

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANKAFERD HEMOSTAT' IN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINA
ETKİSİNİN PROTEOMİK ANALİZLERLE İNCELENMESİ**

Kim. Özge Cansın ZEKİ

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2019**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANKAFERD HEMOSTAT' IN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINA
ETKİSİNİN PROTEOMİK ANALİZLERLE İNCELENMESİ**

Kim. Özge Cansın ZEKİ

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ**

**ANKARA
2019**

ONAY SAYFASI

ANKAFERD HEMOSTAT'IN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINA ETKİSİNİN
PROTEOMİK ANALİZLERLE İNCELENMESİ

Kim. Özge Cansın Zeki

Danışman: Prof. Dr. İncilay Süslü

Bu tez çalışması 11.07.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Analitik Kimya Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Nursabah Elif Başçı Akduman
(Hacettepe Üniversitesi)



Tez Danışmanı:

Prof. Dr. İncilay Süslü
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Doç. Dr. Mustafa Çelebier
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Doç. Dr. Ayşe Ercan
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Doç. Dr. İsmail Murat Palabıyık
(Ankara Üniversitesi)



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

19 Temmuz 2019



Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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



11/07/2019

Özge Cansın ZEKİ

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

(1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*

(2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*

(3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

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



11/07/2019

Kim. Özge Cansın ZEKE

TEŞEKKÜR

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

Yüksek lisans eğitimim boyunca sağladığı olanaklarla bana her zaman destek olan, bilgi ve birikimleri ile yol gösteren Doç. Dr. Emirhan Nemutlu ve Doç. Dr. Mustafa Çelebier hocalarıma teşekkür ederim.

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

Tez çalışmalarım sırasında verdikleri destek ve katkıları ile her zaman yanımda olan Dr. Ecz. Merve Nenni' ye, Dr. Kim. Engin Koçak' a, Uzm. Kim. Ozan Kaplan' a ve Uzm. Kim. Cemil Can Eylem' e aynı zamanda yakın arkadaşlıkları için teşekkür ederim.

Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nursabah Elif Başçı' ya ve Analitik Kimya Anabilim Dalı' nın Öğretim Üyelerine, teorik ve pratik derslerde öğrettikleri eşsiz bilgiler, bilgi ve birikimime sağladıkları katkılar, gösterdikleri yakınlık, ilgi, samimiyet ve yardımları için teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan ve tüm hayatım boyunca üzerimden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili babam Alaattin ve sevgili annem Filiz' e minnettarlığımı sunarım.

Yardım ve desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim sevgili arkadaşlarım Selçuk ve İlknur' a teşekkür ederim.

ÖZET

Zeki, Ö.C. Ankaferd Hemostat' ın MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattına Etkisinin Proteomik Analizlerle İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019. Günümüzde tedavisi en zor olan ve ölümcül hastalıkların başında gelen kanserle ilgili çok sayıda araştırma gerçekleştirilmektedir. Bu araştırmalardan biri olan omik tekniklerden proteomik analizler; kanser, protein düzeyinde incelenerek kanser hastalığının oluşum mekanizması, teşhis ve tedavisi ile ilgili mevcut klinik çalışmalara destek olunmasının yanı sıra yeni alternatiflere ışık tutmaktadır. Bu tez çalışması, MCF-7 meme kanseri hücre hattının Ankaferd Hemostat (ABS; Ankaferd Blood Stopper®) ile farklı sürelerde muamele edilmesi sonucunda, ABS ile muamele edilmemiş (kontrol, C grubu) ve ABS ile muamele edilmiş hücrelerde (işlenmiş, T grubu) gerçekleştirilen karşılaştırmalı proteomik çalışmalar yapılmıştır. Böylece ABS' nin etkisi, MCF-7 meme kanseri hücre hattına *in vitro* olarak uygulandıktan sonra moleküler düzeyde incelenmiştir. Bu çalışmada, C ve T gruplarına ait proteinler iki boyutlu jel elektroforez ile ayrılmıştır. ABS uygulandıktan sonra azalan veya artan miktarlarda ifade edilen proteinler imaj analizi çalışmaları yapılarak tespit edilmiştir. C ve T gruplarının karşılaştırılması sonucunda nicel olarak en az 2 kat farklılaşmış olan proteinler, matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon, uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF/TOF-MS) ile analiz edilmiş ve peptid dizileme çalışmaları ile tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinler, veri bankaları yardımıyla taranmış ve fonksiyonları ile protein-protein etkileşimleri belirlenmiştir. String ve KEGG veri tabanları aracılığıyla da ABS' nin, kanser hücrelerinde etkilediği biyolojik süreçler ve yollar tespit edilmiştir. Elde edilen proteinler, ABS' nin antikanser aktivitesini proteom düzeyinde açıklamak amacıyla kaynaklardaki çalışmalarla ilişkilendirilmiştir.

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

ABSTRACT

Zeki, Ö.C. Investigation of Ankaferd Hemostat's Effect on MCF-7 Breast Cancer Cell Line by Proteomic Analysis, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Analytical Chemistry Program Master Thesis, Ankara, 2019. Nowadays, a large number of cancer-related research is being conducted, which is one of the most difficult and deadly diseases to treat. Thanks to one of these studies, proteomics analysis, which is one of the omic techniques, cancer can be examined at the protein level and shed light on new alternatives as well as supporting current clinical studies related to the mechanism of diagnosis, treatment and diagnosis of cancer. In this study, after the MCF-7 breast cancer cell line was treated with Ankaferd Hemostat (ABS; Ankaferd Blood Stopper®) for different periods of time, comparative proteomic studies performed on ABS untreated (control, C group) and ABS treated cells (treated, T group). Thus, the effect of ABS was examined at molecular level after being applied *in vitro* on MCF-7 breast cancer cell line. In this study, proteins belonging to C and T groups were separated by two-dimensional gel electrophoresis. After ABS were applied, decreasing or increasing amounts of proteins were determined by image analysis studies. As a result of comparison of C and T groups, proteins which were Quantitatively differentiated at least 2-fold were analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization, flight time mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF-MS) and identified by peptide sequencing studies. The identified proteins were searched with the help of databases and their functions and protein-protein interactions were determined. The biological processes and pathways that ABS has affected on MCF-7 breast cancer cell have been identified with the database of String and KEGG. The obtained proteins were associated with the studies in the literature in order to explain the anticancer activity of ABS at the proteome level.

Keywords: Proteomics, Breast cancer, Two-dimensional (2D) gel electrophoresis, MALDI-TOF/TOF-MS, Ankaferd Hemostat.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Protein Tanımı ve Yapısı	5
2.2. DNA ve Proteinin Hücre İçinde Sentezi	7
2.3. Gen ve Genom Kavramları	8
2.4. Proteom ve Proteomik Kavramları	9
2.5. Proteomik ve Genomik İlişkisi	11
2.6. Bir Gen - Bir Enzim Hipotezi ve İnsan Genom Projesi	12
2.7. Kıyaslamalı, Yapısal ve İşlevsel Proteomik Teknikler	14
2.8. Proteomik Araştırma Stratejileri	15
2.9. Proteomik Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler	17
2.10. İki Boyutlu (2D) Jel Elektroferez	18
2.11. Proteomik Çalışmalarda Kütle Spektrometrisi	26
2.11.1. İyonlaştırma Kaynakları	28
2.11.2. Kütle Analizörü ve Dedektör	30
2.12. Peptid Dizileme ve De Novo Dizileme Çalışmaları	32
2.13. Protein Veri Bankaları ve Protein Modifikasyonları	34

2.14. Kanser ve Proteomik Analizler	34
2.14.1. Meme Kanseri	37
2.15. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı	40
2.16. Kanser Tedavisinde Kullanılan Geleneksel ve Alternatif Yöntemler	41
2.17. Ankaferd Hemostat (ABS, Ankaferd Blood Stopper®)	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM	50
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	54
3.2. Sitolitik Fraksiyon Eldesi	55
3.3. Protein Miktar Tayini	55
3.4. Proteinlerin Çöktürülmesi	56
3.5. Proteinlerin IPG Şeride Yüklenmesi	57
3.6. IEF Basamağı (1. Boyut)	59
3.7. SDS - PAGE Basamağı (2. Boyut)	62
3.8. Jellerin Boyanması ve Görüntülenmesi	66
3.9. İmaj Analizi Çalışmaları	67
3.10. Proteinlerin MALDI-TOF/TOF-MS ile Analizleri ve Peptid Dizileme Yöntemi (PMF) ile Proteinlerin Tanımlanması	68
3.11. Farklılaştığı Tespit Edilen Proteinlerin Fonksiyonları ve Birbirleriyle Etkileşimleri	69
4. BULGULAR	70
4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	70
4.2. Protein Miktar Tayini	70
4.3. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Yapılan Proteomik Çalışmalar	71
4.3.1. İmaj Analiz Sonuçları	71
4.3.2. Proteinlerin Karakterizasyonu	78
5. TARTIŞMA	81
5.1. Karakterize Edilen Proteinlerin Literatür Verileri ile Fonksiyonlarının Araştırılması ve Proteomik Analiz Sonuçlarının Yorumlanması	98
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	103
7. KAYNAKLAR	107

8. EKLER

Ek-1: Ankaferd Blood Stopper®' in Ruhsat Belgesi

Ek-2: Orjinallik Raporu

Ek-4: Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

2D	2 boyutlu
ABS	Ankaferd Hemostat (Ankaferd Blood Stopper®)
ATCC	American Type Culture Collection, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC)
CE	Kapiler elektroforez
DMBA	7,12-dimetilbenz [a]antrasen
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	DL-Ditiyotreitol
ER	Endoplazmik retikulum
ERAD	Endoplazmik retikulumla ilişkili bozulma
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
GN	Gene name, gen adı
GO	Gen ontolojisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IAA	İyodoasetamit
IEF	İzoelektrik odaklama
IEX	İyon değişim kromatografisi
IR	İnfrared
IPG	İmmobilize pH gradyan
LC	Sıvı kromatografisi
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi
m/z	Kütle/yük
MALDI	Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon
MALDI-TOF/TOF-MS	Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon, uçuş zamanlı kütle spektrometrisi
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MS	Kütle spektrometrisi

MS/MS	Tandem kütle spektrometrisi
NMR	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NP	Normal faz kromatografisi
OS	Organism name, organizma adı
PE	Protein existence, protein varlığı
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pI	İzoelektrik nokta
PMF	Peptid dizileme yöntemi
PTM	Translasyon sonrası modifikasyon
RP	Ters faz kromatografisi
RPLC	Ters faz sıvı kromatografisi
SCX	Boyut dışlama kromatografisi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEC	Boyut-eleme kromatografisi
SSP	Seçilmiş spot pozisyonu
SV	Sequence Version, dizi sürümü
TCA	Triklorasetik asit
TOF	Time of flight, uçuş zamanlı kütle analizörü
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik
UPR	Katlanmamış protein cevabı
UV	Ultraviyole
vb.	ve benzeri
WAX	Zayıf anyon değişimi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İki ayrı aminoasitteki karboksil ve amino gruplarının reaksiyonu sonucunda oluşan peptid bağı ve peptid bağında aynı düzlemde yer alan atomlar.	5
2.2. Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları (18).	6
2.3. DNA çift sarmalı (19).	7
2.4. Proteinlerin hücre içinde sentezi (21).	8
2.5. Tırtıl ve kelebeğin protein profilinin değişimiyle birlikte geçirmiş olduğu morfolojik değişim.	11
2.6. İribaş ve kurbağanın protein profillerinin değişimi ile geçirmiş olduğu morfolojik değişim	12
2.7. Proteomik stratejileri (43).	16
2.8. 2D jel elektroforez tekniği.	20
2.9. Proteinlerin kendi pI' larına göre ayırımı.	22
2.10. Ticari IPG şeritler (67).	23
2.11. SDS öncesi ve SDS ile muamele sonrası moleküllerin yükleri (70).	24
2.12. Proteinlerin poliakrilamid jel üzerinde kütlelerine göre farklı hızlarda gerçekleşen göçü (71).	25
2.13. SDS-PAGE uygulamasının şematize edilmiş hali (54).	25
2.14. Kütle spektrometresinin genel şeması (78).	27
2.15. ESI sistemi (83).	29
2.16. MALDI lazer iyonlaştırma tekniği (88).	30
2.17. MALDI-TOF/TOF-MS cihazının şematik gösterimi (89).	31
2.18. Peptidlerin parçalanması sonucu oluşan "b" ve "y"türü iyonlar (96).	33
2.19. "ANELLVVK" peptidinin Tandem-MS ile analizi sonucunda elde edilen b ve y iyonlarını gösteren spektrum (99).	33
2.20. Düşük ve yüksek yoğunluktaki MCF-7 meme kanseri hücre görüntüleri (142).	41

3.1.	Numunenin IPG şerit tablasına uygulanması.	58
3.2.	IPG şerit üzerindeki koruyucu bandın pens ile çıkarılması.	58
3.3.	IPG şeridin numune üzerine yerleştirilmesi.	59
3.4.	IEF odaklama tablasına elektrot kâğıtlarının yerleştirilmesi.	60
3.5.	Mineral yağın odaklama tablasındaki şeritlerin üzerine eklenmesi.	61
3.6.	Elektrot ağırlıklarının odaklama tablası üzerine yerleştirilmesi.	61
3.7.	Bio-Rad marka Protean IEF sistemi.	62
3.8.	Elektroforez hücresi (209).	63
3.9.	SDS-PAGE jellerin elektroforez hücresine yerleştirilmesi.	64
3.10.	IPG şeridin yerleştirilmesi, marker eklenmesi ve sıcak agaroz jelin uygulanması.	65
3.11.	Elektroforez hücresi ve güç kaynağı.	66
4.1.	Bio-Rad™ protein miktar tayininde elde edilen kalibrasyon eğrisi.	70
4.2.	C ve T grubuna ait 3 tekrarlı analiz sonucu elde edilen jel görüntüleri.	72
4.3.	C grubuna ait MCF-7 hücrelerinin jel görüntüsü.	73
4.4.	T grubuna ait MCF-7 hücrelerinin jel görüntüsü.	74
4.5.	208 SSP numaralı spota ait görüntü.	74
4.6.	1901 SSP numaralı spota ait görüntü.	75
4.7.	3603 SSP numaralı spota ait görüntü.	75
4.8.	3606 SSP numaralı spota ait görüntü.	76
4.9.	4905 SSP numaralı spota ait görüntü.	76
4.10.	7704 SSP numaralı spota ait görüntü.	77
4.11.	1209 SSP numaralı spota ait görüntü.	77
4.12.	"Endoplasmin" proteinin "GLFDEYGSK" peptidine ait tüm iyonlar ile "b" ve "y" türü iyon fragmentlerinin spektrumu.	79
5.1.	MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ABS' nin etkisiyle farklılaşan proteinlerin birbirleriyle etkileşimi (221).	89
5.2.	ER' da protein işleme yolağı (223).	91
5.3.	RNA bozunma yolağı (224).	92
5.4.	Östrojen sinyal yolağı (225).	93

5.5. Kanser yolağı (226).

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1.	MCF-7 meme kanseri hücre hattına ait genel bilgiler (141).	40
2.2.	Ampul formundaki ABS' nin içeriği (194).	47
3.1.	Kullanılan hücre hattı.	50
3.2.	Kullanılan kimyasal malzemeler.	50
3.3.	Satın alınan ticari tampon çözeltiler.	51
3.4.	Hazırlanan çözeltiler ve tamponlar.	51
3.5.	Kullanılan sarf malzemeler.	52
3.6.	Kullanılan cihaz ve ekipmanlar.	53
3.7.	Kullanılan yazılım ve veri tabanları.	53
3.8.	IEF' de pH 4 - 7 IPG şeritler için uygulanan program.	62
4.1.	MCF-7 hücrelerinin ABS ile muamelesi sonucunda nicel olarak düşük ve yüksek miktarlarda saptanan proteinler.	78
4.2.	"Endoplasmin" proteininin "GLFDEYGSK" peptidine ait amino asit dizisi.	80
5.1.	MCF-7 hücre hattının ABS ile muamelesi sonucu tanımlanan kümelerdeki ve MALDI-TOF/TOF-MS analizi için belirlenen spot sayıları.	84
5.2.	MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat ABS' nin muamelesi sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapıları ve fonksiyonları (220).	86

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun yaşama dair ilgi ve merakı, birçok buluşun ortaya çıkmasını ve bilimsel yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Anton Van Leeuwenhoek' un buluşu ve geliştirilmesinde büyük katkı sağladığı mikroskop, insanların gözle görülemeyen yapılara dair bilgi sahibi olmasını sağlamış ve böylece birçok araştırma için temeller atılmıştır. Ardından, önce hücre sonra çekirdek tanımlanarak, DNA' nın çift sarmal yapısı, ilk defa 1953 yılında Nature dergisinde, yayınlanan makale ile aydınlatılmaya çalışılmıştır (1). İlk gen diziliminin oluşturulmasıyla birlikte insan genom şifresinin çözülmesine dair araştırmalarda büyük ilerleme sağlanmıştır (2).

Genom, organizmanın kromozom yapılarında bulunan genetik bilginin tümünü kapsayan ve tanımlayan bir kavramdır (3, 4). Genom üzerinde bulunan, transkripsiyonu gerçekleştirilen, düzenleyici ve fonksiyonel bölümleri olan bölgeler ise gen olarak tanımlanmaktadır (5). Genom ve genlerle ilgili fonksiyonel bilginin açıklanması için gerçekleştirilen çalışmaların tümü şeklinde özetlenen genomik (4); genlerin birbirleriyle ilişkilerinin ortaya konması, canlılarda bulunan genlerin tanımlanması, genlerin üretimleri ve fonksiyonlarının araştırılmasına aracılık etmektedir (3).

Günümüzde insan genomu ile beraber, virüs, bakteri ve ökaryotlar gibi birçok organizmaya ait olan genom dizilimleri belirlenmiştir. 1990' lı yıllarda gerçekleştirilen "İnsan Genom Projesi" sayesinde insan genom dizilimi belirlenebilmiş ve ilk sonuçları, insan genomunun % 99.9 kadarının insanların tümünde aynı olan yaklaşık olarak 3.109 nükleotidden meydana geldiği ve 20.500 kadar gen içerdiği ortaya konmuştur (6).

İnsan Genom Projesi' nin tamamlanması ile birlikte projenin sonucunda kronik hastalıklarla ilgili genlerin ortaya çıkarılması, hastalıkların teşhisi ve tedavisine yönelik yeni ufukların açılmasına ve böylece yeni ilaçların geliştirilmesine dair yeni beklentiler oluşturmuştur. Ancak; kronik hastalıkların oluşmasında genlerin etkisi oldukça azdır ve tek başına genomik çalışmalarla söz konusu organizmanın, geni hangi miktarda kullandığına dair bir bilgiye ulaşılamamaktadır. Bir gen birden fazla biyolojik fonksiyona sahip olan proteinleri kodlamakta ve bu proteinler translasyon sonrası değişimlere uğramaktadır. Posttranslasyonel modifikasyonlar olarak tanımlanan translasyon sonrası modifikasyon

(PTM)' lar, gen işlevinden bağımsız olarak ilerlemektedir (7). Tek başına genomik çalışmalardan elde edilen bulgular ile hastalıkların önlenmesi, teşhisi ve tedavi edilmesinin mümkün olmadığı; proteinlerin meydana getirdiği karmaşık ağdaki bilginin genomik bilgiye göre daha çok olduğu ve bu karmaşık ağdaki bilgiye sadece genomik bilgilerle ulaşamayacağı ortaya konmuştur (8). Proteinlerin tanımlanması ile hücre içinde ve hücreler arasında oluşan kimyasal olayların anlaşılması, hücrelerin canlılığının korunması, hücre çeşitliliğinin sağlanması ve hücre yapısının gelişmesi şeklindeki sorulara yanıt bulunabilecektir.

Proteomik, proteomun tanımlanması işlemidir (9). Proteom, genom tarafından kodlanmış olan bütün proteinleri tanımlar (10). Proteom, belirli bir zaman ve mekânda, organizmanın sahip olduğu ve eksprese ettiği proteinlerin tamamı olup genler tarafından kodlanan polipeptid yapılarının yanı sıra, aynı zamanda PTM' leri de içermektedir. "Mekân" terimiyle farklı proteinlerin değişik hücre tiplerinde ve bölümlerindeki ifadesi olarak tanımlanırken, "zaman" terimi ise farklı gelişim evreleri, hastalıklar, çevresel koşullar ve yaşlılık gibi süreçleri ifade etmektedir (3). Proteom doku ve hücrelere, hücre döngüsündeki evrelere, çevre koşullarına ve benzeri durumlara göre farklılık gösteren dinamik bir yapıdır (9). Genomiğin aksine dinamik bir kavram olarak tanımlanan proteomik, değişik koşullarda hücre, doku ya da vücut sıvılarında bulunan proteinlerin kantitatif analizi olarak da tanımlanmaktadır (3). Her bireyin proteom yapısı kendine özgü olduğundan, herhangi bir patolojik durum sonucunda bireyin proteomunda meydana gelen değişimlerin analiz edilmesi ile kişiye özgü tedavilerin geliştirileceği düşünülmektedir (8).

Kökeni Antik Yunan' a kadar dayanan, "tümü-hepsi" anlamına gelen "omik", eklendiği kelimeye tümlük ve bütünlük anlamını vermektedir. Genom bütün genleri, proteom ise belli bir yer ve zamandaki bütün proteinleri tanımlamaktadır. Omik, herhangi bir yapının bütünüyle çalışılması anlamında kullanılmaktadır. Geleneksel çalışmalardan farklı olarak omik yaklaşımlar, karmaşık sistemlerin ancak bir bütün olarak değerlendirildiğinde tam olarak anlaşılacağı temeline dayanmaktadır. Omik çalışmalarında, genomik (gen düzeyinde), transkriptomik (mRNA düzeyinde), proteomik (protein düzeyinde) ve metabolomik (metabolit düzeyinde) analizler yer almaktadır (11).

Fiziksel, sosyal ve ruhsal durumları ile birlikte bireyin tüm yaşam kalitesini etkileyen birçok hastalık vardır. Kanser de bu hastalıklardan biridir ve hücrelerin kontrolsüz şekilde

çoğalmaları olarak ifade edilir. Günümüzde yaygın olarak görülmesi, morbidite ve mortaliteye neden olması sebebiyle kanser önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

Kanser hastalığında, ölüm oranları azaltılmaya ve hastaların sağ kalım süreleri artırılmaya çalışılmaktadır. Kanser kontrol altına alınmasında, kanserin erken evrelerinde hastalığın teşhisinin konulması çok önemlidir. Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler genel olarak; kemoterapi, radyoterapi, immün tedavisi, hormon tedavisi ve cerrahi müdahale şeklindedir. Bu yöntemlerden uygun olanı veya birkaçının birlikte kombinasyonu tercih edilmektedir, ancak hastalarda genelde istenmeyen yan etkiler oluşmaktadır. Toksik yan etkilerin en az seviyeye indirildiği, sadece ilgili kanser hücrelerini hedefleyen daha seçici ve etkili olan yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle son yıllarda "alternatif tıp" adı altında antikanser özelliğe sahip bitkiler de tedavilerde kullanılmaktadır (12, 13). Hedef kanser hücrelerine yönelik etkili kanser tedavi stratejilerinin belirlenerek, erken evrelerde kanserin teşhis edilebilmesi amacı ile ilgili kanserin yayılması yani metastazi sonucunda protein mekanizmasında oluşan değişikliklerin belirlenmesi ve protein biyobelirteçlerinin tespit edilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda genetik bilimindeki önemli gelişmelerin yanı sıra kanserin erken teşhisi ve tedavisinde önemli bilgilerin elde edildiği proteomik analizlere yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Günümüzde özellikle kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden olan meme kanseri ile ilgili biyobelirteçlerin keşfedilmesi, yeni ilaç ve tedavi şekillerinin aydınlatılması ile ilgili proteomik çalışmalar yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, Ankaferd Hemostat (ABS; Ankaferd Blood Stopper®)' in meme kanseri hücrelerindeki antikanser etkisi karşılaştırmalı proteomik çalışmalarla incelenecektir. ABS' nin kanser hücrelerinde meydana getirdiği değişiklikler, proteomik analizlerden olan "iki boyutlu (2D) jel elektroforez yöntemi" kullanılarak araştırılacaktır. Bunun için kullanılacak olan MCF-7 meme kanseri hücre hattı ABS ile muamele edilip, işlenmiş (T) gruplar ile ABS uygulanmamış kontrol (C) grupları karşılaştırılarak; bu iki gruba ait meme kanseri hücrelerinde nicel anlamda en az 2 kat farklılaşan proteinler imaj analiz çalışmaları ile saptanacaktır. Daha sonra bu proteinler MALDI-TOF/TOF-MS ve peptid dizileme yöntemi ile karakterize edilecektir. C ve T grupları arasında farklılaştığı tespit edilen bu proteinlerin yapıları, fonksiyonları, gen adları ve protein-protein etkileşimleri çeşitli veri bankaları

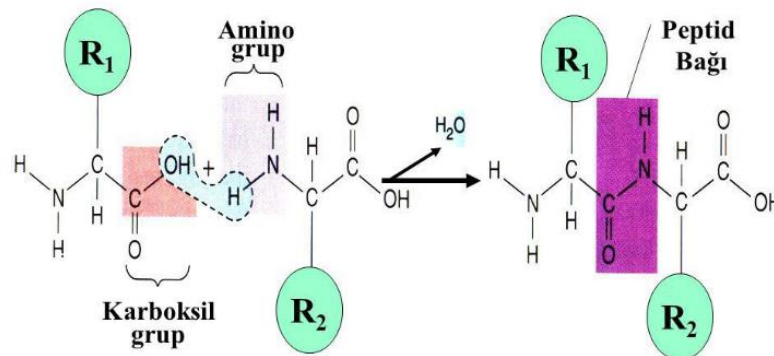
kullanılarak araştırılacaktır. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ABS' nin etkilediği olası biyolojik süreçler ve yolaklar tespit edilmeye çalışılacaktır.

Bu tez çalışması ile antioksidan etkileri olduğu bilinen ABS' nin antikanser etkisinin olup olmadığı; eğer var ise bu etki hangi proteinler üzerinden gerçekleşmektedir sorularına yanıt aranmaya çalışılacaktır. Elde edilen verilere göre, ABS' nin meme kanseri üzerindeki etkisi, ilk defa moleküler düzeyde 2D jel elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS yöntemleri ile araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Protein Tanımı ve Yapısı

Yapısında temel olarak karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O) ve azot (N) bulunduran organik bileşiklere protein denilmektedir. Proteinler canlı sistemler içinde en çok bulunan ve çeşitli görevlere sahip olan organik moleküllerdir. İlk olarak Jacob Berzelius tarafından 19. yüzyılda keşfedilmiştir (14). Proteinlerin monomerleri yani yapı taşları aminoasitlerdir ve proteinler, 20 farklı amino asitten oluşan doğrusal polimerlerdir. Aminoasitler karboksil (-COOH), amin (-NH), H ve R (değişken) gruplarının bir C atomunun etrafına dizilmesinden meydana gelen bir yapıya sahiptirler. Bu grupların bağlı olduğu merkez karbon, alfa karbon (α -karbon) olarak ve devam eden diğer karbonlar da merkezden uzaklaştıkça sırasıyla β , γ , δ , ϵ karbonlar olarak adlandırılır. R grubu ise her aminoasitte farklıdır. Proteini meydana getiren bir polipeptid zincirindeki aminoasitler, dehidrasyon tepkimesi sonucunda oluşan aminoasidin karboksil karbonu ile bir diğer aminoasidin amino grubundaki azot arasında oluşan C-N bağları ile birbirlerine bağlanırlar ve bu aralarında oluşan bağ, peptid bağı olarak adlandırılır (Şekil 2.1.). Peptid bağı, C=N çift bağından uzun ve C-N tek bağından küçük olduğu için kısmi çift bağ olarak tanımlanmaktadır. Bu kısmi çift bağın varlığı, peptidin kendi eksenini etrafında dönmesine engel olur ve sonuçta peptid bağını oluşturan gruplara ait atomların (C, O, N) aynı düzlemde bulunmasını sağlar ve böylece peptid bağı sağlam ve düzlemsel bir yapıya sahip olur (15).



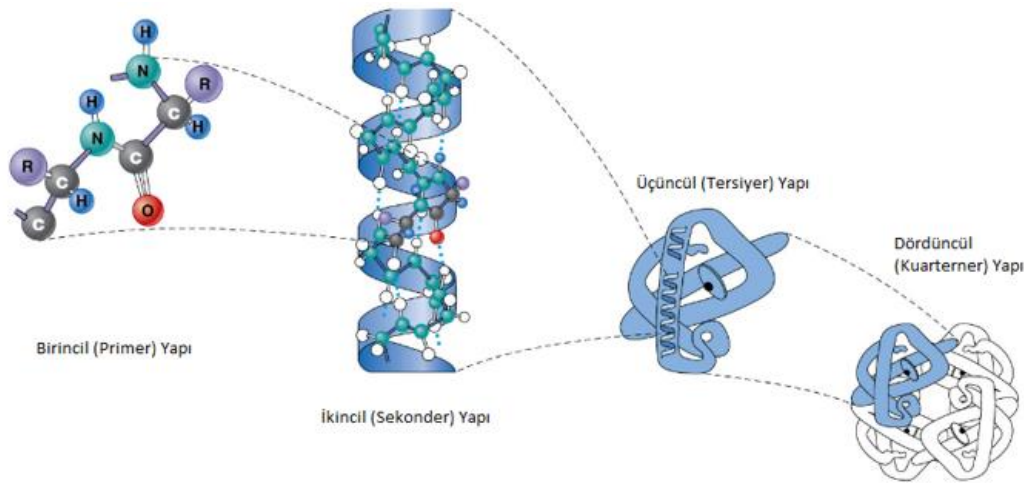
Şekil 2.1. İki ayrı aminoasitteki karboksil ve amino gruplarının reaksiyonu sonucunda oluşan peptid bağı ve peptid bağında aynı düzlemde yer alan atomlar.

Proteinlerde birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül yapı (kuarterner) olmak üzere dört temel yapı bulunmaktadır. Proteinin birincil yapısı aminoasit dizilişidir ve bu aminoasitlerin peptid bağlarıyla oluşturdukları bir polipeptid zinciri şeklindeki düzlemsel yapıdır. Amino asitler peptid bağları ile birbirine bağlandığında polipeptid oluşur. Polipeptid sonra amino asit yan zincirleri arasındaki etkileşimlere bağlı olarak belirli bir konformasyona göre katlanır.

Proteinin ikincil yapısı, polipeptid zincirlerinin bükülmeleri ile oluşan alfa sarmal ve beta tabaka yapılarıdır. Birincil yapı ile oluşan polipeptid omurgası ve hidrojen bağları sayesinde ikincil yapı meydana gelir ve devamlılığı sağlanır.

Üçüncül yapı, ikincil yapıdaki alfa sarmal ve beta tabakalarının katlanmalarıyla oluşur ve proteinin üç boyutlu molekül yapısı oluşur. Bu katlanmalar sonucu oluşan tersiyer yapının kararlı halde olmasında, hidrojen ve disülfür bağları ve yan zincirlerin sıkı şekilde düzenlenmesi gibi etkileşimler rol oynar. PTM, (proteinlerin sentezleri sonucunda değişikliklere uğraması olayı) üçüncül yapı oluşumu ile birlikte gerçekleşmektedir. Üçüncül yapının oluşumundan sonra proteinler işlevlerini kazanıp biyolojik süreçte rol almaktadırlar.

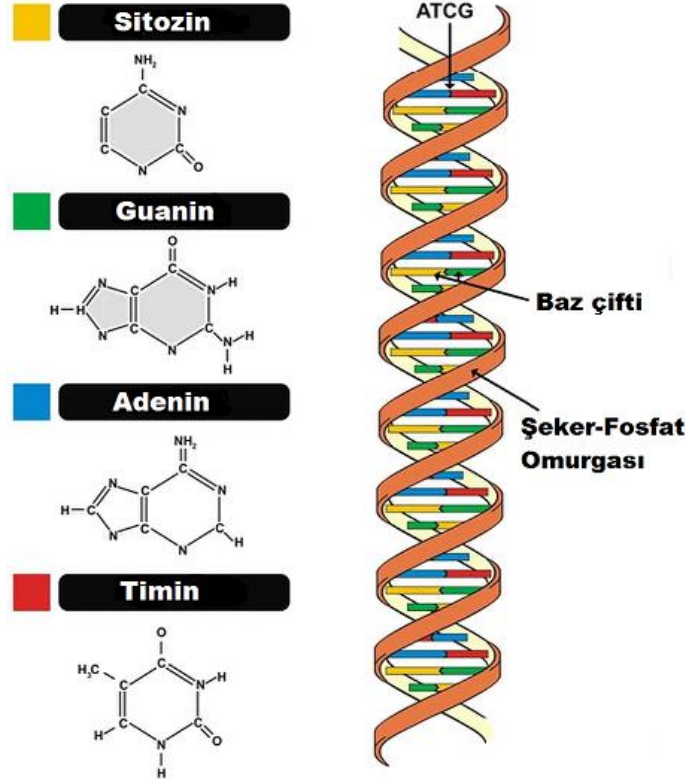
Dördüncül yapı ise birkaç proteinin ya da polipeptid zincirinin birlikte bir yığın meydana getirerek oluşturduğu yapı olarak adlandırılmaktadır. Üçüncül yapıyı kararlı halde tutan, non-kovalent ve disülfid bağları ile dördüncül yapı kararlı hale gelir. Bir proteinin dördüncül yapısı, çoklu polipeptid zincirleri veya alt birimleri olan makro moleküllere karşılık gelir (16, 17). Proteinlerin yapıları Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları (18).

2.2. DNA ve Proteinin Hücre İçinde Sentezi

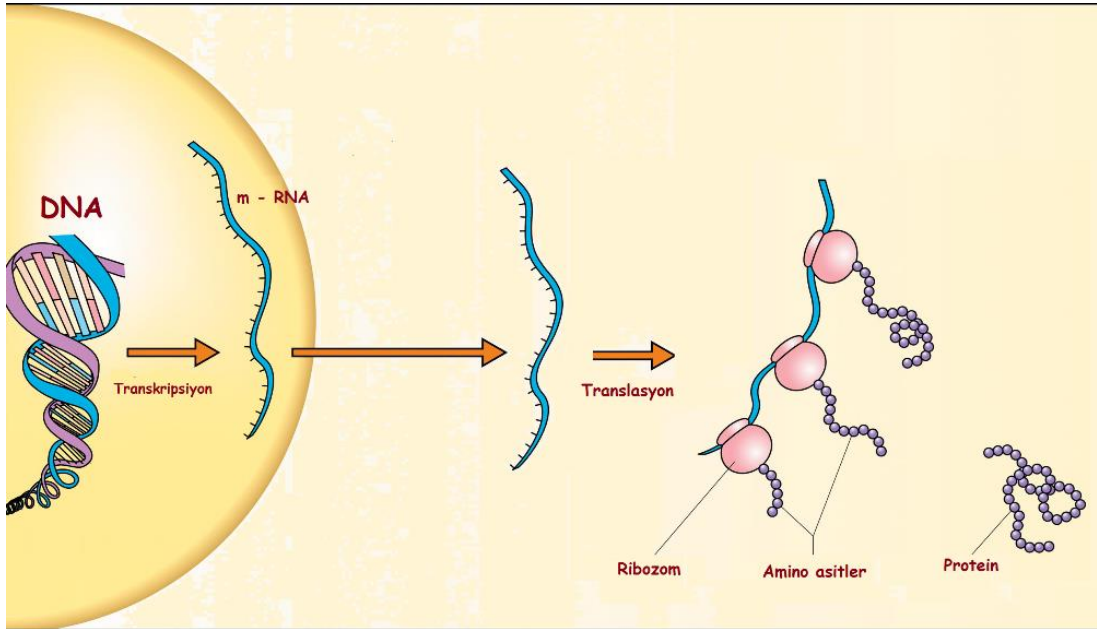
Deoksiribonükleik asit (DNA), bütün organizmaların ve bazı virüslerin canlılık işlevleriyle, biyolojik gelişmeleri için gereksinim duyulan genetik bilgi ve materyalin bulunduğu nükleik asittir. İki uzun polimer DNA' nın kimyasal yapısını oluşturur. Bu polimerler, ester bağlarıyla birbirine bağlanmış şeker ve fosfat gruplarının oluşturduğu, birbirlerine ters yönde uzanan iki sarmal yapı meydana getirir. Adenin (A), sitozin (C), guanin (G) ve timin (T) olarak adlandırılan dört çeşit nükleobaz molekülünden her biri şeker grubuna bağlanır ve nükleotidler oluşur (17). Nükleobazların oluşturduğu dizi DNA üzerinde genetik bilgiyi kodlar. Kodlanan bu genetik bilgileri içeren DNA bölümleri ise gen olarak adlandırılmaktadır. DNA' nın yapısı Şekil 2.3.' de verilmiştir.



Şekil 2.3. DNA çift sarmalı (19).

Aynı genetik bilgiye sahip organizmaların farklı bölgelerinde farklı hücre tipleri oluşur ve hücreler farklı zamanlarda farklı görevler alırlar. Bu farklılıkların temelinde ise proteinler yer almaktadır. Proteinlerin çeşitleri, yapıları ve fonksiyonlarındaki değişiklikler sonucu aynı genetik bilgiye sahip çok farklı hücre tipleri oluşmaktadır.

Proteinlerin hücrede oluşma süreci, genetik bilgilerin depolandığı DNA ile başlar. Protein sentezinde; DNA, mesajcı ribonükleik asit (mRNA), taşıyıcı ribonükleik asit (tRNA), adenin trifosfat (ATP) ve ribozom gibi birimler görev alır. DNA’ da bulunan şifrelerin, mRNA’ya aktarılması transkripsiyon (genetik şifrenin yazılımı) olarak tanımlanır. Protein sentezinde ilk olarak DNA tarafından, sentezlenecek olan protein dizisine karşılık gelen mRNA transkripsiyonu gerçekleşmektedir. mRNA’ daki bilgilerin ışığında ribozomda gerçekleşen protein sentezi ise translasyon (şifrenin okunması) şeklinde isimlendirilmektedir. Transkripsiyon sonrası sentezlenecek olan proteinlerin aminoasit dizisi mRNA’da belirlenir. mRNA, protein dizisindeki kodlayıcı bilgiyi taşır ve ribozomda gerçekleşen translasyon sonrasında proteinlerin oluşmaktadır (20). Proteinlerin sentezi Şekil 2.4.’ de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Proteinlerin hücre içinde sentezi (21).

2.3. Gen ve Genom Kavramları

Gen, genom dizisinde yer alan küçük DNA bölümleridir ve kalıtımda rol oynayan fonksiyonel birim olarak da tanımlanır (5). Genler, canlı hücreleri için gerekli olan proteinler, enzimler, diğer moleküllerin kodlarını taşır ve böylece kalıtsal karakterlerin nesilden nesile aktarılması sağlar. Aynı zamanda canlılardaki tüm genetik, fizyolojik ve biyokimyasal olayların denetimi ve doğru şekilde ilerleyip ilerlemediğinin kontrolü de genler sayesinde gerçekleşir.

Genom, DNA' daki tüm genetik bilgi olarak tanımlanmaktadır ve organizmaların kromozomlarındaki genetik şifreyi temsil eder. Kromozom ise, DNA' nın histon proteinlerinin etrafına sarılarak yoğunlaşmasıyla oluşan ve canlılarda kalıtımı sağlayan genetik birim olarak tanımlanmaktadır.

Genom bir kalıtım birimidir ve genom analizine ise genomik adı verilmektedir. Genomik analizler, bir organizmanın tanımlanmış olan genleri, ne oranda kullandığı bilgisini bizlere vermez. Bir gen, birbirinden farklı biyolojik fonksiyona sahip olan birçok proteini kodlarken bu proteinler sentez sonrasında farklılaşmaktadır (7). Çoğunlukla sentez sonrası gerçekleşen değişimler genlerden bağımsız olduğundan; hastalıkların önlenmesi, teşhis ve tedavisine yönelik, tek başına genomik analizler ile yeterli bulgu elde edilememektedir (8).

Proteinlerin oluşturduğu karmaşık ağı taşıdığı bilgiler, genomikten sağlanan bilgiden daha fazladır ve tek başına genomikten yola çıkılarak bu bilgi ağının aydınlatılamayacağı düşünülmektedir. Proteinlerin tanımlanması ile hücre içi ve hücreler arasında oluşan kimyasal tepkimeler, hücrelerin canlılıklarını nasıl korudukları, birbirleriyle nasıl iletişim kurdukları, hücre yapısının gelişimi ve hücre çeşitliliğinin sağlanması gibi bilgiler açığa kavuşacaktır. Bu bilgilerin ışığında eczacılık ve ilaç alanında etkili sonuçlar ortaya konmuştur (22).

2.4. Proteom ve Proteomik Kavramları

"Proteom" terimi ilk defa 1994' de yapılan sempozyumda, Avustralyalı araştırmacı Marc R Wilkins ve ark. (23) tarafından önerilmiştir. Proteom; protein ve genom sözcüklerinden oluşmaktadır. Bir hücre, organ ya da organizmaya belirli zamanda ve belirli ortamdaki proteinlerin toplamına proteom denir.

"Proteomik" ise proteom analizi olarak tanımlanmaktadır. Proteomik, bir hücre veya organizmanın tüm protein içeriğinin incelenmesini sağlar. Aynı zamanda proteom, genomun kodladığı proteinleri tanımlarken hücreden hücreye değişiklik gösterir.

Proteomik, belirli bir yerde ve belirli bir zamanda bulunan tüm proteinlerin yapılarını, miktarlarını, yerleşimlerini, değişim sonrası fonksiyonlarını, diğer proteinler ve büyük moleküllerle olan etkileşimlerini incelemektedir. "Belirli bir yer" terimi, farklı proteinlerin farklı hücre bölümlerinde ve farklı hücre türlerindeki ifadesini, "belirli bir zamanda" terimi ise

farklı gelişim evrelerinde, farklı çevresel koşullarda, yaşlılık ve çeşitli hastalıklardaki süreçleri ifade eder (3).

Proteom, genomun statik yapısının aksine, hastalık, stresli olma ve günün farklı saat dilimlerinde bile farklılık göstermektedir (10). Böylece bir organizma; vücudun değişik bölgelerinde, her bir hücre döngüsü evresinde ve değişen çevre koşullarında değişik protein ekspresyonlarına sahip olur. Genom, sabit ve organizma için tanımlanabilir bir yapıyken; proteom, hücreden hücreye değişen ve uyarılara cevap olarak biyokimyasal etkileşimlerin olduğu dinamik bir yapıdır. Böylelikle, proteomik uygulamaları ile hastalıklarla alakalı dinamiklerin daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir (24).

İnsan genomu binlerce gen içerirken, insan vücudundaki proteom çok daha karmaşıktır ve yaklaşık milyonlarca farklı protein içerir (25).

Fonksiyon gösteren proteinlerin çoğu modifiye formlardadır ve 150' den fazla translasyonun ardından modifikasyon gerçekleşir; ancak gen dizileri protein aktivite ve fonksiyonları için ihtiyaç duyulan bu PTM' lere dair bilgi verememektedir (3).

Gen ürünlerindeki sentez sonrasında meydana gelen değişimleri, hücredeki konumları ve ne miktarlarda olduklarının açığa kavuşması için genomik sonrası bilgilere ihtiyaç duyulmaktadır (4). Bu noktada proteom ve proteomik teknolojisi karşımıza çıkmaktadır.

Proteomik çalışmalar genomik araştırmaların devamı olarak düşünülmektedir ve postgenomik çalışmalar olarak da adlandırılmaktadır. Proteomik çok geniş bir kavramdır ve proteinlerin tanımlanması ve analizinin yapılması, hücredeki yerlerinin belirlenmesi, yapısı, diğer proteinlerle olan etkileşimleri, modifikasyonu şeklinde çok fazla çalışmayı kapsamaktadır.

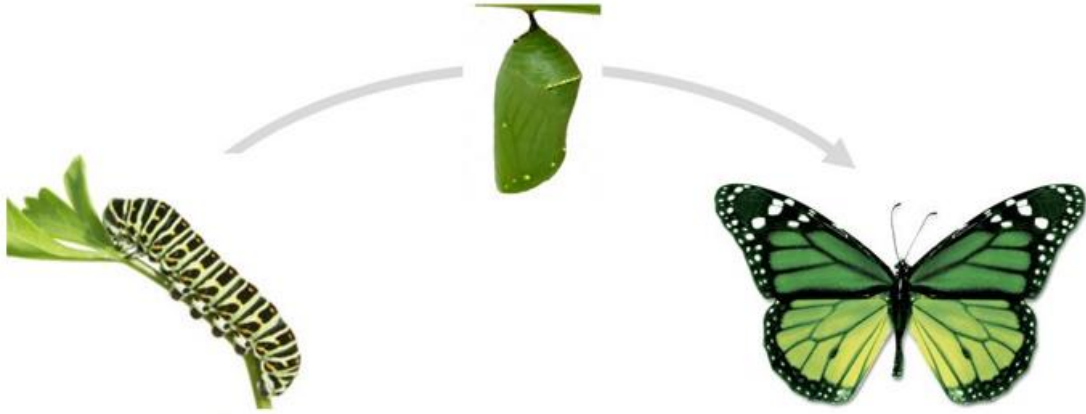
Proteomik veriler, hastalık durumundaki hücrelerin ve dokuların sınıflandırılmasında ve farklı biyolojik mekanizmaların aydınlatılmasında önemlidir. Hücreler ve organizmalarda yer alan tüm proteinlerin yapısı, etkileşimleri ve fonksiyonları, çeşitli yöntemler kullanılarak tanımlanmaktadır. Proteomik analizler, kanserli hastanın patogenezi anlamada klinisyenlere ve bilim adamlarına yardımcı olmak için biyobelirteçler şeklinde önemli biyolojik bilgiler elde etmek amacıyla serum ve dokuya uygulanabilen araştırmaları içermektedir (26).

Belli bir zamanda kanser safhasının ve ilerlemesinin önemli bir biyolojik göstergesi olan biyobelirteçler, kanser sürecini takip etmek, yeni terapötik ajanların etkisini ve güvenilirliğini ortaya koymak için en önemli araçlardır (27). Bu biyobelirteçlerin tanımlanması, spesifik proteinlerin hedeflenmesi ve sağlık hizmetlerinin daha iyileştirilmesi için gerekli bilgi, proteomik analizlerden elde edilen veriler ile bulunmaya çalışılmaktadır (28).

2.5. Proteomik ve Genomik İlişkisi

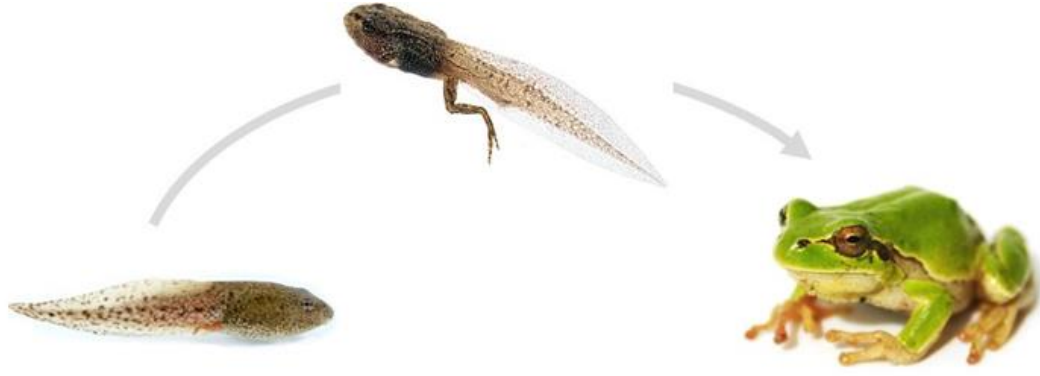
Proteomik ile genomik arasında doğrudan bir ilişki vardır; çünkü genomik, hücre veya organizmaya ait genlerle ilgilenirken aynı zamanda bu genlerin proteinleri ne şekilde kodladığı ile de alakalıdır. Genomik statiktir; çünkü organizmanın hücre içindeki DNA dizilimi her zaman sabittir. Bunun aksine, protein içeriği hücreden hücreye değişiklik göstermektedir ve proteomik dinamiktir.

Bu statik ve dinamik olma durumuna bir örnek olarak tırtıl ve kelebek değerlendirildiğinde, ikisi de aynı genoma sahip olmalarına rağmen; proteom yapılarının farklı oldukları ve bu nedenle de farklı morfolojilerde ve kabiliyetlerde oldukları sonucu gözlemlenmektedir (Şekil 2.5.) (29).



Şekil 2.5. Tırtıl ve kelebeğin protein profilinin değişimiyle birlikte geçirmiş olduğu morfolojik değişim.

Bunun diğer bir örneği ise yine aynı genomlara sahip fakat proteomları farklı olan iribaş ve kurbağadır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. İribaş ve kurbağanın protein profillerinin değişimi ile geçirmiş olduğu morfolojik değişim.

Proteinlerin kodlanması ve PTM'lerin sonucunda protein ve gen sayısı arasında büyük bir fark oluşur ve bunun sonucunda protein profilinde değişiklikler meydana gelmektedir (30).

2.6. Bir Gen - Bir Enzim Hipotezi ve İnsan Genom Projesi

Geçmişten günümüze hayvan ve bitkiler üzerinde deneyler ve gözlemler yapılarak canlıların kalıtsal özellikleri araştırılmıştır. Kalıtsal özellikler birbirinden bağımsız birimler olarak aktarılmaktadır ve bu kalıtım birimleri gen olarak tanımlanmaktadır. Genom ve proteom arasındaki ilişki konusunda da uzun yıllardan bu yana araştırmalar yapılmaktadır. Bu konuda ilk olarak 1941 yılında Tatum ve Beadle'ın yaptığı çalışmaların sonucunda, 1948'de bir gen-bir enzim hipotezi ortaya atılmıştır. Ekmek küfü olarak geçen "*Neurospora crassa*" adlı mantar türü ile yapılan araştırmanın sonucunda; aminoasitlerin birbirlerine dönüşümlerinde üç değişik enzimin görev aldığı ve her bir enzimin sentezinden değişik bir genin sorumlu olduğu sonucu elde edilmiştir; yani bu hipotez bir tek genin tek bir proteini kodladığını belirtmektedir (31). Bu hipotezde, "*Neurospora crassa*" mutantları üzerinde çalışılıp protein eksikliği ya da proteinin deformasyonu ve mutasyon arasında doğrudan bir ilişkinin olduğu tespit edilmiş, sonrasında tüm canlı türlerinde de geçerliliği gözlenerek ortaya konmuştur.

Protein dizileme (*protein fingerprint*) ile ilgili 1957 yıllarında gerçekleştirilen araştırmaların sonucunda, bir çeşit hücre hastalığında (orak hücre hastalığı), hemoglobinin beta zincirine ait altıncı sırada bir nokta mutasyonu gözlemlenmiştir. Böylece glutamatin

yerine başka bir aminoasit olan valin geçmiştir. Buna bağlı olarak modifikasyonun, protein zincirinin tümünde değil, yalnızca bir polipeptid zincirinin üzerinde olduğu sonucuna varılmıştır. 1958' de Davis, bir gen - bir enzim hipotezinin yerine bir gen - bir polipeptid hipotezinin geçerli olabileceğini ve bir gen - bir enzim terimlerinin yalnız ilgili araştırma programı için kullanılabileceğini söylemiştir (32).

DNA' nın yapısı aydınlatıldıktan sonra yapılan araştırmalar, bir gen - bir protein ilişkisinin farklı değerlendirmelerine neden olmuştur. Örnek olarak, DNA zincirinde bulunan gen dizilerinden hareketle bazı nükleotidlerin bloke edilmesi sonucunda birtakım mutasyonlar görülmüştür. 1967 yılında Yanofsky ve arkadaşları, triptofan sentetaz protein A adı verilen gene ait başlangıç nükleotid dizileri üzerinde yaptıkları değişikliklerle protein dizisine ait başlangıç amino asitlerinin de farklılaştığını ve aynı şekilde nükleotid dizilerinin orta ve son bölümlerinde yapılan değişiklik sonucunda yine amino asit dizilerinde de aynı bölümlerin değiştiği görüşmüştür (33).

1984 yılında Los Hamas ve Lawrence Livermore Laboratuvarları' nda insanların kromozomlarına ait bilgilerin toplandığı kütüphanelerin oluşturulması ile insan genomunun dizilenmesine ait çalışmalara başlanmıştır. 1990 yılında 18 ülkenin desteğiyle "İnsan Genom Projesi" 15 yıllık bir süre için başlatılmıştır (34). Projenin başlatılmasıyla genom dizileme çalışmaları hızlandırılmış ve sonuçların bir araya getirilmesi ve paylaşımı sağlanmıştır.

Projede, insan genomunun şifrelerini çözmek; yani DNA bazlarına ait dizilim sırasını belirlemek, kalıtsal özelliklerle ilgili olan genleri tanımlamak ve günümüzde tedavisi mümkün olmayan 3.000' den fazla genetik kaynaklı hastalıklara olan yatkınlığı belirlemek amaçlanmıştır. Böylece ilgili genlerin yerleri ve yapıları belirlenerek hastalığın tanı ve tedavisine ışık tutacağı düşünülmüştür (35).

Gelişen teknoloji ile birlikte İnsan Genom Projesi 2003' de tamamlanmış ve böylece insanların DNA dizileri kayıt altına alınıp internet ortamında paylaşılmıştır.

Projenin sonuçlarından elde edilen bilgilere göre, insan genomu 24 kromozomun içinde yaklaşık olarak 2.85 milyar nükleotid bulundururken, yaklaşık 20.000 ile 25.000 arasında gen bulunduğu söylenmiştir (36).

Projeye başlanırken, insanların morfolojik özellikleri 100.000' den fazla olduğundan 100.000 'in üzerinde genin keşfedilmesi beklenmiştir, çünkü bir gen - bir enzim hipotezinde

belirtildiği üzere; her bir özellik bir enzim tarafından kontrol ediliyorsa mRNA ile 100.000' in üzerinde genin transkripte edilmesi gerekmektedir. Proje sonucunda beklenildiği gibi 100.000 kadar mRNA ile protein kodlayan yalnızca 23.000 kadar gen bulunmuştur (37).

Ayrıca beraber kodlanan 100.000 kadar protein çok fazla sayıda modifikasyonlara uğrayarak farklı hücrelerde analiz edilebilecek yaklaşık 500.000 kadar proteini oluşturduğu düşünülmektedir (38).

Projeden elde edilen sonuçlar ile birçok genetik hastalığın teşhis ve tedavisi aydınlatılırken çok sayıda hastalığın da genetik risk haritaları oluşturulmuştur (39).

Proje sonrasında hala aydınlatılamayan hastalık ve hücre içindeki biyolojik mekanizmalar var olduğundan, araştırmaların odağı, tek bir gen ve proteinin karakterizasyonundan çok canlı organizmaya ait olan birçok proteinin izlenmesi ve yorumlanmasına yönelik yöntemlere kaymıştır (26).

2.7. Kıyaslamalı, Yapısal ve İşlevsel Proteomik Teknikler

Proteomik analizlerde numunede bulunan proteinlerin ayırımı ve tanımlanmaları için temel olarak üç ayrı teknik uygulanmaktadır. Bunlar:

- * Kıyaslamalı (*ekspresyon*),
- * Yapısal (*structural*),
- * İşlevsel (*functional*) proteomiktir.

Kıyaslamalı proteomik, iki farklı koşulda elde edilen sonuçların birbiriyle karşılaştırılmasıyla hem nitel hem de nicel olarak protein analizlerinin gerçekleştirildiği tekniktir. Sağlıklı hücre, bir hastalık veya çevresel bir faktöre maruz kaldığında veya gelişerek değiştiğinde proteinler de değişime uğrar ve farklılaşan bu proteinler kıyaslamalı proteomik ile araştırılır. Ya da bir ilaç veya kimyasal madde ile muamelede farklılaşan proteinler bu teknik ile incelenir (40).

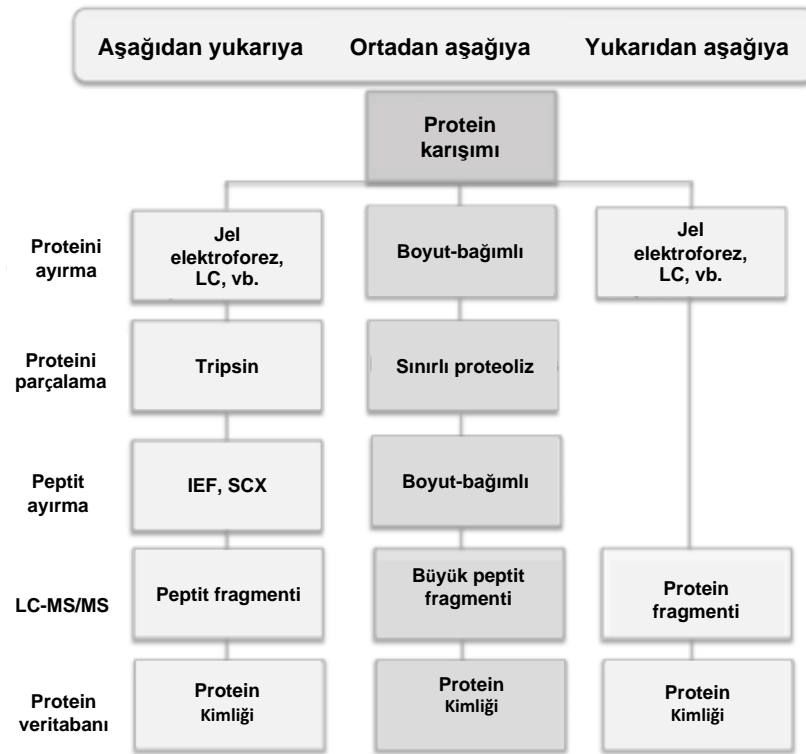
Bu tez çalışmasında, MCF-7 meme kanseri hücre hattından birine ABS uygulanmış ve diğerine ise uygulanmamıştır. Bu iki grupta bulunan proteinler, iki boyutlu (2D) jel elektroforez yöntemi kullanılarak ve kütle spektrometrisinin de yardımıyla analiz edilmiştir ve bu iki grup arasında farklılaşan proteinler tespit edilmiştir. Böylece kanserle ilişkili proteinler belirlenmeye çalışılmıştır.

Yapısal proteomik, protein ve protein komplekslerinin üç boyutlu yapılarının analizini kapsayan bir tekniktir. Proteinlerin yapılarının ortaya çıkarılması hem genomik hem proteomik çalışmalar açısından oldukça önemlidir ve aynı zamanda proteinin üç boyutlu yapılarının analizi sayesinde enzim - substrat ilişkisi şeklinde etkileşimlere de açıklık getirilebilmektedir. Enzimlerin birçoğu protein yapısındadır ve bilgisayar destekli bir şekilde ilaç moleküllerinin tasarlanmasında hedef enzim molekülüne ait üç boyutlu yapıdan faydalanılarak uygun afiniteli ilaç molekülleri ortaya çıkarılmaktadır. Sonuç olarak, yapısal proteomik sayesinde elde edilen sonuçlar, yeni ilaçların araştırılması ve tasarlanmasında oldukça önemlidir (41).

İşlevsel proteomik ise çoğu proteinin fonksiyon ve işleyişinin, başka proteinlerle etkileşimi sonucu ortaya konduğu tekniktir. Protein yapısının belirlenmesinden sonra metabolik düzeyde aldığı rolü belirlemek ve protein ağındaki rolünü araştırmak önemlidir. Ayrıca bu protein ağ haritaları var olan sistemler içerisindeki proteinlerin birbirleri ile olan etkileşimini ortaya koymaktadır. Ayrıca proteinlerin uğradığı modifikasyonların belirlenip haritalanması, proteinin hangi bölgede ve nasıl değişikliğe uğradığını göstermektedir. PTM' ler, proteinin yapı ve işlevleri üzerinde etkilidir ve tüm bu modifikasyonlarla ilgili çalışmalar da işlevsel proteomik araştırma alanı içinde yer almaktadır (42).

2.8. Proteomik Araştırma Stratejileri

Protein karışımlarının nitel ve nicel analizlerine dayanan proteomik çalışmalarda, yukarıdan aşağıya (*top-down*), aşağıdan yukarıya (*bottom-up*) ve ortadan aşağıya (*middle-down*) şeklinde adlandırılan stratejiler kullanılmaktadır (43) (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Proteomik stratejileri (43).

"Aşağıdan yukarıya" proteomik tekniğinde, kütle spektrometrisi (MS) yardımıyla ve proteolitik parçalamayla aminoasitlere ait sekanslar belirlenip ve proteinler tanımlanmaktadır. Biyolojik numune, proteinlerin yapısındaki peptid zincirini parçalayan tripsin ve benzeri proteolitik enzimler tarafından peptid karışımı oluşturmak için tanımlanan bölgelerinden (arjinin ya da lizin) parçalanır ve bir karışım elde edilir. Bu karışım sıvı kromatografisi (LC) yardımıyla bileşenlerine ayrılır ve sonrasında tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) ile analiz edilir (44).

Bu tez çalışması kapsamında aşağıdan yukarıya proteomik çalışma strateji tekniği kullanılmıştır ve proteinin yapısına dair daha çok bilgi elde edebilmek için MS ile beraber uygulanmaktadır.

"Ortadan aşağı" proteomik tekniğinde, ekspresyona uğrayan aminoasit veya aminoasit kalıntılarının kombinasyonlarının bölünmesi sonucunda, 5 - 15 kDa aralığında olan büyük peptid fragmanları oluşturulmaktadır. Enzimle veya kimyasal parçalanma gibi yöntemler kullanılarak parçalanma gerçekleştirilmektedir (45, 46).

"Yukarıdan aşağıya" proteomik tekniği ise bir parçalanma gerçekleşmeden, biyolojik numunelerde bulunan parçalanmamış proteinleri peptidlerine ayırmak amacıyla MS' in de kullanıldığı analizleri kapsamaktadır. Bu araştırma tekniği sayesinde genetik ya da kimyasal olarak modifikasyona uğramış proteinler yapısal olarak tanımlanabilmektedir (47).

2.9. Proteomik Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler

Proteomik çalışmalarda, proteinleri tanımlayabilmek ve nicel olarak tespitlerini yapabilmek amacıyla analiz öncesinde proteinlerin ayırımı için birden fazla yöntem kullanılmaktadır ve bunların çoğu MS ile beraber uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden biri de yüksek ayırmalı 2D jel elektroforezdir ve son yıllarda yüksek duyarlılığa sahip MS ile beraber kullanılmaktadır (48, 49).

2D jel elektroforez yöntemi ile proteinlerin ayırımında; 1. boyut proteinlerin izoelektrik noktalarına (pI) göre ayrıldıkları izoelektrik odaklama (IEF) basamağı, 2. boyut ise proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrıldığı Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) basamağı olarak tanımlanmaktadır (50).

Bu şekilde proteinlerin ayırımı gerçekleştirildikten sonra proteinlerin farklı boyama teknikleri (gümüş ya da SYPRO-Ruby ve Coomassie mavisıyla boyama) ile renklendirilmesi ve sonrasında uygulandığı jellerden kesilip parçalanması gerekmektedir. En son aşamada ise MS gibi analitik tekniklerin yardımıyla proteinlerin analizi gerçekleştirilmekte ve çeşitli bilgisayar yazılımlarıyla analiz edilen proteinler karakterize edilmektedir (51).

Elektroforetik ve kromatografik teknikler ile protein ve peptid karışımlarının, fizikokimyasal özellikleri baz alınarak ayırımı gerçekleştirilir ve bu teknikler proteomik araştırmalarda kullanılan temel stratejilerdir (52).

Peptid karışımları, temel olarak farklı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) teknikleri normal faz kromatografisi (NP), iyon değişim kromatografisi (IEX), boyut eleme kromatografisi (SCX), afinite veya ters faz kromatografisi (RP), nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kapiler elektroforez (CE) ile ayrılır. Elektroforetik ve kromatografik tekniklerin kullanılmasının bir avantajı ise kompleks protein/peptid karışımlarının fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılmasıdır (52).

2D jel elektroforez tekniği diğer yöntemlere göre daha fazla emek gerektirmesi, düşük verim ve yüksek miktarda numune ihtiyacı olması gibi dezavantajlara sahip olmasına rağmen proteinlerin ayırımında, literatürde hala fazlasıyla kullanıldığı görülmektedir. Aynı zamanda, 2D jel elektroforez tekniği, proteinleri pI ve moleküler kütle gibi iki farklı fizikokimyasal parametreye göre ayırdığından yüksek miktarda çözünürlük sağlanır.

2.10. İki Boyutlu (2D) Jel Elektroforez

Elektroforez, iletken bir çözelti içindeki yüklü parçacıkların veya moleküllerin elektriksel alan varlığında ve uygun pH' daki tampon çözeltilerde göç etmesi olayıdır. Farklı yük ve büyüklükteki parçacıklar farklı hızlarda göç ederek birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Elektroforez, doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Elektroforez, bir düzlemde bulunan destek ortamında gerçekleştiriliyorsa "tabaka elektroforezi", kapiler tüp içinde gerçekleştiriliyorsa "kapiler elektroforez" adını alır.

Elektroforez yöntemi; molekül ağırlığı saptama, saflaştırma, saflık kontrolü, genetik hastalıkları saptama ve enzim tayininde, ayrıca immünoloji ve moleküler biyoloji alanlarında da kullanılmaktadır. Popülasyonlardaki genetik varyasyonların hesaplanması, canlılardaki çeşitli enzim ve protein seviyeleri, farklı elektroforez türleri ile analiz edilebilmektedir (53).

Elektroforez yöntemleri şu şekilde sınıflandırılabilir:

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

Elektroforez, belirli bir elektriksel alanda moleküllerin yüklerine ve büyüklüklerine göre ayrılmasıdır. Karışımında bulunan moleküle etki eden kuvvet (F), moleküle ait net yük (q) ve elektriksel alan (E) ile doğru orantılıdır (Formül 2.1).

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

Formülden de anlaşılacağı üzere molekülün net yükü (q) artınca molekülün hareketini sağlayan kuvvet (F) de artar. Eşit kütledeki iki molekülden net yükü daha fazla olan daha hızlı hareket edecektir. Aynı yüklere sahip iki molekül arasında ise sürtünme kuvvetinin etkisiyle molekül kütlesi büyük olan daha yavaş hareket edecektir. Sürtünme kuvveti, çalışılan jelle ait viskozite (akışkanlığa karşı gösterilen direnç) ve porozite (bir boşluğun birim dolu hacmine oranı) gibi fiziksel özelliklere bağlı olan sürtünme katsayısı (f_s) ile tanımlanmaktadır. Moleküllerin kütleleri ve büyüklükleri arttığında, hareket edecek moleküllerin maruz kaldığı sürtünme kuvveti de artacaktır ve molekülün göç hızı da buna bağlı olarak düşecektir. Buna göre molekülün elektroforetik hareketliliği (μ) ve elektrik alan büyüklüğüne bağlı olarak göç hızı (v) Formül 2.2. ve 2.3.' de verilmiştir:

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

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

Bu formüllere göre; molekülün elektroforetik hareketliliğinin (μ), molekülün yük/kütle oranına bağlı olduğu görülmektedir. Yük/çap oranları aynı olan moleküller, aynı ortamda elektrik alanın etkisiyle eşit hızlarda hareket edeceklerdir.

Elektroforez tekniği ile başarılı bir ayırımın gerçekleşmesi, analiz numunesi ile reaksiyon vermeyen ve numunenin elektriksel alanda ilerlemesine engel olmayan bir zeminin yani jelin seçimine bağlıdır (54).

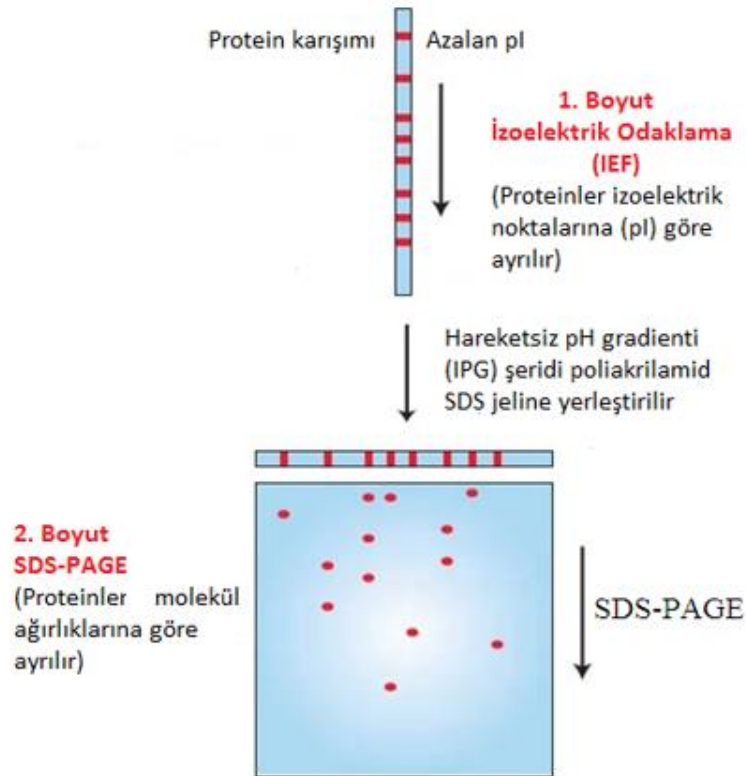
DNA ve RNA ayırımında genelde agaroz jel kullanılırken, proteinlerin ayırımı için poliakrilamid jel kullanılmaktadır (55).

1970' li yılların başında, birbirinden bağımsız 2 ayrı elektroforetik protein ayırım yöntemi bulunmaktaydı. Bunlardan biri Laemmli (56) tarafından ortaya atılan SDS ile proteinlerin ayırımında hala sıklıkla kullanılan zon elektroforez tekniği ve bir diğeri ise Gronow ve Griffith (57) tarafından geliştirilen IEF tekniğidir. Bir süre sonra bu iki bağımsız parametrelerin (moleküler kütle ve pI) ışığında ayırımın gerçekleştirildiği teknikler bir araya getirilmiştir.

1975 yılında O'Farrel ve Klose isimli araştırmacılar tarafından 2D jel elektroforez yöntemi ortaya konmuştur (58, 59). Geliştirilen bu teknikte, öncelikle proteinler strip denilen bir şeridin üzerinde belirli pH gradientleri arasında elektrik alanın etkisiyle pI larına göre ayrılırlar ve bu işlem 1. boyut olarak tanımlanır. pI larına göre ayrılmış olan proteinlerin

sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jelin üzerinde kütlelerine göre ayrıldıkları işlem ise 2. boyuttur. Bu şekilde proteinlerin her biri, iki boyutlu olarak pI ve kütlelerine göre farklı ve kendine özgü bölgelerde konumlanarak dağılım gösterir. Proteinlerin bu şekilde konumlanmaları, özellikle kıyaslamalı proteomikte çok önemli olduğundan, bu teknik çok fazla tercih edilmektedir (60). Aynı zamanda proteinlerin, pI ve kütle gibi bağımsız iki parametreye göre ayırımı gerçekleştiğinden, jel boyunca oldukça homojen bir dağılım meydana gelmektedir. Bu teknikte, tekrarlanabilirlik sorunları olsa da aynı anda birden fazla jelle çalışma yapılarak tekrarlanabilirliğin artırılması amaçlanmakta ve halen günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (61).

Uygulanan bu tekniğin genel olarak şematik gösterimi Şekil 2.8.' de verilmektedir.



Şekil 2.8. 2D jel elektroforez tekniği.

2D jel elektroforezi tekniği 10 temel basamaktan oluşmaktadır ve bu basamaklar sırasıyla aşağıda açıklanmıştır (62, 63):

1. Proteinlerin İzolasyonu: Proteinlerin analizinden önce buldukları hücre içerisinden alınmaları gerekmektedir. Proteinin hücre içerisinde tutulmasını sağlayan hücre zarının kırılmasından sonra elde edilen protein ve nükleik asitlerden meydana gelen çözelti lizat olarak tanımlanmaktadır. Analize geçilmeden önce kontaminasyon oluşturabilecek tüm bileşenlerin lizat çözeltisinden uzaklaştırılması gerekmektedir (64).

2. Proteinlerin öktürülmesi: Protein karışımında oluşabilecek kontaminasyonlardan kurtulma yollarından biri proteinlerin çöktürülmesi ve çökeltinin yıkanıp yeniden çözülmesidir. öktürme yöntemi ile aynı zamanda daha derişik bir protein karışımı elde edilebilmektedir. Bu işlem, saflaştırma ve daha derişik çözelti elde etmek amacıyla kullanılsa da işlem sırasında protein kayıpları da oluşabilmektedir (65).

3. Numune Hazırlama: Bu basamak başarılı bir protein analizi için çok önemlidir. Protein öktürme işlemi sonrasında çökeleği yeniden çözmek için kullanılan ve lizat tamponu veya yükleme tamponu şeklinde tanımlanan çözeltiye protein yapısının korunması ve 2D jel elektroforez yönteminin sorunsuz gerçekleşebilmesi için belirli kimyasallar eklenmelidir. Yükleme tamponununun ayrıca proteinlerin oksidasyonunu ve modifikasyonları önlemesi, hidrofobik yapıdaki proteinleri çözmesi, disülfür ve hidrojen bağlarını çözerek grupları çözeltide serbest hale geçirmesi gibi görevleri de bulunmaktadır.

4. Belirli miktardaki proteinlerin hareketsiz pH gradyanı (IPG; immobilize pH gradyan) şeritlerine tatbik edilmesi ve sonrasında IEF tekniği ile pI' ları esas alınarak ayrılmasıdır.

5. IPG şerit üzerinde pI' larına göre ayrımı sağlanan proteinlerin SDS-PAGE tekniği ile moleküler kütlelerine göre ayrımının gerçekleştirilmesidir.

6. Poliakrilamid jelin üzerinde ayrılmış olan proteinlerin renklendirilmesidir.

7. Renklendirilen proteinlerin imaj görüntüleme ile jel haritalarının oluşturulması ve jel üzerinde spotların belirlenmesidir.

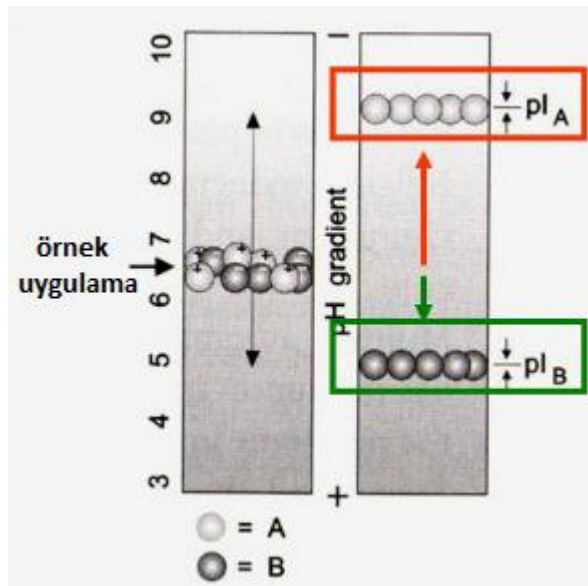
8. Analiz edilmesi için seçilen protein spotlarının jellerden kesilmesi ve sonrasında bu proteinlerin tripsin gibi bir enzim yardımıyla peptidlerine parçalanmasıdır.

9. Peptidlerine ayrılmış olan proteinlerin MS ile analizlerinin yapılmasıdır.

10. Son basamak ise analizi yapılan proteinlerin veri bankalarından faydalanılarak belirlenmesi ve karakterize edilmesidir.

1. Boyut - İzoelektrik Odaklama (IEF) Tekniği

Proteinleri oluşturan aminoasit zincirlerinde bulunan yan gruplar nedeniyle, proteinler asidik ortamda katyonik yapıda, bazik ortamda ise anyonik yapıda bulunmaktadır. Hem katot hem de anot tarafından eşit miktarda çekildiği noktada, aminoasitlerin yan zincirlerindeki gruplar en üst düzeyde iyonlaşabildiği halde proteine ait toplam net yük sıfır olmaktadır. Bu noktada pH değeri, proteinin pI ' sı olarak tanımlanmaktadır. Proteinler pI ' larında elektrik alanın etkisi altında hareket etmezler ve bu nedenle belirli bir pH gradyanında bulunan ve elektrik alanın etkisindeki proteinler, her bir proteinin kendi pI ' sına kadar göç edip bu noktada hareketsiz kalmaktadır (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Proteinlerin pI ' larına göre ayırımı.

IEF tekniğinde IPG olarak adlandırılan şeritler kullanılmaktadır. Bu şeritlerin tekrarlanabilirlik sorunları olmaması, sağlam ve tutarlı sonuçlar elde edilmesi, zamandan tasarruf etmek amacıyla hazır olarak satılanları daha çok tercih edilmektedir (66). Bu ticari IPG şeritler farklı boylarda ve farklı pH aralıklarında bulunmaktadır (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Ticari IPG şeritler (67).

IEF tekniği, sabit bir pH gradyan ortamında amfoterik (hem asidik hem de bazik özellik gösteren) türlerin, belirli bir elektrik alanın etkisinde pI'larına göre ayrılması olarak özetlenebilir (61). Bir proteinin pI değeri, hem net yükün hem de proteinin elektroforetik hareketliliğinin sıfır olduğu pH' dır. Analiz edilecek numune, elektrik alan uygulanan jel ortamına yerleştirildikten sonra protein molekülleri, yüklerine bağlı olarak kendi pI'larına gelene kadar jel üzerinde hareket ederler.

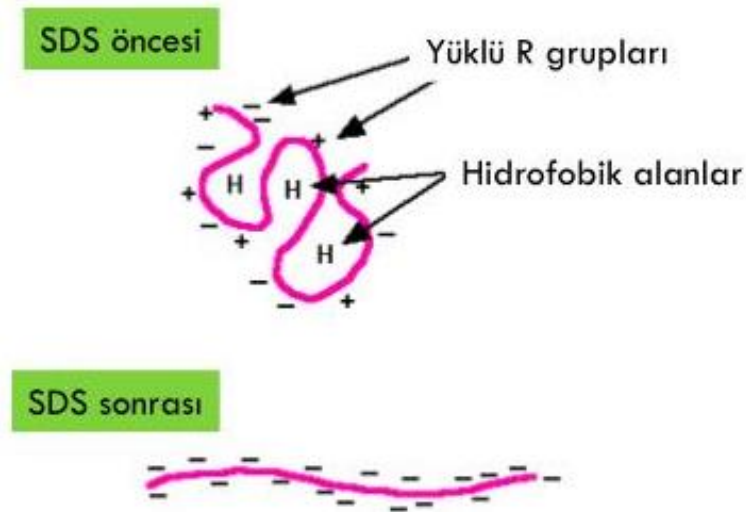
IEF tekniği ile başlıca peptidler ve proteinlerin ayırımı gerçekleştirilmektedir. Ayrıca bakteri hücreleri veya amfoterik nanopartiküller gibi diğer yapılar da IEF ile ayrılabilir (68).

IEF işleminde jellere uygulanacak olan voltaj değeri öncelikle düşük tutulmalıdır, böylece IPG şeritlerin ısınması önlenir ve tuzların sebep olduğu girişimler tuzların uzaklaştırılmasıyla önlenir. Voltaj değeri sonra doğrusal bir şekilde artırılır ve bu değerde uzun süre tutulduktan sonra elektroforez işlemi sonlandırılır. Uygulanacak olan voltaj programını bu şekilde ayarlamak proteinlerin yeterli miktarda odaklanmasını sağlamak açısından oldukça önemlidir. Proteinler yeterli odaklanamazsa "*under focusing*" şeklinde adlandırılan olay gerçekleşir ve 2. boyut SDS-PAGE basamağında jelin üzerinde yatay çizgiler gözlenir. Voltaj gereğinden fazla uygulandığında ise "*over focusing*" oluşur ve bu da proteinlerin çok fazla odaklanmasına sebep olurken; bazı proteinlerde modifikasyon meydana gelip gerçek pI değerlerinden uzaklaşabilir. En uygun IEF işlemi, uygulanacak olan en yüksek değerdeki voltaj değeri ile jellerin en kısa süreyle muamele edilmesidir (65).

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

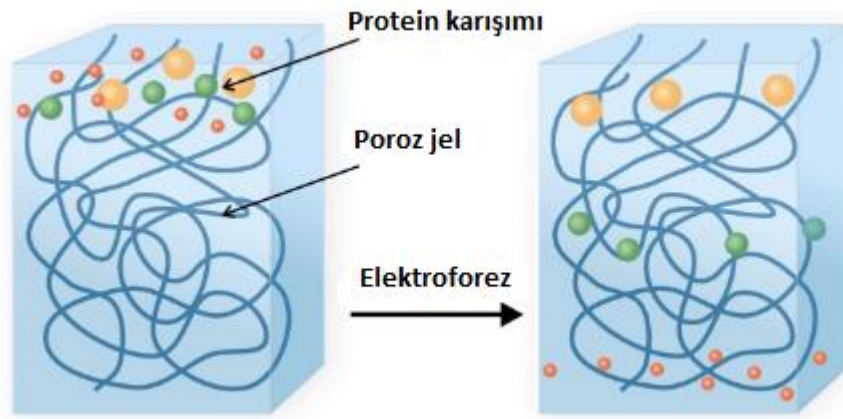
Protein ya da polipeptid moleküllerinin kütlelerine göre akrilamid jel üzerinde göç etmesi ve sonrasında jel üzerinde göç etmesi sonlanan moleküllerin yerlerinin tespit edildiği tekniktir. Akrilamid monomerlerinin bir çapraz bağlanma reaktifiyle (N, N'-metilenbisakrilamid gibi) polimerleşmesi sonucu elde edilen poliakrilamid jel yapılarının elektrofrez için uygun bir ortam olduğu belirtilmiştir (69).

Proteinlerin jel elektrofrez tekniği ile ayrılmasında, anyonik bir deterjan olan SDS yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteinler için yüksek afiniteye sahip olan SDS, protein moleküllerine sıkıca bağlanarak kendi yüklerini saf dışı bırakıp denatürasyonu sağlar. Bu şekilde SDS varlığında proteinler kendi yüklerinden bağımsız, birim kütleleri başına sabit, homojen bir negatif yük kazanırlar ve yükleri eşit olduğu için sadece molekül ağırlıklarına göre göç etmeye başlayıp ayrımları gerçekleşmektedir (Şekil 2.11.).



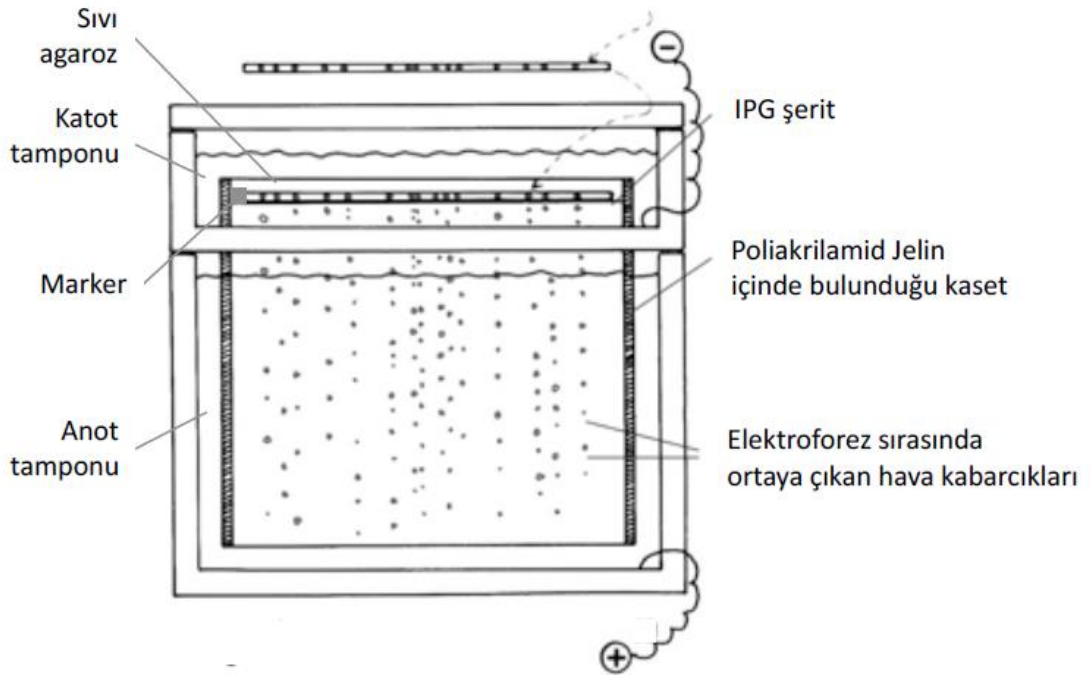
Şekil 2.11. SDS öncesi ve SDS ile muamele sonrası moleküllerin yükleri (70).

Sonuç olarak jelin üzerinde her proteinin kendi molekül ağırlığına göre aldığı yol farklılık göstermektedir (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Proteinlerin poliakrilamid jel üzerinde kütlelerine göre farklı hızlarda gerçekleşen göçü (71).

pI' larına göre IPG şeritler üzerinde ayrılan proteinler (1. boyut), SDS-PAGE basamağında, şeritler özel bir hücre içerisine konulan poliakrilamid jelin bulunduğu kasetin üzerine yerleştirilip bu basamakta moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar (2. boyut) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. SDS-PAGE işleminin şematize edilmiş hali (54).

Şekil 2.13.' de şematik olarak gösterilen SDS-PAGE uygulamasından sonra kaset, hücre içinden çıkarılır ve proteinler artık jel üzerine geçip kütlelerine göre ayrıldığından IPG şerit atılır.

Normalde renksiz olan proteinleri renklendirmek ve jelin üzerinde gözlemleyebilmek için çeşitli kimyasallar kullanılır. Coomassie mavisi ve gümüş boyama gibi kolorimetrik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır ve floresan boyalar ile renklendirme işleminin daha yüksek hassasiyet ve geniş bir doğrusal aralık sağladığı tespit edilmiştir (72, 73).

Daha sonraki basamakta, proteinler jelin üzerinde renklendirildikten sonra 2D imaj analizi ile jelin üzerinde bulunan ve proteinleri temsil eden spotların tespit edilip istatistiksel olarak değerlendirilmesi gerçekleştirilmektedir. Bu işlem "*image capturing*" denilen cihazların yardımıyla jellere ait görüntülerin bilgisayar ortamına aktarılmasıyla yapılmaktadır.

Sonrasında ise dijital ortama aktarılan jel görüntülerinin PDQuest™, ImageMaster 2D, Z4000, Z3, Progenesis ve Phoretix gibi ticari olarak bulunan imaj analiz programlarının kullanılarak analizi yapılır ve jel haritaları oluşturulur. Her bir numune için bir minimum sayı (3 ile 5) 2D jel harita kopyası üretilir ve protein ifadesi iki farklı numunede (örneğin biri normal ve diğeri patolojik) karşılaştırılır. Bu analizlerle, normal ve patolojik numune için 1 tane sanal ana (master) 2D haritası oluşturulur. Aynı yazılım, yoğunlukları farklı olan ve ölçülebilir düzeyde düşük ve yüksek miktarda ifade edilmiş proteinleri karşılaştırır.

2.11. Proteomik Çalışmalarda Kütle Spektrometrisi

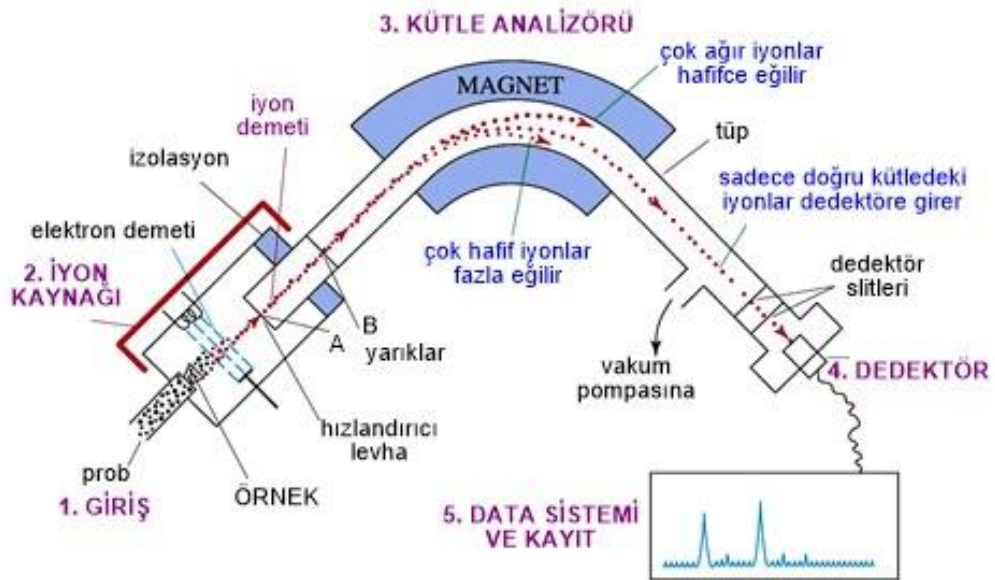
Kütle spektroskopisi, yüklü partiküllerin bir manyetik ya da elektriksel alandan geçerken diğerk yüklü partiküllerden, kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılmasına dayanan analitik bir tekniktir. Moleküller ilk olarak iyonize forma getirilir ve kütle analizörü ile ayrılmadan önce bir iyon kaynağında gaz fazına dönüştürülür. Numunelerin analizi için normalde yüklü olmayan her bir partikül, iyonize hale getirildikten sonra kendine özgü bir kütle (m) ve yük (z) sahibi olurlar. Kütle spektrometrelerinde, her m/z değerindeki iyon sayıları dedektör ile kaydedilir ve m/z değerlerinin şiddete yani intensiteye karşı çizilen spektrumlar kullanılarak bileşikler karakterize edilmektedir (74, 75).

Bu teknik proteinlerin kütlelerini yüksek hassasiyetle analiz etmek için kullanılır. Her bir proteinin yapıtaşı olan aminoasitler belirli olduğundan, proteinleri oluşturan peptidlerin

kütlelerinin yardımı (peptid dizileme çalışmaları) ya da aminoasit yapılarını peptidlerden sırayla kopararak elde kalan kütle değerlerinin belirlenmesi (De Novo dizileme) ile proteinlerin analizi yapılabilmektedir. Önceki yıllarda proteinler, zaman alan ve Edman yıkımı adı verilen yöntem ile belirlenirken, peptid dizileme yöntemi (PMF)' nin geliştirilmesi ile protein analizleri oldukça hızlanmıştır (76).

Kütle spektroskopisi analitik teknikler arasında oldukça önemlidir. Bir molekülün kütlesini yüksek hassasiyetle ölçer ve bu özelliği nedeniyle geniş bir uygulama alanına sahiptir. Proteinlerin kütlelerinin belirlenmesi, proteinlerin tanımlanmasının yanı sıra kütlede oluşan değişimler sayesinde proteinlerde meydana gelen modifikasyonların belirlenmesi ve proteinlerin etkileşimleri gibi birçok konuya da ışık tutmaktadır (77). Bu nedenlerden dolayı MS, proteomik çalışmalarda kullanılan temel yöntemlerden biridir.

MS' de, kromatografik bir ayırım ya da direkt enjeksiyon sonucunda spektrometrenin numune giriş bölümüne ulaşan analit, iyon kaynağında iyonlaştırılıp gaz fazına geçirildikten sonra genelde yüklü bir kapilerin yardımıyla kütle analizörüne taşınır. Kütle analizöründen sonra dedektörde sinyaller kaydedilir. Kütle spektrometreleri yüksek vakum altında çalışan analitik cihazlar olup şematik gösterimi Şekil 2.14.'de verilmiştir.



Şekil 2.14. Kütle spektrometresinin genel şeması (78).

2.11.1. İyonlaştırma Kaynakları

Numunenin sisteme girişinden sonra gerçekleşen ilk işlem iyonlaştırmadır. Çalışılacak maddenin türüne ve analiz sonucunda elde edilmek istenen bilgilere göre iyon kaynağı seçilmektedir. İyon kaynağının, yüksek iyon verimi ve mümkün olduğunca küçük enerji dağılımı gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir. İyonlaştırma işlemi, istenilen iyonlaştırma türüne göre elektronlar, elektriksel ark (kıvılcım), fotonlar, ısı ve kimyasal reaksiyonlar gibi birçok kaynaktan faydalanarak gerçekleştirilmektedir.

İyon kaynakları, gaz faz iyon ve desorpsiyon iyon kaynakları şeklinde iki grup altında toplanabilir. Gaz fazlı iyon kaynaklarında, numune öncelikle buharlaştırılır ve sonrasında iyonize edilir. Desorpsiyon iyon kaynaklarında ise numune katı ya da sıvı halden direkt olarak gaz fazındaki iyonlara dönüştürülür. Uçucu olmayan ve ısıya dayanıksız bileşiklere kolaylıkla uygulanabilen desorpsiyon kaynakları, diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır.

Sıklıkla kullanılan Elektrosprey İyonizasyon (ESI) ve Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon (MALDI), desorpsiyon iyon kaynakları sınıfına girmektedir. Bu iyon kaynağı, ısıya dayanıksız ve uçucu olmayan örneklerle de kolayca çalışılmasını olanak sağlamaktadır (79).

ESI iyon kaynakları; genomik, proteomik, metabolik çalışmalarda ve protein, polipeptid, metabolit, oligonükleotid analizlerinde çok sık kullanılmaktadır. Daha yeni bir teknik olan MALDI ise protein ile peptid analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (75, 77).

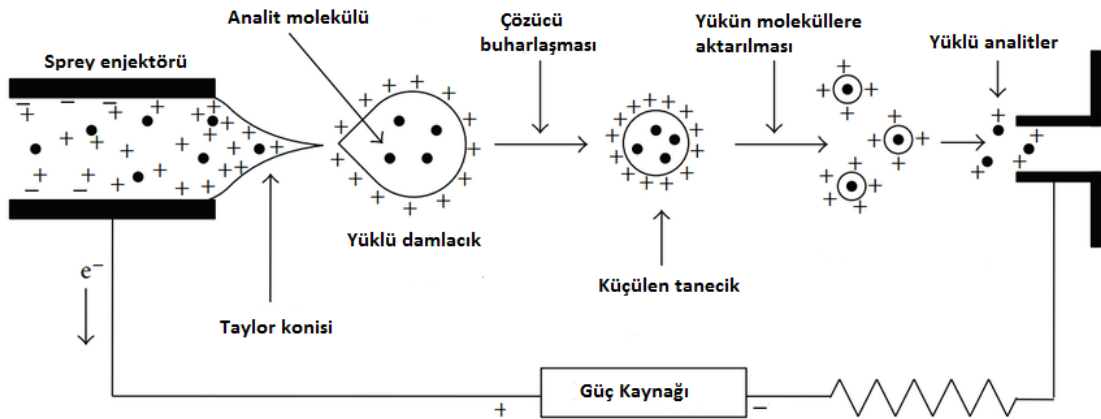
Elektrosprey İyonizasyon (ESI)

ESI, büyük polar moleküllerin parçalanmadan iyonlaştırılmasında kullanılan yumuşak (*soft*) iyonizasyon tekniğidir. Elektrosprey iyonlaştırıcılar, genelde polar olan bir çözücüde çözülmüş olan analitin, 3 - 4 kV arasında elektrik potansiyelinde küçük bir metal kapilerden spreylenirken püskürtülerek iyonlaştırılması esasına dayanır (80). Çıkışı fazlasıyla dar olan bu kapiler ile çıkış yönünde bulunan levha arasında yüksek bir potansiyel fark oluşturulur (81).

Metal kapiler yüklendiğinde cihaz içindeki çözeltide bulunan aynı yüke sahip iyonlar dışarıya doğru itilir ve bunun sonucunda yüklü damlacıklar oluşur. Elektriksel alanın etkisiyle bu yüklü sıvı, kapilerin ucunda Taylor konisi olarak tanımlanan bir koni oluşturur ve bu koni sayesinde yüzeydeki yük oranı azalır. Koninin ucunda damlacıklar oluştuktan sonra cihazın

girişine taşınırlar. Sonrasında çözeltiliyle aynı anda geçirilen ve sıcaklığı 300 - 450 °C arasında değişebilen azot gazı ile çözücü buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılır ve böylece küçülen taneciklerin üzerinde oluşan yük moleküllere aktarılır, iyonlar da kütle analizörüne iletilir.

ESI iyon kaynağı, HPLC ve CE gibi teknikler ile birlikte kombine olarak kullanılmaktadır (82). Şekil 2.15.'de ESI sistemi şematize edilmiştir.



Şekil 2.15. ESI sistemi (83).

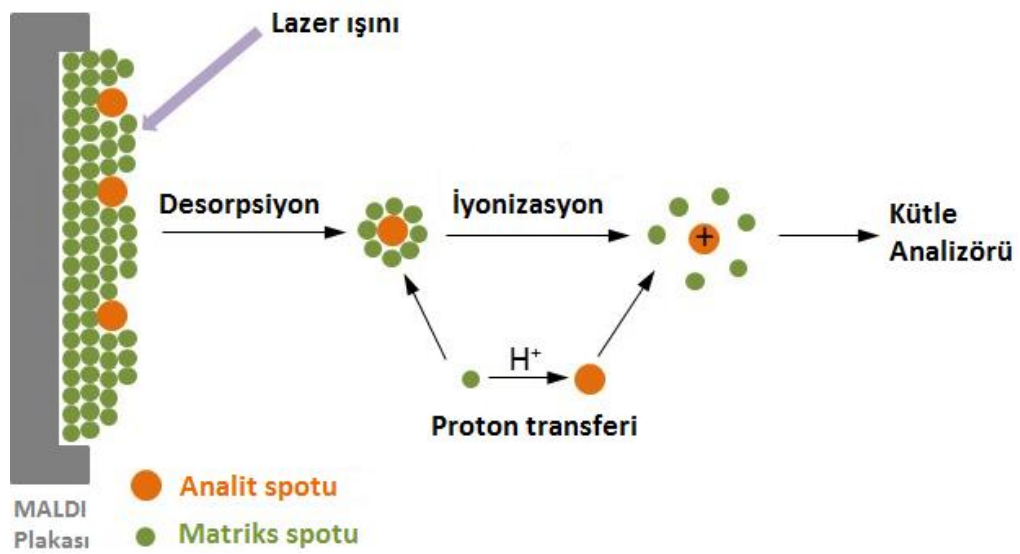
Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI)

MALDI tekniğinde, lazerden gelen enerjiyi absorblayan ve matriks olarak tanımlanan bileşikler ile düşük uçuculuk ve yüksek moleküler ağırlığa sahip analitler parçalanmadan analiz edilir. Analit, kendisinden çok daha fazla miktarda bulunan ve mor ötesi yani ultraviyole (UV) ışınları soğuran bir matriksin içine gömülerek analize hazır hale getirilir. Bu teknikte analit, matriksle karıştırılıp sıvı haldeki matriks - numune karışımı, çelik MALDI plakası üzerine tatbik edilir ve sonrasında havayla kurutulur (84).

UV veya İnfrared (IR) ışınları absorbe eden, konjuge zayıf organik asit bileşikleri matriks olarak kullanılır. Kesikli lazer ışını uygun bir dalga boyunda kullanılan matrikse gönderildikten sonra matriks bileşenleri parçalanmaksızın süblimasyona uğrar ve düşük miktarda bulunan analit molekülleri gaz fazına geçer. Aynı zamanda gerçekleşen çok sayıda çarpışmanın etkisiyle artı ve eksi yüklü analit molekülleri meydana gelir (85). Artı yüklenmiş moleküller, elektrik alanının etkisi altında buharlaşmanın gerçekleştiği yüzeyden uzaklaştırılır ve kütle spektrometresine geçerler.

Bu teknikte kullanılan matriksin 2 ana görevi vardır: Birincisi, desorpsiyonu sağlamak için lazer enerjisini almak; bir diğeri iyonizasyon için numuneye aktarılan H^+ iyonları kaynağı olmaktır (86).

MALDI - MS, gaz halinde protonlanmış iyonlar oluşturan ve analitin moleküler ağırlığını belirlemek için kullanılan bir tekniktir. MALDI, yumuşak bir iyonlaştırma tekniğidir ve analitlerden az sayıda fragment (parçalanma ürünü) meydana getirerek analizi gerçekleştirir. Bu sebeple, nükleik asit ve protein gibi biyomoleküller gibi çok sayıda numunenin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır (87). MALDI tekniği Şekil 2.16.' da şematize edilmiştir.



Şekil 2.16. MALDI lazer iyonlaştırma tekniği (88).

2.11.2. Kütle Analizörü ve Dedektör

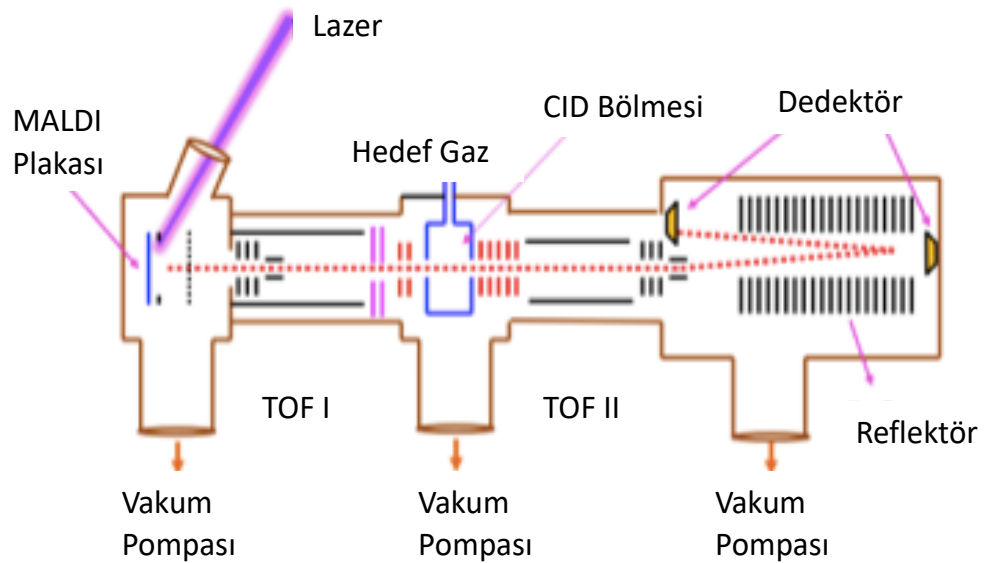
Kütle analizörü, iyonlaştırma kaynağından çıkan ürünlerin m/z oranlarına göre ayırımının gerçekleştiği bölümdür. Küçük kütle farklılıklarını yüksek bir hassasiyetle ölçebilen sistemler tercih edilmekte ve bunun için manyetik sektörlü, kuadropol ve uçuş zamanlı kütle analizörleri çok sık kullanılmaktadır. ESI veya MALDI iyonlaştırma kaynaklarıyla kombine şekilde kullanılabilen uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF) omiks çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (87).

TOF kütle analizöründe, elektrik alanın etkisiyle ivme kazanan farklı kütlelerdeki iyonların dedektöre ulaşma zamanı ölçülür.

Kütle analizörlerinden geçen iyonlar son adımda dedektöre ulaşır. Elektron çoğaltıcı özellikteki dedektörde, çarpışmanın etkisiyle oluşan akım, önce analog voltaja sonra ise sinyale dönüşür. Dizi diyot ve devamlı diyot elektron çoğaltıcı dedektörler en sık kullanılanlar arasındadır (79).

Cihazda daha hafif iyonlar daha hızlı ilerler ve dedektöre ağır iyonlara göre daha önce ulaşırlar. Dedektöre ulaşmak için belirli bir m/z değerindeki iyonunun aldığı zaman daha sonra bir kütleyle dönüştürülür ve iyonların sayı/şiddeti değerine karşı grafiğe geçirilir. Ayrıca bazı durumlarda, iyon kaynağında oluşturulan ve TOF analizöründe hızlanan aynı m/z değerindeki iyonlar, tam olarak aynı zamanda harekete başlamayabilir ve aynı kinetik enerjilere sahip olmayabilir. Bu durumda aynı m/z değerindeki iyonlar dedektöre farklı zamanlarda ulaşırlar, pik genişlemesi gözlenir ve ayırım gücü düşer.

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon, Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF/TOF-MS) cihazının şematik hali Şekil 2.17.' de gösterilmiştir.



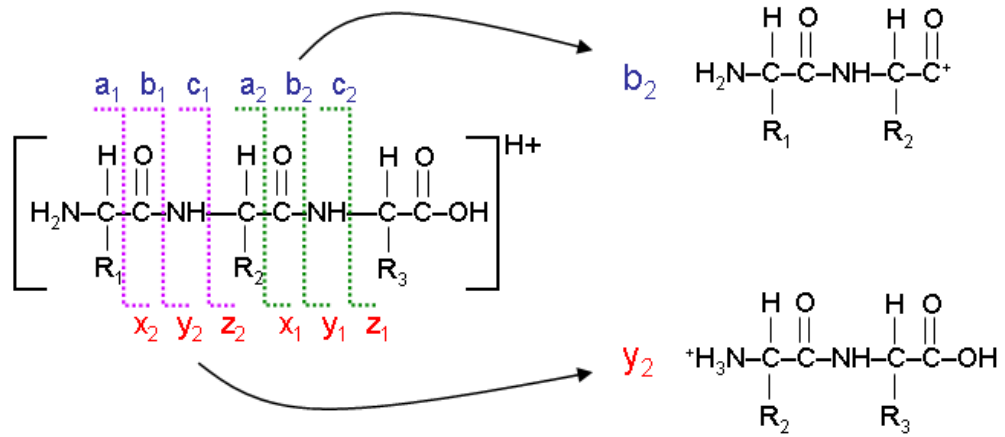
Şekil 2.17. MALDI-TOF/TOF-MS şematik gösterimi (89).

2.12. Peptid Dizileme ve De Novo Dizileme Çalışmaları

Proteomik çalışmalarda, tripsin yardımıyla parçalanmış proteinlerden elde edilen peptidlere ait kütle miktarları, yüksek kesinlik ve doğrulukla ESI-TOF-MS ya da MALDI-TOF-MS ile belirlenmektedir (90). Peptidlerin kütle değerleri ile çeşitli veri tabanları kullanılarak bilinen proteinlere ait peptid dizisi değerlerinin karşılaştırılması ile proteinlerin analiz edilmesi, "peptid dizileme çalışmaları (*peptide mass fingerprint*)" olarak tanımlanmaktadır.

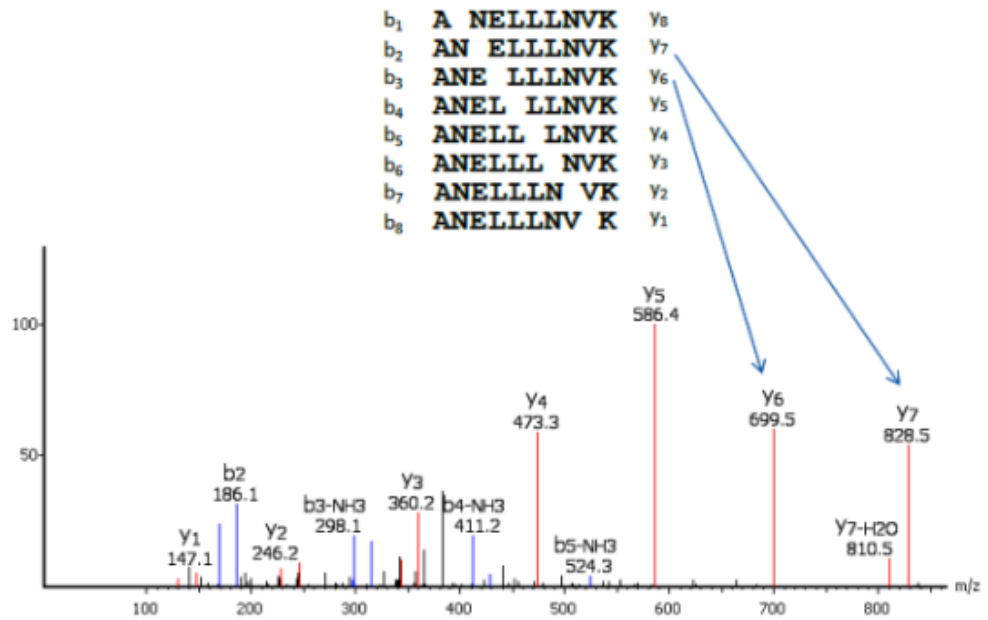
Peptid dizileme çalışmalarında, tripsin gibi bir proteaz enzimi ile enzimatik olarak parçalanmış bir proteinden bir "kütle parmak izi" elde edilir. Genelde MALDI-TOF yardımıyla elde edilen bu değerler, veri tabanında kayıtlı, teorik olarak ulaşılması beklenen peptid kütle değerleri kıyaslanır. Peptid eşleşmelerine göre proteinler sıralanabilir (91-93). Aynı zamanda kütle parmak izi ile benzer miktarlardaki proteinlerden meydana gelen karışımlar da veri tabanlarındaki bir eşleşmeyle birbiriyle ilişkili peptidler araştırılabilir (94).

Diğer bir alternatif ise "De Novo Dizileme" çalışmaları olup Tandem-MS kullanılarak gerçekleştirilir. MS¹ de izole edilip kütlesi belirlenen bir peptid iyonu (*precursor ion*) sonrasında çarpışmalarla parçalanarak fragmentlerine (*product ions*) ayrılır ve bu fragmentlerin m/z değerleri ikinci bir kütle spektrometresi ile ölçülür (65). Fragment iyonlara ait kütle değerlerinin ışığında ilgili peptide ait olan aminoasit dizilimi belirlenebilmektedir. Peptidin parçalanmasıyla oluşan ve çok sayıda bilgiyi içinde barındıran iyonlar, aminoasitlerin arasında bulunan peptid bağının kırılması sonucu oluşur (95). Bu tür iyonlar, parçalanmış omurga bağının türüne ve içeriğindeki terminal atoma göre bir harf ile tanımlanmaktadır. "b" türü ve "y" türü iyonların yanı sıra "a, c, x ve z" türü iyonlar da meydana gelmektedir (Şekil 2.18.). Gözlenebilirliği en yüksek olanları, "a, b ve y" türü iyonlardır.



Şekil 2.18. Peptidlerin parçalanması sonucu oluşan "b" ve "y" türü iyonlar (96).

Peptidler parçalanırken var olan yükün amino terminali tarafında kalması sonucunda "b" türü iyonlar, karboksi terminali tarafında kalmasıyla ise "y" türü iyonlar meydana gelir. Peptid zinciri "b" ile "y" türü iyonların oluşması sonucunda C-N ve N-C yönünde her iki taraftan da fragmentlerine ayrılmaktadır (97, 98). "ANELLVNK" peptidine ait Tandem-MS ile analizine ait spektrum, b ve y iyonlarını göstererek Şekil 2.19.' da verilmiştir.



Şekil 2.19. "ANELLVNK" peptidinin Tandem-MS ile analizi sonucunda elde edilen "b" ve "y" iyonlarını gösteren spektrum (99).

2.13. Protein Veri Bankaları ve Protein Modifikasyonları

Proteomik analizlerde peptid dizileme ve De Novo dizileme çalışmaları için geliştirilmiş birçok yazılım ve veri tabanları bulunmaktadır. SwissProt, UniProt, NCBI, MASCOT, MatrixScience bunlardan bazılarıdır. İnternet ortamındaki veri tabanları ve yazılımlar proteomik analizleri oldukça hızlandırmaktadır (100, 101).

Bu veri tabanları ve yazılımların bazı sınırlamaları vardır. Bunlardan biri, büyük protein moleküllerinin çok fazla miktarda teorik peptid oluşturması ve bunun sonucunda karışık spektrumların elde edilmesidir. Korunmuş dizilerdeki spektrumların bir başka protein tarafından oluşturulabilme ihtimali de bulunmaktadır ve küçük peptidler veri tabanındaki birçok proteinle eşleşebilirler.

Bu sebeple bu çalışmalarda bir hata payı bulunmaktadır; fakat bu hata payının belirlenebilmesi açısından da araştırmalar mevcuttur (102). Tüm deneysel çalışmaların sonunda, dikkatli bir şekilde gerçekleştirilen veri analizi basamağı da doğru yorumlanmış bir analiz sonucu açısından büyük önem arz etmektedir.

2.14. Kanser ve Proteomik Analizler

Kanser, hücrelerdeki DNA hasarı sonucunda, hücrelerin kontrolsüz büyüme ve normal olmayan hücre yayılımı ile ortaya çıkan hastalıklar grubunu tanımlamaktadır.

Kanser geliştikleri dokuya göre farklı isim almaktadır. Beyaz kan hücreleri olarak bilinen lökositlerin kanseri "lösemi," bağ dokusunda gelişen ve özelleşen lenfositlerin tümörü "lenfoma", derinin melanosit denilen pigment hücrelerinden oluşan kanserler "melanoma", mide, akciğer gibi karın boşluğundaki organların epitel hücrelerinden kaynaklanan kanserler "karsinoma", bağ doku ve kas dokusundaki kanserler de "sarkoma" olarak adlandırılır. Terminolojik olarak spesifik tip kanserler; meme, kolon, akciğer ve prostat kanserleri gibi organ adlarıyla da isimlendirilirler (103).

Apoptoz yani programlı hücre ölümü; fonksiyonunu kaybetmiş, fazlaca üretilmiş, düzensiz gelişmiş, görevini tamamlamış ya da hasara uğrayan hücrelerin çevredeki hücrelere zarar vermeden yok edilmesini sağlayan, genetik olarak kontrol edilebilen programlanmış hücre ölümüdür (104). Hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Apoptoz oranları tümör derecesi ile ilişkilidir ve daha agresif tümörler daha yüksek apoptoz ve proliferasyon

oranlarına sahiptir (105). Gelişme sürecinde mitoz bölünme, organizmanın normal büyümesi ve gelişimi için gereklidir; apoptoz ise organizmanın bütünlüğüne karşı tehdit oluşturan hücreleri uzaklaştırmak için gerekli olan bir mekanizmadır (106).

Sağlıklı bireylerde sinir hücreleri haricinde diğer tüm normal hücreler yaşam için sistemli olarak büyür, bölünür ve ölürlür. Çocukluktan yetişkinliğe kadar olan süreçte hücreler daha hızlı bölünürken, sonrasında birçok dokuda yer alan hücrelerde sadece ölen hücrelerin yenilenmesi amacıyla bölünme gerçekleşir. Normalde yeni hücrelerin oluşumuna ihtiyaç yoksa her hücrenin kendi mekanizmasıyla bu hücredeki bölünme durdurulur. Kanser hücreleri ise büyüyüp bölünmeye devam eder ve vücutta diğer bölgelere yayılır. Kanser hücreleri tümörleri oluştururlar ve bu tümörler sağlıklı dokuları sıkıştırabilir, içine sızabilir veya dokuları tahrip edebilirler. Kanser hücreleri kan veya lenf dolaşımı ile vücudun diğer bölgelerine de gidebilir ve bu bölgelerde de tümör oluşumuna neden olup büyürler. Oluşan tümörlerin hepsi kanser değildir. Tümör hücreleri çevresindeki dokulara yayılmalarına göre "iyi huylu (*benign*)" ve "kötü huylu (*malign*)" olarak sınıflandırılırlar. İyi huylu olan tümör hücreleri vücudun diğer bölümlerine yayılmazlar. Canlının yaşamını çok fazla tehlikeye sokmazlar ve sinir sistemi, damarlar ve kanallara basınç yaparak belirti verirler ve genelde cerrahi operasyon ile alınırlar. Kötü huylu tümörler ise oluştukları yerden ayrılıp vücudun değişik bir bölgesine giderek ikinci bir tümörü oluştururlar. Kanser vücudun diğer bölgelerine bu şekilde yayılması "metastaz" olarak tanımlanmaktadır (107). Bazı kanser türleri diğerlerine göre daha hızlı büyür, yayılır ve tedaviye farklı şekillerde cevap verirler (108). Kan ve lenf yoluyla diğer organlara taşınan hücreler, birbirine yapışmazlar, hücrelerden gelen sinyallere cevap vermezler ve apoptoza uğramazlar (109).

Kanser hastalığının oluşmasında birçok faktör rol oynamaktadır. Bunlar arasında güneş ışığı, radyasyon, endüstriyel atıklar, kronik irritasyon, ilaçlar, besinler, hareketsiz bir yaşam, stres, tansiyon yüksekliği, sigara, alkol, virüsler, bakteriler, immün yetmezlik gibi birçok faktör sayılmaktadır. Kanser oluşumunda genetik faktörlerin de rol aldığı bilinmektedir (110, 111).

HücreSEL davranışı genler kontrol etse de proteinler de bu mekanizmalar üzerinde etkilidir. Spesifik olarak kanser ile ilgili olarak tanımlanan proteinler, tümörün büyümesini, yayılmasını, metastazı, çevreleyen hücrelerle etkileşimi ve tedaviye yanıtı yönlendirir (112).

Proteinler organizma içerisinde, biyolojik fonksiyonlar ve hücre fenotipinden sorumludur. Kanser hücreleri tarafından salgılanan proteinler normal hücrelerden farklıdır. Kanserli hücrenin proliferasyonu (çoğalması) ve aşırı protein salgılanması birbirleriyle ilişkilidir ve erken dönemde kanda tespit edilebilir.

Proteomik yaklaşımlar, proteinin hücreden ne şekilde salgılandığı, hücredeki fonksiyonu ve karşılıklı olarak etkileşimleri, protein miktarları, hücre hasarından sonra göstermiş olduğu değişimler ve protein üzerinde oluşan modifikasyonlar konusunda bilgi vermektedir. Ayrıca proteinlerin hastalıkların spesifik belirteçleri olarak oynadıkları rolü araştırmaktadır. Özellikle hastalığın erken teşhisinde ve yeni tedavi seçenekleri konusunda proteomiks alanında yoğun olarak araştırmalar yapılmaktadır (113).

Proteomik analizlerin amacı; kanserin patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamak, teşhis için yeni tümör biyobelirteçlerini bulmak, proteomik analizlerden elde edilen veriler aracılığıyla hastalığın erken teşhis ve tanısını sağlamaktır. Onkoproteomik, kanser hücrelerindeki protein etkileşimlerini inceleyen proteomiklerin bir koludur. Onkoproteomik, kanserle ilgili tüm protein ağı, terapötik etkinliğin ve toksisitenin değerlendirmesi, prognoz ve ilaç direnci ile ilişkili kanser-protein ağındaki değişikliklere dayalı tedaviyi hedeflemektedir ve ilaç kullanımını bireyselleştiren bu tür çalışmalar klinikte önemli bir yere sahiptir (27).

Kanser tedavisi üzerine çalışmalar devam etmektedir. Omik bilimlerin gelişmesi ile klasik kanser tedavi yöntemleri daha detaylı şekilde incelenirken, ayrıca alternatif tedavi yöntemleri üzerinde de çalışılmaktadır. Bu alternatif yöntemlerden biri antikanserojen etki gösteren bitkisel ürünlerin kullanımudur. Biberiye, zerdeçal ve üzüm çekirdeğindeki resveratrol gibi maddelerin bazı kanser türleri üzerinde etkisi olduğu proteomik çalışmalarla ortaya konmuştur.

Genomik ve proteomik çalışmalarda, ileri analitik teknikler kullanılarak bitkisel kaynaklı ürünlerin kanser hastalığında iyileştirici etkilerinin moleküler düzeyde araştırılmasına ait literatürde çok sayıda çalışmaya rastlanmaktadır (114-120).

Kanser araştırmalarında proteomik çalışmalar, işlevsel ve düzenleyici yolların tanımlanması, dokuda ve biyolojik sıvılarda hastalığa sebep olan molekül yapılarını ortaya çıkarma, hastalık evrelerine, hastalığa, kişiye özgü farklılıklara dair çok sayıda değerli veriler ortaya koymaktadır (121, 122). Günümüzde çok sayıda biyolojik örnekler ile yapılan

proteomik çalışmalarda artış gözlemlenmiştir. Meme kanserinde de hastalığın sürecini daha iyi anlayabilmek amacıyla tümör dokusu ve biyolojik sıvılar (serum, iğne aspirasyon sıvısı, duktal lavaj sıvısı ve hücrelerarası tümör sıvısı) ile çok sayıda çalışmalar yapılmıştır (112, 113, 123).

2.14.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda görülen en yaygın kanser türü olmakla birlikte; başta gelişmiş ülkeler olmak üzere en sık görülen kanser kaynaklı ölüm nedenlerindedir (124). Meme kanserinin görülme riski, gelişmiş toplumlarda çok daha yüksek olduğundan, örnek olarak Amerika'da 10 kadından biri, ülkemizde ise her 25 kadından biri, hayatı boyunca meme kanserine yakalanmaktadır (125).

Meme kanseri risk faktörleri; demografik özellikler (cinsiyet, yaş gibi), reproduktif öykü (menarş yaşı, doğum yapma sayısı, ilk hamilelik yaşı, menapoz yaşı), ailesel ve genetik faktörler (aile öyküsü, bilinen veya şüphe edilen BRCA1, BCRA2 ve diğer gen mutasyonları), çevresel faktörler (hayat tarzı, alkol ve sigara kullanımı, fazla radyasyona maruz kalma vb.) şeklinde özetlenebilir (126). Anne ya da kızkardeşte meme kanseri görülmesi, riski 2-3 kat arttırırken, ikinci derece bir akrabasında meme kanseri olan kadın için risk iki kattan daha az artar.

Meme kanserinde yaş önemli bir risk faktörüdür. Yirmi yaşın altında meme kanseri görülme ihtimali oldukça düşüktür. Meme kanseri teşhisi konan kadın hastaların % 70' i, 50 yaşın üzerindedir. Yani elli yaşın üzerindeki kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı, yaşı 50' nin altında olan kadınlardan yaklaşık dört kat fazladır (127).

Bir diğer risk faktörü ise erken menarş ve geç menopozdur. Meme kanserinin görülme riskini arttıran bu faktörlerin, uzun süreyle östrojene maruz kalmayla ilişkili olduğu düşünülmektedir (128). Ülkemizde yapılan bir çalışma sonucunda, 15 yaşın altında menarş olan kadınlarda, diğerlerine göre 1.72 kat daha fazla meme kanseri görülme ihtimali olduğu ortaya konmuştur (129).

Kadınlarda gebelik ve emzirme de risk faktörleri arasında yer almaktadır. Meme hücreleri, gebelik ve emzirme sırasında veya sonrasında olgunlaşıp farklılaşır ve ovulatuvar döngü sayısı azalır. Bu konuda yapılan araştırmalarda, ilk doğum yapılan yaş ile meme kanseri

arasında pozitif bir ilişki olduğu, bir diğer çalışmada ise daha önce hiç doğum yapmamış olmanın bir risk faktörü olmadığı; ancak 20 yaş altında ya da 30 yaş sonrasında doğum yapmanın meme kanseri görülme riskini artırdığı belirtilmiştir (130).

Östrojene maruz kalma süresiyle meme kanseri gelişiminin ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan birçok çalışma, östrojenin ve progesteronun meme hücreleri üzerinde büyümeyi ve proliferasyonu artırıcı etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Tek başına östrojen alımının meme kanseri gelişme riskine etkisi, kombine östrojen ve progesteron alımından daha yüksek bulunmuştur. Günümüzde östrojen kullanılması tartışmalıdır, fakat menapoz semptomlarının giderilmesi amaçlı kullanılan yüksek östrojen dozlarının orta derecede risk artışına yol açtığı gösterilmiştir (131).

Meme kanserinin oluşmasında hormonların etkisi çok fazladır ve bu hormonlar arasında en büyük risk faktörünün de östrojen olduğu bildirilmiştir (132). Steroid yapısında bir hormon olan östrojen, genelde ovaryumlardan, az miktarda böbrek üstü bezlerinden ve plasentadan salgılanır. Doğal östrojenler olan β -östradiol (E2), östron (E1) ve östriol (E3)'dür. Bunlardan en fazla salgılananı β -östradiol, en az salgılananı ise östrondur. Östriol ise östradiol ve östronun özellikle karaciğerdeki oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Biyolojik olarak meme dokusunda en etkin olan östrojen ise β -östradioldür (133).

Hormonlar, hücrelerdeki etkilerini, hücre yüzeyinde veya içinde bulunan ve ilgili hormona karşı spesifik afinitesi olan reseptör proteinlerine bağlanarak gösterirler. Reseptör - hormon ilişkisi hücrede bir takım biyokimyasal değişikliklere yol açar. Meme ve uterus dokusu östrojen reseptörleri nedeniyle östrojenin etkilerine açıktır. Meme kanseri hastalarında östrojen reseptörlerinin pozitifliğinin % 40 - 80 oranlarında olduğu bulunmuştur. Östrojen kendi reseptörünü aktive ederek hücrenin daha çok bölünmesine neden olmaktadır. Kansersiz hücrelerde bulunan östrojen reseptörü, normal hücrelerdekinden belirgin derecede fazladır (134).

Menopoz öncesi ovaryumda oluşan östrojen sentezi, postmenopoz döneminde durur ve serbest östrojen miktarı biyolojik etki seviyesinin altına iner. Ancak yine de östrojene bağlı meme kanserlerinin büyük bölümü bu dönemde ortaya çıkmaktadır (132).

Vücut yağ oranının artması ile meme kanseri riskinin arttığı bilinmektedir. Avrupa Beslenme ve Kansere Çalışma Grubu (*European Prospective Investigation into Cancer and*

Nurition-EPIC' nun oluşturduğu rapora göre; kilolu kadınların zayıf olanlara göre % 31 oranında daha fazla meme kanseri riski taşıdığı bulunmuştur (130).

Son yıllardaki genetik çalışmalar, meme kanserinde genetik faktörlerin de risk oluşturabileceğini göstermiştir. Kalıtsal bazı sendromların varlığında meme kanserinin görülme sıklığında artış gözlenmiştir (135). Kalıtsal meme sendromu birçok gen mutasyonuna bağlı olarak gelişebilir; ancak sıklıkla BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar tespit edilmiştir. Kalıtsal olarak BRCA1 ve BRCA1 genlerinde gelişen mutasyon, anne ya da babadan aktarıldıktan sonra bu kromozom çiftinde meydana gelen başka bir mutasyon sonucunda kanser gelişmektedir. Mutasyona uğrayan BRCA1 ve BRCA2 genlerini taşıyan insanlarda meme kanseri riskinin belirgin olarak arttığı bulunmuştur (136-138).

Meme kanseri belirtilerini bilmek, meme kanserinin ilerlemesini engellemek ve erken teşhis ve böylece tedavinin başarı şansını yükseltmek adına çok önemlidir. Meme kanseri belirtileri şu şekilde sıralanabilir:

- Memede genelde ağrısız, sert yapılı, hareket ettirilebilen ya da yerinde sabit olan, zamanla büyüklüğü değişebilen, ele gelen şişlik ve kitleler,
- Meme boyutu ya da şeklinde gözle görülebilir değişiklik olması,
- Meme cildi üzerinde gözlenen kızarıklık, kaşıntı, morluk, yara, damar genişlemesi, içeri doğru çöküntü, yayılmış küçük şişlikler ve portakal kabuğu görünüşü,
- Meme başında ve çevresindeki renk, şekilde değişiklik,
- Meme başından gelen kanlı ya da kansız akıntı,
- Koltuk altında elle fark edilen ağrılı veya ağrısız şişlikler (139).

Meme kanseri tedavisi yönteminin başarısı; hastanın yaşına, cinsiyetine, genel durumuna ve yaşam kalitesine göre değişiklik göstermektedir. Tedavi, hastalığın hangi evrede olduğuna bağlı olarak değişmektedir. *Evre 0* da ameliyat sonrasında kemoterapi tedavisi uygulanmasına gerek duyulmamaktadır. Radyoterapi de çoğu zaman tedaviye eklenir. *Evre I* ve *I'* de ise kitle küçüktür, ameliyat ardından kemoterapi tedavisi uygulanıp uygulanmayacağına karar verilir. *Evre III'* de kemoterapi tedavisi uygulandıktan sonra hasta ameliyat edilir. *Evre IV'* de ise eğer ki kanser vücudun çok fazla bölgesine yayılmamış

durumda ise cerrahi operasyon uygulanabilir; ancak kanser yayılımı fazla ise sadece ameliyat kesinlikle önerilmez. Sadece kemoterapi ve bazen radyoterapi tedavisi uygulanır.

2.15. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı

Bu tez çalışması kapsamında, MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) meme kanseri hücre hattı ile çalışılmıştır. ABS' nin, MCF-7 hücre hatlarında proteom düzeyinde meydana getirebileceği değişiklikler ve meme kanseri tedavisinde ne derece etkili olabileceğinin proteomik analizler ile ortaya konulması planlanmıştır.

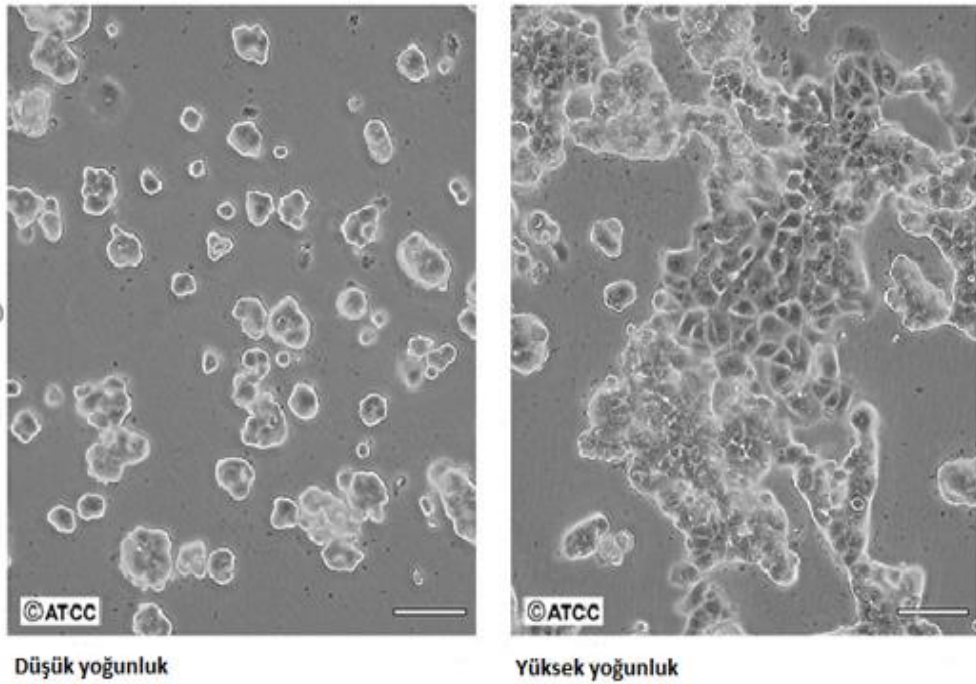
MCF-7 hücreleri, 1970 yılında 69 yaşında Kafkas kadın hastanın metastatik dokusundan elde edilen epitel hücrelerdir. İnsan meme kanseri hücre hattı olup, morfolojik olarak aderent bir yüzeye tutunarak büyüyen fibroblast benzeri hücrelerdir. Bu hücreler östrojen reseptöre pozitif özellik gösterdiğinden dolayı meme kanseri araştırmalarında sıklıkla kullanılır. Bu hücrelerin büyümesi *in vitro* olarak TNF alfa ve anti-estrogenler ile inhibe edilebilir (140).

MCF-7 meme kanseri hücre hattına ait genel bilgiler Tablo 2.1' de, düşük ve yüksek çözünürlük görüntüleri ise Şekil 2.20.' de sunulmuştur.

Tablo 2.1. MCF-7 meme kanseri hücre hattına ait genel bilgiler (141).

Organizma	Homo sapiens, insan
Doku	Meme bezi, meme
Hücre tipi	Epitel hücreleri
Hastalık	Adenokarsinom
Yaş	69
Cinsiyet	Kadın
Etnik köken	Kafkas

ATCC numarası: HTB-22



Şekil 2.20. Düşük ve yüksek yoğunluktaki MCF-7 meme kanseri hücre görüntüleri (142).

2.16. Kanser Tedavisinde Kullanılan Geleneksel ve Alternatif Yöntemler

Genellikle günümüzde kanser tedavileri dört farklı şekilde uygulanmaktadır:

- **Cerrahi:** Kanserli dokuyu ve çevresindeki yayılma riski taşıyan sağlıklı dokunun bir kısmının cerrahi müdahale ile alınmasıdır. Cerrahi müdahalenin mümkün olmadığı durumlarda ise radyoterapi ya da kemoterapiye başvurulmaktadır. Cerrahi ne kadar standart yöntem olsa da operasyon sırasında anestezi ve sonuçta ölüm riskinin olması, operasyon sonrası uzun bakım süresi ve kanser hücrelerinin başka dokulara yayılması ve bunun sonucunda tümörün tamamıyla yok olmaması gibi yan etkileri bulunmaktadır (143).

- **Radyoterapi:** Uygun dozlarda ışın uygulayarak kanser hücrelerinin öldürülmesine dayanan tedavi şeklidir. Genelde tedavi dozuna ve tedavi edilen bölgeye göre oluşan yan etkiler şu şekildedir: Bulantı ve kusma, epitel yüzeylerin zarar görmesi, ağız ve boğaz kuruması, bağırsak sorunları, ödem, fibroz, saç dökülmesi, tükürük ve gözyaşının kuruması, lenflerin ödemi, sekonder kanser, kalp hastalıkları, kısırlık, bilişsel gerileme görülebilir.

- **Kemoterapi:** İlaç kullanımına dayanan tedavi şeklidir. Vücuttaki istenmeyen hücrelerin öldürülmesi planlanır. Kemoterapik ilaçlar tek veya birkaç ilacın aynı anda verildiği kürler halinde uygulanır. Her hastaya ait kemoterapi protokolü diğerinden farklı olup hastaya özeldir. Bu ilaçlar, zararlı hücreleri öldürürken; normal hücrelere de zarar verip yan etkilere yol açmaktadırlar. Ayrıca bu ilaçlar, hızla bölünen hücreleri örneğin saç, gastrointestinal sistem, kemik iliği gibi sistemleri daha çok etkilerler. Ancak etkilenme kişiden kişiye farklılık gösterebilir. Tad değişikliği, ağız ve boğaz kuruması, aşırı yorgunluk, anemi ve kanama problemleri, diyare, bulantı ve kusma, kabızlık, aşırı ağrı, derideki yan etkileri, saç dökülmesi, kilo kaybı, bağışıklık sistemi sorunları ve viral enfeksiyonlar, hafıza değişiklikleri gibi yan etkiler gözlenmektedir (144).

- **Alternatif Tıp:** Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi ve asıl tedaviye destek olmayı amaçlayan ancak güvenilirliği ve etkinliği halen araştırılan yöntemlerdir (145).

Kemoterapide uygulanan antikanser etkili ilaçların etki mekanizmaları halen kesin olarak bilinmemesine rağmen kuvvetli bir antiproliferatif etkiye sahip oldukları ortaya konmuştur (146).

Kemoterapi amaçlı kullanılan ilaçlar kanserli hücreye karşı toksik etki gösterir, ancak aynı şekilde sağlıklı hücrelere de bu toksik etkiyi göstermekte ve bundan etkilenen sağlıklı hücreleri içeren organları da tahrip etmektedir. Antikanser ilaçların bu yan etkileri nedeni ile hastaların ölümü ile sonuçlanabilmektedir. Literatürde yer alan bir çalışmada, kemoterapi tedavisi gören kanser hastalarının % 80' ninde iyileşme gözlenirken; geriye kalan % 20 hastada bu ilaçlara karşı direnç gelişmiş veya ölümcül derecede toksisite meydana geldiği belirtilmiştir (147). Bu nedenlerden ötürü günümüzde uygulanan geleneksel kanser tedavisi yöntemlerinin ve ilaçların yetersiz olduğu düşünülmektedir.

Günümüze kadar tıbbi bitkilerden elde edilen ekstraktların antikanser aktiviteleri üzerine çok fazla sayıda araştırma yapılmıştır (148-151).

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan arasındaki dengenin bozulması sonucunda oluşan patolojik bir durum olan kanser; kardiyovasküler, otoimmün bozukluklar gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir (152). Antioksidan aktivite bu nedenle, insan sağlığı açısından oldukça önemlidir ve son yıllardaki çalışmalara göre pek çok biyolojik aktivitenin de antioksidan etkiden kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Ayrıca araştırmalarda, doğal ürünlerin

içeriğindeki fitokimyasalların (bitkilerde doğal olarak bulunan, biyolojik olarak aktif olan kimyasal bileşikler) oksidatif stres ile ilgili hastalıklardan korunmada önemli bir rol alabileceği ortaya konmuştur. Bu fitokimyasalların antioksidan özellikleri sayesinde, serbest radikallerin hücre için zararlı olan etkilerini ortadan kaldırdığı düşünülmektedir (153).

Doğal bir bileşiğin kemoterapötik olarak etkili olduğunu gösteren bazı kriterler belirlenmiştir ve bu kriterlerin en önemlileri; araştırılan doğal ürünün, kanserli hücreler üzerinde gösterdiği sitotoksik etkiyi normal hücreler üzerinde göstermemesi ve birden fazla kanserli hücre türlerinde etkili olmasıdır.

MCF-7 meme kanseri hücre hattında bazı bitki ve karışımlarının antikanser etkisinin araştırıldığı çalışmalar aşağıda sıralanmıştır:

* *Lampetra tridentata* (gürçalılık) (*Creosote Bush*) ve *Juniperus communis* L. (*Juniper Berry*) (ardıç) gibi bitkilerin, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde antikanser etkinlikleri araştırılmıştır ve bu bitkilere ait ekstraktların, meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını yavaşlattığı gözlemlenmiştir (145).

* Nar meyve ekstresinin MCF-7 meme kanseri hücre hattında, derişim ve zamana bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik etkiler oluşturduğu ve hücre proliferasyonunda inhibitör etkisinin olduğu gözlemlenmiştir (154).

* Aydın yöresinde baharat ve tedavi amaçlı kullanılan 4 çeşit tıbbi bitki türünden *Euphorbia platyphyllos* L. (koca sütleğen), *Vitex agnus-castus* L. (hayıt otu), *Dracunculus vulgaris* Schott. (yılanyastığı), *Asphodelus aestivus* Brot.'dan (çiriş otu) elde edilen ekstralarının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde *in vitro* sitotoksik etkisinin, kontrol gruplarına kıyasla uygulandığı süre ve derişim artışına bağılı olarak arttığı görülmüştür. Ayrıca MCF-7 meme kanseri hücre hattında yüksek sitotoksik etkisi olan bu ekstraların belirli derişimlerde, DNA hasarı da meydana getirdiği ve bu ekstralardan bazılarının MCF-7 meme kanseri hücre hattında genotoksik ve hasar yapıcı etkileri olduğu da gözlemlenmiştir (155).

* *Nerium oleander* (zakkum) bitkisinin çiçek ve yaprağından elde edilen ekstraların, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde belirgin derecede sitotoksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir (156).

* Zeytin yaprağından elde edilen ekstraktın, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını engellediği ortaya konulmuştur (157).

* Kuzukulağgiller (*Polygonaceae*) ailesinden çok yıllık otsu yabancı bir bitki olan ve ülkemizde daha çok Orta Anadolu'da yol ve tarla kenarlarında yetişen *Polygonum cognatum* Meissn. (madımak) bitkisi, insan türüne ait sağlıklı epitelyal hücrelerinde sitotoksik bir etki oluşturmazken, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda antioksidan aktiviteleri de araştırmanın sonucunda ortaya konmuştur (158).

* Patates ekstraktlarının içerdiği antioksidan özelliği olan fenolik bileşenler, özellikle klorojenik asit ile hücre büyümesini engellediği ve meme kanseri hücrelerinde de etkili olduğu gözlemlenmiştir (159).

* Aynı şekilde, soya sütünün (160), *Vigna unguiculata'* nın (börülce) (161) ve zeytinyağının (162), elmadan (163), *Tephrosia purpurea* ve *Ficus religiosa* (kutsal hint inciri)' dan (164), üzümde elde edilen ekstraktların (165), MCF-7 meme kanseri antiproliferatif etkiye sahip oldukları bulunmuştur.

Geçmişten günümüze kadar olan süreçte kanser ve diğer pek çok hastalığın tedavisinde bitkisel ilaçlar kullanılmaktadır. Araştırmacılar, gelişmekte olan ülkelerde tıbbi amaçlı kullanan ve antikanser özellik gösteren bitkilere odaklanmış ve bu bitki türlerinin üzerinde çalışmalar yürütmüşlerdir (166).

Avrupa, Hindistan ve Çin' de, alternatif bitkisel ilaçlara yönelik talebi karşılamak için birçok tıbbi bitki yetiştirilmektedir. Yapılan araştırmaların sonucunda bulunan bu bitki özüt ve bileşiklerinin gösterdiği biyouyumluluk ve aynı zamanda kanser hücrelerindeki sitotoksik etkileri nedeniyle bu bitki türlerine olan ilgi ve talep artmıştır (167).

Hemostatik ajan olarak isimlendirdiğimiz kanama durdurucular kanser hastalığında önemli bir yere sahiptir. Kanser hastalığında sıklıkla lokal kanamalarla karşılaşmaktadır ve bu kanamalar ani hasta ölümlerine sebebiyet verebilmektedir (168). Bu kanamalar hastalığın yanı sıra uygulanan kemoterapi ya da radyoterapi tedavilerinin bir sonucu olarak da meydana gelebilmektedir (169).

Kanser hastalarının tedavisi sürecinde kullanılan hemostatik ajanlar bitkisel, sentetik ve polisakkarit temelli olmak üzere farklı gruplar altında toplanmaktadır. Özellikle kanser araştırmalarında, vücut ile uyumlu olması ve günümüzde uygulanan tedavi yöntemlerine

oranla daha az yan etkilere sahip olması sebebiyle hemostatik ajanlar da sık sık kullanılmaktadır.

Meme kanserinde etkinliklerinin değerlendirilmesine yönelik çalışılan ilaçlar olsa da günümüzde tedavisinde % 100 etkili denilebilecek sentetik ya da bitkisel kaynaklı ilaçlar bulunmamaktadır (170-172).

Bu tez kapsamında kullanılan ABS' nin MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisi başka bir tez çalışmasında incelenmiştir (173). Bu çalışmada, ABS' nin MCF-7 üzerindeki hücre canlılığını *in vitro* olarak nasıl etkilediği ve klinikte kullanılan belirli kemoteröpatik ilaçlarla kombinasyonlarının yine hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, kültür ortamına eklenen ABS' nin etkisiyle hücre canlılığında azalma gözlemlenmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile yapılan MTT testi sonuçlarına göre; kemoteröpatik ilaçlarla ABS' nin beraber uygulanması sonucunda; kümülatif bir etki gözlemlenmiş ve ayrı ayrı yapılmış olan uygulamalarına kıyasla hücre canlılığını daha fazla azaltmıştır. Ayrıca, ABS' nin bu ilaçlarla kombinasyonunun mitokondriyal yolakta bulunan genler üzerindeki etkisi araştırılmış ve ayrı ayrı uygulanmalarına kıyasla kombinasyonların Bax, P53 ve Kaspaz-9 gen ifadelerini istatistik olarak arttırdığı bulunmuştur. ABS' nin apoptotik etkisinin, çalışmada kullanılmış olan ilaçlara göre daha üstün olduğu ve ilaçların tek başına kullanılmasındansa, ABS ile birlikte kombinasyonların gen ifadesindeki etkiyi arttırdığı sonuçlarına ulaşılmıştır (173).

Günümüze kadar yayınlanan çalışmalar incelendiğinde, ABS içeriğindeki bitkilerin karışımından oluşan ekstrenin antikanserojenik etkilerini MCF-7 meme kanseri hücre hattında proteomik düzeyde bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Gelişmiş ülkelerde destekleyici ve alternatif olarak hastaların kullanımına sunulabilecek bitkisel kaynaklı ilaçlar büyük hızla kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye ve Asya bölgelerinde tıbbi olarak birçok hastalığın tedavisi için tek başına veya kombine karışımlar halinde bitkiler kullanılmaktadır. Bitkisel kaynaklı tedavi geleneksel Türk tıp tarihinde de önemli bir yere sahiptir ve sık sık kullanılmıştır. Birçok kişi, bitkisel tedavilerin “doğal” ve “güvenli” olduğunu düşünmektedir (174, 175). Böylece hastalar bitkisel kaynaklı ilaçları, tedavide kullanılan kemoterapötik ilaçların yanında destekleyici ya da alternatif bir tedavi şekli olarak kendi istekleri doğrultusunda kullanmaktadır.

Yapılan araştırmalarda toksik etkiyi minumuma indirmek ve etkin bir tedavi alternatifi bulabilmek amaçlanmaktadır. Böylece günümüzde yapılan çalışmalarda çeşitli kanser tiplerine karşı bitkisel kaynaklı ilaçlardaki antikanser etkiler araştırılmaktadır ve elde edilen veriler alternatif ve destekleyici bir tedavinin nn açmak için oldukça önemlidir.

2.17. Ankaferd Hemostat (ABS, Ankaferd Blood Stopper®)

ABS eskiden az gelişmiş bölgelerde kullanılan bir bitkisel karışımın, modern tıbbi bilim insanlarının çalışmaları sayesinde yeniden kazandırılmasıyla ortaya çıkmıştır. ABS, hemostatik ajan olarak kullanılan bitkisel bir ekstrattır.

ABS, *Thymus vulgaris* (kekik), *Glycyrrhiza glabra* (meyan), *Vitis vinifera* (koruk), *Alpinia officinarum* (havlıcan) ve *Urtica dioica* (ısırgan) bitkilerinden oluşan standardize edilmiş bitkisel bir ekstrattır. Karışımı oluşturan bitkilerin tek başlarına endotel ve kan hücreleri, damar oluşumunda, vasküler dinamikler ve mediatörler üzerinde hemostatik etkiye sahip oldukları bilinmektedir.

* *Thymus vulgaris* yapraklarının antioksidan etki ile aynı zamanda terletici, antispazmodik ve sedatif özellikleri vardır. Kekik ekstrakt ve infuzyonlarının boğaz ve bronş hastalıklarıyla birlikte kronik gastrit, diyare ve iştahsızlık durumlarında da etkili olduğu bilinmektedir (176).

* *Glycyrrhiza glabra* köklerinden oluşan ekstratın *in vitro* hücre çalışmalarında antianjiyonik etkisinin olduğu ve aynı zamanda antiinflamatuvar, antirombotik, antiaterosklerotik, antitümöral ve antioksidan etkileri de birçok araştırma ile ortaya konulmuştur (177-179).

* *Vitis vinifera'* nın tohumlarından elde edilen ekstrakt antiinflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal olarak etkilidir (180).

* *Alpinia officinarum* ise bronş nezlesi, ülser, idrar kaçırmanın kontrol altına alınması, ağız kokusu, çocuklarda öksürük boğmaca, romatizma ve boğaz enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (181).

* *Urtica dioica* sıçanlarda, nitrik oksit kaynaklı olarak endotel bağlantılı hipotansif bir cevap oluşturmasının yanısıra ekstratının kardiyovasküler, diüretik, hipotansif ve insan

lenfositlerinde çoğalmayı uyarıcı etkilerinin olduğu araştırmaların sonucunda bulunmuştur (182-184).

ABS' nin etki mekanizması canlı eritrositlerden kapsüllenmiş protein ağlarının oluşturulması şeklinde dir. Bu şekilde protein ağları oluşurken organizmaya ait fizyolojik pıhtılaşma sistemleri üzerinde ABS' nin bir etkisi yoktur (179).

ABS' nin deneysel majör arteriyel damar yaralanmalarında, normal ve yüksek arter içi kan basıncı olduğunda, kanama süresi ve kan kaybını azalttığı ortaya konmuştur. Aynı zamanda, diş çekimi ve periodental cerrahi sırasında, 1 veya 2 mL kadar ABS, oluşan kanamanın kontrolü için de kullanılmaktadır (185). ABS, ciddi kanamalı durumlarda ve burun, tiroid, geniz eti ve bademcik kanamalarında yapılan tedavi sırasında da güvenle kullanılmıştır (186-190). ABS' nin, üst gastrointestinal kanama, sindirim kanalında oluşan arteriyel kaynaklı kanama ve soliter rektal ülser kaynaklı kanamayı kontrol altında tutmak için de kullanılmıştır (191, 192).

ABS' nin sebep olduğu eritrosit - protein ağına ait önemli proteomik bileşenlerin olduğu gözlemlenmiştir. Proteomik araştırmaların sonucunda, ABS' nin içeriğinde, insanların peptidleriyle benzerlik gösteren 35 tane farklı protein olduğu bulunmuştur (193).

ABS ampul, sprey ve tampon olarak 3 farmasötik formda bulunur. Tez kapsamındaki çalışmalarda ABS' nin ampul formu (2 mL) kullanılmıştır. Ampul formunun içeriği Tablo 2. 2.'de gösterilmiştir (194).

Tablo 2.2. Ampul formundaki ABS' nin içeriği (194).

Etkin Madde	Ampul (2 mL)
<i>Urtica dioica</i> (ısırgan)	0.12 mg
<i>Vitis vinifera</i> (koruk)	0.16 mg
<i>Glycyrrhiza glabra</i> (meyan)	0.18 mg
<i>Alpinia officinarum</i> (havlıcan)	0.14 mg
<i>Thymus vulgaris</i> (kekik)	0.10 mg

Deney hayvanlarında yapılan toksisite testlerinin sonucunda haricen uygulanan ABS ürünleri; irritabilite, toksisite, stabilite ve sterilite testlerini başarıyla geçmiştir ve T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü tarafından eksternal kanamaları kontrol etmek

için ara ürün olarak (Mayıs 2017) ruhsatı verilmiştir (Ek. 1). ABS, insanlarda dental olarak gerçekleşen kanamaların kontrolünde, acil servislerde ve 112 ilk yardım ambulanslarında kanamaları durdurmak ve kontrol altına almak amacıyla kullanılmaktadır.

ABS uygulanarak displazi (anormal hücre ve/veya doku büyümesi) ve kanserli hücreler üzerinde yapılan klinik çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir:

Şişanlarda, 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) kaynaklı oral epitelyal displaziye karşı ABS' nin koruyucu etkilerinin olduğu belirlenmiştir (195).

İnsan kolon kanserinde gözlenen gastrointestinal kanamaları durdurabilmek amacıyla ABS kullanılmıştır. Bu çalışmalarda, ulaşılması zor bölgelere ABS' nin kolayca uygulanabildiği belirtilmiştir. ABS' nin herhangi bir yan etkisinin bulunmaması, tekrar tekrar kullanılabilceği, antikoagülan ve antitrombotik ilaç kullanan hastaların da rahatlıkla ve cerrahi müdahalelere kıyasla daha düşük bir maliyetle kullanılabilceği gözlemlenmiştir (196).

Çocuklarda görülen kanserlerde, uygulanan kemoterapi tedavisi sonucunda oluşan oral mukozitlerin önlenmesinde ve tedavi sürecinde ABS' nin etkili olduğu bulunmuştur (197).

Birçok akciğer hastalığı (akciğer kanseri, mesleki astım ve akciğerlerde tozun birikimi sonucu doku hasarı ile seyreden bir meslek hastalığı olarak bilinen pnömokonyoz) kaynaklı duman ile ilişkilendirilmektedir. 40 yaşındaki bir kaynak işçisinde gözlenen ve kaynak dumanlarına bağlı alveoler kanamada, bronkoskop probuyla akciğer loblarına buzlu salin ve ABS lavajı uygulandıktan sonra kanama günden güne azalmış ve 6. günün sonunda kaybolmuştur (198).

Kanamalı kusma ve yutma güçlüğü şikâyetleri bulunan primer özofagus adenokarsinom' lu 10 yaşındaki erkek çocuk hastaya topikal ABS uygulaması ile gastrointestinal kanamanın kontrol altına alındığı ve bu uygulamanın alternatif bir yöntem olabileceği belirtilmiştir (199).

89 yaşında rektal karsinomu olan kadın hastaya uygulanan cerrahi müdahalede, 15 dakika boyunca ABS ile tampon yapılmış ve kanamanın durdurduğu gözlenmiştir. Ayrıca topikal olarak yapılan ABS uygulamasıyla kanamalı gastrointestinal karsinomlarda tümör vaskülarizasyonunun azaltıldığı da belirtilmektedir (200).

Bazı melanom hücrelerinde yapılan bir çalışmada, ABS' ye karşı farklı oranlarda direnç oluşmuş ve ABS derişimi ve inkübasyon süresi arttığında hücre canlılığının azaldığı belirtilmiştir (201).

ABS' nin antineoplastik etkisi Saos-2 ve Caco-2 hücre hatlarında da araştırılmıştır. Öncelikle, Saos-2 osteosarkom hücreleri üzerinde yapılan çalışmada, ABS; 2 - 10 µL/mL derişimlerde uygulanmıştır. Hücre proliferasyonunda uygulanan doza bağlı azalma ve Saos-2 hücrelerinin canlılığında azalma tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir hücre ölümü gözlemlenmiştir (179).

ABS' nin antineoplastik aktivitelerini göstermek için lösemi ve lenfoid tümör hücre hatlarında çalışılmıştır. Bu çalışmada 0.5, 1 ve 2 µg/mL derişimler uygulandığında, 0.5 µg/mL ve daha yüksek dozlarda antikanser etkinin, 0.5 µg/mL altındaki dozlarda ise hücresel olarak farklılaşmanın uyarıldığı ve kansere bağlı kanamalarda yapılacak tedavilere yönelik gelişmeler olduğu gözlenmiştir (202).

Başka bir çalışmada, ABS' nin K-562 and Jurkat lösemi hücre hatlarında apoptoza neden olduğu saptanmıştır (203).

Caco-2 kolon kanseri hücre hattında bu bitkisel kaynaklı hemostatik ajanın antikanser etkisi, ultra performanslı LC-MS tekniği kullanılarak proteomik çalışmalar ile saptanmıştır (204).

Başka bir tez çalışmasında, ABS' nin antikanser etkisinin araştırılması amacıyla ABS, HepG2 karaciğer kanseri, Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücre hatlarına uygulanmıştır. ABS ile muamele edilen (işlenmiş, T grubu) ve muamele edilmeyen hücrelerde (kontrol, C grubu) karşılaştırmalı proteomik çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarda 2D jel elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS teknikleri kullanılmıştır ve ABS' nin çalışılan kanser hücrelerinde etkilediği biyolojik süreçler ve yollar tespit edilmiştir (205).

Bu tez çalışması kapsamında, incelenen MCF-7 meme adenokarsinom hücre hattının ABS ile muamelesi sonucunda 2D jel elektroforez tekniği ile proteinler ayrılıp MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilip her bir hücre hattına ait düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler tespit edilmiştir. Çalışma sonucu elde edilen verilerle, ABS' nin antikanser aktivitesi moleküler düzeyde açıklanmaya çalışılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez kapsamında kullanılan hücre hattı, kimyasallar, hazır satın alınan ticari tamponlar ve hazırlanan çözeltiler Tablo 3.1. - Tablo 3.4.' de gösterilmiştir. Kullanılan sarf malzemeler, cihazlar ve ekipmanlar sırasıyla Tablo 3.5. ve Tablo 3.6.' da ve imaj analizi çalışmalarında kullanılan yazılım ve veri bankaları ise Tablo 3.7.' de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan hücre hattı.

Hücre Hattı	Firma	Kullanım Amacı
MCF-7	ATCC	Hücre kültürü çalışmalarında sitozolik fraksiyon elde etmek için

Tablo 3.2. Kullanılan kimyasal malzemeler.

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

Tablo 3.3. Satın alınan ticari tampon çözeltiler.

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

Tablo 3.4. Hazırlanan çözeltiler ve tamponlar.

Çözeltiler	Hazırlama	Kullanım Amacı
20 mM DTT, % 10 (a/h) TCA içeren aseton çözeltisi	0.1234 g DTT ve 4.00 g TCA tartılmış, üzerine bir miktar aseton yavaş yavaş ilave edilip çözülmüş ve hacim 40 mL' ye asetonla tamamlanmıştır.	Proteinlerin çöktürülmesinde
DTT içeren dengeleme tamponu 1	13.35 mL % 30' luk ultrasaf gliserol, 1 şişe hazır dengeleme tamponu katı karışımını çözmek için kullanılmıştır. Çözeltinin 4 mL' lik iki kısma ayrılmıştır. Bu kısımlardan ilki kullanılmadan önce % 2 DTT içerecek şekilde hazırlanmıştır.	SDS-PAGE (2. Boyut) için IPG şeritleri şartlandırmada
IAA içeren dengeleme tamponu 2	0.1 g IAA tartılmıştır. Dengeleme tamponu için hazırlanan 4 mL' lik ikinci kısma kullanımdan hemen önce IAA ilave edilerek karıştırılmıştır. Taze olarak hazırlanmıştır.	SDS-PAGE (2. Boyut) için IPG şeritleri şartlandırmada
Protein boyama çözeltisi	Konsantre haldeki protein boyama çözeltisi, ultra saf su ile 5 kat seyreltilmiş ve PTFE (0.45 µm) filtreden süzölmüştür.	Proteinlerin miktar tayininde
Siğir serum albümin standartları	100 µL suda, 0.2 - 0.9 mg/mL derişim aralığında 6 nokta olacak şekilde, stok siğir serum albümin çözeltisinden uygun miktarlarda alınarak hazırlanmıştır.	Proteinlerin miktar tayininde
Criterion XT MOPS tamponu (1x)	Criterion XT MOPS tamponu (20x) ultrasaf su ile 20 kat seyreltilerek magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.	SDS - PAGE (2. boyut) Criterion™ Cell hücrelerinde kullanılmak üzere

Tablo 3.4 (Devam). Hazırlanan çözeltiler ve tamponlar.

Çözeltiler	Hazırlama	Kullanım Amacı
Saklama çözeltisi	% 0.5 (h/h) asetik asit içeren sulu çözeltilerdir. 100 mL' lik çözelti için 100 mL' lik balon jöjeye biraz saf su eklenmiş, üzerine 500 µL glasiyel asetik asit ilave edilip ultra saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.	Jellerin MALDI-TOF/TOF-MS analizine kadar saklanması sürecinde

Tablo 3.5. Kullanılan sarf malzemeler.

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

Tablo 3.6. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar.

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

Tablo 3.7. Kullanılan yazılım ve veri tabanları.

Yazılım/ Veri Tabanı	Kullanım Amacı
PDQuest™ 2D Analysis Software (versiyon 8.0)	İmaj analizinde (internet üzerinden ücretsiz olarak kullanılabilir)
Image Lab (Bio-Rad)	Görüntüleme cihazında kullanılan program
MASCOT	Proteinlerin tanımlanması ve nicel analizinde
UniProt	Proteinlerin yapısı ve fonksiyonunu belirlenmesinde
SwissProt	Proteinlerin yapısı ve fonksiyonunu belirlenmesinde
String	Protein-protein etkileşimlerinin bulunmasında
QuickGo	Yolak analizlerinde
KEGG	Yolak analizlerinde

Bu tez çalışmasında MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile çalışılmıştır. MCF-7 kanser hücre hattına uygulanan ABS, içeriğindeki 5 tane bitki ekstresinin oluşturduğu sinerjik etkiden dolayı hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır. Çalışmada, ABS ile muamele edilen hücreler işlenmiş (T) grubu ve muamele edilmeyen hücreler ise kontrol (C) grubu olarak tanımlanmıştır. T grubunda MCF-7 hücreleri ABS ile 24 saat muamele edilmiştir. *In vitro* olarak gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında, ABS' nin meme kanseri hücrelerine muamelesi sonucunda, stres proteinleri devreye girmektedir. Ayrıca çalışmanın sonucunda stres proteinleri ile birlikte başka proteinler de gözlenmiştir. Bu sonuç, ABS' nin bilinen antioksidan etkisinin yanında farklı etkilere de sahip olabileceğini göstermektedir.

Tez kapsamındaki çalışmada, C ve T gruplarından elde edilen sitozolik fraksiyonlarda bulunan proteinler önce pI değerlerine, sonrasında ise kütlelerine göre 2D jel elektroforez tekniği kullanılarak ayrılmış ve imaj analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. C ve T gruplarındaki düşük (*down-regulated*) ve yüksek miktarda ifade edilen (*up-regulated*) proteinler karşılaştırılmıştır. Farklılaştığı tespit edilen proteinlerin yapıları, MALDI-TOF/TOF-MS cihazı ve PMF yardımıyla analiz edilerek aydınlatılmıştır. Bu proteinlerin yapıları, fonksiyonları, proteinlere ait gen adları ve amino asit dizilimleri UniProt, SwissProt gibi veri tabanları kullanılarak bulunmuştur. Ayrıca görev aldıkları yollar ve kanserle olan ilişkileri String, QuickGO ve KEGG veri tabanları kullanılarak açıklanmaya çalışılmıştır.

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu çalışma kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan, Doç. Dr. Ayşe Ercan ve Dr. Bio. Selin Öncül tarafından yapılmıştır.

İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi, hücre canlılığının saptanması için renk değişimine dayanan enzimatik test yöntemidir (206, 207). MTT sarı renklidir ve sadece canlı hücrelerde aktif olarak absorbe olur ve mitokondriyal redüktaz enzimiyle suda çözünmeyen mor renkli formazan bileşiğine indirgenir. Oluşan bu renkli çözeltinin, 500 - 600 nm dalga boylarında spektrofotometrede absorbansı ölçülür. Bu değerler hücre canlılığının göstergesi olarak kabul edilmekte ve absorbans değeri yani

formazan yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Bu yöntemin hassas, tekrarlanabilir olması, kolay uygulanması ve hızlı olması avantajlarından (206).

Hücreler T75 kültür kaplarında, % 10 Fetal Sığır Serum (FBS), % 1 (a/h) Penisilin/Streptomisin antibiyotiği (P/S) ve %1 L-Glutamin (L-Glu) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besi ortamında, 37 °C' de ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Hücrelerin canlılık ve çoğalma durumları her gün ışık mikroskobu altında izlenmiş ve besi yeri taze DMEM ortamı ile üç günde bir değiştirilmiştir. Hücreler kültür kabında yaklaşık % 80 doluluğa ulaştığında deneyler yapılmıştır.

Kanser hücrelerine uygulanacak en uygun ABS derişiminin belirlenmesi için hücre kültürü çalışmalarında kullanılan sığır serum albümine ait yüzde düşürülmüş ve MTT testi gerçekleştirilmiştir. ABS' nin istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkisinin gözlemlendiği en düşük doz ve daha önceki yapılan çalışmalarda kullanılan 8 µL/mL (ABS/Besi ortamı) ABS dozu, MCF-7 hücrelerine de uygulanmıştır (205).

MCF-7 meme kanseri hücreleri, ABS ile 24 saat boyunca muamele edilmiş ve C ile T grubuna ait sitozolik fraksiyonlar elde edilmiştir.

3.2. Sitozolik Fraksiyon Eldesi

C ve T gruplarına ait MCF-7 hücreleri, soğuk DPBS (10 mM Na₂HPO₄, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH: 7.4, Sigma-Aldrich) çözeltisiyle 2 kez yıkayıp hazır satın alınan homojenizasyon tamponunda, homojenizatör cihazının yardımıyla parçalanarak homojenize edilmiştir. Sonrasında, örnekler 14 dakika, 4 °C' de, 14000 g' de santrifüjlenmiştir. Nükleer ve mitokondriyal fraksiyonların bulunduğu çökelek atıldıktan sonra süpernatant, 1 saat, 4 °C ve 100.000 g' de ultrasantrifüj cihazıyla tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan süpernatant yani sitozolik fraksiyon toplanmış ve - 80 °C' de 500 µL' lik fraksiyonlar şeklinde saklanmıştır.

3.3. Protein Miktar Tayini

Sitozolik fraksiyonlarda bulunan proteinlerin miktarları "Bio-Rad™ Protein Assay" yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Bu yöntem, "Bradford Protein Assay" yöntemini temel almaktadır ve çözünebilir haldeki proteinlerin miktar tayini için kullanılan doğru ve basit bir

yöntem olarak bilinmektedir (208). MCF-7 meme kanseri hücresinden elde edilen C ve T gruplarının sitozolik fraksiyonları, muhafaza edildiği $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' den çıkartılıp oda sıcaklığında çözünene değin bekletilmiştir. Protein miktar tayini aşağıda verilen işlemler uygulanarak gerçekleştirilmiştir (n=3):

1. 6 tane test tüpüne, derişimleri 0.2 - 0.9 mg/mL aralığında olacak şekilde sığır serum albümin standartlarından 100 μL kadar konulmuştur. C ve T gruplarına ait sitozolik fraksiyon numunelerinden 100 μL ayrı bir tüpe alınmıştır. Ayrıca ayrı bir tüpe homojenizasyon tamponundan 100 μL alınarak kör çözeltisi hazırlanmıştır.

2. Her tüpe taze olarak hazırlanmış olan protein boyama çözeltisinden 5 mL eklenmiş ve vortekslenmiştir.

3. Tüp içindeki çözeltiler 5' er dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 595 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı kullanılarak 1 saat içinde absorbansları ölçülmüştür.

4. Elde edilen absorbans değerleri, sığır serum albümin standartlarının derişimine karşı grafiğe geçirilip kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

5. C ve T gruplarına ait numune çözeltilerinin absorbansı, kalibrasyon grafiğinden elde edilen regresyon denklemi yardımıyla C ve T gruplarına ait numunelerde bulunan proteinlerin miktarları hesaplanmıştır.

3.4. Proteinlerin Çöktürülmesi

MCF-7 hücresine ait C ve T grupları için 3 tekrarlı olacak şekilde analiz gerçekleştirilmiştir. Böylece 3 tane C grubu ve 3 tane T grubu olmak üzere toplam 6 tane numune ile çalışılmıştır.

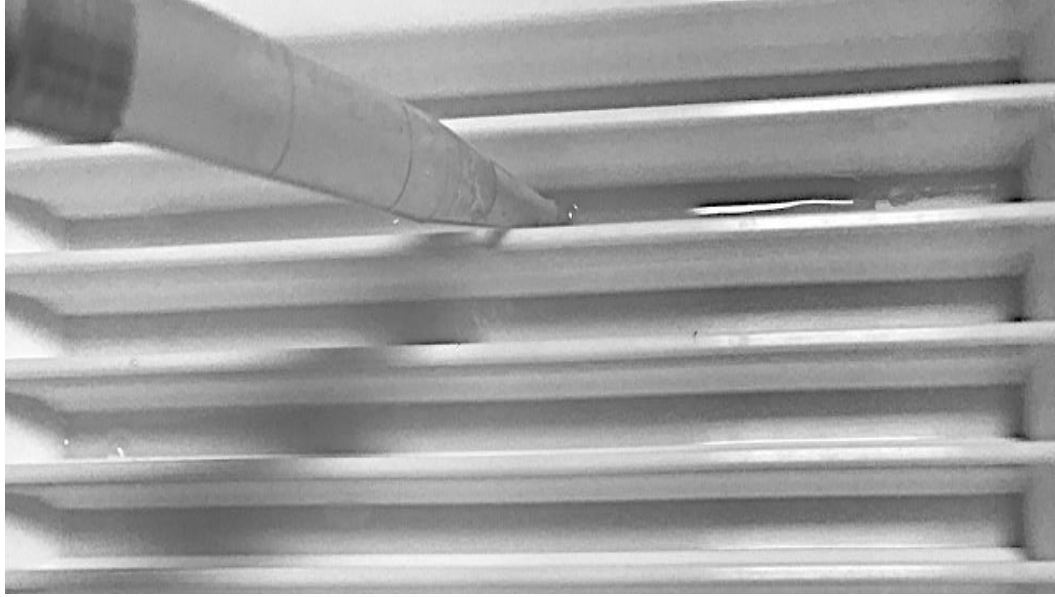
MCF-7 hücresine ait C ve T gruplarının protein miktarları belirlendikten sonra her bir Eppendorf tüpte 250 μL ' de 1.5 mg/mL protein olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır ve buna göre; C grubu için her bir Eppendorf tüpe 143 μL ve T grubu için 106 μL sitozolik fraksiyonlardan eklenmiştir. Her bir tüpe 20 mM DTT, % 10 (a/h) TCA içeren ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de bekletilmiş soğuk aseton çözeltisinden 1.5 mL eklenip proteinlerin çöküp çökmediği kontrol edilmiştir. Daha sonra çözeltiler vortekslenmiş, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 24 saat kadar bekletilmiş ve protein pelletlerinin çöktüğü gözlenmiştir. Bu basamakta, proteomik analizlerde daha çok protein

tespiti için proteinlerin geri kazanımının en üst seviyede olması oldukça önemlidir. Çökmüş protein pelletleri, soğutmalı santrifüj cihazı ile 10 dakika, 14000 devir/dakika' da, 8 °C' de santrifüj edilmiştir. Oluşan santrifüगत mikropipetle çekilerek atılmıştır. Protein pelletleri, üzerine -20 °C' de bekletilmiş soğuk asetondan, bir kere 0.75 mL ve iki kere de 0.5 mL eklenerek ayrı ayrı 3 defa yıkanmıştır. Pelletlerde kalan aseton, vakum santrifüj kullanılarak oda sıcaklığında uçurulmuştur. Tamamen kurutulan Eppendorf tüplerdeki pelletlere satın alınan ve hazır haldeki yükleme tamponundan 250 µL (C ve T grubu için son derişim 250 µL' de 1.5 mg/mL olmuştur) ilave edilmiş ve 24 saat süresince oda sıcaklığındaki orbital karıştırıcıda karıştırılarak inkübe edilmiştir.

3.5. Proteinlerin IPG Şeritlere Yüklmesi

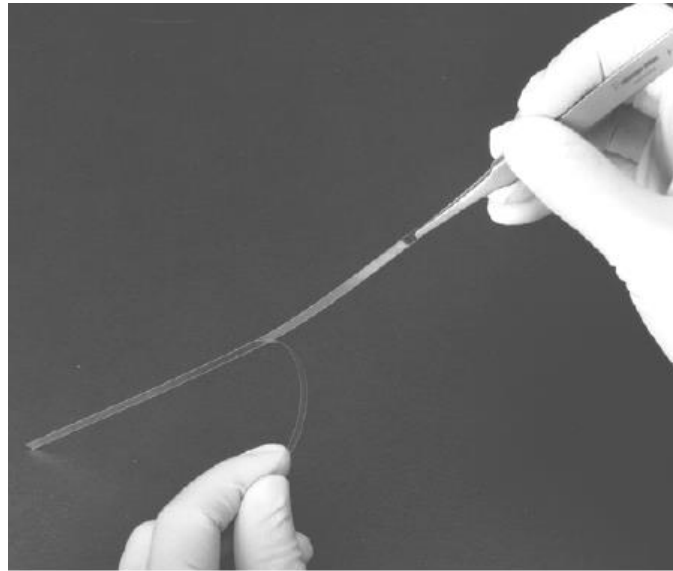
Hücre hattında bulunan proteinlerin pI değeri, proteinlerde gözlemlenen varyasyon sebebiyle farklılık göstermektedir. Bu yüzden 2D jel elektroforez çalışmalarında 1. boyutta kullanılacak ticari IPG şeritlerin, proteinlerin pI değerlerine uygun olması gerekmektedir. Çalışmada pH 4 - 7 IPG şeritler kullanılmıştır. IPG şeritlerdeki pH değerlerindeki farklılık, analiz basamaklarından yalnızca IEF aşamasında uygulanacak olan programın değişmesine sebep olmuştur. Proteinlerin IPG şeritlere yüklenmesi ise aşağıda verilen basamaklardan oluşmaktadır:

1. 250 µL yükleme tamponunda çözünmüş 375 µg protein çözeltisi, mikropipet ile IPG şerit tablasındaki kanallar boyunca, kanalların başına ve sonuna temas etmeyecek şekilde Şekil 3.1.' de gösterildiği gibi yayılmıştır.



Şekil 3.1. Numunenin IPG şerit tablasına uygulanması.

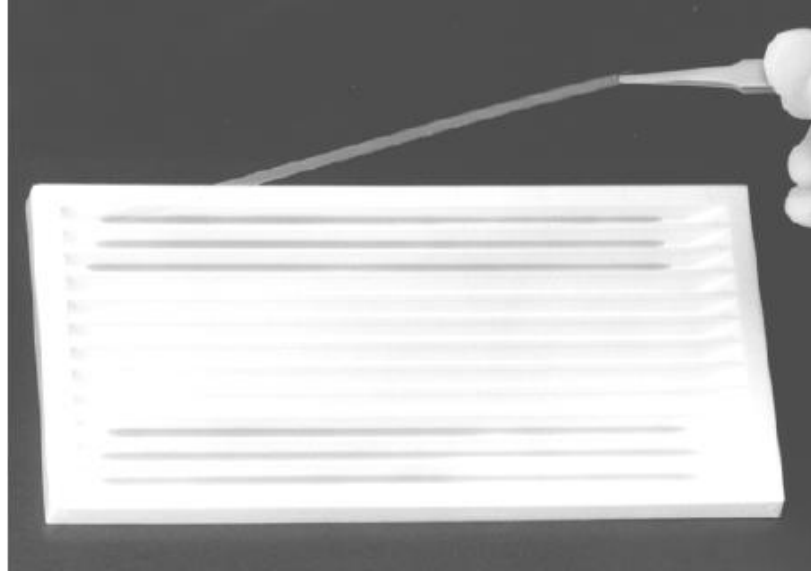
2. - 20 °C' de saklanan IPG şeritler, deney sırasında çıkarılıp oda sıcaklığında 5 dakika kadar bekletilmiştir. IPG şeritlerin üzerindeki jeli koruyan film, bir pens yardımıyla el değmeden Şekil 3.2.' deki gibi ayrılmıştır.



Şekil 3.2. IPG şerit üzerindeki koruyucu bandın pens ile çıkarılması.

3. IPG şeridinin jelin bulunduğu yüzü, IPG şerit tablasına bakacak ve numune ile nüfus edecek şekilde bir pens ile el değmeden Şekil 3.3.' de gösterildiği üzere dikkatli bir şekilde

yerleştirilmiştir. IPG şeridin jel yüzeyinin numune ile temas ettiği noktalarda hava kabarcığının kalmaması ve şerit üzerindeki jel ile numunenin tamamının temas etmesi için pens, IPG şeridin üzerinde baskı uygulamaksızın ve numuneyi dışarı taşırmamaya özen gösterilerek gezdirilmiştir.



Şekil 3.3. IPG şeridin numune üzerine yerleştirilmesi.

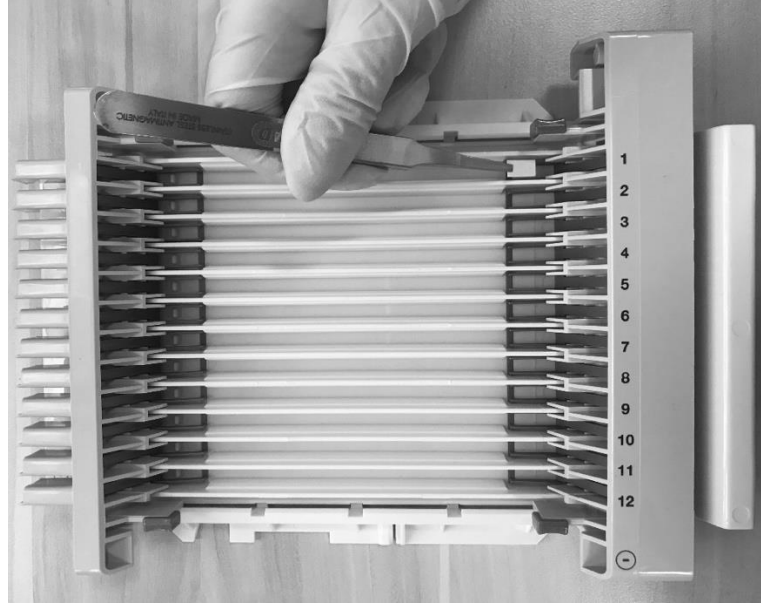
4. IPG şerit tablasının kapağı kapatıldıktan sonra bu şekilde 2 saat bekletilmiş ve her bir şeridin bulunduğu bölmeye 2 mL mineral yağ ilave edilip 3 saat daha bekletilmiştir.

5. Yeterli süre bekletilen IPG şeritlerin ucundan pens yardımıyla kaldırılarak tabladaki bölmelerde numune çözeltisinin kalıp kalmadığı kontrol edilmiş ve numune çözeltisinin IPG şeritlerdeki jel tarafından neredeyse tamamen absorplandığı gözlenmiştir.

3.6. IEF Basamağı (1. Boyut)

Çalışmada pH 4 - 7 IPG şeritleri kullanılmıştır. Bu pH aralığına uygun olarak IEF basamağında uygulanacak olan program seçilmiştir. IEF cihazının 12 kanaldan oluşan odaklama tablasının her iki ucunda, elektrik akımının geçmesini sağlayan teller vardır. Teller ile IPG şeritlerin arasındaki elektrik akımı ise su ile ıslatılmış "elektrot kâğıtları" ile sağlanmaktadır. Bu tez çalışmasında, jel kısmı aşağıya bakan anlamına gelen "*Gel-Side Down Assembly*" IEF yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemle ait analiz aşamaları aşağıda anlatılmıştır:

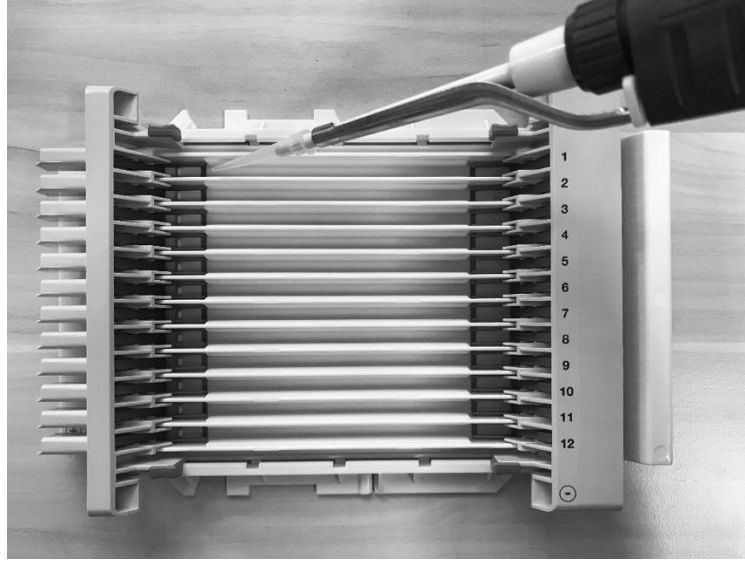
1. Odaklama tablasının uçlarındaki tellerin üzerine dikdörtgen şekilde elektrot kâğıtları yaklaşık 5 μ L ultra saf su ile ıslatıldıktan sonra katlanmamasına ve parçalanmamasına dikkat edilerek Şekil 3.4.' deki gibi yerleştirilmiştir.



Şekil 3.4. IEF odaklama tablasına elektrot kâğıtlarının yerleştirilmesi.

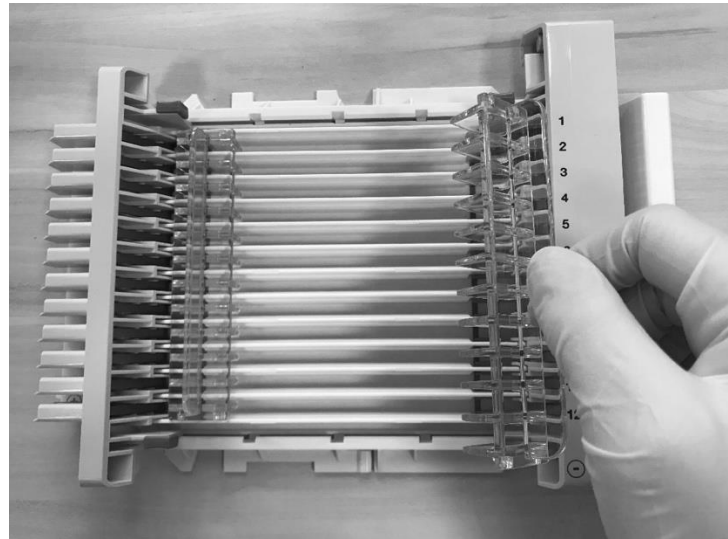
2. Bir pens yardımıyla IPG şerit tablasından alınan IPG şeritlerin pozitif ve negatif uçları, odaklama tablasının pozitif ve negatif elektrotlarına denk gelecek ve şeritlerin jel kısmı aşağıya yani tablaya değecek şekilde yerleştirilmiştir.

3. 2.5 mL kadar mineral yağ, IPG şeritlerin üzerine mikropipet ile Şekil 3.5.' deki gibi eklenmiştir.



Şekil 3.5. Mineral yağın odaklama tablasındaki şeritlerin üzerine eklenmesi.

4. Elektrot kâğıtlarının IPG şeritler ile temas ettiğinden emin olmak için odaklama tablasındaki IPG şeritlerin uç kısmına elektrot ağırlıkları Şekil 3.6.'daki gibi yerleştirilmiştir.



Şekil 3.6. Elektrot ağırlıklarının odaklama tablası üzerine yerleştirilmesi.

5. Son olarak odaklama tablası Şekil 3.7.'de gösterilen IEF cihazına yerleştirilmiştir. IEF için Tablo 3.8.'de verilmiş olan program 1 gece (yaklaşık 10 saat) boyunca uygulanmıştır. IEF cihazıyla yapılan odaklama işlemi süresince uygulanan programların voltaj ile akım değerleri izlenerek kontrol edilmiştir.



Şekil 3.7. Bio-Rad marka Protean IEF sistemi.

6. Program tamamlandıktan sonra kontrol edilen toplam volt x saat değerleri kaydedilmiştir.

Tablo 3.8. IEF' de pH 4 - 7 IPG şeritler için uygulanan program.

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

3.7. SDS - PAGE Basamağı (2. Boyut)

2D jel elektroforez çalışmalarında, öncelikle pI değerine göre sonrasında ise kütlelerine göre ayrılan proteinler boyanıp jel haritaları görüntülenmiş ve imaj analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada SYPRO-Ruby boyama tekniği kullanılmıştır. Kullanılan boyama tekniği, 2. boyutta kullanılacak olan marker olarak bilinen işaretleyici ile uyumlu olmalıdır. MCF-7 hücrelerine ait C ve T grupları SYPRO - Ruby ile boyanıp marker olarak "*Protein Unstained Standard*" kullanılmıştır. Proteinler 1. boyutta pI değerlerine göre ayrıldıktan sonra kütlelerine göre ayrıldığı basamak olan SDS - PAGE (2. boyut) analizindeki uygulamalar aşağıda anlatılmıştır:

1. Odaklama tablasından bir pens yardımıyla ucundan tutularak çıkartılan IPG şeritler, temiz bir süzgeç kâğıdına jel kısmı kâğıda değmeyecek şekilde konulmuş ve IPG şeritlerdeki mineral yağ mümkün olduğunca uzaklaştırılmıştır.

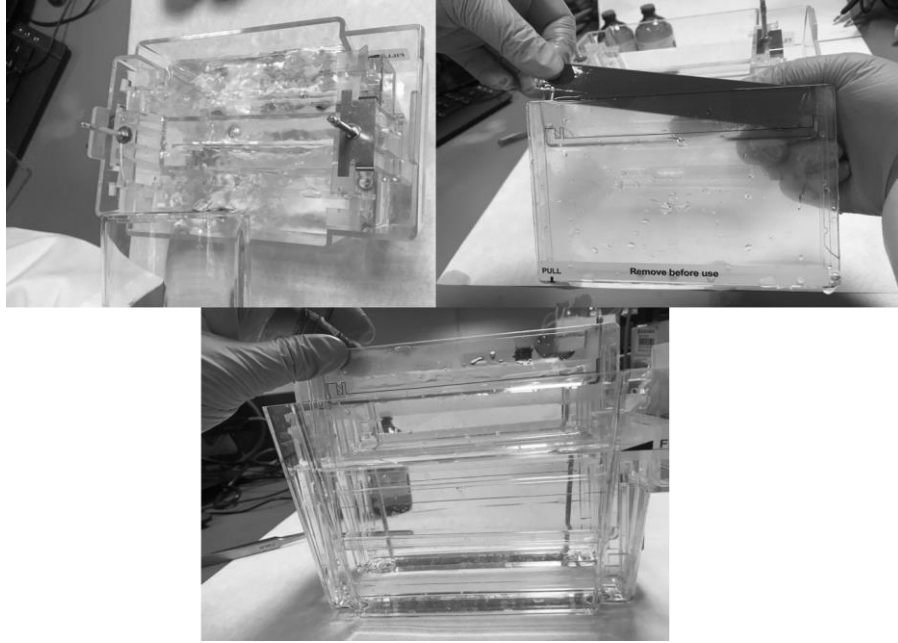
2. IPG şeritler, IPG şerit tablasının kanallarına jel kısmı yukarı doğru bakacak şekilde yerleştirildikten sonra her birinin üzerine 3.5 mL kadar "dengeleme tamponu 1" eklenmiş ve orbital karıştırıcıda 15 dakika hareket ettirilmişdir.

3. Dengeleme tamponu 1' in bulunduğu kanallardan çıkarılan IPG şeritler dik bir konumda kısa bir süre bekletilip süzölmüştür. Tekrar IPG şerit tablasına jel kısmı yine yukarı doğru bakacak şekilde yerleştirilmiş ve IPG şeritlerin her birinin üzerine 3.5 mL kadar "dengeleme tamponu 2" eklenmiş ve orbital karıştırıcıda 15 dakika boyunca hareket ettirilmişdir.

4. Dengeleme tamponu 2' den çıkartılan IPG şeritler, SDS - PAGE için katot ve anot tamponu olarak kullanılan ve hazırlanan "*Criterion XT MOPS Buffer (1x)*" tamponunun bulunduğu 25 mL' lik bir mezürün içine daldırılıp çıkartılmış ve böylece üzerindeki tampon çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan "*Criterion XT MOPS Buffer (1x)*" tamponu Şekil 3.8.' de gösterilen elektroforez hücrelerine (*Criterion™ Cell*) doldurulmuştur (Şekil 3.9.).



Şekil 3.8. Elektroforez hücresi (209).



Şekil 3.9. SDS - PAGE jellerin elektroforez hücrelerine yerleştirilmesi.

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

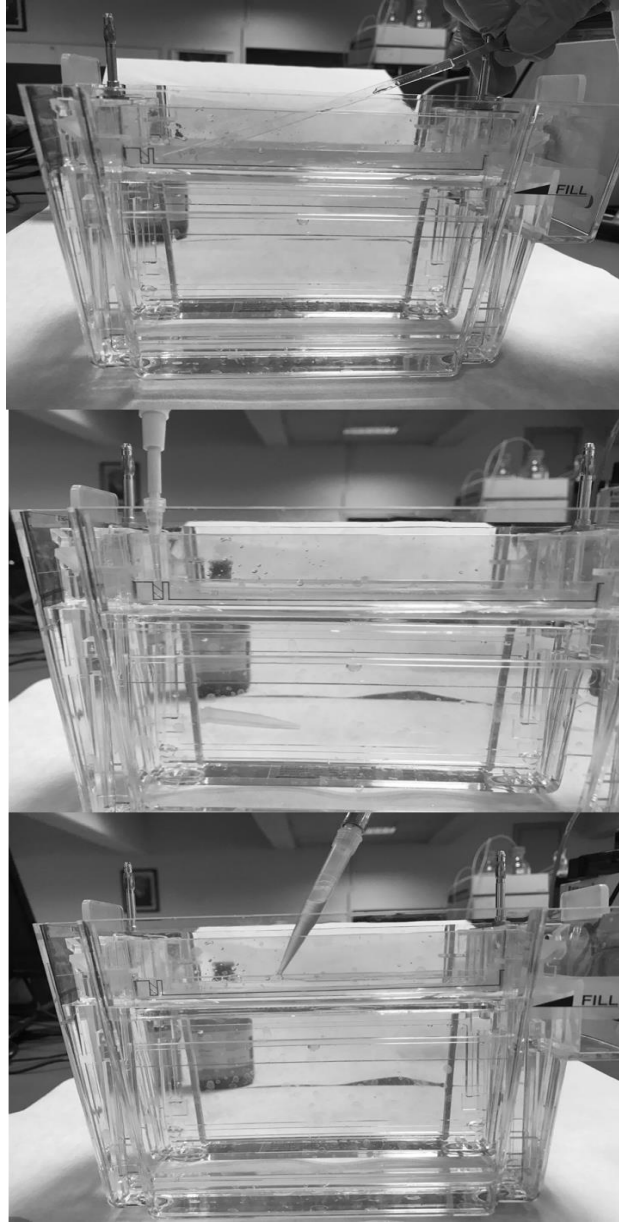
6. "*Criterion XT MOPS Buffer (1x)*" tamponuna daldırılıp çıkartılmış IPG şeritlerin pozitif ve negatif uçlarına dikkat edilerek ve jel kısmı dışa doğru bakacak şekilde jel üzerindeki yuvasına yerleştirilmiştir (Şekil 3.10.).

7. 6 µL marker kendi yuvasına mikropipet ile ilave edilmiştir (Şekil 3.10).

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

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

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



Şekil 3.10. IPG şeridin yerleştirilmesi, markerın eklenmesi ve sıcak agaroz jelin uygulanması.

11. 3 tane elektroforez hücresi çok çıkışlı güç ünitesine bağlanarak jel başına 1 saat boyunca 50 V, elektroforez bitinceye kadar (yaklaşık 2 saat) 75 V voltaj uygulanmıştır (Şekil 3.11.). Her bir hücrede C ve T grubuna ait birer jelin olduğu toplam 6 jelin elektroforez işlemi aynı anda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.11. Elektroforez hücresi ve güç kaynağı.

12. Agaroz çözeltisinde bulunan bromofenol mavisine ait şeritin, elektroforez süresince jel üstünde doğrusal ve düzgün bir biçimde ilerleyişi izlenerek elektroforez işleminin kontrolü sağlanmıştır. Mavi şerit jelin en altına geldiğinde elektroforezin tamamlanmış ve güç kaynağı kapatılmıştır. Her hücredeki elektroforezin tamamlanma süresi yaklaşık 200 dakika sürmüştür.

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

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

3.8. Jellerin Boyanması ve Görüntülenmesi

MCF-7 hücrelerine ait C ve T grupları SYPRO- Ruby ile boyanmıştır. Boyama işleminde aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulanmıştır:

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

2. % 7 asetik asit ve % 10 metanol içeren yıkama çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözülden 100 mL ilave edilerek ve orbital karıştırıcıda 24 saat hareket ettirmek suretiyle jellerin fiksleme işlemi yapılmıştır.

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

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

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

6. Saf su kullanılarak imaj görüntüleme cihazının tablası yumuşak ve partikül bırakmayan bir peçete ile temizlenmiştir.

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

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

3.9. İmaj Analizi Çalışmaları

Bu basamakta aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır:

1. Resim dosyası olarak kaydedilen jel görüntüleri, imaj analiz programı olan PDQuest™ yazılımına yüklenmiştir. PDQuest™ programı jel haritalarının belirlenmesi ve farklılaşan spotların saptanması amacıyla kullanılmıştır. Bu program internet üzerinden ücretsiz olarak kullanılabilir.

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

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

4. Program tarafından bulunan bütün noktaların ve otomatik olarak işaretlenen noktaların jel görüntüleri tek tek yakınlaştırılarak taranmış ve her bir jel için koordinatları eşleştirilmiştir. Jel üzerinde programın bulamadığı spotlar, jel görüntüleri yakınlaştırarak, manuel olarak bulunmaya çalışılmış ve her bir jel için koordinatlar eşleştirilmiştir.

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

6. Spotlar arasından intensiteleri (yoğunlukları) grup içinde birbiriyle istatistiksel olarak % 95 güven seviyesinde örtüşenler "*Statistic*" adı verilen analiz kümesinde toplanmıştır.

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

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

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

10. Farklılaştığı tespit edilen ve MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilmek üzere seçilen spotlar, C ve T grupları için ayrı ayrı tablolananmıştır.

3.10. Proteinlerin MALDI-TOF/TOF-MS Tekniği ile Analizleri ve Peptid Dizileme Yöntemi (PMF) ile Proteinlerin Tanımlanması

İmaj analizleri sonucunda elde edilen jellerdeki proteinlere ait spotların kesilmesi, tripsin enzimi ile proteinlerin peptidlerine parçalanması, MALDI-TOF/TOF-MS ile analizi ve PMF ile proteinlerin tanımlanması çalışmaları, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

2D jel elektroforez çalışmaları sonucunda farklılaştığı tespit edilen proteinlere ait spotların kesimi, Spot-cutter robotu (Bio-Rad) ile yapılmıştır. Proteinlerden peptidlerin elde edilebilmesi için önce proteinlerin jel içinde peptidlerine ayrılması ve sonrasında da jelden elde edilmeleri gerekmektedir. Bu işlem için kesilmiş spotlar asetonitril ve 25 mM amonyum bikarbonat (50:50, h/h) içeren çözelti ile çalkalamalı karıştırıcıda yıkanmıştır. Daha sonra örnekler, % 10 TCEP içeren 25 mM amonyum bikarbonat içinde 60°C' de 10 dakika disülfid bağlarının kırılması sağlanarak indirgenmiştir. Son derişimi 100 mM iyodaasetamit (IAA) olan 25 mM amonyum bikarbonat içinde, oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat bekletilerek indirgenmiş olan sistein yan zincirleri metillenmiştir (alkilasyon işlemi). Sonrasında önce

spotlar asetonitril içine alınmış ve daha sonra asetonitril uçurularak uzaklaştırılmıştır. Son derişimi 10 ng/ μ L olan tripsin ile 30 °C' de gece boyu peptidlerine parçalanmıştır. Zip - Tip pipet uçları (Milipore C18 pipet ucu) önce asetonitril ve % 0.1 triflorik asit ile dengelenmiş ve sonra her numune 25 - 30 defa pipetlendikten sonra MALDI matriks ile MALDI plaka üzerine elüe edilmiştir (210).

Zip - Tip işleminin sonrası MALDI plakasına yerleştirilen örneklerin, MALDI-TOF/TOF-MS cihazı kullanılarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde lazer ışığı kullanarak iyonize olan peptidlerin, vakumlu bir tüp içerisinde ayrılması sağlanmış ve sonra m/z değerlerine göre peptidlere ait amino asit dizimleri tanımlanmaya çalışılmıştır. MALDI kalibrasyonu, eksternal veya internal kalibrant kullanılarak yapılmış, her bir spektrum için ortalama 200 lazer darbesi kullanılmıştır.

Analiz sonucunda elde edilen tüm spektrumlarda, arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, fiksed modifikasyon olarak karbamidometil (sistein), değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, peptid yükü + 1, monoizotopik kütle değerleri, peptid kütle toleransı ± 50 ppm, fragment kütle toleransı ± 0.25 Da olarak belirlenmiştir ve MASCOT veri bankasında analiz edilmiştir (210).

Cihazdan elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, online MASCOT veri bankasından "*Protein Pilot*" programı kullanılmıştır ve proteinlerin karakterizasyonları yapılarak hangi proteinlere ait oldukları belirlenmiştir.

3.11. Farklılaştığı Tespit Edilen Proteinlerin Fonksiyonları ve Birbirleriyle Etkileşimleri

MCF-7 meme kanseri hücrelerine ait C ve T gruplarında farklılaştığı bulunan proteinler arasındaki biyolojik ilişkiyi ortaya koymak, birbirleriyle etkileşimlerini incelemek ve hangi hücresel yollarda görev aldıklarını belirlemek için String, QuickGO ve KEGG programları kullanılmıştır.

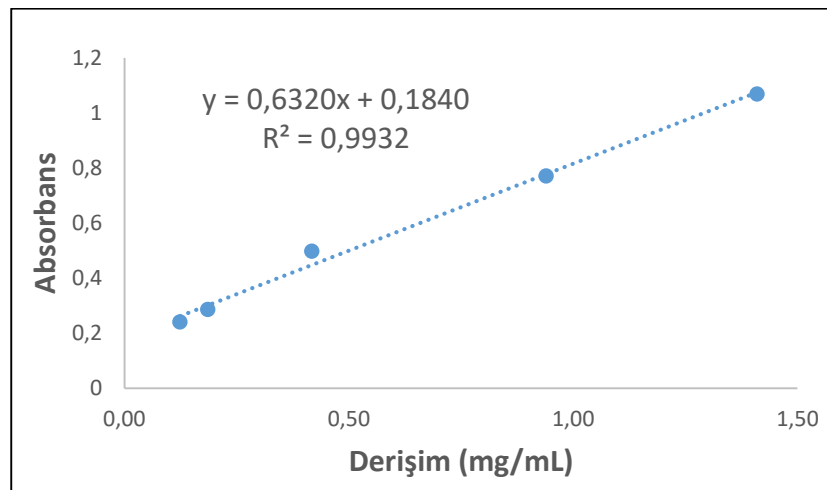
4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu tez çalışmasında MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılmış ve bu hücreler 24 saat boyunca ABS ile muamele edilmiştir. ABS' nin istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkisinin gözlemlendiği en düşük doz olarak ve daha önceki yapılan çalışmalarda kullanılan 8 µL/mL (ABS/Besi ortamı) ABS dozu, MCF-7 hücrelerine de uygulanmıştır (205). Hücre kültürü çalışmalarında belirgin derecede hücre ölümü gözlemlenmiş ve sitozolik fraksiyonlar elde edilmiştir.

4.2. Protein Miktar Tayini

2D jel elektroforez tekniği ile ayırımın gerçekleştirilmesi için elde edilen sitozolik fraksiyonlarda bulunan protein miktarları, "Bio-Rad™ Protein Assay" yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yöntemde standart olarak sığır serum albümini kullanılmıştır ve miktar tayini için kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.1). Hücre kültürü çalışmalarından elde edilmiş sitozolik fraksiyonlardaki protein miktarları regresyon denklemi kullanılarak belirlenmiştir. Protein miktarları C grubu için 2.63 mg/mL, T grubu için 3.56 mg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Bio-Rad™ protein miktar tayininde elde edilen kalibrasyon eğrisi.

4.3. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Yapılan Proteomik Çalışmalar

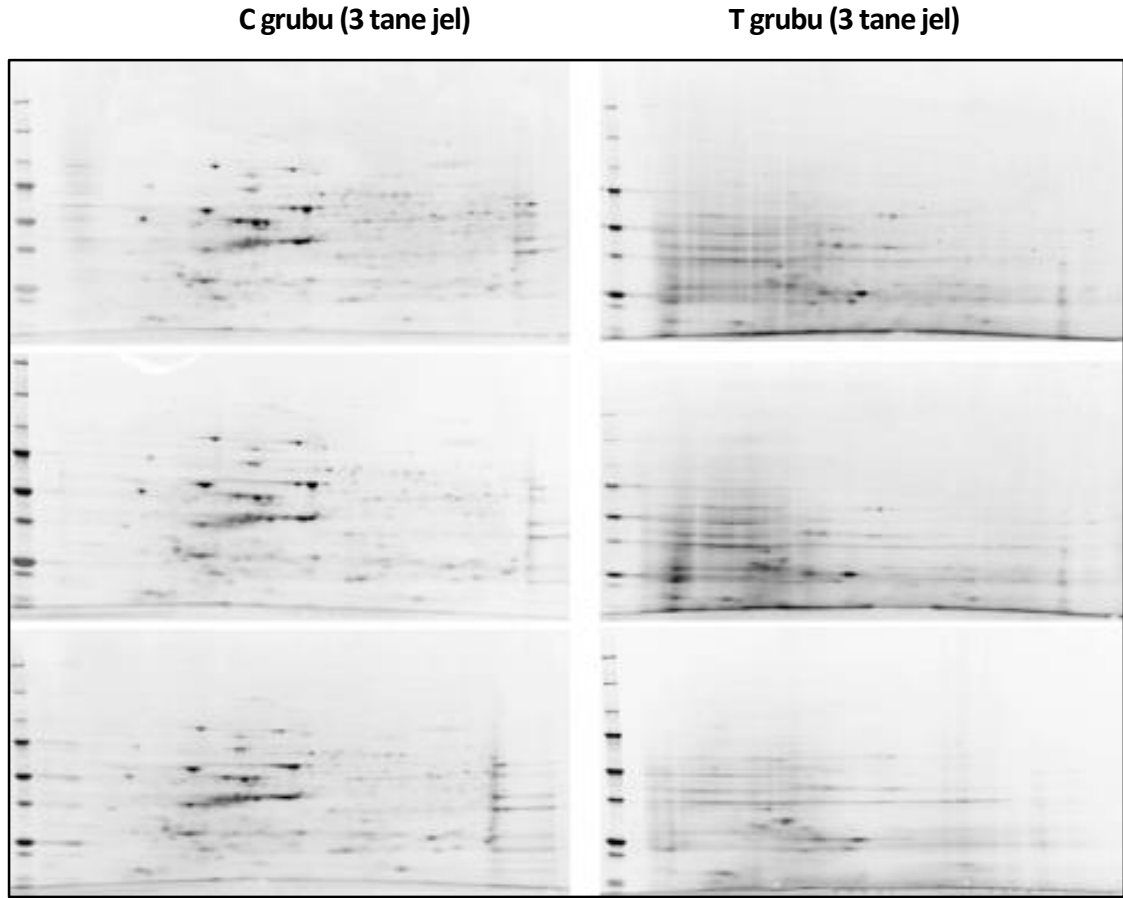
MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, C ve T grupları ile gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları sonrasında elde edilen sitozolik fraksiyonlarda bulunan protein miktarları belirlendikten sonra bu fraksiyonlardaki proteinlerin çöktürülmesi basamağına geçilmiştir. Bkz. Bölüm 3.4' de verilen basamaklar uygulanarak çöktürülen proteinler, yükleme tamponu ile yeniden çözülmüş ve pH 4 - 7 aralığına sahip 11 cm' lik IPG şeritlere yüklenmiştir. Literatürde MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda pH 3 - 10 ve pH 4 - 7 aralığındaki IPG şeritler kullanılmıştır. Daha geniş aralıklı olan pH 3 - 10 aralığındaki IPG şeritleri ile proteinlerin genel dağılımı gözlenirken, pH 4 - 7 aralığındaki IPG şeritleri ile çok daha iyi bir ayırım elde edilmiştir (211-213). Bu verilere dayanarak bu tez kapsamında, birbirinden daha iyi ayrılmış ve daha çok sayıda spot elde edebilmek amacıyla pH 4 - 7 IPG şeritler kullanılmıştır.

Sonraki basamakta, proteinlerin pI'larına göre ayrılmalarında, daha önce denenmiş birçok IEF programları içinde Tablo 3.8'de verilen optimum koşullar uygulanmıştır.

Proteinlerin ayırımı gerçekleştirildikten sonra, bir diğer önemli basamak olan jellerin boyanması sırasında, daha önce birçok boyama tekniği kullanılarak elde edilen jel görüntülerinin karşılaştırılması sonucunda, SYPRO-Ruby tekniği ile çok daha fazla sayıda spot ve daha iyi bir ayırım görülmüştür (54, 205). Bu tez çalışmalarında jeller, SYPRO-Ruby tekniği kullanılarak 48 saat boyunca boyanmıştır (Bkz. Bölüm 3.8).

4.3.1. İmaj Analizi Sonuçları

MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat ABS muamelesi ile elde edilen T grubu ve muamele edilmeyen C grubuna ait proteinlerin, 2D jel elektroforez ile jellerin üzerinde ayırımı ve boyanması gerçekleştirildikten sonra görüntüleme cihazının yardımıyla jellerin görüntüleri alınmış ve dijital ortama aktarılmıştır (Şekil 4.2). Bu jel görüntülerine ait imaj analizi çalışmaları ise PDQuest™ yazılımı kullanılarak yapılmış ve sonuçta proteinler C ve T grupları arasında düşük veya yüksek miktarda ifade edilen proteinler belirlenmiştir.



Şekil 4.2. C ve T grubuna ait 3 tekrarlı analiz sonucu elde edilen jel görüntüleri.

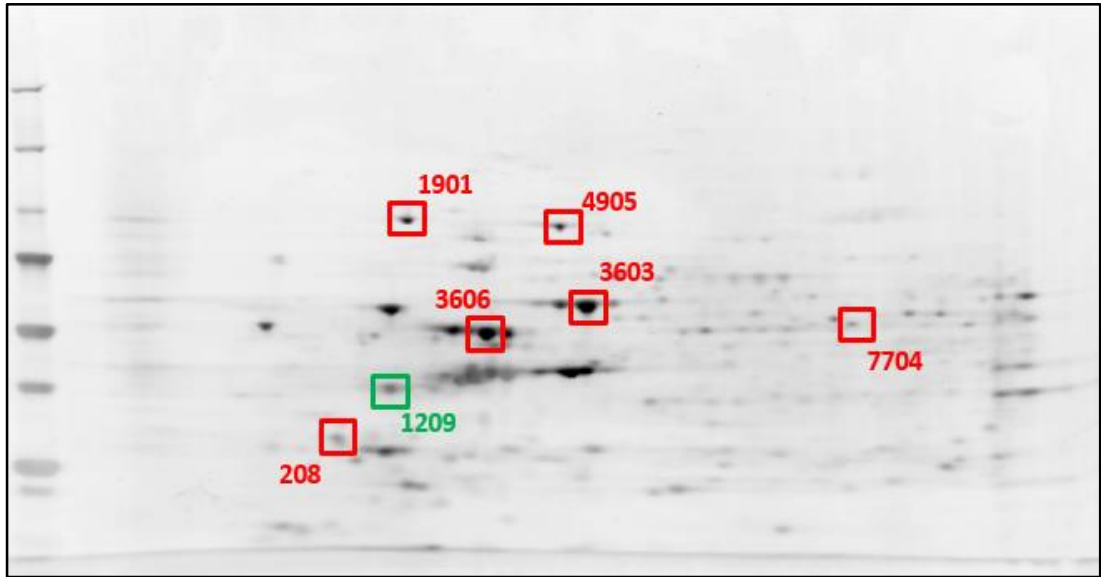
PDQuest™ programının yardımıyla C ve T gruplarına ait program tarafından oluşturulan sanal jel haritalarında 102 tane spot bulunmuştur. Elde edilen spotlar, program tarafından bulunduğu koordinatlara göre SSP (Seçilmiş spot pozisyonu) adı verilen numaralar verilerek numaralandırılmıştır.

Farklılaşan spotları tespitinin sadece göz ile takip edilerek yapılması hatalara sebep olacağından PDQuest™ programının yardımı ile spotlara ait 3 tane küme belirlenmiştir (Bkz. Bölüm 3.9). C ve T gruplarında spotların intensitelerinde en az 2 kat farklılaşma saptanmış olanların oluşturduğu analiz kümesine *Quant* adı verilmiş ve bu kümeye ait 38 tane spot saptanmıştır. C ve T gruplarında kendi içlerinde istatistiksel olarak % 95 güven seviyesinde intensiteleri aynı olan spotlar ise *Statistic* analiz kümesinde toplanmış ve bu kümede 49 tane spot saptanmıştır. *BooIn* olarak adlandırılan bir diğer küme ise *Statistic* ve *Quant* kümelerine ait bir kesişim kümesidir ve bu küme grup içinde % 95 güven seviyesinde intensiteleri

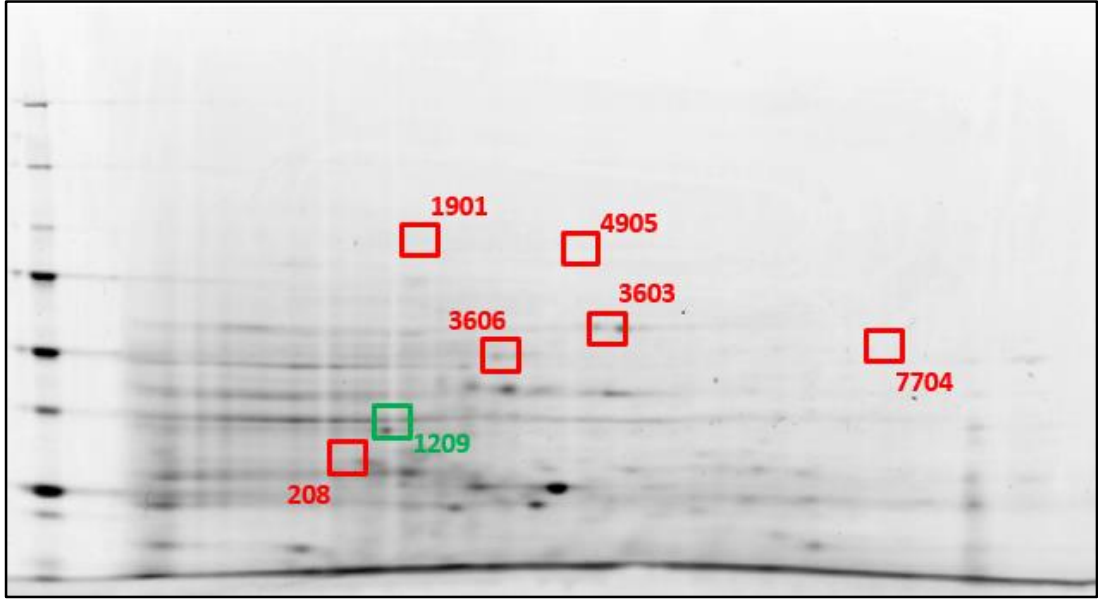
uyuşurken, gruplar arasında en az 2 kat intensiteleri farklılaşan spotlardan oluşmaktadır. *Booln* kümesine ait 24 tane spot saptanmıştır.

Belirlenen 24 tane spot ayrıntılı olarak tekrar incelendiğinde, bazılarının birbirlerine çok yakın olduğu ve bu sebeple aynı protein grubuna ait olabilecekleri düşünüldüğünden; bu spotlar arasında en yüksek yoğunluğa sahip olanları seçilmiştir.

Booln kümesine ait 24 spottan 7 tanesi, MALDI-TOF/TOF-MS analizleri için Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.' de gösterildiği gibi seçilmiş Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı' nda jellerden kesimi ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu şekillerdeki jellerin üzerinde kırmızı kutucukla işaretlenenler ABS' nin etkisiyle azalmış olan (*under expressed*), yeşil kutucukla işaretlenen ise ABS etkisiyle artmış olan (*over expressed*) protein spotlarıdır. Kesilen spotların yakınlaştırılmış görüntüleri ise Şekil 4.5. - 4.11.' de verilmiştir.



Şekil 4.3. C grubuna ait MCF-7 hücrelerinin jel görüntüsü.



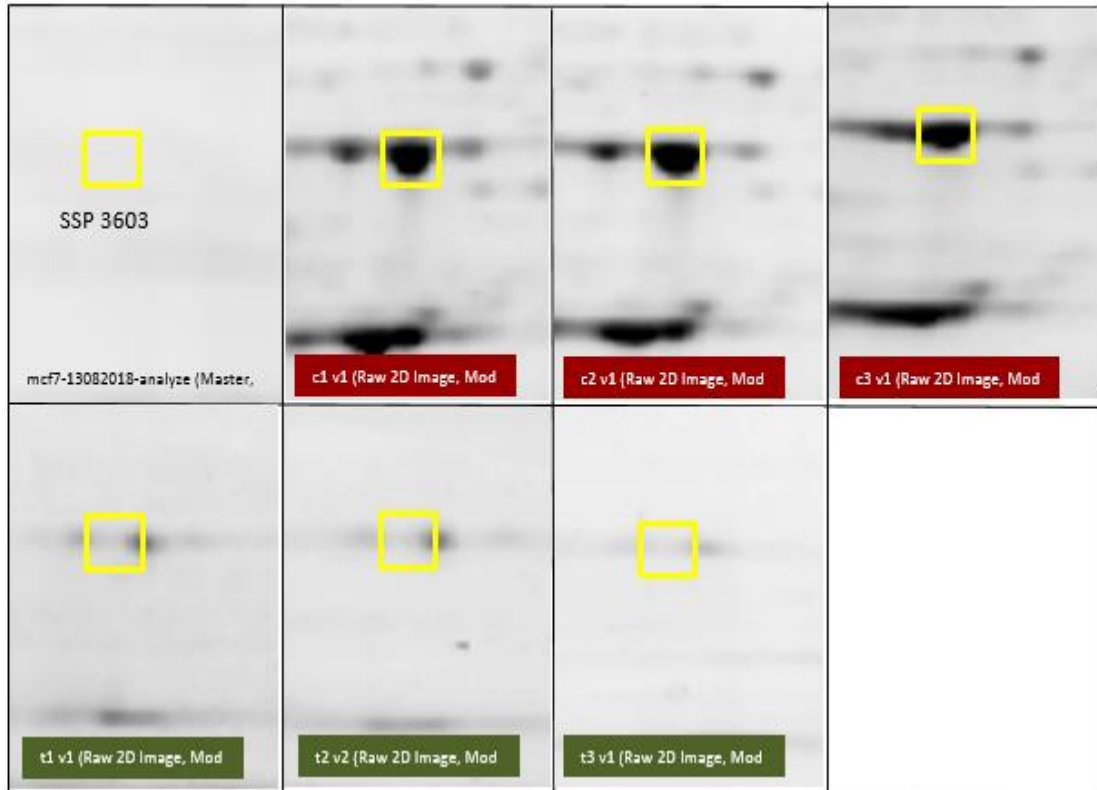
Şekil 4.4. T grubuna ait MCF-7 hücrelerinin jel görüntüsü.



Şekil 4.5. 208 SSP numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.6. 1901 SSP numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.7. 3603 SSP numaralı spota ait görüntü.



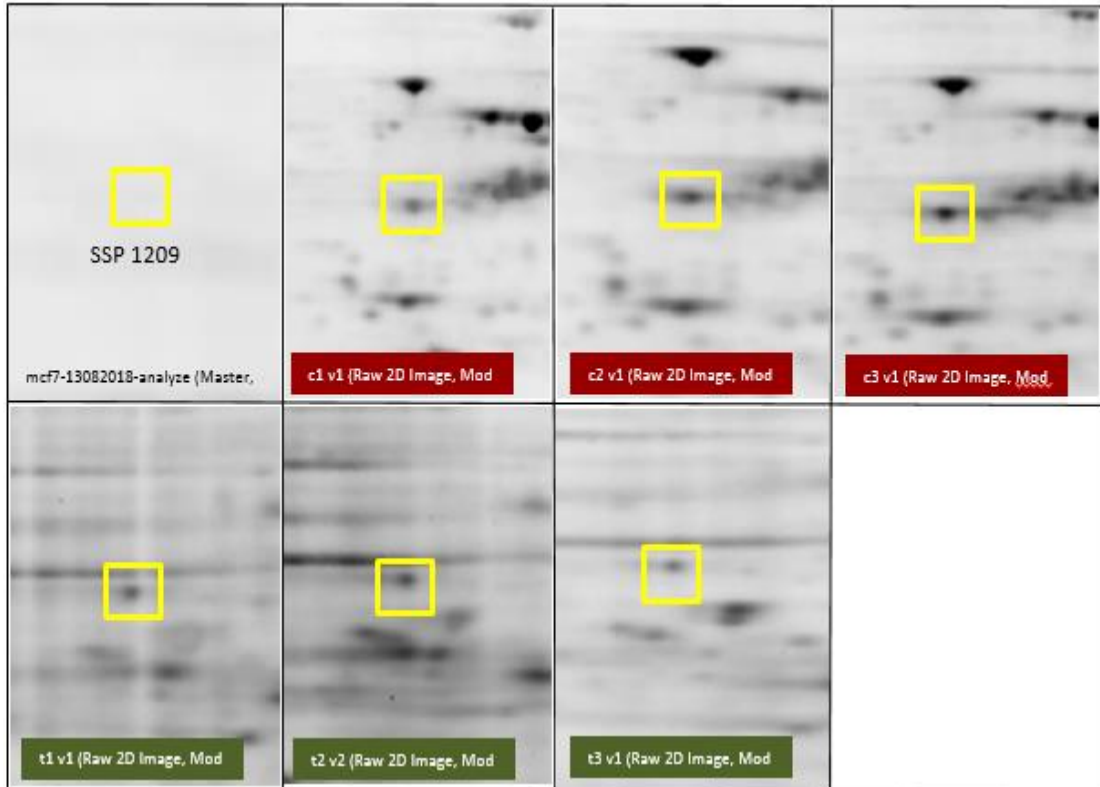
Şekil 4.8. 3606 SSP numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.9. 4905 SSP numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.10. 7704 SSP numaralı spota ait görüntü.



Şekil 4.11. 1209 SSP numaralı spota ait görüntü.

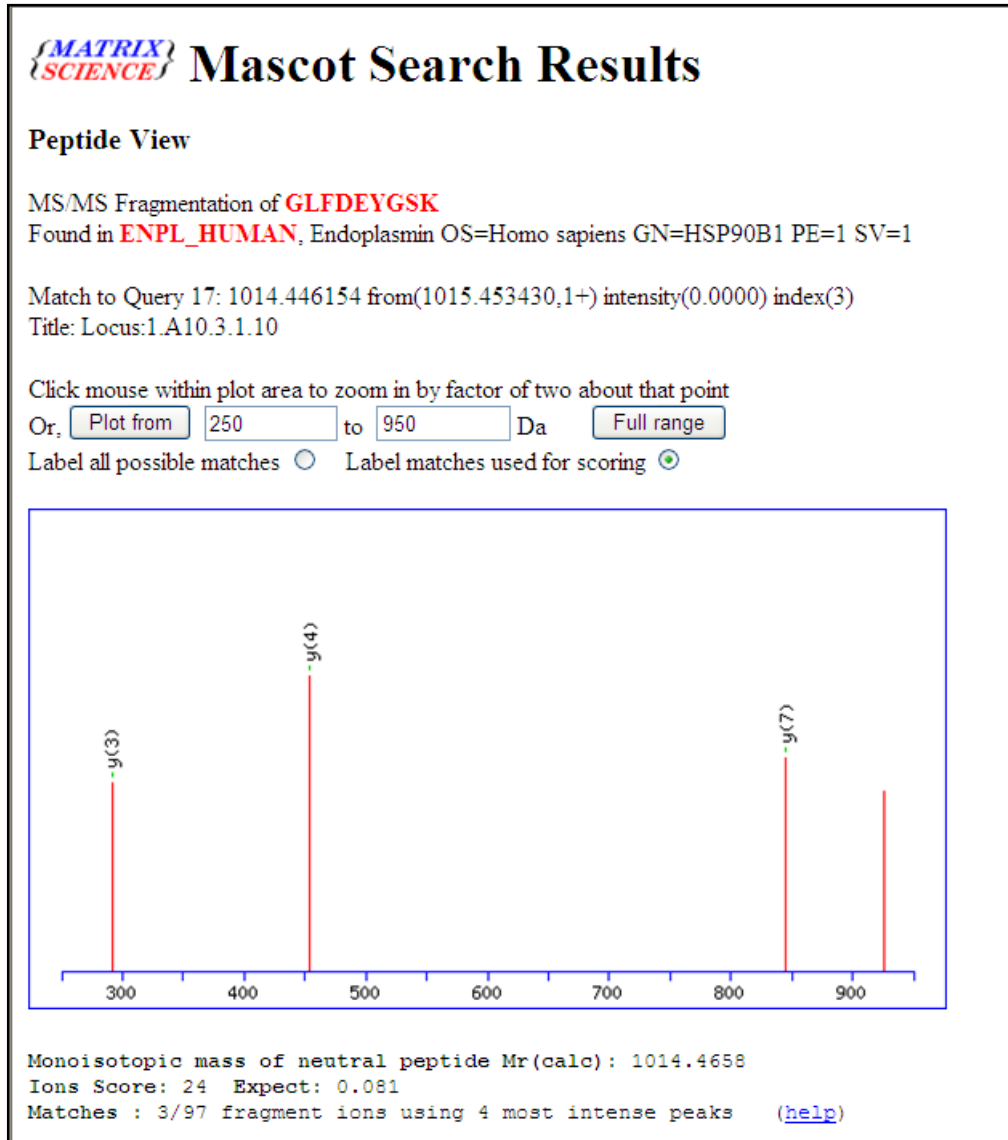
4.3.2. Proteinlerin Karakterizasyonu

C ve T gruplarında farklılaşan spotlardan 7 tanesi (SSP No: 208, 1901, 3603, 3606, 4905, 7704 ve 1209) seçilmiş ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı'nda bu seçilen spotlar jellerden kesilip ayrılmış ve sonrasında tripsinle peptidlerine parçalanıp jellerden ekstre edilmiştir. Ekstre edilmiş proteinlerin MALDI-TOF/TOF-MS cihazı ile analizi tamamlandıktan sonra elde edilen proteinler, veri bankalarında taranarak karakterize edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. MCF-7 hücrelerinin ABS ile muamelesi sonucunda nicel olarak düşük ve yüksek miktarlarda saptanan proteinler.

SSP No	C Ortalama	T Ortalama	Değişim (C/T veya T/C Oranı)	Protein Adı
ABS uygulandıktan sonra azalan				
208	247599.6	132909.15	2.01	Endoplazmin OS=Homo Sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1
1901	270328.9	125544.15	2.15	60 kDa ısı şok proteini, mitokondriyal OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2
3603	356352.8	152071.85	2.34	ATP sentaz beta alt birimi, mitokondriyal OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3
3606	316109.8	82114.1	3.85	Geçişli (transisyonel) endoplazmik retikulum ATPaz OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4
4905	239021.1	93186	2.56	Selenyum bağlayıcı protein 1 OS=Homo sapiens GN=SELENBP1 PE=1 SV=2
7704	176557.9	0.00001	T grubunda gözlenemedi.	Protein disülfit-izomeraz A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1
ABS uygulandıktan sonra artan				
1209	28321.05	87152.65	3.1	Varsayılan (putative) 40S ribozomal protein S10-benzeri OS=Homo sapiens GN=RPS10P5 PE=5 SV=1

MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 24 saat ABS ile muamele edilmesi sonucunda farklılaştığı tespit edilen her bir spot, MASCOT programı kullanılarak analiz edilmiş ve en yüksek skora sahip peptid ve bu peptide ait aminoasit dizisi bulunmuştur. Farklılaştığı saptanan proteinlerden "Endoplasmin" proteinin "GLFDEYGSK" peptidine ait "b" ve "y" türü iyon fragmentlerinin spektrumu ve m/z değerleriyle peptidin amino asit dizisi, MASCOT programı ile yapılan analizlere örnek olması için Şekil 4.12. ve Tablo 4.2' de verilmiştir.



Şekil 4.12. "Endoplasmin" proteinin "GLFDEYGSK" peptidine ait tüm iyonlar ile "b" ve "y" türü iyon fragmentlerinin spektrumu.

Tablo 4.2. "Endoplasmin" proteininin "GLFDEYGSK" peptidine ait amino asit dizisi.

#	Immon.	a	a ⁰	b	b ⁰	Seq.	y	y*	y ⁰	#
1	30.0338	30.0338		58.0287		G				9
2	86.0964	143.1179		171.1128		L	958.4516	941.4251	940.4411	8
3	120.0808	290.1863		318.1812		F	845.3676	828.3410	827.3570	7
4	88.0393	405.2132	387.2027	433.2082	415.1976	D	698.2992	681.2726	680.2886	6
5	102.0550	534.2558	516.2453	562.2508	544.2402	E	583.2722	566.2457	565.2617	5
6	136.0757	697.3192	679.3086	725.3141	707.3035	Y	454.2296	437.2031	436.2191	4
7	30.0338	754.3406	736.3301	782.3355	764.3250	G	291.1663	274.1397	273.1557	3
8	60.0444	841.3727	823.3621	869.3676	851.3570	S	234.1448	217.1183	216.1343	2
9	101.1073					K	147.1128	130.0863		1

5. TARTIŞMA

Kanser, günümüzde insanları hem sosyal hem de ekonomik anlamda etkileyen ölümcül hastalıklardan biridir ve teşhis ve tedavisinde sürekli olarak çözüm bulunmaya çalışılan hastalıkların başında gelmektedir.

Kanser türlerinin gelişimleri farklı olduğundan değişik tedaviler uygulanmaktadır. Günümüzde, kanserin önlenmesi ve tedavisi için moleküler hedefler belirlenerek gerçekleştirilen kanser araştırmaları devam etmektedir. Ancak yalnız bir ilacın kullanıldığı tedavi yaklaşımları ile hala daha istenilen amaca ulaşamaması, araştırmacıları kombine tedavi yöntemleri uygulamaya ya da değişik metabolik yolları aynı anda etkisi altına alan yaklaşımlar geliştirmeye yönlendirmiştir (214, 215).

Proteomik ve genomik çalışmalarda amaç genlerin tanımlanmasıdır. Binlerce hücreden oluşan vücudumuzdaki bütün yaşamsal fonksiyonların devam edebilmesi için gerekli olan yapı taşları olarak bilinen proteinlerin sentezi, genler tarafından yapılmaktadır. Genler tarafından katlanmış olan proteinler proteom denen yapıyı oluşturur ve proteom içinde yer alan bu proteinlerin analizleri proteomik çalışmalarla yapılmaktadır.

Proteomik çalışmalar, kanserin gelişimi ve ilerleme aşamaları ile ilgili gerçekleşen hücresel olayları moleküler düzeyde incelediği için çok önemlidir (216, 217). Klinik tümör örnekleriyle gerçekleştirilen çalışmalar ile kansere özgü olan protein markerları tanımlanmış ve aynı zamanda erken teşhis için yeni yöntemler geliştirilmiş olup bu sayede kanserin temeli ve nasıl ilerlediğini moleküler düzeyde açıklamak açısından ipuçları vermiştir (218).

Gen Ontolojisi (GO), gen fonksiyonları ile alakalı kavramları ve genlerin birbirleriyle nasıl ilişkili olduğunu tanımlamaktadır. Biyolojik bilgiler arttıkça GO sürekli olarak genişlemektedir. GO, gen fonksiyonlarını aşağıda verilen üç açıdan ele almaktadır:

- Moleküler fonksiyon; gen ürünlerinin gerçekleştirdiği moleküler düzeylerdeki aktiviteler,
- Hücresel bileşen; bir gen ürününün bir işlevi gerçekleştirdiği hücre yapılarına göre konumları,
- Biyolojik süreç; daha büyük süreç veya çoklu moleküler faaliyetlerle gerçekleştirilen biyolojik programlar (219).

Bu tez çalışmasında, antikanser etkisi araştırılan ABS, Türk Tıp Hekimliğinde hemostatik ajan olarak kullanılmakta olup *Urtica dioica* (ısırgan), *Vitis vinifera* (koruk), *Glycyrrhiza glabra* (meyan), *Alpinia officinarum* (havlıcan) ve *Thymus vulgaris* (kekik) bitkilerinin standardize karışımından oluşan bitkisel bir ekstraktır. Karışımı oluşturan bitkiler tek başlarına, endotel ve kan hücreleri, damar oluşumu, vasküler dinamikler ve mediatörler üzerinde hemostatik bir etkiye sahiptirler. Anormal hücre - doku büyümesi olarak tanımlanan diplazi ve kanser hücrelerine ABS uygulanarak gerçekleştirilmiş olan klinik çalışmalar ile ilgili ayrıntılı bilgi Bkz. Bölüm 2.17.' de verilmiştir.

ABS kanserin neden olduğu kanamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Melanom, osteosarkom, kolorektal ve lösemi hücre hatlarında ABS' nin sitotoksik etkisi *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ABS' nin antiproliferatif ve sitotoksik etkisi kanıtlanmıştır. ABS' nin içinde yer alan bitkisel proteinleri ve insan proteinlerine benzer proteinleri saptamak amacıyla proteomik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Her ne kadar ABS' nin farklı kanser hücre hatlarında antiproliferatif etkisi ile ilgili çalışmalar bulunsa da MCF-7 meme kanserine karşı antiproliferatif etkisini moleküler düzeyde açıklayan bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, MCF-7 meme kanseri hücre hattının ABS ile muamelesi sonucu 2D jel elektroforez ile proteinler ayrılmış ve MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edildikten sonra C ve T gruplarına ait hücreler arasında nicel anlamda düşük ve yüksek miktarlarda bulunan proteinler tespit edilmiştir. Proteinler ayrılıp karakterize edildikten sonra ise çalışma sonucu elde edilen bulgular kullanılarak ve literatür araştırması ile ABS' nin antikanser aktivitesi moleküler düzeyde açıklanmaya çalışılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında ABS, MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat uygulanmıştır. ABS ile muamele edilen T grubu ve muamele edilmeyen C grubu hücrelerden sitozolik fraksiyonlar elde edilmiştir. Sitozolik fraksiyonlardaki protein miktarları "Bio-Rad™ Protein Assay" yöntemi ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.1.) Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sitozolik fraksiyonlarda bulunan protein miktarları C grubu için 2.63 mg/mL, T grubu için 3.56 mg/mL olarak bulunmuştur. Her bir C ve T grupları için 2D jel elektroforez çalışmaları 3 kez tekrarlanarak yapılmıştır.

Özellikle iki veya daha fazla grubun karşılaştırıldığı karşılaştırmalı (*ekspresyon*) proteomik çalışmalarda, her bir gruptaki numunenin yani 2D Jel elektroforez ile ayrılacak proteinlerin miktarlarının eşit bir düzeyde olması gerekmektedir. Böylece, her bir grup için boyanma sonucunda imaj analizi çalışmaları ile intensiteleri ölçülen protein spotları, birbirleriyle doğru biçimde karşılaştırılabilecek ve düşük ya da yüksek miktarda ifade edilip edilmediği anlaşılacaktır.

Çalışmada her bir jele 1.5 mg/mL protein olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Sonrasında proteinler -20 °C' de bekletilen TCA ve DTT içeren aseton çözeltisi ile çöktürülmüş, ardından çöktürülen proteinler yükleme tamponunda çözülerek IPG şeritlere yüklenmiştir. Literatürde farklı pH aralığına sahip IPG şeritleri denenmiş, spot dağılımı ve ayırımın en yüksek olduğu şerit olarak pH 4 - 7 IPG şeritlerinin olduğu tespit edildiği için deneylerde pH 4 - 7 IPG şeritler kullanılmıştır.

IPG şeritlere yüklenen proteinler önce IEF cihazında Bkz. Tablo 3.8.' de verilen odaklama programıyla pI değerlerine göre birbirinden ayrılmıştır. IPG şeritler sırasıyla dengeleme tamponu 1 ve 2 ile muamele edilerek proteinlerin SDS ile kompleks oluşturması sağlanmıştır. Dengeleme tamponu 1' de bulunan DTT, proteinlerin disülfid bağlarını koparmaktadır. Böylece proteinler SDS ile kolayca etkileşmektedir. Dengeleme tamponu 2' de bulunan IAA, açıkta kalan -SH gruplarını alkilleyerek SDS - PAGE' de bulunan akrilamit yapısıyla etkileşime girmesini önlemektedir. IPG şeritler sonra elektroforez hücrelerine yerleştirilerek proteinlerin kütlelerine göre ayrılmaları sağlanmıştır. Protein yüklenmiş jeller, +4 °C'de % 0.5 (h/h) oranında asetik asit içeren saklama çözeltisinde bekletilmiş ve en fazla bir hafta içinde MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilmiştir.

C ve T grubundaki jellere yüklenen toplam protein miktarı aynı olmasına rağmen gruptaki protein dağılımı ve intensiteleri farklıdır. 1. boyutta pI' larına, 2. boyutta kütlelerine göre ayrılan proteinlerin imaj çalışmaları için görüntülenebilmesi için öncelikle boyanması ve jellerin görselleştirilmesi gerekmektedir. Proteinler uygun bir biçimde boyanmamışsa jel üzerinde gözlenebilen protein sayısı ve fotoğraflama koşulları iyi sonuç vermeyecektir. Proteinlerin boyanması sonucu jel üzerinde gözlenen spotun intensitesi protein miktarı ile doğru orantılıdır. Bu çalışmada C ve T gruplarına ait jeller SYPRO- Ruby ile boyanmıştır. Birçok boyama yöntemi karşılaştırıldığında SYPRO - Ruby ile boyama

yönteminde çok daha fazla sayıda spot tespit edildiğinden bu çalışma kapsamında bu boyama yöntemi kullanılmıştır. Proteinlerin boyama çözeltisi ile iyi bir biçimde boyanması, jel üzerinde gözlenebilen protein sayısı ve fotoğraflama koşullarını etkilemektedir.

Çalışmanın bundan sonraki aşamasında Bölüm 4.3.1.' de anlatıldığı gibi imaj analizi çalışmaları yapılmıştır. İmaj analiz programlarının çoğunda jel görüntüleri üzerinde toplam spot intensitesine bağlı olarak görüntünün kontrastı ayarlanabilmektedir. Yüksek miktarda proteinin izoelektrik odaklamasında çıkan en büyük problem odaklamanın tam olarak gerçekleşmemesi ve sonuçta oluşan yatay çizgilerdir.

İmaj analizlerinde ilk olarak görüntüleme çalışmaları yapılmaktadır. Bu nedenle görüntüleme cihazı aracılığıyla jel haritaları oluşturulmuştur (Bkz. Şekil 4.2.). Manuel olarak yapılan çalışmalarda hatalar olabileceği için farklılaşan spotların tespitinde PDQuest™ programı kullanılmıştır. Ancak programın otomatik olarak saptama yapması, spot olmayan lekeleri de spot olarak verebilme ihtimali bulunmaktadır. Bu nedenle programın bulunduğu her bir spot tek tek incelenmiş, tespit edilen hatalar düzeltilmiştir. Daha sonra, Bkz. Bölüm 3.9.' de anlatıldığı gibi PDQuest™ programı tarafından 3 tane küme tanımlanmıştır (*Statistic*, *Quant* ve *Booln*).

Görüntüleme cihazı ile görüntüleri alınan jellere ait haritalar, PDQuest™ yazılımı aracılığıyla analiz edilmiş, ABS' nin etkisiyle % 95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı ve miktarı en az 2 kat artan ya da azalan proteinler tespit edilmiştir. *Booln* kümesinde saptanan spot görüntüleri tekrar incelendiğinde bazı spotların birbirlerine çok yakın oldukları gözlenmiştir. Bu spotlar aynı protein ailesine ait olabilmektedir. Bu nedenle MALDI-TOF/TOF-MS analizi için içlerinden intensiteleri en yüksek olanlar seçilmiştir. Çalışmada *Statistic*, *Quant* ve *Booln* kümesine ait elde edilen spot sayıları Tablo 5.1' de verilmiştir.

Tablo 5.1. MCF-7 hücre hattının ABS ile muamelesi sonucu tanımlanan kümelerdeki ve MALDI-TOF/TOF-MS analizi için belirlenen spot sayıları.


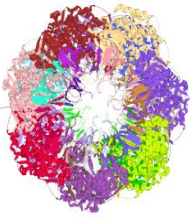
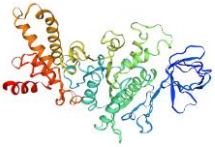
Hücre Hattı	Toplam Spot	<i>Statistic</i>	<i>Quant</i>	<i>Booln</i>	Analiz Edilen Spot Sayısı
MCF-7	102	49	38	24	7

MCF-7 hücrelerine ait C ve T grupları karşılaştırılarak % 95 güven seviyesinde en az 2 kat fark olan ve *Boon* kümesindeki 24 spotun 7 tanesi MALDI TOF/TOF-MS analizi için seçilmiştir (Bkz. Şekil 4.3. ve 4.4.) Bu 7 spotun, jelden kesilip ekstre edilmesi ve proteinlerin veri bankaları kullanılarak tanımlanması Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekart Proteomik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. PMF için MASCOT programı ve De Novo peptid dizileme (Bkz. Bölüm 4.6.) yöntemleri kullanılmıştır.

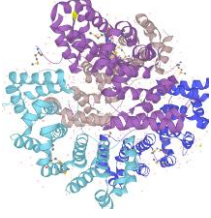
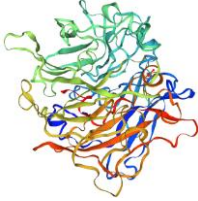
MCF-7 meme kanseri hücrelerine ABS' nin muamelesi sonucunda, nicel anlamda düşük ve yüksek miktarda ifade edilen proteinler tanımlanmış ve değişim oranları Tablo 4.1.' de verilmiştir.

Farklılaşan bu proteinlerin 3 boyutlu yapıları, fonksiyonları, gen adları ve amino asit dizileri UniProt, SwissProt gibi veri tabanları ile bulunmuştur (Tablo 5.2). Farklılaşan proteinlerin görev aldığı yollar ve kanser ile olan ilişkileri, String ve KEGG veri veri tabanları kullanılarak açıklanmaya çalışılmıştır.


Tablo 5.2. MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat ABS uygulanması sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapıları ve fonksiyonları (220).

Protein Adı ve Yapısı	Gen	Protein Fonksiyonu
<p>Endoplasmin</p> 	HSP90B1	Proteinlerin işlenmesi ve taşınmasında görev alan moleküler şaperondur ve belirli reseptörlerin düzgün katlanması için gereklidir. Endoplazmik retikulum ile ilişkili bozulmada görev alırken ATPaz aktivitesine sahiptir.
<p>60 kDa ısı şok proteini</p> 	HSPD1	Şaperonin mitokondriyal protein taşınmasında ve makromoleküler yapımında rol oynar. HSP10 ile birlikte proteinlerin doğru katlanmasını kolaylaştırır. Ayrıca yanlış katlanmayı da önler. Mitokondriyal matristeki stres koşullarında oluşan katlanmamış polipeptidlerin yeniden katlanmasını ve uygun şekilde düzenlenmesini destekler. Bu şaperoninlerin fonksiyonel üniteleri, arka arkaya çift halka görevi gören büyük alt ünite HSP60'ın heptamerik halkalarından oluşur. Substrat proteini, HSP60'ın iç boşluğunda belirli bir süre başka hücre bileşenleri tarafından bozulmadan katlanır.
<p>ATP sentaz beta alt birimi, mitokondriyal</p> 	ATP5B	Solunum zincirinin elektron taşıma kompleksleri tarafından üretilen membran boyunca proton gradyanı varlığında ADP'den ATP üretir. F-tipi ATPazlar, yapısal bir katalitik çekirdeği içeren F1 ve merkezi bir sap ve bir çevresel sap ile birbirine bağlanan membran proton kanalını içeren F1 - iki yapısal alandan oluşur. Kataliz sırasında F1'in katalitik alanındaki ATP sentezi, merkezi sap alt birimlerinin bir mekanizma vasıtasıyla proton translokasyonuna birleştirilir.

Tablo 5.2 (Devam). MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat ABS uygulanması sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapıları ve fonksiyonları (220).

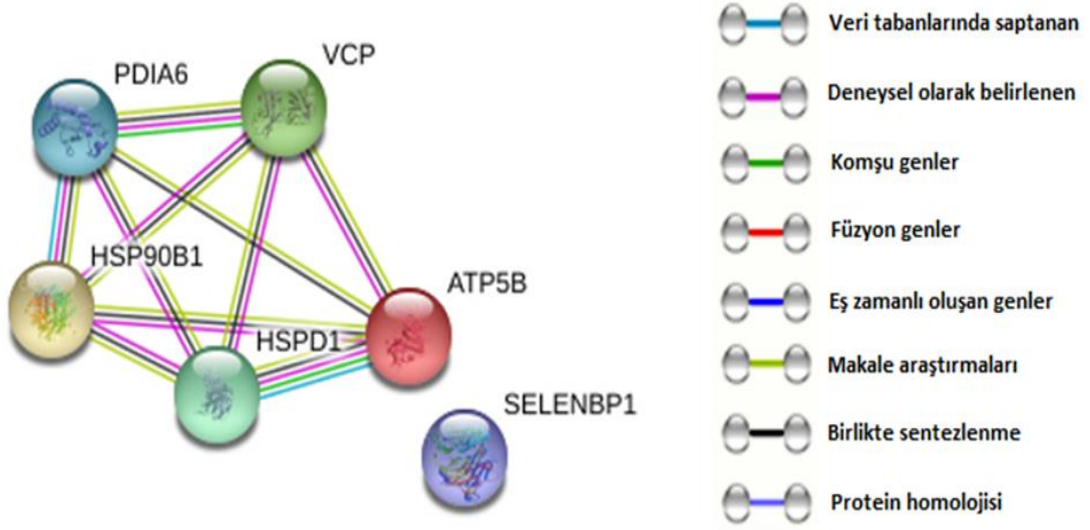
Protein Adı ve Yapısı	Gen	Protein Fonksiyonu
<p>Geçişli endoplazmik retikulum ATPaz</p> 	VCP	<p>Mitoz sırasında golgi yığınlarının parçalanması ve mitozdan sonra tekrar biraraya getirilmesi için gereklidir. Transisyonel endoplazmik retikulumunun (tER) oluşumunda rol alır. Arsenit kaynaklı tepkilerde stres granüllerinin (SG'ler) temizlenmesi işleminin düzenlenmesinde rol oynar ve protein katlanmasında görevlidir.</p> <p>UFD1, VCP ve NPLOC4 içeren üçlü kompleks, ubikastine edilmiş proteinleri bağlar, yanlış katlanmış proteinlerin ER'den sitoplazmaya, proteazom tarafından parçalandıkları yere aktarılmasında gereklidir. NPLOC4-UFD1-VCP kompleksi, mitoz sonunda nükleer zarfın oluşturulması için gereklidir. RNF19A'nın E3 ubiquitin-protein ligaz aktivitesini düzenler. HMGCR'nin sterol aracılı ubiquitinasyon ve endoplazmik retikulum ilişkili bozulmasının (ERAD) son basamağında yer alan VCP / p97-AMFR / gp78 kompleksinin bileşenidir.</p>
<p>Selenyum bağlayıcı protein 1 (Metanoetil oksidaz)</p> 	SELENBP1	<p>Bağırsak bakterileri tarafından önemli miktarlarda üretildiği bilinen bir organosülfür bileşiği olan metaniol oksidasyonunu katalizler. Sitoplazmada reaktif ksenobiyotiklerin algılanmasında rol alabilen selenyum bağlayıcı protein, golgi içi protein taşınmasında rol oynar.</p>

Tablo 5.2 (Devam). MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat ABS uygulanması sonucunda nicel anlamda farklılaşan proteinlerin yapıları ve fonksiyonları (220).

Protein Adı ve Yapısı	Gen	Protein Fonksiyonu
<p>Protein disülfid-izomeraz A6</p> 	PDIA6	Yanlış katlanmış proteinlerin toplanmasını önleyen bir şaperon olarak işlev görür. Negatif olarak katlanmamış protein cevabını (UPR) ERN1 gibi UPR sensörlerine bağlayarak düzenler ve bu da ERN1 sinyalini etkisizleştirir. Convulxin, kolajen ve trombin gibi agonistler tarafından trombosit agregasyonunda ve aktivasyonunda rol oynar.
<p>Varsayılan (putative) 40S ribozomal protein S10-benzeri</p> <p>String programında protein yapısına dair herhangi bir veriye ulaşılamamıştır.</p>	RPS10P5	Bir psödojen (gen benzeri olan fakat genlerden farklı olarak fonksiyonel ürününü kodlayamayan, sahte gen bölgeleri) ürünü olabileceği düşünülmektedir. Ribozomun yapısal bileşeni ve ribozomal küçük alt ünite düzeniği olarak işlevleri vardır.

Hücre içi ya da hücreler arasında bulunan proteinler, tek başlarına birçok fonksiyona sahip olmalarının yanısıra diğer proteinlerle birlikte çeşitli yollarda da görev almaktadırlar. Bu çalışmada MCF-7 hücrelerine ait C ve T grupları arasında farklılaşan her bir proteinin fonksiyonu, SwissProt ve UniProt programı kullanılarak incelenmiş ve önemli fonksiyonlara sahip oldukları tespit edilmiştir ve aynı zamanda hangi biyolojik yolları etkilediği bulunmuştur.

Farklılaşan proteinlerin gen adları kullanılarak String programı yardımıyla protein - protein etkileşim ağ haritası oluşturulmuştur (221) (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ABS' nin etkisiyle farklılaşan proteinlerin birbirleriyle etkileşimi (221).

String programı aracılığıyla ABS' nin etkisiyle MCF-7 hücrelerinde değişen proteinlerin atlasına göre; bağlantıların, bir genomdan çekilmiş, benzer boyutlarda olan rastgele protein gruplarına kıyasla kendi aralarında çok daha fazla etkileşime girmiş olduğu gözlenmektedir. Bu da bize analiz sonucu elde edilen proteinlerin biyolojik olarak birbirlerine grup halinde bağlı olduğunu göstermektedir.

Protein atlası incelendiğinde PDIA6, VCP, ATP5B, HSPD1 ve HSP90B1 ile ifade edilen genler komşu genlerdir. String programında RPS10P5 genine ait herhangi bir veriye ulaşılamamıştır. Programda gen ismi ile ifade edilen proteinler arasındaki ilişkiler farklı renklerde verilerek ortaya konmaya çalışılmıştır.

String programı aracılığıyla saptanan biyolojik süreçler ve moleküler fonksiyonlar, GO numaraları aracılığıyla QuickGO ve KEGG veri tabanlarında araştırılmıştır. ABS' nin endoplazmik retikulum (ER) protein işleme, RNA bozunma, östrojen sinyal ve kanser yolları üzerinde etkili olduğu saptanmıştır.

Biyolojik süreçlerde PDIA6, VCP, HSPD1 ve HSP90B1, GO: 0006986 numaralı yolak olan katlanmamış proteine bir cevap olarak ve katlanmamış bir protein uyarının sonucu olarak bir hücrenin veya bir organizmanın (hareket, sekresyon, enzim üretimi, gen ekspresyonu, vs. açısından) durumunda veya aktivitesinde değişiklik ile sonuçlanan herhangi bir işlemde görev alır (222).

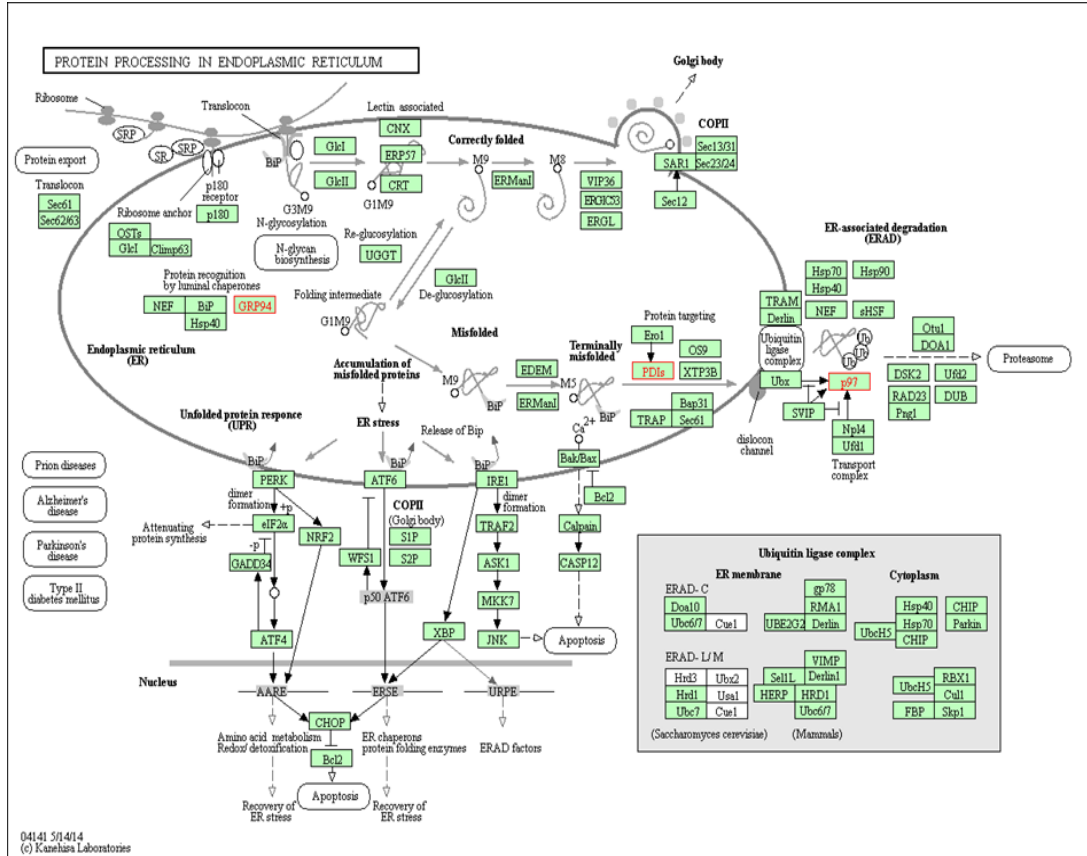
Biyolojik süreçlerde PDIA6, VCP, HSPD1 ve HSP90B1, GO: 0006457 numaralı yolak olan protein katlanmasında ve tek zincirli polipeptidlerin veya çok üyeli komplekslerin kovalent, kovalent olmayan montajında doğru üçüncül yapıya yardımcı olma işlemlerinde görev alır (222).

Biyolojik süreçlerde PDIA6, VCP ve HSP90B1, GO: 0030968 numaralı yolak ER katlanmamış protein cevabı olarak görev alır. ER veya diğer ER ile ilgili streste katlanmış proteinlerin varlığının bir sonucu olarak üretilen moleküler sinyaller serisi; transkripsiyon ve çeviri düzenlemelerinde değişikliklere neden olur (222).

Biyolojik süreçlerde VCP ve HSP90B1, GO: 0030970 numaralı yolak olan ER'den sitozol retrograde protein taşınımında ve katlanmış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER'dan translokon yoluyla sitozol hareketini yönetmekte görev alır (222).

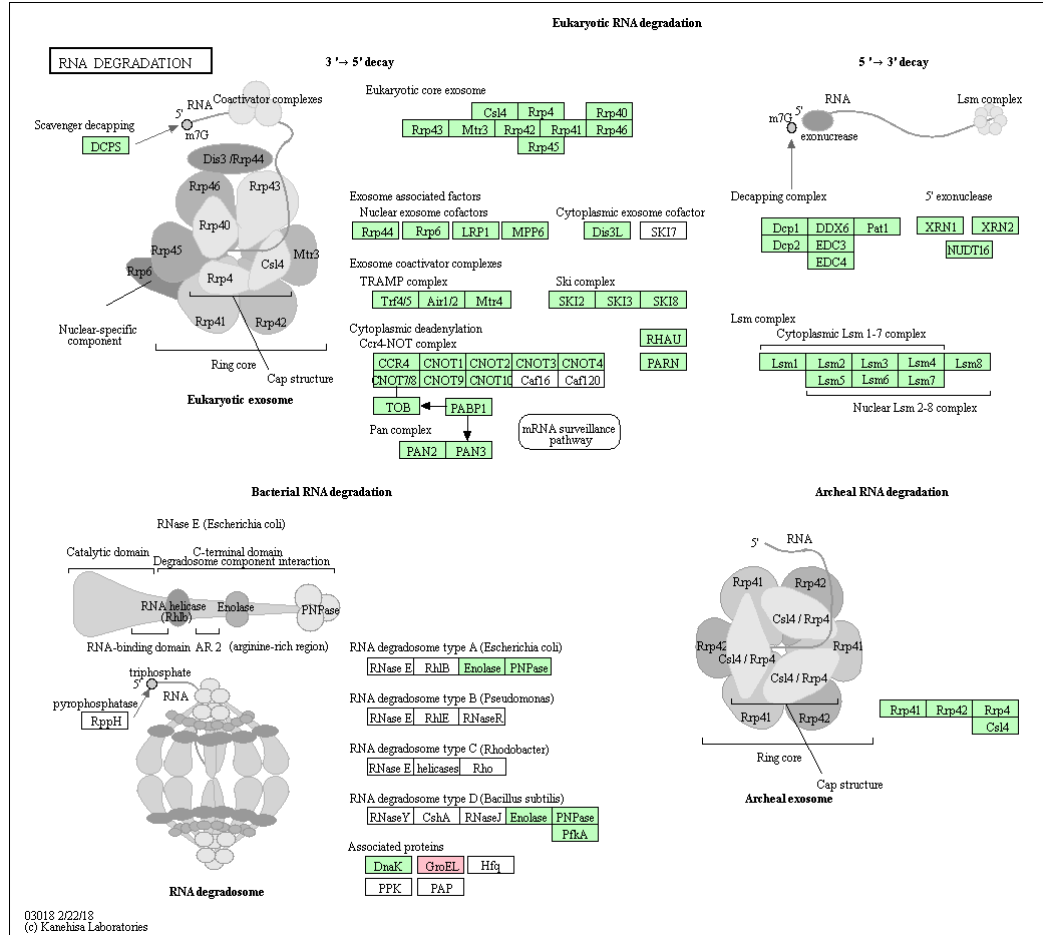
Biyolojik süreçlerde PDIA6, VCP, ATP5B, HSPD1, HSP90B1 ve SELENBP1, GO: 0006810 numaralı yolak olan taşıma ve maddelerin (makromoleküller, küçük moleküller, iyonlar gibi) veya hücrenel bileşenlerin (örneğin, kompleksler ve organeller gibi) bir hücrenin içine hareketinde görevlidir (222).

KEGG yolak analizi veri tabanı aracılığıyla ER protein işleme yolağında (Şekil 5.2.) PDIA6, HSP90B1 ve VCP' nin ABS' nin etkisiyle farklılaştığı saptanmıştır. ER, bir hücre organeli olup yeni sentezlenen peptidler, ER içine girer ve glikozillenir. Doğru şekilde katlanmış proteinler, veziküllere aktarılıp golgi aygıtına aktarılır. Yanlış katlanmış proteinler ise moleküler şaperonlarla kompleks halinde ER' da lümen içinde tutulur. Yanlış katlanmış olan proteinler, endoplazmik retikulumla ilişkili bozulma (ERAD) adı verilen işlemde proteazom aracılığıyla bozulur. ER' da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ER stresine neden olur ve katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak tanımlanan sinyal yolunu aktive eder. Ayrıca, bazı ciddi durumlarda, UPR tarafından aktive edilen koruyucu mekanizmalar, normal ER fonksiyonunu ve apoptotik hücreleri geri getirmek için yeterli değildir (223).



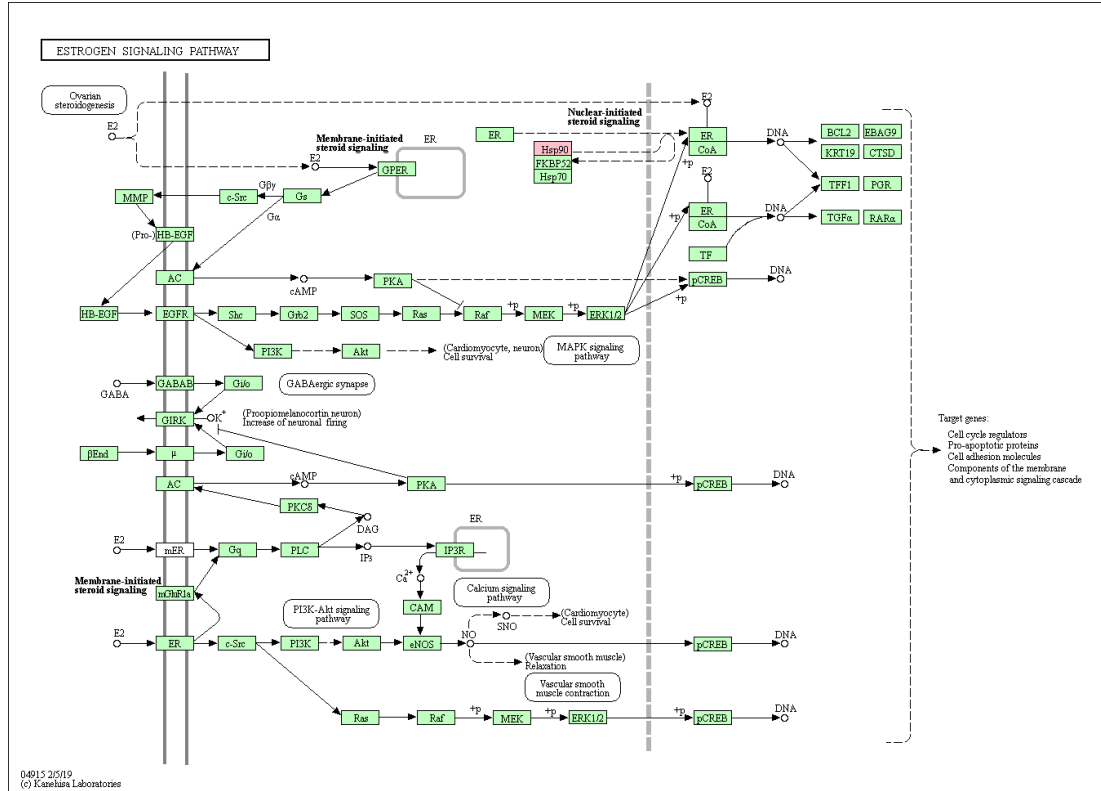
Şekil 5.2. ER’ da protein işleme yolu (223).

KEGG veri tabanı aracılığıyla RNA bozunma yolunda (Şekil 5.3.) HSPD1’ in ABS’ nin etkisiyle farklılaştığı saptanmıştır. Hücrel RNA moleküllerinin doğru işlenmesi, kontrolü ve genetik bilginin tanımlanmasında gibi birçok yönden önemlidir. Ökaryotlarda, iki ana mRNA yolu, mRNA’nın poli (A) kısaltılmasıyla başlatılmaktadır. 5’ ile 3’ yolunda bunu, daha sonra 5’ ve 3’ transkripsiyonların eksonükleolitik bozunmasına neden olan olay izlemektedir. 3’ ve 5’ yolunda, büyük ve çok bölümlü bir kompleks olan, ekson önemli bir rol oynar. Eksozom arkeal hücrelerde bulunur. Bakterilerde RNA bozulması ve işlenmesinde rol oynayan anahtar enzim olan endoribonükleaz E, protein kompleksi adı verilen degradozomu organize eder. RNAaz E veya R, fosfata bağlı ekzoribonükleaz polinükleotit fosforilaz, DEAD-kutulu helikazlar ve RNA-bozucu kompleks içindeki ilave faktörlerle etkileşime girer (224).



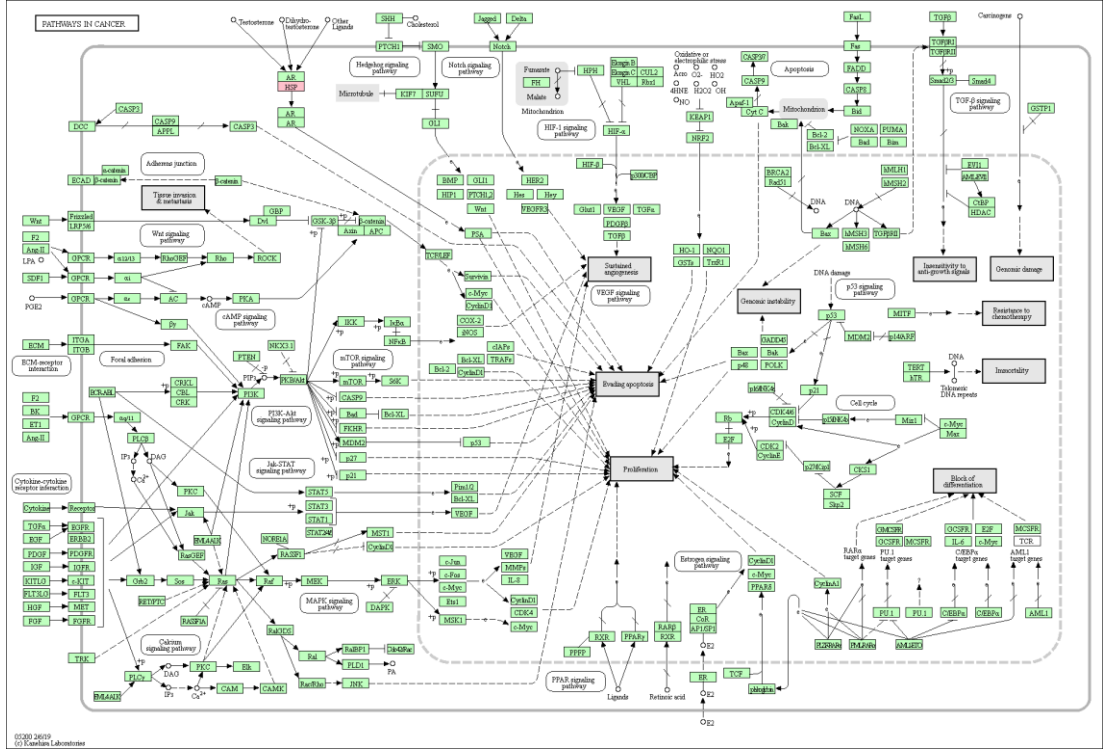
Şekil 5.3. RNA bozunma yoluğđ (224).

KEGG yolak analizi ile östrojen sinyal yoluğđında (Şekil 5.4.) HSP90B1' in ABS' nin etkisiyle farklılaştığı bulunmuştur. Östrojenler, üreme, kardiyovasküler koruma, kemik bütünlüğü, hüresel homeostaz ve davranış gibi memelilerde fizyolojik olayları düzenleyen steroid hormonlarıdır. Östrojen, hüresel olaylara "nükleer başlatılmış steroid sinyali" ve "membranla başlatılmış steroid sinyali" olarak sınıflandırılan iki sinyal yolu ile aracılık eder. "Nükleer" yolakta östrojen, alfa ER veya beta ER'yi bağlar ve bu da ERE elementlerinde DNA'yı bağlar ve ERE'ye bağımlı genlerin ekspresyonunu aktive eder. "Membran" yolunda, östrojen, plazma membranında (mER) veya yeni G-protein bağılı E2 reseptörlerinde (GPER) bir ER alt popülasyonu yoluyla fonksiyonlarını gerçekleştirebilir. Bu reseptörlerin aktivasyonu üzerine çeşitli sinyal yolları (yani Ca^{2+} , cAMP, protein kinaz basamakları) hızlı bir şekilde aktive edilir ve sonuçta aşağı akış transkripsiyon faktörlerini etkiler (225).



Şekil 5.4. Östrojen sinyal yolağı (225).

KEGG veri tabanı yardımıyla kanser yolağında (Şekil 5.5.) HSP90B1' in ABS' nin etkisiyle farklılaştığı bulunmuştur (226).



Şekil 5.5. Kanser yolağı (226).

Analiz edilen 7 tane proteinden, UniProt (220) insan protein veri bankası tarandığında, 4 tanesinin (HSP90B1, VCP, PDIA6 ve RPS10P5) ER kaynaklı, 2 tanesinin (HSPD1 ve ATP5B) mitokondriyal ve 1 tanesinin (SELENBP1) ise ribozomal/sitoplazma kaynaklı olduğu görülmüştür. Bu durumda ER stresinin, ABS uygulanmış MCF-7 meme kanseri hücre hattında daha yoğun görüldüğü ve sitotoksik etkisinin de daha çok ER üzerinden gerçekleştiği söylenebilir.

Tanımlanan proteinler içerisinde HSPD1 (60 kDa ısı şok proteini) ile SELENBP1 (selenyum bağlayıcı protein)' in yüksek derecede korunmuş proteinler (*highly conserved protein*) olduğu veri bankalarında yapılan araştırmalar sonucunda görülmüştür.

Yüksek Derecede Korunmuş Dizi ve Proteinler

Korunan diziler, DNA'da meydana gelen ve aynı zamanda RNA, protein, karbonhidratlardaki dizileri oluşturan benzer veya aynı dizilerdir.

Evrimsel biyolojide, korunan diziler, nükleik asitlerdeki (DNA ve RNA) veya türler boyunca (ortolog diziler) veya bir genom içindeki (paralog diziler) veya donör ve reseptör

taksonlar (ksenolog diziler) arasındaki proteinlerle aynı ya da benzer dizilerdir. Koruma, bir dizinin doğal seçim ile korunduğunu gösterir.

1960' lardaki çalışmalarda, hemoglobin (227) ve sitokrom c. (228) gibi bilinen proteinler arasındaki benzerlik ölçülmüştür. Émile Zuckerkandl ve Linus Pauling, 1965 yılında moleküler saat kavramını ortaya atmıştır ve bunun sonucunda, ilk filogeniler fosil kayıtlarıyla yakından eşleşirken, bazı genlerin farklı oranlarda evrimleştiği gözlemlenmiş ve moleküler evrim teorileri gelişmeye başlamıştır (229, 230). Margaret Dayhoff' un 1966 ferredoxin dizilerini karşılaştırması ile doğal seçimin, yaşam için gerekli protein dizilerini korumakta rol oynayacağını göstermiştir (231).

Nesiller boyunca, evrimsel bir soyun genomundaki nükleik asit dizileri, zaman içinde kademeli olarak değişebilir (232, 233). Diziler ayrıca kromozomal düzenlemeler nedeniyle yeniden birleşebilir veya silinebilir. Korunan diziler, bu tür kuvvetlere rağmen genomda devam eden ve daha yavaş mutasyon oranlarına sahip olan dizilerdir (234). Bu diziler türler arasında gerçekleşir. Bu durum, dizilimlerin özelliklerine rağmen evrimde korunduğunu göstermektedir. Sekans bilgisi normal olarak ebeveynlerden gelen genler tarafından diğer nesile aktarıldığından, korunmuş bir sekansın olması korunmuş bir gen olduğu anlamına gelir.

Yüksek oranda korunmuş proteinler, hücrelerin çalışması veya bölünmesi için gereklidir. Protein sekanslarının korunması, proteinlerin benzer kısımlarında aynı aminoasit kalıntılarının varlığı ile gösterilir. Protein yapılarının korunması, aynı olmasa da aminoasit kalıntıları ve proteinlerin benzer kısımları arasındaki yapılarla, zorunlu olarak özdeş olmamakla birlikte, işlevsel olarak eşdeğerdir.

Korunan diziler biyoinformatik yaklaşımlarla belirlenir. Yüksek verimli DNA sıralamasındaki ve MS' deki gelişmeler, protein sekanslarının ve genomların analizlerini büyük ölçüde arttırmıştır (235, 236).

ER Proteinleri

ER; hücrede bulunan, veziküller ve tüplerden oluşmuş bir organeldir. Membran proteinlerinin veya bir membran içinden geçerek (hücre dışına veya membranla çevrili bir organelin içine) salgılanacak olan proteinlerin katlanması ve taşınması; kalsiyum, bazı lipit ve makromoleküllerin depolanması gibi çeşitli görevleri vardır (237).

ER' nin ilk ve en önemli görevi proteinlerin sentezidir. Tüm hücresele proteinlerin yaklaşık 3' de 1' i, salgılanan proteinlerin ve hücre yüzeyi proteinlerinin çoğunluğu, ER' nin lümenine veya zarına çevrilir. Çeviri sitozolde başlatılır, ancak bir sinyal peptidi, oluşan yeni proteini ER' ye yönlendirir. Bu proteinler doğru katlanmayı sağlar, glikozilasyon ve disülfid bağ oluşumu gibi translayon sonrası değişiklikleri yapar ve son olarak katlanmış proteinlerin kalitesini kontrol eder (237).

Sadece doğru katlanmış proteinler ER' den taşınır. Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler lümeninde birikerek ER stresine neden olabilir. Bu işlem, genel protein sentezini azaltarak stresi gideren, protein katlama kapasitesini artırarak ve yanlış katlanmış proteinlerin ERAD ile uzaklaştırılmasını sağlayarak katlanmış protein cevabını (UPR) aktive eder (237). Bununla birlikte, stres hafifletilmezse, sonuçta apoptozu tetikler. Bazı patolojik süreçler, özellikle Parkinson hastalığı veya Alzheimer gibi nörolojik hastalıkların ER stresine ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Mitokondriyal Proteinler

Mitokondri, enerji metabolizması, apoptoz, sinyal ve lipidleri, aminoasitleri ve demiri içeren metabolik yollar dâhil çok sayıda hücresele süreç için çok önemlidir. Mitokondri yaklaşık 1000 (maya) ile 1500 (insan) farklı protein içerir (238, 239). Bunlardan yaklaşık % 1' i matriksteki ribozomlar üzerinde sentezlenirken, kalanı sitozoldeki ribozomlar üzerinde sentezlenir. Matrikste sentezlenen mitokondriyal proteinler, canlılarda enerji kaynağı olarak kullanılan ATP sentez yollarından biri olan oksidatif fosforilasyonun çok önemli zar bileşenlerini temsil etmektedir.

Mitokondriyal proteinler genellikle, elektron taşıma reaksiyonlarını yürütür ve mitokondriyal fonksiyonlara katılır (240).

Mitokondriyal proteinler, enerji metabolizması, aminoasitlerin, lipidlerin, demirin metabolizmasında, metabolitlerin taşınmasında, proteinlerin taşınması ve katlanmasında, protein degradasyonunda, sinyal iletilmesinde, membranın yeniden oluşumunda, birleştirilmesi ve parçalanmasında ve son olarak apoptozda görevlidir (241).

Sitoplazmik Ribozomal Proteinler

Sitoplazmik ribozomlar ER ve sitoplazmada bulunur. Nükleer genlerden üretilen tüm mRNA'ları çevirir ve hücrel protein sentezinin çoğunu gerçekleştirir. Ribozomlar, irili ufaklı iki ribonükleoprotein alt birimi tarafından oluşturulur. Büyük alt birimin temel işlevi, polipeptidlerin sentezi sırasında tRNA'yı bağlamaktır (242).

Ribozomlar protein sentezinden sorumlu hücre bileşenidir ve hücre büyümesini, bölünmesini ve gelişmesini kontrol etmekte rol oynar (243).

Isı Şok Proteinleri ve Şaperonlar

1962 yılında tükürük salgısının, ısıya maruz bırakılması sonucunda yüksek ısıya bağlı olarak protein sentezlendiği gözlemlenmiştir. Ferruccio Ritossa' nın gerçekleştirdiği bu çalışmada, ısı sonucu sentezlenen bu proteinler ısı şok proteinleri (heat-shock proteins; HSP) olarak adlandırılmıştır (244, 245). Bu protein, normal fizyolojik koşullarda sentezlenen proteinlerin üçüncül yapılarının oluşumu, proteinlerin çökmesinin engellemesi, yanlış katlanmış ve çökmüş proteinlerin birbirinden ayrılması ile doğru katlanmasının sağlanmasında görevlidir. Aynı zamanda proteinleri, ribozomdan alarak görev alacağı yerlere taşırlar. Genellikle ısı stresine bir cevap olarak sentezlenen bu proteinler, ısı dışında da farmakolojik ajanlara karşı sentezlenmektedir. Bu nedenle, bu proteinleri sadece ısı şoku proteini olarak değil, stres koşullarında hücrenin cevabı olarak değerlendirmek gerekmektedir. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 7 - 110 kDa arasında değişmektedir ve hem hücre içinde bulunan sitoplazma ve organellerde hem de hücre dışında bulunurlar (246).

Şaperonlar ise, proteinlerin katlanarak üç boyutlu yapısının oluşmasında görev alan refakatçi proteinlerdir. HSP ve şaperon isimleri genellikle aynı anlamda kullanılsa da şaperon özelliği göstermeyen HSP' ler ve de HSP olmayan şaperonlar bulunmaktadır (247).

Yüksek oranda korunmuş protein grubu olan HSP' ler, çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlerin bozulmasından ya da stresinden kaynaklanır (248).

ABS' nin uygulandığı MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, C grubundakine kıyasla; HSP90B1 ısı şok proteini 90 beta üyesi olarak da bilinen endoplasmin ve HSPD1 60 kDa

ağırlığındaki ısı şok proteinlerinin miktarlarında Tablo 4.1.' de görüldüğü üzere azalma görülmüştür ve bu sonuç literatürdeki araştırma sonuçları ile uyuşmaktadır. HSP miktarlarındaki artışın, tümör gelişim aşamaları ve ilaca dirençli fenotip gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. HSP' ler kanser gelişiminde apoptoz gibi antikanser mekanizmaların baskılanmasına sebep olmaktadır ve aynı zamanda metastatik genlerin ekspresyonlarını hızlandırmaktadır(249). Bu nedenle, MCF-7 meme kanseri hücresi üzerinde ABS uygulaması sonrasında tespit edilen HSP miktarlarındaki azalma ABS' nin antikanser etkisini ortaya koyan bir sonuç olarak değerlendirilebilir.

5.1. Karakterize Edilen Proteinlerin Literatür Verileri ile Fonksiyonlarının Araştırılması ve Proteomik Analiz Sonuçlarının Yorumlanması

Elde edilen protein haritası ile birlikte ABS'nin spesifik yollarla hücre içerisinde gerçekleşen biyosüreçleri etkilediği gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 5.1). ABS ile MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki protein seviyelerinde farklılık yarattığı gözlemlenmiştir.

Endoplasmin (SSP No: 208, GN: HSP90B1)

Isı şok proteini 90 beta üyesi olarak bilinen bir gendir. ATP ailesine ait olan bu gen, proteinlerin işlev görmesi ve taşınmasında görevli olan moleküler şaperonları metabolize eden ve proteinlerin katlanması gibi görevleri olan proteinleri kodlamaktadır. Bu kodlanan protein, melanozomlar (pigment içeren organel) ve ER üzerinde yer almaktadır. Tümör oluşumu ile ilgili patojenik yani hastalığa yol açan durumlar ile ilişkilendirilen bir proteindir (246).

Grp94 olarak da bilinen bu proteinin kanserle ilişkisine dair çok sayıda araştırma yapılmıştır ve bunlardan özellikle meme kanseri ile ilişkili olanlardan birkaçı aşağıda sıralanmıştır:

Grp94 proteinlerin bir araya getirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Grp94 overekspresyonunun (bir genin diğerine göre daha çok okunması) tümör agresifliği ile ilgili olduğunu öne süren Calderon ve ark., birçok tümörde yüksek Grp94 seviyelerinin görüldüğünü belirtmişlerdir. Grp94 ekspresyonunun hipoksi (beden dokularında oksijen oranının azalması) sonucu, insan tümör hücre hatları MCF-7 meme kanseri ve HepG2

karaciğer kanserinde değişmediği, ancak; daha agresif bir kanser hücresi modeli olan MDA-MB-231 meme kanserinde, Grp94' ün kanser hücrelerinin istilacı kapasitesini azalttığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, Grp94 ifadesinin tümör saldırganlığı ile bağlantılı olduğu ve bu sebeple, Grp94' ü hedeflemenin, kemoterapi sonuçlarını iyileştirici ve tümör büyümesini önleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir (250).

Dejeans ve ark., daha çok tekrarlanan meme kanseri üzerine gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda, Grp94 ekspresyonu ile kanser saldırganlığı arasında bir ilişki olduğunu vurgulamıştır. Grp94' ün oksidatif strese ve bazı kemoterapötik ilaçlara dirençli bir hücre hattında yüksek oranda çoğalmaya sebep olduğu ve ayrıca, tekrarlayan meme kanserlerinde Grp94 ekspresyonunun arttığı ortaya konmuştur. Grp94' ü aşılama stratejisiyle hedefleme ile beraber radyoterapi ile birleştirdiğinde kanser metastazının baskılandığı ve Grp94' ün kanserin tekrarını önlemek için önemli olabileceği, böylece yeni tedavi seçenekleri oluşturabileceği sonucuna ulaşılmıştır (251).

60 kDa Isı Şok Proteini (SSP No: 1901, GN: HSPD1)

60 kDa ısı şoku proteini, mitokondriyal; protein transferi ve HSP10 ile birlikte, transfer edilen proteinlerin doğru katlanmasından sorumludur. Yanlış katlanmayı önler ve mitokondriyal matristeki stres koşulları altında üretilen katlanmış polipeptidlerin yeniden katlanmasını ve uygun şekilde birleştirilmesini teşvik eder (252).

Bu gen ve meme kanseri ile ilgili araştırmalar gerçekleştirilmiş olsa da direkt kanserle ilişkisi olduğuna dair literatürde bir bilgiye ulaşılamamış olup bu konuda daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamındaki analiz sonuçlarına dayanarak ABS' nin uygulanmasıyla azalan bu proteinin baskılanması ya da inhibisyonu ile ABS' nin antikanser etki mekanizmasının, protein sentezini ve modifikasyonunu bozarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

ATP Sentaz Beta Alt Birimi (SSP No: 3603, GN: ATP5B)

ATP sentaz alt birimi beta, mitokondriyal; mitokondriyal membran ATP sentaz (F (1) F (0) ATP sentaz veya kompleks V), solunum zincirinin elektron taşıma kompleksleri

tarafından üretilen membran boyunca bir proton gradyanı varlığında ADP'den ATP üretir (253).

ATP5B ile ilgili meme kanserine dair yapılan bir çalışmada, 101 meme kanseri ve 13 çözülmemiş meme örneği, protein ekspresyonundaki kantitatif farklılıklar açısından incelenmiştir. β -F1-ATPaz olarak da adlandırılan ATP5B' nin ekspresyon seviyesinin kötü prognozu olan bir meme kanseri hasta alt grubunda tanımlanmış ve önemli bir prognostik belirteç olduğu öne sürülmüştür (254).

Meme kanseri dışında da ATP5B ile birçok kanser türü ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir (255-257).

Transisyonel Endoplazmik Retikulum ATPaz (SSP No: 3606, GN: VCP)

Transisyonel endoplazmik retikulum ATPaz, valosin içeren proteinler (VCP) grubundan bir enzimdir ve VCP geni tarafından kodlanır.

Mitoz sırasında golgi yığınlarının parçalanması ve mitozdan sonra yeniden biraraya getirilmesi için gereklidir. Transisyonel endoplazmik retikulumunun (tER) oluşumunda rol alır. Arsenit kaynaklı tepkilerde stres granüllerinin (SG'ler) temizlenmesi işleminin düzenlenmesinde rol oynar ve protein katlanmasında görevlidir.

Yamamoto ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; VCP proteinlerinin, mide kanseri sonrasında yapılan ameliyatların ardından yüksek miktarda bulunmasının ölüm oranındaki artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (258).

Ayrıca birçok kanser hücresinde bu gen ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (259-261).

Selenyum Bağlayıcı Protein (SSP No: 4905, GN: SELENBP1)

Bağırsak bakterileri tarafından önemli miktarlarda üretildiği bilinen bir organosülfür bileşiği olan metaniol oksidasyonunu katalizler. Sitoplazmada reaktif ksenobiyotiklerin algılanmasında rol alabilen selenyum bağlayıcı protein, golgi içi protein taşınmasında rol oynar (262).

Bu gen selenyum bağlayıcı protein ailesinin bir üyesini kodlar. Selenyum, güçlü antikarsinogenik özellikler gösteren temel bir besindir ve selenyum eksikliği bazı nörolojik

hastalıklara neden olabilir. Selenyumun kanser ve nörolojik hastalıkların önlenmesindeki etkilerine selenyum bağlayıcı proteinler aracılık edebilir ve bu genin azalmış ekspresyonu birkaç kanser türüyle ilişkilendirilebilir. Kodlanmış protein ubiquitin/de-ubikuitin aracılı protein parçalanmasında selenyum rol oynayabilir (263).

Raucci ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada, ilk kez hepatokarsinomlu hastaların karaciğer dokularında SELENBP1 ekspresyonunun azaldığını ortaya koymuşlardır (264).

Meme ve yumurtalık kanserinde bu gen ile ilgili çalışmalar yapılmış olup SELENBP1 ekspresyonu ile kanser arasında genellikle hastalıkta ekspresyonun azalması şeklinde bir ilişki olduğu düşünülmektedir (265, 266).

Protein Disülfid - İzomeraz A6 (SSP No:7704, GN: PDIA6)

Yanlış katlanmış proteinlerin toplanmasını önleyen bir şaperon olarak görev görür (267).

Bu gen, protein katlanmasını ve tiyol-disülfür değişim reaksiyonlarını katalize eden ER proteinlerinin disülfid izomeraz (PDI) ailesinin bir üyesini kodlar ve yanlış katlanmış proteinlerin toplanmasını inhibe eder (268).

Son zamanlarda, PDIA6' nın farklı kanser türlerinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır (269, 270).

Bu tez çalışmasında ABS' nin uygulanmış olduğu MCF-7 meme kanseri hücresinde C grubunda bu protein tespit edilmesine rağmen T grubunda gözlenememiştir.

Varsayılan (Putative) 40S Ribozomal Protein S10-benzeri (SSP No: 1209, GN: RPS10P5)

Bu tez çalışmasında, ABS uygulandıktan sonra artış gösteren tek proteindir.

Bir psödogen olarak bilinen RPS10P5, ribozomun yapısal bileşeni ve ribozomal küçük alt ünite düzeneği olarak görev yapan bir protein olarak tanımlanmaktadır (271).

Psödogenler, gen benzeri olan fakat genlerden farklı olarak fonksiyonel ürününü kodlayamayan, sahte gen bölgeleridir. İnsan genomu, yaklaşık olarak 20.000 psödogen içermektedir.

Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalara göre, herhangi bir görevi olmadığı düşünülen psödogenlerin bazı görevlerinin olduğu ve bazılarının ise kısa peptid ve protein üretebildiği gösterilmiştir. mRNA stabilitesini ve gen ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir. Psödogenlerin mikroRNA tuzakları ile tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerin düzenlenmesinde görev aldıkları bildirilmiştir (272).

Sonuç olarak ise bu genlerin "sahte" ismini hak etmediğini, moleküler çalışmalar ile bu genlerin hücrede gen ekspresyonunda önemli rol oynadığı tespit edilmiştir.

Eksprese olarak protein üretme yeteneğine sahip 43 kDa olan bir psödogen olarak bilinen proteinin, tümör hücrelerinde hücre büyümesini durdurduğu görülmüştür (273).

Genellikle kanserli hücrelerde biyomarker olarak kullanılan RPS10P5 geninin ABS uygulandıktan sonra artmış olması, ABS' nin antikanser etki mekanizmasını MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bu şekilde gösterdiğine bir işaret olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğma, büyüme, olgunlaşma ve ölümle son bulan olaylar bütünü olarak tanımlanan hayatta, yaşamı olumsuz şekilde etkileyen ve hatta ölümle sonuçlanan birçok faktör bulunmaktadır. Bunların en önemlilerinden birisi kanserdir ve yüksek mortaliteye sahip bir hastalıktır.

Kanser, DNA' nın hasarı ile hücrelerin, kontrolsüz veya anormal şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Kanser, günümüzde insanları gerek sosyal gerekse ekonomik anlamda çok etkileyen ölümcül hastalıkların başında gelmektedir.

Günümüzde kanser tedavilerinin oldukça kısıtlı olması sebebiyle kanserin önlenmesi, erken tanı ve tedavisine yönelik araştırmaların yapıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalar yoğun bir şekilde de devam etmektedir. Yapılan bu çalışmalarda daha çok hücre büyümesi, bölünmesi ve ölümü üzerine etkili ilaçlar, beslenme alışkanlıkları, stres, cinsiyet, ultraviyole ışınlar, bitkisel ekstratlar gibi faktörlerin etkileri *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda araştırılmaktadır.

Kanser hastalığının tedavisi için alternatif tedavi yolları bulmaya ve ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Şu anda kullanılan kemoterapötiklerin hedef organ ve doku dışında, çok sayıda organı olumsuz etkilediği de göz önüne alındığında bu yönde yapılan çalışmaların ne kadar önemli olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar; hücrede serbest radikallerin artmasına neden olmakta, hücre ölümünü tetiklemekte ve hedef hücrelerde daha fazla DNA hasarının ve mutasyonun oluşmasına neden olmaktadır. Buna göre antikanserojen özellik taşıyan bitkilerin ilaçlar ile kombine kullanımının önemi ortaya çıkmaktadır.

Kanser sonucunda oluşan tümörlerin hücrelerde meydana getirdiği değişiklikleri ve kanserin oluşum mekanizmalarını moleküler düzeyde incelemek için omiks analizler ve omiks analizlerin bir dalı olan proteomik çalışmalar yapılmaktadır. Kanserinin etki mekanizması ve yeni ilaçlar ile tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi, aynı zamanda kanser hastalığında çok büyük önem taşıyan erken teşhiste proteomik çalışmalar çok büyük önem arz etmektedir.

İki farklı koşul altında toplam protein ifadesinin veya ekspresyonuna ait nitel ve nicel analizlerin yapıldığı kıyaslamalı proteomik, bir hastalık durumunda değişime uğrayan

proteinlerin belirlendiği veya bir ilaç ya da kimyasal uygulanması durumunda etkilenen proteinlerin incelendiği çalışmaları kapsamaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, ABS' nin bilinen hemostatik ve antioksidan etkisinin yanısıra meme kanserinde muhtemel antikanser aktivitesini moleküler düzeyde açıklamaktır. Bu amaçla gerçekleştirilen kıyaslamalı proteomik çalışmalarda, 2D jel elektroforez yöntemi kullanılarak iki boyutlu bir ayırım gerçekleştirilmiştir. 1. boyutta, pI' larına göre IPG şeritler üzerinde ayrılan proteinler, 2. boyutta SDS-PAGE tekniği ile molekül ağırlıklarına göre ayrılmıştır. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında C ve T gruplarına ait farklılaştığı tespit edilen proteinler, MALDI-TOF/TOF-MS kullanılarak tanımlanmış ve MASCOT ve De Novo dizilimi gibi veri bankaları kullanılarak proteinlerin yapıları, fonksiyonları ve birbirleriyle etkileşimleri incelenmiştir. String ve KEGG veri tabanı kullanılarak ABS' nin, kanser hücrelerinde etkilediği biyolojik süreçler ve yollar tespit edilmiştir. ABS' nin antikanser aktivitesini proteom düzeyinde açıklamak amacıyla analiz sonucu farklılaştığı bulunan proteinler kaynaklardaki çalışmalarla karşılaştırılmıştır.

Günümüze kadar yayınlanan çalışmalar incelendiğinde, bu tez çalışmasında kullanılan bitkilerin karışımından oluşan ekstrenin yani ABS' nin antikanser etkisini, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde proteomik düzeyde araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, MCF-7 hücre hattında, ABS' nin etkisini, moleküler düzeyde proteomik çalışmalarla (2D jel elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS) ortaya koyan ilk çalışmadır. Çalışmada ABS tarafından % 90 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı olan ve nicel olarak en az 2 kat değişen 7 tane protein analiz edilmiştir (Bkz. Tablo 5.2.).

ABS uygulanması ile azalan ve artan proteinlerin, farklı yollarla birbirine bağlı olduğu gözlenmektedir (Bkz. Şekil 5.2 - 5.5.) ve bu veriler, ABS' nin antikanser etki mekanizmasının spesifik yollar üzerinden gerçekleşmiş olabileceğini işaret etmektedir. Bu yolların aynı zamanda hücrelerin içerisinde gerçekleşen biyolojik süreçleri etkilediği görülmüştür.

MCF-7 meme kanseri hücre hattının hormonal kaynaklı olmasından dolayı hücre kültürü çalışmaları sonucunda, ABS' nin hücreleri çok fazla tahrip etmediği gözlenmesine rağmen; kanserle ilişkili proteinler ortaya konmuştur. Elde edilen proteinlerin daha çok ER stresine bağlı olarak meme kanseri hücrelerini etkilediği görülürken daha agresif bir meme

kanseri hücre hattı kullanılarak da ABS' nin bu kanser türü üzerindeki etkilerinin daha ayrıntılı gözlenebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın devamında MCF-7 kanser hücrelerine ABS uygulanarak; genomik, metabolomik ve transkriptomik gibi farklı omik tekniklerle ABS' nin meme kanseri üzerindeki etkisi, moleküler düzeyde bir bütün olarak değerlendirilebilir. Bu omik teknikler kullanılarak ulaşılan sonuçların değerlendirilmesiyle ABS' nin antikanser aktivitesinin, hangi metabolik yolları etkileyerek ortaya çıktığı konusunda araştırmalar gerçekleştirilebilir. Yapılacak bu kapsamlı omiks çalışmalarla ABS' nin etkilediği önemli kanser biyobelirteçlerinin belirlenebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmaya göre elde edilen bulgular ışığında, ABS' nin meme kanseri hücrelerinde antiproliferatif etkisinin olduğu bulunmuştur. ABS'nin ER protein işleme, RNA bozunma, östrojen sinyal ve kanser yolları üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. ABS' nin kanser hastalıklarında alternatif bir tedavi olarak sunulabilmesi için sağlıklı meme hücreleriyle de araştırma ve çalışmalar yapılmalı ve ABS' nin herhangi bir yan etkisinin olup olmadığı tespit edilmelidir.

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültürü ve proteomik analizler sonucunda, ABS uygulanmasıyla nicel anlamda farklılaşan proteinler saptanmıştır. Belirlenen bu proteinlerin analizleri; Western Blot, eş zamanlı (real time) PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemleri kullanılarak da yapılabilir ve gen düzeyinde de bu protein miktarlarının değişip değişmediği tekrar kanıtlanabilir.

ABS' nin daha büyük ve farklı organizmalar üzerinde de aynı biyolojik yollarda ve moleküler fonksiyonlarda yer alıp almayacağı, aynı etkiyi gösterip göstermeyeceği araştırılmalıdır. Bu sebeple ABS' nin antikanser etkisini deney hayvanları üzerinde de araştırmak için *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

ABS' nin sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığı tavşanlar üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (274). Toksik olmaması sebebiyle ABS' nin oral yolla alınarak da alternatif bir tedavi sunabileceği düşünülmektedir. Bunun için gerekli ek çalışmaların gerçekleştirilip ABS' nin oral yoldan kullanımı sağlanabilir. Yapılacak ek çalışmalar sonucunda herhangi bir toksik etkisi bulunmadığı kanıtlanacak olan ABS' nin farklı dozaj formlarında üretilerek alternatif bir ürün olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

ABS' nin sağlıklı hücreler üzerindeki yara iyileştirici etkisinin olduğu yapılan deneysel çalışmalarla ortaya konmuş olsa da sağlıklı hücreler üzerinde ABS' nin etkisi daha ayrıntılı olarak araştırılmalıdır (275).

Ayrıca, ABS' nin gastrointestinal sistemde bozunma ihtimalinin de olabileceği göz önünde tutulmalıdır. Alternatif bir ürün olarak kullanılabilmesi için ilaç taşıyıcı sistemlerle hedefe taşınması sağlanabilir; bu sebeple doku hedefli ABS ilaç taşıyıcı formları geliştirilebilir. ABS içeren ve geliştirilecek olan bu taşıyıcı sistemlerin sağlıklı ve hasta grubu hücre/dokulardaki etkileri *in vivo* ve *in vitro* deneylerle araştırılmalıdır.

Daha önce yapılan bir çalışmada, ABS' nin klinikte kullanılan belirli kemoteröpatik ilaçlarla kombinasyonlarının hücre canlılığını daha fazla azalttığı ve bazı genlerdeki etkiyi arttırdığı göz önüne alınarak (173); kanser araştırmalarında, kullanılan kemoterapötik ilaçların toksik etkilerini minimuma indirmek ve daha etkin bir tedavi alternatifi bulabilmek amaçlanmaktadır. Kanserli hastaların tedavi sürecinde yaşadığı sorunlar ve ilaçların yarattığı yan etkiler nedeni ile antioksidan ve antikanserojen etkili yeni ilaçların geliştirilerek kullanılması oldukça önemlidir. Günümüzde yapılan çalışmalarda çeşitli kanser tiplerine karşı bitkisel kaynaklı ilaçların antikanser etkileri araştırılmaktadır.

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular ile farklı bir endikasyonda yani hemostatik ajan olarak kullanılan ABS' nin alternatif ve destekleyici bir tedavide kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak; kemoterapötik ilaçlarla birlikte ABS kullanımına yönelik tüm omik analizler yapılmalı ve elde edilen sonuçlara göre bu ilaçlarla birlikte ABS' nin kullanılmasının bir sinerjik etki oluşturup oluşturmayacağı araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Watson JD ve Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid DNA. *Nature*. 1953; 171(4356):737-8.
2. Jou WM, Haegeman G, Ysebaert M, Fiers WJN. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature*. 1972;237(5350):82.
3. Başaran E, Aras S, Cansaran-Duman D. Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Türk Hijyen ve Besinsel Biyoloji Dergisi*. 2010;67(2):85-96.
4. Kurban S, Mehmetoğlu İ. Proteomik. *Yeni Tıp Dergisi*. 2010;27:70-5.
5. Pearson, H. What is a gene? *Nature*. 2006;441(7092):398-401.
6. Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, ve ark. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007;104(49):19428-33.
7. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):193.
8. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405(6788):837.
9. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998;19(11):1853-61.
10. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez J-C, ve ark. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (NY)*. 1996;14(1):61.
11. Horgan RP, Kenny LC. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2011;13(3):189-95.
12. Levitsky DO, Dembitsky VM. Anti-breast Cancer Agents Derived from Plants. *Natural Products & Bioprospecting*. 2015;5(1):1-16.
13. Tagne RS, Telefo BP, Nyemb JN, Yemele DM, Njina SN, Goka SMC ve ark. Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014;7:S442-S7.
14. Robert A, Kyle MD, David P, Steensma MD. Jöns Jacob Berzelius e A Father of Chemistry. *Mayo Clinic Proceedings*. 2018; 93(5):e53-e54.
15. What Are Proteins Made Of? [Internet]. 2014 [Erişim Tarihi: 1 Temmuz 2019]. Erişim Adresi: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/122996920>.
16. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson AD, Lewis J, Raff M ve ark. *Essential cell biology*. Norton: Garland Science; 2013.
17. Robert KM, Daryl K, Peter A, Victor WJ. *Harper's illustrated biochemistry*. 26 edition. New York: McGraw-Hill Medical; 2003.
18. Biomolecules: Proteins [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://thenorashikinrahim-biochemistry.weebly.com/biomolecules.html>.

19. Rettner, R. ve Writer, S. DNA: Definition, Structure & Discovery [Internet]. 2017 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.livescience.com/37247-dna.html>.
20. Fields S. Proteomics in genomeland. *Science*. 2001;291(5507):1221-4.
21. Limmroth, V. Making Sense of Genetic Manipulation In Humans Results of Oligonucleotide Trials [Internet]. 2014 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://multiple-sclerosis-research.org/2014/09/making-sense-of-genetic-manipulation-in-humans-results-of-oligonucleotide-trials/>.
22. Öztürk, M. İnsan Genom Projesi ve Eczacılık Alanına Etkileri. *TEB Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*. 2002; 3(4): 63-6.
23. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR ve ark. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 1995;16(1):1090-4.
24. Del Boccio P, Urbani A. Homo sapiens proteomics: clinical perspectives. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*. 2005;41(4):479-82.
25. Bauer A, Kuster B. Affinity purification-mass spectrometry: Powerful tools for the characterization of protein complexes. *European Journal of Biochemistry*. 2003;270(4):570-8.
26. Patricelli MP. Activity-based probes for functional proteomics. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2002;1(2):151-8.
27. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Molecular Cancer Research*. 2007;6(1):25.
28. Pierce JD, Fakhari M, Works KV, Pierce JT, Clancy RL. Understanding proteomics. *Nursing & Health Sciences*. 2007;9(1):54-60.
29. Mishra NC. Introduction to proteomics: principles and applications. 1 edition. United States: Wiley; 2010.
30. Huang S. Rational drug discovery: what can we learn from regulatory networks? *Drug Discovery Today*. 2002;7(20):s163-s9.
31. Horowitz N. One-gene-one-enzyme: Remembering biochemical genetics. *Protein Science*. 1995; 4:1017-9.
32. Davis RH. Beadle's progeny: Innocence rewarded, innocence lost. *Journal of Biosciences*. 2007;32(2):197-205.
33. Yanofsky C, Drapeau GR, Guest JR, Carlton BC. The complete amino acid sequence of the tryptophan synthetase A protein (α subunit) and its colinear relationship with the genetic map of the A gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 1967;57(2):296.
34. Venter JC. A Part of the Human Genome Sequence. *Science*. 2003;299(5610):1183-4.
35. Lalueza-Fox C. The Neandertal Genome Project; towards a genetic definition of the human species. *Fosiles Y Moléculas: Aproximaciones a La Historia Evolutiva De Homo Sapiens*. 2010;8:69-78.
36. Tamminga CA. The human genome sequence. *American Journal of Psychiatry*. 2001;158(3):370.
37. Zichi D, Eaton B, Singer B, Gold L. Proteomics and diagnostics: Let's get specific, again. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2008;12(1):78-85.

38. Wilkins MR, Appel RD, Williams KL, Hochstrasser DF. Proteome research: concepts, technology and application: Springer Science & Business Media; 2008.
39. Cullen P, Funke H. Implications of the human genome project for the identification of genetic risk of coronary heart disease and its prevention in children. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2001;11:45-51.
40. Minden J. Comparative proteomics and difference gel electrophoresis. *Biotechniques*. 2007;43(6):739-45.
41. Renfrey S, Featherstone J. Structural proteomics. Nature Publishing Group. 2002;1:175-6.
42. Bíliková K, Mirgorodskaya E, Bukovská G, Gobom J, Lehrach H, Šimúth J. Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2. *Proteomics*. 2009;9(8):2131-8.
43. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek M-C, Yates JR. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews*. 2013;113(4):2343-94.
44. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, ve ark. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*. 1999;17(7):676.
45. Wu C, Tran JC, Zamdborg L, Durbin KR, Li M, Ahlf DR, ve ark. A protease for 'middle-down' proteomics. *Nature Methods*. 2012;9(8):822.
46. Taouatas N, Drugan MM, Heck AJ, Mohammed S. Straightforward ladder sequencing of peptides using a Lys-N metalloendopeptidase. *Nature Methods*. 2008;5(5):405.
47. Tran JC, Zamdborg L, Ahlf DR, Lee JE, Catherman AD, Durbin KR, ve ark. Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature*. 2011;480(7376):254.
48. Ong S-E, Pandey A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomolecular engineering*. 2001;18(5):195-205.
49. Issaq HJ. The role of separation science in proteomics research. *Electrophoresis*. 2001;22(17):3629-38.
50. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong CJ. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics*. 2010;73(11):2064-77.
51. Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJJ. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1994;28(3):239-42.
52. Lescuyer P, Hochstrasser DF, Sanchez JC. Comprehensive proteome analysis by chromatographic protein prefractionation. *Electrophoresis*. 2004;25(7-8):1125-35.
53. Telman Ç. Kapiler Elektroferezin İlaç Analizlerine Uygulanması. Kayseri: Erciyes Üniversitesi; 2017.
54. Çelebier M. HT29 ve K562 Kanser Hücrelerinde Protein ve Metabolitlerin Analizi İçin Çeşitli Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi [Doktora Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2013.

55. Gault VA, McClenaghan NH. Understanding bioanalytical chemistry: principles and applications: John Wiley & Sons; 2013.
56. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680.
57. Gronow M, Griffiths G. Rapid isolation and separation of the non-histone proteins of rat liver nuclei. *FEBS Letters*. 1971;15(5):340-4.
58. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1975;250(10):4007-21.
59. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik*. 1975;26(3):231-43.
60. Klein E, Klein JB, Thongboonkerd V. Two-dimensional gel electrophoresis: a fundamental tool for expression proteomics studies. *Contributions to Nephrology*. 141: Karger Publishers; 2004; 25-39.
61. Ek K, Bjellqvist B, Righetti PG. Preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients. I. General principles and methodology. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1983;8(2):135-55.
62. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R ve ark. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000;21(6):1037-53.
63. Görg A, Postel W, Günther SJE. Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1988;9(9):531-46.
64. Cell Disruption by Homogenization [Internet]. 2008 [Erişim Tarihi 4 Ocak 2019]. Erişim adresi: http://www.apv.com/pdf/catalogs/Cell_Disruption_by_Homogenization_3006_01_06_2008_US.pdf.
65. Westermeier R, Naven T. Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis: Wiley-VCH Verlag; 2002.
66. Taylor RC, Coorssen JR. Proteome resolution by two-dimensional gel electrophoresis varies with the commercial source of IPG strips. *Journal of Proteome Research*. 2006;5(11):2919-27.
67. Ticari IPG Şeritler [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <http://www.bio-rad.com/de-at/product/readystrip-ipg-strips?ID=56994cbe-ea1b-48d8-b7e9-bc17726c0d70>.
68. Suchkov S, Nikol'skaia I, Debov S. Isoelectric focusing of DNA-methylases from *Shigella sonnei* 47. *Voprosy meditsinskoï khimii*. 1983;29(4):117-22.
69. Raymond S, Weintraub LJS. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*. 1959;130(3377):711-.
70. Jel Elektroforezi SDS-PAGE [Internet]. 2014 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.slideserve.com/isla/jel-elektroforez-sds-page>.
71. Introduction to Practical Biochemistry [Internet]. 2015 [Erişim Tarihi 18 Nisan 2019]. Erişim adresi: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch07s03.html>.

72. Harris LR, Churchward MA, Butt RH, Coorsen JR. Assessing detection methods for gel-based proteomic analyses. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(4):1418-25.
73. Miller I, Crawford J, Gianazza EJP. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics*. 2006;6(20):5385-408.
74. Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo EJBIFG. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in Functional Genomics*. 2006;4(4):295-320.
75. Biberoglu G. Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2003;23(6):491-8.
76. Matsudaira P. Sequence from picomole Quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *Journal of Biological Chemistry. Mass Spectrometry Reviews*. 1987;262(21):10035-8.
77. Lifshitz C. Basic aspects and principles of mass spectrometry applied to biomolecules. *Mass spectrometry reviews*. 2003;22(3):157.
78. Mass Spectrometry Process [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <http://chemicalinstrumentation.weebly.com/mass-spectrometry.html>.
79. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Instrumental analysis: Brooks/Cole*, Cengage Learning Belmont; 2007.
80. El-Aneed A, Cohen A, Banoub J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2009;44(3):210-30.
81. Gross JH. *Mass spectrometry: a textbook: Springer Science & Business Media*; 2006.
82. Korkmaz A. Çoklu İlaç Karışımlarında Etken Maddelerin Kantitatif Tayinleri İçin Metod Geliştirme [Yüksek Lisans Tezi]. Sakarya: Sakarya Üniversitesi; 2006.
83. Ranković M. Photon and electron action spectroscopy of trapped biomolecular ions - From isolated to nanosolvated species [Doktora Tezi]. Belgrade: University of Belgrade; 2016.
84. Aitken A. Identification of posttranslational modification by mass spectrometry. *The Proteomics Protocols Handbook: Springer*; 2005. p. 431-7.
85. Hoffman ED, Stroobant VJ, Sons B, Belgica. *Mass spectrometry: principles and applications*. 2007;1(2):85.
86. Beavis RC, Chait BT, Standing K. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1989;3(12):436-9.
87. Garcia BA, Heaney PJ, Tang K. Improvement of the MALDI-TOF analysis of DNA with thin-layer matrix preparation. *Analytical Chemistry*. 2002;74(9):2083-91.
88. MALDI-TOF Mass Spectrometry [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>.
89. Wambua DM. *Mass spectrometric methods and bioinformatics tools for accurate identification of microRNA biomarkers: The University of North Carolina at Greensboro*; 2012.
90. Matthiesen R. *Mass spectrometry data analysis in proteomics: Springer*; 2007.

91. Berndt P, Hobohm U, Langen H. Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints. *Electrophoresis*. 1999;20(18):3521-6.
92. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell J. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999;20(18):3551-67.
93. Eriksson J, Chait BT, Fenyö D. A Statistical basis for testing the significance of mass spectrometric protein identification results. *Analytical chemistry*. 2000;72(5):999-1005.
94. Jensen ON, Podtelejnikov AV, Mann M. Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching. *Analytical chemistry*. 1997;69(23):4741-50.
95. Vékey K, Telekes A, Vertes A. *Medical applications of mass spectrometry*: Elsevier; 2011.
96. Peptide Sequence Fragmentation Modelling [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <http://www.alchemistmatt.com/mwthelp/peptidefragmodelling.htm>.
97. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry*. 1984;11(11):601.
98. Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomedical & environmental mass spectrometry*. 1988;16(1-12):99-111.
99. De Novo Peptide Sequencing [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <http://www.bioinform.com/de-novo-sequencing/>.
100. Keller A, Shteynberg D. Software pipeline and data analysis for MS/MS proteomics: the trans-proteomic pipeline. *Bioinformatics for Comparative Proteomics*: Springer; 2011. p. 169-89.
101. Vizcaíno JA, Cote R, Reisinger F, Barsnes H, Foster JM, Rameseder J ve ark. The proteomics identifications database: 2010 update. *Nucleic acids research*. 2009;38(suppl_1):D736-D42.
102. Keller A, Purvine S, Nesvizhskii AI, Stolyar S, Goodlett DR, Kolker E. Experimental protein mixture for validating tandem mass spectral analysis. *Omics : A Journal of Integrative Biology*. 2002;6(2):207-12.
103. Salyers AA, Whitt DD, Whitt DD. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*: ASM press Washington, DC; 1994.
104. Cotran S, Kumar C, Collins T, Robbins W. *Pathologic Basis of Disease*. ed. Philadelphia: Saunders Co; 1999.
105. Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *British medical journal (Clinical research ed.)*. 2001;322(7301):1528-32.
106. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*. 1993;75(4):641-52.
107. Yılmaz E, Altunok V. Kanser ve p53 geni. *Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2011;1:19-23.
108. Chaffer CL, Weinberg RA. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*. 2011; 331(6024):1559-1564.

109. Aslan G. Tümör İmmünolojisi. *Turkish Journal of Immunology*. 2010;15:1.
110. Erman Y. Erkek ve Kadınların Diyet-Kanser İlişkisi Hakkında Bilgi ve İnanışları [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2007.
111. Kutluk T. Kanser konusunda genel bilgiler: TC Sağlık Bak. Kanser Savaş Daire Bşk. Türk Kanser Arş. ve Savaş Kurumu; 1996.
112. Shruthi BS, Palani Vinodhkumar S. Proteomics: A new perspective for cancer. *Advanced Biomedical Research*. 2016;5.
113. Hanash S, Taguchi A. Application of proteomics to cancer early detection. *Cancer Journal*. 2011;17(6):423.
114. Tan W, Lu J, Huang M, Li Y, Chen M, Wu G ve ark. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chinese medicine*. 2011;6(1):27.
115. Böttcher T, Pitscheider M, Sieber SA. Natural products and their biological targets: proteomic and metabolomic labeling strategies. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 2010;49(15):2680-98.
116. Qiu J, Madoz-Gurpide J, Misek DE, Kuick R, Brenner DE, Michailidis G ve ark. Development of natural protein microarrays for diagnosing cancer based on an antibody response to tumor antigens. *Journal of Proteome Research*. 2004;3(2): 261-7.
117. Piggott AM, Karuso P. Quality, not Quantity: the role of natural products and chemical proteomics in modern drug discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2004;7(7):607-30.
118. Rochfort SJ. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of Natural Products*. 2005;68(12):1813-20.
119. Kim HK, Wilson EG, Choi YH, Verpoorte R. Metabolomics: a tool for anticancer lead-finding from natural products. *Planta Medica*. 2010;76(11):1094-102.
120. Yuliana ND, Khatib A, Choi YH, Verpoorte R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy research : PTR*. 2011;25(2):157-69.
121. Baskin Y, Yigitbasi T. Clinical proteomics of breast cancer. *Current Genomics*. 2010;11(7):528-36.
122. Celis JE, Gromov P. Proteomics in translational cancer research: toward an integrated approach. *Cancer Cell*. 2003;3(1):9-15.
123. Massion PP, Caprioli RM. Proteomic strategies for the characterization and the early detection of lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2006;1(9):1027-39.
124. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C ve ark. GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11. 2013. 2014.
125. Eser S. Türkiye'de yaşam boyu kanser olma yığılımlı riskleri. *Turkish Journal of Public Health*. 2015;13(2):87-96.
126. Koçak S, Çelik L, Özbaş S, Sak SD, Tükün A, Yalçın B. Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi ve Prevansiyon İstanbul 2010 Konsensus Raporu, İstanbul: The Journal of Breast Health; 2011;7(2):47-67.

127. Çakır S, Kafadar MT, Arslan ŞN, Türkan A, Kara B, İnan A. Meme kanseri tanısı konmuş kadınlarda risk faktörlerinin güncel veriler ışığında gözden geçirilmesi. FNG & Bilim Tıp Dergisi. 2016;2(3):186-94.
128. Vogel VG. Assessing risk of breast cancer: Tools for evaluating a patient's 5-year and lifetime probabilities. Journal Postgraduate medicine. 1999;105(6):49-58.
129. Beji N, Reis N. Risk factors for breast cancer in Turkish women: a hospital-based case-control study. European Journal of Cancer Care. 2007;16(2):178-84.
130. Yılmaz M, Seki Z, Gürler H, Çiççi ES. Bir Üniversitede Çalışan Kadınların Meme Kanseri Risk Faktörleri Yönünden İncelenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi. 2010; 3(2),65-71.
131. Aşık F. Meme Kanseri Metastazları İle ADAMTS-9 Proteaz Geninin Promotor Bölgesindeki CA Tekrar Dizileri Arasındaki İlişki [Uzmanlık Tezi]. Ankara: Fatih Üniversitesi; 2011.
132. Martin A-M, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. Journal of the National Cancer Institute. 2000;92(14):1126-35.
133. Russo J, Lareef MH, Balogh G, Guo S, Russo IH. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2003;87(1):1-25.
134. Tüzüner MB. Duktal Meme Kanseri Olgularında CYP17A1 Ve CYP19A1 Gen Bölgelerinin Ekspresyonlarının ve Aromataz Aktivitelerinin İncelenmesi [Doktora Tezi]: İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi; 2017.
135. Selçuk İ, Özel Ş, Güngör T, Engin-Üstün Y. Over Kanseri Perspektifinde BRCA Gen Mutasyonları ve Herediter Meme ve Over Kanseri Sendromu. Jinekoloji - Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi. 2018;15(3).
136. Arvas M, Gezer A. Ailevi Over Kanseri, BRCA Genleri ve Over Kanseri Tarama Programları. Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi. 2004;7(2):53-8.
137. Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N ve ark. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. The New England Journal of Medicine. 2017;377(6):523-33.
138. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K-A, Mooij TM, Roos-Blom M-J ve ark. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Journal of the American Medical Association. 2017;317(23):2402-16.
139. Parlar S, Kaydul N, Ovayolu N. Meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesinin önemi. Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi. 2005;8(1):72-83.
140. Fagan DH, Fattig LM, Avdulov S, Beckwith H, Peterson MS, Ho Y-Y ve ark. Acquired tamoxifen resistance in MCF-7 breast cancer cells requires hyperactivation of eIF4F-mediated translation. Hormones & cancer. 2017;8(4):219-29.
141. MCF-7 Hücre Hattına Dair Genel Bilgiler [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx?geo_country=tr#characteristics M-hhEa.
142. MCF-7 Hücre Hattı [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx?geo_country=tr#characteristics M-hhEa.

143. Day ES, Morton JG, West JL. Nanoparticles for thermal cancer therapy. *Journal of biomechanical engineering*. 2009;131(7):074001.
144. Selwood K, Ward E, Gibson F. Assessment and management of nutritional challenges in children's cancer care: a survey of current practice in the United Kingdom. *European journal of oncology nursing: The Official Journal of European Oncology Nursing Society*. 2010;14(5):439-46.
145. Özenoğlu S, Aydoğdu G, Dinçsoy AB, Taghidizaj AA, Derici K, Yılmaz E, ve ark. Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2013;70(4):215-26.
146. Mork CN, Faller DV, Spanjaard RA. Loss of putative tumor suppressor E124/PIG8 confers resistance to etoposide. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 2007;581(28):5440-4.
147. Korkmaz S. Paklitaksel, Kersetin ve Berberinin, A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi [Doktora Tezi]. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi; 2002.
148. Lee K-H. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. *Journal of Biomedical Science*. 1999;6(4):236-50.
149. El-Shazly M, El-Zayat E, Hermersdörfer H. Insecticidal activity, mammalian cytotoxicity and mutagenicity of an ethanolic extract from *Nerium oleander* (Apocynaceae). *Annals of Applied Biology*. 2000;136(2):153-7.
150. Kitdamrongtham W, Manosroi A, Akazawa H, Gidado A, Stienrut P, Manosroi W, ve ark. Potent anti-cervical cancer activity: Synergistic effects of Thai medicinal plants in recipe N040 selected from the MANOSROI III database. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;149(1):288-96.
151. Ziech D, Anastopoulos I, Hanafi R, Voulgaridou GP, Franco R, Georgakilas AG, ve ark. Pleiotrophic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: the role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. *Cancer Letters*. 2012;327(1-2):16-25.
152. Aliyazicioglu R, Guven S, Mentese A, Kolayli S, Cengiz S, Deger O ve ark. Serum Anti-Carbonic Anhydrase II Antibodies and Oxidant-Antioxidant Balance in Pre-eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*. 2011;66(4):297-303.
153. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *The International Journal of Food Science & Technology*. 2001;36(7):703-25.
154. Dikmen M, Öztürk N, Öztürk Y. Nar meyve kabuğu ekstresinin MCF-7 hücre proliferasyonu üzerine sitotoksik ve inhibitör etkileri. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2008;37(3):179-90.
155. Aslantürk ÖS. Aydın yöresinde kullanılan bazı tıbbi bitkilerin antioksidant ve sitotoksik etkilerinin araştırılması [Doktora Tezi]. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi; 2013.
156. Karaca TD. İnsan Meme Kanseri Hücre Kültüründe *Nerium Oleander* Bitkisinden Elde Edilen Ekstraktların Antikanserojen Etkisinin İncelenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Sakarya: Sakarya Üniversitesi; 2008.

157. Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, ve ark. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009;53(5):600-8.
158. Saraç H, Daştan T, Demirbaş A, Daştan Sd, Karaköy T, Durukan H. Madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) Bitki Özütlerinin Besin Elementleri ve In Vitro Antikanserojen Aktiviteleri Yönünden Değerlendirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 1. Uluslararası Tarımsal Yapılar ve Sulama Kongresi Özel Sayısı. 2018: 340-347.
159. Leo L, Leone A, Longo C, Lombardi DA, Raimo F, Zacheo G, ve ark. Antioxidant compounds and antioxidant activity in “early potatoes”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(11):4154-63.
160. Xu B, Chang SK, Liu Z, Yuan S, Zou Y, Tan Y ve ark. Comparative studies on the chemical and cell-based antioxidant activities and antitumor cell proliferation properties of soy milk manufactured by conventional and commercial UHT methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(6):3558-66.
161. Gutiérrez-Urbe J, Romo-Lopez I, Serna-Saldívar S. Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its anatomical parts. *Journal of Functional Foods*. 2011;3(4):290-7.
162. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A ve ark. Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *International Journal of Molecular Medicine*. 2008;22(4):433-9.
163. He X, Liu RH. Phytochemicals of apple peels: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(21):9905-10.
164. Gulecha V, Sivakuma T. Anticancer activity of *Tephrosia purpurea* and *Ficus religiosa* using MCF 7 cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2011;4(7):526-9.
165. Fernandes I, Faria A, Azevedo J, Soares S, Calhau C, De Freitas V ve ark. Influence of anthocyanins, derivative pigments and other catechol and pyrogallol-type phenolics on breast cancer cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(6):3785-92.
166. Roleira FM, Tavares-da-Silva EJ, Varela CL, Costa SC, Silva T, Garrido J ve ark. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*. 2015;183:235-58.
167. Zschocke S, Rabe T, Taylor J, Jäger A, Van Staden J. Plant part substitution—a way to conserve endangered medicinal plants? *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;71(1-2):281-92.
168. Pereira J, Phan T. Management of bleeding in patients with advanced cancer. *The oncologist*. 2004;9(5):561-70.
169. Dutcher JP. Hematologic abnormalities in patients with nonhematologic malignancies. *Hematology/oncology clinics of North America*. 1987;1(2):281-99.
170. Hostanska K, Nisslein T, Freudenstein J, Reichling J, Saller R. *Cimicifuga racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative

human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004;84(2):151-60.

171. Einbond LS, Shimizu M, Xiao D, Nuntanakorn P, Lim JT, Suzui M ve ark. Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004;83(3):221-31.

172. Sharma G, Tyagi AK, Singh RP, Chan DC, Agarwal R. Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004;85(1): 1-12.

173. Fidan Ç. Ankaferd Bloodstopper Kanama Durdurucu'nun In Vitro Meme Kanseri Hücrelerinin Çoğalmaları Üzerine Olan Etkisi [Yüksek Lisans Tezi]. Edirne: Trakya Üniversitesi; 2017.

174. Gözüm S, Tezel A, Koc M. Complementary alternative treatments used by patients with cancer in eastern Turkey. *Cancer Nursing*. 2003;26(3):230-6.

175. Health WHODoM, Abuse S, Organization WH, health WhoDom, health saM, evidence, et al. *Mental health atlas 2005: World Health Organization*; 2005.

176. Behnia M, Haghghi A, Komeylizadeh H, Tabaei S-JS, Abadi A. Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on in vitro growth of *Entamoeba histolytica*. *The Korean Journal of Parasitology*. 2008;46(3):153.

177. Mauricio I, Francischetti B, Monteiro RQ, Guimarães J. Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;235(1):259-263.

178. Sheela M, Ramakrishna M, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *International Immunopharmacology*. 2006;6(3):494-8.

179. Goker H, Cetinkaya D, Kilic E, Haznedaroglu I, Kirazli S, Firat H ve ark. Anti-cancer activity of ankaferd blood stopper on osteosarcom (SAOS-2) cell lines in vitro. *Ankaferd: Scientific perspectives and basic-clinical data Istanbul, Naviga Publications*. 2008;109.

180. Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive constituents: an update. *Phytotherapy Research: PTR*. 2016;30(9):1392-403.

181. Srividya A, Dhanabal S, Misra V, Suja G. Antioxidant and antimicrobial activity of *Alpinia officinarum*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;72(1):145.

182. Wagner H, Willer F, Kreher B. Biologically active compounds from the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Planta Medica*. 1989;55(5):452-4.

183. Tahri A, Yamani S, Legssyer A, Aziz M, Mekhfi H, Bnouham M ve ark. Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;73(1-2): 95-100.

184. Testai L, Chericoni S, Calderone V, Nencioni G, Nieri P, Morelli I ve ark. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L.(Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002;81(1):105-9.

185. Ercetin S, Haznedaroglu IC, Mevlut K, Aktas A, Goker H, Ozdemir O ve ark. Safety and efficacy of Ankaferd Blood Stopper in dental surgery. *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*. 2010;28(4):001-5.
186. Huri E, Haznedaroglu IC, Akgul T, Astarci M, Ustun H, Germiyanoulu C. Biphasic effects of ankaferd blood stopper on renal tubular apoptosis in the rat partial nephrectomy model representing distinct levels of hemorrhage. *Saudi Medical Journal*. 2010;31(8):864-8.
187. Teker AM, Korkut AY, Gedikli O, Kahya V. Prospective, controlled clinical trial of Ankaferd Blood Stopper in children undergoing tonsillectomy. *International journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2009;73(12):1742-5.
188. Teker AM, Korkut AY, Kahya V, Gedikli O. Prospective, randomized, controlled clinical trial of Ankaferd Blood Stopper in patients with acute anterior epistaxis. *European archives of oto-rhino-laryngology: Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 2010;267(9):1377-81.
189. Kelles M, Kalcioğlu MT, Samdancı E, Selimoğlu E, İraz M, Mıman MC ve ark. Ankaferd Blood Stopper is more effective than adrenaline plus lidocaine and gelatin foam in the treatment of epistaxis in rabbits. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*. 2011;72(5):185-94.
190. İynen I, Bozkus F, San I, Alatas N. The hemostatic efficacy of Ankaferd Blood Stopper in adenoidectomy. *International journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2011;75(10):1292-5.
191. Kurt M, Disibeyaz S, Akdoğan M, Sasmaz N, Aksu S, Haznedaroglu İC. Endoscopic application of ankaferd blood stopper as a novel experimental treatment modality for upper gastrointestinal bleeding: a case report. *The American Journal of Gastroenterology*. 2008;103(8):2156.
192. İbis M, Kurt M, Onal İK, Haznedaroglu İC. Successful management of bleeding due to solitary rectal ulcer via topical application of Ankaferd blood stopper. *Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, N.Y.)*. 2008;14(9):1073-4.
193. Demiralp DÖ, Haznedaroglu İC, Akar N. Functional proteomic analysis of Ankaferd Blood Stopper. *Turkish journal of haematology: Official Journal of Turkish Society of Haematology*. 2010;27(2).
194. Fırat HC, Haznedaroglu İC. Kanıt ve Gelenek. *İstanbul: İmmun*; 2017.
195. Ozle M, Çankal DAU, İlhan M, Keleş H, Akkol EK. Evaluation of the chemopreventive effects of Ankaferd Bloodstopper in 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced oral epithelial dysplasia. *Clinical Oral Investigations*. 2018;22(9):3091-6.
196. Chen Y-I, Barkun AN, Soulellis C, Mayrand S, Ghali P. Use of the endoscopically applied hemostatic powder TC-325 in cancer-related upper GI hemorrhage: preliminary experience (with video). *Gastrointestinal Endoscopy*. 2012;75(6): 1278-81.
197. Patiroğlu T, Şahin NE, Ünal E, Kendirci M, Karakükcü M, Özdemir MA. Effectiveness of Ankaferd BloodStopper in prophylaxis and treatment of oral mucositis in childhood cancers evaluated with plasma citrulline levels. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*. 2018;35(1):85.

198. Uzun O, Ince O, Bakalov V, Tuna T. Massive hemoptysis due to welding fumes. *Respiratory Medicine Case Reports*. 2012;5:1-3.
199. Zulfikar OB, Emiroglu HH, Kebudi R. Nasogastric application of topical Ankaferd Blood Stopper for bleeding from primary esophageal adenocarcinoma in a child with disseminated intravascular coagulation. *Digestive and liver disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2011;43(3):247-8.
200. Turhan N, Kurt M, Shorbagi A, Akdogan M, Haznedaroglu IC. Topical Ankaferd Blood Stopper administration to bleeding gastrointestinal carcinomas decreases tumor vascularization. *The American Journal of Gastroenterology*. 2009;104(11):2874.
201. Turk S, Malkan UY, Ghasemi M, Hocaoglu H, Mutlu D, Gunes G ve ark. Growth inhibitory activity of Ankaferd hemostat on primary melanoma cells and cell lines. *SAGE Open Medicine*. 2017;5:2050312116689519.
202. Akalin I, Fatma V, Haznedaroglu IC, Sayinalp N, Salih A, Buyukasik Y, ve ark. Acute in vitro effects of ABS (Ankaferd Hemostat) on the lymphoid neoplastic cells (B-CLL and RAJI tumor cell lines). *International Journal of Hematology and Oncology*. 2014;28(4):253-9.
203. Mumcuoglu M, Akin DF, Ezer U, Akar N. Ankaferd Blood Stopper induces apoptosis and regulates PAR1 and EPCR expression in human leukemia cells. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2015;16(1):19-27.
204. Koçak E. Caco2 Kolon Kanseri Hücrelerinde Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi Bazlı Proteomik Çalışmalar [Doktora Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2017.
205. Nenni M. HepG2, Caco-2 ve HT-29 Kanser Hücrelerinde 2D Jel Elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS ile Ankaferd Hemostat'ın İn-Vitro Antineoplastik Etkisinin Proteomik Açısından Araştırılması [Doktora Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2019.
206. Mosmann TJ. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
207. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL ve ark. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*. 1988;48(3):589-601.
208. Bio-Rad [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf> B-RpaEa.
209. Bio-Rad [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <http://www.bio-rad.com/de-at/product/criterion-cell?ID=0d31b27f-e577-4e08-b552-8dc71e6105b7>.
210. Akpınar G, Kasap M, Canturk NZ, Zulfigarova M, ISLEK EE, Guler SA ve ark. Proteomics analysis of tissue samples reveals changes in mitochondrial protein levels in parathyroid hyperplasia over adenoma. *Cancer Genomics & Proteomics*. 2017;14(3):197-211.
211. Tan A-A, Phang W-M, Gopinath SC, Hashim OH, Kiew LV, Chen Y. Revealing glycoproteins in the secretome of MCF-7 human breast cancer cells. *BioMed Research International*. 2015;2015.

212. Tkáčiková S, Talian I, Petrovič M, Sabo J. Using 2-D electrophoresis followed by nano HPLC in nuclear protein analysis of MCF-7 breast cancer cell line by MALDI-TOF/TOF. *Central European Journal of Chemistry*. 2012;10(2):407-12.
213. Jung S, Lee S, Lee J, Li C, Ohk J-Y, Jeong HK ve ark. Protein expression pattern in response to ionizing radiation in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncology Letters*. 2012;3(1):147-54.
214. Hodge JW, Ardiani A, Farsaci B, Kwilas AR, Gameiro SR. The tipping point for combination therapy: cancer vaccines with radiation, chemotherapy, or targeted small molecule inhibitors. *Seminars in Oncology*. 2012; 9(3):323-39.
215. Wenger JB, Chun SY, Dang DT, Luesch H, Dang LH. Combination therapy targeting cancer metabolism. *Medical Hypotheses*. 2011;76(2):169-72.
216. Nooter K, Stoter G. Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Pathology, Research and Practice*. 1996;192(7):768-80.
217. Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *The Journal of Pathology*. 2000;192(3):280-8.
218. Laszlo A, Venetianer A. Heat resistance in mammalian cells: Lessons and challenges. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;851(1):169-78.
219. Geneontology [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <http://geneontology.org/page/ontology-documentation>.
220. UniProt Database [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.uniprot.org/>.
221. String Database [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=afztfvFwnjJN>.
222. Qucikgo [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>.
223. ER-KEGG [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?1561192421144261/hsa04141.args.
224. RNA-KEGG[Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?15611963895245/hsa03018.args.
225. Östrojen-KEGG [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04141.
226. Kanser-KEGG [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2019]. Erişim adresi: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?1561192421144261/hsa05200.args.
227. Zuckerkandl E, Pauling L. Molecular disease, evolution and genetic heterogeneity. *Horizons in Biochemistry*, Academic Press, New York. 1962: 189-225.
228. Margoliash E. Primary structure and evolution of cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1963;50(4):672.
229. Marmur J, Falkow S, Mandel M. New approaches to bacterial taxonomy. *Annual Review of Microbiology*. 1963;17(1):329-72.
230. Pace NR, Sapp J, Goldenfeld N. Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(4):1011-8.

231. Eck RV, Dayhoff MO. Evolution of the structure of ferredoxin based on living relics of primitive amino acid sequences. *Science*. 1966;152(3720):363-6.
232. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. 1968;217(5129):624-6.
233. King JL, Jukes TH. Non-darwinian evolution. *Science*. 1969;164(3881):788-98.
234. Kimura M, Ohta T. On some principles governing molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71(7):2848-52.
235. Ahituv N, Zhu Y, Visel A, Holt A, Afzal V, Pennacchio LA ve ark. Deletion of ultraconserved elements yields viable mice. *Public Library of Science Biology*. 2007;5(9):e234.
236. Klug WSea. *Concepts of genetics*. 10th ed. ed: Pearson; 2010.
237. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 2000;101(3):249-58.
238. Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE ve ark. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(23):13207-12.
239. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong S-E ve ark. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 2008;134(1):112-23.
240. Mitochondrial proteins [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.nature.com/subjects/mitochondrial-proteins>.
241. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*. 2009;138(4):628-44.
242. Gene Group : Cytoplasmic Large Ribosomal Proteins [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://flybase.org/reports/FBgg0000200.html>.
243. Barakat A, Szick-Miranda K, Chang F, Guyot R, Blanc G, Cooke R ve ark. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiology*. 2001;127(2):398-415.
244. Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress & Chaperones*. 1996;1(2):97.
245. De Maio A, Santoro MG, Tanguay RM, Hightower LE. Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress & Chaperones*. 2012;17(2):139-43.
246. HSP90B1 heat shock protein 90 beta family member 1 [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7184#gene-expression>.
247. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006;31(3):164-72.
248. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*. 2002;295(5561):1852-8.

249. Öncel M. Heat Shock Proteins and Cancer. *European Journal of Basic Medical Sciences*. 2012;16-23.
250. Calderon PB, Sennesael A-L, Glorieux C. Glucose-regulated protein of 94 kDa contributes to the development of an aggressive phenotype in breast cancer cells. *Pharmacotherapy*. 2018;105:115-20.
251. Dejeans N, Glorieux C, Guenin S, Beck R, Sid B, Rousseau R ve ark. Overexpression of GRP94 in breast cancer cells resistant to oxidative stress promotes high levels of cancer cell proliferation and migration: implications for tumor recurrence. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012;52(6):993-1002.
252. UniProtKB - P10809 (CH60_HUMAN) [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10809>.
253. ATP5F1B ATP synthase F1 subunit beta [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/506>.
254. Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa A., Alonso AM ve ark. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis*. 2005;26(12): 2095–2104.
255. Geyik E, Igci YZ, Pala E, Suner A, Borazan E, Bozgeyik I ve ark. Investigation of the association between ATP2B4 and ATP5B genes with colorectal cancer. *Gene*. 2014;540(2):178-82.
256. Sun J, Yang Z, Miao X, Zou Q, Li J, Liang L ve ark. ATP5b and β 2-microglobulin are predictive markers for the prognosis of patients with gallbladder cancer. *Journal of Molecular Histology*. 2015; 46:57277.
257. Li W, Li Y, Li G, Zhou Z, Chang X, Xia Y ve ark. Ectopic expression of the ATP synthase β subunit on the membrane of PC-3M cells supports its potential role in prostate cancer metastasis. *International Journal of Oncology*. 2017; 50(4):1312-20.
258. Yamamoto, S., Tomita, Y., Hoshida, Y., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Yasuda, T. ve ark. Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma. *Journal of clinical oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003; 21 (13): 2537-44.
259. Laguë M-N, Romieu-Mourez R, Bonneil É, Boyer A, Pouletty N, Mes-Masson A-M ve ark. Proteomic Profiling of a Mouse Model for Ovarian Granulosa Cell Tumor Identifies VCP as a Highly Sensitive Serum Tumor Marker in Several Human Cancers. *PLOS ONE*. 2012;7(8):e42470.
260. Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y-L, Girard L, Gandhi J ve ark. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLOS ONE*. 2009;4(7):e6146.
261. Welcsh PL, King M-C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*. 2001;10(7):705-13.
262. UniProtKB - Q13228 (SBP1_HUMAN) [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q13228>.

263. SELENBP1 selenium binding protein 1 [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8991>.
264. Raucci R, Colonna G, Guerriero E, Capone F, Accardo M, Castello G ve ark. Structural and functional studies of the human selenium binding protein-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2011;1814(4):513-22.
265. Suzuki T, Hayashi S, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Sugawara A ve ark. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. *Endocrine-Related Cancer*. 2006;13(1):233-50.
266. Huang K-C, Park DC, Ng S-K, Lee JY, Ni X, Ng W-C ve ark. Selenium binding protein 1 in ovarian cancer. *International Journal of Cancer*. 2006;118(10):2433-40.
267. UniProtKB - Q15084 (PDIA6_HUMAN) [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q15084>.
268. PDIA6 protein disulfide isomerase family A member 6 [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10130>.
269. Horibe T, Torisawa A, Masuda Y, Kawakami K. Functional analysis of protein disulfide isomerase P5 in glioblastoma cells as a novel anticancer target. *Oncology Reports*. 2019; 41(2):961-72.
270. Gao H, Sun B, Fu H, Chi X, Wang F, Qi X ve ark. PDIA6 promotes the proliferation of HeLa cells through activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget*. 2016; 7(33):53289-98.
271. UniProtKB - Q9NQ39 (RS10L_HUMAN) [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 3 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NQ39>.
272. Sönmez D, Göğebakan B, Ecevit H, Ataç L, Küçük M, İzmirli M. Sahte İsmi Haketmeyen Genler; Psödogenler. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*. 2016; 7(25): 50-5.
273. Kandouz M, Bier A, Carystinos GD, Alaoui-Jamali MA, Batist G. Connexin43 pseudogene is expressed in tumor cells and inhibits growth. *Oncogene*. 2004;23(27):4763-70.
274. Metin B, Altınok T, Menevşe E, Esen H. Pulmoner parenkim hasarı yapılan tavşanlarda ankaferd blood stopper uygulamasının etkileri: Deneysel bir çalışma. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*. 2013;21(2):428-33.
275. Sezgin S.Ö, Saraç GC, Şamdancı E, Şenol M. Hemostatik ajan Ankaferd' in yara iyileşmesi üzerine etkileri. *Türk Dermatoloji Dergisi*. 2015; 49: 218-21.

8. EKLER

Ek-1. Ankaferd Blood Stopper®' in Ruhsat Belgesi



Ek-2. Orijinallik Raporu

ANKAFERD HEMOSTAT' IN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINA ETKİSİNİN PROTEOMİK ANALİZLERLE İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%8	%4	%2	%5
BENZERLIK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

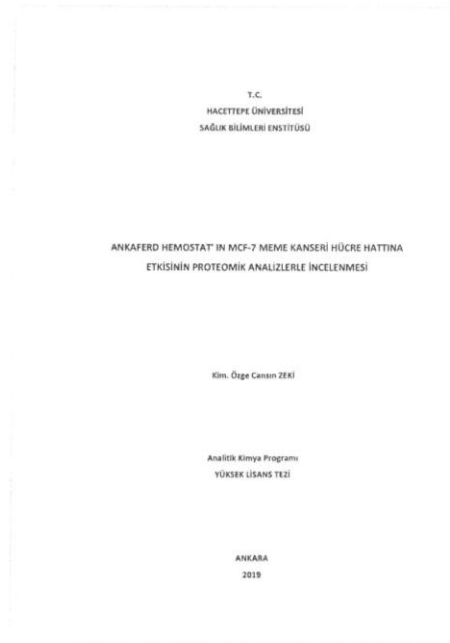
1	earsiv.atauni.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Eastern Mediterranean University Öğrenci Ödevi	<%1
4	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
7	bilgiharitasi.com İnternet Kaynağı	<%1
8	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	<%1

Ek-3. Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Özge Cansın Zeki
Ödev başlığı: ANKAFERD HEMOSTAT' IN MCF-7...
Gönderi Başlığı: ANKAFERD HEMOSTAT' IN MCF-7...
Dosya adı: Dosya boyutu:3.76M
Sayfa sayısı: 109
Kelime sayısı: 22,461
Karakter sayısı: 153,791
Gönderim Tarihi: 19-Tem-2019 02:10PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1153182369



9. ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Ankara' da doğdum. Elvankent Bilgi Anadolu Lisesi' ni bitirdikten sonra 2010 yılında girdiğim Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü' nden 2016 yılında mezun oldum. 2016 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' nde Analitik Kimya Yüksek Lisans eğitimime başladım. Halen Analitik Kimya Anabilim Dalı' nda yüksek lisans öğrencisi olarak eğitim hayatımı sürdürmekteyim.