.
86. Hatrout, Y., Gehrmann, M.L., Chertov, A., Fenselau, C., Proteomic phenotyping: metastatic and invasive breast cancer; *cancer letters* 210 245-253, 2004.
87. Duffy, M.J., Serum Tumor Markers in Breast Cancer: Are They of Clinical Value?, *Clinical Chemistry* 52: 3 345-351, 2006.
88. Anonymous, Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer; *journal of Clinical Oncology* 14: 2843-77, 1996.
89. Luque-Garcia, J.L., Neubert, T.A., Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry; *Journal of Chromatography A*, 1153, 259-276, 2007.

90. Scott, G. B. I., Crawford, A. S., Chapman, H. A., Wildsmith, J., Cockrill, S. L., et al., High Specificity Depletion of Twenty High-Abundance Proteins from Human Plasma Facilitates Examination of Plasma Proteome Differences Between Individuals, *Journal of Chromatography*, 2007.
91. www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-05.pdf
92. http://en.wikipedia.org/wiki/Serum_albumin
93. Kılıç, S., Bayraktar, M., Bayraktar, N., Ergin, H., Beytur, A., Eğri, M., Mesane Kanseriinde Serum İmmünoglobulin (IgA, IgE, IgG,IgM),Kompleman (C3, C4) ve C-reaktif protein düzeyi Değerlendirmesi: Kontrollü Prospektif Klinik Çalışma, *Türk Üroloji Dergisi*: 31 (4): 495-502, 2005.
94. Terpstra, A.H., Isolation of plasma lipoproteins by a combination of differential and density gradient ultracentrifugation *Anal.Biochem*, 150, 221-227, 1985.
95. Brunetti, ND., Padalino, R., De Gennaro, L., et al., Acute phase proteins activation in subjects with coronary atherosclerosis and micro-vessel coronary circulation impairment, *J Thromb Thrombolysis*, 2008.

EK 1: 20 standart amino asidin genel yapıları

EK 2: Sağlıklı bir kişinin plazmasında yer alan bol(abundant) proteinlerin listesi

No	Proteinler	Konsantrasyon		Moleküler Kütle (Da)
		M.mol/L	mg/L	
1	Albümin	500-800	35000-52000	66438
2	IgG	40-100	7000-16000	160000
3	Apolipoprotein A-I	36-72	1000-2000	28079
4	Transferrin	25-45	2000-3600	79600
5	Apolipoprotein A-II	22-60	200-550	8691
6	α 1-Proteinaz inhibitör	18-40	900-2000	55000
7	α 1-Acit glikoprotein	12-30	500-1200	40000
8	Transtyretin	15-30	200-400	54000
9	Hepatogloblin	3-20	300-2000	104000
10	Hemopexin	15	900	57000
11	IgA	4-24	700-4000	170000
12	Apolipoprotein C-III	6-20	60-180	8765
13	α 2-Makroglobin	7-17	1300-3000	30000
14	α 2- HS glikoprotein	12	600	50000
15	Gc Globülin	8-14	400-700	51000
16	Apolipoprotein C-I	6-12	40-80	6631
17	Fibrinojen	6-12	2000-4000	340000
18	α 1-Antikimotripsin	7	500	68000
19	C3	5-10	900-1800	180000
20	b2-Glikoprotein I	4-8	150-300	40000
21	Vitronektin	4-8	250-450	55000
22	α 1-BGlikoprotein	3-6	150-300	63000
23	Apolipoprotein A-IV	3-6	130-250	43375
24	Apolipoprotein C-II	2-7	20-60	8915
25	β 2- Glikoprotein II	2-5	12-30	63000
26	Antitrombin III	3	200	65000
27	Inter α -tripsin inhibitör	2-4	400-700	160000
28	Plasminojen	2-4	150-350	81000
29	Seruloplasmin	1,5-5	200-600	135000
30	Retinol-bağı protein	1,5-3	30-60	21000

ÖZGEÇMİŞ

Cevahir Altınkaynak; ilk, orta ve lise öğrenimini Kayseri’de tamamladıktan sonra, 2001 yılında Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2006 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümün’ de Yüksek Lisans’ a başladı. Bu süreç içerisinde; proteomiks, meme kanseri, maldi kütle spektrometresi, gen taşınımı, polimerik nano küre hazırlanması ve epileptogenez süreci gibi araştırma alanlarında tecrübe edindi.

Erciyes Üniversitesi BAP Destekli “Sağlıklı ve meme kanseri hastası kadınların (tedavi almamış, tedavi alan ve tedavi olmuş) serum proteinleri değişiminin 2-D (İki Boyutlu) elektroforez ile tespiti.” başlıklı tamamlanan projede 2009 yılında araştırmacı olarak yer aldı. Halen devam etmekte ve araştırmacı olarak yer aldığı projeleri ise “N-izopropilakrilamit bazlı polimerik nano kürelerin hazırlanması karakterizasyonu ve gen taşınımı amacıyla kullanılabilirliklerin araştırılması” başlıklı Erciyes Üniversitesi BAP Destekli, ve “Genetik Absans Epilepsili WAG/Rij Sıçanlarda Epileptogenez Sürecinin, Absans ve Limbik Epilepsi Örneklerinde, Bölgesel ve Moleküler Düzeyde Proteomiks Yöntemi ile Araştırması” başlıklı TÜBİTAK 1001 proje destekli çalışmalardır.

Doğum Tarihi, Yeri : 31.03.1983, Kayseri

Yazışma Adresi 1 : Becen mah. Gülerce cad. No:27 Melikgazi/KAYSERİ

Yazışma Adresi 2 :Çiğdem mah. Dünyabir sok. Şelale sit. B1 blok 2.kat No:7
Çankaya/ANKARA

Telefon : 0 352 242 19 61, 0 312 222 58 20/144, 0 538 815 32 45

Fax. : 0 312 222 58 72

Elektronik posta : akcevahir@gmail.com

