

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

**CACO2 KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE ULTRA
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE
SPEKTROSKOPİSİ BAZLI PROTEOMİK ÇALIŞMALAR**

Uzm. Kim. Engin KOÇAK

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2017**

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

**CACO2 KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE ULTRA
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE
SPEKTROSKOPİSİ BAZLI PROTEOMİK ÇALIŞMALAR**

Uzm. Kim. Engin KOÇAK

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof .Dr. Sacide ALTINÖZ**

**ANKARA
2017**

ONAY SAYFASI**CACO2 KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE ULTRA PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROSKOPİSİ BAZLI PROTEOMİK ÇALIŞMALAR****Uzm. Kim. Engin Koçak**

Bu çalışma 20.01.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Analitik Kimya Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Dilek Ak
(Anadolu Üniversitesi)



Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sacide Altınöz
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Sedef Kır
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. İbrahim Demirtaş
(Karatekin Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Özden Tacal
(Hacettepe Üniversitesi)

**ONAY**

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır. Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

x Tezimin/Raporumun 01.01.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

20 /01/2017



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 zgn olduğunu, Prof .Dr. Sacide ALTINÖZ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi ve hazırlanması süresince yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman destek olan, bilgilerinden, önerilerinden ve birikimlerinden sürekli yararlandığım çok değerli danışman hocam Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sacide Altınöz'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında destek veren Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. İncilay Süslü, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Çelebier ve ayrıca Kim. Ozan Kaplan ve Ecz. Merve Nenni'ye teşekkür ederim.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda hücre kültürü deneylerinde yaptıkları katkılardan dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Özden Tacal ve Yrd. Doç. Dr. Kevser Biberogluna teşekkür ederim.

Tez kapsamında proteomik çalışmalarımı yapabilmek için İspanya'da CIAL enstitüsüne kabul ederek, gitmemi sağlayan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Foodomik Laboratuvarı Başkanı Prof. Dr. Alejandro Cifuentes ve proteomik çalışmalar sorumlusu Dr. Carolina Simo ve transkriptomik çalışmalar sorumlusu Dr. Virginia Canas'a teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde bulunan ve değerli katkılar Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sedef Kır ve Karatekin Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim Demirtaş'a teşekkürlerimi sunarım.

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın Öğretim Üyelerine, teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler, bilgi ve birikimime sağladıkları katkılar, gösterdikleri yakınlık, ilgi ve samimiyet için, çalışma arkadaşlarıma yakın arkadaşlıkları, her zaman yanımda oldukları ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemi sağladıkları için sevgili annem ve babama minnettarlığımı sunarım.

Sevgili kardeşlerime her zaman üzerimde hissettiğim destekleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmaları için Tübitak 2214-a burs kapsamında aldığım destek için teşekkür ederim.

ÖZET

Koçak, E. CaCo₂ Kolon Kanseri Hücrelerinde Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi Bazlı Proteomik Çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017. Kanser günümüz dünyasında teşhis ve tedavisi en zor hastalıkların başında gelmektedir. Yeni geliştirilen omik teknolojilerinden proteomik çalışmalar özellikle kanser üzerine yapılan genomik çalışmaları tamamlamakta ve kanseri protein seviyesinde inceleyerek kanser oluşum mekanizmalarının aydınlatılmasında, hastalığın teşhis ve tedavisinde klinik çalışmalara destek vermektedir. Bugün dünyada sıvı kromatografisi bazlı proteomik çalışmalar nano sıvı kromatografisi ile yapılmaktadır. Nano sıvı kromatografisi yüksek duyarlılık sağlamasına karşın kontrol edilmesi oldukça güç sistemlerdir. Bu tez çalışması temel olarak iki kısımdan oluşmaktadır; birinci kısımda nano sıvı kromatografisinin gösterdiği dezavantajları ortadan kaldırarak daha güvenilir sonuçlar verebilen standart protein sığır serum albumin kullanılarak ultrabasinçlı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmesi ve valide edilmesi planlanmıştır. Geliştirilen ve valide edilen bu yöntem kullanılarak CaCo₂ kolon kanseri hücrelerinde bulunan protein ve peptitlerin nitel ve yarı nicel analizleri yapılmıştır. Tez çalışmasının ikinci kısmında bitkisel temelli hemostatik ajanın CaCo₂ kolon kanseri hücreleri üzerindeki çoğalmayı durdurucu etkileri geliştirilen ultra basınçlı sıvı kromatografisi ile birlikte kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektroskopisi yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Maxquant programı ile değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda tez çalışmasının amaçları içinde yer alan bitkisel temelli hemostatik ajanın CaCo₂ kolon kanseri hücreleri üzerinde hangi yolları etkilediği ve hangi önemli kanser hedefleri üzerinde hücre proliferasyonu etki gösterdiği, bu etkiye karşı hücrenin hangi savunma yollarını kullandığı ve bu ajana karşı nasıl direnç geliştirdiği proteomik açıdan incelenmiştir. Çalışmalarda bitkisel temelli hemostatik ajan kullanılması ile bir çok proteinin azalması ve çoğalarak etkilendiği ve miktarının değiştiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Proteomik, Ultra basınçlı sıvı kromatografisi, Kütle spektroskopisi, Hemostatik ajan

ABSTRACT

Koçak, E. Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Based Proteomics Studies on CaCo2 Colon Cancer Cells, Hacettepe University Health Sciences Institute Analytical Chemistry Program Doctor of Philosophy, Ankara, 2017. Cancer is the one of the most difficult disease to detect and treat. By omic technologies it has been analyzed at molecular level about cancer. Among the omic technologies Proteomic, has been studied intensively worldwide, is a interdisciplinary area. Especially proteomics studies, which investigate about cancer at protein level, provide more information to support genomics results and clinic studies for cancer progression, detection and treatment. Liquid chromatography based proteomics researches have been making by using nano liquid chromatography. Although it gives more sensitivity, it has some drawbacks and is very difficult to control. In this thesis there are two main objectives. Firstly it has been tried to develop new ultra pressure liquid chromatography method to correct the drawbacks of nano liquid chromatography and to get reliable results. Bovine serum albumin was used as a standard protein to develop new analytical method and insight of the bovine serum albumin results CaCo2 colon cancer cell line was investigated. In second part of thesis effect of platelet based hemostatic agent on colon cancer was investigated with new developed analytical method. Ultra pressure liquid chromatography was followed quadrupole time of flight mass spectrometry. Mass spectroscopy results were evaluated with Maxquant. It was evaluated cancer targets and cancer pathways that are affected by hemostatic agent in colon cancer cells.

Key Words : Cancer, Hemostatic agent, Proteomic, Mass spectroscopy, Maxquant

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMA DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Protein	5
2.2. Proteinlerin Hücre İçerisinde Biyosentezi	7
2.3. Proteom ve Proteomik	7
2.4. Proteomik Yaklaşımları	9
2.5. Yukarıdan Aşağı (Top Down) Yaklaşım	9
2.6. Aşağıdan Yukarı (Bottom Up) Yaklaşım	10
2.6.1. Bottom Up (Aşağıdan Yukarı) Yöntemi ile Yapılan Proteomik Çalışmalar	13
2.7. Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi (LC/MS) Bazlı Aşağıdan Yukarı Proteomik Çalışmalar	14
2.7.1. Örnek Hazırlama	14
2.7.2. Proteomik Analiz Yöntemleri	18
2.7.4. Peptitlerin MS Analizi	29
2.7.5. LC/MS Verilerinin Biyoinformatik Sistemlerle Analizi	29
2.7.6. Proteinlerin Nitel Analizleri	30
2.7.7. Proteinlerin Yarı-Nicel Analizi	37
2.7.8. Verilerin İstatistiksel Olarak Anlamlandırılması	40
2.7.9. Verilerin Hücre Biyolojisi İçerisinde Değerlendirilmesi	41

2.8. Proteomik Çalışmaların Kansere Üzerindeki Uygulamaları	41
2.9. Bitkisel Temelli Hemostatik Ajanlar ve Kansere Üzerinde Etkileri	43
2.10. Proteomik Analizlerde Validasyon Çalışmaları	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Kimyasallar ve Gereçler	46
3.2. Sığır Serum Albümin Analizi	49
3.2.1. Sığır Serum Albümininin Peptitlerine Parçalanması	49
3.2.2. Sığır Serum Albümine ait Peptitlerin UPLC/QTOF ile Analizi	49
3.2.3. UPLC/QTOF Verilerinin Maxquant Programında Analiz Edilmesi	52
3.2.4. Sistem Optimizasyonu ve Validasyon Çalışmaları	53
3.3. CaCo2 Kolon Kanseri Hücrelerinin Proteomik Açısından İncelenmesi	55
3.3.1. CaCo2 Kolon Kanseri Hücre Kültürü Çalışmaları	55
3.3.2. Numune Hazırlama	55
3.3.3. Protein Miktar Analizi	55
3.3.4. Proteinlerin Metanol, Kloroform, Su Karışımı ile Çöktürülmesi	56
3.3.5. Protein Karışımının Parçalanması	56
3.3.6. Peptitlerin UPLC/MS ile Analizi	57
3.3.7. Verilerin Maxquant Programında Değerlendirilmesi	58
3.3.8. Maxquant Sonuçlarının Perseus İstatistik Programında Değerlendirilmesi	59
3.4. Bitkisel Temelli Hemostatik Ajanın CaCo2 Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkisinin Proteomik Açısından İncelenmesi	60
3.4.2. Proteinlerin UPLC/MS Yöntemi ile Analizi	60
3.4.3. UPLC/MS Verilerinin Maxquant Programı ile Değerlendirilmesi	60
3.4.3. Maxquant Programı ile Elde Edilen Sonuçların Perseus Programı ile Değerlendirilmesi	60
3.4.5. Verilerin Hücre Biyolojisi İçerisinde Değerlendirilmesi	61
4. BULGULAR	62
4.1. Sığır Serum Albüminin Nitel Analizleri	62
4.1.1. Gradient Süresinin Optimizasyonu	62
4.1.2. Proteinlerin Nitel Analizinde Enjeksiyon Miktarının Optimizasyonu	63
4.2. Maxquant ile Örnek Peptit Nitel Analizi	66

4.3. Sığır Serum Albumin Analizlerinde Validasyon Çalışmaları	69
4.4. CaCo2 Kolon Kanseri Hücrelerinin Proteomik Açıdan Nitel Analizi	78
4.4.1. CaCo2 Hücrelerinin LC/MS ve Maxquant Programı ile Analizleri	79
4.4.2. Proteinlerin Gen Ontoloji Analizleri	85
4.5. Bitkisel Temelli Hemostatik Ajanın CaCo2 Kolon Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Etkisinin Proteomik Yaklaşım ile İncelenmesi	87
4.5.1. LC/MS, Maxquant, Perseus ve String Analizleri	87
5. TARTIŞMA	107
5.1. Sığır Serum Albüminin Maxquant Programı ile Nitel Analizi	115
5.2. CaCo2 Hücre Hattı Proteinlerinin Nitel Analizi	122
5.3. Bitkisel Temelli Hemostatik Ajanın Antikanserojen Etkisinin Proteomik Açıdan İncelenmesi	125
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	128
7. KAYNAKLAR	131
EKLER	
Ek 1. 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücresi ile yapılan analizlerde elde edilen proteinleri	
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

2-D jel elektroforez	: İki boyutlu jel elektroforez
Arg	: Arjinin
Da	: Dalton
DC	: Deterjan uyumlu
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ESI	: Elektrosprey iyonlaşma kaynağı
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LC	: Sıvı kromatografisi
Lys	: Lizin
m/z	: Kütle/yük
MALDI	: Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonlaştırma
MS	: Kütle spektroskopisi
MS/MS	: Tandem MS spektrumu
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
Q	: Kuadrupol
RNA	: Ribo Nükleik asit
SDS	: Sodyumdodesil sülfat
TOF	: Uçuş zamanlı kütle analizörü
UPLC	: Ultra basınçlı sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Proteinlerin amino asitlerden peptit bağları ile oluşumu	6
2.2. Proteinlerde yapı oluşumu	6
2.3. Proteinlerin hücre içerisinde biyosentezi	7
2.4. Bottom up ve Top down proteomik çalışmalar	10
2.5. İki boyutlu jel elektroforez uygulaması sonucu görüntüleme cihazında elde edilen protein dağılımı (Bio-rad uygulamaları)	11
2.6. Tripsin ile proteinin parçalanması ve peptit oluşum	17
2.7. Nano LC için modifiye edilmiş UPLC pompa sistemi	20
2.8. 1 pmol sığır serum albüminin nano LC ile analizi, a) Sistemde ölü hacim varken oluşan kromatogram b) Ölü hacim problemi çözüldükten sonra elde edilen kromatogram (94).	21
2.9. Kütle spektrometresinin bölümleri	23
2.10. MALDİ iyonlaşma kaynağı	25
2.11. Elektrosprey iyonizasyon kaynağı.	26
2.12. QTOF şematik gösterimi	28
2.13. Peptitlerin MS/MS verilerinin ilgili veri bankaları ile karşılaştırılması	34
2.14. Peptitlerin parçalanması ile oluşan fragment iyonları	34
2.15. İki farklı koşula ait 2-D jel elektroforez sonrası elde edilen görüntü ve spotlar arasında yoğunluk farklılıkları (Bio-rad uygulamaları)	37
2.16. Proteom içerisinde nitel ve nicel analizi yapılan protein sayısının analiz edilen protein konsantrasyonu ile ilişkisi.	38
2.17. İşaretlemeli ve işaretli nicel analiz yöntemleri. A) İşaretsiz B) işaretli nicel analiz yöntemi	39
4.1. Sığır serum albüminin 70 dk'lık gradient kromatogramı	62
4.2. Sığır serum albüminin 45 dk'lık gradient kromatogramı	63
4.3. a) 0,5, b) 1, c) 5, d) 10, e) 20 µg sığır serum albümine ait kromatogramlar	64
4.4. Enjeksiyon miktarı ile birlikte nitel analizi yapılan peptit sayısının ve yüzde protein içeriğinin değişimi	66
4.5. MPCTEDYLSLILNR peptidine ait ayrıştırılmış iyon kromatografisi	66
4.6. MPCTEDYLSLILNR peptidine ait izotop pikler	67

4.7.	MPCTEDYLSLILNR peptidine ait MS/MS verileri ve eşleşen fragment iyonları.	67
4.8.	a) İçerisinde Sığır serum albümin olmayan ortamda (kör çözelti) elde edilen kromatogram, b) Sığır serum albüminli ortamda elde edilen kromatogram,	69
4.9.	GLVLIAPSQYLQQCPFDEHVK peptidine ait MS/MS spektrumu ile birlikte nitel analizde tespit edilen fragment iyonlar ve amino asit dizileri	70
4.10.	LGEYGFQNALIVR peptidine ait MS/MS spektrumu ile birlikte nitel analizde tespit edilen fragment iyonlar ve amino asit dizileri	71
4.11.	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK (a), LGEYGFQNALIVR (b) peptitlerine ait MS değerlerinin 11 gün boyunca değişimi	72
4.12.	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerinin zamanlarının günler arası değişimi	74
4.13.	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerine ait yoğunluklarının 11 gün boyunca değişimi	75
4.14.	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerine ait eşleşme skorlarının 11 gün boyuca gösterdiği değişimi	76
4.15.	Sığır serum albümin proteinine ait yoğunlukların 11 gün boyunca değişim grafiği	77
4.16.	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidine ait yoğunluğun enjeksiyon miktarı ile değişimi	77
4.17.	LGEYGFQNALIVR peptidine ait yoğunluğun enjeksiyon miktarı ile değişimi	78
4.18.	Protein yoğunluğunun enjeksiyon miktarı ile değişimi	78
4.19.	Sığır serum albümin standart proteini ile kalibrasyon doğrusu	79
4.20.	20, 40 ve 80 µg protein enjeksiyon miktarlarına göre elde edilen kromatogramlar	80
4.21.	20 µg CaCo2 kolon kanseri hücresi içinde bulunan ve 3 farklı enjeksiyonda elde edilen protein sayıları	80
4.22.	40 µg CaCo2 kolon kanseri hücresi içinde bulunan ve 3 farklı enjeksiyonda elde edilen protein sayıları	81

4.23. 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücresi içinde bulunan ve 3 farklı enjeksiyonda elde edilen protein sayıları	81
4.24. SADTLWDIGKDLKDL peptidine ait MS/MS spektrumu ve eşleşme sonuçları	82
4.25. RHPEYAVSVLLR peptidine ait MS/MS spektrumu ve eşleşme ürünleri	82
4.26. 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait peptitlerin yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyonda karşılaştırılması. A) Enjeksiyon 1- Enjeksiyon 2 (E1-E3), B) Enjeksiyon 1- Enjeksiyon 3 (E3-E2), Enjeksiyon 2- Enjeksiyon 3 (E1-E2). (mavi düşük yoğunluğu , kırmızılar yüksek yoğunluğu göstermektedir)	83
4.27. 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait proteinlerin yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyonda karşılaştırılması. A) Enjeksiyon 1- Enjeksiyon 2 (E1-E2), B) Enjeksiyon 1- Enjeksiyon 3 (E1-E3), Enjeksiyon 2- Enjeksiyon 3 (E2-E3). mavi düşük yoğunluğu , kırmızılar yüksek yoğunluğu göstermektedir)	84
4.28. Nitel analizi yapılan proteinlerin buldukları protein sınıfları	85
4.29. Nitel analizi yapılan proteinlerin gösterdikleri moleküler fonksiyonlar	85
4.30. Nitel analizi yapılan proteinlerin buldukları biyolojik süreçler	86
4.31. Nitel analizi yapılan proteinlerin hücre içerisinde dağılımları	86
4.32. K (alt) ve T (üst) gruplarına ait LC/MS kromatogramları	87
4.33. K ve T gruplarında nitel analizi yapılan protein sayısının Venn şemasında gösterimi	88
4.34. Hemostatik etkisi ile miktarı azalan proteinlerin birbirleri ile ilişkileri	91
4.35. Hemostatik ajan ile miktarı artan proteinlerin birbirleri ile olan ilişkileri	94

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Kromatografisi türleri, kolon iç çapları ve akış hızları	19
3.1. Hücre kültürü içerisinde kullanılan kimyasallar.	46
3.2. Proteomik deneyleri kapsamında kullanılan kimyasallar	47
3.3. Proteomik çalışmalarda kullanılan cihazlar	48
3.4. Proteomik deneyleri kapsamında kullanılan programlar	48
3.5. Gradient sistemi 1	50
3.6. Gradient sistemi 2	50
3.7. Elektrosprey iyonizasyon parametreleri	51
3.8. MS parametleri	51
3.9. MS/MS parametreleri	52
3.10. CaCo2 Hücre proteinlerinin analizi için kullanılan gradient sistemi	57
4.1. 0,5, 1, 5, 10, 20 µg sığır serum albümine ait peptit sayıları ve tanımlanabilen protein yüzdesi	64
4.2. 0,5, 1, 5, 10, 20 µg sığır serum albümine ait peptitler	65
4.3. MPCTEDYLSLILNR peptidine ait fragment iyonları ve eşleşmede gözlemlenen kütle hataları.	68
4.4. GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidine ait deneysel ve teorik kütlelerin karşılaştırılması.	71
4.5. LGEYGFQNALIVR peptidine ait deneysel ve teorik değerlerin karşılaştırılması.	72
4.6. 11 gün süresince yapılan deneylerde bulunan ortak peptitler	73
4.7. 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait peptitlerin yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyonda karşılaştırılması	83
4.8. 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait protein yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyonda karşılaştırılması	84
4.9. Hemostatik ajan ile miktarı K grubuna göre azalan proteinler	89
4.10. Hemostatik ajan ile miktarı artan proteinler	92

1. GİRİŞ

1860'lı yıllarda Mendel ile başlayan genetik bilimi organizmaların sahip oldukları karakterlerin gen adı verilen birimler tarafından belirlendiğini keşfetmiştir. Gen kromozom içerisinde kromozomun belirli bir kısmını oluşturan nükleik asit dizisidir. Bir kromozom içerisinde çok fazla sayıda gen mevcuttur. Genler içerdikleri şifreler aracılığı ile vücut içerisindeki her süreçte etkin durumdadırlar. Bazı genler vücut için gerekli, kimyasalların oluşumunda görev alırken bazı genler süreçlerde düzenleyici olarak görev yapmaktadırlar. Genler organizmanın yönetici molekülleridir ve organizmanın özelliklerini, organizma içerisinde hangi olayların gerçekleştiğini ve organizmanın hastalıklarda dahil olmak üzere hangi koşulda nasıl eğilim göstereceklerini belirlemektedirler.

Organizma içerisinde bulunan bütün genlerin oluşturduğu genom yapısının aydınlatılması için yapılan çalışmalar genomik olarak adlandırılmaktadır. Modern genomik çalışmalar ise 1953 yılında DNA'nın moleküler yapısının aydınlatılması hakkında yayımlanan çalışmalar ile başlamıştır. 1990'lı yıllarda çalışmalar insan genom projesi adı altında DNA içerisinde bulunan bütün genlerin tanımlanması ve hastalıklarda etkinliklerin belirlenmesi olarak hedeflenmiştir (1).

İnsan genom projesi içerisinde başlayan çalışmalar amaçlar doğrultusunda devam etmiştir. Kromozomlar içerisindeki genler tayin edilmeye, genlerin organizmaya sağladığı eğilimler belirlenmeye, genlerin birbirleriyle ve çevre ile olan etkileşimleri aydınlatılmaya çalışılmıştır. Proje sonucunda elde edilen bilgilerden veri bankaları oluşturularak sistematik bir şekilde kullanıma açılmıştır (2).

Genom projesinin 2003 yılı itibarıyla sonuçlanmasından sonra hücrelerin içerisinde gerçekleşen biyolojik süreçlerin tamamıyla anlaşılabilmesi buna bağlı olarak hastalıkları meydana getiren mekanizmaların aydınlatılabileceği beklentileri tam olarak cevaplanamamıştır. Genlerin birden fazla proteinin translasyonunda bulunması ve genlerden bağımsız olarak meydana gelen modifikasyonların hastalıklarda çok etkin olması nedeniyle hastalıkların tedavi ve teşhisinde genomik çalışmaların yeterli olmadığı gerçeği ile karşılaşmıştır (3, 4).

Genomik çalışmalarda yaşanan bu gelişmelerle birlikte genomik sonrası çalışmalar (postgenomik çalışmalar) hücre biyolojisi içerisinde daha çok önem

kazanmaya başlamıştır. Postgenomik çalışmalar başlıca iki isim altında proteomik ve metabolomik olarak belirtilmiştir. Hücre içerisinde gerçekleşen olaylar protein ve metabolit düzeyinde incelenerek genomik veriler daha anlamlı bir şekilde değerlendirilmeye başlanmıştır. Genomik çalışmalarca saptanan organizma içerisindeki eğilimlerin ne ölçüde gerçekleşebildiği ve sonuçları postgenomik çalışmalarla incelenmektedir. Yani genomik çalışmalar organizma içerisinde neler olabileceğini araştırırken post genomik çalışmalar ne olduğunu göstermektedir.

Proteom sözcüğü bir organizma, doku veya hücrenin belirli bir zaman içerisinde genler tarafından kodlanmış bütün proteinlerini içermektedir. Bir organizma içerisinde değişik bölgelerde bulunan hücreler farklı proteom yapısına sahip olması, her bir hücrenin farklı evrelerinde farklı proteom ifadelerine sahip olması ve proteom içerisinde bulunan proteinlerin dış uyarıcıların etkisiyle meydana gelen modifikasyonları ve üç boyutlu yapı değişimleri bunlara bağlı olarak değişen aktiviteleri göz önüne alındığı zaman proteom analizlerinin genomik analizlere göre oldukça kompleks ve zor olduğu anlaşılmaktadır. Proteom analizlerine proteomik denilmektedir. Proteomik çalışmalar belirli bir zaman ve koşul altında protein miktarları, yapıları, aktiviteleri, etkileşimleri, uğradıkları modifikasyonları içermektedir.

Proteomik çalışmalar günümüzde çok farklı alanlarda devam etmektedir. Bu alanların başında ise dünya genelinde çok yaygın olan ve etkili bir tedavi yöntemi bulunmayan kanser gelmektedir. Kanser çok farklı türlere sahip son derece ölümcül bir hastalıktır. Kolon kanseri yer yüzünde en sık karşılaşılan kanser türlerinden biridir. Günümüzde kolon kanserine yönelik proteomik çalışmalar biyobelirteçlerin keşfi, yeni ilaç veya kürlerin etki mekanizmalarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Özellikle bitkisel temelli ürünlerin giderek daha yaygın kullanılmasıyla proteomik çalışmalar bitkisel ürünlerin kolon kanseri üzerindeki etki mekanizmalarının aydınlatılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Hemostatik ajan (kanama durdurucu) olarak kullanılan bitkisel temelli ürünler ise giderek daha popüler olmaktadır. Kanama durdurucu bu ürünlerin yan etkilerinin düşük olması ve kanser üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahip olmaları nedeniyle değişik kanser türlerinde alternatif tedavi modelleri olarak görülmektedirler.

Proteomik çalışmalarda organizma içerisinde bulunan proteinlerin biyoanalitik metotlarla analiz edilmesi en önemli kısımdır. Bu kısımda elde edilecek verinin kalitesi ve miktarı proteomik çalışmaların verimini ve kalitesini belirleyen en önemli etkidir. Gelişen teknoloji ile birlikte kütle analizörlerinin yüksek ayırıcılık ve doğrulukla analiz yapabilmesi ile birlikte kütle spektrometrisi bazlı proteomik çalışmalar sık bir şekilde kullanılmaktadır. Kütle spektrometrisindeki gelişmelere rağmen kompleks protein karışımları göz önüne alındığında sistemin yüksek ayırıcılık sağlayan bir ayırma sistemine gerek olduğu görülmüştür. Kromatografik sistemler gelişen pompa ve kolon teknolojisi ile birlikte bu ihtiyaca cevap verecek düzeye ulaşmıştır. Özellikle sıvı kromatografisinin elektrosprey iyonlaşma kaynağı arayüzeyi ile birlikte kütle analizörüne bağlanmasıyla kompleks proteom yapısı bir kaç saat içerisinde analiz edilebilir hale gelmiştir.

Son yıllarda proteomik analizlerin nano sıvı kromatografisi (Nano LC) yöntemi ile oldukça sık yapıldığı kaynaklarda görülmektedir (5). Nano LC yöntemi yüksek duyarlılık sağlamasına karşın çalışılması oldukça güç sistemlerdir. Özellikle sağlamlık ve tekraredilebilirlik parametreleri nano LC'nin en çok zorlandığı kısımlardır. Ayrıca nano LC sistemleri ve buna uygun nano elektrosprey iyonlaşma kaynakları normal yüksek basınçlı sıvı kromatografisine ve iyonlaşma kaynaklarına göre oldukça pahalı olduğu için bir çok laboratuvarda bulunmamaktadır.

Bu tezin amacı standart protein olan sığır serum albümin kullanılarak kütle spektrometresi ile ultra basınçlı sıvı kromatografisi yönteminin geliştirilmesi ve valide edilmesi daha sonra geliştirilen ve valide edilen bu yöntemin bitkisel temelli hemostatik ajan ilave edilmiş CaCo2 kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin proteomik çalışmalarla nitel ve yarı nicel analizlerle saptanmasıdır.

Proteomik çalışmalar, CaCo2 kolon kanseri hücrelerinin elde edilmesi ve hazırlanması, örneklerden elde edilen proteinlerin biyoanalitik yöntemlerle analizi, elde edilen sonuçların biyoinformatik sistemlerle protein boyutuna getirilmesi, sonuçların istatistiksel olarak incelenmesi ve son olarak elde edilen sonuçların hücre biyolojisi içerisinde değerlendirilmesi planlanmıştır.

Geliştirilen bu analitik yöntem ile birlikte elde edilen veriler biyoinformatik sistemlerle uyumlu bir şekilde analiz edilmiştir. Standart protein analizinden elde

edilen sonuçlar ışığında CaCo2 kolon kanseri hücre hattına ait proteom yapısı analiz edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen veriler gen ontoloji analizinde değerlendirilmiştir bu sayede sistemin verimi incelenmiştir.

Geliştirilen yöntem ile bitkisel temelli hemostatik ajanın CaCo2 kolon kanseri hücreleri üzerinde hangi yolakları etkilediği ve hangi önemli kanser hedefleri üzerinde antikanserojen etki gösterdiği proteomik açıdan incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda hemostatik ajanın antikanserojen etkisine karşı hücrenin hangi savunma yollarını kullandığı ve bitkisel karışıma karşı nasıl direnç geliştirmeye çalıştığı saptanılmaya çalışılmıştır. Çalışmalarda hemostatik ajanın bir çok kanser hedefi üzerinde etkin olduğu ve klinik anlamda önemli bazı proteinleri inhibe ettiği gözlenmeye çalışılmıştır. Bu sonuçlar hemostatik ajanın hem tek başına hemde mevcut kanser terapilerinde yardımcı olarak kullanılabileceğini gösterilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

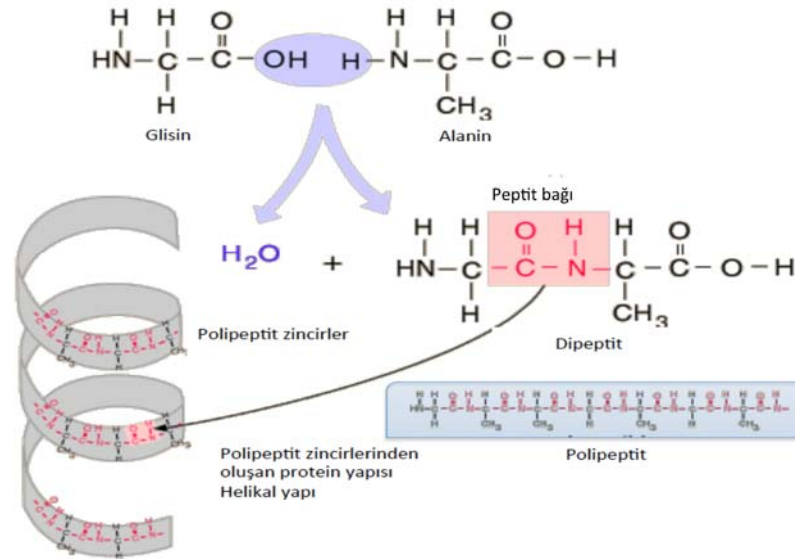
2.1. Protein

Proteinler ilk defa 19. yüzyılda Jacob Berzelius tarafından keşfedilmiştir (6). Proteinler 20 farklı aminoasidin peptit bağları ile birbirine bağlanmasıyla oluşan büyük organik moleküllerdir. Peptit bağı bir aminoasidin karboks grubundaki karbon atomuyla diğer aminoasidin amino grubundaki azot arasında oluşmaktadır (Şekil 2.1.). İki aminoasidin peptit bağı ile birbirine bağlanması sırasında yan ürün olarak su oluşur. Peptit bağı C-N bağından kısa, C=N bağından uzun olduğu için kısmen çift bağ olarak nitelendirilir ve bu özelliğinden dolayı rijit ve düzlemsel bir yapıya sahiptir. Amino asitlerin peptit bağlarıyla birleşmesinden oluşan yapıya peptit denilmektedir. Peptitlerin birleşmesi ile birlikte polipeptit yapıları meydana gelmektedir. Polipeptitler birleşerek proteinleri oluşturmaktadır (7).

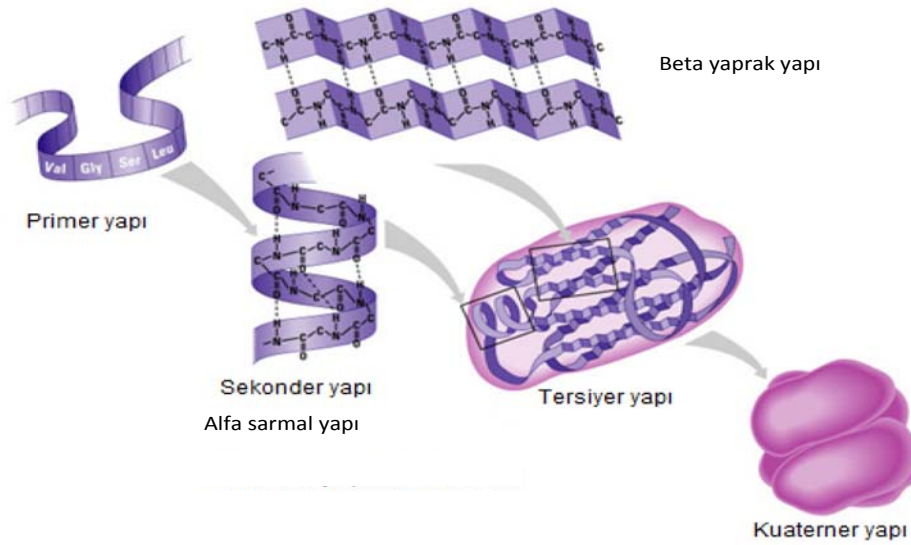
Proteinlerin oluşumunda birbirini takip eden dört temel yapı mevcuttur. İlk olarak aminoasitler peptit bağlarıyla düzlemsel olarak birincil yapıyı (primer) oluşturur. İkincil yapılar (sekonder) ise birincil yapıların bükülmesi ile birlikte oluşan alfa sarmal ve beta yaprak yapılarıdır. İkincil yapılarda meydana gelen alfa sarmal ve beta yaprak yapılarının kendilerine has katlanmaları ile birlikte üçüncül yapıları (tersiyer) meydana gelmektedir. Proteinlerin üçüncül yapılarının oluşumunda hidrojen bağları, disülfid bağları ve tuz köprüleri yer almaktadır. Proteinler işlevlerini üçüncül yapılar oluştuktan sonra kazanmaktadırlar. Üçüncül yapı oluşumu ile birlikte proteinler biyolojik süreçlerde rol almaktadırlar. Ayrıca proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları üçüncül yapılar oluştuktan sonra meydana gelmektedir. Dördüncül (Kuaterner) yapıda ise birkaç protein veya polipeptit özel bir geometri meydana getirecek şekilde birleşerek bir yığın oluşturmaktadırlar (Şekil 2.2.) (8).

Proteinler hücre içerisinde bir çok önemli moleküler fonksiyona sahiptir ve bir çok biyolojik süreçte görev yapmaktadırlar. Proteinlerin en önemli görevi yapı taşı olarak hücre ve hücre içi bileşenlerin iskeletini oluşturmaktır. Proteinlerin bilinen bir diğer önemli görevi ise hücre içerisinde gerçekleşen kimyasal olayları hızlandıran enzim işlevi görmeleridir. Ayrıca proteinler hücre sinyalleme ve

sinyal aktarımında da görev almaktadırlar. Hücre içi veya hücre dışı sinyal aktarımında görev olarak organizma içerisindeki biyokimyasal süreçlere etki etmektedirler. Bu tarz proteinlere en önemli örnek antikorlardır (9).



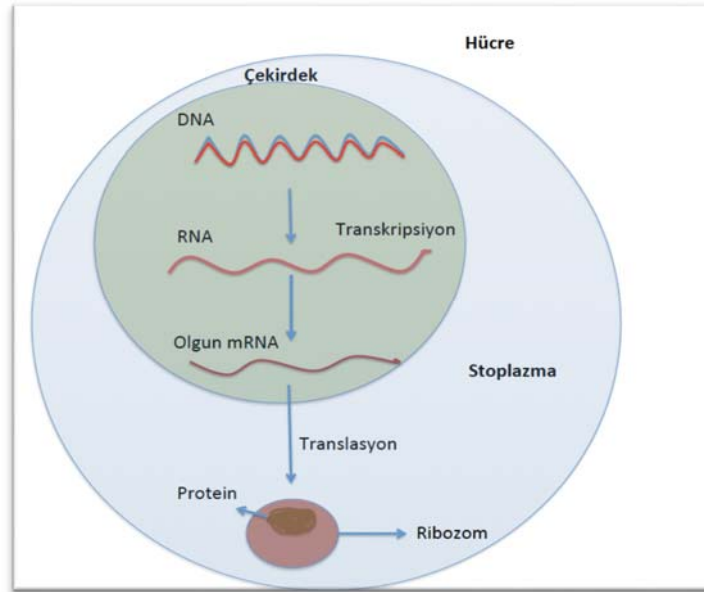
Şekil 2.1. Proteinlerin amino asitlerden peptit bağları ile oluşumu



Şekil 2.2. Proteinlerde yapı oluşumu

2.2. Proteinlerin Hücre İçerisinde Biyosentezi

Crick ve arkadaşları 1958 yılında moleküler biyolojinin temellerini atarken protein sentezinin hücre içerisinde mevcut durumda bulunan genetik koda bağlı olduğunu keşfetmişlerdir. Proteinlerin hücre içerisinde meydana gelmesi genetik bilginin depolandığı DNA ile başlamaktadır. Genler, yani genetik kodlar proteinlere karşılık gelen DNA dizileridirler. Protein sentezinde ilk olarak sentezlenecek protein dizisine karşılık gelen mesajcı RNA (mRNA) transkripsiyonu (yazılımı) DNA tarafından gerçekleşmektedir. mRNA, protein dizisine karşılık gelen kodlayıcı bilgiyi taşıyarak ribozomlarda translasyon (çevirim) süreci sonrasında proteinleri meydana getirmektedir (10) (Şekil 2.3.). Proteinlerin translasyonu tamamen gen bazlı bir süreç olarak devam etmektedir ancak protein translasyonu sonucunda oluşan proteinin modifikasyona uğraması genlerden bağımsız işleyen bir süreçtir.



Şekil 2.3. Proteinlerin hücre içerisinde biyosentezi

2.3. Proteom ve Proteomik

Proteom tanımı ilk olarak 1994 yılında Marc Wilkins tarafından kullanılmıştır. Proteom genom tarafından kodlanan proteinleri tanımlamaktadır (11). Proteom hücreden hücreye ve aynı hücre içerisinde iki farklı zaman diliminde

ve farklı koşullarda değişim gösteren son derece dinamik yapılardır.

Proteinler hücre, doku ve organizmalarda temel yapı taşlarıdır ve organizmanın fenotipinin belirlenmesinde önemli bir parametredir. Organizmalar aynı genom yapısına sahip olsa bile farklı proteom yapıları olabilir ve farklı fenotiplere sahip olabilir. Bunun için tırtıl ile kelebek örneği verilebilir. Bu iki canlı aynı genotipe sahip olmalarına karşın fenotipleri birbirlerinden farklıdır. Bu farklılık sonucunda farklı morfolojilere ve özelliklere sahiptirler.

Genom ile proteom arasındaki ilişki uzun yıllardır araştırılan bir konudur. Bu konuda ilk ortaya atılan hipotez tek gen tek protein hipotezi olmuştur ancak insan genom projesinden elde edilen sonuçlarla birlikte bu hipotez zarla çevrili çekirdeği ve organelleri olan ökaryot hücreler için terk edilmiştir ve bir genin birden fazla protein translasyonunda görev aldığı hipotezi geliştirilmiştir. Karışık biyolojik süreç içerisinde bir gen birden fazla alternatif kodlamalar ile birlikte birden fazla mesajcı RNA üretimi yapabilmektedir ayrıca protein translasyonu sonrasında meydana gelen modifikasyonlar nedeniyle organizma içerisinde bulunan protein sayısı gen sayısına oranla çok fazladır (12). 2003 yılında tamamlanan insan genom projesi ile elde edilen bilgilerde insan genomu 24 kromozom içerisinde yaklaşık 2.85 milyar nükleotid içermektedir ve yaklaşık olarak 20000-25000 gen bulunduğu keşfedilmiştir (13). Bununla birlikte kodlanan protein sayısı 100000 iken yaklaşık 200 farklı modifikasyona uğrayabilmesi ile birlikte analiz edilebilecek proteom çok kompleks bir yapı halini almıştır. Bu yapı içerisinde yaklaşık olarak 500000 protein olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu kompleks yapı içerisinde proteinlerin birbirleri ile olan etkileşimleri ve birden çok biyolojik süreçte rol alabilmeleri göz önüne alındığında proteom içerisinde analiz yapmak oldukça güç olmaktadır (14).

Proteomik, proteom içerisinde bulunan proteinlerin analizi olarak tanımlanmaktadır (15). Proteomik çalışmalar genomik çalışmaların devamı olarak nitelendirilmektedir. Proteomik çalışmalar için genomik sonrası (postgenomik) çalışmalar denilmektedir. Genomik çalışmalar kalıtsal olarak gelen eğilimleri tanımlarken proteomik çalışmalar meydana gelen sonucu incelemektedir böylece iki analiz birbirini tamamlamaktadır. Proteomik kavramı son derece geniş bir kavramdır ve proteinlerin tanımlanması, nicel analizleri, hücre içerisindeki yerleri,

yapıları, diğer proteinlerle etkileşimleri, modifikasyonları ile ilgili çalışmalarını içermektedir (10).

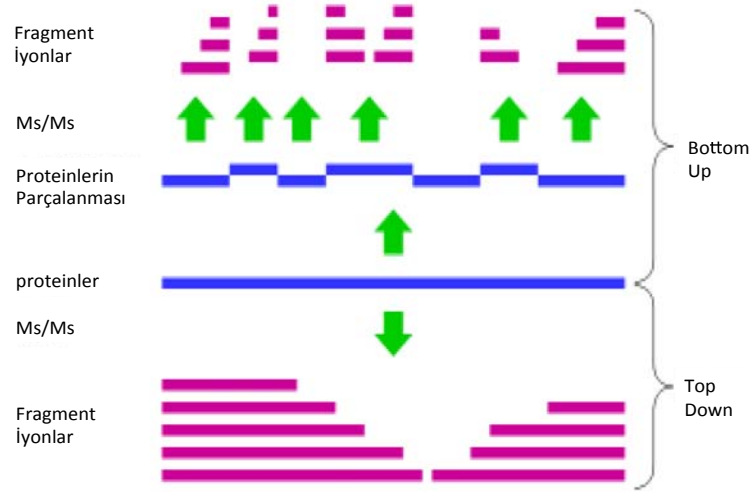
2.4. Proteomik Yaklaşımları

Çalışılacak örneğin durumu ve eldeki şartlara göre değişik proteomik yöntemler geliştirilebilir (4, 16). Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) yöntemi tarama (array) bazlı sistemler proteinlerin yarı nicel analizlerinde kullanılmaktadır (17). Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte yüksek ayırıcılık ve doğruluğa sahip kütle spektroskopisi bazlı yöntemler proteomik çalışmalarda en sık kullanılan sistem haline gelmiştir.

Kütle spektroskopisi bazlı proteomik çalışmalar yukarıdan aşağı (top down) ve aşağıdan yukarı (bottom up) olmak üzere iki farklı alanda devam etmektedir (18, 19).

2.5. Yukarıdan Aşağı (Top Down) Yaklaşımı

Yukarıdan aşağı yaklaşımında hücre, doku veya vücut sıvılarından izole edilen proteinler kromatografik yöntemlerle veya iki boyutlu jel elektroforez yöntemi ile daha basit ve analiz edilebilir hale getirildikten sonra kütle spektrometrisinde analizi gerçekleştirilmektedir (20). Bu yaklaşım içerisinde proteinler direk olarak analiz edilmekte herhangi bir parçalama işlemi yapılmamaktadır. Kromatografik veya jel bazlı sistemlerle analiz sonrası kütle spektroskopisine gelen proteinler direk olarak burada iyonlaştırılarak analiz edilmektedirler (Şekil 2.4.). Yukarıdan aşağı yaklaşımının en önemli üstünlüğü proteinin direk olarak kütle spektroskopisinde analiz edilmesiyle birlikte madde kaybının az olması ve protein dizisinin %100 oranında analiz edilmesidir. Ayrıca proteinler üzerinde meydana gelen translasyon sonrası modifikasyonlar yine bu yaklaşım içerisinde yüksek doğrulukla analiz edilebilmektedir (21, 22). Yukarıdan aşağı proteomik çalışmalar izole edilmiş tek bir protein için veya basit protein karışımları için çok iyi sonuçlar verse de konu karmaşık proteomlar olduğunda aynı başarıyı gösterememektedir. Yukarıdan aşağı yaklaşımı ile karmaşık proteom yapısının çok küçük bir kısmı aydınlatılmaktadır (23).



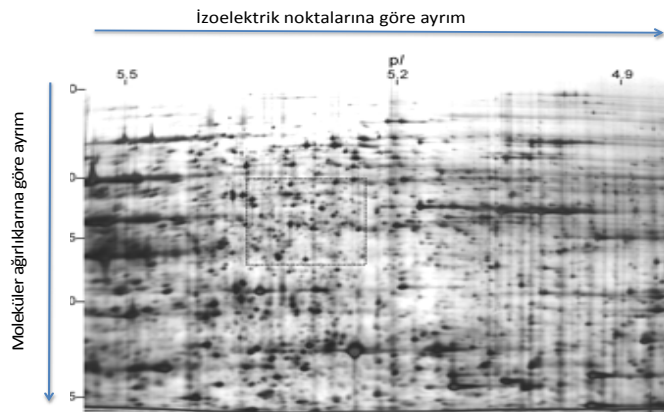
Şekil 2.4. Bottom up ve Top down proteomik çalışmaları

2.6. Aşağıdan Yukarı (Bottom Up) Yaklaşımı

Aşağıdan yukarı yaklaşımı proteomik alanında modern kütle spektroskopisi bazı çalışmalarda kullanılan diğer yöntemdir. Proteinler kütle spektroskopisi analizinden önce proteolitik enzimlerle küçük peptitlere parçalanmaktadır (24). Proteinlerin parçalanması ile oluşan peptit karışımları ayırma teknikleri ile daha basit hale getirildikten sonra kütle spektroskopisi ile analiz edilerek peptit profillemesi yapılmakta daha sonra buna bağlı olarak protein profillemesi yapılmaktadır (Şekil 2.4.). Aşağıdan yukarı yaklaşımı genel olarak iki farklı deneysel sistem üzerinden ilerlemektedir. Bu sistemlerden birincisi iki boyutlu jel elektroforez (2-D jel elektroforez) sistemidir. Bu sistem yaklaşık 30 yıldır kullanılmaktadır (25). Bu sistemde biyolojik örneklerden elde edilen proteom içerisindeki proteinler jel bazlı iki farklı ayırma tekniği ile analiz edilebilir hale getirilmektedir. Bu ayırım sonrasında proteinler peptitlerine parçalanarak kütle spektrometresinde analiz edilmektedir. 2-D jel elektroforez sisteminde proteinler ilk olarak jel bazlı izoelektrik odaklama yöntemi ile izoelektrik noktalarına göre ayrılmaktadır. Bu ayırım pH gradienti içerisinde elektriksel alan varlığında yapılmaktadır ve proteinler şeritlerin üzerinde izoelektrik noktalarına göre

dağılmaktadırlar. Şeritler üzerinde izoelektrik noktalarına göre ayrımı gerçekleşen proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrıldıkları sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforez (SDS-PAGE) ile yeniden farklı bir ayırma uğramaktadır. Bu basamakta yine elektriksel alan varlığında proteinler hareket ettirilmekte ve jel içerisinde molekül büyüklüklerine göre ayrılmaktadır. Protein karışımları 2 boyutlu bu sistemde ayrıldıktan sonra elde edilen jeller görüntüleme cihazlarında incelenmektedir (Şekil 2.5.). Jel görüntüleme cihazında belirlenen protein spotları kesilerek ve peptitlerine parçalanarak kütle spektrometresinde analiz edilmektedirler. Bu sisteme uygun olarak matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonlaştırma yöntemi (MALDİ) kullanılmaktadır (26). 2-D jel elektroforez bazlı sistemlerin en önemli avantajı proteinlerin spotlardan tek tek kesilerek kompleks karışımdan izole edilmesi ve kütle spektroskopisinde analiz edilmesi ile yüksek doğrulukta ve tekrar edilebilirlikte nitel analiz yapılabilmesidir.

2-D jel elektroforez sistemi bazı dezavantajlara sahiptir. Proteinlerin kütle spektroskopisi ile analizi öncesinde bir çok basamaktan geçmekte ve bununla birlikte yüksek miktarda örnek kaybı yaşanmaktadır. Jel görüntüleme ve spotlarının kesimi ile ilgili teknolojilerinin istenilen düzeye gelemediği için sadece miktarı fazla yani spot yoğunluğu yüksek olan proteinler belirlenip analiz edilebilmektedir. 2-D jel elektroforez sistemi ile karışık hücre proteomunun sadece çok küçük bir parçası analiz edilebilmektedir. Bu yöntem ile yapılan analizler çok pahalı ve uzun sürmektedir (27).



Şekil 2.5. İki boyutlu jel elektroforez uygulaması sonucu görüntüleme cihazında elde edilen protein dağılımı (Bio-rad uygulamaları)

Hücre proteomu son derece karmaşık bir yapı olduğundan yapı içerisinde bir kaç proteinin analizini yapıp bütün bir proteom hakkında yorum yapmak neredeyse imkansızdır. Geliştirilen jel bazlı sistemler izole proteinlerinin analizinde iyi sonuçlar verse bile proteom düzeyinde verdikleri bilgiler son derece sınırlı olmaktadır. Bu nedenle zaman içerisinde gelişen analitik teknikler ve biyoinformatik sistemler kullanılarak kromatografik bazlı proteomik çalışmalar geliştirilmiştir. Bu sistemlerin gelişmesinde Fenn ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalar günümüz çalışmaların temellerini atmış ve elektrosprey iyonlaşma kaynağını kullanarak sıvı kromatografisi ile kütle spektrometresi arasında elektrosprey iyonizasyonu ile büyük biyomoleküllerin analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Bu sistemin geliştirilmesi ile birlikte protein analizleri yapılabilir hale gelmiştir. John Bennett Fenn bu çalışmalarla elektrosprey iyonlaşma kaynağı alanında yaptığı katkılardan dolayı 2002 yılında Nobel ödülünü kazanmıştır (28), (29).

Kromatografik bazlı proteomik çalışmalarda kompleks protein karışımları, jelsiz izoelektrik odaklama veya SDS-PAGE gibi bazı fraksiyonlama işlemi sonrasında veya direkt olarak hiç bir fraksiyonlama işlemi yapmadan gerekli proteolitik enzimler yardımı ile peptitlerine parçalanmaktadırlar (30-35). Oluşan peptit karışımı ise sıvı kromatografisi (LC) yöntemi ile ayrılıp kütle spektroskopisinde analiz edilmektedir. Peptit karışımlarının LC yöntemi ile analizleri tek boyutta olduğu gibi (36-38) bazende iki boyutta (LC/LC) olabilmektedir (39-41). Bu sistemin en önemli avantajı karışık hücre proteomu içerisinde yüzlerce proteinin analiz edilebilmesidir. Yapılan çalışmalarda tek bir enjeksiyonda 500 ile 1000 arasında protein analiz edilebilmektedir (42). Ayrıca sıvı kromatografisi ve kütle analizörünün sağladığı yüksek hassasiyet nedeniyle eser miktarda bulunan proteinlerde analiz edilmektedir. Sistemin bir diğer avantajı ise 2-D jel bazlı proteomik yöntemlere göre daha az deneysel basamağa sahip olması ve daha kısa sürmesidir.

Aşağıdan yukarı yaklaşımı günümüzde proteomik çalışmalarda daha çok tercih edilmektedir. Bu tercihin en önemli sebebi yukarıdan aşağı yaklaşımının karışık proteom analizlerinde iyi sonuçlar vermemesi ve kütle spektrometrisi içerisinde analizi yapılacak olan proteinlerin iyonlaşmalarının peptit düzeyinde

yapılan çalışmalara oranla oldukça zor olmasıdır. Özellikle sıvı kromatografisi bazlı sistemlerin proteomik çalışmalarda kullanımıyla birlikte proteomik çalışmalarda aşağıdan yukarı yaklaşımı hızlı ve maksimum bilgi verebilen sistem haline gelmiştir (43, 44).

2.6.1. Bottom Up (Aşağıdan Yukarı) Yöntemi ile Yapılan Proteomik Çalışmalar

Aşağıdan yukarı proteomik çalışmalar birbiri ile devamlı ilişki içerisinde bulunan 3 ana başlıkta gerçekleştirilmektedir. En temel proteomik analiz; hücre, doku veya vücut sıvısı gibi biyolojik örneklerden elde edilen örneklerin iki farklı koşul altında protein miktarının (ekspresyonunun) yarı-nicel olarak belirlenmesidir. Bu çalışmalara kıyaslamalı proteomik çalışmalar denilmektedir. Organizmalara ait proteomların organizmanın yaşam döngüsünde ya da farklı koşullarda nasıl değiştiğini inceleyen proteomik alanıdır. Bu alan içerisinde proteomda yaşam döngüsü içerisinde değişen morfoloji ve proteom değişikliklerinin incelenmesi, hastalıkların oluşum döngülerinin değerlendirilmesi ve bu süreçte gözlemlenebilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi, hastalık üzerinde tedavi süreçlerinin protein seviyesinde izlenmesi, yeni ilaç etken moleküllerinin hastalıklar üzerindeki etkisinin incelenmesi gibi çalışmalar bulunmaktadır (25, 37, 45-50).

Yapısal proteomik çalışmaları proteinlerin 3 boyutlu yapılarının aydınlatılması ve proteinler üzerinde meydana gelen transkripsiyon sonrası modifikasyonların belirlenmesini kapsamaktadır. Bugün bir çok önemli hastalığın protein modifikasyonlarından ve proteinlerin 3 boyutlu yapılarında bulunan noksanlıklardan kaynaklandığı bilinmektedir. Bu hastalıklara ait ilaç moleküllerinin geliştirilmesi yine yapısal proteomik sonuçlarına bağlı olmaktadır. Aşağıdan yukarı çalışmalarda proteinlerin üç boyutlu yapısının aydınlatılmasında döteryum/hidrojen değişimi ve farklı işaretleme metotları kullanılmaktadır (51). Yapısal proteomik alanında aşağıdan yukarı ile çalışmalar yapılmaktaysa da bu alanda en iyi sonucu NMR bazlı proteomik çalışmalar ve yukarıdan aşağı proteomik çalışmalar vermektedir (52-57).

İşlevsel proteomik çalışmalar proteinlerin hücre içerisindeki görevlerinin

belirlenmesi ve hücre içerisinde gerçekleşen olayların moleküler seviyede incelenerek mekanizmalarının çözülmesi ile uğraşmaktadır. Bu çalışmalarda hücre içerisinde bulunan proteinlerin görevleri belirlenirken bu proteinlerin diğer proteinlerle olan etkileşimleri incelenmektedir. Afinite bazlı sistemlerin gelişmesi ile birlikte etkileşim halindeki proteinler sistemden izole edilmektedir. Sonrasında ise analizleri yapılmaktadır. Kompleks proteom yapısı düşünüldüğünde ise bu çalışmaların çok kolay olmadığı görülmektedir (38, 58-60).

2.7. Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi (LC/MS) Bazlı Aşağıdan Yukarı Proteomik Çalışmalar

LC/MS proteomik çalışmalar 2000'li yılların başında ilk defa kompleks proteom yapıları için kullanılmıştır (61, 62). Gelişen biyoinformatik sistemler ve analitik yöntemlerle LC/MS proteomik analizleri konusunda her yıl daha çok çalışma yapılmaktadır.

LC/MS proteomik çalışmaları diğer omik (genomik, transkriptomik ve metabolomik) çalışmalar gibi disiplinler arası bir alandır. Analizlerin kalitesi bir çok deneysel basamağın uyumlu ve birbirini destekleyici şekilde çalışmasına bağlıdır. Proteinlerin LC/MS bazlı aşağıdan yukarı proteomik çalışmalarda analizleri birbirini takip eden 3 basamaktan meydana gelmektedir. Bu deneysel basamaklar;

- 1) Örnek hazırlama,
- 2) LC/MS ile peptitlerin analizi,
- 3) LC/MS verilerinin biyoinformatik sistemlerle değerlendirilmesidir.

2.7.1. Örnek Hazırlama

Proteomik çalışmaların kalitesini belirleyen en önemli basamak örnek hazırlama basamağıdır. Proteomik çalışmalar hücre, doku, vücut sıvıları gibi çok karışık ortamlarda gerçekleştirilmektedir. Bu ortamlarda yapılan proteomik çalışmalarda binlerce protein bulunmaktadır ve bu proteinlerin derişimleri arasındaki fark bazı durumlarda 10^8 mertebesine kadar ulaşmaktadır (63). Örnek hazırlama basamağında bir çok protein kaybedilmektedir. Bunun önüne geçebilmek için mümkün olduğunca az basamağa sahip deneysel prosedürler ve örnek türüne

en uygun kimyasal maddeler seçilmelidir. Ayrıca kontaminasyona karşı özel bir dikkat gösterilmelidir. Özellikle hücre biyolojisinde kullanılan bir çok kimyasal maddenin proteinlerden uzaklaştırılması ve dışardan gelebilecek keratin gibi proteinlerin kirlilik olmaması için büyük bir dikkat gösterilmelidir (64).

Örnek hazırlama işlemi hücrelerden lizatların hazırlanması, dokuların homojenizasyonu ve vücut sıvılarının hazır hale getirilmesi ile başlamaktadır. Hücre içerisinde bulunan proteinlerin analiz edilebilmeleri için yapılarını koruyabilecekleri bir ortam içerisinde bulunmaları gerekmektedir (65). Hücreler için bu ortamın yaratılması fiziksel ve hassas liziz teknikleri ile yapılabilmektedir. Fiziksel liziz sistemlerinde sonikasyon, french press ile ezme, numune öğütme kiti kullanımı ve çeşitli ajanlarla birlikte vorteks kullanımı gibi değişik yöntemler kullanılmaktadır (66). Hassas liziz teknikleri ise osmotik liziz, tekrarlı dondurma - çözme, deterjan kullanılması ve enzimatik liziz olarak sınıflandırılmaktadır (67). Hücrelerin yapılarının bozulup parçalanması ile birlikte oluşan yapıya lizat denilmektedir.

Lizatların hazırlanmasından sonra diğer basamak proteinleri kimyasal veya fiziksel olarak bağlı oldukları diğer biyomoleküllerden ayırma işlemidir (68). Bazı durumlarda fiziksel ve kimyasal etkileşimler proteinlerin ayrılmasını ve analizini inhibe edebilmektedir. Bunlara en güzel örnek lipidlere bağlı durumda bulunan membran proteinleri ve DNA'ya karşı yüksek afiniteye sahip transkripsiyon faktörleri proteinleridir. Diğer moleküllerle yüksek etkileşime sahip bu proteinleri uzaklaştırmak ve analiz edebilmek oldukça güçtür. Birçok çalışmada bu proteinler ya diğer moleküllerden hiç ayrılmadığı yada analize yetecek miktarda ayrılmadığı için gözlemlenememektedir. Örneklerde mümkün olan en fazla proteinin, mümkün olan en fazla miktarda, diğer moleküllerden ayrılması gerekmektedir (69).

Proteinlerin diğer hücre moleküllerinden ayrılması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler içerisinde organik çözücülerle çöktürme yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Trikloroasetik asit, aseton, metanol, kloroform gibi organik çözücüler proteinlerin çöktürülmesinde kullanılmaktadır. Organik çözücülerin en büyük avantajı hücre lizatlarının hazırlanmasında kullanılan ve kütle spektroskopisi ile uyumlu olmayan deterjanların rahatlıkla ve kısa sürede proteinlerden uzaklaştırmalarıdır (70). Kullanılan diğer yöntemler ise amonyum

sülfat gibi tuzlarla çöktürme, ultrafiltrasyon yöntemi, jelsiz izoelektrik odaklama yöntemi, termal yöntemler ve son olarak hem proteinlerin ayrılması hem de proteinlerin ön fraksiyonlama işleminde kullanılan SDS-PAGE elektroforez sistemleridir (71-76).

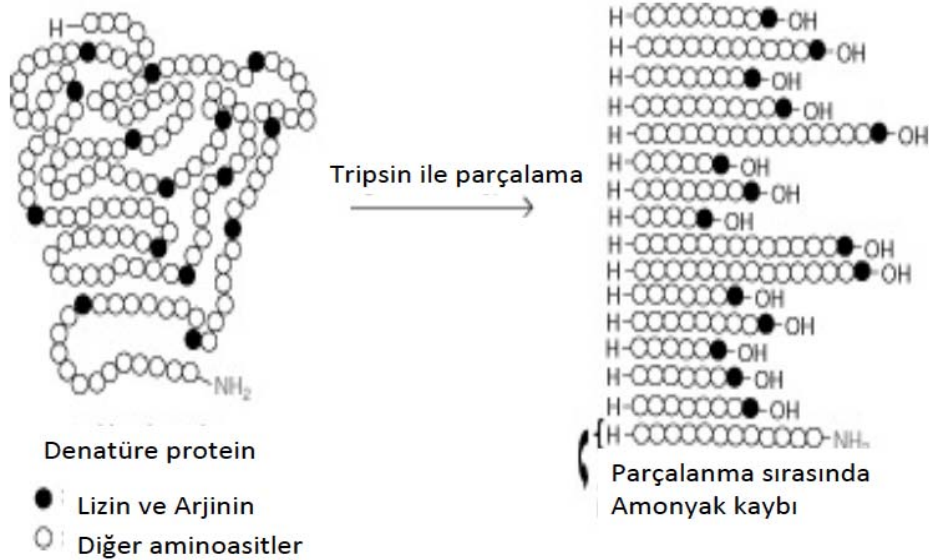
Çöktürülen proteinler çöktürücü ajanlardan tamamen temizlendikten sonra yeniden uygun bir çözücüde çözünmelidir. Kullanılan örnek türüne göre kullanılan çözücü değişebilmektedir. Proteinlerin yeniden çözünmesi için amonyum bikarbonat çözeltisi sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca üre gibi çeşitli deterjanlar kullanılmaktadır (77-79). Proteinlerin çöktürüldükten sonra yeniden çözünmesi kolay bir işlem değildir. Öncelikle proteinler çözücü içerisinde süspansiyon oluşturmaktadır. Oluşan süspansiyon vorteks ve sonikatör yardımı ile örnek türüne göre değişen sürelerde çözelti haline gelmektedir (76, 80, 81).

Proteinler yeniden çözüldükten sonra çözelti içerisinde denatüre hale getirilmelidir. Bunun için çözelti içerisinde bulunan proteinlerin disülfid köprüleri parçalanarak tersiyer yapıları bozulmalıdır. Ditiyotreitol (DTT), 2-merkaptoetanol veya tris (2-karboksietil) fosfin proteinlerin disülfid bağlarının koparılmasında sıklıkla kullanılan maddelerdir. Bu işlem sırasında ortam sıcaklığı bazen 56 °C' ye kadar yükseltilebilir. İnkübasyon süresi ise kullanılan ajanların konsantrasyonlarına ve ortam sıcaklığına göre değişmektedir (82, 83).

İndirgenen proteinlerin yeniden disülfid bağlarını oluşturamaması için sistein içerisindeki tiyol gruplarına kovalent bağlarla bağlanan iyodo asetamid veya akrilamid türevleri eklenmektedir (84, 85). İyodo asetamid kullanımında ortamın karanlık olması gerekmektedir. Genellikle 30 dk inkübasyon süresi yeterli olmaktadır.

Örnek hazırlama işleminin son basamağı ise proteinlerin peptitlere parçalanması işlemidir. Proteinlerin peptitlere parçalanma işlemi enzimatik veya kimyasal yollarla yapılabilmektedir. Proteomik çalışmalarda genellikle enzimatik protein parçalama işlemi yapılmaktadır. Enzimatik parçalama işleminde proteolitik enzimler vasıtasıyla özel kırılma noktalarından proteinler parçalanmakta ve peptitler oluşmaktadır. Tripsin gerek ekonomik oluşu gerekse yüksek verimliliği nedeniyle proteomik çalışmalarda en çok kullanılan proteaz enzimidir. Tripsin, protein yapısı içerisinde Lizin (Lys) ve Arjinin (Arg) bulunan C-merkezli peptit

bağını kırmaktadır (86) (Şekil 2.6). Lys ve Arg proteinlerde göreceli olarak yüksek miktarda bulunmaktadır ve iyi bir dağılıma sahiptir. Bu nedenle tripsin kullanımı yüksek verim sağlamaktadır. Tripsin ile oluşan peptitler yaklaşık 14 aminoasit bulundurmakta ve en az 2 tane pozitif yük taşımaktadır (87). Bu özellikler kütle spektrometrisi çalışmaları için optimum niteliktedir (88).



Şekil 2.6. Tripsin ile proteinin parçalanması ve peptit oluşum

Bir çok proteomik çalışmada tripsin tek başına protein karışımlarının parçalanmasında kullanılırken son yıllarda Arg-C, Asp-N, Glu-C ve Lys C endoproteinazlar tripsin ile birlikte kullanılmıştır (89). Kombine protein parçalama sistemlerinin kullanılmasıyla çok daha fazla sayıda peptit elde edilerek analiz verimi arttırılmıştır.

Aşağıdan yukarı proteomik çalışmalarda proteinlerin parçalama işlemi iki koşul altında gerçekleşebilir. Bunlardan bir tanesi proteinlerin jel içerisinde parçalanması (in-gel digestion) diğeri ise proteinlerin çözelti içerisinde parçalama (in-solution digestion) işlemidir. LC bazlı proteomik çalışmalarda genellikle çözelti içerisinde proteinlerin parçalanması yapılmaktadır. Çünkü jel içi protein parçalama işleminin dezavantajı peptitler jelin içerisinde parçalandıktan sonra jel dışına alınması gerekmektedir ve bu işlem esnasında oldukça madde kaybı olmaktadır.

Enzimlerle proteinleri parçalama işlemi için optimum şartların sağlanması

gerekmektedir. Bu şartlar enzimin maksimum aktiflik gösterdiği sıcaklık ve pH değeri ve enzim/protein oranıdır. Örneğin tripsin enziminin optimum verim verdiği sıcaklık 37 °C, en aktif olduğu pH değeri yaklaşık olarak 8.5 ve optimum enzim/protein oranı 1/20 ile 1/100 (a/a) aralığı içerisindeydir. Ayrıca tripsin ile proteinin optimum inkübasyon süresi 18 saate kadar sürmektedir (82, 90).

Enzimlerle parçalama işlemi sonrasında oluşan peptit karışımının enzimden zarar görmemesi için parçalayıcı enzimlerin inhibe edilmesi gerekmektedir. Tripsin ile parçalama sonrasında tripsinin peptitlere zarar vermemesi için ortamın pH değeri veya sıcaklığı değiştirilmektedir. Sonrasında peptit karışımları LC yöntemi ile analiz edilebilecek şekilde hareketli faz ile seyreltilmelidir.

2.7.2. Proteomik Analiz Yöntemleri

Proteomik çalışmalarda analiz yöntemleri olarak sıvı kromatografisi (LC) kütle spektrometresi (MS) ve NMR kullanılmaktadır.

Sıvı Kromatografisi (LC)

Kompleks peptit karışımlarının daha basit fraksiyonlar halinde kütle spektrometresinde analizi için bugün kullanılan en geçerli yöntemlerin başında LC yöntemi gelmektedir. LC hareketli ve sabit faz olmak üzere iki fazlı bir sistemden meydana gelmektedir. Peptitler kolon içerisinde hareketli faz ve sabit faz ile birbirlerinden farklı bir dengede etkileşerek kolon içerisinde ayrılmakta ve kütle spektroskopisine farklı zamanlarda gitmektedirler.

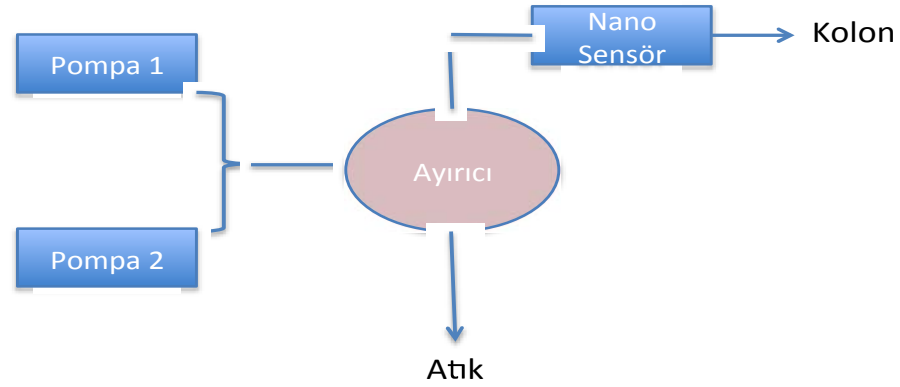
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazlarının geliştirilmesiyle yüksek ayırıcılık, duyarlılık, tekrar edilebilirlik ve sağlamlık özelliklerine sahip bir sistem haline gelmiştir. Geliştirilen klasik HPLC sistemi Tablo 2.1 de görüldüğü gibi yaklaşık 3-10 µm parçacık çaplı kolonlar kullanılmaktadır. Sonraki yıllarda gelişen sistemlerle birlikte kolon içerisindeki parçacık çapları küçültülerek ve basınç yükseltilerek ultra basınçlı sıvı kromatografisi (UPLC) sistemleri geliştirilmiş daha kısa süre içerisinde daha etkin analizler yapılmıştır. UPLC sistemleri ile birlikte 2 µm altında çapa sahip parçacıklar kullanılmaya başlanmıştır. Geliştirilen yeni pompa sistemleri ile birlikte 1000 bar seviyesine kadar basınçlar ulaşılabilir hale gelmiştir (91). Kolon ve pompa teknolojisindeki gelişim sayesinde

kolonda çok daha etkin bir ayırım gerçekleşirken analiz süresi ve kullanılan kimyasal miktarı HPLC'ye göre azalmıştır. Sonraki yıllarda gelişen teknoloji UPLC ile de sınırlı kalmamıştır. Gelişen kolon teknolojisi ile birlikte kolon içerisindeki sabit faz parçacıklarının gözenek boyutları değeri giderek artmıştır ve daha yüksek ayırıcılık sağlanmıştır. Gelişen bu yüksek ayırıcılıkla birlikte biyomoleküllerin özellikle peptitlerin ayrılması mümkün hale gelmiştir. Kompleks peptit karışımlarının ayrılması için tercih edilen sistemler gözenek boyutu 100Å ve üstü olan kolonlardır (92).

Proteomik çalışmalarda kullanılan biyolojik örneklerden elde edilen protein miktarları sınırlı olmaktadır. Bu nedenle duyarlılığı son derece yüksek sistemlerle çalışılması gerekmektedir. Bu ihtiyaca cevap verecek şekilde geliştirilen nano elektro sprey iyonlaşma (nano-ESI) kaynakları 300 nL/dk ile çalışmaktadır. Bu sisteme entegre olacak sıvı kromatografisi ise bu akış hızını karşılayacak şekilde geliştirilmiş nano-LC ve mikro-LC sistemleridir (93). Tablo 2.1'de görüldüğü gibi bu akış hızında çalışabilmek için kolon iç çapının 75 µm' ye kadar düşmesi gerekmektedir. Bu akış hızında böyle bir kolonun kullanılması ise HPLC veya UPLC pompa düzenekleri ile sağlanamaz. Bu nedenle bu sisteme uygun nano pompalı ya da normal UPLC pompasının modifiye edilmiş versiyonu kullanılmaktadır. Modifiye edilmiş UPLC pompaları, normal pompa sisteminin devamına basit bir elektronik ayırıcı konularak akışı ikiye bölen sistemlerdir. İkiye bölünen akışın bir kısmı nano akış hızında sisteme giderken büyük bir kısmı atık olarak atılmaktadır (Şekil 2.7.)

Tablo 2.1. Sıvı Kromatografisi türleri, kolon iç çapları ve akış hızları

Tür	Kolon İç Çapı	Akış Hızı
Nano LC	75 µm	100-300 nL/dk
Mikro-LC	150-800 µm	300nL/min-100 µL/dk
UPLC	1.1mm-2.1mm	100-500 µL/dk
HPLC	4.6 mm	1-2.5 mL/dk

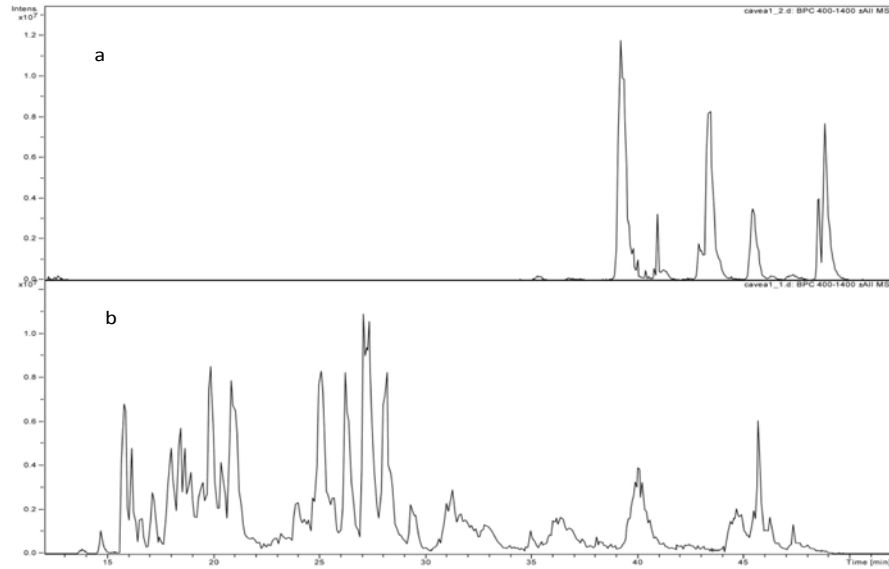


Şekil 2.7. Nano LC için modifiye edilmiş UPLC pompa sistemi

Yapılan analizlerde kompleks peptit karışımı içerisinde miktarı düşük olan peptitlerin diğer peptitler tarafından baskılanmasını önlemek için MS öncesi ayırma işlemi LC ile yapılmaktadır. LC sistemleri içerisinde duyarlılığı en yüksek nano LC yöntemidir. Nano LC yönteminde ortalama akış hızı 300 nL/dk kullanılan kolon çapı ise 75 μm 'dir. Yüksek duyarlılığına rağmen sistemin doğasından kaynaklı tekrarlanabilirlik, ölü hacim ve tıkanma riski gibi problemler çalışmayı güçleştirmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında UPLC üzerinde durulmuştur. Nano LC sistemleri çok az protein miktarı (20-100 ng) ile bütün bir proteomu analiz edebilmektedir. Bu özellikle jel bazlı sistemlerle karşılaştırıldığında büyük bir avantaj sağlamaktadır. Örneğin 2-D jel elektroforez sisteminde kullanılması gereken minimum protein miktarı yaklaşık 300 μg olmakla birlikte en az 3 tekrar yapıldığı düşünüldüğünde biyolojik materyallerden çok ciddi bir protein gereksinimine ihtiyaç duyulmaktadır. Nano LC sistemleri gösterdikleri yüksek duyarlılık ve buna bağlı olarak az miktarda örnek kullanımı nedeniyle proteomik çalışmalarda kullanılmaktadır. Ancak nano LC sistemlerinin bazı dezavantajları vardır. Nano LC'nin dezavantajları;

- 1) Modifiye UPLC pompaya sahip sistemlerde görülen dengesiz geri basınç akış hızını etkilemektedir. Pompa sonrasında akışın ikiye ayrılması sırasında oluşan geri basıncın yarattığı dengesizlik akış hızında dalgalanmalar yaratmaktadır. Bunun sonucu olarak peptitlerin alıkonma zamanlarında enjeksiyonlar arasında sapmalar gözlenmektedir.

- 2) Nano LC sistemleri bilinen HPLC sistemlerin minyatürize edilmiş halidir. Bu sistem içerisindeki bütün bağlantıların nano boyuta indirgenmesi gerekmektedir. Bu işlem bazı noktalarda problem yaratmaktadır. Bağlantı yerlerinde oluşabilecek küçük boşluklar normal HPLC veya UPLC sistemlerinde önemli olmazken nano LC sistemlerinde analizi tamamen değiştirebilmektedir. Özellikle kolonun çıkış noktasında ve nano elektrosprey iğnesi içerisinde oluşabilecek boşluklar kolon içerisinde ayrılan peptitlerin yeniden karışmasına sebep olmaktadır. Oluşabilecek bu duruma ölü hacim etkisi denilmektedir. Şekil 2.8' ölü hacim etkisinin kromatogramda görülmesine bir örnektir (94).



Şekil 2.8. 1 pmol sığır serum albüminin nano LC ile analizi, a) Sistemde ölü hacim varken oluşan kromatogram b) Ölü hacim problemi çözüldükten sonra elde edilen kromatogram (94).

- 3) Nano LC sistemlerinde bütün bağlantıların iç çapları son derece küçük olduğu için sistemin tıkanma riski ve zarar görme riski çok yüksektir. Sistem içerisinde kullanılan hareketli fazların çok dikkatli hazırlanması gerekmektedir. Ayrıca sistemin temizliği her analiz sonrası ve günlük olarak

yapılmalıdır. Bütün bu önlemlere rağmen sistem içerisinde bulunan bağlantılar düzenli aralıklarla değiştirilmelidir.

- 4) Nano LC sistemlerde kullanılan ortalama akış hızları 300 nL/dk'dır. Bu akış hızında sistemde oluşabilecek sızıntıların tespiti oldukça güç olmaktadır. Özellikle kolonun çıkış bölgesinde meydana gelebilecek sızıntıların gözlenebilmesi son derece zordur. Nano LC ile çalışabilecek özel analizcilerin olması gerekmektedir.

Bu dezavantajları ortadan kaldırmak ve daha güvenilir, kolay proteomik çalışmalar yapmak için UPLC sistemi seçilmiştir. Sayısı çok sınırlı olmakla birlikte kaynaklarda bir kaç çalışma bu alanda yapılmıştır. 2012 yılında Percy ve arkadaşları hedeflenmiş proteomik çalışmalarında UPLC ve nano LC sistemlerini karşılaştırmıştır. Proteomik kapsamında, peptitlerin nitel ve nicel analizlerinde, UPLC'nin, nano LC kadar iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Yine Percy ve arkadaşları hücre hatlarının protein profillemeye çalışmalarında nano LC ile UPLC'nin hemen hemen yakın sonuçlar verdiğini bulmuştur (95). 2015 yılında Nino ve arkadaşları prokaryot ve ökaryot hücrelerinde proteomik çalışmalar yapmış ve standart akış hızına sahip UPLC kullanmışlardır. Kullandıkları sistem hem prokaryot hemde ökaryot hücrelerde yaklaşık olarak 1000 'e yakın proteinin nitel analizini yapabilmişlerdir (96). Elde edilen sonuçlar ışığında özellikle hücre hatları ile yapılan çalışmalarda uygun UPLC yöntemlerinin proteomik çalışmalarda kullanılabileceği görülmüştür.

LC içerisinde ters faz sıvı kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi ve hidrofilik etkileşim kromatografisi (HİLİC) proteomik çalışmalarda kullanılmıştır (97). Bazı çalışmalarda iki kromatografik sistem birleştirilerek iki boyutlu ayırım sağlanabilmiştir. Bu çalışmalarda genellikle peptit karışımları öncelikle iyon değiştirme kromatografisinden geçirildikten sonra ters faz sıvı kromatografisi ile analiz edilmiştir (98).

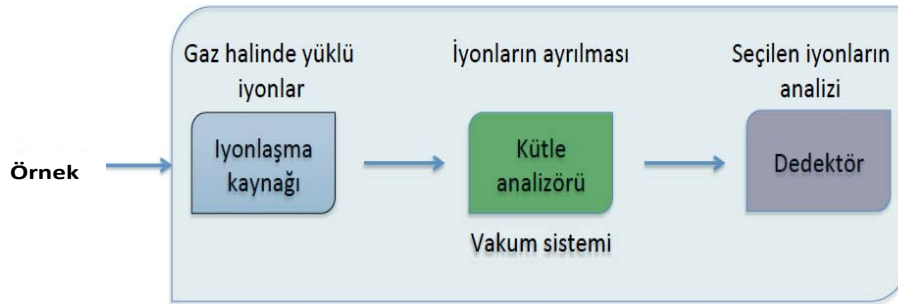
Ters faz sıvı kromatografisi proteomik çalışmalarda en sık kullanılan sistemdir. Peptitler polaritelerine göre apolar sabit faz (genellikle C18 kolon) ile ayrılmaktadırlar. Bu sistem içerisinde hareketli faz olarak su ve asetonitril gibi su ile çözünebilen organik çözücüler kullanılmaktadır (99). Hareketli faz içerisinde

formik, asetik veya trifloroasetik asit gibi asitler peptitleri pozitif yüke çevirmek ve sabitfaz ile peptitler arasında istenmeyen iyonik etkileşimleri azaltmak için kullanılmaktadır. Ters faz sıvı kromatografisi yüksek ayırıcılık özelliğine sahip olduğu için tek boyutlu olarak proteomik çalışmalarda kullanılmıştır (100). Ayrıca yukarıda belirtildiği gibi diğer kromatografik yöntemlerde son ayırma işleminin yapıldığı yer olarak kullanılmıştır.

Kütle Spektrometrisi (MS)

Kütle spektrometresi LC ile ayrılan peptitlerin analizinde kullanılır. Kütle spektrometrisi parçalanma ürünlerine ait iyonların kütle/yük (m/z) değerini ölçülerek moleküler ağırlıklarının hesaplanmasında ve moleküler yapının tayininde kullanılan analitik yöntemlerden biridir.

Kütle spektrometresinin bölümleri Şekil 2.9.'da verilmiştir. Kütle spektrometreleri bir vakum sistemi altında çalışmaktadır. Vakum sistemi istenmeyen iyon molekül etkileşimlerini en aza indirerek iyonların geçişini ve stabil bir şekilde belirlenmesini sağlamaktadır.



Şekil 2.9. Kütle spektrometresinin bölümleri

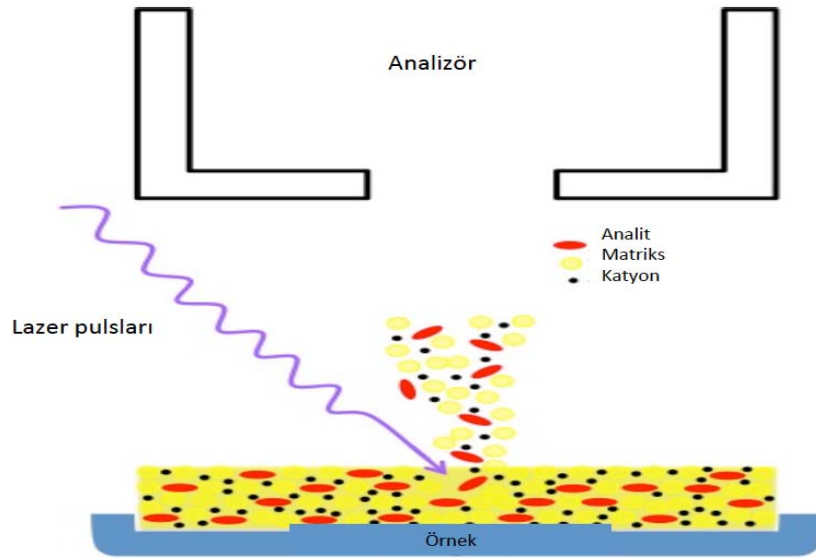
İyonlaşma Kaynakları

İyonlaşma kaynakları kütle spektrometresinde giriş kısmında bulunmakta ve kütle analizöründe ayırımı yapılacak iyonları oluşturmakla görevlidir. İyonlaşma kaynağının verimi kütle spektrometresinden elde edilecek sonuçların kalitesini etkileyen en önemli parametredir. İyonlaşma kaynakları yüksek hassasiyet ve hıza sahip olmalıdır. Özellikle kombine sistemlerde bu iki gereksinim eksiksiz yerine

getirilmelidir (101). Günümüzde bir çok iyonlaşma kaynağı mevcuttur. İyonlaşma kaynakları genel olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Birinci sınıf kaynaklar örneklerin öncelikle buharlaştırılıp daha sonra iyonlaştırıldığı gaz faz iyon kaynaklardır. Gaz faz iyon kaynakları; elektron bombardımanı, kimyasal iyonlaştırma, ve alan iyonizasyon kaynaklarıdır. Kullanılan diğer iyonlaştırma kaynağı sınıfı ise desorpsiyon kaynaklarıdır. Burada örnekler sıvı ya da katı fazdan gaz halinde iyonlaştırılmaktadırlar. Desorpsiyon kaynakları; alan desorpsiyon, elektrosprey, matriks destekli desorpsiyon, hızlı atom bombardımanı, termo sprey iyonlaşma kaynaklarıdır (102).

Proteomik çalışmalarda 2 farklı tür iyonlaşma kaynağı kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi 2 boyutlu jel elektroforez sisteminde kullanılan matriks destekli lazer desorpsiyon iyonlaştırma (MALDİ) tekniğidir (103). MALDİ ile birlikte proteinlerin yanısıra (104, 105), DNA (106-108), lipidler (109-111) ve glikokonjuge (112) yapılar analiz edilebilmektedir.

Şekil 2.10'da görüldüğü gibi bu sistem içerisinde örnek kendisine göre çok fazla miktarda bulunan matriksin içerisine gömülü bir şekilde yerleştirilmektedir. Yapılan bu karışım MALDİ plakası üzerine yerleştirilerek kuruması beklenir. Kuruyan ve krisitalize hale gelen karışıma kısa pulslu lazer ışını gönderilmektedir. Lazer ışınını absorplayan matriks direkt olarak süblimleşir ve bu sırada örnek molekülleri gaz fazına geçmektedir bu arada gerçekleşen çarpışmalar sonucunda ise yüklü iyonlar oluşmaktadır. Çarpışmalar sonucunda negatif ve pozitif yükler oluştuğu için MALDİ içerisinde hem pozitif hemde negatif mod ile çalışılmaktadır (113, 114).

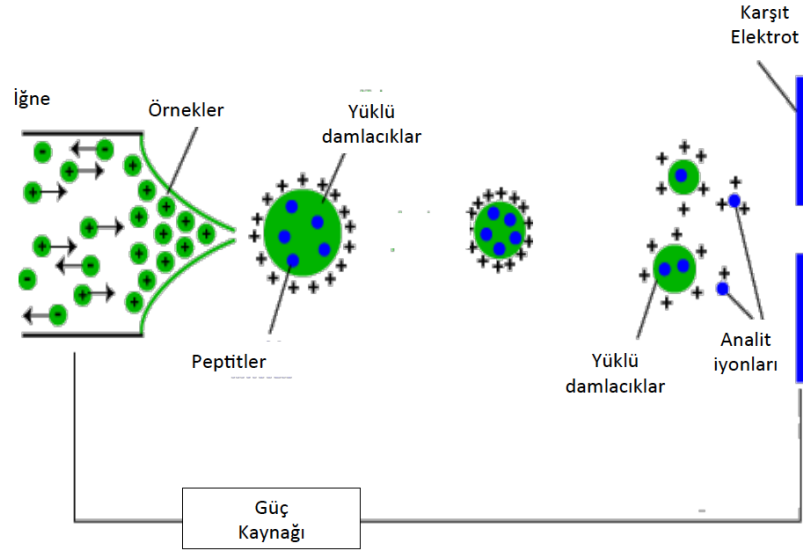


Şekil 2.10. MALDI iyonlaşma kaynağı

Aşağıdan yukarı proteomik çalışmalarda kullanılan diğer iyonlaşma kaynağı ise elektrosprey iyonizasyon (ESI) sistemidir (115). Bu sistemin en büyük avantajı kromatografik sistemlerle entegre bir şekilde çalışabilmesidir. ESI'nun geliştirilmesi ile proteinlerin yanında diğer biyomoleküllerin (lipidler, karbonhidratlar, nükleotidler, organik yada inorganik bileşikler) analizleri rahatlıkla yapılabilmektedir (116-120). Özellikle LC ile uyumlu bir arayüzey olarak çalışması ve yüksek sayıda gaz fazında iyon elde edilebilmesi sistemi vazgeçilmez yapmaktadır. İlk olarak 1937 yılında Chapman tarafından keşfedilmiş olmasına rağmen 1980'lere kadar yaygın bir kullanıma sahip olamamıştır. Fenn ve arkadaşları sistemi ara yüzey olarak kullanmaya başlamış ve biyomoleküllerin analizlerini gerçekleştirmişlerdir (121).

Şekil 2.11' de görüldüğü gibi kromatografik fraksiyonlama sonrasında sisteme gelen iyonik türler yüksek elektriksel alan varlığında elektrosprey iğnesinden hızla çıkmaktadır. İyonik türler iğneden çıkarken Taylor konisi adını alan şekli alacaktır. Taylor konisi dışarda püskürtme olarak görmektedir. Püskürtülen yüklü damlacıklar, elektriksel alan varlığında, kapilere doğru hareket etmektedir. Bununla birlikte kaynak içerisinde uygulanan yüksek sıcaklık çözücüyu buharlaştırarak yüklü damlacıklardan uzaklaştırmaktadır. Çözücünün buharlaşması belirli bir süre sonra damlacıklarda dengesizlik yaratmaktadır. Çözücünün

sistemden uzaklaştırılması ile birlikte damla içerisindeki aynı yüklerin birbirini itmesi bir süre sonra yüzey gerilimine karşı baskın gelmekte ve bu durumda parçalanmalar, büyük damlalardan küçük damlalar oluşmaktadır. Oluşan bu yeni damlalarda da aynı süreç yaşanmaktadır (122). Sonuç olarak sistem içerisinde yüklü iyonlar çözücülerden ayrılarak kütle analizörüne gönderilmektedir.



Şekil 2.11. Elektrosprey iyonizasyon kaynağı.

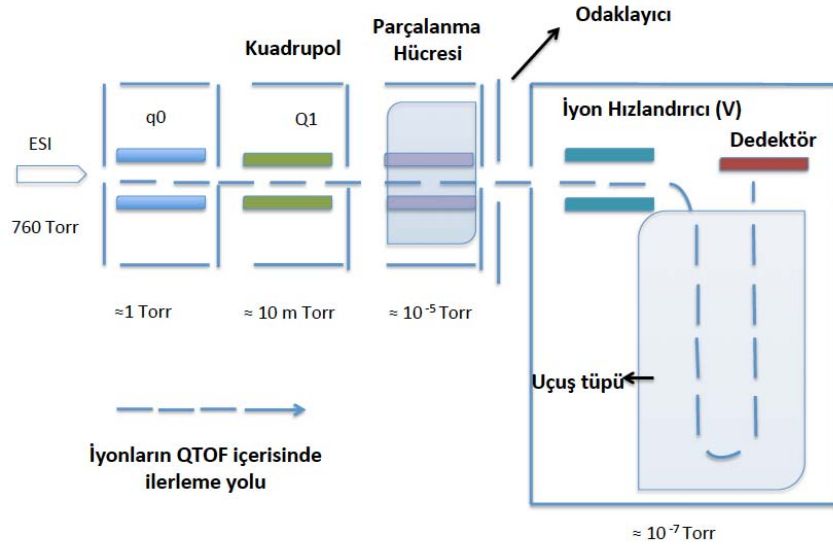
Kütle Analizörleri

İyon kaynağında oluşan iyonları m/z değerlerine göre ayıran sistemlere kütle analizörleri denilmektedir. Proteomik çalışmalarda çoğunlukla kullanılan analizörler kuadrapol analizörü (Q), uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF), iyon siklotron rezonans analizörü (FTICR), iyon kapanı analizörü (IT) (doğrusal iyon kapanı (LIT) veya kuadrapol iyon kapanı (QIT)) ve son olarak orbitrap analizörüdür. Bu analizörler çoğunlukla hibrid yapılarda kombine bir şekilde (Q-TOF, Q-Q-Q, TOF-TOF, LTQ-FTICR) proteomik çalışmalarda kullanılmaktadır.

İyon tuzaklı kütle analizörleri başta orbitrap olmak üzere sağladıkları yüksek ayırıcılık (rezolüsyon) ve kütle doğruluğu nedeniyle proteomik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (123-127).

Özellikle son yıllarda gelişen iyon tuzaklı ve orbitrap sistemlere karşı uçuş zamanlı kütle analizörleri (TOF) proteomik çalışmalarda alternatif olarak sıklıkla

kullanılmaktadır. Sistemin çok hızlı tarama yapabilmesi yaşam süresi kısa olan türlerin analizlerinde büyük bir avantaj sağlamaktadır, ayrıca iyon tuzaklı sistemlerde sıklıkla gözlemlenen boş yükler (space charge) TOF içerisinde gözlemlenmemesi sisteme bir başka avantaj sağlamaktadır. TOF içerisinde iyonların ayrılmasında magnetik etki bulunmamaktadır. Analizöre gelen iyonlar elektrik alanı pulsu ile hızlandırılır. Hızlandırılmış iyonlar elektriksel alan bulunmayan ayırım tüpüne geçirilir. Buraya gelen bütün iyonlar aynı kinetik enerjiye sahip oldukları için hafif türlerin daha hızlı hareket etmeleri gerekmektedir. Böylece sistemden önce hafif daha sonra ise ağır türler çıkmaktadır. 2D-jel elektroforez bazlı proteomik çalışmalarda MALDİ-TOF en çok kullanılan sistemdir (26, 128-135). LC bazlı proteomik çalışmalarda da sıklıkla kullanılan TOF analizörü kuadropole ile birlikte QTOF sistemini oluşturmaktadır (136-141). Şekil 2.12’de verildiği gibi ESI’den gelen iyonlar ilk olarak filtre görevine sahip kuadropol sistemine gelmektedir daha sonra iyonların parçalandığı ve MS/MS verilerinin elde edilmesini sağlayan parçalama kısmına gelmektedir. İyonların parçalanması proteomik çalışmalarda peptitlerin parçalanma ürünlerinin elde edildiği kısımdır. Genellikle çarpışma indüklü parçalanma sistemi kullanılmaktadır (CID). Bu sistemde belirli bir potansiyel uygulanarak hızlandırılan iyonlar inert bir gaz ile çarpıştırılmakta ve bu işlem sonucunda parçalanma ürünleri oluşmaktadır. En son kısımlar ise TOF analizörü içerisindeki iyonların hızlandırıldığı modül ve iyonların ağırlıklarına göre ayrıldığı tüptür.



Şekil 2.12 QTOF şematik gösterimi

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

Atom çekirdeklerinin belirli manyetik özelliklerini kullanan bir analiz yöntemidir. Molekülün içindeki atomun ya da molekülün fiziksel ve kimyasal özellikleri, yapısı, dinamiği, reaksiyon durumu ve molekülün kimyasal çevresi, hakkında bilgi vermektedir. Proteomik çalışmalarda NMR proteinlerin 3 boyutlu yapılarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır.

Tarama bazlı proteomik sistemler

Proteinlerin farklı koşullarda değişimlerinin incelenmesinde kullanılan tarama bazlı yöntemler antikör-antijen etkileşimine dayalı sistemlerdir. Bu sistemlerde bir veya bir kaç proteinin takibi yapılabilmektedir.

2.7.3. Peptitlerin LC ile ayrılması

Örnek hazırlama ile elde edilen peptit karışımının direkt kütle spektroskopisinde analizi çeşitli sıkıntıları içermektedir. Kompleks peptit karışımlarında miktarı düşük olan peptitler diğer peptitler tarafından baskılanacağı için kütle spektroskopisinde analizi oldukça zordur. Bu nedenle kütle

spektroskopisi öncesi peptit karışımları ayrılarak analiz edilmesi gerekmektedir. Böylece sistemin verimi artmaktadır.

2.7.4. Peptitlerin MS Analizi

Peptit karışımları LC ile ayrıldıktan sonra kütle spektrometresine gelmektedir. Kütle spektrometri yöntemi parçalanma ürünlerine ait iyonların kütle/yük (m/z) oranlarını ölçerek moleküler ağırlıklarının hesaplanmasında ve moleküler yapının tayininde kullanılan gelişmiş analitik sistemdir (12). Bu sistemlerin analizleri 3 basamakta gerçekleşmektedir.

- 1) İlk olarak moleküllerin iyonlaşma kaynaklarında gaz halinde iyonlaştırılması gerçekleştirilmektedir.
- 2) İyonların kütle analizörleri içerisinde elektriksel ya da manyetik alan varlığında m/z oranlarına göre ayrılması sağlanmaktadır.
- 3) Son olarak ayrılan iyonların bulunma miktarları ile orantılı olarak tespiti yapılmaktadır (122).

2.7.5. LC/MS Verilerinin Biyoinformatik Sistemlerle Analizi

Biyoinformatik; biyolojik verilerinin bilgisayar programları ile incelenmesidir. Biyoinformatik disiplinler arası bir bilim alanıdır. Özellikle moleküler biyoloji içerisinde deneysel olarak elde edilen bilginin hücre biyolojisi içerisinde değerlendirilmesini sağlamaktadır.

Proteomik çalışmalar ilk başladığı günden bugüne kadar çeşitli evrimler geçirmiştir. 2-D jel elektroforez ile başlayan çalışmalarda izole edilen bir kaç proteinin analizi yapılmaktayken günümüzde UPLC'nin proteomik çalışmalarda kullanılmaya başlanması ile birlikte hücre proteomunun önemli bir kısmı kısa süre içerisinde analiz edilebilmektedir. Bugün yapılan çalışmalarda tek bir enjeksiyondan elde edilen veriler yüzlerce proteinin nitel ve nicel analizini sağlayabilmektedir (29, 142). Elde edilen bu devasal veri yığınlarının analizi biyoinformatik alanında 2000' li yılların başından itibaren gelişen teknolojiler ile yapılabilir duruma gelmiştir. Elde edilen ham verilerin protein boyutuna getirilmesi, sonuçların istatistiksel analizlerle zenginleştirilmesi ve son olarak elde edilen proteinlerin kompleks protein haritası içerisinde incelenmesi bugün

biyoinformatiğin proteomik içerisinde uğraştığı konulardır (27).

Proteomik çalışmalarda kütle spektroskopisinden elde edilen ham verilerin işlenmesi genellikle aşağıda birbirini takip eden basamaklarda gerçekleştirilmektedir.

- 1) Proteinlerin nitel analizlerinin yapılması
- 2) Proteinlerin nicel analizlerinin yapılması
- 3) Elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlandırılması.
- 4) Elde edilen verilerin hücre biyolojisi içerisinde değerlendirilmesi

Bazı proteomik çalışmalarda elde edilen sonuçlar çoğu zaman başka çalışmalarla doğrulanmaktadır. Proteomik sonuçları bazen;

Western blot çalışmaları ve transkriptomik analiz verileri kullanılarak kontrol edilmektedir (143-146).

2.7.6. Proteinlerin Nitel Analizleri

Proteomik çalışmaların en temel hedeflerinden bir tanesi proteom içerisinde en fazla sayıda proteinin nitel analizinin yapılmasıdır. Aşağıdan yukarıya proteomik çalışmalarda bu hedefin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle mümkün olduğunca çok peptidin belirlenmesi gerekmektedir. Kütle spektroskopisi ile elde edilen çok sayıdaki verinin, peptitlerin ve buna bağlı olarak proteinlerin analizinde kullanılabilmesi gelişen biyoinformatik sistemler sayesinde günümüzde yüksek doğrulukta gerçekleşmektedir (147). Günümüzde proteinlerin nitel analiz çalışmaları 3 temel sisteme dayanmaktadır. Bu sistemler;

- 1) *De Novo* dizileme çalışmaları (148)
- 2) Peptit dizileme çalışmaları (peptide mass fingerprint) (149)
- 3) Peptitlerin amino asit dizilimlerinin veri tabanları ile karşılaştırmalı analizleridir.

De Novo Dizileme Çalışmaları

De Novo dizileme çalışmaları proteinlerin nitel analizi için kullanılan eski tekniktir. İlk olarak GC/MS çalışmalarında elde edilen verilerin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (150). Gelişen proteomik tekniklerle birlikte *de novo* dizileme çalışmaları 2-D jel elektroforez çalışmaları sonucunda elde edilen

peptitlerin MS/MS verilerinden faydalanarak proteinlerin nitel analizlerinin yapılmasında (151) ve peptitlere ait MS/MS verileri kullanılarak amino asit dizilerinin elde edilmesinde kullanılmaktadır. Elde edilen amino asit dizilerinden hareket ederek peptit yapıları ve buna bağlı olarak protein yapıları aydınlatılmaktadır. *De novo* dizileme çalışmalarının diğer nitel analiz yöntemlerinden en büyük farkı her analizde herhangi bir veri bankasına gerek duymamasıdır. *De novo* dizileme çalışmaları günümüzde hala sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun en önemli sebebi *de novo* dizileme çalışmalarının daha önce genomik dizilemesi bulunmamış türlerin keşfedilmesine olanak sağlamasıdır. Ayrıca *de novo* dizileme çalışmaları diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında çok yüksek doğrulukta nitel analiz sonuçları vermektedir. Sistemin dezavantajları ise sadece izole proteinlerin analiz edilebilmesi, kompleks protein karışımlarında kullanılamaması, elde edilen MS/MS verilerinin son derece yüksek kalitede olma zorunluluğu ve analizlerin çok uzun sürede yapılmasıdır (152).

Peptit Dizileme Çalışmaları

Peptit dizileme çalışmaları, belirli bir proteine ait peptitlerin m/z değerlerinin MS verileri ile tespiti ve bu değerlerin veri bankaları ile karşılaştırılarak proteinin nitel analizinin yapılması çalışmalarını içermektedir (153). Peptit dizileme çalışmaları tıpkı *de novo* dizileme çalışmaları gibi izole edilen proteinler için uygulanmakta ve karışık protein karışımlarında kullanılamamaktadır.

Peptit dizileme çalışmaları *de novo* dizileme çalışmalarından sonra geliştirilmiş ve günümüzde 2-D jel elektroforez sonrasında elde edilen proteinlerin izole edilip MALDİ-TOF veya ESI-TOF ile analizleri sonucunda elde edilen verilerinin analizi için kullanılmaktadır. Peptit dizileme çalışmaları uygulama bakımından kolay olması nedeniyle günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır (153).

Peptit dizileme çalışmalarında proteinlerin nitel analizinin yapılabilmesi için elde edilen peptit kütlelerinin veri bankaları ile karşılaştırılması gerekmektedir. Bu karşılaştırma işleminde çeşitli parametrelerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu parametreler;

- 1) Peptitlerin oluşumunda kullanılan enzimin belirtilmesi gerekmektedir.
- 2) Veri tabanında tarama yapılabilmesi için çalışılan örneğin ait olduğu taksonomik birim (insan, fare vb.) belirlenmelidir.
- 3) Örnek hazırlama sırasında oluşabilecek sabit veya değişken modifikasyonların belirtilmesi gerekmektedir.
- 4) Veri tabanı ile karşılaştırma sırasında peptit kütlelerinde hata miktar sınırının belirlenmesi gerekmektedir.

Peptit dizileme çalışmalarının en önemli avantajı analizde bir tane protein kullanıldığı için çok yüksek doğrulukta nitel analiz yapılabilmesidir. Peptit dizileme çalışmalarında özellikle örnek hazırlama kısmında ve protein izolasyonunda çok dikkatli olunması gerekmektedir. Dışarıdan gelebilecek safsızlıklar elde edilecek sonuçları tamamen değiştirmektedir. Bugün en gelişmiş peptit dizileme analiz programı altın standart olarak nitelendirilen Mascot programıdır.

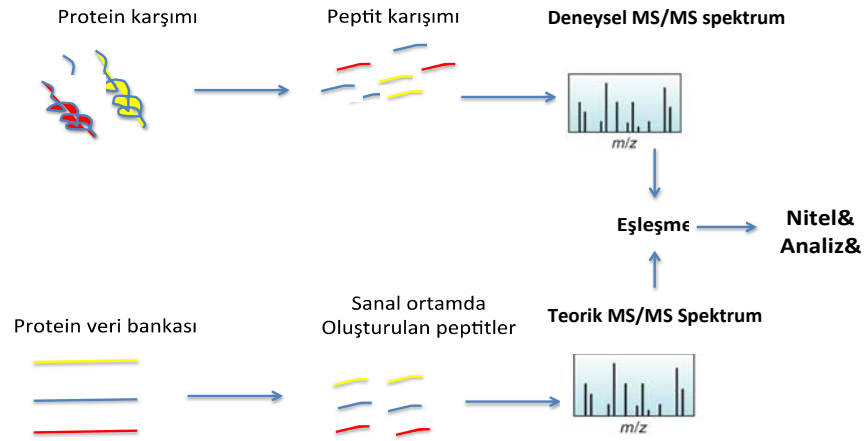
Peptitlerin MS/MS Spektrumlarının Veri Tabanları ile Karşılaştırmalı Analizleri

LC/MS bazlı proteomik sistemlerin gelişmesi sonucunda bir proteoma ait proteinlerin ön fraksiyonlama işlemleri olmaksızın peptitlerine parçalanıp direk olarak LC ve sonrasında MS yöntemi ile analizi yapılabilir hale gelmiştir. Bununla birlikte *de novo* dizileme ve peptit dizileme çalışmaları bu sistemlerde yetersiz hale gelmiştir. Karışık proteom yapısının LC/MS analizleri sonucunda elde edilen MS verilerinin bir bütün halinde incelenmesi için son derece gelişmiş veri bankaları ve bunları kullanabilecek programları geliştirmek zorunluluğu doğmuştur. Bu nedenle yeni bir analiz algoritması geliştirilmiştir. Geliştirilen yeni algoritma ile birlikte protein veri bankalarının sistematik bir şekilde düzenlenmesi, MS sonuçlarının yüksek doğruluk ve kesinlik içerisinde analiz edilebilmesini sağlamıştır (154-158).

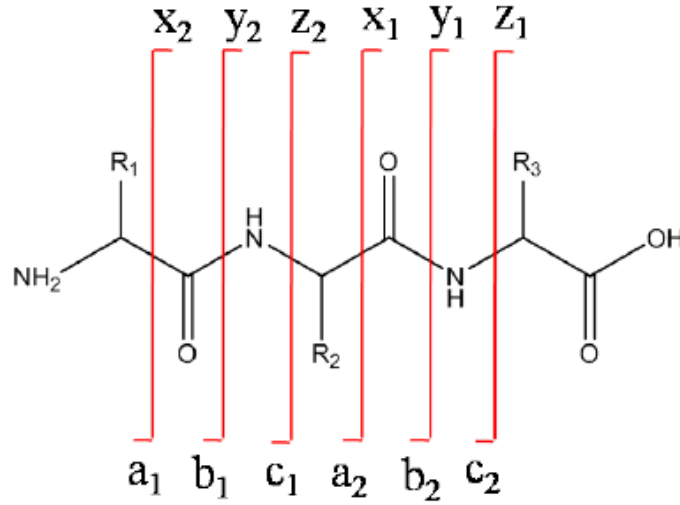
Yeni geliştirilen algoritmalarda proteinlerin nitel analizleri iki kısımda incelenmiştir. İlk kısımda peptitlere ait olan m/z değerleri, teorik m/z değerleri ile karşılaştırılmakta ve olası peptitler belirlenmektedir. İkinci kısımda ise deneysel olarak elde edilen MS/MS verileri, veri bankaları içerisinde bulunan olası peptitlere

ait teorik MS/MS sonuçları ile karşılaştırılmaktadır. Bu karşılaştırma ile birlikte eşleşme sağlandığı zaman peptidin nitel analizinin yapılabildiği kabul edilmektedir (159). Yapılan eşleştirme işleminde her zaman %100 bir eşleşme oranı mevcut olamamaktadır. Bu nedenle eşleşmenin derecesini belirlemek için eşleşme skorları adında yeni bir parametre geliştirilmiştir. Böylelikle peptitlerin ve buna bağlı olarak proteinlerin veri bankalarında bulunan peptit ve proteinlere olan yakınlığı gözlenebilmektedir (160).

Veri bankaları ile karşılaştırmalı protein analizleri Şekil 2.13'de görüldüğü gibi iki koldan yürüyen bir çalışma şeklindedir. İlk olarak çalışılan örneğe ait peptitlerin MS ve MS/MS verileri deneysel olarak kütle spektrometresinden elde edilmektedir. Tek boyutlu MS verisinde belirlenen peptit iyonu (precursor) çarpışma ünitesinde parçalanarak fragmentlerine ayrılmaktadır. Bu parçalanma iki yol üzerinden meydana gelmektedir. Bunlardan bir tanesi N-merkezli diğeri ise C-merkezli fragmentlerdir. Bu isimlendirmenin temeli ise var olan yükün aminoasit üzerinde kalması (N-Merkezli) veya karboksi grubu (C-Merkezli) üzerinde kalması esasına dayanmaktadır. Peptit fragment iyonlarının isimlendirilmesi de bu merkezlere bağlı olarak değişmektedir. Eger N-merkezli fragmentler oluşuyorsa, meydana gelebilecek iyonlar a, b, c, eğer C-merkezli fragmentler üzerinden gidiliyorsa, meydana gelebilecek iyonlar x, y ve z iyonları denilmektedir (Şekil 2.14). Peptitler parçalanma ünitelerinde fragmentlerine parçalanırken hem N hemde C merkezli iyonlar oluşmaktadır. Oluşan fragment iyonları içerisinde gözlemlenme ihtimali en yüksek olan iyonlar b ve y iyonları olarak belirlenmiştir. Ayrıca fragment iyonların oluşumunda amonyak veya su molekülleri oluşmaktadır. Bu değişimler MS/MS verilerinde kaydedilmiş ve eşleşme işleminde kullanılabilir hale getirilmiştir (29).



Şekil 2.13. Peptitlerin MS/MS verilerinin ilgili veri bankaları ile karşılaştırılması



Şekil 2.14. Peptitlerin parçalanması ile oluşan fragment iyonları (152)

Deneysel MS/MS verilerinin elde edilmesinden sonra veri bankalarında bulunan proteinlere ait peptitlerden oluşturulacak teorik (*in silico*) MS/MS verileri bilgisayarda elde edilmektedir. Teorik MS/MS verilerinin eldesi deneysel koşulların sanal olarak yaratılması ile gerçekleşmektedir. Öncelikle analizi yapılan örneğin ait olduğu taksonomik sınıf belirlenmekte ve buna uygun bir veri bankası seçilmektedir. En sık kullanılan veri bankaları uluslararası protein indeks (IPI),

Uniprot sistemi, Swissprot ve NCBI içerisindeki referans dizi bankalarıdır (161, 162).

Veri bankası belirlendikten sonra sanal peptitlerin oluşumu sağlanmaktadır. Bunu sağlamak için ilk olarak proteinleri parçalamak için kullanılan enzim seçilmelidir.

Parçalayıcı enzim ve veri bankasının belirlenmesinden sonra proteinler üzerinde deneysel olarak meydana gelebilecek olası modifikasyonlar sanal ortamda belirlenmelidir. Böylelikle modifikasyonlardan dolayı meydana gelebilecek kütleli farklılıklar sistemde tanımlı hale gelmektedir (163).

Deneysel çalışmalarda oluşabilecek en kısa ve en uzun amino asit dizileri sisteme girilerek araştırılacak peptitlerde bir filtre yaratılmaktadır.

Belirlenen deneysel parametrelerle birlikte teorik peptitler oluşturulmuştur. Oluşturulan teorik peptitler ile deneysel sonuçlar iki basamaklı bir eşleştirme işlemine sokulmuştur. Birinci basamakta deneysel olarak belirlenen m/z değerleri veri tabanından elde edilen peptitlere ait m/z değerleri ile karşılaştırılmaktadır. Burada kullanılan kütle spektrometresinin türüne göre eşleşmede olası hata payları ppm veya dalton cinsinden belirlenmektedir. Burada eşleşen olası peptitlerin MS/MS verileri teorik sonuçlarla karşılaştırılarak, ikinci basamakta eşleştirme işlemi yapılmaktadır.

Proteomik nitel analiz çalışmalarında proteinin nitel analiz kalitesinin ölçüsü eşleşme skorudur. Eşleşme skorlarının belirlenmesinde ilk olarak MS/MS verisi içerisinde peptitlerden oluşan fragment iyonlarının eşleşme skorları kullanılmaktadır. Bu skorlar birleşerek peptit skorunu oluşturmakta ve peptit skorları da protein skorlarını oluşturmaktadır.

Yapılan LC/MS analizlerinde binlerce MS/MS verisi elde edilmektedir ve bu verilerin nitel analizlerinde en düşündürücü kısım eşleşmelerin ne kadar doğrulukla yapılmış olduğudur. Bunun için çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam etmektedir. Proteomik çalışmalarda sonuçların güvenilirliğini arttırmak için kullanılan en önemli yöntemlerden bir tanesi Hedef/Tuzak (Target/Decoy) veri bankaları analizi olmuştur. Deneysel veriler nitel analiz için örneğin bulunduğu taksonomideki hedef veri bankasına (Target) karşı analiz yapılırken ikinci bir karşılaştırma rastgele dizilerden oluşan tuzak (Decoy) bir veri

bankasına karşı yapılmaktadır. Tuzak veri bankasında eşleşen peptitlerin sayısını hedef veri bankasındaki peptit sayısına böldüğümüzde yanlış doğru oranı (FDR) hesaplanmaktadır (164, 165). Bu oran mümkün olduğunca düşük olmalıdır. FDR oranı peptit eşleşmesinin ne kadar sağlıklı bir şekilde yürüdüğünü göstermektedir. Son yıllarda FDR hesaplamaları yeni algoritmalarla birlikte geliştirilmiştir. Artık bulunan bütün peptitlerin FDR değeri yerine her bir peptit için farklı FDR değerleri hesaplanmaktadır. Bir peptitin tuzak ve hedef veri bankaları ile eşleşme yüzdelerinin oranı hesaplanmaktadır. Bu değer belirlenen limitin altında ise peptide ait nitel analiz kabul edilmektedir.

Nitel analiz sonuçlarında güvenilirliği arttırmak için eşleşme skorlarında sınırlama yapılmış ve belirli bir skorun altındaki peptitler kabul edilmemiştir (166). Son yıllarda geliştirilen yeni algoritmalarla birlikte FDR ve skor sınırlaması birlikte kullanılarak proteinlerin nitel analizlerinde yüksek doğrulukta sonuçlar alınmıştır (167).

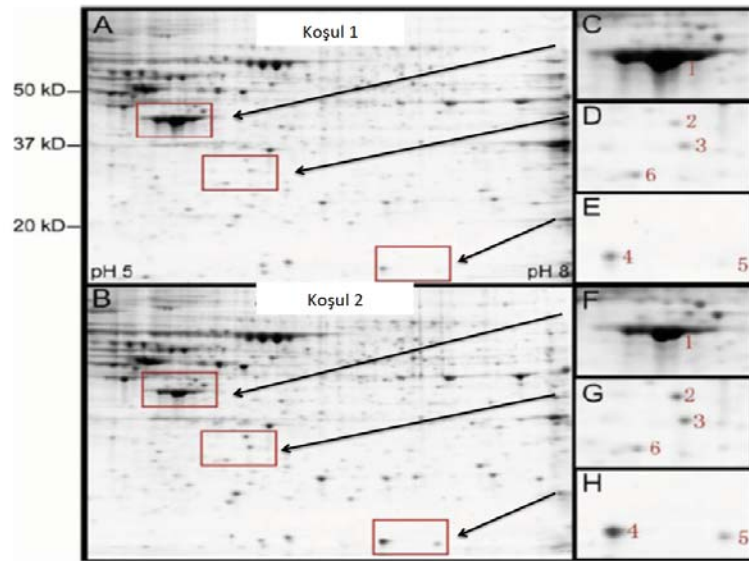
Yapılan bir çok proteomik çalışmada nitel analiz doğruluğunu arttırmak için peptit sayısına sınırlama getirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bir proteinin güvenilir bir şekilde analiz edilebilmesi için o proteine ait en az 2 peptidin nitel analizinin olması gerektiği saptanmıştır (164, 168).

Bugün peptitlerin ve proteinlerin nitel analizlerinde kullanılan bir çok program geliştirilmiştir. Mascot (169, 170), Omssa (171), Xtandem (172), Andromeda (Maxquant) (173) programları sıklıkla nitel analizde kullanılmaktadır. Andromeda (Maxquant) programı hem kolay bir arayüze sahiptir hem de başta Mascot olmak üzere diğer programlara karşı yapılan çalışmalarda yüksek verim sağladığı saptanmıştır (174).

Yukarıda belirtilen üç nitel analiz modeli farklı bir şekilde anlatılmış olsada bu modeller birbirlerini tamamlayan özelliklere sahiptir. Bir hücrenin proteomu ile çalışılırken de novo dizileme bilinmeyen daha önce belirlenememiş proteinlerin bulunmasını sağlamaktadır. Peptitlerin MS/MS spektrumlarının veri tabanları ile karşılaştırmalı analizleri ise o proteom hakkında global bir bilgi vermektedir. Peptit dizileme çalışmaları ise bilinen proteinlerde proteinlerin analizlerinde diğer iki metodu destekleyecek şekilde kullanılmaktadır.

2.7.7. Proteinlerin Yarı-Nicel Analizi

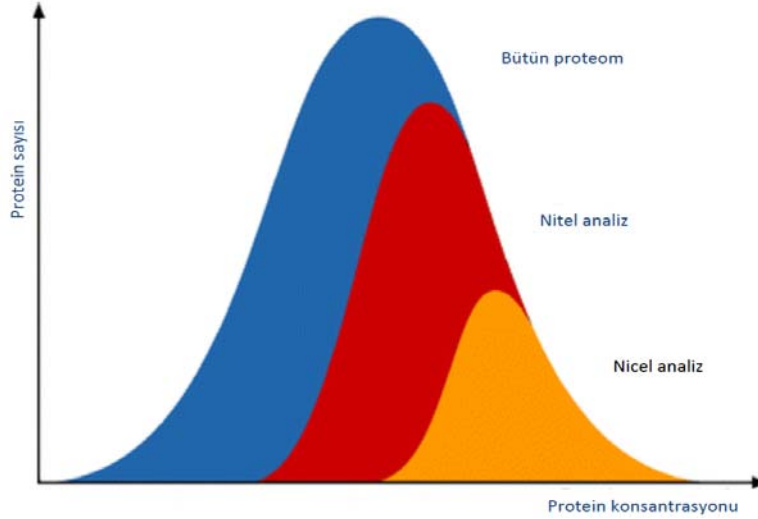
Proteomik çalışmalarda belirli bir zaman diliminde biyolojik sistem içerisinde bulunan proteinlerin nitel analizlerinin yapılması kadar protein miktarlarında oluşan değişimlerinde analiz edilmesi gerekmektedir. Yarı nicel analiz aynı hücrenin iki farklı koşul altında proteomlarında bulunan protein miktarlarının birbirlerine göre değişiminin ölçülmesidir. Yarı nicel analiz için kullanılan yöntemler gerçekleştirilen deneysel sistemlere göre değişmektedir. İki boyutlu 2-D jel elektroforez sonrası MALDİ-TOF ile analizi gerçekleştirilen proteomik deneylerde nicel analiz 2-D jel elektroforez sonrasında elde edilen protein profilinin bilgisayar ortamında görsel olarak incelenmesi ve çeşitli bilgisayar programları kullanılarak spot yoğunluklarının karşılaştırılması ile yapılmaktadır (175). İki farklı koşula ait jel görüntülerinden faydalanarak nicel analiz yapılmaktadır (Şekil 2.15..



Şekil 2.15. İki farklı koşula ait 2-D jel elektroforez sonrası elde edilen görüntü ve spotlar arasında yoğunluk farklılıkları (Bio-rad uygulamaları)

LC/MS proteomik çalışmalarda yüzlerce proteinin nitel analizi yapılmasına rağmen bunların hepsinin yarı nicel analizde kullanılamayacağı saptanmıştır. Bunun sebebi yarı nicel analiz için gerekli veri kalitesinin sağlanamaması olarak belirtilmiştir. Nitel ve nicel analizlerde daha çok protein ile çalışabilmek için Şekil

2.16'da görüldüğü gibi protein konsantrasyonunun arttırılması veya duyarlılığı daha yüksek sistemler kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (176).



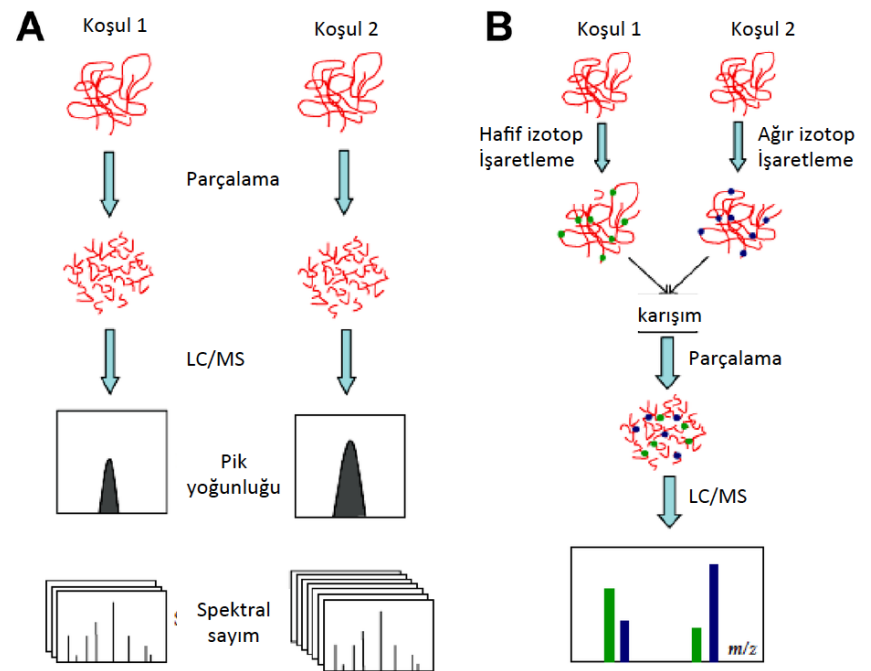
Şekil 2.16. Proteom içerisinde nitel ve nicel analizi yapılan protein sayısının analiz edilen protein konsantrasyonu ile ilişkisi.

LC/MS proteomik çalışmalarda yarı nicel analiz çalışmaları işaretli ve işaretli olmayan üzere iki farklı metot uygulanarak yapılmaktadır.

İşaretli nicel analiz çalışmalarında iki farklı koşul altında elde edilen proteinler ağır ve hafif izotoplarla işaretlenmektedir. İşaretleme analizlerinde kararlı izotopların eklenmesi (SILAC)(177), kararlı izotoplar ile etiketlenmiş peptitlerin eklenmesi (178), radyoizotop işaretlenmiş (radiolabeled) aminoasitlerin eklenmesi (179), kimyasal olarak sentezlenmiş peptit standartlarının eklenmesi (180), izotop kodlu afinite işaretlerinin eklenmesi (ICAT)(181), izobarik etiketlerin eklenmesi (ITRAQ)(182) yöntemleri kullanılmaktadır. İşaretleme işlemi kullanılan işaretleme ajanına göre değişmektedir. SILAC metodunda hücre kültürü ortamında işaretleme yapılmaktadır. ICAT işleminde proteinlerin izole edilmesinden sonra işaretleme yapılmaktadır. ITRAQ metodunda proteinler peptitlere parçalandıktan sonra işaretleme peptitler üzerinde yapılmaktadır. İşaretleme işlemi yapıldıktan sonra ise Şekil 2.17'de görüldüğü gibi iki farklı koşula ait örnekler karıştırılarak LC/MS analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda farklı izotop ile işaretlenmiş peptitler belirlenmekte ve yoğunlukları karşılaştırılmaktadır. İşaretleme bazlı nicel analizler ilave örnek hazırlama basamağı, işaretleme işlemindeki belirsizlikler ve

sınırlı sayıda koşula uygulanabilmesinden dolayı bazı problemler içerdiği saptanmıştır.

Proteinlerin nicel analizinde kullanılan diğer yöntem ise işaretli (label free) nicel analiz yöntemidir. Bu sistemin en önemli avantajı uygulanabilirliğinin kolay olması ve çok fazla koşulun birbiri ile kıyaslamasının yapılabilmesi olarak belirtilmiştir (183). Şekil 2.17’de görüldüğü gibi işaretli ve işaretli nicel analiz yöntemlerinde örnek hazırlama kısımları farklıdır. İşaretli yöntemlerde örnekler birbirinden tamamen ayrı bir şekilde analiz edilmekte ve elde edilen LC/MS verilerinin karşılaştırılması ile göreceli miktar tayini gerçekleştirilmektedir. İşaretli nicel analizde veriler iki şekilde değerlendirilmektedir. Bunlardan birincisi iyon piki yoğunlukları (pik alanı veya yükseklikleri) karşılaştırılmakta ve nicel analiz yapılmaktadır. İkinci yöntem ise nitel analizde kullanılan fragment spektrumlarının sayımı (counting) ile birlikte nicel analiz yapılmaktadır (184).



Şekil 2.17. İşaretli ve işaretli nicel analiz yöntemleri. A) İşaretli B) işaretli nicel analiz yöntemi

Yapılan çalışmalarda spektral sayım tekniğine karşı genellikle şüpheli bir yaklaşım duyulmaktadır. Bu teknik içerisinde belirlenen peptitlerle ilgili olarak herhangi bir fiziksel özellik ölçülmediği için peptit ve buna bağlı olarak protein miktarı için çok sağlıklı bir sistem olmadığı düşünülmüştür (185).

Pik yoğunluklarının karşılaştırılmasında kullanılan yöntem peptitler için elde edilen tek boyutlu MS verilerinde peptit piklerinin yoğunluklarının belirlenmesi ve iki farklı koşul için bu yoğunlukların karşılaştırılması ile yapılmaktadır (186, 187). Bu sistem ilk geliştirildiğinde iki temel sorun ile karşılaşmıştır. Bunlar aynı örneğin farklı enjeksiyonlarında farklı peptit yoğunluklarının gözlemlenmesi ve iki farklı koşul için yapılan enjeksiyonlarda aynı peptitlerin farklı alıkonma zamanlarında bulunmuş olmalarıdır. Son yıllarda geliştirilen yeni algoritmalarla birlikte güvenilir normalizasyon yöntemleri geliştirilmiş ve enjeksiyonlar arasında gözlemlenen pik yoğunluğundaki sapmalar büyük ölçüde önlenmiştir (188, 189). Geliştirilen işaretli nicel analiz yöntemi klinik çalışmalarda çok iyi sonuçlar vermiştir. Özellikle biyobelirteçlerin belirlenmesinde bir çok çalışmada kullanılmıştır (190-193).

Günümüzde dünya çapında nicel analizler için en çok kullanılan bilgisayar programı Maxquant programıdır (173, 194). Nitel analiz sonrasında Maxquant içerisindeki algoritmalarla birlikte nicel analiz yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda normalizasyon sisteminin nicel analizlerde çok önemli olduğu ve doğru sonuçların belirlenmesinde çok önemli bir parametre olduğu saptanmıştır (195).

2.7.8. Verilerin İstatistiksel Olarak Anlamlandırılması

İstatistiksel analizler proteomik çalışmalarda çok önemli bir yere sahiptir. Proteinlerin nitel ve nicel analizleri sonrasında kullanılacak anlamlı sonuçlar çeşitli istatistiksel algoritmalarla sağlanmaktadır (196).

Proteomik çalışmalarda istatistiksel uygulamalar hem aynı örneğin farklı enjeksiyonlarda tekrarlanabilirliğin takibinde hem de farklı iki koşul altında miktarları değişen proteinlerin değişim miktarının anlamlı olup olmadığını incelemekte kullanılmaktadır.

Perseus programı proteomik çalışmalarda kullanılan ve maxquant programı ile uyumlu olarak hazırlanmış bir istatistik programıdır. Program içerisinde nicel

analizle ilgili olarak çok sayıda algoritma geliştirilmiştir (197). Perseus programı, Maxquant programı ile çeşitli proteomik çalışmalarda kullanılmıştır (198, 199).

2.7.9. Verilerin Hücre Biyolojisi İçerisinde Değerlendirilmesi

Elde edilen verilerin hücre biyolojisi ve protein haritası içerisinde belirlenmesi gelişen biyoinformatik sistemlerle birlikte yapılabilir bir hale gelmiştir. Gen ontoloji analizleri ile analizi yapılan proteinlerin hangi moleküler fonksiyona sahip olduğu, bu moleküler fonksiyonu hangi biyolojik süreç içerisinde ve hücre içerisinde hangi lokasyonda kullandığı belirlenmektedir. Ayrıca analizi yapılan proteinlerin hangi sınıf proteine ait olduğu yine bu analizlerle saptanmaktadır (200, 201).

Yolak analizleri ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişen proteinlerin hangi yollar üzerinde olduğu belirlenerek koşulların hücre üzerindeki etki mekanizmaları aydınlatılmaktadır (202).

2.8. Proteomik Çalışmaların Kanser Üzerindeki Uygulamaları

Günümüzde her yıl yaklaşık olarak 10 milyon insan kanser hastalığı sebebiyle hayatını kaybetmektedir (203). Kişilerin genetik yatkınlıklarının yanı sıra yaşam tarzı kanser türüne bağlı olarak oldukça etkilidir (204). Kanser türleri arasında en sık rastlanan kolon kanseridir.

Kanser çalışmaları içerisinde son yıllarda omik çalışmalar daha çok önem kazanmıştır. Klasik kanser tedavi ve teşhis yöntemlerinin yanında ve onları tamamlayıcı olarak moleküler boyutta inceleme fırsatı sunmuştur (205).

Proteomik analizleri kanser çalışmaları içerisinde önemli bir yere sahiptir. Proteomik çalışmalar, genomik çalışmaların aksine oldukça dinamik bir süreç içerisinde bulunmaktadır. Sürekli değişen proteom yapısı içerisinde protein miktarlarının analizi, proteinlerin üzerinde meydana gelen modifikasyonlar, proteinlerin birbirleri ile etkileşimleri ve yolak analizlerinin yapılmasıyla kanser oluşumu ve gelişim evreleri takip etme fırsatı sunmuştur. Kanser süreci içerisinde biyobelirteçlerin bulunması, kanser üzerinde etkili olan moleküllerin etki mekanizmalarının belirlenmesi proteomik çalışmaların önemli araştırma alanlarını oluşturur (206). Özellikle hastalığın erken teşhisi ve yeni tedavi yöntemleri ile

ilgili çalışmalar proteomik alanında yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (207-209).

Yapılan çalışmalar kanser ile ilgili yapılan proteomik incelemelerde hücre, doku, vücut sıvılarının kanser ile ilgili derin bilgiler sunduğunu göstermektedir. Hücre kültürü kolay örnek elde edilmesi ve bir çok deneysel dizayn yapılabilmesi nedeniyle proteomik çalışmalarda çok sık tercih edilmektedir (210). Vücut sıvıları özellikle kanser tanı ve tedavisinde kullanılacak biyobelirteçlerin keşfinde, takibinde kolay elde edilmesi ve işlenebilmesi nedeniyle (211) kanser dokuları ise direkt olarak hastalığın gelişimi hakkında en kesin bilgiyi verdiği için proteomik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (212). Ancak bu farklı örnek tiplerinin bazı dezavantajlara sahip olduğu çalışmalarda gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda hastalardan elde edilen vücut sıvıları yada dokularla yapılan çalışmaların en büyük dezavantajının heterojen bir örnek havuzu meydana getirmiş olmalarıdır (206). Bu heterojen yapının özellikle biyobelirteçlerin keşfedilmesinde sorun yarattığı saptanmıştır. Hücre kültüründe yapılan çalışmalar ise homojen bir örnek karışımı vermesine rağmen sonuçlar hastalardan elde edilen doku ve vücut sıvıları ile karşılaştırıldığı saptanmıştır (213). Bu nedenle yapılan çalışmalarda bu farklı örnek tipleri bir bütün olarak incelenmiştir. Hücre kültürü ile başlayan çalışmalar daha sonrasında doku ve vücut sıvıları ile devam etmiştir (214).

Kanser tedavisi zor bir hastalıktır. Dünya çapında farklı disiplinlerden bir çok grup çalışmalar yapmaktadır. Özellikle omik bilimlerin gelişmesiyle birlikte klasik kanser tedavilerinin etkisi daha derin bilgilerle incelenmektedir. Klasik tedavilerin yanı sıra alternatif tedavi yöntemleride yine omik bilimlerle incelenmektedir. Alternatif tedavi yöntemleri içerisinde ise doğal bitkisel bazı ürünler gösterdikleri antikanserojen etkilerle önemli bir yere sahiptir. Polifenolik bileşikler ise bitkisel bazı ürünler içerisinde en çok ilgi çeken anti kanserojen ajanların başında gelmektedir. Özellikle yüksek polifenolik içeriğe sahip ürünlerin yüksek antikanserojen etki göstermesi ile son yıllarda polifenolik bileşikler üzerine yapılan çalışmaları giderek artmıştır (215, 216). Özellikle son yıllarda geliştirilen "Foodomik" yaklaşımı ile birlikte bitkisel gıdaların insan sağlığı üzerindeki etkisi çok geniş bir aralıkta incelenmiştir (217-219). Bu anlayış içerisinde yapılan çalışmalarda biberiye (123), zerdeçal (220), özellikle üzüm çekirdeğinde mevcut bulunan resveratrol (221), elma gibi meyvelerin kabuklarında bulunan

kuersetin(222) gibi maddelerin kolon kanseri üzerinde etkili olduğu proteomik çalışmalarla da belirlenmiştir.

2.9. Bitkisel Temelli Hemostatik Ajanlar ve Kanser Üzerinde Etkileri

Kanama bozukluğu, vücut içerisinde sıvı akışının yaralanma, travma, cerrahi operasyonlar gibi olaylar sonucunda normal deri yapısının oluşmamasından kaynaklanmaktadır (223). Bu koşulların oluşumu sonucunda meydana gelen kanama bozukluğu vücudun kendi onarım sistemi ile her zaman onarılamaz. Özellikle genetik olarak dezavantaja sahip kişiler için bu durum hayati önem arz etmektedir. Böyle durumlarda hemostatik ajan denilen kanama durdurucular kullanılmaktadır.

Hemostatik ajanlar kanser hastalığında özel bir öneme sahiptir. Kanser de oluşacak lokal kanamalar hastaların yaşamları açısından çok önemlidir. Kanser hastalarının yaklaşık %10 nu bu kanamalarla karşılaşmaktadır. Kanamalar ani hasta ölümlerine sebep olmaktadır (224). Kanser hastalarında oluşan bu kanamalar hastalıktan kaynaklandığı gibi uygulanan kemoterapi veya radyo terapi sonucunda da oluşabilmektedir (225).

Kanser hastalarında kullanılan hemostatik ajanlar özelliklerine göre ve kullanılma prosedürlerine göre çeşitli gruplara (bitkisel temelli, sentetiktemelli, polisakkarit temelli gibi) ayrılmaktadırlar. Yapılan çalışmalarda gerek vücut ile daha uyumlu olması gerekse de yan etkilerinin az olması nedeniyle bitkisel hemostatik ajanlar günümüzde kullanılmaktadır. Bu hemostatik ajanların başında polisakkarit bazlı hemostatik ajanlar gelmektedir (226).

2.10. Proteomik Analizlerde Validasyon Çalışmaları

Yöntem geliştirme sürecinde validasyon parametrelerinin yerine getirilmesi geliştirilen metodun geçerli olduğunu göstermektedir. Özellikle biyolojik örneklerin kullanıldığı çalışmalar fazla miktarda belirsizlikler içermektedir.

Validasyon çalışmaları analite ait standart ile yapılmaktadır. ICH kılavuzuna göre validasyon çalışmalarında nitel analizde yapılması gereken tek parametre özgünlüktür. Ancak yarı nicel analiz yapılması, sistemin doğruluğunun ve kesinliğinin incelenmesinide gereklidir (227).

Proteomik çalışmalarda analitik yöntem validasyonu genel olarak anlamıyla yapılmamakta ve çalışmalarda göze çarpan eksikliklerdir. Proteomik çalışmalarda analitik yöntem validasyonu genel olarak standart proteinler ile yapılmaktadır. Bazı çalışmalarda standart proteinlerin karışımı kullanılırken bazı çalışmalarda standart proteinler tek başına analiz edilmektedir (228).

Özgünlük, analiz maddesi dışında matris ortamında bulunan diğer maddelerin geliştirilen analitik yöntem sonuçlarını ne kadar etkilediğinin ölçüsüdür.

Doğruluk, deneysel verilerden elde edilen değerlerin gerçek değere olan yakınlığını göstermektedir. Doğruluk ile ilgili sonuçların değerlendirilmesinde yüzde bağıl hata değerleri kullanılmaktadır.

Yöntem kesinliği, ölçümlerde gözlemlenebilen bir değerlerin tekrarlanabilirlik kabiliyetini göstermektedir. Ölçümlerde elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı sistemin kesinliğini tanımlama da kullanılmaktadır. Elde edilen deneysel verilerin bağıl standart sapmalarının hesaplanması ile birlikte sistemin kesinliği belirlenir vermektedir.

Proteomik çalışmalarda alıkonma zamanı ve peptitlerin pik alanları özellikle nicel analiz için önemli olduğundan incelenen parametredir. Peptitlere ait piklerin alıkonma zamanları ve pik alanları tekrarlanabilir sonuçlar vermelidir (229). Peptit yoğunluklarının aynı enjeksiyon miktarındaki tekrarlanabilirliği de kesinlik parametresi ile incelenmektedir.

Nano LC sistemlerde kesinlik parametresi için hem akış hızlarında meydana gelen dalgalanmalar hemde nano-ESI sisteminde meydana gelen stabilite problemlerinden dolayı yeterli sonuçlar alınamamaktadır.

Tönetimin doğrusallık elde edilen sonuçların kullanılan standart madde derişimi ile orantılı bir şekilde değişimidir. Çizilen grafiklerde eğim, kesişim ve korelasyon katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir.

Validasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılan standart proteinlerden en önemlisi sığır serum albüminidir. Sığır serum albümin 607 tane amino asitten oluşmaktadır. Sığır serum albümin stabil bir yapıda olması, kolay temin edilebilir olması ve ucuz olması nedeniyle proteomik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (230, 231). LC/MS bazlı proteomik çalışmalarda örneklerin analizinden önce sığır serum albümin analizi yapılarak sistemin durumu incelenmektedir. Peptitlerin

alikonma zamanları ve yoğunluklarının tekrar edilebilir düzeyde olması gerekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar ve Gereçler

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda hücre kültürü ortamında kullanılan kimyasallar Tablo 3.1, proteomik çalışmaları kapsamında yapılan deneylerde kullanılan kimyasallar ve tamponlar Tablo 3.2, cihazlar Tablo 3.3 ve biyoinformatik ve istatistik programları Tablo 3.4 içerisinde verilmiştir.

Tablo 3.1. Hücre kültürü içerisinde kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Firma
CaCo-2 hücre hattı	ATCC
Fötal sıgır serumu (FBS)	Sigma
Sodyum pirüvat	Sigma
Esansiyel olmayan amino asit karışımı	Sigma
Sodyum bikarbonat	Sigma
Glutamin	Sigma
Penisilin-streptomisin	Sigma
MEM-Eagle besi yeri	Sigma
Fosfat tamponlu tuz (DPBS)	Sigma
Homojenizasyon tamponu	Sigma

Tablo 3.2. Proteomik deneyler kapsamında kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Firma	Kullanım Amacı
DL-Ditiotreitol (DTT)	Fluka	Proteinlerin denatüre hale getirilmesinde
Protein assay standard II (bovine serum albumin)	Bio-Rad	Protein miktar tayininde standart olarak
DC Protein assay reagent A	Bio-Rad	Protein miktar tayininde
DC Protein assay reagent B	Bio-Rad	Protein miktar tayininde
DC Protein assay reagent S	Bio-Rad	Protein miktar tayininde
Protein assay dye reagent	Bio-Rad	Protein miktar tayininde
İyodoasetamid (IAA)	Sigma	Alkilleyici ajan
Metanol	Sigma	Proteinlerin çöktürülmesinde
Kloroform	Merck	Proteinlerin çöktürülmesinde
Amonyum bikarbonat	Sigma	Proteinlerin çözünmesinde
Tripsin	Sigma	Proteinlerin parçalanmasında
Asetonitril	Sigma	Sıvı kromatografisinde hareketli faz olarak
Distile su	Sigma	Sıvı kromatografisinde hareketli faz olarak
Formik asit	Sigma	Hareketli faz içerisinde iyon çifti ajanı olarak
Sığır Serum Albümin	Sigma	Proteomik çalışmalarda Standart protein olarak

Tablo 3.3. Proteomik çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz	Firma	Kullanım Amacı
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Agilent 1290	Peptit karışımlarının ayrılmasında
Kütle spektroskopisi (QTOF)	Agilent 6530	Peptitlerin analizinde
Vakumlu santrifüj	Labconco	Amonyum bikarbonatın uzaklaştırılmasında
Yüksek hızlı Santrifüj	Hermle	Proteinlerin hücre Lizatından uzaklaştırılmasında
İnkübatör	Grant bio	Proteinlerin peptitlerine parçalanmasında
Homojenizatör	Schütt homgen	Hücre homojenizasyonunda

Tablo 3.4. Proteomik çalışmalarda kullanılan programlar

Program	Kullanım Amacı
Agilent Mass Hunter	Kromatogramların incelenmesinde
Maxquant	Proteinlerin tanımlanması ve nicel analizinde
Perseus	Maxquant sonuçlarının istatistiksel açıdan incelenmesinde
Panther	Gen ontoloji analizinde
String	Protein-protein etkileşimi analizinde
Reactome	Yolak analizinde

3.2. Sığır Serum Albümin Analizi

3.2.1. Sığır Serum Albümininin Peptitlerine Parçalanması

Ticari olarak temin edilen sığır serum albümin %20 oranında metanol içeren (h/h) 100 mM amonyum bikarbonat çözeltisi (pH: 8.5) içerisinde 4000 ppm olacak şekilde çözülmüştür. 25 µL sığır serum albümin çözeltisine 5 µL, 200 mM DTT eklenerek 56 °C de inkübe edilmiştir. Bu süreç içerisinde disülfid bağları kırılmıştır. Bu işlem sonrasında 20 µL, 100 mM iyodo asetamid eklenerek karışım 30 dk boyunca oda sıcaklığında ve karanlık bir yerde tutulmuştur. Böylelikle sığır serum albümin alkilenmiştir. Sığır serum albümininin peptitlerine parçalanma işlemi ise tripsin enzimi ile gerçekleştirilmiştir. Sığır serum albümin çözeltisine 1:100 oranında (a/a) tripsin eklenmiştir. Proteinin parçalanması için tripsin ile inkübasyonu 16 saat sürmüştür. İnkübasyon sıcaklığı ise 37 °C olarak ayarlanmıştır. İnkübasyon sonrasında elde edilen peptit karışımı, amonyum bikarbonatın uzaklaştırılması için vakum santrifüj içerisinde yaklaşık 1 saat kadar santrifüj edilmiştir. Santrifüj esnasında sıcaklık 4 °C'ye ayarlanarak tripsin aktivitesi inhibe edilmiştir. Ayrıca tripsin inhibisyonu için formik asit eklenerek ortamın pH değeri 3.5'e kadar düşürülmüştür. Amonyum bikarbonat ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra peptitler % 0.1 formik asit içeren (h/h) asetonitril içerisinde çözülmüş ve ultra basınçlı sıvı kromatografisinde (UPLC) uygulanmak üzere enjeksiyona hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. Sığır Serum Albümine ait Peptitlerin UPLC/QTOF ile Analizi

Karışım halinde bulunan peptitler UPLC ile C18 (Agilent, Zorbax, 2.1 mm x 100 mm, 1.8 µm, 300Å) kolon içerisinde polaritelerine göre ayrılmıştır. Sistem içerisinde hareketli faz olarak asetonitril (%0.1 formik asit (h/h)) ve su (%0.1 formik asit h/h)) kullanılmıştır. UPLC kolonun dengeye gelmesi için yaklaşık 50 kolon hacmi kadar hareketli faz sistemden geçirilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0.2 mL/dk olarak belirlenmiştir. Sığır serum albümininin analizi için 45 ve 70 dk olmak üzere iki farklı gradient kullanılmıştır (Tablo 3.5. ve Tablo 3.6.). Gözlemlenen peptit sayıları göz önüne alınarak hangi gradient sisteminin daha avantajlı olduğu araştırılmıştır.

Tablo 3.5. Gradient sistemi 1

Zaman (dk)	Asetonitril (%0.1 formik asit içeren h/h) (%)	Su (%0.1 formik asit içeren h/h) (%)
0	3	97
25	45	55
27	85	15
29	85	15
31	3	97
45	3	97

Tablo 3.6. Gradient sistemi 2

Zaman (dk)	Asetonitril (%0.1 formik asit içeren h/h) (%)	Su (%0.1 formik asit içeren h/h) (%)
0	3	97
45	45	55
50	85	15
51	85	15
54	3	97
70	3	97

UPLC'den çıkan peptitler iyonlaşmaları için elektrosprey iyonizasyon (ESI) ünitesine gönderilerek burada Tablo 3.7. içerisinde gösterilen şartlar altında iyonlaşmaları sağlanmıştır. Sistemde formik asit kullanılması ile birlikte peptitler pozitif yüklenmiştir. Tablo 3.7.'de verildiği gibi elektrosprey iyonlaşma kaynağı içerisinde gaz halinde iyonik peptit türlerin elde etmek için sıcaklık 350 °C ye çıkarılmış kapiler potansiyeli 4000 volt olarak belirlenmiştir. Düzgün bir sprej oluşumu için nebulizer basıncı 45 psig olarak ayarlanmıştır.

Tablo 3.7. Elektrosprey iyonizasyon parametreleri

Parametre	Değer
İyon polaritesi	Pozitif
Sıcaklık	350 °C
Kurutucu gaz	10 L/dk
Nebulizer	45 psig
Kapiler potansiyeli	4000 V

Gaz halinde ki pozitif yüklü peptitler daha sonra kütle analizörüne (QTOF) doğru hareket etmişlerdir. Tek boyutlu kütle spektroskopisi (MS) analizi ile proteinlere ait peptitlerin m/z değerleri bulunmuştur. Birinci aşama da MS analizinde taranan m/z aralığı 100 ile 1700 arasında seçilmiştir (Tablo 3.8.).

Tablo 3.8. MS parametleri

Parametre	Değer
Kütle aralığı	100-1700 m/z
Veri toplama hızı	2 spektra/sn
Veri toplama döngüsü	500 ms/spektrum

Daha sonra peptitlerin ikinci boyut kütle spektroskopisi analizi olan tandem MS değerleri (MS/MS) incelenmiştir. Deneylerde MS/MS analizleri için 300-1400 m/z aralığı seçilmiştir. Peptitlerin çarpışma indüklü parçalanması için ayarlanan potansiyel 45 volt olarak belirlenmiştir. Her bir MS/MS döngüsünde minimum iyon yoğunluğu 1500 birim olarak belirlenmiştir. Analizlerde her bir MS/MS döngüsünde yoğunluğu en yüksek 3 iyon incelenmiş ve buna bağlı olarak MS/MS döngüsü 3,63 sn olarak gözlemlenmiştir. Peptitlerde yük aralığı ise +2 ile +5

arasında seçilmiştir. Bu parametreler doğrultusunda analiz edilen peptitler için ham MS/MS verileri elde edilmiştir (Tablo 3.9.)

Tablo 3.9. MS/MS parametreleri

Parametre	Değer
Tarama aralığı	300-1400 m/z
Parçalama enerjisi	45 V
Maksimum iyon sayısı	3
Döngü zamanı	3,63 sn
Haberci iyon yoğunluğu alt sınırı	1500 birim

3.2.3. UPLC/QTOF Verilerinin Maxquant Programında Analiz Edilmesi

Sığır serum albüminin analizinde veri değerlendirme işlemleri Maxquant programı içerisinde yapılmıştır. Bu analizlerde Maxquant programına uygun parametreler girilerek nitel analiz yapılması sağlanmıştır. Maxquant programı ile elde edilen ham MS/MS değerleri veri bankalarında bulunan teorik değerler ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma işleminde deneysel sonuçların seçilen parametrelere göre veri tabanındaki sonuçlara ne kadar yakın olduğu gözlemlenmiştir.

Maxquant programıyla analizlerinde belirlenen ilk parametre parçalayıcı enzim seçimi olmuştur. Parçalayıcı enzim olarak tripsin seçilmiştir. Modifikasyon parametreleri peptitler üzerinde sabit ve değişken olmak üzere iki başlık altında verilmiştir. Sabit modifikasyon olarak sistein üzerinde karboamidometilasyon, değişen modifikasyon olarak metionin üzerindeki oksidasyon ve proteinlerin –N birimleri üzerindeki asetilasyon seçilmiştir. Peptitlerin tanımlanması sırasında en küçük olası peptit uzunluğu 6, en uzun peptit uzunluğu ise 40 aminoasit olarak belirlenmiştir. Ayrıca sistem 4600 Daltondan daha ağır peptitleri elimine edecek şekilde programlanmıştır. Peptitlerin ve proteinleri nitel analizlerinde FDR değeri 0.01 olarak seçilmiştir. Modifikasyonlara uğramış peptitler için skor 10 ve

üzerindekiler kabul edilmiştir. Sığır serum albümin için Bostaurus.FASTA veri bankası kullanılmıştır.

MS ve MS/MS analizlerinde 20 ppm hata payı ile tarama yapılmıştır. Sonuçlar veri bankaları ile karşılaştırılmıştır.

Ayrıca Maxquant programı ile birlikte sığır serum albümin örneklerine ait peptitlerin ve proteinin yoğunlukları hesaplanmıştır.

3.2.4. Sistem Optimizasyonu ve Validasyon Çalışmaları

Sığır serum albümin analizlerinde geliştirilen yöntemin geçerliliği çeşitli parametrelerle test edilmiştir. Yapılan çalışmalarda özgünlük, doğruluk, kesinlik ve doğrusallık parametreleri incelenmiştir (226).

Özgünlük

Tez çalışması kapsamında sistemin özgünlüğü ile ilgili olarak sığır serum albümin içermeyen analiz çözeltisi tripsin ve diğer bütün deneysel kimyasallar içerecek şekilde hazırlanan kör çözeltilerle analiz edilmiştir. Aynı deneysel koşullarda MS/MS verileri elde edilmeye çalışılmıştır. Analiz verileri maxquant programında değerlendirilmiştir. Böylelikle matriks ortamından peptit analizini etkileyen herhangi bir girişim kaynağı olup olmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmalar 6 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Doğruluk

Nitel analizlerin yapılmasında peptitlerin kütlelerinin doğru bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Peptit kütleleri Maxquant programı içerisinde monoizotopik m/z değerlerinden faydalanarak belirlenmektedir. Belirlenen kütleler veri bankalarında bulunan gerçek değerleri ile Maxquant programı içerisinde karşılaştırılmaktadır.

Çalışmalar kapsamında farklı eşleşme skorlarına sahip GLVLIASFQYLQQCPFDEHVK, LGEYGFQNALIVR peptitlerinin kütleleri analizlerde takip edilmiştir. 11 gün boyunca yapılan analizlerde deneysel olarak hesaplanan peptit kütleleri veri bankasında bulunan gerçek kütle değerleri ile karşılaştırılmış ve yüzde bağıl hata (% BH) değerleri hesaplanmıştır. Böylelikle

sistemin peptit kütlelerini ne kadar doğrulukta verdiği belirlenmiştir.

Kesinlik

Çalışmalarda kesinlik parametresi 10 µg sığır serum albümin ile 3 farklı açıdan incelenmiştir.

Kesinlik analizlerinde ilk olarak 11 gün boyunca analizi yapılan 10 µg sığır serum albüminin peptitleri incelenmiştir. 11 günlük verilerden peptitlerin nitel analizlerinde değişimlerin olup olmadığı ve nitel analizin tekrarlanabilirliği kontrol edilmiştir.

Bir başka kesinlik analizinde ise GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK, LGEYGFQNALIVR peptitlerinin 11 gün boyunca değişen alıkonma zamanları, peptit yoğunlukları ve eşleşme skorları incelenmiştir. Yüzde bağıl standart sapma (%BSS) değerleri hesaplanmış ve sonuçlar incelenmiştir. Böylelikle peptitlerin kromatogram içerisindeki yerleri, yoğunlukları ve nitel analizlerinde veri bankaları ile karşılaştırma sonuçlarının tekrarlanabilirliği incelenmiştir.

Kesinlik testleri protein seviyesinde de yapılmıştır. Maxquant programında hesaplanan protein yoğunluğu sonuçları 11 gün boyunca takip edilmiştir. Yüzde BSS değerleri incelenerek sonuçların tekrarlanabilirliğine bakılmıştır.

Elde edilen sonuçlar kaynaklarda belirtilen nano LC yöntemi sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Doğrusallık

Bu çalışma kapsamında 0.5, 1, 5, 10 ve 20 µg sığır serum albümin enjekte edilmiş ve Maxquant programında hesaplanan peptit ve protein yoğunluklarının enjeksiyon miktarı ile değişimi incelenmiştir. Peptit düzeyinde yapılan çalışmalarda diğer parametrelerde de kullanılan GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK, LGEYGFQNALIVR kullanılarak doğrusallık parametresi için deneyler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kaynaklarda belirtilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

3.3. CaCo2 Kolon Kanseri Hücrelerinin Proteomik Açından İncelenmesi

3.3.1. CaCo2 Kolon Kanseri Hücre Kültürü Çalışmaları

CaCo2 kolon kanseri hücrelerinin çoğaltılması ve hücre lizatların eldesi ve deneylerde kullanılmadan önce -80 °C saklanması Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında Prof. Dr. Özden Tacal ve Yrd. Doç. Dr. Kevser Biberöglü tarafından yapılmıştır.

CaCo2 kolon kanseri hücreleri önce % 20 fetal sığır serumu, % 1 sodyum pirüvat, % 1 non-esansiyel amino asit, % 3 sodyum bikarbonat, % 1 Glutamin, % 1 penisilin-streptomisin içeren MEM-Eagle besi yerinde 75 cm²'lik flasklarda çoğaltılmıştır. Bu işlemde proteomik analizler için yeterli olacak hücre sayısına ulaşıncaya kadar devam edilmiştir.

3.3.2. Numune Hazırlama

Hücre kültürü çalışmaları sonrası CaCo2 kolon kanseri hücre hatları DPBS (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH : 7.4,) çözeltisi ile yıkanarak homojenizasyon tamponunda (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 120 mM NaCl, pH:7.4) çözülmüş ve homejenize edilmiştir. Homojenat santrifüj edilmiş(14.000 g x 14 dk, 4 °C' de) ve santrifüj işlemi sonrasında oluşan çökelti (nükleer fraksiyon ve mitokondriyal fraksiyon) atılmıştır. Kalan çözelti ultrasantrifüj cihazında tekrar santrifüj (100.000 g x 1 saat, 4 °C' de) edilmiştir. Santrifugat (sitozolik fraksiyon) alınarak kullanılacağı zamana kadar -80 °C' de 500 µL' lik fraksiyonlar halinde saklanmıştır. Elde edilen hücre lizatı proteomik deneyler için saklanmıştır. Hücre lizatları deney öncesi oda sıcaklığında çözdürülerek hazır hale getirilmiştir.

3.3.3. Protein Miktar Analizi

Hücre lizatları içerisindeki proteinlerin miktar analizi Bio-Rad deterjan uyumlu ölçüm sistemi (Bio-Rad DC™) ile yapılmıştır. Bu sistemin temeli proteinlerin bakır ile kompleks oluşturması ve sonrasında Folin reaktifinin bu kompleks tarafından indirgenmesine dayanan kolorimetrik bir ölçüme dayalı yöntemdir. Bu sistem tüm çalışmalarda standart olarak kullanılan ticari kit ürünleri ile yapılmaktadır.

750 nm dalga boyunda Bio-Rad standart sığır serum albümin ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Regresyon denklemi ve tanımlayıcılık katsayısı hesaplanarak regresyon denkleminde proteinlerin miktar tayini yapılmıştır.

3.3.4. Proteinlerin Metanol, Kloroform, Su Karışımı ile Çöktürülmesi

Elde edilen hücre lizatlarında bulunan proteinlerin diğer bileşenlerden ayrılması için son derece güvenilir, hızlı ve tekrar edilebilir bir yöntem olan metanol, kloroform, su karışımı kullanılmıştır. 100 µL hücre lizatı üzerine 400 µL metanol eklenerek 2 dk vortekslenmiştir. Bu karışımın üzerine 100 µL kloroform eklenerek yine 2 dk vortekslenmiştir. Son olarak sisteme 300 µL su eklenmiştir. 2 dk'lık vorteks sonrasında 14000 g'de 5 dk'lık santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında 3 fazlı bir sistem ortaya çıkmıştır. İlk olarak üstteki sulu faz içerisinde polar metabolitler ayrılmıştır. Alttaki organik fazda ise lipidler bulunmaktadır. Bu iki fazın ortasında ise katı protein pelleti gözlemlenmiştir. Üstteki faz ortamdaki uzaklaştırılarak 400 µL metanol eklenmiştir. İki dk'lık vorteks sonrasında 14000 g'de 5 dk'lık santrifüj yapılmıştır ve proteinler tüpün dibine çökmüştür. Santrifügatın uzaklaştırılmasından sonra proteinler metanol ve kloroformun tamamen sistemden uzaklaşması için 15 dk boyunca oda sıcaklığında bırakılmıştır.

3.3.5. Protein Karışımının Parçalanması

Hücre lizatından elde edilen protein pelleti 100 mM amonyum bikarbonat (%20 metanol (h/h)) çözeltisi içerisinde 4 mg/mL olacak şekilde çözünmüştür. Çözünme işleminde örnekler yaklaşık 30 dk sonikatörde bırakılmıştır. Sonrasında proteinlerin indirgenmesi için 25 µL protein çözeltisi üzerine 200 mM, 5 µL DTT eklenmiştir. DTT ile inkübasyonu 56 °C' de 15 dk boyunca devam etmiştir. Üç boyutlu yapısı bozulan proteinlerin alkillenmesi için 20 µL, 100 mM iyodoasetamid eklenmiştir. Karanlık ortamda, oda sıcaklığında 30 dk boyunca örnekler inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemler sonrasında tripsin enzimi 1:50 (a/a) oranında eklenerek CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait proteinlerin parçalanmaları sağlanmıştır. Bu işlem esnasında sıcaklık 37 °C' ye ayarlanmıştır. İnkübasyon süresi 18 saat olarak belirlenmiştir. 18 saat sonra elde edilen peptit karışımı vakum santrifüjde bırakılarak amonyum bikarbonatın uçurulması sağlanmıştır. Vakum

santrifüj sonrası peptit karışımı 50 µL, %0.1 formik asit içeren (h/h) asetonitril içerisinde çözülmüştür. İşlem sonucunda protein konsantrasyonu 4 mg/mL protein konsantrasyonu olacak şekilde çözelti elde edilmiştir. Böylelikle elde edilen peptit karışımları UPLC/MS analizleri için hazır hale getirilmiştir.

3.3.6. Peptitlerin UPLC/MS ile Analizi

CaCo2 kolon kanseri hücreleri içerisinde bulunan peptitlerinin UPLC ile analizinde kullanılan kromatografik şartlar sığır serum albümin için belirtilen şartlarla hemen hemen aynıdır (Bölüm 3.2.2.). CaCo2 kolon kanseri hücre hattı yüzlerce protein içermektedir. Bu proteinlerin tripsin ile parçalanması ile birlikte binlerce peptit oluşmuştur. Bu peptitlerin bazıları yüksek konsantrasyonda bulunuyorken bazı peptitler eser miktarda bulunmaktadır. Konsantrasyon farklılığı oldukça fazla olan bu binlerce peptidin UPLC ile ayrılması için daha uzun gradient süresine gereksinim duyulmuştur. Kaynaklarda belirtilen gradient süreleri gözönüne alınarak 150 dk'lık gradient sistemi kullanılmıştır (Tablo 3.10.). Böylelikle daha etkin ayırım yapılarak elektrosprey iyonlaşma kaynağında daha fazla peptidin iyonlaşması sağlanmıştır.

Sığır serum albümin analizlerinde olduğu gibi, hacim olarak % 0.1 formik asit içeren (h/h) asetonitril ve sudan oluşan hareketli faz kullanılmıştır. Gradient sistemi içerisinde kompleks peptit karışımı % 3-% 45 asetonitril aralığında ayrılmıştır. Sonrasında sistem yıkama ve yeniden başlangıç koşullarına dönmüştür.

Tablo 3.10. CaCo2 Hücre proteinlerinin analizi için kullanılan gradient sistemi

Zaman (dk)	Asetonitril (%)	Su (%)
0	3	97
130	45	55
135	85	15
136	85	15
138	3	97
150	3	97

UPLC ile ayrılan peptitlerin daha sonra elektrosprey iyonlaşma kaynağında iyonlaşmaları sağlanmıştır. Peptitlerin iyonlaşması için Tablo 3.7. içerisinde kullanılan parametreler aynen kullanılmıştır.

İyonlaşan peptitlerin MS ve MS/MS analizleri QTOF analizörü içerisinde yapılmıştır. QTOF analizlerinde MS ve MS/MS verileri elde etmek için kullanılan deneysel parametreler sığır serum albümin için kullanılan parametrelerle aynıdır (Tablo 3.8., Tablo3.9.). Sığır serum albümininden farklı olarak sistemde 150 dk gradient kullanılmıştır (Tablo 3.10.). Bu nedenle MS/MS verileri 130 dk boyunca sistemden elde edilmiş, sonrasında sistem yıkama ve yeniden başlangıç koşullarına dönmüştür.

CaCo2 kolon kanseri hücreesindeki proteinlerin analizleri için 20, 40 ve 80 µg miktarında enjekte edilmiştir. Her bir miktar için 3'er defa analiz yapılmıştır.

3.3.7. Verilerin Maxquant Programında Değerlendirilmesi

Elde edilen MS/MS deney sonuçları Maxquant programında veri bankası olarak uniprot HUMAN kullanılarak değerlendirilmiştir.

Nitel analizde ilk olarak MS peptit kütleleri taranarak olası peptitler belirlenmiştir. Sonrasında ise belirlenen peptitlerin MS/MS verileri teorik sonuçlarla karşılaştırılmıştır. MS ve MS/MS verilerinin teorik sonuçlarla karşılaştırılmasında 20 ppm hata limiti belirlenmiştir.

Sabit modifikasyon olarak sistein üzerinde karboamidometilasyon ve değişen modifikasyon olarak metionin üzerindeki oksidasyon ve proteinlerin -N birimleri üzerindeki asetilasyon seçilmiştir. Peptitlerin tanımlanması sırasında en küçük olası peptit uzunluğu 6, en uzun peptit uzunluğu ise 40 aminoasitten meydana gelecek şekilde düşünülmüştür. Ayrıca sistem 4600 Daltondan daha ağır peptitleri elimine edecek şekilde programlanmıştır. Peptitlerin nitel analizlerinde FDR değeri 0.01 olarak seçilmiştir. Proteinler için FDR değeri 0.01 olarak belirlenmiştir. Modifikasyonlara uğramış peptitler için skor 10 ve üzerindeki kabul edilmiştir. Proteinlerin tanımlanması için bir proteinlerin en az 10 skor puanına sahip olması istenmiştir.

20, 40 ve 80 µg protein analizlerinde her bir miktar için üç enjeksiyon yapılmıştır. Maxquant programı ile analizlerde yapılan bütün enjeksiyonlardan elde

edilen sonuçlar incelenmiştir. En az 2 enjeksiyonda gözlemlenen proteinlerin nitel analizi kabul edilmiştir.

Nicel analiz çalışmalarında maxquant programı içerisinde işaretli nicel analiz algoritması (MLFQ algoritması) kullanılmıştır. Proteinlere ait peptitlerden yola çıkarak proteinlerin yoğunlukları hesaplanmıştır. Bir proteinin yoğunluğunun belirlenebilmesi için o proteine ait en az iki peptit yoğunluğunun sistem içerisinde olması gerektiği belirlenmiştir. Elde edilen protein yoğunlukları toplam protein yoğunluklarına göre normalize edilmiş böylelikle deneysel hataların payı en aza indirilmiştir.

3.3.8. Maxquant Sonuçlarının Perseus İstatistik Programında Değerlendirilmesi

Perseus ile analizlerde öncelikle kontaminasyon olabilecek proteinler ve tuzak veri bankası ile eşleşen yanlış proteinler verilerde elimine edilmiştir. Analiz edilen proteinlere ait yoğunluklar daha rahat işlem yapılabilmesi amacıyla Log 2 türüne çevrilmiştir.

80 µg protein miktarı için yapılan 3'er enjeksiyondan elde edilen veriler Maxquant programında değerlendirildikten sonra Perseus programı ile analiz edilmiştir. Perseus programında 3 enjeksiyondan elde edilen protein yoğunlukları incelenmiştir.

Sonuçların Hücre Biyoloji İçerisinde Değerlendirilmesi

Geliştirilen UPLC/MS yöntemi ile analiz edilen proteinler hücre içerisinde buldukları yere, sınıfa ve moleküler özelliklerine göre gen ontoloji analizi ile incelenmiştir.

Nitel analizi yapılan proteinlerin hücrenin hangi kısımlarından geldiği, hücre içerisindeki işlevlerinin ne olduğunu anlamak için elde edilen proteinler gen ontoloji analizi ile incelenmiştir. Böylece Panther programı ile yapılan gen ontoloji analizleri ile Proteinleri hücre içerisinde hangi biyolojik süreçlerde buldukları, hangi protein sınıfına ait oldukları, hücrenin hangi parçasında oldukları saptanmıştır.

Proteinlerin bağılı oldukları gen isimleri girilerek proteinlerin sistemde tanımlanması sağlanmıştır. Örnek için taksonomik birim *homo sapiens* seçilmiştir.

3.4. Bitkisel Temelli Hemostatik Ajanın CaCo2 Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkisinin Proteomik Açından İncelenmesi

3.4.1. Örnek Hazırlama

CaCo2 kolon kanseri hücreleri daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi hücre kültürü içerisinde çoğaltılmıştır (Bölüm 3.3.1.). Kolon kanseri hücrelerinin çoğaltılmasından sonra bitkisel temelli hemostatik ajan ile muamele edilmesi işlemi Hacettepe üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında Prof. Dr. Özden Tacal ve Yrd. Doç. Dr. Kevser Biberoğlu tarafından yapılmıştır. Hücreler daha sonra 2 gruba ayrılmıştır. Birinci gruba 8 µL/mL'lık bitkisel temelli hemostatik ajan eklenmiştir. Hemostatik ajanın eklenmesinden sonra 48 saatlik bir inkübasyon süresi beklenmiştir. Bu gruba T grubu denilmiştir. Diğer hücre grubuna ise hemostatik ajan eklenmemiş ve kontrol grubu olarak aynı koşullarda 48 saat bekletilmiştir. Bu gruba K grubu denilmiştir.

Liziz prosedürleri, proteinlerin çöktürülmesi, proteinlerin miktarının belirlenmesi, proteinlerin peptitlerine parçalanması kısımları Bölüm 3.3. içerisinde belirtilen şekilde yapılmıştır.

3.4.2. Proteinlerin UPLC/MS Yöntemi ile Analizi

Proteinler Tablo 3.10'da kullanılan gradient sistemi ile UPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz sırasında kullanılan MS ve MS/MS parametreleri daha önce belirlenen parametrelerle olacak şekilde ayarlanmıştır (Bölüm 3.2.2.).

3.4.3. UPLC/MS verilerinin Maxquant Programı ile Değerlendirilmesi

Maxquant programı ile yapılan analizler Bölüm 3.3.7'de belirlenen şartlar altında yapılmıştır.

3.4.3. Maxquant Programı ile Elde Edilen Sonuçların Perseus Programı ile Değerlendirilmesi

Maxquant programı ile elde edilen veriler Perseus programında incelenmiştir. Elde edilen protein yoğunlukları K ve T grupları arasında çift yönlü t testi yapılarak karşılaştırılmıştır. Bu test sonucunda farklılığı istatistiksel olarak anlamlı olan proteinlerin değişim oranları bulunmuştur ($p < 0.05$).

Elde edilen protein analizleri iki türlü değerlendirilmiştir. İlk olarak bitkisel hemostatik ajan etkisi ile azalan proteinler, ikinci kısımda ise bitkisel hemostatik ajan etkisi ile artan proteinler belirlenmiş ve değerlendirilmiştir.

3.4.5. Verilerin Hücre Biyolojisi İçerisinde Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlar String programı ile değerlendirilmiştir. Bu program ile miktarı artan veya azalan proteinlerin aralarındaki ilişkiler incelenmiştir. Ayrıca bulunan sonuçlar kaynaklardaki sonuçlarla karşılaştırılarak bitkisel hemostatik ajanın hücre içerisinde hangi önemli yolak ve hedefleri etkilediği araştırılmıştır. Çalışmalarda taksonomik birim olarak *homo sapiens* belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Geliştirilen UPLC/MS yönteminden elde edilen verilerin incelenmesi ve bu verilerin protein düzeyinde değerlendirilebilir hale gelmesi Maxquant biyoinformatik sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

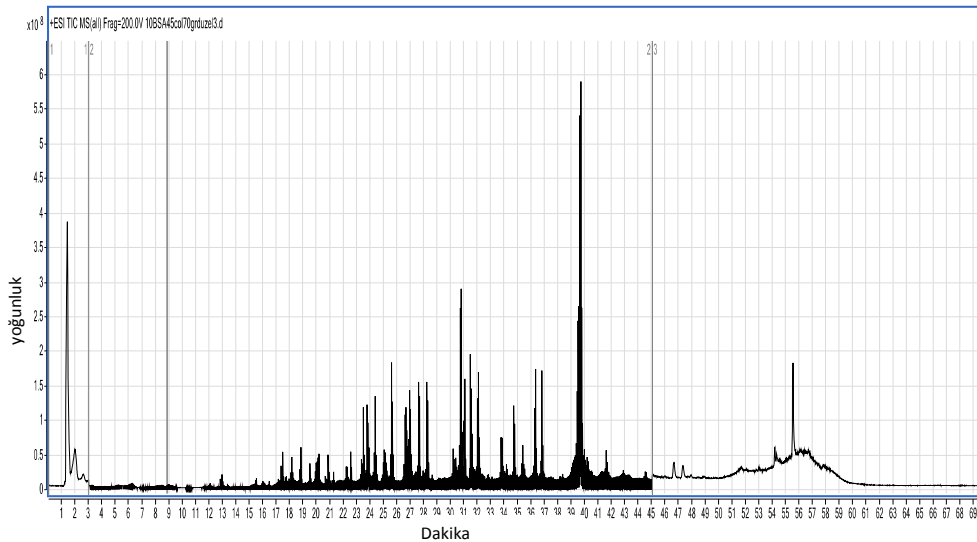
4.1. Sığır Serum Albüminin Nitel Analizi

Sığır serum albümin proteini referans standart madde olarak ele alınmıştır. Tez kapsamında geliştirilen UPLC/MS yönteminin Maxquant programı ile uyumlu ve güvenilir sonuçlar verip vermediği araştırılmıştır.

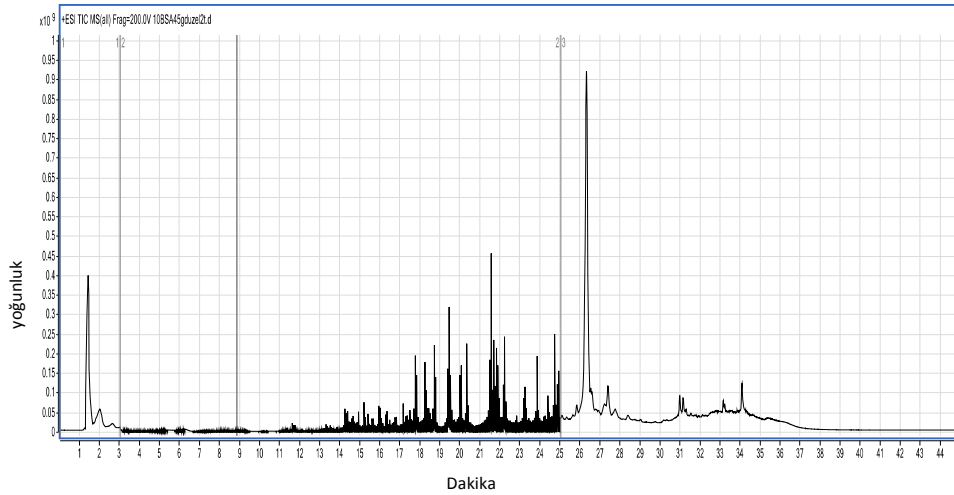
4.1.1. Gradient Süresinin Optimizasyonu

Sığır serum albüminin UPLC ile analizinde iki farklı gradient sistemi kullanılmıştır. Toplamda 70 (gradient 1) ve 45 (gradient 2) dk bu iki gradient (Bölüm 3.2.2. Tablo 3.5 ve Tablo 3.6) sistemi nitel analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.1 ve 4.2’de gradient 1 ve gradient 2’den elde edilen sığır serum albümin kromatogramları gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Sığır serum albüminin 70 dk’lık gradient kromatogramı



Şekil 4.2. Sığır serum albüminin 45 dk'lık gradient kromatogramı

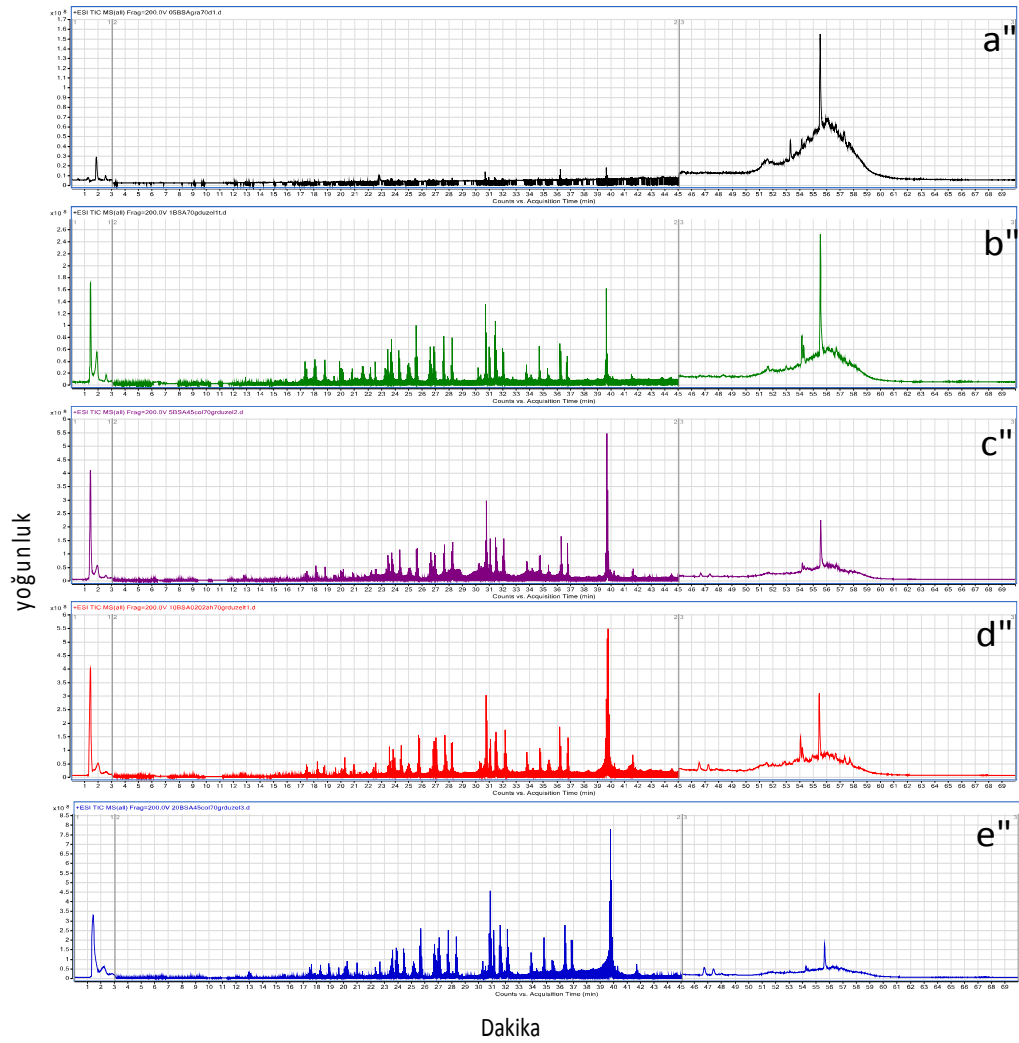
4.1.2. Proteinlerin Nitel Analizinde Enjeksiyon Miktarının Optimizasyonu

Sığır serum albüminin analizinde değişik miktarlarda proteinler (0,5, 1, 5, 10 ve 20 µg) enjekte edilmiştir. Her bir miktar için 3 tekrar yapılmış ve en az iki enjeksiyonda gözlemlenen peptitler incelenmiştir.

Bu enjeksiyon miktarları için elde edilen kromatogramlar Şekil 4.3.'te her bir enjeksiyon miktarı için Maxquant programı ile yapılan analizlerde elde edilen peptit sayıları ve sığır serum albüminin yüzde olarak protein içerikleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.2.'de her bir enjeksiyonda nitel analizi yapılan peptitlerin amino asit dizileri verilmiştir.

Artan enjeksiyon miktarı ile birlikte artan peptit sayıları ve nitel analizi yapılan sığır serum albümin yüzde olarak protein içerikleri Şekil 4.4.'de verilmiştir.



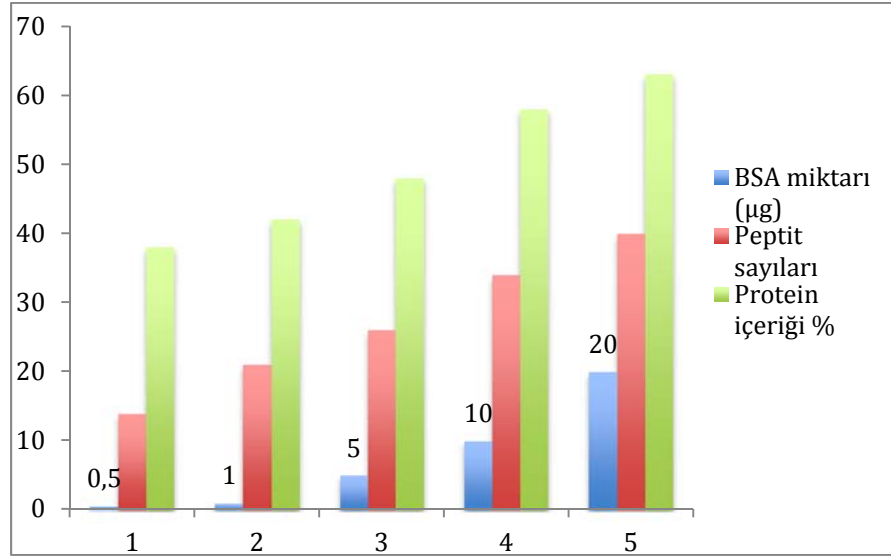
Şekil 4.3. a) 0,5, b) 1, c) 5, d) 10, e) 20 µg sığır serum albümine ait kromatogramlar

Tablo 4.1. 0.5, 1, 5, 10, 20 µg sığır serum albümine ait peptit sayıları ve tanımlanabilen protein yüzdesi

BSA miktarı (µg)	Peptit sayıları	Protein içeriği %
0.5	14	28
1	21	42
5	26	48
10	34	58
20	38	63

Tablo 4.2. 0,5, 1, 5, 10, 20 µg sığır serum albümine ait peptitler

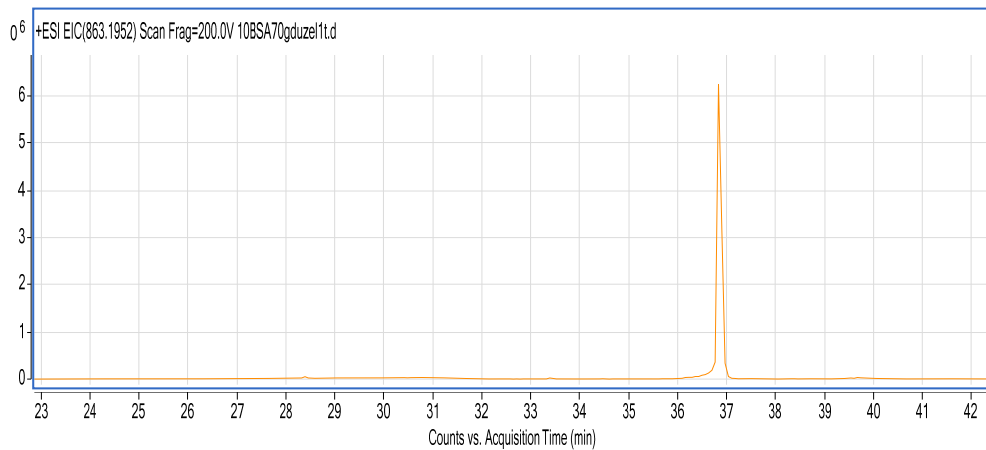
Peptit	0.5 µg	1 µg	5 µg	10 µg	20 µg
CCAADDKEACFAVEGPK					+
CCTESLVNR			+	+	+
DAFLGSFLYEYSR			+	+	+
DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK	+	+	+	+	+
DDPHACYSTVFDK	+	+	+	+	+
EACFAVEGPK			+	+	+
ECCHGDLLECADDR				+	+
ECCHGDLLECADDRADLAK			+	+	+
ETYGDMADCCEK	+	+	+	+	+
ETYGDMADCCEKQEPER			+	+	+
EYEATLEECCA		+		+	+
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	+	+	+	+	+
HLVDEPQNLIK		+	+	+	+
HPYFYAPELLYYANK			+	+	+
KVPQVSTPTLVEVSR	+	+	+	+	+
LFTFHADICTLPDTEK	+	+	+	+	+
LGEYGFQNALIVR	+	+	+	+	+
LKPDPNTLCDEFKADEK		+	+	+	+
LMIMMATRNIVR					+
LVNELTEFAK			+	+	+
MPCTEDYLSLILNR	+	+	+	+	+
NECFLSHKDDSPDLPK					+
QTALVELLK				+	+
RHPEYAVSVLLR	+	+	+	+	+
RHPYFYAPELLYYANK	+	+	+	+	+
RPCFSALTPDETYVPK		+	+	+	+
SHCIAEVEK				+	+
SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK	+	+	+	+	+
SLHTLFGDELCK		+	+	+	+
TCVADESHAGCEK			+	+	+
TVMENFVAFVDK	+	+	+	+	+
TVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPK				+	+
VHKECCHGDLLECADDR	+	+		+	+
VHKECCHGDLLECADDRADLAK				+	+
VLDQYIFELSR					+
YICDNQDTISSK		+	+	+	+
YLYEIAR	+	+		+	+
YNGVFQECCQAEDK		+	+	+	+



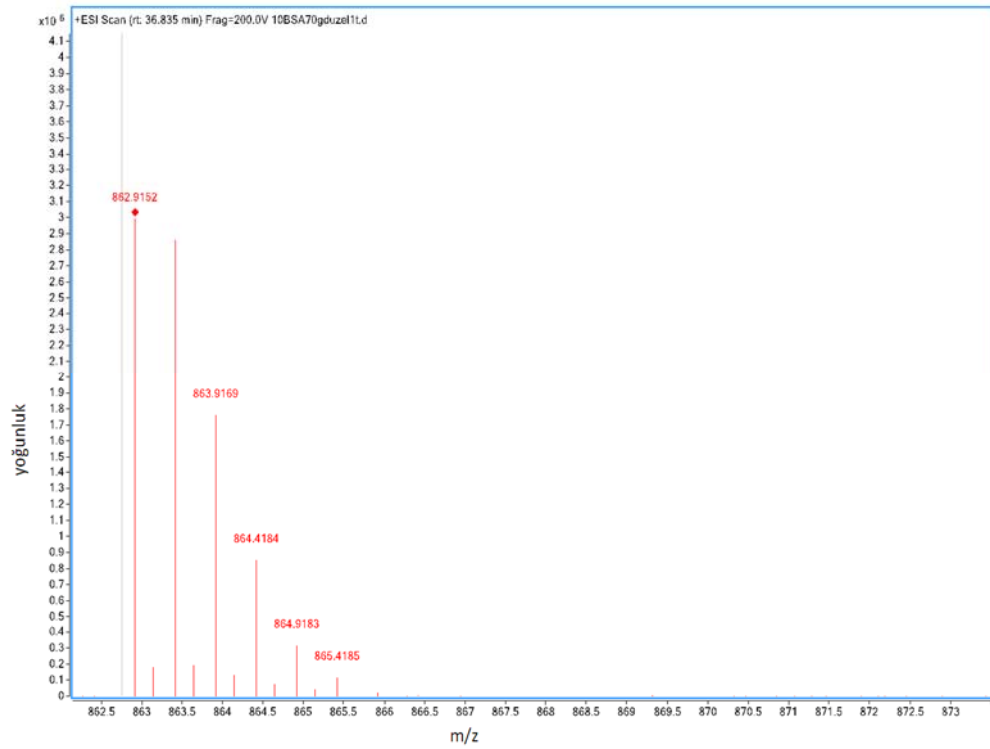
Şekil 4.4. Enjeksiyon miktarı ile birlikte nitel analizi yapılan peptit sayısının ve yüzde protein içeriğinin değişimi

4.2. Maxquant ile Örnek Peptit Nitel Analizi

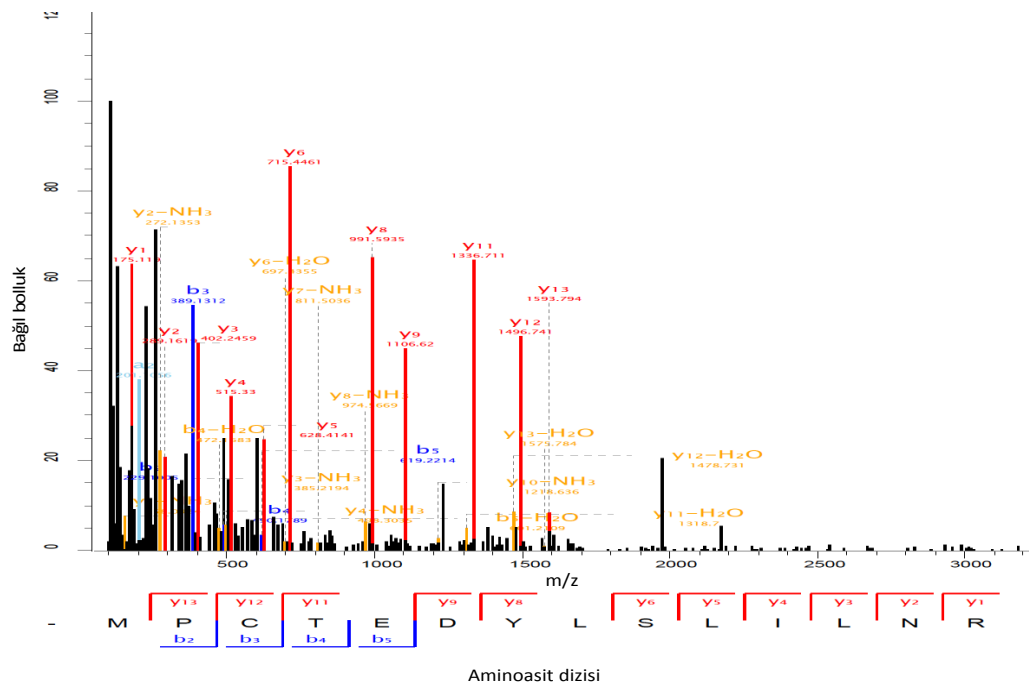
Şekil 4.5.'de ayrıştırılmış iyon kromatografisi içerisinde pik görülmektedir. Görülen pikin alıkonma zamanı 36,8 dk olarak belirtilmiştir. Pikin izotop kümeleri Şekil 4.6.'da verilmiştir. Elde edilen monizotop pikinin MPCTEDTSLINR peptidine ait teorik MS/MS verileri ile eşleşmesi Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. MPCTEDYLSLILNR peptidine ait ayrıştırılmış iyon kromatografisi



Şekil 4.6. MPCTEDYLSLILNR peptidine ait izotop pikler



Şekil 4.7. MPCTEDYLSLILNR peptidine ait MS/MS verileri ve eşleşen fragment iyonları.

Ön tarama sonrası monoizotopik pike ait MS/MS verisi olası peptide ait MS/MS verisi ile karşılaştırılması ile yapılan fragment iyon eşleşmesi ve Tablo 4.3.'de eşleşme hata payları verilmiştir.

Tablo 4.3. MPCTEDYLSLILNR peptidine ait fragment iyonları ve eşleşmede gözlemlenen kütle hataları.

İyon	Ölçüm hatası (ppm)
y1	12.9547
y2	14.2285
y3	10.6168
y4	7.45017
y5	5.3912
y6	5.6604
y8	0.6500
y9	-0.3534
y11	-0.5625
y12	3.4685
y13	-7.8013
y1-NH ₃	18.7195
y2-NH ₃	15.0451
y3-NH ₃	10.7929
y4-NH ₃	0.5628
y6-H ₂ O	16.1725
y8-NH ₃	-9.3102
y11-H ₂ O	-3.1103
y12-H ₂ O	4.9824
y13-H ₂ O	4.9974
a2	-11.4955
b2	-5.6915
b3	13.0506
b4	-2.8241
b4-H ₂ O	0.4906
b5	9.9068
b5-H ₂ O	11.8860

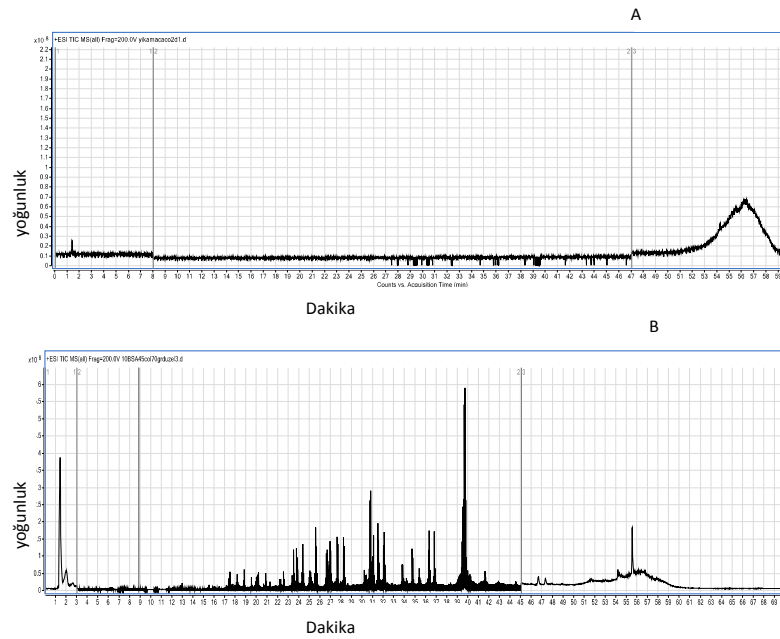
Tez çalışmasında standart sığır serum albümin ve CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait peptitlerin nitel analizleri bu örnekteki gibi yapılmıştır. Nitel analizleri yapılan Peptitlerden yola çıkarak proteinlerin de nitel analizleri yapılmıştır.

4.3. Sığır Serum Albumin Analizlerinde Validasyon Çalışmaları

Validasyon çalışmalarında bazı parametreler hem protein hem de peptit düzeyinde çalışılmıştır. Analizler ICH klavuzuna göre yapıldığı için özgünlük parametresi ile çalışmalara başlanılmıştır (226); daha sonraki çalışmalarda doğruluk, kesinlik ve doğrusallık parametreleri de çalışılmıştır.

Özgünlük

Özgünlük deneyleri için 10 µg sığır serum albümin olan ve sığır serum albümin proteini olmayan kör çözeltiler analiz edilmiştir. Bu örneklerin analizine ait kromatogramlar Şekil 4.8.'de verilmiştir.

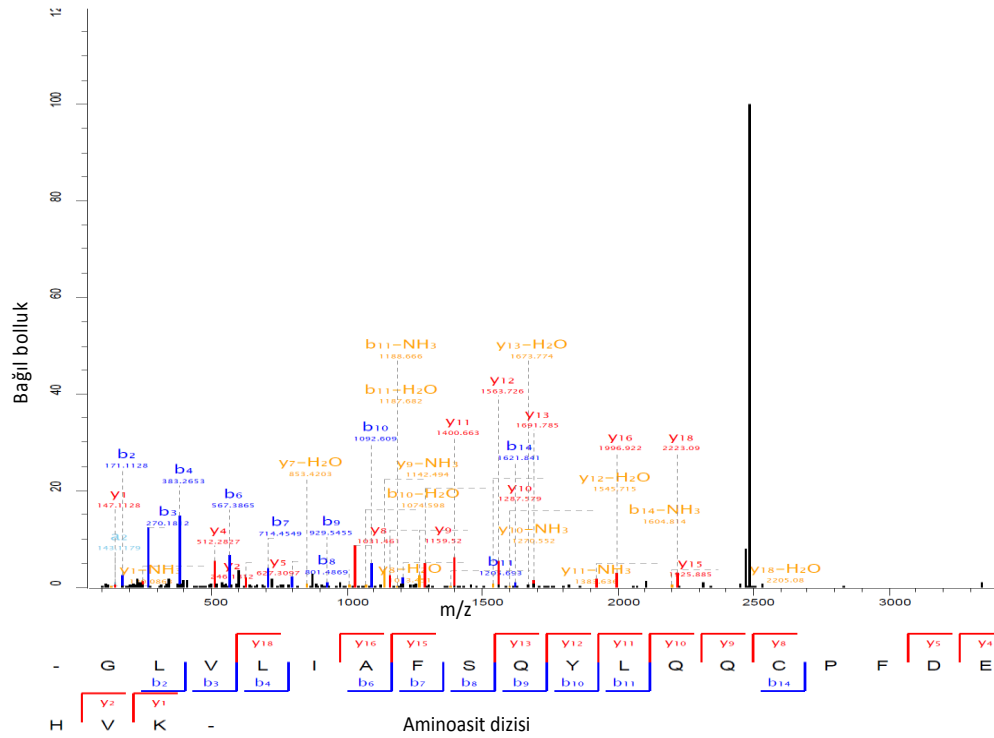


Şekil 4.8. a) İçerisinde Sığır serum albümin olmayan ortamda (kör çözelti) elde edilen kromatogram, b) Sığır serum albüminli ortamda elde edilen kromatogram,

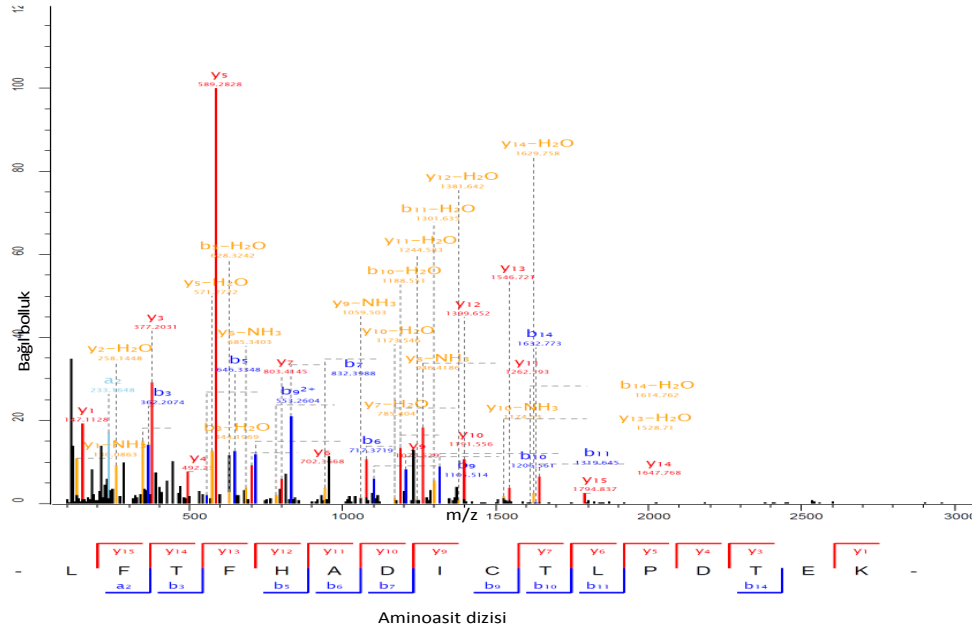
Doğruluk

Peptitlerin nitel analiz sonuçlarında Maxquant programı ile hesaplanan peptit kütlesi gerçek değerler ile karşılaştırılmıştır. 11 gün boyunca yapılan

ölçümlerden elde edilen peptit kütleleri very bankalarında bulunan gerçek değerler ile karşılaştırılmış ve %BH değerleri hesaplanmıştır. GLVLIAPSQYLQQCPFDEHVK, LGEYGFQNALIVR peptitleri doğruluk analizlerinde kullanılmıştır. Bu peptitlere ait MS/MS verisi ve amino asit dizilimi Şekil 4.9. ve 4.10.'da verilmiştir. Tablo 4.4.'de GLVLIAPSQYLQQCPFDEHVK peptidi ve Tablo 4.5.'de LGEYGFQNALIVR peptidi için 11 günde elde edilen sonuçlar verilmiştir.



Şekil 4.9. GLVLIAPSQYLQQCPFDEHVK peptidine ait MS/MS spektrumu ile birlikte nitel analizde tespit edilen fragment iyonlar ve amino asit dizileri



Şekil 4.10. LGEYGFQNALIVR peptidine ait MS/MS spektrumu ile birlikte nitel analizde tespit edilen fragment iyonlar ve amino asit dizileri

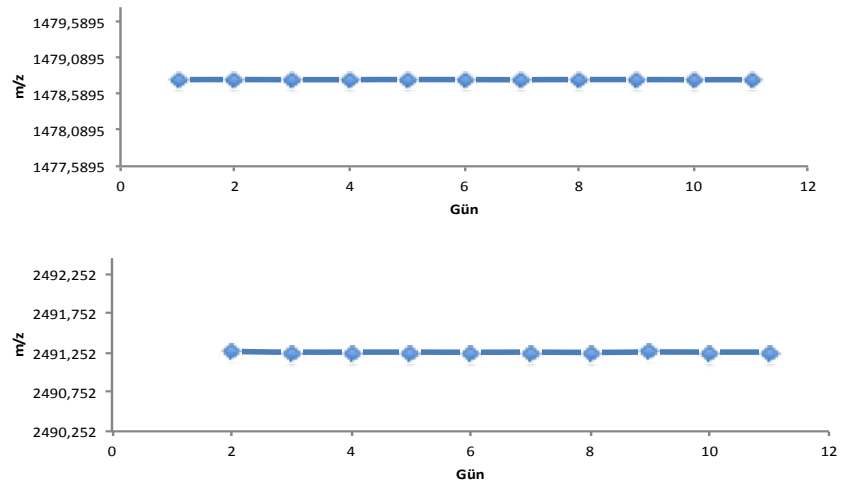
Tablo 4.4. GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidine ait deneysel ve gerçek kütlelerin karşılaştırılması

Deneysel peptit kütlesi (Da)	Gerçek peptit kütlesi (Da)	Yüzde bağıl hata
2491, 2562	2491,2569	$2,83 \times 10^{-5}$
2491,2587	2491,2569	$-7,22 \times 10^{-5}$
2491,2560	2491,2569	$3,61 \times 10^{-5}$
2491,2572	2491,2569	$-1,20 \times 10^{-5}$
2491,2571	2491,2569	$-8,02 \times 10^{-6}$
2491,2543	2491,2569	$1,04 \times 10^{-5}$
2491,2577	2491,2569	$-3,21 \times 10^{-5}$
2491,2531	2491,2569	$1,52 \times 10^{-5}$
2491,2582	2491,2569	$-5,21 \times 10^{-5}$
2491,2567	2491,2569	$8,02 \times 10^{-6}$
2491,2578	2491,2569	$-3,61 \times 10^{-5}$

Tablo 4.5. LGEYGFQNALIVR peptidine ait deneysel ve teorik değerlerin karşılaştırılması

Deneysel peptit kütlesi (Da)	Gerçek peptit kütlesi (Da)	Yüzde bağıl Hata
1478,7884	1478,7881	$-1,62 \times 10^{-5}$
1478,7888	1478,7881	$-4,32 \times 10^{-5}$
1478,7869	1478,7881	$8,52 \times 10^{-5}$
1478,7879	1478,7881	$1,75 \times 10^{-5}$
1478,7887	1478,7881	$-3,65 \times 10^{-5}$
1478,7883	1478,7881	$-9,46 \times 10^{-6}$
1478,7867	1478,7881	$9,87 \times 10^{-5}$
1478,7892	1478,7881	$-7,03 \times 10^{-5}$
1478,7884	1478,7881	$-1,62 \times 10^{-5}$
1478,7876	1478,7881	$3,78 \times 10^{-5}$
1478,7881	1478,7881	$4,05 \times 10^{-6}$

Peptitlerin m/z değerlerinin 11 gün boyunca değişimleri Şekil 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.11. GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK (a), LGEYGFQNALIVR (b) peptitlerine ait MS değerlerinin 11 gün boyunca değişimi

Kesinlik

Sistemin kesinliği ile ilgili olarak üç farklı yöntem kullanıldığı deneysel kısımda belirtilmiştir (Bölüm 3.2.4). Yapılan analizlerle her gün yeni hazırlanan 10 µg sığır serum albüminlerle birlikte 11 gün boyunca devam edilmiştir ve her gün 3 enjeksiyon yapılmıştır (n=3).

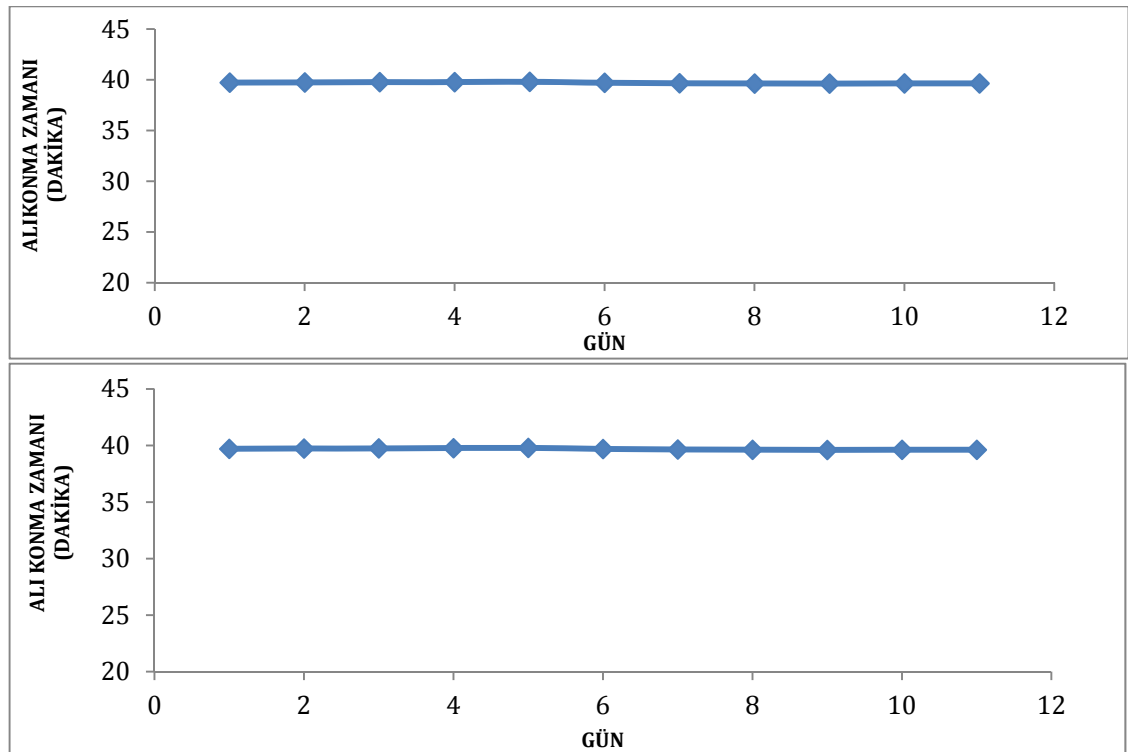
İlk kısımda sığır serum albümininin nitel analizinin verimini incelemek için 11 gün boyunca elde edilen veriler Maxquant programında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda 11 gün boyunca her gün Tablo 4.6. içerisinde gösterilen 27 peptit nitel analizde saptanmıştır. CCTESLVNR, ECCHGDLLECADDR, DDPHACYSTVFDK, VPQVSTPTLVEVSR, TVMENFVAFVDKCCAADDKEAC FAVEGPK, ETYGDMA DCCEKQEPER, SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAED KDVCK peptitleri ise 11 günlük çalışmada 10 gün boyunca; EACFAVEGPK, KQTALVELLK, VPTAHLEDVLPLAEDITTILSK, HPHYFYAPELLYYANK, MPCTEDYLSLILNR peptitleri ise 9 gün boyunca gözlemlenmiştir.

Tablo 4.6. 11 gün süresince yapılan deneylerde bulunan ortak peptitler

Peptitler
KVPQVSTPTLVEVSR
LFTFHADICTLPDTEK
MPCTEDYLSLILNR
SLHTLFGDELCK
ETYGDMA DCCEK
RHPYFYAPELLYYANK
SHCIAEVEK
DAFLGSFLYEYSR
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK
VLDQYIFELSR
YNGVFQECCQAEDK
YICDNQDTISSK
RHPEYAVSVLLR
ECCHGDLLECADDR
TCVADESHAGCEK
LGEYGFQNALIVR
NECFLSHKDDSPDLPK

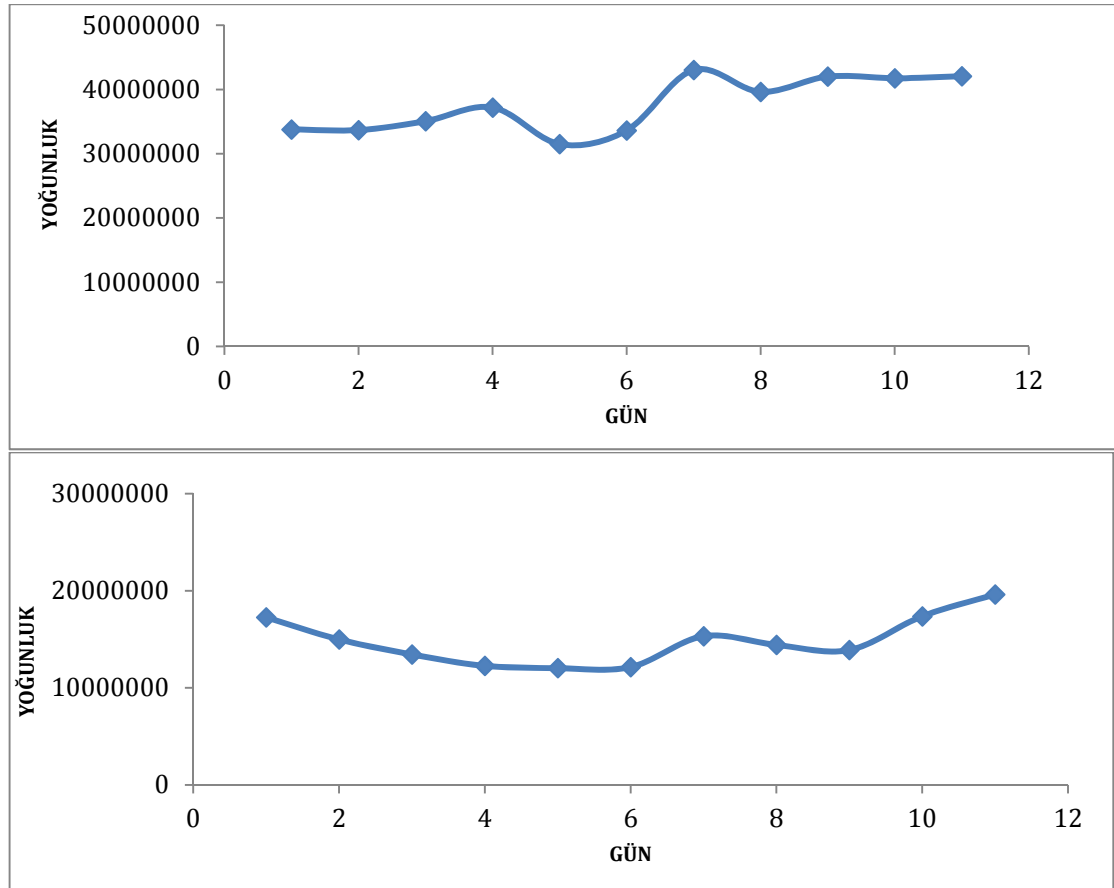
EYEATLEECCA
VHKECCHGDLLECADDR
TVMENFVAFVVK
DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK
LYYEIAR
RPCFSALTPDETYVPK
VHKECCHGDLLECADDRADLAK
HLVDEPQNLK
LKPDPNTLCDEFKADEK
QTALVELLK

GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitleri tekrarlanabilirlik çalışmalarında kullanılmıştır. Şekil 4.12.'de alıkonma zamanlarının günler arası değişimi verilmiş, %BSS değeri GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidi için % 0.19 ve LGEYGFQNALIVR peptidi için % 0.17 olarak hesaplanmıştır.



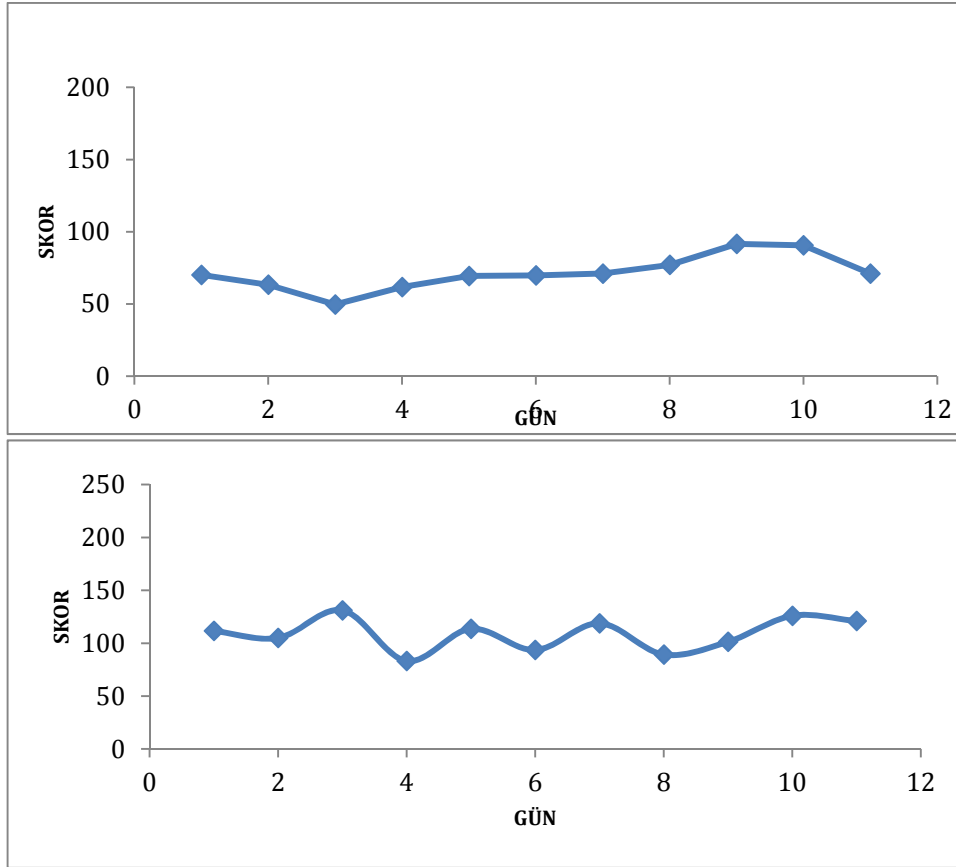
Şekil 4.12. GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerinin alıkonma zamanlarının günler arası değişimi

Maxquant programı ile peptitlerin yoğunlukları 11 gün boyunca hesaplanmıştır (Şekil 4.13). GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidi için %BSS değeri % 11,24, LGEYGFQNALIVR peptidi için ise %BSS değeri % 14,58 olarak bulunmuştur.



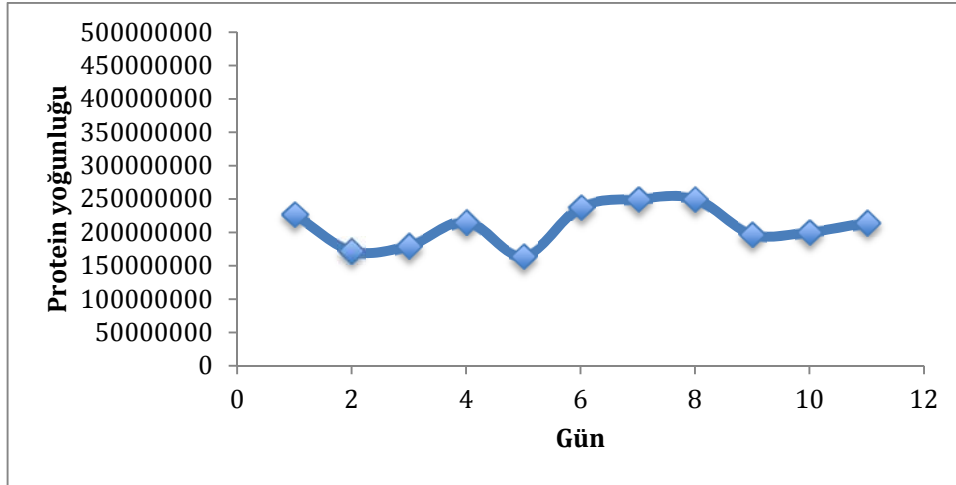
Şekil 4.13. GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerine ait yoğunluklarının 11 gün boyunca değişimi

Çalışmalarda eşleşme skorları da kullanılmıştır. Bunun için MS/MS verileri elde edilen peptitlerin teorik sonuçlar ile ne kadar eşleştiği incelenmiştir. Burada yapılan ölçümlerde GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitleri için skorlardaki gelen %BSS değerleri ölçülmüş ve % 12.29 ile % 15.75 değeri olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerine ait eşleşme skorlarının 11 gün boyuca gösterdiği değişimi

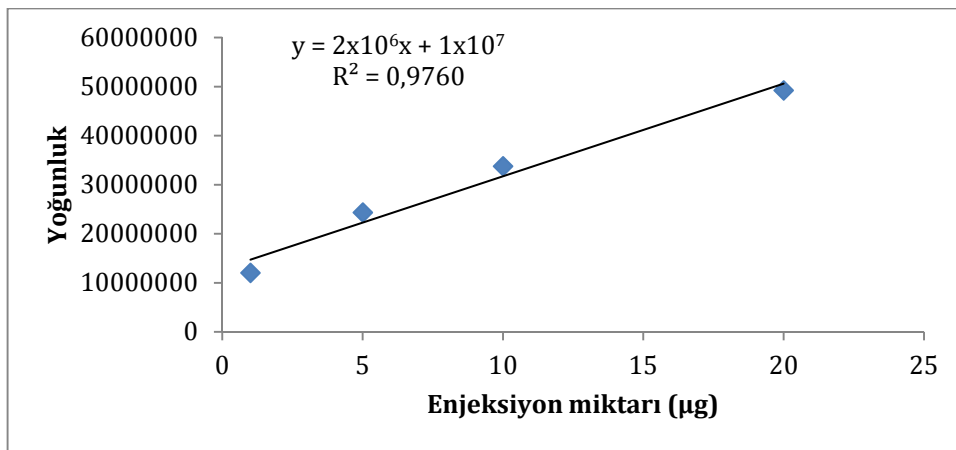
Protein boyutunda da tekrarlanabilirlik analizleri yapılmıştır. Sığır serum albümin ile yapılan çalışmalar Şekil 4.15'te verilmiştir. Protein yoğunluğunun % BSS değeri %14.27 olarak hesaplanmıştır.



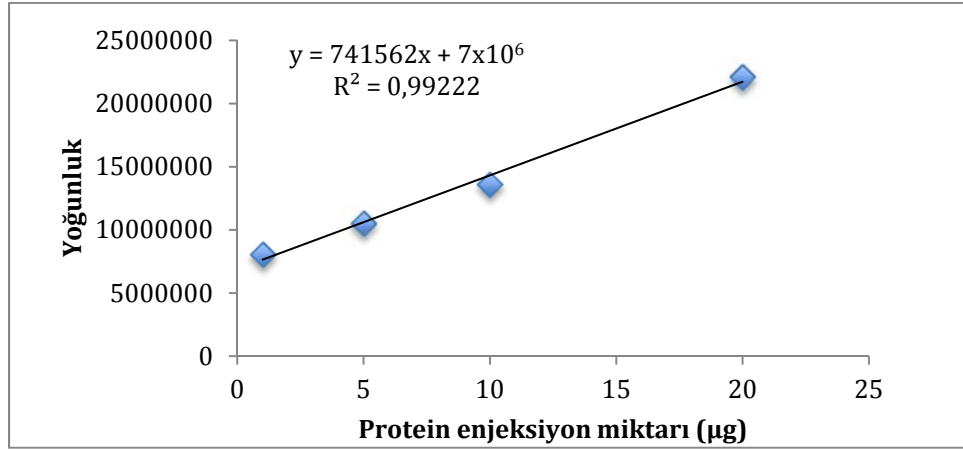
Şekil 4.15. Sığır serum albümin proteinine ait yoğunlukların 11 gün boyunca değişim grafiği

Doğrusallık

GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerine ait yoğunluklar Maxquant programı ile hesaplandıktan sonra enjeksiyon miktarına göre grafiğe geçirilmiş ve doğrusallık denklemleri Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.'de verilmiştir. Yapılan analizlerdeki GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidi için R^2 değeri 0.976 olarak gözlemlenirken LGEYGFQNALIVR peptidi için 0.992 olarak belirlenmiştir.

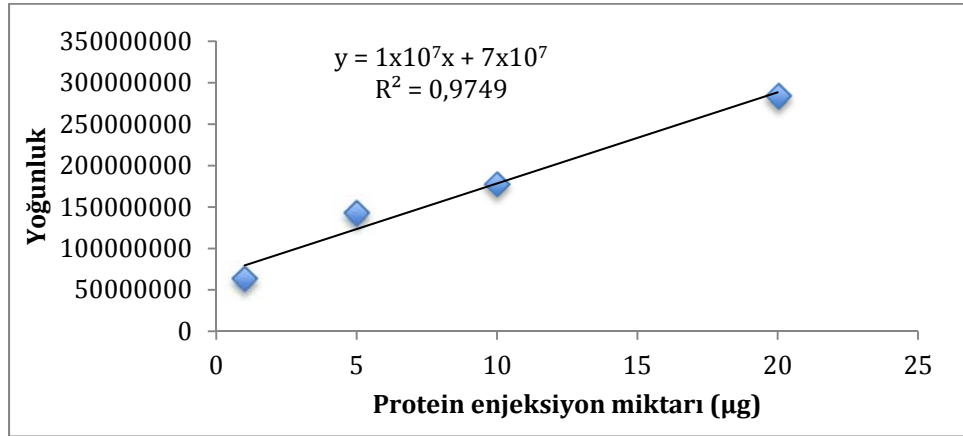


Şekil 4.16. GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidine ait yoğunluğun enjeksiyon miktarı ile değişimi



Şekil 4.17. LGEYGFQNALIVR peptidinin yoğunluğunun enjeksiyon miktarı ile değişimi

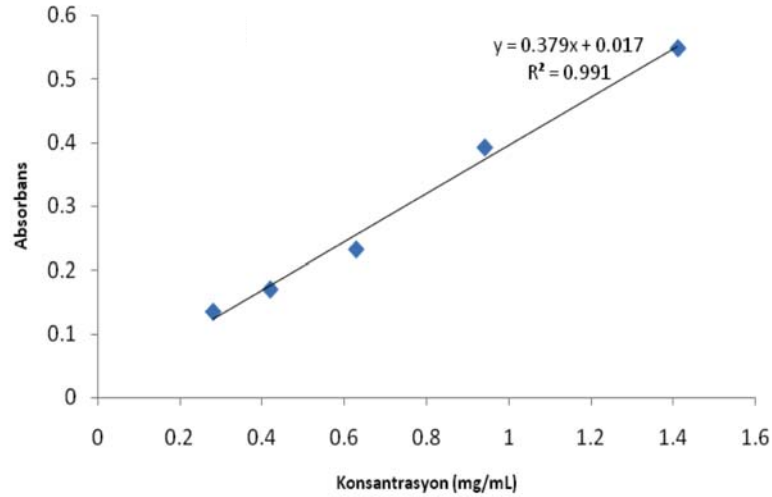
Peptitler için yapılan analizler protein boyutunda da sığır serum albümin ile yapılmıştır. Maxquant programı ile hesaplanan protein yoğunluğu enjeksiyon miktarına göre grafiğe geçirilmiş ve doğrusallık denklemi Şekil 4.18.'de verilmiştir. Protein için yapılan analizlerde R^2 değeri 0.9749 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.18. Protein yoğunluğunun enjeksiyon miktarı ile değişimi

4.4. CaCo2 Kolon Kanseri Hücrelerinin Proteomik Açından Nitel Analizi

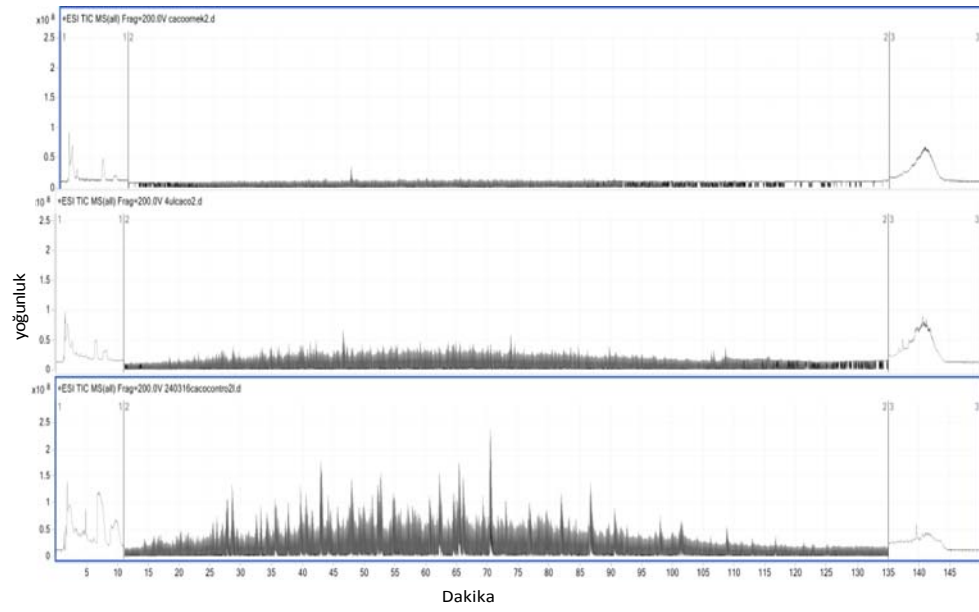
Protein miktar analizlerinde ilk olarak kit içerisinde bulunan sığır serum albümin ile kalibrasyon doğrusu çizilmiştir (Şekil 4.19). Elde edilen kalibrasyon doğrusu sonrasında hazırlanan CaCo2 kolon kanseri hücrelerinin konsantrasyonu 1.106 mg mL^{-1} olarak hesaplanmıştır.



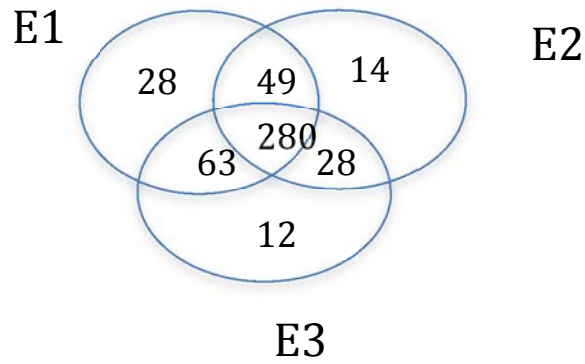
Şekil 4.19. Sığır serum albümin standart proteini ile kalibrasyon doğrusu

4.4.1. CaCo2 Hücrelerinin LC/MS ve Maxquant Programı ile Analizleri

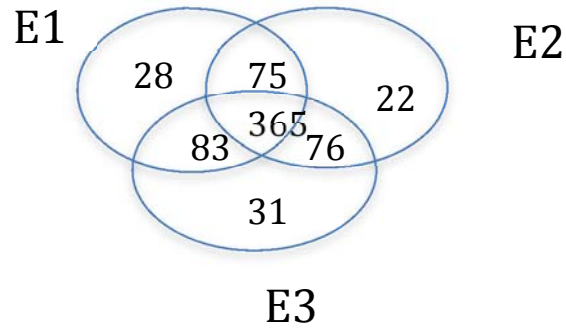
Proteomik analizler için ilk önce analiz edilecek optimum protein miktarı 20, 40 ve 80 µg enjeksiyon miktarı kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi 20, 40 ve 80 µg proteinleri enjekte edilmiştir ve her bir enjeksiyon sonrası elde edilen MS/MS verilerinden faydalanarak proteinlerin nitel analizi yapılmıştır. Elde edilen MS ve MS/MS verileri Maxquant programında analiz edilmiştir. Analizler sonucunda 3 farklı enjeksiyondan 20 µg için Şekil 4.21.'de gösterilen Venn şeması elde edilmiştir. Şekil 4.22. ve 4.23.'de ise 40 ve 80 µg protein miktarları için elde edilen Venn şemaları gösterilmiştir.



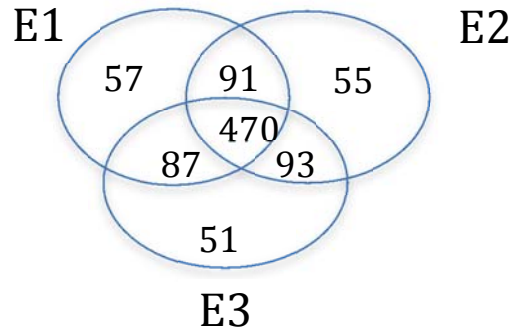
Şekil 4.20. 20, 40 ve 80 µg protein enjeksiyon miktarlarına göre elde edilen kromatogramlar



Şekil 4.21. 20 µg CaCo2 kolon kanseri hücresi içinde bulunan ve 3 farklı enjeksiyonda elde edilen protein sayıları

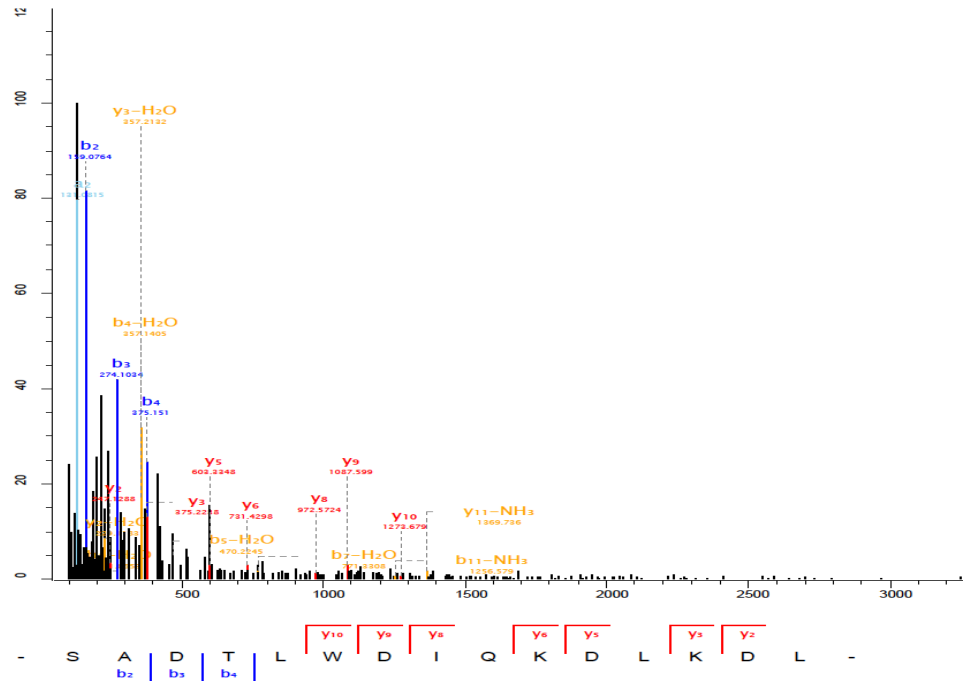


Şekil 4.22. 40 µg CaCo2 kolon kanseri hücresi içinde bulunan ve 3 farklı enjeksiyonda elde edilen protein sayıları

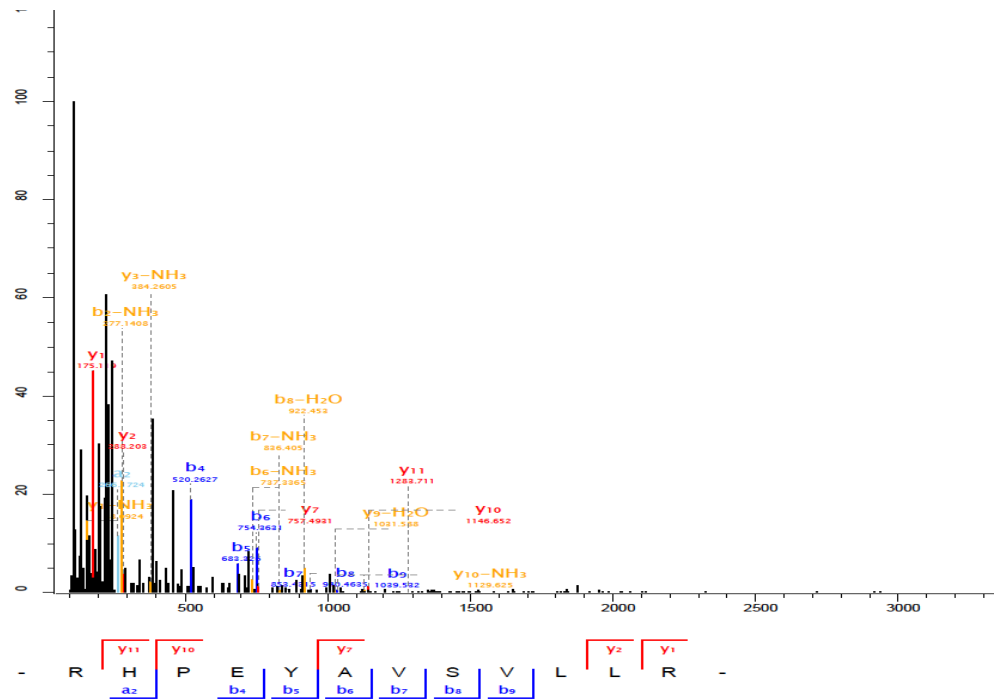


Şekil 4.23. 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücresi içinde bulunan ve 3 farklı enjeksiyonda elde edilen protein sayıları

Maxquant programının kullanılması ile birlikte elde edilen peptitlerin nitel analizine örnek olarak bir kaç peptit seçilmiştir. Burada gösterilen eşleşmeler diğer peptit eşleşmelerinde de kullanılmıştır (Şekil 4.24- Şekil 4.25).

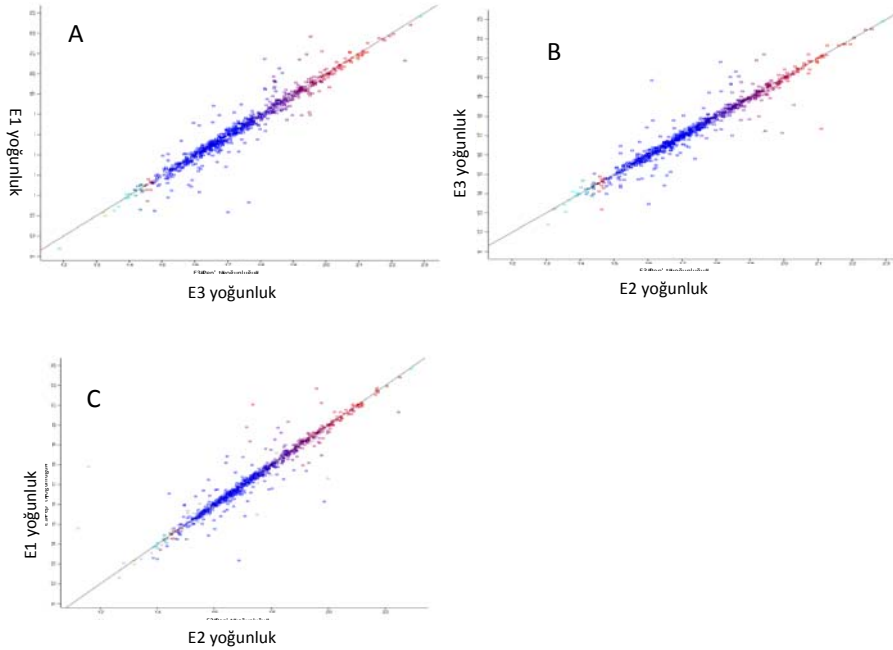


Şekil 4.24. SADTLWDIGKDLKDL peptidine ait MS/MS spektrumu ve eşleşme sonuçları



Şekil 4.25. RHPEYAVSVLLR peptidine ait MS/MS spektrumu ve eşleşme ürünleri

Peptit yoğunlukları ile ilgili olarak Şekil 4.26.'de elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. Tablo 4.7.'de enjeksiyonların karşılaştırılması sonucu R^2 ve Pearson korelasyon katsayıları (r) hesaplanarak verilmiştir.

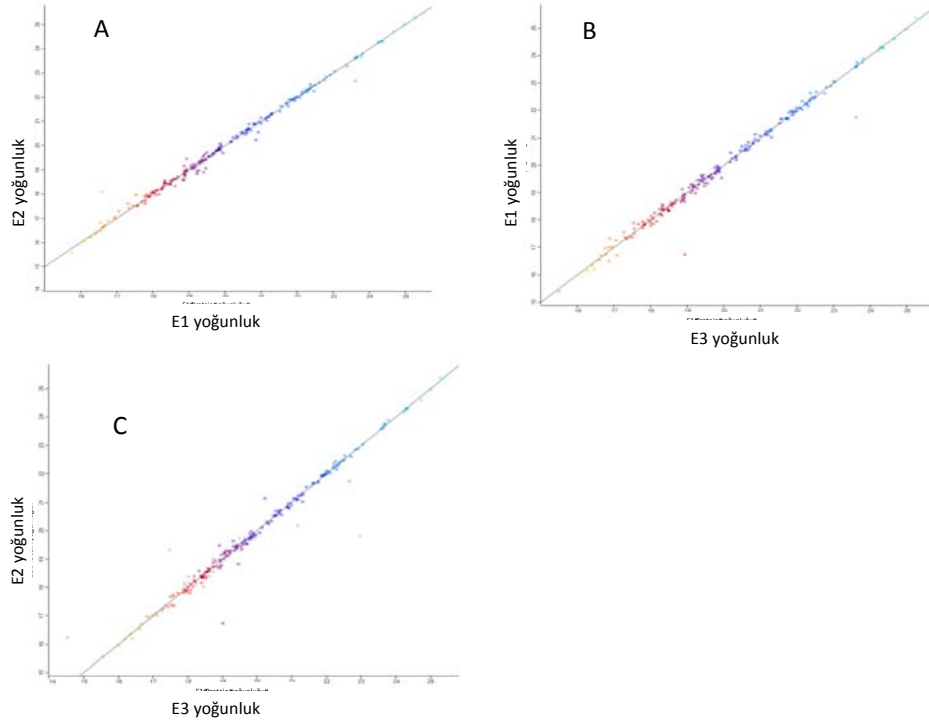


Şekil 4.26. 80 μg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait peptitlerin yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyonda karşılaştırılması. A) Enjeksiyon 1- Enjeksiyon 2 (E1-E3), B) Enjeksiyon 1- Enjeksiyon 3 (E3-E2), Enjeksiyon 2- Enjeksiyon 3 (E1-E2). (mavi düşük yoğunluğu , kırmızılar yüksek yoğunluğu göstermektedir)

Tablo 4.7. 80 μg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait peptitlerin yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyonda karşılaştırılması

	E1-E2	E1-E3	E2-E3
R^2	0.9382	0.9390	0.9162
Pearson Korelasyon katsayısı (r)	0.9683	0.9691	0.9572

Protein düzeyinde ise yapılan analizlerde Maxquant programı içerisinde kullanılan işaretli nicel analiz algoritması ile hesaplanan normalize edilmiş protein yoğunlukları yine 3 enjeksiyon için karşılaştırılmıştır. Şekil 4.27 ve Tablo 4.8'de 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait proteinlerin yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyonda karşılaştırmaları yapılarak R^2 ve r değerleri hesaplanmıştır.



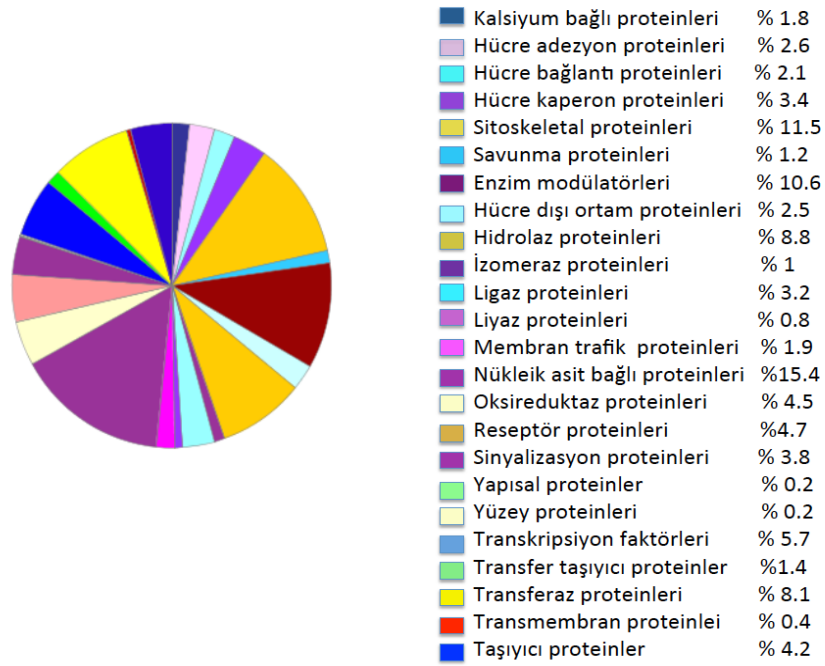
Şekil 4.27. 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait proteinlerin yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyonda karşılaştırılması. A) Enjeksiyon 1- Enjeksiyon 2 (E1-E2), B) Enjeksiyon 1- Enjeksiyon 3 (E1-E3), Enjeksiyon 2- Enjeksiyon 3 (E2-E3). mavi düşük yoğunluğu , kırmızılar yüksek yoğunluğu göstermektedir)

Tablo 4.8. 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait protein yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyonda karşılaştırılması

	E1-E2	E1-E3	E2-E3
R^2	0.9934	0.9914	0.9878
Pearson korelasyon katsayısı (r)	0.9947	0.9929	0.9914

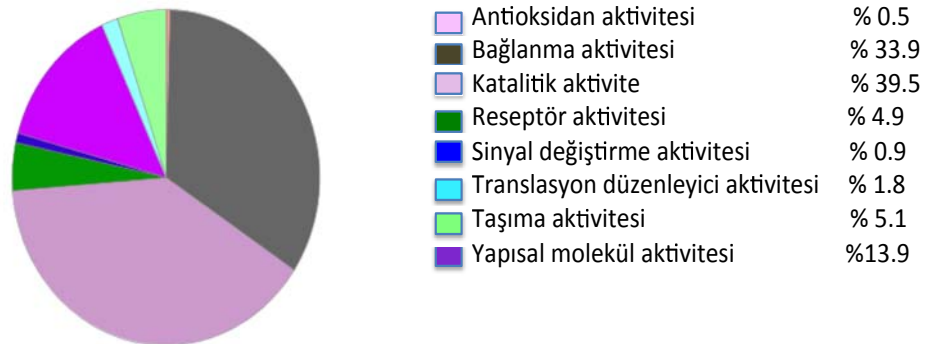
4.4.2. Proteinlerin Gen Ontoloji Analizleri

80 µg için elde edilen proteinlerin ait oldukları gen isimleri kullanılarak Panther programında gen ontoloji analizi yapılmıştır. İlk olarak protein sınıfları analiz edilmiştir. Şekil 4.28’de verilen analiz sonucunda nitel analizi yapılan proteinlerin buldukları sınıflar gösterilmiştir.



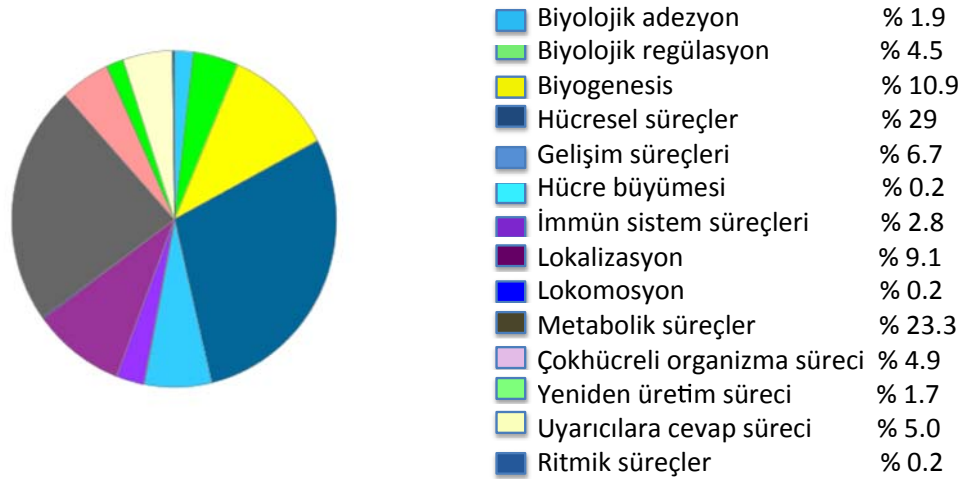
Şekil 4.28. Nitel analizi yapılan proteinlerin buldukları protein sınıfları

Şekil 4.29’da proteinlerin gösterdikleri moleküler fonksiyonlara göre dağılımları verilmiştir.



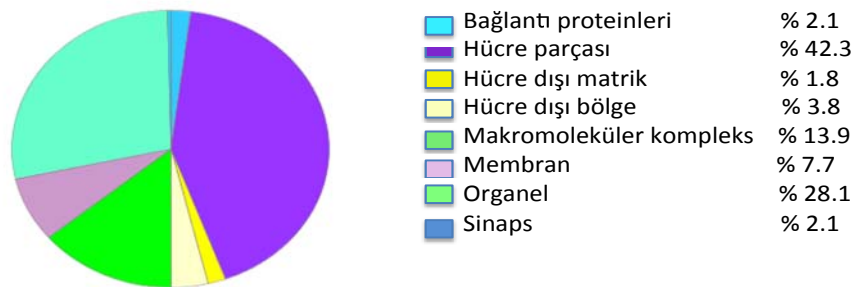
Şekil 4.29. Nitel analizi yapılan proteinlerin gösterdikleri moleküler fonksiyonlar

Proteinlerin hücre içerisinde hangi biyolojik süreçte yer aldığına ilişkin dağılım Şekil 4.30.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Nitel analizi yapılan proteinlerin buldukları biyolojik süreçler

Gen ontolojisi analizlerinde son olarak nitel analizinin yapılabilen proteinlerin hücre içerisinde bulunduğu yerlere göre dağılımı araştırılmıştır. Proteinlerin hücre içerisindeki dağılımı ve yüzdeleri Şekil 4.31.'de gösterilmiştir.

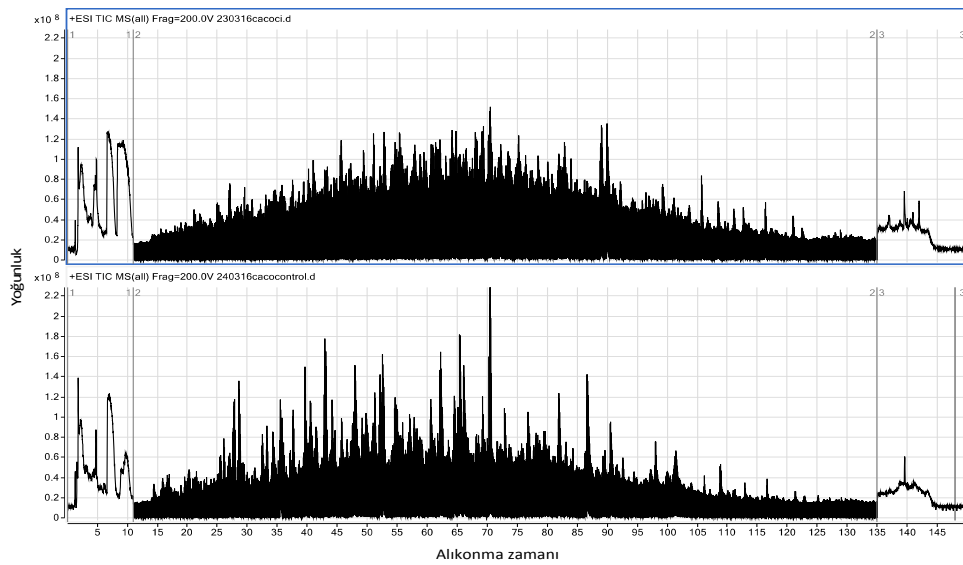


Şekil 4.31. Nitel analizi yapılan proteinlerin hücre içerisinde dağılımları

4.5. Bitkisel Temelli Hemostatik Ajanın CaCo2 kolon kanser Hücre Hattı Üzerinde Etkisinin Proteomik Yaklaşım ile İncelenmesi

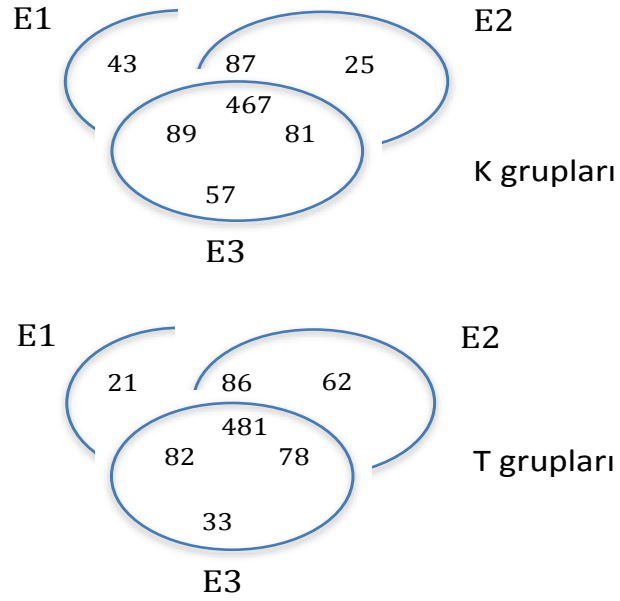
4.5.1. LC/MS, Maxquant, Perseus ve String Analizleri

Bitkisel temelli hemostatik ajanın antikanserojen etkisi geliştirilen UPLC/MS tekniği ile incelenmiştir. K (kontrol grubu) ve T (hemostatik ajan eklenmiş grup) gruplarından elde edilen hücre lizatları Şekil 4.19.'da elde edilen kalibrasyon doğrusu kullanılarak protein konsantrasyonları K hücrelerinde elde edilen lizat içerisinde 1.106 mg mL^{-1} ve T hücrelerinden elde edilen lizat içerisinde 0.856 mg mL^{-1} olarak bulunmuştur. Her bir grup için 3'er tekrarlı analizler yapılmıştır. K ve T grupları için elde edilen kromatogram Şekil 4.32.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.32. K (alt) ve T (üst) gruplarına ait LC/MS kromatogramları

Elde edilen protein sayıları bakımından sonuçlar Şekil 4.33'de Venn şeması ile verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde kontrol grubunda elde edilen protein sayısı 724 iken T gruplarında 727 tane protein bulunmuştur.



Şekil 4.33. K ve T gruplarında nitel analizi yapılan protein sayısının Venn şemasında gösterimi

Maxquant programı ile nitel analizi yapılan proteinlerin normalize edilmiş protein yoğunlukları hesaplanmıştır. Elde edilen proteinlerin yoğunluklarını karşılaştırmak ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulmak için Perseus programı kullanılmıştır. Perseus programı içerisinde K ve T grupları arasında çift yönlü t-testi yapılmıştır ($p < 0.05$). Tablo 4.9.'da hemostatik ajan ile miktarı azalan proteinler verilmiştir.

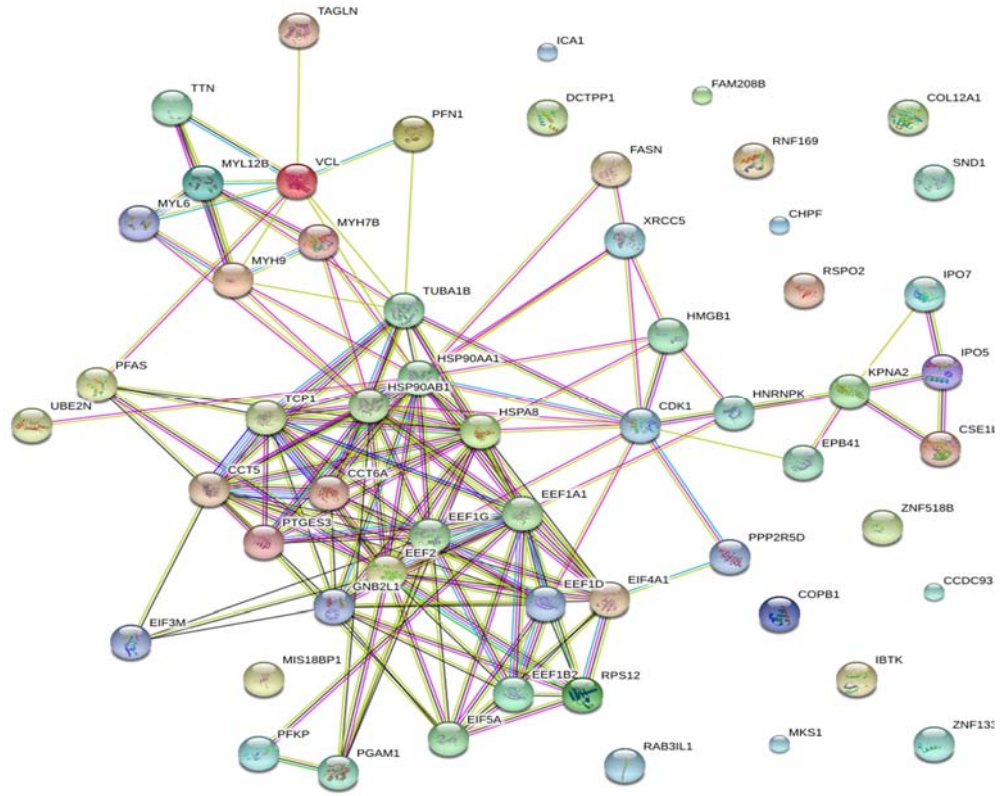
Tablo 4.9. Hemostatik ajan ile miktarı K grubuna göre azalan proteinler görülmektedir.

Sayı	Protein adı	Gen adı	Azalış miktarı
1	Zinc finger protein 518B	ZNF518B	163.58
2	Titin	TTN	51.35
3	Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	46.81
4	R-spondin-2	RSPO2	39.39
5	High mobility group protein B1	HMGB1	29.91
6	Islet cell autoantigen 1	ICA1	22.20
7	Myosin-7B	MYH7B	14.31
8	Elongation factor 1-beta	EEF1B2	12.64
9	Prostaglandin E synthase 3	PTGES3	9.78
10	Chondroitin sulfate synthase 2	CHPF	8.65
11	E3 ubiquitin-protein ligase RNF169	RNF169	8.11
12	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	5.68
13	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform	PPP2R5D	5.65
14	Importin subunit alpha-1	KPNA2	4.02
15	Guanine nucleotide exchange factor for Rab-3A	RAB3IL1	3.97
16	Coiled-coil domain-containing protein 93	CCDC93	3.44
17	Elongation factor 1-delta	EEF1D	2.97
18	Coatomer subunit beta	COPB1	2.68
19	Transgelin	TAGLN	2.22
20	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	2.16
21	Elongation factor 1-gamma	EEF1G	2.09
22	Mis18-binding protein 1	MIS18BP1	1.83
23	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	EIF5A	1.72
24	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	1.67
25	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	1.60
26	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	EIF3M	1.54
27	Protein 4.1	EPB41	1.53
28	Fatty acid synthase	FASN	1.51
29	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	1.50
30	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	PFAS	1.46
31	Meckel syndrome type 1 protein	MKS1	1.41
32	dCTP pyrophosphatase 1	DCTPP1	1.40
33	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A	1.35
34	Exportin-2	CSE1L	1.35
35	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	PFKP	1.34

Tablo 4.9. (devamı) Hemostatik ajan ile miktarı K grubuna göre azalan proteinler görülmektedir.

36	40S ribosomal protein S12	RPS12	1.34
37	Zinc finger protein 133	ZNF133	1.32
38	Protein FAM208B	FAM208B	1.32
39	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	1.30
40	Importin-5	IPO5	1.29
41	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	1.29
42	Profilin-1	PFN1	1.29
43	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	1.29
44	Inhibitor of Bruton tyrosine kinase	IBTK	1.28
45	Myosin light polypeptide 6;	MYL6	1.28
46	Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	1.24
47	Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	1.24
48	Myosin regulatory light chain 12B	MYL12B	1.21
49	Elongation factor 2	EEF2	1.18
50	Myosin-9	MYH9	1.18
51	Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	1.14
52	X-ray repair cross-complementing protein	XRCC5	1.14
53	Importin-7	IPO7	1.13
54	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	1.12
55	T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5	1.12
56	Vinculin	VCL	1.11
57	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	1.08

Şekil 4.34'de proteinlerin birbirleri ile olan ilişkileri string programı ile gösterilmiştir.



Şekil 4.34. Hemostatik etkisi ile miktarı azalan proteinlerin birbirleri ile ilişkileri

Tablo 4.10.'da bitkisel temelli hemostatik ajan ile birlikte miktarı artan proteinler verilmiştir.

Tablo 4.10. Hemostatik ajan ile miktarı K grubuna göre artan proteinler

No	protein Adı	Gen Adı	Artış miktarı
1	Glutathione S-transferase A1	GSTA1	65.95
2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	17.86
3	Aldo-keto reductase family 1 member C3	AKR1C3	6.80
4	Prosaposin	PSAP	5.58
5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRNPF	5.36
6	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1	4.14
7	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	4.09
8	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	3.74
9	Endoplasmin	HSP90B1	3.41
10	Protein disulfide-isomerase	P4HB	3.38
11	Neutral alpha-glucosidase AB	GANAB	3.32
12	Centrosomal protein of 290 kDa	CEP290	3.30
13	Pleckstrin homology domain-containing family G member 4B	PLEKHG4B	2.48
14	Dynein heavy chain 14, axonemal	DNAH14	2.38
15	Protein-glutamate O-methyltransferase	ARMT1	2.19
16	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6	2.07
17	Anterior gradient protein 2 homolog	AGR2	2.06
18	Calreticulin	CALR	1.97
19	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	1.96
20	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	1.95
21	Netrin-5	NTN5	1.94
22	Glycine--tRNA ligase	GARS	1.91
23	Xaa-Pro dipeptidase	PEPD	1.83
24	Annexin A5	ANXA5	1.81
25	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	1.79
26	Alpha-actinin-1	ACTN1	1.75
27	Transketolase	TKT	1.74
28	Protein deglycase DJ-1	PARK7	1.71
29	Clathrin heavy chain 1	CLTC	1.68
30	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	GFPT1	1.65
31	Heat shock 70 kDa protein 1B;	HSPA1B	1.64
32	14-3-3 protein gamma	YWHAG	1.64
33	Alpha-actinin-4	ACTN4	1.63
34	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	1.63
35	Thioredoxin	TXN	1.62
36	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	1.62
37	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	AARS	1.61

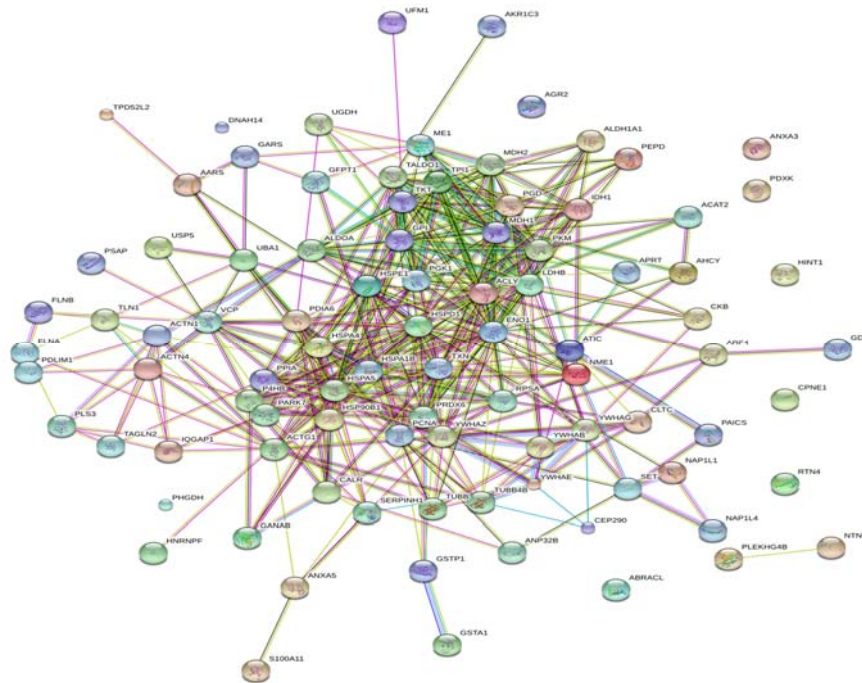
Tablo 4.10.(devamı) Hemostatik ajan ile K grubuna göre miktarı artan proteinler

38	NADP-dependent malic enzyme	ME1	1.59
39	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	1.56
40	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	1.56
41	Tumor protein D54	TPD52L2	1.54
42	UDP-glucose 6-dehydrogenase	UGDH	1.54
43	Ubiquitin-fold modifier 1	UFM1	1.52
44	14-3-3 protein beta/alpha;14-3-3 protein beta/alpha, N-terminally processed	YWHAB	1.52
45	Transaldolase	TALDO1	1.49
46	Filamin-A	FLNA	1.48
47	Plastin-3	PLS3	1.45
	Reticulon-4	RTN4	1.44
48	Copine-1	CPNE1	1.42
49	Costars family protein ABRACL	ABRACL	1.42
50	Serpin H1	SERPINH1	1.41
51	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	ATIC	1.40
52	Pyridoxal kinase	PDXK	1.40
53	Heat shock 70 kDa protein 4	HSPA4	1.38
54	Nucleoside diphosphate kinase A	NME1	1.37
55	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	1.34
56	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	ANP32B	1.34
57	Nucleosome assembly protein 1-like 4	NAP1L4	1.31
58	Nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	1.31
59	Triosephosphate isomerase	TPI1	1.31
60	ADP-ribosylation factor 4	ARF4	1.30
61	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	1.29
62	Protein SET;Protein SETSIP	SET	1.29
63	Glutathione S-transferase P	GSTP1	1.29
64	Alpha-enolase	ENO1	1.29
65	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	1.29
66	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	ACAT2	1.28
67	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	1.26
68	PDZ and LIM domain protein 1	PDLIM1	1.26
69	Filamin-B	FLNB	1.25
70	Peroxiredoxin-6	PRDX6	1.23
71	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	1.22
72	40S ribosomal protein SA	RPSA	1.21
73	Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	1.20
74	Adenosylhomocysteinase	AHCY	1.20
75	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	USP5	1.19
76	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	1.19
77	Creatine kinase B-type	CKB	1.19

Tablo 4.10 (devamı). Hemostatik ajan ile K grubuna göre miktarı artan proteinler

78	Annexin A3	ANXA3	1.18
79	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGAP1	1.17
80	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	1.15
81	Pyruvate kinase PKM	PKM	1.14
82	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	1.14
83	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	1.13
84	Tubulin beta chain	TUBB	1.11
85	ATP-citrate synthase	ACLY	1.10
86	Transgelin-2	TAGLN2	1.09
87	Protein S100-A11	S100A11	1.08
88	Talin-1	TLN1	1.08
89	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD	1.07
90	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	1.06
91	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	1.06
92	Multifunctional protein ADE2	PAICS	1.06

Hemostatik ajan ile artan proteinlerin birbirleri ile olan ilişkileri string programı ile analiz edilmiştir (Şekil 4.35).

**Şekil 4.35.** Hemostatik ajan ile miktarı artan proteinlerin birbirleri ile olan ilişkileri

Elde edilen sonuçlar neticesinde artan ve azalan proteinler kaynaklar ile karşılaştırılmıştır. Proteomik verilerin daha güvenilir bir şekilde yorumlanmasını sağlamak amacıyla değişim miktarı 1.5'in altında olan proteinler elimine edilmiştir. Değişim miktarı 1.5 ve üzeri olan proteinler ise kaynaklarda ve yolak analiz programlarında incelenerek kanser üzerinde önemli proteinler belirlenmeye çalışılmıştır

Kolon kanseri ile ilgili olabilecek miktarı azalan proteinler

Zinc Finger 518 B (ZNF518B)

Zinc finger proteinleri genel olarak kanser oluşumunda ve gelişiminde etkin transkripsiyon faktörleridir (236). Yapılan çalışmalarda bu proteinlerin inhibe edilmesi ile birlikte kanser üzerinde hücre proliferasyon süreci gözlemlenmiştir (237). Zinc finger proteinlerinin çeşitli kanser türlerinde farklı etkileri gözlemlenmiştir. Farklı kanser türlerinde farklı özellikler sergiledikleri gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda zinc finger proteinlerinin kanser tedavisinde olası hedefler olabileceği belirtilmiştir (238). Bitkisel temelli hemostatik ajanın etkisi ile ZNF 518 B proteini yaklaşık 163 kat azalmıştır. Bitkisel temelli hemostatik ajanın bu proteini inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

R spondin-2 (RSPO2)

R-spondin sinyal transdüksiyonu içerisinde çeşitli yollarda görev yapmaktadır. Bu proteinin kanser hücreleri üzerindeki etkisi hala tartışmalıdır. Pankreas kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalarda R-spondin 2 proteinin miktarının kanser ile birlikte arttığı saptanmıştır (239). Kolon kanseri ile yapılan bazı çalışmalarda bu proteinin Wnt yolağının ve buna bağlı olarak tümör gelişiminin oluşumunda rol aldığı saptanmıştır (240). Yapılan bir başka çalışmada ise bu proteinin tümör baskılayıcı özelliğinin olduğu saptanmıştır (241). Bizim yaptığımız çalışmada 48 saatlik inkübasyon süreci içerisinde miktarı en çok azalan proteinlerin başında bu protein gelmektedir. Tez çalışması kapsamında hemostatik ajan ile K gruplarına göre T gruplarında bu proteinin miktarı yaklaşık 40 kat azalmıştır.

Yüksek Hareketli Grup Proteini B1 (HMGB1)

HMGB1 proteini kaynaklarda çelişkili olmakla birlikte hücrenin ölümü ve yaşamasında son derece etkili bir proteindir. HMGB1 çok fazla yolak içerisinde görev yapmaktadır. Kolon kanseri ile yapılan çalışmalar HMGB1 in kolon kanseri gelişiminde etkin rol oynadığını ve kanser tedavisinde olası bir hedef olabileceği saptanmıştır (242, 243). Yapılan çalışmalarda HMGB1'in kolon kanserinde biyobelirteç olarak kullanılabilceğini göstermektedir(244). Yapılan çalışmalarda HMGB1 in miktarının artması ile birlikte hücrelerin antikanser ilaçlara direncinin arttığı saptanmıştır (245). HMGB1 in susturulması ile birlikte bu direncin azaldığı gözlemlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda ise HMGB1 in otofajiyi tetiklediği ve apoptozu inhibe ettiği saptanmıştır. Çalışmalarda HMGB1 ile p53 tümör baskılayıcı proteinin birbirlerine zıt hareket ettiği gözlemlenmiştir (246). Bizim çalışmamızda bitkisel karışımın T gruplarında HMGB1 miktarını azalttığı başka bir deyişle inhibe ettiği saptanmıştır. Tez çalışmasında hemostatik ajan ile birlikte yaklaşık olarak 30 katlık bir azalış meydana gelmiştir.

Uzama Faktörleri (EEF1A1, EEF1B1, EEF1G, EEF1D)

Uzama faktörleri hücre döngüsü içerisinde protein sentezinde görev yapan bir dizi proteinin genel adıdır. Uzama faktörleri genel olarak kanser oluşumu ile birlikte artmaktadır. Yapılan çalışmalarda EEF1A1, EEF1B2, EEF1D ve EEF1G'nin ifadelerinde değişiklikler olduğu saptanmıştır.

Kaynaklar EEF1A1'in kolon, pankreas, akciğer, prostat ve meme kanseri tümörlerinde yüksek seviyede bulunduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda EEF1A1 in kanser hücrelerinde apoptozu karşı etki gösterdiğini ve hücrelerin kemoterapiye karşı direnç kazanmasında etkin rol oynadığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda EEF1A1 in inhibisyonu ile kanser hücrelerin apoptoz sürecine girdiği saptanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda EEF1A1 in inhibe edilmesiyle birlikte kemoterapiye karşı kazanılan direncin kırıldığı gözlemlenmiştir (247). Tez çalışmasında EEF1A1 in hemostatik ajan ile birlikte T gruplarında 1.6 kat azaldığı saptanmıştır.

EEF1D proteinlerin sentezi sırasında aminoasit TRNA' ların ribozoma enzimatik salımlarıyla ilgilenmektedir. Sküamöz hücreli kanser ile yapılan

çalışmada kanser hücrelerinde yüksek seviyede EEF1D miktarı bulunmuştur. Genetik susturma ile yapılan analizlerde hücrelerin yayılmadığı ve çoğalmayı durdurucu bir etkinin gözlemlendiği belirtilmiştir (248). Kolon kanseri üzerine yapılan çalışmalarda ise bu proteinin miktarının arttığı tespit edilmiştir (249). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile birlikte proteinin miktarı 3 kat azalmaktadır.

EEF1G proteini aynen uzama faktörü 1 deltaya benzer bir şekilde proteinlerin sentezinde aminoasil tRNA yı ribozomlara taşımaktadır. Yapılan araştırmalarda kolon, mide, göğüs ve pankreas kanserlerinde yüksek seviyede uzama EEF1G gözlemlenmiştir (250). Çalışmalarda artan protein miktarıyla birlikte metastaz ve ileri seviye kanser oluşumu artmaktadır (251). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile uzama faktörü 1 gamma proteinin miktarının 2.1 kat azaldığı tespit edilmiştir.

EEF1B2 proteini ile ilgili olarak kanser içerisinde nasıl bir rolü olduğu hala belirli değildir. Ancak kaynaklarda kanser hücrelerinde fazla miktarda bulunduğu saptanmıştır. Akciğer kanseri ile yapılan çalışmalarda metilselenik asit ile apoptoza uğrayan kanser hücrelerinde bu proteinin inhibe olduğu saptanmıştır (252). Tez çalışmasında bu protein hemostatik ajan ile etkisi ile birlikte 12 katlık bir azalış olmuştur.

Prostaglandin E (p23)

Prostaglandin E synthase 3 bilinen ismiyle p23, HSP90 şaperonuna bağlı yollarda yardımcı şaperondur. HSP 90 kamperonu diğer proteinlerin düzgün bir şekilde yapısal özelliklerini kazanmasını ve aktif hale gelmelerini sağlamaktadır. P23 görev olarak ATPaz'ı inhibe ederek HSP 90 nın diğer proteinlerle stabil bir bağlantı kurmasını sağlamaktadır. Ayrıca HSP90 proteinleri stres koşullarında stabil hale getirmekle görevlidir. Yapılan çalışmalar içerisinde p23 ün kanser oluşumunda ve gelişiminde önemli noktalardan biri olduğu görülmüştür. P23 miktarının normal hücrelere göre kanser hücrelerinde çok daha yüksek seviyelerde olduğu saptanmıştır. Prostat kanserinde p23 ün androjen reseptör aktivitesinin bileşenlerinden biri olarak kanserin gelişiminde rol aldığı saptanmıştır. Bu etkinliğinin ise HSP90 ile bağlantılı ve bağlantısız bir şekilde ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (253). Yapılan çalışmalar p23 'ün meme kanserinde metastaz

döneminde ve antikanser ilaçlara karşı direnç oluşumunda etkili olduğunu göstermektedir (254). Yapılan çalışmalarda yeni geliştirilen gedunin adlı ürünün p23'e bağlandığı ve aktivitesini inhibe ederek kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü belirlenmiştir. Gedunin kolon kanserine karşıda kullanılan oldukça etkili bir inhibitördür. Ayrıca yine yapılan çalışmalarda p23 ün susturulması ile aynı sonuçların gerçekleştiği gözlemlenmiştir (255). Tez çalışmalarında hemostatik ajan ile bu proteinin miktarının yaklaşık 9.8 kat azaldığı saptanmıştır.

Ubiquitin E3 ligaz (RNF169)

RNF 169 proteini DNA nın onarılmasında RNF8/RNF168 yolaklarında düzenleyici olarak rol almaktadır. Normal koşullarda miktarı düşük olan protein gelebilecek stres koşulları ile birlikte miktarı artarak DNA nın zarar görmesini engellemektedir. RNF169 hakkında yapılan çalışmalar oldukça enteresandır. Proteinin ana görevi DNA hasarını onarmak ile birlikte bir süre sonunda bu onarım mekanizması içerisinde bazı bileşenleri inhibe etmektedir (256). Protein hakkında çalışmalar devam etmektedir. Tez çalışmasında hemostatik ajan ile bu protein 8.1 kat azalmıştır.

Karyoferin alfa 2 (KPNA2)

KPNA2 bir çok kanser türünde ilerleyen kanser ile birlikte miktarı artan ve bir çok kanser türü için biyobelirteç görevi yürütmektedir (257). Kolon kanseri ile yapılan çalışmalarda KNPA2 miktarının kolon kanseri hücrelerinde ve dokularında normal hücre ve dokulara göre arttığını göstermiştir. Ayrıca artan KNPA2 ile birlikte klinik çalışmalarda patolojik parametrelerle korelasyon içerisinde olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar KNPA2 nin inhibisyonu sonrası kanser hücrelerinde büyümenin durduğu gözlemlenmiştir (258). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile KPNA2 proteini yaklaşık olarak 4 kat azalmıştır.

Coatomer Subunit beta (COBP1)

COPB1 ile yapılan deneylerde kanser hücreleri üzerinde yaşayabilirlik ve otofagazom etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. COPB1 in susturulması ile birlikte kanser hücrelerinin büyümesinin azaldığı gözlemlenmiştir(259). Yapılan bir başka

çalışma içerisinde ise COPB1 in susturulması ile birlikte kanser hücrelerinin antikanser ilaçlara duyarlılıklarının daha da arttığı saptanmıştır (260). Tez çalışmasında COPB1 miktarı hemostatik ajan ile T grubu hücrelerde yaklaşık 2.7 kat azalmıştır.

Heterojen Çekirdek Ribonükleikprotein K (HNRNPK)

HNRNPK proteini çekirdeğin içinde ve sitoplazmada bulunmakta ve birden çok görevi yapmaktadır. Gen ekspresyonu, sinyalleme, alternatif RNA uçbirleştirme ve translasyon içerisinde düzenleyici görevlerde bulunmaktadır (261). Yapılan çalışmalar HNRNPK' nın kanser hücrelerinde yüksek miktarda bulunduğunu göstermiştir. Bazı kanser türlerinde biyobelirteç olarak kullanılabilceği saptanmıştır (262) Akciğer kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda HNRNPK' nın inhibe edilmesinin kanser hücrelerinde çoğalmayı durdurucu etkisi olduğu saptanmıştır (263). Kolon kanseri içerisinde de HNRNPK yüksek miktarlarda saptanmıştır (264). Tez çalışmasında hemostatik ajan etkisiyle bu proteinin miktarında 2.2 kat azalma tespit edilmiştir.

Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (EIF5A1)

EIF5A1 hücre içerisinde protein sentezinde görev almakla birlikte mRNA bağlı farklı fonksiyonlara da sahiptir. EIF5A1 proteini aralarında kolon kanseri de olmak üzere bazı kanser hücrelerinde yüksek miktarda bulunmaktadır (265-267). Yapılan çalışmalarda bu proteinin kanser gelişiminde etkin rol aldığını göstermektedir (268, 269). Özellikle kolon kanseri ile yapılan çalışmalarda bu proteinin bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği saptanmıştır. Tez çalışmasında hemostatik ajan ile bu proteinin miktarı 1.7 kat azalmıştır.

Siklin Bağlı Kinaz 1 (CDK1)

Bu proteinler içerisinde CDK1 hücre döngüsü içerisinde düzenleyici olarak görev yapan serin/treonin kinaz olarak görev yapmaktadır. Hücre döngüsünde mitotik evrede ve kontrol noktalarında işlev görmektedir. Ayrıca DNA onarımı, kök hücre yenilenmesi ve epigenetik düzenleyici olarakta görev yapmaktadır. Kanser hücrelerinde bir çok CDK inhibitörü tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır.

Bunlar içerisinde bütrolakton CDK1' e karşı inhibitör etki göstermiştir kolon ve akciğer kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmada bu inhibitörün yüksek anti kanserojen etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Kolon kanseri hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada ise kanser ilaçları ile birlikte CDK1 inhibitörleri kullanılmış ve CDK1 inhibitörlerinin hücreleri kanser ilaçlarına daha duyarlı hale getirdiği saptanmıştır. Tez çalışmasında hemostatik ajan ile yaklaşık olarak 1.4 katlık bir azalış gözlemlenmektedir.

Ubiquitin-conjugating enzim E2 N (UBE2N)

Bu yollarda bulunan proteinlerden UBE2N proteini hücre döngüsü içerisinde kontrol noktalarında görev almaktadır. Protein meme, kolon, prostat gibi bir çok kanser türünde yüksek miktarda bulunmaktadır. Proteinin en önemli özelliği p53 tümör bastırıcı proteinin transkripsiyonunda aktif rol almasıdır. Çeşitli kanser türleriyle yapılan çalışmalarda UBE2N inhibitörlerinin kanser hücrelerinde çoğalmayı durduğunu ve p53 yolaklı apoptozun meydana geldiğini göstermektedir (270-272). Tez kapsamında yapılan çalışmalarda hemostatik ajan ile UBE2N proteinin 1.5 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M (EIF3M)

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda hem kolon kanseri hücrelerinde hem de dokularda EIF3M 'in miktarının kanser gelişimi ile birlikte arttığı saptanmıştır. HTC-116 hücreleri ile yapılan çalışmalarda EIF3M in tümör oluşumu ve gelişimiyle ilgili bazı genler üzerinde etkin olduğu saptanmıştır. Proteinin susturulmasının hücre proliferasyonu etki yaptığı ve ayrıca kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü belirlenmiştir (273). Tez kapsamında yapılan çalışmalarda hemostatik ajan ile EIF3M'in 1.4 kat azaldığı tespit edilmiştir.

Yağ Asidi Sentaz (FASN)

Yağ asidi Sentez hücre biyolojisinde uzun zincirli yağ asitleri oluşumundan ve lipogenesisden sorumlu olan biyo sentetik bir enzimdir. Normal hücrelerde düşük seviyede bulunmaktadır. Kanser hücreleri hızlı çoğaldıkları için metabolizmalarında FASN e ihtiyaçları bulunmaktadır bu nedenle FASN miktarı

kanser hücrelerinde oldukça yüksektir. Yapılan çalışmalarda FASN' nin kanser gelişiminde çok özel bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (274-276). Kaynaklarda FASN' nin kolon kanseri üzerinde çok etkili bir belirteç olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (277, 278). Kanser hücrelerinin gelişiminde bu kadar önemli bir protein kanser tedavisinde doğan bir hedef haline gelmiştir (279). Çeşitli inhibitör maddeler bu yolla kansere karşı kullanılmıştır (280-282). Tez kapsamında yapılan deneylerde hemostatik ajan ile birlikte FASN miktarında 1.5 katlık azalma saptanmıştır.

Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 (SND1)

SND1 bir çok kanser türünde tümör oluşumunun desteklemektedir (283, 284). Yapılan çalışmalar kolon kanseri hücrelerinde bu proteinin yüksek miktarda bulunduğunu göstermiştir (285). SND1 ile yapılan çalışmalarda özellikle kanserin erken safhalarında etkili olduğu ve tümör gelişimini sağlayan bir çok önemli proteinin translasyon sonrası kontrolünü yaptığını göstermiştir (286). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile birlikte bu protein miktarında 1.7 kat azalma gözlemlenmiştir.

Kolon kanseri ile ilgili olabilecek miktarı artan proteinler

Hemostatik ajan ile birlikte azalan proteinlerden sonra bu etki ile artan proteinler de incelenmiştir. Tablo 4.10'da hemostatik ajan ile birlikte miktarı artan proteinler değişim miktarları ile birlikte verilmiştir.

Artış olan proteinlerin birbirleri ile ne kadar bağlantılı olduğunu görmek için proteinler string yolak analiz programı ile incelenmiştir ve Şekil 4.33' de görüldüğü gibi hangi proteinlerin arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Proteinler içerisinde sadece 7 tanesinin diğer proteinlerle bağlantılı olmadığı saptanmıştır. Bu sonuç azalan proteinlere göre daha iyidir.

Glutasyon S-Transferaz (GSTA1)

Bu protein genellikle hücre içerisindeki detoks faaliyetlerinde görev almaktadır. Hücre içerisindeki tedavi amaçlı ilaçların, dışardan gelebilecek toksik maddelerin ve içeride oluşan stres ürünlerinin temizlenmesinde görev yapmaktadır

(287). GSTA1 ile yapılan çalışmalarda kanser oluşumunda ve gelişiminde etkin olabileceği saptanmıştır (288). Kanser hücrelerine dışardan gelebilecek stres unsurlarına ve kemoterapik ajanlara karşı koruyucu ve direnç arttırıcı fonksiyona sahip olduğu belirtilmiştir (289). CaCo2 hücrelerinde yapılan çalışmalarda GSTA1 miktarının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Caco 2 hücrelerinde oksidatif stres artmasıyla GSTA1 artmaktadır. Ancak bazı çalışmalarda GSTA1' in yüksek miktarda olmasının apoptoza yol açtığını göstermiştir (290). Bir başka çalışmada ise GSTA1 in artmasıyla birlikte UV ışımaya bağlı olarak oluşan hidrojen peroksit kaynaklı apoptozu CaCo2 hücrelerinde engellediği gözlemlenmiştir (291). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile bu protein 65.9 kat artış göstermiştir.

Maleat Dehidrogenaz 2 (MDH2)

MDH2 hücre içerisinde trikarboksilik asit döngüsünde bulunan önemli bir enzimdir. MDH2 malat ve oksaloasetat in dönüşümünü sağlamakla görevlidir. Bu süreç içerisinde NAD/NADH koenzim sistemini kullanmaktadır (292). Kanser hücreleri içerisinde bu enzim genellikle yüksek miktarda bulunduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda çeşitli kanser türlerinde MDH2 nin kemoterapi ajanlarına karşı direnç kazanılmasında etkin olduğu saptanmıştır (293). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile muamele edilen hücrelerde bu proteinin 17.9 kat arttığı tespit edilmiştir.

Aldo keto reduktaz aile1 üye 3 (AKR1C3)

AKR1C3 proteinin hücre içerisindeki görevi aldehit ve ketonları NAD ve NADPH sistemini kullanarak alkollere çevirmek olarak belirlenmiştir. Bir çok kanser türünde bu protein yüksek miktarlarda bulunduğu saptanmıştır (294). AKR1C3 proteinin yapılan çalışmalarda kolon kanseri için biyobelirteç olarak kullanabileceği belirtilmiştir (295). Ayrıca yapılan çalışmalar bir çok kanser türünde bu proteinin ilaç direncini ve oluşan oksidatif stres direncini arttırdığını göstermiştir. Kaynaklarda genellikle bu proteinin ilaç direnci ile etkinliği göz önüne alınarak potansiyel kanser tedavisi için yeni bir hedef olarak görülmüştür (296-298). Tez çalışmalarında hemostatik ajan ile 6.80 kat artış bu protein için gözlemlenmiştir.

Isı şok proteinleri

Isı şok proteinleri hücre biyolojisi içerisinde önemli fonksiyonlara sahip protein grubudur. En önemli özellikleri hücrenin stres koşullarına direnç kazanmasını sağlamalarıdır. Hücre içerisinde bir çok fonksiyona sahip bu proteinler hücre yaşamının vazgeçilmezleri arasında bulunmaktadır. Isı şok proteinleri bir çok kanser türünde yüksek miktarlarda bulunmaktadır (299, 300). Isı şok proteinleri kanser hücreleri hakkında oldukça fazla bilgi sunmaktadırlar özellikle kemoterapiye karşı direnç kazanılması ve yaşam süreci tahminlerinde önemli bir belirteç olarak düşünülmüşlerdir (301, 302). HSP proteinlerinin miktarındaki değişim hücrelerin apoptoza karşı gösterebileceği direncin bir göstergesi kabul edilebilir(303). Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin kemotörpatik ilaçlara karşı direnç kazanmasında ve apoptozun inhibe edilmesinde bu ısı şok proteinleri son derece etkin olarak rol almaktadırlar (304).

Tez çalışmasında HSPE1 ve HSPD1 proteinleri CaCo2 hücrelerinde hemostatik ajan ile yaklaşık 4.1 kat artmıştır. HSPA5 proteini 3.74 kat artarken, HSP90B1 3.40 kat artmıştır. HSP1B proteini ise yaklaşık olarak 1.7 kat artış göstermiştir.

Protein Disülfid izomeraz proteinleri

Protein disülfid izomeraz proteinleri hücreler içerisinde proteinlerin üç boyutlu yapısının kazanılmasında oluşan disülfid bağlarının oluşumundan görevli proteinler olarak tanımlanmıştır. PDI grubu proteinleri, yapısal olarak yanlış oluşan proteinlerin hücre içerisinde birikmesini engellemektedir (305). Bu proteinler kanser hücrelerinde yüksek miktarda ekspresyona uğradığı saptanmıştır (306, 307). Yapılan çalışmalar PDI proteinlerinin kanser hücrelerinde uygulanan kemoterapiye karşı direnç kazanmada etkili olduğunu göstermiştir ve kanser tedavisinde önemli bir hedef olarak ele alınmıştır (308, 309).

Protein disülfid izomeraz (P4HB) proteini translasyon sonrası modifikasyonlarda görev alan önemli bir enzimdir. Ayrıca hücre içerisinde antioksidasyon ve detoks yollarında görev aldığı ve kanser hücrelerinde miktarının arttığı saptanmıştır (310). Yapılan çalışmalarda bu proteinin akciğer kanserinde yüksek miktarda bulunduğunu göstermiştir. Akciğer kanser hücrelerinde

kullanılan bazı tedavi yöntemlerinde hücre proliferasyonu etki gözlemlenirken P4HB miktarında düşüş tespit edilmiştir (311). Beyin tümörleri ile yapılan çalışmalarda bu proteininin susturulması ile birlikte kanser hücrelerinin kemoterapi ajanlarına daha duyarlı hale geldiği saptanmıştır (312). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile 48 saatlik inkübasyon sonrasında protein seviyesinde 3.38 katlık bir artış tespit edilmiştir.

Protein disülfid izomeraz 6A (PDI6A) ile yapılan çalışmalarda bu proteinin kanser türlerinde yüksek miktarda bulunduğu saptanmıştır (306, 313-315). Yapılan çalışmalarda PDIA6'nın kanser tedavisinde kemoterapötik ajanlarına karşı direnç oluşumunda etkili olduğu ve hücrelerin apoptozlarını inhibe ettiği saptanmıştır (316, 317). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile 48 saat süren inkübasyon sonrasında PDIA6 protein seviyesinde 2.07 kat artış gözlemlenmiştir.

Anterior gradient protein 2 homolog (AGR2) bir başka disülfid izomeraz proteindir. AGR2 proteini bir çok kanser türünde yüksek miktarda bulunmaktadır (318-320). Kanser gelişimi ile son derece ilgili olan protein hücrenin canlılığı, çoğalması ve metastaz evrelerinde etkin rol almaktadır (321-324). Yapılan çalışmalarda AGR2'nin kemoterapi ajanlarına karşı direnç kazanma sürecinde çok etkili olduğu saptanmıştır (325, 326). Tez çalışmasında bu proteinin hemostatik ajan ile 48 saat sonunda kontrol grubuna göre 2.06 kat arttığı saptanmıştır.

Calretucilin (CALR)

Calretucilin proteini endoplasmik retikulum içerisinde yer almaktadır. Hücre içerisinde çeşitli süreçlerde görev almaktadır. Özellikle CALR'nin protein şaperonu ve kalsiyum homeostaz sürecinde denetleyici olarak görev yaptığı saptanmıştır (327). CALR üzerine yapılan yoğun çalışmalarda bu proteinin kanser hücrelerinde normal hücrelere göre oldukça fazla miktarda olduğu saptanmıştır (328). CALR ile yapılan analizlerde proteinin kanserin oluşum, gelişim, adezyonu ve metastazında etkin rol aldığı saptanmıştır. CALR inhibisyonun kanser üzerinde apoptoz ve çoğalmayı durdurucu etki yaptığı saptanmıştır (329, 330). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile CALR'nin T grubu hücrelerinde 1.97 kat arttığı saptanmıştır.

Retinal denidrogenaz 1(ALDH1A1)

ALDH proteinleri hücre içerisinde peroksit zararını engellemesi açısından önemli bir koruyucu görevi gördüğü saptanmıştır (331). Birçok kanser türünde bu proteinin miktarı oldukça yüksek miktarda bulunmaktadır (332). Proteinin özellikle ilaçlara karşı direnç kazanılmasında etkili olduğu saptanmıştır (333, 334). Bu proteine ait genin susturulması ile yapılan çalışmalarda kemoterapötik ajanlara karşı kanser hücresindeki direncin azaldığı bulunmuştur (335). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile T gruplarında 1.96 katlık bir artış gözlemlenmiştir.

Anneksin A5 (ANXA5)

ANXA 5 proteini bir çok kanser türünde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Kanser gelişiminin bir çok kısmında çeşitli yollarla etkinlik gösterdiği belirlenmiştir ANXA5'in ilaçlara karşı gelişen hücre direncinde etkin olduğu saptanmıştır (336). Kolon kanseri ile yapılan çalışmalarda ANXA 5 miktarının tümörlerde çok yüksek olduğu gözlemlenmiştir (337). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile 48 saat sonunda hücrelerde ANXA 5 miktarı kontrol grubuna oranla yaklaşık olarak 1.8 kat artmıştır.

Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1)

HINT1 proteini ile yapılan çalışmalarda kolonkanser hücreleri SW480 üzerinde tümör baskılayıcı özelliğinin olduğu gözlemlenmiştir. Kanser hücrelerinde oldukça az miktarda bulunan proteinin artması ile hücrelerde çoğalmayı durdurucu bir etki yapmıştır. HINT1 in bu baskılayıcı özelliğinde JAK yolağına etki etmesinden kaynaklandığı saptanmıştır (338). Kanser baskılayıcı özellik sadece kolon kanserinde değil diğer kanser türlerinde de gösterilmiştir (339, 340). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile HINT1 proteinin miktarının 1.79 kat arttığı gözlemlenmiştir.

Transketolaz (TNK)

Transketolase proteini bir çok kanser türünde oksidatif strese karşı hücreyi korumaktadır. Transketolaz oksidatif strese karşı etkinliği NADPH'ı kullanmasıyla

meydana geldiği saptanmıştır. Böylelikle hücredeki antioksidan kapasite arttırılarak oluşan oksidatif strese karşı savunma gerçekleşmektedir (341). Transketolazın kanser oluşumunda etkin olduğu belirtilmiş ve transketolazın susturulmasının kanser hücreleri üzerinde çoğalmayı durdurucu etki yaptđđ gözlemlenmiştir (342). Tez çalışmasında hemostatik ajan ile bu proteinin miktarı T gruplarında 48 saat sonrasında 1.74 kat artmıştır.

5. TARTIŞMA

Vücutumuz binlerce hücreden oluşmaktadır. Proteinler ise hücre içerisinde yaşamsal fonksiyonların devamı için gerekli yapı taşlarıdır.

Organizmaların fenotipinin belirlenmesinde proteinler önemli bir parametredir. Proteinler organizma içerisinde kromozomun belirli bir kısmını oluşturan gen adı verilen kısımlardan kodlanarak sentezlenmektedirler. Genler organizmanın yöneticileridir. Belirli bir zaman içerisinde genler tarafından kodlanan bütün proteinler proteom adı verilen yapıyı oluşturur. Proteom içerisindeki proteinler proteomik çalışmalar ile incelenmektedir.

Sağlıklı vücut hücreleri (kas ve sinir hücreleri hariç) yaşamsal fonksiyonların devamı için bölünebilme yeteneğine sahiptir. Bu yeteneklerini zamanla ölen hücrelerin yenilenmesi ve çeşitli yaralanmalara uğrayan dokuların onarılmasında kullanılmaktadırlar. Hücrelerin sınırlı sayıda bölünme süreçleri vardır. Hiç bir hücre sağlıklı bir şekilde sonsuza kadar bölünmeye devam edemez (apoptoz). Ancak kanser hücreleri bölünme sürecinde kontrolü kaybederek kontrolsüz bir şekilde bölünmeye başlar. Kontrolsüz çoğalan kanser hücreleri birikerek tümörleri (kitleleri) oluştururlar. Kanser tümörleri normal dokulara çeşitli şekillerde zarar vermekte ve tahrip etmektedirler.

Kanser günümüz dünyasını sosyal ve ekonomik açıdan tehdit eden en tehlikeli ölümcül hastalıklardan biridir. Farklı kanser türlerinin gelişimleri ve biyolojik süreçleri birbirinden farklıdır. Bu nedenle kanser hastalıklarının tedavisinde kanser türüne göre uygulanan tedaviler farklılıklar göstermektedir. Kolon kanseri ise dünya çapında en yaygın 3. kanser türüdür. Yaşam süresi boyunca her 50 kişiden birinde kolon kanserine rastlanmaktadır. Kolon kanseri, özellikle teşhisi erken safhalarda oldukça güç olan sinsi bir hastalık olup, sindirim sisteminde ince bağırsaklardan sonra gelen yaklaşık 1,5-2 m uzunluğundaki kalın bağırsak kısmında rastlanmaktadır. Kolon kanserinin teşhisinin konulabilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için omik teknolojiler son yıllarda kullanılarak klinik çalışmalara destek vermektedirler. Bu tekniklerden proteomik çalışmalar hastalığı protein seviyesinde inceleyerek erken teşhis ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, proteomik açıdan; CaCo2 kolon kanseri

hücreleri üzerinde, bitkisel temelli hemostatik ajan kullanılarak, hücre proliferasyonu etki mekanizması *in vitro* sonrası olarak UPLC/ MS yöntemi ile incelenmiştir.

Yapılan analizler doğrultusunda elde edilen sonuçları sıralayacak olursak;

1) Proteomik analizleri için UPLC/MS yöntemi geliştirilmiş ve Maxquant programı ile uyumlu bir şekilde analiz yapılmıştır.

2) Geliştirilen bu yöntem CaCo2 kolon kanseri hücreleri içerisinde bulunan tüm proteinlerin yani hücre proteomunun nitel analizinde kullanılmıştır.

3) Geliştirilen bu yöntemle proteomik çalışmalar devam etmiş, CaCo2 kolon kanseri hücrelerine bitkisel temelli hemostatik ajan ilave edilmiş (T grubu) ve ilave edilmemiş (K grubu) CaCo2 kolon kanseri hücreleri üzerinde antikanserojen etkileri incelenmiştir.

4) Elde edilen bu proteomik sonuçlar ayrı ayrı değerlendirildikten sonra kaynaklarda ve reactome programı ile belirtilen bulgularla karşılaştırılarak antiproliferasyon (çoğalmayı durdurucu etki) mekanizması moleküler düzeyde açıklanmaya çalışılmıştır.

5) Yapılan çalışmalarda bitkisel temelli hemostatik ajanın antikanserojen etkisine karşı hücrenin hangi savunma yolağının kullanıldığı ve bu ajana karşı nasıl direnç kazandığı saptanmıştır.

6) Proteomik çalışmalarla CaCo2 kolon kanseri hücre hattı için gen ontoloji analizleri ile Panther programında protein profillemesi yapılmıştır. Böylelikle analizleri yapılan proteinlerin hücrede hangi biyolojik süreçte ve hücrenin hangi kısmında oldukları belirlenmiştir.

7) Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar hem kaynaklarda belirtilen sınırlarla hem de kullanılan UPLC/MS yönteminden elde edilen verilerle karşılaştırılarak değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Proteomik çalışmalarda analiz edilecek örnek ve yapılacak çalışmanın türüne göre kullanılan, pek çok kimyasal, cihaz ve veri değerlendirme programı mevcuttur. Kullanılan bu farklı kimyasal ve cihazlarla değişik proteomik yöntemler geliştirilmiştir (Bölüm 2.7.2.). NMR bazlı yöntemler fonksiyonel proteomik çalışmalarda sıklıkla kullanılırken, tarama (array) bazlı sistemler proteinlerin yarı nicel analizlerinde kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişen ayırma teknikleri ve

biyoinformatik teknolojilerle birlikte kütle spektroskopisi proteomik çalışmalarda en çok kullanılan sistem haline gelmiştir. Özellikle gelişen yüksek ayırıcılık, kütle doğruluğu, duyarlılık ve tarama hızı ile birlikte proteomik çalışmalar kütle spektroskopisi bazlı yöntemlerle güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmektedir.

Tez kapsamında yapılan proteomik çalışmalarda dedektör olarak kuadropol uçuş zamanlı (QTOF) analizörün kullanıldığı ters faz UPLC/MS yöntemi ile çalışılmıştır.

MS bazlı proteomik çalışmalarda iki yaklaşım bulunmasına karşın aşağıdan yukarı yaklaşımlı LC/MS sistemleri geniş analiz aralığı sağlaması nedeni ile oldukça sık kullanılmaktadır. Tez çalışmasında LC/MS ile aşağıdan yukarı yaklaşım kullanılmıştır. Proteinler MS analizinden önce tripsin ile küçük peptitlere parçalanmıştır. Proteinlerin parçalanması ile oluşan peptit karışımları LC sistemi ile ayrıldıktan sonra MS ile analiz edilerek peptit profillemesi ve daha sonra da buna bağlı olarak protein profillemesi yapılmıştır. Elde edilen MS ve MS/MS sonuçları Maxquant programı ile değerlendirilmiştir.

Günümüzde nano boyutta LC yöntemi tüm dünyada proteomik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak nano LC yöntemi düşük tekrarlanabilirlik ve cihazın doğasından kaynaklı olarak ölü hacim ve tıkanma riski gibi problemler içermektedir. Bu nedenle bu çalışma kapsamında nano LC yöntemine alternatif olabilecek UPLC yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda proteinlerin LC/MS bazlı aşağıdan yukarı proteomik çalışmaları birbirini takip eden örnek hazırlama, LC/MS yöntemi ile sıgır serum albümin ve CaCo2 kolon kanseri hücrelerinin protein ve peptitlerin analizi ve LC/MS verilerinin biyoinformatik sistemlerle değerlendirmesi şeklinde yapılmıştır.

CaCo2 kolon kanseri hücre hattı ile yapılan çalışmalarda, örnek hazırlama basamağı hücrelerin mekanik liziz teknikleri ile parçalanmasıyla başlamıştır. Parçalanmış hücrelerin içerisinde bulunan proteinlerin diğer moleküllerden ve hücre ile yapılan deneylerde, dışardan gelen kimyasallardan ayrılması işleminde tüm dünyada sıklıkla kullanılan metanol, kloroform ve su karışımı kullanılmıştır. 3 fazlı bu sistemin en büyük avantajı; polar metabolitlerin sulu faz içerisinde, lipidlerin de organik faz içerisinde etkin bir şekilde proteinlerden ayrılmasıdır. Organik ve sulu

fazın ortasında ise katı protein peleti oluşmaktadır (Bölüm 3.3.4).

Elde edilen protein peleti daha sonra amonyum bikarbonat çözeltisi ile çözünmüştür. Çözünme işlemi oldukça güç bir işlemdir. Çözünen proteinler, disülfid bağlarının koparılması ve tekrar oluşumunun engellenmesi amacıyla en sık kullanılan ajanlardan DTT ve iyodoasetamid seçilerek denatüre hale getirilmiştir. Örnek hazırlama işleminin son basamağı ise proteinlerin peptitlere parçalanması işlemidir. Denatüre hale gelerek 3 boyutlu yapısını kaybeden proteinlerin parçalanmasında proteaz enzimi olan tripsin enzimi kullanılmıştır. Tripsin ile parçalanmasından sonra peptit karışımı elde edilmiştir (Bölüm 3.3.5). Çözelti içerisinde enzimlerle proteinleri parçalama işlemi için optimum şartların sağlanması gerekmektedir. Enzimin maksimum aktiflik gösterdiği sıcaklık ve pH değeri ve enzim/protein oranı optimize hale getirilmelidir. Yapılan çalışmalarda tripsin enziminin optimum verim verdiği sıcaklık 37 °C, en aktif olduğu pH değeri 8.5 ve enzim/protein oranı 1/50 ile 1/100 (a/a) olarak seçilmiştir. Ayrıca tripsin ile proteinin inkübasyon süresi 18 saat olarak uygulanmıştır. Parçalama işlemi sonrasında oluşan peptit karışımının tripsin enziminden zarar görmemesi için ortam şartları değiştirilerek tripsin inhibe edilmiştir. Bunun için ortamın sıcaklığı 4 °C' ye düşürülmüş ve formik asit kullanılarak ortamın pH değeri 3.5 olarak değiştirilmiştir (Bölüm 3.3.5).

Elde edilen peptit karışımı daha sonra UPLC yöntemi ile analiz edilebilecek şekilde hareketli faz ile seyreltilmiştir. Örnek hazırlama ile elde edilen peptit karışımının direkt MS yöntemi ile analizi, bazı problemler içermektedir. Kompleks peptit karışımlarında miktarı düşük olan peptitler diğer peptitler tarafından baskılanacağı için MS yöntemi ile analizi oldukça zordur. Bunun için MS yöntemi ile uygulama öncesinde peptit karışımlarının daha basit hale getirilerek analiz edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla günümüzde en sık kullanılan ayırma tekniği LC yöntemidir. LC yöntemi içerisinde peptitler hareketli ve sabit faz ile farklı oranlarda etkileşerek ayrılmaktadırlar.

Tablo 2.1'de LC yöntemi ile ilgili olarak verilen bilgilerde proteomik çalışmalarda en sık kullanılan LC yönteminin son derece yüksek duyarlılığa sahip nano LC yöntemi olduğu görülmektedir. Nano LC yönteminde genellikle 75 µm

çaplı kolonlar ve buna uygun olarak hareketli faz akış hızı ortalama 300 nL/dk olarak kullanılmaktadır.

Analizlerde UPLC kolonu olarak 1.8 µm çapa sahip parçacıkların bulunduğu apolar sabit faz olan C₁₈ (2.1 mm x 100 mm, 1.8 µm, 300 Å) kolon seçilmiştir. Çalışmada peptitlerin iyi bir şekilde ayrılması için gözenek boyutu 300 Å olan bir kolon kullanılmıştır.

Proteomik çalışmalarda hidrofilik etkileşim kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi gibi ayırım yöntemler kullanılmasına karşın dünya çapında sıklıkla kullanıldığı için çalışmalarda ters faz LC yöntemi kullanılmıştır. Bunun en önemli nedeni, bu sisteme uygun hareketli faz ve iyon çifti ajanlarının kütle spektrometresi ile uygun bir şekilde çalışmasıdır.

Kaynaklarda en çok kullanılan asetonitril (% 0.1 formik asit (h/h)) ve su (% 0.1 formik asit (h/h)) karışımı hareketli faz olarak seçilmiştir. UPLC’de tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesi için analizlerden önce kolonun dengeye gelmesi gerekmektedir. Bunun için yaklaşık 50 kolon hacmi kadar hareketli faz sistemden geçirilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0.2 mL/dk olarak belirlenmiştir.

UPLC yöntemi ile ayrılan peptitler daha sonra analiz için kütle spektrometresine gelmektedir. Şekil 2.9.’da görüldüğü gibi kütle spektrometresi iyonlaşma kaynağı, kütle analizörü ve detektörden oluşmaktadır. Sistem vakum altında çalışmaktadır. Kütle spektrometresine gelen peptitler ilk olarak gaz halinde peptit iyonlarının elde edildiği iyonlaşma kaynağına gelmektedir. Proteomik çalışmalarda MALDİ ve ESI olmak üzere iki iyonlaşma kaynağı kullanılmasına rağmen LC/MS bazlı proteomik çalışmalarda ESI sistemi kullanılmaktadır. Bu nedenle tez çalışmasında ESI sistemi kullanılmıştır. ESI içerisinde gaz halinde iyonik peptit türlerini elde etmek için sıcaklık 350 °C ye çıkarılmıştır. Kapiler potansiyeli 4000 volt olarak belirlenmiştir. Düzgün bir sprey oluşumu için nebulizer basıncı 45 psig olarak ayarlanmıştır (Tablo 3.7). Analizlerde hareketli fazdan kaynaklanan her hangi baskılayıcı türlere rastlanmamıştır.

Gaz haline getirilen peptit iyonlarının analizi kütle analizöründe gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar kapsamında kuadrupol uçuş zamanlı (QTOF) kütle analizörü kullanılmıştır. QTOF sisteminin çok hızlı tarama yapabilmesi yaşam süresi kısa olan türlerin analizlerinde büyük bir avantaj sağlamakta, ayrıca iyon

tuzaklı sistemlerde sıklıkla gözlemlenen boş yükler (space charge) TOF içerisinde gözlemlenmemesi sisteme bir başka avantaj katmaktadır. QTOF sisteminde gaz halindeki iyonik peptitler kuadropol sistemine geçmektedir. Kuadropol filtresinden geçen iyonlar, parçalanmanın yapıldığı ve MS/MS verilerinin elde edildiği parçalanma ünitesine gelmekte iyonların ağırlıklarına göre ayrılan pozitif yüklü iyonların bulunma miktarları ile orantılı olarak tespit edilerek MS ve MS/MS verileri elde edilmiştir (Tablo 3.8 ve 3.9).

Elde edilen bu MS ve MS/MS verileri biyoinformatik sistemlerde değerlendirilmiştir. LC/MS bazlı proteomik çalışmalarda yüzlerce proteinin nitel analizi aynı anda yapılmaktadır. De novo ve peptit dizileme işlemleri sadece bir tek protein veya basit bir protein karışımları için uygulanabilmektedir. Bu yüzden bu kadar fazla proteinin nitel analizi biyoinformatik sistemlerde de novo ve peptit dizileme çalışmaları ile yapılamamaktadır. Tez kapsamında yüzlerce proteinin analizi için peptitlerden elde edilen MS ve MS/MS spektrumları veri tabanları ile karşılaştırılarak analizleri yapılmıştır. Veri tabanları ile karşılaştırma çalışmaları Bölüm 2.7.5'te verildiği gibi iki basamaktan meydana gelmiştir. İlk olarak peptitlere ait olan m/z değerleri, teorik m/z değerleri ile karşılaştırılmış ve olası peptitler belirlenmiştir. İlk kısımdan sonra m/z değeri deneysel olarak bulunan precursor iyon parçalanma ünitesi (CID) içinde parçalanmıştır. Böylelikle MS/MS verileri elde edilmiştir. Elde edilen MS/MS verileri, veri bankaları içerisinde bulunan teorik MS/MS sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Deneysel MS/MS sonuçları elde edilirken spektrumlarda peptidin parçalanması ile birlikte N-merkezli ve C-merkezli iyonlar oluşmaktadır. Oluşan N merkezli iyonlar a, b ve c iyonları olarak gösterilmiştir. C-merkezli iyonlar ise x, y ve z iyonları olarak gösterilmiştir (Şekil 2.14). Eşleştirme işleminde oluşan deneysel iyonlar teorik iyonlarla karşılaştırılmıştır. Bu eşleşmelerde amino asit dizileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu karşılaştırma ile birlikte eşleşme sağlandığı zaman peptidin nitel analizinin yapılabildiği kabul edilmiştir. Eşleşmenin derecesini belirlemek için eşleşme skorları kullanılmıştır. Böylelikle peptitlerin ve buna bağlı olarak proteinlerin veri bankalarında bulunan peptit ve proteinlere olan yakınlığı gözlemlenmiştir. Tez kapsamında yapılan bu çalışmalarda proteinlerin nitel analizleri Andromeda ve Maxquant programları ile birlikte entegre bir şekilde kullanılmıştır. Andromeda

(Maxquant) programı hem kolay bir arayüze sahiptir hem de başta Mascot programı olmak üzere diğer programlara karşı yapılan çalışmalarda daha yüksek verim sağlamaktadır.

Maxquant ve Andromeda programı ile yapılan analizlerde ilk olarak çalışılan örnek türüne uygun bir şekilde veri bankası seçilmelidir. Yapılan sığır serum albümin çalışmalarında dünyada çok sık kullanılan Uniprot veri bankası içerisinde BosTaurus.fasta taksonomik birimi kullanılırken, CaCo2 kolon kanseri hücreleri için HUMAN.Fasta taksonomik birimi kullanılmıştır. Bu veri bankası içerisinde insan için validasyonu yapılmış yaklaşık 20000 protein mevcut iken bilgisayar simülasyonları ile belirlenen yaklaşık 130000 türde mevcuttur. Sistem her ay kendini yenilemekte ve yeni proteinler eklemektedir. Veri bankalarının seçilmesinden sonra sıra bu bankalarda bulunan proteinlerin deneysel koşullarla aynı olacak şekilde sanal ortamda peptitlerine parçalanması işlemine geçilmiş ve tripsin enzimi seçilmiştir. Parçalayıcı enzim ve veri bankasının belirlenmesinden sonra proteinler üzerinde deneysel olarak meydana gelebilecek olası modifikasyonlar sanal ortamda belirlenmelidir. Böylelikle modifikasyonlardan dolayı meydana gelebilecek kütleli farklılıklar sistemde tanımlı hale getirilmelidir.

Deneysel çalışmalarda oluşabilecek en kısa ve en uzun amino asit dizileri sisteme girilerek araştırılacak peptitlerde bir filtre yaratılmıştır.

Belirlenen deneysel parametrelerle birlikte teorik peptitler oluşturulmuştur. Oluşturulan teorik peptitler ile deneysel sonuçlar iki basamaklı bir eşleştirme işlemine sokulmuştur. Birinci basamakta deneysel olarak belirlenen peptitlere ait m/z değerleri teorik sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Burada kullanılan kütle spektrometresinin türüne göre eşleşmede olası hata payları 20 ppm olarak belirlenmiştir. Burada eşleşen olası peptitlerin MS/MS verileri teorik sonuçlarla karşılaştırılmış ve ikinci basamakta eşleştirme işlemi yapılmıştır. Yapılan analizlerde güvenilirliği arttırmak için çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Bunların başında tüm dünyada kullanılan FDR filtresi uygulanmıştır. MS/MS verileri hedef veri bankası ile analiz sonrasında Maxquant programı tarafından yapılan tuzak veri bankası ile de karşılaştırılmıştır. Bu eşleşmede hedef/tuzak oranı hesaplanmıştır. Bu karşılaştırılma işlemlerinde FDR değeri maksimum 0.01 olarak belirlenmiştir. Bu değer altında bulunan proteinler nitel analiz çalışmalarında kullanılırken FDR

değeri 0.01'den büyük olanlar elimine edilmiştir. FDR filtresinden sonra skor filtresi uygulanmıştır. Nitel analizi yapılan proteinler için 10 ve altındakiler elimine edilmiştir. Son olarak sığır serum albüminde yapılan 3 enjeksiyondan en az 2 tanesinde gözlemlenen peptitler nitel analiz için seçilmiştir. CaCo2 kolon kanseri hücreleri için aynı işlem protein seviyesinde uygulanmıştır. CaCo2 kolon kanseri hücrelerinde bir proteinin nitel analizinin yapılabilmesi için o proteine ait en az 2 peptidin nitel analizinin yapılabilmesi şartı konmuştur.

Yapılan çalışmalarda proteinlere ait nitel analizin yanı sıra iki farklı koşul altında bulunan proteinlerin karşılaştırılmalı analizleri (yarı nicel) yapılmıştır. Bu işlem için yine Maxquant programı kullanılmıştır.

LC/MS bazlı proteomik çalışmalarda yarı nicel analiz çalışmaları işaretli (labelled) ve işaretsiz (label free) olmak üzere iki farklı yöntem uygulanarak yapılmaktadır. İşaretsiz nicel analiz yöntemi klinik çalışmalarda çok iyi sonuçlar vermektedir. Özellikle biyobelirteçlerin belirlenmesinde bir çok çalışmada kullanılmaktadır. Tez kapsamında proteinlerin nicel analizleri, işaretsiz olarak pik yoğunluklarının karşılaştırılması ile yapılmıştır. Bu sistemin en önemli avantajı uygulanabilirliğinin kolay olması ve çok fazla koşulun birbiri ile kıyaslanmasının yapılabilmesi olarak belirtilmiştir. Bu amaçla kullanılan bilgisayar programı günümüzde dünya çapında kullanılan Maxquant programı olmuştur. Maxquant programı içerisinde yapılan nicel analizlerde sistemde kullanılacak yöntem yani işaretli veya işaretsiz nicel analiz ile yapılacağı mutlaka belirtilmelidir. Şekil 2.17'de işaretsiz nicel analiz metodu için örnek hazırlama basamakları verilmiştir. İşaretsiz yöntemlerde örnekler birbirinden tamamen ayrı bir şekilde analiz edilmekte ve elde edilen LC/MS verilerinin karşılaştırılması ile göreceli bir miktar tayini gerçekleştirilmektedir.

Proteinlere ait yarı nicel analizlerinde proteinlerin yoğunluklarının karşılaştırılması ile de yarı nicel analizler yapılmıştır. Pik yoğunluklarının karşılaştırılmasında kullanılan yöntem, peptitler için elde edilen tek boyutlu MS verilerinde peptit piklerinin yoğunluklarının belirlenmesi ve iki farklı koşul için bu yoğunlukların karşılaştırılması ile yapılmıştır. Bu sistem ilk geliştirildiğinde iki temel sorun ile karşılaşmıştır. Bunlar aynı örneğin farklı enjeksiyonlarında farklı peptit yoğunluklarının gözlemlenmesi ve iki farklı koşul için yapılan

enjeksiyonlarda aynı peptitlerin farklı alıkonma zamanlarında bulunmuş olmalarıdır. Son yıllarda geliştirilen yeni algoritmalarla birlikte güvenilir normalizasyon yöntemleri geliştirilmiş ve enjeksiyonlar arasında gözlemlenen pik yoğunluğundaki sapmalar büyük ölçüde önlenmiştir.

Maxquant programı ile yarı nicel analizleri yapılan proteinlerin değişimlerinin anlamlı olup olmadığı Perseus istatistik programı ile incelenmiştir. Kolay arayüzü ve Maxquant programı ile uyumlu olması nedeniyle Perseus programı proteomik analizlerde kullanılmıştır. Perseus analizlerinde öncelikle her iki koşulda yoğunluğu hesaplanmış proteinler belirlenmiştir. Daha sonra protein yoğunlukları her bir koşulun 3'er enjeksiyonu hesaba katılarak çift yönlü t-testi ile analiz edilmiştir. Böylelikle farklı koşullarda miktarları istatistiksel olarak anlamlı değişen proteinler belirlenmiştir.

5.1. Sığır Serum Albüminin Maxquant Programı ile Nitel Analizi

Tez kapsamında yapılan analizlerde sığır serum albümin proteini referans standart madde olarak seçilmiştir. Geliştirilen UPLC/MS metodu sığır serum albüminin analizinde kullanılmış ve maxquant programı ile birlikte uyumlu ve güvenilir sonuçlar verip vermediği araştırılmıştır. Öncelikle standart sığır serum albümin proteini analiz edilmiştir. Bu nedenle proteomik çalışmalarda sıkça kullanılan sığır serum albümin standart proteini hem analitik yöntemin geliştirilmesinde hemde biyoinformatik sistemlerde kullanılmıştır.

Sığır serum albümine ait çok sayıda peptidin nitel analizi yapılabilmektedir. Ayrıca elde edilen peptitlerin sığır serum albüminin %50 den fazlasını gösterdiği tespit edilmiştir. Verilerin maxquant programı içerisinde bu sonuçları vermesi bize UPLC verilerinin biyoinformatik sistemlerle de uyumlu olduğu sonucunu vermiştir.

Bu amaçla geliştirilen UPLC/MS bazlı yöntem birbirini takip eden üç basamaktan meydana gelmiştir. Bu basamaklar örneklerin analiz için hazırlanması (Bölüm 3.2.1), örneklerin UPLC/MS ile analizi (Bölüm 3.2.2) ve son olarak elde edilen MS/MS verilerinin Maxquant programı içerisinde incelenmesidir.

Çalışmalarda UPLC yöntemi sığır serum albümine ait peptit karışımının ayrılmasında kütle spektrometresi ise ayrılan peptitlerin analizinde kullanılmıştır. Mass hunter programı ile birlikte UPLC/MS ile analiz sonucunda elde edilen

kromatogram incelenmiştir. Çalışmada hareketli faz olarak kaynaklarda sıkça kullanılan su ve asetonitril çözeltileri seçilmiştir. Hareketli faz içerisine iyon çifti ajanı olarak formik asit eklenmiştir. Formik asit kullanımı ile birlikte peptitler pozitif olarak yüklenmiştir. Kütle spektrometresinde analiz modu pozitif olarak seçilmiştir.

Sığır serum albüminin UPLC ile analizinde iki farklı gradient sistemi kullanılmıştır. Toplamda 70 (Gradient 1) ve 45 (Gradient 2) dk gradient sistemi uygulanmıştır (Tablo 3.5. ve3.6.).

Peptitlerin ters faz UPLC yöntemi ile analizinde asetonitrilin % 3 ile % 45 arasında değişim gösterdiği kısımlarda peptitlerin kolonda polaritelerine göre ayrımı gerçekleştirilmiştir. Bu ayırım sırasında MS/MS verileri de alınmıştır. Gradient 1 içerisinde peptitler asetonitrilin hareketli fazdaki yüzdesiyle orantılı olacak şekilde ilk 45 dk'da yoğun bir şekilde gözlemlenmiştir Şekil 4.1.'de 45 ile 70 dk arasında ise kolonun yıkanması ve yeniden başlangıç koşullarına dönmesi sağlanmıştır.

Gradient 2 sisteminde yine asetonitril yüzdesi % 3-45 aralığında değiştiği ilk 25 dk kısımda peptitler kolon içerisinde polaritelerine göre ayrılmıştır (Şekil 4.2.). 25 ile 45 dk arasında kolonun yıkanması ve yeniden başlangıç koşullarına dönmesi sağlanmıştır .

Her iki gradient sisteminde 10 µg sığır serum albümin proteini enjekte edilerek 3'er tekrarlı analizler yapılmıştır.

Bu çalışmada sistemin verimi, sığır serum albümine ait peptit sayıları ve bulunan peptitlerin proteinin ne kadarlık bir kısmını gösterdiği yönünden incelenmiştir. Peptitlerin MS/MS verilerinden nitel analizlerini yapmak için Maxquant programı kullanılmıştır. Deneysel kısımda anlatılan parametreler girilerek nitel analiz işlemi gerçekleştirilmiştir.

UPLC/MS yöntemi ile elde edilen sonuçların 45 dk gradient sistemi ile 26 peptit gözlemlenirken bu peptitler sığır serum albümin proteinin %41'lik kısmını; 70 dk gradient sisteminde ise 36 peptidin nitel analiz yapılmış ve sığır serum albüminin %56'lık kısmını göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar neticesinde daha fazla peptit gözlemlenen 70 dk gradient sistemi sığır serum albümin ile yapılan diğer çalışmalarda kullanılmıştır.

Sığır serum albümin analizlerinde değişik miktarlarda (0,5, 1, 5, 10 ve 20 µg) protein enjekte edilerek optimum enjeksiyon miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Her bir miktar için 3 enjeksiyon yapılmış ve en az 2 enjeksiyonda nitel analizi yapılabilen peptitler seçilmiştir. Şekil 4.3.'de verildiği gibi enjeksiyon miktarı arttıkça peptitlere ait piklerin şiddetleri de artmaktadır.

Tablo 4.1'de görüldüğü gibi en az enjeksiyon miktarı 0.5 µg olarak uygulanmıştır. 0.5 µg için sadece 14 peptit gözlemlenmiş ve gözlemlenen peptitler sığır serum albüminin % 28'sini içermiştir. 1 µg enjekte edildiğinde ise gözlemlenen peptit sayısı 29' a çıkmıştır. Burada gözlemlenen peptitler proteinin % 42 sini kapsamıştır. 5 µg protein enjeksiyonunda ise % 48 lik bir protein içeriği ile 26 peptit gözlenmiştir. 10 µg enjeksiyonda 36 peptit proteinin %58 lik kısmını ve son olarak 20 µg enjeksiyon proteinin % 63'lük kısmını içermiştir. Tablo 4.2' de bütün enjeksiyon miktarları için gözlemlenen peptitlerin aminoasit dizilimleri verilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.4.' de grafikte de gösterilmiştir.

Sonuçlarda sadece 10 ve 20 µg protein miktarları enjeksiyonu ile proteinin % 50 den fazlasının nitel analizinin yapılabildiği gözlenmiştir. Bundan sonraki deneysel süreçte hem çok sayıda peptit vermesi hem de ekonomik olması nedeniyle 10 µg sığır serum albümin kullanılmıştır.

Hem sığır serum albümin analizleri hem de CaCo2 kolon kanseri hücrelerindeki peptit ve buna bağlı olarak proteinlerin nitel analizlerinin nasıl yapıldığı sığır serum albümine ait olan MPCTEDYLSLILNR peptidinin nitel analizi ile gösterilmiştir (Bölüm 4.2.). MPCTEDYLSLILNR peptidine ait deneysel olarak elde edilen MS ve MS/MS verileri Maxquant programı içerisinde analiz edilerek veri bankalarında bulunan teorik peptit sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

MPCTEDYLSLILNR peptidinin nitel analizi için iki basamaklı bir eşleştirme işlemi yapılmıştır. Eşleştirme işlemi ilk olarak peptidin MS verilerinden elde edilen m/z alınarak yapılmıştır.

İkinci kısımda ise peptitlerin MS/MS verileri kullanılarak parçalanma ürünleri teorik sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma işleminde eşleşen ürünlerden hareket ile aminoasit dizisi belirlenmiştir.

MPCTEDYLSLILNR peptidi EIS de iyonlaşarak +2 yüklü iyon halinde analiz edilmiştir. MPCTEDYLSLILNR peptidine ait ayrıştırılmış iyon

kromatogramı Şekil 4.5.'de görülmektedir. Peptidin alıkonma zamanı 36.8 dk olarak saptanmıştır. MPCTEDYLSLILNR peptidi biraz daha yakından incelendiğinde peptide ait izotop kümeleri gözlemlenmiştir. Peptide ait monoizotopik pik 892.9152 m/z değerine sahiptir (Şekil 4.6.). MPCTEDYLSLILNR peptidinin +2 yüklü iyonunun gerçek m/z değeri 892.9204 olarak veri bankasından belirlenmiştir.

MS/MS verilerinin teorik sonuçlarla karşılaştırılmasında kullanılan en önemli parametre eşleşmede kullanılacak kütle hata payıdır. MS/MS verilerinin karşılaştırılmasında kullanılacak hata payı maksimum 20 ppm olarak belirlenmiştir. Yukarıda belirlenen peptitler için eşleştirme işleminde oluşan hata payları Tablo 4.3. içerisinde gösterilmiştir. MPCTEDYLSLILNR peptidinin deneysel MS/MS sonuçlarının teorik sonuçlarla karşılaştırılması Şekil 4.7.'de verilmiştir. Yapılan ön tarama sonrası monoizotopik pike ait MS/MS verileri olası peptitlerin teorik MS/MS verileri ile karşılaştırılarak fragment iyonların eşleşmesi yapılmıştır. Bu eşleşmede deneysel MS/MS verileri MPCTEDYLSLILNR peptidine ait fragment iyonlarla eşleşmiştir (Şekil 4.7). Şekilde görüldüğü gibi bu eşleşme ürünleri ; y1, y2, y3, y4, y5, y6, y8, y9, y11, y12, y13, y1-NH₃, y2-NH₃, y3-NH₃, y4-NH₃, y6-H₂O, y8-NH₃, Y11-H₂O, y12-H₂O, y13-H₂O, a2, b2, b3, b4-H₂O, b5, b5-H₂O olarak belirlenmiştir.

Yapılan bu analizle birlikte MS/MS verilerinden oluşan eşleşmelere göre geliştirilen algoritmalarla birlikte peptidin nitel analiz eşleşme skoru belirlenmiştir. MPCTEDYLSLILNR peptidi için eşleşme skoru 93.65 olarak belirlenmiştir.

Tez kapsamında yapılan bütün çalışmalarda peptitlerin nitel analizi bu şekilde yapılmıştır.

Sığır serum albümin ile yapılan gradient ve enjeksiyon miktarı optimizasyonlarından sonra geliştirilen yöntem geçerliliği araştırılmıştır. Geçerlilik parametreleri kaynak olarak ICH klavuzuna göre değerlendirilmiştir (226)

Özgünlük

ICH klavuzuna göre nitel analiz çalışmalarında yerine getirilmesi gereken tek parametre özgünlük olarak belirtilmiştir. Buna bağlı olarak sistem geçerliliğinde özgünlük parametresi çalışmaları için sığır serum albümin içermeyen

fakat tripsinde dahil olmak üzere bütün kimyasalları içeren kör çözeltiler hazırlanmıştır (Bölüm 3.2.4). Kör çözeltiler 70 dk gradient sistemi ile 6 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir. Elde edilen veriler Maxquant programı ile değerlendirilmiş, sonuçlarda herhangi bir peptide rastlanmamıştır. Bu sonuç bize nitel analizi yapılan peptitlerin hepsinin sığır serum albümininden geldiğini ve çalışma esnasında dışarıdan gelebilecek protein kalıntılarının bulunmadığını göstermiştir (Şekil 4.8.).

Doğruluk

Yapılan özgünlük parametresine ilaveten sistemin yarı nicel analizde kullanılacağı düşünülerek doğruluk ve kesinlik parametreleri de incelenmiştir.

Geliştirilen UPLC/MS yönteminin doğruluğunu hesaplamak için farklı eşleşme skorlarına sahip 2 farklı peptit seçilmiştir. Bu peptitler GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR'dir. Bu 2 farklı peptit Maxquant programında analiz edilmiş, ve m/z değerlerinden peptit kütleleri hesaplanmıştır. GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerine ait MS/MS spektrumları ve aminoasit dizileri Şekil. 4.9. ve 4.10.'da verilmiştir.

Deneysel olarak hesaplanan sonuçlar, teorik (gerçek) sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Yapılan ölçümler 11 gün boyunca devam etmiştir ve GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidi için Tablo 4.4. ve LGEYGFQNALIVR peptidi için Tablo 4.5.' de gözlenen sonuçlar elde edilmiştir. 11 gün boyunca 2 peptit için elde edilen %BH ortalaması alınmış, GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidi için $1,05 \times 10^{-5}$ ve LGEYGFQNALIVR peptidi için $4,67 \times 10^{-5}$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar neticesinde peptit kütlelerinin çok yüksek doğrulukta bulunduğu saptanmıştır. GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerinin 11 günlük çalışmasında elde edilen m/z verilerinin değişimi Şekil 4.11.'de verilmiştir.

Kesinlik

Proteomik çalışmalarda, kesinlik parametresi özellikle yarı nicel analizlerde önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda kesinliği incelemek için çeşitli ölçütler

kullanılmıştır. Sığır serum albümin analizlerinde kesinlik çalışmaları 11 gün boyunca yapılan analizlerle incelenmiştir

Çalışmalarda öncelikle 11 gün boyunca kaç tane peptidin nitel analizi yapıldığı ve hangi peptitlerin kaç gün boyunca nitel analizinin yapılabildiği takip edilmiştir. Her gün 10 µg sığır serum albümin proteini 3 defa enjekte edilmiş ve her gün gözlemlenen peptitler Tablo 4.6'da verilmiştir. Bunun yanısıra CCTESLVNR, ECCHGDLLECADDR, VPQVSTPTLVEVSR, DDPHACYSTVFDK, ETYGDMA DCCEKQEPER, SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK, TVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPK peptitleri 11 günlük çalışmada 10 gün boyunca gözlemlenmiş sadece 1 gün gözlemlenememiştir. EACFAVEGPK, KQTALVELLK, VPTAHLEDVLPLAEDITTILSK, HPYFYAPELLYYANK, MPCTEDYLSLILNR peptitleri ise 9 gün boyunca gözlemlenmiş sadece 2 gün gözlemlenememiştir. Böylelikle 10 µg sığır serum albümin proteini içinde bulunan peptitlerin nitel analizlerinin büyük bir çoğunluğunda tekrarlanabilir olduğu gözlemlenmiştir.

Yöntemin kesinliğini incelemek için kullanılan diğer ölçütler ise GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerine ait alıkonma zamanları, yoğunlukları ve eşleşme skorlarıdır.

Şekil 4.12'de peptitlere ait alıkonma zamanlarının 11 gün boyunca nasıl değiştiği verilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde alıkonma zamanlarının 11 gün boyunca değişmediği ve tekrarlanabilir olduğu gözlemlenmiştir. Bu süre boyunca hesaplanan %BSS değerleri GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidi için % 0.1993 ve LGEYGFQNALIVR peptidi için % 0.17703 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar kaynaklarda belirtilen nano LC yöntemi ile karşılaştırılmıştır (Nano LC bağıl standart sapma değeri 0.380 olarak verilmiştir) ve nano LC yöntemine oranla tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu bulunmuştur (232).

Maxquant programı ile peptitlerin yoğunlukları 11 gün boyunca hesaplanmıştır (Şekil 4.13). GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidi için %BSS değeri % 11.24, LGEYGFQNALIVR peptidi için ise % 14.58 olarak bulunmuştur.

Peptitlerin yoğunlukları ile 11 gün boyunca yapılan çalışmalar kaynaklarda yapılan nano LC yöntemi çalışmaları ile karşılaştırıldığında sonuçların nano LC

yöntemine göre çok daha iyi olduğu saptanmıştır (nano LC çalışmalarında peptit yoğunluklarında gözlemlenen b%BSS değerleri 11.54-63.5 arasında değişmektedir) (233).

Kesinliğin belirlenmesinde eşleşme skorlarının tekrarlanabilirliğine de bakılmıştır. Bunun için MS/MS verileri elde edilen peptitlerin teorik sonuçlar ile ne kadar eşleştiği yönünden incelenmiştir. GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitleri için 11 gün boyunca yapılan analizlerinde ölçülen eşleşme skorları takip edilerek %BSS değerleri % 12,29 ile % 15,75 olarak değerleri sırasıyla hesaplanmıştır (Şekil 4.14.).

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği protein seviyesinde de incelenmiştir. Sığır serum albümin ile yapılan çalışmalarda Şekil 4.15.'de protein yoğunluğunun 11 gün boyunca nasıl değiştiği gösterilmiştir. Protein yoğunluğunun %BSS değeri %14.27 olarak hesaplanmıştır.

Protein yoğunluğu için elde edilen sonuçlar kaynaklarla karşılaştırıldığında elde edilen değerlerin nano LC yöntemine göre çok daha iyi olduğu görülmüştür (233).

Doğrusallık

Doğrusallık parametresi için enjeksiyon miktarı ile yoğunlukların değişimi incelenmiştir. Böylelikle hem protein hemde peptit seviyesinde incelemeler yapılmıştır. Çalışmalarda Maxquant programı içerisinde hem hesaplanan sığır serum albümin protein yoğunluğu, hem de GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerine ait yoğunluklar kullanılmıştır.

GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK ve LGEYGFQNALIVR peptitlerine ait yoğunluklar Maxquant programı ile hesaplandıktan sonra enjeksiyon miktarına göre grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.16. ve 4.17.'de peptitlere ait sonuçlar gösterilmiştir. Buradaki grafiklerde 0.5 µg enjeksiyon miktarı göz önüne alınmamıştır. Bunun nedeni gözlemlenen peptit yoğunluklarının oldukça düşük olmasıdır. Yapılan analizlerde GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK peptidi için tanımlayıcılık katsayısı (R^2) değeri 0.976, LGEYGFQNALIVR peptidi için ise 0.9922 olarak belirlenmiştir.

Peptitler için yapılan enjeksiyon miktarı analizleri protein boyutunda sığır serum albümin ile de yapılmıştır. Maxquant programı ile hesaplanan protein yoğunluğu enjeksiyon miktarına göre grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.18.).

Elde edilen sonuçlar kaynaklar ile karşılaştırıldığında peptit ve protein yoğunluklarının enjeksiyon miktarı ile değişiminin kabul edilebilir ölçütlerde olduğu saptanmıştır (234, 235).

Yapılan çalışmalar sonucunda geliştirilen UPLC/MS yönteminin Maxquant programı ile birlikte sığır serum albümin proteinin nitel analizinde yüksek özgünlük, doğruluk ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermiştir. Referans standart madde sığır serum albümin ile yapılan analizler sonrasında geliştirilen yöntemin içerisinde binlerce protein bulunduran CaCo2 kolon kanseri hücre hattı üzerinde denenmesine karar verilmiştir.

5.2. CaCo2 Hücre Hattı Proteinlerinin Nitel Analizi

Sığır serum albümin ile yapılan analizler sonrasında CaCo2 kolon kanseri hücrelerinin nitel analizleri yapılmıştır. Analizlerde öncelikle hücre içerisinde bulunan protein konsantrasyonunun bilinmesine gerek duyulmuştur. Bu nedenle hücrelerin liziz işlemi sonrasında elde edilen lizat içerisindeki protein konsantrasyonu Bölüm 3.3.3' de anlatıldığı gibi Bio-Rad deterjan uyumlu (DC) ticari kit ile protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Protein miktar analizlerinde ilk olarak kit içerisinde bulunan sığır serum albümin ile kalibrasyon doğrusu çizilmiştir (Şekil 4.19.). Elde edilen kalibrasyon doğrusu sonrasında hazırlanan CaCo2 kolon kanseri hücrelerinden elde edilen lizat çözeltisi ölçülmüş ve 750 nm dalga boyunda absorbansı okunmuştur. Kalibrasyon eğrisinin regresyon denklemi ($y=0.379x + 0.017$) kullanılarak CaCo2 hücre lizatının protein konsantrasyonu 1.106 mg mL^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Protein konsantrasyonu belli olan hücre lizatları içerisinde proteinlerin izole edilmesi işlemi ise metanol, kloroform ve su karışımı ile yapılmıştır (Bölüm 3.3.4.).

Çöken proteinler sığır serum albüminde olduğu gibi amonyum bikarbonat ile çözülüp DTT ve iyodo asetamid ile denatüre hale getirilmiştir. Tripsin ile 18 saat inkübasyon sonrası proteinler peptitlerine parçalanmıştır. Elde edilen peptit

karışımları vakum santrifüj ile uçurma sonrası UPLC ile analize hazır hale getirilmiştir (Bölüm 3.3.5.).

Elde edilen peptit karışımının UPLC ile analizinde kullanılan gradient süresi değiştirilmiştir. Sığır serum albüminde tek bir protein analiz edilirken CaCo2 kolon kanseri hücrelerinde binlerce protein analiz edilmeye çalışılmıştır. Bu nedenle gradient süresi daha uzun tutulmuştur. Kaynaklarda gradient süresi ile ilgili olarak 120 dk ve üstünde çalışmalar yapılmıştır. Buna göre gradient sistemi 150 dk olarak alınmıştır (Tablo 3.10.).

CaCo2 kolon kanseri hücrelerinin analizinde optimum enjeksiyon miktarı araştırılmıştır. Optimum protein miktarı 20, 40 ve 80 µg enjeksiyon miktarı kullanılarak gözlemlenen protein sayısı ile belirlenmeye çalışılmıştır. Nano LC proteomik çalışmalarda uygun miktarda protein miktarı ile 500 ile 1000 arasında protein analiz edilebilmektedir. Bu değerler göz önüne alınarak protein miktarları araştırılmıştır. Şekil 4.20’de 20, 40 ve 80 µg enjekte edilmiş proteinlerin kromatogramları verilmiştir. Her bir enjeksiyon sonrası elde edilen MS/MS verilerinden faydalanarak proteinlerin nitel analizi yapılmıştır. Her bir miktar için 3’er tekrarlı analizler yapılmıştır. Yapılan CaCo2 kolon kanseri hücresi analizleri sonrasında 20 µg enjeksiyon miktarı için 420 protein (Şekil 4.21.), 40 µg enjeksiyon miktarı için 599 protein (Şekil 4.22.) ve 80 µg enjeksiyon miktarı için 741 protein tespit edilmiştir (Şekil 4.23.). Sonuçlar karşılaştırıldığında beklenildiği gibi enjeksiyon miktarı arttıkça nitel analizi yapılan protein sayısı da artmıştır. Yapılan nitel analizlerde en uygun enjeksiyon miktarının, 741 protein sayısı gözlemlenen 80 µg enjeksiyon miktarı olduğu saptanmıştır.

Proteinlerin tanımlanmasının yanı sıra yapılan analizlerin birbirleri ile tutarlı olup olmadığını anlamak için Perseus istatistik programı kullanarak veriler değerlendirilmiştir. Bu işlem için önce peptit boyutunda karşılaştırma yapılmıştır. Şekil 4.26.’ da görüldüğü gibi tanımlanan peptitlerin normalize olmamış yoğunlukları 3 enjeksiyon arasında karşılaştırılmıştır ve aralarındaki korelasyon incelenmiştir. Tablo 4.7.’de 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait peptitlerin yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyonda karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda R^2 değeri 0.9382 ile 0.9162 arasında değişmiştir. Bu sonuçlar bize analizlerin peptit düzeyinde tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir.

Protein düzeyinde ise yapılan analizlerde Maxquant programı içerisinde kullanılan işaretli nicel analiz algoritması ile hesaplanan normalize edilmiş protein yoğunlukları yine 3 enjeksiyon için karşılaştırılmıştır. Şekil 4.27 ve Tablo 4.8.'de 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait proteinlerin yoğunluklarının 3 farklı enjeksiyondaki karşılaştırmaları verilmiştir. Proteinler için gözlemlenen R^2 değeri 0.9934 ile 0.9878 arasında hesaplanmıştır. Proteinler için hesaplanan R^2 değerlerinin yüksek olmasının sebebi peptit düzeyinde herhangi bir normalizasyonun yapılmaması ve sistemden gelecek belirsizliklerin sonuçları etkilememesinden kaynaklanmıştır. Yapılan nitel analiz çalışmaları sonrası bulunan proteinler gen ontoloji yöntemi ile analiz edilerek hücre içerisindeki görevleri, fonksiyonları, buldukları protein sınıfı ve moleküler özellikleri analiz edilmiştir. Elde edilen proteinlerin ait oldukları gen isimleri kullanılarak Panther programında gen ontoloji analizi yapılmıştır. İlk olarak proteinlerin ait oldukları sınıflar düşünülerek incelenmiştir. Şekil 4.28.'da gösterildiği gibi analiz sonucunda bir çok sınıfa ait proteinin nitel analizinin yapılabildiği saptanmıştır. Analizi yapılan proteinlerin büyük bir çoğunluğunu sitoskeletal proteinler, enzim modülatörleri ve nükleik asite bağlı proteinler oluşturmaktadır.

Gen ontolojisi ile yapılan bir başka çalışmada ise proteinlerin hücre içerisinde hangi moleküler fonksiyonlara sahip olduğunun belirlenmesidir. Elde edilen sonuçlara bu açıdan yaklaşıldığında Şekil 4.29 'daki dağılım gözlemlenmiştir. Analiz edebilen proteinlerin % 39.5 kısmı katalitik aktivitelere rol almıştır.

Bu katalitik aktiviteyi gösteren proteinler yine gen ontolojisi analizlerinin Panther programı ile incelendiğinde, enzim düzenleyici aktiviteler, helikaz, hidrolaz, izomeraz, ligaz, liyaz, oksiredüktaz ve transferaz aktivitelerini sağladıkları bulunmuştur. Ayrıca bu proteinlerin % 33.9'luk bir kısmı hücre içerisinde bağlanma özelliğine sahip olup, bağlanma aktivitesi olarak görev yapan proteinlerin kalsiyum, kalsiyum bazlı fosfolipid, kromatin, nükleik asit, nükleotid ve proteinlere bağlandığı bulunmuştur.

Nitel analizi yapılan proteinleri buldukları protein sınıfı ve moleküler aktivitelerine göre inceledikten sonra hangi biyolojik süreçlerde yer aldıklarında yine gen ontolojisi ile incelenmiştir. Nitel analizi yapılan proteinlerin %29'luk kısmı

hücresel süreçlerde rol almaktadır. Bu hücresel süreçler iletişim, hücre döngüsü, çoğalma, hücresel bileşenlerin hareketleri kromozom segregasyonu ve sitokinesis olarak belirlenmiştir. Nitel analizi yapılan proteinlerin ikinci olarak en çok görev aldığı biyolojik süreç ise metabolik süreçlerdir. Bu proteinlerin %23,3' ü metabolik süreçlerde katabolik, biyosentez, koenzim metabolizması, azotlu bileşikler metabolizması, fosfat içeren bileşiklerin metabolik sürecinde, birincil metabolik süreçlerde, ikincil metabolik süreçlerde, sülfür ve vitamin metabolik süreçlerinde görev aldıkları saptanmıştır. Proteinlerin biyolojik süreçlerdeki dağılımı Şekil 4.30.' da gösterilmiştir.

Gen ontolojisi analizlerinde son olarak nitel analizi yapılabilen proteinlerin hücre içerisinde bulunduğu yerlere göre dağılımı araştırılmıştır. Proteinlerin % 42,3'lük bir kısmı hücre içerisinde sitoplazma ve plazma zarında moleküler fonksiyonlarını göstermektedirler. Proteinlerin % 7.7' lik bir kısmı membran proteinleri olduğu saptanmıştır. Analizi oldukça güç olan membran proteinlerinin analizinin yapılabilmesi özellikle örnek hazırlama kısmının oldukça başarılı olduğunu göstermiştir. Proteinlerin hücre içerisindeki dağılımı ve yüzdeleri Şekil 4.31.'de verilmiştir.

Gen ontoloji analizleri ile birlikte elde edilen sonuçlar geliştirilen yöntem ile CaCo2 kolon kanseri hücresi içerisinde bulunan pek çok farklı sınıftan, biyolojik süreçten, moleküler özelliklere sahip ve hücrenin değişik kısımlarında bulunan proteinin analiz edilebileceğini göstermiştir.

5.3. Bitkisel Temelli Hemostatik Ajanın Antikanserojen Etkisinin Proteomik Açısından İncelenmesi

Tez çalışmaları kapsamında Hacettepe Üniversitesi Hematoloji Anabilimdalı Başkanlığından elde edilen bitkisel temelli hemostatik ajan kullanılmıştır. Kaynaklarda hemostatik ajanların antikanserojen etkisi proteomik çalışmalarla incelenmiştir. Geliştirilen ve nitel analizde kullanılan analitik yöntem, bitkisel temelli hemostatik ajanın *in vitro* çalışmalar sonrasında CaCo2 kolon kanseri hücreleri üzerindeki hücre proliferasyonu etkisini kıyaslamalı proteomik çalışmalarda incelemek için kullanılmıştır. CaCo2 kolon kanseri hücre hatlarından bir kısmına hemostatik ajan eklenerek (T grubu) 48 saat inkübasyon edilmiştir.

Hemostatik ajan eklenmeyen diğer grup ise kontrol grubu (K grubu) olarak aynı koşullarda inkübasyon sürelerinde tutulmuştur. K ve T gruplarında proteomik analiz yapılmadan önce protein miktar tayini yapılmıştır. Şekil 4.19'da elde edilen kalibrasyon doğrusu ile birlikte K hücrelerinde elde edilen CaCo2 hücre lizatı içerisinde 1.106 mg mL^{-1} ve T hücrelerinden elde edilen lizat içerisinde 0.856 mg mL^{-1} protein konsantrasyonu elde edilmiştir (Bölüm 3.3.3).

Bölüm 3.3.6'da anlatıldığı gibi LC/MS analizlerinde kullanılan aynı gradient sistemi kullanılmıştır. Her bir grup için 3 enjeksiyon yapılmıştır. K ve T gruplarına ait kromatogramlar Şekil 4.30.'da verilmiştir.

Elde edilen bu kromatografik veriler maxquant programında incelenmiştir. Maxquant programı ile proteinlerin öncelikle nitel analizleri yapılmıştır. 48 saat inkübe edilmiş K gruplarında yapılan analizlerde enjeksiyon başına 4975 tane MS verisi, 5501 tane MS/MS verisi elde edilmiştir. Yapılan üç enjeksiyonda 1739, 1846 ve 1711 tane peptidin nitel analizi gerçekleştirilmiştir. T grupları için yapılan çalışmalarda ise ortalama 4974 tane MS, 5499 tane MS/MS verisi elde edilmiştir. Yapılan üç enjeksiyondan elde edilen sonuçlarla 2217, 2017 ve 2116 tane peptidin nitel analizi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen protein sayıları bakımından sonuçlar incelendiğinde ise Şekil 4.33.'deki Venn şemasında sonuçlar görülmektedir. K grubunda elde edilen protein sayısı 724 iken T grubunda 727 tane protein bulunmuştur. Bu sonuç beklenildiği gibi CaCo2 kolon kanseri hücrelerine ait proteinlerin nitel analiz sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

Maxquant programı ile nitel analizi yapılan proteinlerin normalize edilmiş protein yoğunlukları hesaplanmıştır. Protein yoğunlukları hesaplanırken proteine ait peptit yoğunlukları kullanılmıştır.

Elde edilen proteinlerin yoğunluklarını karşılaştırmak ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olup olmadığını bulmak için Perseus programı kullanılmıştır. Perseus programı içerisinde K ve T grupları arasında çift yönlü t testi yapılmıştır ($p < 0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklara sahip proteinler belirlendikten sonra bu proteinler iki kısımda incelenmiştir. Birinci kısımda hemostatik ajan ile miktarı K grubuna göre azalan proteinler, ikinci kısımda ise hemostatik ajanın etkisiyle K grubuna göre miktarı artan proteinler saptanmıştır. Hemostatik ajan ile

birlikte miktarı azalan proteinler Tablo 4.9.'da değişim miktarları ile birlikte verilmiştir. Miktarı azalan proteinlerin birbirleriyle olan ilişkilerini gözlemek maksadıyla string yolak analiz programı uygulanmıştır. Şekil 4.32.'de görüldüğü gibi proteinlerin büyük bir kısmının bir veya daha fazla yolak ile birbirlerine bağlı olduğu saptanmış ve azalan proteinlerin birbirleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Proteomik verilerin daha güvenilir bir şekilde yorumlanmasını sağlamak amacıyla değişim miktarı 1.5'in altında olan proteinler elimine edilmiştir. Değişim miktarı 1.5 ve üzeri olan proteinler ise kaynaklarda ve yolak analiz programlarında incelenerek kanser üzerinde önemli proteinler belirlenmeye çalışılmıştır.

RSPO2, HMGB, uzaman faktörleri, p23, RNF169, KPNA2, COPB1, HNRNPK, EIF5A1, CDK1, UBE2N, EIF3M, FASN, SND1 proteinlerinin kaynaklarda kanser oluşumunda etkili olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu proteinlerin bitkisel temelli hemostatik ajan ile inhibe oldukları belirlenmiştir. Bitkisel temelli hemostatik ajanın bu hedefleri etkileyerek antiproliferatif etki gösterdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda ilk defa hemostatic ajanın Wnt, p53 ve ubiquitin proteazom gibi programlı hücre ölümüne götüren yolakları etkilediğı belirlenmiştir (253, 247).

Yapılan çalışmalarda CaCo2 kolon kanseri hücrelerinin bitkisel temelli hemostatik ajana karşı bazı direnç mekanizmalarına sahip olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda GSTA1, MDH2, AKR1C3, ısı şok proteinleri, protein disulfide izomeraz proteinleri, CALR, ALDH1A1, ANXA5 ve TNK proteinlerinin arttığı saptanmıştır. Kaynaklarda bu proteinlerin hücrenin antioksidan kapasitesini arttırarak hücrelerin stres kaynaklarına karşı direnç kazanmaları sağladıkları gösterilmiştir

Elde edilen sonuçlar kaynaklarda ilk defa bitkisel temelli hemostatik ajanın değişik proteinleri kullanarak farklı antiproliferatif etki mekanizmalarının varlığını göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Proteomik çalışmalarla LC yöntemi kullanılarak protein ve peptitlerin nitel ve yarı nicel analizleri ile ayrılması ve MS yöntemi ile proteinlerin kütlelerinin yüksek duyarlılıkta belirlenmesi yapılmaktadır. Tez kapsamında yapılan proteomik çalışmalarda ilk defa CaCo2 kolon kanseri hücreleri içerisinde bulunan protein ve peptitlerin nitel ve yarı nicel analizleri için geliştirilen UPLC/MS yönteminin nano LC/MS yöntemine alternatif olarak kullanılabilceği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda UPLC/MS yönteminin nano LC yöntemine göre daha yüksek tekrarlanabilirlik gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca Nano LC sisteminde karşılaşılan ölü hacim ve tıkanma problemleri gibi dezavantajlar UPLC/MS yöntemi kullanılmasıyla ortadan kaldırılmıştır.

UPLC yönteminde kullanılacak daha uzun ve çapı düşük kolonlar hem kullanılan örnek miktarını azaltacak hemde duyarlılığı arttıracaktır. Kolonda bulunan sabit fazda kullanılan partiküllerin gözenek alanlarının büyük olması kompleks peptit karışımlarının ayrılmasında daha etkin olacaktır ve daha fazla peptit yapısı aydınlatılabilecektir.

Yapılan analizlerde CaCo2 kolon kanser hücresi içerisinde bulunan bir çok farklı sınıftan protein analiz edilmiştir. Gelecekte UPLC/MS yöntemi ile yapılan proteomik çalışmalarda, CaCo2 kolon kanser hücrelerinden örnek hazırlama ile ilgili olarak mevcut yöntemlere ilaveten yeni yöntemler geliştirilerek analiz edilen protein sayısı artırılarak klinik çalışmalara ışık tutulabilir. Örneğin geliştirilen UPLC/MS yönteminde analizler yapılırken kompleks protein karışımları enzimatik parçalanmadan önce SDS-PAGE veya jelsiz izoelektrik odaklama gibi ön saflaştırma sistemleri ile daha basit fraksiyonlara ayrılabilir ve analizi yapılan protein sayısı artırılabilir. Örnek hazırlamada daha az basamak içeren ve madde kaybını azaltan filtre destekli örnek hazırlama sistemleri kullanılabilir. Enzimatik protein parçalama işleminde tripsin ile birlikte bir kaç farklı enzim kullanılarak daha etkili parçalama işlemi ve bunun sonucunda daha fazla analiz edilebilecek peptit elde edilebilir.

Geliştirilen ve valide edilen UPLC/MS yöntemi proteomik çalışmalarda kullanıma sunulmuştur. Böylece bu çalışma SCI dergilerinde yayınlanması sonrasında kaynaklarda yerini alacaktır. Bundan sonraki proteomik çalışmalarda

UPLC/MS yöntemi kullanımı ile birlikte dünya çapında daha fazla grup ve bilim insanı bu çalışmalarda yer alabilecektir. Geliştirilen yöntemin biyolojik materyal (vücut sıvıları ve dokularda) analizlerine uygulanması önerilmektedir. Böylelikle klinik çalışmalara destek verilebilir hale gelecektir.

Yapılan çalışmalarda bitkisel temelli hemostatik ajanın bazı proteinlerin ifedelerini hücre içerisinde değiştirdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda kanser oluşumunda ve gelişiminde etkili olan RSPO2, HMGB, uzama faktörleri, p23, RNF169, KPNA2, COPB1, HNRNPK, EIF5A1, CDK1, UBE2N, EIF3M, FASN, SND1 gibi kanser hedefleri hemostatik ajan tarafından inhibe edilmiştir. Yapılan gen ontoloji analizlerinde bu proteinlerin hücreleri apoptoza götürdüğü bilinen Wnt, p53, ubiquitin proteazom yolları üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca kanser hücrelerinin gelişiminde çok etkili olan FASN'nin inhibe edilmesi kanser hücreleri üzerinde proliferatif etki göstermektedir.

Kontrol gruplarına göre miktarı artan proteinler içerisinde HINT 1 proteini tespit edilmiştir. Böylelikle bitkisel temelli hemostatik ajanın antiprolatif etkisi wnt yolağı üzerinden etkili olduğu saptanmıştır. Antiproliferatif etki yolları genetik susturucularla analiz edilmelidir.

CaCo2 kolon kanseri hücrelerinin hemostatik ajanın antiproliferatif etkisine karşı çeşitli savunma mekanizmaları geliştirdiği saptanmıştır. Bu çalışmalarda bitkisel temelli hemostatic ajanın etkisi ile artan GSTA1, MDH2, AKR1C3, ısı şok proteinleri, protein disulfid izomeraz proteinleri, CALR, ALDH1A1, ANXA5 ve TNK proteinlerinin hemostatik ajana karşı hücrelerin direncini arttırdığı saptanmıştır. Bu proteinler üzerindeki inhibe edici maddeler hemostatic ajan ile kullanılarak sinerjik etki araştırılmalıdır.

Bitkisel temelli hemostatik ajanın CaCo2 kolon kanseri üzerine etkisi proteomik çalışmalarla incelenmiştir. Elde edilen veriler transkriptomik ve metabolomik verilerle birlikte bir bütün halinde incelenmelidir. Böylelikle hemostatik ajanın etki mekanizmaları moleküler seviyede tamamen çözülecektir. Yapılan çalışmalarda hemostatik ajanın etkilediği önemli kanser hedefleri, belirteçleri tek tek incelenerek hemostatik ajan ile hangi yolak üzerinde ne kadar etkinlik gösterdiği belirlenmelidir. Hemostatik ajanın uygulandığı *in vitro* çalışmalardan sonra *in vivo* çalışmalar da araştırılmalıdır. Hemostatik ajanın tek

başına gösterdiği çoğalmayı durdurucu etki yanında antikanserojen ilaçlarla birlikte gösterebileceği sinerjik etki incelenmelidir. Böylelikle olası yeni kanser tedavi kürleri belirlenebilecek ve tedavi amaçlı olarak klinik çalışmalarda kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Bentley DR. The Human Genome Project--an overview. *Med Res Rev.* 2000;20(3):189-96.
2. Wilson BJ, Nicholls SG. The Human Genome Project, and recent advances in personalized genomics. *Risk Manag Healthc Policy.* 2015;8:9-20.
3. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature.* 2003;422(6928):193-7.
4. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 2000;405(6788):837-46.
5. Wilson SR, Vehus T, Berg HS, Lundanes E. Nano-LC in proteomics: recent advances and approaches. *Bioanalysis.* 2015;7(14):1799-815.
6. Cunsolo V, Saletti R, Muccilli V, Foti S. Characterization of the protein profile of donkey's milk whey fraction. *Journal of Mass Spectrometry.* 2007;42(9):1162-74.
7. Leicester HM. History of Protein Chemistry. *Isis.* 1979;70(254):600-1.
8. Gething MJ, Sambrook J. Protein Folding in the Cell. *Nature.* 1992;355(6355):33-45.
9. Lamond AI. Molecular biology of the cell, 4th edition. *Nature.* 2002;417(6887):383-.
10. Fields S. Proteomics. Proteomics in genomeland. *Science.* 2001;291(5507):1221-4.
11. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1996;13:19-50.
12. Domon B, Aebersold R. Review - Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* 2006;312(5771):212-7.
13. Tamminga CA. The human genome sequence: the human genome I: chromosomes and protein coding. *Am J Psychiatry.* 2001;158(3):370.
14. Makowski GS. Advances in CLINICAL CHEMISTRY VOLUME 67 PREFACE. *Advances in Clinical Chemistry, Vol 67.* 2014;67:Xi-Xi.
15. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:437-73.
16. Righetti PG, Castagna A, Antonucci F, Piubelli C, Cecconi D, Campostrini N, et al. The proteome: anno Domini 2002. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(4):425-38.
17. Sanchez-Carbayo M. Antibody array-based technologies for cancer protein profiling and functional proteomic analyses using serum and tissue specimens. *Tumour Biol.* 2010;31(2):103-12.

18. Mann M. Origins of mass spectrometry-based proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016.
19. Doerr A. Mass spectrometry-based targeted proteomics. *Nat Methods.* 2013;10(1):23.
20. Catherman AD, Skinner OS, Kelleher NL. Top Down proteomics: facts and perspectives. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;445(4):683-93.
21. Zhang J, Guy MJ, Norman HS, Chen YC, Xu Q, Dong X, et al. Top-down quantitative proteomics identified phosphorylation of cardiac troponin I as a candidate biomarker for chronic heart failure. *J Proteome Res.* 2011;10(9):4054-65.
22. Armirotti A, Damonte G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. *Proteomics.* 2010;10(20):3566-76.
23. Compton PD, Zamdborg L, Thomas PM, Kelleher NL. On the Scalability and Requirements of Whole Protein Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry.* 2011;83(17):6868-74.
24. Sidoli S, Lin S, Karch KR, Garcia BA. Bottom-up and middle-down proteomics have comparable accuracies in defining histone post-translational modification relative abundance and stoichiometry. *Anal Chem.* 2015;87(6):3129-33.
25. Paulus A, Wehr T, Freeby S, Liu N, Academia K. Biomarker discovery strategies; Comparison of 2D gel-based, bottom-up and top-down proteomics approaches with diabetic serum samples. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2005;4(8):S325-S.
26. Lohnes K, Quebbemann NR, Liu K, Kobzeff F, Loo JA, Loo RRO. Combining high-throughput MALDI-TOF mass spectrometry and isoelectric focusing gel electrophoresis for virtual 2D gel-based proteomics. *Methods.* 2016;104:163-9.
27. Kumar C, Mann M. Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. *Febs Lett.* 2009;583(11):1703-12.
28. Michalski A, Damoc E, Hauschild JP, Lange O, Wiegand A, Makarov A, et al. Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2011;10(9).
29. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003;422(6928):198-207.
30. Song MN, Moon PG, Lee JE, Na M, Kang W, Chae YS, et al. Proteomic analysis of breast cancer tissues to identify biomarker candidates by gel-assisted digestion and label-free quantification methods using LC-MS/MS. *Archives of Pharmacal Research.* 2012;35(10):1839-47.
31. Lu YT, Han CL, Wu CL, Yu TM, Chien CW, Liu CL, et al. Proteomic profiles of bronchoalveolar lavage fluid from patients with ventilator-associated pneumonia by gel-assisted digestion and 2-D-LC/MS/MS. *Proteomics Clinical Applications.* 2008;2(9):1208-22.

32. Bhat VB, Choi MH, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Comparative proteomic analysis of control and RcsX tumor-bearing SJL mouse plasma by Gel-LC-MS/MS. *Chemical Research in Toxicology*. 2004;17(12):1769-.
33. Zhang P, Zhu SS, Li YG, Zhao MZ, Liu M, Gao J, et al. Quantitative proteomics analysis to identify diffuse axonal injury biomarkers in rats using iTRAQ coupled LC-MS/MS. *Journal of Proteomics*. 2016;133:93-9.
34. Tsai TH, Song EW, Zhu R, Di Poto C, Wang MK, Luo Y, et al. LC-MS/MS-based serum proteomics for identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics*. 2015;15(13):2369-81.
35. Ramm S, Morissey B, Hernandez B, Rooney C, Pennington SR, Mally A. Application of a discovery to targeted LC-MS proteomics approach to identify deregulated proteins associated with idiosyncratic liver toxicity in a rat model of LPS/diclofenac co-administration. *Toxicology*. 2015;331:100-11.
36. Roxas BAP, Li QB. Significance analysis of microarray for relative quantitation of LC/MS data in proteomics. *Bmc Bioinformatics*. 2008;9.
37. Levin Y, Schwarz E, Wang L, Leweke FM, Bahn S. Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics for large-scale biomarker discovery in complex samples. *J Sep Sci*. 2007;30(14):2198-203.
38. Wallace A, Kenney B. Label-free quantitation: time-resolved accurate mass LC-MS for functional proteomics and biomarker discovery. *Nat Methods*. 2006:17-9.
39. Keshamouni VG, Jagtap P, Michailidis G, Strahler JR, Kuick R, Reka AK, et al. Temporal Quantitative Proteomics by iTRAQ 2D-LC-MS/MS and Corresponding mRNA Expression Analysis Identify Post-Transcriptional Modulation of Actin-Cytoskeleton Regulators During TGF-beta-induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(1):35-47.
40. Wang J, Xu XJ, Yu YL, Liu YK, Yang PY. Establishment of offline 2D-LC-MS system and its application to human liver proteomics. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*. 2004;25(12):2247-9.
41. Mitulovic G, Jakob T, Van Ling R, Swart R, Chervet JR. Comprehensive 2D nano LC-MS for human tissue proteomics. *Lc Gc Europe*. 2003;16(12a):62-4.
42. Kolker E, Higdon R, Hogan JM. Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. *Trends in Microbiology*. 2006;14(5):229-35.
43. McQueen P, Krokhn O. Optimal selection of 2D reversed-phase-reversed-phase HPLC separation techniques in bottom-up proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9(2):125-8.
44. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR, 3rd. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev*. 2013;113(4):2343-94.

45. Pagliuca FW, Collins MO, Lichawska A, Zegerman P, Choudhary JS, Pines J. Quantitative Proteomics Reveals the Basis for the Biochemical Specificity of the Cell-Cycle Machinery. *Molecular Cell*. 2011;43(3):406-17.
46. Cell cycle proteomics using quantitative mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005;4(8):S432-S.
47. Porter IM, Khoudoli GA, Andersen JS, Blow JJ, Swedlow JR. Cell cycle dependent chromatin proteomics: Identification and preliminary characterisation of novel chromosome binding proteins. *Molecular Biology of the Cell*. 2004;15:262a-a.
48. Soni S, Raaijmakers AJA, Raaijmakers LM, Damen JMA, van Stuijvenberg L, Vos MA, et al. A Proteomics Approach to Identify New Putative Cardiac Intercalated Disk Proteins. *Plos One*. 2016;11(5).
49. Thierolf M, Hagmann ML, Pfeffer M, Berntenis N, Wild N, Roessler M, et al. Towards a comprehensive proteome of normal and malignant human colon tissue by 2-D-LC-ESI-MS and 2-DE proteomics and identification of S100A12 as potential cancer biomarker. *Proteomics Clinical Applications*. 2008;2(1):11-22.
50. Cole LM, Bluff JE, Carolan VA, Paley MN, Tozer GM, Clench MR. MALDI-MSI and label-free LC-ESI-MS/MS shotgun proteomics to investigate protein induction in a murine fibrosarcoma model following treatment with a vascular disrupting agent. *Proteomics*. 2014;14(7-8):890-903.
51. Zhang H, Shen W, Rempel D, Monsey J, Vidavsky I, Gross ML, et al. Carboxyl-Group Footprinting Maps the Dimerization Interface and Phosphorylation-induced Conformational Changes of a Membrane-associated Tyrosine Kinase. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011;10(6).
52. Zhukov I, Ejchart A. NMR spectroscopy in structural proteomics. NMR-based protein structure determination. *Polimery*. 2003;48(1):28-34.
53. Yee A, Chang XQ, Pineda-Lucena A, Wu B, Semesi A, Le B, et al. An NMR approach to structural proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(4):1825-30.
54. Leitner A, Walzthoeni T, Herzog F, Reischl R, Aebersold R. Applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in structural proteomics: Chemical cross-linking as a case study. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. 2012;244.
55. Serpa JJ, Parker CE, Petrotchenko EV, Han J, Pan JX, Borchers CH. Mass spectrometry-based structural proteomics. *European Journal of Mass Spectrometry*. 2012;18(2):251-67.
56. Messana I, Cabras T, Pisano E, Sanna MT, Olianias A, Fanos V, et al. Modifications of the acidic soluble salivary proteome in human babies from the birth up to the age of 48 months investigated by a top-down HPLC-ESI-MS platform. *Febs Journal*. 2013;280:486-.

57. Lanucara F, Eyers CE. Top-down mass spectrometry for the analysis of combinatorial post-translational modifications. *Mass Spectrometry Reviews*. 2013;32(1):27-42.
58. Periyasamy S, Gray A, Kille P. The bottom-up approach to defining life: deciphering the functional organization of biological cells via multi-objective representation of biological complexity from molecules to cells. *Frontiers in Physiology*. 2013;4.
59. Hanson SJ, Hanson C, Halchenko Y, Matsuka T, Zaimi A. Bottom-up and top-down brain functional connectivity underlying comprehension of everyday visual action. *Brain Structure & Function*. 2007;212(3-4):231-44.
60. Jungblut PR, Schiele F, Zimny-Arndt U, Ackermann R, Schmid M, Lange S, et al. *Helicobacter pylori* proteomics by 2-DE/MS, 1-DE-LC/MS and functional data mining. *Proteomics*. 2010;10(2):182-93.
61. Geng H, Naylor PH, Dosesco J, Skunca M, Majumdar AP, Moshier JA. TGFalpha is required for full expression of the transformed growth phenotype of NIH 3T3 cells overexpressing ornithine decarboxylase. *Carcinogenesis*. 2000;21(4):567-72.
62. Zhang R, Sioma CS, Wang S, Regnier FE. Fractionation of isotopically labeled peptides in quantitative proteomics. *Anal Chem*. 2001;73(21):5142-9.
63. Granvogl B, Ploscher M, Eichacker LA. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389(4):991-1002.
64. Smejkal GB. Proteomics sample preparation, preservation, and fractionation. *Int J Proteomics*. 2012;2012:701230.
65. Ngoka LCM. Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Science*. 2008;6.
66. Moore SM, Hess SM, Jorgenson JW. Extraction, Enrichment, Solubilization, and Digestion Techniques for Membrane Proteomics. *J Proteome Res*. 2016;15(4):1243-52.
67. Dhabaria A, Cifani P, Reed C, Steen H, Kentsis A. A High-Efficiency Cellular Extraction System for Biological Proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(8):3403-8.
68. Ling X, Guo J, Zheng C, Ye C, Lu Y, Pan X, et al. Simple, effective protein extraction method and proteomics analysis from polyunsaturated fatty acids-producing micro-organisms. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2015;38(12):2331-41.
69. Glatter T, Ahrne E, Schmidt A. Correction to "Comparison of Different Sample Preparation Protocols Reveals Lysis Buffer-Specific Extraction Biases in Gram-Negative Bacteria and Human Cells". *J Proteome Res*. 2016;15(2):679.

70. Bodzon-Kulakowska A, Bierczynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, et al. Methods for samples preparation in proteomic research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;849(1-2):1-31.
71. Wisniewski JR, Zielinska DF, Mann M. Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method. *Analytical Biochemistry.* 2011;410(2):307-9.
72. Glatz Z. Affinity precipitation of proteins. *Chem Listy.* 2000;94(6):389-96.
73. Hegg PO. Precipitation of Egg-White Proteins Below Their Isoelectric Points by Sodium Dodecyl-Sulfate and Temperature. *Biochimica Et Biophysica Acta.* 1979;579(1):73-87.
74. Fan JP, Huang B, Wang XP, Zhang XJC. Thermal precipitation fluorescence assay for protein stability screening. *Journal of Structural Biology.* 2011;175(3):465-8.
75. Hill AR, Irvine DM. Effects of Ph on the Thermal Precipitation of Proteins in Acid and Sweet Cheese Wheys. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal-Journal De L Institut Canadien De Science Et Technologie Alimentaires.* 1988;21(4):386-9.
76. Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A.* 2004;1023(2):317-20.
77. Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis.* 2000;21(6):1054-70.
78. Molloy MP, Herbert BR, Williams KL, Gooley AA. Extraction of Escherichia coli proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 1999;20(4-5):701-4.
79. Santoni V, Rabilloud T, Doumas P, Rouquie D, Mansion M, Kieffer S, et al. Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis.* 1999;20(4-5):705-11.
80. Burgess RR. Protein Precipitation Techniques. *Guide to Protein Purification, Second Edition.* 2009;463:331-42.
81. Robinson PJ, Liu JP, Chen W, Wenzel T. Activation of Protein-Kinase-C In vitro and in Intact-Cells or Synaptosomes Determined by Acetic-Acid Extraction of Marcks. *Analytical Biochemistry.* 1993;210(1):172-8.
82. Gundry RL, White MY, Murray CI, Kane LA, Fu Q, Stanley BA, et al. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr Protoc Mol Biol.* 2009;Chapter 10:Unit10 25.
83. Scheerlinck E, Dhaenens M, Van Soom A, Peelman L, De Sutter P, Van Steendam K, et al. Minimizing technical variation during sample preparation prior to label-free quantitative mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2015;490:14-9.

84. Bai F, Liu S, Witzmann FA. A "de-streaking" method for two-dimensional electrophoresis using the reducing agent tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride and alkylating agent vinylpyridine. *Proteomics*. 2005;5(8):2043-7.
85. Herbert B, Galvani M, Hamdan M, Olivieri E, MacCarthy J, Pedersen S, et al. Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how? *Electrophoresis*. 2001;22(10):2046-57.
86. Olsen JV, Ong SE, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(6):608-14.
87. Tsiatsiani L, Heck AJ. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J*. 2015;282(14):2612-26.
88. Chen GY, Chen SH, Yu CH, Huang SY, Tsai ML. Trypsin digest coupled with two-dimensional shotgun proteomics reveals the involvement of multiple signaling pathways in functional remodeling of late-gestation uteri in rats. *Proteomics*. 2008;8(15):3173-84.
89. Giansanti P, Tsiatsiani L, Low TY, Heck AJ. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nat Protoc*. 2016;11(5):993-1006.
90. Cheison SC, Leeb E, Toro-Sierra J, Kulozik U. Influence of hydrolysis temperature and pH on the selective hydrolysis of whey proteins by trypsin and potential recovery of native alpha-lactalbumin. *International Dairy Journal*. 2011;21(3):166-71.
91. Novakova L, Matysova L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*. 2006;68(3):908-18.
92. Krokhin OV. Sequence-specific retention calculator. Algorithm for peptide retention prediction in ion-pair RP-HPLC: application to 300- and 100-Å pore size C18 sorbents. *Anal Chem*. 2006;78(22):7785-95.
93. Saz JM, Marina ML. Application of micro- and nano-HPLC to the determination and characterization of bioactive and biomarker peptides. *J Sep Sci*. 2008;31(3):446-58.
94. Noga M, Sucharski F, Suder P, Silberring J. A practical guide to nano-LC troubleshooting. *J Sep Sci*. 2007;30(14):2179-89.
95. Percy AJ, Chambers AG, Smith DS, Borchers CH. Standardized protocols for quality control of MRM-based plasma proteomic workflows. *J Proteome Res*. 2013;12(1):222-33.
96. Gonzalez Fernandez-Nino SM, Smith-Moritz AM, Chan LJ, Adams PD, Heazlewood JL, Petzold CJ. Standard flow liquid chromatography for shotgun proteomics in bioenergy research. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:44.
97. Righetti PG, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E. Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis*. 2005;26(2):297-319.

98. Washburn MP, Wolters D, Yates JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology*. 2001;19(3):242-7.
99. Wagner K, Miliotis T, Marko-Varga G, Bischoff R, Unger KK. An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. *Anal Chem*. 2002;74(4):809-20.
100. Xu P, Duong DM, Peng J. Systematical optimization of reverse-phase chromatography for shotgun proteomics. *J Proteome Res*. 2009;8(8):3944-50.
101. Chait EM. Ionization Sources in Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1972;44(3):A77-&.
102. Busch KL. Desorption Ionization Mass-Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 1995;30(2):233-40.
103. Karas M, Ingendoh A, Bahr U, Hillenkamp F. Ultraviolet-Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry of Femtomolar Amounts of Large Proteins. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*. 1989;18(9):841-3.
104. Banoub J, Thibault P, Mansour A, Cohen A, Heeley DH, Jackman D. Characterisation of the intact rainbow trout vitellogenin protein and analysis of its derived tryptic and cyanogen bromide peptides by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight-mass spectrometry and electrospray ionisation quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*. 2003;9(5):509-24.
105. Ibanez C, Simo C, Garcia-Canas V, Cifuentes A, Castro-Puyana M. Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry in Foodomics: a review. *Anal Chim Acta*. 2013;802:1-13.
106. Seyfarth F, Ziemer M, Sayer HG, Burmester A, Erhard M, Welker M, et al. The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. *Exp Dermatol*. 2008;17(11):965-71.
107. Gut IG. DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat*. 2004;23(5):437-41.
108. Ross PL, Davis PA, Belgrader P. Analysis of DNA fragments from conventional and microfabricated PCR devices using delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*. 1998;70(10):2067-73.
109. Fuchs B, Suss R, Schiller J. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog Lipid Res*. 2011;50(1):132.
110. Schiller J, Suss R, Arnhold J, Fuchs B, Lessig J, Muller M, et al. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog Lipid Res*. 2004;43(5):449-88.
111. Schiller J, Zschornig O, Petkovic M, Muller M, Arnhold J, Arnold K. Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and (31)P-NMR. *J Lipid Res*. 2001;42(9):1501-8.

112. Geyer H, Schmitt S, Wuhrer M, Geyer R. Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS. *Anal Chem.* 1999;71(2):476-82.
113. Karas M, Gluckmann M, Schafer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom.* 2000;35(1):1-12.
114. Karas M. Matrix-assisted laser desorption ionization MS: a progress report. *Biochem Soc Trans.* 1996;24(3):897-900.
115. Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Analytical Chemistry.* 1985;57(3):675-9.
116. Montero O. Lipid profiling of *Synechococcus* sp. PCC7002 and two related strains by HPLC coupled to ESI-(ion trap)-MS/MS. *Z Naturforsch C.* 2011;66(3-4):149-58.
117. Schneider R, Brugger B, Sandhoff R, Zellnig G, Leber A, Lampl M, et al. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 1999;146(4):741-54.
118. Pruvost A, Theodoro F, Agrofoglio L, Negro E, Benech H. Specificity enhancement with LC-positive ESI-MS/MS for the measurement of nucleotides: application to the quantitative determination of carbovir triphosphate, lamivudine triphosphate and tenofovir diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells. *J Mass Spectrom.* 2008;43(2):224-33.
119. Bezy V, Chaimbault P, Morin P, Unger SE, Bernard MC, Agrofoglio LA. Analysis and validation of the phosphorylated metabolites of two anti-human immunodeficiency virus nucleotides (stavudine and didanosine) by pressure-assisted CE-ESI-MS/MS in cell extracts: sensitivity enhancement by the use of perfluorinated acids and alcohols as coaxial sheath-liquid make-up constituents. *Electrophoresis.* 2006;27(12):2464-76.
120. Nordstrom A, Tarkowski P, Tarkowska D, Dolezal K, Astot C, Sandberg G, et al. Derivatization for LC-electrospray ionization-MS: a tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Anal Chem.* 2004;76(10):2869-77.
121. Mann M. Origins of mass spectrometry-based proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(11):678.
122. Di Girolamo F, Lante I, Muraca M, Putignani L. The Role of Mass Spectrometry in the "Omics" Era. *Curr Org Chem.* 2013;17(23):2891-905.
123. Valdes A, Artemenko KA, Bergquist J, Garcia-Canas V, Cifuentes A. Comprehensive Proteomic Study of the Antiproliferative Activity of a Polyphenol-Enriched Rosemary Extract on Colon Cancer Cells Using Nanoliquid Chromatography-Orbitrap MS/MS. *Journal of Proteome Research.* 2016;15(6):1971-85.

124. Jia JT, Chen Y, Jiang YH, Li ZY, Zhao LQ, Zhang J, et al. Proteomic analysis of *Vibrio metschnikovii* under cold stress using a quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Research in Microbiology*. 2015;166(8):618-25.
125. Papachristou EK, Roumeliotis TI, Chrysagi A, Trigoni C, Charvalos E, Townsend PA, et al. The Shotgun Proteomic Study of the Human ThinPrep Cervical Smear Using iTRAQ Mass-Tagging and 2D LC-FT-Orbitrap-MS: The Detection of the Human Papillomavirus at the Protein Level. *Journal of Proteome Research*. 2013;12(5):2078-89.
126. Sun LL, Zhu GJ, Dovichi NJ. Comparison of the LTQ-Orbitrap Velos and the Q-Exactive for proteomic analysis of 1-1000 ng RAW 264.7 cell lysate digests. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2013;27(1):157-62.
127. Gallien S, Duriez E, Crone C, Kellmann M, Moehring T, Domon B. Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(12):1709-23.
128. Bielinska I, Marczak L, Jakubowski H. Analysis of liver proteome in cystathionine beta-synthase deficient mice using 2D IEF/SDS-PAGE gel electrophoresis, MALDI-TOF mass spectrometry, and label-free based relative quantitative proteomics. *Protein Sci*. 2015;24:254-5.
129. van Belkum A, Chatellier S, Girard V, Pincus D, Deol P, Dunne WM. Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. *Expert Review of Proteomics*. 2015;12(6):595-605.
130. Zhang AH, Sun H, Wu GL, Sun WJ, Yuan Y, Wang XJ. Proteomics Analysis of Hepatoprotective Effects for Scoparone Using MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry with Bioinformatics. *Omics-a Journal of Integrative Biology*. 2013;17(4):224-9.
131. Kamal AHM, Kim KH, Shin DH, Seo HS, Shin KH, Park CS, et al. Proteomics profile of pre-harvest sprouting wheat by using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Plant Omics*. 2009;2(3):110-9.
132. Quattieri A, Urso E, Le Pera M, Scornaienchi M, Quattrone A, Di Donna L, et al. Proteomics of bovine myelin sheath: Characterization of a truncated form of P0 by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2006;17(2):117-23.
133. Mak SYC, Tsim KWK, Wan DCC. A proteomics analysis by 2D-PAGE/MALDI-TOF-MS/MS on SH-SY5Y cells after chronic lithium and kenpaullone treatment. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2004;3(10):S181-S.
134. Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003;376(7):952-65.
135. Huang HH. Application of MALDI-QTOF in proteomics and glycomics. *Australian Journal of Chemistry*. 2003;56(1):65-.
136. Nanni P, Mezzanotte L, Roda G, Caponi A, Levander F, James P, et al. Differential proteomic analysis of HT29 Cl.16E and intestinal epithelial cells

- by LC ESI/QTOF mass spectrometry. *Journal of Proteomics*. 2009;72(5):865-73.
137. Matysiak J, Hajduk J, Mayer F, Hebel R, Kokot ZJ. Hyphenated LC-MALDI-ToF/ToF and LC-ESI-QToF approach in proteomic characterization of honeybee venom. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016;121:69-76.
 138. Beck S, Michalski A, Raether O, Lubeck M, Kaspar S, Goedecke N, et al. The Impact II, a Very High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Instrument (QTOF) for Deep Shotgun Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015;14(7):2014-29.
 139. Heller M, Mattou H, Menzel C, Yao XD. Trypsin catalyzed O-16-to-O-18 exchange for comparative proteomics: Tandem mass spectrometry comparison using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-Ion trap mass spectrometers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003;14(7):704-18.
 140. Ji CJ, Lo A, Marcus S, Li L. Effect of 2MEGA labeling on membrane proteome analysis using LC-ESI QTOF MS. *Journal of Proteome Research*. 2006;5(10):2567-76.
 141. Sharma S, Ray S, Moiyadi A, Sridhar E, Srivastava S. Quantitative Proteomic Analysis of Meningiomas for the Identification of Surrogate Protein Markers. *Sci Rep-Uk*. 2014;4.
 142. Mann M, Kelleher NL. Precision proteomics: The case for high resolution and high mass accuracy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(47):18132-8.
 143. Nawrot R, Barylski J, Lippmann R, Altschmied L, Mock HP. Combination of transcriptomic and proteomic approaches helps to unravel the protein composition of *Chelidonium majus* L. milky sap. *Planta*. 2016;244(5):1055-64.
 144. Whitelaw BL, Strugnell JM, Faou P, da Fonseca RR, Hall NE, Norman M, et al. Combined Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Posterior Salivary Gland from the Southern Blue-Ringed Octopus and the Southern Sand Octopus. *Journal of Proteome Research*. 2016;15(9):3284-97.
 145. Li YF, Zou Y, Xia YT, Bai J, Wang XW, Jiang P. Proteomic and Transcriptomic Analyses of Swine Pathogen *Erysipelothrix rhusiopathiae* Reveal Virulence Repertoire. *Plos One*. 2016;11(8).
 146. Zhang HJ, Cao J, Li L, Liu YB, Zhao H, Li N, et al. Identification of urine protein biomarkers with the potential for early detection of lung cancer. *Scientific Reports*. 2015;5.
 147. Baldwin MA. Protein identification by mass spectrometry - Issues to be considered. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2004;3(1):1-9.
 148. Mikkat S, Fulda S, Hagemann M. A 2D gel electrophoresis-based snapshot of the phosphoproteome in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Microbiology-Sgm*. 2014;160:296-306.

149. Alty LT, LaRiviere FJ. Peptide Mass Fingerprinting of Egg White Proteins. *Journal of Chemical Education*. 2016;93(4):772-7.
150. Hudson G, Biemann K. Mass-Spectrometric Sequencing of Proteins - Structure of Subunit I of Monellin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1976;71(1):212-20.
151. Frank A, Pevzner P. PepNovo: De novo peptide sequencing via probabilistic network modeling. *Analytical Chemistry*. 2005;77(4):964-73.
152. Altelaar AFM, Navarro D, Boekhorst J, van Breukelen B, Snel B, Mohammed S, et al. Database independent proteomics analysis of the ostrich and human proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(2):407-12.
153. Thiede B, Hohenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, et al. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005;35(3):237-47.
154. Nesvizhskii AI, Aebersold R. Analysis, statistical validation and dissemination of large-scale proteomics datasets generated by tandem MS. *Drug Discovery Today*. 2004;9(4):173-81.
155. Chalkley RJ, Hansen KC, Baldwin MA. Bioinformatic methods to exploit mass spectrometric data for proteomic applications. *Biological Mass Spectrometry*. 2005;402:289-312.
156. Colinge J, Bennett KL. Introduction to computational proteomics. *Plos Computational Biology*. 2007;3(7):1151-60.
157. Frank AM, Bandeira N, Shen Z, Tanner S, Briggs SP, Smith RD, et al. Clustering millions of tandem mass spectra. *Journal of Proteome Research*. 2008;7(1):113-22.
158. Rinner O, Mueller LN, Hubalek M, Muller M, Gstaiger M, Aebersold R. An integrated mass spectrometric and computational framework for the analysis of protein interaction networks. *Nature Biotechnology*. 2007;25(3):345-52.
159. Eng JK, Searle BC, Clauser KR, Tabb DL. A face in the crowd: recognizing peptides through database search. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(11):R111009522.
160. Zhang Z, Sun SW, Zhu XP, Chang SH, Liu XF, Yu CG, et al. A novel scoring schema for peptide identification by searching protein sequence databases using tandem mass spectrometry data. *Bmc Bioinformatics*. 2006;7.
161. Kersey PJ, Duarte J, Williams A, Karavidopoulou Y, Birney E, Apweiler R. The International Protein Index: An integrated database for proteomics experiments. *Proteomics*. 2004;4(7):1985-8.
162. Apweiler R, Martin MJ, O'Donovan C, Magrane M, Alam-Faruque Y, Antunes R, et al. The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Research*. 2010;38:D142-D8.
163. Cottrell JS. Protein identification using MS/MS data. *Journal of Proteomics*. 2011;74(10):1842-51.

164. Gupta N, Pevzner PA. False Discovery Rates of Protein Identifications: A Strike against the Two-Peptide Rule. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(9):4173-81.
165. Shen YF, Tolic N, Hixson KK, Purvine SO, Pasa-Tolic L, Qian WJ, et al. Proteome-wide identification of proteins and their modifications with decreased ambiguities and improved false discovery rates using unique sequence tags. *Analytical Chemistry*. 2008;80(6):1871-82.
166. Tu CJ, Sheng QH, Li J, Ma DJ, Shen XM, Wang X, et al. Optimization of Search Engines and Postprocessing Approaches to Maximize Peptide and Protein Identification for High-Resolution Mass Data. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(11):4662-73.
167. Choi H, Nesvizhskii AI. False discovery rates and related statistical concepts in mass spectrometry-based proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2008;7(1):47-50.
168. Higdon R, Kolker E. A predictive model for identifying proteins by a single peptide match. *Bioinformatics*. 2007;23(3):277-80.
169. Palmblad M, Bindschedler LV, Cramer R. Quantitative proteomics using uniform N-15-labeling, MASCOT, and the trans-proteomic pipeline. *Proteomics*. 2007;7(19):3462-9.
170. Brosch M, Yu L, Hubbard T, Choudhary J. Accurate and Sensitive Peptide Identification with Mascot Percolator. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(6):3176-81.
171. Geer LY, Markey SP, Kowalak JA, Wagner L, Xu M, Maynard DM, et al. Open mass spectrometry search algorithm. *Journal of Proteome Research*. 2004;3(5):958-64.
172. Lewis S, Csordas A, Killcoyne S, Hermjakob H, Hoopmann MR, Moritz RL, et al. Hydra: a scalable proteomic search engine which utilizes the Hadoop distributed computing framework. *Bmc Bioinformatics*. 2012;13.
173. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *Journal of Proteome Research*. 2011;10(4):1794-805.
174. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res*. 2011;10(4):1794-805.
175. Dowsey AW, Morris JS, Gutstein HB, Yang GZ. Informatics and statistics for analyzing 2-d gel electrophoresis images. *Methods Mol Biol*. 2010;604:239-55.
176. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389(4):1017-31.
177. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple

- and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2002;1(5):376-86.
178. Kuhn E, Wu J, Karl J, Liao H, Zolg W, Guild B. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and C-13-labeled peptide standards. *Proteomics*. 2004;4(4):1175-86.
 179. Sadaghiani AM, Verhelst SHL, Bogoyo M. Tagging and detection strategies for activity-based proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2007;11(1):20-8.
 180. Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(12):6940-5.
 181. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*. 1999;17(10):994-9.
 182. Luczak M, Formanowicz D, Marczak L, Suszynska-Zajczyk J, Pawliczak E, Wanic-Kossowska M, et al. iTRAQ-based proteomic analysis of plasma reveals abnormalities in lipid metabolism proteins in chronic kidney disease-related atherosclerosis. *Scientific Reports*. 2016;6.
 183. Arike L, Peil L. Spectral counting label-free proteomics. *Methods Mol Biol*. 2014;1156:213-22.
 184. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007;389(4):1017-31.
 185. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR, et al. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005;4(10):1487-502.
 186. Chelius D, Bondarenko PV. Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*. 2002;1(4):317-23.
 187. Bondarenko PV, Chelius D, Shaler TA. Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2002;74(18):4741-9.
 188. Wiener MC, Sachs JR, Deyanova EG, Yates NA. Differential mass spectrometry: A label-free LC-MS method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures. *Analytical Chemistry*. 2004;76(20):6085-96.
 189. Bylund D, Danielsson R, Malmquist G, Markides KE. Chromatographic alignment by warping and dynamic programming as a pre-processing tool for

- PARAFAC modelling of liquid chromatography-mass spectrometry data. *Journal of Chromatography A*. 2002;961(2):237-44.
190. Lengqvist J, Andrade J, Yang Y, Alvelius G, Lewensohn R, Lehtio J. Robustness and accuracy of high speed LC-MS separations for global peptide quantitation and biomarker discovery. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009;877(13):1306-16.
 191. Huang SK, Darfler MM, Nicholl MB, You JS, Bemis KG, Tegeler TJ, et al. LC/MS-Based Quantitative Proteomic Analysis of Paraffin-Embedded Archival Melanomas Reveals Potential Proteomic Biomarkers Associated with Metastasis. *Plos One*. 2009;4(2).
 192. Manor A, Richmond T, Sutton J, Gerszten R, Liu E, Shi X, et al. The biomarker sieve; a computational framework for label-free MS-based proteomic biomarker discovery. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005;4(8):S27-S.
 193. Beretov J, Wasinger VC, Millar EKA, Schwartz P, Graham PH, Li Y. Proteomic Analysis of Urine to Identify Breast Cancer Biomarker Candidates Using a Label-Free LC-MS/MS Approach. *Plos One*. 2015;10(11).
 194. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*. 2008;26(12):1367-72.
 195. Chen SS, Luo Y, Ding GD, Xu FS. Comparative analysis of Brassica napus plasma membrane proteins under phosphorus deficiency using label-free and MaxQuant-based proteomics approaches. *Journal of Proteomics*. 2016;133:144-52.
 196. Urfer W, Grzegorzczak M, Jung K. Statistics for proteomics: a review of tools for analyzing experimental data. *Proteomics*. 2006;6 Suppl 2:48-55.
 197. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016;13(9):731-40.
 198. Schiller HB, Fernandez IE, Burgstaller G, Schaab C, Scheltema RA, Schwarzmayer T, et al. Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair. *Mol Syst Biol*. 2015;11(7):819.
 199. Pernikarova V, Sedlacek V, Potesil D, Prochazkova I, Zdrahal Z, Bouchal P, et al. Proteome-wide dataset generated by iTRAQ-3DLCMS/MS technique for studying the role of FerB protein in oxidative stress in *Paracoccus denitrificans*. *Data Brief*. 2015;4:390-4.
 200. Schmidt A, Forne I, Imhof A. Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC Syst Biol*. 2014;8 Suppl 2:S3.
 201. Carvalho PC, Fischer JS, Chen EI, Domont GB, Carvalho MG, Degraeve WM, et al. GO Explorer: A gene-ontology tool to aid in the interpretation of shotgun proteomics data. *Proteome Sci*. 2009;7:6.

202. Wu X, Hasan MA, Chen JY. Pathway and network analysis in proteomics. *J Theor Biol.* 2014;362:44-52.
203. Cho WCS. Proteomics in translational cancer research: biomarker discovery for clinical applications. *Expert Review of Proteomics.* 2014;11(2):131-3.
204. Kahi CJ, Rex DK, Imperiale TF. Screening, surveillance, and primary prevention for colorectal cancer: A review of the recent literature. *Gastroenterology.* 2008;135(2):380-99.
205. Nambiar PR, Gupta RR, Misra V. An "Omics" based survey of human colon cancer. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2010;693(1-2):3-18.
206. Sallam RM. Proteomics in Cancer Biomarkers Discovery: Challenges and Applications. *Disease Markers.* 2015:1-12.
207. Hanash S, Taguchi A. Application of Proteomics to Cancer Early Detection. *Cancer Journal.* 2011;17(6):423-8.
208. Michener CM, Ardekani AM, Petricoin EF, Liotta LA, Kohn EC. Genomics and proteomics: application of novel technology to early detection and prevention of cancer. *Cancer Detection and Prevention.* 2002;26(4):249-55.
209. Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2003;3(4):267-75.
210. Geiger T, Wehner A, Schaab C, Cox J, Mann M. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(3):M111 014050.
211. Veenstra TD, Conrads TP, Hood BL, Avellino AM, Ellenbogen RG, Morrison RS. Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(4):409-18.
212. Chen CL, Chung T, Wu CC, Ng KF, Yu JS, Tsai CH, et al. Comparative Tissue Proteomics of Microdissected Specimens Reveals Novel Candidate Biomarkers of Bladder Cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2015;14(9):2466-78.
213. Pan CP, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative Proteomic Phenotyping of Cell Lines and Primary Cells to Assess Preservation of Cell Type-specific Functions. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2009;8(3):443-50.
214. Brown KJ, Formolo CA, Seol H, Marathi RL, Duguez S, An E, et al. Advances in the proteomic investigation of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics.* 2012;9(3):337-45.
215. Kampa M, Nifli AP, Notas G, Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2007;159:79-113.
216. Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis.* 1998;19(4):611-6.
217. Cifuentes A. Foodomics: Still a long way to go ... and we keep going! *Electrophoresis.* 2016;37(13):1747-.

218. Valdes A, Garcia-Canas V, Kocak E, Simo C, Cifuentes A. Foodomics study on the effects of extracellular production of hydrogen peroxide by rosemary polyphenols on the anti-proliferative activity of rosemary polyphenols against HT-29 cells. *Electrophoresis*. 2016;37(13):1795-804.
219. Capozzi F, Bordoni A. Foodomics: a new comprehensive approach to food and nutrition. *Genes and Nutrition*. 2013;8(1):1-4.
220. Wang JG, Zhang JB, Zhang CJ, Wong YK, Lim TK, Hua ZC, et al. In situ Proteomic Profiling of Curcumin Targets in HCT116 Colon Cancer Cell Line. *Scientific Reports*. 2016;6.
221. Vanamala J, Radhakrishnan S, Reddivari L, Bhat VB, Ptitsyn A. Resveratrol suppresses human colon cancer cell proliferation and induces apoptosis via targeting the pentose phosphate and the talin-FAK signaling pathways-A proteomic approach. *Proteome Science*. 2011;9.
222. Mouat MF, Kolli K, Orlando R, Hargrove JL, Grider A. The effects of quercetin on SW480 human colon carcinoma cells: a proteomic study. *Nutrition Journal*. 2005;4.
223. Scarano A, Murmura G, Di Cerbo A, Palmieri B, Pinchi V, Mavriqi L, et al. Anti-hemorrhagic agents in oral and dental practice: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(4):847-54.
224. Pereira J, Phan T. Management of bleeding in patients with advanced cancer. *Oncologist*. 2004;9(5):561-70.
225. Dutcher JP. Hematologic abnormalities in patients with nonhematologic malignancies. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1987;1(2):281-99.
226. Schmitz C, Sodian R. Use of a plant-based polysaccharide hemostat for the treatment of sternal bleeding after median sternotomy. *J Cardiothorac Surg*. 2015;10:59.
227. GUIDELINE IHT. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). 2005.
228. Jenkins R, Duggan JX, Aubry AF, Zeng J, Lee JW, Cojocar L, et al. Recommendations for validation of LC-MS/MS bioanalytical methods for protein biotherapeutics. *AAPS J*. 2015;17(1):1-16.
229. de Meent MHMV, de Jong GJ. Improvement of the liquid-chromatographic analysis of protein tryptic digests by the use of long-capillary monolithic columns with UV and MS detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007;388(1):195-200.
230. Pellitteri-Hahn MC, Warren MC, Didier DN, Winkler EL, Mirza SP, Greene AS, et al. Improved mass spectrometric proteomic profiling of the secretome of rat vascular endothelial cells. *Journal of Proteome Research*. 2006;5(10):2861-4.
231. Zauber H, Schuler V, Schulze W. Systematic evaluation of reference protein normalization in proteomic experiments. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4.

232. Sinnaeve BA, Van Bocxlaer JF. Evaluation of nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a column switching setup for the absolute quantification of peptides in the picomolar range. *J Chromatogr A*. 2004;1058(1-2):113-9.
233. Lai X, Wang L, Witzmann FA. Issues and applications in label-free quantitative mass spectrometry. *Int J Proteomics*. 2013;2013:756039.
234. Zauber H, Schuler V, Schulze W. Systematic evaluation of reference protein normalization in proteomic experiments. *Front Plant Sci*. 2013;4:25.
235. Sandberg A, Branca RM, Lehtio J, Forshed J. Quantitative accuracy in mass spectrometry based proteomics of complex samples: the impact of labeling and precursor interference. *J Proteomics*. 2014;96:133-44.
236. Lai KP, Chen J, He M, Ching AK, Lau C, Lai PB, et al. Overexpression of ZFX confers self-renewal and chemoresistance properties in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2014;135(8):1790-9.
237. Yang L, Hamilton SR, Sood A, Kuwai T, Ellis L, Sanguino A, et al. The previously undescribed ZKSCAN3 (ZNF306) is a novel "driver" of colorectal cancer progression. *Cancer Res*. 2008;68(11):4321-30.
238. Jen J, Wang YC. Zinc finger proteins in cancer progression. *J Biomed Sci*. 2016;23(1):53.
239. Ilmer M, Boiles AR, Regel I, Yokoi K, Michalski CW, Wistuba, II, et al. RSPO2 Enhances Canonical Wnt Signaling to Confer Stemness-Associated Traits to Susceptible Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res*. 2015;75(9):1883-96.
240. Zhang S, Han X, Wei B, Fang J, Wei H. RSPO2 enriches LGR5(+) spheroid colon cancer stem cells and promotes its metastasis by epithelial-mesenchymal transition. *Am J Transl Res*. 2016;8(2):354-64.
241. Wu C, Qiu S, Lu L, Zou J, Li WF, Wang O, et al. RSPO2-LGR5 signaling has tumour-suppressive activity in colorectal cancer. *Nat Commun*. 2014;5:3149.
242. Suren D, Yildirim M, Demirpence O, Kaya V, Alikanoglu AS, Bulbuller N, et al. The role of high mobility group box 1 (HMGB1) in colorectal cancer. *Med Sci Monit*. 2014;20:530-7.
243. Lee H, Song M, Shin N, Shin CH, Min BS, Kim HS, et al. Diagnostic significance of serum HMGB1 in colorectal carcinomas. *PLoS One*. 2012;7(4):e34318.
244. Zhang J, Yan B, Spath SS, Qun H, Cornelius S, Guan D, et al. Integrated transcriptional profiling and genomic analyses reveal RPN2 and HMGB1 as promising biomarkers in colorectal cancer. *Cell Biosci*. 2015;5:53.
245. Zheng H, Chen JN, Yu X, Jiang P, Yuan L, Shen HS, et al. HMGB1 Enhances Drug Resistance and Promotes In Vivo Tumor Growth of Lung Cancer Cells. *DNA Cell Biol*. 2016;35(10):622-7.

246. Livesey KM, Kang R, Vernon P, Buchser W, Loughran P, Watkins SC, et al. p53/HMGB1 complexes regulate autophagy and apoptosis. *Cancer Res.* 2012;72(8):1996-2005.
247. Blanch A, Robinson F, Watson IR, Cheng LS, Irwin MS. Eukaryotic translation elongation factor 1-alpha 1 inhibits p53 and p73 dependent apoptosis and chemotherapy sensitivity. *PLoS One.* 2013;8(6):e66436.
248. Flores IL, Kawahara R, Miguel MC, Granato DC, Domingues RR, Macedo CC, et al. EEF1D modulates proliferation and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Clin Sci (Lond).* 2016;130(10):785-99.
249. Shen H, Huang JL, Pei HP, Zeng S, Tao YM, Shen LF, et al. Comparative proteomic study for profiling differentially expressed proteins between Chinese left- and right-sided colon cancers. *Cancer Science.* 2013;104(1):135-41.
250. Mimori K, Mori M, Inoue H, Ueo H, Mafune K, Akiyoshi T, et al. Elongation factor 1 gamma mRNA expression in oesophageal carcinoma. *Gut.* 1996;38(1):66-70.
251. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka Y, Tanaka F, Inoue H, et al. Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma. *British Journal of Cancer.* 2004;91(2):282-6.
252. Zhong XR, Li L, Wang M, Luo W, Tan QW, Xu F, et al. A proteomic approach to elucidate the multiple targets of selenium-induced cell-growth inhibition in human lung cancer. *Thoracic Cancer.* 2011;2(4):164-78.
253. Cano LQ, Lavery DN, Sin S, Spanjaard E, Brooke GN, Tilman JD, et al. The co-chaperone p23 promotes prostate cancer motility and metastasis. *Mol Oncol.* 2015;9(1):295-308.
254. Simpson NE, Lambert WM, Watkins R, Giashuddin S, Huang SJ, Oxelmark E, et al. High levels of Hsp90 cochaperone p23 promote tumor progression and poor prognosis in breast cancer by increasing lymph node metastases and drug resistance. *Cancer Res.* 2010;70(21):8446-56.
255. Patwardhan CA, Fauq A, Peterson LB, Miller C, Blagg BS, Chadli A. Gedunin inactivates the co-chaperone p23 protein causing cancer cell death by apoptosis. *J Biol Chem.* 2013;288(10):7313-25.
256. Chen J, Feng WJ, Jiang J, Deng YQ, Huen MSY. Ring Finger Protein RNF169 Antagonizes the Ubiquitin-dependent Signaling Cascade at Sites of DNA Damage. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287(33):27715-22.
257. Huang L, Wang HY, Li JD, Wang JH, Zhou Y, Luo RZ, et al. KPNA2 promotes cell proliferation and tumorigenicity in epithelial ovarian carcinoma through upregulation of c-Myc and downregulation of FOXO3a. *Cell Death & Disease.* 2013;4.
258. Zhang Y, Zhang M, Yu FD, Lu S, Sun HM, Tang HM, et al. Karyopherin alpha 2 is a novel prognostic marker and a potential therapeutic target for colon cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2015;34.

259. Claerhout S, Dutta B, Bossuyt W, Zhang F, Nguyen-Charles C, Dennison JB, et al. Abortive autophagy induces endoplasmic reticulum stress and cell death in cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(6):e39400.
260. Kobayashi H, Nishimura H, Matsumoto K, Yoshida M. Identification of the determinants of 2-deoxyglucose sensitivity in cancer cells by shRNA library screening. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;467(1):121-7.
261. Michelotti EF, Michelotti GA, Aronsohn AI, Levens D. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*. 1996;16(5):2350-60.
262. Guo YT, Zhao JM, Bi JT, Wu Q, Wang X, Lai QY. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a tissue biomarker for detection of early Hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Journal of Hematology & Oncology*. 2012;5.
263. Tang F, Li W, Chen Y, Wang D, Han J, Liu D. Downregulation of hnRNP K by RNAi inhibits growth of human lung carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2014;7(4):1073-7.
264. Carpenter B, McKay M, Dundas SR, Lawrie LC, Telfer C, Murray GI. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2006;95(7):921-7.
265. Clement PM, Johansson HE, Wolff EC, Park MH. Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells. *FEBS J*. 2006;273(6):1102-14.
266. Tunca B, Tezcan G, Cecener G, Egeli U, Zorluoglu A, Yilmazlar T, et al. Overexpression of CK20, MAP3K8 and EIF5A correlates with poor prognosis in early-onset colorectal cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(4):691-702.
267. Fujimura K, Wright T, Strnadel J, Kaushal S, Metildi C, Lowy AM, et al. A hypusine-eIF5A-PEAK1 switch regulates the pathogenesis of pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2014;74(22):6671-81.
268. Memin E, Hoque M, Jain MR, Heller DS, Li H, Cracchiolo B, et al. Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation. *Cancer Res*. 2014;74(2):552-62.
269. Balabanov S, Gontarewicz A, Ziegler P, Hartmann U, Kammer W, Copland M, et al. Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach. *Blood*. 2007;109(4):1701-11.
270. Hymowitz SG, Wertz IE. A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(5):332-41.
271. Cheng J, Fan YH, Xu X, Zhang H, Dou J, Tang Y, et al. A small-molecule inhibitor of UBE2N induces neuroblastoma cell death via activation of p53 and JNK pathways. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1079.

272. Wu XF, Zhang WZ, Font-Burgada J, Palmer T, Hamil AS, Biswas SK, et al. Ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 controls breast cancer metastasis through a TAK1-p38 MAP kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(38):13870-5.
273. Goh SH, Hong SH, Hong SH, Lee BC, Ju MH, Jeong JS, et al. eIF3m expression influences the regulation of tumorigenesis-related genes in human colon cancer. *Oncogene*. 2011;30(4):398-409.
274. Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*. 2000;16(3):202-8.
275. Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G, et al. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2003;30(1):23-8.
276. Wang H, Xi Q, Wu G. Fatty acid synthase regulates invasion and metastasis of colorectal cancer via Wnt signaling pathway. *Cancer Med*. 2016;5(7):1599-606.
277. Zaytseva YY, Harris JW, Mitov MI, Kim JT, Butterfield DA, Lee EY, et al. Increased expression of fatty acid synthase provides a survival advantage to colorectal cancer cells via upregulation of cellular respiration. *Oncotarget*. 2015;6(22):18891-904.
278. Long QQ, Yi YX, Qiu J, Xu CJ, Huang PL. Fatty acid synthase (FASN) levels in serum of colorectal cancer patients: correlation with clinical outcomes. *Tumour Biol*. 2014;35(4):3855-9.
279. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):763-77.
280. Zhang JS, Lei JP, Wei GQ, Chen H, Ma CY, Jiang HZ. Natural fatty acid synthase inhibitors as potent therapeutic agents for cancers: A review. *Pharmaceutical Biology*. 2016;54(7-9):1919-25.
281. Puig T, Aguilar H, Cufi S, Oliveras G, Turrado C, Ortega-Gutierrez S, et al. A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines. *Breast Cancer Research*. 2011;13(6).
282. Brusselmans K, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*. 2003;106(6):856-62.
283. Yu L, Liu X, Cui K, Di YB, Xin LB, Sun XM, et al. SND1 Acts Downstream of TGF beta 1 and Upstream of Smurf1 to Promote Breast Cancer Metastasis. *Cancer Research*. 2015;75(7):1275-86.
284. Cappellari M, Bielli P, Paronetto MP, Ciccocanti F, Fimia GM, Saarikettu J, et al. The transcriptional co-activator SND1 is a novel regulator of alternative splicing in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2014;33(29):3794-802.

285. Wang N, Du XL, Zang L, Song NA, Yang T, Dong R, et al. Prognostic impact of Metadherin-SND1 interaction in colon cancer. *Molecular Biology Reports*. 2012;39(12):10497-504.
286. Tsuchiya N, Ochiai M, Nakashima K, Ubagai T, Sugimura T, Nakagama H. SND1, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis. *Cancer Research*. 2007;67(19):9568-76.
287. Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Gluthione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*. 2005;401:1-8.
288. de Sa RA, Moreira AD, Cabello PH, Ornellas AA, Costa EB, Matos CD, et al. Human glutathione S-transferase polymorphisms associated with prostate cancer in the Brazilian population. *International Braz J Urol*. 2014;40(4):463-73.
289. McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*. 2006;25(11):1639-48.
290. Adnan H, Quach H, MacIntosh K, Antenos M, Kirby GM. Low Levels of GSTA1 Expression Are Required for Caco-2 Cell Proliferation. *Plos One*. 2012;7(12).
291. Romero L, Andrews K, Ng L, O'Rourke K, Maslen A, Kirby G. Human GSTA1-1 reduces c-Jun N-terminal kinase signalling and apoptosis in Caco-2 cells. *Biochem J*. 2006;400(1):135-41.
292. Goward CR, Nicholls DJ. Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci*. 1994;3(10):1883-8.
293. Ban HS, Xu X, Jang K, Kim I, Kim BK, Lee K, et al. A Novel Malate Dehydrogenase 2 Inhibitor Suppresses Hypoxia-Inducible Factor-1 by Regulating Mitochondrial Respiration. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162568.
294. Dozmorov MG, Azzarello JT, Wren JD, Fung KM, Yang Q, Davis JS, et al. Elevated AKR1C3 expression promotes prostate cancer cell survival and prostate cell-mediated endothelial cell tube formation: implications for prostate cancer progression. *Bmc Cancer*. 2010;10.
295. Nakarai C, Osawa K, Akiyama M, Matsubara N, Ikeuchi H, Yamano T, et al. Expression of AKR1C3 and CNN3 as markers for detection of lymph node metastases in colorectal cancer. *Clinical and Experimental Medicine*. 2015;15(3):333-41.
296. Hofman J, Malcekova B, Skarka A, Novotna E, Wsol V. Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: The role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014;278(3):238-48.
297. Xiong W, Zhao J, Yu HL, Li XY, Sun SQ, Li Y, et al. Elevated Expression of AKR1C3 Increases Resistance of Cancer Cells to Ionizing Radiation via Modulation of Oxidative Stress. *Plos One*. 2014;9(11).

298. Zhou W, Limonta P. AKR1C3 Inhibition Therapy in Castration-Resistant Prostate Cancer and Breast Cancer: Lessons from Responses to SN33638. *Front Oncol.* 2014;4:162.
299. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77.
300. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(7):570-4.
301. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, et al. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res.* 2000;60(24):7099-105.
302. van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *New England Journal of Medicine.* 2002;347(25):1999-2009.
303. Nylandsted J, Brand K, Jaattela M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Mechanisms of Cell Death Ii.* 2000;926:122-5.
304. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell.* 1991;66(2):191-7.
305. Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1699(1-2):35-44.
306. Cheng HP, Liu Q, Li Y, Li XD, Zhu CY. The inhibitory effect of PDIA6 downregulation on bladder cancer cell proliferation and invasion. *Oncol Res.* 2016.
307. Grek C, Townsend DM. Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. *Endoplasmic Reticulum Stress Dis.* 2014;1(1):4-17.
308. Xu S, Butkevich AN, Yamada R, Zhou Y, Debnath B, Duncan R, et al. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(40):16348-53.
309. Goplen D, Wang J, Enger PO, Tysnes BB, Terzis AJ, Laerum OD, et al. Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. *Cancer Res.* 2006;66(20):9895-902.
310. Zhang DH, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK, Koay ESC. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2005;4(11):1686-96.
311. Wang SM, Lin LZ, Zhou DH, Zhou JX, Xiong SQ. Expression of prolyl 4-hydroxylase beta-polypeptide in non-small cell lung cancer treated with Chinese medicines. *Chin J Integr Med.* 2015;21(9):689-96.
312. Sun S, Lee D, Ho AS, Pu JK, Zhang XQ, Lee NP, et al. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) attenuates temozolomide resistance in

- malignant glioma via the endoplasmic reticulum stress response (ERSR) pathways. *Neuro Oncol.* 2013;15(5):562-77.
313. Da Costa GG, Gomig TH, Kaviski R, Santos Sousa K, Kukulj C, De Lima RS, et al. Comparative Proteomics of Tumor and Paired Normal Breast Tissue Highlights Potential Biomarkers in Breast Cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 2015;12(5):251-61.
 314. Ramos FS, Serino LT, Carvalho CM, Lima RS, Urban CA, Cavalli IJ, et al. PDIA3 and PDIA6 gene expression as an aggressiveness marker in primary ductal breast cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14(2):6960-7.
 315. Gao H, Sun B, Fu H, Chi X, Wang F, Qi X, et al. PDIA6 promotes the proliferation of HeLa cells through activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncotarget.* 2016.
 316. Tufo G, Jones AW, Wang Z, Hamelin J, Tajeddine N, Esposti DD, et al. The protein disulfide isomerases PDIA4 and PDIA6 mediate resistance to cisplatin-induced cell death in lung adenocarcinoma. *Cell Death Differ.* 2014;21(5):685-95.
 317. Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes Dde C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(9):1954-69.
 318. Kim HS, Kang SH, Park CH, Yang WI, Jeung HC, Chung HC, et al. Genome-wide molecular characterization of mucinous colorectal adenocarcinoma using cDNA microarray analysis. *Oncol Rep.* 2011;25(3):717-27.
 319. Ramachandran V, Arumugam T, Wang H, Logsdon CD. Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival. *Cancer Res.* 2008;68(19):7811-8.
 320. Ma SR, Wang WM, Huang CF, Zhang WF, Sun ZJ. Anterior gradient protein 2 expression in high grade head and neck squamous cell carcinoma correlated with cancer stem cell and epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget.* 2015;6(11):8807-21.
 321. Barraclough DL, Platt-Higgins A, de Silva Rudland S, Barraclough R, Winstanley J, West CR, et al. The metastasis-associated anterior gradient 2 protein is correlated with poor survival of breast cancer patients. *Am J Pathol.* 2009;175(5):1848-57.
 322. Zhang Y, Forootan SS, Liu D, Barraclough R, Foster CS, Rudland PS, et al. Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2007;10(3):293-300.
 323. Vanderlaag KE, Hudak S, Bald L, Fayadat-Dilman L, Sathe M, Grein J, et al. Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor-alpha and survivin. *Breast Cancer Res.* 2010;12(3):R32.

324. Obacz J, Brychtova V, Podhorec J, Fabian P, Dobes P, Vojtesek B, et al. Anterior gradient protein 3 is associated with less aggressive tumors and better outcome of breast cancer patients. *Onco Targets Ther.* 2015;8:1523-32.
325. Li Z, Zhu Q, Hu L, Chen H, Wu Z, Li D. Anterior gradient 2 is a binding stabilizer of hypoxia inducible factor-1alpha that enhances CoCl₂ -induced doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2015;106(8):1041-9.
326. Hrstka R, Brychtova V, Fabian P, Vojtesek B, Svoboda M. AGR2 predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Dis Markers.* 2013;35(4):207-12.
327. Lu YC, Weng WC, Lee H. Functional roles of calreticulin in cancer biology. *Biomed Res Int.* 2015;2015:526524.
328. Zamanian M, Veerakumarasivam A, Abdullah S, Rosli R. Calreticulin and cancer. *Pathol Oncol Res.* 2013;19(2):149-54.
329. Sheng W, Chen C, Dong M, Zhou J, Liu Q, Dong Q, et al. Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. *J Cell Physiol.* 2014;229(7):887-97.
330. Chen CN, Chang CC, Su TE, Hsu WM, Jeng YM, Ho MC, et al. Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(2):524-33.
331. Yoshida A, Hsu LC, Dave V. Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase. *Enzyme.* 1992;46(4-5):239-44.
332. Lohberger B, Rinner B, Stundl N, Absenger M, Liegl-Atzwanger B, Walzer SM, et al. Aldehyde dehydrogenase 1, a potential marker for cancer stem cells in human sarcoma. *PLoS One.* 2012;7(8):e43664.
333. Januchowski R, Wojtowicz K, Zabel M. The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(7):669-80.
334. Yang Y, Zhou W, Xia J, Gu Z, Wendlandt E, Zhan X, et al. NEK2 mediates ALDH1A1-dependent drug resistance in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2014;5(23):11986-97.
335. Januchowski R, Wojtowicz K, Sterzynska K, Sosinska P, Andrzejewska M, Zawierucha P, et al. Inhibition of ALDH1A1 activity decreases expression of drug transporters and reduces chemotherapy resistance in ovarian cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;78:248-59.
336. Peng B, Guo C, Guan H, Liu S, Sun MZ. Annexin A5 as a potential marker in tumors. *Clin Chim Acta.* 2014;427:42-8.
337. Xue G, Hao LQ, Ding FX, Mei Q, Huang JJ, Fu CG, et al. Expression of annexin a5 is associated with higher tumor stage and poor prognosis in colorectal adenocarcinomas. *J Clin Gastroenterol.* 2009;43(9):831-7.

338. Wang L, Zhang Y, Li H, Xu Z, Santella RM, Weinstein IB. Hint1 inhibits growth and activator protein-1 activity in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(10):4700-8.
339. Yuan BZ, Jefferson AM, Popescu NC, Reynolds SH. Aberrant gene expression in human non small cell lung carcinoma cells exposed to demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Neoplasia.* 2004;6(4):412-9.
340. Su T, Suzui M, Wang L, Lin CS, Xing WQ, Weinstein IB. Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):7824-9.
341. Xu IM, Lai RK, Lin SH, Tse AP, Chiu DK, Koh HY, et al. Transketolase counteracts oxidative stress to drive cancer development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(6):E725-34.
342. Ricciardelli C, Lokman NA, Cheruvu S, Tan IA, Ween MP, Pyragius CE, et al. Transketolase is upregulated in metastatic peritoneal implants and promotes ovarian cancer cell proliferation. *Clin Exp Metastasis.* 2015;32(5):441-55.

EKLER

Ek 1. 80 µg CaCo2 kolon kanseri hücresi ile yapılan analizlerde elde edilen proteinleri

Protein	Gen	Peptit sayısı
Titin	TTN	38
Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	36
Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	28
Actin, cytoplasmic 1	ACTB	28
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	27
Elongation factor 2	EEF2	25
Heat shock protein HSP 90 -alpha	HSP90AA1	25
Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	24
Alpha-enolase	ENO1	24
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	23
Tubulin beta chain	TUBB	22
Myosin-9	MYH9	22
Fatty acid synthase	FASN	22
Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	21
Pyruvate kinase PKM	PKM	20
Transketolase	TKT	20
Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	20
Tubulin beta-2B chain	TUBB2B	20
L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	18
Triosephosphate isomerase	TPI1	17
L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	17
Adenosylhomocysteinase	AHCY	17
Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1	17
Alpha-actinin-4	ACTN4	17
Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	16
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	16
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	16
14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB	15
Creatine kinase B-type	CKB	15
Rab GDP dissociation inhibitör Beta	GDI2	15
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	15
Exportin-2	CSE1L	15
Heat shock 70 kDa protein 4	HSPA4	15
Filamin-B	FLNB	15
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	14

Annexin A2	ANXA2	14
14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	14
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	13
Annexin A5	ANXA5	13
Importin subunit beta-1	KPNB1	13
Alpha-actinin-1	ACTN1	13
78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	13
Glutathione S-transferase P	GSTP1	12
Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	12
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	ATIC	12
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	12
Peroxiredoxin-1	PRDX1	11
Heat shock 70 kDa protein 1B	HSPA1B	11
Nebulin	NEB	11
Fibrous sheath-interacting protein 2	FSIP2	11
Nucleoside diphosphate kinase B	NME2	10
14-3-3 protein epsilon	YWHAE	10
Peroxiredoxin-6	PRDX6	10
Annexin A3	ANXA3	10
14-3-3 protein theta	YWHAQ	10
Eukaryotic initiation factor 4A-	EIF4A1	10
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD	10
Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	AARS	10
Filamin-A	FLNA	10
Dystonin	DST	10
Nesprin-1	SYNE1	10
Cofilin-1	CFL1	9
Profilin-1	PFN1	9
Tubulin beta-8 chain	TUBB8	9
Chloride intracellular channel protein1	CLIC1	9
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	9
Putative heat shock protein HSP 90-beta 2	HSP90AB2P	9
Beta-actin-like protein 2	ACTBL2	9
Transgelin	TAGLN	8
Transaldolase	TALDO1	8
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	8
Myosin-7B	MYH7B	8
ATP-citrate synthase	ACLY	8
Microtubule-actin cross-linking factor 1	MACF1	8
Nesprin-2	SYNE2	8
Multifunctional protein ADE2;	PAICS	8
Tubulin beta-6 chain	TUBB6	8
TPR and ankyrin repeat-containing protein 1	TRANK1	8
UDP-glucose 6-dehydrogenase	UGDH	8
Dynein heavy chain 5, axonemal	DNAH5	8

Uncharacterized protein C2orf16	C2orf16	8
Thioredoxin	TXN	7
Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	7
Elongation factor 1-gamma	EEF1G	7
Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3	7
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	7
Heat shock 70 kDa protein 6	HSPA6	7
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGAP1	7
Importin-5	IPO5	7
Protein FAM208B	FAM208B	7
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	7
Unconventional myosin-XVIIIb	MYO18B	7
Desmoplakin	DSP	7
Apolipoprotein B-100;Apolipoprotein B-48	APOB	7
Rho-associated protein kinase 1	ROCK1	7
Myosin-13	MYH13	7
Protein piccolo	PCLO	7
Alpha-actinin-3	ACTN3	7
E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	HERC2	7
Protein sidekick-2	SDK2	7
Ryanodine receptor 3	RYR3	7
Golgin subfamily B member 1	GOLGB1	7
Dynein heavy chain 7, axonemal	DNAH7	7
Myosin-6	MYH6	7
GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	6
40S ribosomal protein SA	RPSA	6
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	ANP32B	6
Nucleoside diphosphate kinase A	NME1	6
14-3-3 protein gamma	YWHAG	6
Plastin-3	PLS3	6
Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	6
Ezrin	EZR	6
Epiplakin	EPPK1	6
Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B	LRP1B	6
X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5	6
NADP-dependent malic enzyme	ME1	6
Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	ARFGEF2	6
Down syndrome cell adhesion molecule-like protein 1	DSCAML1	6
Zinc finger protein 646	ZNF646	6
Synaptonemal complex protein 1	SYCP1	6
E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	UBR4	6
Centrosomal protein of 152 kDa	CEP152	6
Lysine-specific demethylase	KDM2B	6

2B		
Histone-lysine N-methyltransferase 2A	KMT2A	6
Centrosomal protein of 290 kDa	CEP290	6
Adenomatous polyposis coli protein	APC	6
Myosin-10	MYH10	6
Myosin-4	MYH4	6
Dynein heavy chain 6, axonemal	DNAH6	6
Centromere protein F	CENPF	6
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	GLUD1	6
Endoplasmin	HSP90B1	6
Protein disulfide-isomerase	P4HB	6
Histone-lysine N-methyltransferase 2D	KMT2D	6
Treslin	TICRR	6
Dynein heavy chain 10, axonemal	DNAH10	6
Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	6
Myosin-3	MYH3	6
High mobility group protein B1	HMGB1	5
Protein SET;Protein SETSIP	SET	5
Inorganic pyrophosphatase	PPA1	5
Anterior gradient protein 2 homolog	AGR2	5
Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	5
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	5
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	5
Msx2-interacting protein	SPEN	5
Serpin H1	SERPINH1	5
Zinc finger protein 792	ZNF792	5
Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	ZC3H13	5
Glycine--tRNA ligase	GARS	5
DNA ligase 4	LIG4	5
Calreticulin	CALR	5
Zinc finger protein castor homolog 1	CASZ1	5
Flotillin-2	FLOT2	5
Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	ARAP2	5
Protein basson	BSN	5
Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	GFPT1	5
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	USP5	5
Myosin-binding protein C, cardiac-type	MYBPC3	5
Vinculin	VCL	5
Villin-1	VIL1	5
Cytoskeleton-associated protein 5	CKAP5	5
Sorting nexin-2	SNX2	5
Cilia- and flagella-associated protein 54	CFAP54	5
CAP-Gly domain-containing linker protein 1	CLIP1	5
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	5

Clathrin heavy chain 1	CLTC	5
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	SPTBN1	5
RB1-inducible coiled-coil protein 1	RB1CC1	5
E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2	MYCBP2	5
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYNC1H1	5
Unconventional myosin-Va	MYO5A	5
Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	5
Talin-1	TLN1	5
Pericentrin	PCNT	5
Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	ASPM	5
CAP-Gly domain-containing linker protein 2	CLIP2	5
Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	LRP2	5
Intraflagellar transport protein 172 homolog	IFT172	5
Polycystic kidney disease protein 1-like 1	PKD1L1	5
Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	ASCC3	5
Dedicator of cytokinesis protein 2	DOCK2	5
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5	CHD5	5
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	IQGAP2	5
Kinesin-like protein KIF20B	KIF20B	5
Dynein heavy chain 9, axonemal	DNAH9	5
Centrosomal protein of 170 kDa	CEP170	5
Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	BMS1	5
Sodium channel protein type 10 subunit alpha	SCN10A	5
Xin actin-binding repeat-containing protein 2	XIRP2	5
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7	CHD7	5
Ankyrin repeat domain-containing protein 12	ANKRD12	5
Metabotropic glutamate receptor 4	GRM4	5
Polycystic kidney disease protein 1-like 3	PKD1L3	5
Coatomer subunit beta	COPB1	5
Separin	ESPL1	5
E3 ISG15--protein ligase HERC5	HERC5	5
Protein SZT2	SZT2	5
Bloom syndrome protein	BLM	5
Clathrin heavy chain 2	CLTCL1	5
Nucleolar transcription factor 1	UBTF	5
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	ANP32A	5
Myotubularin-related protein 5	SBF1	5
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1	PPRC1	5
MORC family CW-type zinc finger protein 1	MORC1	5
Band 4.1-like protein 4A	EPB41L4A	5
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y	USP9Y	5
Serine protease inhibitor Kazal-type 5	SPINK5	5
Hydrocephalus-inducing protein homolog	HYDIN	5
G-protein coupled receptor family C group 6 member A	GPRC6A	5

Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein	PREX2	5
Zinc finger protein 224	ZNF224	5
Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	5
Uncharacterized protein KIAA1551	KIAA1551	5
Protein S100-A11	S100A11	4
PR domain-containing protein 11	PRDM11	4
Nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	4
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	EIF5A	4
Protein deglycase DJ-1	PARK7	4
Inhibitor of Bruton tyrosine kinase	IBTK	4
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	4
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	PAFAH1B2	4
Vascular endothelial growth factor receptor 1	FLT1	4
Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	QPRT	4
Ribonucleases P/MRP protein subunit POP1	POP1	4
PDZ and LIM domain protein 1	PDLIM1	4
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	4
Microtubule-associated tumor suppressor candidate 2	MTUS2	4
SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1	SHANK1	4
T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5	4
Glycosyltransferase-like protein LARGE1	LARGE	4
Coiled-coil domain-containing protein 151	CCDC151	4
Zinc finger protein 518A	ZNF518A	4
Sushi, von Willebrand factor type A	SVEP1	4
Proto-oncogene vav	VAV1	4
Chromatin assembly factor 1 subunit A	CHAF1A	4
Triadin	TRDN	4
Putative zinc finger protein 833	ZNF833P	4
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	PFKP	4
RIMS-binding protein 3B	RIMBP3B	4
C-myc promoter-binding protein	DENND4A	4
Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	ACIN1	4
Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1	4
Early endosome antigen 1	EEA1	4
General transcription factor II-I repeat domain-containing protein 1	GTF2IRD1	4
Polyamine-modulated factor 1-binding protein 1	PMFBP1	4
Transcription initiation factor TFIID subunit 1	TAF1	4
Coiled-coil domain-containing protein 177	CCDC177	4
Midasin	MDN1	4
Germinal-center associated nuclear protein	MCM3AP	4
Adenylate cyclase type 10	ADCY10	4
Laminin subunit alpha-5	LAMA5	4
Dynein heavy chain 14, axonemal	DNAH14	4
Centrosome-associated protein CEP250	CEP250	4

DNA replication licensing factor MCM7	MCM7	4
Unconventional myosin-X	MYO10	4
Laminin subunit gamma-1	LAMC1	4
Cullin-4A	CUL4A	4
Tubulin polyglutamylase TTLL6	TTLL6	4
Acylamino-acid-releasing enzyme	APEH	4
Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	ASH1L	4
Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 1	MAST1	4
Insulin-degrading enzyme	IDE	4
G-protein coupled receptor 98	GPR98	4
Helicase with zinc finger domain 2	HELZ2	4
Eukaryotic translation initiation factor 5B	EIF5B	4
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	SPTBN2	4
Neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	4
Uncharacterized protein KIAA0556	KIAA0556	4
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	TXNRD1	4
Inactive phospholipase C-like protein 1	PLCL1	4
Unconventional myosin-IXa	MYO9A	4
Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1	PRPSAP1	4
Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1	HERC1	4
Neurobeachin-like protein 1	NBEAL1	4
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	CELSR2	4
Centrosomal protein of 120 kDa	CEP120	4
Hexokinase-1	HK1	4
Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 and H4 lysine-20 specific	NSD1	4
Lysine-specific demethylase 3B	KDM3B	4
Zinc finger and BTB domain-containing protein 11	ZBTB11	4
Round spermatid basic protein 1-like protein	RSBN1L	4
Palladin	PALLD	4
Putative heat shock protein HSP 90-alpha A4	HSP90AA4P	4
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3	IQGAP3	4
Unconventional myosin-Vb	MYO5B	4
Pleckstrin homology domain-containing family G member 4B	PLEKHG4B	4
Mucin-16	MUC16	4
Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6	4
Centrosomal protein of 57 kDa	CEP57	4
cTAGE family member 5	CTAGE5	4
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	USP9X	4
Zinc finger and BTB domain-containing protein 38	ZBTB38	4
Caldesmon	CALD1	4
Extracellular matrix protein FRAS1	FRAS1	4
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa	PTPRK	4
Myotubularin-related protein 12	MTMR12	4

Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1	4
Zinc finger protein 638	ZNF638	4
Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4	4
CAD protein	CAD	4
Rho GTPase-activating protein 32	ARHGAP32	4
Zinc finger protein 836	ZNF836	4
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	POLR1A	4
Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	ZC3H18	4
Down syndrome cell adhesion molecule	DSCAM	4
Prolyl endopeptidase-like	PREPL	4
E3 ubiquitin-protein ligase RNF169	RNF169	4
Serine/threonine-protein kinase Nek5	NEK5	4
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13	PTPN13	4
ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1	ERC1	4
Structural maintenance of chromosomes protein 1B	SMC1B	4
Histone-lysine N-methyltransferase 2B	KMT2B	4
Uncharacterized protein C6orf118	C6orf118	4
Thyroid receptor-interacting protein 11	TRIP11	4
Myosin-14	MYH14	4
Heat shock protein 105 kDa	HSPH1	4
CUB and sushi domain-containing protein 2	CSMD2	4
Putative NPIP-like protein LOC729978	PNP	4
Histone deacetylase 9	HDAC9	4
Plexin-B2	PLXNB2	4
Laminin subunit alpha-2	LAMA2	4
Collagen alpha-5(VI) chain	COL6A5	4
DNA damage-binding protein 1	DDB1	4
Coiled-coil domain-containing protein 178	CCDC178	4
G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	GPRIN1	4
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	LRP1	4
Myosin light polypeptide 6	MYL6	4
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1	4
Annexin A4	ANXA4	4
Multimerin-1	MMRN1	4
DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	POLE	4
Probable rRNA-processing protein EBP2	EBNA1BP2	4
Coiled-coil domain-containing protein 62	CCDC62	4
Unconventional myosin-VIIb	MYO7B	4
Cyclin-dependent kinase 13	CDK13	4
Vacuolar protein sorting-associated protein 13D	VPS13D	4
Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3	ARFGEF3	4
Leucine zipper putative tumor suppressor 1	LZTS1	4
Zinc finger protein Rlf	RLF	4
EF-hand calcium-binding domain-containing protein 6	EFCAB6	4

40S ribosomal protein S9	RPS9	4
DmX-like protein 1	DMXL1	4
Pro-neuregulin-2, membrane-bound isoform;Neuregulin-2	NRG2	4
SPATS2-like protein	SPATS2L	4
Collagen alpha-1(XI) chain	COL11A1	4
Histone acetyltransferase KAT6A	KAT6A	4
RAD51-associated protein 2	RAD51AP2	4
Zinc finger homeobox protein 3	ZFHX3	4
Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5	4
Kinectin	KTN1	4
Dynein heavy chain 3, axonemal	DNAH3	4
Adenylate cyclase type 3	ADCY3	4
Insulinoma-associated protein 2	INSM2	4
FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1	FARP1	4
Protein SOGA1;N-terminal form;	SOGA1	4
Triple functional domain protein	TRIO	4
Protein PRR14L	PRR14L	4
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	HSPG2	4
Zinc finger transcription factor Trps1	TRPS1	4
Exophilin-5	EXPH5	4
RNA-binding protein 12B	RBM12B	4
Dipeptidyl peptidase 9	DPP9	4
Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	TXNRD2	4
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2	3
Zinc finger protein 518B	ZNF518B	3
Glutaredoxin-3	GLRX3	3
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52	3
Protein PTHB1	BBS9	3
Protein S100-A6	S100A6	3
40S ribosomal protein S12	RPS12	3
Probable ATP-dependent DNA helicase HFM1	HFM1	3
Costars family protein ABRACL	ABRACL	3
Elongation factor 1-beta	EEF1B2	3
Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	3
Prostaglandin E synthase 3	PTGES3	3
Zinc finger and BTB domain-containing protein 46	ZBTB46	3
M-phase phosphoprotein 8	MPHOSPH8	3
ADNP homeobox protein 2	ADNP2	3
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	3
ADP-ribosylation factor 1;ADP-ribosylation factor 3	ARF1	3
40S ribosomal protein S5	RPS5	3
Myosin regulatory light chain 12B	MYL12B	3
Interleukin-17 receptor A	IL17RA	3

Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 3	KCNQ3	3
Elongation factor 1-delta	EEF1D	3
Immunoglobulin superfamily member 22	IGSF22	3
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform	PPP2R5D	3
DNA annealing helicase and endonuclease ZRANB3	ZRANB3	3
Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D	SSC5D	3
Melanopsin	OPN4	3
Myosin-15	MYH15	3
Sperm-associated antigen 17	SPAG17	3
Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1	PIEZO1	3
Guanine nucleotide exchange factor for Rab-3A	RAB3IL1	3
Actin-related protein 3	ACTR3	3
Peroxiredoxin-2	PRDX2	3
Nuclear receptor-interacting protein 3	NRIP3	3
Obg-like ATPase 1	OLA1	3
Importin subunit alpha-1	KPNA2	3
Obscurin-like protein 1	OBSL1	3
Pyridoxal kinase	PDXK	3
Protocadherin-15	PCDH15	3
T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	3
ATP-dependent RNA helicase DQX1	DQX1	3
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	NACA	3
Coiled-coil domain-containing protein 124	CCDC124	3
Mis18-binding protein 1	MIS18BP1	3
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	3
Centromere protein J	CENPJ	3
Patched domain-containing protein 2	PTCHD2	3
Coatomer subunit gamma-1	COPG1	3
Importin-7	IPO7	3
Tudor domain-containing protein 15	TDRD15	3
Nuclear autoantigenic sperm protein	NASP	3
Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	TARS	3
Adenylosuccinate lyase	ADSL	3
Cadherin-17	CDH17	3
Plectin	PLEC	3
Poly(A) polymerase alpha	PAPOLA	3
Extracellular calcium-sensing receptor	CASR	3
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	VPS35	3
Unconventional myosin-Ic	MYO1C	3
Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a	SMPDL3A	3

Phosphoribosylformylglycinamide synthase	PFAS	3
Transmembrane protein 131	TMEM131	3
E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B	CBLB	3
Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 1	ZKSCAN1	3
Spermatogenesis-associated protein 31E1	SPATA31E1	3
WD repeat and FYVE domain-containing protein 3	WDFY3	3
Zinc finger protein 668	ZNF668	3
Sacsin	SACS	3
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	USP7	3
40S ribosomal protein S21	RPS21	3
Mucin-2	MUC2	3
Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1	3
Protein FAM160A1	FAM160A1	3
WD repeat-containing protein 44	WDR44	3
Meckel syndrome type 1 protein	MKS1	3
Disks large-associated protein 1	DLGAP1	3
Rab11 family-interacting protein 5	RAB11FIP5	3
Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	KIDINS220	3
Collectin-12	COLEC12	3
Probable global transcription activator SNF2L2	SMARCA2	3
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	CAND1	3
Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1I	CACNA1I	3
Protein FAM83G	FAM83G	3
Gigaxonin	GAN	3
Periplakin	PPL	3
Zinc finger protein 43	ZNF43	3
PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit PAN2	PAN2	3
Leucine-rich repeat and coiled-coil domain-containing protein 1	LRRCC1	3
NK-tumor recognition protein;Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	NKTR	3
Zinc finger protein 236	ZNF236	3
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	ITPR2	3
cTAGE family member 6	CTAGE6	3
Dynein heavy chain 2, axonemal	DNAH2	3
DIS3-like exonuclease 1	DIS3L	3
Uncharacterized protein CXorf22	CXorf22	3
Bromodomain and WD repeat-containing protein 1	BRWD1	3
Mdm2-binding protein	MTBP	3
Hephaestin	HEPH	3
Ankyrin repeat domain-containing protein 30B	ANKRD30B	3
TRPM8 channel-associated factor 1	TCAF1	3
Ankyrin-2	ANK2	3

Tau-tubulin kinase 2	TTBK2	3
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12	ADAMTS12	3
Elongator complex protein 2	ELP2	3
Outer dense fiber protein 2	ODF2	3
Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein	GNL3L	3
YTH domain-containing family protein 2	YTHDF2	3
Protein KIAA0100	KIAA0100	3
Uridine-cytidine kinase 2	UCK2	3
Glypican-4;Secreted glypican-4	GPC4	3
Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A	CACNA1A	3
Mitochondrial fission factor	MFF	3
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 18	GALNT18	3
Folliculin-interacting protein 2	FNIP2	3
Matrix metalloproteinase-14	MMP14	3
FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 3	FGD3	3
Protein FAM184B	FAM184B	3
Telomerase reverse transcriptase	TERT	3
RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	RAF1	3
F-box/WD repeat-containing protein 10	FBXW10	3
Forkhead-associated domain-containing protein 1	FHAD1	3
F-box/WD repeat-containing protein 11	FBXW11	3
Protein Daple	CCDC88C	3
Son of sevenless homolog 1;Son of sevenless homolog 2	SOS1;SOS2	3
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	THRAP3	3
Coiled-coil and C2 domain-containing protein 2A	CC2D2A	3
Diacylglycerol kinase zeta	DGKZ	3
Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	VPS13A	3
Protein furry homolog	FRY	3
Serine-protein kinase ATM	ATM	3
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 21	PTPN21	3
Zinc finger protein 721	ZNF721	3
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC7	POLR3G	3
Myosin-IIb	MYO3B	3
Methionine synthase reductase	MTRR	3
SprT-like domain-containing protein Spartan	SPRTN	3
Hexokinase-2	HK2	3
Zinc finger protein 708	ZNF708	3
Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	IGF2R	3
Coagulation factor VIII	F8	3
Centrosomal protein of 78 kDa	CEP78	3
Chromobox protein homolog 3	CBX3	3
Hsc70-interacting protein	ST13	3
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	3
Interferon-induced guanylate-binding protein 1	GBP1	3

Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 6	PIK3R6	3
RNA polymerase II transcription factor SIII subunit A3	LOC101930 165	3
DNA replication licensing factor MCM3	MCM3	3
Piwi-like protein 1	PIWIL1	3
FERM and PDZ domain-containing protein 3	FRMPD3	3
Microtubule-associated protein 1B;MAP1B heavy chain;MAP1 light chain LC1	MAP1B	3
Cardiomyopathy-associated protein 5	CMYA5	3
Prickle-like protein 2	PRICKLE2	3
Junction-mediating and -regulatory protein	JMY	3
Stathmin	STMN1	3
Importin-9	IPO9	3
Ankyrin-3	ANK3	3
Retinal-specific ATP-binding cassette transporter	ABCA4	3
Rab11 family-interacting protein 4	RAB11FIP4	3
THO complex subunit 2	THOC2	3
Peroxisomal NADH pyrophosphatase NUDT12	NUDT12	3
Sterile alpha motif domain-containing protein 15	SAMD15	3
E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1	HECTD1	3
MARVEL domain-containing protein 2	MARVELD 2	3
Coiled-coil domain-containing protein 171	CCDC171	3
Cell division cycle 5-like protein	CDC5L	3
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1	3
Liprin-beta-1	PPFIBP1	3
Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1	BOD1L1	3
DNA-binding protein SMUBP-2	IGHMBP2	3
Proteoglycan 4	PRG4	3
Zinc finger protein 567	ZNF567	3
Thyroglobulin	TG	3
Kinesin-like protein KIF21A	KIF21A	3
Fanconi anemia group I protein	FANCI	3
Girdin	CCDC88A	3
Rho GTPase-activating protein 22	ARHGAP22	3
DNA topoisomerase 2-beta	TOP2B	3
Protein PRRC2B	PRRC2B	3
Protein FAM83H	FAM83H	3
Ryanodine receptor 2	RYR2	3
Laminin subunit alpha-3	LAMA3	3
FERM and PDZ domain-containing protein 1	FRMPD1	3
Uncharacterized protein CXorf23	CXorf23	3
Potassium voltage-gated channel subfamily C member 1	KCNC1	3
Transient receptor potential cation channel subfamily M	TRPM2	3

member 2		
Centromere-associated protein E	CENPE	3
Obscurin	OBSCN	3
FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1	FYCO1	3
Protein tyrosine phosphatase domain-containing protein 1	PTPDC1	3
Inactive serine/threonine-protein kinase TEX14	TEX14	3
Protein CASC5	CASC5	3
A-kinase anchor protein 9	AKAP9	3
Teneurin-4	TENM4	3
Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	PDS5B	3
Mucin-5AC	MUC5AC	3
Leucine-rich repeat and IQ domain-containing protein 3	LRRIQ3	3
Alpha-mannosidase 2	MAN2A1	3
Hemicentin-1	HMCN1	3
Low-density lipoprotein receptor-related protein 8	LRP8	3
Stonin-1	STON1	3
Sucrase-isomaltase, intestinal;Sucrase	SI	3
FH2 domain-containing protein 1	FHDC1	3
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34	USP34	3
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24	USP24	3
Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF	BPTF	3
tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase, mitochondrial	TRMT61B	3
DBF4-type zinc finger-containing protein 2	ZDBF2	3
Dedicator of cytokinesis protein 11	DOCK11	3
ATP-dependent RNA helicase DDX54	DDX54	3
Nucleolar protein 8	NOL8	3
Zinc finger protein 777	ZNF777	3
Schlafen family member 12	SLFN12	3
Rho GTPase-activating protein 4	ARHGAP4	3
Sialic acid-binding Ig-like lectin 11	SIGLEC11	3
Neural cell adhesion molecule L1	L1CAM	3
Testis- and ovary-specific PAZ domain-containing protein 1	TOPAZ1	3
Rab5 GDP/GTP exchange factor	RABGEF1	3
Nebulette	NEBL	3
Golgin subfamily A member 8B subfam	GOLGA8B	3
T-box transcription factor TBX2	TBX2	3
Structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC1A	3
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 4	SPTBN4	3
Mucin-4;Mucin-4 alpha chain;Mucin-4 beta chain	MUC4	3
Fas-binding factor 1	FBF1	3
V(D)J recombination-activating protein 1;Endonuclease RAG1	RAG1	3
Fibrocystin	PKHD1	3
Spatacin	SPG11	3

Regulator of nonsense transcripts 2	UPF2	3
Coiled-coil domain-containing protein 82	CCDC82	3
PAX3- and PAX7-binding protein 1	PAXBP1	3
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	NDUFB7	3
Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha	PIK3C2A	3
Transcription factor TFIIB component B homolog	BDP1	3
Coiled-coil domain-containing protein 73	CCDC73	3
Putative RNA-binding protein 15	RBM15	3
Transmembrane protein 131-like	KIAA0922	3
Testis-specific gene 10 protein	TSGA10	3
Ankyrin repeat domain-containing protein 36A	ANKRD36	3
Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	HGS	3
Ankyrin repeat domain-containing protein 13D	ANKRD13D	3
Guanylate-binding protein 6	GBP6	3
Striated muscle preferentially expressed protein kinase	SPEG	3
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UGP2	3
Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	BAZ1A	3
Spermatogenesis-associated protein 31D1 spermatogenesis-associated protein 31D3	SPATA31D1	3
Dynamin-3	DNM3	3
Zinc finger protein 133	ZNF133	3
Cysteine-rich protein 2-binding protein	CSRP2BP	3
Glypican-1;Secreted glypican -1	GPC1	3
Myomegalin	PDE4DIP	3
Cytoskeleton-associated protein 2-like	CKAP2L	3
Neurobeachin-like protein 2	NBEAL2	3
Copine-1	CPNE1	3
Lanosterol synthase	LSS	3
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRNPF	3
Condensin-2 complex subunit G2	NCAPG2	3
Contactin-2	CNTN2	3
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9	CHD9	3
HEAT repeat-containing protein 1;HEAT repeat-containing protein 1, N-terminally processed	HEATR1	3
Solute carrier family 12 member 5	SLC12A5	3
Protein ZGRF1	ZGRF1	3
Integrator complex subunit 1	INTS1	3
Nuclear pore complex-interacting protein family member B5	NPIP5	3
HEAT repeat-containing protein 4	HEATR4	3

Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	3
Integrin beta-4	ITGB4	3
Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1	ZZEF1	3
Myotubularin-related protein 11	MTMR11	3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	PSMD3	3
Splicing factor 3A subunit 1	SF3A1	3
Zinc finger protein 707	ZNF707	3
Protein PAT1 homolog 2	PATL2	3
Plastin-2	LCP1	3
Dynein heavy chain 8, axonemal	DNAH8	3
Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1	3
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	ACAT2	3
BTB/POZ domain-containing protein 10	BTBD10	3
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	3
SH3 and cysteine-rich domain-containing protein	STAC	3
Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	3
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2D	GRIN2D	3
Patatin-like phospholipase domain-containing protein 7	PNPLA7	3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	PSMD2	3
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	3
Filamin-C	FLNC	3
SUMO-activating enzyme subunit 2	UBA2	3
Coiled-coil domain-containing protein 186	CCDC186	3
Nuclear receptor-binding protein 2	NRBP2	3
SCAN domain-containing protein 3	ZBED9	3
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret;Soluble RET kinase fragment;	RET	3
Serine/threonine-protein kinase N1	PKN1	3
PHD and RING finger domain-containing protein 1	PHRF1	3
Little elongation complex subunit 2	ICE2	3
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	3
Unconventional myosin-I α	MYO1F	3
Probable helicase senataxin	SETX	3
Hepatoma-derived growth factor	HDGF	3
Ral guanine nucleotide dissociation stimulator	RALGDS	3
Uncharacterized protein C9orf84	C9orf84	3
cAMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase 4C	PDE4C	3
Probable E3 ubiquitin-protein ligase TRIML2	TRIML2	3
MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1	MECOM	3
UPF0606 protein KIAA1549L	KIAA1549L	3
Vascular endothelial growth factor D	FIGF	3
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	CYFIP1	3
DENN domain-containing protein 2A	DENND2A	3

Protein broad-minded	TBC1D32	3
Wee1-like protein kinase	WEE1	3
Uncharacterized protein KIAA1210	KIAA1210	3
Heparin cofactor 2	SERPIND1	3
Uncharacterized protein KIAA0753	KIAA0753	3
Integrin alpha-11	ITGA11	3
Centlein	CNTLN	3
Transmembrane protein 232	TMEM232	3
Lysine-specific demethylase 5C	KDM5C	3
Plexin-D1	PLXND1	3
Protein disulfide-isomerase A2	PDIA2	3
Autophagy-related protein 2 homolog B	ATG2B	3
Protein GREB1	GREB1	3
Kinetochores-associated protein DSN1 homolog	DSN1	3
Antigen KI-67	MKI67	3
Nitric oxide synthase, brain	NOS1	3
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A	DNMT3A	3
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	DDX6	3
Kinesin-like protein KIF1C	KIF1C	3
Plakophilin-4	PKP4	3
Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	PICALM	3
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit beta isoform	PPP2R5B	3
Serine/threonine-protein kinase Nek1	NEK1	3
Neuralized-like protein 4	NEURL4	3
Structural maintenance of chromosomes protein 2	SMC2	3
UPF0160 protein MYG1, mitochondrial	C12orf10	3
Utrophin	UTRN	3
Protein kinase C epsilon type	PRKCE	3
ATP-binding cassette sub-family D member 1	ABCD1	3
Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2	RGL2	3
Kinetochores-associated protein NSL1 homolog	NSL1	3
Glucagon-like peptide 2 receptor	GLP2R	3
Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1	3
SH2 domain-containing adapter protein E	SHE	3
ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	3
Unconventional myosin-XV	MYO15A	3
Cytosolic carboxypeptidase 2	AGBL2	3
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2	3
Neurobeachin	NBEA	3
Unconventional myosin-VI	MYO6	3
Zonadhesin	ZAN	3
Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	3
Lysosomal-trafficking regulator	LYST	3
Lon protease homolog, mitochondrial	LONP1	3

Probable helicase with zinc finger domain	HELZ	3
Protein strawberry notch homolog 2	SBNO2	3
Pecanex-like protein 2	PCNXL2	3
CCR4-NOT transcription complex subunit 1	CNOT1	3
Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	3
Tubulin--tyrosine ligase	TTL	3
Protein RRP5 homolog	PDCD11	3
Ankyrin repeat domain-containing protein 26	ANKRD26	3
Immunoglobulin superfamily member 10	IGSF10	3
Myoferlin	MYOF	3
PR domain zinc finger protein 2	PRDM2	3
Serrate RNA effector molecule homolog	SRRT	3
Zinc finger protein 311	ZNF311	3
Hermansky-Pudlak syndrome 3 protein	HPS3	3
Focadhesin	FOCAD	3
Coiled-coil domain-containing protein 47	CCDC47	3
Zinc finger protein 107	ZNF107	3
F-box/LRR-repeat protein 19	FBXL19	3
Unconventional myosin-Id	MYO1D	3
TBC1 domain family member 21	TBC1D21	3
DNA helicase INO80	INO80	3
Canalicular multispecific organic 2	ABCC3	3

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Ankarada doğdum. Ankara Kaya Bayazıtöğlu Lisesini bitirdikten sonra 1999 yılında Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümüne lisans öğrencisi olarak başladım. 2005 yılında aynı bölümden kimyager olarak mezun oldum. 2006 yılında Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümünde yüksek lisans öğrencisi olarak girdim polimer ve radyasyon kimyası üzerine yüksek lisans tezimi tamamlayarak 2009 tarihinde mezun oldum. Yüksek lisansımı yaptığım sırada Novo-Nordisk firmasında ruhsatlandırma uzman yardımcısı olarak görev yaptım. 2008 yılında Pharma Mondial firmasında üretim müdür yardımcısı olarak göreve başladım ve 2009 yılında üretim müdürü görevine atandım. 2011 yılında Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya doktora programında öğrenime başladım. 2012 yılında araştırma görevlisi olarak atandım. Doktora öğrenimim sırasında 2014 yılında 1 yıl süre ile Laboratory of Foodomics, CIAL, National Research Council of Spain' de çalışmalarda bulundum. Halen Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.