



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**FİBROSARKOMA VE DERİ FİBROBLAST HÜCRE
HATLARININ KARŞILAŞTIRMALI
PROTEOMİK ANALİZLERİ**

Öğünç MERAL

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hamdi UYSAL**

2013 - ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FİBROSARKOMA VE DERİ FİBROBLAST HÜCRE
HATLARININ KARŞILAŞTIRMALI
PROTEOMİK ANALİZLERİ**

Öğünç MERAL

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hamdi UYSAL**

2013 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Doktora Programı

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

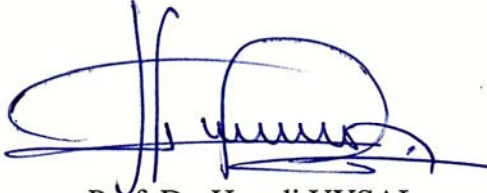
Tez Savunma Tarihi: 07.10.2013



Prof. Dr. Hilal KARAGÜL

Ankara Üniversitesi

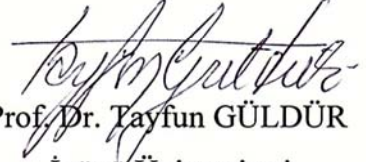
(Jüri Başkanı)



Prof. Dr. Hamdi UYSAL

Ankara Üniversitesi

(Danışmanı)



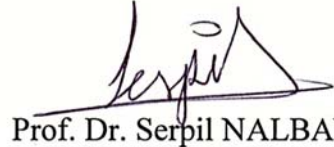
Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR

İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Tevhide SEL

Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU

Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.1.1. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genler	2
1.1.2. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri	3
1.2. Bağ Doku	5
1.2.1. Fibroblast	6
1.2.2. Fibrosarkoma	7
1.2.2.1. Fibrosarkomanın Klinik Görünümü	8
1.2.2.2. Fibrosarkomanın Histopatolojisi	9
1.3. Proteomik	10
1.3.1. Proteomik Biliminin Tarihçesi	10
1.3.2. Proteomik Biliminin Önemi	12
1.3.3. Proteomik Stratejileri	14
1.3.3.1. Klasik Proteomik	14
1.3.3.1.1. Kantitatif Proteomik	15
1.3.3.1.2. Biyoinformatik Analiz	16

1.3.3.2. Fonksiyonel Proteomik	16
1.3.3.3. Yapısal Proteomik	16
1.3.4. Proteomik Çalışmalarındaki Zorluklar	17
1.3.5. Proteomik ve Kanser	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Gereç	23
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	25
2.1.3. Kullanılan Cihazlar	26
2.2. Yöntem	27
2.2.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	27
2.2.2. Hücre Lizatı ve Sekretom Örneklerinin Oluşturulması	28
2.2.2.1. Hücre Lizatı Örneklerinin Oluşturulması	28
2.2.2.2. Sekretom Örneklerinin Oluşturulması	29
2.2.2.2.1. Trikloroasetik Asit (TCA) ile Protein Çöktürme Yöntemi	30
2.2.3. Hücre Canlılığının Kontrolü (Tripan Mavis Testi)	30
2.2.4. Protein Miktar Tayini	31
2.2.5. 2D-PAGE ile Proteinlerin Ayrılması	31
2.2.5.1. IEF ile Proteinlerin İzoelektrik Noktalarına Göre Ayrılması	31
2.2.5.2. SDS-PAGE ile Proteinlerin Molekül Ağırlıklarına Göre Ayrılması	33
2.2.6. Jellerin Kolloidal Coomassie Mavis ile Boyanması	35
2.2.7. Jellerin Görüntülenmesi ve Analizi	36
2.2.8. İstatistiksel Analiz	36

2.2.9. Protein Spotlarının Seçimi	36
2.2.10. Protein Spotlarının Triptik Parçalanması ve LC-MS/MS ile Protein İdentifikasyonu	37
2.2.10.1. Protein Spotlarının Triptik Parçalanması	37
2.2.10.2. LC-MS/MS ile Protein İdentifikasyonu	39
3. BULGULAR	41
3.1. Hücre Canlılık Testi Sonuçları	41
3.2. Hücre Lizatı ve Sekretom Örneklerinin 2D-PAGE Sonuçları	42
3.2.1. Hücre Lizatı Örneklerinin 2D-PAGE Sonuçları	42
3.2.2. Sekretom Örneklerinin 2D-PAGE Sonuçları	46
3.3. Hücre Lizatı ve Sekretom Örneklerinin LC-MS/MS Sonuçları	50
3.3.1. Hücre Lizatı Örneklerinin LC-MS/MS Sonuçları	50
3.3.2. Sekretom Örneklerinin LC-MS/MS Sonuçları	53
4. TARTIŞMA	56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
ÖZET	70
SUMMARY	71
KAYNAKLAR	72
EKLER	79
Ek - 1	79
Ek - 2	80
Ek - 3	81
Ek - 4	82

Ek - 5	83
Ek - 6	84
ÖZGEÇMİŞ	85

ÖNSÖZ

Son yıllarda proteomik teknolojisindeki gelişmeler ile kanserin tanı ve tedavisinde, ilaç uygulamalarının etkilerinin izlenmesi ve etkin ilaç geliştirilmesinde kullanılabilecek kansere özgü tümör belirteci olarak da adlandırılan proteinlerin keşfedilmesi hız kazanmıştır. Kansere özgü bu proteinlerin identifikasyonu ve kanserin gelişimi ile ilgisi bu çalışmaların hedefini oluşturmaktadır. Kanserın moleküler mekanizmasının ortaya konması da amaçlanan bir diğer hedeftir. Bu hedeflerin gerçekleştirilmesi amacıyla sıklıkla normal durum ile hastalık durumu arasındaki protein ekspresyon farklılıklarının ortaya konması ve ekspresyonu farklılık gösteren proteinlerin identifiye edilmesi gerekmektedir. Normal durum ile hastalık durumu karşılaştırılırken serum/plazma örneklerinde albumin gibi yüksek miktarda bulunan proteinlerin sonucu maskeleymesi gibi olumsuz faktörler nedeniyle son yıllarda bu karşılaştırmalı proteomik analizlerde hücre hatlarının kullanımı yaygınlaşmıştır.

İki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) ile kütle spektrometresi (MS) tabanlı proteomik analizler klasik ve istikrarlı bir proteomik yaklaşımdır. Proteomik teknolojisi ile ilk hedef örneklerdeki proteinlerin ayrılması ve sonra ekspresyon farklılıkları gösteren proteinlerin kütle spektrometresi ile identifiye edilmesi esasına dayanmaktadır. Son yıllarda birçok kanser hücre hattında biyolojik belirteç aranması ve kanserin moleküler mekanizmasının ortaya konması amacıyla karşılaştırmalı proteomik analizler gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız çalışmanın bu anlamda literatüre katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Çalışmada fibrosarkoma için potansiyel tümör belirteçlerinin belirlenmesi ve fibrosarkomanın moleküler mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla deri fibroblast ve fibrosarkoma hücre hatlarının karşılaştırmalı proteomik analizleri gerçekleştirilmiştir. Hücre içi proteinlerin karşılaştırılması amacıyla hücre lizatında, hücre dışına salgılanan proteinlerin karşılaştırılması amacıyla sekretom örneklerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda hücre lizati

örneklerinde fibrosarkomada ekspresyonu artan 13, azalan 1 protein kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır. Sekretom örneklerinde fibrosarkoma sekretom örneklerinde görülen, fibroblast sekretom örneklerinde görülmeyen 13 protein kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinlerin kanserde hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, invazyon, metastaz ve apoptozis ile ilgili fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Hem hücre lizati örneklerinde hem de sekretom örneklerinde tanımlanması yapılan bu proteinlerin fibrosarkoma için potansiyel tümör belirteci oldukları ve fibrosarkomanın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunacakları düşünülmektedir.

Doktora eğitimin süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hilal Karagül ve tez danışmanım Prof. Dr. Hamdi Uysal başta olmak üzere, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Tevhide Sel ve Prof. Dr. Serpil Nalbantoğlu'na, Biyolog Şükran Yılmaz'a, kütle spektrometresi analizlerinde yardımcı olan Dr. Tarık Baykal'a, tez çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Mert Pekcan başta olmak üzere Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlileri, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma ve hayatımın her aşamasında ve tez çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: 12B3338001.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFP	Alfa-feto protein
APS	Amonyum Per Sülfat
BIA-MS	Biyomoleküler Etkileşim Analiz – Kütle Spektrometresi
BSA	Sığır Serum Albumini
CBB	Coomassie Brilliant Mavisi
CEA	Karsinoembriyonik Antijen
CO ₂	Karbondioksit
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
ESI-MS	Elektrospray İyonizasyon Kütle Spektrometresi
FBS	Fetal Dana Serumu
HSP-60	Heat Shock Protein 60
IEF	İzoelektrik Odaklama
IPG	Immobilize pH Gradient
LC	Sıvı Kromatografi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi-Ardışık Kütle Spektrometresi
MALDI-MS	Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Kütle Spektrometresi
mRNA	Mesajcı RNA
MS	Kütle Spektrometresi
MVP	Major Vault Protein
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PLGS	ProteinLynx Global Server
PSA	Prostat Spesifik Antijen
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SPARC	Secreted Protein and Rich in Cysteine
SSP	Sample Spot Protein
STI1	Stress induced phosphoprotein 1
TAP	Tandem Sequential Affinity Tag Purification
TCA	Trikoloroasetik asit
TCP-1- β	T complex protein 1 subunit beta
TCP-1- ϵ	T complex protein 1 subunit epsilon
VEGF	Vasküler Endotelyal Üreme Faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
2-DE	İki Boyutlu Jel Elektroforezi
2D-PAGE	İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri	4
Şekil 1.2. Fibroblast, iğsi görünüm sergileyen hücreler	7
Şekil 1.3. Fibrosarkoma, polimorfik hücreler	9
Şekil 1.4. Zamana bağlı olarak farklı teknik ve yaklaşımların proteomik sürece katılımları	11
Şekil 1.5. Bir böceğin farklı yaşam döngülerinde aynı gene sahip olmasına rağmen farklı proteom sergilemesinden dolayı farklı morfolojik özellikler göstermesi	13
Şekil 1.6. Proteomik stratejileri	15
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan CCD-1135Sk insan deri fibroblast hücre hattı (A) ve HT-1080 insan fibrosarkoma hücre hattının (B) ışık mikroskopik görüntüleri (100x büyütme)	28
Şekil 2.2. İzoelektrik odaklama grafiği	33
Şekil 3.1. Hücre lizatı ve sekretom örneklerinin hücre canlılık oranları	41
Şekil 3.2. Fibroblast hücre lizatı (A) ve fibrosarkoma hücre lizatı (B) örneklerinin 2D-PAGE analizi sonrası koloidal Coomassie mavisi ile boyanması sonucu elde edilen protein spotlarına ait jel görüntüleri	43
Şekil 3.3. Hücre lizatı grubunda identifiye edilen protein spotlarının jel (fibrosarkoma hücre lizatı örneğine ait) üzerindeki görüntüleri	45
Şekil 3.4. Fibroblast sekretom (A) ve fibrosarkoma sekretom (B) örneklerinin 2D-PAGE analizi sonrası koloidal Coomassie mavisi ile boyanması sonucu elde edilen protein spotlarına ait jel görüntüleri	47
Şekil 3.5. Sekretom grubunda identifiye edilen protein spotlarının jel (fibrosarkoma sekretom örneğine ait) üzerindeki görüntüleri	49
Şekil 3.6. 8209 numaralı spota ait temsili MS/MS spektrumları	52
Şekil 3.7. 9307 numaralı spota ait temsili MS/MS spektrumları	55

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	23
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	25
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan cihazlar	26
Çizelge 2.4. İzoelektrik odaklama protokolü	32
Çizelge 3.1. Hücre lizatı grubu tekrarlarının 2D-PAGE ve PDQuest analiz sonuçları	44
Çizelge 3.2. Sekretom grubu tekrarlarının 2D-PAGE ve PDQuest analiz sonuçları	48
Çizelge 3.3. Hücre lizatı grubunda seçilen spotların LC-MS/MS sonuçları	51
Çizelge 3.4. Sekretom grubunda seçilen spotların LC-MS/MS sonuçları	54

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Organizmadaki hücrelerin amaçsız, sınırsız ve kontrolsüz bir biçimde üremesiyle meydana gelen oluşumlara tümör adı verilmektedir. Tümörler iyi huylu (benign) veya kötü huylu (malign) olabilmektedir. İyi huylu tümörler invazyon ve metastaz gibi özellikler göstermezken kötü huylu tümörler bu özellikleri sergilerler. Kötü huylu tümörler genel anlamda kanser olarak adlandırılırlar (Pecorino, 2012).

Kanserde hücrelerin aşırı miktarda artışının normal hücre kaybı ile dengelenememesi sonucu hücrelerin sürekli olarak birikimi söz konusudur. Oluşan bu aşırı birikim organizmadaki doku ve organlarda hasarlara sebep olmaktadır. Kanser hücrelerinin ölüm oranları köken aldıkları normal hücrelere göre daha fazla olmasına rağmen, yeni hücre oluşumunun çok daha hızlı gerçekleşmesinden dolayı hücreler devamlı olarak bulundukları dokuda birikir. Bu dengesizliğin sebebi hem kanser hücrelerinde meydana gelmiş olan genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımadaki ve yok etmedeki yetersizliklerinden kaynaklanmaktadır (Casciato ve Territo, 2009).

Bütün kanser türleri DNA dizisindeki birtakım anormallikler sonucu oluşmaktadır. Kanser olgularının % 5-10'unun kalıtsal olduğu, kalan % 90-95'lik kısmının ise yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın mutajenlere maruz kalması, DNA'da meydana gelen progresif değişiklikler ve replikasyondaki hatalar sonucu oluştuğu bilinmektedir. Kanser; bakteriler, viruslar, radyasyon, kalıtım, çevresel faktörler, beslenme alışkanlığı ve kimyasallar gibi birçok etken sonucu oluşabilen çok faktörlü bir hastalıktır (Anand ve ark., 2008).

Kanser köken aldığı dokuya göre farklı karakteristik özellikler gösterir. Kanser olgularının yaklaşık % 85'i epitel dokuda meydana gelir ve bu tür kanserler

karsinoma olarak adlandırılır. Kemik, kas ve bağ doku gibi mezoderm kökenli dokularda meydana gelen kanser türlerine ise sarkoma adı verilir (Pecorino, 2012).

Kanser oluşumuna neden olan etmenler sebebi her ne olursa olsun nihai olarak canlı hücrenin genetik materyalinde bozulma meydana getirir. Hücre sayısının artması yönünde çalışan genler olan onkogenler, tümör önleyici genler ve DNA onarım genleri gibi bir veya birkaç gende oluşan bu hasarlar kanser oluşumunda rol oynamaktadır (Corn ve El-Deiry, 2002).

1.1.1. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genler

Hücrelerde normal üreme kontrolünü sağlayan iki tip gen vardır. Bunlar proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir (Aslan, 2010).

Proto-onkogenler hücrelerin büyümesinde, çoğalmasında, farklılaşmasında ve apoptozisin düzenlenmesinde rol alan proteinleri kodlayan genlerdir (McKinnel ve ark., 2006). Onkogenler ise hücre büyümesini kontrol eden proto-onkogenlerin çeşitli nedenlerle mutasyona uğramış şekillerdir (Burtis ve ark., 2008). Günümüzde proto-onkogenlerin üreme faktörlerini, hücre yüzey reseptörleri ve onların ligandlarını, üremeyi uyarıcı sinyalleri taşıyan sinyal moleküllerini, transkripsiyon faktörlerini, hücre proliferasyonuna, hücre farklılaşmasına ve apoptotik hücre ölümünün moleküler kontrolüne katılan molekülleri ve normal hücre üremesinin regülasyonu için gerekli olan proteinleri kodladıkları bilinmektedir (Aslan, 2010). Proto-onkogenlerin çeşitli nedenlerle mutasyona uğramaları sonucunda büyüme faktörleri gibi proteinlerin aşırı üretimi, hücre membranı ve çekirdek arasındaki ara yolların kontrolsüz uyarılması, transkripsiyon faktörlerinin sentezinin artması gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Scriver ve ark., 2001).

Tümör baskılayıcı genler hücre proliferasyonunu inhibe eden veya geciktiren genlerdir. Bu genler inaktive oldukları zaman kansere neden olmaktadır. Kanserde onkogenlerde meydana gelen mutasyonların fonksiyon kazandırması veya tümör

baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonların fonksiyon kaybettirmesi normal hücre proliferasyonundaki dengenin bozulmasına neden olmaktadır (Aslan, 2010).

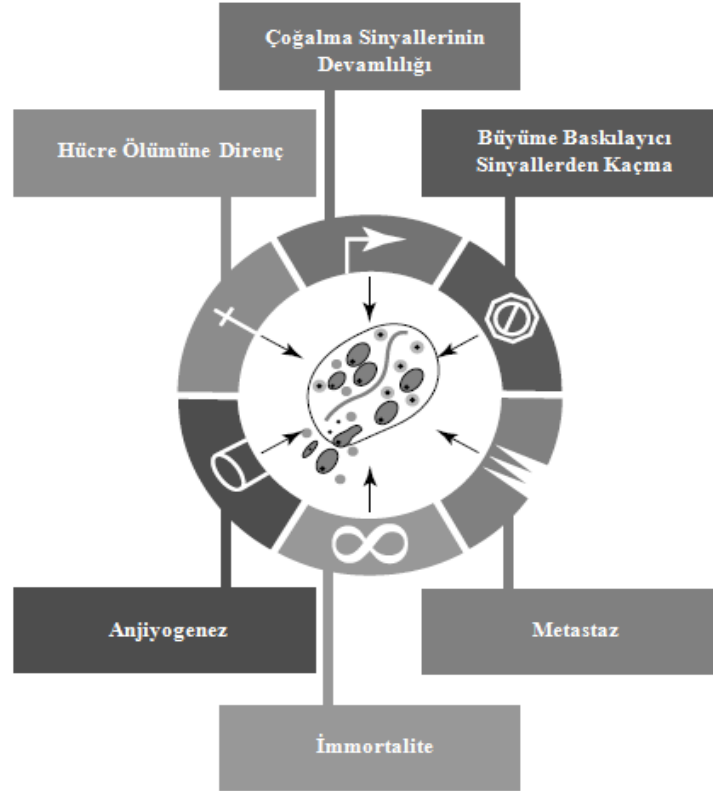
1.1.2. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Kanserde genetik kararsızlık DNA onarımındaki ve DNA ipliklerinin birbirlerini tanımasındaki hatalardan dolayı oluşur. Kanseri hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az duyarlı koloniler oluşturarak bu kopyaların yabancı ortamlarda yaşama kapasitesinin artmasını sağlarlar (Casciato ve Territo, 2009).

Normal hücreler ile kanser hücreleri arasında bir takım farklılıklar mevcuttur. Dokularda artan hücre sayısı ile hücre kaybı bir denge halindedir ve bu nedenle normal hücrelerin bölünmeleri kontrol altındadır. Kanseri hücreleri ise kontrolsüz bir şekilde bölünürler (Aslan, 2010). Normal hücrelerin çoğalabilmesi için mitojenik sinyallere ihtiyaç vardır. Kanserde ise hücrede meydana gelen mutasyonlar dışarıdan gelen çoğalma sinyallerine bağımlı olmadan hücrelere kontrolsüz bölünme potansiyeli kazandırır. Kanseri hücrelerinde görülen bir diğer özellik çoğalma sinyallerinin inhibisyonunu sağlayan moleküllerde oluşan bozukluklar ile çoğalma sinyallerinin kesintisiz devam etmesi ve bunun sonucu hücrelerin sürekli olarak bölünmesidir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanseri hücrelerine ölümsüzlük kazandıran mekanizma kromozom uçlarında bulunan telomerlerdir. Çoğu normal hücre tipinde telomerler hücre farklılaştıkça zamanla giderek kısalır. Fakat kanseri ve kök hücrelerinde telomerler telomeraz enziminin vasıtasıyla yenilenirler. Telomeraz enzimi normalde hücreler farklılaşırken bir taraftan programlı bir şekilde azalır ve tamamen farklılaşmış hücre sonunda çoğalma kapasitesini kaybederek ölür. Aksine birçok kanseri türünde telomeraz enzimi etkinliğini sürdürür ve bunun sonucu telomerlerin uzunluğu sabit kalarak hücre sınırsız sayıda çoğalır (Casciato ve Territo, 2009).

Kanser hücrelerinin bir diğer karakteristik özellikleri programlı hücre ölümü yani apoptozis mekanizmasında yer alan moleküllerde meydana gelen bozukluklar ile apoptotik sinyallere karşı duyarsızlaşarak apoptozisten kaçabilmeleridir (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 1.1. Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanser hücrelerinde görülen bir diğer özellik anjiyogenezdır. Normal dokularda yeni kan damarları oluşumu için bazı maddeler gereklidir. Fakat hemen hemen bütün kanser türlerinde bu maddelerden yalnızca vasküler endotelial üreme faktörü (VEGF) üretilir. Bu madde kanserde anjiyogenezi yani yeni kan damarlarının oluşumunu indükler. Anjiyogenez kanser hücrelerinin canlılıklarını sürdürebilmeleri için gerekli olan besin maddelerini alabilmesi için büyük önem taşır (Casciato ve Territo, 2009).

Metastaz kanser hücrelerinde görülen en önemli özelliklerden biridir. Metastaz kanser hücrelerinin doğrudan ya da kan veya lenf yoluyla bulundukları dokudan başka dokulara göç etmesi olarak tanımlanabilir. Metastaz iyi huylu tümörlerde ve normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Hücrelerin metastaz yapma yetenekleri ekstrasellüler matrikste adhezyondan sorumlu hücresel proteinlerin kaybı ya da anormallikleri, hücreler arası etkileşimdeki anormallikler, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormallikler, anormal bazal membran üretimi ve metalloproteaz gibi bazı enzimlerin bazal membranı yıkımlaması sonucu oluşur (Casciato ve Territo, 2009). Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri Şekil 1.1.'de yer almaktadır.

1.2. Bağ Doku

Canlıda en bol bulunan doku tipi olan bağ doku diğer doku ve organlara destek görevi gören, doku onarımında ve organizmanın savunmasında görev alan mezoderm kökenli bir dokudur. Bağ doku genel olarak bağ doku hücrelerinden ve ekstrasellüler matriksi oluşturan fibriller ve şekilsiz temel maddeden oluşur (Ross ve Pawlina, 2011). Fibroblastlar, fibrositler, mezenkim hücreleri, mast hücreleri, plazma hücreleri, makrofajlar, yağ hücreleri, pigment hücreleri ve retikulum hücreleri bağ dokunun yapısında bulunan hücrelerdir. Bağ dokusunda bulunan fibriller ise kollojen fibriller, retikulum fibrilleri ve elastik fibrillerdir. Fibrillerin arasını dolduran madde şekilsiz temel madde olup glikozaminoglikanlardan ve proteoglikanlardan oluşur (Eurell, 2004). Fibrillerden ve şekilsiz temel maddeden oluşan ekstrasellüler matriks fibröz proteinleri, proteoglikanları ve birçok glikoproteini içeren karmaşık bir yapıdır (Ross ve Pawlina, 2011).

Bağ doku fibrilleri dokunun yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre değişen miktarlarda bulunurlar. Bağ dokuda bulunan bütün fibril tipleri protein yapısında olup fibroblastlar tarafından üretilirler. Kollojen fibriller bağ dokuda en çok bulunan fibril türü olup bunlardan tip I kollojen bağ doku yapısında en fazla bulunan kollojen tipidir (Mescher, 2013). Retikulum fibrilleri tip III kollojenden meydana gelirler ve yapılarında proteoglikanlar ve glikoproteinler bulunur. Elastik fibriller elastin adı

verilen bir tür proteinden oluşurlar. Organizmada en az bulunan bağ dokusu fibrillerinden olup yüksek derecede esneme özellikleri vardır (Eurell, 2004).

Bağ dokusunun yapısında fagositoz yapan makrofajlar, antikor üretiminde görevli plazma hücreleri, heparin ve histamin salgılanmasında görev alan mast hücreleri ve melanin üreten melanositler gibi çeşitli fonksiyonlara sahip hücreler bulunmaktadır. Ancak bağ dokusunun yapısında en çok bulunan hücreler dokuda fibrillerin ve şekilsiz temel maddenin büyük bir kısmının sentezlenmesi gibi birçok önemli görevi bulunan fibroblastlardır (Mescher, 2013).

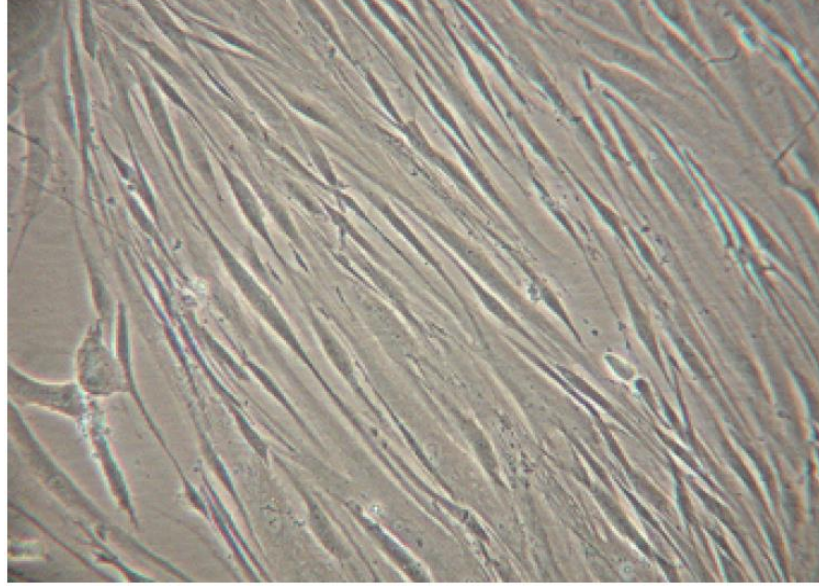
1.2.1. Fibroblast

Fibroblastlar bağ dokuda sayıca en fazla bulunan hücrelerdir. Fibroblastlar iğ şeklinde hücreler olup ekstrasellüler matriks molekülleri ile birlikte vücutta bulunan doku ve organların büyük kısmında bulunurlar. Fibroblastların karakteristik özellikleri alfa-düz kas aktin ve desmin eksikliğinde vimentin eksprese etmeleridir. Fibroblastlar aktive olduklarında protein sentezi yapan hücrelere özgü olan gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ve belirgin golgi kompleksi tipik özellikleridir. Fibroblastlar fibronektin, kollojenler ve proteoglikanlar gibi ekstrasellüler matriks moleküllerini sentezler ve salgırlar (McAnulty, 2007). Fibroblast hücrelerinin karakteristik görünümüleri Şekil 1.2.'de yer almaktadır.

Fibrillerin ve şekilsiz temel maddenin oluşumdan sorumlu olan fibroblastların daha genç ve daha az aktif olan şekillerine fibrosit adı verilmektedir. Fibroblastların aksine fibrositlerin sitoplazmaları daha az olup sadece çekirdekten ibaretlermiş gibi bir görünüm sergilerler (Eurell, 2004).

Fibroblastların en önemli fonksiyonları doku ve organlarda bulunan ekstrasellüler matriks moleküllerinin üretimi ve hemostatik dengenin sağlanmasıdır. Fibroblastlar metabolik olarak oldukça aktif hücreler olup kollojenler,

proteoglikanlar, tenasin, laminin ve fibronectin gibi başlıca ekstrasellüler matriks moleküllerinin sentezi ve salgılanmasında görev alırlar (McAnulty, 2007).



Şekil 1.2. Fibroblast, iğsi görünüm sergileyen hücreler (Keira ve ark., 2004).

Ekstrasellüler matriks bileşenleri hücrelerin şekillerini belirler. Deri fibroblast ve kondrosit gibi bağ doku hücreleri tamamen ekstrasellüler matriks ile çevrilidirler. Fibronectin fibroblast gibi birçok hücrenin yayılmasını laminin ise hücrelerin tutunmasını teşvik eder. Ayrıca hem fibronectin hem de laminin hücrelerin kollojene adhezyonunda görev alırlar (Watt, 1986).

Fibroblastların hücreler arası sıvı hacminin ve basıncının ayarlanmasında önemli rolleri vardır (Wiig ve ark., 2003). Bunun yanında fibroblastların yara iyileşmesinde kritik rolleri mevcuttur (Desmouliere ve ark., 2003).

1.2.2. Fibrosarkoma

Fibrosarkoma bağ dokusunun kötü huylu bir tümörü olup erişkin tip fibrosarkoma 2002 yılında dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından; balık sırtı dizilimi gösteren

değişik tip kollojenler ile fibroblastlar tarafından oluşan ve yetişkinlerde rastlanılan kötü huylu yumuşak doku tümörü olarak tanımlanmıştır (Bahrami ve Folpe 2010).

1936 yılında bütün yumuşak doku kanserlerinin % 65'i fibrosarkoma olarak tanımlanmış, bu oran 1974 yılında % 12 ve 1989 yılında % 12'den de az olarak revize edilmiştir. Son yıllarda fibrosarkomanın görülüş sıklığının azalmasına rağmen fibrosarkomanın farklı türlerinin belirlenmesine yönelik yeni çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte biyolojik olarak bu farklı türlerin birbirlerinden ayrılmasında ölçünün ne olacağı hala açık değildir ama bu farklı türlerin belirgin histolojik özellikleri farklı türlerin tanımlanmasına olanak sağlar (Weiss ve Goldblum 2008).

1.2.2.1. Fibrosarkomanın Klinik Görünümü

Fibrosarkoma diğer çoğu sarkomada olduğu gibi karakteristik bir semptom göstermez ve teşhis edilmesi oldukça güçtür. Fibrosakoma her yaşta insanda görülebilir fakat en çok 30 ila 50 yaş arasında görülür. Araştırmalar fibrosarkomanın erkeklerde kadınlara oranla daha sık rastlanılan bir kanser türü olduğunu göstermiştir (Weiss ve Goldblum 2008).

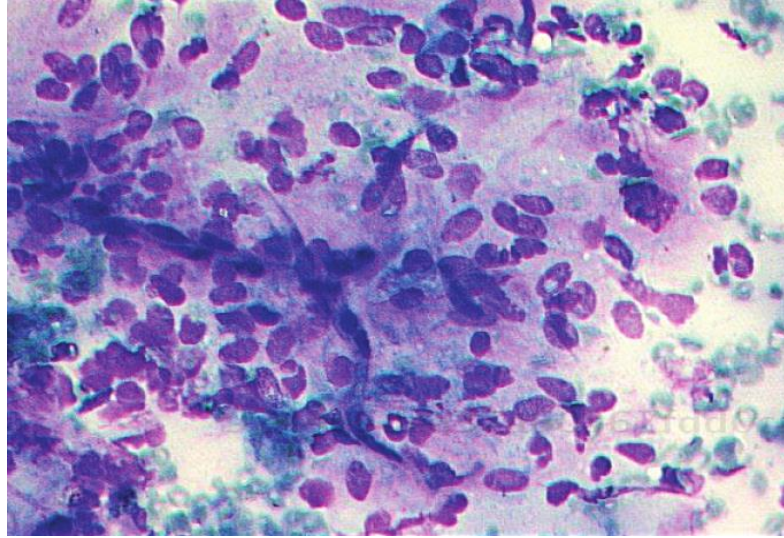
Fibrosarkoma herhangi bir yumuşak dokuda oluşabildiği gibi daha çok derin yumuşak dokularda ortaya çıkmaktadır (Fisher ve ark., 2002). Ayrıca nadir olmakla birlikte tiroid, kalp, karaciğer ve merkezi sinir sisteminde de görülebilmektedir (Weiss ve Goldblum 2008).

Fibrosarkomada metastaz daha çok kan dolaşımı yoluyla meydana gelmektedir. Akciğer başlıca metastatik bölge olup iskelet sistemi ve özellikle omurga ve kafatası akciğeri takip etmektedir. Metastazların büyük bir kısmı teşhis konulduktan sonraki 2 yıl içerisinde meydana gelmektedir (Weiss ve Goldblum 2008). 5 yıllık hayatta kalma oranı % 39-54 olarak bildirilmiştir (Fisher ve ark., 2002).

Fibrosarkomanın teşhisi oldukça zordur ve dermatofibrosarkom protüberans, miksofibrosarkom gibi diğer iğsi hücreli sarkomalardan ayırt edilmesi oldukça önemlidir (Klijanienko ve Lagace, 2011).

1.2.2.2. Fibrosarkomanın Histopatolojisi

Fibrosarkoma iğsi görünümlü hücrelerden oluşmuş olup karakteristik olarak balık sırtı görünümü mevcuttur. Hücreler konik şekilde ve koyu boyanmış çekirdeklere, belirgin çekirdekçiklere ve sınırlı sitoplazmaya sahiptir. Yüksek mitotik aktivite gösterirler (Fisher ve ark., 2002). Fibrosarkoma hücrelerinin görünümü Şekil 1.3.'de yer almaktadır.



Şekil 1.3. Fibrosarkoma, polimorfik hücreler (Klijanienko ve Lagace, 2011).

Fibrosarkomada fibroblastlar, çekirdekleri ve sitoplazmaları uzamış, iğsi görünüm sergilerler. Fibrosarkomada fibroblastlar ve bunların fibrilleri birbirleri içine geçmiş düzenli bantlar şeklindedirler (Hajdu, 1998). İyi belirlenmiş fibrosarkomalar olgun kollojenler bakımından zengindirler (Wong, 2008). Bunun yanında immunohistokimyasal incelemede vimentin pozitif, CD34 nadiren pozitifdir. Şimdiye kadar ayırt edilebilir bir sitogenetik veya moleküler karakterizasyonu yapılamamıştır (Klijanienko ve Lagace, 2011).

1.3. Proteomik

Proteom terimi ilk olarak Wilkins ve ark. (1995) tarafından, bir organizmanın genomu tarafından eksprese edilen proteinlerin tümü olarak tanımlanmıştır. Proteom terimi, bir organizma, doku veya hücrede herhangi bir zamanda bulunan proteinlerin tümünü ifade eder (Karataylı ve Bozdayı, 2008). Proteom analizi denildiği zaman ise bir genom, doku veya hücre tarafından eksprese edilen bütün proteinlerin analizi anlaşılmaktadır. Proteom analizinin ardında yatan teknolojiler iki boyutlu jel elektroforezi ve protein identifikasyonunu mümkün kılan kütle spektrometresidir (Westermeyer ve ark., 2008). Kısaca proteomun analiz edilmesi olarak da tanımlanabilen proteomik ifadesi ise pratikte, geniş çaplı protein ayırma ve tanımlama tekniklerinin kullanılması ile yapılan proteom çalışması olarak tanımlanmaktadır. Proteomik, biyoloji, biyoinformatik ve protein biyokimyasını içeren multidisipliner bir bilim dalıdır (Karataylı ve Bozdayı, 2008).

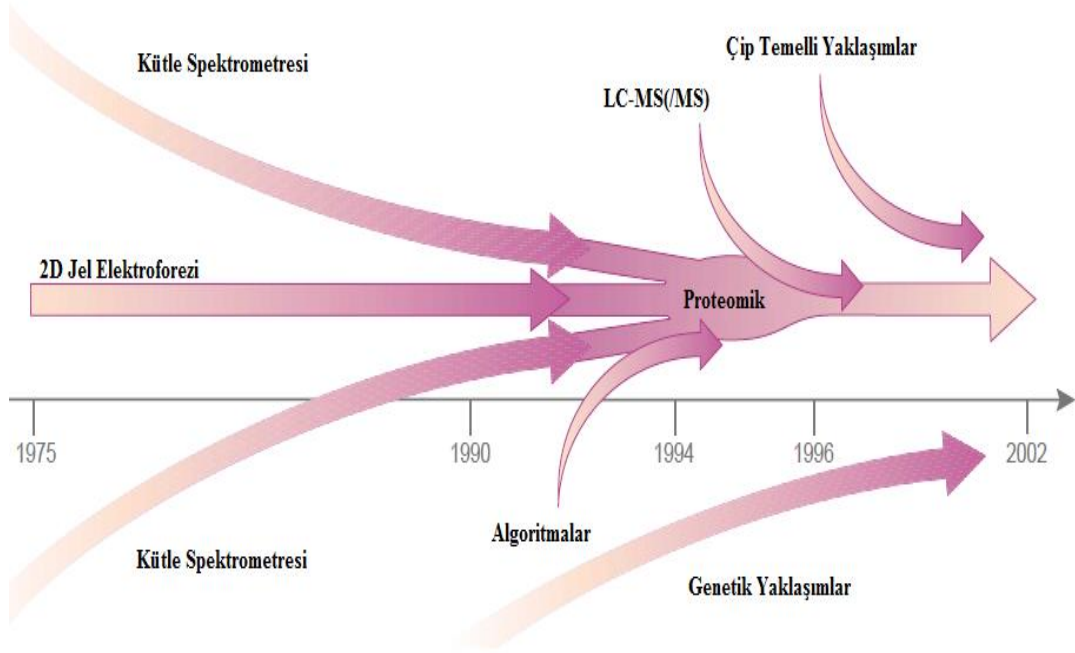
Proteinler bütün biyolojik süreçlerde yer alırlar ve bu nedenle fonksiyonel olarak en önemli biyolojik moleküller olarak değerlendirilmektedirler. Proteinlerin identifikasyonu ve karakterizasyonu olarak da adlandırılan proteomik son yıllarda en önemli multidisipliner çalışma alanları içerisinde yer almaktadır. Genomik, metabolomik ve biyoinformatik gibi diğer multidisipliner çalışma alanları gibi proteomik sistem biyolojisinin temel parçasıdır. Bu multidisipliner çalışma alanlarının ortaya çıkışı yaşayan organizmaların anlaşılması ve çözülmemiş biyolojik sorunların çözülmesine olanak sağlamıştır. Proteinlerin neredeyse tüm biyolojik aktivitelerle ilişkili olduğu düşünüldüğünde proteomik bilimi biyolojik bilgi için oldukça zengin bir kaynaktır (Takahashi ve Isobe, 2007).

1.3.1. Proteomik Biliminin Tarihçesi:

İki boyutlu jel elektroforezi'nin (2-DE) O'Farrell (1975) tarafından tanımlanmasıyla ilk defa kompleks protein karışımlarının bileşenlerine ayrılması sağlanmıştır. Fakat protein identifikasyonundaki zorluklar nedeniyle o zamanlarda 2-DE yaygın olarak

kullanılamamıştır (Klein ve Thongboonkerd, 2004). Sonraki yıllarda matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometresi (MALDI-MS) Karas ve Hillenkamp (1988) tarafından ve Elektrospray iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS) Fenn ve ark. (1989) tarafından geliştirilmiştir. Bu gelişmelerin sonucu ilk defa veri tabanları kullanılarak ve peptid kütle haritalanması ile proteinlerin identifikasyonu Henzel ve ark. (1989) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Bilimin en önemli dönüm noktalarından biri olan insan genom projesinin (Human Genom Project) 2003 yılında tamamlanmasından sonra yaşamın moleküler temelini anlaşılmak için yürütülen araştırmaların sayısı artmıştır. Bu projeden elde edilen bilgilerin klinik çalışmalara uygulanması ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacı ile proteomik kavramı hızla gelişmeye başlamıştır (Karataylı ve Bozdayı, 2008).



Şekil 1.4. Zamana bağlı olarak farklı teknik ve yaklaşımların proteomik sürece katılımları (Patterson ve Aebersold, 2003).

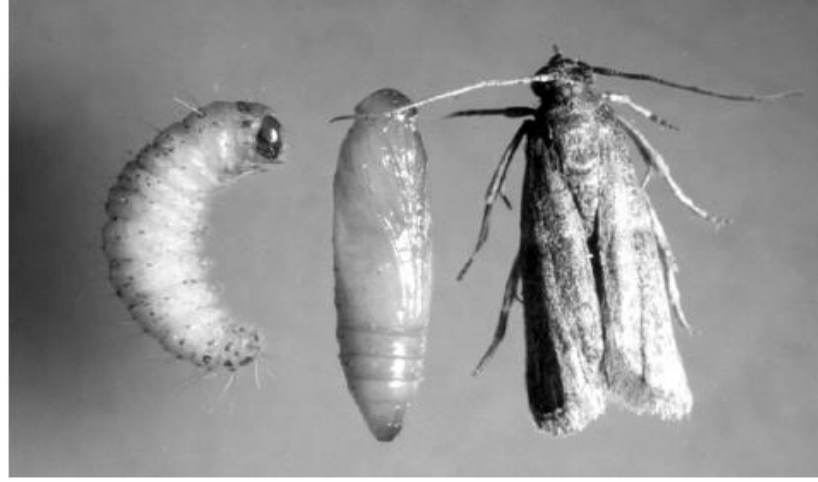
Bunun yanında son yıllarda genomik analizlerdeki başarılı sonuçlara paralel gelişen kütle spektrometresindeki (MS) gelişmeler, 2-DE ile ayrılan proteinlerin identifiye edilmesini olanaklı hale getirmiştir. Proteinlerin 2-DE ile ayrılması sonrası yüksek verimli analiz özelliğine sahip kütle spektrometresi ile proteinlerin identifikasyonu proteomik analizleri pratik hale getirmiştir (Klein ve Thongboonkerd, 2004). Proteomik bilimi başlangıcından bugüne kadar farklı tekniklerin sürece katılımı ile oldukça ilerlemiş durumdadır (Patterson ve Aebersold, 2003). Zamana bağlı olarak farklı teknik ve yaklaşımların proteomik sürece katılımları Şekil 1.4.'de yer almaktadır.

1.3.2. Proteomik Biliminin Önemi

İnsan genom projesinin tamamlanmasından önce biyolojik araştırmalar sınırlı sayıda gen ve proteinler üzerine odaklanmış durumdaydı (Link ve Labaer, 2009). İnsan genomunun haritalanmasının büyük bir bölümü tamamlandıktan sonra araştırmalar gen ürünlerinin normal biyolojik fonksiyonlarının ve hastalıkların gelişimindeki fonksiyonel rollerinin belirlenmesine yönelmiştir. Bu nedenle proteomik post-genomik süreçte genlerin fonksiyonlarının anlaşılması için önemli uygulama alanlarından birisi haline gelmiştir (Atabey, 2002).

Moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmeler insan hastalıklarının genetik ve moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Son zamanlarda farklı koşullardaki gen ekspresyonu değişimi analizlerini tanımlayan fonksiyonel genomik terimi ortaya çıkmıştır. Fakat genomik analizlerdeki sınırlama yüzünden hücresel düzeyde proteinlerin ön planda olduğu fonksiyonlar hakkında tam bir bilgi elde edilememektedir. Proteinlerin hücresel fonksiyonlar üzerine direk etkisi düşünüldüğünde, genomik analizler proteomik analizlere göre hücresel fonksiyonların anlaşılmasında sınırlı kalmaktadırlar. Canlılardaki farklı gelişim süreçleri genom sabit iken proteomdaki değişime bağlıdır (Şekil 1.5). Bu durum proteomun önemini vurgulamaktadır (Klein ve Thongboonkerd, 2004).

Proteomik alanında yapılan çalışmaların gen çalışmalarına ek olarak sunduğu avantajlardan en önemlileri vücut sıvılarında, hücrelerde ve doku biyopsilerinde diagnostik ve prognostik hastalık belirteçlerinin tanımlanmasına ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine olanak sağlamasıdır (Karataylı ve Bozdayı, 2008). Proteomik son yıllarda biyolojik süreçler ile hücre ve dokulardaki protein profil değişikliklerinin incelendiği etkili bir yaklaşım olmuştur. Sağlık bilimlerinde proteomik bilimi, hastalıklarda yeni hastalık belirteçlerinin aranmasında kullanılmaktadır. Bununla beraber çoğu ilaç tedavisinde ilaçların hedef proteinler üzerinden hastalıkları tedavi ettikleri göz önüne alındığında proteomik, ilaç tedavileri için yeni hedefler belirlenmesi için yeni bir araç olmuştur (Link ve Labaer, 2009).



Şekil 1.5. Bir böceğin farklı yaşam döngülerinde aynı gene sahip olmasına rağmen farklı proteom sergilemesinden dolayı farklı morfolojik özellikler göstermesi (Klein ve Thongboonkerd, 2004).

Hücrelerin fonksiyonları genler ve mRNA’lardan ziyade direk olarak proteinler ile düzenlenir. Proteinlerin fonksiyonlarında ise hücredeki lokalizasyonları, fizyolojik uyaran sonucu lokalizasyonlarında meydana gelen değişiklikler ve post-translasyonel modifikasyonları önemlidir. Bu değişiklikler ancak proteomik çalışmaları ile belirlenebilir. Proteomik, spesifik hastalıklar, toksik ajanlar veya enfeksiyonlar gibi pek çok dış faktör uyarısı sonucu değişen protein profillerinin ve proteinlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi, işlevlerinin aydınlatılması ve interaksiyonları üzerinde çalışan multidisipliner, teknoloji gerektiren bir bilimdir (Kurban ve Mehmetoğlu, 2010).

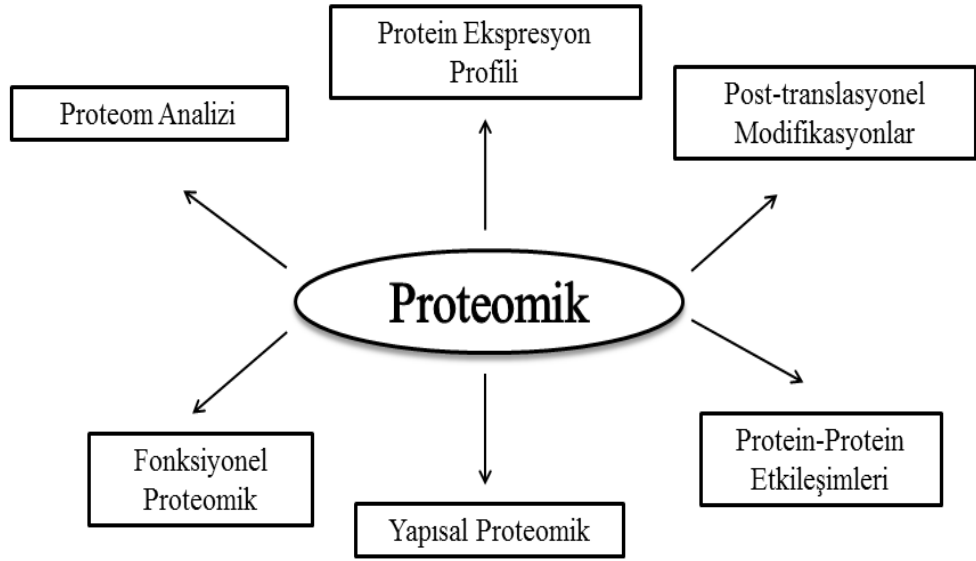
1.3.3. Proteomik Stratejileri

Kütle spektrometresinin dahil olduğu proteomik çalışmaları; protein identifikasyonu, protein-protein etkileşimleri, kantitatif ve diferansiyel protein analizleri, post-translasyonel modifikasyonlar ve yapısal proteomik olmak üzere beş kategoride sınıflandırılabilir (Stults ve Arnott, 2005). Fakat genel bakış açısı ile proteomik stratejiler; klasik proteomik, fonksiyonel proteomik ve yapısal proteomik olmak üzere üç ana kategoride sınıflandırılır. Fonksiyonel çalışmalar proteomik çalışmalarda önemli bir bölüm olmakla birlikte klasik proteomik çoğu zaman fonksiyonel proteomik çalışmalarının başlangıç aşamasını oluşturmaktadır. Günümüze kadar çoğu proteomik çalışma normal ve hastalıklı hücre veya dokuların protein ekspresyonlarının karşılaştırılması şeklinde olmuştur (Klein ve Thongboonkerd, 2004). Proteomik stratejileri Şekil 1.6.'da görülmektedir.

1.3.3.1. Klasik Proteomik

Klasik proteomik veya ekspresyon proteomik hedef proteinlerin identifiye edildiği, karakterize edildiği ve biyokimyasal yollarla ilişkilendirildiği proteomik çeşididir (Westermeyer ve ark., 2008). Ekspresyon proteomik spesifik hücre veya dokulardan eksprese edilen proteinlerin identifiye edilmesini ifade edilmektedir. Bununla birlikte iki veya daha fazla farklı deneysel durum için protein ekspresyonlarını karşılaştırmak fizyolojik ve patojenik mekanizmanın anlaşılmasında daha fazla bilgi sunmaktadır (Klein ve Thongboonkerd, 2004).

Klasik proteomikte başlangıç aşaması jel bazlı yöntem olsun veya olmasın örneklerin proteomik analizlere hazır hale getirilmesidir. Proteinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki farklılıklar sonucu farklı ekstraksiyon protokolleri farklı kompartmanlardaki proteinlerin lehine sonuç doğurabilmektedir. Hücrelerden veya dokulardan proteinlerin izolasyonu veya ekstraksiyonu sonrasında proteinler 2-DE veya sıvı kromatografisi (LC) kullanılarak separasyona uğrattılırlar. Daha sonra proteinler MS kullanılarak identifiye edilirler (Klein ve Thongboonkerd, 2004).



Şekil 1.6. Proteomik stratejileri (Graves ve Haystead, 2002).

Hastalıklı ile sağlıklı materyal veya tedavi görmüş ile kontrol arasında yapılan karşılaştırmalı analizler anlamlı protein ekspresyon değişiklerini belirleyen güçlü bir yaklaşımdır. Çoğu durumda artan veya azalan proteinler gözlenmekte iken pratikte, bir durumda görülmekte iken diğer durumda görülmeyen proteinler daha değerlidir (Westermeyer ve ark., 2008).

1.3.3.1.1. Kantitatif Proteomik

Kantitatif proteomik çalışmaları iki veya daha fazla örnekteki protein profillerinin karşılaştırılması şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmalar ilaç tedavisi sonucu veya hastalık durumundaki protein farklılıklarının ortaya konulmasında kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan örnekler plazma, serum, idrar gibi biyolojik sıvılar olduğu gibi hücre veya doku kültürleri olabilmektedir. Örneklerdeki proteinlerin ayrıştırılması genellikle 2-DE ile olmakta ve kantitatif analiz için uygun boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Proteomik çalışmalarının bu alanına ekspresyon proteomik adı da verilmektedir. Kantitatif proteomik sıklıkla hastalıklara spesifik belirteçlerin bulunması için kullanılmaktadır (Stults ve Arnott, 2005).

1.3.3.1.2. Biyoinformatik Analiz

Proteinler identifiye edildikten sonra biyoinformatik analiz ile proteinler hakkında bilgi elde edilir. Buna ek olarak biyoinformatik analiz ileride yapılacak olan fonksiyonel proteomik çalışmalarına yol gösterici olmaktadır (Klein ve Thongboonkerd, 2004).

1.3.3.2. Fonksiyonel Proteomik

Fonksiyonel proteomik protein-protein etkileşimlerinin incelendiği proteomik stratejisidir (Westermeyer ve ark., 2008). Hedeflenmiş proteinlerin hücrel fonksiyonlarını anlamak için protein-protein etkileşimlerinin, protein komplekslerinin ve post-translasyonel modifikasyonlarının kapsamlı analizi gerekmektedir (Klein ve Thongboonkerd, 2004). Post-translasyonel modifikasyonların analizi istenilen proteindeki modifikasyonun yerinin ve tipinin identifiye edilmesi işlemidir. Proteinlerdeki fosforilasyon bölgelerinin belirlenmesi fosforilasyonun hücrel düzenleyici mekanizmalardaki önemi dolayısıyla en çok gerçekleştirilen çalışmalardır. Glikozilasyon bölgelerinin ve glikan yapılarının belirlenmesi de çokça gerçekleştirilen çalışmalar arasındadır (Stults ve Arnott, 2005). Protein etkileşimleri ve protein kompleksleri 2-DE, afinite kromatografisi, protein çipleri, TAP (tandem sequential affinity tag purification), BIA-MS (biomolecular interaction analysis-mass spectrometry) gibi tekniklerle analiz edilebilmektedir (Klein ve Thongboonkerd, 2004).

1.3.3.3. Yapısal Proteomik

Proteinlerin üçüncül ve dördüncül yapılarının belirlenmesi çalışmaları protein fonksiyonunun ve protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesinde önemli yer tutmaktadır. Yapısal proteomikte NMR (Nuclear Magnetic Resonance), X-Işınları

kristalografisi gibi teknikler kullanılmakta olup kütle spektrometresininde bu alanda gittikçe artan bir önemi mevcuttur (Stults ve Arnott, 2005).

1.3.4. Proteomik Çalışmalarındaki Zorluklar

Proteinler değişik büyüklük ve şekillerde, değişik izoelektrik noktalarına sahip, değişken hidrofobiklik ve biyolojik ilgi gösteren moleküllerdir. Proteinlerdeki amino asit yan dallarındaki değişkenlik ve proteinlerin kendilerine özel üç boyutlu yapısı her proteine farklı fiziksel, kimyasal ve fonksiyonel özellikler kazandırmaktadır. Bu özellikler proteinlere hücrede birçok ayrı fonksiyon sergileme yeteneği vermektedir. Proteomikte en büyük zorluk bu değişik fiziksel özelliklere sahip ve çok değişken miktarlarda bulunan proteinler üzerinde çalışmaktır (Link ve Labaer, 2009).

Bir organizmanın genomu sabit iken aynı organizmanın proteomu dinamiklik göstermektedir. Genom ile karşılaştırıldığında proteom oldukça karmaşıktır. Proteolitik süreç ve post-translasyonel modifikasyonlar gibi faktörler hücrenin proteomunun karmaşıklığını arttırmaktadır. Bunun yanında bir organizma farklı hücre tiplerinde, farklı süreçlerde ve farklı koşullarda farklı protein ekspresyonları sergiler. Protein etkileşimleri, hücrelerarası yerleşim ve post-translasyonel modifikasyonlar bu olaylar sırasında devamlı değişim göstermektedir. Proteomda karşımıza çıkan zorluk hücre veya doku proteomunda meydana gelen bu değişikliklerin doğru olarak, etraflı bir şekilde belirlenmesi ve ölçülmesidir (Link ve Labaer, 2009).

Biyomedikal araştırmalar için uygulanan proteom analizleri biyolojik sistemlerdeki karmaşıklık nedeniyle güçtür. Birkaç nedenden dolayı eksprese edilen proteinlerin identifikasyonu ve karakterizasyonunda problemler yaşanmaktadır. Özellikle kan gibi vücut sıvılarında gerçekleştirilen proteom analizleri, yüksek miktarda bulunan albümin gibi bileşenlerin sonucu maskeleymesi sonucu zor olmaktadır (Zwickl ve ark., 2005).

Proteomik çalışmalardaki bir diğer zorluk membran proteinleri üzerine yapılan çalışmalarda ortaya çıkmaktadır. Membran proteinleri üzerine yapılan proteomik çalışmalarda iki temel sorun ile karşılaşmaktadır. Bunlardan ilki toplam hücre protein kompozisyonu ile karşılaştırıldığında membran proteinlerinin miktarının çok az olması, ikincisi örnek hazırlama aşamasında yüksek hidrofobik özellik gösteren membran proteinlerinin çözünürlüğünde karşılaşılan sorunlardır. Bütün bu karşılaşılan zorluklar membran proteinleri üzerine yapılan proteomik analizlerde örnek hazırlama stratejilerinin önemini ortaya çıkarmaktadır. Bundan dolayı membran proteini çalışmalarında protein çözünürlüğü ve miktarı ile ilgili yeni stratejiler geliştirilmiştir (Ahram ve Springer, 2004; Tan ve ark., 2008).

1.3.5. Proteomik ve Kanser

Kanserin bütün dünyada yılda 6 milyondan fazla ölümden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde kanser ölümlerine sona eren hastalıklar arasında ikinci sırada yer almaktadır ve ölüm oranının % 23-25'ini oluşturmaktadır. Diagnostik görüntüleme teknolojilerine, cerrahi yöntemlere ve terapötik modellere rağmen çoğu kanser türünde hayatta kalma oranı düşüktür. Örneğin akciğer kanserinde son 5 yılda hayatta kalma oranı % 14 iken, bu oran pankreas kanserinde % 4'dür (Xue ve ark., 2008).

Genomik devrim ve ardından ortaya çıkan proteomik bilimi kanser araştırmalarının biçimini değiştirmiştir. Kanseri uzun yıllardır genetik kararsızlık ve büyüme disregülasyonu ile ilgili bir hastalık olarak bilinmektedir. Genlerin sonuçta fonksiyona dönüşmesi gibi kanserde meydana gelen genetik kararsızlık disfonksiyona dönüşmekte ki bu durum proteinler ve proteom değişikliğine sebep olmaktadır. Kanserde bu protein değişiklikleri tümör spesifik hedefler ve hastalıklar ile ilgili yüksek derecede bilgi veren belirteçleri ortaya çıkarmaktadır (Liebler, 2005).

Kanser üzerine yapılan çalışmalarda genomik yaklaşım uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (Guoqing ve ark., 2011). Bunun yanında nükleik asitler hastalıklar için belirteç olarak ilgi çekici moleküllerdir. Ancak kanserde meydana gelen mRNA ekspresyon farklılığı ilgili proteinin ekspresyon farklılığına eşit değildir. Bu durumun nedeni mRNA miktarının değişim düzeyinin ilgili proteinin değişim düzeyiyle zayıf ilişkili olmasından kaynaklanmaktadır. mRNA düzeyindeki değişiklik ilgili protein düzeyindeki değişikliğin en fazla % 40'ını temsil etmektedir. Ayrıca elde edilen mRNA verileri ile post-translasyonel modifikasyonların, proteinlerin hücre içi yerlerinin belirlenmesinin ve protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesi olanaksızdır. Proteinler birçok hücresel süreçten sorumlu moleküllerdir. Bu nedenle proteinlerin analiz edilmesi hastalıkların mekanizmasının ortaya konulmasında ve hastalıkların altında yatan nedenlerin ortaya çıkarılmasında büyük önem taşımaktadır (Tan ve ark., 2012).

Henüz başlangıç döneminde olmasına rağmen proteomik çalışmaları klinik çalışmalarla oldukça ilişkilidir. Klinik proteomikte temel amaç erken teşhis için tümör belirteçleri bulmak ve tedaviye müdahale edebilmek için potansiyel hedefler belirlemektir. Biyolojik belirteç iki ya da daha fazla biyolojik durum için (örneğin; hastalık durumuna karşı sağlıklı durum) miktara bağlı olarak değişebilen madde veya molekül (örneğin; peptid veya protein) olarak tanımlanabilir. Bir biyolojik belirteç fizyolojik veya patolojik bir durumu gösteren biyolojik bir parametredir (Karataylı ve Bozdayı, 2008).

Hücrelerden eksprese edilen proteinler büyüme, bölünme, farklılaşma, hücresel düzeyde apoptozis, gelişme, immün savunma, pıhtılaşma ve tümör oluşumu gibi birçok biyolojik süreci belirleyen, kontrol ve koordine eden moleküllerdir (Zwickl ve ark., 2005). Kanserli hücrelerden eksprese edilen proteinler farklılaşmada, invazyonda, metastazda ve hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerini düzenleyerek kanserin anjiyogenezinde rol alan temel moleküllerdir. Daha önemlisi kanserli hücrelerden salgılanan bu proteinler daima kan ve idrar gibi vücut sıvılarına girerler ve ölçülebilmektedirler (Xue ve ark., 2008). Proteinlerin organizmadaki bu rolleri onları kanser gibi hastalıkların teşhis ve tedavisinde ve ilaç

geliştirilmesinde iyi bir hedef ve kaynak yapmaktadır. Bu nedenle yeni tümör belirteçlerinin identifiye edilmesi için neoplastik hücrelerden salgılanan proteinlerin karakterizasyonu son zamanlarda önem kazanmıştır (Zwickl ve ark., 2005). Son zamanlardaki çalışmalar kanserli ve normal hücreler arasındaki farklılıkları proteom düzeyinde belirlemeye yönelik olup bu araştırmalar proteom farklılığının kanser oluşumuyla ve süreciyle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Guoqing ve ark., 2011).

Erken teşhis ve müdahale kanser hastalarını tedavi etmede en iyi yol olarak kabul görmüştür. Tümör belirteçleri belirli kanser türlerinde diagnostik, prognostik ve terapötik bilgiler sağlamaktadır ve bu belirteçlerin kanserin erken tanısındaki önemleri gittikçe artmaktadır (Xue ve ark., 2008).

Proteomik teknolojisi ile kanser tanısı için yeni tümör belirteçlerin tanımlanması ve bu tümör belirteçlerinin analizi ile erken kanser tanısında önemli adımlar atılmıştır (Kurban ve Mehmetoğlu, 2010). Karsinoembriyonik antijen (CEA), prostat spesifik antijen (PSA), alfa-feto protein (AFP) gibi birçok önemli kanser belirteci keşfedilmiştir. Bu keşfedilen kanser belirteçleri genellikle klinik teşhislerde kullanılmaktadır. Birçok belirteç sınırlı spesifiteleri ve hassaslıkları nedeniyle pek tatmin edici değildirler. Bu nedenle klinik uygulamalar için yeni belirteçlerin keşfedilmesi büyük önem taşımaktadır (Xue ve ark., 2008).

Tümör belirteçlerinin keşfinde proteomik profillerin oluşturulması en çok kullanılan stratejilerdendir. Kütle spektrometresindeki etkili gelişim, biyoinformatik ve analitik teknikler ile proteomik yaklaşım kanserde salgılanan bu proteinlerin analizlerinde ve belirteç keşiflerinde gelişmeye yol açmıştır. İki boyutlu jel elektroforezi ile bağlantılı kütle spektrometresi klasik ve istikrarlı bir proteomik yaklaşımdır. Bu yöntem kompleks protein bileşimlerinin yüksek kararlılıkta ayrılmasına olanak sağlar. İki boyutlu jel elektroforezi ile bağlantılı kütle spektrometresi ile proteomik analiz başta akciğer kanseri olmak üzere birçok kanser türünde kanser belirteci aranması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. İki türlü proteomik strateji mevcuttur. Bunlardan biri kanserli doku ile normal dokunun

protein modellerinin karşılaştırılması iken bir diğeri kanser hastalarının serum/plazma örnekleri ile normal bireylerin serum/plazma örneklerinin protein modellerinin karşılaştırılması şeklindedir. Kan proteomik çalışmalarındaki büyük sınırlama bilim adamlarını tümör belirteçleri keşfinde hücre kültürü ile bağlantılı proteomik çalışmaları gibi yeni yöntemler aramaya yöneltmiştir (Xue ve ark., 2008).

Günümüzde tek belirteç analizleri ile yapılan kanser tanısının özgüllük ve hassasiyeti yeterli değildir. Proteomik teknolojisi kullanılarak tek belirteç analizinde karşılaşılan bu problem çoklu belirteç analizi ile ortadan kaldırılmakta, yüksek özgüllük ve duyarlılıkta erken dönemde kanser tanısı mümkün olmaktadır. Çünkü proteomik teknolojisi ile birden fazla belirteç molekülün ekspresyon değişimleri oldukça yüksek bir özgüllük ve duyarlılıkta değerlendirilebilmektedir. Bu amaçla kanser ve normal doku proteinleri karşılaştırılarak farklı olan proteinler belirlendikten sonra bu proteinlerden belirteç olarak prediktif değeri en iyi olanları bulunur (Kurban ve Mehmetoğlu, 2010).

Bu çalışmada iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) ve sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemleri birlikte kullanılarak fibrosarkoma ve deri fibroblast hücre hatlarının karşılaştırmalı proteomik analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kanser hücre hattı olarak insan fibrosarkoma hücre hattı olan HT-1080, karşılığı normal hücre hattı (kontrol) olarak da insan deri fibroblast hücre hattı olan CCD-1135Sk hücre hattı seçilmiştir. Proteomik analizler hücre içi proteinlerin analiz edilmesi amacıyla hücre lizatı, hücre dışı (ekstrasellüler matriks) proteinlerin analiz edilmesi amacıyla sekretom örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Hücre lizatı örneklerinde her iki hücre hattının protein profilleri karşılaştırılırken fibrosarkoma hücre hattında fibroblast hücre hattına göre ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede artan veya azalan protein spotları 2D-PAGE ile tespit edilip bu proteinler LC-MS/MS yardımıyla identifiye edilmiştir. Böylece kanser durumunda hücre içi ekspresyonu değişen proteinler ortaya konulmuştur. Sekretom örneklerinde ise fibrosarkoma sekretomunda görülüp fibroblast sekretomunda görülmeyen protein spotları 2D-PAGE ile tespit edilip bu proteinler LC-MS/MS yardımıyla identifiye edilmiştir.

Böylece normal duruma göre sadece kanser hücrelerinden hücre dışına salgılanan proteinler tespit edilmiştir. Hem hücre lizatında hem de sekretomda identifiye edilen bu proteinlerin kanserdeki rolleri göz önünde bulundurulduğunda elde edilen sonuçlar ile fibrosarkomanın moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır. Bununla beraber özellikle sekretom örneklerinden elde edilen sonuçlar başta olmak üzere identifiye edilen bütün proteinlerin fibrosarkoma hücre hattında fibroblast hücre hattına göre farklı ekspresyon sergilemesinden dolayı fibrosarkoma için potansiyel tümör belirteçlerinin (biyomarker) bulunması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.1.'de yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-F12)	Lonza	BE12-719F
Gentamisin Sülfat	Lonza	17-518Z
Fetal Dana Serum (FBS)	Lonza	DE14-802E
Fosfat Tampon Solusyonu (PBS), Steril	HyClone	SH302258.01
Tripsin-EDTA Çözeltisi	Lonza	BE17-161E
Tripan Mavisi Çözeltisi	HyClone	SV30084.01
Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)	Fisher	BP118-500
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Merck	K23823671-712
Disodyum Fosfat (Na_2HPO_4)	Merck	K42792580-141
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma	12636
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma	S9888
Sakkaroz	Difco	0176-17
Trikloroasetik Asit (TCA)	Merck	K42609607-145
Etanol	J. T. Baker	8229
Üre	Amresco	0568
Tiyoüre	Sigma	T8656
Mixed Bed İon Exchange Resin	Sigma	M8032
CHAPS	Acros Organics	436550050
Amfolit pH 3-10	Sigma	P1522
Dithiotreitol (DTT)	Fisher	BP172-5
Proteaz İnhibitör Çözeltisi	Cell Signaling	5871S

Çizelge 2.1. (Devamı) Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Sığır Serum Albumini	Sigma	A2153
660 nm Protein Assay Reagent	Thermo	22660
Gliserol	Fisher	BP229-1
Mineral Yağ	Fisher	BP2629-1
Akrilamid	Fisher	BP170-500
N'N'-Metilenbisakrilamid	Fisher	BP171-100
Tris-Baz	Fisher	BP152-1
Hidroklorik Asit (HCl)	J. T. Baker	6081
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Fisher	BP166-500
Amonyum Persülfat (APS)	Fisher	BP179-100
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED)	Fisher	BP150-20
1-Butanol	Sigma	537993
Bromofenol Mavisi	Fisher	BP114-25
İyodoasetamid	Sigma	I1149
Glisin	Fisher	BP381-1
Agaroz	Lonza	50002
Aluminyum Sülfat	Fluka	06421
Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250)	Fisher	BP100-25
Fosforik Asit	Riedel-de Haen	04107
Asetik Asit	Merck	K37372756-720
Protein Standardı	Thermo	26619
Immobilize pH Gradient (IPG) strip, pH 3-10, 13 cm	GE Healthcare	17.6001.14
Asetonitril	Fisher	A/0638/17
Amonyum Bikarbonat	Fisher	BP2413
Tripsin	Promega	V5111
Formik Asit	Sigma	14265

2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 2.2.'de yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.

Sarf Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Hücre Kültürü Flaskı, 175 cm ²	Starstedt	83.1812.002
Hücre Kültürü Flaskı, 75 cm ²	Starstedt	83.1813.002
Hücre Kültürü Flaskı, 25 cm ²	BD Falcon	353108
Santrifüj Tüpü, 50 ml	Starstedt	62.547.254
Santrifüj Tüpü, 15 ml	Starstedt	62.554.502
Santrifüj Tüpü, 2 ml	Starstedt	72.694.006
Cryotube, 1.8 ml	Sigma	V7884
Elektrot Kağıdı	Amersham	18.1004.40
Steril Filtre (0.45 µm)	Orange Scientific	1520014
Pipet ucu, 1000 µl, Steril	Biohit	791003
Pipet ucu, 100 µl	FL medical	28052
Pipet ucu, 10 µl, Steril	Biohit	7910011F
96 kuyucuklu plaka	BD Falcon	353072
Neubauer lamı	Isolab	075.03.001
Serolojik Pipet, Steril, 1 ml	BD Falcon	357521
Serolojik Pipet, Steril, 5 ml	BD Falcon	357543
Serolojik Pipet, Steril, 10 ml	Starstedt	82.1254.001

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 2.3.'de yer almaktadır.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Üretici Firma	Model
Su Banyosu, Isıtmalı	Nüve	BM402
Steril Güvenlik Kabini (Laminar Flow)	Holten	1,8
CO ₂ 'li İnkubatör	Sanyo	MCO-18AIC
Mikroskop, Invert, Trinoküler	Olympus	CKX41
Klasik Işık Mikroskobu	Leica	CME
Saf Su Cihazı	Millipore	Synergy 185
Kırık Buz Makinesi	Frocchetti	AF-100
Santrifüj, Yüksek Hızlı, Soğutmalı	Sigma	3K30
Hassas Terazı	Shimadzu	AUW320
Vorteks	Biosan	Biovortex V1
ELISA Okuyucu	Tecan	Sunrise
Otomatik Pipetler, 10 µl, 100 µl, 1000µl	Gilson	Pipetman
Derin Dondurucu (-80 °C)	Sanyo	MDF-03386S
İzoelektrik Odaklama (IEF) Cihazı	Amersham	Ettan IPGphor II
Elektroforez Tankı	Hoefer	SE600
Güç Kaynağı	Consert	E815
Elektroforez Soğutma Ünitesi	LKB	2219
Dansitometre	Bio-Rad	GS-800

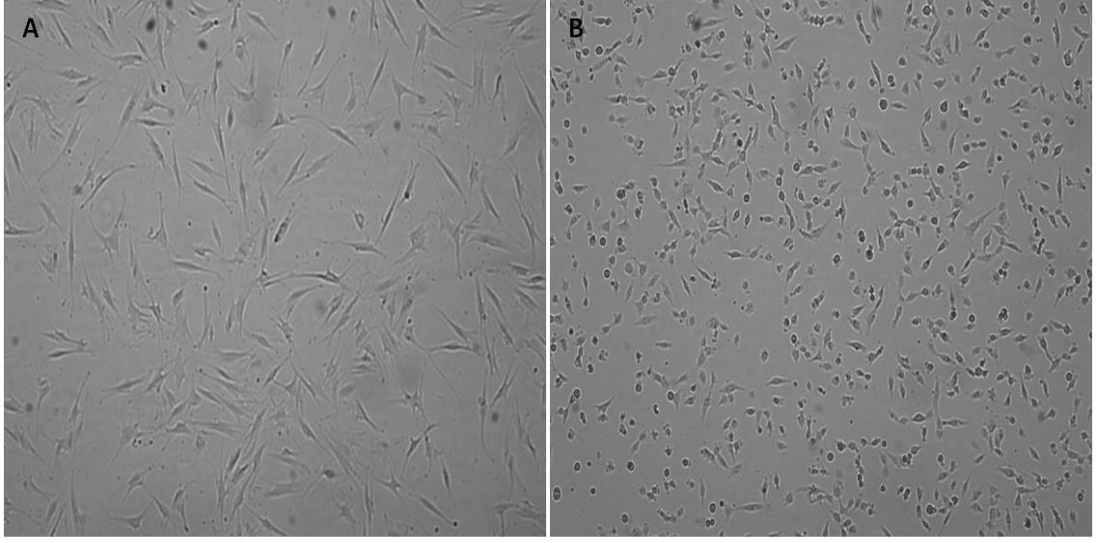
2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Çalışmada insan deri fibroblast hücre hattı olan CCD-1135Sk hücre hattı (ATCC: CRL-2691) ve insan fibrosarkoma hücre hattı olan HT-1080 (ATCC: CCL-121) hücre hatları kullanıldı. Çalışmada kullanılan her iki hücre hattı için DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) besiyeri kullanıldı. Her iki hücre hattı da % 10 Fetal Dana Serum (FBS) ve 50 mg/l gentamisin içeren besiyerleri içerisinde, 37 °C'de ve % 5 CO₂ içeren ortam sağlayan hücre kültürü inkübatöründe üretildi. Hücrelerin besiyerleri her gün değiştirildi. Üretilen hücrelerin canlılıkları, çoğalma hızları ve morfolojik yapıları her gün invert mikroskop ile takip edildi. Çalışmada kullanılan CCD-1135Sk insan deri fibroblast hücre hattı ve HT-1080 insan fibrosarkoma hücre hattının mikroskopik görüntüleri Şekil 2.1.'de yer almaktadır.

Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan flasklarda bulunan besiyerleri uzaklaştırılarak hücreler bir kere Ca ve Mg tuzları içermeyen steril PBS ile yıkandı. Yıkanan hücrelerin üzerine 1 : 250 Trypsin-EDTA çözeltisi eklenerek 8-10 dakika hücre kültürü inkübatöründe hücrelerin yüzeyden ayrılması beklendi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra üzerlerine besiyerleri eklenerek tripsin nötralize edildi. Daha sonra hücreler santrifüj tüplerine aktararak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak yerine taze besiyeri eklendi. Taze besiyerinde süspansiyon haline getirilen hücreler yeni flasklara bölünerek pasajlandı.

Hücre hatlarının üretimi ve pasajlanması esnasında kontaminasyonu önlemek amacıyla tek kullanımlık steril pipetler ve filtre kapaklı steril hücre kültürü flaskları kullanıldı. Bütün işlemler hücre kültürü laboratuvarında ve steril güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan CCD-1135Sk insan deri fibroblast hücre hattı (A) ve HT-1080 insan fibrosarkoma hücre hattının (B) ışık mikroskopik görüntüleri (100x büyütme).

2.2.2. Hücre Lizatı ve Sekretom Örneklerinin Oluşturulması

Tez çalışmasında hem fibroblast hem de fibrosarkoma hücre hatlarından hücre içi proteinlerin analiz edilmesi amacıyla hücre lizatı örnekleri, hücre dışına salgılanan proteinlerin analiz edilmesi amacıyla da sekretom örnekleri oluşturuldu.

2.2.2.1. Hücre Lizatı Örneklerinin Oluşturulması

Kullanılan Çözeltiler:

1. PBS Çözeltisi (pH 7,4): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 ve 0,24 g KH_2PO_4 ultra saf suda (18,2 M Ω) çözülerek hacim 1000 ml'ye tamamlandı.
2. PBS-EDTA Çözeltisi (pH 7,4): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 ve 0,2 g EDTA ultra saf suda çözülerek hacim 1000 ml'ye tamamlandı.
3. Sukroz Çözeltisi: 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 ve 85,57 g sukroz ultra saf suda çözülerek hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

4. Lizis Tamponu (7 M Üre, 2 M Tiyoüre, % 4 CHAPS, % 2 DTT, % 2 Amfolit pH 3-10): 4,2 g Üre, 1,5 g Tiyoüre, 0,4 g CHAPS ve 0,2 g DTT ultra saf suda çözülerek üzerine 0,2 ml Amfolit pH 3-10 eklendi ve hacim 10 ml'ye tamamlandı.

Her iki hücre hattı 75 cm²'lik flasklarda üretilip ~% 70 yoğunluğa ulaştıklarında besiyerleri uzaklaştırılarak Ca ve Mg tuzları içermeyen PBS ile bir kere yıkandı. Yıkanan hücrelerin üzerine PBS-EDTA çözeltisi ilave edilerek 8-10 dakika hücre kültürü inkübatöründe hücrelerin yüzeyden ayrılmaları beklendi. Bütün hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskop altında gözlemlendikten sonra hücreler santrifüj tüplerine alınarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak dipte kalan hücreler 2 kere PBS çözeltisi ve son olarak bir kere sukroz çözeltisi ile yıkandı. Son yıkama sonrası süpernatant uzaklaştırılarak hücreler lizis tamponu ile lize edildi. Lize edilen örnekler proteaz inhibitör çözeltisi eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında tutulan örnekler son olarak 15.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alınarak daha sonra 2-D PAGE işleminde kullanılmak üzere - 80 °C'de saklandı.

2.2.2.2. Sekretom Örneklerinin Oluşturulması

Sekretom örnekleri için her iki hücre hattı da 175 cm²'lik flasklarda üretildi. Yoğunlukları ~% 70 'e ulaşan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılarak Ca ve Mg tuzları içermeyen PBS ile üç kere yıkandı. Yıkanan hücrelerin üzerine FBS içermeyen besiyerleri ilave edilerek hücre kültürü inkübatöründe 24 saat muhafaza edildi. Bu süre sonunda FBS içermeyen besiyerleri toplanarak ölü hücrelerin uzaklaştırılması için 0.45 µm'luk filtrelerden geçirildi. Filtreden geçirilen FBS içermeyen besiyerlerine TCA ile protein çöktürme yöntemi uygulandı.

2.2.2.2.1. Trikloroasetik Asit (TCA) ile Protein Çöktürme Yöntemi

Örnekler son konsantrasyonu % 20 TCA olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra + 4 °C’de bir gece muhafaza edildi. Örnekler daha sonra 15.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Çöken protein peleti TCA’nın tamamen uzaklaştırılması için soğuk etanol ile üç kere yıkandı. Son yıkamadan sonra süpernatant atıldı ve oda sıcaklığında 5-10 dakika kalan etanolun uçması sağlandı. Etanolun uçmasını takiben pelet lizis tamponu ile lize edildi. Oluşturulan sekretom örnekleri daha sonra iki boyutlu jel elektroforezi işleminde kullanılmak üzere - 80 °C’de saklandı.

2.2.3. Hücre Canlılığının Kontrolü (Tripın Mavisi Testi)

Hücre canlılığının kontrolü için hem hücre lizatı örneklerinin hem de sekretom örneklerinin oluşturulma aşamasından önce tripan mavisi ile hücre canlılık testi uygulandı. Hücre canlılığı kontrolü hücre lizatı örneklerinde hücreler lize edilmeden önce gerçekleştirildi. Sekretom örneklerinde ise hücreler 24 saat FBS içermeyen besiyerinde muhafaza edildikten sonra hücrelere canlılık testi uygulandı. Bunun için her iki örnek grubu için de mevcut besiyerleri ve tripsinize edilerek kaldırılan hücreler beraber 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve yerine % 10 FBS içeren besiyerleri ilave edilerek hücreler süspansiyon haline getirildi. Daha sonra süspansiyondan 100 µl ve tripan mavisinden 100 µl alınarak ayrı bir ependorf tüpte karıştırıldı ve 5 dakika boyunca ölü hücrelerin boyanması için beklendi. Bu süre sonunda ışık mikroskobu altında boya alan ölü hücreler ve boya almayan canlı hücreler Neubauer Lamı yardımıyla sayılarak hücre canlılığı yüzde olarak hesaplandı.

2.2.4. Protein Miktar Tayini

Oluşturulan hücre lizatı ve sekretom örneklerinin protein miktar tayinleri Antharavally ve ark. (2009) bildirdikleri şekilde gerçekleştirildi. Yöntem 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirildi. Kuyucuklara 150 µl 660 nm protein assay çözeltisi ile 10 µl örnek ve standartlar koyuldu. Örnek ve standartların çözelti ile reaksiyona girmesi için oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmesinin ardından mikropalkanın ölçümü 660 nm’de ELISA okuyucuda gerçekleştirildi. Protein miktar tayininde standart olarak 125, 250, 500, 1000 ve 2000 µg/ml konsantrasyonlarında sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Örnekler ve standartlar üç tekrarlı çalışılarak ortalamaları alındı.

2.2.5. 2D-PAGE ile Proteinlerin Ayrılması

2D-PAGE gerçekleştirilirken ilk olarak birinci boyut elektroforez işlemi olan izoelektrik odaklama (IEF) ardından ikinci boyut elektroforez işlemi olan Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) gerçekleştirildi.

2.2.5.1. IEF ile Proteinlerin İzoelektrik Noktalarına Göre Ayrılması

Kullanılan Çözeltiler:

1. Rehidrasyon tamponu (7 M Üre, 2 M Tiyoüre, % 4 CHAPS, % 1 DTT, % 0,5 Amfolit pH 3-10, % 10 Gliserol): 42 g Üre, 15,2 g Tiyoüre, 4 g CHAPS, 1 g DTT ultra saf suda çözülerek üzerine 0,5 ml Amfolit pH 3-10 ve 10 ml Gliserol eklendi ve 100 ml’ye tamamlandı.

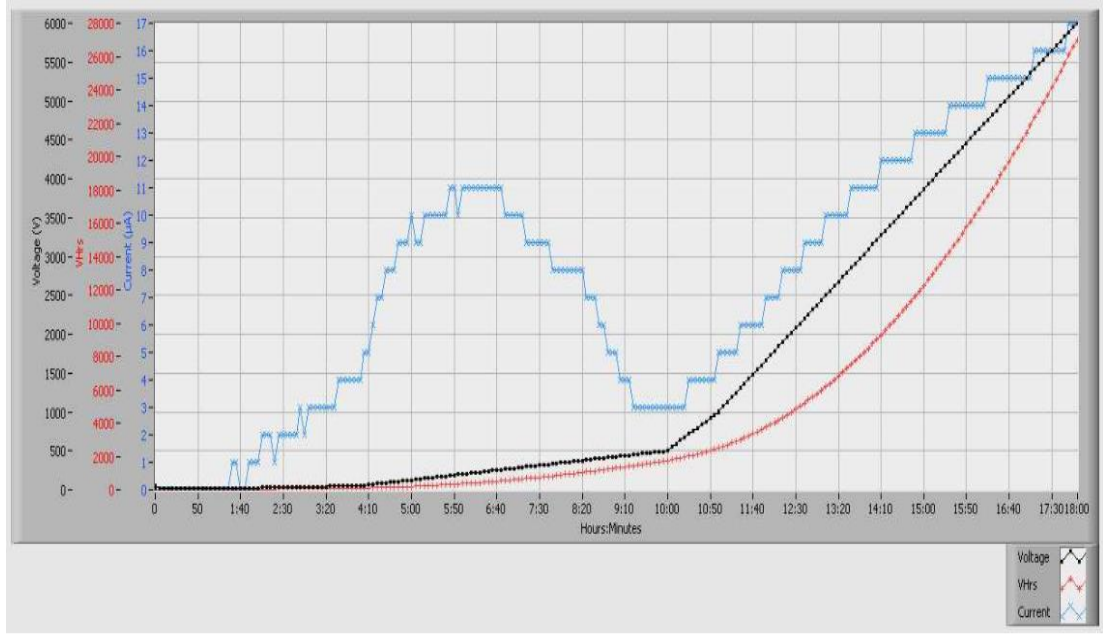
Protein miktarları hücre lizatı örnekleri için 250 µg ve sekretom örnekleri için 75 µg olacak şekilde örnekler rehidrasyon tamponuyla karıştırılarak son hacmi 250 µl

olacak şekilde ayarlandı. İzoelektrik odaklama işlemine hazır hale gelen örnekler pasif rehidrasyon tepsisinin kanallarına otomatik pipet yardımı ile dikkatlice yayıldı. 13 cm uzunluğunda ve pH 3-10 aralığındaki Immobilize pH Gradient (IPG) striplerin jel kısmı üzerinde bulunan koruyucu bant çıkarılarak tepsi kanallarında bulunan örneğin üzerine yerleştirildi. Striplerin bulunduğu her kanala hava ile teması kesmek için sribin üzerini örtecek kadar mineral yağ eklendi. Pasif rehidrasyon tepsisinin kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 15 saat boyunca bekletildi. Pasif rehidrasyon işlemi sonunda örnekleri emen stripler + ve – uçlarına göre izoelektrik odaklama tablasına yerleştirildi. Striplerin uç kısımlarına distile su ile ıslatılmış elektrot kağıtları yerleştirildi. İzoelektrik odaklama tablasına elektrotlar yerleştirildikten sonra striplerin üzerini tamamen kaplayacak şekilde mineral yağ eklendi. İzoelektrik odaklama işlemi 4 basamakta yapılarak proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrımları yapıldı. İzoelektrik odaklama protokolü Çizelge 2.4.’de ve izoelektrik odaklama grafiği Şekil 2.2.’de yer almaktadır.

Çizelge 2.4. İzoelektrik odaklama protokolü.

	Uygulanan Volt	Uygulanan Süre (Saat)	Uygulama Şekli
1. Basamak	50	4	Gradient
2. Basamak	500	6	Gradient
3. Basamak	1000	1	Gradient
4. Basamak	6000	5	Gradient

Birinci boyut elektroforez işlemi biten stripler izoelektrik odaklama tablasından alınarak SDS-PAGE işlemine kadar - 80 °C’de muhafaza edildi.



Şekil 2.2. İzoelektrik odaklama grafiği.

2.2.5.2. SDS-PAGE ile Proteinlerin Molekül Ağırlıklarına Göre Ayrılması

Kullanılan Çözeltiler:

1. Dengeleme Tamponu I (6 M Üre, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, % 30 Gliserol, % 2 SDS, % 1 DTT): 36 g Üre, 0,6 g Tris, 2 g SDS ultra saf suda çözüldü ve üzerine 30 ml gliserol eklenerek ultra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti kullanılmadan önce her 20 ml için 0,2 g DTT ilave edildi.
2. Dengeleme Tamponu II (6 M Üre, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, % 30 Gliserol, % 2 SDS, % 2,5 İyodoasetamid): 36 g Üre, 0,6 g Tris, 2 g SDS ultra saf suda çözüldü ve üzerine 30 ml gliserol eklenerek ultra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti kullanılmadan önce her 20 ml için 0,5 g İyodoasetamid ilave edildi.
3. 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 18,1 g Tris ultra saf suda çözüldü. HCl ile pH 8,8'e ayarlandıktan sonra ultra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

4. Akrilamid-bisakrilamid Çözeltisi (% 30 Akrilamid, % 0,8 N'N'-metilenbisakrilamid): 120 g Akrilamid, 4 g N'N'-metilenbisakrilamid ultra saf suda çözüldü ve hacim 500 ml'ye tamamlandı.

5. SDS Yürütme Tamponu (25 mM Tris baz, 0.192 M Glisin, % 0.1 SDS): 6 g Tris, 28,8 g Glisin, 2 g SDS ultra saf suda çözüldü ve hacim 2000 ml'ye tamamlandı.

6. Agaroz Çözeltisi (% 0,5 Agaroz, % 0,002 Bromofenol Mavisi): 0,5 g Agaroz, 2 mg Bromofenol Mavisi SDS yürütme tamponunda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

7. % 12,5'luk Ayırma Jeli: 33,6 ml Akrilamid-bisakrilamid Çözeltisi, 20 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 25 ml ultra saf su, 0,8 ml % 10 SDS, 0,6 ml % 10 APS, 0,04 ml TEMED karıştırılarak hazırlandı.

İkinci boyut jel elektroforezi için % 12,5'luk SDS-PAGE ayırma jeli hazırlandı. Ayırma jeli çözeltisi hazırlandıktan sonra önceden etanol ile temizlenmiş cam plakalar arasına döküldü. Çözelti üzerine örtecek kadar distile su ile doyurulmuş n-butanol eklendi. Çözelti polimerize olana kadar beklendi. Ayırma jeli hazır hale gelince üzerindeki n-butanolun uzaklaştırılması için birkaç kere distile su ile yıkandı. Önceden - 80 °C'de saklanan izoelektrik odaklama işlemi gerçekleştirilen örnekleri içeren stripler ilk olarak dengeleme tamponu I'de 15 dakika ve son olarak dengeleme tamponu II'de 15 dakika muhafaza edildi. Daha sonra stripler donan jelin üzerine dikkatlice yerleştirildi. Bir elektrot kağıdına protein standardı emdirilerek üzerine sıcak agaroz döküldü. Agarozun donması beklendikten sonra protein standardı stribin uç kısmına doğru jele yerleştirildi. Önceden 60 °C'lik su banyosunda ısıtılan agaroz çözeltisi stribin üzerine dökülerek stribin ve protein standardının jele iyice yapışması sağlandı. Agarozun donması beklendikten sonra jeller elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının içerisi SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. Jel başına ilk 30 dakika 10 mA daha sonra izleme boyası jelin altına ulaşınca kadar jel başına 20 mA sabit akımda işlem gerçekleştirildi. İşlem yaklaşık 6 saat sürdü.

Elektroforez işlemi tamamlanan jeller cam plakalar arasından dikkatlice çıkartıldıktan sonra jellerin boyama işlemlerine geçildi.

2.2.6. Jellerin Kolloidal Coomassie Mavisi ile Boyanması

Kullanılan Çözeltiler:

1. Kolloidal Coomassie Mavisi Çözeltisi (% 0,02 CBB G-250, % 5 alüminyum sülfat-16-hidrat, % 10 etanol, % 2 ortofosforik asit): 25 g alüminyum sülfat-16-hidrat ultra saf suda çözüldü ve üzerine 50 ml etanol eklendi. Daha sonra üzerine 0,1 g CBB G-250 eklenerek karıştırıldı. 10 ml ortofosforik asit eklendikten sonra ultra saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

2. Boya Çıkarma Çözeltisi (% 10 etanol, % 2 ortofosforik asit): 50 ml etanol ve 10 ml ortofosforik asit alınarak ultra saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Elektroforez işlemi biten jellerin boyama işlemi Dyballa ve Metzger (2009) bildirdikleri şekilde gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle kolloidal Coomassie mavisi çözeltisi hazırlandı. Elektroforez sonrası cam plakalar arasından çıkarılan jeller distile su ile 10'ar dakika olmak üzere 3 kere yıkandı. Yıkama işlemi sonunda jeller kolloidal Coomassie mavisi çözeltisine koyularak gece boyunca bekletildi. Boyanan jeller tekrar 10'ar dakika 3 kere distile su ile yıkandı. Yıkama sonrasında jeller boya çıkarma çözeltisinde 4 saat bekletildi. Jellerdeki fazla boyaların temizlenmesi sağlanarak protein spotları görünür hale getirildi. Protein spotları görünür hale gelen jeller 3 kere 10'ar dakika distile su ile yıkandıktan sonra görüntülendi ve % 10'luk asetik asit içerisinde +4 °C'de saklandı.

2.2.7. Jellerin Görüntülenmesi ve Analizi

Jeller dansitometre yardımı ile görüntülendikten sonra jellerin analizi PDQuest (Bio-Rad) programı ile gerçekleştirildi. Her bir örnek için 3 tekrar yapılan çalışmada bütün jeller programa tanıtılarak fibrosarkoma ve fibroblast hücre lizatı örnek tekrarları kendi aralarında, fibrosarkoma ve fibroblast sekretom örnek tekrarları kendi aralarında olmak üzere eşleştirilmeleri yapıldı. Eşleştirilen jel görüntülerinden hücre lizatı ve sekretom gruplarında yer alan örnek tekrarlarının analizleri kendi aralarında gerçekleştirildi. Bu analiz sekretom grubu için kalitatif, hücre lizatı grubu için ise kantitatif olarak değerlendirildi.

2.2.8. İstatistiksel Analiz

Hücre canlılık testi üç tekrarlı çalışılan her bir örnek grubuna uygulanarak sonunda elde edilen veriler yüzde olarak hesaplandı ve standart sapmaları belirlendi. Sekretom grubunun karşılaştırmalı analizi PDQuest programı vasıtasıyla kalitatif olarak gerçekleştirildi. Kalitatif değerlendirme için jel arka planı dansitesine göre 30 kat ve üstündeki farka sahip olan spotlar seçildi. Hücre lizatı grubunun karşılaştırmalı analizi PDQuest programı vasıtasıyla kantitatif olarak gerçekleştirildi ve elde edilen spotların yoğunluk değerleri % 95 güven aralığında ($p < 0,05$) student t-test ile analiz edildi (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 2002).

2.2.9. Protein Spotlarının Seçimi

Sekretom grubunun karşılaştırmalı analizi kalitatif olarak gerçekleştirilirken, fibrosarkoma sekretom örnek tekrarlarında gözlemlenip fibroblast sekretom örnek tekrarlarında gözlemlenmeyen ve yoğunlukları en yüksek olan spotlar seçildi. Fibrosarkoma sekretom örnek tekrarlarında bulunan fakat fibroblast sekretom örnek tekrarlarında bulunmayan protein spotları kesilip ependorf tüplere aktarıldı. Hücre lizatı grubunun karşılaştırmalı analizi kantitatif değerlendirme yapılarak

gerçekleştirilirken, fibrosarkoma hücre lizatı örnek tekrarlarında fibroblast hücre lizatı örnek tekrarlarına göre istatistiksel olarak ekspresyonu artan veya azalan protein spotları kesilip ependorf tüplere aktarıldı. Protein spotlarının kesimi ve ependorf tüplere aktarımı keratin kontaminasyonunu en aza indirmek amacıyla steril güvenlik kabini içerisinde steril ekipmanlar ile gerçekleştirildi. Ependorf tüplere aktarılan protein spotları triptik parçalanma ve sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile protein identifikasyonu işlemlerine kadar - 80 °C’de saklandı.

2.2.10. Protein Spotlarının Triptik Parçalanması ve LC-MS/MS ile Protein İdentifikasyonu

Seçilen protein spotlarının triptik parçalanması ve LC-MS/MS ile protein identifikasyonu TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü’nde gerçekleştirildi.

2.2.10.1. Protein Spotlarının Triptik Parçalanması

Kullanılan Çözeltiler:

1. 50 mM Amonyum Bikarbonat Çözeltisi: 40 mg amonyum bikarbonat ultra saf suda (LC-MS grade) çözüldü ve hacim 10 ml’ye tamamlandı.
2. 100 mM Amonyum Bikarbonat Çözeltisi: 80 mg amonyum bikarbonat ultra saf suda (LC-MS grade) çözüldü ve hacim 10 ml’ye tamamlandı.
3. Temizleme Çözeltisi: Asetonitril ve 100mM amonyum bikarbonat çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.
4. DTT Çözeltisi (10 mM DTT, 50 mM Amonyum Bikarbonat): 15,4 mg DTT 10 ml 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde çözüldü.

5. İyodoasetamit Çözeltisi (55 mM İyodoasetamit, 50 mM Amonyum Bikarbonat): 102 mg İyodoasetamit 10 ml 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde çözüldü.

6. Tripsin Çözeltisi: 50 mM Amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde 20 ng/μl tripsin olacak şekilde hazırlandı.

7. Ekstraksiyon Çözeltisi (% 1 Formik Asit, % 2 Asetonitril): 1 ml formik asit ve 2 ml asetonitril alınarak ultra saf su (LC-MS grade) ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Protein spotlarının triptik parçalanması Wilm ve ark. (1996) bildirdikleri şekilde gerçekleştirildi. Analizi gerçekleştirilecek olan jel parçaları cam yüzey üzerinde bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrıldı. Parçalanmış jeller ependorf tüplere aktararak 200-500 μl temizleme çözeltisi ile karıştırıcı kullanılarak 15-30 dakika boya temizleme işlemine tabi tutuldu. Temizleme işlemine boya tamamen temizlenene kadar devam edildi. Temizleme işlemi sonunda temizleme çözeltisi uzaklaştırılarak jel parçalarına asetonitril ile çektirme işlemi uygulandı. Asetonitril ilavesi ile jel parçaları birbirlerine yapışarak beyaz renk aldı. Fazla asetonitril uzaklaştırılarak jeller 50 °C'de kurutuldu. Kurutulan jellerin üzerine 100 μl DTT çözeltisi ilave edilerek 80 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından üzerlerine 100 μl İyodoasetamit çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi. DTT ve İyodoasetamit çözeltileri uzaklaştırılarak jel parçaları iki defa 500 μl 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi ile yıkandı. Yıkama çözeltisi uzaklaştırılarak jel parçalarına 200 μl asetonitril ilave edilerek çektirme işlemi uygulandı. Daha sonra asetonitril uzaklaştırılarak ve 200 μl 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi eklenerek gevşetme işlemi uygulandı. Amonyum bikarbonat çözeltisi uzaklaştırıldı ve çektirme ve gevşetme aşaması tekrarlandı. Son olarak jel parçalarına 200 μl asetonitril ile çektirme işlemi uygulandı ve asetonitril uzaklaştırılarak jel parçaları 50 °C'de kısa bir süre kurutuldu. Jel parçalarının üzerine yeterli miktarda tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C'de 16-18 saat inkübe edilerek tripsinizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Tripsinizasyon işleminin ardından ependorf tüpler santrijüf edilerek üzerlerine ekstraksiyon çözeltisi eklendi. Daha sonra örnekler çalkalayıcıda 30 dakika çalkalandı. Tripsinizasyon işlemi biten örneklerin LC-MS/MS ile protein identifikasyonu işlemlerine geçildi.

2.2.10.2. LC-MS/MS ile Protein İdentifikasyonu

Kullanılan Çözeltiler:

1. Mobil Faz A (Ultra saf su içerisinde % 0,1 Formik Asit): 1 ml formik asit alınarak ultra saf su (LC-MS grade) ile hacim 1000 ml'ye tamamlandı.
2. Mobil Faz B (Asetonitril içerisinde % 0,1 Formik Asit): 1 ml formik asit alınarak asetonitril ile hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

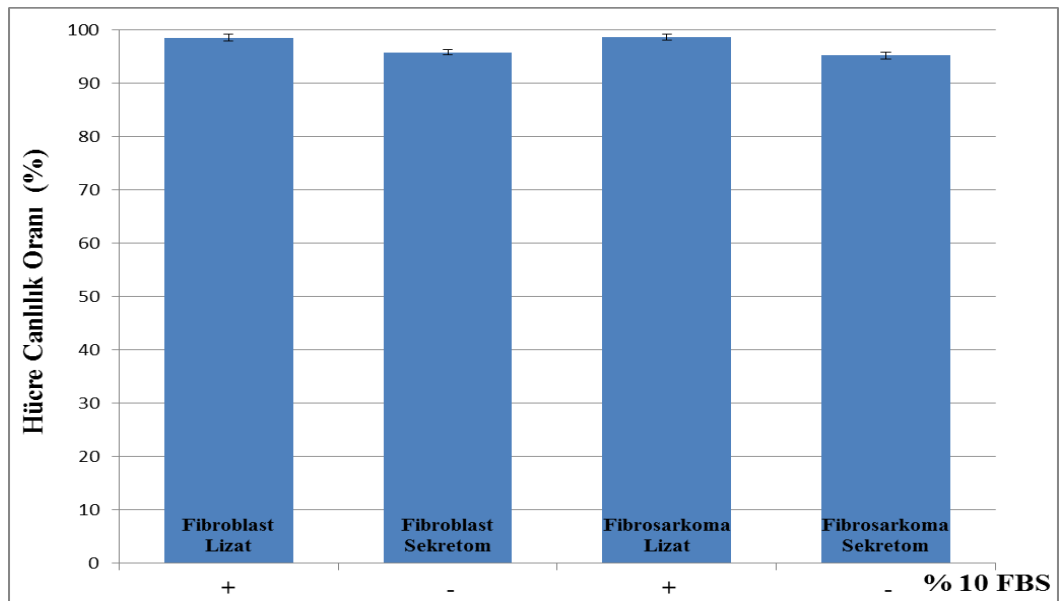
Triptik peptitleri içeren 1 µl örnek LC-ESI-qTOF sistemine (nanoACQUITY ultra pressure liquid chromatography (UPLC) and SYNAPT high definition mass spectrometer with nanolockspray ion source, Waters) yüklendi. Kolonlar % 97 mobil faz A ve % 3 mobil faz B ile dengelendi. Kolonların sıcaklığı 35 °C'ye ayarlandı. Peptitler ilk önce 5 µl/dakika akış hızında 5 dakika nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap kolonunda tutulduktan sonra 300 nl/dakika akış hızında nanoACQUITY UPLC BEH C18 analitik kolonunda % 5'ten başlayan ve % 35'lik asetonitril konsantrasyonu ile sonlandırılan doğrusal gradient tekniği kullanılarak ayrıştırıldı. CID (Collision Induced Dissociation) tekniği; pozitif iyon V modunda 1,5 saniyelik sürelerde dönüşümlü olarak MS ile 6 V düşük ve 15-40 V yüksek enerjili çarpışmaların oluşturulduğu MS/MS fonksiyonu gerçekleştirildi. Kütle düzeltmesi her 45 saniyede bir glu-fibrinopeptid (500 pmol/µl) ile yapıldı. Analizde 50-1600 m/z aralığındaki peptid sinyalleri değerlendirmeye alındı.

Peptid kütle ölçümleri düşük enerjili çarpışmalarda, peptid dizi verilerinin toplanması yüksek enerjili çarpışmalarda gerçekleştirildi. Tandem kütle spektrumu, ProteinLynx Global Server v2.4 (PLGS) (Waters Corp., Milford, MA) ile analiz edildi. Protein dizi veritabanı olarak Uniprot kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Hücre Canlılık Testi Sonuçları

Fibroblast ve fibrosarkoma hücre lizatı örneklerinde hücreler lize edilmeden önce hücrelere canlılık testi uygulandı ve hücre canlılık oranları sırasıyla % 98,5 ve % 98,6 olarak bulundu. Böylece hücre lizatı örneklerinin oluşturulma aşamasında lize edilen hücrelerin lize edilmeden önceki hücre canlılık oranları tespit edildi. Sekretom örneklerinde ise hücrelere 24 saat FBS içermeyen besiyerinde muhafaza edildikten sonra hücre canlılık testi uygulandı ve hücre canlılık oranları fibroblast örnekleri için % 95,7 fibrosarkoma örnekleri için % 94,7 bulundu. Böylece FBS içermeyen besiyerine proteinlerini salgılayan hücrelerin canlılık oranları tespit edildi. Hücre lizatı örneklerinin hücre canlılık oranları birbirleri arasında benzerlik göstermektedir. Sekretom örneklerinde hücre canlılık oranları birbirleriyle benzerlik göstermekle birlikte hücre lizatı örneklerine göre daha düşük bulundu. Hücre lizatı ve sekretom örneklerinin oluşturulma aşamasında gerçekleştirilen hücre canlılık testleri sonucunda elde edilen % hücre canlılık oranları ve standart sapmaları Şekil 3.1.'de yer almaktadır.



Şekil 3.1. Hücre lizatı ve sekretom örneklerinin hücre canlılık oranları.

3.2. Hücre Lizatı ve Sekretom Örneklerinin 2D-PAGE Sonuçları

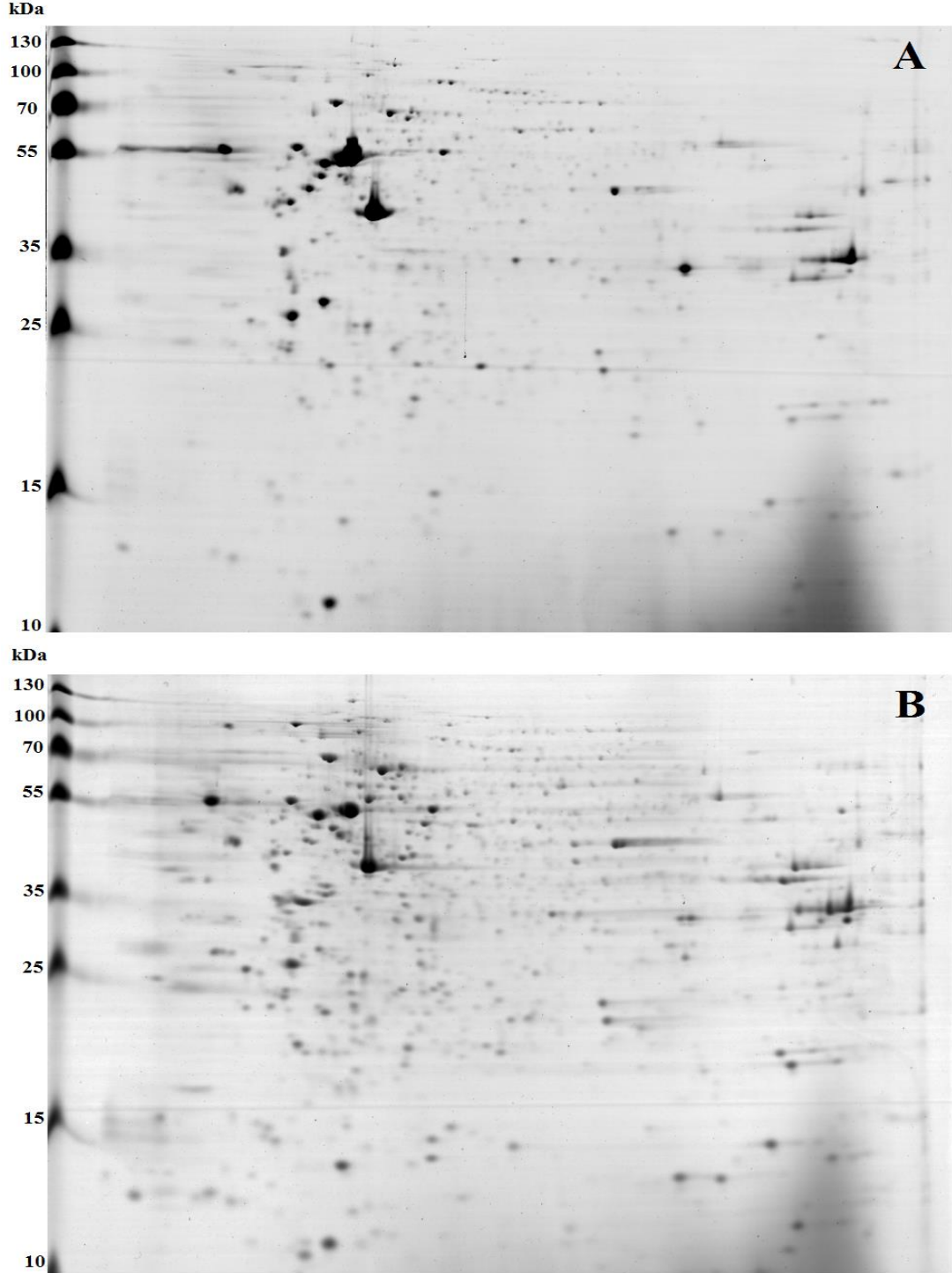
Fibrosarkoma ve fibroblast hücre hatlarından oluşturulan hem hücre lizatı hem de sekretom örneklerinde 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen 2D-PAGE protein ayırma yöntemini takiben elde edilen jel görüntüleri PDQuest programı ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

3.2.1. Hücre Lizatı Örneklerinin 2D-PAGE Sonuçları

Fibrosarkoma ve fibroblast hücre lizatı örnek tekrarları PDQuest programı ile eşleştirilerek gruplandırıldı. Böylece fibrosarkoma ve fibroblast örnek tekrarlarını içeren hücre lizatı grubu oluşturuldu. Fibrosarkoma hücre lizatı örnek tekrarlarının iki boyutlu jel elektroforez görüntüleri Ek-1’de, fibroblast hücre lizatı örnek tekrarlarının iki boyutlu jel elektroforez görüntüleri Ek-2’de yer almaktadır. Hücre lizatı grubunun iki boyutlu jel elektroforezi sonucunda PDQuest programı ile yapılan analizlerinde fibrosarkoma hücre lizatı örnek tekrarlarında sırasıyla toplam spot sayıları 489, 448 ve 430, toplam dansiteleri 4610, 4523 ve 4367, master jele göre eşleşen spot sayıları 489, 419 ve 386, master jele göre eşleşmeyen spot sayıları 0, 29 ve 44 ve master jele göre eşleşme yüzdeleri 100, 93 ve 89 olarak bulundu. Fibroblast hücre lizatı örnek tekrarlarında sırasıyla toplam spot sayıları 210, 212 ve 243, toplam dansiteleri 4548, 4416 ve 4477, master jele göre eşleşen spot sayıları 163, 173 ve 178, master jele göre eşleşmeyen spot sayıları 47, 39 ve 65, master jele göre eşleşme yüzdeleri 77, 81 ve 73 olarak bulundu.

Fibrosarkoma ve fibroblast hücre lizatı örnek tekrarlarının iki boyutlu jel elektroforezi işleminden önce protein miktar tayinlerinin yapılması ve eşit miktarda protein içeren çözeltilerine iki boyutlu jel elektroforezi işlemi uygulanması sonucunda grupların tekrarlarının toplam dansiteleri beklendiği gibi birbirlerine yakın bulundu. Hücre lizatı grubu örnek tekrarlarının toplam spot sayıları aynı örnek tekrarlarında benzerlik göstermekle birlikte fibrosarkoma hücre lizatı örnek tekrarlarında fibroblast hücre lizatı örnek tekrarlarına göre fazla bulundu. 2D-PAGE

ve boyama işlemi biten fibroblast ve fibrosarkoma hücre lizatı örneklerine ait jel görüntüleri Şekil 3.2.'de yer almaktadır.



Şekil 3.2. Fibroblast hücre lizatı (A) ve fibrosarkoma hücre lizatı (B) örneklerinin 2D-PAGE analizi sonrası koloidal Coomassie mavisi ile boyanması sonucu elde edilen protein spotlarına ait jel görüntüleri.

Hücre lizati örnek tekrarlarının iki boyutlu jel elektroforezleri sonucunda master jel olarak en fazla spot sayısını içeren 1. tekrar fibrosarkoma hücre lizati örneği seçildi. Master jele göre spotların eşleşme yüzdeleri fibrosarkoma hücre lizati örnek tekrarlarında fibroblast hücre lizati örnek tekrarlarına göre yüksek bulundu.

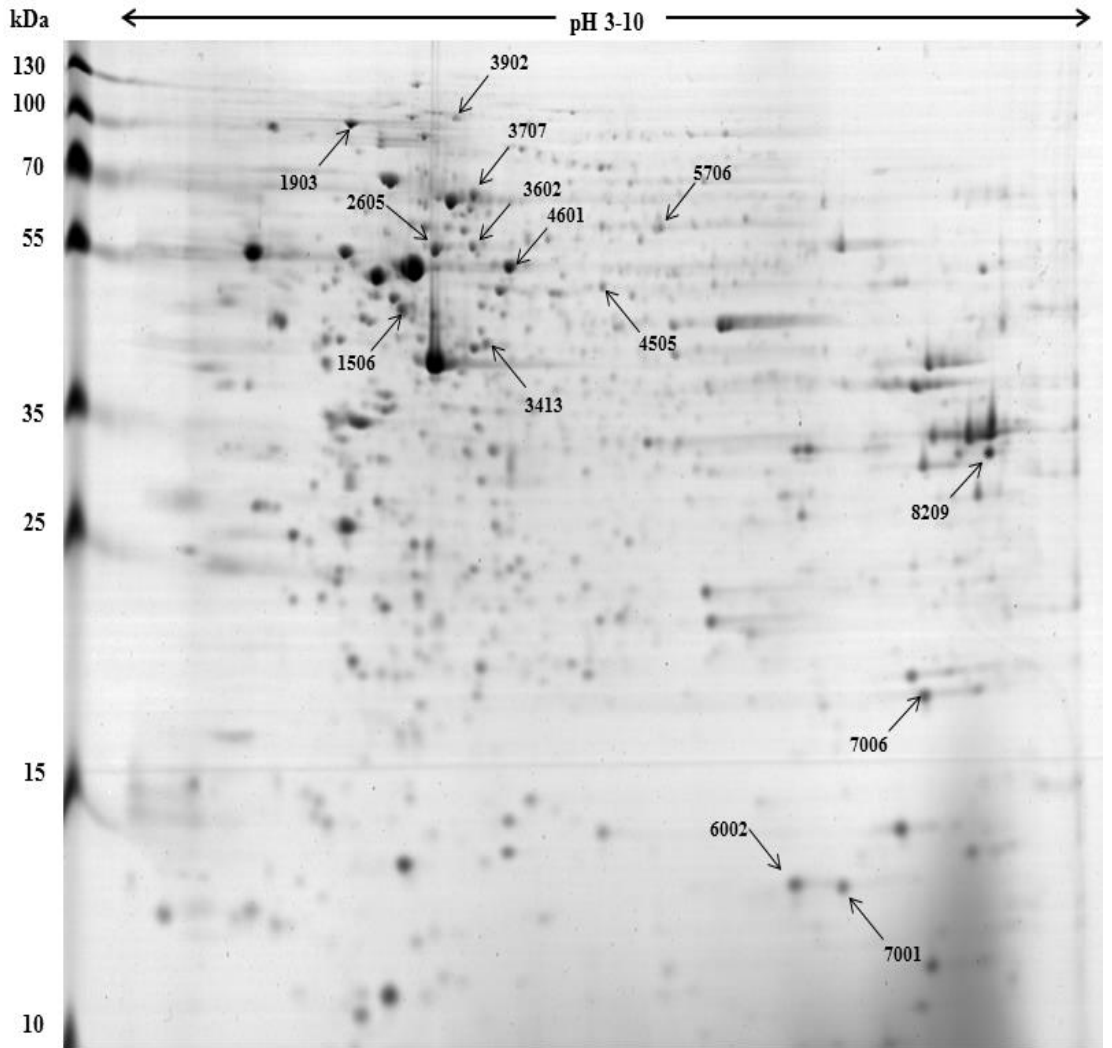
Hücre lizati grubu örnek tekrarlarının toplam spot sayıları, toplam dansiteleri, master jele göre eşleşen spot sayıları, master jele göre eşleşmeyen spot sayıları ve master jele göre eşleşme yüzdeleri Çizelge 3.1.'de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Hücre lizati grubu tekrarlarının 2D-PAGE ve PDQuest analiz sonuçları.

Örnek		Toplam Spot Sayısı	Toplam Dansite	Master Jele Göre Eşleşen Spot Sayısı	Master Jele Göre Eşleşmeyen Spot Sayısı	Master Jele Göre Eşleşme Yüzdesi
Fibrosarkoma Hücre Lizati	1. tekrar (master jel)	489	4610	489	0	100
	2. tekrar	448	4523	419	29	93
	3. tekrar	430	4367	386	44	89
Fibroblast Hücre Lizati	1. tekrar	210	4548	163	47	77
	2. tekrar	212	4416	173	39	81
	3. tekrar	243	4477	178	65	73

Fibrosarkoma hücre lizati örnek tekrarları ile fibroblast hücre lizati örnek tekrarları karşılaştırmalı olarak kantitatif değerlendirildi. Kantitatif değerlendirilme yapılırken fibrosarkoma hücre lizati örnek tekrarlarında fibroblast hücre lizati örnek tekrarlarına göre ekspresyonu artan veya azalan protein spotları değerlendirilmeye alındı. Önemli düzeyde değişimin ortaya konması amacıyla istatistiksel analiz olarak t-testi kullanıldı ve bunun sonucunda 14 spot için önemli fark belirlendi ($p<0,05$).

İstatistiksel olarak anlamlı çıkan ve identifikasyonu yapılan protein spotlarının görüntüleri ve dansite grafikleri Ek-3'de yer almaktadır. Belirlenen 14 protein spotunun 13'ünün ekspresyonunun fibrosarkomada arttığı ve 1'inin ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. Ekspresyonu artan 13 protein spotunun sample spot protein (SSP) numaraları sırasıyla 1506, 1903, 2605, 3413, 3602, 3707, 4505, 4601, 5706, 6002, 7001, 7006 ve 8209 olarak program aracılığıyla belirlendi. Ekspresyonu azalan tek spotun SSP numarası ise 3902 olarak belirlendi. Analiz edilen protein spotlarının jel üzerindeki görüntüleri Şekil 3.3.'de yer almaktadır.

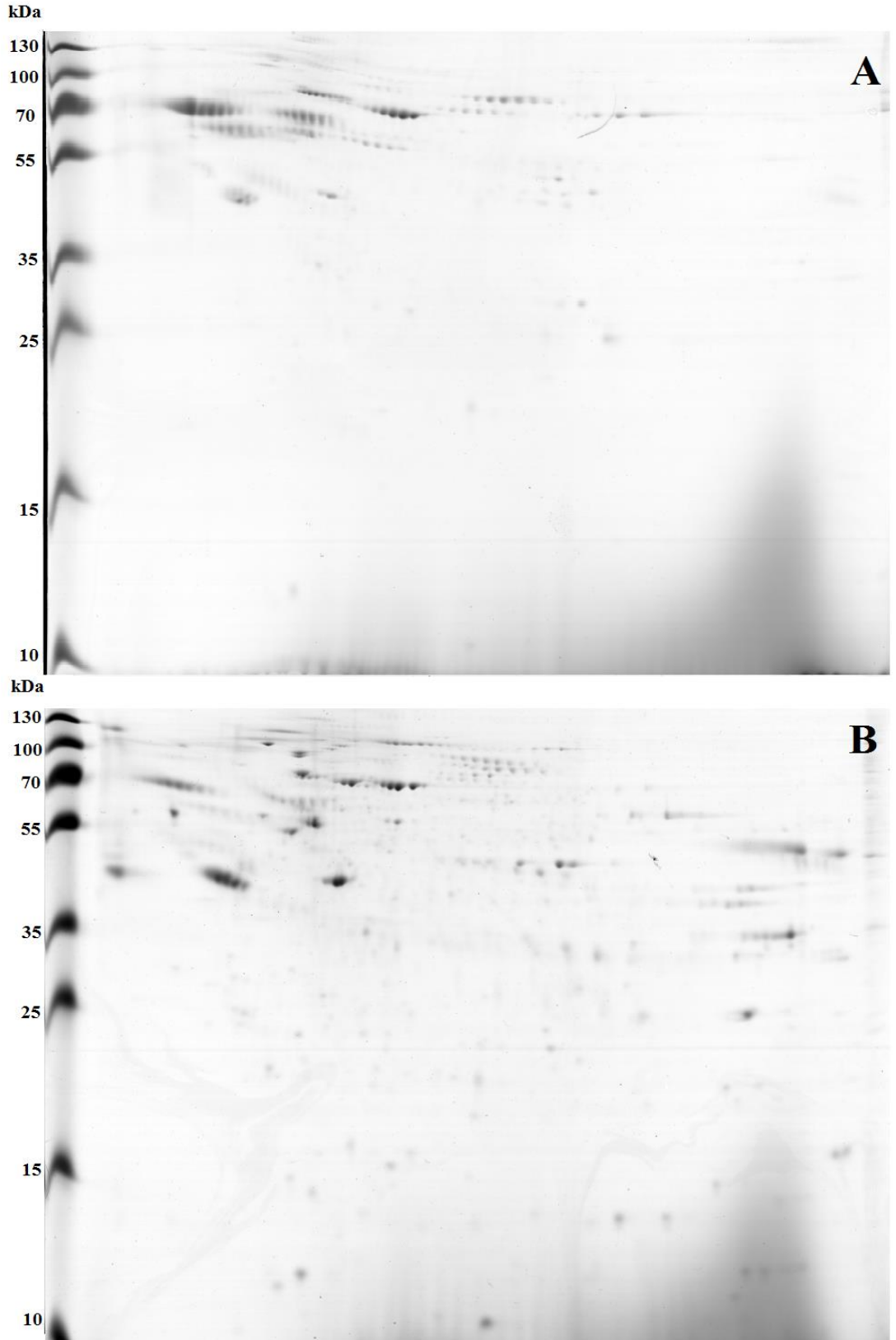


Şekil 3.3. Hücre lizatı grubunda identifiye edilen protein spotlarının jel (fibrosarkoma hücre lizatı örneğine ait) üzerindeki görüntüleri.

3.2.2. Sekretom Örneklerinin 2D-PAGE Sonuçları

Fibrosarkoma ve fibroblast sekretom örnek tekrarları PDQuest programı ile eşleştirilerek gruplandırıldı. Böylece fibrosarkoma ve fibroblast örnek tekrarlarını içeren sekretom grubu oluşturuldu. Fibrosarkoma sekretom örnek tekrarlarının iki boyutlu jel elektroforez görüntüleri Ek-4’de, fibroblast sekretom örnek tekrarlarının iki boyutlu jel elektroforez görüntüleri Ek-5’de yer almaktadır. Sekretom grubunun iki boyutlu jel elektroforezi sonucunda PDQuest programı ile yapılan analizlerinde fibrosarkoma sekretom örnek tekrarlarında sırasıyla toplam spot sayıları 123, 113 ve 119, toplam dansiteleri 1298, 1278 ve 1293, master jele göre eşleşen spot sayıları 123, 107 ve 115, master jele göre eşleşmeyen spot sayıları 0, 6 ve 4 ve master jele göre eşleşme yüzdeleri 100, 94 ve 96 olarak bulundu. Fibroblast sekretom örnek tekrarlarında sırasıyla toplam spot sayıları 92, 89 ve 103, toplam dansiteleri 1253, 1249 ve 1278, master jele göre eşleşen spot sayıları 35, 35 ve 38, master jele göre eşleşmeyen spot sayıları 57, 54 ve 65, master jele göre eşleşme yüzdeleri 38, 39 ve 36 olarak bulundu.

Fibrosarkoma ve fibroblast sekretom örnek tekrarlarının iki boyutlu jel elektroforezi işleminden önce protein miktar tayinlerinin yapılması ve eşit miktarda protein içeren çözeltilerine iki boyutlu jel elektroforezi işlemi uygulanması sonucunda örnek tekrarlarının toplam dansiteleri beklendiği gibi birbirlerine yakın bulundu. Sekretom örnek tekrarlarının toplam spot sayıları aynı grubun tekrarlarında benzerlik göstermekle birlikte fibrosarkoma sekretom örnek tekrarlarında fibroblast sekretom örnek tekrarlarına göre fazla bulundu. 2D-PAGE ve boyama işlemi biten fibroblast sekretom ve fibrosarkoma sekretom örneklerinin jel görüntüleri Şekil 3.4.’de yer almaktadır.



Şekil 3.4. Fibroblast sekretom (A) ve fibrosarkoma sekretom (B) örneklerinin 2D-PAGE analizi sonrası koloidal Coomassie mavisi ile boyanması sonucu elde edilen protein spotlarına ait jel görüntüleri.

Sekretom grubu tekrarlarının iki boyutlu jel elektroforezleri sonucunda master jel olarak en fazla spot sayısını içeren 1. tekrar fibrosarkoma sekretom örneği seçildi. Master jele göre spotların eşleşme yüzdeleri master jelin kendi kendine eşleşme oranı göz ardı edildiğinde fibrosarkoma sekretom örnek tekrarlarında fibroblast sekretom örnek tekrarlarına göre yüksek bulundu.

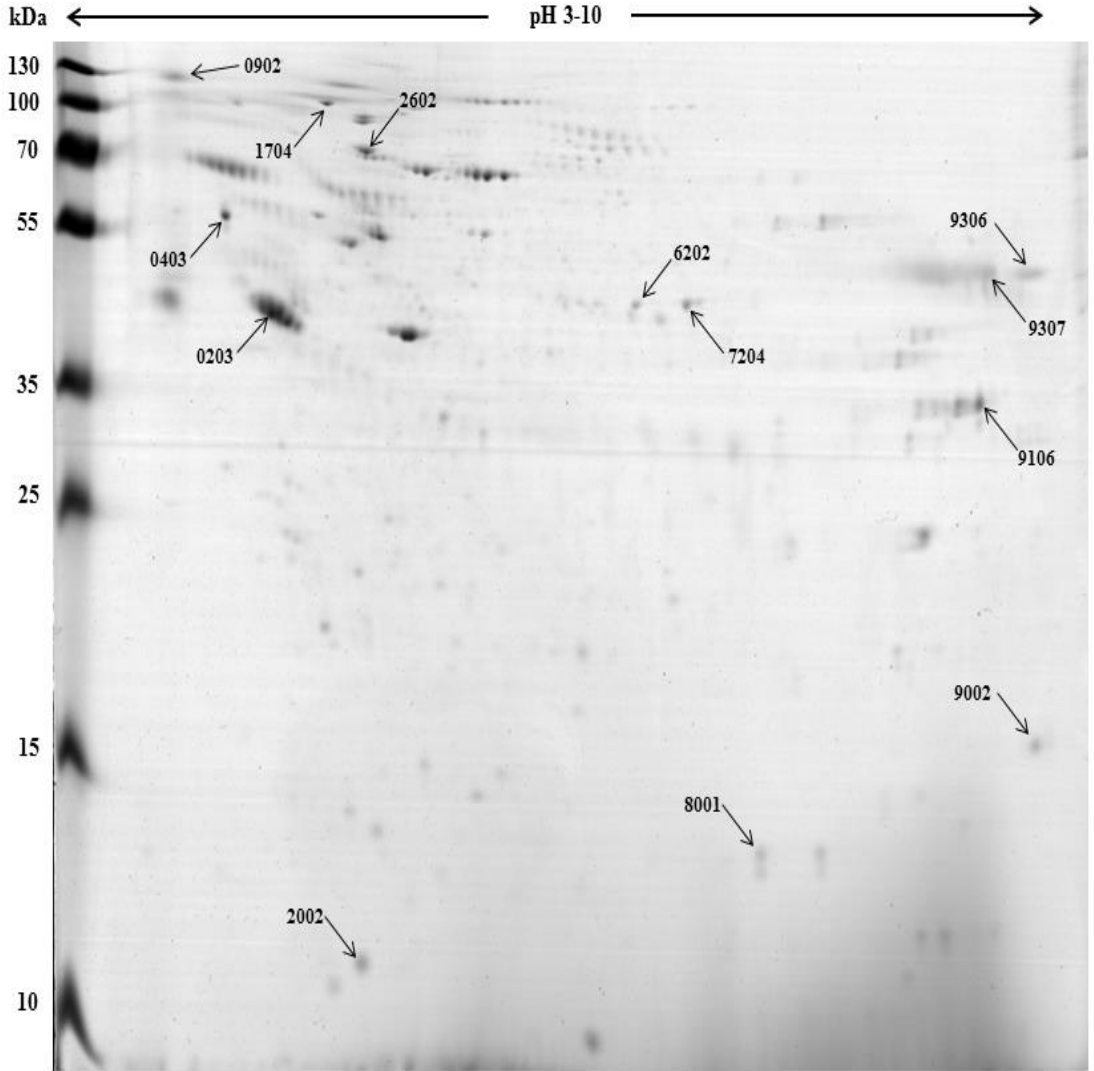
Sekretom grubu tekrarlarının toplam spot sayıları, toplam dansiteleri, master jele göre eşleşen spot sayıları, master jele göre eşleşmeyen spot sayıları ve master jele göre eşleşme yüzdeleri Çizelge 3.2.'de yer almaktadır.

Çizelge 3.2. Sekretom grubu tekrarlarının 2D-PAGE ve PDQuest analiz sonuçları.

Örnek		Toplam Spot Sayısı	Toplam Dansite	Master Jele Göre Eşleşen Spot Sayısı	Master Jele Göre Eşleşmeyen Spot Sayısı	Master Jele Göre Eşleşme Yüzdesi
Fibrosarkoma Sekretom	1. tekrar (master jel)	123	1298	123	0	100
	2. tekrar	113	1278	107	6	94
	3. tekrar	119	1293	115	4	96
Fibroblast Sekretom	1. tekrar	92	1253	35	57	38
	2. tekrar	89	1249	35	54	39
	3. tekrar	103	1278	38	65	36

Fibrosarkoma sekretom örnek tekrarları ile fibroblast sekretom örnek tekrarları karşılaştırmalı olarak kalitatif değerlendirildi. Kalitatif değerlendirme için jel arka planı dansitesine göre 30 kat ve üstündeki farka sahip olan spotlar seçildi. Kalitatif değerlendirme fibrosarkoma sekretom örnek tekrarlarında yer alan fakat fibroblast sekretom örnek tekrarlarında yer almayan spotlar arasında gerçekleştirildi.

Değerlendirme sonucunda 13 adet spot belirlendi. Protein spotlarının görüntüleri ve dansite grafikleri Ek-6'da yer almaktadır. Değerlendirme sonucunda belirlenen spot SSP numaraları sırasıyla 0203, 0403, 0902, 1704, 2002, 2602, 6202, 7204, 8001, 9002, 9106, 9306, 9307 olarak program aracılığıyla verilmiştir. Analiz edilen spotların jel üzerindeki görüntüleri Şekil 3.5.'de yer almaktadır.



Şekil 3.5. Sekretom grubunda identifiye edilen protein spotlarının jel (fibrosarkoma sekretom örneğine ait) üzerindeki görüntüleri.

3.3. Hücre Lizatı ve Sekretom Örneklerinin LC-MS/MS Sonuçları

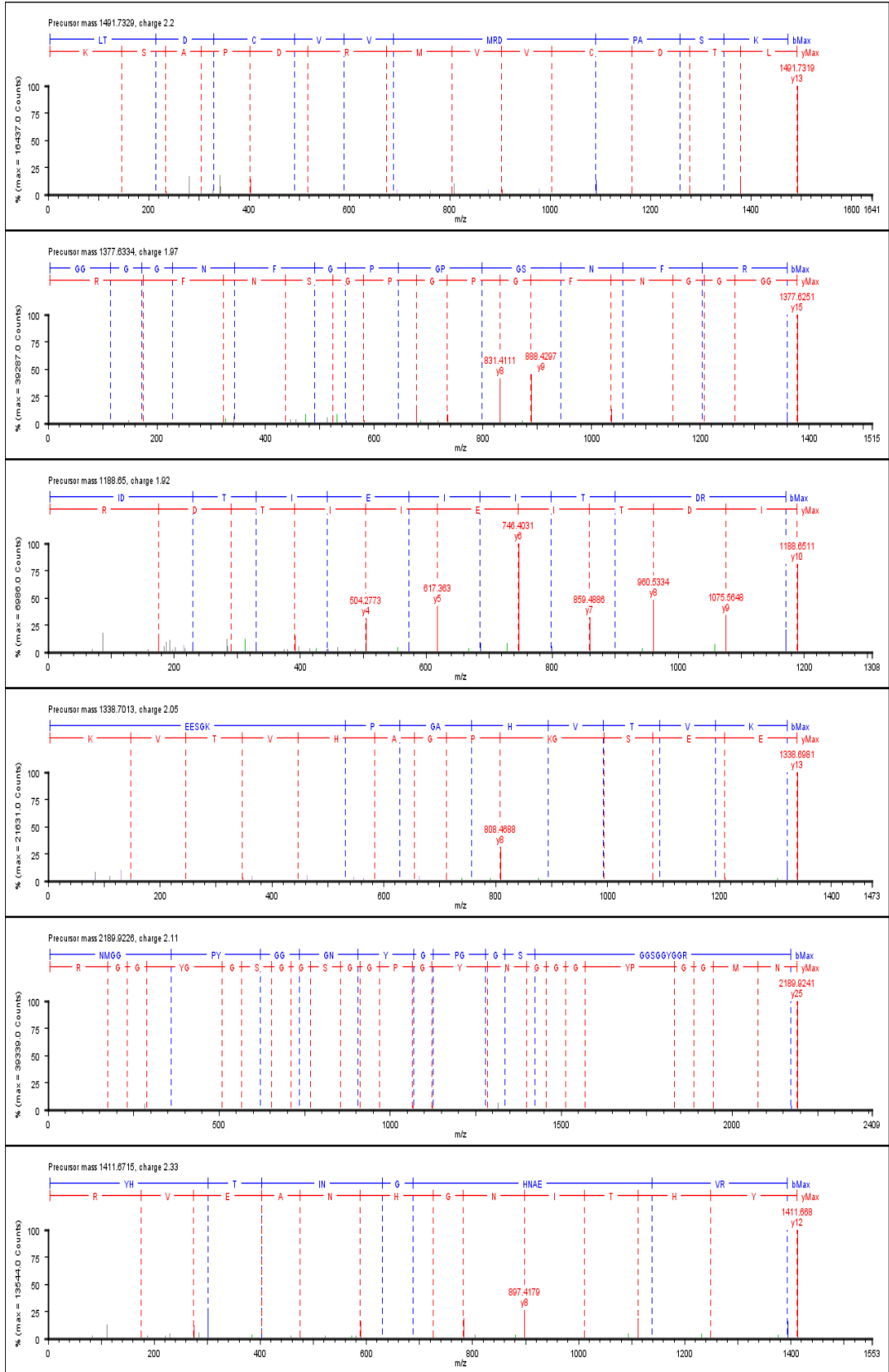
Hücre lizatı ve sekretom örneklerinde seçilen protein spotlarının LC-MS/MS ile protein identifikasyonları sonucunda PLGS skorları en yüksek olan proteinler değerlendirmeye alındı.

3.3.1. Hücre Lizatı Örneklerinin LC-MS/MS Sonuçları

Hücre lizatı örneklerinde seçilen spotların LC-MS/MS ile protein identifikasyonları sonucunda PLGS skorları en yüksek olan proteinler değerlendirmeye alındı. Fibrosarkoma hücre lizatı örnek tekrarlarında fibroblast hücre lizatı örnek tekrarlarına göre ekspresyonu azalan tek spot olan 3902 numaralı spot MVP (Major Vault Protein) olarak belirlendi. Fibrosarkoma hücre lizatı örnek tekrarlarında fibroblast hücre lizatı örnek tekrarlarına göre ekspresyonu artan diğer 13 spot; 1506 numaralı spot protein disülfid izomeraz A6, 1903 numaralı spot endoplazmin, 2605 numaralı spot HSP-60 (Heat Shock Protein 60), 3413 numaralı spot protein NDRG1, 3602 numaralı spot TCP-1- ϵ (T Complex Protein 1 subunit epsilon), 3707 numaralı spot GRP-75 (Mortalin), 4505 numaralı spot TCP-1- β (T Complex Protein 1 subunit beta), 4601 numaralı spot protein disülfid izomeraz A3, 5706 numaralı spot STI1 (Stress Induced Phosphoprotein 1), 6002 numaralı spot peptidil prolil cis-trans izomeraz A, 7001 numaralı spot peptidil prolil cis-trans izomeraz A, 7006 numaralı spot transgeline-2 ve 8209 numaralı spot heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1 olarak belirlendi. Seçilen spotların protein identifikasyon sonuçları, PLGS skorları ve protein fonksiyonları Çizelge 3.3.'de yer almaktadır. 8209 numaralı spota ait temsili MS/MS spektrumları Şekil 3.6.'da görülmektedir.

Çizelge 3.3. Hücre lizatı grubunda seçilen spotların LC-MS/MS sonuçları.

Spot Numarası	Protein Adı	Molekül Ağırlığı (Da)	İzoelektrik Noktası (pH)	PLGS Skoru	Protein Fonksiyonu
1506	Protein Disülfit İzomeraz A6	53867	5,0	27342	İzomeraz
1903	Endoplazmin	92411	4,6	15993	Şaperon
2605	HSP-60 (Heat Shock Protein 60)	61016	5,6	30952	Şaperon
3413	Protein NDRG1	42807	5,4	5928	Stres Yanıt Proteini
3602	TCP-1-ε (T complex protein 1 subunit epsilon)	59632	5,3	14835	Şaperon
3707	GRP-75 (Mortalin)	73634	5,8	14715	Şaperon
3902	MVP (Major Vault Protein)	99266	5,2	5029	Ribonükleoprotein
4505	TCP-1- β (T complex protein 1 subunit beta)	57452	6,0	18799	Şaperon
4601	Protein Disülfit İzomeraz A3	56746	5,9	23115	İzomeraz
5706	STI1 (Stress induced phosphoprotein 1)	62599	6,4	5942	Ko-Şaperon
6002	Peptidil Prolil cis-trans İzomeraz A	18000	7,9	10210	İzomeraz
7001	Peptidil Prolil cis-trans İzomeraz A	18000	7,9	8605	İzomeraz
7006	Transgelin-2	22377	8,4	27775	Tümör Baskılayıcı Protein
8209	Heterojen Nükleer Ribonükleoprotein A2/B1	37406	9,2	14281	Ribonükleoprotein



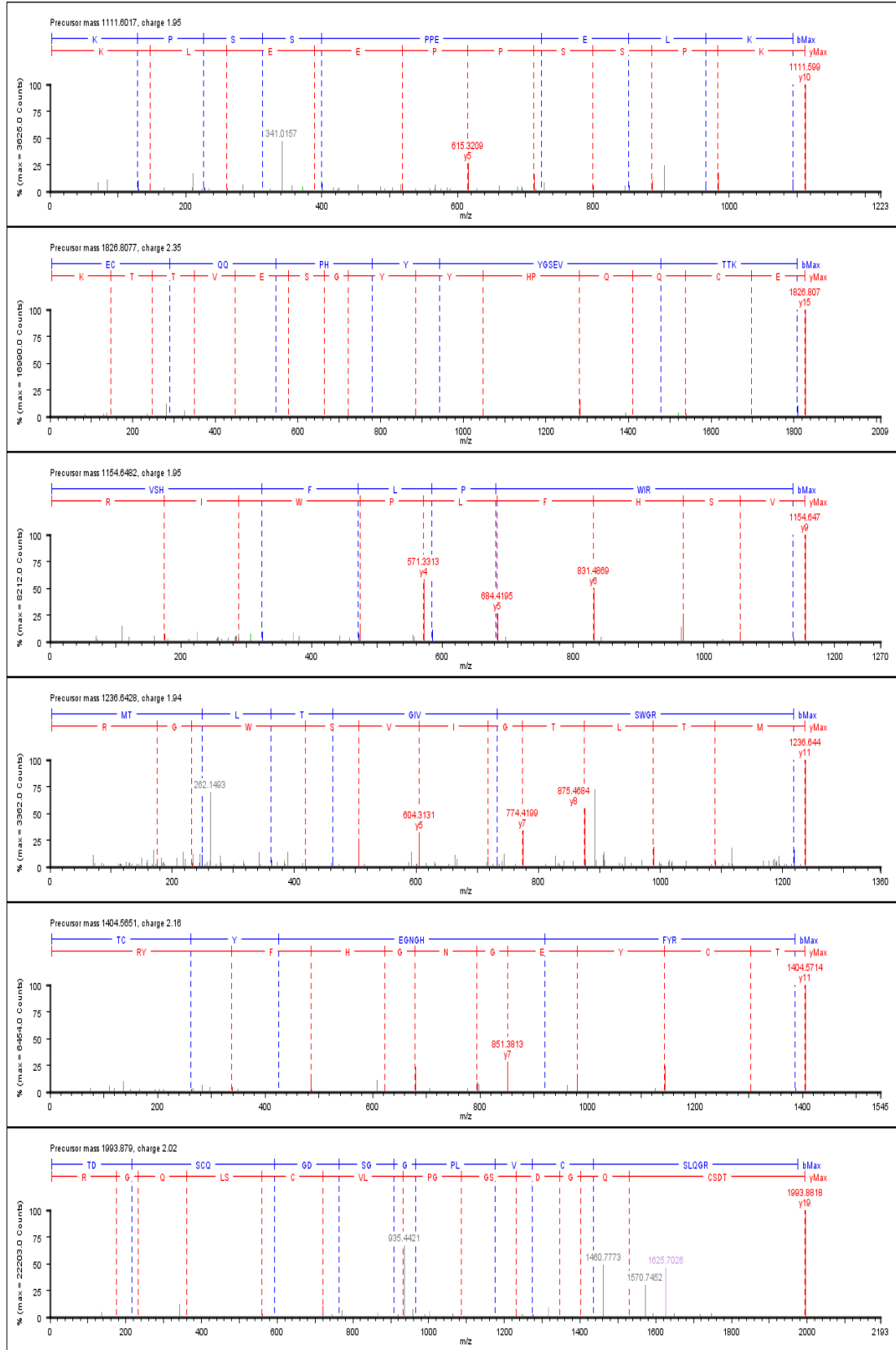
Şekil 3.6. 8209 numaralı spota ait temsili MS/MS spektrumları.

3.3.2. Sekretom Örneklerinin LC-MS/MS Sonuçları

Sekretom örneklerinde seçilen spotların LC-MS/MS ile protein identifikasyonları sonucunda PLGS skorları en yüksek olan proteinler değerlendirmeye alındı. Seçilen 13 adet spottan 0203 numaralı spot SPARC, 0403 numaralı spot kalretikulin, 0902 numaralı spot amiloid β A4 (APP751 İzofomu), 1704 numaralı spot endoplazmin, 2002 numaralı spot galektin-1, 2602 numaralı spot GRP-78, 6202 numaralı spot alfa-enolaz, 7204 numaralı spot alfa-enolaz, 8001 numaralı spot peptidil prolil cis-trans izomeraz A, 9002 numaralı spot peptidil prolil cis-trans izomeraz B, 9106 numaralı spot gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz, 9306 numaralı spot EF-1 (Putative elongation factor 1 alpha like 3) ve 9307 numaralı spot ürokinaz tip plazminojen aktivatörü olarak belirlendi. Seçilen spotların protein identifikasyon sonuçları, PLGS skorları ve protein fonksiyonları Çizelge 3.4.'de yer almaktadır. 9307 numaralı spota ait temsili MS/MS spektrumları Şekil 3.7.'de görülmektedir.

Çizelge 3.4. Sekretom grubunda seçilen spotların LC-MS/MS sonuçları.

Spot Numarası	Protein Adı	Molekül Ağırlığı (Da)	İzoelektrik Noktası (pH)	PLGS Skoru	Protein Fonksiyonu
0203	SPARC	34609	4,5	4886	Ekstrasellüler Matriks Proteini
0403	Kalretikulin	48111	4,1	5534	Şaperon
0902	Amiloid β A4 (APP751 İzofomu)	84764	4,5	1520	Serin Proteaz İnhibitörü
1704	GRP-94 (Endoplazmin)	92411	4,6	7611	Şaperon
2002	Galektin-1	14706	5,1	2855	Galaktozid Bağlayıcı Protein
2602	GRP-78	72288	4,9	6867	Şaperon/Stres Proteini
6202	Alfa-Enolaz	47139	7,2	3430	Liyaz
7204	Alfa-Enolaz	47139	7,2	3083	Liyaz
8001	Peptidil Prolil cis-trans İzomeraz A	18000	7,9	1652	İzomeraz
9002	Peptidil Prolil cis-trans İzomeraz B	23727	9,9	7594	İzomeraz
9106	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz	36030	8,7	13439	Oksidoredüktaz
9306	EF-1 (Putative elongation factor 1 alpha like 3)	50153	9,4	3961	Uzama Faktörü
9307	Ürokinaz Tip Plazminojen Aktivatörü	48475	8,3	5618	Serin Proteaz



Şekil 3.7. 9307 numaralı spota ait temsili MS/MS spektrumları.

4. TARTIŞMA

Kanser hücrelerinin yapıları ve fonksiyonları normal hücrelere göre oldukça farklıdır. Bu nedenle kanser hücrelerinin protein ekspresyonu kanser hücrelerinin karşılığı olan normal hücrelerin protein ekspresyonu ile oldukça farklılık göstermektedir (Deng ve ark., 2006). Protein ekspresyonunda meydana gelen bu değişimler tümörögenезle ilişkilidir. Bununla birlikte proteomik çalışmalarda en önemli hedef bu ekspresyon farklılıkları sonucu ortaya konan ve kanserin diagnozunda büyük öneme sahip tümör belirteçlerinin keşfidir (Zang ve ark., 2008).

Günümüze kadar İki boyutlu jel elektroforezi ile bağlantılı kütle spektrometresini içeren karşılaştırmalı proteomik analizler karaciğer, akciğer, prostat ve ovaryum kanseri gibi birçok kanser türünde uygulanmıştır (Guo ve ark., 2007). Proteinlerin organizmadaki rollerinin önemi göz önünde bulundurulduğunda proteomik analizler, kanserin moleküler mekanizmasının anlaşılmasında ve tümör belirteçlerinin keşfinde etkili bir yöntemdir (Rubporn ve ark., 2009).

Kanser hücreleri normal hücrelere göre daha fazla stres içeren ortamlarda canlılıklarını sürdürürler. Bu stresi yaratan durumlar kanser hücrelerinin sayılarındaki fazlalık ile birlikte besin miktarındaki yetersizliktir. Buna ilaveten DNA hasarı ve ultraviyole radyasyon gibi stres oluşturuıcı faktörler kanser hücrelerinde stres oluşumunu tetikler (Ando ve ark., 2013).

Isı şoku proteinleri (HSP) moleküler şaperonlar olup, protein katlanması, taşınması ve strese karşı hücrenin canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan protein yapılarının oluşturulmasında görev alırlar (Rubporn ve ark., 2009). Katlanmamış polipeptidlere bağlanan ısı şoku proteinleri protein yapımına yardımcı olmak amacıyla iki yolda görev alırlar. Birincisi nonprodüktif protein-protein etkileşimlerini bloke ederler, ikincisi proteinlerin normal olarak katlanmalarına aracılık ederler (Johansson ve ark., 2006). Isı şoku proteinleri protein katlanması, protein yapılarının düzenlenmesi ve istenmeyen protein kümelenmesinden korunma gibi protein-protein

etkileşimlerinde görev alan fonksiyonel protein sınıfıdır. Isı şoku proteinlerinin ekspresyonu sıcaklığın artması ve oksidatif stres gibi fizyolojik ve patofizyolojik uyarılarla indüklenir (Shen ve ark. 2013).

Mortalin mitokondriyal proteinlerin katlanmasında görev alan bir proteindir (Rozenberg ve ark., 2013). Mortalin ısı şoku protein ailesinin bir üyesi olup stres yanıtı, glikoz regülasyonu, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve tümörogeneizde önemli rolleri mevcuttur (Yi ve ark., 2008). Birçok tümör hücresinde mortalın ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Mortalin kanser hücrelerini sitotoksiteden korur, kanser hücrelerinin yaşlanmasını engeller ve hücreleri apoptoza karşı korur (Rozenberg ve ark., 2013).

Mortalinin ekspresyonu stres koşulları altında artar. Mortalin p53'ün hücre çekirdeğine girmesini inhibe ederek p53 fonksiyonunu engeller. Bunun sonucunda stres koşullarında bir tümör baskılayıcı olan p53'ün fonksiyonu ve dolayısıyla apoptozis engellenir. Bu durum kanser hücresinin kendisini stresten koruması için mortalın ekspresyonunu arttırmasına sebep olur (Ando ve ark., 2013).

Dundas ve ark. (2005) yaptıkları bir çalışmada kolorektal adenokarsinomada mortalın ekspresyonunun arttığını ve bu durumun düşük hayatta kalma oranı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Yi ve ark. (2008) mortalın ekspresyonunun hepatosellüler karsinoma metastazı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Takano ve ark. (1997) ise mortalın ekspresyonunun beyin tümöründe arttığını bildirmişlerdir.

Bir diğer ısı şoku proteini olan endoplazminin tümör oluşumu ile bağlantılı çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rolleri mevcuttur. Endoplazmin stres sonrası denatüre olan proteinlerin tekrar katlanmalarını sağlayarak tümör hücrelerinin canlılıklarını sürdürmelerini kolaylaştırır. Endoplazmin HSP-90 protein ailesinin bir üyesidir. HSP-90 glikokortikoid reseptörleri ve AKT sinyal yolağına dahil olarak glikoz metabolizmasını, hücre proliferasyonunu ve hücre göçünü arttırırken, apoptozisi azaltır. Bununla beraber endoplazmin ekspresyonunun meme kanseri metastazı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Cawthorn ve ark., 2012).

HSP-60 ısı şoku proteini normal şartlarda birçok farklı organizmada, dokuda ve memeli hücrelerinde bol miktarda bulunur. HSP-60'ın normal olmayan ekspresyon düzeylerinin otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu ve malign hastalıklardaki antijen varlığında rolü olduğu düşünülmektedir. HSP-60'ın biyolojik rolü ve karsinogeneze belirteç olarak potansiyel kullanımı birkaç çalışma ile araştırılmıştır. Ayrıca HSP-60'ın monosit-makrofaj sisteminde sitokinlerin üretimini indüklemeye yönünde kabiliyeti olduğu gösterilmiştir (Johansson ve ark., 2006). Kolorektal karsinogeneze sırasında HSP-60 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiş ve bu durumun tümöral farklılaşma, patofizyolojik karakteristik ve kolorektal kanser metastazıyla ilişkili olduğu saptanmıştır (Shen ve ark. 2013). Johansson ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada HSP-60'ın prostat kanser hücre hatlarındaki ekspresyon düzeylerine bakarak bu proteinin prostat kanseri malignansisiyle bağlantılı olabileceğini bildirmişlerdir. Zang ve ark. (2008) çalışmalarında HSP-60 ekspresyonunun mide kanseri hücre hattında mide epitel hücre hattına göre arttığını bildirmişlerdir. Yang ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada HSP-60 ekspresyonunun adrenokortikal karsinoma dokusunda normal adrenokortikal dokuya göre arttığını bildirmişlerdir. Rubporn ve ark. (2009) ise HSP-60 ekspresyonunun akciğer kanser hücre hattında akciğer fibroblast hücre hattına göre arttığını bildirmişlerdir.

Şaperonlar proteinlerin fonksiyonel yapılarının oluşturulması için gerekli protein katlanması için vazgeçilmez moleküler yapılardır. Şaperonların bir üyesi olan TCP-1'in tümörlerdeki rolü üzerine sınırlı bilgi mevcuttur. TCP-1 hücre canlılığı için vazgeçilmez bir şaperon olup proteinlerin doğru katlanmasında görev alır. Aktin gibi bir dizi proteinin fonksiyonu özellikle TCP-1 üzerine kuruludur ve diğer şaperonlar bu fonksiyonu yerine getiremezler. Önemli hücresel fonksiyonlarına rağmen TCP-1'in tümörlerdeki ekspresyonu ve fonksiyonu üzerine fazla bilgi yer almamaktadır (Coghlin ve ark., 2006).

TCP-1-ε, aktin ve tubulin proteinlerinin katlanmasına aracılık eder. Kolorektal kanserde TCP-1-ε ekspresyonunda artış gözlemlenmiş ve bu durumun kanserin progresyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Shen ve ark. 2013). Coghlin ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada TCP-1-β ve TCP-1-ε ekspresyonunun kolorektal

kanserde arttığını bildirmişlerdir. Li ve ark. (2003) yaptıkları bir çalışmada TCP-1 ekspresyonunun akciğer skuamöz hücreli karsinom dokusunda normal bronş epitel dokusuna göre arttığını bildirmişlerdir. Yang ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada TCP-1 ekspresyonunun adrenokortikal karsinoma dokusunda normal adrenokortikal dokuya göre arttığını bildirmişlerdir.

Kalretikulin kalsiyum bağlayıcı protein olarak tanımlanmakla birlikte hücre adhezyonu, otoimmunité ve ısı şoku gibi birçok hücresel fonksiyon ve patofizyolojik süreçte görev almaktadır. Birçok kanser türünde kalretikulin ekspresyonunda artış tespit edilmiş ve bu ekspresyon artışının kanserde hücresel strese bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Ayrıca kalretikulin ekspresyonunun adrenokortikal karsinoma dokusunda normal adrenokortikal dokuya göre arttığı bildirilmiştir (Yang ve ark., 2013).

Tez çalışmasında şaperon proteinleri olan mortalin, endoplazmin, HSP-60, TCP-1-ε ve TCP-1-β ekspresyonları fibrosarkoma hücre lizatı örneklerinde fibroblast hücre lizatı örneklerine göre anlamlı artış göstermiştir. Bunun yanında fibrosarkoma sekretom örneklerinde kalretikulin ekspresyonuna rastlanmış olup fibroblast sekretom örneklerinde rastlanmamıştır. Bu şaperon protein ekspresyonlarının kanser hücrelerinde görülen strese bağlı olarak fibrosarkomada arttığı düşünülmektedir.

STI1 (Stress-induced-phosphoprotein 1) ısı şoku proteini düzenleyici protein olarak da adlandırılır. STI1 HSP-70 ve HSP-90'ın protein katlanmasındaki fonksiyonlarını koordine eden bir adaptör proteindir. STI1 ekspresyonunun meme kanserinde arttığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2010). Tez çalışmasında STI1 ekspresyonunun fibrosarkoma hücre lizatı örneklerinde fibroblast hücre lizatı örneklerine göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Fibrosarkomada ekspresyonlarında artış tespit edilen ısı şoku proteinleri göz önünde bulundurulduğunda bir ısı şoku proteini düzenleyicisi olan STI1 proteininin artışının bu durumla bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

Galektin-1, β -galaktozid bağlayıcı proteinler ailesinin bir üyesi olup hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde görev alır (Ge ve ark., 2012). Galektin-1'in ekspresyonunun melanom, ovaryum, akciğer, tiroid ve kolorektal kanser gibi birçok kanser türünde normal dokuya kıyasla arttığı bilinmektedir. Bu ekspresyon artışının kanserin metastazı ve kötü prognozu ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Galektin-1'in kanserde temel görevi tümör progresyonunu teşvik etmesidir (Ito ve ark., 2012). Yapılan araştırmalar Galektin-1'in hücre adhezyonunda ve gelişiminde, apoptoziste, metastazda ve inflamasyonda rol aldığını göstermiştir. Tümör hücreleri tarafından eksprese edilen galektin-1'in ekstrasellüler matriks'de yer alan laminin ve fibronektinin çapraz bağlanmasını etkileyerek tümör hücrelerinin adhezyonunu arttırdığı bilinmektedir (Erçetin ve ark., 2011). Bununla birlikte galektin-1'in tümör anjiyogenezinde rolü olduğu bilinmektedir. Galektin-1 vasküler endotelial hücre büyümesini uyararak ve yeni oluşan kapiller damarlara fiziksel destek sağlayarak anjiyogenezde rol oynar (Ito ve ark., 2012). Ge ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada galektin-1 ekspresyonunun nazofaringeal karsinoma (Nasopharyngeal carcinoma-associated stromal fibroblast) sekretomunda normal fibroblast sekretomuna göre arttığını bildirmişlerdir. Tez çalışmasında fibrosarkoma sekretomunda galektin-1 ekspresyonuna rastlanmış olup fibroblast sekretomunda rastlanmamıştır. Bu durumun galektin-1'in tümör gelişimindeki önemli rolünden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1 kanser hücrelerinin canlılığını sürdürebilmesi için büyük önem arz eden bir proteindir. Heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1 telomer bağlayıcı bir protein olup kanserli hücrenin yaşlanmasını engeller ve telomer uzunluğunun korunmasında görevli telomerase enzimi üzerine fonksiyonunu gösterir. Heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1 bunun yanında hücre proliferasyonunda da rol almaktadır (Chang ve ark., 2013). Pino ve ark. (2003) yaptıkları bir çalışmada akciğer kanserinde heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1'in ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Chang ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1 ekspresyonunun ağız kanseri hücre hattı sekretomunda normal primer hücre hattı sekretomuna göre arttığını bildirmişlerdir. Zang ve ark. (2008) yaptıkları bir

çalışmada heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1 ekspresyonunun mide kanseri hücre hattında mide epitel hücre hattına göre arttığını bildirmişlerdir. Tez çalışmasında heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1 ekspresyonunun fibrosarkoma hücre lizati örneklerinde fibroblast hücre lizati örneklerine göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Bu artışın heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1'in kanser hücrelerinin canlılıklarını sürdürebilmelerindeki önemli rollerine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Transgelin-2 aktin bağlayıcı proteinlerin kalponin ailesinin bir üyesidir. Transgelin'in homoloğu olan transgelin-2 ekspresyonunun hepatosellüler karsinoma, akciğer adenokarsinomu ve pankreas kanserinde arttığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında kolorektal kanserde transgelin-2 ekspresyonunun artmasının lenf nodülü metastazıyla, uzak metastazla ve tümör nod metastaz (TNM) derecelendirilmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Nohata ve ark., 2011). Deng ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada transgelin-2 ekspresyonunun meme kanseri dokusunda normal meme dokusuna göre arttığını bildirmişlerdir. Yang ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada transgelin-2 ekspresyonunun adrenokortikal karsinoma dokusunda normal adrenokortikal dokuya göre arttığını bildirmişlerdir. Tez çalışmasında transgelin-2 ekspresyonunun fibrosarkoma hücre lizati örneklerinde fibroblast hücre lizati örneklerine göre anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Bu artış transgelin-2'nin fibrosarkomanın gelişiminde potansiyel rolünün olduğunu düşündürmektedir.

Osteonektin olarak da isimlendirilen SPARC (secreted protein and rich in cysteine) matrisellüler protein ailesinin bir üyesidir. SPARC hücre-matriks etkileşimlerini ve ekstrasellüler matriks in yapısına katılmadan hücre fonksiyonunu düzenler. Yakın zamanda yapılan bir çalışma SPARC'ın hücreleri stres kaynaklı apoptozisten koruduğunu ortaya koymuştur. Bir diğer yandan bazı çalışmalarda SPARC'ın kanser hücrelerinde apoptozisi teşvik ettiği gösterilmiştir (Yin ve ark., 2010).

SPARC'ın çeşitli kanser türlerinde önemli rolleri olduğu üzerine çalışmalar mevcut olmasına karşın kanser progresyonuna ve gelişimine yaptığı katkı ve

fonksiyonu hala netlik kazanmamıştır. SPARC'ın ekspresyon düzeyinin çeşitli kanser türlerinde normal dokulara göre farklılık gösterdiğine dair çalışmalar mevcuttur. Ekspresyon düzeyindeki değişim kanser tipine göre farklılık göstermektedir. Meme kanseri, glioblastoma ve melanoma da SPARC ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Ekspresyon düzeylerindeki bu artış SPARC'ın tümör gelişimi üzerine potansiyel rolü olduğunu düşündürmektedir. Buna karşın ovaryum, kolorektal ve pankreas kanserlerinde SPARC'ın ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. Bu düşüş SPARC'ın tümör oluşumunda kısıtlayıcı etkisi olduğunu düşündürmektedir (Tai ve Tang, 2008). Bu araştırmalar sonucunda SPARC'ın tümör oluşumundaki rolünün hücre tipi spesifik olduğu ve tümör hücrelerini çevreleyen ortamın etkisine göre değişebileceği düşünülmektedir (Yin ve ark., 2010). Tez çalışmasında fibrosarkoma sekretomunda SPARC ekspresyonuna rastlanmış olup fibroblast sekretomunda rastlanmamıştır. SPARC ekspresyonunun kanser türüne göre değişkenlik gösterdiği düşünüldüğünde fibrosarkoma sekretomunda SPARC ekspresyonu gözlenmesinin önemli olduğu ve SPARC'ın fibrosarkomanın gelişimi üzerine potansiyel rolü olduğu düşünülmektedir.

Protein disülfid izomeraz ökaryotik endoplazmik retikulumda bulunan bir enzim olup protein katlanması sırasında sistein kalıntıları arasındaki disülfid bağların oluşumunu ve kırılmasını katalizler. Mide kanserinde protein disülfid izomeraz ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Bunun yanında protein disülfid izomeraz'ın malign gliomanın invaziv özellikleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca protein disülfid izomeraz'ın kolorektal kanser hücre hattı olan caco-2 hücre hattının proliferasyonu ve farklılaşması üzerine etkisi olduğu bildirilmiştir (Shen ve ark. 2013). Tez çalışmasında protein disülfid izomeraz A3 ve A6 ekspresyonları fibrosarkoma hücre lizatı örneklerinde fibroblast hücre lizatı örneklerine göre anlamlı artış göstermiştir. Bu artış protein disülfid izomeraz A3 ve A6'nın fibrosarkomanın gelişiminde potansiyel rolü olduğunu düşündürmektedir.

Alfa-enolaz, glikolizdeki rolünün dışında, büyümenin kontrolü, hipoksi toleransı, alerjik yanıt gibi birçok süreçte rol aldığı gibi birçok tümör tipinde diagnostik belirteç olarak dikkate alınması gerektiği düşünülen çok fonksiyonlu bir

enzimdir. Yakın zamanda enolazın memeli hücrelerinde 3 izoformunun olduğu saptanmıştır. Bunlar alfa-enolaz, beta-enolaz ve gama-enolaz olarak isimlendirilmiştir (Rubporn ve ark., 2009).

Tümör gelişimi sırasında tümör hücrelerinde glikoz metabolizmasında artış meydana gelir. Buna bağlı olarak glikolitik bir enzim olan alfa-enolaz'ın ekspresyonu tümör hücrelerinde artar. Ayrıca alfa-enolaz'ın kanser hücrelerinin invazyonunda etkili oldukları bilinmektedir (Ramos ve ark., 2012). Alfa-enolazın küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde tümör malignansisinin belirlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (Rubporn ve ark., 2009). Huang ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanseri sekretomunda alfa-enolaz ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Rubporn ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada alfa-enolaz ekspresyonunun akciğer kanser hücre hattında akciğer fibroblast hücre hattına göre arttığını bildirmişlerdir. Tez çalışmasında fibrosarkoma sekretomunda alfa-enolaz ekspresyonuna rastlanmış olup fibroblast sekretomunda rastlanmamıştır. Fibroblast sekretomuyla karşılaştırıldığında fibrosarkoma sekretomunda alfa-enolaz ekspresyonuna rastlanılmasının bu proteinin kanserdeki rolü ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Peptidil prolil cis-trans izomeras, apoptozis, yangı, protein katlanması gibi birçok biyolojik süreçte rol almaktadır. Peptidil prolil cis-trans izomeras A ekspresyonunun akciğer kanser hücre hattında akciğer fibroblast hücre hattına göre arttığı bildirilmiştir (Rubporn ve ark., 2009). Tez çalışmasında peptidil prolil cis-trans izomeras A ekspresyonunun fibrosarkoma hücre lizatı örneklerinde fibroblast hücre lizatı örneklerine göre anlamlı artış gösterdiği görülürken fibrosarkoma sekretomunda peptidil prolil cis-trans izomeras A ve B ekspresyonuna rastlanılmıştır. Bu durum peptidil prolil cis-trans izomeras A ve B'nin fibrosarkomanın gelişimi üzerine potansiyel rolü olduğunu düşündürmektedir.

Ekstrasellüler matriks ve bazal membranın yıkımı tümör invazyonu ve metastaz için büyük önem taşır. Ekstrasellüler matriks'in yıkınlanması metalloproteazlar ve serin proteazları gibi ekstrasellüler proteolitik enzimler

vasıtasıyla gerçekleşir. Plazminojen aktivatörleri inaktif bir pro-enzim olan plazminojenin plazmine dönüşümünü katalizler. Plazmin ekstrasellüler matriksin yıkımında rol oynadığı gibi tip-IV kollogenaz gibi enzimleri aktive eder. Plazminojen aktivatörleri içinde yer alan ürokinaz tip plazminojen aktivatörü ve reseptörünün tümör gelişiminde önemli roller üstlendiği bilinmektedir. Ürokinaz tip plazminojen aktivatörü hem normal hem de kötü huylu hücrelerde üretilir. Normal hücrelerde dokunun yeniden yapılandırılmasında rolü mevcuttur. Kötü huylu hücrelerde ise metastaz için büyük önem teşkil eden ekstrasellüler matriks'in ve bazal membranın yıkımında görev alır (Kaneko ve ark., 2003). Sardana ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada prostat kanseri için aday tümör belirteçlerini araştırmışlar ve araştırma sonucunda prostat kanseri hücre hattı sekretomunda ürokinaz tip plazminojen aktivatörü ekspresyonunu bildirmişlerdir. Tez çalışmasında fibrosarkoma sekretomunda ürokinaz tip plazminojen aktivatörü ekspresyonuna rastlanmış olup fibroblast sekretomunda rastlanmamıştır. Bu durumun ürokinaz tip plazminojen aktivatörünün tümör gelişiminde üstlendiği önemli rollere bağlı olduğu düşünülmektedir.

NDRG1 (human N-myc downstream-regulated gene 1) geni metastaz baskılayıcı gen olup hücre farklılaşması, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve stres yanıtı gibi birkaç fonksiyondan sorumludur. NDRG1 geni NDRG1 proteinini kodlar. NDRG1 proteininin hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında rolü olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur. NDRG1 proteini hücrel farklılaşmada rol aldığı gibi bazı metaller ve hormonlar ile etkileşim gösterir. NDRG1 ayrıca karsinogenez, anjiyogenez, tümör invazyonu, metastaz ve ilaç dirençliliğinde rol oynar. Bunun yanında NDRG1 ve NDRG2'nin tümör baskılayıcı olduklarına ilişkin potansiyel rolleri olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2012; Dos Santos ve ark., 2012).

NDRG1 daha çok epitelyal hücreler tarafından eksprese edilir. Bunun yanında kalp, beyin, plasenta, karaciğer, kas, böbrek, bağırsak ve pankreasta mevcuttur. İmmunohistokimyasal ve elektron mikroskopik çalışmalar NDRG1'in dokulara göre değişmekle birlikte sitoplazmik veya nükleer lokalizasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (Wang ve ark., 2012; Dos Santos ve ark., 2012).

Anormal NDRG1 ekspresyon düzeyleri bazen karsinomun derecesine bağlı olmak üzere birçok farklı tümörde tespit edilmiştir (Dos Santos ve ark., 2012). NDRG1 ekspresyonu akciğer, karaciğer ve meme kanserinde normal dokulara göre anlamlı derecede yüksektir. Bunun yanında NDRG1 ekspresyon düzeyinin normal akciğer dokusunda ölçülemeyecek düzeyde iken akciğer kanser dokusunda yüksek derecede eksprese edildiği ortaya konulmuştur. Bu durum NDRG1'in akciğer kanseri için belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Wang ve ark., 2012). Bazı çalışmalar prostat kanserinde normal hücrelere göre NDRG1 ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Bununla birlikte melanom, akciğer, karaciğer, meme, renal, servikal ve oral kanserlerde de NDRG1 ekspresyonunda artış mevcuttur (Dos Santos ve ark., 2012). Guan ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada kolon kanserinde NDRG1'in in vitro invazyonu ve in vivo metastazı muhtemelen hücre farklılaşmasını baskılayarak kısıtladığını ortaya koymuşlardır. Dos Santos ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada NDRG1 ekspresyonunun orofarengeal skuamöz hücre karsinomunda arttığını bildirmişlerdir. Tez çalışmasında fibrosarkoma hücre lizati örneklerinde fibroblast hücre lizati örneklerine göre NDRG1 ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Bu artışın NDRG1'in kansinogenezdeki rolüyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

MVP kemoterapötik ajanların hücre içi düzeylerini azaltarak çoğul ilaç direncine sebep olan bir proteindir (Sasaki ve ark., 2002). MVP böbrek, kalp, akciğer, kas doku, tiroid, prostat ve testis dokusunda mevcuttur. Ayrıca MVP bowman kapsülünün epitelyal hücrelerinde ve distal tübüllere göre proksimal tübüllerde daha fazla olmak üzere tübüllerde tespit edilmiştir. Bu araştırmalar MVP'nin sözü geçen organlarda fizyolojik rollerinin olduğunu düşündürmektedir (Ikeda ve ark., 2008). Günümüze kadar yapılan çalışmalarla MVP ekspresyonu birçok tümörde gösterilmiştir. MVP ekspresyonu ile kemoterapiye hassasiyetin azalması arasındaki ilişki T hücreli lösemi, osteosarkoma, akut lösemi, prostat kanseri, ovaryum kanseri, akut myeloid lösemi ve akciğer kanserinde gösterilmiştir. MVP ekspresyonu testis kanseri, akciğer kanseri, ovaryum kanseri, meme kanseri, osteosarkoma, mide kanseri, kolorektal kanser, pankreas kanseri gibi birçok kanser türünde gösterilmiştir (Sasaki ve ark., 2002). Ikeda ve ark. (2008) yaptıkları bir

çalışmada kolon kanser hücrelerinin hiperozmotik strese maruz kalması sonucunda MVP ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Tez çalışmasında fibrosarkoma hücre lizatında MVP ekspresyonu fibroblast hücre lizatı örneklerine göre anlamlı düşüş göstermiştir. Bu durum MVP'nin fibrosarkomanın moleküler mekanizmasında rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Amiloid beta A4 proteininin alzheimer hastalığının gelişimindeki rolü uzun yıllardır bilinmektedir. Bunun yanında son zamanlarda yapılan çalışmalar amiloid beta A4'ün büyüme faktörleri ve NF-kB metabolik yolunun aktivasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Amiloid beta A4 proteininin bu fonksiyonu amiloid beta A4 proteininin kanser gelişiminde rolü olduğunu düşündürmektedir. Amiloid beta A4 protein ekspresyonu pankreas, prostat, kolon ve skuamöz hücreli karsinom gibi kanserli dokularda artış gösterir (Chaker ve ark., 2012). Minamida ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada amiloid beta A4 protein ekspresyonunun renal hücreli karsinoma dokularında normal böbrek dokularına göre bir değişiklik göstermediğini bildirmişlerdir. Chaker ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada amiloid beta A4 protein ekspresyonunun agresif tiroid kanser hücre hatlarının sekretomunda agresif olmayanlara göre arttığını bildirmişlerdir. Sardana ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada prostat kanseri için aday tümör belirteçlerini araştırmışlar ve araştırma sonucunda prostat kanseri hücre hattı sekretomunda amyloid beta A4 protein ekspresyonunu bildirmişlerdir. Tez çalışmasında fibrosarkoma sekretom örneklerinde amyloid beta A4 ekspresyonuna rastlanmış olup fibroblast sekretom örneklerinde ekspresyon gözlenmemiştir. Son zamanlarda amyloid beta A4 proteinin kanser gelişimindeki rolü olabileceğine dair yapılan çalışmalar ışığında bu proteinin fibrosarkomanın gelişiminde rolü olabileceği düşünülmektedir.

Sekretom örneklerinde identifikasyonu yapılan 4 spotun hücre içi proteinler olan endoplazmin, GRP-78, gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz ve EF-1 (Putative elongation factor 1 alpha like 3) olduğu görülmüştür. Sekretomda yer alan proteinlerin hücre dışına salgılanan proteinler olması gerekliliği ve identifikasyonu yapılan bu proteinlerin hücre içi yer alan proteinler oldukları düşünüldüğünde bu durumun sekretom örneklerinin hazırlanması aşamasında ölü hücrelerden ortaya

çıktığı düşünülmektedir. Dolayısıyla sekretom örneklerinde identifikasyonu yapılan bu proteinler değerlendirmeye alınmamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) ve sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak yapılan karşılaştırmalı proteomik analizler günümüze kadar akciğer kanseri, prostat kanseri ve kolon kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünde uygulanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda identifiye edilen proteinlerin kanserin tanısında ve prognozunda önemli oldukları ortaya konduğu gibi kanserin moleküler mekanizmasının açığa kavuşmasında da etkili olmuşlardır. Bununla birlikte bu yönde yapılan proteomik çalışmalar ile tümör belirteçlerinin keşfinde önemli adımlar atılmıştır.

Çalışmada 2D-PAGE ile birlikte LC-MS/MS yöntemleri kullanılarak insan fibrosarkoma ve fibroblast hücre hatlarının karşılaştırmalı proteomik analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için hem fibrosarkoma hem de fibroblast hücre hatlarından hücre içi proteinlerinin analiz edilmesi amacıyla hücre lizatı, hücre dışına salgılanan proteinlerin analiz edilmesi amacıyla sekretom örnekleri oluşturulmuştur. Fibrosarkoma ve fibroblast hücre lizatı örneklerinin karşılaştırmalı analizinde spotların yoğunluk değerleri % 95 güven aralığında student t-test ile analiz edilmiştir ($p < 0,05$). Yapılan istatistik sonucunda 13 protein ekspresyonu fibrosarkomada anlamlı derecede yüksek bulunmuş, 1 protein ekspresyonu ise fibrosarkomada anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Toplamda istatistiksel olarak anlamlı bulunan 14 proteinin identifikasyon işlemi kütle spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. Sekretom örnekleri kalitatif olarak karşılaştırılmış olup fibrosarkoma sekretomunda gözlemlenip fibroblast sekretomunda gözlemlenmeyen dansiteleri en yüksek olan 13 protein kütle spektrometresi ile identifiye edilmiştir. Hem hücre lizatı örneklerinde hem de sekretom örneklerinde tanımlanan bu proteinlerin kanserde hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, invazyon, metastaz ve apoptozis ile ilgili fonksiyonları olduğu bilinmektedir.

Normal ve kanser hücre hatlarının potansiyel tümör belirteçleri aranması amacıyla yapılan karşılaştırmalı proteomik analizlerinde en değerli bilgi sekretom

örneklerinden elde edilen bilgidir. Bunun nedeni sekretom örneklerinde farklı ekspresyon gösteren proteinlerin hücre dışına salgılanan proteinler olması ve bu proteinlerin kan ve idrar gibi biyolojik sıvılarda tespit edilebilme olasılığının bulunmasıdır. Tez çalışmasında özellikle sekretom örneklerinde identifikasyonu yapılan SPARC, kalretikulin, amiloid β A4 (APP751 İzofomu), Galektin-1, alfa enolaz, ürokinaz tip plazminojen aktivatörü, peptidil prolil cis-trans izomeraz A ve B hücre dışına salgılanan proteinler olup fibroblast sekretomu ile karşılaştırıldığında sadece fibrosarkoma sekretomunda ekspresyonuna rastlanmıştır. Sekretomda identifikasyonu yapılan bu proteinlerin fibrosarkoma için potansiyel tümör belirteçleri olarak hizmet edebilecekleri düşünülmektedir.

Hücre lizatı örneklerinde identifikasyonu yapılan ve fibrosarkomada ekspresyonu artan proteinler olan protein disülfid izomeraz A6, endoplazmin, HSP-60 (Heat Shock Protein 60), protein NDRG1, TCP-1- ϵ (T Complex Protein 1 subunit epsilon), GRP-75 (Mortalin), TCP-1- β (T Complex Protein 1 subunit beta), protein disülfid izomeraz A3, STI1 (Stress Induced Phosphoprotein 1), peptidil prolil cis-trans izomeraz A, transgelin-2, heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1 ve ekspresyonu azalan MVP (Major Vault Protein) ile sekretomda identifikasyonu yapılan diğer proteinlerin fibrosarkomanın moleküler mekanizmasının, patogenezinin ve karsinogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Tez çalışmasında hem hücre lizatı hem de sekretom örneklerinde identifikasyonu yapılan bu proteinlerin ileride yapılacak olan klinik çalışmalar ile birlikte fibrosarkoma için potansiyel tümör belirteci ve ilaç hedefi olarak kullanılabilirlikleri aydınlatılacaktır.

Günümüze kadar kanserin moleküler mekanizmasının aydınlatılması ve potansiyel yeni tümör belirteçlerinin aranması amacıyla birçok kanser türünde karşılaştırmalı proteomik analizler gerçekleştirilmiş olup, fibrosarkoma ve fibroblast hücre hatları ile yapılan bu proteomik çalışmanın literatüre ayrıca katkı sağlayacağı gibi ileride bu konu ile ilgili yapılacak klinik çalışmalara da temel teşkil edeceği kanısındayız.

ÖZET

Fibrosarkoma ve Deri Fibroblast Hücre Hatlarının Karşılaştırmalı Proteomik Analizleri

Proteom terimi bir genom tarafından kodlanan tüm proteinleri tanımlar. Proteomik terimi ise bir organizma, doku veya hücre hattından eksprese edilen bütün proteinlerin geniş çaplı olarak analiz edilmesi işlemini ifade eder. Normal ve kanser hücre hatlarında yapılan karşılaştırmalı proteomik analizler kanser gelişiminin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve yeni tümör belirteçlerinin veya ilaç hedeflerinin geliştirilmesinde önemli bir yer tutar.

Çalışmanın amacı fibrosarkoma ve deri fibroblast hücre hatlarının protein ekspresyonlarının karşılaştırılması ve farklı ekspresyon gösteren proteinlerin identifikasyonunun yapılmasıdır. Çalışmamızda iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) ve sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresinin (LC-MS/MS) kullanımı ile fibrosarkoma ve fibroblast hücre hatlarının karşılaştırmalı proteomik analizleri gerçekleştirilmiştir. Her iki hücre hattında hücre içi proteinlerin analizi için hücre lizati, hücre dışı proteinlerin analizi için sekretom örnekleri oluşturulmuştur.

Analizler sonucunda hücre lizati örneklerinde fibrosarkoma hücre hattında fibroblast hücre hattına göre ekspresyonu artan 13 protein (protein disülfid izomeraz A6, endoplazmin, HSP-60, protein NDRG1, TCP-1-ε, GRP-75, TCP-1-β, protein disülfid izomeraz A3, STI1, peptidil prolil cis-trans izomeraz A, transgelin-2, heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1), azalan 1 protein (MVP) identifiye edilmiş olup, sekretom örneklerinde fibrosarkoma hücre hattında gözlemlenip fibroblast hücre hattında gözlemlenmeyen 13 protein (SPARC, kalretikulin, amiloid β A4, endoplazmin, galektin-1, GRP-78, alfa enolaz, peptidil prolil cis-trans izomeraz A ve B, gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz, EF-1, ürokinaz tip plazminojen aktivatörü) identifiye edilmiştir. İdentifikasyonu yapılan proteinlerin kanserde hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, invazyon, metastaz ve apoptozis ile ilgili fonksiyonları olduğu bilinmektedir.

Sonuç olarak elde edilen verilerin fibrosarkomanın moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılmasında önem arz ettiği ve ileride bu konu ile ilgili yapılacak klinik çalışmalar ile tanımlanan bu proteinlerin potansiyel tümör belirteci ve ilaç hedefleri olabilecekleri düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: 2D-PAGE, Fibrosarkoma, Fibroblast, LC-MS/MS, Proteomik

SUMMARY

Comparative Proteomic Analysis of Fibrosarcoma and Skin Fibroblast Cell Lines

The term “proteome” represents proteins encoded by the genome. However the term “proteomics” was defined large-scale characterization of the entire protein complement of a cell line, tissue, or organism. Comparative proteomic analyses of normal and cancer cell lines provide for a better understanding of the molecular mechanism of cancer development, and are essential for developing more effective strategies for new biomarker or drug target discovery.

The purpose of this study is to compare protein expression levels between fibrosarcoma and fibroblast cell lines. In our study, two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) techniques were carried out to compare the protein profile between fibrosarcoma and fibroblast cell lines. We prepared cell lysate samples to analyse intracellular proteins and secretome samples to analyse extracellular proteins in both cell lines.

Our results revealed 13 upregulated proteins (protein disulphide isomerase A6, endoplasmin, HSP-60, protein NDRG1, TCP-1- ϵ , GRP-75, TCP-1- β , protein disulphide isomerase A3, STI1, peptidyl prolyl cis trans isomerase A, transgelin-2, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1) and 1 downregulated protein (MVP) of which all of them identified in fibrosarcoma cell line after the comparison with fibroblast cell line cell lysates. When comparing secretome profiles of both cell lines we found and identified 13 proteins (SPARC, calreticulin, amyloid β A4, endoplasmin, galectin-1, GRP-78, alpha enolase, peptidyl prolyl cis trans isomerase A and B, glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, EF-1, urokinase type plasminogen activator) only expressed in fibrosarcoma cell line. These identified proteins have common functions such as cell proliferation, cell differentiation, invasion, metastasis and apoptosis in cancer.

In conclusion, the data obtained from this study indicates that these proteins have importance of understanding the molecular mechanism of fibrosarcoma. These proteins may serve as a candidate biomarkers and drug targets for the future clinical studies.

Keywords: 2D-PAGE, Fibrosarcoma, Fibroblast, LC-MS/MS, Proteomics

KAYNAKLAR

- AHRAM, M., SPRINGER, D.L. (2004). Large-scale proteomic analysis of membrane proteins. *Expert Rev. Proteomics*, **1**(3): 293-302.
- ANAND, P., KUNNUMAKARA, A.B., SUNDARAM, C., HARIKUMAR, K.B., THARAKAN, S.T., LAI, O.S., SUNG, B., AGGARWAL, B.B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, **25**(9): 2097-2116.
- ANDO, K., OKI, E., ZHAO, Y., IKAWA-YOSHIDA, A., KITAO, H., SAEKI, H., KIMURA, Y., IDA, S., MORITA, M., KUSUMOTO, T., MAEHARA, Y. (2013). Mortalin is a prognostic factor of gastric cancer with normal p53 function. Eriřim: [<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10120-013-0279-1>]. Eriřim Tarihi: 05.09.2013.
- ANTHARAVALLY, B.S., MALLIA, K.A., RANGARAJ, P., HANEY, P., BELL, P.A. (2009). Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Analytical Biochemistry*, **385**: 342-345.
- ASLAN, G. (2010). Tümör immünolojisi. *Turkish Journal of Immunology*, **15**(1): 7-13.
- ATABEY, N. (2002). İnsan genom projesi tamamlanınca ne olacak: fonksiyonel genomiks ve proteomiks. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **16**: 121-131.
- BAHRAMI, A., FOLPE, A.L. (2010). Adult-type fibrosarcoma: a reevaluation of 163 putative cases diagnosed at a single institution over a 48-year period. *Am. J. Surg. Pathol.*, **34**: 1504-1513.
- BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R., BRUNS, D.E., SAWYER, B.G. (2008). Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th Ed. Missouri: Saunders Elsevier, p.: 358-362.
- CASCIATO, D.A., TERRITO, M.C. (2009). Manual of Clinical Oncology. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Wiliams and Wilkins, p.: 1-10.
- CAWTHORN, T.R., MORENO, J.C., DHARSEE, M., TRAN-THANH, D., ACKLOO, S., ZHU, P.H., SARDANA, G., CHEN, J., KUPCHAK, P., JACKS, L.M., MILLER, N.A., YOUNGSON, B.J., IAKOVLEV, V., GUIDOS, C.J., VALLIS, K.A., EVANS, K.R., MCCREADY, D., LEONG, W.L., DONE, S.J. (2012). Proteomic analyses reveal high expression of decorin and endoplasmin (hsp90b1) are associated with breast cancer metastasis and decreased survival. *PLoS One*, **7**(2): 1-11.
- CHAKER, S., KASHAT, L., VOISIN, S., KAUR, J., KAK, I., MACMILLAN, C., OZCELIK, H., SIU, K.W., RALHAN, R., WALFISH, P.G. (2012). Secretome proteins as candidate biomarkers for aggressive thyroid carcinomas. *Proteomics*, **13**(5): 771-787.
- CHANG, H.Y., HOR, S.Y., LIM, K.P., ZAIN, R.B., CHEONG, S.C., RAHMAN, M.A., KARSANI, S.A. (2013). Oral cancer secretome: identification of cancer associated proteins. *Electrophoresis*, **34**(15): 2199-2208.

- COGHLIN, C., CARPENTER, B., DUNDAS, S.R., LAWRIE, L.C., TELFER, C., MURRAY, G.I. (2006). Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. *Journal of Pathology*, **210**: 351-357.
- CORN, P.G., EL-DEIRY, W.S. (2002). Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *BioEssays*, **24**(1): 83-90.
- DENG, S.S., XING, T.Y., ZHOU, H.Y., XIONG, R.H., LU, Y.G., WEN, B., LIU, S.Q., YANG, H.J. (2006). Comparative proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human. *Geno. Prot. Bioinfo.*, **4**(3): 165-172.
- DESMOULIERE, A., DARBY, I.A., GABBIANI, G. (2003). Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab. Invest.*, **83**:1689–1707.
- DOS SANTOS, M., DA CUNHA MERCANTE, A.M., NUNES, F.D., LEOPOLDINO, A.M., DE CARVALHO, M.B., GAZITO, D., LOPEZ, R.V., CHIAPPINI, P.B., DE CARVALHO NETO, P.B., FUKUYAMA, E.E., TAJARA, E.H., LOURO, I.D., DA SILVA, A.M. (2012). Prognostic significance of ndrg1 expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Mol. Biol. Rep.*, **39**(12): 10157-10165.
- DUNDAS, S.R., LAWRIE, L.C., ROONEY, P.H., MURRAY, G.I. (2005). Mortalin is over-expressed by colorectal adenocarcinomas and correlates with poor survival. *J. Pathol.*, **205**: 74-81.
- DYBALLA, N., METZGER, S. (2009). Fast and sensitive colloidal coomassie g-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *JoVE*, **30**: 1-4.
- ERÇETİN, A.P., AKTAŞ, S., PİŞKİN, Ö., ÖZCAN, M.A. (2011). Multipl myelomda galektin-1 ekspresyonunun düzenleyici t hücreler ve otolog kemik iliği transplantasyonu ile ilişkisi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **25**(3): 137-143.
- EURELL, J.A.C. (2004). Veterinary Histology. 1st Ed. Salt Lake City: Teton New Media, Chapter 6.
- FENN, J.B., MANN, M., MENG, C.K., WONG, S.F., WHITEHOUSE, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**: 64-71.
- FISHER, C., BERG, E., MOLENAAR, W.M. (2002). Adult Fibrosarcoma. In: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Ed.: C. D. M. Fletcher, K. K. Unni, F. Mertens. Oxford: Oxford University Press, p.: 100-102.
- GE, S., MAO, Y., YI, Y., XIE, D., CHEN, Z., XIAO Z. (2012). Comparative proteomic analysis of secreted proteins from nasopharyngeal carcinoma-associated stromal fibroblasts and normal fibroblast. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **3**: 857-860.
- GRAVES, P.R., HAYSTEAD, T.A.J. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**(1): 39-63.

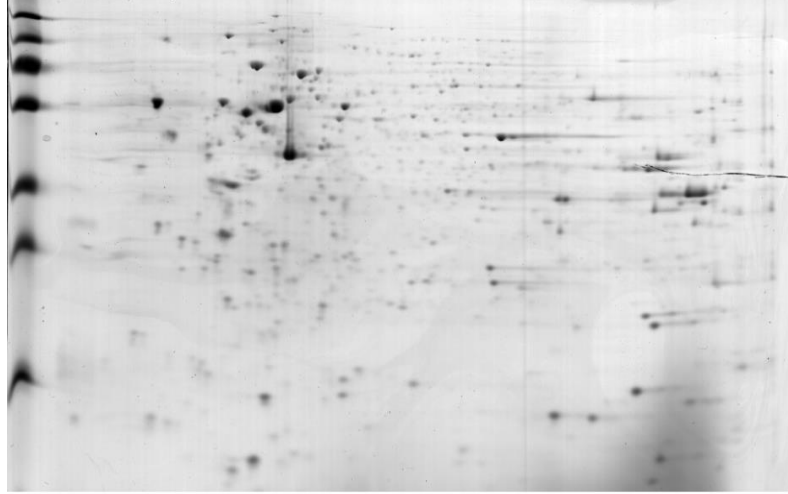
- GUAN, R.J., FORD, H.L., FU, Y., LI, Y., SHAW, L.M., PARDEE, A.B. (2000). Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer. *Cancer Res.*, **60**(3): 749-755.
- GUO, Q., SHEN, J., JIN, S., WANG, J., HUANG, G., ZHANG, L., YIN, J., ZOU, C., LI, M. (2007). Comparative proteomic analysis of human osteosarcoma and sv40-immortalized normal osteoblastic cell lines. *Acta Pharmacol. Sin.*, **28**(6): 850-858.
- GUOQING, L., ZHEFENG, X., JIANPING, L., CUI, L., FENG, L., ZHUCHU, C. (2011). Cancer: a proteomic disease. *Science China Life Sciences*, **54**: 403-408.
- HAJDU, S.I. (1998). Fibrosarcoma: a historic commentary. *Cancer*, **82**: 2081-2089.
- HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**: 646-669.
- HENZEL, W.J., ASWAD, D.W., STULTS, J.T. (1989). Techniques in Protein Chemistry. 1st Ed. San Diego: Academic Press, p.: 127-134.
- HUANG, L.J., CHEN, S.X., LUO, W.J., JIANG, H.H., ZHANG, P.F., YI, H. (2006). Proteomic analysis of secreted proteins of non-small cell lung cancer. *Chinese Journal of Cancer*, **25**(11): 1361-1367.
- IKEDA, R., IWASHITA, K., SUMIZAWA, T., BEPPU, S., TABATA, S., TAJITSU, Y., SHIMAMOTO, Y., YOSHIDA, K., FURUKAWA, T., CHE, X.F., YAMAGUCHI, T., USHIYAMA, M., MIYAWAKI, A., TAKEDA, Y., YAMAMOTO, M., ZHAO, H.Y., SHIBAYAMA, Y., YAMADA, K., AKIYAMA, S. (2008). Hyperosmotic stress up-regulates the expression of major vault protein in sw620 human colon cancer cells. *Exp. Cell Res.*, **14**(16): 3017-3026.
- ITO, K., STANNARD, K., GABUTERO, E., CLARK, A.M., NEO, S., ONTURK, S., BLANCHARD, H., RALPH, S.J. (2012). Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.*, **31**: 763-778.
- JOHANSSON, B., POURIAN, M.R., CHUAN, Y., BYMAN, I., BERGH, A., PANG, S., NORSTEDT, G., BERGMEN, T., POUSETTE, A. (2006). Proteomic comparison of prostate cancer cell lines LNCaP-FGC and LNCaP-r reveals heatshock protein 60 as a marker for prostate malignancy. *The Prostate*, **66**: 1235-1244.
- KANEKO, T., KONNO, H., BABA, M., TANAKA, T., NAKAMURA, S. (2003). Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer. *Cancer Sci.*, **94**(1): 43-49.
- KARAS, M., HILLENKAMP, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. *Anal. Chem.*, **60**: 2299-2301.
- KARATAYLI, S.C.Ö., BOZDAYI, A.M. (2008). Proteomiks ve gastroenteroloji. *Güncel gastroenteroloji*, **12**(2): 72-76.
- KEIRA, S.M., FERREIRA, L.M., GRAGNANI, A., DUARTE, I.S., DOS SANTOS, I.A.N. (2004). Experimental model of fibroblast culture. *Acta Cir. Bras.*, **19**: 11-16.

- KLEIN, J.B., THONGBOONKERD, V. (2004). Overview of proteomics. *Contrib. Nephrol.*, **141**: 1-10.
- KLIJANIENKO, J., LAGACE, R. (2011). Soft Tissue Tumors: A Multidisciplinary, Decisional Diagnostic Approach. 1st Ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, p.: 197-207.
- KURBAN, S., MEHMETOĞLU, İ. (2010). Proteomik. *Yeni Tıp Degisi*, **27**: 70-75.
- LI, C., CHEN, Z., XIAO, Z., WU, X., ZHAN, X., ZHANG, X., LI, M., LI, J., FENG, X., LIANG, S., CHEN, P., XIE, J. (2003). Comparative proteomic analysis of human lung squamous carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **309**: 253-260.
- LIEBLER, D.C. (2005). Proteomics in Cancer Research. 1st Ed. New Jersey: Wiley-Liss, Chapter 1.
- LINK, A.J., LABAER, J. (2009). Proteomics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. 1st Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.: 1-13.
- MCANULTY, R.J. (2007). Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**: 666-671.
- MCKINNEL, R.G., PARCHMENT, R.E., PERANTONI, A.O., DAMJANOV, I., PIERCE, G.B. (2006). The Biological Basis of Cancer. 2nd Ed. New York: Cambridge University Press, p.: 145-193.
- MESCHER, A.L. (2013). Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 13th Ed. McGraw-Hill Medical, Chapter 5.
- MINAMIDA, S., IWAMURA, M., KODERA, Y., KAWASHIMA, Y., IKEDA, M., OKUSA, H., FUJITA, T., MAEDA, T., BABA, S. (2011). Profilin 1 overexpression in renal cell carcinoma. *Int. J. Urol.*, **18**(1): 63-71.
- NOHATA, N., SONE, Y., HANAZAWA, T., FUSE, M., KIKKAWA, N., YOSHINO, H., CHIYOMARU, T., KAWAKAMI, K., ENOKIDA, H., NAKAGAWA, M., SHOZU, M., OKAMOTO, Y., SEKI, N. (2011). miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, **2**: 29-42.
- O'FARRELL, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**(10): 4007-4021.
- PATTERSON, S.D., AEBERSOLD, R.H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.*, **33**: 311-323.
- PECORINO, L. (2012). Molecular Biology of Cancer: Mechanism, Targets and Therapeutics. 3rd Ed. United Kingdom: Oxford University Press, p.: 1-21.
- PINO, I., PIO, R., TOLEDO, G., ZABALEGUI, N., VICENT, S., REY, N., LOZANO, M.D., TORRE, W., GARCIA-FONCILLAS, J., MONTUENGA, L.M. (2003). Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer*, **41**(2): 131-143.

- RAMOS, A.D., BORELLAS, A.R., MELERO, A.G., ALEMANY, R.L. (2012). α -enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2012**: 1-12.
- ROSS, M.H., PAWLINA, W. (2011). Histology: A Text and Atlas. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, Chapter 6.
- ROZENBERG, P., KOCSIS, J., SAAR, M., PROHASZKA, Z., FUST, G., FISHELSON, Z. (2013). Elevated levels of mitochondrial mortalin and cytosolic hsp70 in blood as risk factors in patients with colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, **133**(2): 514-518.
- RUBPORN, A., SRISOMSAP, C., SUBHASITANONT, P., CHOKCHAMNANKIT, D., CHIABLAEM, K., SVASTI, J., SANGVANICH, P. (2009). Comparative proteomic analysis of lung cancer cell line and lung fibroblast cell line. *Cancer Genomics & Proteomics*, **6**: 229-238.
- SARDANA, G., MARSHALL, J., DIAMANDIS, E.P. (2007). Discovery of candidate tumor markers for prostate cancer via proteomic analysis of cell culture conditioned medium. *Clinical Chemistry*, **53**(3): 429-437.
- SASAKI, T., HANKINS, G.R., HELM, G.A. (2002). Major vault protein/lung resistance-related protein (MVP/LRP) expression in nervous system tumors. *Brain Tumor Pathol.*, **19**(2): 59-62.
- SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. (2001). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th Ed. McGraw-Hill, p.: 613-674.
- SHEN, H., HUANG, J., PEI, H., ZENG, S., TAO, Y., SHEN, L., ZENG, L., ZHU, H. (2013). Comparative proteomic study for profiling differentially expressed proteins between chinese left and right sided colon cancers. *Cancer Science*, **104**(1): 135-141.
- STULTS, J.T., ARNOTT, D. (2005). Proteomics. *Methods Enzymol.*, **402**: 245-289.
- SÜMBÜLOĞLU, K., SÜMBÜLOĞLU V. (2002). Biyoistatistik. Hatipoğlu yayınları. 10. Baskı, Ankara.
- TAI, I.T., TANG, M.J. (2008). SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resistance Updates*, **11**(6): 231-246.
- TAKAHASHI, N., ISOBE, T. (2007). Proteomic Biology Using LC-MS: Large Scale Analysis of Cellular Dynamics and Function. 1st Ed. New Jersey: Wiley-Interscience, Chapter 1.
- TAKANO, S., WADHWA, R., YOSHII, Y., NOSE, T., KAUL, S.C., MITSUI, Y. (1997). Elevated levels of mortalin expression in human brain tumors. *Exp. Cell Res.*, **237**: 38-45.
- TAN, H.T., LEE, Y.H., CHUNG, M.C.M. (2012). Cancer proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, **31**: 583-605.
- TAN, S., TAN, H.T., CHUNG, M.C.M. (2008). Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*, **8**: 3924-3932.

- WANG, D., TIAN, X., JIANG, Y. (2012). NDRG1/Cap43 overexpression in tumor tissues and serum from lung cancer patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **138**(11): 1813-1820.
- WANG, T.H., CHAO, A., TSAI, C.L., CHANG, C.L., CHEN, S.H., LEE, Y.S., CHEN, J.K., LIN, Y.J., CHANG, P.Y., WANG, C.J., CHAO, A.S., CHANG, S.D., CHANG, T.C., LAI, C.H., WANG, H.S. (2010). Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. *Mol. Cell Proteomics*, **9**(9): 1873-1884.
- WATT, F.M. (1986). The extracellular matrix and cell shape. *Trends in Biochemical Sciences*, **11**: 482-485.
- WEISS, S.W., GOLDBLUM, J.R. (2008). Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors. 5th Ed. Philadelphia: Mosby, Chapter 11.
- WESTERMEIER, R., NAVEN, T., HOPKER, H.R. (2008). Proteomics in Practice. 2nd Ed. Darmstadt: Wiley-VCH, p.: 1-15.
- WIIG, H., RUBIN, K., REED, R.K. (2003). New and active role of the interstitium in control of interstitial fluid pressure: potential therapeutic consequences. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, **47**(2): 111-121.
- WILKINS, M.R., SANCHES, J.C., GOOLEY, A.A., APPEL, R.D., SMITH, I.H., HOCHSTRASSER, D.F., WILLIAMS, K.L. (1995). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **13**: 19-50.
- WILM, M., SHEVCHENKO, A., HOUTHAEVE, T., BREIT, S., SCHWEIGERER, L., FOTSIS, T., MANN, M. (1996). Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, **379**: 466-469.
- WONG, S.L. (2008). Diagnosis and management of desmoid tumors and fibrosarcoma. *J. Surg. Oncol.*, **97**: 554-558.
- XUE, H., LU, B., LAI, M. (2008). The cancer secretome: a reservoir of biomarkers. *J. Transl. Med.*, **6**: 52.
- YANG, M.S., WANG, H.S., WANG, B.S., LI, W.H., PANG, Z.F., ZOU, B.K., ZHANG, X., SHI, X.T., MU, D.B., ZHANG, D.X., GAO, Y.S., SUN, X.W., XIA, S.J. (2013). A comparative proteomic study identified calreticulin and prohibitin up-regulated in adenocortical carcinomas. *Diagnostic Pathology*, **8**(58): 1-8.
- YI, X., LUK, J.M., LEE, N.P., PENG, J., LENG, X., GUAN, X.Y., LAU, G.K., BERETTA, L., FAN, S.T. (2008). Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence. *Mol. Cell Proteomics*, **7**(2): 315-325.
- YIN, J., CHEN, G., LIU, Y., LIU, S., WANG, P., WAN, Y., WANG, X., ZHU, J., GAO, H. (2010). Downregulation of SPARC expression decreases gastric cancer cellular invasion and survival. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **29**(59): 1-9.

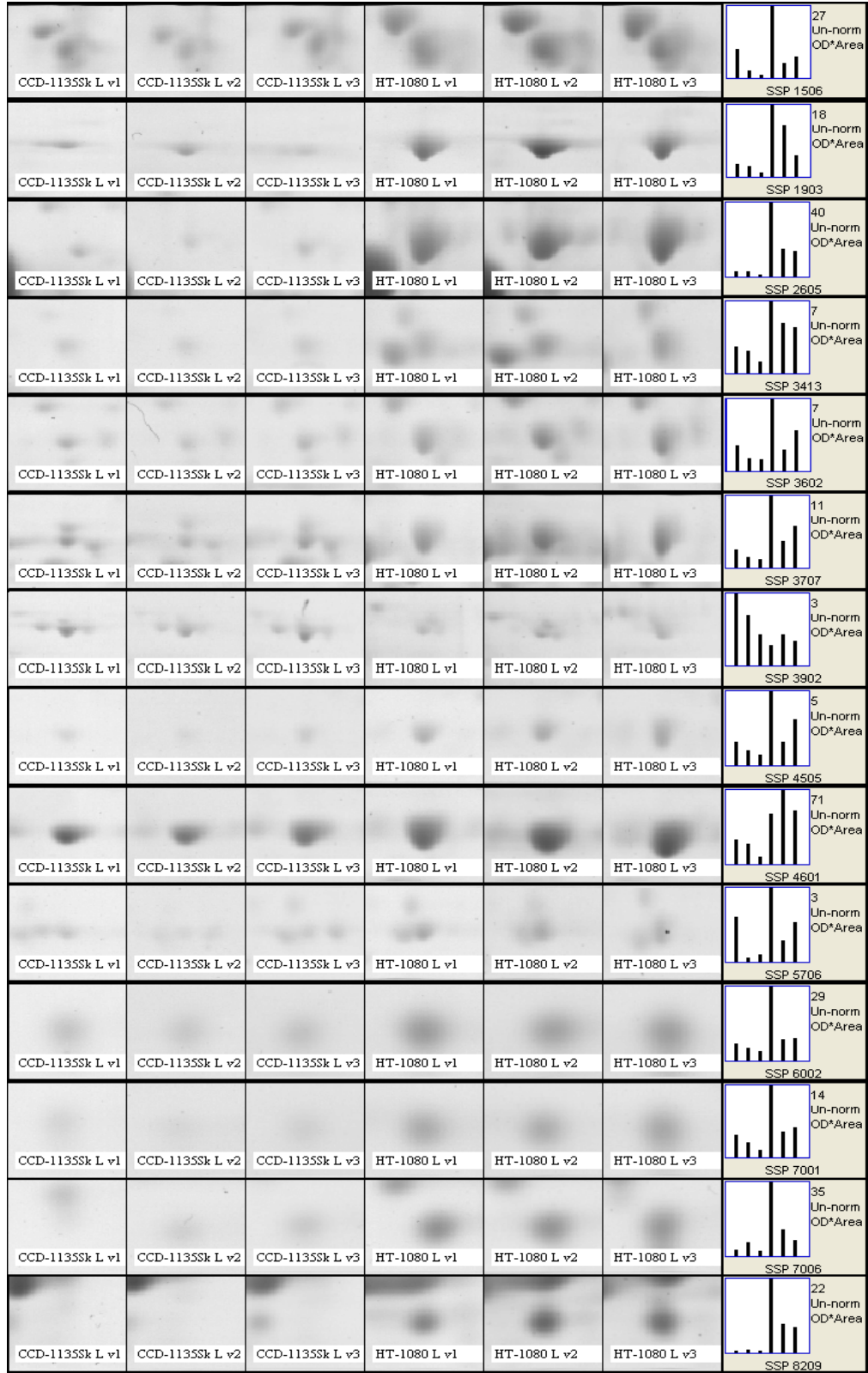
- ZANG, J., WANG, P., GAO, S., XIAO, D., ZHANG, J., WANG, K. (2008). Differential proteins expression between gastric cancer and normal cell lines. *Life Science Journal*, **5**(4): 28-32.
- ZWICKL, H., TRAXLER, E., STAETTNER, S., PARZEFALL, W., KRAUPP, B.G., KARNER, J., HERMANN, R.S., GERNER, C. (2005). A novel technique to specifically analyze the secretome of cells and tissues. *Electrophoresis*, **26**: 2779-2785.

EKLER**Ek - 1** Fibrosarkoma hücre lizati örnek tekrarlarının 2D-PAGE görüntüleri.

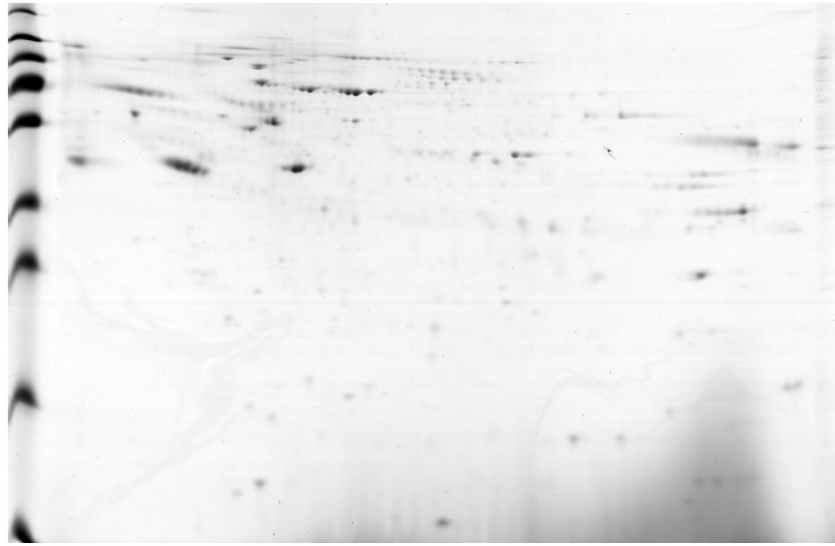
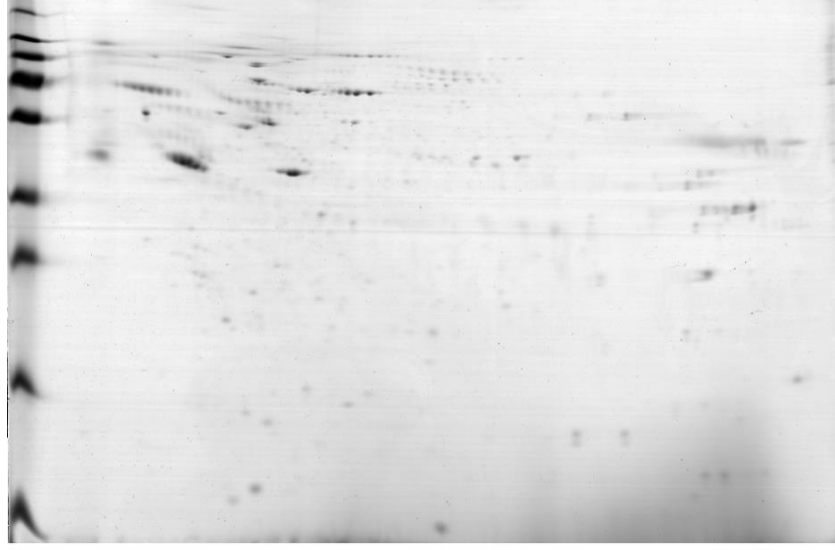
Ek - 2 Fibroblast hücre lizatı örnek tekrarlarının 2D-PAGE görüntüleri.



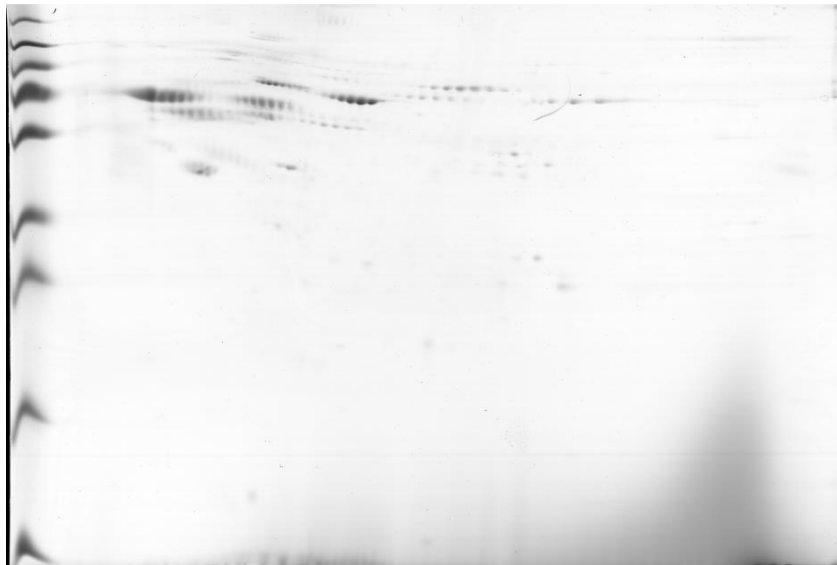
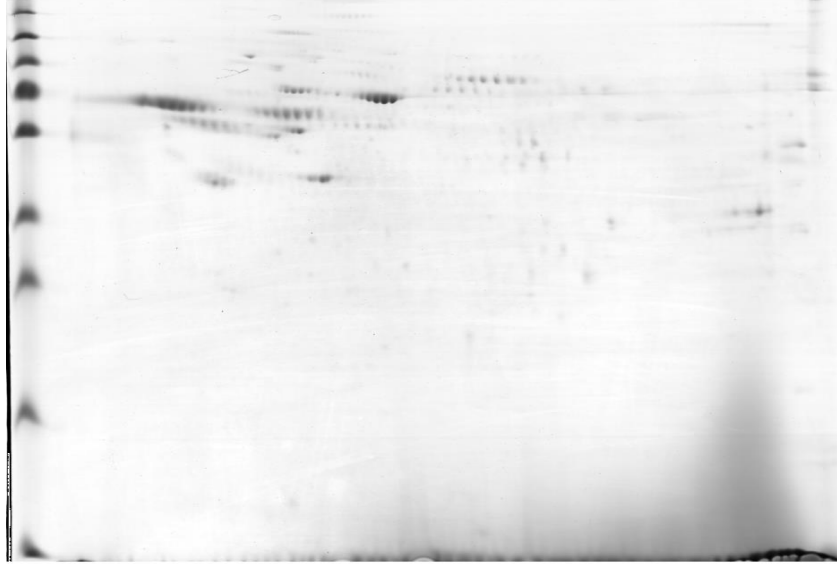
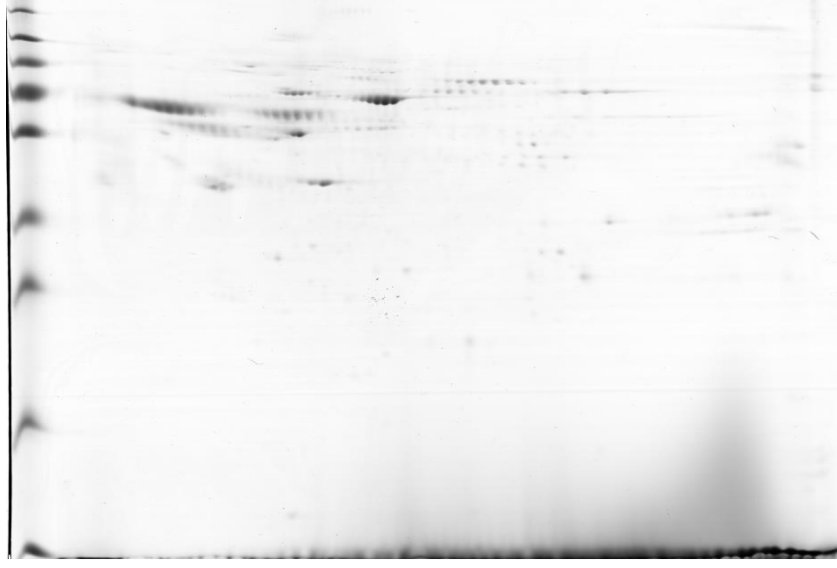
Ek - 3 Hücre lizatı grubunda identifiye edilen proteinlerin spot görüntüleri ve dansite grafikleri.



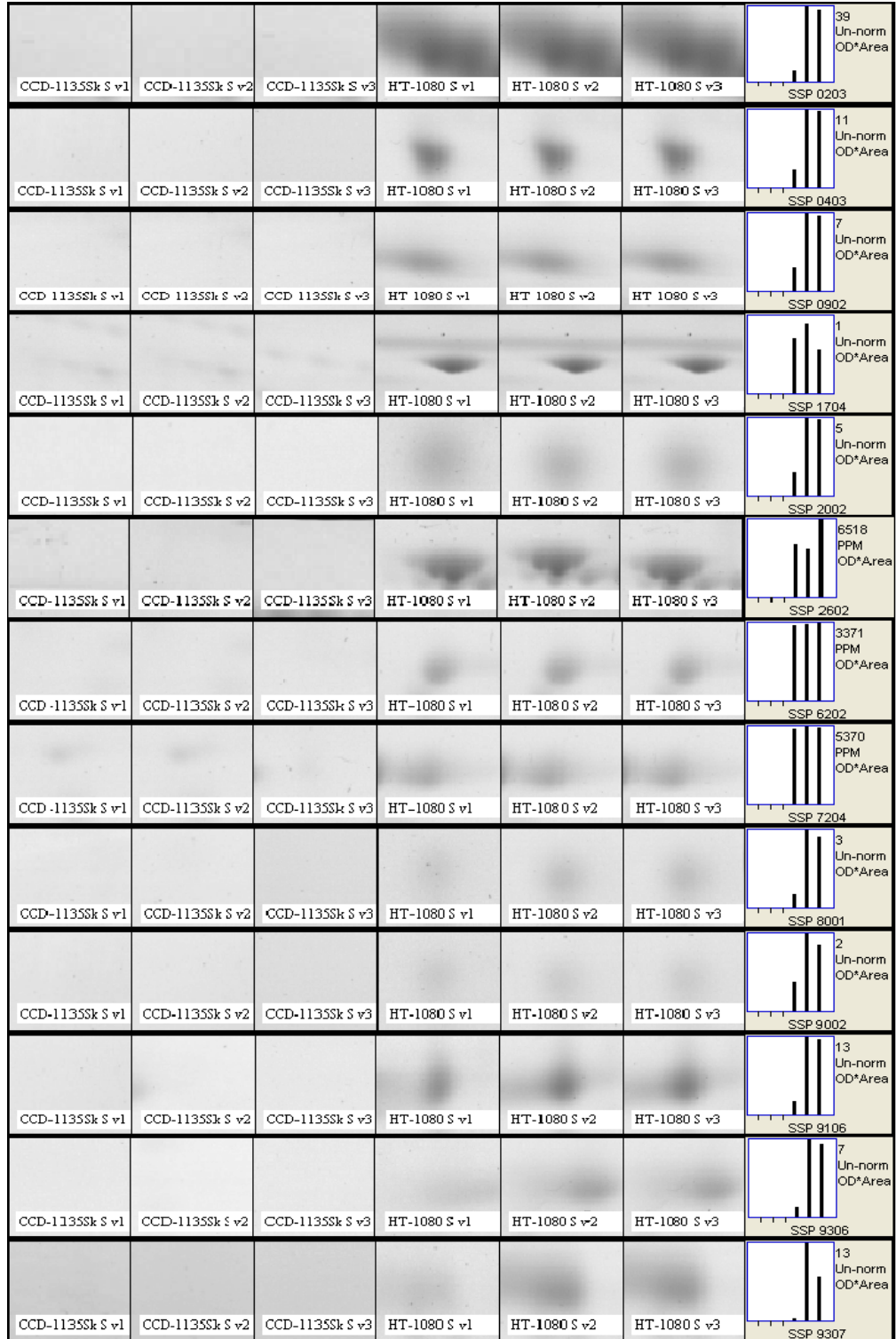
Ek -4 Fibrosarkoma sekretom örnek tekrarlarının 2D-PAGE görüntüleri.



Ek - 5 Fibroblast sekretom örnek tekrarlarının 2D-PAGE görüntüleri.



Ek - 6 Sekretom grubunda identifiye edilen proteinlerin spot görüntüleri ve dansite grafikleri.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler:

Adı: Öğünç
Soyadı: Meral
Doğum yeri ve tarihi: İzmir, 25.06.1984
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Bekar
Askerlik durumu: Tecilli (17.04.2014)
İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı Dışkapı/ANKARA
omer al@ankara.edu.tr
0 533 253 78 91

II- Eğitim:

Doktora: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya A.D. (2007-2013)
Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2002-2007)
Lise: T.E.D. Özel Aliğa Lisesi (2002)

Yabancı Dili: İngilizce

III- Ünvanları:

Araştırma Görevlisi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim
Dalı, Nisan 2009 - Devam ediyor

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Bilimsel Makaleler:

Öztürk H., Demirtaş A., Salgırlı Y., **Meral Ö.**, Pişkin İ., Emre B., Fidancı U. R. (2011) “Üzüm çekirdeği ekstraktının rumen mikroorganizmalarının fermentasyon aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri”, *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 22 (1): 1-6.

Kismali G., Emen F.M., Yesilkaynak T., **Meral O.**, Demirkiran D., Sel T., Kulcu N., (2012) “The cell death pathway induced by metal halide complexes of pyridine and derivative ligands in hepatocellular carcinoma cells–necrosis or apoptosis?”, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 16 (8): 1001-1012.

Ulusal ve Uluslararası Kongrelerdeki Bildiriler:

Pekcan M., Özkurt Borazan G., Çamkerten İ., Demirkiran D., **Meral Ö.**, Can Mutan O., Karagül H., “Plasma Paraoxonase and Ceruloplasmin Levels of Sheep with Enzootic Pneumonia”, Türk-Alman Üniversiteleri İşbirliğinin Tarım Alanındaki Bilimsel Araştırma Sonuçları IX. Uluslararası Sempozyumu. 22-27 Mart 2010 Hatay/Türkiye

Kismali G., Emen F.M., Yesilkaynak T., **Meral O.**, Demirkiran D., Sel T., Kulcu N., “Karaciğer Kanseri Hücrelerinde Karışık Pridin Türevli Halojen Komplekslerinin Anti-tümör Etkinliğinin Araştırılması”, III. Anorganik Kimya Kongresi. 19-22 Mayıs 2011 Çanakkale/Türkiye

Öztürk H., Demirtaş A., Salgırlı Y., **Meral Ö.**, Pişkin İ., Emre B., Fidancı U. R. “Üzüm Çekirdeği Ekstraktının Rumen Mikroorganizmalarının Fermentasyon Aktivitesi Üzerine *in vitro* Etkileri”. VI. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi, 29 Haziran – 2 Temmuz 2011, Samsun/Türkiye.

Pekcan M., Özgür E., Kısmalı G., **Meral Ö.**, Demirkıran D., Öztürk G. G., Seyhan N. “Baz İstasyonundan Yayılan 3g Cep Telefonu Radyasyonunun Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattında 14-3-3 Protein Ailesine Etkisi”. V. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 6 – 8 Eylül 2011, Aydın/Türkiye.

Meral Ö., Pekcan M., Uysal H., Karagül H. “Kedi ve Köpek Plazma Albumin Saflaştırılmasında İyon Değişim Kromatografisi ve Etanol Çöktürme Tekniğinin Birlikte Kullanımı”. VI. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25 - 27 Haziran 2013, Kars/Türkiye.

Nasiri F., Güneş V., **Meral Ö.**, Pekcan M., Kısmalı G., Salmanoğlu B., Sel T. “İçme Sularında Yüksek Nitrat Bulunan Akkaraman Koyunlarında Serum Seruloplazmin, Paraoksanaz ve Nitrik Oksit Düzeyleri”. VI. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25 - 27 Haziran 2013, Kars/Türkiye.

V- Bilimsel Etkinlikler:

Katıldığı Bilimsel Toplantılar ve Kurslar:

- Akredite Veteriner Hekim Sertifikası-ISO 22000, 14-16 Nisan 2007, ANKARA
- Protein Analitiği Lisansüstü Yaz Okulu, 20 - 26 Eylül 2009, MUĞLA
- Proteomik Araştırmaları Temel Bilgiler ve Uygulama Örnekleri, 10 - 11 Aralık 2009, İSTANBUL
- III. Ankara Tıp Biyokimya Günü, 13 Nisan 2010, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, ANKARA
- III. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, 1 - 2 Kasım 2010, ANKARA
- Klinik Laboratuvarlarda Analitik Kalite Yönetimi ve Referans Aralıkları Hesaplama Kursları, 16-18 Aralık 2010, İZMİR

- II. Kök Hücre Kursu ve VI. Kök hücre Sempozyumu, 24-25 Haziran 2011, ANKARA
- V. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 6 - 8 Eylül 2011, AYDIN
- Laboratuvar Güvenliği – Laminar Flow ve Biyolojik Kabin Teknolojisi, Sitotoksik ve İnsan Sağlığı Açısından Tehlikeli İlaçlarla Güvenli Bir Şekilde Çalışma, Eğitim Semineri, 29 Eylül 2011, ANKARA
- V. Ankara Tıp Biyokimya Günü, 17 Nisan 2012, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, ANKARA
- II. Ulusal HPV ve Kanser Sempozyumu, 30 Nisan 2012, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, ANKARA
- Biyokimya Laboratuvar Eğitimine çok Disiplinli Yaklaşım Çalıştayı, 3-4 Mayıs 2012, ANKARA
- VI. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25 - 27 Haziran 2013, KARS

Görev Aldığı Projeler:

ANKARA ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ: 12B3338001 “Fibrosarkoma ve Deri Fibroblast Hücre Hatlarının Karşılaştırmalı Proteomik ve Glikobiyolojik Analizleri”, Yardımcı Araştırmacı, 2012.

TAGEM (Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü) PROJESİ: TAGEM/HAYSÜD/11/13/02/03 “Yumurtacı Tavuklarda Thermoregülasyonun Epigenetik Adaptasyon Yoluyla Geliştirilmesi”, Yardımcı Araştırmacı, 2011.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ: TF.01/2010-14 “Radyo Frekans Alanın Biyolojik Etki Mekanizmaları: Hamile ve Yeni Doğan Tavşanların Dokularında Reaktif Oksijen Ürünleri ve Apoptozis”, Yardımcı Araştırmacı, 2010.

VI- Diğer Bilgiler:

- Freie University Institute of Veterinary Biochemistry
2-D Flourescence Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) ve iki boyutlu
jel elektroforezi sonrası kütle spektrometresi için örnek hazırlanması
konularında eğitim alma, Hayat Boyu Öğrenme – Erasmus Öğrenim
Hareketliliği Programı
10 Ekim 2011 – 7 Ocak 2012 Berlin/ALMANYA