

**SİKLODEKSTRİN NANOPARTİKÜLLERİNİN HEPG-2
KARACİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNE
ETKİSİNİN PROTEOMİK ÇALIŞMALARLA
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION of THE EFFECT of CYCLODEXTRIN
NANOPARTICLES on HEPG-2 LIVER CANCER CELL
LINE by PROTEOMIC STUDIES**

FIRAT ŞAKAR

**DOÇ. DR. MUSTAFA ÇELEBİER
TEZ DANIŞMANI**

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2019

FIRAT ŞAKAR'ın hazırladığı “**Siklodekstrin Nanopartiküllerinin HEPG-2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattı Üzerine Etkisinin Proteomik Çalışmalarla İncelenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Dilek AK
Başkan



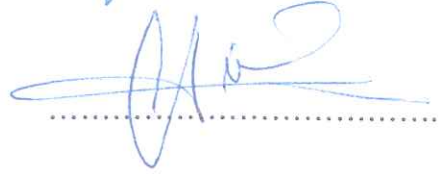
Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER
Danışman



Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ
Üye



Doç. Dr. Gürler AKPINAR
Üye



Doç. Dr. Ayşe ERCAN
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak / /..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.



10.07.2019

Fırat ŞAKAR

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 kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.


10.07.2019..
(İmza)
Fırat ŞAKAR

ÖZET

SİKLODEKSTRİN NANOPARTİKÜLLERİNİN HEPG-2 KARACİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİSİNİN PROTEOMİK ÇALIŞMALARLA İNCELENMESİ

Fırat ŞAKAR

Doktora, Fen Bilimleri Enstitüsü,

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER

Haziran 2019, 121 sayfa

Proteom; protein ve genom sözcüklerinin birleştirilmesinden türetilmiş, belli bir genom tarafından kodlanan proteinlerin tümünü işaret kapsayan bir sözcüktür. Proteom analizine proteomik denilmektedir. Bir organizma vücudunun farklı bölgelerinde, hücre döngüsünün farklı evrelerinde ve farklı çevre koşullarında farklı protein ekspresyonlarına sahiptir. Sabit bir yapı olan ve bir organizma için çok iyi tanımlanabilen genomun aksine, proteom, hücreden hücreye farklılık gösterir ve iç ve dış uyaranlara yanıt olarak biyokimyasal etkileşimler aracılığı ile sürekli bir değişim halindedir. Amfifilik siklodekstrinler kendi kendine nanopartikül oluşturabilme yeteneğine sahip moleküllerdir. Ayrıca; bu moleküllerin intrinsik olarak bazı kanser hücre hatları üzerinde apoptotik etki gösterdiği saptanmıştır. Göstermiş olduğu özellikler nedeniyle bu yapılar nano ölçekte ilaç taşıyıcı sistem olarak literatüre girmiştir. Bu tez çalışmasında, PBO kodlu amfifilik siklodekstrin nanopartikülün HEPG-2 karaciğer kanser hücreleri üzerindeki antikanser mekanizması karşılaştırmalı proteomik yaklaşımlarla tespit edilmiştir.

Amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerin etkisiyle çoğalmanın önlendiği kanser hücre hatları, işlem görmüş hücre hatları olarak kullanılmış ve T grubu olarak isimlendirilmiş olup; hiçbir şekilde işlem görmeden çoğalmanın önlenmediği grup ise kontrol grubu olarak kullanılmış olup C grubu olarak ifade edilmiştir.

T ve C gruplarından elde edilmiş lizat çözeltilerinden sitozolik fraksiyonlar elde edilmiştir. Proteomik çalışmalarda, 2 boyutlu jel elektroforez (2D jel elektroforez) ile ayrılan T ve C gruplarına ait proteinler için imaj analizi çalışmaları yapılmıştır. T ve C grupları için farklılaştığı tespit edilen proteinler Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF/TOF-MS) ile analiz edilmiş ve tanımlanmıştır.

Bu çalışma ile ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerin tek başına da karaciğer kanseri üzerine etkili olduğu proteom düzeyindeki değişimlerle gösterilmiştir. Kanser tedavisinde amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı durumlarda, nanopartikülün kendisinin de hücre çoğalmasını baskılamada göstermiş olduğu etki göz ardı edilmemelidir sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nanoteknoloji, Nanotıp, Siklodekstrin nanopartikül, Proteomik, Karaciğer Kanseri, HEPG-2 hücre hattı, 2 Boyutlu Jel Elektroforez, Kütle Spektrometrisi.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CYCLODEXTRIN NANOPARTICLES ON HEPG-2 LIVER CANCER CELL LINE BY PROTEOMIC STUDIES

Fırat ŞAKAR

**PhD Program, Institute of Science,
Nanotechnology and Nanomedicine Department**

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER

June 2019, 121 page

Proteome; derived from the combination of protein and genome words, is a word that covers all the proteins encoded by a particular genome. Proteome analysis is called proteomics. An organism has different protein expressions in different parts of the body, at different stages of the cell cycle, and in different environmental conditions. Unlike the genome, which is a stable structure and well-defined for an organism, the proteome differs from cell to cell and is in constant change through biochemical interactions in response to internal and external stimuli. Amphiphilic cyclodextrins are molecules capable of self-forming nanoparticles. Also; these molecules were found to have an apoptotic effect intrinsically on some cancer cell lines. Due to the properties it has shown, these structures have entered the literature as a drug delivery system at nano scale. In this study, the anticancer mechanism of PBO coded amphiphilic cyclodextrin nanoparticle on HEPG-2 liver cancer cells was determined by expressional proteomic approaches.

Cancer cell lines that prevent proliferation by the effect of amphiphilic cyclodextrin nanoparticles were used as treated cell lines and named as T group; the group in which the proliferation was not prevented without being treated in any way was used as the control group and was named as the C group. Cytosolic fractions were obtained from the lysate solution taken from T and C groups. In proteomic studies, two-dimensional gel

electrophoresis (2D gel electrophoresis) was performed for determination of the over or under expressed proteins belonging to T and C groups. According to the results of image analysis, the proteins found to be differentiated for T and C groups were identified by Matrix Assisted Laser Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF / TOF-MS).

In this study, amphiphilic cyclodextrin nanoparticles, which are used as drug delivery systems, have been shown to be effective on liver cancer alone with changes in proteome level. In cases where amphiphilic cyclodextrin nanoparticles are used as drug delivery system in cancer treatment, the effect of the nanoparticle itself on suppressing cell proliferation should not be ignored.

Keywords: Nanotechnology, Nanomedicine, Cyclodextrin nanoparticle, Proteomics, Liver Cancer, HEPG-2 cell line, 2D Gel Electrophoresis, Mass Spectrometry.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini paylaşan, kullandığı her kelimenin çalışmalarım ve hayatıma kattığı önemini unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER'e,

Çalışmamın her aşamasında her türlü bilgi ve tecrübesini esirgemeyen Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. A. Sacide ALTINÖZ'e,

Tez çalışmalarım sırasında sahip olduğu tecrübe ile bana her zaman yol gösteren Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL'e,

Tez çalışmalarım sırasında her türlü bilgisini paylaşan H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı Başkanı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Şadan ÖZCAN'a,

PBO kodlu siklodekstrinlerinin temininde yardımlarından dolayı H.Ü Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof Dr. Erem BİLENSOY'a,

HEPG-2 hücrelerinin nanopartiküllerle etkileşim çalışmalarındaki katkıları dolayısıyla Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Ayşe Ercan'a,

Spotların kesimi, jelden geri kazanımı ve peptidlere parçalanması ile kütle spektrometresi çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Birimi (KABİ) Proteomik Laboratuvarı sorumlusu Sayın Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a,

Çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki hayatında çok daha başarılı olacağına inandığım Çukurova Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Sayın Dr. Merve NENNİ'ye,

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı Saygıdeğer Öğretim Üyelerine,

Bu tez çalışmasında kullanılan sarf malzemelerin alınması ve hizmet alımlarının gerçekleştirilmesi için 115S456 nolu proje kapsamında desteği sebebiyle TÜBİTAK'a;

Çalışmalarına her konuda yardımlarını hiç esirgemeyen ve yanımda olan arkadaşlarım Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı Arş. Gör. Engin KOÇAK'a, Kimyacı Sayın Ozan KAPLAN'a, Sayın Hakan ÇELİK'e,

Zorlu süreçlere rağmen manevi desteğini hep hissettiğim, her zaman yanımda olan, yaşam kaynağım, değerli eşim Dr. Vefa SALİMOVA ŞAKAR'a ve yaşam gayem, canım oğlum Onur Yiğit ŞAKAR'a,

Yaşamım boyunca, göstermiş olduğu tüm özverileriyle bu günlere gelmemi sağlayan babam Sayın Kazım ŞAKAR'a, duyduğu sonsuz güven ve sevgiyle annem Sayın Fatma ŞAKAR'a, yakın bir tarihte kaybettiğim anneannem Sayın Menent GİRGİN'e, dayım Sayın Cafer GİRGİN'e ve diğer yakınlarıma,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM...

Nük. Müh. FIRAT ŞAKAR

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ÇİZELGELER	xii
ŞEKİLLER.....	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Bilim ve Teknolojinin Nanoteknolojinin Gelişimi Üzerine Etkisi.....	5
2.1.1. Bilim ve Teknolojinin Gelişiminden Nanoteknolojinin Günlük Hayatımıza Girişine Uzanan Kronolojik Tarih	5
2.2. Nanoteknoloji	7
2.3. Nanotıp	7
2.3.1. Nanoteknolojinin Tıptaki Kullanım Alanları	9
2.3.2. İlaç Taşıyıcı Sistemler	9
2.3.3. Nanopartiküller	11
2.4. Gen, Protein, Genom ve Proteom Tanımı	13
2.4.1. Genomikten Proteomiğe	18
2.5. Proteomik Çalışmalar	20
2.5.1. Proteomik Teknolojisi	21
2.6. Protein Ayırma Yöntemleri	21
2.7. İki Boyutlu Jel Elektroferez	23
2.7.1. Numune Hazırlama ve IPG Şeritlere Protein Yüklenmesi	24
2.7.2. İzoelektrik Odaklama (IEF).....	25
2.7.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez.....	27
2.7.4. Protein Analizinde Renklendirme	29
2.7.5. İmaj Görüntüleme.....	29
2.7.6. Proteinlerin Jelden Uzaklaştırılması	31
2.7.7. Proteinlerin Peptidlere Parçalanması ve Peptid Dizileme	32
2.8. Kütle Spektrometresi	33

2.8.1. MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi	34
2.8.2. ESI-TOF Kütle Spektrometresi	35
2.9. Biyoinformatik	36
2.10. Kanser Tedavisinde Proteomik Yaklaşımlar	36
2.11. Karaciğer Kanseri	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. Gereçler (Kullanılan Kimyasallar, Araç ve Gereçler, Yazılımlar, Veritabanları, Hazır/lanan Tamponlar-Çözeltiler)	39
3.1.1. Tez Çalışmasında Uygulanan Genel Metodoloji	40
3.1.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	41
3.1.3. Numune Hazırlama ve Protein Miktar Tayini	41
3.2. Yöntem	49
3.2.1. Proteinlerin Çöktürülmesi	49
3.2.2. Proteinlerin IPG Şeritlere Yüklenmesi	49
3.2.3. Birinci Boyut-Proteinlerin İzoelektrik Noktalara Ayrılması	50
3.2.4. İkinci Boyut SDS-PAGE	51
3.2.5. Jel Haritalaması ve Proteinlerin Jelden Uzaklaştırılması	54
3.2.6. Seçilen Proteinlerin Peptidlere Parçalanması	55
3.2.7. Proteinlerin Tanımlanması	56
3.2.8. Tanımlanan Proteinlerin Literatür ve Veri Bankası Aracılığıyla Kanserle İlişkilendirilmesi	56
4. BULGULAR	57
4.1. Proteomik Çalışmalar	57
4.1.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	57
4.1.2. Numune Hazırlama ve Protein Miktar Tayini	57
4.1.3. 2-D Jel Elektrofrez Şartlarının Optimizasyonu	58
4.1.4. İmaj Analiz Çalışmaları	58
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	73
5.1. Proteomik Çalışmaları ve Optimizasyon Süreçleri	73
5.2. Elektrofrez Koşullarının Uygun Hale Getirilmesi	82
5.3. İmaj Analiz Çalışmaları ve Değerlendirilmesi	82
5.4. Proteinlerin Tanımlanması	83
5.5. Proteomik Sonuçların Değerlendirilmesi	83
KAYNAKLAR	89

ORJİNALLİK RAPORU.....	99
ÖZGEÇMİŞ	100

SİMGELER VE KISALTMALAR

Å	Angström
ACD	Amfifilik Siklodekstrin
CE	Kapiler Elektroforez
CGT-ase	Glukozil Transferaz Enzimi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzyme-Linked immunosorbent Assay
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
EPR	Zenginleştirilmiş Kalıcılık ve Alıkoyma Etkisi
FT-MS	Fourier Transform Kütle Spektrometresi
GTP	Guanozin Trifosfat
HCC	Hepatosellüler Karsinom
HCl	Hidroklorik Asit
HGP	İnsan Genom Projesi
hnRNP-F	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (İnsan)
IEF	İzoelektrik Odaklama
IPG	Immobilize pH Gradient
k.b.	Keyfi Birim
LC	Sıvı Kromatografisi
GC	Gaz Kromatografisi
LOAC	Çip Üzerindeki Laboratuvar
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon
mMW	Ortalama Molekül Ağırlığı
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MR	Manyetik Rezonans
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NP	Nanopartikül
pI	İzoelektrik Nokta
PTM	Posttranslasyonel Modifikasyonlar
RES	Retikuloendotelyal Sistem
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SELDI	Yüzey-Zenginleştirilmiş Desorpsiyon İyonizasyon

TCA	Triklorasetik Asit
UV	Ultraviyole
1D SDS PAGE	Bir Boyutlu Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
2D SDS DIGE	İki Boyutlu Floresan Jel Elektroforez

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	α -, β - ve γ -Siklodekstrinlerin Genel Karakteristikleri	12
Çizelge 3.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
Çizelge 3.2.	Kullanılan Araç ve Gereçler	44
Çizelge 3.3.	Kullanılan Yazılım ve Veritabanı	45
Çizelge 3.4.	Kullanılan Hazır Tamponlar ve Çözeltiler	46
Çizelge 3.5.	Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler	47
Çizelge 3.6.	IEF Sistemi Uygulama Parametreleri.	51
Çizelge 4.1.	Belirlenen Spot Sayıları.	62
Çizelge 4.2.	Belirlenen ve Gruplandırılan Spot Sayılarının Karşılaştırılması.	63
Çizelge 4.3.	PDQuest™ Yazılımı ve Göz Taramasıyla ile Elde Edilen Spotların Intensite Değerleri.	72
Çizelge 4.4.	HEPG-2 Kanser Hücre Hattı için Tanımlanan Proteinler Dizini.	72

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Altın (Au) görüntüsü a) makro boyutlarda b) 12 nm boyutunda kırmızı renkte.....	7
Şekil 2.2.	Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistem olarak planlanan, nano yüzücü olarak isimlendirilen, 2000 nm uzunluğunda pervane nanorobot	8
Şekil 2.3.	Nano ilaç taşıyıcı sistemlerden bazıları a)Misel, b)Lipozom, c)Nanokapsül, d)Nanoküre, e) Dendrimer	9
Şekil 2.4.	Siklodekstrin kimyasal yapısı (n=6 alfa, n=7 beta, n=8 gama).	11
Şekil 2.5.	DNA üç boyutlu yapısı.....	14
Şekil 2.6.	Aminoasitlerin peptid bağları ile oluşturdukları polipeptid zinciri	15
Şekil 2.7.	a) Metiyonin 2-Boyutlu Kimyasal Yapısı, b) Metiyoninin 3-Boyutlu kimyasal yapısı	16
Şekil 2.8.	Protein yapıları	16
Şekil 2.9.	Proteom analizinde yaklaşımlar.	18
Şekil 2.10.	Protomik teknolojinin uygulamaları	21
Şekil 2.11.	Proteom analiz yöntemleri.....	22
Şekil 2.12.	İzoelektrik odaklama sisteminin bir görüntüsü (Protean IEF Cell 2D Cihazı ve Komponentleri, Bio-Rad™, ABD).	25
Şekil 2.13.	Ticari IPG şerit yapısı.....	26
Şekil 2.14.	Rehidrasyon tekniği ile IPG şeritlerine yüklenen proteinlerin bulunduğu odaklama tablasının IEF Cihazına yerleştirilmesi (Birinci Boyut).....	27
Şekil 2.15.	a) IPG şeritlerin kasetlere yerleştirilmesi, b) katot ve anot tamponlarının eklenmesi.	28
Şekil 2.16.	Protein içeren IPG şeritlere SDS-PAGE uygulanması (İkinci Boyut).....	29
Şekil 2.17.	Jel imaj cihazının görüntüsü (ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad™, ABD)	30
Şekil 2.18.	Farklı yazılımlarda belirlenmiş spotlara ait görüntüler.	31
Şekil 2.19.	Jel spot kesici cihazının görüntüsü (EXQuest Spot Cutter, Bio-Rad™, ABD).....	32
Şekil 2.20.	Kütle spektrometresi görünümü (ABI 5800 MALDI-TOF/TOF-MS, Applied Biosystem, ABD).....	33
Şekil 2.21.	MALDI-TOF/TOF kütle spektrometresi çalışma yapısı.	35

Şekil 2.22.	Birincil karaciğer kanseri tümörünün magnetik rezonans görüntüsü.....	38
Şekil 3.1.	Tez çalışmasında uygulanan genel metodolojinin aşamaları	40
Şekil 3.2.	IPG şeritlerin protein numunelerinin üzerine yerleştirilmesi.	50
Şekil 3.3.	IPG şeritlerin PROTEAN IEF sistemine yerleştirilmesi.	51
Şekil 3.4.	Kasetin hazırlanması ve jellerin yerleştirilmesi.	52
Şekil 3.5.	Agaroz çözeltisinin uygulanması	53
Şekil 3.6.	Üç Adet Bio-Rad™ Criterion Cell'in bağlanması ve kasetlere voltaj uygulanması.....	53
Şekil 3.7.	ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad™ İmaj Sistemi ile jellerin görüntülerinin alınması.....	54
Şekil 3.8.	Proteiner dp™ Fraction Collector Cihazı, Brucker Daltonics Görünümü.....	56
Şekil 4.1.	Bio-Rad™ protein miktar tayini kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	57
Şekil 4.2.	HEPG-2 PDQuest™ yazılımı tarafından oluşturulan 432 spotu ait sanal jel görüntüsü (pH 5-8).	59
Şekil 4.3.	C grubu jel görüntüleri.	60
Şekil 4.4.	T grubu jel görüntüleri.....	61
Şekil 4.5.	HEPG-2 Kanser hücre hatlarına ait nicel anlamda farklılaşan spotların tespitinde grupların oluşturulması ve yazılıma ait analiz ayarlarının görünümü	63
Şekil 4.6.	PDQuest™ yazılımıyla ve göz taraması ile sanal(master) jelde belirlenen tüm spotların haritalanması.	64
Şekil 4.7.	Belirlenen 432 spotun tüm gruplardaki genel görüntüleri.....	65
Şekil 4.8.	HEPG-2 hücre hattı için 402 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri.	65
Şekil 4.9.	HEPG-2 hücre hattı için 1602 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri.	66
Şekil 4.10.	HEPG-2 hücre hattı için 2502 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri.	66
Şekil 4.11.	HEPG-2 hücre hattı için 3503 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri	67
Şekil 4.12.	HEPG-2 hücre hattı için 4804 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri	67
Şekil 4.13.	HEPG-2 hücre hattı için 5802 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri..	68

Şekil 4.14. HEPG-2 hücre hattı için 8406 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri.	68
Şekil 4.15. HEPG-2 hücre hattı için 402 numaralı spot.	69
Şekil 4.16. HEPG-2 hücre hattı için 1602 numaralı spot.	69
Şekil 4.17. HEPG-2 hücre hattı için 2502 numaralı spot.	70
Şekil 4.18. HEPG-2 hücre hattı için 3503 numaralı spot.	70
Şekil 4.19. HEPG-2 hücre hattı için 4804 numaralı spot.	70
Şekil 4.20. HEPG-2 hücre hattı için 5802 numaralı spot.	71
Şekil 4.21. HEPG-2 hücre hattı için 8406 numaralı spot.	71
Şekil 5.1. Aşırı protein yüklemesi sonucu oluşan jel görüntüleri.....	75
Şekil 5.2. Kontaminantlar (tuzlar, iyonik deterjanlar) sonucu oluşan jel görüntüleri	75
Şekil 5.3. Optimize edilmemiş IEF sonucu oluşan jel görüntüleri	76
Şekil 5.4. DTT eksikliği sonucu oluşan jel görüntüsü.....	76
Şekil 5.5. Yetersiz rehidrasyon çözeltisi sonucu oluşan jel görüntüsü.....	77
Şekil 5.6. Protein toplanması ya da çökmesi sonucu oluşan jel görüntüsü	77
Şekil 5.7. Eski Iodoacemide (IAA) Kullanımı Sonucu Oluşan jel görüntüsü	78
Şekil 5.8. IPG şerit ve ikinci boyut jel arasında sıkışan hava kabarcıkları sonucu oluşan jel görüntüsü.	78
Şekil 5.9. Dikey Elektroforez ünitesinin üst tampon haznesinin (katot) sızması sonucu oluşan jel görüntüsü	79
Şekil 5.10. Karışan maddeler; rehidrasyon / numune çözeltisinde safsızlıklar sonucu oluşan jel görüntüsü.	79
Şekil 5.11. SDS jelin eşit polimerize olmaması ya da jel kasetinden sızması sonucu oluşan jel görüntüsü	80
Şekil 5.12. Proteoliz, eski reajan kullanımı ya da elektroforez boyunca büyük proteinlerin ikinci boyut jele girememesi sonucu oluşan jel görüntüleri	80
Şekil 5.13. IPG Şeritlerin jele düzensiz yerleştirilmesi, elektroforez sürecinde sıcaklığın artması, polipeptidlerin yeterince indirgenememesi, eski reajan kullanımı sonucu oluşan jel görüntüsü	81
Şekil 5.14. Yetersiz temizleme/yıkama süreçleri sonrası sonucu oluşan jel görüntüsü	81
Şekil 5.15. Seçilen 7 spota ait 'intensite x alan' değerlerine ait çubuk grafikler.	82
Şekil 5.16. PBO kodlu siklodekstrinlerin uygulanmış HEPG-2 kanser hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki bir görüntüsü.	87

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanlığın en büyük sağlık sorunlarından biri haline gelen kanser hastalığına, her yıl 14 milyon kişinin yakalanmakta ve zengin fakir ayırımı yapmadan tüm ülkeleri, yaş, cins, dil, din, ırk ayırmaksızın insanlığı etkilediği bilinmektedir. Kanser, Türkiye’de her yıl ortaya çıkan 148.000 civarındaki yeni kanser vakası ve 91.800 kanser ölümü ile önemli bir halk sağlığı sorunudur [1].

Kanser terimi, tıbbın babası olarak bilinen Yunan fizikçi Hippocrates (M.Ö. 460-370) tarafından oluşturulmuştur. Hippocrates, "carcinoma" ve "carcinoma" terimlerini "ülser oluşturan" ve "ülser oluşturmeyen tümörler" için kullanmıştır. Ayrıca; Hippocrates, benign ve malign tümörler arasındaki farkları ortaya koyan ilk kişidir [2].

Kanser, canlının belirli sistemlerinde, hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile oluşan 100'den fazla hastalık grubunu içeren genel bir tanımdır. Çok çeşitli kanser tipleri olmasına rağmen, tümü anormal hücrelerin kontrolsüz, hızlı ve aniden çoğalması ile başlar. Tedavi uygulanmaması durumunda yayılarak (metastaz) ciddi rahatsızlıklara, hatta ölüme neden olabilir [3].

Amerikan Kanser Enstitüsü, kanser tedavisi amacıyla 140.000 sentetik, 80.000 doğal kaynak (bitki, deniz organizmaları ve diğer doğal kaynaklar) ile elde edilen moleküllerin kanser tedavisi için kullanıldığını bildirmektedir [4]. Kanser hastalığının tedavisinin bilinen en önemli yöntemi kemoterapi olarak bilinen sitotoksik ilaç tedavisidir. Sitotoksik tedavi ya da kemoterapi kanserli dokuda anormal hücreleri ortadan kaldırmak ya da çoğalmasını engellemek amacıyla kontrol altına alınması için antikanser ilaçlar ya da ajanlar kullanılarak yapılan, yan etkileri olan bir tedavi yöntemidir. Kemoterapi, kanser tedavisinde tek başına yeterli olmadığı durumlarda ise radyoterapi ve cerrahi tedavileri ile senkronize olarak uygulanabilmektedir.

Vücudumuzun hayati organlarından biri olan retikuloendotelial sistemin (RES) en önemli parçası karaciğerin ana fonksiyonları olarak; madde yıkımı (yağ yakımı için safra üretimi) veya dönüştürme (zararlı amonyakın üreye dönüşümü), glikozu glikojene dönüştürerek depolama veya enerji açığa çıkarma (karbonhidrat ve lipid metabolizması), kan plazması için belirli proteinlerin üretimi (kanın osmotik basıncını

düzenleyen albümin ve globulin proteinlerini üretir), kan pıhtılaşmasını düzenlemesi (protrombin ve fibrinojen, heparin proteinlerini üretir), toksinleri vücuda daha az zararlı hale getirmek ve kan dolaşımından çıkarılmasını sağlamak şeklinde sayılabilir [5]. Deriden sonra vücudun en büyük ve rejeneratif organı olan, tüm hayati fonksiyonlarda görev alan karaciğerin sağlığı aşırı önem arz etmektedir.

Tüm Dünyada en sık teşhis edilen altıncı kanser ve ölümlü kanser vakalarının dördüncü nedeni karaciğer kanseri, kemoterapötik ilaçlarının çoğuna yapısı gereği direnir. Karaciğer kanserinde sistemik kemoterapik olarak en etkili ilaçlar, doksorubisin (Adriamycin), 5-florourasil ve sisplatin'dir. Ancak, bu ilaçlar bile sadece tümörlerin küçük bir kısmını küçültür ve yanıtları genellikle uzun sürmez. İlaç kombinasyonları ile bile, çoğu çalışmada sistemik kemoterapötik ilaçlar, hastaların daha uzun yaşamasına yardımcı olamamıştır [6]. Bu nedenlerle karaciğer kanseri tedavisinde farklı yöntemler ve terapötik ilaçlar geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Etkin maddenin ya da onu taşıyan partiküllerin; boyutları, yüzey modifikasyonları aracılığıyla uzun sirkülasyon sürelerine sahip olması ve dolayısıyla ilgilenilen alana hedeflemek için, çap olarak nano boyutta, 100 nm veya daha az olmalıdır. Makrofajlar sonucu oluşan klirensi azaltmak için hidrofilik bir yüzeye sahip olmalıdırlar [7].

Nanopartiküllerin; RES organlarının alıkoyma etkisinin azaltılması, vücutta arttırılmış kalıcılık ve tümör spesifik hedeflemenin arttırılmış geçiş ve alıkonma (EPR) etkisi arttırılması amacıyla çalışmalar yapılmaktadır [8, 9].

Nanopartikülleri kanserli dokuya hedeflemede, optimal hedef ajanı tanımlanması ve seçimi en büyük zorluklardır. Hedef hücrelerin veya ligandların reseptör endositozunu tetiklemek için bağlanma yeteneğinin en uygun şekilde sağlanması gerekir. Nanopartiküllerle yapılan çalışmalarda, karaciğer hedeflemesi için umut verici bir reseptör asialoglikoprotein reseptörüdür (ASGP-R, galaktoz reseptörü). Laktobionik asit, biotin ve polietilenglikol içindeki galaktoz parçasındaki nanopartiküllerin sabit bir oranda, bir ay boyunca A11-trans-retinoik asidin in-vitro salımı (bir çeşit kanser ilacı) yaptığını göstermektedir [10].

Kendine birçok kullanım alanı bulmuş bir kimyasal olan, monomer isimli küçük boyutlu moleküllerin birbirini tekrar ederek eklenmesiyle çok uzun zincirli moleküllerden oluşan,

doğal ya da sentetik olarak elde edilen polimerler; tıp, eczacılık, mühendislik, endüstri başta olmak üzere birçok önemli alanda yer edinmiştir [11].

Polimerlerden oluşan nanopartiküllerin, istenilen bölgeye etken maddenin iletilebilmesi başka deyişle kontrollü salımın (aktif ya da pasif hedeflendirme) ile yapılması amacıyla polimer yüzeyinin ve boyutlarının modifiye edilebilmesi, biyouyumlu, biyobozunabilir olabilmeleri, toksisiteyi azaltabilmeleri, suda çözünürlükleri düşük ilaçların çözünürlüklerinin ve dokudaki ilaç etkisinin arttırabilmesi nedeniyle ilaç taşıyıcılar için en yaygın araştırılan sistemlerdir [12, 13]. Bu avantajlardan yola çıkarak yapay olarak sentezlenen, polimerizasyon için kullanım alanı teşkil eden amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerin (ACD) ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasıyla yüksek oranda lipofilik ilaç enkapsüle etme, kontrollü salım profili sağlama, ilacın fizyolojik koşullarda stabilitesini koruma ve ilaçların mukozal penetrasyonunu ve hücre alımı arttırma özelliklerinin bulunduğu yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Kanser ilaçlarının biyoyararlanımının ACD'lerle arttırılması ve daha düşük dozda etkin bir şekilde kanser dokularına taşınmasına yönelik çalışmalar son yıllarda giderek önem kazanmaktadır [14-16]. Ayrıca; ACD'ler spontane olarak kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyici (antiproliferatif) etkileri bulunmaktadır. Pozitif ve negatif yüzey yüküne sahip iki farklı ACD ile yapılan çalışmada mesane, serviks, meme (sırasıyla MB49, HeLa, MCF7) kanserlerinin hücre hatlarında apoptoza yol açtığı ve bu etkinin zamana ve hücre membran integritesinin bozulmasına bağlı olduğu deneysel olarak gösterilmiştir [17]. Fakat; ACD nanopartiküllerin antikanser etki mekanizmasının; moleküler düzeyde, hücre hatlarıyla ve hücre yapısında bulunan protein, lipid kompleksleriyle nasıl meydana geldiği ile ilgili çalışmalar sınırlıdır [18].

Tıpta; genetik bilgiyi kodlayan en küçük DNA birimi gen olarak adlandırılır. Bir organizmanın DNA'sında genetik bilgilerin toplamı genom olarak adlandırılmakta olup; genom tarafından kodlanan proteinler ise 1995 yılında ilk defa proteom olarak ifade edildi [19].

ACD nanopartiküllerin antikanser etki mekanizmasının aydınlatılması amacıyla yapılan proteom analizinde en önemli faktörler, proteinlerin saflaştırılması ve ayrıştırılmasıdır. Bu amaçla en çok tercih edilen ve yüklü bir molekölün elektrik alan içerisinde, kutuplar arasında hareket ederek yüklerine, büyüklüklerine göre ayrılması sağlayan, izoelektrik odaklama (IEF) ve proteinlerin kütlelerine göre ayrıldığı sodyum dodesil sülfat

poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) aşamasından oluşan iki boyutlu jel elektroforez (2D Elektroforez) tekniği kullanılmaktadır. Saflaştırılan ve ayrıştırılan proteomların analizi amacıyla kütle spektrometrisi ve yazılım teknolojilerinden de faydalanılarak proteomik çalışmalar yapılmıştır.

Proteomik çalışmalar; proteomların tümünün analiz edilmesi, diğer moleküllerle etkileşimi, tanımlanması (yerleşim, miktarı) ile ilgilenen çalışmalardır. Proteomik çalışmaları çoklu protein sistemlerini inceler. Sistemlerin karşılıklı etkileşimlerini ve sistemlerde bulunan farklı proteinleri ve miktarlarını araştırır.

Bu çalışmada, proteomik yaklaşımlar ve çalışmalar sonucu elde edilen verinin değerlendirilmesi ile kanser ilaçlarının taşınmasında nanoilaç materyali olarak öne çıkan ACD'lerin karaciğer kanseri üzerine iyileştirici etki mekanizması incelenecek olup; kanser ilacı etken maddesi yüklenmeden ACD'lerin hücre içerisine ulaştıktan sonra nanopartikülün (NP) anti proliferatif (çoğalmayı önleyici) etkisi hakkında daha fazla bilgi edinilebilecektir. ACD'lerin etki ettiği metabolik yolaklar ve etki mekanizmaları değerlendirilerek daha etkin, yüzey yüklü ve reseptör–ligand ilişkileri ile hedeflendirilmiş yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanması sağlanabilecektir.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile etken madde yüklemesi yapılmadan ACD'lerin karaciğer kanseri hücre hatlarından olan HEPG-2 hücre hatlarına için (kontrol ve tedavi grupları oluşturarak) uygulanması sonucu spesifik proteinlerin (apoptozla ilişkili protein vb.) miktar değişimi ve protein karakterizasyonu yapılarak ACD'lerin moleküler düzeyde çoğalmayı önleyici etki mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bilim ve Teknolojinin Nanoteknolojinin Gelişimi Üzerine Etkisi

Bilim: evren, yeryüzü, canlı ve cansız varlıklar, insan ve toplum üzerine deneylere ve gözleme bağlı olarak yasalara ulaşan düzenli bilgidir. Gözlem ve deneylerin her canlıya göre farklılaşması nedeniyle hipotezler değiştirilebilir. Hipotezlerin doğruluğuna ve tutarlılığına göre geçerliliği artar. Böylece bilim gelişerek sınırlı imkan ve sezgilerle evrenin sorularına cevap bulmaya çalışır [20].

Teknoloji insanların bilimi kullanarak hayatlarını daha kolay hale getirmek için yaptığı her türlü teknik işlem, kullanılan yöntem ve materyal genel olarak “teknoloji” olarak tanımlanır. Sonsuz insan ihtiyaçlarına paralel olarak teknoloji de gelişim kaydetmiş olup; tekerleğin icadı, matbaa, telefon ve internet toplumların kaderini değiştirmekte önemli bir rol oynamıştır. Günümüzde nanoteknolojiyi, parçacık teknolojilerini, nükleer teknolojik gelişmeleri, hatta yapay zekânın insanları yönetebileceğini ve insanlığın nasıl bir reaksiyonla karşı karşıya kalabileceğini düşünmekteyiz.

2.1.1. Bilim ve Teknolojinin Gelişiminden Nanoteknolojinin Günlük Hayatımıza Girişine Uzanan Kronolojik Tarih

İnsanlık tarihi, M.Ö. 3 milyon yıl ve daha gerisinden başlar. Teknolojinin ilk kanıtı olarak bilinen çakıl taşlarından aletler kullanmasıyla birlikte insanlar gözlemleyerek hayatlarını kolaylaştıracak yöntemler araştırmışlardır. M.Ö. 2500’lerde temel matematiksel hesaplamalar yapmaya başlamıştır. M.Ö. 1000’lerde bilim Yunan medeniyetinde gelişmeye başlamış olup başta felsefe olmak üzere birçok düşünce gelişmiştir. Materyalizim ve rasyonalizm gibi kavramlar ortaya çıkmıştır. Böylece Milattan 100 yıl sonrasına kadar bilim Yunan medeniyetinde astronomi, doğa olayları ve meteoroloji ilgisiyle gelişme göstermeye başlar. Fakat kilisenin baskısı nedeniyle bilim bayrağı Pers ve Hint medeniyetlerine geçer. Bilim M.S 600’lerde ise İslamiyetin doğuşuyla birlikte, yaklaşık 600 yıl gelişimine devam etmiştir.

Bilimin gelişimi skolastik düşünörlere rağmen 15. yüzyıl Avrupa Rönesansı ile kilisenin baskısı azalır. Rönesans döneminde bilim adamı, tarihçi, sanatçı yetişir.

Rönesans döneminin en önemli aktörlerinden biri Leonardo da Vinci (1452-1519)’ dir.

Nicolaus Copernicus'un (1477-1543) evrenin güneş merkezli yaklaşımı sadece modern bilimin başlangıcı gösterilir. Copernicus'un fikirlerinin büyük bir bölümünü Pythagoras ve Aristoteles'den alır. Ayrıca Copernicus insanın evrendeki yerinin belirlenmesinde büyük rol oynar. Aydınlanma dönemi ve modern bilimin adımları atılarak yeni bir çağ başlar. Bu çağda Johannes Kepler (1571-1630), Galileo Galilei (1564-1642), Isaac Newton (1642-1727) ve Leonard Euler (1707-1783) gibi bilim insanlarının modern bilime katkılarıyla gelişen çağda bilimin gelişmesiyle ortaya çıkan teknolojiler dönemi başlar. Atölyeler yerlerini laboratuvarlara, araştırma-geliştirme (Ar-Ge) birimlerine ve fabrikalara devreder.

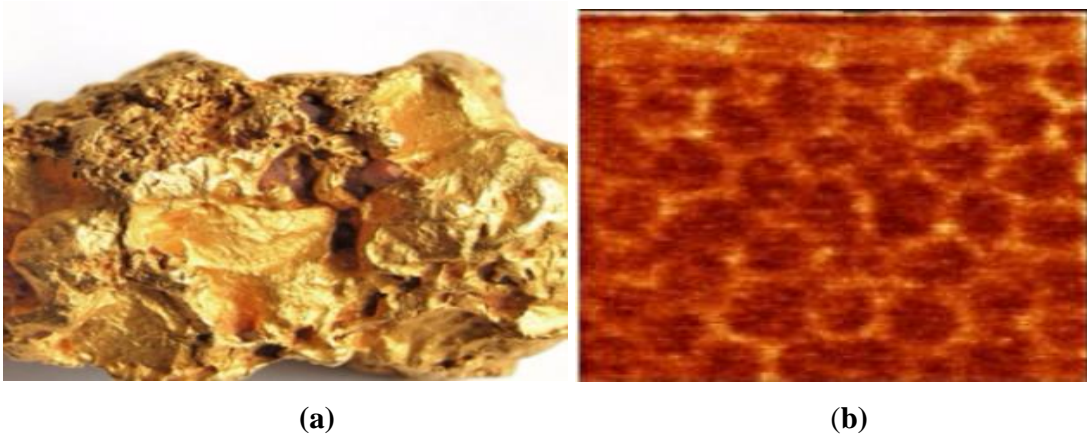
Avrupa kıtasında ticari sömürgeciliğin artmasıyla bilim insanları ticari uygulamalara yönelir. Thomas Edison'un bilimsel gelişmeleri ticari uygulamalara dönüştürerek gerçekleştirdiği elektrik teknolojisi (elektrik lambası, güç santrali 1887), Henri Ford'un 1908 yılında seri otomobil üretmesi 'kütlesel üretim' terimini, 1895'de Röntgen'in X ışınları keşfi ve doğal radyoaktivitenin keşfi (1896), Thomson'un elektronu keşfetmesi, Planck'ın kuantum kavramını ortaya atması, Einstein'ın özel görelilik teoremini ve foton tanımını (1905) ve genel görelilik teoremini (1920) ortaya koyması örnek olarak verilebilir. Malzeme bilimi, madde fiziği ve elektroniğin gelişmesi sonucu bilgisayar ve telekomünikasyon teknolojileri ortaya çıkmıştır. Yazı, parşömen ve matbaanın icadı ile iletişim, telekomünikasyon teknolojileri ile evrilmiştir. Bilgi işleme ve enformatik aracılığıyla yazılım, opto-elektronik ve fotonik gibi yeni teknolojiler ortaya çıkmıştır. Transistörün geliştirilmesi ile devam eden yarım asırlık "ileri teknolojiler" oluşmuştur. Nükleer teknolojiler, gen ve moleküler biyoloji ile üretim sistemindeki değişimler ve gelişmeler ortaya çıkan ürünlerin boyutlarında da zamanla bir minimizasyona gidilmesine yol açmıştır [21].

2.2. Nanoteknoloji

Amerikan Fizik Derneği'nde, 1959 yılında nanoteknolojide yapılabilecek teknolojilere değinilmesi (daha iyi elektron mikroskobu, bilgisayarları minyatürleştirme, sürtünme sorunlarına çözümler, yüzlerce minik el, büyük bilgilerin küçük yapılarda depolanmasını sağlama gibi) ve 'Aşağıda çok yer var' sözü ile Richard Feynman (1918-1988)'in temellerini attığı nanoteknoloji terimi; öncelikle 1974'de Norio Taniguchi'nin "Temel Nanoteknoloji Konseptleri" makalesinde atom ya da molekül ayırma, birleştirme ve bozma süreci olarak tanımlanmıştır [22, 23]. Sonuç olarak maddenin en küçük yapı taşı olan atom ve moleküllerin biraraya getirilerek nano (birimin milyarda biri) boyutlarda işlevli yapıların oluşturulması ya da nano boyutlu yapıların makro büyüklükte yapılardan minyatürleştirilerek üretilmesi ya da nanometre cinsinden ölçülebilen en az bir karakteristik boyuta sahip fonksiyonel yapıların tasarımı, inşası ve kullanımı nanoteknoloji olarak özetlenebilir.

Nanoteknoloji; tıp ve eczacılık, elektronik, gıda, enerji, çevre, uzay araştırmaları gibi alanlarda kullanım alanları ve potansiyel teknolojiler üretmektedir [24].

Materyaller küçük boyutlarda fiziksel, mekanik, kimyasal, elektriksel, optik olarak farklı özellikler gösterebilirler (Şekil 2.1). Nano boyutlarda yüzey alan, hacim, renk değişiklikleri, iletkenlikler, kuantum etkileri gözlemlenebilir [25].



Şekil 2.1. Altın (Au) görüntüsü a) makro boyutlarda b) 12 nm boyutunda kırmızı renkte [26]

2.3. Nanotıp

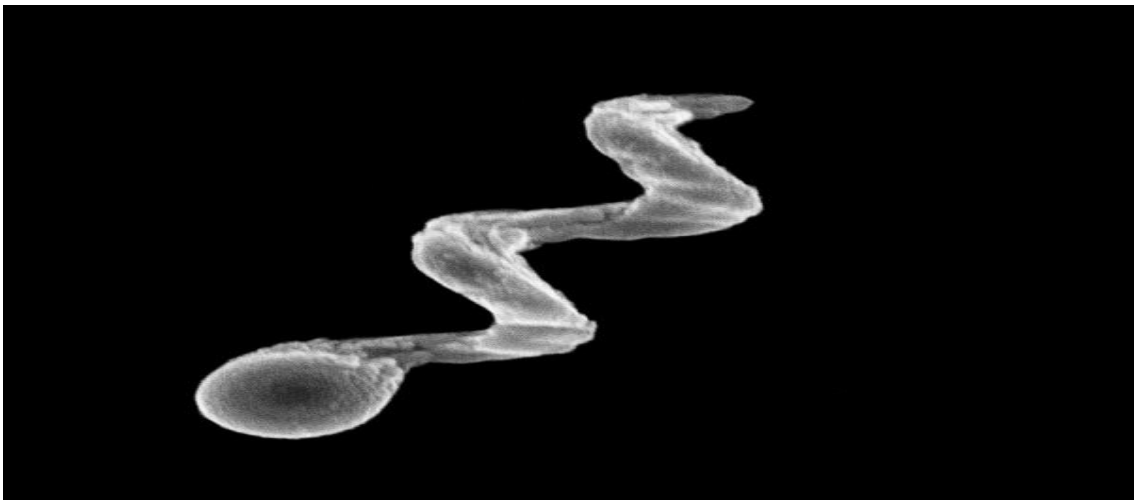
Nanoteknoloji tıp biliminde; hücrenin, doku ya da organın ihtiyacını veya sorununu nano boyutta belirleyen, gerekli yapıları temin edebilen, istenmeyen maddeyi nano boyutta yok

edebilen ya da canlı sistematiğini taklit edebilen nanomalzeme ve nanocihaz üretimini, nano yüzey işleme ve geliştirmeyi hedeflemektedir.

Nanotıp; hastalıkların ve yaralanmaların çok küçük boyutlarda tanı, teşhisi ve tedavi edilmesi, canlı sağlığının devamlılığının korunması için tıp, eczacılık, veterinerlik gibi biyolojik alanlarda kullanılması olarak tanımlanır [27]; Protein, DNA gibi yapıların nano boyutlarda olması vücutta bulunan boyutsal geçiş-bariyer mekanizmalarında etkisiyle nanoteknolojinin önemli uygulama alanlarından biri haline gelmiştir.

Nanotıp, nanopartiküllerle kontrollü ilaç salımından, nano boyutlu yapay doku iskelelerine, teşhis ve tedavi amaçlı nanorobotlara kadar çeşitli uygulamaları içermektedir (Şekil 2.2). Spesifik özellikleri sayesinde organik veya inorganik protein nano yapılar, tıp ve eczacılık başta olmak üzere sağlık alanında birçok uygulama alanı edinmiştir. Bu yapılar; çözünürlüğü arttırılmış ilaç, bozulmaya karşı koruma, toksisitenin azalması, farmakokinetik özelliklerinin düzenlenmesi, biyoyararlanımın arttırılması, uzatılmış ilaç etkisi, kontrollü salım yapılabilmesinin sağlanması gibi birçok avantaja sahiptir.

Freitas ve arkadaşları, 'Pharmacyte' adı düşünülen, 2006'da nanoteknoloji kullanılarak kendi kendine enerjisini üretebilen, bilgisayar kontrollü nanorobot tasarımından söz etmektedir. Bunun gibi nano aygıtlar aracılığı ile hassas bir şekilde taşınan ilacın canlıya ne zaman, ne kadar sürede, hangi hücreye iletilebileceğinin kontrolü mümkün olabilir [28].

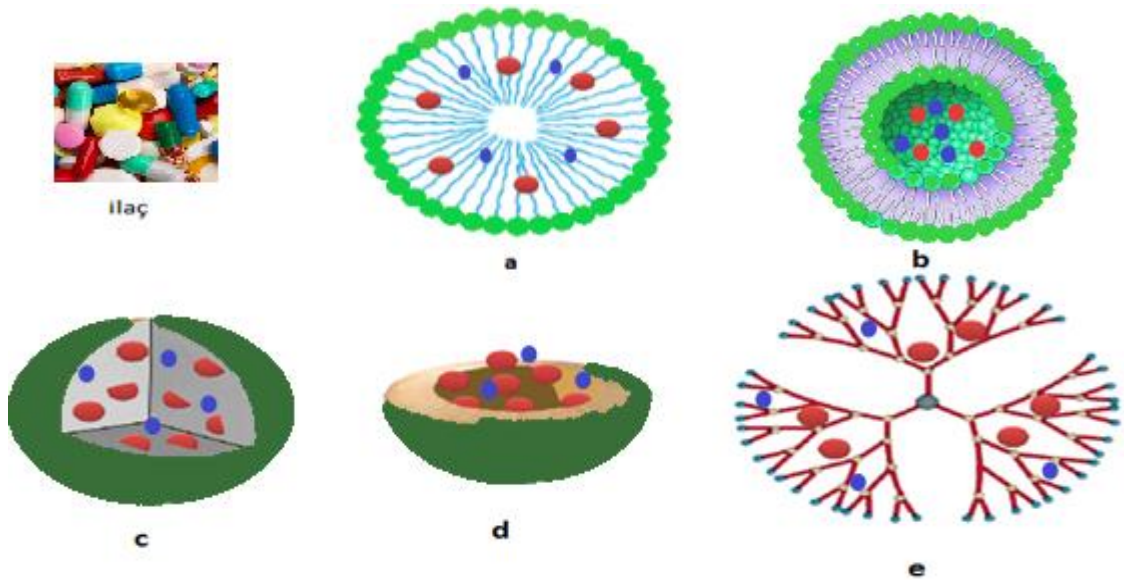


Şekil 2.2. Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistem olarak planlanan, nano yüzücü olarak isimlendirilen, 2000 nm uzunluğunda pervane nanorobot [29].

2.3.1. Nanoteknolojinin Tıptaki Kullanım Alanları

Nanoteknolojinin sağlık ve tıp alanında kullanım alanları her geçen gün gelişmekte ve artmaktadır. Nanotıp olarak isimlendirilen bilim dalında potansiyel oluşturan ve uygulama alanı bulabilen bazı örnekleri aşağıda sıralanmıştır:

- Eczacılık: İlaç taşıyıcı sistemler (nanopartiküller, dendrimerler, lipozomlar vb.) (Şekil 2.3), ilaç kaplama, yapay bağlayıcılar, nanofarmasötikler [30],
- Moleküler tıp: Farmakogenomi, gen terapisi,
- Tanı, teşhis ve tedavi: Nanoçipler, nano-biyosensörler, LOAC, quantum noktaları, nano terapötikler farmasötikler, radyofarmasötikler,
- Biyoteknoloji ve biyrobotikler: Doku mühendisliği (yapay doku ve organlar), nanobiyoteknoloji [31].



Şekil 2.3. Nano ilaç taşıyıcı sistemlerden bazıları a) Misel, b) Lipozom, c) Nanokapsül, d) Nanoküre, e) Dendrimer.

2.3.2. İlaç Taşıyıcı Sistemler

Mikron ya da mikron altı boyutlarda koloidal yapıda preparatlardır. İlaç kullanımında sıklıkla kullanılan konvansiyonel yöntemler (kapsül, tablet vb.) ağızdan alımı veya ilacın deriye enjeksiyonu şeklindedir. Bu yöntemler sık ve tekrarlanan dozlarla ilaç alımını gerektirirler. Alternatif dozajlamaya izin vermek için taşıyıcıların geliştirilmesi gerekir. Taşıyıcı, hedeflenen hız ve periyodik zamanda etken maddenin salımına etki eder.

Hedeflenen bölgeye, istenen hızda, sürede etken maddelerin salımının sağlanması amacıyla kontrollü salım formülasyonlarında genellikle polimerik bir madde olan taşıyıcılar kullanılır. Örneğin, kontrollü salım sistemlerinde kullanılan taşıyıcıların çoğunun yapı taşı polimerlerdir. Polimerler, suda çözünebilir ya da çözünürlüğü artırabilen, boyutlarının ve yüzeyinin hedeflendiricilerle modifiye edilebilmesi, biyoyumlu ve biyobozunur özelliğe sahip olmaları nedeniyle tercih edilirler [32].

Geleneksel taşıyıcılar yalnızca ilaç moleküllerini genel dolaşıma sunarken; nano boyutlarda sentezlenen taşıyıcılar yüzeylerine yapılan modifikasyonlar ile sistemdeki taşınım sırasındaki yarı ömürlerinin ayarlanması, immün sistemden gizlenmesi, ilacın ilerlediği yolların izlenmesi için manyetik veya floresan madde bulunması, taşıyıcının ilacı hücrenin içine iletmek amacıyla programlanması veya istendiğinde DNA vektörlerinin de taşınmak üzere programlanması olasıdır [33].

Kemoterapide faydalanılan antikanser ajanların (paklitaksel, doksorubisin, fluorourasil, antineoplastik ajanlar vb.) çoğunun sulu çözeltilerde çözünürlüklerinin çok düşük olması ve ticari preparatlarda kullanılan taşıyıcıların istenmeyen sitotoksik özellikleri nedeniyle ve sudaki çözünürlüklerinin artırılması amacıyla; yardımcı çözücüler, emülsifikasyonlar, yapısal modifikasyon (yarı sentetik paklitaksel), taşıyıcı aracılı yaklaşımlar (lipozom, nanopartikül vb.) ilaç kompleksi (siklodekstrin) vb. çözümler önerilmektedir [34].

Etkin madde olan antikanser ajanlarının organizmaya taşınmasında çözünürlük probleminin önlenmesi amacıyla formülasyonlarda solventler kullanılabilir. Fakat bu yardımcı solventlerin nörotoksisite, duyarlılık reaksiyonları gibi oluşabilen ciddi yan etkileri yok etmek amacıyla sulu çözeltilerde düşük çözünürlüklü olan antikanser ajanlarının farklı taşıyıcı sistemlerle taşınması için seçenek olabilecek yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır [35].

Bir antikanser ajan olan paklitaksel sulu çözeltilerde zayıf çözünür, fakat alkoller gibi birçok organik çözücü içinde çözünür. Bu nedenle, antikanser ajanı daha gelişmiş formülasyon stratejilerine ihtiyaç duyar. Günümüzde paklitakselin ticari preparatlarında taşıyıcı olarak mevcut formülasyon Chremophor EL (polyethoxylated castor oil) ve etanol içerir. Ancak Chremophor EL toksiktir ve hipersensitivite reaksiyonları, nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi yan etkiler gösterir [36].

Sonuç olarak; kemoterapide kullanılan antikanser ilaçların seçici olmayan toksisitesi ve antikanser ajanların çoğunun suda çözünürlüklerinin çok düşük olması nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine ve avantajlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3.3. Nanopartiküller

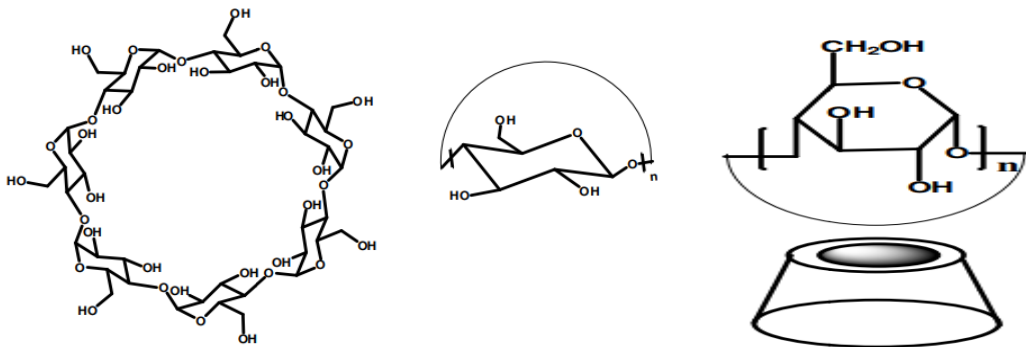
Genel anlamda; en az bir boyutu 1-100 nm aralığında bulunan partiküllerdir. Bir boyutu 100 nm altında olanlara nanosheet, iki boyutu nanotüp, üç boyutu 100 nm altında olanlar ise nanopartikül olarak adlandırılır [37, 38].

Partiküller temel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

- Yarı iletken temelli nanopartiküller (altın, kuantum noktaları, demir oksit)
- Metal temelli nanopartiküller (nanoshell, nanosticks, süperparamagnetik demiroksit nanopartiküller),
- Karbon temelli nanopartiküller (fuleren, çok katmanlı karbon nanotüpler vb.) [39].
- Polimerik nanopartiküller: sentetik polimerler (polilaktik asit, polikaprolakton, polimalik asit, poliglutamik asit ve kopolimerleri) [40]; doğal polimerler (proteinler, aljinat, jelatin, albümin, nükleik asitler, polisakkaritler (kitosan), oligosakkaritler (siklodekstrin)).

Siklodekstrin Nanopartiküller

Polimer temelli nanopartiküller biyobozunur ve biyouyumlu olması gibi özellikleri nedeniyle ön plana çıkmaktadır. Ayrıca kimyasal yüzey modifikasyonlarıyla kontrollü ilaç salımı ve farmakokinetik kontrol sağlarlar [41, 42]. Doğal ve sentetik yapıda olabilirler.



Şekil 2.4. Siklodekstrin kimyasal yapısı (n=6 alfa, n=7 beta, n=8 gama).

Nişastanın CGT-ase enzimi ile katalizlenerek parçalanması sonucu Şekil 2.4'de gösterildiği gibi halkalı molekül yapıda olur. Konik yapıdadırlar. İ kaviteleri hidrofobik yapıya sahiptir. Dış yüzeyde ise tam tersi bir yapı hakimdir. Sterik engel nedeniyle, CD'ler için en az altı glukopiranoz ünitesinin α -1,4 bağlarıyla bağlanması gerekir. Glukopiranoz sayısı yedi olanlar β -CD'ler, sekiz glukopiranoza sahip olanlar γ -CD'ler isimlendirilmekte; düşük kompleks oluşturma ve sudaki çözünürlük artışı özellikleri nedeniyle çok sayıda glukopiranoz içeren CD'ler tercih edilmemektedir (izelge 2.1) [43]. Bazı siklodekstrinlerin genel karakteristikleri izelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1: α -, β - ve γ -Siklodekstrinlerin Genel Karakteristikleri

Parametre	α	β	γ
Glukoz Sayısı	6	7	8
Ortalama Moleküler Ağırlık (mMW)	972	1135	1297
Koni Oyuk apı (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Sudaki öznrlk (g/100mL ⁻¹) 25C ⁰	14.5	1.85	23.2
Suda Kristal Formları	Hexagonal Tabakalar	Monoklinik Parallelogram	Kare Prizma

CD'lerin lipofilik etkin maddelerini sulu çözeltide tutarak zar geçişini sağlayan birer taşıyıcı gibi işlevlerinin olduğu bildirilmiş olup lipofilik hücre zarının hidrofilik CD'lere olan afinitesinin düşük olmasından dolayı, CD'ler sulu dış membranda kalmakta ve yeteri derecede lipofilik olan etken maddelerin hücre içine alınmasını arttırmaktadır [44].

ACD'ler doğal CD'lerin eczacılık uygulamalarındaki bazı sınırlamalarını azaltmak ya da yok etmek amacıyla sentezlenmiştir. Bu amaçla; doğal siklodekstrinlerin ciddi yan etkisi olan nefrotoksisiteyi yok etmek, eritrosit yıkımını engellemek, CD'lerin biyolojik zarlardan geçişini kolaylaştırmak, CD'lere kendiliğinden yapılanmasını sağlayarak kolloid ilaç taşıyıcı sistem oluşturmak vb. görevleri olduğu söylenbilir.

ACD'lerin yüzey aktif özelliklerine alifatik zincirlerin yapısı etki etmektedir. ACD'ler herhangi bir sürfaktan veya makromolekül kullanılmadan kendi kendine nanopartikül

yapısı oluşturabilmektedir. Bu özelliği sayesinde nanopartikül hazırlanmasında tercih nedenidir [45].

Kendiliğinden nanopartikül oluşturabilme özelliğine sahip ACD'ler nano ölçekte ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır [46]. ACD nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Kontrollü ilaç salımı sağlarlar.
- İlacı çevresel faktörlerden korurlar.
- İlacın absorpsiyonu ve biyoyararlanımını artırır.
- CD'ler hidrofobik iç kavitealarında ilaçları hapsederek, onların çözünürlüklerini artırır,
- İlacın kötü tat ve kokusunu maskelerler.
- İlacın stabilitesini artırır,
- İlacın yan etkilerini azaltır.

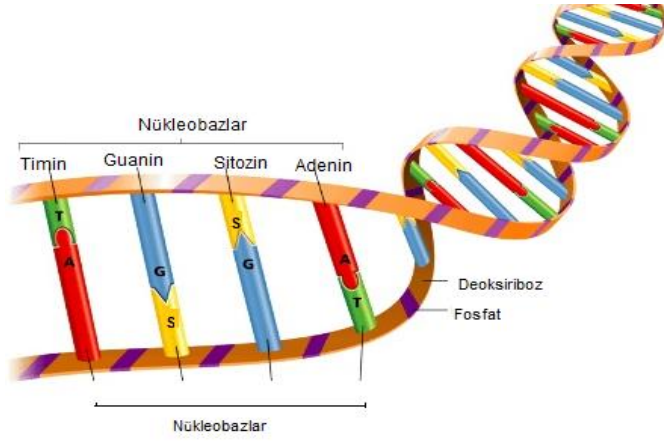
Ayrıca ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan CD'lerin kendiliğinden kanser hücrelerinde çoğalmayı önleyici (antiproliferatif) etkileri bulunmaktadır [47].

Toksisiteyi belirleyen en önemli etken doz miktarı olmakla birlikte ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan dozda ACD'ler toksik etki göstermemektedir. Yapılan çalışmalarda ACD'lerin tek başına (içinde paklitaksel, sisplatin vb. kanser ajanları bulunmadan) kanser hücrelerine karşı davranışları incelenmiş ve tek başına da antikanser aktivitesi ve apoptotik etkilerinin (programlı hücre ölümü) olduğu gözlemlenmiştir [48].

Son dönemlerde, ACD nanopartiküllerinin bu özelliklerinden faydalanılarak antikanser ajanlarının taşınmasında birçok çalışma yapılmaktadır [49, 50, 51].

2.4. Gen, Protein, Genom ve Proteom Tanımı

Deoksiribonükleik asit (DNA) genetik bilgiyi taşıyan, iki uzun polimerden (ester bağları, şeker ve fosfat grupları) oluşan nükleik asitlerdir. Her bir şeker grubu nükleobaz adı verilen (adenin, guanin, sitozin, timin, urasil) moleküllerin birleşmesi ile nükleotid olarak adlandırılan birimleri oluşturur (Şekil 2.5). Nükleobaz dizilimi genetik bilgiyi kodlar.



Şekil 2.5. DNA üç boyutlu yapısı.

Genetik bilgiyi kodlayan en küçük DNA birimine gen adı verilir. Gen kalıtımda rol oynayan, genetik, biyokimyasal, fizyolojik durumları kontrol edici, düzenleyici ve fonksiyonel olan birimlerdir [52]. Bir organizmanın DNA'sında kayıtlı tüm genetik bilgilere ise genom olarak isimlendirilmektedir [53].

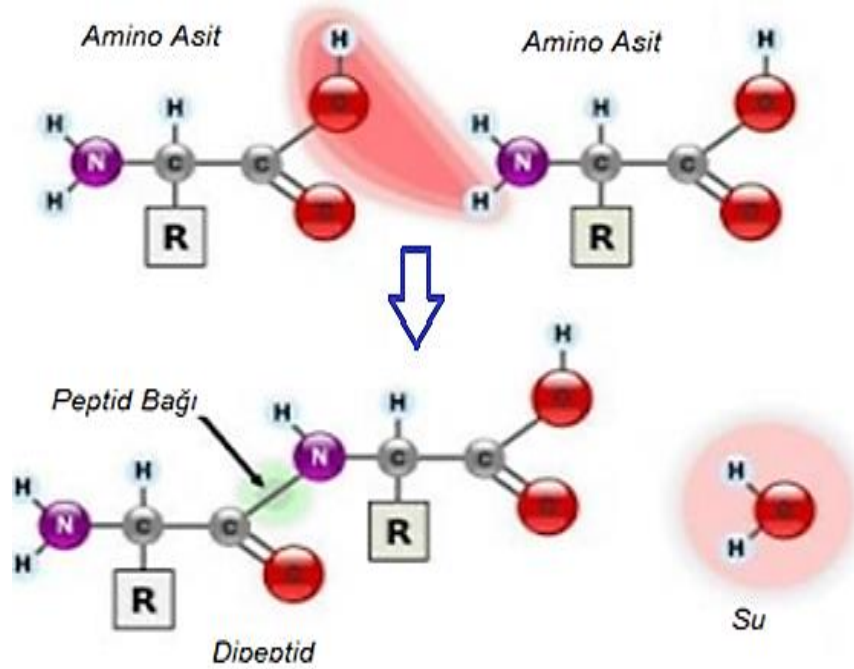
DNA'da bir amino asidi kodlayan üçlü nükleotit serilerinden herbirine genetik kod adı verilir. Bu koda göre oluşturulan mesajcı ribonükleik asit (Mrna)'daki üçlü nükleotit grubu kodon olarak tanımlanmıştır. Her kodon bir amino asidi belirler [54].

Kalıtsal tanımlar sırasıyla; baz, nükleozit (fosfat hariç), nükleotid, kod (kodon, antikodon), gen, DNA, kromozomdur. mRNA molekülünde 64 farklı kodon olmasına rağmen amino asit çeşidi 20'dir. Bu nedenle belirli bir amino asit, birden çok kodon tarafından tayin edilebilmektedir [55].

Proteinleri kodlayıcı gendeki baz dizileri yoluyla DNA'da bulunan genetik bilginin mRNA polimerine yazılması (transkripsiyon), mRNA'daki baz dizisinin de hücrenin protein sentez yerleri olan ribozomlarda amino asit dizisine çevrilmesi (translasyon) ile yeni proteinler oluşur [56].

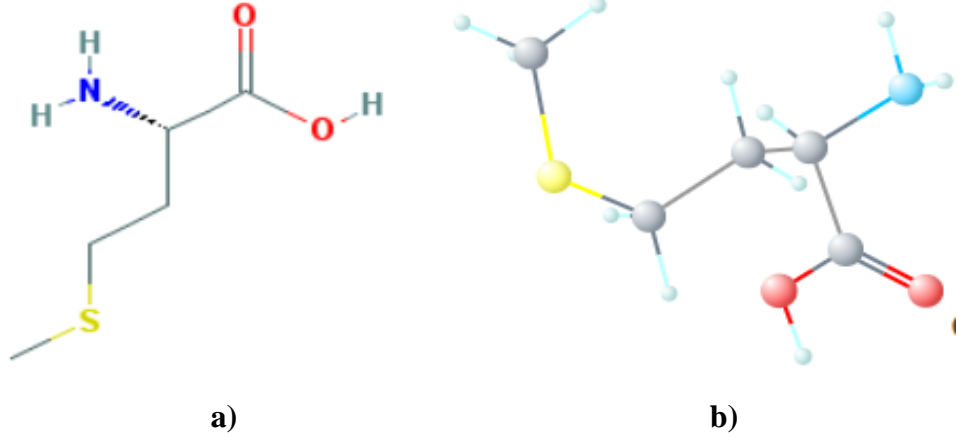
Proteinlerin temeli olan aminoasitler, hem asit özellikli karboksil (-COOH) ve hem de baz özellikli amino (-NH₂) grubunu barındıran kimyasal bileşiklerdir ve α -C'a bağlanma sırasına göre adlandırılırlar. R- gruplarının fizikokimyasal özelliklerine göre (hidrofilik, hidrofobik, asidik, bazik, aromatik vb.) gruplandırılırlar. Doğada yaklaşık 300 çeşit amino asit vardır. Standart amino asitler diye sınıflandırılan 20 tanesi, karakteristik diziliş ve sayıyla düz bir zincirde kovalent olarak (peptid bağları ile) bağlanarak lineer polimer

olan proteinleri oluştururlar (Şekil 2.6). Kısaca, proteinler α -amino asitlerin polimerleşmesi ile oluşmuş; iplik ya da yumak şeklinde moleküllerdir. Hücrenin üstlendiği çeşitli işlevlerde, yapısal ve fizyolojik olarak görev alırlar. Hücrelerin zarında lipitlerle birlikte; enzimlerin ve hormonların yapısında bulunurlar.



Şekil 2.6. Aminoasitlerin peptid bağları ile oluşturdukları polipeptid zinciri [57].

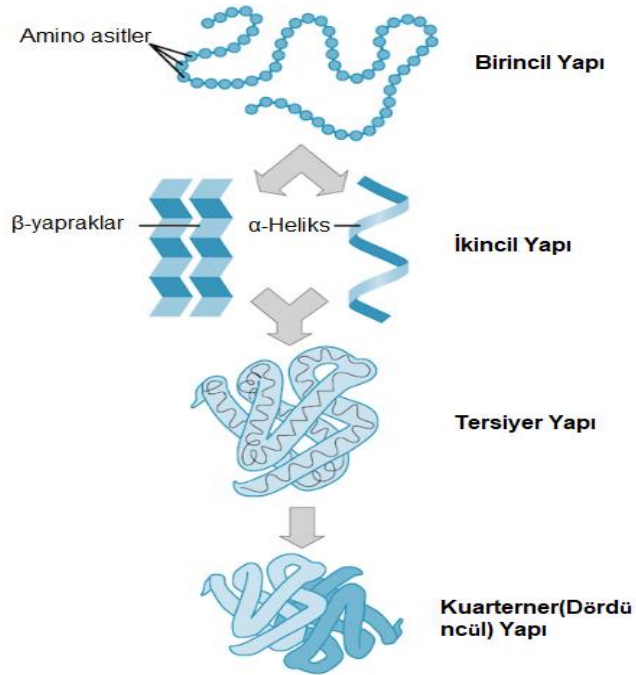
Protein element analizi: C (% 50-55) S (% 0.2-3.0), N (% 12-19), O (% 20-23), H (% 6-7)'dir. Bunların dışında Fe, Zn, Cu, P barındırmaktadır. Yağlardan ve karbohidratlardan N varlığıyla ayrışmaktadır. Örnek olarak; vücuttaki yağların metabolik yakılmasını hızlandıran lipotropik molekül olan apolar aminoasit metiyonin kimyasal yapısı Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7. a) Metiyonin 2-boyutlu kimyasal yapısı, b) Metiyoninin 3-boyutlu kimyasal yapısı [58].

Proteinlerin dört yapısal düzeyi tanımlanmıştır:

- Birincil yapı,
- İkincil yapı,
- Üçüncül (tersiyer), yapı
- Dördüncül (kuarterner) yapı (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Protein yapıları [59].

Lineer polimer (polipeptid) zinciri, proteinin birincil yapısı olarak tanımlanır. Birincil yapı, polipeptid zincirinin biyolojik olarak aktif proteinlere dönüşebilmesi için üç boyutlu yapısını belirler. Birincil yapıdaki amino asit farklılıkları proteinin üç boyutlu fonksiyonunu etkileyebilir.

Proteinin ikincil yapısı, tekrarlanan katlanmalarla tanımlanır. Bu katlanmalar, polipeptid boyunca düzenli aralıklarla kurulan hidrojen bağlarıyla oluşur. İkincil yapılar α -heliks ve β tabakadır. α -heliks, her dört amino asitte bir kurulan kovalent olmayan H- bağları ile şeklini koruyan kıvrımlı bir yapıdır ve kıvrımlı yapı dayanıklılık sağlamaktadır. β -tabaka yapısında omurganın paralel bölgeleri arasında H- bağları oluşmuştur. İkincil yapı katlanmalarında kovalent olmayan iyonik bağlar da bulunur.

Bir sonraki yapı, protein molekülünün üç boyutlu yapısıdır. α -sarmal ve β -yaprak birlikte hidrofobik kalıntıların sudan uzaklaştırılması nedeniyle katlanırlar. Posttranslasyonel modifikasyonlar (protein biyosentezinin son adımlarında kimyasal değişime uğraması) üçüncül yapı aşamasında gerçekleşir.

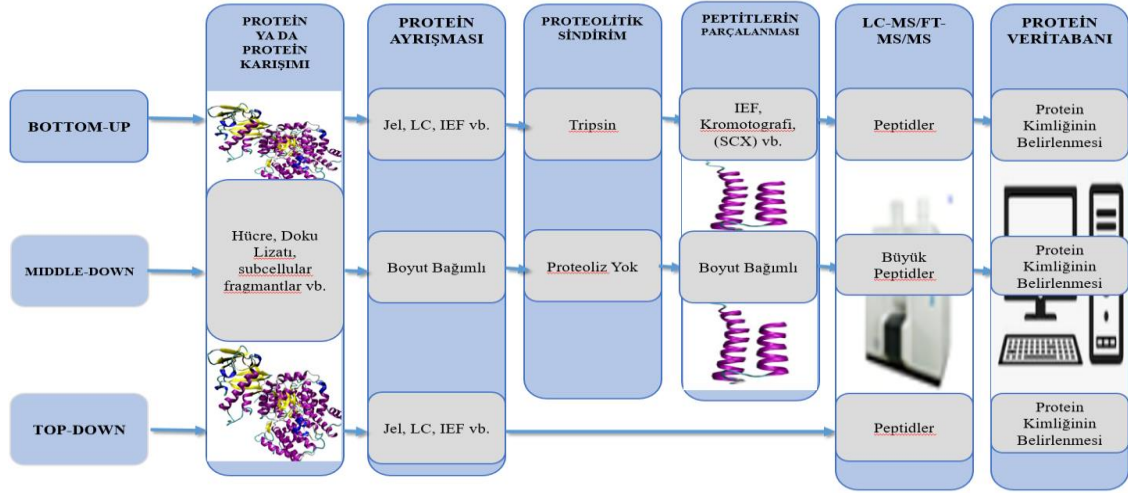
Dördüncül yapı ise disülfid bağları ve kovalent olmayan bağlar aracılığıyla üçüncül yapıdaki proteinin kararlı ve stabil olmuş halini ifade eder [60].

Proteom; genom tarafından kodlanan proteinleri ifade eder. Kodlanan proteinlerin farklılaşması ile aynı genoma sahip (DNA dizilimi sabit kalır) fakat farklı morfolojide canlılar bulunabilmektedir. Proteomlar, aynı canlıdaki hücreler arasında da farklılık gösterebilir. Her bireye özgü proteomda birçok protein sağlıklı bir birey için yaklaşık aynı miktarda ve aynı şekilde var oldukları halde çevresel etkenler, hastalık durumu hatta salgıladığımız hormonlara bile bağlı olarak değişebilir [61].

Proteom analizinde yaklaşımlar, nanoteknolojik yaklaşımlara benzer yaklaşımlara sahiptir. Bu yaklaşımlar; yukarıdan-aşağıya, ortadan-aşağıya ve aşağıdan-yukarıya olarak ifade edilir (Şekil 2.9). Bottom-up yaklaşımının sınırladığı yerlerde top-down yaklaşımına yönelinir. Bu yöntemde bozulmamış proteinler karakterize edilir. Top-down yaklaşımında proteinlerin hücreden kromatografik yöntemlerle ayrılması ve kütle spektrometresine gönderilmesi sağlanırken; Bottom-up yönteminde, proteoliz ile proteinler peptidlerine kadar parçalanarak MS'e iletilir. Kısaca bottom-up yöntemde peptid üretimi varken, top-down yöntemde proteoliz olmamaktadır. Bottom-up yönteminde protein karışımlarının kullanılmasına ise shot gun yöntemi denmektedir.

Shotgun yönteminde kullanılan proteomik teknikler bozulmamış proteinlerin proteolitik sindiriminden elde edilen peptidler aracılığıyla dolaylı bir protein ölçümü sağlar [62, 63].

Middle-down yöntemi ise diğer iki yöntemin hibridi olarak düşünülebilir [64, 65].



Şekil 2.9. Proteom analizinde yaklaşımlar.

Sonuç olarak aşağıdan-yukarıya yaklaşım, proteolitik peptidleri analiz eder. Yukarıdan-aşağıya yaklaşımı bütünlüğü bozulmamış proteinleri tanımlar. Ortadan-aşağıya yaklaşımı ise sınırlı sindirim veya daha seçici proteazlardan kaynaklanan daha büyük peptidleri analiz eder. MS analizi ve veri tabanı araştırmasından önce birden daha fazla protein veya peptid fraksiyonlama tekniği uygulanabilir.

2.4.1. Genomikten Proteomiğe

Proteomik, proteomların tümünün analiz edilmesi, işlevleri (diğer moleküllerle etkileşimi), tanımlanması (yerleşim, miktarı) ile ilgilenen çalışmalardır. Proteomik olarak adlandırılacak ilk protein çalışmaları, 1975 yılında Escherichia coli, guinea domuzu ve fare bakterilerinden alınan proteinlerin haritalanması ve iki boyutlu jelin tanıtılmasıyla başlamıştır. Proteomik çalışmaları, içinde birden fazla işlev barındıran protein sistemlerini araştırır. Sistemlerin birbirleriyle etkileşimlerini, bu sistemlerdeki farklı proteinleri inceler [66]. Proteomik kavramı yapısal biyoloji yerine sistemlerin biyolojisidir. Sistem davranışının karakterizasyonu hakkında bilgi verir [67]. Günümüzde, DNA sarmalındaki baz dizilişleri ve dolayısıyla genlerin yerlerinin belirlenmesi amacıyla çalışma yapılmış olup; insan genomu dahil birçok organizmanın genom dizilimleri belirlenmiştir. Bu amaçla, insan genom projesi (HGP) çalışmaları ile

birçok hedef ortaya atılmıştır. 2004 yılında İnsan Genom Dizisi verilerinin yayınlanmasının ardından, insanların proteinleri kodlayan 19.599 gen olduğu düşünülmekteydi. DNA'da bulunan bilginin %99'undan fazlasının, tüm insanlar için ortak olduğunu ortaya çıkarmakla birlikte genomdaki bireysel farklılıkların % 1'den az olduğunu ortaya konmuştur. Farklılığın, hastalık riskleri ve genetik hastalıkların tanımlanması, kişiye özel ilaç geliştirilmesi, genomda bulunan gen dizilerinin fonksiyonunun bulunmasına imkan sağlayan mikrodizilim, spektroskopi ve bilgisayar teknolojilerinin gelişmesi ile proteomik analizlere katkı sağlanması gerekliliği oluşmuştur [68].

Sonuç olarak HGP ile insan morfoloji sayısı (yaklaşık 100.000) kadar beklenen gen sayısı ve bununla birlikte gen sayısı kadar protein translasyonu gereklidir. DNA'dan transkripte edilen mRNA sayısının aynı olmasına rağmen yaklaşık 23.000 protein kodlayan gen bulunmuştur. Bununla birlikte mRNA ekspresyon düzeyleri ile şifreledikleri proteinlerin miktarı arasında lineer bir bağ bulunmamaktadır. mRNA her zaman proteine dönüşmez. mRNA düzeyleri şifrelenmiş veya kodlanmış proteinlerin aktivitesini göstermez [69]. Doğrusal olmayan bu bağın nedenlerinden başlıcaları ise post translasyonel modifikasyonlar ve bunun sonucunda birden fazla protein sentezlenebilmesi, protein yıkım hızı, RNA interferans, bazı proteinlerin aktif olabilmesi için kompleks yapması gerekliliği olarak sayılabilir [70].

Bazı fetal bozuklukların anneye bebekten geçen proteinler vasıtasıyla araştırılabileceğini öne süren çalışmada, annenin doğum öncesi ve sonrası kanında, bebeğin ise kordon kanında genomik ve proteomik bilgi araştırılmıştır. Annenin doğum öncesi kanında bulunup, doğum sonrasında bulunmayan ve bebeğin kordon kanından alınan numune ile örtüşen mRNA'lar ve proteinler incelenmiştir. Araştırma sonucunda anne kanında gebelik sürecinde bebeğe ait olduğu gösterilen 157 mRNA transkripti ve 222 farklı protein belirlenmiştir. Çalışmada, gebelik döneminde anne ve bebek arasında yoğun protein akışı olduğu, bu proteinlerin invaziv olmayan yeni biyomarkerler olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir. İlgili araştırma, genomik bilginin proteomik bilgiye katkı sağladığı durumlara da örnek oluşturabilir [71].

Proteomik çalışmaları önceden transkriptomiks adı altında RNA seviyesindeki değişiklikleri belirlemekte fakat mRNA ekspresyon seviyesindeki değişiklikler, posttranslasyonel modifikasyonlar sonucu proteinlerdeki farklılıklar ve çeşitlilikler

hakkında bilgi sağlayamamaktaydı. Ayrıca; mRNA ekspresyon seviyeleri, protein ekspresyon seviyeleri ile iyi korele edilemez. Sonuç olarak; RNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişimleri incelemek yerine, proteinlerin ekspresyonlarındaki değişimleri incelemek yaklaşım olarak daha doğru ve daha mantıklı olacaktır. Genom ve proteom çalışmalarından elde edilen verilerin birlikte analiz edilmesi önemlidir [72].

2.5. Proteomik Çalışmalar

Proteomik çalışmalar; farklı hücre tiplerinde, organizmanın gelişimsel evrelerinde, çeşitli hastalıklarda kodlanan polipeptid yapıları ile birlikte posttranslasyonel modifikasyonları da inceleyen dinamik yapıdaki çalışmalardır. Genetiği değişmemiş bir yapının farklı zaman ve ortamda farklı DNA diziliminin değişimi beklenemez. Bu nedenle genomik çalışmalar statik çalışmalardır.

Proteom araştırmaları ve analizleri, gen ekspresyon analizlerine göre çok daha farklı ve fazla grupta yöntemlere ihtiyaç duyar. Proteom karakterizasyonunda modifiye olmuş ve modifiye olmamış proteinlerin tespiti ile birlikte miktar tayininin yapılması için gelişmiş analitik yöntemlere ihtiyaç duyar.

Aynı koşullardaki belirlenen proteinlerin değerlendirilip yorumlanması için biyoinformatik bilgisine oldukça ihtiyaç bulunmaktadır. Proteomik çalışmalar, incelenecek olan proteinlerin ayırımına ve tanımlanması temeline dayanır. Bu amaçla; proteomik çalışmalarda, elektroforetik, kromatografik yöntemler, MS ve mikroarray teknolojisi kullanılan yöntemler arasındadır.

Analizler sonucu; proteom farklılıklarından yola çıkarak o hastalığa özel proteinlerin belirlenmesi ve izlenmesi ile proteinlerdeki etkileşimlerin incelenmesinde ve hastalığa yakınlıkların tespitinde önemli adımlar atılmaktadır [73, 74]. Vücut sıvılarında, hücrelerde veya doku örneklerinde diagnostik ve prognostik hastalık belirteçlerinin tanımlanması, yeni tedavi yöntemlerin geliştirilmesi, vücut sıvı örneklerinin veya doku biyopsilerinin orijinlerinin araştırılması, vücut sıvılarında, hücre veya dokularda protein fenotiplerinin ve posttranslasyonel modifikasyonların tespiti, hastalığın ilerlemesinin izlenmesi ve hastalığın alt sınıflandırmalarının yapılabilmesi proteomik çalışmaların diğer amaçlarındandır.

Kısaca; başta biyoloji ve tıp olmak üzere birçok disiplinde ufuk açan çalışmalar yapılmakta, yeni gelişmelere yol açmaktadır.

2.5.1. Proteomik Teknolojisi

Proteomik teknolojisi temelde dört uygulama alanında tanımlanabilir:

- Protein Madenciliği (proteinlerin tanımlanabilmesi, yapısal proteomik),
- Protein Ekspresyon Profili (proteinin stimüle edici karşısındaki tepkisinin belirlenmesi, kıyaslamalı proteomik),
- Protein Haritalaması (proteinlerin birbirleri ile etkileşiminin nerede, ne zaman olduğunun belirlenmesi, işlevsel proteomik),
- Protein Modifikasyon Haritalaması (modifikasyonun nasıl ve nerede olduğunu belirlenmesi),

Proteomik teknolojisinde kullanılan teknikler Şekil 2.10'daki gibi özetlenebilir:



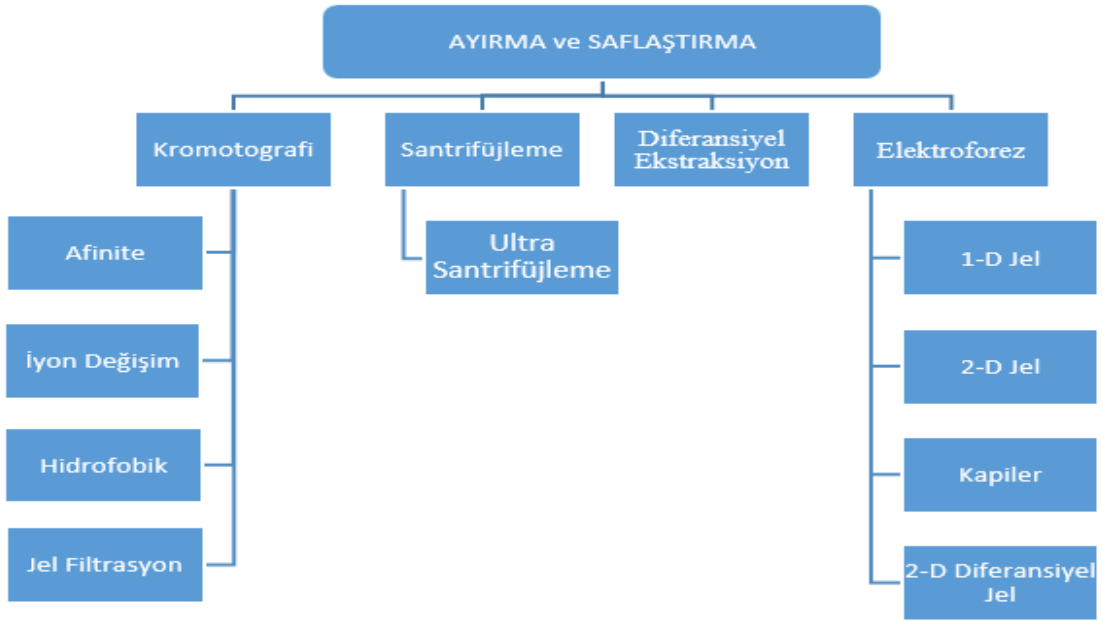
Şekil 2.10. Proteomik teknolojisinin uygulamaları [75].

2.6. Protein Ayırma Yöntemleri

Kromatografik ve elektroforetik tekniklerin 1950 yıllarından itibaren gelişmeye başlamasıyla çökme, kromatografi, elektroforez, adsorblama ve santrifüjleme protokolleri oluşturulmuştur. Kompleks protein karışımları, başlıca adsorblama ve çökme yöntemleri ile saflaştırılmaktadır [76].

Genel olarak proteinler, sıvı süspansiyon içerisinde hızlandırılarak kütle ve yoğunluklarına ayrılması yöntemi olan santrifüjleme; protein içeren bir çözeltinin içinde reçine gibi özel bir madde bulunan bir kolondan geçirilmesi kromatografik ya da elektrik alan içerisindeki iyon hareketinden faydalanılarak yapılan elektroforetik yöntemlerle saflaştırılır (Şekil 2.11).

Kıyaslamalı proteomik çalışmalar için en önemli başlangıç proteinlerin saflaştırılması ve birbirlerinden ayrıştırılmasıdır. Bu amaca yönelik birçok yöntem bulunmakta olup; başta jel tabanlı yaklaşımlar, bir boyutlu elektroforez (1D-SDS PAGE), iki boyutlu elektroforez (2D-SDS PAGE), iki boyutlu diferansiyel elektroforez (2D-SDS DIGE) olmak üzere; bir ve iki boyutlu sıvı, afinite, iyon değişim, hidrofobik, jel filtrasyon kromatografileri; santrifüjleme ve diferansiyel ekstraksiyon gibi diğer ayırma yöntemleri kullanılmaktadır [77].



Şekil 2.11. Proteom analiz yöntemleri [78].

1D-SDS-PAGE’de, proteinlerin sadece moleküler ağırlıklarına göre ayrımı yapılırken; 2D-SDS-PAGE’de ise proteinler moleküler ağırlıklarına göre ve kendi izoelektrik noktalarına göre ayrılırlar. 2D-SDS PAGE, protein karışımlarının kompleks yapılarının ayrışmasına katkıda bulunur.

2D-SDS DIGE yönteminde ise izoelektrik noktasına ayırım yapılmadan önce proteinlerin ayrılması amacıyla, amino uçlarındaki lizin yapıları floresan boyayla işaretlenir [79, 80]. En çok tercih edilen yöntemlerden biri olan SDS-PAGE yöntemi iki ana aşamadan oluşmaktadır. Birincisi izoelektrik odaklama (IEF) diğeri ise proteinlerin kütlelerine göre ayrıldığı SDS-PAGE aşamasıdır [81, 82]. SDS-PAGE basamağı, protein analizinde kullanılan diğeri yöntemlere göre daha güçlü bir yöntemdir. SDS-PAGE suda çözünemeyenler dahil bütün protein çeşitlerini ayırmak için kullanılabilir. Hücre iskeletinin protein bölümleri, membran proteinleri ve büyük makromolekül bileşenlerinin protein kısımlarının analizinde bu yöntem kullanılabilir [83].

Saflaştırılan ve ayrıştırılan proteinlerin analizi amacıyla kütle spektrometrisi ve yazılım teknolojilerinden yardım alınır.

Tez çalışmamızda, aşağıdan-yukarıya yaklaşımı benimsenerek 2D-SDS PAGE yöntemi ile ayrışan ve MS'e hazır hale getirilen proteinlerin Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometrisi cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.

2.7. İki Boyutlu Jel Elektroforez

Yüklü bir molekülün elektrik alan içerisinde, kutuplar arasında hareket ederek yüklerine ve büyüklüklerine göre ayrılması tekniğine elektroforez denir. Elektroforez proteinlerin, makromoleküllerin (DNA, RNA gibi) ayrıştırılmasında önemli bir yere sahiptir. Temel olarak göç hızı formüle edildiğinde; elektrik alan kuvveti (E), protein yükü (z), sürtünme katsayısı (f), ortamın akışkanlığı (η), molekül yarıçapı (r), göç hızı (v) ise,

$$v = Ez/f \quad (1)$$

Denklem (1)'e göre elektroforez yönteminde göç hızı sürtünme katsayısı ile ters; elektrik alan kuvveti ve protein yükü ile doğru orantılı olup;

$$f = 6\pi\eta r \quad (2)$$

$$v = Ez/ 6\pi\eta r \quad (3)$$

sürtünme katsayısının ise ortamın akışkanlığı ve molekülün boyutu ile doğru orantılı; fakat göç hızı ile ters orantılı olduğu anlaşılmaktadır. Sonuç olarak; aynı yük/çap oranında iki farklı molekül ortamda (poliakrilamid jel, agaroz matriks vb) aynı hızda kutuplar arası göç edecektir.

Yüklü moleküller bir elektriksel alana konulduklarında por adı verilen gözeneklerden elektrik alan etki ettiği kuvvetle, yüklerine göre ya pozitif (anot) ya da negatif (katot) kutuba hareket ederler. Negatif yüklü DNA veya katodik veya anodik peroksidazlar farklı kutuplara hareket ederler.

Protein ve nükleik asit ayırımında agaroz ve poliakrilamid jellerden faydalanılır. O'Farell tarafından ilk kez uygulanan 2D elektroforezde ortam sentetik poliakrilamid matriksten oluşturulmuştur [84]. Ortam seçiminde en önemli iki faktör çözünürlük ve kullanılacak olan örneklerdir. Poliakrilamid, agaroz matriks ortamına göre por çapı, yoğunluğu kontrol edilebilir ve daha ucuz bir malzemedir. Yapılan bazı çalışmalar sınırlayıcı por büyüklüğünün birincil neden olmadığını; ek olarak DNA gibi makromoleküllerin poliakrilamid ortamda daha yavaş ilerlediğini belirtmektedir [85].

Akrilamid monomerlerin çapraz bağlama reaktifi olan N-metilenbisakrilamid kullanılarak polimerleşmesiyle ve amonyumpersülfat katalizliğinde oluşturulan poliakrilamid kullanılan 2D elektroforez analiz tekniği geniş kullanım alanı bulmaya başlamıştır [86, 87]. Genel olarak; IEF koşullarına göre oluşturulmuş protein bantlarını içeren örnek çubukları jelin bir ucundan uygulanır ve SDS içeren jel içerisinde, birinci aşamada izoelektrik noktalarına ve ikinci aşamada poliakrilamid jel üzerinde moleküler ağırlıklarına göre proteinlerin ayırımı gerçekleşir.

2.7.1. Numune Hazırlama ve IPG Şeritlere Protein Yüklenmesi

Protein çöktürülmesi amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları organik çözücülerle ya da polimerlerle çöktürme, iyonik şiddeti arttırarak ya da azaltarak çöktürme, denatürasyon ile çöktürme, pHdeğişimi ile çöktürmedir. Proteinlerin çöktürülmesi için en çok tercih edilen yöntem organik çözücüler kullanılarak yapılan çöktürme işlemidir. Damerval ve ark. tarafından önerilen yöntemde -20 °C'de aseton içinde %10 TCA ve %0,007 2-merkaptetanol çözeltisi kullanılmıştır [88]. Uygulama sırasında bazı asidik proteinlerin 2-merkaptetanol nedeniyle çökmemesinden dolayı ditiyotritol (DTT) önerilmiştir [89].

Çöktürülen proteinlerin tekrar çözülmesi amacıyla lizat tamponu (rehidrasyon/yükleme tamponu) kullanılmakta olup; proteinlerin okside olmasının, proteinlerin birbirleriyle etkileşiminin, gruplanmasının ve modifikasyonların engellenmesi, hidrofobik proteinlerin çözülmesi amacıyla; hatta 2D elektroforez işleminin evrelerini belirlemek

için kullanılan bromfenol mavisi, üre, deterjan, DTT, indirgeyici ajanlar, proteaz inhibitörleri, tris tamponu, taşıyıcı amfolit gibi kimyasallar lizat tamponuna eklenebilir [90].

Protein karışımının yükleme tamponunda çözüldükten sonra mineral yağı gibi nemliliği, proteinlerin rahat hareketini ve Immobilize pH gradient (IPG) şeritlere difüze edilmesini kolaylaştıracak ortamın hazırlanması denatürizasyon oluşmaması bakımından çok önemlidir. IPG şeritler üzerinde bulunan porlara yükleme tamponuna ait distile su, üre, indirgeyiciler, deterjan girdikten sonra proteinler, gözeneklerin açılmasıyla girebilirler. Bu yöntemde rehidrasyon yüklemesi adı verilir [91]. IEF'e hazır olan protein yüklü IPG şeritlerin sıcaklık, nemlilik ve dış ortamdan izolasyonu çok önemlidir.

2.7.2. İzoelektrik Odaklama (IEF)

Bir molekülün elektrik net yükünün sıfır olduğu, bu nedenle elektrik alanda hareket etmediği pH noktasına izoelektrik nokta (pI) denilmektedir. Burada aminoasit yan zincirlerinin üstünde bulunan, iyonlaşabilen grupların iyonlaşmasına rağmen proteinin toplam net yükü sıfırdır.



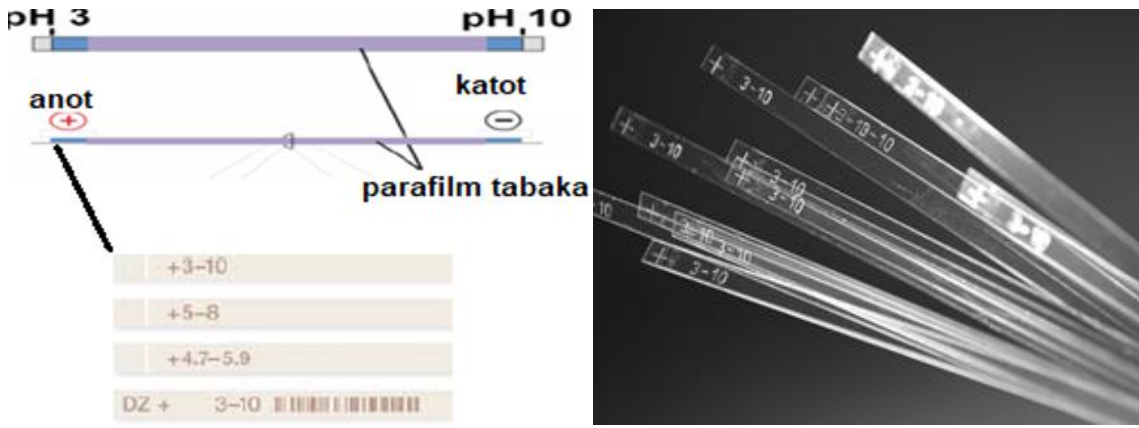
Şekil 2.12. İzoelektrik odaklama sisteminin bir görüntüsü (Protean IEF Cell 2D Cihazı ve Komponentleri, Bio-Rad™, ABD).

IEF Sisteminin birinci boyut olarak da ifade edilen bu işlemde, pH aralığı proteinin pI'na göre belirlenir (Şekil 2.12). Proteinler, pH gradienti sıfır olacak biçimde polimerize edilmiş ve üzerinde en az iki amfolit immobilin taşıyan (pH gradientinin sağlanması amacıyla) akrilamid jelden oluşan IPG şeritlere uygulanır. pI'nın altındaki bir pH bölgesinde bulunan bazik maddeler pozitif yüklerle yüklenerek katoda; pI'nın üstündeki bir

pH bölgesinde bulunan asidik maddeler negatif yüklenerek anoda doğru hareket ederler, bu yönlere hareketleri devam ederken pI'ya ulaşılır. Kısaca, proteinler jel üzerinde net yüklerinin sıfır olduğu pH değerine kadar hareket ederler ve bu noktada sabitlenirler.

Sonuç olarak; amfolit maddeler dar bantlar halinde sabitleşir ve proteinler bir pH gradientinde pI'larına göre ayrılırlar [92].

IPG şeritler yerine pH gradienti oluşturulan, akrilamid monomerlerinin amfolit immobilinle birlikte oluşan karışımın cam plakalar arasına tatbiki ile yapılan birinci boyut işlemleri tekrarlanabilirlik, tutarlılık, zaman tasarrufu açısından yerini kullanıma hazır ticari şeritlere bırakmıştır [93].



Şekil 2.13. Ticari bir IPG şerit yapısı.

Ticari IPG şeritler Şekil 2.13'de örnek olarak gösterildiği üzere, 7 ile 24 cm boyutlarında olup; üzerlerinde pH aralıkları ve izoelektrik cihazına doğru yerleştirilebilmesi amacıyla pozitif yük işareti belirtilmiştir. Ayrıca; pH'larına göre IPG şeritler mikro ve dar menzilli olarak adlandırılabilirler.

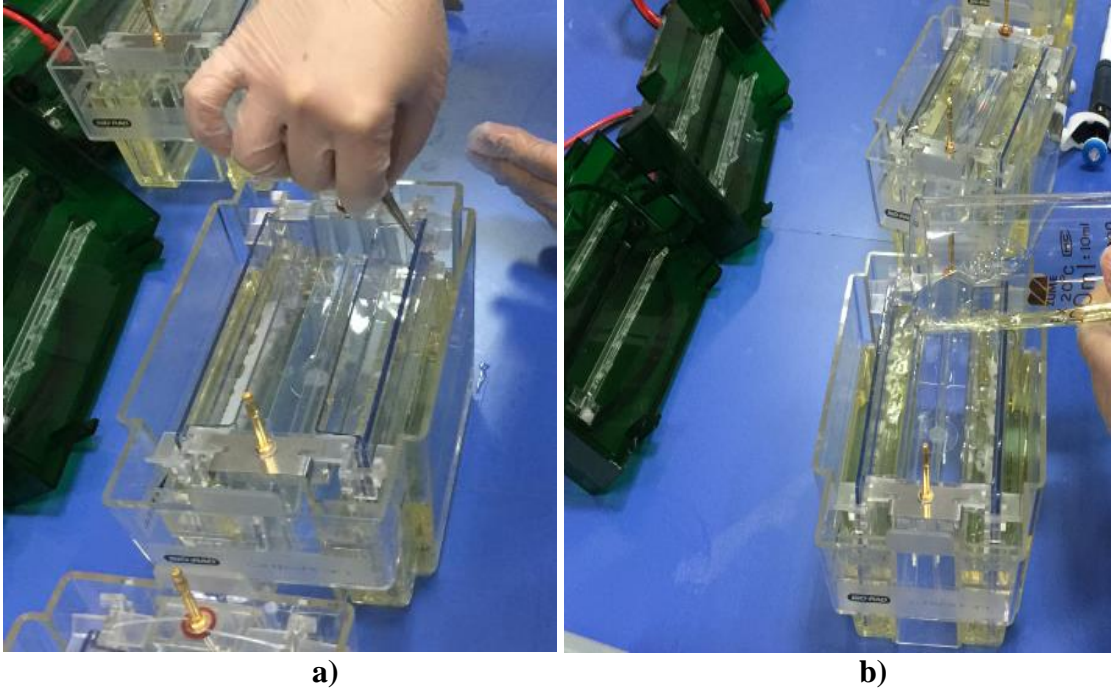
IEF işleminde sıcaklık ve şeritlere uygulanacak olan elektrik akımı, voltajın süresi, şerit yerleşimi (Şekil 2.14) ve şerit iletkenliklerinin aynı olması proteinlerin tam anlamıyla bozulmadan odaklanması bakımından çok önemlidir [91, 94].



Şekil 2.14. Rehidrasyon tekniği ile IPG şeritlerine yüklenen proteinlerin bulunduğu odaklama tablasının IEF cihazına yerleştirilmesi (Birinci Boyut).

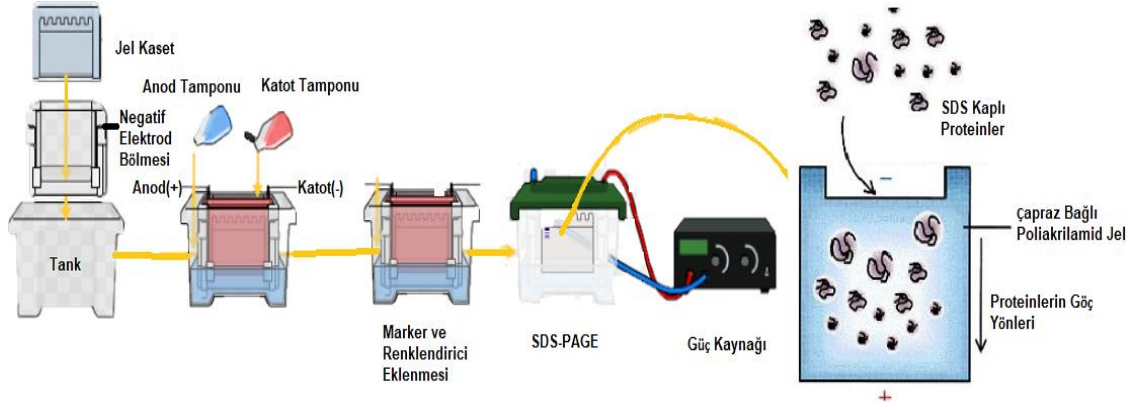
2.7.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez

İkinci boyut olarak ifade edilen bu işlemde; anyonik deterjan olan negatif yüklü SDS'nin sülfat gruplarıyla birçok polipeptid belirli bir oranda etkileşir. Etkileşim sonucu birim kütle başına homojen, SDS molekülleri içeren (-) yüklü SDS ve protein kompleksleri oluşur. Bu etkileşimle, proteinler yük olarak eşitlendiği için molekül ağırlıklarına göre ayrımları gerçekleşir. Poliakrilamid jele elektrik akımı uygulandığında, SDS ve protein kompleksleri çapraz bağlı jeldeki gözeneklerde moleküler ağırlıklarına bağlı olarak hareketlenerek bant profilleri ortaya çıkarır. Jelde oluşacak çapraz bağların derecesi; proteinlerin moleküler ağırlıklarına ve jellerin yoğunluğuna bağlıdır. Bu bağlamda; ağırlığı büyük protein karışımlarının ayrımını yapabilmek için, düşük dereceli çapraz bağların oluşması, proteinlerin jel içinde hareketini kolaylaştırarak daha iyi ayırım sağlar [95].



Şekil 2.15. a) IPG şeritlerin kasetlere yerleştirilmesi, b) katot ve anot tamponlarının eklenmesi.

IPG jel şeritleri ikinci boyut öncesi, pH'larına göre konumlanan proteinlerin SDS ile kompleks oluşturması amacıyla dengeleme tamponu %2'lik SDS, üre, gliserol içeren Tris-HCl (pH 8.8) hazırlanır. Tris-HCl Tamponu disülfid bağlarını koparmak ve SDS-protein etkileşimini arttırmak amacıyla DTT içerir. Bağlanmamış -SH gruplarını alkile etmek ve keskin spotları gözlemlmek için ikinci bir Tris-HCl tamponu hazırlanarak DTT yerine IAA (ioyodoasetamid) eklenir. Her iki tamponda da bulunan ürenin görevi ise protein-protein etkileşimini engellemektir. Şeritlere 10'ar dakika süreyle tampon çözeltilerin uygulanmasının ardından arasında polikarilamid jelin bulunduğu çift katmanlı saydam cam kasete yerleştirilir (Şekil 2.15). Ayrıca; kasette belirtilmiş olan bölgelere ve tanka anot ve katot tamponları, bromfenol mavisi ve ağırlığı bilinen proteinlerden oluşan markerlar özenle yerleştirilir. İkinci boyutun tamamlanması ile jele proteinler geçmiş ve jel üzerinde ağırlıklarına göre bir dağılım oluşturmuş olurlar. Büyük moleküler ağırlığı sahip proteinler jelin yukarısında kalırken; daha küçük moleküler ağırlığa sahip proteinler jelin daha alt bölgelerine difüze olurlar (Şekil 2.16). Jel üzerindeki spotların renklendirilmesi ile kesilecek spotların seçimi yapılır.



Şekil 2.16. Protein içeren IPG şeritlere SDS-PAGE uygulanması (İkinci Boyut).

2.7.4. Protein Analizinde Renklendirme

2D Elektroferez işlemi sonrası poliakrilamid jelde ayırımı sağlanan proteinlerin oluşturduğu spotların, işaretlenerek ya da boyanarak görünür hale getirilmesi çok önemlidir. Jellerdeki protein spotlarının boyanmasında genelde; Coomassie Brilliant Blue G250 veya R250 boyama, SYPRO Ruby protein jel boyası, gümüş boyama teknikleri kullanılmaktadır[96-98].

Protein miktar tayini işlemlerinde de kullanılan renklendirme tekniklerinin başında boya-bağlama tekniği (Bradford) bulunmaktadır. Bu teknik boyanın proteinlere bağlanarak renk oluşturması esasına dayanır. Rengin şiddeti; protein yoğunluğu ile doğru orantılı olup; boya arginin gibi bazik ve aromatik aminoasitlere bağlanmaktadır [99].

Spot analizlerinde, proteinlerle etkileşmeyecek, MS'e uyumlu, toksik olmayan, spotlar için uygulanan renk kimyasallarının protein miktarına göre lineer değişim gösterdiği, basit ve tekrarlanabilir özelliklere sahip olan bir kimyasal bulunmaması nedeniyle renklendirme yöntemi amaca yönelik ve avantajları göz önünde bulundurularak seçilmelidir [100].

2.7.5. İmaj Görüntüleme

Jel kasedinden alınan poliakrilamid jele gömülü, pI'ya ve molekül ağırlığına göre ayrılmış proteinlerden oluşan jel haritasının incelenmesi ve diğer jel haritaları ile karşılaştırılması, proteinlerdeki değişim ve etkileşimlerin değerlendirilmesi açısından çok önemlidir (Şekil 2.17).

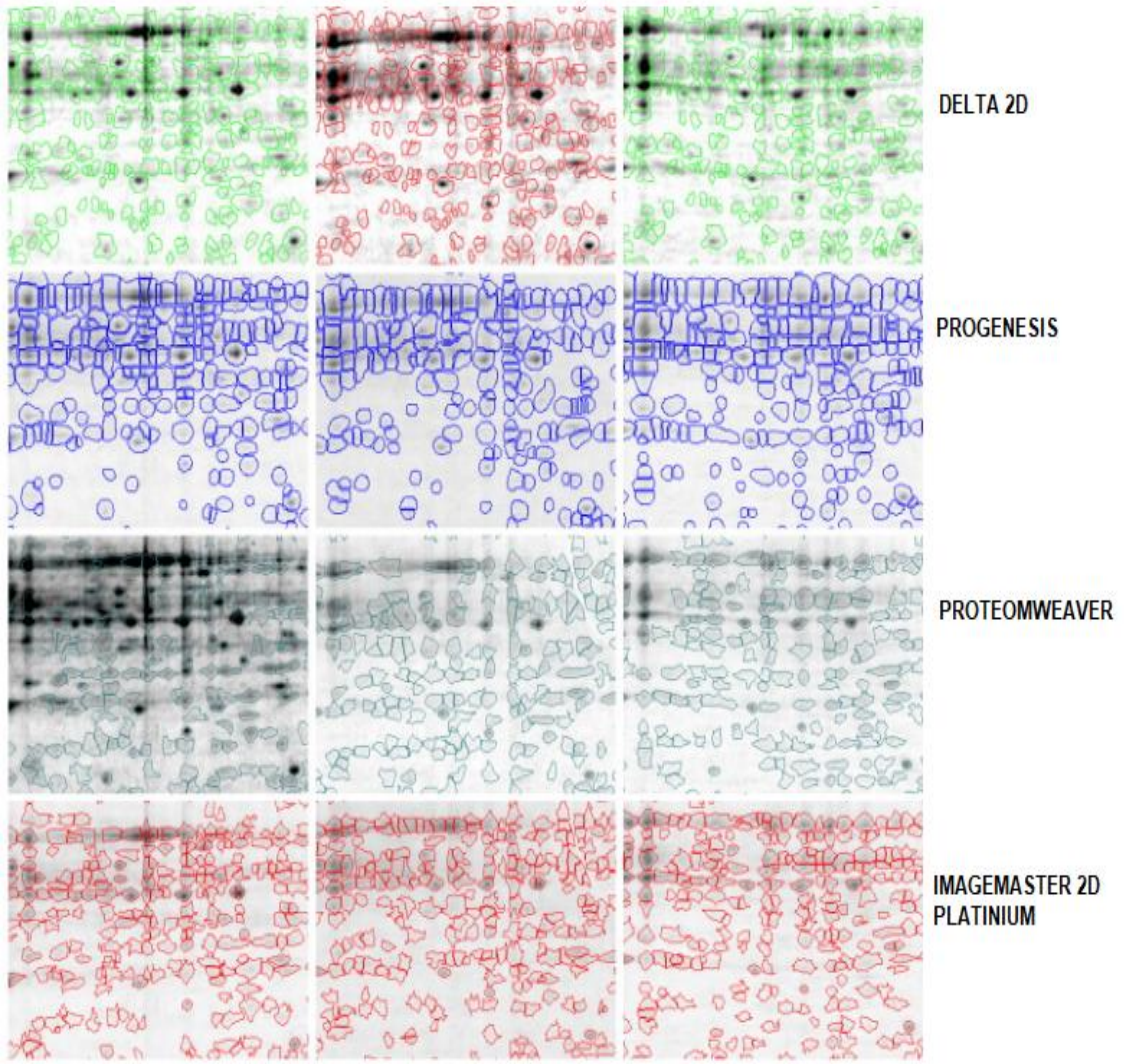


Şekil 2.17. Jel imaj cihazının görüntüsü (ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad™, ABD).

Jel üzerindeki değişimlerin fiziksel olarak ayırt edilmesinin çok zor olması ve protein sayısındaki fazlalık nedeniyle jel imaj cihazından görüntüleri alınan spotların bilgisayar yazılımları aracılığıyla incelenip değerlendirilmesi daha net ve daha doğru sonuçlara gitmemizi sağlayacaktır. Ayrıca, görüntü netliğinin artırılması, spotların yerlerinin net tespit edilmesi, arka plan gürültüsünün azaltılması elde edilecek önemli avantajlardır. Bu yazılımlardan başlıcaları:

- PDQuest
- Progenesis
- Proteomweaver
- Dimension
- Redfin
- Delta 2D
- Image Master 2D sayılabilir [101].

Farklı yazılımlarla belirlenmiş spot görüntüleri Şekil 2.18’de verilmiştir.



Şekil 2.18. Farklı yazılımlarda belirlenmiş spotlara ait görüntüler.

2.7.6. Proteinlerin Jelden Uzaklaştırılması

Proteinlerin, MS'e uyumlu olması, proteinlerin birbirleriyle etkileşmemesi ve spesifik proteinlerin incelenmesi amacıyla poliakrilamid jelin fiziksel olarak uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlemin el ile fiziksel olarak yapılması çok zor ve zaman alıcıdır. Bunun yerine hassas ve istenilen bölgelerde kesim yapan cihazlar kullanılmaktadır (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Jel spot kesici cihazının görüntüsü (EXQuest Spot Cutter, Bio-RadTM, ABD).

2.7.7. Proteinlerin Peptidlere Parçalanması ve Peptid Dizileme

Proteinlerin tanımlanması amacıyla peptidlerin kütlelerinin hassas ölçümüne ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, asetonitril ve triflorasetik asit ile yıkanan, kesilmiş ve hava ile temas etmeyecek şekilde vakum altında bekletilen spotlara seçilen bir enzim (tripsin, pepsin, kimotripsin vb.) içeren tampon çözelti uygulanarak peptidlerine parçalanması sağlanır. Örnek olarak tripsin (proteaz aktivitesi olan enzim türü), peptidlerin karboksil uçlarındaki (histidin, lizin veya arjinin gruplarındaki) peptid bağlarını uzaklaştırmak için kullanılmaktadır.. Staudenmann ve ark. tarafından tarif edilen jel içinde proteinlerin parçalanması yöntemine *in-gel digestion* adı verilmektedir. Peptid parçalanma işlemi 24 saatten fazla sürebilmektedir[102].

Elde edilen peptidlerin, kütle spektrometresi aracılığıyla kütlelerinin ve diğer özelliklerinin belirlenerek veri tabanlarındaki referans kütlelerle karşılaştırılması ile proteinlerin tanımlanması sağlanır. Bu işleme peptid dizileme çalışmaları (peptide mass fingerprint) denir.

Protein veya DNA dizileme yöntemlerinden bir diğeri ise Tandem kütle spektrometresinde kullanılan De Novo dizileme çalışmalarıdır. De Novo dizileme yöntemi shotgun ve paired-end dizileme yöntemlerini de kapsamaktadır [103, 104]. Peptid dizileme çalışmalarından farklı olarak; peptid iyonu çarpışarak bileşenlerine ayrılır; özellikle aminoasitler arasındaki peptid bağlarının kırılması ile oluşan yeni iyonların kütle değerleri ölçülerek parçalanmış peptide ait aminoasit dizilimi elde edilir.

Dizileme ve tanımlama çalışmalarında; genom dizilimi gerçekleştirilmiş yapılar ile veri tabanları karşılaştırılarak daha iyi sonuçlar alınmaktadır. Ayrıca; büyük proteinlerin veritabanlarıyla karşılaştırılması doğru sonuçlar ortaya koyarken küçük aminoasitlerden oluşan proteinler birden fazla proteinle uyuşarak sorun oluşturmaktadır. Ayrıca; oligopeptidlerin, nükleik asitlerdeki gibi tamamlayıcı dizinlerinin olmaması dizileme çalışmalarını zorlaştırmaktadır.

2.8. Kütle Spektrometresi (MS)

Peptid dizileme çalışmaları öncesi elde edilen peptid iyonlarının kütle/yük oranını temel analitik yöntemlerden olan MS tarafından belirlenmesi sonucu oluşan spektrumun, referans veri spektrumları ile karşılaştırılması yapılarak protein tanımlaması yapılır. MS (Şekil 2.20), kütle bilgisiyle birlikte kofaktör ve metal iyon varlığı, translasyon sonrası modifikasyon, protein etkileşimleri hakkında veri sağlar (105). Spektrumların birbiri üzerine düşüşünün engellenmesi ve her bir pikin ayrıntılı analizinin kolaylaşması amacıyla moleküllerin katettikleri yol, elektrik ve manyetik yansıtıcılar kullanılarak menzilleri arttırılır.

Tüm MS'ler yüklü analitin manyetik ya da elektriksel alandan geçerek hedefe çarpması ve bir sinyal oluşturması mantığına dayanır. Sinyaller, analitlerin kütle/yük oranlarının şiddete karşı gösterdiği spektrumu oluştururlar. MS'lerin kütle farklılıklarında yüksek hassasiyet ve çözünürlüğe sahip olmaları beklenir. Proteomik yaklaşıma göre MS seçimi yapılır [106].



Şekil 2.20. Kütle spektrometresi görünümü (ABI 5800 MALDI-TOF/TOF-MS, Applied Biosystem™, ABD).

Kütle Spektrometreleri dört temel bölümden oluşmaktadır:

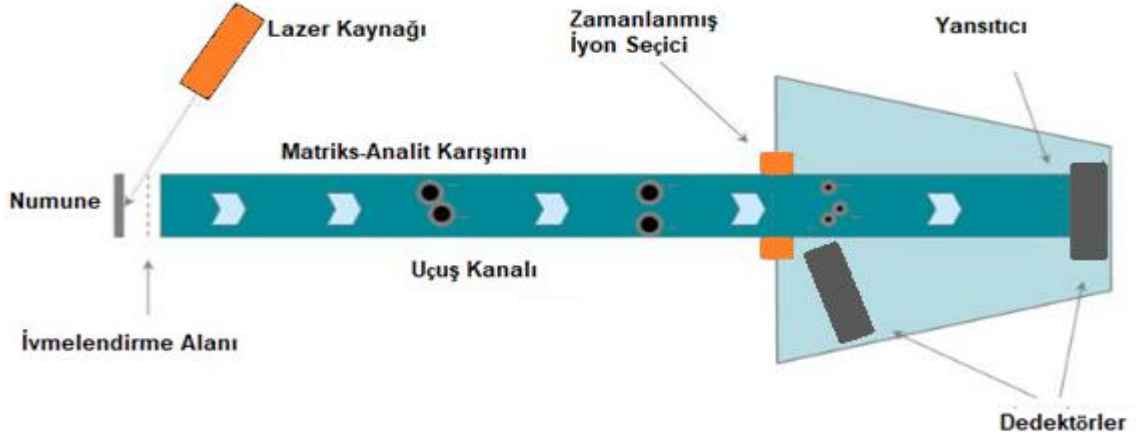
- **Numune girişi ve vakum sistemi:** Numunenin gaz ya da sıvı kromatografisi, katı prob veya kapiler elektroforez aracılığıyla sisteme girişi vakum ortamında sağlanır.
- **İyonlaştırma Kaynağı:** Peptidlerin iyonlaştırılmasını sağlar. Pozitif ve negatif iyonlar meydana getirir Kaynakları olarak: Desorpsiyon ve gaz faz iyon olarak iki grupta toplamak mümkündür. Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometrisi (MALDI), Yüzey-Zenginleştirilmiş Desorpsiyon İyonizasyon (SELDI), elektrosprey iyonizasyon (ESI), UV lazer iyonizasyon, kimyasal iyonizasyon, alan iyonizasyonu ve desorpsiyonu, termosprey iyonizasyonu ve elektron bombardıman iyonizasyonu bu amaçla kullanılan kaynaklardır.
- **Kütle Analizörü:** İyonlaştırma ürünlerinin analizöre yönlendirildiği ve ürünlerin kütle/yük oranlarına göre ayırımının yapıldığı bölümdür. Bazı analizör çeşitleri: Tek veya çift odaklamalı, manyetik sektör (MSA), yol-zaman (time to flight) bağımlı (TOF), kuadropol (Q), Fourier transform iyon siklotron rezonans (FT-ICR MS), iyon kapanı kütle analizörü (QSTAR). TOF analizörü MALDI ve ESI iyonlaştırma kaynaklarıyla birlikte kullanılabilen ve en çok tercih edilen MS bileşenleridir.
- **Dedektör:** Analizörden geçen iyonların elektron çoğaltıcı dedektöre çarpması sonucu oluşan elektrik akımı sinyal oluşturur. Dizi ve devamlı dinot elektron çoğaltıcı dedektörler mevcuttur. Elektromanyetik radyasyonun fonksiyonu sonucu oluşan absorbanların hepsine spektrum adı verilir.

Hazırlanmış olduğumuz numunelerin MS ile analizleri; Kocaeli Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Birimi (KABİ) Proteomik Laboratuvarında yapılmıştır [107].

2.8.1. MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi

Bu teknikde analit (şeker, polimer, dendrimer, peptid vb), enerjiyi absorblayan bir matriks içine gömülü olacak şekilde oluşturulur. Matriks malzemesi düşük molekül ağırlıklı aromatik yapılu organik asitlerden seçilir (gliserol, tiyogliserol, nitrobenzil alkol vb). Uygun dalga boyunda lazer, matriks-analit çözeltisi üzerine (matriks ve analit aynı enerji ile uyarılarak) odaklandırılır, hızlı titreşimler ile katı solüsyonun parçalanmasına neden olur. Matriks molekülleri yüzeyden saçılan demetlerden çıkarak analitin gaz halinde serbest bırakılmasını sağlar. Meydana gelen iyonlar MS'e yönlendirilir [108]. Yönlendirilen iyonlar farklı kinetik enerji, kütle ve yüke sahip olmaları nedeniyle dedektöre farklı sürelerde ulaşırlar (Şekil 2.21).

Bu farklılığı engellemek amacıyla, elektrikle yüklü bir ekstraksiyon ızgarası kullanılarak geriden gelen daha büyük kütleli bir molekülle aynı anda dedektöre varan küçük kütleli moleküllerin varlığı gibi sorunlar önlenir.



Şekil 2.21. MALDI-TOF/TOF kütle spektrometresi çalışma yapısı.

MS'in diğer ana bileşeni TOF aracılığıyla, iyonlar uygulanan elektrik alan etkisiyle ivmelendirilir ve dedektöre uçuş süreleri belirlenir. İyonlardaki bu uçuş sürelerindeki farklılık ile kütleleri ölçülür [109].

2.8.2. ESI-TOF Kütle Spektrometresi

TOF analizörü MALDI yerine ESI iyonlaştırıcısı birleştirilerek de kullanılabilir. ESI-TOF'da elektrosprey iyonizasyon yöntemi, polar ve uçucu olmayan bileşikler ile iyonlaştırılması zor olan büyük organik moleküller (peptidler, farmasötikler vb.) için kullanılır. Bu yöntemde; numune kapiler uçlar veya şırınga pompası ile yüksek basınç yardımıyla MS içine iletilir. Oluşan çok küçük damlaların uçuşları sırasında taşıyıcı faz hızla buharlaşır (oda koşullarında) ve yüksek potansiyel fark nedeniyle damlaların üzerinde oluşan yük, polipeptide aktarılır. Polipeptid molekülleri iyonlaşan su ve amonyak gibi taşıyıcı faz moleküllerinden aldıkları protonlar nedeniyle pozitif yüklenirler. Taşıyıcı faz, pozitif yüklü iyonların oluşumunun kolaylaştırılması için çoğu zaman asidik pH'da tutulur. Birden fazla analit içeren damlalar aynı yüklü analit moleküllerinin birbirlerini itmesi nedeniyle parçacık yarılmaya uğrayarak ayrışır. Sonuç olarak, buhar fazında ve iyonize olmuş polipeptid veya protein molekülleri oluşturulur. TOF, MALDI'de olduğu gibi ESI sonrası oluşan iyonların kütlelerini ölçer [110].

Yukarıda ifade edilen analiz yöntemlerinin tümü proteom analizinde kıyaslamalı proteomik uygulamalar olup; proteom analizinde aşağıdan-yukarıya yaklaşıma aittir. Aşağıdan-yukarıya yaklaşımına ait bir diğer kıyaslamalı proteomik uygulaması; doğrudan protein karışımlarının peptidlere parçalanması ardından LC (Sıvı Kromatografi) ve CE (Kapiler Elektroforez) tekniklerle peptidlerin ayrılarak MS ile analiz edilmesi örnek olarak verilebilir.

Diğer proteom yaklaşımı olan yukarıdan-aşağıya'da ise en iyi örnek, translasyon sonrası posttranslasyonel modifikasyonlarda kütle farklılıkları oluşmaması sonucu tespit edilemeyen aminoasit dizilerinin çözümü olarak görülen, işlevsel ve yapısal proteomik teknolojilerinde kullanılan FT-MS (Fourier Transform Kütle Spektrometresi)'dir. FT-MS, kromatografik tekniklerle ayrılan proteinlerin iyonlarına parçalanarak yüksek hassasiyette analiz edilmesini sağlar [111].

2.9. Biyoinformatik

Bilgisayar mühendisliği ve istatistik gibi bilimlerden de yardım alan disiplinlerarası bir bilim olan biyoinformatik, biyolojik veriyi depolama ve veri havuzu oluşturarak istenilen verileri istenildiği zamanda almak için teknikler üretir, düzenler ve analiz eder. Biyoinformatik,

- bilimsel verileri organize etmek
- verilerin analiz edilmesine yardımcı olacak araçlar ve kaynaklar geliştirmek
- çalışma sonuçlarıyla elde edilen veriyi analiz etmek için geliştirilen teknolojileri kullanmayı amaçlar.

2.10. Kanser Tedavisinde Proteomik Yaklaşımlar

Kanser; değişime uğramış hücrelerin kontrolsüz bölündüğü ve aynı hücrelerin çevresindeki tüm yapılara nüfuz ederek çoğaldığı hastalıklar için kullanılan bir terimdir. Kanser hücrelerikan ve lenf sistemleriyle vücudun diğer bölgelerine de yayılabilir. Bu duruma metastaz adı verilir. Birkaç ana kanser türü bulunmaktadır: Karsinom; deride,iç organları kaplayan dokularda başlayan bir kanserdir. Sarkom; bağ veya destekleyici dokularda (kemik, kıkırdak, kas, kan damarları) oluşan bir kanser türüdür. Lösemi; kemik iliği gibi kan üretimini sağlayan dokularda oluşan ve normal fonksiyonunu yerine getiremeyen birçok kan hücresinin üretilmesine neden olan bir kanser çeşididir. Lenfoma ve multiple miyelom, bağışıklık sisteminin hücrelerinde başlayan; merkezi sinir sistemi

kanserleri ise beyin ve omurilik dokularında başlayan kanser türleridir. Ayrıca; kansere malignite adı da verilir. 2018 yılında, 327 milyon nüfusa sahip Amerika Birleşik Devletlerinde 1.735.350 kanser teşhisi konulmuştur. Bu rakam Dünya ortalamasında birinci sıradadır. 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır [112]. Bazı majör kanser risk faktörleri ise çevresel kirleticiler, tütün, obezite, mesleki karsinogenler, enfeksiyonlar (Helikobakter pilori, HPV, HBV ve HCV enfeksiyöz ajanları), üreme ile ilgili alışkanlıklar olarak sıralanabilir.

Sağlıklı bir organizmada hücrelerin işlevlerini yerine getirmesi için büyümesi, bölünmesi, hücre üretimine katkıda bulunması ve programlı bir şekilde hücre ölümüne (apoptozuna) gereksinim vardır. Bu amaçla; DNA, hücrenin faaliyetlerinde önemli bir rol oynar. Hücrenin normal yaşam siklusunda DNA hasarı olsa da hücre kendi içinde bunu onarır ya da apoptoza hatta nekroza uğrar. Kanserli hücreler DNA iplikçiklerindeki hasardan meydana gelir. Hücrede onarılamayan DNA kontrolsüz çoğalma başlar. DNA, birçok nedenden dolayı hasar görebilir. Bunların başında çevresel etkenler (kimyasallar, enfeksiyonlar, obezite, virüs, alkol ve tütün kullanımı veya radyasyon vb.) gelmektedir [113].

Kanser tedavisinde kullanılan konvansiyonel yöntemler ise; radyoterapi, kemoterapötik ilaç tedavisi ve cerrahi müdahale şeklindedir [114].

Kanser araştırmalarında proteomik çalışmalar, karsinogenezis (kansere oluşum mekanizması) durumunda proteinlerde değişimlerin varlığının gösterilmiş olmasına, biyobelirteçlerin keşfine olanak sağlamasına hatta proteomik bulgularla kanser genomunun açıklanmasına izin vermesine karşın, proteinlerin hangi kanser türlerinde ne gibi farklılaşmalar meydana getirdiğinin belirlenmesine hala ihtiyaç duyulmaktadır [115].

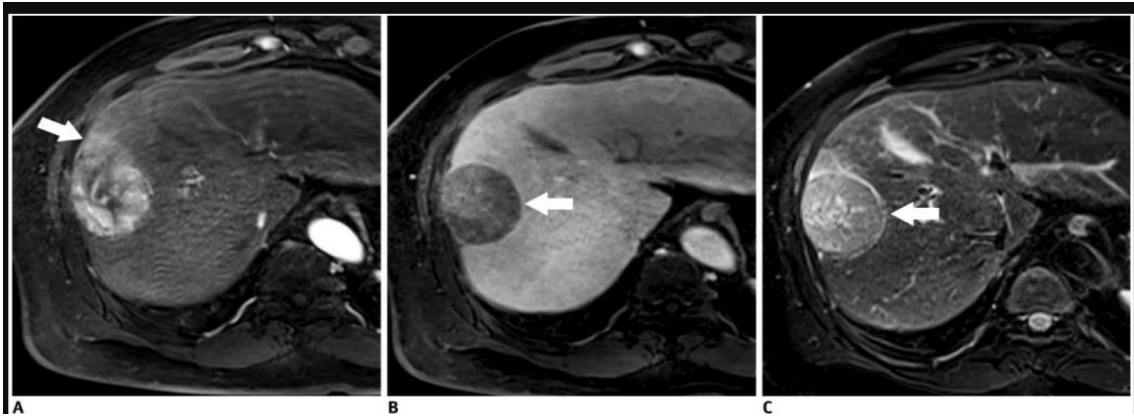
Kanserli hücrelerin çoğalması ile oluşan tümörlerin gelişmesine neden olan majör faktörlerden biri olan apoptotik mekanizmaların (apoptoz, nekroz veya mitotik katastrof) bozulması nedeniyle, kanser araştırmalarında bu alanda proteomik çalışmalar yapılmaktadır [116].

2.11. Karaciğer Kanseri

Karaciğer kanserinin, dünyada en sık teşhis edilen altıncı kanser ve tüm dünyada kanser ölümünün dördüncü nedeninin, yaklaşık 841.000 yeni vakanın ve yılda 782.000 ölümün olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 2.22). Bu fark, bu kanser için son derece kötü

prognuzu yansıtmaktadır; Sağ kalım oranları, Amerika Birleşik Devletleri ve gelişmekte olan ülkelerde kanser kayıtlarında bildirildiği üzere % 3 ile % 5 arasındadır. Dünya çapında primer karaciğer kanseri; hepatosellüler karsinoma (HCC) (vakaların % 75-85'ini içerir) ve diğer nadir tiplerin yanı sıra intrahepatik kolanjiokarsinom (vakaların % 10 - 15'ini içerir) dan oluşur. HCC için ana risk faktörleri ise hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), aflatoksin-kontamine gıda maddeleri tüketimi, ağır alkol alımı, obezite, sigara ve tip 2 diyabet ile kronik enfeksiyondur [117]. Her iki hepatit virüsü de 20 kat artmış karaciğer kanseri riskini beraberinde getirmektedir. Hepatit B virüsü daha yaygın olduğundan, dünya çapında enfeksiyonun dağılımı büyük ölçüde karaciğer kanseri paternlerini açıklar [118].

Kanser tedavi mekanizmalarındaki amaç; kanserli dokuyu kemoterapi ve radyoterapi ile küçültmek; daha sonra cerrahi müdahale (tümörü çıkarmak) ve daha fazla kemoterapi ve radyoterapi takip etmekte ve asıl hedef tümörlü hücrelerin yok edilmesidir. Karaciğer kendini çok hızlı yenileyebilen organların başında yer almakta ve bu nedenle erken teşhis ile birlikte tedaviye daha olumlu cevaplar alınabilmektedir.



Şekil 2.22. Birincil karaciğer kanseri tümörünün farklı kontrast oranlarında magnetik rezonans görüntüsü [119].

Tez çalışmasında; ACD'lerin HEPG-2 kanser hücre hatlarındaki proteinler için etken madde yüklemesi yapılmadan etkileşiminin incelenmesi amacıyla oluşturulan numunelerde kontrol ve tedavi grupları belirlenmiş olup; bu numunelerin 2D-SDS PAGE ve MALDI-TOF/TOF-MS kullanılarak analiz edilmesi ve kanserle ilişkili ve miktarı değişen proteinler belirlenerek antikanser mekanizmasının açıklanmaya çalışılmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

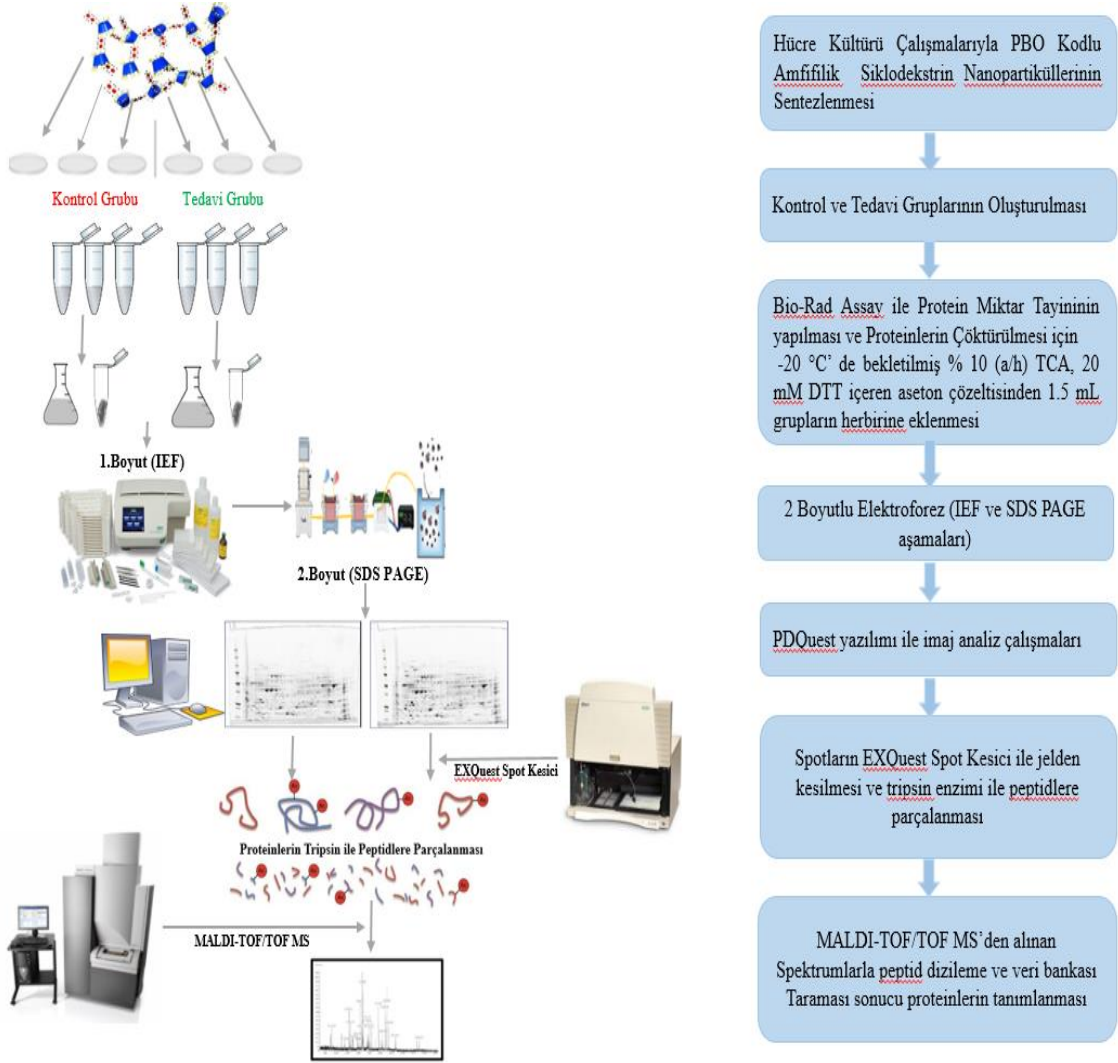
3.1. Gereçler (Kullanılan Kimyasallar, Araç ve Gereçler, Yazılımlar, Veritabanları, Hazır/lanan Tamponlar-Çözeltiler)

Aşağıdan-yukarıya yaklaşımıyla tasarlanan tez çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler (Çizelge 3.1), kullanılan araç ve gereçler (Çizelge 3.2), kullanılan yazılım ve veritabanı (Çizelge 3.3), kullanılan hazır tamponlar ve çözeltiler (Çizelge 3.4), hazırlanan tampon ve çözeltiler (Çizelge 3.5)'de verilmiştir.

Çalışmada, kullanılan tampon ve çözeltiler protokol şartlarına uygun olarak tablolarda verildiği üzere hazırlanmıştır.

3.1.1. Tez Çalışmasında Uygulanan Genel Metodoloji

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen çalışmalara ait akış şeması Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Tez çalışmasında uygulanan genel metodolojinin aşamaları.

PBO kodlu siklodekstrin nanopartikülleri Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji A.B.D. Öğretim Görevlisi Prof. Dr. Erem Bilensoy’un katkılarıyla Doç. Dr. Mustafa Çelebier’in yürütücüsü olduğu TÜBİTAK 115S456 nolu proje kapsamında hazırlanmış ve tez çalışması için HEPG-2 karaciğer kanseri hücrelerine uygulanmak üzere tarafımıza iletilmiştir.

3.1.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Kanserli hücre hattı, DMEM' in ısıyla inaktive edilmiş % 5 fetal sığır serumu içerdiği ortama 2 mM L-glutamin, 50 U mL⁻¹ penisilin G ve 50 µg/ml streptomisin ilave edilerek 37 °C nemli atmosfer altında % 5 CO₂ uygulanarak 60 mm çapında hücre kültürü kaplarında cm² başına 10000 hücre olacak şekilde çoğaltılmıştır. Hücrelerin iki gruba ayrılması sağlanmıştır.

İlk grup, 5 µM CD (PBO kodlu ACD nanopartikül kullanılmıştır) ile muamele edilip 48 saat boyunca bekletilmiştir. Bu işlenmiş ya da CD uygulanmayan HEPG-2 hücreleri kontrol (C) grubu; uygulananlar ise işlem görmüş grup tedavi (T) grubu olarak işaretlenmiştir.

3.1.3. Numune Hazırlama ve Protein Miktar Tayini

Hücre kültürü çalışmalarının ardından T ve C grupları hazır temin edilen fosfat tamponlu salin çözeltisi ile yıkanarak homojenizasyon tamponunda çözülmüş ve homojenizatör cihazı yardımıyla homojenat hazırlanmıştır. Homojenat santrifuj edilmiş ve santrifuj işlemi (14.000 g x 14 dk, 4 °C' de) sonrasında oluşan çökelti sonrası mitokondriyal ve nükleer fraksiyon atılmıştır. Geri kalan çözelti ultrasantrifuj cihazında tekrar santrifujlenmiştir (100.000 g x 1 saat, 4 °C). Sitozolik kısımlar alınarak kullanılacağı tarihe kadar -80 °C' de 500 µL' lik bölümler halinde saklanmıştır.

Bio-RadTM protein assay, "protein assay dye reagent concentrate" adında boya, fosforik asit ve metanol karışımından oluşan derişik çözelti bulundurmaktadır. Protein miktar tayini için büyükbaş hayvanların serumundan oluşturulan albumin çözeltisi standart olarak kullanılmıştır. 10 mg mL⁻¹ derişimdeki hazır alınmış stok çözülden 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.5, 0.75 ve 1.5 mg mL⁻¹ derişiminde 7 farklı çözelti toplam hacim en az 150 µL olacak şekilde mikropipet kullanılarak uygun seyreltme oranlarında seyreltilmiş ve taze hazırlanmıştır. Bio-RadTM protein assay kullanımında hazır temin edilen derişik boya çözeltisinden prosedür uyarınca 600 µL alınmış ve 2400 µL su kullanılarak toplam hacim 3 mL' ye seyreltilmiştir. 200 µL seyreltik boya çözeltisi üzerine 10 µL standard çözelti ilave edildikten sonra vortekslenmiştir. Bradford metodu kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan Kimyasal	Kullanım Amacı	Markası ve Menşei
%30' luk ultrasaf gliserol	Dengeleme tamponlarının hazırlanmasında	Bio-Rad (CA, ABD)
Agaroz (%0.5 eritilmiş agaroz, 1x Tris-Glisin-SDS ve %0.001 bromfenol mavisi içeren)	SDS-PAGE (2.boyut)	Bio-Rad (CA, ABD)
Akrilamid (AA)	İndirgeyici ajan	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Amonyum bikarbonat	Jelden kesilen spotların yıkanması için	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Aseton	Proteinlerin çöktürülmesi	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Asetonitril (HPLC grade)	Jelden kesilen spotların yıkanması için	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Bio-Lyte 3/10 Ampholyte	Yükleme tamponunun hazırlanmasında	Bio-Rad (CA, ABD)
CHAPS BioXtra, $\geq 98\%$	Yükleme tamponunun hazırlanmasında	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
DL-Ditiotreitol (DTT)	Proteinlerin çöktürülmesi ve yükleme tamponunun hazırlanmasında	Fluka (Buchs, İsviçre)
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) disodyum tuzu	Homojenizasyon tamponunun hazırlanmasında	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Glasiyel Asetikasit	Jellerin yıkamasında	Scharlu (Barcelona, İspanya)

Kullanılan Kimyasal	Kullanım Amacı	Markası ve Menşei
HCl	Tampon çözelti pH ayarlamada	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
İyodoasetamid (IAA)	Alkilleyici ajan	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Metanol	Jelleri yıkamak için	Lab-Scan (Gliwece, Polonya)
Mineral Yağı	IEF (1.boyut)	Bio-Rad (CA, ABD)
NaCl	Homojenizasyon tamponunun hazırlanmasında	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Precision Plus Protein All Blue Standards	SDS-PAGE (2.boyut) için Biyobelirteç	Bio-Rad (CA, ABD)
Precision Plus Protein Unstained Standards	SDS-PAGE (2.boyut) için Biyobelirteç	Bio-Rad (CA, ABD)
Protein assay dye reagent	Protein miktar tayininde	Bio-Rad (CA, ABD)
Protein assay standard II (bovine serum albumin)	Protein miktar tayininde referans	Bio-Rad (CA, ABD)
SYPRO-Ruby Protein Gel Stain	Jelleri boyamak için	Bio-Rad (CA, ABD)
Triflorasetikasit (TFA)	MALDI-TOF-MS ile peptit analizi sırasında protein parçalanma reaksiyonunun durdurulması için	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Triklorasetikasit (TCA)	Proteinlerin çöktürülmesi	Merck (NJ, ABD)
Tripsin (sequencing grade)	Analiz edilecek proteinlerin peptitlere parçalanması için	Promega (WI, ABD)
Trizma (minimum %99.9)	Homojenizasyon tamponunun hazırlanmasında	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
α -ciyano-4-hidroksisinamik asit	MALDI-TOF/TOF-MS ile peptit analizi sırasında kullanılan matriks	Sigma-Aldrich (MO, ABD)

Çizelge 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Kullanılan Kimyasal	Kullanım Amacı	Markası ve Menşei
HCl	Tampon çözelti pH ayarlamada	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
İyodoasetamid (IAA)	Alkilleyici ajan	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Metanol	Jelleri yıkamak için	Lab-Scan (Gliwece, Polonya)
Mineral Yağı	IEF (1.boyut)	Bio-Rad (CA, ABD)
NaCl	Homojenizasyon tamponunun hazırlanmasında	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Precision Plus Protein All Blue Standards	SDS-PAGE (2.boyut) için Biyobelirteç	Bio-Rad (CA, ABD)
Precision Plus Protein Unstained Standards	SDS-PAGE (2.boyut) için Biyobelirteç	Bio-Rad (CA, ABD)
Protein assay dye reagent	Protein miktar tayininde	Bio-Rad (CA, ABD)
Protein assay standard II (bovine serum albumin)	Protein miktar tayininde referans	Bio-Rad (CA, ABD)
SYPRO-Ruby Protein Gel Stain	Jelleri boyamak için	Bio-Rad (CA, ABD)
Triflorasetikasit (TFA)	MALDI-TOF-MS ile peptit analizi sırasında protein parçalanma reaksiyonunun durdurulması için	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
Triklorasetikasit (TCA)	Proteinlerin çöktürülmesi	Merck (NJ, ABD)
Tripsin (sequencing grade)	Analiz edilecek proteinlerin peptitlere parçalanması için	Promega (WI, ABD)
Trizma (minimum %99.9)	Homojenizasyon tamponunun hazırlanmasında	Sigma-Aldrich (MO, ABD)
α -ciyano-4-hidroksisinamik asit	MALDI-TOF/TOF-MS ile peptit analizi sırasında kullanılan matriks	Sigma-Aldrich (MO, ABD)

Çizelge 3.3. Kullanılan Yazılım ve Veritabanı

Yazılım/Veritabanı	Kullanım Amacı	Firma/Kaynak
PDQuest™ 2D Analysis Software (versiyon 8.0.1)	İmaj analizinde	Bio-Rad (CA, ABD)
ABi 5800 Series Explorer Spot Set Manager	Numunelere ait spektrumların kaydedilmesinde	Applied Biosystems
MASCOT software v.2.2.04 (KABİ Proteomik Lab Bünyesinde)	Peptit dizileme çalışmalarında	Matrix Science (İnternet üzerinden erişilebilen veritabanıdır. Ticari amacı bulunmamaktadır).
GPS Explorer™ v4.9	Peptit dizileme çalışmalarında veritabanının kullanılmasında	Applied Biosystems
NCBI protein database (NCBI no. 20100930 (11,960,556 sequences; 4,082,908,561 residues)). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein	Peptit dizileme çalışmalarında veritabanı olarak yararlanılmak amaçlı	National Center for Biotechnology Information from web.

Çizelge 3.4. Kullanılan Hazır Tamponlar ve Çözeltiler

Kimyasal	Kullanım Amacı	Firma
Dengeleme tamponu (375 mM Tris-HCl, 6 M Üre, %2 SDS, pH: 8.8)	İzoelektrik odaklama sonrasında IPG şeritleri şartlandırmak için	Bio-Rad (CA, ABD)
Yükleme tamponu (8 M üre, %2 CHAPS, 50 mM DTT, %0.2 Bio-Lyte 3/10 amfolit, 0.001% bromofenol mavisi)	Çöktürülen proteinleri tekrar çözerek IPG şeritlere yüklemeye	Bio-Rad (CA, ABD)
Criterion XT MOPS Buffer (20x)	SDS-PAGE (2.boyut) Criterion XT Precast Gel ile kullanılmak üzere	Bio-Rad (CA, ABD)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Hücre kültürü çalışmalarında	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Salin Çözeltisi (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH:7.4)	Hücre kültürü çalışmalarında	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)

Çizelge 3.5. Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler

Tampon/Çözelti	Hazırlanışı
%0.5 Triflorasetikasit çözeltisi	250 µL Triflorasetikasit, suda çözülerek hacim 50 mL 'ye tamamlanmıştır.
%10 (a/h) TCA, 20 mM DTT içeren aseton çözeltisi	0.1234 g DTT ve 4.0 g TCA tartılıp yavaş yavaş aseton ilave edilerek karıştırılmıştır. Her ikisi birden çözülmüş olup ve hacim 40 mL 'ye tamamlanmıştır.
%25 Asetonitril/50 mM Amonyumbikarbonat (h/h) çözeltisi	0.3953 g NH ₄ HCO ₃ tartılıp bir miktar distile suda çözülmüştür. Üzerine 25 mL asetonitril ilave edilip hacim suyla 100 mL 'ye tamamlanmıştır.
%7 (h/h) ' lik asetik asit çözeltisi	500 mL su üzerine 70 mL glasiyel asetik asit ilave edildi, karıştırılmış ve hacim 1 L' ye tamamlanmıştır.
%7 (h/h) asetik asit, %10 (h/h) metanol çözeltisi	500 mL su üzerine 70 mL glasiyel asetik asit ve 100 mL metanol ilave edilip karıştırılmış ve hacim 1 L' ye tamamlanmıştır.
10 mM DTT içeren 25 mM amonyumkarbonat çözeltisi	15.4 mg DTT tartılıp 10 mL 25 mM amonyumkarbonat çözeltisinde çözülmüştür.
16 µg mL ⁻¹ tripsin içeren %25 Asetonitril/50 mM Amonyumbikarbonat (h/h) çözeltisi	0.0016 g tripsin tartılmış olup yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan çözelti içinde kullanılmadan hemen önce çözülmüştür.
50 mM Amonyumbikarbonat çözeltisi	0.3953 g NH ₄ HCO ₃ tartılmış olup bir miktar distile suda çözülerek hacim 100 mL 'ye tamamlanmıştır.
55 mM IAA içeren 50 mM amonyumkarbonat çözeltisi	104 mg IAA tartılıp 10 mL 25 mM amonyumkarbonat çözeltisinde çözülmüştür.

Tampon/Çözelti	Hazırlanışı
1. Dengeleme tamponu	13.35 mL %30' luk ultrasaf gliserol, 1 şişe hazır dengeleme tamponu katı karışımını çözmek için kullanılmıştır. Çözeltinin 4 mL' lik iki kısmı ayrılmıştır. Bu kısımlardan ilki kullanılmadan önce %2 DTT içerecek şekilde hazırlanmıştır.
2. Dengeleme tamponu	0.1 g IAA tartılmıştır. Dengeleme tamponu 1 için hazırlanan 4 mL' lik ikinci kısma kullanımdan hemen önce ilave edilerek karıştırılmıştır. Taze çözelti hazırlanmıştır.
Homojenizasyon tamponu (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 120 mM NaCl, pH: 7.4)	1.211 g Trizma bazı tartılmış olup hacim 100 mL olacak şekilde suda çözülmüştür. 1.871 g EDTA disodyum tuzu tartılmış olup hacim 100 mL olacak şekilde suda çözülmüştür. 2.922 g NaCl tartılmış olup hacim 50 mL olacak şekilde suda çözülmüştür. 10 mL Trizma çözeltisi, 10 mL EDTA çözeltisi ve 12 mL NaCl çözeltisi karıştırılmıştır. Hacim 95 mL' ye tamamlanmıştır. 1:5 oranında seyreltilmiş HCl çözeltisinden birkaç damla damlatılarak manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırılarak bir pH metre yardımıyla pH: 7.4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Homojenizasyon tamponunda protein denatürizasyonu olmaması amacıyla SDS kullanılmamıştır.
Yükleme tamponu (8 M üre, %2 CHAPS, 50 mM DTT, %0.2 Bio-Lyte 3/10 amfolit, 0.001% bromofenol mavisi)	4.805 g üre ve 0.2 g CHAPS tartılmıştır. Her ikisi de 5 mL suda düşük sıcaklıkta (~40 °C' de) manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırılarak çözülmüştür. Sıcaklığın yükselmesi önlenmiştir. Daha sonra hacim 10 mL' ye tamamlanmıştır. Ependorf tüpler içinde 250 µL olacak şekilde porsiyonlara bölünmüş olup -20 °C' de saklanmıştır. Kullanılmadan önce çözülüp vortekslendikten sonra üzerine her bir porsiyon için 20 µL Bio-Lyte 3/10 amfolit ve 1 damla kadar bromfenol mavisi mikropipetle eklenmiştir.

3.2. Yöntem

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji A.B.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Erem Bilensoy'un katkılarıyla Doç. Dr. Mustafa Çelebier'in yürütücüsü olduğu TUBİTAK 115S456 nolu proje kapsamında hazırlanmış ve tez çalışması için HEPG-2 karaciğer kanseri hücre hatlarına uygulanmak üzere tarafımıza verilen PBO kodlu CD nanopartikülleri Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ayşe Ercan'ın katkısıyla HEPG-2 hücrelerine in-vitro olarak 24 saat süresince uygulanmıştır.

3.2.1. Proteinlerin Çöktürülmesi

Proteinlerin eldesi ve çöktürülmesi amacıyla, hedef CD ile etkileşmiş HEPG-2 hücre hatlarından T ve C grupları için stoplazmadaki fraksiyonlar her bir tüp için 0.5'er mL olacak şekilde ependorf tüplere ayrılmıştır ve -85°C' de bekletilmiştir. Tüpler, proteomik çalışmalarda her bir hücre hattı için T ve C gruplarına ait toplam 2' şer mL olacak şekilde (3 adet T grubu için, 3 adet C grubu için toplam 6 ependorf tüp) alınarak oda sıcaklığında (25 °C) çözülene kadar bekletilmiş olup hemen arkasından vorteksleme yapılmıştır. Oluşturulan çözeltiler, T ve C grupları için 6 ayrı tüpe 250' şer µL olacak şekilde bölünmüştür. Üstlerine -20 °C' de bekletilmiş soğuk 20 mM DTT, % 10 (a/h) TCA içeren aseton çözeltisinden 1.5 mL eklenmiştir. Proteinlerin çöküşü takip edilmiştir. Çöken proteinlere tekrar vorteksleme yapılarak ve -20 °C' de 24 saat beklemeye bırakılmıştır. 24 saat sonra eppendorftaki örnekler 10.000 rpm' de 15 dakika boyunca 10 °C' de santrifuj edilmiştir. Pelletler, iki kez 1 mL, bir kez 0.5 mL -20 °C' de bekletilmiş asetonla yıkanarak ependorf tüp içinde oda sıcaklığında kurutulmak üzere tekrar beklemeye alınmıştır. Asetonun uzaklaştırılması ile kuruyan pelletler ticari olan hazır yükleme tamponunda çözülmüş ve 1 saat boyunca oda koşullarında Eppendorf thermo mixer cihazı ile karıştırılarak inkübe edilmiştir. Proteinlerin çöktürülmesi çalışmalarında proteinlerin geri kazanımının en üst düzeyde olması amaçlanmıştır.

3.2.2. Proteinlerin IPG Şeritlere Yüklenmesi

Proteinler, çöktürme ve miktar tayini sonrası yaklaşık 1 µg mL⁻¹ derişimde hazırlanan yükleme tamponunda çözülmüş ve %0.2 Bio-Lyte 3/10 amfolit, 0.001% bromofenol mavisi eklendikten 300 µL' lik kısımlar halinde protein çözeltisi, her bir grup için (T ve C grupları) 3 farklı IPG şeride (pH 5-8) aktarılmıştır.

Yükleme işlemi sırasında önce numuneler mikropipetle tabla kanallarına eklenmiş olup; -20 °C’ de bekletilen ticari IPG şeritlerin oda sıcaklığına getirildikten sonra parafilm koruyucu tabakası çıkarılarak, uçları kanal başı ve sonlarına değmeyecek şekilde numunelerin üstüne, çıkarılan tabakaların bulunduğu yönde yerleştirilmiştir (Şekil 3.2). Mineral yağlı ortamda, proteinin şeritlere difüzyonu amacıyla 2 saat beklenmiştir. Süre sonunda her stripe 1.5-2 mL tekrar mineral yağı ilave edilmiş 3-4 saat beklemeye bırakılmıştır. Ortamın mümkün olduğunca az ışıktaki olmasına ve bekletilen yerin karanlık olmasına dikkat edilmiştir.

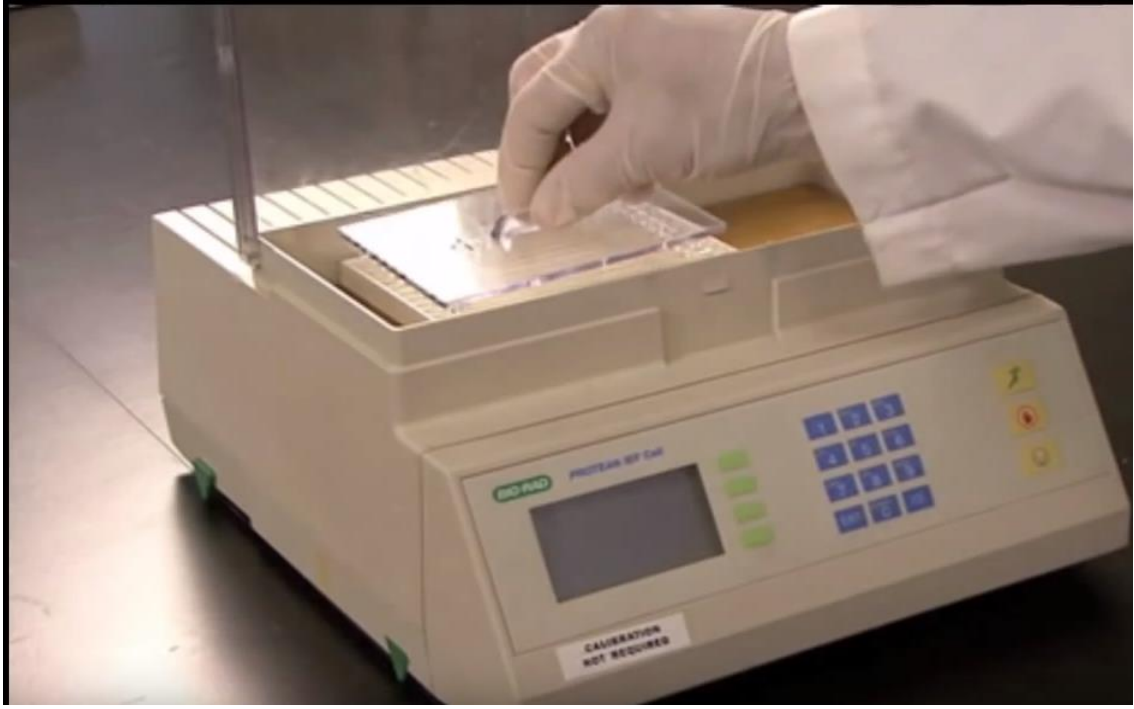


Şekil 3.2. IPG şeritlerin protein numunelerinin üzerine yerleştirilmesi.¹

3.2.3. Birinci Boyut-Proteinlerin İzoelektrik Noktalara Ayrılması

Proteinlerin nüfuz ettiği IPG şeritler önce IEF cihazına ait elektrik akımının iletilmesini sağlayan farklı bir tablaya alınmıştır. Saf suya daldırılıp çıkarılan ticari elektrot kağıtları şeritlerin kutuplarının tablanın elektrik akımını ileten kutupları ile temasını sağlar. Tabladaki herbir kanala 2.5 mL mineral yağı eklenir. Tabla IEF cihazına yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). IEF cihazına uygulama parametreleri Çizelge 3.6’da gösterildiği gibi parametreleri üç aşamada uygulanmıştır.

¹ Bu çalışmada; Bio-Rad™ kitlerinin kullanılması nedeniyle görüntülerin bir kısmı Bio-Rad™ orijinal kılavuz ve dökümanlarından elde edilmiştir.



Şekil 3.3. IPG şeritlerin PROTEAN IEF sistemine yerleştirilmesi¹.

Çizelge 3.6. IEF Sistemi Uygulama Parametreleri.

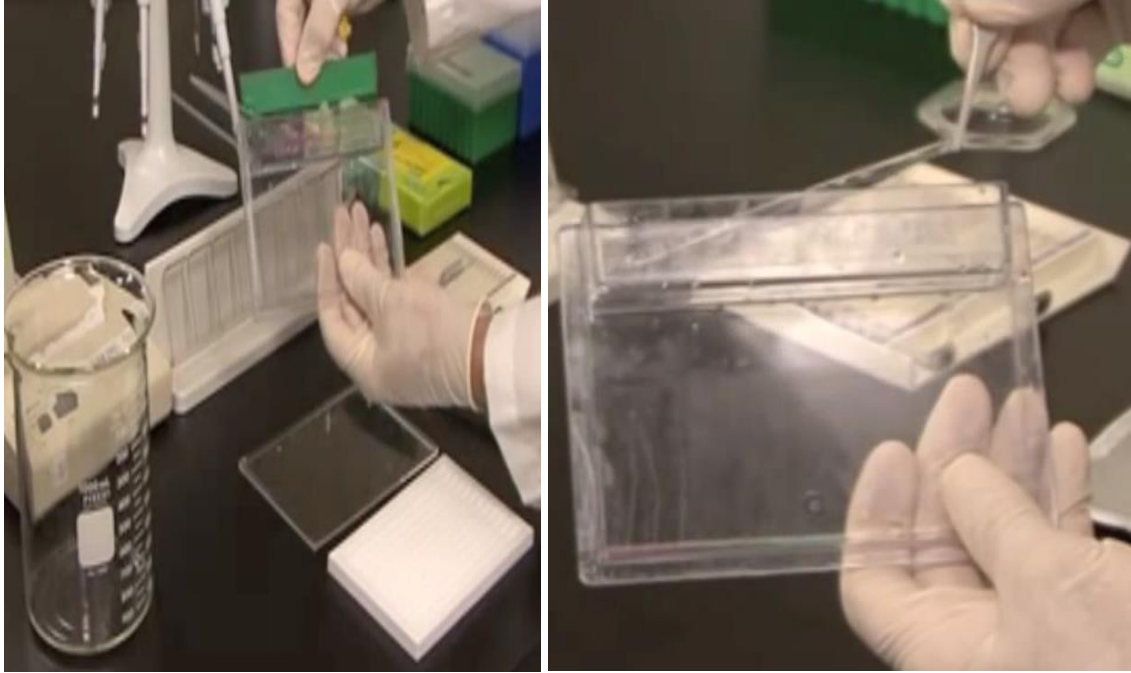
11 cm IPG şerit (pH 5-8)	Voltaj (V)	Mod	Süre (saat)
1	1000	Lineer	4
2	8000	Lineer	2
3	1000	Lineer	8

3.2.4. İkinci Boyut SDS-PAGE

PI'larına göre ayrılan proteinlerin bulunduğu IPG şeritler üzerinde bulunan mineral yağdan uzaklaştırmak için odaklama tablasından çıkarılarak, 60 saniye dik olarak tutulur ve kağıt üzerinde bekletilmiştir. IPG şerit tablasına yerleştirilerek burada önce 4 mL 1.dengeleme tamponu tatbik edilerek 15dk. beklenir. Daha sonra yeni bir şerit tablasına koyulan IPG şeritlere 2.dengeleme tamponu tatbik edilerek yine 15 dk. beklenmiştir. Bu tamponların eklenmesindeki amaç, proteinlerin okside olmasını engellemek, akrilamid ile reaksiyonu önlemektir.

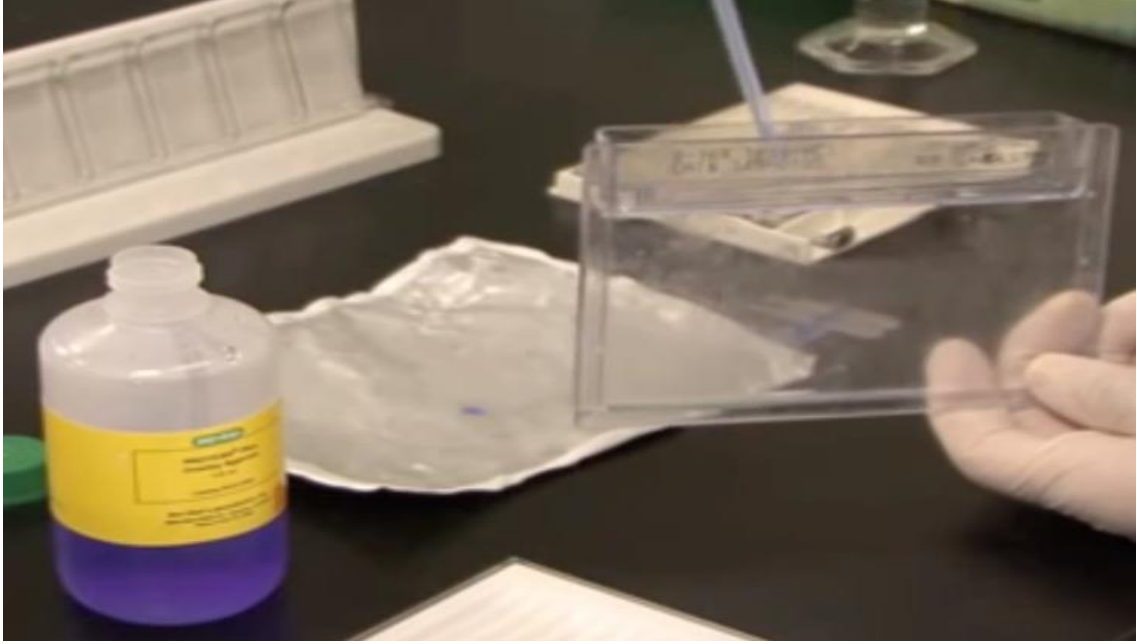
Ticari tampon olan Criterion XT MOPS Buffer 1:20 oranında seyreltilmiştir. Tampondan alınan 25 mL'lik kısım IPG şeritlerinden dengeleme tamponunu uzaklaştırmak amacıyla kullanılmıştır.

Ticari jel olan +4 °C'de bekletilen Criterion XT jel (4-12%, Bis-Tris IPG 1 Well Comb, 11 cm, 1.0 mm) saydam kaset içinde bulunmaktadır. Kasetteki koruyucu yeşil bölge çıkarılıp. IPG şeritler kasete jel kısmı dışarı bakacak yönde yerleştirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kasetin hazırlanması ve jellerin yerleştirilmesi¹.

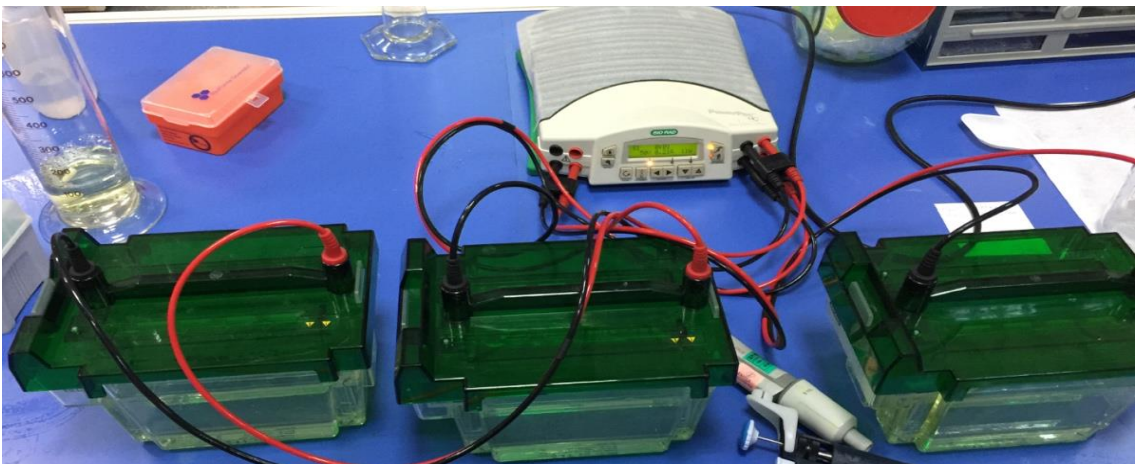
Agaroz çözeltisi (%0.5 eritilmiş agaroz, 1x Tris-Glisin-SDS ve %0.001 bromfenol mavisi içeren) +40 °C'de akıcı hale gelene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra SDS-PAGE içindeki şerit yuvasının üstüne mikropipet aracılığıyla eklenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Agaroz çözeltisinin uygulanması¹.

SDS anot ve katot tamponları Criterion Cell’de belirlenmiş bölgelere kadar doldurulmuştur. Biyobelirteçler (“Precision Plus Protein™”) kasette bulunan yuvalara mikropipet ile vasıtasıyla 4 µL eklenmiştir.

Çalışmamızda, 6 grup (3 T, 3 C) bulunmaktadır. Bu nedenle, üç üniteye ihtiyaç duyulmuştur (Şekil 3.5). Bu üç ünite (PowerPac HC Power Supply) güç ünitesine bağlanarak her bir jel için öncelikle 100 V daha sonra akımın limit değeri olan 500 A çıkmasıyla 35. dk.’dan sonra voltaj değeri 150 V olarak ayarlanmıştır. Akım değeri 350 A civarına çekilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Üç adet Bio-Rad™ Criterion Cell’in bağlanması ve kasetlere voltaj uygulanması.

Bromfenol mavisinin jelde düzenli bir şekilde aşağıya doğru ilerlemesi takip edilmiştir. İlerlemenin jelin altına gelmesi ile SDS-PAGE süreci yaklaşık 2 saat sürede tamamlanmıştır.

Jeller kasetlerinden hassas şekilde jel kazıyıcı aracılığıyla çıkarılarak, distile su ile hasar görmeyecek şekilde; daha sonra %10 metanol ve %7 asetik asit içeren çözeltiyle tekrar yıkanarak 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

İmaj görüntüleme amacıyla, 24 saat sonra 20 mL SYPRO Ruby protein jel boyama çözeltisi yüzeyi kaplayacak şekilde jellerin üzerine ilave edilmiş ve jellerin bulunduğu kaplar alüminyum folyoyle sarılarak orbital karıştırıcı üzerinde 48 saat beklemeye alınmıştır. Boyanan jellerin görüntüleri imaj görüntüleme cihazı ile fotoğrafları çekilmek suretiyle alınmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad™ İmaj Sistemi ile jellerin görüntülerinin alınması.

3.2.5. Jel Haritalaması ve Proteinlerin Jelden Uzaklaştırılması

Belirlenen jel haritası, seçilen imaj analiz programı olan PDQuest™ (v8.0.1) yazılımı ile analiz edilmiştir. Yazılımda farklılaşan spotların belirlenmesi amacıyla intensitesi(yoğunluğu) en küçük, en büyük ve en silik spot fiziksel olarak tespit edilmiştir. Belirlenen spotlar aracılığı ile yazılım jel haritasında tüm spotları otomatik olarak belirlemiştir. Yazılım tarafından belirlenemeyen spotlar fiziki olarak tespit edilmiş olup;

bütün spotlar her bir jel için eşleştirildiğinde intensiteleri grup (T ve C grupları) içinde %90 güven seviyesinde olanlar ‘Grup 1’; gruplar arasındaki intensiteleri 2 kat farklılaşmış spotlar ‘Grup 2’; oluşturulan bu her iki grubun kesişimindeki spotlar ise ‘Grup 3’ kümesinde tanımlanmıştır. ‘Grup3’ de tespit edilen tüm spotlar ve jel haritaları göz taramasıyla tekrar kontrol edilmiştir. Sonuç olarak kendi grup içinde %90 güven seviyesinde intensiteleri örtüşen; fakat gruplar arasında 2 kat intensite farkı olan spotların konumları belirlenmiştir.

Laboratuvarımız bünyesinde MALDI-TOF/TOF-MS cihazı bulunmaması nedeniyle, tespit edilen ve iki grup arasında değişim gözlenen spotların jellerden yüksek geri kazanımla alınabilmesi için çalışmaların bundaki sonraki kısmı Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Birimi (KABİ) Proteomik Laboratuvarında hizmet alımı aracılığıyla Doç. Dr. Güler Akpınar’ın katkılarıyla gerçekleştirilmiştir.

En çok farklılaşan spotlar tespit edilerek MALDI-TOF/TOF MS’de analiz edilmek üzere Bio-Rad™ EXQuest aracılığıyla hassas bir şekilde itinayla jellerden ayrılıp, eppendorflara yerleştirilmiştir.

3.2.6. Seçilen Proteinlerin Peptidlere Parçalanması

Kesilen protein spotlarını içeren tüpler, 96 delikli levhaya alınmıştır. Protein fraksiyonlarını MS’e hazırlamak amacıyla, Proteomik dp™ cihazına yerleştirildikten sonra spotlar, 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi ile yıkanmıştır (Şekil 3.8).

Proteinlerin yükseltgenmesi amacıyla 10 mM DTT içeren 25 mM amonyum bikarbonatla; proteinlerin alkali hale gelmesi amacıyla 55 mM IAA içeren 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi ile tekrar yıkanmıştır. Spotların kuru azot altında kurutulmasından önce 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi ve asetonitril ile tekrar yıkanmıştır. 16 µg mL⁻¹ tripsin içeren % 25 asetonitril/50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi spotların üzerine eklenmiş ve 37 °C’ de 5 saat inkübe edilmiştir. %0.5 TFA çözeltisi eklenmesi amacıyla parçalanma reaksiyonu duraklatılmış olup peptidlere ekstrasyon uygulanmış ve sonrasında 15 dakika santrifujlenmiştir. 0.8 µL hazırlanan örnek çözeltisi, 386 delikli OptiTOF™’ye alınarak 25°C’de kurutulmuştur. 3 mg.mL⁻¹ α-ciano-4-hidroksisinamik asit çözeltisi içerecek şekilde hazırlanan 0.8 µL’ lik MALDI çözeltisi OptiTOF™’deki numunelere ilave edildikten sonra 25°C’de kuruyana kadar bekletilmiştir.



Şekil 3.8. Proteineer dp™ Fraction Collector Cihazı, Bruker Daltonics.

3.2.7. Proteinlerin Tanımlanması

Hazırlanan numuneler, MALDI-TOF/TOF MS ile analiz edilmiştir. MS cihazı hızlandırma potansiyeli 25kV, MS/MS için 1kV voltaj ve pozitif iyon modunda çalıştırılarak spektrumlar alınmıştır.

3.2.8. Tanımlanan Proteinlerin Literatür ve Veri Bankası Aracılığıyla Kansere İlişkilendirilmesi

MALDI-TOF/TOF-MS'den alınan spektrumlar, GPS Explorer v4.9.2 aracılığıyla MASCOT v2.2.04 programına aktarılmış olup; NCBI (National Center of Biotechnology Information) protein veri bankasında spektrumlar için tarama yapılmıştır. Güven seviyesi %90 seviyesinde olası proteinler tanımlanmıştır.

Çalışmada, HEPG-2 kanser hücre hatları için ACD nanopartiküllerinin etkileşim mekanizması ve seviyesi, peptid dizileme çalışmaları ve değişen protein yapıları ile aydınlatılmaya çalışılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Proteomik Çalışmalar

Bölüm 3’de belirtildiği gibi hassasiyetle elde edilen jel görüntülerinde ve jellerden itinayla kesilerek alınan spotların incelenmesi sonucu farklılaşan proteinlerin tespit edilmesine ve sistematik hataların minimize edilmesine çalışılmıştır. Optimum koşulların kalibrasyonu yapılarak deney protokolü oluşturulmuştur.

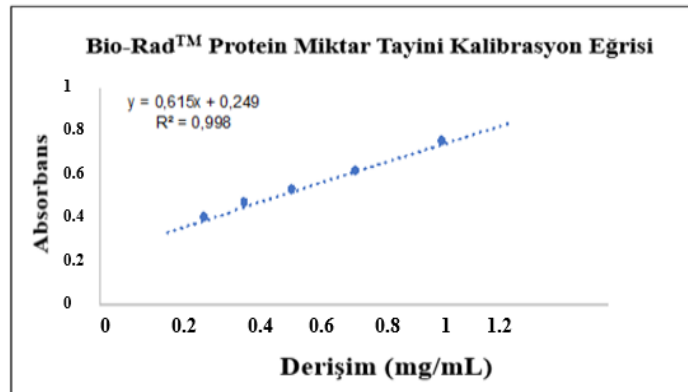
4.1.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bölüm 3.1.2’de anlatıldığı gibi hücre kültürü çalışmalarından elden edilen hücreler çoğaltılarak C ve T gruplarına ayrılmıştır.

4.1.2. Numune Hazırlama ve Protein Miktar Tayini

Bölüm 3.1.3’de anlatıldığı gibi sitozolik fraksiyonlar elde edilmiştir. Protein miktar tayini amacıyla, 10 mg/mL derişimdeki hazır satın alınan albümin stok çözeltisinden 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.5, 0.75 ve 1.5 mg/mL derişiminde 7 farklı çözelti toplam hacim en az 150 µL olacak şekilde uygun seyreltme oranlarında seyreltilerek taze hazırlanmıştır. Bio-Rad™ protein assay’de hazır temin edilen derişik boya çözeltisi seyreltilerek kullanılmıştır.

Numune çözeltileri 1:16 oranında standartla uyumlu ve uygulanan metoda göre seyreltilerek analiz edilmiş, kalibrasyon eğrisine girecek miktarda ayarlanmıştır (Şekil 4.1). Tüm ölçümler mikro plaka okuyucu spektrofotometre kullanılarak uygun dalga boylarında en az 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Bio-Rad™ protein miktar tayini kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

C ve T grubu için elde edilen sitozolik fraksiyonlarda protein derişiminin 1.0 mg/mL'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

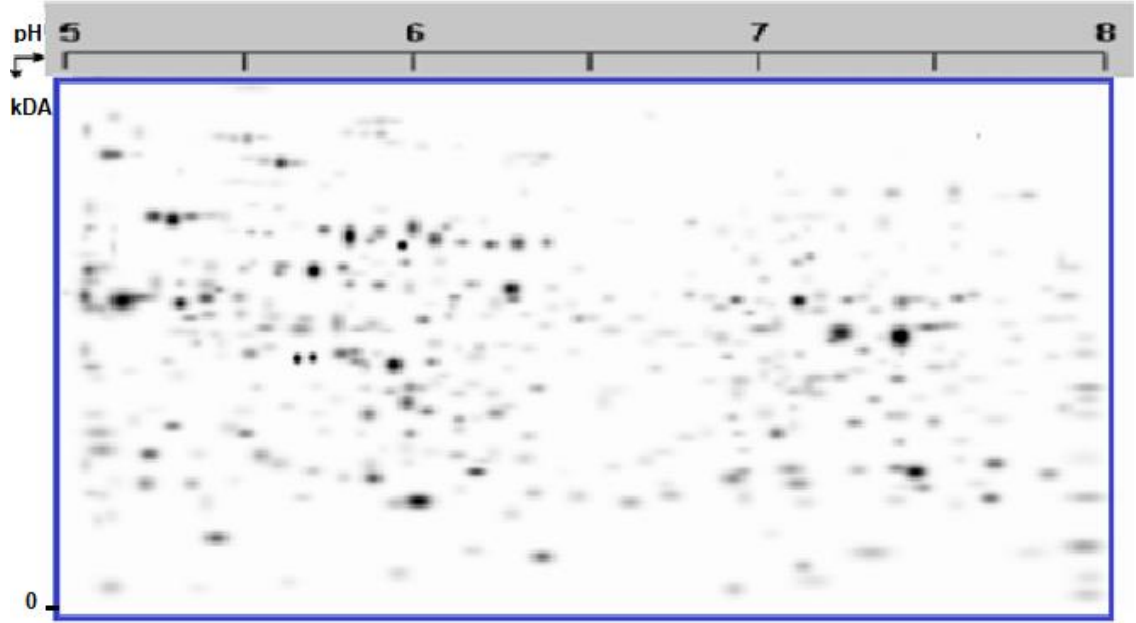
4.1.3. 2D Jel Elektroforez Şartlarının Optimizasyonu

Elektroforez aşamalarının optimize edilebilmesi amacıyla aşağıda sıralanan parametreler belirlenerek optimum şartlar sağlanmaya çalışılmıştır. Optimum koşullar aşağıda belirtildiği şekilde bulunmuştur:

- Yüklene protein miktarı (200 µg)
- Proteinlerin çöktürülmesi (20 mM DTT, %10 (a/h) TCA içeren aseton çözeltisi)
- Yükleme tamponu (Hazır satın alınan ve hazırlanan)
- Bio-Rad™ IPG şerit pH aralığı (5-8)
- İndirgeyici alkilleyici ajan kombinasyonu (DTT-IAA)
- SDS PAGE için kullanılan hazır jeller (Bio-Rad™ Criterion XT jel 4-12% Bis-Tris IPG)
- Boyama tekniği (hazır satın alınan SYPRO Ruby)
- Görüntüleme koşulları (ChemiDoc™ image system'de jellerin en yüksek kontrastta en iyi şekilde görüntülenmesini sağlamak için yapılan çalışmalar)
- PDQuest™ 2D Analiz yazılımı aracılığıyla belirlenen en fazla sayıda spotun içinden en fazla değişim gösteren spotları tespit edebilmek için yazılım koşulların saptanması.

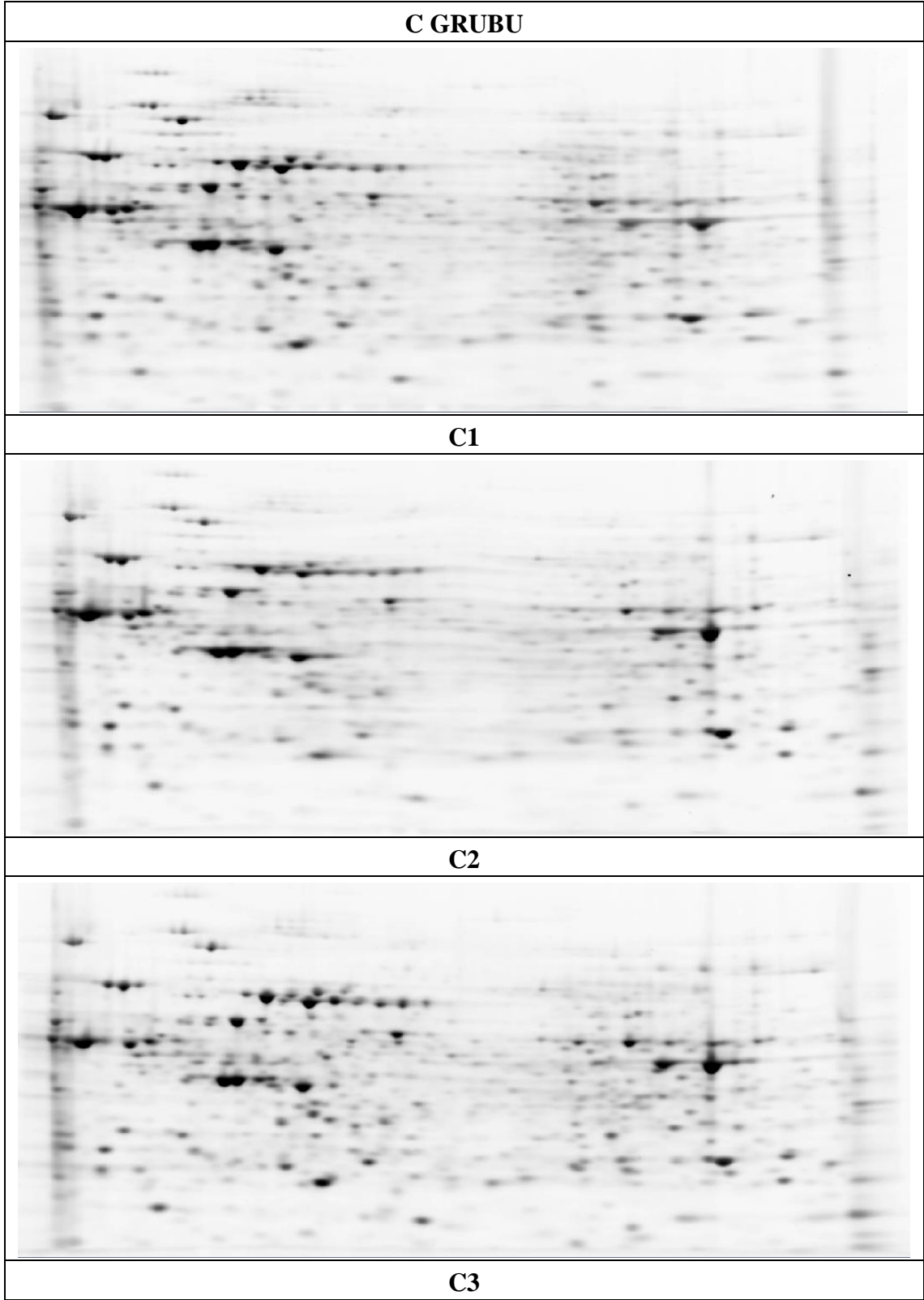
4.1.4. İmaj Analiz Çalışmaları

Bölüm 3.2'de anlatıldığı üzere jel haritalarının T ve C grupları için çıkarıldıktan sonra PDQuest™ yazılımına aktarılmasıyla farklılaşan intensitelere sahip spotların belirlenmesi sağlanmıştır. Yazılım va algoritması aracılığıyla tüm gruplara ait jellerden oluşan sanal jele ait görüntü aşağıdadır. Analiz çalışmaları, tüm gruplar için Şekil 4.2'de belirtilen dörtgen alan içerisinde kalan spotlar için yapılmıştır. Yazılımda normalizasyon yöntemi olarak, lokal regresyon modeli seçilmiştir.

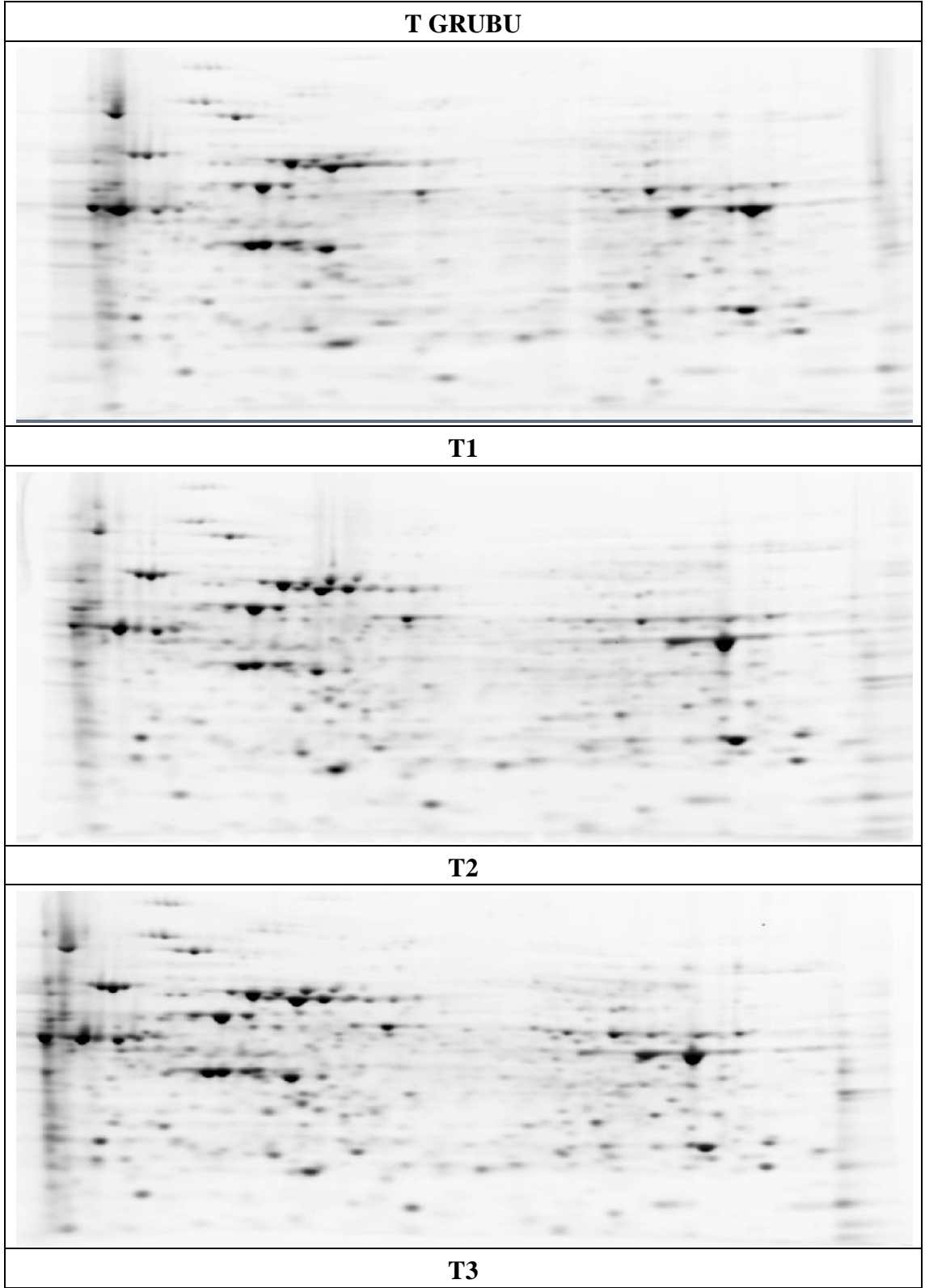


Şekil 4.2. HEPG-2 PDQuest™ yazılımı tarafından oluşturulan 432 spota ait sanal jel görüntüsü (pH 5-8) (Görüntüleme çalışmalarında kullanılan jel mavi alan içerisinde gösterilmiştir).

Kontrol (C) gruplarında sayıca artan spot sayısına rastlanılmamıştır. C ve T gruplarına ait jel görüntüleri Şekil 4.3. ve Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.3. C grubu jel görüntüleri.



Şekil 4.4. T grubu jel görüntüleri.

PDQuest™ yazılımı ile Bölüm 3.2.5’de ifade edilen Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve spot sayıları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

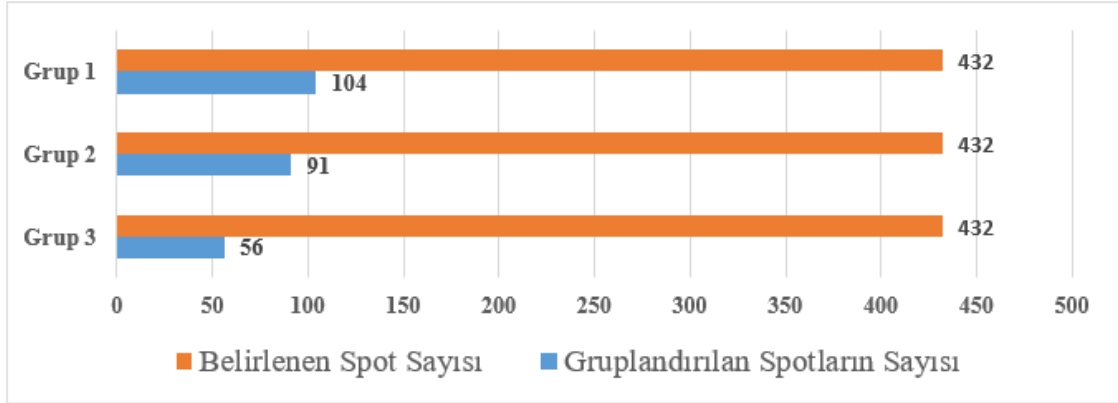
Çizelge 4.1. Belirlenen Spot Sayıları.

Numune	Belirlenen Spot Sayısı	Grup1	Grup2	Grup3
Amfifilik Siklodekstrin Nanopartiküller-HEPG-2 Karaciğer Kanseri Hücre Hatları	432	104	91	56

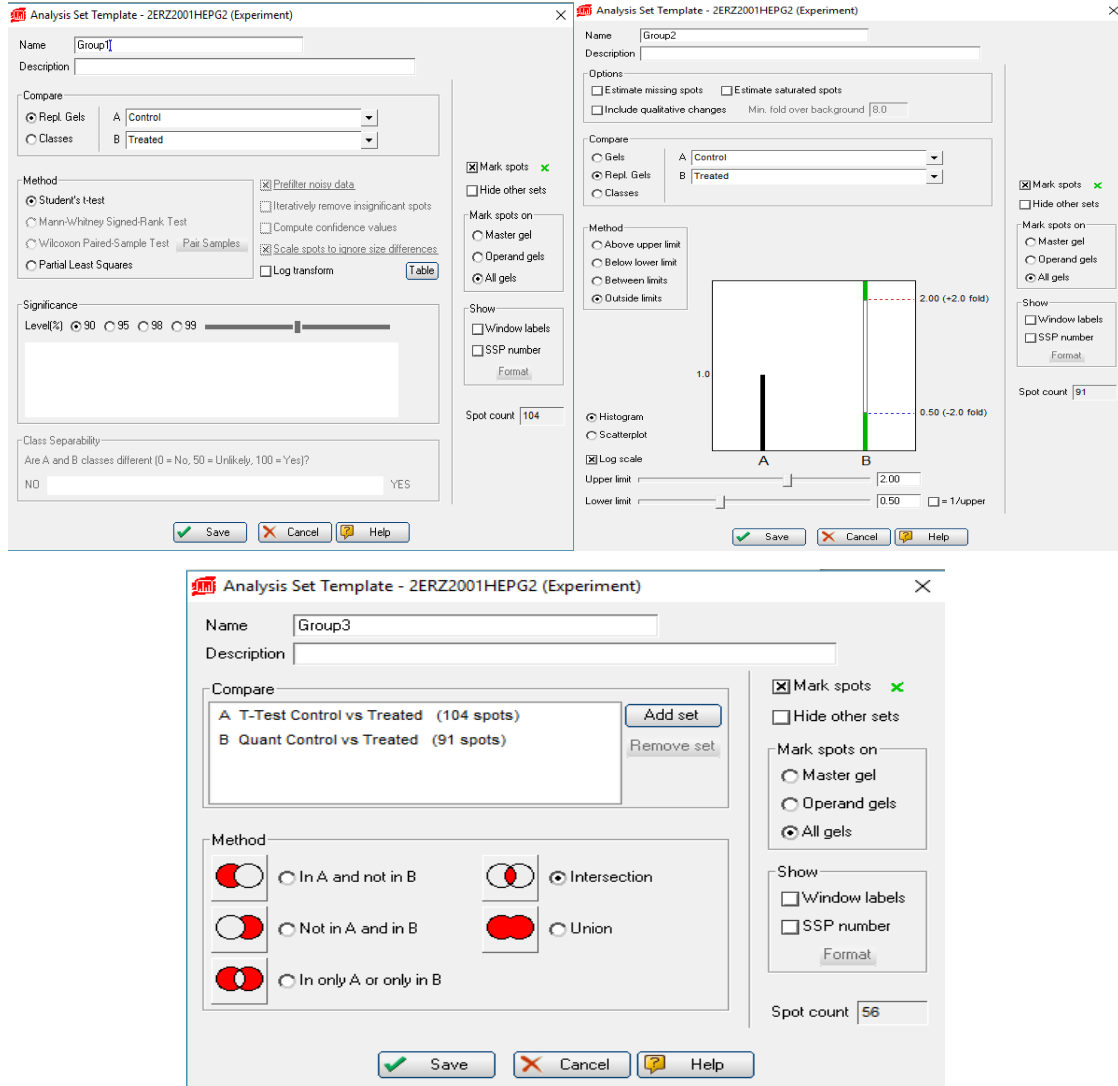
Tüm spotlar her bir jel için eşleştirildiğinde intensiteleri grup (T ve C grupları) içinde %90 güven seviyesinde olanlar ‘Grup 1’ 104 spot; gruplar arasındaki intensiteleri 2 kat farklılaşmış spotlar ‘Grup 2’ 91 spot belirlenirken; oluşturulan bu her iki grubun kesişimindeki spotlar ise ‘Grup 3’ kümesinde 56 adet spot belirlenmiştir. ‘Grup 3’ de tespit edilen tüm spotlar ve jel haritaları göz taramasıyla, hassasiyetle tekrar kontrol edilmiştir. Göz taraması yapıldığında jel üzerindeki silik olan spotların çıkarılmasıyla Grup 3’deki spot sayısı 12’ye inmiştir. Belirlenen 12 spottan 5 spota ait karakterizasyon sağlanamadığı için geriye kalan 7 spot (sadece T grubunda miktarı azalan) üzerinden PBO kodlu ACD nanopartikülün HEPG-2 karaciğer hücre hattı üzerine etkisi bu tez çalışması kapsamında değerlendirilmiştir. Kendi grubu içinde %90 güven seviyesinde intensiteleri benzeşen; fakat gruplar arasında 2 kat intensite farkı olan 7 spota ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

Grup spot sayılarının, PDQuest™ yazılımınca ve göz taramasıyla belirlenen spot sayılarına göre karşılaştırması Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Belirlenen ve Gruplandırılan Spot Sayılarının Karşılaştırılması.



Yazılımın analiz ayarlarının bir görüntüsü Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



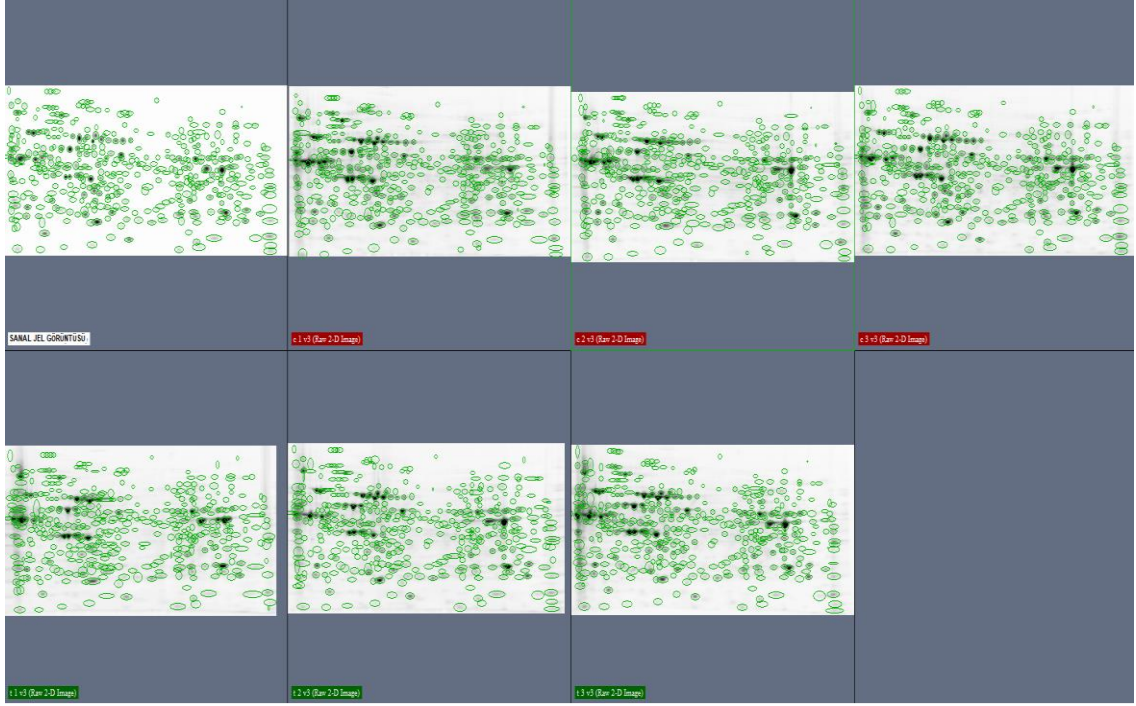
Şekil 4.5. HEPG-2 kanser hücre hatlarına ait nicel anlamda farklılaşan spotların tespitinde grupların oluşturulması ve yazılıma ait analiz ayarlarının görünümü.

Analiz setinde, numerik (sürekli) değişkenlerin ya da grupların arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark olup olmadığını test etmek veya gözlemlenen ortalama değerin varsayılan ya da öngörülen (ya da önceki araştırmalarda bulunan) değerden farklı olup olmadığını tespit etmek için kullanılan Student t-testi metodu tercih edilmiştir.



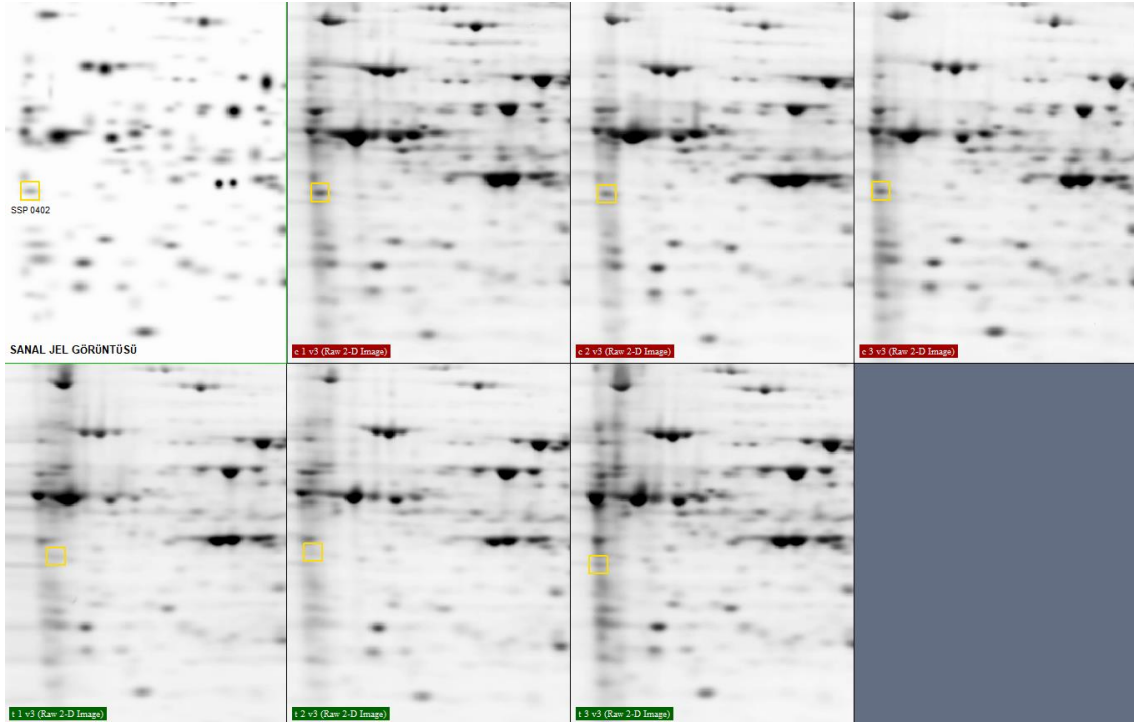
Şekil 4.6. PDQuest™ yazılımıyla ve göz taraması ile sanal(master) jelde belirlenen tüm spotların haritalanması.

Çalışmada, jeller üzerinde farklılaşan 7 adet spot seçilerek; 402, 1602, 2502, 3503, 4804, 5802 ve 8406 numaralı spotlar analiz edilmiştir. Bölüm 3.2.8’de ifade edildiği üzere pozitif iyon modunda bulunan MALDI-TOF/TOF-MS analizi ile peptidler analiz edilmiş ve peptid dizileme çalışmalarıyla proteinler tanımlanmıştır. Spotlara ait odaklanılmış jel görüntüleri Şekil 4.6’de verilmiştir. Belirlenen 432 spotun genel görüntülerine ait başlıkların renkleri, beyaz sanal (master) jel görüntüsünü, kırmızı C gruplarını ve yeşil T gruplarını ifade etmektedir (Şekil 4.7).

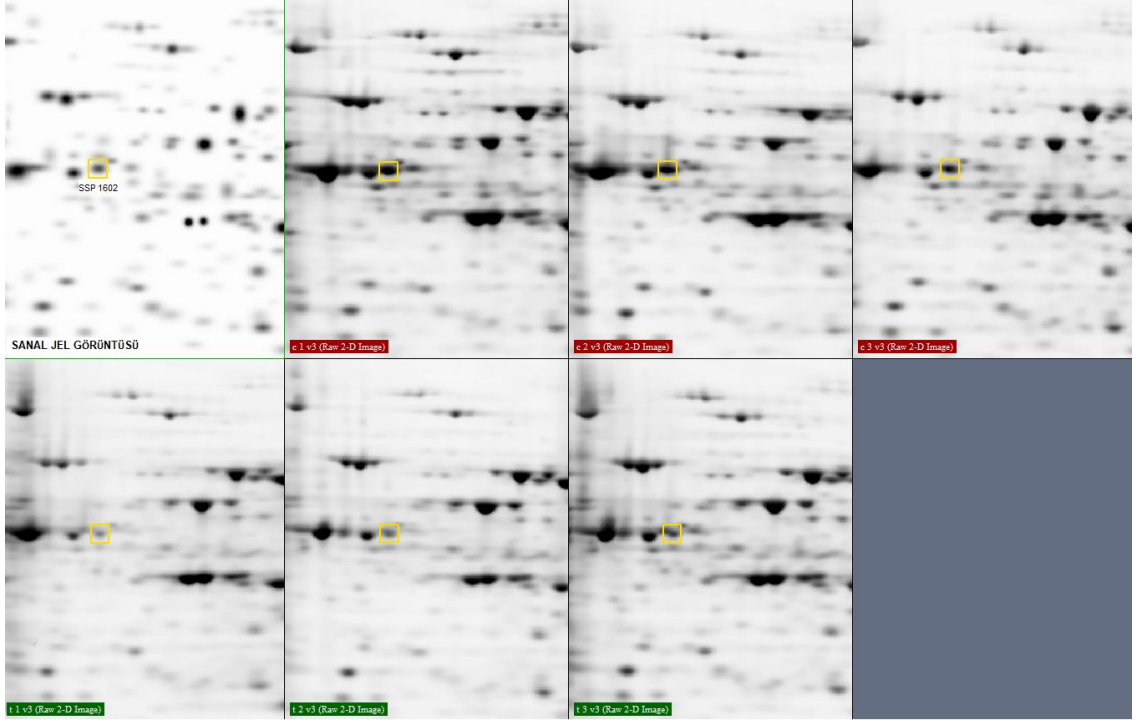


Şekil 4.7. Belirlenen 432 spotun tüm gruplardaki genel görüntüleri.

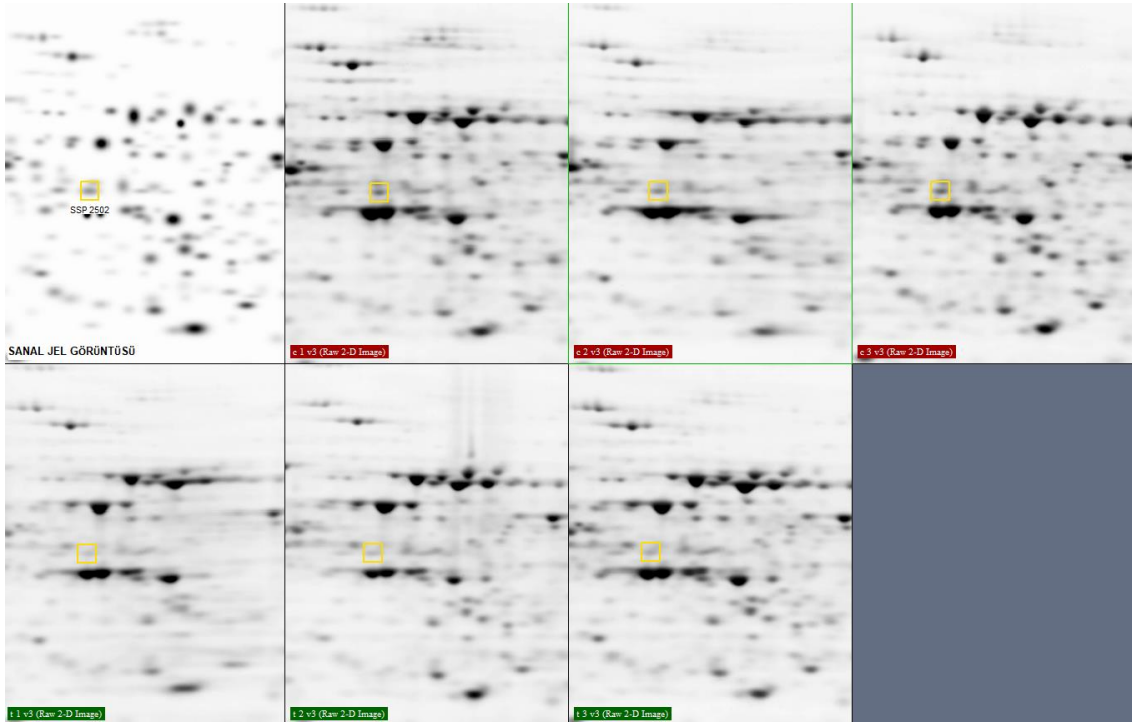
Elde edilen Şekil 4.8. ile Şekil 4.14. arasındaki jel görüntüleri, oluşturulan C ve T gruplarına ait jellerdeki belirlenen her bir spotun konumunu göstermektedir.



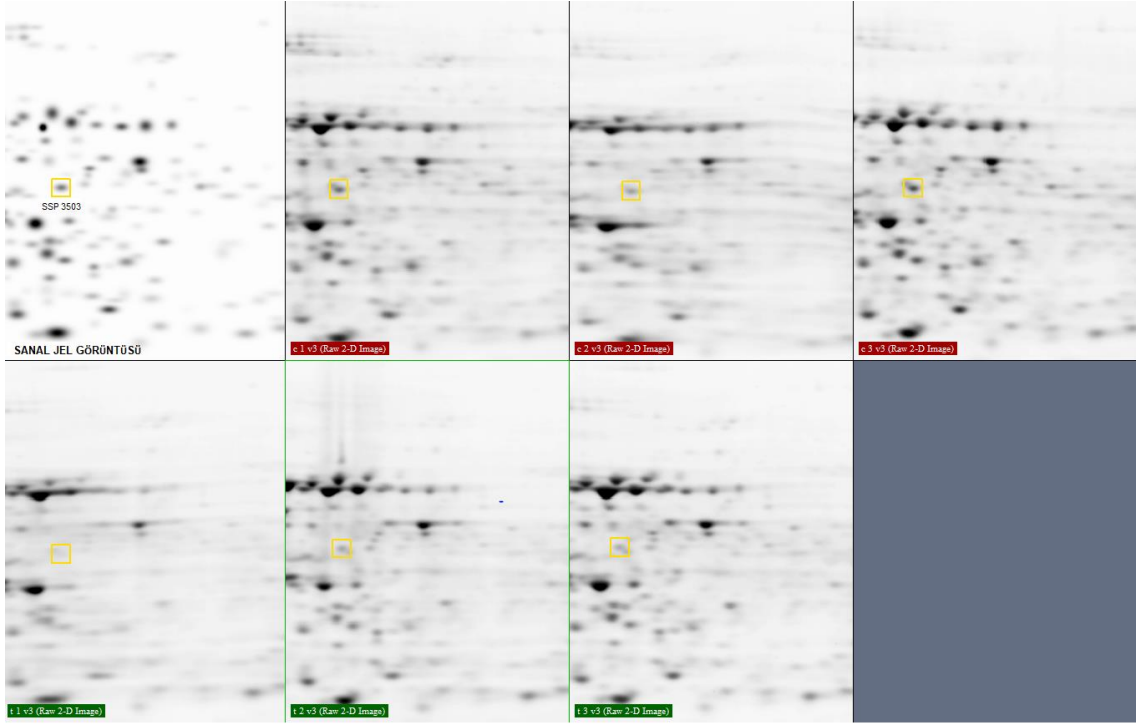
Şekil 4.8. HEPG-2 hücre hattı için 402 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri.



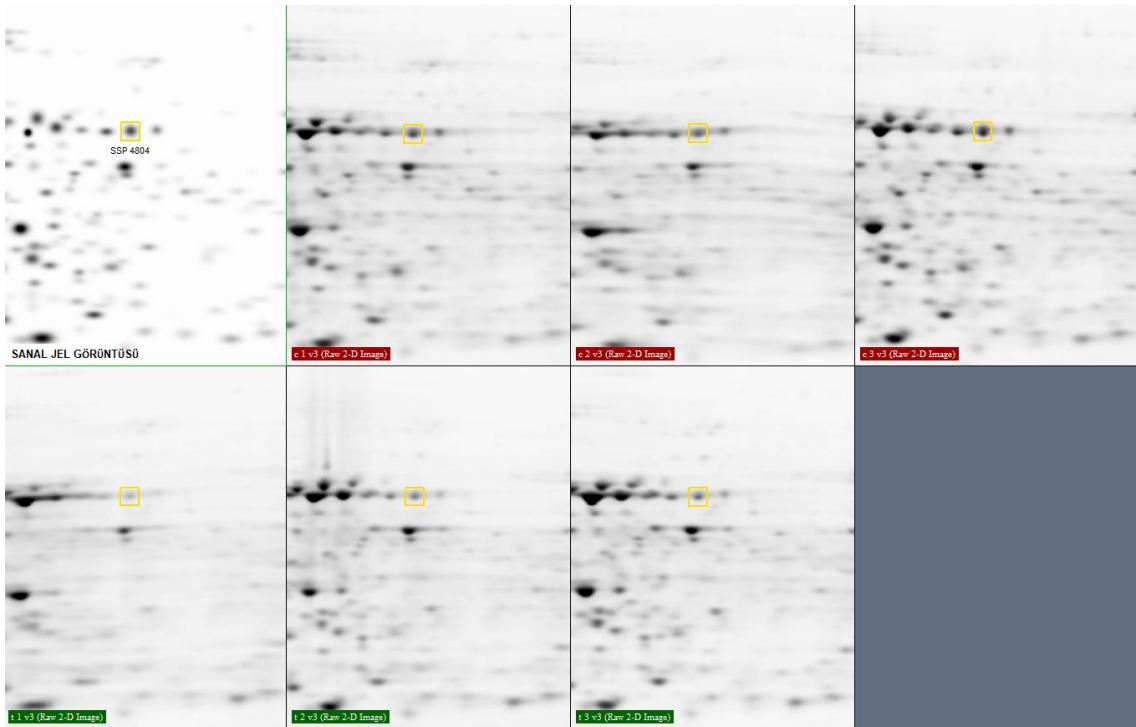
Şekil 4.9. HEPG-2 hücre hattı için 1602 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri.



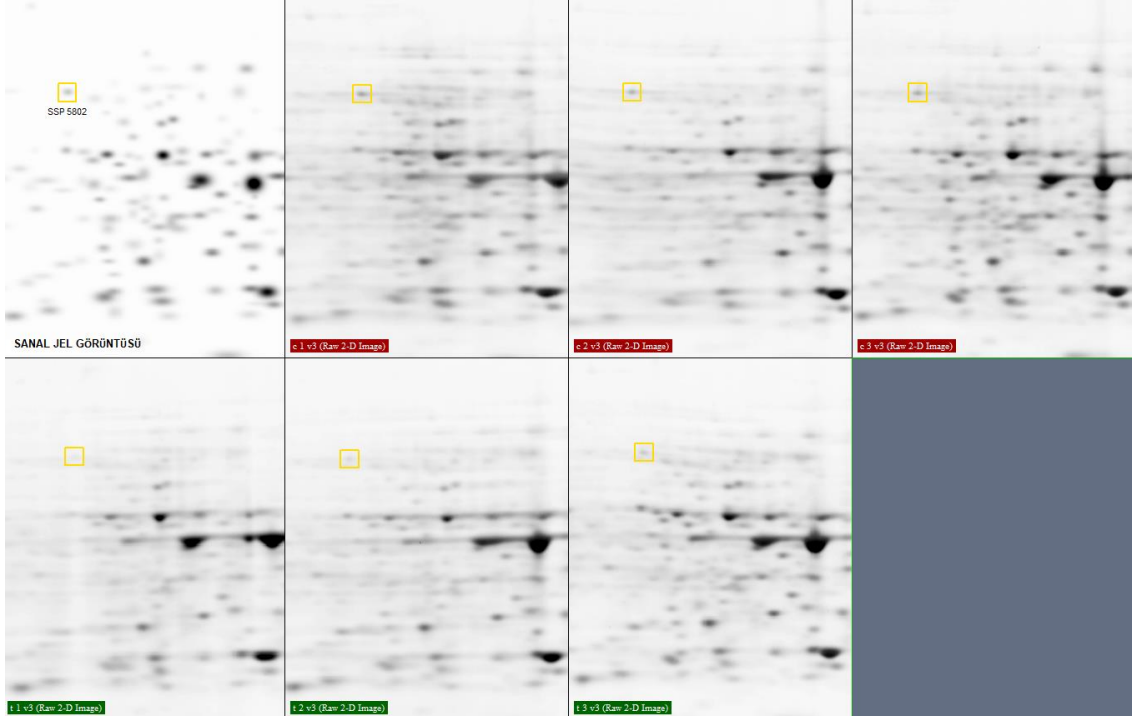
Şekil 4.10. HEPG-2 hücre hattı için 2502 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri.



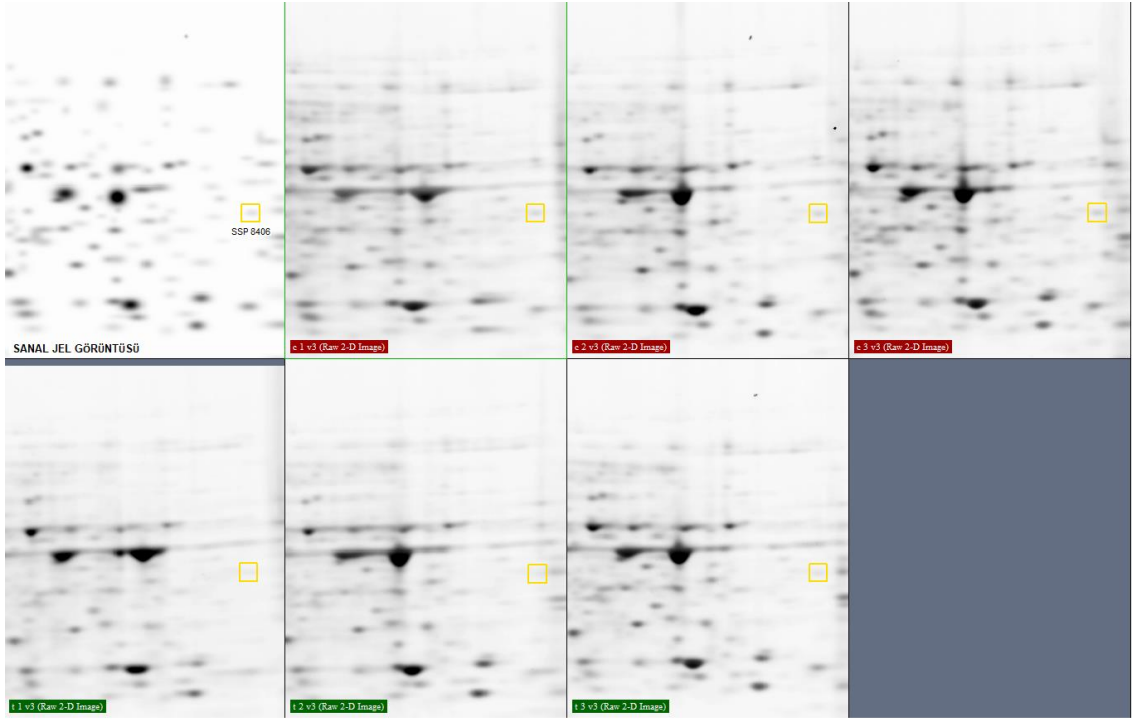
Şekil 4.11. HEPG-2 hücre hattı için 3503 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri.



Şekil 4.12. HEPG-2 hücre hattı için 4804 numaralı spotun tüm gruplardaki görüntüleri.

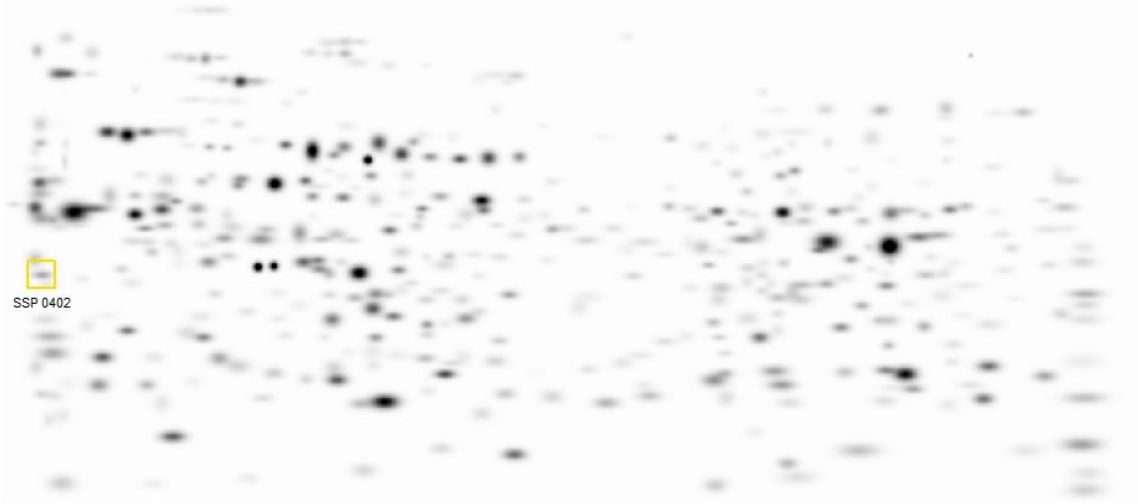


Şekil 4.13. HEPG-2 hücre hattı için 5802 numaralı spotun tüm gruptaki görüntüleri.

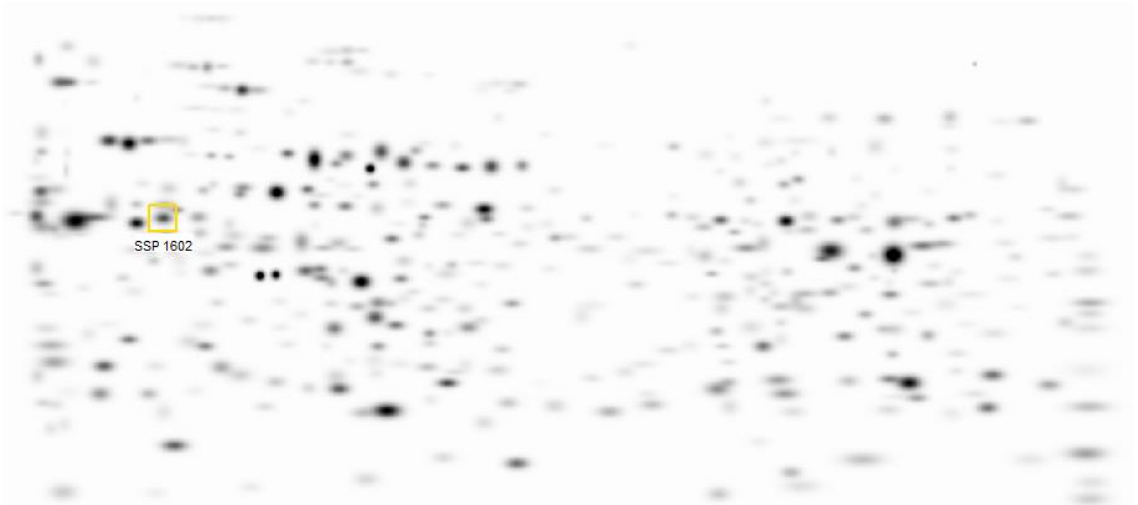


Şekil 4.14. HEPG-2 hücre hattı için 8406 numaralı spotun tüm gruptaki görüntüleri.

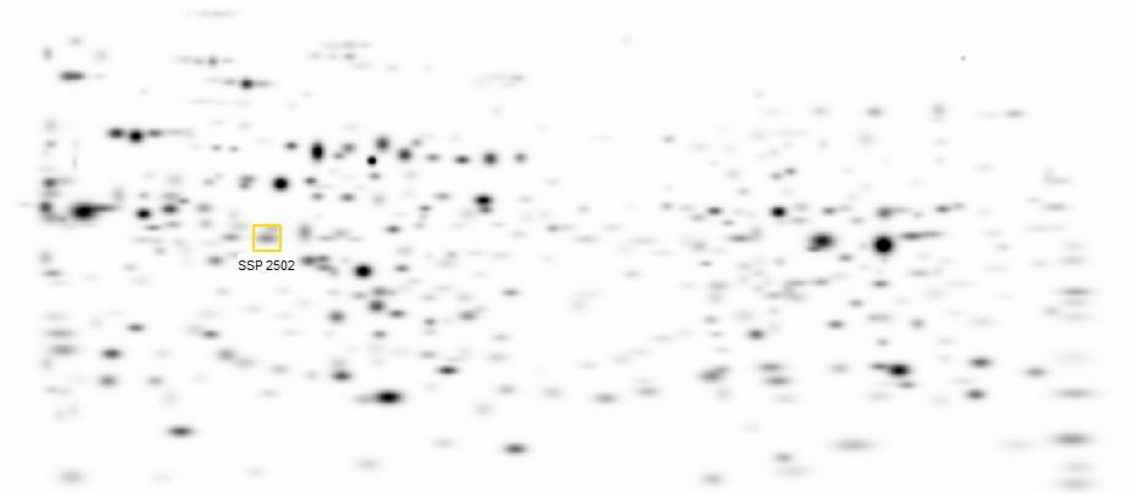
Şekil 4.15 ile Şekil 4.21 arası verilen görüntüler, HEPG-2 hücre hattı için belirlenen spotların herbirinin jel üzerindeki konumunu göstermektedir.



Şekil 4.15. HEPG-2 hücre hattı için 402 numaralı spot.



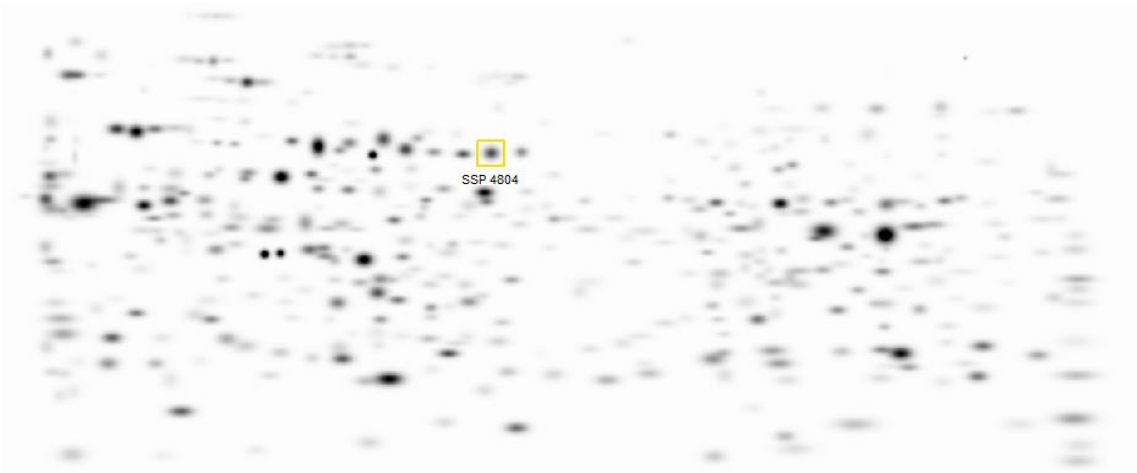
Şekil 4.16. HEPG-2 hücre hattı için 1602 numaralı spot.



Şekil 4.17. HEPG-2 hücre hattı için 2502 numaralı spot.



Şekil 4.18. HEPG-2 hücre hattı için 3503 numaralı spot.



Şekil 4.19. HEPG-2 hücre hattı için 4804 numaralı spot.



Şekil 4.20. HEPG-2 hücre hattı için 5802 numaralı spot.



Şekil 4.21. HEPG-2 hücre hattı için 8406 numaralı spot.

PDQuest™ yazılımı ve göz taramasıyla belirlenen spotların intensiteleri Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. PDQuest™ Yazılımı ve Göz Taramasıyla ile Elde Edilen Spotların Intensite Değerleri.

GRUPLARDAKİ SPOTLARIN İNTENSİTE DEĞERLERİ										
SPOT NO	C 1	C 2	C 3	Cort	T 1	T2	T3	Tort	Ic/I _T	I _T /Ic
402	2.527.461	2.052.843	1.823.842	2.134.715	1.476.769	341.355	483.413	767.179	2.80	0.40
1602	5.988.184	7.645.811	4.336.986	5.990.327	2.067.407	2.860.462	2.911.876	2.613.248	2.30	0.40
2502	2.010.606	2.084.889	3.127.150	2.407.548	454.178	1.051.170	1.070.134	858.494	2.80	0.40
3503	2.023.292	1.479.979	2.063.594	1.855.622	397.050	1.182.932	1.071.609	883.863	2.10	0.50
4804	2.789.358	2.565.970	4.277.254	3.210.861	1.173.169	1.694.703	1.706.300	1.524.724	2.10	0.50
5802	862.856	826.131	658.047	782.345	119.634	264.545	527.272	303.817	2.60	0.40
8406	547.529	700.796	484.281	577.535	281.290	181.749	246.316	236.452	2.40	0.40

Analiz amacıyla belirlenen spotlardaki proteinlerin tanımlanması sağlanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. HEPG-2 Kanser Hücre Hattı için Tanımlanan Proteinler Dizini.

Spot Numarası	Proteinlere ait I _c /I _T Oranları ²	Organizma	Gen	Protein
402	2.80	Homo Sapiens	PRDX2	Peroxiyredoxin-2
1602	2.30	Homo Sapiens	CCT2	T-complex protein 1 subunit beta
2502	2.80	Homo Sapiens	RPSA	40S ribosomal protein SA
3503	2.10	Homo Sapiens	TUBA1B	Tubulin alpha-1B
4804	2.10	Homo Sapiens	hnRNP-F	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-F (human)
5802	2.60	Homo Sapiens	UQCRC1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondria
8406	2,40	Homo Sapiens	ALB	Serum albumin

² Protein spotlarının intensitelerinin oranları (I_c: kontrol grubu intensiteleri, I_T: amfifilik siklodekstrinlerle etkileşmiş olan grupların intensitesi).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çağımızın en büyük hastalık gruplarından biri olan kansere proaktif çözümler yeterli olmamakta; her geçen yıl kanserli vaka sayısı artmaktadır. Kanser tedavisinde; radyasyon terapisi, kemoterapi, cerrahi, immünoterapi, hedeflenmiş terapi, hormon tedavisi, kök hücre transplantasyonu ve kişisel ya da hassas ilaç tedavileri kullanılmaktadır [120]. Bu tedavi yöntemleri, birlikte de uygulanabilmektedir [121].

Kanser tedavisinde yukarıda sayılan tedavi yöntemlerinin, hastalığın tedavisinde, hedeflenen aşamaya gelememesi, araştırmacıları yeni arayışlara yönlendirmektedir. Bu çalışmalara Ayşe Ercan ve ark. ACD nanopartiküllerin kanser hücre hatları arasındaki etkilerini araştırdığı çalışmalar örnek gösterilebilir [18, 47, 142].

ACD nanopartiküllerinin farklı kanser çeşitlerine göstereceği etki mekanizmaları ve bu mekanizmalarının aydınlatması, tez çalışmamızın oluşumunda önemli çıkış noktalarından biri olarak görülebilir. Ölümcül kanser türlerinden biri olan, HEPG-2 karaciğer kanseri hücre hatlarındaki mekanizmanın incelenmesindeki asıl amaç, üzerinde çok az çalışma yapılmış olan bu konu hakkında yeni yöntemler bulunmasının sağlanmasıdır.

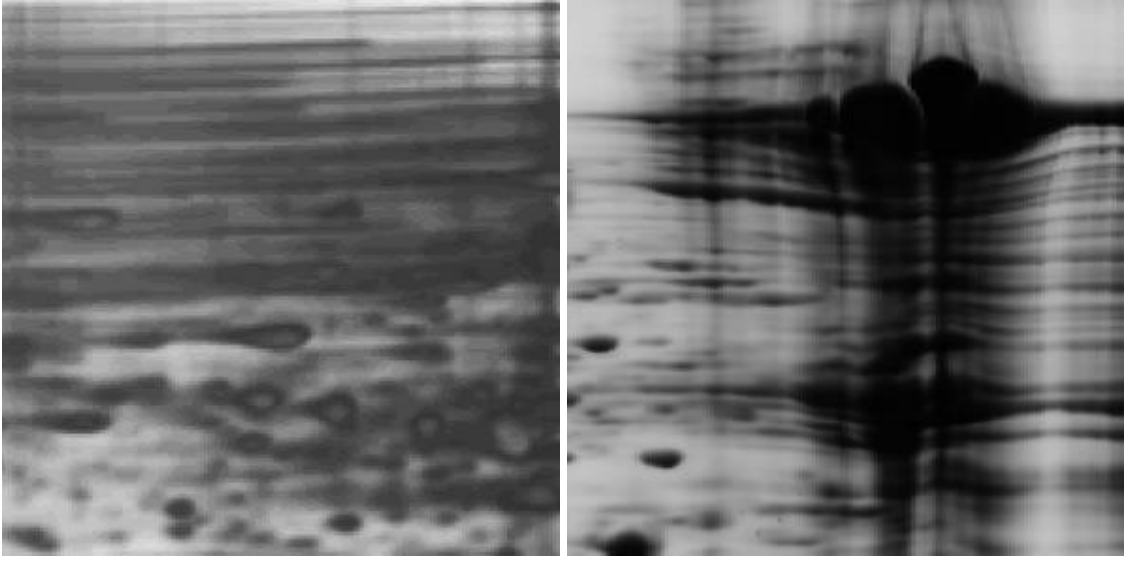
5.1. Proteomik Çalışmalar ve Optimizasyon Süreçleri

Çalışmamızda, HEPG-2 karaciğer kanserli hücre hatlarındaki proteinler 2D elektroforez yöntemi yardımıyla ayrılarak MALDI-TOF/TOF-MS ile proteinlerin nitel analizleri yapılmıştır. İntensiteleri düşük ve yüksek düzeyde tespit edilen proteinler bulunmaya çalışılmıştır [122]. T ve C gruplarının karşılaştırıldığı karşılaştırmalı proteomik çalışmamızda, üçer tekrarlı analiz yapılmış; analiz sonucunda %90 güven seviyesinde eşleştirilen spotlar istatistiki olarak, sistemin tekrarlanabilirliği bakımından kesinlik kavramı ile değerlendirilmiştir. C ve T gruplarındaki spot sayıları beklenildiği gibi aynı çıkmıştır. Deney sırasında kullanılan ekipman kalibrasyonlarının yapılması ve deney parametrelerinin doğru tercih edilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle, jel görüntüsü üzerinde oluşabilecek bazı sorunları şöyle özetleyebiliriz [123]:

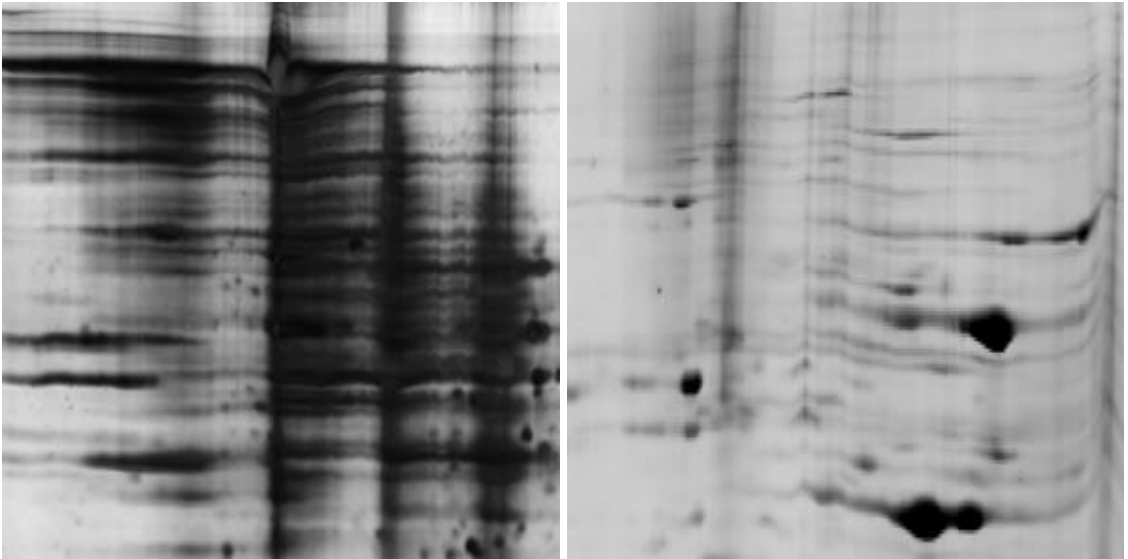
- Dikey lekelenme,
 - Aşırı protein yüklemesi (Şekil 5.1),
 - Kontamine olan tuzlar, iyonik deterjanlar (SDS) (Şekil 5.2),
 - Optimize edilmemiş IEF; IEF koşullarında, yükleme tamponunun ve numune miktarının odaklama üzerindeki etkisi (Şekil 5.3),
 - DTT eksikliği (Şekil 5.4),
 - Yetersiz rehidrasyon çözeltisi (Şekil 5.5).

- Yatay lekelenme,
 - Protein toplanması ya da çökmesi (Şekil 5.6),
 - Eski IAA kullanımı (Şekil 5.7),
 - IPG şerit ve ikinci boyut jel arasında sıkışan hava kabarcıkları (Şekil 5.8),
 - Dikey elektroforez ünitesinin üst tampon haznesinin (katot) sızması, Eski DTT ve IAA kullanımı (Şekil 5.9),
 - Karışan maddeler; rehidrasyon / numune çözeltisinde safsızlıklar (Şekil 5.10).

- Düzensiz spot biçimleri
 - Karışan maddeler; rehidrasyon / numune çözeltisinde safsızlıklar (Şekil 5.10),
 - SDS jelin eşit polimerize olmaması ya da jel kasetinden sızması (Şekil 5.11),
 - Proteoliz, eski reajan kullanımı ya da elektroforez boyunca büyük proteinlerin ikinci boyut jele girememesi (Şekil 5.12),
 - IPG şeritlerin jele düzensiz yerleştirilmesi, elektroforez sürecinde sıcaklığın artması, polipeptidlerin yeterince indirgenememesi, eski reajan kullanımı (Şekil 5.13),
 - Yetersiz temizleme/yıkama aşamaları (Şekil 5.14),

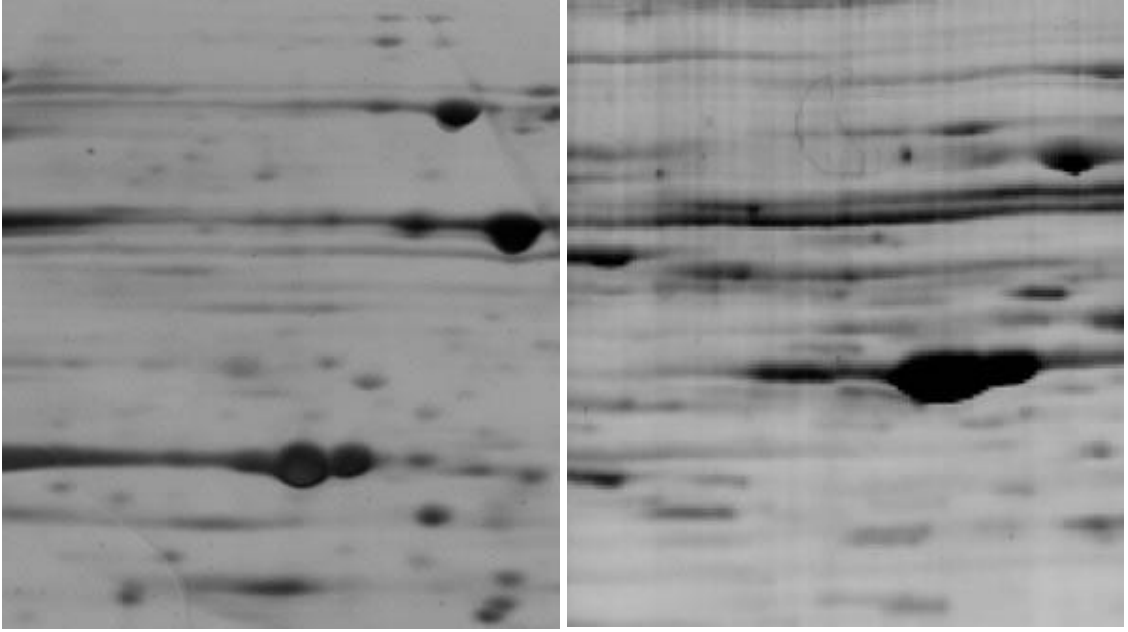


Şekil 5.1. Aşırı protein yüklemesi sonucu oluşan jel görüntüleri³.

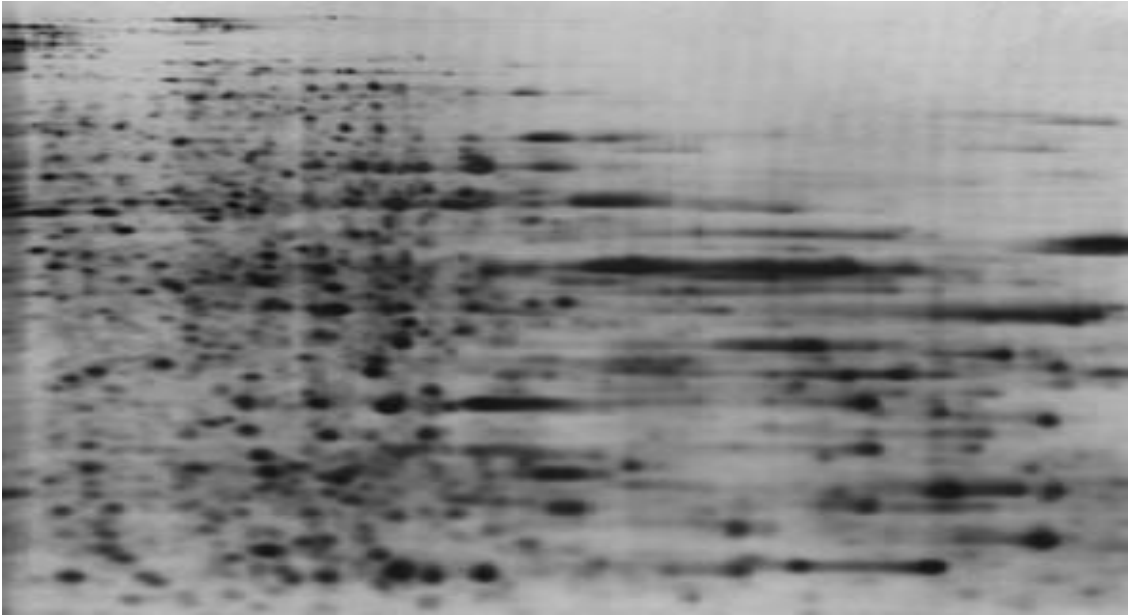


Şekil 5.2. Kontaminantlar (tuzlar, iyonik deterjanlar) sonucu oluşan jel görüntüleri³.

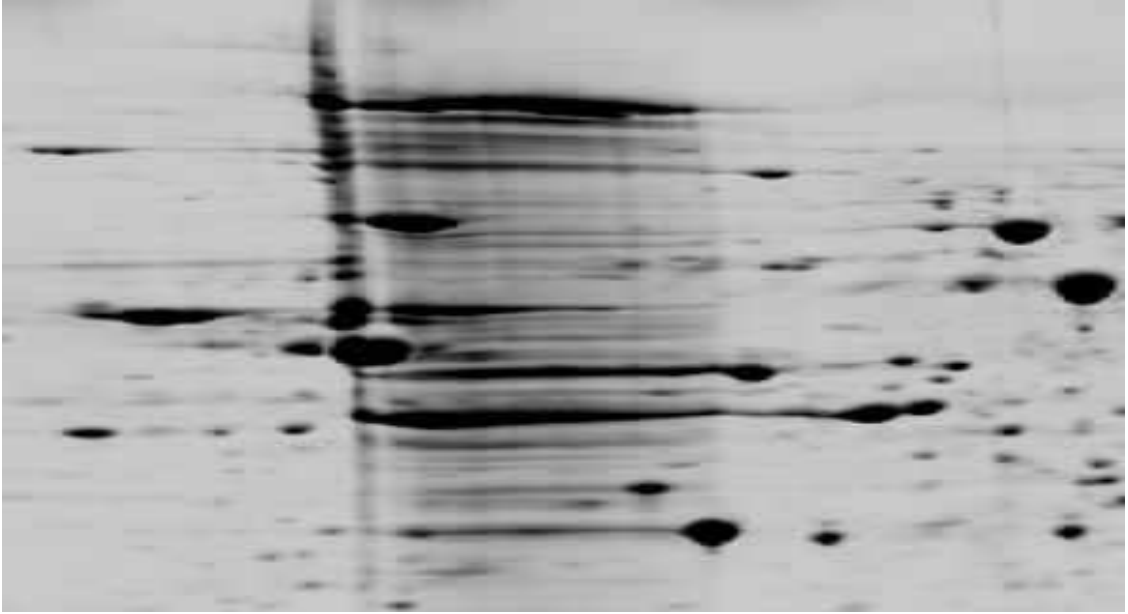
³Bu çalışmada; Bio-Rad™ kitlerinin kullanılması nedeniyle 2-D Gel Electrophoresis Troubleshooting görüntüleri Bio-Rad™ web sitesinden elde edilmiştir.



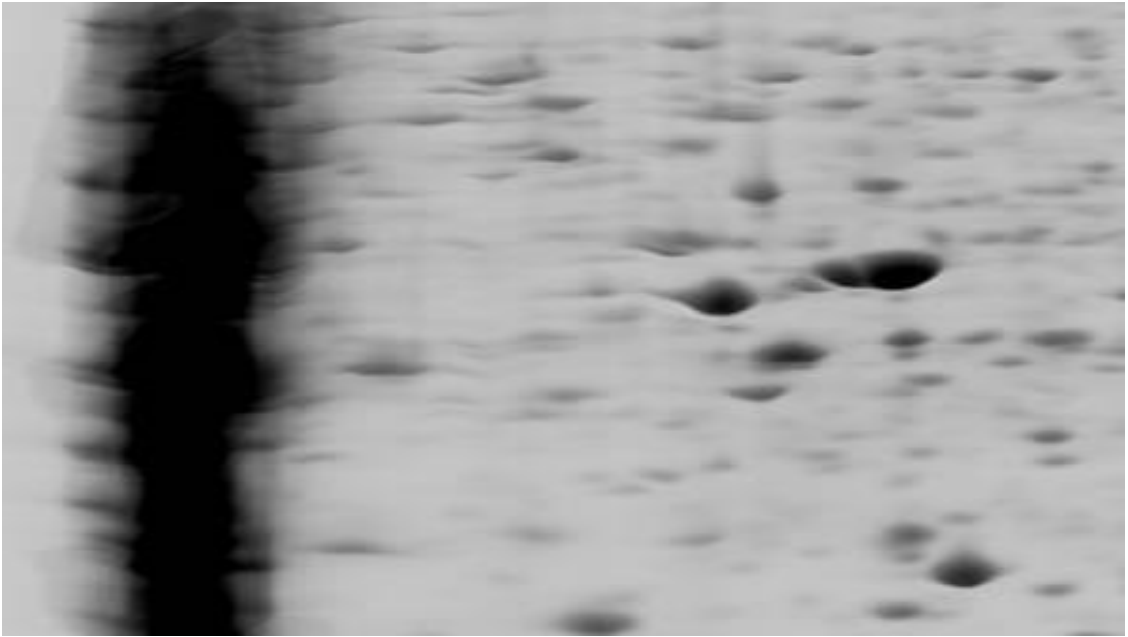
Şekil 5.3. Optimize edilmemiş IEF sonucu oluşan jel görüntüleri³.



Şekil 5.4. DTT eksikliği sonucu oluşan jel görüntüsü³.



Şekil 5.5. Yetersiz rehidrasyon çözeltisi sonucu oluşan jel görüntüsü³.



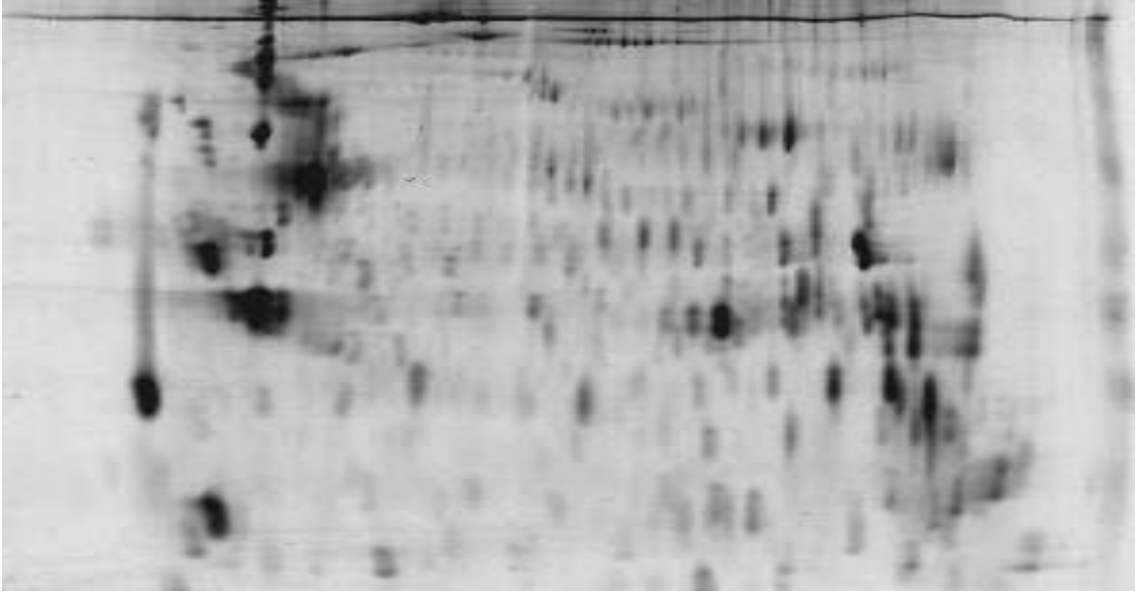
Şekil 5.6. Protein toplanması ya da çökmesi sonucu oluşan jel görüntüsü³.



Şekil 5.7. Eski Iyodoasetamid (IAA) kullanımını sonucu oluşan jel görüntüsü³.



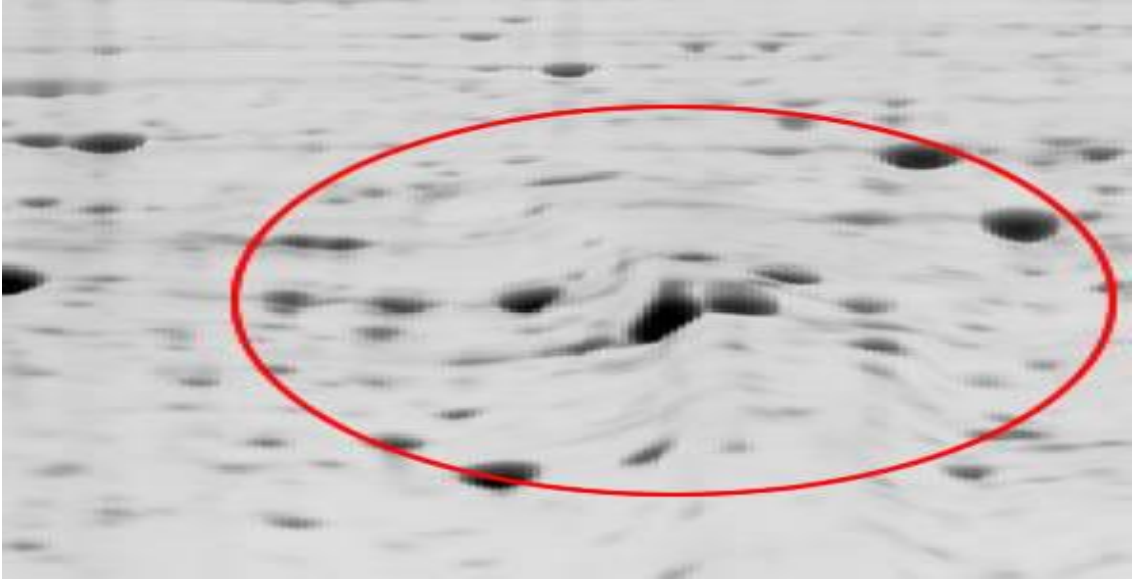
Şekil 5.8. IPG şerit ve ikinci boyut jel arasında sıkışan hava kabarcıkları sonucu oluşan jel görüntüsü³.



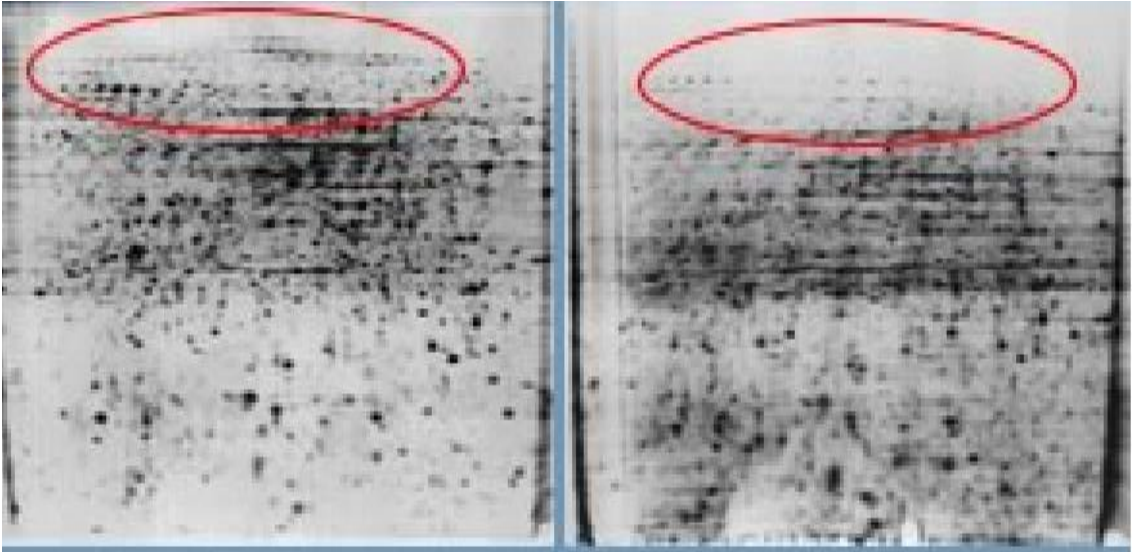
Şekil 5.9. Dikey elektroforez ünitesinin üst tampon haznesinin (katot) sızması sonucu oluşan jel görüntüsü³.



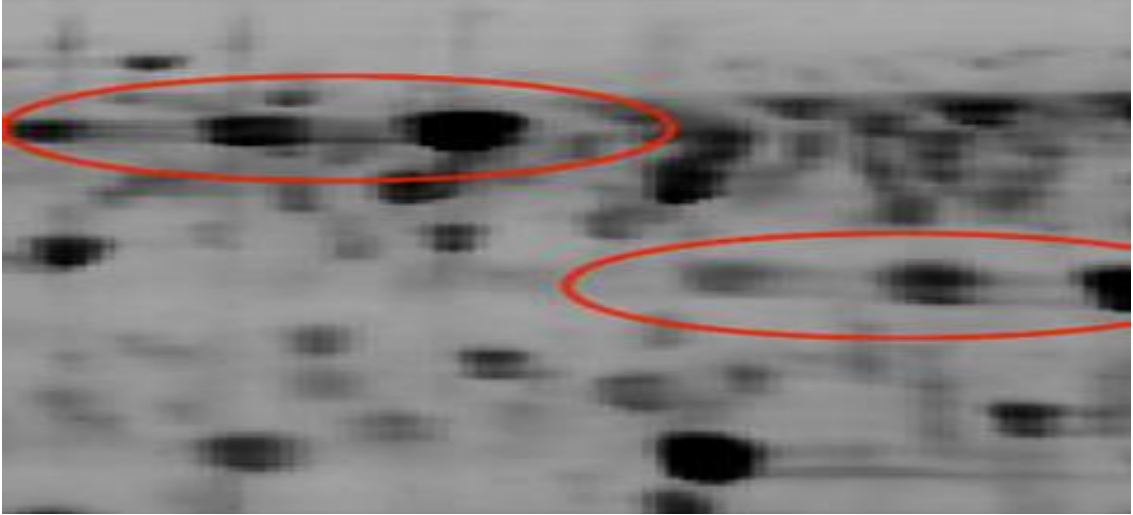
Şekil 5.10. Karışan maddeler; rehidrasyon / numune çözeltisinde safsızlıklar sonucu oluşan (kırmızı kare içinde kalan alan) jel görüntüsü³.



Şekil 5.11. SDS jelin eşit polimerize olmaması ya da jel kasetinden sızması sonucu oluşan(kırmızı daire içinde kalan alan) jel görüntüsü³.



Şekil 5.12. Proteoliz, eski reajan kullanımı ya da elektroforez boyunca büyük proteinlerin ikinci boyut jele girememesi sonucu oluşan jel görüntüleri³ (kırmızı daireler içinde kalan alanlar).



Şekil 5.13. IPG şeritlerin jele düzensiz yerleştirilmesi, elektroforez sürecinde sıcaklığın artması, polipeptidlerin yeterince indirgenememesi, eski reajan kullanımı sonucu oluşan Jel Görüntüsü³ (kırmızı daireler içinde kalan alanlar).



Şekil 5.14. Yetersiz temizleme/yıkama süreçleri sonrası sonucu oluşan jel görüntüsü³.

Numune hazırlanmasında, istenmeyen bileşenlerin ayrılması, deneylerde dezavantaj yaratabilecek bileşiklerin çöktürülmesi amacıyla 20 mM DTT, %10 (a/h) TCA içeren aseton çözeltisi kullanılmıştır. Ticari olarak satılan kitlere göre avantaj sağlamadığı çalışmalarda belirtilmiştir [65]. Kullanılacak jellerin ve jel kasetlerinin ise istatistiksel kesinlik parametresi göz önüne alınarak ve raf ömrü nedeniyle hazır olarak temin edilmesi tercih edilmiştir.

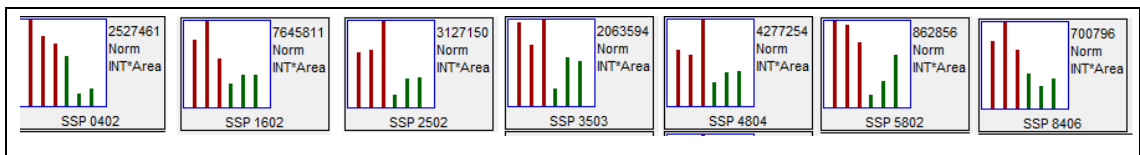
Çalışmada, ticari olarak mevcut iki hazır jel olan Criterion TGX ve Criterion XT'den ikincisi daha keskin spot görüntüsü eldesi ve örneklerinin çok sayıda olması nedeniyle tercih edilmiştir. Criterion TGX'in daha yeni bir yapı olması ve SDS-PAGE ayırımında daha hızlı olduğu düşünülmesi çalışmada avantaj sağlamayacağı için tercih edilmemiştir.

5.2. Elektroforez Koşullarının Uygun Hale Getirilmesi

Proteinlerin IPG şeritlere yüklenmesi ve IEF işlemleri sırasında yükleme tamponu olarak 8 M üre, %2 CHAPS, 50 mM DTT, %0.2 Bio-Lyte 3/10 amfolit, 0.001% bromofenol mavisi ile hazırlanmıştır. Yükleme tamponunda, tribütilfosfin (TBP) yerine DTT tercih edilmesinin nedeni; Bölüm 5.1'de belirtildiği üzere IEF aşamasında jel görüntüleri üzerinde yatay ve dikey çizgilerin oluşmasına neden olmasıdır (Şekil 5.3). Önceki çalışmalarımızda, proteinlerin pH 3-10 aralığında olan ticari IPG şerit üzerinde pH 4-7 aralığında olan bölgelerde toplanması nedeniyle ve daha net odaklanmış imaj analizinin yapılabilmesi amacıyla ticari IPG şeritlerde pH 5-8 aralığında olanlar tercih edilmiştir.

5.3. İmaj Analiz Çalışmaları ve Değerlendirilmesi

SDS-PAGE ayırımı sonrası proteinler Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi SYPRO Ruby protein jel boyası ile boyanmıştır. Jellerdeki farklılaşanspotlar belirlenmiştir. ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad™ İmaj Sistemi ile görüntüleri alınmıştır. Ticari olarak bulunan tarayıcı şeklindeki sistemler, jel yapısına zarar verebilmesi ihtimali nedeniyle tercih edilmemiştir. Ayrıca; elde edilen görüntülerde kontrast iyileştirmesine gidilerek spotlar daha belirgin hale getirilmiştir. İmaj analiz çalışmaları için hazırlanan jeller imaj analiz programı olan PDQuest™ (v8.0.1) yazılımı ile Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı şekilde analiz edilmiştir. Tüm grup jellerindeki spotlar, teker teker eşleştirilmiştir. Yazılım aracılığıyla, farklılaşan spotlar için istatistiki gruplar (Grup 1, Grup 2, Grup 3) oluşturulmuştur. Bölüm 3.2.5'de belirtildiği üzere MS analizi için Grup 1 ve Grup 2 spotlarının kesişiminde yer alan spotlardan Grup 3'e ait spotlar belirlenmiştir. Bu spotlara ait PDQuest™ yazılım aracılığıyla belirlediğimiz 'yoğunluk x alan' grafiği Şekil 5.15.'de verilmiştir.



Şekil 5.15. Seçilen 7 Spota ait 'intensite x alan' değerlerine ait çubuk grafikler (C grupları kırmızı, T grupları yeşil olarak belirtilmiştir).

5.4. Proteinlerin Tanımlanması

En çok farklılaşan 7 spot MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edilerek veribankaları (MASCOT v2.2.04, NCBI Protein Bankası) vasıtasıyla tanımlanmıştır. Tanımlanan tüm proteinlerin (402, 1602, 2502, 3503, 4804, 5802, 8406) Homo-Sapiens türüne ait olan proteinler olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4.). Elde edilen sonuçlar, aynı zamanda çalışmamızda oluşabilecek tüm sorunların minimize edildiğinin bir göstergesidir.

5.5. Proteomik Sonuçların Değerlendirilmesi

Kanserli hatlarda gerçekleşen fizyolojik değişimlere neden olan mekanizmaların moleküler düzeyde aydınlatılması amacıyla gerçekleştirilen çalışmamızda, HEPG-2 kanser hücre hatlarıyla ACD'lerin etkileşiminin sağlanması sonucunda nicel olarak düşük miktarda ifade edilen proteinlerin tanımlanması sağlanmıştır. Etkileşimin, hücre hatlarında veya hücre döngüsünde meydana getirdiği fizyolojik değişimler nedeniyle proteinlere ait intensite değerlerinin değişimleri (Çizelge 4.3.) deneysel olarak gözlenmiştir. Nicel olarak en çok farklılaşan proteinler Çizelge 4.4'de tanımlanmıştır.

Kanserli hücrelerde, hücre döngüsü sürecinde oluşan hızlı proliferasyonların ACD'ler ile etkileşimi sonrası azaldığı gözlemlenmiştir. Aşağıda belirtilen bazı protein isimleri orijinal isimleri ile verilmiştir.

Peroksiredoksin-2

Peroksiredoksin-2 (Uniport ID:P32119), hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin sırasıyla su ve alkollere indirgenmesini katalizleyen tiyol-spesifik peroksidazdır. Peroksitleri detoksifiye ederek ve hidrojen peroksit aracılı sinyalizasyon olaylarının sensörü olarak oksidatif strese karşı hücre korumasında rol oynar. Hidrojen peroksitin hücre içi konsantrasyonlarını düzenleyerek büyüme faktörleri ve tümör nekroz faktör-alfa sinyalizasyon döngülerine katılabilirler.

Peroksiredoksin-2, HEPG-2 kanser hücre hatlarında düşük miktarda ifade edilmiştir. Kolon kanserinde ilgili proteinin nicel olarak düşük miktarda olmasının hücrede apoptoz meydana getirdiği bildirilmiştir [124, 125]. Kanser hücrelerinin, koruma amaçlı oksidatif strese karşı tepki göstermesi beklenir.

Tez çalışmamızda, kanser hücreleri üzerinde fizyolojik olarak apoptoz olduğu söylenebilir ve düşük miktarda ifade edilen proteinin, nanopartiküllerle etkileşim sonrası nicel olarak azalmasının nedeni olarak gösterilebilir.

T-kompleks protein 1 subunit beta

T-kompleks protein 1 subunit beta (Uniport ID:P78371), ATP hidrolizinde proteinlerin katlanmasını destekleyen bir moleküler şaperon kompleksi ve şaperonin içeren T-kompleksi (TRiC) bileşenidir [126]. TRiC kompleksi; aktin, tubulin, WRAP53/TCAB1'in katlanmasına aracılık eder, böylece telomer onarımını, korunmasını düzenler.

Tez çalışmasında, T-kompleks protein 1 subunit beta, HEPG-2 kanser hücre hatlarında düşük miktarda ifade edilmiştir. Kolorektal kanserlerinde şaperonin T-kompleks proteinlerinin yüksek miktarlarda olduğu gösterilmiştir [127]. Bu nedenle, kanser hücrelerinin fizyolojik olarak apoptoza uğradığı söylenebilir ve düşük miktarda ifade edilen proteinin nicel olarak azalmasının, ACD'lerin fizyolojik hücre mekanizmalarıyla kanser hücrelerinin proliferasyonunun önlenmesine neden olduğu söylenebilir.

40S ribosomal protein SA

İlgili protein (Uniport ID:P08865), 40S ribozomal alt birimin oluşumu veya stabilitesi için gereklidir. 40S ribozomal alt birimlerinin 20S rRNA ve 18S rRNA olgunlaşması aşamasında gereklidir. Ayrıca laminin için bir hücre yüzeyi reseptörü olarak işlev görür. Bazal membrana hücre adezyonunda ve sinyalleme transdüksiyon yollarının müteakip aktivasyonunda rol oynar. Kısaca; hücrenin ve hücre döngüsünün geleceğini belirleme ve doku morfojeninde rol oynayabilir [128].

Tez çalışmasında, 40S ribosomal protein SA, HEPG-2 kanser hücre hatlarında düşük miktarda ifade edilmiştir. Kanserli hücrelerdeki ilgili proteinin, nanopartiküllerle etkileşim sonrası, fizyolojik değişimlerle nicel olarak azaldığı söylenebilir.

Tubulin alfa-1B

Bu protein (Uniport ID:P68363), küresel protein olan mikrotübüllerin ana bileşeni olarak; biri beta zincirindeki değiştirilebilir bölgede ve alfa zincirinde değiştirilemeyen bölgede olmak üzere iki mol guanozin trifosfat (GTP)'yi bağlar. Mikrotübüller birleşerek güçlü bir yapı kurması nedeniyle, hücrede iskelet görevi görür.

Mikrotübüllerin işlevini etkileyen etken maddelerin en yaygın olanları taksan (paklitaksel ve yarı yapay çeşidi dosetaksel vb.) ve vına alkaloitleridir [129]. Bu tip etkin maddeler, mikrotübüllerin polimer yapısının bozulmasını engelleyerek toplanmasını arttırmaktadır [130]. Tübülün, anti-kanser ilaçları için önemli bir hedeftir [131]. Spesifik β -tubulin

izotipinin anormal ekspresyonu, katı kanserlerde kemoterapötik tedaviye dirençle ilişkilidir [132].

Tez çalışmasında, Tubulin alfa-1B, HEPG-2 kanser hücre hatlarında düşük miktarda ifade edilmiştir. İlgili proteinin azalması, ACD nanopartiküllerin ile muamele sonucu mikrotübüllerin kararlılığını bozarak mitoz bölünme aşamalarındaki geçişleri engellediğini ve dolayısıyla hücre çoğalmasının azaltıldığı elde ettiğimiz sonuçlar arasında, araştırılan amaç bakımından en önemli göstergelerden biridir. Kanserli hücrelerdeki ilgili proteinin, amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerle etkileşim sonrası, fizyolojik değişimlerle nicel olarak azaldığı söylenebilir.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-F

Bir diğer protein hnRNP-F (Uniport ID:P52597), hücre çekirdeğindeki pre-mRNA'lar ile ilişkilidir. Poliadenilasyon⁴, mRNA metabolizmasının ve taşınmasının diğer yönlerini düzenler. Nükleer ribonükleoprotein komplekslerinin bir bileşenidir. hnRNP'ler heterojen nükleer RNA ile kompleksleşen RNA bağlayıcı proteinlerdir. Alternatif adhezyon olaylarının düzenlenmesinde rol oynar. Pre-mRNA'larda G-zengin sekansları bağlar ve hedef RNA'yı açılmamış halde tutar [133]. Tez çalışmasında, hnRNP-F, ACD nanopartikülleri ile muamele sonucu HEPG-2 kanser hücre hatlarında düşük miktarda belirlenmiştir. Kanserli hücre hatlarında yapılan çalışmalarda ilgili proteinin yüksek miktarda bulunduğunu bildirmektedir [134, 135].

⁴Poliadenilasyon, mRNA'ya poladenilil parçasının kovalent bağ ile eklenmesidir. Poliadenilasyon DNA'nın RNA'ya yazılımı sürecinde ve sonrasında meydana gelmektedir. Bir mRNA'nın birden çok poliadenilasyon türü olabilmektedir.

Amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerin tatbiki sonucu, hnRNP-F protein miktarının düşük tanımlanması nanopartiküllerin ilgili proteini hedeflediğinin bir göstergesi olarak düşünülebilir. Hedeflemenin sonucu olarak, mRNA metabolizması ve taşınması gibi işlevlerde rol oynayan hnRNP-F'yi etkileyebileceği söylenebilir.

Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial

Bu protein (Uniport ID:P31930) mitokondriyal solunum zincirinin bir parçası olan ubiquinol-sitokrom c redüktaz kompleksinin (kompleks III veya sitokrom b-c1 kompleksi) bir bileşenidir. Bu protein, sitokromlar c ve c1 arasındaki kompleks oluşumuna aracılık edebilir. Ayrıca; hücresel solunum ve fotosentez için gerekli olan entegre bir zar protein kompleksidir [136].

Tez çalışmasında, Cytochrome b-c1 complex subunit 1 proteini, ACD nanopartikülleri ile muamele sonucu HEPG-2 kanser hücre hatlarında düşük miktarda belirlenmiştir.

Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial proteininin aynı zamanda gastrik kanser çeşitlerine karşı potansiyel, tanı amaçlı, biyomarker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [137]. ACD nanopartiküllerin etkileşimi sonrası bu protein miktarının düşük tanımlanması, nanopartiküllerin proteinin bulunduğu hücre hatları üzerinde apoptoza yol açtığı düşünülebilir.

Serum albumin, Human

Serum albumin (Uniport ID:Q56G89), karaciğer tarafından üretilen, kan plazmasında bulunan ve kan damarları ile dokular arasındaki ozmotik basıncın korunmasına yardımcı olan bir proteindir. Serum albümin kan plazmasındaki toplam proteinin yüzde 55'ine yakını oluşturur [138]. Plazmada çok bulunan bir protein olan albümin, önemli antioksidan aktiviteler sunar; molekül, çoklu bağlanma bölgeleri ve serbest radikal yakalama özellikleriyle etkili olur [139].

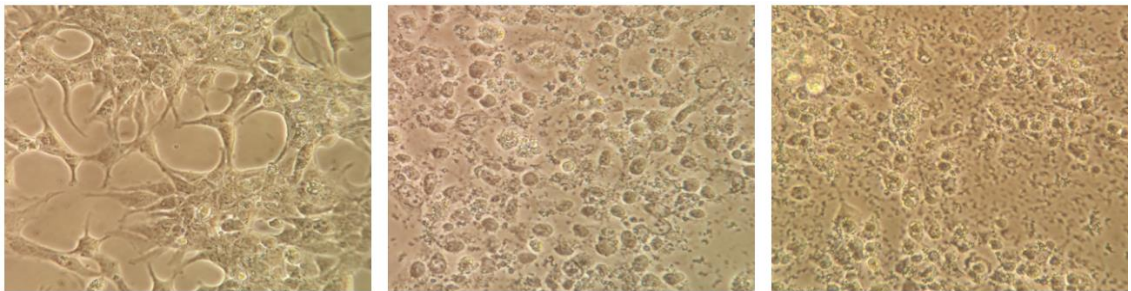
Vücutta, albümin miktarının azalması protein sentezinin aksadığı ya da protein kaybının yaşadığı anlamına gelmektedir. Hepatit, siroz veya kanser gibi karaciğer hastalıkları serum albümin düşüklüğüne sebep olur [140].

Tez çalışmasında; serum albumin, ACD nanopartikülleri ile muamele sonrası HEPG-2 kanser hücre hatlarında düşük miktarda belirlenmiştir. Nanopartiküllerin proteinin

bulunduğu hücre hatları üzerinde apoptoza yol açtığı düşünülebilir. Ayrıca; ilgili proteinin miktarındaki azalış direkt olarak kanserli hücrelerin proliferasyonundaki azalış ile ilişkilendirilebilir. Karaciğer kanseri gibi önemli rahatsızlıklarda yeterince düşük olan serum albümin miktarının tedavi amaçlı ACD nanopartikülün tatbikinde miktar bakımından, uygulamada hassas olunması sonucuna varılabilir.

5.6. PBO kodlu ACD'nin HEPG-2 Hücreleri Üzerine Etkisinin 'Antikanser Aktivite' Açısından Değerlendirilmesi

Çalışmamızda, etkin madde yüklenmeden ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı bilinen ACD'lerin kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etki gösterdiğinin bilimsel çalışmalarda belirtilmiş olması, sürfaktanlar kullanılmadan spontan bir şekilde nanopartikül formu oluşturması, ACD nanopartikülleri ile antikanser etki mekanizmasının moleküler düzeyde, hücre hatlarıyla ve hücre yapısında bulunan protein, lipid kompleksleriyle nasıl meydana geldiği ile ilgili çalışmaların sınırlı olması nedeniyle bu nanopartiküller tercih edilmiştir [141]. Ayrıca; MB49, HeLa, MCF-7, HEPG-2 gibi kanser hücre hatlarıyla ACD'lerin etkileşimi ile ilgili çalışmalar yapılmış olmasına rağmen HEPG-2 kanser hücre hatları ile ACD'lerin etkileşimi sonucu protein ekspresyon düzeyindeki farklılaşmaların belirlenmesi amacıyla proteomik çalışmalar bulunmaması nedeniyle çalışmamız özgün ve yol gösterici olmuştur (47). Ayrıca; 115S456 nolu proje kapsamında, PBO kodlu siklodekstrinlerin HEPG-2 hücreleri üzerinde zamana bağlı olarak etkili olduğu Şekil 5.16'da görüldüğü üzere mikroskop altında gözlemlenmiştir [142].



Kontrol

24. saat

48. saat

Şekil 5.16. PBO kodlu siklodekstrinlerin uygulanmış HEPG-2 kanser hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki zamanla değişen görüntüleri.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar doğrultusunda PBO kodlu siklodekstrinlerin HEPG-2 hücreleri üzerinde sitotoksiteyi doza ve zamana bağlı olarak tetiklediği gösterilmiştir. Yapılan proteomik analizler sonucunda peroksiredoksin-2, 40S ribozomal SA protein, Cytochrome b-c1 complex, hnRNP-F, Tubulin alpha-1B gibi proteinlerin seviyelerinde değişiklik gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4). Seviyeleri değişen bu proteinlerin mitokondriyel yollarda görev alması mitokondri fonksiyonunun biyokimyasal olarak değerlendirilmesini gerektirmiştir. Bu doğrultuda, PBO kodlu siklodekstrinlerin HEPG-2 hücrelerinde antikanser aktivitesini mitokondriyel yolağı tetikleyerek hücre ölümünü kaspazlar üzerinden kontrol ettiğini ve hücreyi apoptoza yönlendirdiğini göstermiştir.

Sonuç olarak; ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan, hem hidrofobik hem hidrofilik özellik taşıyan CD'ler tek başına da *kanseri baskılayıcı* özellik göstermektedir. Bu tez çalışması ile ilk kez bu etki moleküler yolak analizleriyle gözler önüne serilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda, ilaç yüklenmiş ACD'lerle yapılan kanser tedavilerinde, ACD'lerin kanser hücresi üzerine etkisi de göz ardı edilmemelidir. Hatta, ilaç molekülü ile birlikte ACD'nin sinerjik etkisi ayrıca değerlendirilebilir. Dolayısıyla olumlu sonuçlanmış olan bu tez çalışması, ACD'lerin ilaç yüklü formlarının ve tek başına kanser ilaçlarının, kanserli hücrelere olan etkisinin karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi ile ilgili yeni bir soruya cevap aranması gerektiği göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] A. Jemal, P. Vineis, F. Bray, L. Torre, D. Forman, D. Kanser Atlası. İkinci Baskı, Atlanta, GA: Amerikan Kanser Derneği, **2014**.
- [2] World Wide Web, <http://kanser.gov.tr>, <https://hsgm.saglik.gov.tr> (Erişim Tarihi: **15.12.2017**).
- [3] World Wide Web, (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>) (Erişim Tarihi: **03.11.2018**).
- [4] D.J. Newman, G.M. Cragg Natural Products as Sources of New Drugs Over The 30 Years from 1981 to 2010, *Journal of Natural Products*, 75 (3) (**2012**) 311-335.
- [5] V. Mitra, J. Metcalf, Metabolic Functions of The Liver. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 10 (7) (**2009**) 334-335.
- [6] World Wide Web, <https://www.cancer.org/cancer/liver-cancer/treating/chemotherapy.html>, from American Cancer Society, (Erişim Tarihi: **21.10.2018**).
- [7] G. Storm, S.O. Belliot, T. Daemen, D. Lasic, Surface Modification of Nanoparticles to Oppose Uptake by the Mononuclear Phagocyte System, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17 (**1995**) 31–48.
- [8] B.A. Teicher, Molecular Targets and Cancer Therapeutics: Discovery, Development and Clinical Validation, *Drug Resistance Updates*, 3 (**2000**) 67–73.
- [9] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (**2012**) 206–212.
- [10] I.S. Kim, S. H. Kim, Development of Polymeric Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Evaluation of Nanoparticles Based on Biotinylated Poly (ethylene glycol) with Sugar Moiety, *International Journal of Pharmaceutics*, 257 (**2003**) 195–203.
- [11] N. G. McCrum, C.P. Buckley, C.B. Bucknall, *Principles of Polymer Engineering*, Oxford University Press, New York, 1-2, **1997**.
- [12] F. Marcucci, F. Lefoulon, Active Targeting with Particulate Drug Carriers in Tumor Therapy: Fundamentals and Recent Progress, *Drug Discovery Today*, 9 (5) (**2004**) 219-228.
- [13] E. Cohen-Sela, M. Chorny, N. Koroukhov, H.D. Danenberg and G. Golomb, A New Double Emulsion Solvent Diffusion Technique for Encapsulating Hydrophilic Molecules in PLGA Nanoparticles, *Journal of Control Release*, 133 (**2009**) 90-95.
- [14] Y. Heakık, E. Taxaoh, H. Joapark, Cyclodextrin-covered Gold Nanoparticles for Targeted Delivery of An Anti-Cancer Drug. *Journal of Materials Chemistry*, 19 (16) (**2009**) 2310-2315.

- [15] F. Qualia, L. Ostacolo, A. Mazzaglia, V. Villari, D. Zaccaria, M.T. Sciortino, The Intracellular Effects of Non-ionic Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles in The Delivery of Anticancer Drugs, *Biomaterials*, 30 (3) (2009) 374-382.
- [16] A.Z. Wang, R. Langer, O.C. Farokhzad, Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs, *Annual Review of Medicine*, 63 (2012) 185-198.
- [17] A.M. Da Silveira, G. Ponchel, Wouessidjewe, F. Puisieux, D. Duchene, Combined Poly (isobutylcyanoacrylate) and Cyclodextrin Nanoparticles for Enhancing the Encapsulation of Lipophilic Drugs, *Pharmaceutical Research*, 15 (7) (1998) 1051-1055.
- [18] A. Ercan, M. Çelebier, G. Varan, S. Öncül, M. Nenni, O. Kaplan, E. Bilensoy, Global Omics Strategies to Investigate The Effect of Cyclodextrin Nanoparticles on MCF-7 Breast Cancer Cells, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 123 (2018) 377-386.
- [19] V.C. Wasinger, S.J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J.X. Yan, A.A. Gooley, M.R. Wilkins, I Humphery-Smith, Progress with Gene-Product Mapping of The Mollicutes: *Mycoplasma Genitalium*. *Electrophoresis*, 16 (1) (1995) 1090-1094.
- [20] M.A. Alpar, Doğayı öğrenmek: FİZİK, Boğaziçi Üniversitesi Yayınevi, 3, 2015.
- [21] B. Bunch, A. Hellemans, *The History of Science and Technology*, Houghton Mifflin Company, Boston-New York, 10-468, 2004.
- [22] R.P. Feynman, There's plenty of room at the bottom. *Engineering Science*, 23 (1960) 22-36.
- [23] N. Taniguchi, On the Basic Concept of Nano-Technology, *Proceedings of the International Conference on Production Engineering, Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering*, 18-23, 1974.
- [24] Ş. Erkoç, *Nanobilim ve Nanoteknoloji*, ODTÜ Yayıncılık, Ankara, 29, 2007.
- [25] R. W. Kelsall, I. W. Hamley and M. Geoghegan (Eds), *Nanoscale Science and Technology*, John Wiley & Sons Inc, 24-31, 2005.
- [26] World Wide Web, <https://foresight.org/Conferences/MNT7/Abstracts/Levi/>, 15-17 Oct 1999, Seventh Foresight Conference on Molecular Nanotechnology, CA,USA (Erişim Tarihi: 03.02.2018).
- [27] R.A. Freitas Jr, What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology Biology Medicine*, 1 (2005) 2-9.
- [28] R.A. Freitas Jr, *Pharmacytes: An Ideal Vehicle for Targeted Drug Delivery*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6 (2006) 2769-75.
- [29] World Wide Web, <https://physicsworld.com/a/nanoparticles-on-the-move-for-medicine>, 2018 *Physics World Focus on Nanotechnology* (Erişim Tarihi: 03.04.2018).

- [30] R. Misra, S. Acharya, S. K. Sahoo, Cancer Nanotechnology: Application of Nanotechnology in Cancer Therapy, *Drug Discovery Today*, 15 (19–20) (2010) 842-850.
- [31] Ç. Kocaeffe, Nanotıp: Yaşam Bilimlerinde Nanoteknoloji Uygulamaları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38 (2007) 33-38.
- [32] A.Z. Gürsoy, Lipozomlar, *Kontrollü Salım Sistemleri*, 104, 2002.
- [33] V.P. Torchilin, Multifunctional Nanocarriers, *Advance Drug Delivery Reviews*, 58 (2006) 1532-55.
- [34] 6. İlaç Kimyası, İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya, 2018.
- [35] G. Varan, J.M. Benito, C.O. Mellet, E. Bilensoy, Development of Polycationic Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 8 (2017) 1457–1468.
- [36] A.K. Singla, A. Garg, D. Aggarwal, Paclitaxel and its Formulations, *International Journal of Pharmaceutics*, 235 (2002) 179–192.
- [37] International Organization of Standardization: Nanotechnologies – Terminology and Definitions for Nano-Objects, ISO/TS 27687:2008 (E). ISO, Geneva, Switzerland, 2008.
- [38] ASTM International: E 2456-06 Terminology for Nanotechnology. ASTM International, West Conshohocken, USA, 2008.
- [39] N. Lewinski, V. Colvin, R Drezek, Cytotoxicity of Nanoparticles. *Nano, Small, Micro*, 4 (2008) 26-49.
- [40] D. Gilding, A. Reed, Biodegradable Polymers for Use in Surgery, Polyglycolic/poly (Lactic acid) Homo-and Copolymers: 1, *Polymer*, 20 (1979) 1459-1464.
- [41] G. Baratt, Colloidal Drug Carriers: Achievements and Perspectives, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60 (2003) 21-37.
- [42] S. Senel, S.J. McClure, Potential Applications of Chitosan in Veterinary Medicine, *Advance Drug Delivery Reviews*, 56 (2004) 1467-1480.
- [43] J. Szejtli, Cyclodextrins and Encapsulations, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* H.S. Nalwa (Eds), 2 (2004) 283-304.
- [44] T. Loftsson, P. Jarho, M. Masson, T. Jarvinen, Cyclodextrins in Drug Delivery, *Expert Opinion in Drug Delivery*, 2 (2) (2005) 1-17.
- [45] E. Bilensoy, A.A. Hincal, Cyclodextrin Based Nanomaterials in Pharmaceutical Field. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, New Jersey, John Wiley&Sons Inc, 1225-1247, 2008.

- [46] G. Işık, Meme Kanseri Tedavisinde Paklitaksel Yüklü Polikatyonik ve Anyonik Siklodekstrin Nanoküre Formülasyonu ve in Vitro Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, **2013**.
- [47] G. Işık, A. Ercan, J.M. Benito, C. Ortiz Mellet, E. Bilensoy, Polycationic Cyclodextrin Nanoparticles for the Delivery of Paclitaxel to Breast Tumor, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, Antalya, **2014**.
- [48] E. Bilensoy, O. Gürkaynak, A. L. Doğan, A. A. Hıncal, Safety and Efficacy of Amphiphilic β -cyclodextrin Nanoparticles for Paclitaxel Delivery, International Journal of Pharmaceutics, 347 (1–2) (**2008**) 163-170.
- [49] E. Bilensoy, Nanoparticulate Delivery Systems Based on Amphiphilic Cyclodextrins. Journal of Biomedical Nanotechnology, 4 (3) (**2008**) 293-303.
- [50] N. Erdoğan, G. Esendağlı, T.T. Nielsen, G. Esendağlı-Yılmaz, D. Yöyen-Ermiş, B. Erdoğan et al. Therapeutic Efficacy of Folate Receptor-Targeted Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles as a Novel Vehicle for Paclitaxel Delivery in Breast Cancer. Journal of Drug Targeting. 26 (1) (**2008**) 66-74.
- [51] Q. Pei, X. Hu, L. Wang, S. Liu, X. Jing, Z. Xie, Cyclodextrin/Paclitaxel Dimer Assembling Vesicles: Reversible Morphology Transition and Cargo Delivery. ACS Applied Materials & Interfaces. 9 (32) (**2017**) 26740-8.
- [52] World Wide Web, <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/basics/gene>, US National Library of Medicine (Erişim Tarihi: **15.08.2018**).
- [53] H. Pearson, Genetics: What is a Gene? Nature, 441 (7092) (**2006**) 398-401.
- [54] T. Kirby Lorne, DNA Fingerprinting: An Introduction, Breakthroughs in Molecular Biology, Oxford University Press, **1993**.
- [55] R. Scott Hawley, C.A. Mori, Section of Molecular and Cellular Biology, Division of Biological Sciences, University of California, The Human Genome: A User's Guide Book, Academic Press, 32, **1999**.
- [56] D.L. Nelson, M.M. Cox, A.L. Lehninger, Principles of Biochemistry (5th ed. bs.). New York; Basingstoke: W.H. Freeman, **2008**.
- [57] World Wide Web, <https://www.wikipedia.org>, (Erişim Tarihi: **21.10.2018**).
- [58] World Wide Web, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-methionine#section=Top>, Open Chemistry Database, (Erişim Tarihi: **22.10.2018**).
- [59] World Wide Web, <http://nhgri.gov/gallery>, Image modified from OpenStax Biology's modification of work by the National Human Genome Research Institute. (Erişim Tarihi: **16.08.2018**).
- [60] A. Kessel, N. Ben-Tal, Introduction to Proteins: Structure, Function, and Motion Chapman & Hall/CRC Mathematical and Computational Biology, CRC Press, **2010**.

- [61] E. Başaran, S. Aras, D. Cansaran-Duman, Genomik, Proteomik, Metabolomik Kavramlarına Genel Bakış ve Uygulama Alanları. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 67 (2) (2010) 85-96.
- [62] D.A. Wolters, M.P. Washburn, J.R. 3rd Yates, Analytical Chemistry, 73 (23) (2001) 5683-5690.
- [63] J.R. 3rd Yates, Annual Review Biophysics and Biomolecular Structure, 33 (2004) 297.
- [64] C. Wu, J.C. Tran, L. Zamdborg, K.R. Durbin, M. Li, D.R. Ahlf, B.P. Early, P.M. Thomas, J.V. Sweedler, N.L. Kelleher, Nature Methods, 9 (2012) 822.
- [65] M. Çelebier, K562 ve HT29 Kanser Hücrelerinde Protein ve Metabolitlerin Analizi için Çeşitli Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya A.B.D, Doktora Tezi, 2013.
- [66] A. Görg, W. Weiss, M.J. Dunn, Current Two-Dimensional Electrophoresis Technology for Proteomic, Proteomics, 4 (12) (2004) 3665-3685.
- [67] N.C. Mishra, Introduction to Proteomics: Principles and Applications, John Wiley&Sons Inc, USA, 2010.
- [68] L. Hood, L. Rowen, The Human Genome Project: Big Science Transforms Biology and Medicine. Genome Medicine, 5 (9) (2013) 79
- [69] L. Anderson and J. Seilhamer, A Comparison of Selected mRNA and Protein Abundances in Human Liver, Electrophoresis 18 (1997) 533-7.
- [70] S.H. Bal, F. Budak, Genomik, Proteomik Kavramlarına Genel Bakış ve Uygulama Alanları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 39 (1) (2013) 65-69.
- [71] J.L. Maron, G. Alterovitz, M. Ramoni, et al. High-Throughput Discovery and Characterization of Fetal Protein Trafficking in The Blood of Pregnant Women. Proteomics Clin Appl 3 (2009) 1389- 96.
- [72] M. Tyers, M. Mann, From Genomics to Proteomics, Nature, 422 (6928) (2003) 193-197.
- [73] D. Nedelkov, U.A. Kiernan, E.E. Niederkofler, et al. Population Proteomics: The Concept, Attributes, and Potential for Cancer Biomarker Research. Mol Cell Proteomics 5 (2006) 1811-8.
- [74] E. Yohannes, S.K. Ghosh, B. Jiang, et al. Proteomic Signatures of Human Oral Epithelial Cells in HIV-Infected Subjects, PLoS One, 6 (11) (2011) e27816.
- [75] B. Aslam, M. Basit, M.A. Nisar, M. Khurshid, M. H. Rasool, Proteomics: Technologies and Their Applications, Journal of Chromatographic Science, 55 (2) (2017) 182–196.
- [76] Jan-Christer Janson, Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications, Methods of Biochemical Analysis, John Wiley & Sons Inc, 151, 2012.

- [77] B. Wittmann-Liebold, H.R. Graack, T. Pohl, Two-Dimensional Gel Electrophoresis as Tool for Proteomics Studies in Combination with Protein Identification by Mass Spectrometry. *Proteomics*, 6 (17) (2006) 4688-4703.
- [78] J. Peng and S.P. Gygi, Proteomics: the move to mixtures, *Journal of Mass Spectrometry*, 36 (2001) 1083-1091
- [79] M. Ünlü, M.E. Morgan and J.S. Minden, Difference Gel Electrophoresis. A Single Gel Method for Detecting Changes in Protein Extracts. *Electrophoresis*, 18 (1979) 2071-2077.
- [80] Thomas P. Conrads, Haleem J. Issaq, Van M. Hoang, Current Strategies for Quantitative Proteomics, Richard D. Smith, Timothy D. Veenstra (Eds), *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, 65 (2003) 133-159.
- [81] S. Beranova-Giorgianni, Proteome Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry: Strengths and Limitations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (5), (2003) 273-281.
- [82] T. Rabilloud, Two Dimensional Gel Electrophoresis in Proteomics: Old, Old Fashioned, But Still Climps Up The Mountains. *Proteomics*, 2 (1) (2002) 3-10.
- [83] T. Rabilloud and C. Lelong, Two-Dimensional Gel Electrophoresis in Proteomics: A T. *Journal of Proteomics*, 74 (10) (2011) 1829-1841.
- [84] P.H. O'Farrell, High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250 (10) (1975) 4007-4021.
- [85] N.C. Stellwagen, Electrophoresis of DNA in Agarose Gels, Polyacrylamide Gels and in Free Solution, *Electrophoresis*, 30 (Suppl 1) (2009) S188-S195.
- [86] P. Pomastowski, B. Buszewski, Corrigendum to 'Two-Dimensional Gel Electrophoresis in the Light of New Developments' *Trends in Analytical Chemistry*, 53 (2013) 167-177.
- [87] T. Rabilloud, M. Chevallet, S. Luche, C. Lelong, Two-Dimensional Gel Electrophoresis in Proteomics: Past, Present and Future *Journal of Proteomics*, 73 (11) (2010) 2064-2077.
- [88] C. Damerval, D. Devienne, M. Zivy, H. Thiellement, Technical Improvements in Two-Dimensional Electrophoresis Increase the Level of Genetic Variation Detected in Wheat-Seedling Proteins. *Electrophoresis*, 7 (1) (1986) 52, 54.
- [89] A. Gorg, Two Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients. Current State, *Faseb Journal*, 11 (9) (1997) A1131-A1131.
- [90] A. Bodzon-Kulakowska, A. Bierczynska-Krzysik, T. Dylag, A. Drabik, P. Suder, M. Noga et al. Methods for Samples Preparation in Proteomic Research. *Journal of Chromatography B*, 849 (1) (2007) 1-31.
- [91] R. Westermeier, T. Naven, *Proteomics in Practise: A Laboratory Manual of Proteome Analysis*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.

- [92] G. Büyükköroğlu, D. Demir Dora, F. Özdemir, C. Hızal, Omics Technologies and Bio-Engineering, Techniques for Protein Analysis, Chapter 15, 317-351, **2018**.
- [93] R.C. Taylor, J.R. Coorsen, Proteome Resolution by Two-Dimensional Gel Electrophoresis Varies with The Commercial Source of IPG Strips, Journal of Proteome Research, 5 (11) (**2006**) 2919-2927.
- [94] A. Gorg, W. Postel, C. Friedrich, R. Kuick, J.R. Strahler and S.M. Hanash, Temperature-Dependent Spot Positional Variability in Two-Dimensional Polypeptide Patterns. Electrophoresis, 12 (**1991**) 53-658.
- [95] N.L. Anderson and N.G. Anderson, Proteome and Proteomics: New Technologies, New Concepts, and New Words. Electrophoresis, 19 (11) (**1998**) 1853-1861.
- [96] V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, W. Ehrhardt, Improved Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels Including Isoelectric Focusing Gels with Clear Background at Nanogram Sensitivity Using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis, 9 (6) (**1988**) 255-262.
- [97] T. Rabilloud, V. Brodard, G. Peltre, P.G. Righetti, C. Ettori, Modified Silver Staining for Immobilized pH Gradients. Electrophoresis, 13 (4) (**1992**) 264-266.
- [98] J.P. Malone, M.R. Radabaugh, R.M. Leimgruber, G.S. Gerstenecker, Practical aspects of fluorescent staining for proteomic applications, Electrophoresis, 22 (5) (**2001**) 919-932.
- [99] D. Özel Demiralp, N. İğci, S. Peker, B. Ayhan, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, **2014**.
- [100] M.F. Lopez, K. Berggren, E. Chernokalskaya, A. Lazarev, M. Robinson and W.F. Patton, A Comparison of Silver Stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with Respect to Protein Detection in Two-Dimensional Gels and Identification by Peptide Mass Profiling, Electrophoresis, 21 (**2000**) 3673-3683.
- [101] Y.S. Liu , S.Y. Chen, R.S. Liu, Duh D.-J., Y.T. Chao, Y.C. Tsai, J.S. Tsieh, Spot Detection for a 2-D Gel Image Using a Slice Tree with Confidence Evaluation, Mathematical and Computer Modelling, 50 (1-2) (**2009**) 1-14.
- [102] W. Staudenmann, P.D. Hatt, S. Hoving, A. Lehmann, M. Kertesz, P. James, Sample Handling for Proteome Analysis, Electrophoresis, 19 (6) (**1998**) 901-908.
- [103] F. W. McLafferty, Tandem Mass Spectrometric Analysis of Complex Biological Mixtures”, International Journal of Mass Spectrometry 212 (**2001**) 81–87.
- [104] A. Shevchenko, I. Chernushevich, W. Ens, K. G. Standing, B. Thomson, M. Wilm and M. Mann, “Rapid ‘de Novo’ Peptide Sequencing by a Combination of Nanoelectrospray, Isotopic Labeling and a Quadrupole/Time-of-flight Mass Spectrometer”, Rapid Communication in Mass Spectrometry 11 (**1997**) 1015–1024.
- [105] C. Lifshitz, Basic Aspects and Principles of Mass Spectrometry Applied to Biomolecules. Mass Spectrometry Reviews, 22 (3) (**2003**) 157.

- [106] P. Hao, T. Guo, X. Li, S.S. Adav, J. Yang, M. Wei, S.K. Sze, Novel Application of Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography (ERLIC) in Shotgun Proteomics: Comprehensive Profiling of Rat Kidney Proteome. *Journal of Proteome Research*, 9 (7) (2010) 3520-3526.
- [107] World Wide Web, <http://kabiproteomics.kocaeli.edu.tr/>, (Erişim Tarihi: **30.10.2018**).
- [108] R. Aebersold, M. Mann, Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Nature* 422 (2003) 198-207.
- [109] L.F. Marvin, M.A. Roberts and L.B. Fay, Matrix assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 337 (1) (2003) 11-21.
- [110] World Wide Web, http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_protein_ms.pdf, (Erişim Tarihi: **21.08.2018**).
- [111] A. Armirotti, G. Damonte, G. Achievements and Perspectives of Top-Down Proteomics. *Proteomics*, 10 (20) (2010) 3566-3576.
- [112] World Wide Web, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer>, National Cancer Institute, (Erişim Tarihi: **21.08.2018**).
- [113] World Wide Web, <Http://www.who.int/cancer/prevention/en/>, (Erişim Tarihi: **21.08.2018**).
- [114] D.O. Levitsky, V.M. Dembitsky, Anti-breast Cancer Agents Derived from Plants. *Natural Products & Bioprospecting*, 5 (2015) 1–16.
- [115] S. Hanash, A. Taguchi, The Grand Challenge to Decipher the Cancer Proteome, *Nature Reviews Cancer*, 10 (9) (2010) 652-660.
- [116] B. Robaye, A.P. Døskeland, N. Suarez-Huerta, S.O. Døskeland, J.E. Dumont, Apoptotic Cell Death Analyzed at The Molecular Level by Two-Dimensional Gel Electrophoresis, *Electrophoresis*, 15 (1) (1994) 503-510.
- [117] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre and A. Jemal, Global Cancer Statistics 2018: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **2018**.
- [118] D.M. Parkin, P. Pisani and J. Ferlay, Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 49 (1) (1999) 33-64.
- [119] E.S. Cho, J.Y. Choi, MRI Features of Hepatocellular Carcinoma Related to Biologic Behavior, *Korean Journal of Radiology*, 16 (3) (2015) 449-464.
- [120] IARC, WHO World Cancer Report, Edited by B.W. Stewart, C.P. Wild 2014.
- [121] J.B. Wenger, S.Y. Chun, D.T. Dang, H. Luesch, L.H. Dang, Combination Therapy Targeting Cancer Metabolism. *Medical Hypotheses*, 76 (2) (2011) 169-172.
- [122] ICH, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Harmonized Tripartite Guideline, **2005**.

- [123] World Wide Web, <http://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/vertical-streaking?ID=LUSQS649> (Erişim Tarihi: **04.11.2018**).
- [124] S.M. Leydold, M. Seewald, C. Stratowa, K. Kaserer, W. Sommergruber, N. Kraut et al, Peroxiredoxin-4 is Over-Expressed in Colon Cancer and its Down-Regulation. Leads to Apoptosis. *Cancer growth and metastasis*, 4 (**2011**) 7-23.
- [125] H. Ji, G.E. Reid, R.L. Moritz, J.S. Eddes, A.W. Burgess, R.J. Simpson, A two-dimensional gel database of human colon carcinoma proteins. *Electrophoresis*. 18 (3-4) (**1997**) 605-613.
- [126] A. Freund, F.L. Zhong, A.S. Venteicher, Z. Meng, T.D. Veenstra, J. Frydman, S.E. Artandi, Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1. *Cell*. 159 (6) (**2014**) 1389-1403.
- [127] C. Coghlin, B. Carpenter, S.R. Dundas, L.C. Lawrie, C. Telfer, G.I. Murray, Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer, *The Journal of Pathology*, 210 (3) (**2006**) 351-357.
- [128] V.P. Terranova, C.N. Rao, T. Kalebic, I.M. Margulies, L.A. Liotta, Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proceedings of The National Academy of Science of the USA*, 80 (2) (**1983**) 444-448.
- [129] B.T. McGrogan, B. Gilmartin, D.N. Carney, A. McCann, Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1785 (2) (**2008**) 96-132.
- [130] N. Erdemoğlu, B. Şener, Taksan Sınıfı Bileşiklerin Antitümör Etkileri, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 29 (1) (**2000**) 77-90.
- [131] I.T. Yeh, R.F. Luduena, The betaII isotype of tubulin is present in the cell nuclei of a variety of cancers, *Cell Motil Cytoskeleton*, 57 (**2004**) 96-106.
- [132] E.A. Perez, Microtubule inhibitors: differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance, *Molecular Cancer Therapeutics*, 8 (**2009**) 2086-2095.
- [133] C. Dominguez, J.F. Fiset, B. Chabot, F.H. Allain, Structural basis of G-tract recognition and encaging by hnRNP-F quasi-RRMs, *Nature Structural and Molecular Biology*, 17 (7) (**2010**) 853-861.
- [134] R.Y. Zhou, R. Shanas, M.A. Nelson, A. Bhattacharyya, J.Q. Shi, Increased expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in pancreatic cancer and its association with the mutant p53, *International Journal of Cancer*, 126 (2) (**2010**) 395-404.
- [135] P. Barboro, E. Repaci, A. Rubagotti, S. Salvi, S. Boccardo, B. Spina, B. et al, Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K: Altered Pattern of Expression Associated with Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer, *British Journal of Cancer*, 100 (10) (**2009**) 1608-1616.

- [136] G. Xiugong, W. Xiaoling, E. Lothar, Q. Byron, Y. Linda, Y. Chang-An, X. Di, Structural Basis for the Quinone Reduction in the bc₁ Complex: A Comparative Analysis of Crystal Structures of Mitochondrial Cytochrome bc₁ with Bound Substrate and Inhibitors at the Qi Site, *Biochemistry* 42 (30) (2003) 9067-9080.
- [137] N.J. Fan, K. Li, Q.Y. Liu, X.L. Wang, L. Hu, J. T. Li, C. F. Gao, Identification of tubulin beta chain, thymosin beta-4-like protein 3 and cytochrome b-c₁ complex subunit 1 as serological diagnostic biomarkers of gastric cancer, *Clinical Biochemistry*, 46 (15) (2013) 1578-1584.
- [138] P.G. Hill, J. S. Harrop, What is serum albumin, *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 292 (6512) (1986) 61.
- [139] M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, The Antioxidant Properties of Serum Albumin. *FEBS Letters*, 582(13) (2008) 1783-1787.
- [140] A. Gatta, A. Verardo, M. Bolognesi, Hypoalbuminemia, *Internal and Emergency Medicine*, 7 (3) (2012) 193.
- [141] G. Varan, C. Varan, N. Erdoğan, A. A. Hıncal, E. Bilensoy, Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 531 (2) (2017) 457-469.
- [142] G. Varan, S. Öncül, A. Ercan, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, E. Bilensoy, Cholesterol-Targeted Anticancer and Apoptotic Effects of Anionic and Polycationic Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105 (10) (2016) 3172-3182.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 10/07/2019

Tez Başlığı / Konusu: SİKLODEKSTRİN NANOPARTİKÜLLERİNİN HEPG-2 KARACIĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİSİNİN PROTEOMİK ÇALIŞMALARLA İNCELENMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 87 sayfalık kısmına ilişkin, 10/07/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9 'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

10.07.2019
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: FIRAT ŞAKAR
Öğrenci No: N13148242
Anabilim Dalı: NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP
Programı: NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

DOÇ. DR. MUSTAFA ÇELEBİER
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fırat Şakar
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Yılı : 1982
Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise	1996-2000	Anıttepe Süper Lisesi
Lisans	2001-2007	Hacettepe Üniversitesi Nükleer Mühendislik (Eng.)
Yüksek Lisans	2008-2012	Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanoteknoloji ve Nanotıp A.B.D.
Doktora	2013-...	Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanoteknoloji ve Nanotıp A.B.D.

Yabancı Dil:

İngilizce (KPDS-71)

Deneyim Alanları:

İş Sağlığı Güvenliği Uzmanı (C Sınıfı)

İş Tecrübesi:

2007-.....	T. Halk Bankası Genel Müdürlüğü
Eylül 2006	TAEK ÇNAEM Staj
Ağustos 2004	EÜAŞ Yeniköy Termik Santrali Staj

YAYINLAR

- F. Sakar, S. Erdogan, A.Y. Ozer, S. Senel, S. Colak, Studies on Gamma Irradiation Effects on Chitosan Microparticles. 10th International Conference European Chitin Society (EUCHIS'11), St. Petersburg/Russia, **20-24 May 2011**.
- F. Sakar, S. Erdogan, A.Y. Ozer, M. Ekizoglu, D. Kart, M. Ozalp, Y. Zencir, S. Colak, Comparative Evaluation of Gamma Irradiated Drug Carrier Systems. 12th International Symposium of CRS Indian Chapter on "Advance In Technology and Business Potential of New Drug Delivery Systems", Oral and Poster Presentations, Mumbai/India, **9-10 February 2012**.

- F. Sakar, S. Erdogan, A.Y. Ozer, M. Ekizoglu, D. Kart, M. Ozalp, S. Colak, C. Tukul, Studies on Gamma Radiation Sterilization on Liquid and Gel State Liposomes. Gordon Research Conferences on "Radiation Chemistry", Poster Presentation, Andover, NH/USA, **29 July-3 August 2012**.
- F. Sakar, S. Erdogan, A.Y. Ozer, M. Ekizoglu, D. Kart, M. Ozalp, Y. Zencir, S. Colak, Nano Drug Delivery Systems and Gamma Radiation Sterilization, *Pharmaceutical Development and Technology*, 22:6 (2017) 775-784.
- F. Sakar, M. Celebier, A. Ercan, Investigation of the Effect of Cyclodextrin Nanoparticles on HEPG-2 Liver Cancer Cell Line by Proteomic Studies, 1st International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry, Poster Presentation (**3rd Award**), Antalya/Turkey, **27-30 March 2019**.