

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

**PROTHROMBİN G20210A GEN DEĞİŞİMİNİN PLAZMA PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
PROTEOMİK ANALİZLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Yrd. Doç. Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP
Prof. Dr. Nejat AKAR**

08B333013

Başlama Tarihi: 01.03. 2008

Bitiş Tarihi: 04.08.2010

Rapor Tarihi:

**Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - " 2010 "**

ÖZET

PROTHROMBİN G20210A GEN DEĞİŞİMİNİN PLAZMA PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN PROTEOMİK ANALİZLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Venöz tromboembolizm (VTE) morbidite-mortalite oranları yüksek olabilen ve batı toplumunda 1-2/1000/yıl sıklığında görülen bir klinik tablodur. Derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner emboli (PE) aynı klinik tablonun farklı evreleri olarak değerlendirildiğinden, genel olarak venöz tromboembolizm olarak (VTE) adlandırılmaktadır. Genel popülasyona göre trombofilik hastalarda protrombin 20210 G/A mutasyonu taşıma sıklığı %1-2/%6-12 olarak bilinmektedir ve VTE için 3-5 kat risk getirmektedir. Literatüre göre; bazı inflamasyon ile ilişkili abundant proteinlerin ve polimorfik akut faz proteinlerinin serum konsantrasyonlarının artışı inflamasyon ile ilişkisi olan; aterosklerosis, eklem iltihabı, kalple ilgili hastalıklarda ve VTE' de teşhis edilmiştir. Prothrombin geninde 20210 pozisyonunda yer alan G/A mutasyonu, mRNA'da 3' okunmayan poliadenilasyon bölgesini etkilemektedir ve VTE için risk faktörü olarak tanımlanmıştır.

Proje kapsamında, adı geçen gen değişiminin hasta ve kontrol gruplarının plazma protein profilinde oluşturduğu farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile hasta (130) kontrol (130) grupları protrombin 20210 nükleotid değişimleri açısından taranmıştır. Mutasyon taşıyan ve taşımayan hasta/kontrol grupları oluşturulduktan sonra koagülasyon kaskadının bu basamağında etken mekanizmanın anlaşılması amacı ile proteomik çalışmalar kapsamında iki boyutlu jel elektroforezi ile protein profillenmesi ve kütle spektrometresiyle proteinlerin kimliklendirilmesi (PMF) yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen farklı hasta ve kontrol grupları arasında altı farklı abundant proteinin ifadesinin genotipe bağlı değişim gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Venöz Tromboembolizm, Protrombin, 2D jel elektroforezi, MALDI-TOF Kütle spektrometresi.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE INTERACTION BETWEEN THE PLASMA PROTEINS AND THE PROTHROMBIN G20210A MUTATION WITH PROTEOMIC ANALYSIS.

Venous thromboembolism (VTE) is a disease with high morbidity and mortality rates with an incidence of 1-2/1000 in Western societies. Deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE) are considered as the clinical stages of the same disorder, and are collectively called as venous thromboembolism. The prevalence of Factor II prothrombin gene mutations was reported at about 1-2/6-12 % , in whites. Prothrombin allele are the one of the most common cause for hereditary thrombophilia. According to the literature, increased serum concentrations of some abundant plasma proteins related with inflammation and polymorphic acute phase proteins have been associated with inflammation-related atherosclerosis, arthritis, heart-related disorders and also VTE diseases.

The aim of this study is to determine the effect of the Prothrombin 20210 gene mutation, which is known as a risk factor for venous thromboembolism, to the inflammation-sensitive abundant plasma proteins in control and patient groups and also to investigate the relationship between this mutation and MI history by proteomic methods.

In this preliminary work, plasma was separated from whole blood samples collected in tubes with EDTA (1/9 ml) and the remaining sample was used for DNA isolation with conventional phenol-chloroform method. Genetic analysis were done for patient (130) and control (130) individuals in terms of Prothrombin 20210 gene mutation by RT-PCR. Protein profiling by two dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting (PMF) by MALDI-TOF MS were done for patient and control groups. Six abundant proteins were found differentially expressed depending on the genotype between the different patient and control groups.

Key Words: Venous Thromboembolism, prothrombin, 2D gel electrophoresis, MALDI-TOF mass spectrometry.

TEŞEKKÜR

Prothrombin G20210A Gen Değişiminin Plazma Proteinleri Üzerine Etkisinin Proteomik Analizler İle Değerlendirilmesi konulu proje, Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Pediyatrik Genetik Bölümü ve Biyoteknoloji Enstitüsü ortak çalışması olarak sürdürülmüŐ ve tamamlanmıŐtır.

Projenin gerçekteŐirilmesini sağlayan Ankara Üniversitesi yöneticilerine teşekkür ederiz.

Yrd. Doç. Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP

Proje Yürütücüsü

Tarih: 30.08.2010

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----|
| ÖZET | 2 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| TEŞEKKÜR..... | 4 |
| İÇİNDEKİLER | 5 |
| 1. AMAÇ VE KAPSAM | 7 |
| 2. MATERYAL ve YÖNTEM | 9 |
| 2.1 Materyal..... | 9 |
| 2.2 Yöntem..... | 9 |
| 2.2.1 Örneklerin Elde Edilmesi..... | 9 |
| 2.2.2 RT-PCR tekniği ile mutasyon değerlendirmesi | 9 |
| 2.3 Proteomik Teknikler | 10 |
| 2.3.1 Abundant protein filtrelenmesi | 11 |
| 2.3.2 Bradford protein miktar tayini | 13 |
| 2.3.3 İki boyutlu jel elektroforezi | 14 |
| 2.3.4 Jellerin boyaması, görüntülemesi ve analizi | 15 |
| 2.3.5 Protein kümelerinin kesimi ve jel içinde tripsin sindirimi (tripsinizasyon)... | 16 |
| 2.3.6 Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI) ile peptit Analizi..... | 17 |
| 2.3.7 Kütle spektrometresi verilerini kullanarak protein Tanımlanması | 18 |
| 2.4 İstatistik analiz | 19 |
| 3. ANALİZ VE BULGULAR | 20 |
| 3.1 Plazma Abundant (Bol) Proteinlerin Filtrelenmesi | 22 |
| 3.2 Protrombin G20210A Nükleotit Değişimleri Açısından Gen Taranma Sonuçları | 22 |
| 3.3 Oluşturulan Gruplar ve İki Boyutlu Jel Elektroforezi Sonuçlarının değerlendirilmesi..... | 22 |
| 3.3.1 Kontrol set grubu değerlendirmeleri..... | 23 |
| 3.3.1.1 Grup içi standardizasyonları | 23 |
| 3.3.1.2. Farklı genotipte gruplar arası genel protein profilinin değerlendirilmesi | 26 |
| 3.3.1.3. Farklı genotipte gruplar arası abundant proteinlerin değerlendirilmesi.. | 27 |

| | |
|--|----|
| 3.3.2. Hasta set grup değerlendirmeleri | 33 |
| 3.3.2.1 Grup içi standardizasyonları | 33 |
| 3.3.2.2 Farklı genotipte Grup arası Abundant protein değerlendirme | 35 |
| 3.4 Protein Tanımlanması | 41 |
| 3.4.1. MALDI-TOF kütle spektrometresinin m/z kalibrasyonun yapılması..... | 41 |
| 3.4.2. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin spektrumları ve veri tabanından alınmış peptit kütleleri..... | 42 |
| 4. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 53 |
| KAYNAKLAR | 58 |
| EKLER..... | 62 |
| EK 1 | 63 |
| EK 2 | 64 |
| EK 3 | 66 |
| EK 4 | 73 |
| EK 5 | 74 |
| EK 6 | 75 |
| EK 7 | 76 |

1. AMAÇ VE KAPSAM

Venöz tromboz ve komplikasyonlarının en sık morbidite ve mortalite nedeni olması; hem venöz trombozun önlenmesinin, hem de tromboembolik olayın tekrarlama olasılığı açısından yüksek riske sahip olan hastalara daha etkin koruyucu tedavilerin geliştirilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca gen değişimlerini taşıyan hasta grupları içerisinde ilaç tedavisi veya cerrahi müdahale sonrasında prognozun farklı olması, kontrol grubu asemptomatik bireylerde de genetik trombotik risk faktörlerinin bulunması gibi açıklanamayan durumlar günümüzde proteomik yöntemler gibi daha hassas ve güvenilir tekniklerle açıklanabilecektir. VTE için kişiye özel risk faktörlerinin önceden belirlenebilmesini sağlayabilecek yeni hedef moleküllerin bulunması tedaviye yön verebilecek olması nedeni ile önem taşımaktadır. Ayrıca bulunan yeni hedef molekülleri sayesinde, görülme sıklığı yüksek olan PTS'li (post trombotik sendrom) hastaların yaşam kalitesi üzerine olan olumsuz etkileri azaltılmış olacaktır (Demiralp 2009).

İnsan genom projesi, yaklaşık 20-25.000 genin olduğunu ortaya koymuş ve projenin tamamlanmasının ardından, genlerin fonksiyonel ürünü olan proteinlere ait bilgi birikimi artmadığı sürece genetik bilginin tek başına yeterli olamayacağı görülmüş ve proteinlerle ilgili çalışmalara ağırlık verilerek “*proteomiks*” alanı doğmuş, hatta genomik, transkriptomik, metabolomik ve biyoinformatiğin de proteomik çalışmalara eklendiği sistem biyolojisi çalışmaları ağırlık kazanmıştır. Proteomiks alanında yapılan çalışmalar dört ana başlıkta toplanabilir: (1) Protein izolasyonu, (2) proteinlerin ayrımı (elektroforetik, kromatografik vs.) ve ifade analizleri, (3) protein tanımlaması (kütle spektrometreleri, Edman), (4) protein etkileşimleri ve yapısal analizler. Bu şekliyle proteomik yöntemler tıpta erken teşhis ve tedavi seçimi için kullanılabilir, güvenilir veri üretmekte ve bu amaçlarla yeni biyobelirteç tanımlanması için kullanılmaktadır.

Bazı genler, birden çok proteini şifreleyebilir (splicing). Fosforilasyon, glikozilasyon ve proteolitik yıkımları da içeren birçok post-translasyonel modifikasyon sonucu proteinlerin yapısı ve fonksiyonu değişir. Benzer şekilde oligosakkaritler ve lipitler gibi moleküller proteinlere eklenerek hücre kompartmanlarındaki yerleri belirlenir. Sonuç olarak, vücutta çeşitli şekillerde onbinlerce farklı proteinin sentezi yapılmaktadır. Proteomiks teknolojisi ile sağlık ve hastalık gibi farklı koşullarda bulunan hücre, doku ve vücut sıvılarındaki proteinlerin birbirleri ile ilişkileri, yapı ve fonksiyonları sistematik olarak incelenmekte ve nicel (kantitatif) analizleri yapılmaktadır. Son yıllarda, bu teknoloji biyolojik belirteçlerin (biomarker) tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Biyolojik belirteçler,

bir biyolojik sistemin fizyolojik durumunu yansıtır. Bu durum hastalık süresince değişebilir. Bu nedenle biyolojik belirteçler özellikle farklı kanser tiplerinde, inflamasyonla seyreden metabolik hastalıklarda, trombozda ve nörodejeneratif hastalıklarda teşhis ve tedavide önemli rol oynamaktadır (Güneştutar et al 2009).

Genom projesi ile elde edilen bilgilerin klinik çalışmalara uygulanması ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacı ile proteomiks kavramı hızla gelişmeye başlamıştır. Hastalıkların tanımlanması ve tedavi geliştirmede yaygın olarak kullanılan genetik tekniklere ek olarak gelişen proteomik teknikler araştırmacılar için büyük bir umut ışığı olmuştur. Proteomiks çalışmalarının gen çalışmalarına ek olarak sunduğu avantajlardan en önemlileri vücut sıvılarında, hücrelerde ve doku biyopsilerinde diyagnostik ve prognostik hastalık belirteçlerinin tanımlanmasına ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine olanak sağlamasıdır. Ayrıca genetik yatkınlık gösteren hastalıkların tanımlanması doğru bir genetik teste gereksinim duyduğu kadar fenotipin de doğru saptanmasını gerektirir. Çünkü bir organizmadaki proteom genomdan farklı olarak daha dinamik ve organizmanın bulunduğu koşula (örneğin patolojik durum) ve zamana bağlı olarak değişebilir (Güran 2005).

Dolayısıyla bu proje kapsamında; genomik ve proteomik yöntemler birleştirilerek, plazma protein profil değişimlerinin saptanması amaçlanmıştır. Amaç kapsamında öncelikle genetik tarama ile Protrombin G20210A nükleotit değişimi olan ve tromboza yatkınlık gösteren hasta-kontrol gruplarının tanımlanması ve proteomik çalışmalar ile araştırmanın devamında protein profil farklılıklarının takibi ile bilinmeyen farklılıkların ortaya çıkarılması basamakları hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu tez çalışmasına farklı kliniklerden venöz tromboemboli tanısı almış Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalına genetik analiz için konsültasyona yollanmış 130 olgu ve ailesinde ve kendinde hiçbir venöz tromboemboli öyküsü olmayan 130 kontrol bireyi dahil edilmiştir. Hasta-kontrol grupları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Moleküler genetik bilim dalında protrombin G20210A nükleotit değişimi açısından öncelikle taranmış ve farklı genotipe sahip hasta kontrol grupları grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalı proteomik analizler ile değerlendirilmiştir. Projenin Etik kurulu onayı, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri Müdürlüğü tarafından 1997 yılından beri desteklenen farklı projeler kapsamındadır.

Kullanılan bütün kimyasallar moleküler biyoloji veya proteomik çalışmalarında kullanılmaya uygundur. Deneylerde kullanılan kimyasalların listesi Ek 1’de verilmiştir. Kullanılan cihazlar üreticilerinin talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır. Cihazların listesi ve hangi amaçlarla kullanıldığı Ek 2’de verilmiştir. Tüm deneylerde Millipore (Milli-Q ve Elix filtreleri) saf su sisteminden elde edilen su kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1 Örneklerin elde edilmesi

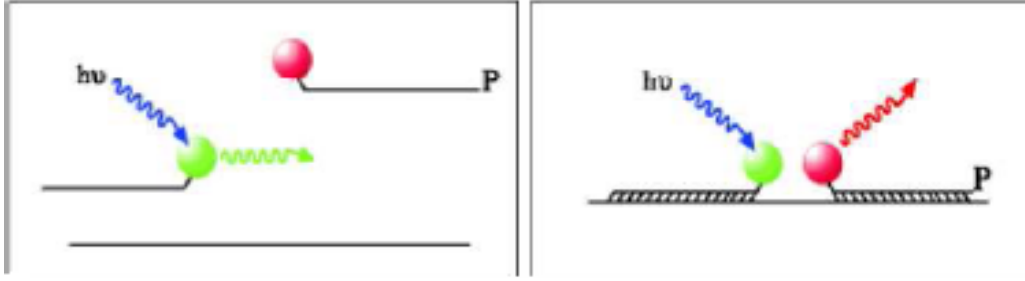
Kan örnekleri 1 ml 0.5 M EDTA’lı (Etilendiamintetraasetikasit, Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 ml kan örneği (1/10 EDTA) olacak şekilde alınmış ve proteom çalışmalarında kullanılacak plazma, kan örneklerinin 4.500 rpm.’de 5 dakika santrifüj yapılması ile ayrılarak kullanıma kadar -80°C’de saklanmıştır. Plazma ayrıldıktan sonra kalan kısım üzerinden geleneksel fenol-kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır.

2.2.2. RT-PCR tekniği ile mutasyon değerlendirmesi

Elde edilen DNA miktarları spektrofometrik yöntemler ile belirlenmiştir. Hasta grubunu oluşturan 130 bireyin ve 130 kontrol bireyin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile genotipleri protrombin 20210 G/A mutasyonu için değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler yeterli konsantrasyonlarda DNA örnekleri eldesini takiben hedef gen bölgesi olan protrombin 20210 bölgelerini içeren gen dizisini sınırlayan özel oligonükleotidler ile ve mutasyonun bulunup

bulunmamasına göre değişen bağlanma sıcaklıkları ile amplifiye edilerek RT-PCR ile değerlendirilmiştir.

Tüm bireylerin RT-PCR genotip analizleri LightCycler (Roche) hibridizasyon prob yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İki farklı prob dizayn edilmiştir. 3' ucunda floresans işaretli boya (donor), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp bir birine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Enerji Transfer). Enerji "donor" boyadan "acceptor" boyaya transfer olur. Bu enerji transfer sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artar (Şekil 2.1) (Günel 2007).



Şekil 2.1. RT-PCR hibridizasyon prob yöntemi

LightCycler PCR sistemi ile, kapiller PCR ile hedef DNA'nın amplifikasyonu, amplifiye olan DNA'nın gerçek-zamanlı olarak floresans artışı ile gözlenmesi ve PCR sonunda, amplikonun spesifitesinin ortaya konması için erime sıcaklığı (temperature of melting) analizi yapmak mümkündür.

2.3. Proteomik Teknikler

Farklı genotiplerin fenotipe etkilerinin araştırılması amacıyla plazma örneklerinde proteomik çalışma planlanmıştır. Proteom çalışmasına; protrombin 20210 G/A mutasyonu taşıyan hasta ve kontrol grupları içerisinde 3'er birey dahil edilmiştir. Tüm plazma örneklerinin proteomik analizleri ikili tekrarlı çalışılmıştır.

2.3.1. Abundant protein filtrelenmesi

Plazmada baskın olarak bulunan proteinler özellikle düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin dağılımını baskıladığından, bazı durumlarda baskın proteinlerin (albümin ve immünoglobülinler gibi) plazmadan filtrelenmesi gerekmektedir. Bu işlem için antikor afinitesi temelli bazı ticari kolonlar mevcuttur. Ancak öncelikle bu işlemin örnekler üzerindeki etkinliği ve kullanımının uygunluğu test edilmelidir. Optimizasyon çalışmaları kapsamında bu amaçla iki farklı kolon sistemi kullanılmıştır.

a) Kolon 1 kullanım protokolü:

Abundant proteinlerin azaltılması işlemi boyunca bütün solüsyonlar ve örnekler buz içerisinde muhafaza edilerek:

1. Çalışmada gerekli olan protein miktarı dikkate alınarak, örnekler 1X dilüsyonu yapılmış dengeleme tamponu ile 12.5:1 oranında seyrelmiştir. Bu çalışmada 64 µL örnek ve 736 µL 1X dengeleme tamponu ile seyreltme yapılmıştır.
2. 0.22 um filtreler kullanılarak 400 µL seyreltilmiş örnekler 1000–2000 g' de 30s santrifüj edilerek kolona uygulanmaya hazır hale getirilmiştir.
3. Uygulama yapılacak kolon hazır hale getirildikten sonra filtre edilmiş örnekten 100µL alınarak kolona yükleme yapılmış, 20 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Kolonun içerisinde serumda bol bulunan 20 proteine özgü antikorlar bulunur. 20 dakikalık bekleme süresi boyunca bu 20 protein kolonda tutulmakta, diğer proteinler ise serbest halde kalmaktadır). Süre sonunda 5000 rpm' de 20sn santrifüj işlemi yapılmıştır.
4. Kolonda tutulan proteinleri uzaklaştırmak amacıyla 2 mL yıkama tamponu kolondan enjektör yardımıyla belirli bir hızda geçirilmiştir. Her filtre edilmiş 100 µL' lik örnek için bu aşamalar tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrası toplanan örnekler %95 abundant proteinler için filtrelenmiştir.
5. Filtrelenen plazma protein örnekleri, 5000 Da MWCO filtreler ile konsantre edilerek kullanılmıştır.

Konsantrasyon tüplerine maksimum 500 µL örnek yüklenmiş ve 45 dakika +4°C' de 14000 g' de santrifüj işlemi uygulanmıştır.



Şekil 2.2. 20 abundant protein için filtreleme sistemi; Kolon I

b) Kolon II kullanım protokolü:

1. Kolona 1 ml bağlama tamponu (binding buffer) ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir (işlem 2 defa tekrarlanır).
2. Örnekten 60 µl ve bağlama tamponundan 180 µl olacak şekilde numune seyreltilmiştir.(Total hacim 200 µl olmaktadır).
3. Dilüe örnek kolona 200 µl olacak şekilde ilave edilmiştir.
4. Kolon hafifçe 5 dakika aralıklı olacak şekilde 3 dakika vortekslenmiştir. 5 dakika bekleme süresinin ardından 20 saniye 10 000 g' de santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüjden alınan kolon üzerine reçineyi yıkamak için 200 µl bağlama tamponu ilave edilerek tekrar 20 s 10 000 g' de santrifüj yapılmıştır.
6. Albümin ve IgG' leri filtre ederek diğer proteinler saflaştırılır.
7. Filtrelenmiş örnek hacmi fazla olduğundan 5000 Da MWCO filtre tüpleri yardımıyla numune içerisindeki protein konsantrasyonu saflaştırılmıştır.

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



Şekil 2.3. Albümin ve IgG için filtreleme sistemi; kolon II

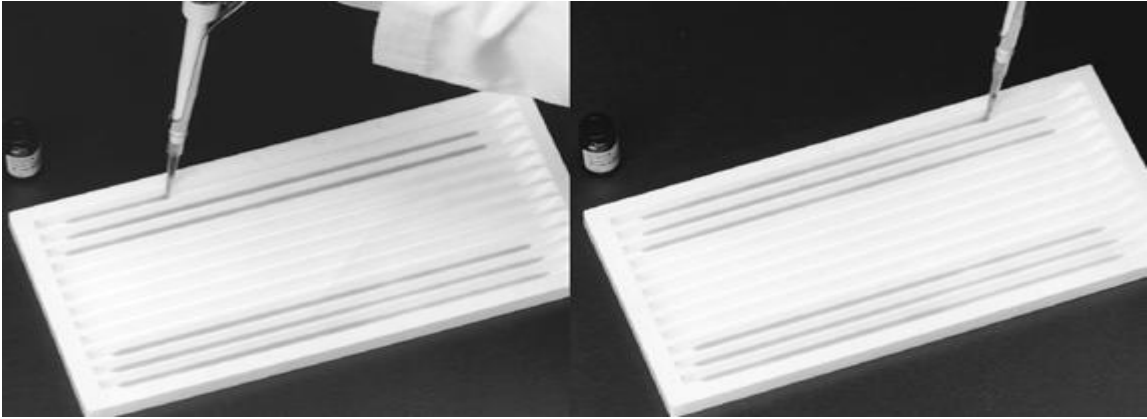
Plazma örneklerinden her iki kolon sistemi ile abundant proteinlerin filtrelenmesi sonrası elde edilen protein örnekleri ve filtreleme yapılmaksızın kullanılan plazma protein örnekleri çalışmanın devamında kullanılacak iki boyutlu jel elektroforezi sistemine uygulanmıştır. Yüksek moleküler ağırlıklı baskın proteinlerin filtrelenmesi ve diğer proteinlerin zenginleştirilmesi için kullanılan kolon ile filtreleme yöntemleri, kan örneklerinin alınma, plazma ayrılması ve saklanması koşullarıyla yakın ilişkilidir (edtalı tüp, taze kan). Bulgular kısmında verilen örnek plazma protein profilinde görüldüğü gibi EDTA'lı tüp içerisinde alınan taze kan örneğinden, soğuk zincir bozulmadan uygun koşullar altında plazma örneğinin ayrılması ile filtreleme işlemi belirtilen kolon sistemleriyle yapılabilmektedir. Ancak çalışma bu tip filtreleme sistemlerinin kullanılabilirliği kan örneklerinin alınması, plazma kısmının ayrılması koşulları ve saklanma süreci ve koşullarıyla ilintili olması nedeniyle bu çalışmada plazma örnekleri için uyumlu bulunmamış ve çalışmalara filtreleme yapılmadan devam edilmesine karar verilmiştir.

2.3.2. Bradford protein miktar tayini

Eşit miktarda plazma örnekleri proteomik çalışmalara temel teşkil eden iki boyutlu jel elektroforezi için 1:100 oranında rehidrasyon tamponunda seyreltme yapılarak protein miktar tayini 96 kuyucuklu mikropalakalarda Bradford (mikro-Bradford) yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford 1976). 5X stok olarak bulunan protein boyası (Bio-Rad) ultra saf su ile 1X'e seyreltilmiştir ve kuyucuklara 200 µl boya, 10 µl örnek koyulmuştur. Örneklerin boyayla reaksiyona girmesi için 15 dk. oda sıcaklığında bekledikten sonra mikropalaka okuyucuda 595 nm'de ölçüm yapılmıştır. Standart olarak 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında sığır serum albümini kullanılmıştır. Örnekler üç tekrarlı olarak ölçülüp ortalamaları alınmıştır.

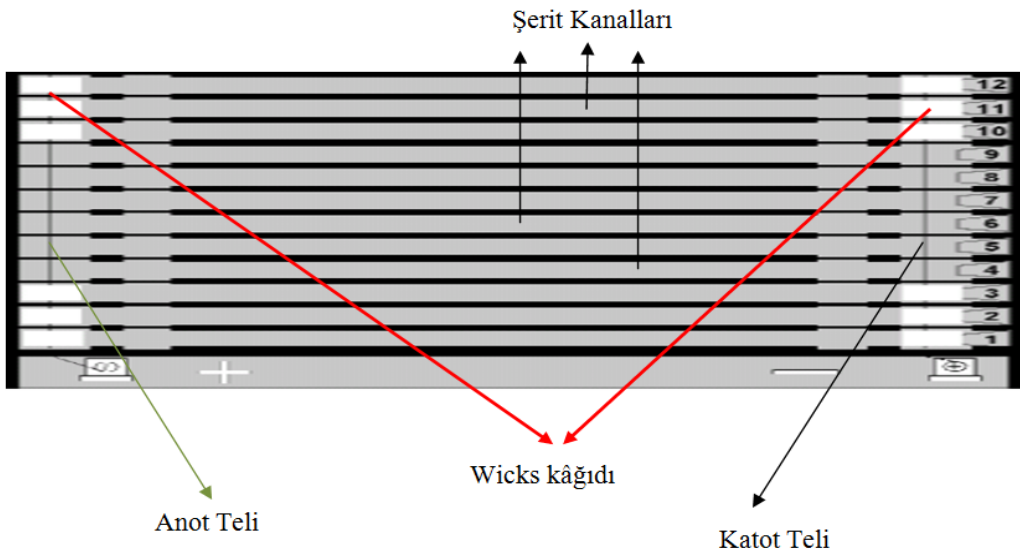
2.3.3. İki boyutlu jel elektroforezi

Aktif rehidrasyon tepsilerinde 17 cm. uzunluğunda ve pH 3–10 aralığındaki Immobilize pH gradient (IPG) şeritlere (Bio-Rad) rehidrasyon tamponuyla (7 M üre, 2 M tiyoüre, %4 CHAPS, %1 amfolit, pH 3-10, 10 mM DTT, bromo fenol mavisi) beraber 175 µg. protein yüklenmiştir ve 50 V'de 16 saat aktif rehidrasyon yapılmıştır (Şekil 2.4).



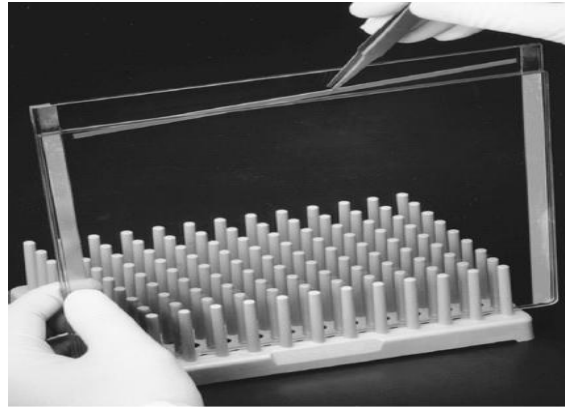
Şekil 2.4. Rehidratasyon tamponunun tabla kanalı boyunca uygulanması (<http://www.scribd.com/doc/24603098/IPG-Ready-Strip-Instructions>)

Daha sonra şeritler temiz bir tepsiye alınarak izoelektrik odaklama işlemi gerçekleştirilmiş ve birinci boyut izoelektrik noktalarına göre protein ayrımı sağlanmıştır (15 dk. 250 V, 3 sa. 10 kV, toplamda 60 kV/sa değerine ulaşana kadar 10 kV) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Tablanın kanallarına wicks kağıdının uygulanması

Bu işlemin ardından şeritler, ikinci boyut ayırma hazır hale gelmeleri için, çalkalayıcı üzerinde 15 dk. dengeleme tamponu I (6 M üre, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS, %20 gliserol, %2 DTT] ve 15 dk. dengeleme tamponu II (dengeleme tamponu I'de %2 DTT yerine %2.5 iyodoasetamid ve ek olarak bromo fenol mavisi) ile muamele edilmiştir. Ardından şeritler %4'lük toplama ve %12'lik ayırma jellerinden oluşan 1 mm. kalınlığındaki SDS poliakrilamid jele yüklenmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Şeritlerin toplama jeline kadar itilerek, sabitlenmesi (<http://www.scribd.com/doc/24603098/IPG-Ready-Strip-Instructions>)

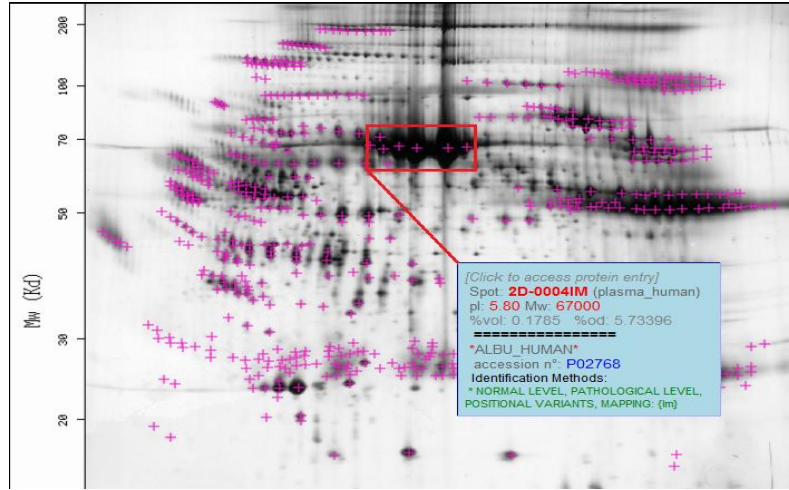
SDS tamponu (%3.03 Tris-Base, %1.44 glisin, %1 SDS) eşliğinde 30 dk. 100 V ve izleme boyası jelin altına ulaşmaya kadar 150 V sabit voltajda ikinci boyut moleküler ağırlıklarına göre proteinlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Jeller her bir örnek için iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

2.3.4. Jellerin boyaması, görüntülemesi ve analizi

Jeller floresans özellikte bir boya olan Sypro Ruby® (Bio-Rad) ile üreticinin talimatlarına göre boyanmıştır. Bu amaçla, fiksatif çözeltisine (%10 metanol, %7 asetik asit) koyulup çalkalayıcıda 1,5 saat bekletilen jeller daha sonra boya içinde gece boyu çalkalayıcıda bırakılmıştır. Son olarak 1,5 saat tekrar fiksatif içinde bekletilerek VersaDoc (Bio-Rad) görüntüleme sisteminde UV altında görüntülenmiştir. Jel fotoğraflarının analizi PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad) programı kullanılarak yapılmıştır. Tekrarlar programa tanıtılıp grup oluşturulmuştur. Yine aynı program yardımıyla protein kümelerinin üç boyutlu ve çubuk grafikleri elde edilmiştir ve deneysel pH ve moleküler ağırlık değerleri hesaplanmıştır. Programın anlamlı farklılık belirlediği kümelerin sayısal yoğunluk değerleri

programdan alınmış ve SPSS 9.0 for Windows programında p değerleri hesaplanmıştır.

Ayrıca, jeller üzerindeki spotların hangi proteinlere ait olabileceği hakkında kütle spektrometresi analizlerinden önce fikir sahibi olabilmek amacıyla görüntüler SwissProt 2DPAGE veri tabanındaki insan plazma görüntüsüyle karşılaştırılmıştır (Şekil 2.7)



Şekil 2.7. İnsan plazma protein profili (http://www.expasy.ch/swiss-2dpag viewer&map=PLASMA_HUMAN&ac=all)

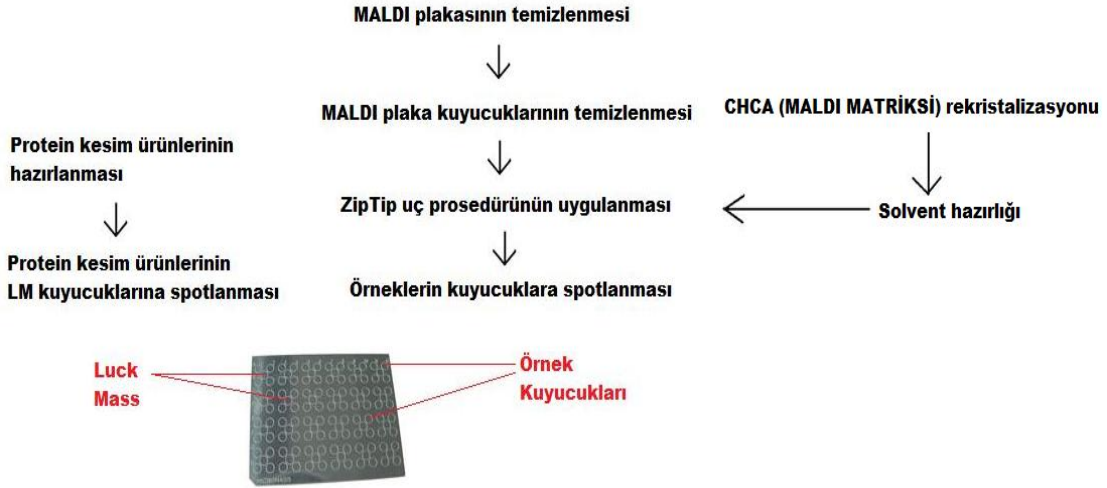
2.3.5. Protein kümelerinin kesimi ve jel içinde tripsin sindirimi (tripsinizasyon)

İlgilenilen protein kümeleri robotik bir sistem olan SpotCutter (Bio-Rad) cihazında 1 mm çaplı daire parçaları şeklinde kesilmiştir. Bu amaçla önce jel görüntülenmiş ve ilgili bölgeler PDQuest 8.0.1 programı aracılığıyla belirlenmiştir. Kesimi yapılan parçalar, her bir kuyucuğuna daha önce 200'er µl ultra saf su koyulan V tabanlı plakaların kuyucuklarına robotik kol tarafından koyulmuştur.

Kesim işleminin ardından jel içinde sindirim işlemi (tripsinizasyon) gerçekleştirilmiştir. Öncelikle amonyum bikarbonat ve asetonitril ile jel parçalarının boyası uzaklaştırılmıştır. Daha sonra DTT ile redükleme, iyodoasetamid ile alkilleme yapılmıştır. Bu işlemlerin ardından her bir kuyucuğa 30 µl. 50 mM amonyum bikarbonat içinde 150 ng. tripsin enzimi koyularak enzimin kendi kendini sindirmeden jele geçmesi için 1 sa. 4°C'de bekletilmiş ve enzimin sindirim işlemini gerçekleştirebilmesi için de gece boyu 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra ekstraksiyon tamponu (%1 formik asit, %2 asetonitril) ile jel içinde sindirilmiş olan peptitler elde edilmiştir. Tripsinizasyon işleminin bütün basamakları laminar akışlı kabinde yapılmıştır.

2.3.6. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI) ile peptit analizi

MALDI kütle spektrometresi hazırlık şeması aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 2.8. MALDI kütle spektrometresi hazırlık şeması

Uygun bir şekilde yüklemeye hazır hale getirilmiş MALDI-TOF örnek yükleme plakasının kuyucukları önce saf su, daha sonra asetonitril ile yıkanmış ve kurumaları beklenmiştir. İyonlaşmayı sağlayacak matriks olarak kullanılmak üzere rekristalize edilmiş *alpha*-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), mg. başına 50 µl. olacak şekilde matriks çözücüsü (%75 asetonitril, %0.1 trifloro asetik asit (TFA) içerisinde hazırlanmıştır. Yükleneyecek peptit örneklerinin üzerine eşit hacimlerde örnek çözücüsü (%50 asetonitril, %0.1 TFA) ve matriks eklenerek kuyucuklara 1,5 µl. yükleme yapılmıştır.

MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonu örnek plakasında bulunan "Lock Mass" kalibrasyon kuyucuklarına yüklenen ve moleküler ağırlıkları bilinen 5 peptit karışımı ile yapıldı (dış kalibrasyon). Bu amaçla, Adrenokortikotropik hormon (ACTH) 18-19, (Glu1)-fibrinopeptit B (Glu-Fib), substance P, renin-14 ve anjiyotensin 1 peptitleri son konsantrasyonları 10-40 pmol olacak şekilde örnek çözücüsü ile seyreltilmiştir. Kullanılan peptitlerin moleküler ağırlıkları Çizelge 2.1.'de verilmiştir. Yapılan kalibrasyon sonrası peptit karışım m/z değerleri, spektralarıyla değerlendirilmiş ve deneyin doğruluğu test edilmiştir.

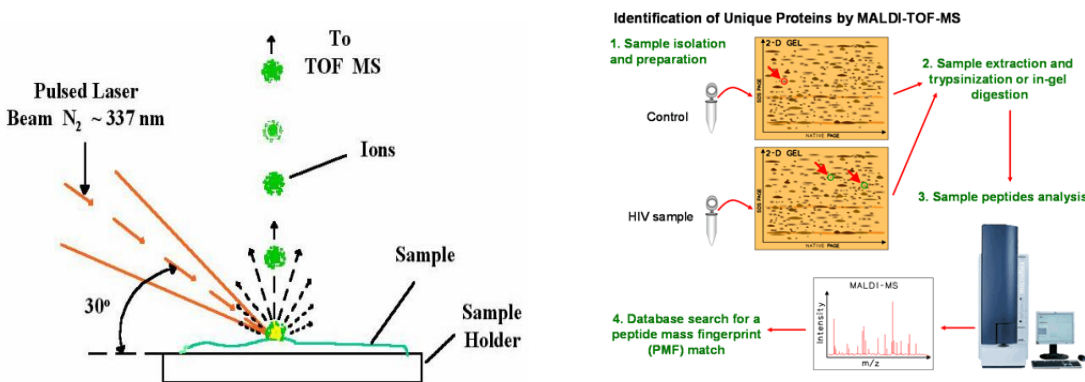
Çizelge 2.1. 5 peptit karışımının kütle değerleri

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

Tüm ölçümler 500-3000 Da. arasında refletron pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. Ancak 700 Da altında CHCA matriksin genel iyonlaştırma derecesi gereği gelen kirlilik yoğun olarak her kuyucukta aynı şekilde görülmüş ve bu bölge analizlere dahil edilmemiştir.

2.3.7. Kütle spektrometresi verilerini kullanarak protein tanımlanması

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)” ve “Time-of-flight (TOF)” adlı kütle spektrometresi yöntemiyle analitlerin kütle ölçümlerinin hızlı ve kesin olarak yapılması olanak sağlanmıştır. Bu teknikte peptidler katı fazdan gaz fazına geçerken, TOF kütle spektrometresiyle hızlı bir biçimde m/z oranlarına göre ayrılırlar.

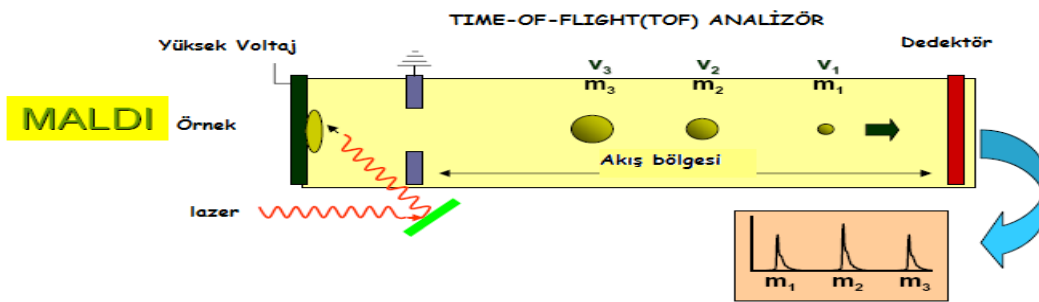


Şekil 2.9. MALDİ lazer ışınının katı matriksi uyarması ve analitleri iyonize etmesi

MALDI-TOF kütle spektrometresiyle proteinlerin tanımlanması +1 yüklü peptidlerin m/z oranının ölçülmesiyle gerçekleşir. Peptid kütlelerinin doğru ölçümüne dayanan protein tanımlanması için

geliştirilmiş farklı programlar vardır. Skorlama için en basit yöntem peptid kütlelerinin sayılarını toplamaktır. Peptid kütlelerinin sayıları protein veri tabanındaki her giriş için tahmin edilen kütleyle eşleştirilir.

TOF analizi, iyonların tümüne aynı miktarda enerjinin verildiği bir dedektöre doğru hızlanan bir dizi iyona dayanmaktadır. Ancak iyonlar aynı enerjiye sahip olmalarına rağmen farklı kütlelerde olduğundan dedektöre ulaşma zamanları farklıdır. En küçük iyonlar hızlarının fazla olmasından dolayı dedektöre ilk ulaşırken daha büyük olan iyonlar daha büyük olan kütleleri yüzünden dedektöre daha geç ulaşmaktadırlar (Şekil 2.10)



Şekil 2.10. Dedektöre çarpan farklı kütlelerdeki iyonlar

Proje kapsamında yapılan çalışmada MALDI-TOF kütle spektrometresinden alınan m/z değerleriyle swiss prot/uniprot veri tabanlarında eşleşen peptid kütleleri Mascot veri analiz tabanları aracılığıyla tanımlanmıştır (www.matrixscience.com). Mascot verileri protein veri tabanında verilen molekül ağırlığı ve pI değerleri açısından 2-D jel elektroforezi MA ve PI değerleri ile karşılaştırılarak tanımlamanın doğruluğu teyit edilmiştir.

2.4. İstatistik Analiz

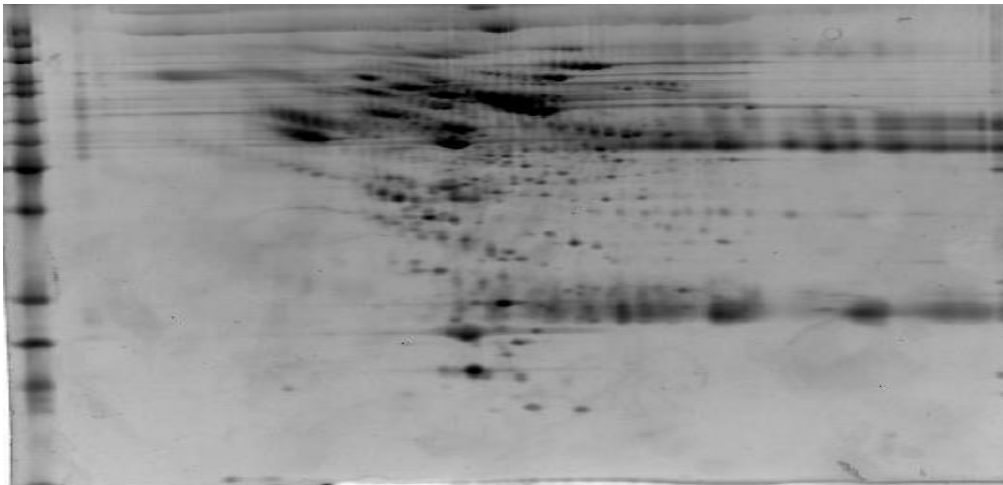
PDQuest programından elde edilen yoğunluk değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması için ANOVA kullanılmıştır (SPSS For Windows 9.0). Analizden önce gruplar içinde bireysel farklılık olup olmadığı test edilip fark bulunanlar analiz dışı bırakılmıştır. Yapılan analizlerde varyansların homojenliği Levene testi ile test edilmiş ve varyansların homojen olduğu durumda Tukey, olmadığı durumda ise Tamhane testi uygulanmıştır.

3. ANALİZ VE BULGULAR

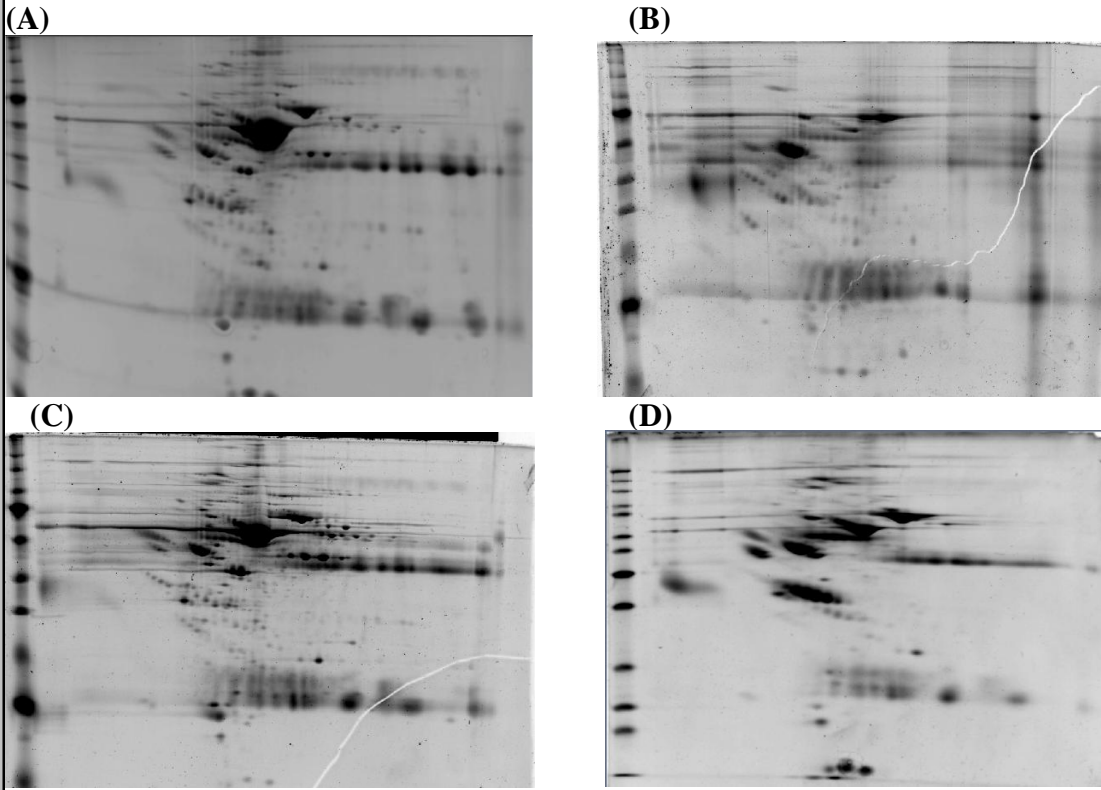
3.1. Plazma Abundant (Bol) Proteinlerin Filtrelenmesi

Proteomik çalışmalarda kullanılabilir bir protein profili elde etmek için en önemli aşama örneğin standardizasyonu ve optimizasyonudur. Örnek tipine ve kaynağına göre değişen tuz ve benzeri inhibitörlerden arındırma ve proteaz ve fosfataz inhibitörleriyle doğal yıkım ve modifikasyonları elimine etmek gerekmektedir. Plazma uygulamalarında, iki boyutlu jel elektroforezi profillemelerinde en önemli optimizasyon ise ifadesi fazla olan albumin gibi abundant proteinlerin filtrelenmesi ve ifadesi az olan proteinlerin profillerinin çıkarılabilir hale getirilmesi yani zenginleştirilmesidir. Farklı kolon sistemleriyle sadece albumin veya 20 ifadesi yüksek abundant proteinin birlikte filtrelenmesi yapılabilir. Kolon sistemlerinin kullanılmasında alınan sonuçları çalışılan materyalin alınma şeklinden, serum/plazma ayrılmasındaki koşullardan, saklanma koşullarından ve en önemlisi de örneğin taze olup olmamasından etkilemektedir. Bu etkenlerin değerlendirilebilmesi amacıyla bu tez çalışması kapsamında kullanılacak hasta ve kontrol plazma örnekleri farklı iki tip kolon filtrelemesi ve filtreleme yapılmadan olacak şekilde çalışılmış ve tez çalışmalarına kolonla filtreleme işlemi yapılmadan devam edilmesine karar verilmiştir (Şekil 3.1).

Yapılan optimizasyon çalışmalarında kit kullanarak yapılan filtrelemenin taze kan kullanıldığında iyi sonuç verdiği görülmüştür (Şekil 3.1). Ancak plazma örnekleri -80°C 'de belli bir süre bekletildikten sonra yapılan filtreleme işlemlerinden iyi sonuç alınamamıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Taze kan örneğinden kit I kullanarak filtreleme yapıldıktan sonra elde edilen 2 boyutlu jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 3.2. Abundant proteinlerin kit I ile filtrelenmesiyle (B) ve aynı örneğin filtrelenmeden (A) elde edilen 2 boyutlu protein profilleri; abundant proteinlerin kit II ile filtrelenmesiyle (D) ve aynı örneğin filtrelenmeden (C) elde edilen 2 boyutlu protein profilleri

Optimizasyon çalışmaları sonucunda filtrelemeden iyi sonuç almak için aşağıdaki noktalara dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır: Buna göre standardizasyon yapılması gereken filtreleme koşulları aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- 1- Kan örneğinin ve ayrıca çalışılacak serum/plazma örneğinin taze olması
- 2- Kan alınan tüplerde kullanılan anti-koagulan maddelerin aynı olması
- 3- Kan almaya uygun tüpleri kullanılması
- 4- Plazma ayırma koşulları her çalışma için aynı olması
- 5- Örnekler aynı koşullarda saklanması
- 6- Kitleri kullanırken kontaminasyon için gerekli önlemler alınması

3.2. Protrombin G20210A Nükleotit Değişimleri Açısından Gen Tarama Sonuçları

Hasta-kontrol grupları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Moleküler Genetik bilim dalında protrombin G20210A nükleotit değişimleri açısından taramıştır. Genetik tarama sonuçları EK 3 ' de verilmiştir. Tarama sonuçları Çizelge 3. 1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Hasta-kontrol grubu içinde gen taraması sonuçları

| Genotipler | PT 20210 | | |
|------------|----------|-------|---------|
| | Kontrol | Hasta | MI Olan |
| GG | 120 | 124 | 10 |
| GA | 10 | 4 | 10 |
| AA | 0 | | 0 |

3.3. Oluşturulan Gruplar ve İki Boyutlu Jel Elektroforezi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında karşılaştırma için kontrol ve hasta setleri oluşturulmuştur. Kontrol setine, Protrombin G20210A grubu dahil edilmiştir. Bunlar grup içi, gruplar arası genel protein profili ve gruplar arası abundant protein profili karşılaştırması şeklinde değerlendirilmiştir. Hasta setine Protrombin G20210A mutasyonu olup MI geçiren ve geçirmeyen dahil edilmiştir. Bunlar da grup içi ve gruplar arası abundant proteinler açısından karşılaştırılmıştır. Oluşturulan gruplar Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Oluşturulan kontrol ve hasta setlerindeki deney gruplarını gösteren tablo

| | | |
|--|--|--|
| Kontrol set grubu değerlendirmeleri | Grup içi standardizasyon | Kontrol grup |
| | | Protrombin G20 10A grubu |
| | Gruplar arası abundant proteinlerin değerlendirilmesi | Kontrol grup |
| | | Protrombin G20210A grubu |
| Hasta set grup değerlendirmeleri | Grup içi standardizasyon | Protrombin G20210 ve MI geçiren hasta gr bu |
| | | Protrombin G20210 ve MI geçi meyen hasta grubu |

3.3.1. Kontrol set grubu değerlendirmeleri

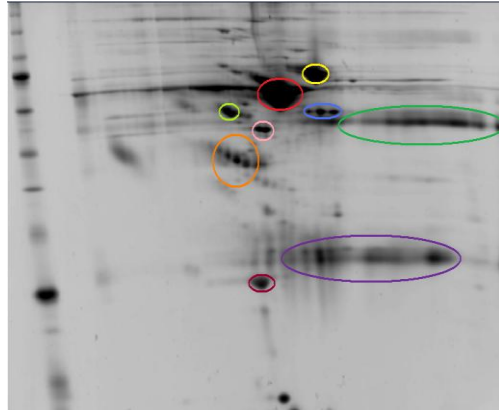
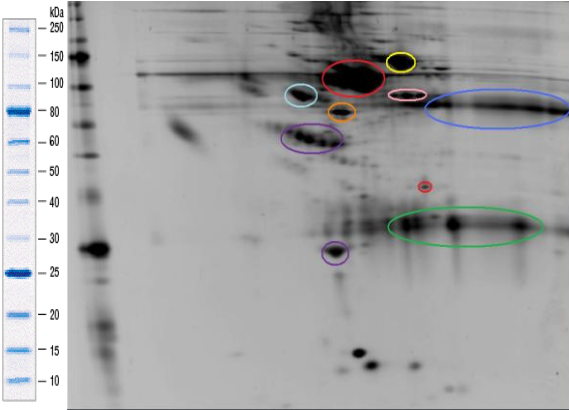
3.3.1.1. Grup içi standardizasyonları

Kontrol grubunun standardizasyonu:

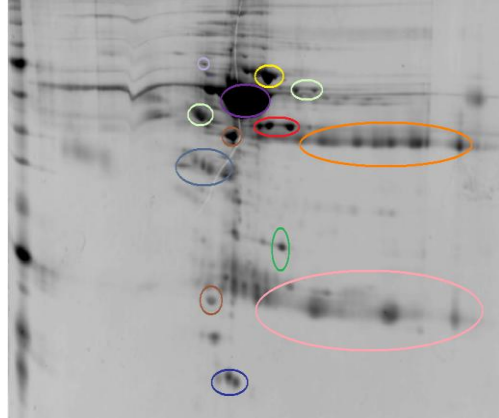
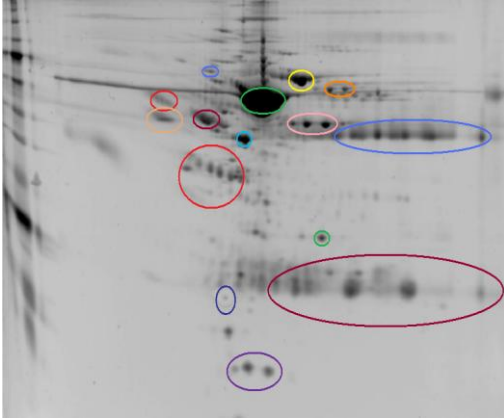
Deney koşulları sabit tutularak, aynı işlemlere maruz bırakılan kontrol örneklerinin tekrarlanabilirlikleri değerlendirilmiş ve kendi içlerinde standardizasyonları sağlanmıştır (Şekil 3.3). Yapılan analizlerde A.K.'de 223 ve 224, K.S.' de 196 ve 216 ve Ö.C.' de 229 ve 252 spot bulunmuştur (teknik replikalı olarak).

Protrombin grubunun standardizasyonu

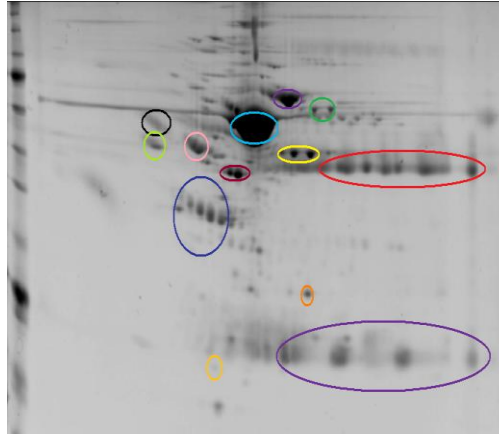
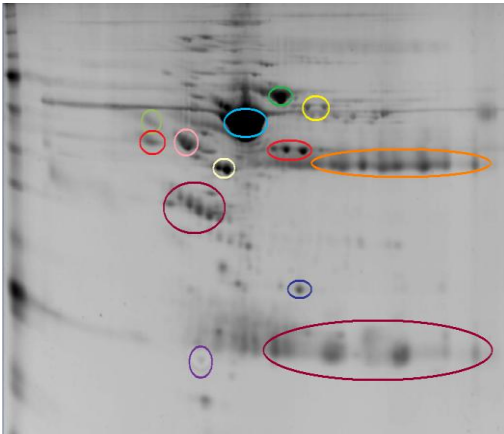
Deney koşulları sabit tutularak, aynı işlemlere maruz bırakılan protrombin örneklerinin tekrarlanabilirliği değerlendirilmiş ve kendi içlerinde standardizasyonları sağlanmıştır (Şekil 3.4). Yapılan analizlerde sıra B.K.'de 225 ve 223, B.G.'de 242 ve 275 ve E.U.'da 217 ve 227 protein spotu bulunmuştur.



A.K.

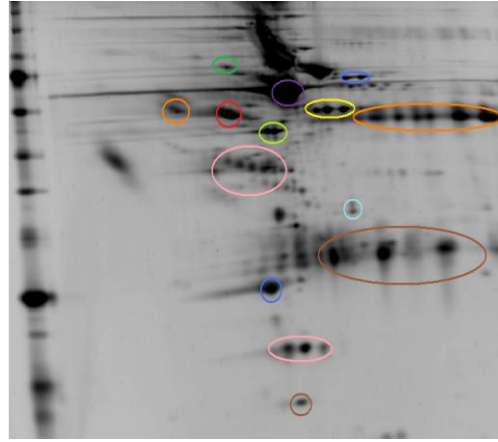
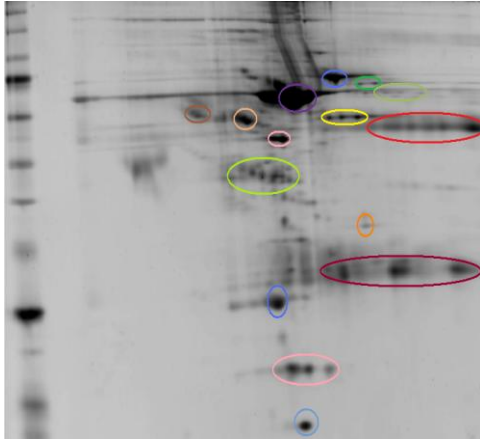
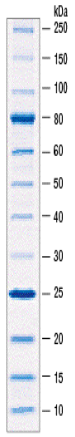


K.S

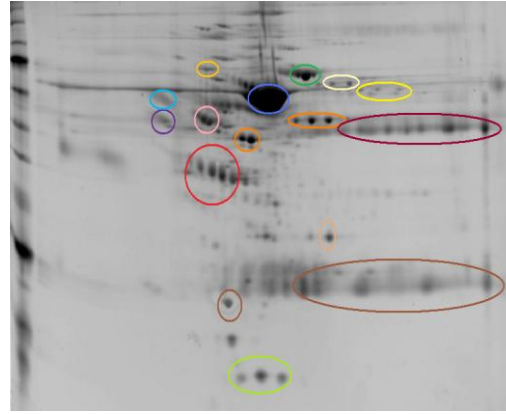
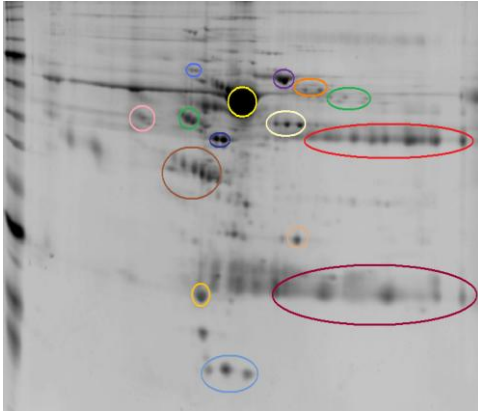


ö.c

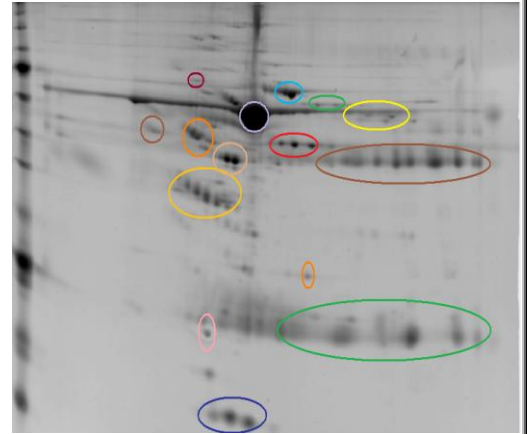
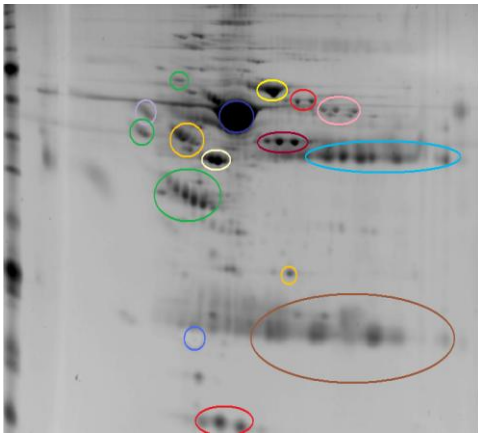
Şekil 3.3. Kontrol grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grup içi standardizasyonun gösterimi (Yanyana olan jeller aynı örneğin teknik replikalarıdır)



B.G



E.U



B.K

Şekil 3.4. Protrombin grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grup içi standardizasyonun gösterimi (Yanyana olan jeller aynı örneğin teknik replikalarıdır)

3.3.1.2. Farklı genotipte gruplar arası genel protein profilinin değerlendirilmesi

Farklı genotip için iki boyutlu jel elektroforezi protein profillerinin PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad) ile karşılaştırmalı analizleri yapıldığında gruplar arası yapılan değerlendirmeler sonucu tespit edilmiş olan proteinler çizelge 3.3' de görünmektedir.

Çizelge 3.3. PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları

| Grup | | Toplam spot sayısı | Master Jele göre eşleşmeler | | |
|------------|------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|-----------|
| | | | Eşleşen spot sayısı | Eşleşmeyen spot sayısı | Eşleşme % |
| Kontrol | 1 (Master) | 216 | 216 | 0 | 100 |
| | 1 (tekrar) | 196 | 168 | 28 | 85 |
| | 2 | 223 | 144 | 79 | 64 |
| | 2 (tekrar) | 224 | 139 | 85 | 62 |
| | 3 | 229 | 187 | 42 | 81 |
| | 3 (tekrar) | 252 | 191 | 61 | 75 |
| Protrombin | 1 | 225 | 147 | 78 | 65 |
| | 1 (tekrar) | 213 | 153 | 50 | 71 |
| | 2 | 242 | 176 | 66 | 72 |
| | 2 (tekrar) | 275 | 200 | 75 | 72 |
| | 3 | 217 | 168 | 49 | 77 |
| | 3 (tekrar) | 227 | 173 | 54 | 76 |

PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları incelendiğinde, gruplar arası belirgin bir fark görülmemektedir (Çizelge 3.3). Kontrol grubu jellerinin eşleşme oranı % 77.8, Protrombin grubunun ise %72.17 olduğu görülmüştür (her gruptaki 6 jelin eşleşme oranlarının ortalaması). Kontrol grubunda master jelin kendi kendine eşleşme oranını göz ardı edersek, gruplar hemen hemen aynı eşleşmeye sahiptirler ve bu anlamda aralarında büyük bir fark yoktur.

3.3.1.3. Farklı genotipte gruplar arası abundant proteinlerin değerlendirilmesi

Jellerin farklı koşullarda yürümesinden, kaymalardan ve bireysel farklılıklardan dolayı PDQuest programının otomatik eşleşme yaptığı spotlar üzerinde anlamlı bir fark bulunmadığından sadece abundant protein spotları üzerinde manüel eşleşme ile değerlendirme yapılmıştır. 20 abundant proteinin (Çizelge 3.4) ifade farklılıkları spot numaralarına göre (SSP) ele alınmıştır.

Çizelge 3.4. 20 abundant protein

| 20 abundant protein | |
|-------------------------|---------------------|
| Albumin | Apolipoprotein A1 |
| IgGs | Apolipoprotein A2 |
| Transferrin | Apolipoprotein B |
| Fibrinogen | Acid-1-Glycoprotein |
| IgAs | Ceruloplasmin |
| α -2-Antitrypsin | Complement C4 |
| IgMs | Complement C1q |
| α -1-Antitrypsin | IgDs |
| Complement C3 | Prealbumin |
| Haptoglobulin | Plasminogen |

PDQuest programı jel görüntüsü alındıktan sonra ve yapılan normalizasyon sonrası aynı MA/pI noktadaki proteinlere aynı spot SSP (Sample Spot Protein) numarasını verilmiştir.

Yapılan ANOVA analizi sonucunda anlamlı farklılık gösteren 8 abundant protein spotu bulunmuştur. Karşılaştırmalı analizlere bakıldığında kontrol ve protrombin grubu arasında 6 spotta anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Farklılık gösteren spotların SSP numaraları, adları, farklılık durumları ve P değerleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Spotların kantitatif değerlerine göre SPSS 9.0 programı ile istatistik analizi ($p < 0.05$ olarak anlamlı farklılık gösterenler koyu olarak belirtilmiştir)

| Spot numarası | Protein adı | Gruplar arası farklılık | P değeri | Uygulanan analiz testi | Analiz sonucu | Ortalama kantitatif değer |
|---------------|------------------------------|--------------------------------|--------------|------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1305 | Haptoglobin ağır | Kontrol& Protrombin | .019 | Tukey | Bireyler arası farklılık var | - |
| 2707 | Protrombin | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 2708 | α -1-b Glikoprotein | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 6606 | Serotr nsferin | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 7608 | komplement c3 | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 7609 | komplement c3 | Kontrol& Pr trombin | 0. 16 | Tukey | anlamlı | 1.86 kat (kon) |
| 7407 | Fibrinojen beta chain | Kontrol& Protrombin | 0.003 | Tukey | anlamlı | 1.09 kat (kon) |
| 6406 | ibrinojen b ta chain | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 6407 | Fibrinojen beta chain | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 2410 | α -1 antitripsin | ok | - | - | Homojen değil | |
| 2411 | α -1 antitripsin | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 1508 | α -1 antitripsin | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 3407 | Fibrinojen gama cha n | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 4306 | Fibrinojen gama chain | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 3007 | Apolipoprotein A | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 7110 | omplement c4 | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 4010 | Haptoglobin hafif | Kontrol& Protrombin | 0.013 | Tukey | anlamlı | 2.29 kat (pro) |
| 5009 | Hap oglobin haf f | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 3009 | Haptoglobin hafif | Kontrol& Protrombin | 0.003 | Tamhane | anlamlı | 5.08 kat (pro) |

Çizelge 3.5. (devam)

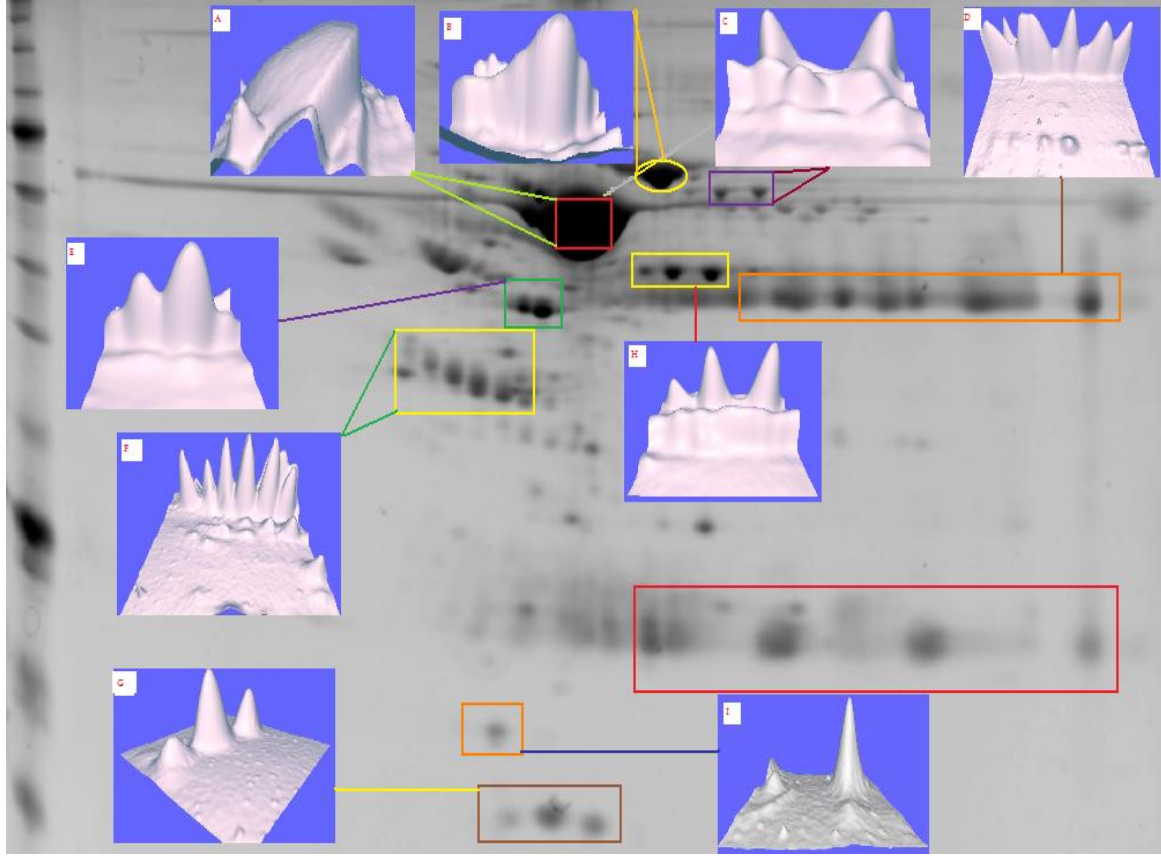
| Spot numarası | Protein adı | Gruplar arası farklılık | P değeri | Uygulanan analiz testi | | |
|---------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------|------------------------|----------------|-----------------------|
| 2308 | Haptogloblin ağır | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 2309 | Haptogloblin ağır | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 3309 | Haptogloblin ağır | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 3311 | Haptogloblin ağır | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 8405 | İmmünoglobulin ağır zincir | Kontrol & protrombin | 0.001 | Tukey | anlamlı | 1.13 kat (pro) |
| 8408 | İmmünoglobulin ağır zincir | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 7006 | İmmünoglobulin afif zincir | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 8008 | İmmünoglobulin hafif zincir | Yok | - | - | Homojen değil | |
| 3010 | prealbumin | Yok | - | - | Homojen değil | |

Kontrol (mutasyon taşımayan) gurubu içinde ağır Haptogloblin'e ait 1305 spot izoformu, grup içi test sonucunda homojen olmadığı için analiz dışı edilmiştir.

7609 spotuna ait komplement C3 protein ifade farklılığı kontrol ve protrombin grubu arasında, 7407 spotuna ait Fibrinojen beta protein ifade farklılığı kontrol-protrombin grubu arasında, 4010 ve 3009 spotlarına ait Haptogloblin protein ifade farklılığı kontrol ve protrombin grubu arasında ve 8405 spotuna ait ağır IgG protein ifade farklılığı ise kontrol & protrombin gruplarında görülmektedir.

Protein profilleri üç boyutlu olarak incelendiğinde abundant proteinlerin ifade farklılıkları daha net görülmektedir. Gruplar arası yapılan değerlendirmeler sonucu Protrombin mutant grupta protein profili incelendiğinde abundant proteinlerin ifadesinin kontrol grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir. Mutant grupta Fibrinojen beta ifadesinde azalma ve Haptogloblin ifadesinde artış görülmektedir. Prealbumin ifadesinde Protrombin mutasyonu taşıyan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark

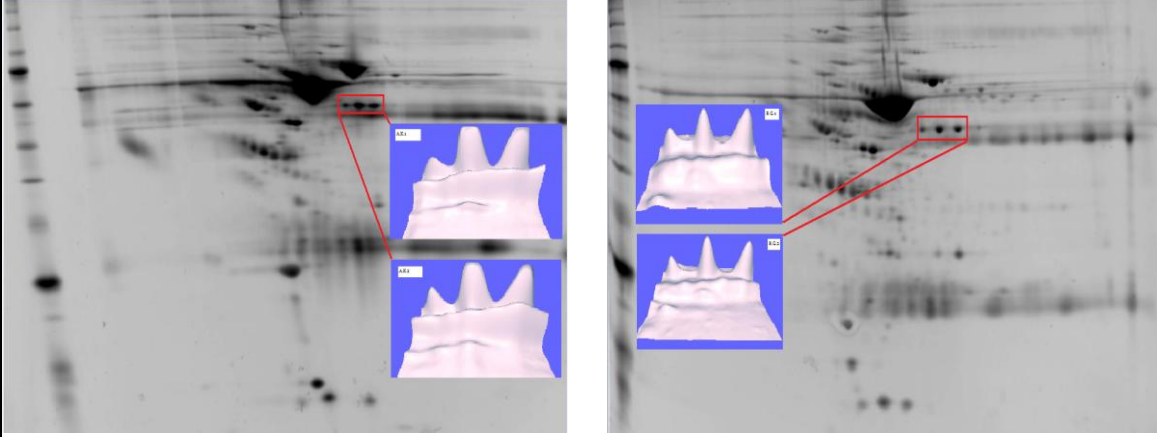
görülmemektedir. Albumin ifadesinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. IgG ağır zincirinin bazı izoformlarında artış görülmektedir. Kontrol ve protrombin gruplarının abundant proteinlerinin üç boyutlu görüntüleri şekil 3.5 da ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 3.5. kontrol grubu 2D jel elektroforezi protein profilinde protein spotlarının 3D gösterimi: (A)Albumin (B)Transferin (C) Complement C (D) IgG ağır (E) Fibrinojen gama (F) Haptoglobin ağır (G) Haptoglobin hafif (H) Fibrinojen beta (I)Apolipoprotein

Gruplar arasında yapılan manüel eşleştirme sonucunda Fibrinojen beta ve Haptoglobin dışındaki protein spotlarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu iki proteinin gruplar arasındaki ifade farklılığı bütün protein izoformlarında görülmektedir. İlgili proteinlerin 2D jel elektroforezi protein profilleri üç boyutlu olarak aşağıda değerlendirilmiştir:

Fibrinojen beta (Kontrol ve protrombin)

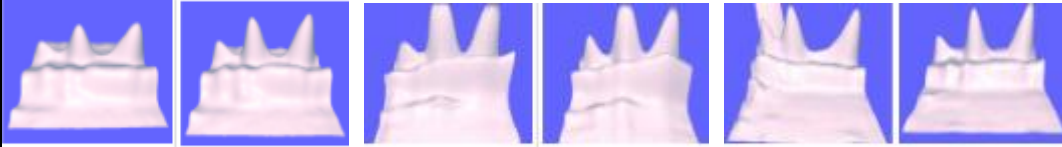


Şekil 3.6. Fibrinojen beta'nın sol tarafta kontrol grubu için (k.s) ve sağ tarafta Protrombin grubu için (b.g) ikili tekrarları ile 3 boyutlu olarak ifadelerinin gösterimi.

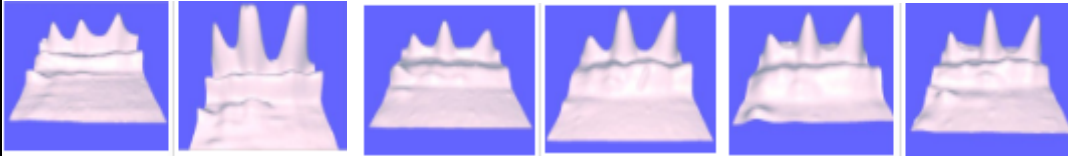
Şekil 3.6'da görüldüğü gibi fibrinojen beta proteininin her üç izoformunun ifadesi Protrombin grubunda kontrol grubuna göre azalmıştır (PDQuest programı, kantitatif analiz).

Gruplar arasındaki Fibrinojen beta spot ekspresyonunun 3 boyutlu görüntüsü 3 örnek tekrarları ile beraber aşağıda görünmektedir:

Kontrol

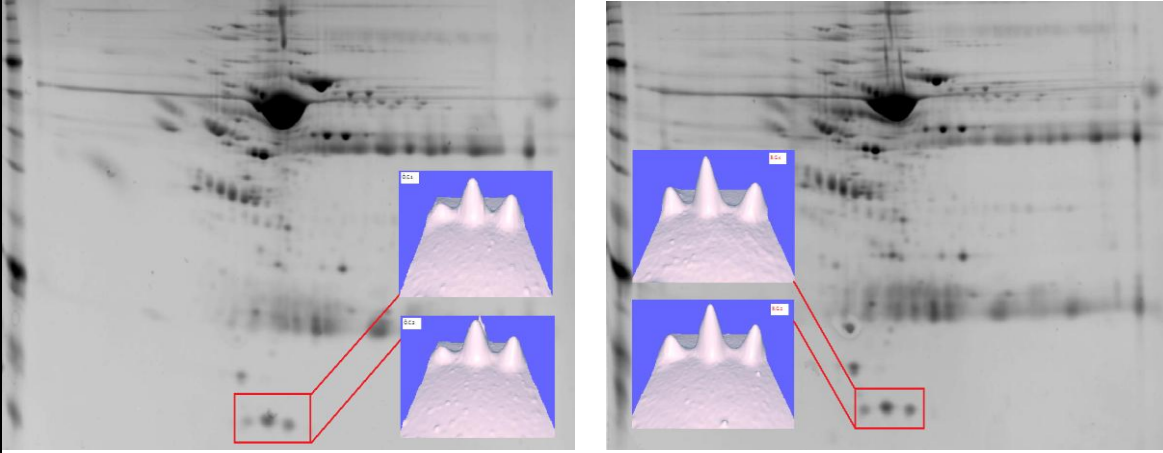


Protrombin



Şekil 3.7. 3 grup arasında Fibrinojen beta ifade farklılıklarının 2Djel elektroforezi protein profilinde 3D gösterimi.

Haptoglobolin (Kontrol ve protrombin)

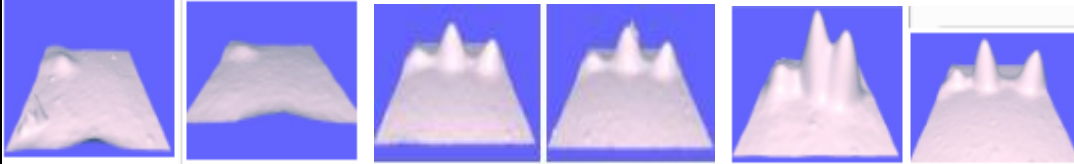


Şekil 3.8. Haptoglobolin'ın sol tarafta kontrol grubu için (ö.c.1,2) ve sağ tarafta protrombin grubu için (e.g.1,2) ikili tekrarları ile 3 boyutlu olarak ifadelerinin gösterimi.

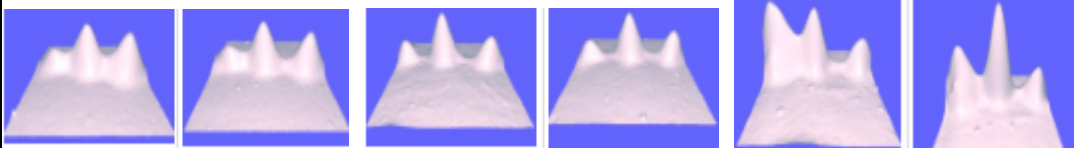
Şekil 3.8'de görüldüğü gibi haptoglobolin proteininin ifadesi Protrombin grubunda, kontrol grubuna göre artmıştır (PDQuest programı, kantitatif analiz).

Gruplar arasındaki haptoglobolin spot ekspresyonunun 3 boyutlu görüntüsü 3 örnek tekrarları ile beraber aşağıda görünmektedir:

Kontrol



Protrombin



Şekil 3.9. 3 grup arasında Hafif haptoglobolin zincirinin ifade farklılıklarının 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D gösterimi

Tüm 2D jel elektroforezi protein profilleri; Albumin, Transferin, Komplemant c3, İmmünoglobulin ağır zincir, c4 komplemant, İmmünoglobulin hafif zincir, Haptoglobolin, Prealbümin, apolipoprotein A, fibrinojen, α -1 antitripsin, α -1 antikimotripsin ve bunlara ek olarak Protrombin izoformları için kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

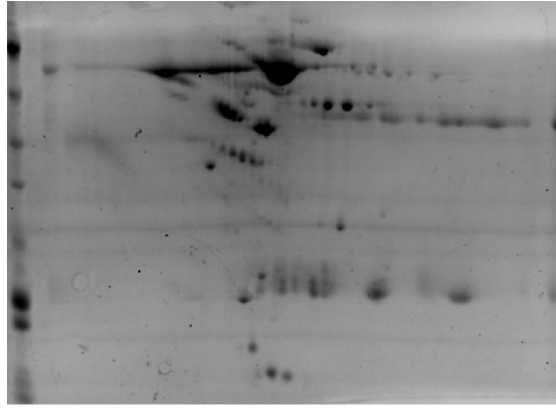
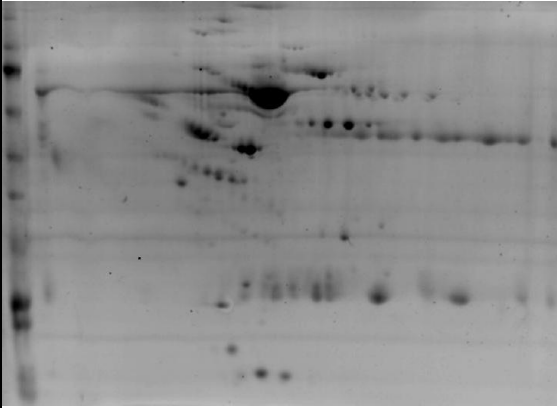
3.3.2. Hasta set grup değerlendirmeleri

3. 3. 2. 1. Grup içi standardizasyonları

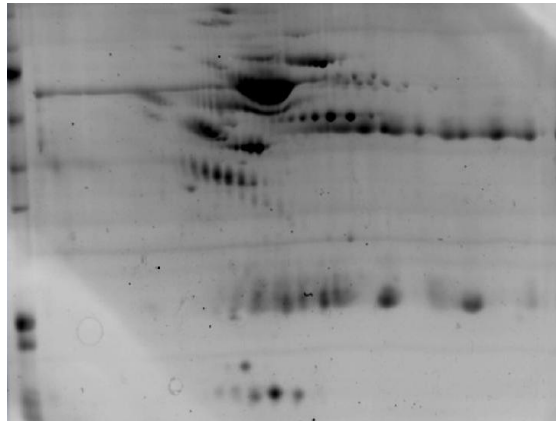
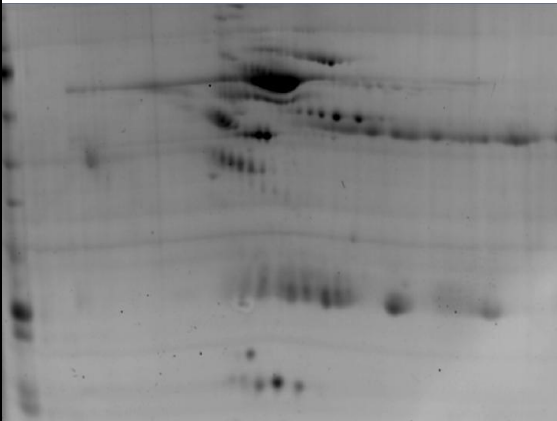
Protrombin G20210 ve MI geçiren hasta grup standardizasyonu:

Deney koşulları sabit tutularak, aynı işlemlere maruz bırakılan MI geçiren olgu örneklerinin tekrarlanabilirlikleri değerlendirilmiş ve kendi içerinde standardizasyonları sağlanmıştır.

H.E



V.K

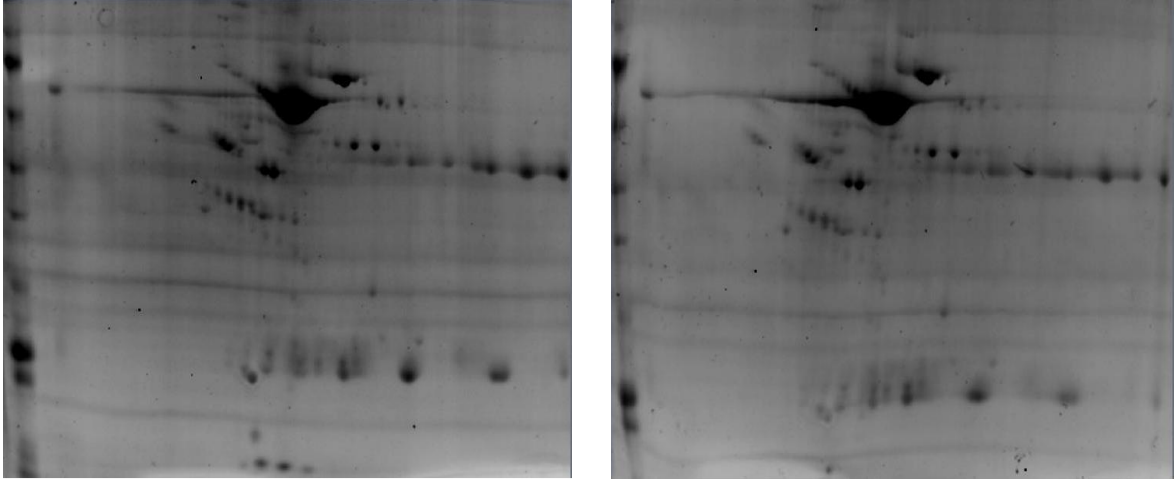


şekil 3.10. MI geçiren hasta grubu plazma örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi profillerinin grup içi standardizasyonun gösterimi (Yanyana olan jeller aynı örneğin teknik replikalarıdır)

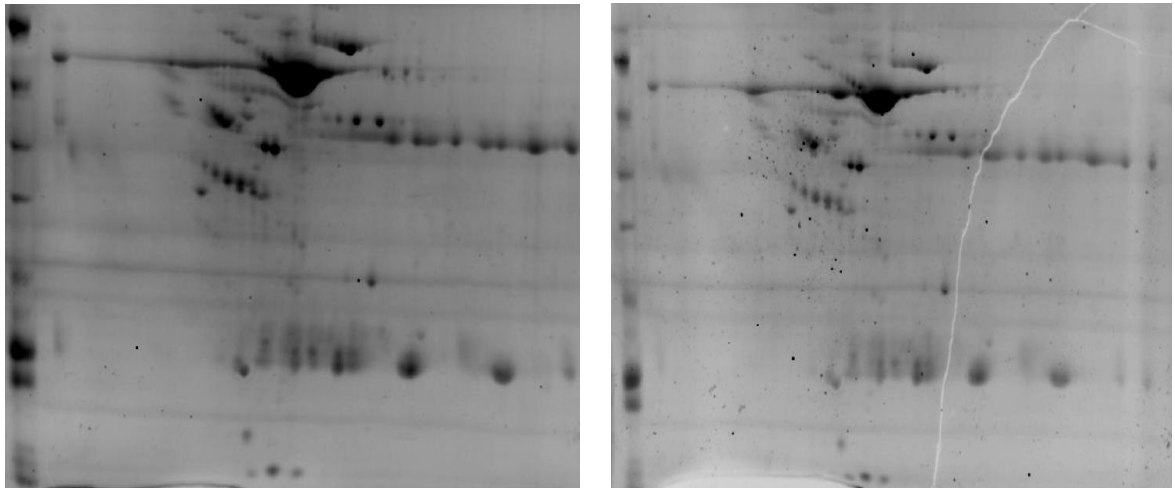
Protrombin G20210 ve MI geçirmeyen hasta grup standardizasyonu:

Deney koşulları sabit tutularak, aynı işlemlere maruz bırakılan MI geçirmeyen olgu örneklerinin 2D jel elektroforezi ile protein profillenmesinin tekrarlanabilirlikleri değerlendirilmiş ve kendi içlerinde standardizasyonları sağlanmıştır.

B.K



S.K



Şekil 3.11. MI geçirmeyen olgu grubunun iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grup içi standardizasyonun gösterimi (Yanyana olan jeller aynı örneğin teknik replikalarıdır)

3.3.2.2. Farklı genotipte gruplar arası abundant proteinlerin değerlendirilmesi

Yapılan ANOVA analizi sonucunda farklı genotipteki hasta grupları arasında anlamlı farklılık gösteren 6 protein spotu bulunmuştur. Karşılaştırmalı analizlere bakıldığında MI geçiren protrombin G20210A taşıyıcı grup ile MI geçirmeyen protrombin G20210A taşıyıcı grup arasında 6 protein spotunda anlamlı ifade farklılığı tespit edilmiştir. Farklılık gösteren spotların SSP numaraları, adları, farklılık durumları ve p değerleri çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Spotların kantitatif değerlerine göre SPSS 9.0 programı ile istatistik analizi

| Spot numarası | Protein adı | Gruplar arası farklılık | P değeri | Uygulanan analiz testi | Analiz sonucu | Ortalama kantitatif değer |
|---------------|---------------------------|--------------------------------|----------|------------------------|---------------|---------------------------|
| 4003 | Retinol binding protein 4 | MI+ ile MI- protrombin G20210A | 0.001 | Tukey | MI+ artmış | 1.684 kat |
| 4404 | Alpha-1-antitrypsin | MI+ ile MI- protrombin G20210A | 0.00 | Tukey | MI+ artmış | 3.494 kat |
| 7503 | Fibrinogen beta chain | MI+ ile MI- protrombin G20210A | 0.00 | Tukey | MI+ artmış | 2.222 kat |
| 8406 | Fibrinogen beta chain | MI+ ile MI- protrombin G20210A | 0.002 | Tukey | MI+ artmış | 2.57 kat |

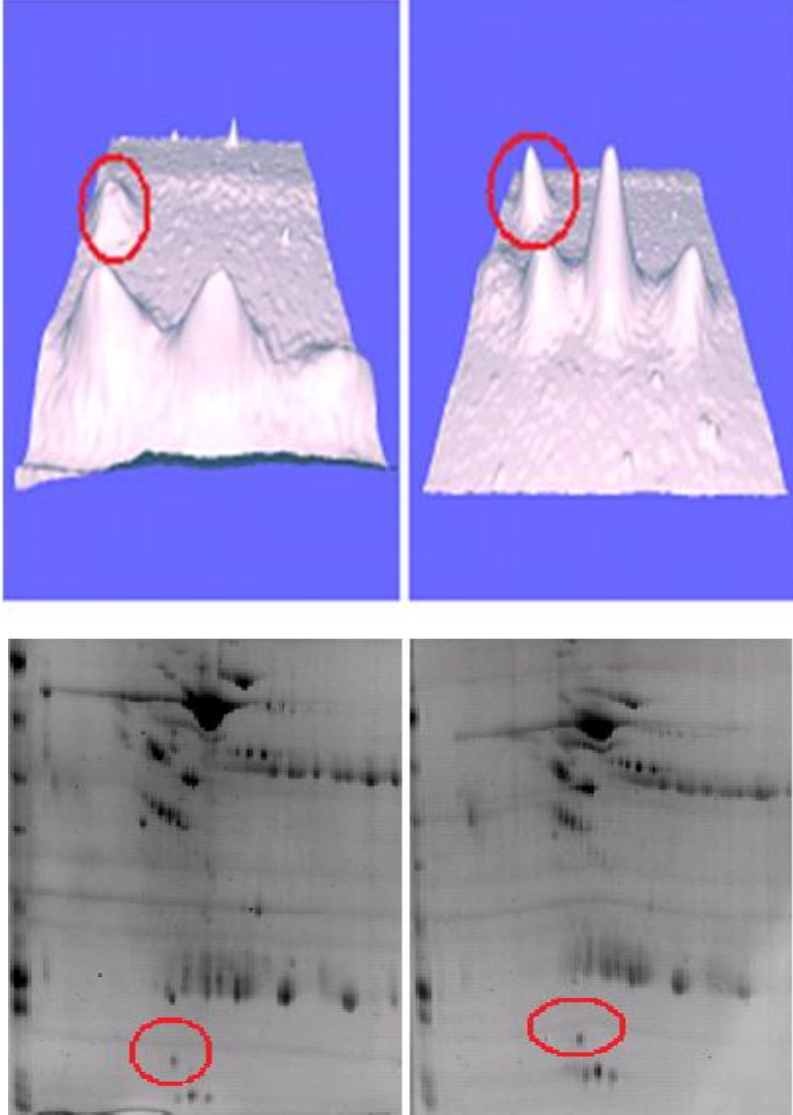
4003 spotuna ait Retinol binding protein 4 protein ifade farklılığı MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile MI geçirmeyen protrombin gen değişimi olan hasta grubu arasında, 4404 spotuna ait Alpha-1-antitrypsin protein ifade farklılığı MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile MI geçirmeyen protrombin gen değişimi olan hasta grubu arasında, 7503 ve 8406 spotuna ait Fibrinogen beta chain protein ifade farklılığı MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile MI geçirmeyen protrombin gen değişimi olan hasta grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

Gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren ve farklılık göstermeyen (standardizasyonu göstermek için) bazı proteinlerin jeller üzerindeki konumları ve 3 boyutlu gösterimleri aşağıda verilmiştir:

Retinol binding protein 4

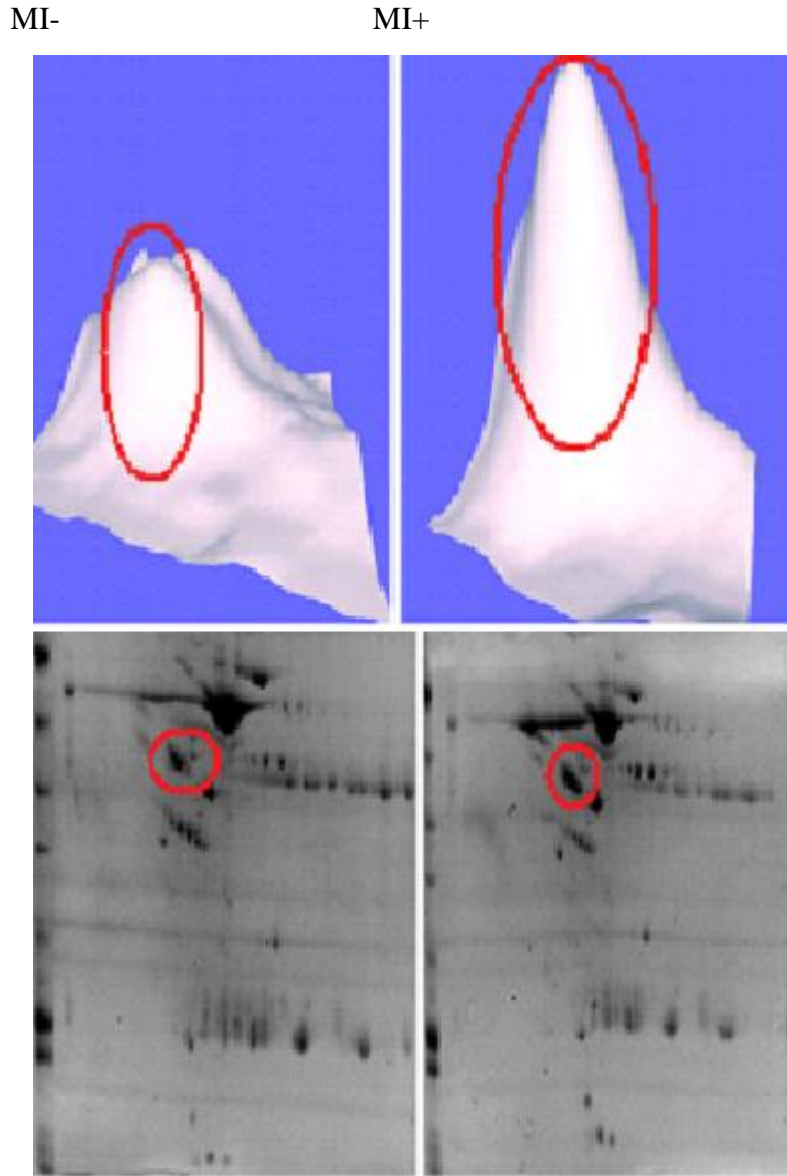
MI -

MI+



3.12. Retinol binding protein 4 protein spotunun 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D protein gösterimi

Alpha-1-antitrypsin

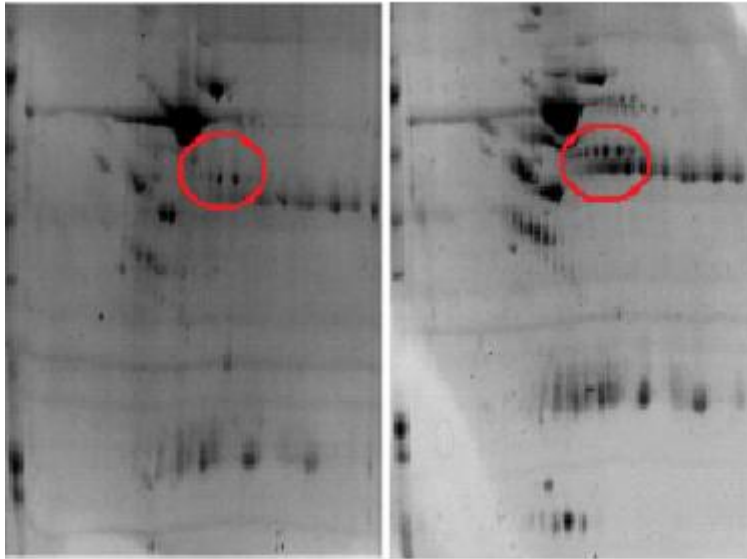
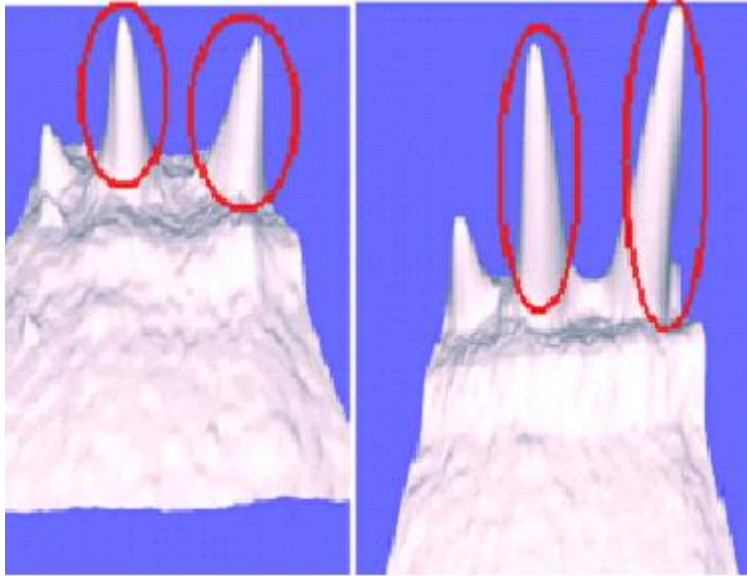


Şekil 3.13. Alpha-1-antitrypsin protein spotunun 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D protein gösterimi

Fibrinogen beta chain

MI-

MI+

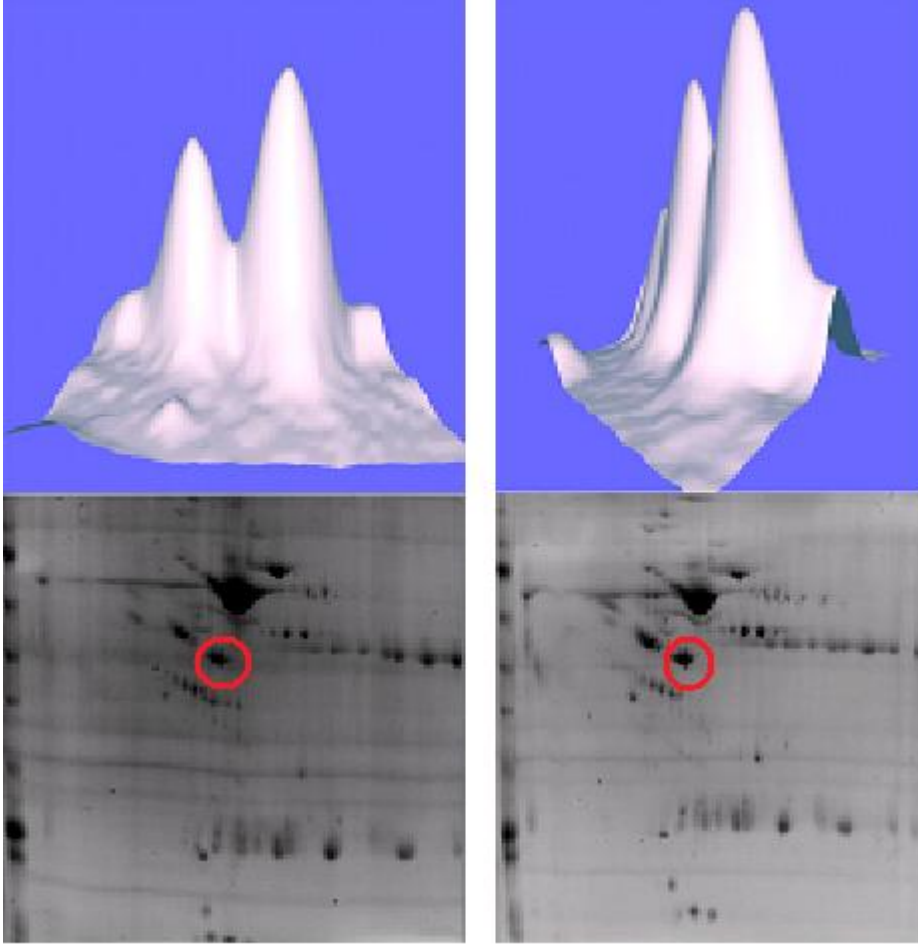


3.14. Fibrinogen beta chain spotunun 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D protein ifade gösterimi

Fibrinojen gama

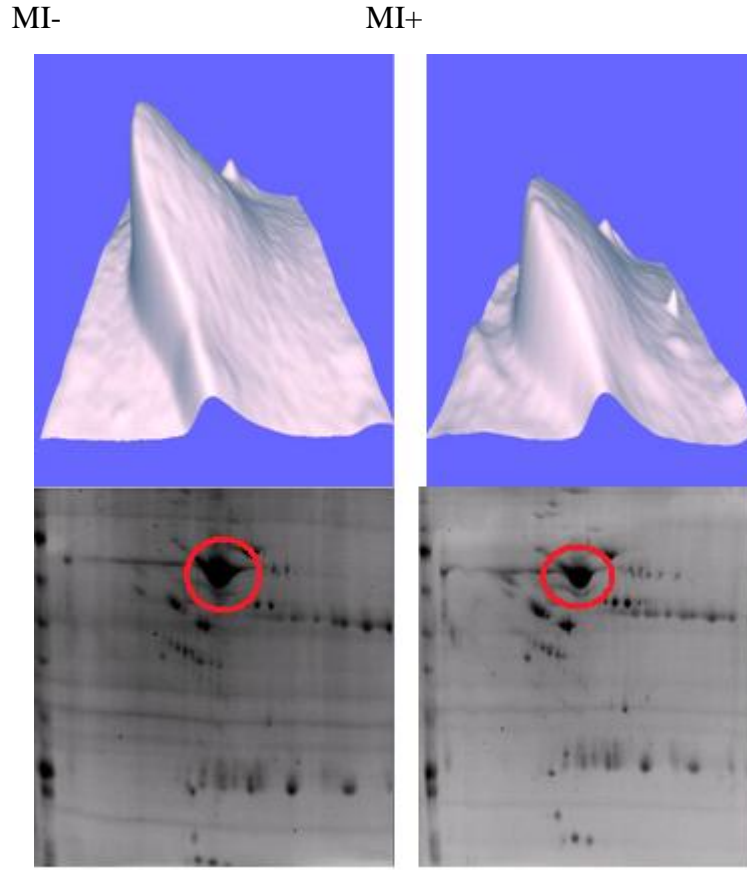
MI-

MI+



Şekil 3.15. Fibrinojen gama spotunun 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D protein ifade gösterimi

Albumin



Şekil 3.16. Albumin spotunun 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D protein ifade gösterimi

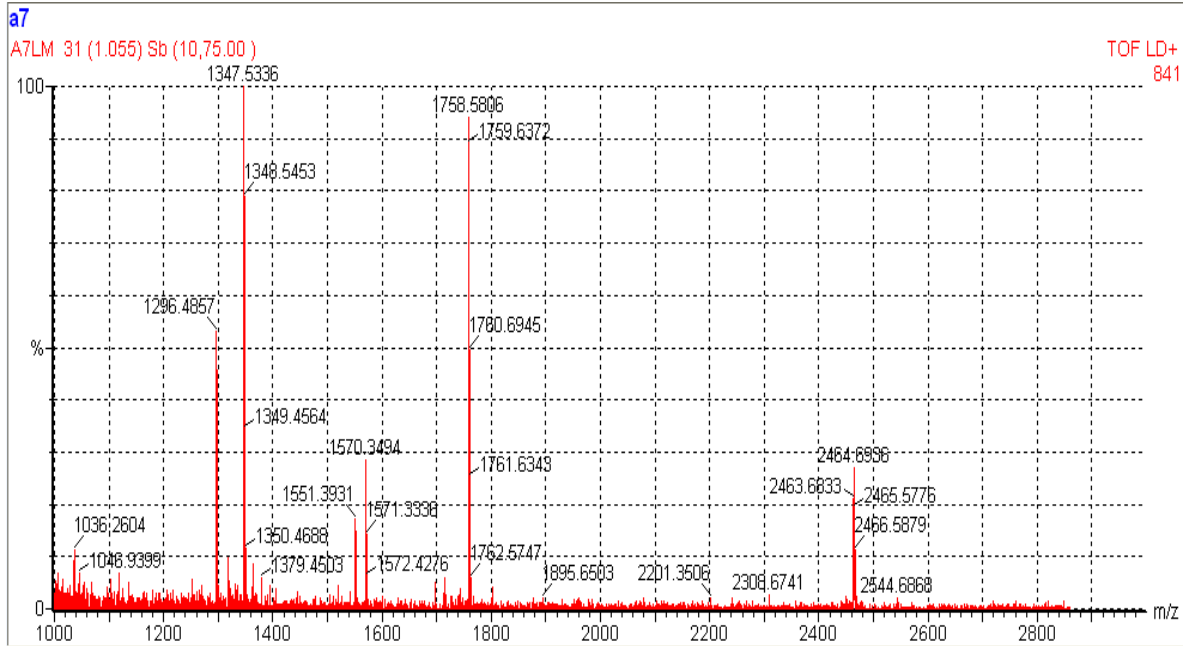
3.4. Protein Tanımlanması

3.4.1. MALDI-TOF kütle spektrometresinin m/z kalibrasyonunun yapılması

MALDI plakalarının Lock Mass kuyucuklarına spotlanan ve cihazın kütle kalibrasyonunun yapılmasında, peptid tanımlanması ile protein kimliklendirmesi (peptide mass finger printing, PMF) için doğrulamada kullanılan, kütleleri bilinen 5 adet peptid karışımı ile elde edilmiş olan spektra Şekil 3.17’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.7. 5 peptid karışımı ile elde edilmiş spektra

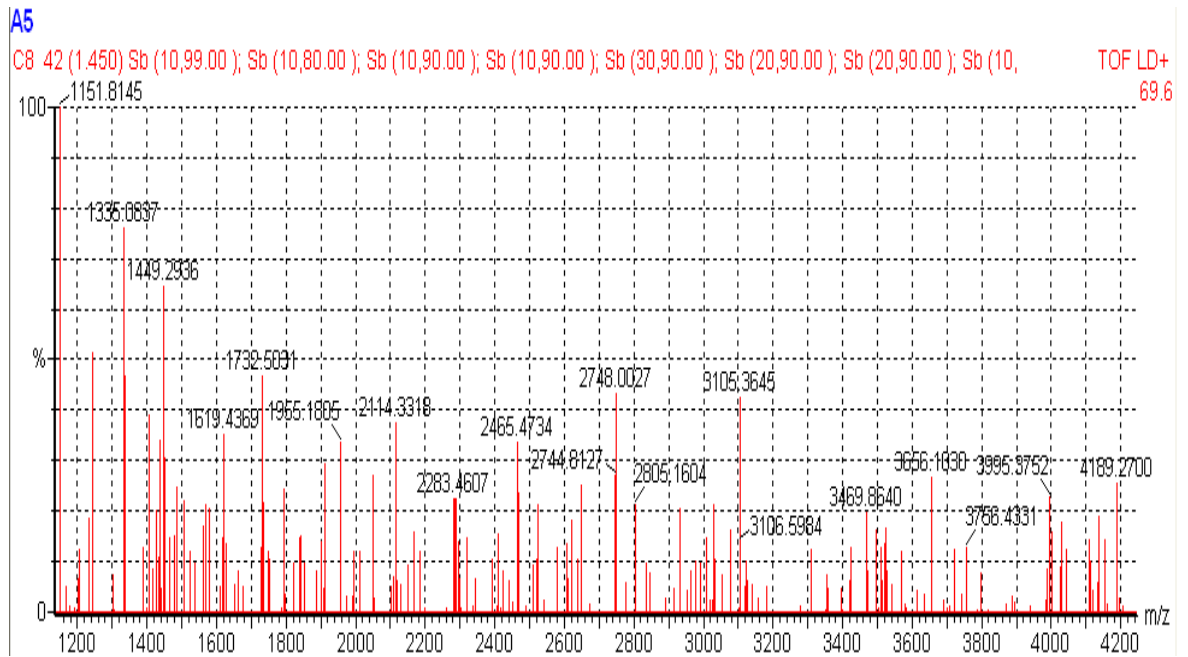
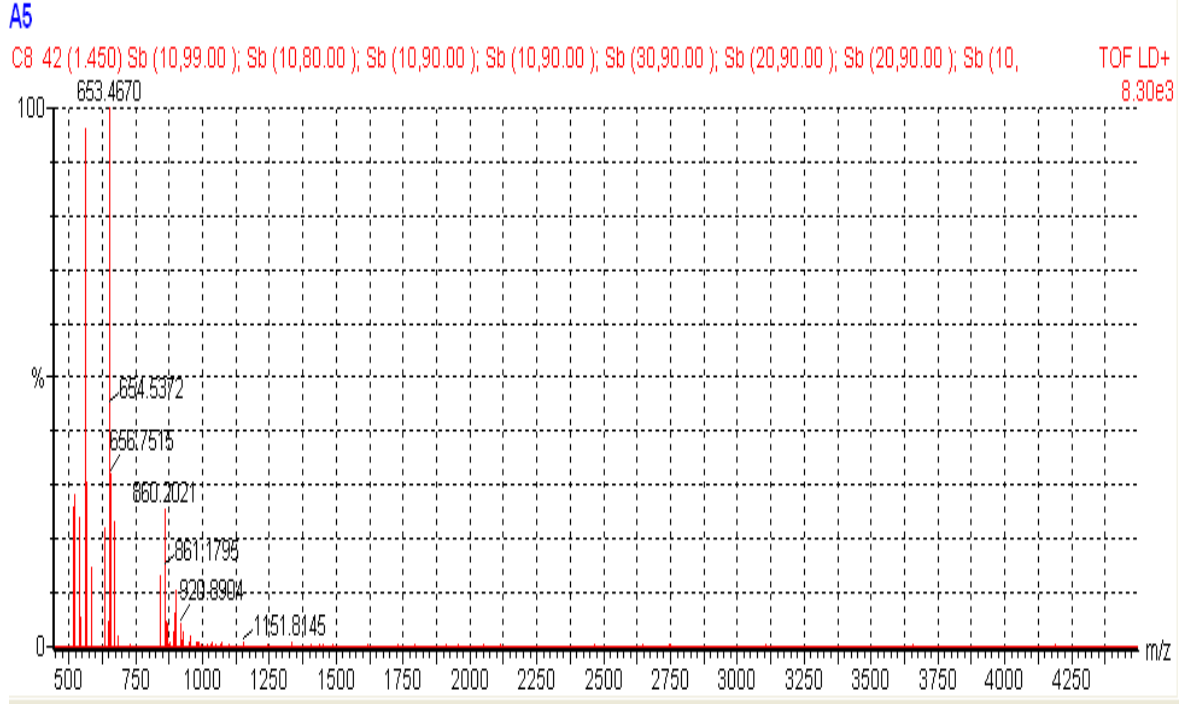
| 5 PEPTİT KARIŞIMI | KÜTLE-Da |
|-------------------|-----------|
| ANGİOTENSİN | 1296,6853 |
| SUBSTANCEP | 1347,7360 |
| Glu Fib | 1570,6774 |
| Renin-14 | 1758,9326 |
| ACTH-18,39 | 2465,1989 |



Şekil 3.17. Maldi –TOF kütle spektrometresinde kullanılan kalibrasyon peptidlerine ait spektrum

3.4.2. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin spektrumları ve veri tabanından alınmış peptit kütleleri

Fibrinojen beta



Şekil 3.18. Fibrinojen beta peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Çizelge 3.8. Fibrinojen beta için listelenmiş olan peptid dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

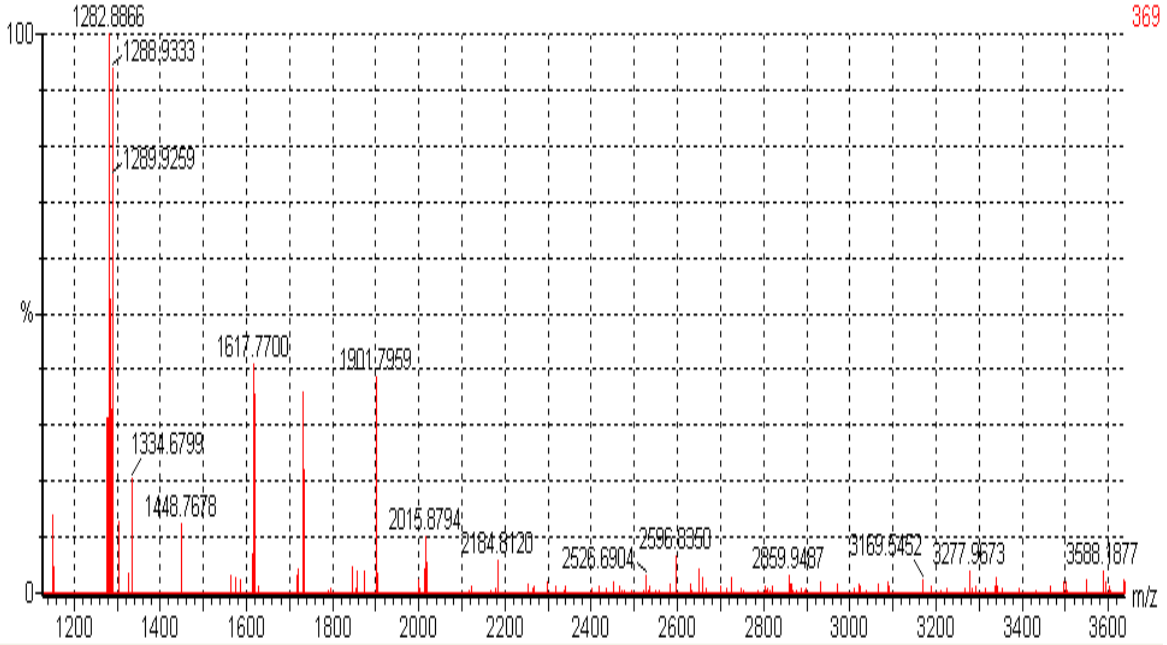
| mass | position | #MC | url(modifications) | modifications | peptide sequence |
|------------------|--------------|----------|-----------------------|---------------|--------------------------------------|
| 3784.8567 | 89-124 | 0 | Cys_CAM: 95, 106, 110 | 3955.9211 | APDAGGCLHADPDLGVLCPT GCQLQEALLQQRPIR |
| 3167.4837 | 125-152 | 0 | | | NSVDELNNVEAVSQTSSSS FQYMYLLK |
| 2257.0805 | 248-267 | 0 | | | GGETSEMYLIQPDSSVKPYR |
| 2127.0829 | 179-196 | 0 | | | HQLYIDETVNSNIPTNLR |
| 2099.9273 | 268-285 | 0 | Cys_CAM: 270 | 2156.9488 | VYCDMNTENGGWTVIQNR |
| 1951.0031 | 54-72 | 0 | | | EEAPSLRPAPPPISGGGYR |
| 1892.8589 | 377-395 | 0 | | | GTAGNALMDGASQLMGENR |
| 1820.8094 | 396-410 | 0 | | | TMTIHNGMFFSTYDR |
| 1768.7871 | 164-178 | 0 | | | DNENVVNEYSSELEK |
| 1728.7686 | 314-328 | 0 | Cys_CAM: 316 | 1785.7901 | NYCGLPGEYWLGN DK |
| 1691.8019 | 335-348 | 0 | | | MGPTELLIEMEDWK |
| 1668.7151 | 446-458 | 0 | | | YYWGGQYTWDMAK |
| 1544.6950 | 459-471 | 0 | | | HGTDDGVVWMNWK |
| 1535.7237 | 354-367 | 0 | | | AHYGGFTVQNEANK |
| 1530.6563 | 212-224 | 0 | Cys_CAM: 223 | 1587.6777 | LESDVSAQMEYCR |
| 1504.7498 | 225-239 | 0 | Cys_CAM: 227, 231 | 1618.7927 | TPCTVSCNIPVSGK |
| 1308.6178 | 301-313 | 0 | | | QGFGNVATNTDGK |
| 1275.5600 | 411-421 | 0 | | | DNDGWLTSDPR |
| 1239.5177 | 427-436 | 0 | | | EDGGGWYNR |
| 1032.5625 | 484-491 | 0 | | | IRPFFPQQ |
| 980.4432 | 286-294 | 0 | | | QDGSVDFGR |
| 939.4213 | 437-445 | 0 | Cys_CAM: 437 | 996.4428 | CHAANPNGR |
| 891.4240 | 240-246 | 0 | Cys_CAM: 241 | 948.4455 | ECEEIIR |
| 886.3876 | 472-478 | 0 | | | GSWYSMR |
| 851.4621 | 368-374 | 0 | | | YQISV NK |
| 844.4887 | 200-206 | 0 | | | SILENLR |
| 822.4580 | 45-51 | 0 | | | GHRPLDK |
| 717.4253 | 329-334 | 0 | | | ISQLTR |
| 708.3351 | 296-300 | 0 | | | WDPYK |
| 689.3617 | 153-157 | 0 | | | DLWQK |
| 589.3304 | 78-83 | 0 | | | AAATQK |
| 542.3409 | 73-77 | 0 | | | ARPAK |
| 1569.6928 | 31-44 | 0 | | | QGVNDNEEGFFSAR |

Haptoglobin

A5

B9 87 (3.085) Sb (10,99.00); Sb (10,75.00); Cm ((5+8.9+25.26+37.44+65.66+85.87))

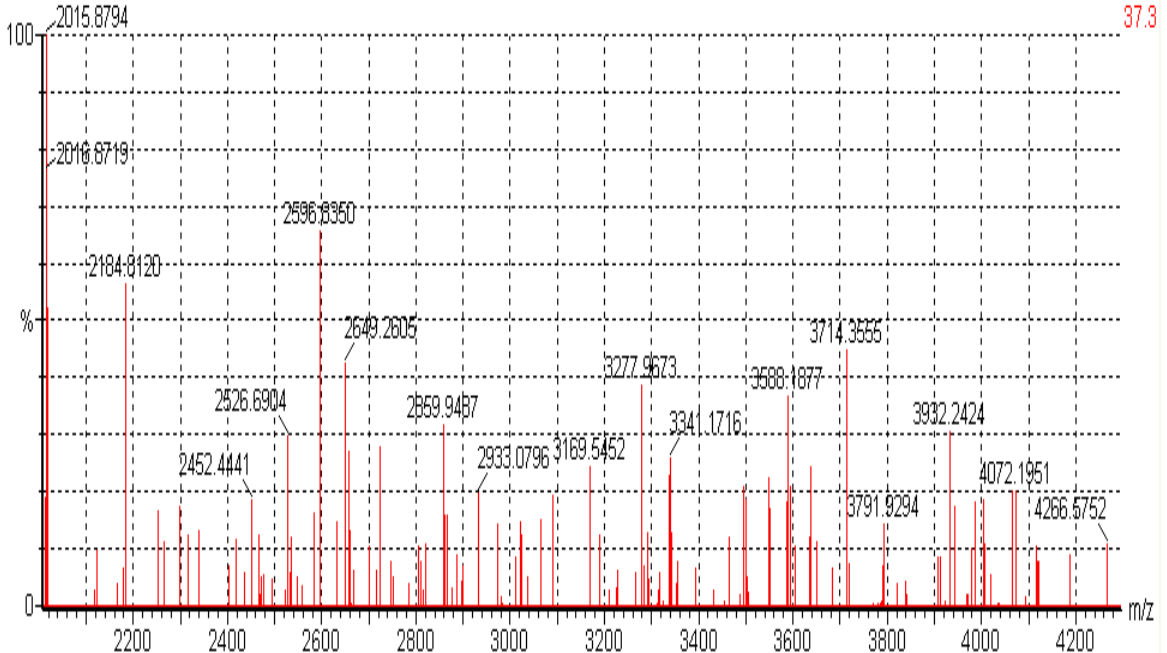
TOF LD+
369



A5

B9 87 (3.085) Sb (10,99.00); Sb (10,75.00); Cm ((5+8.9+25.26+37.44+65.66+85.87))

TOF LD+
37.3

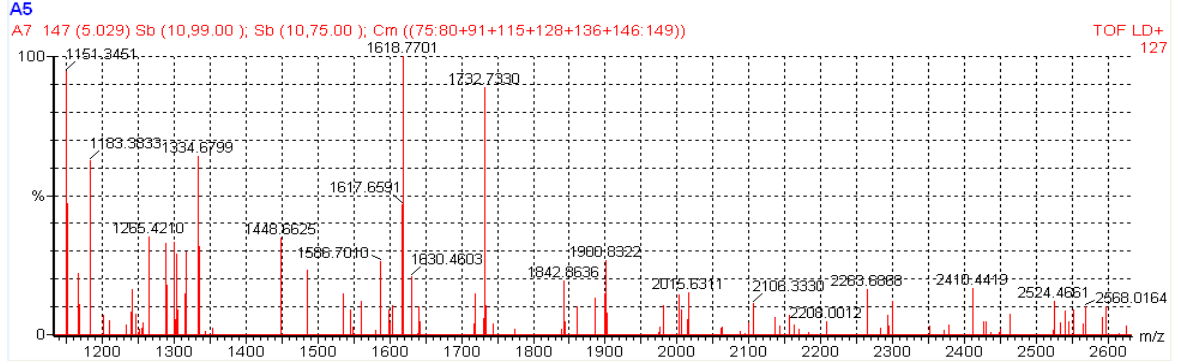


Şekil 3.19. Haptoglobin peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Çizelge 3.9. Haptoglobin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

| mass | position | #MC | arif.modification(s) | modifications | peptide sequence |
|-----------|----------|-----|----------------------|---------------|-------------------------------------|
| 3817.6486 | 346-379 | 0 | Cys_CAM: 351 | 3874.6700 | YQEDTCYGDAGSAFAVHDLE EDTWYATGILSFDK |
| 3292.5174 | 19-49 | 0 | Cys_CAM: 33 | 3349.5389 | VDSGNDVTDIADDGCPKPPE IAHGVEHSVR |
| 2848.3028 | 83-108 | 0 | Cys_CAM: 86, 92 | 2962.3457 | LPECEADDGCPKPPEIAHGY VEHSVR |
| 2679.3923 | 179-202 | 0 | | | MVSHHNLTTGATLINEQWLL TTAK |
| 2115.0361 | 326-345 | 0 | Cys_CAM: 340 | 2172.0576 | SPVGVQPILNEHTFCAGMSK |
| 1795.0112 | 236-251 | 0 | | | VVLHPNYSQVDIGLIK |
| 1650.7978 | 298-311 | 0 | Cys_CAM: 309 | 1707.8193 | YVMLPVADQDQCIR |
| 1458.7335 | 203-215 | 0 | | | NLFLNHSENATAK |
| 1439.6648 | 119-131 | 0 | | | TEGDGVYTLNNEK |
| 1311.6063 | 60-71 | 0 | | | TEGDGVYTLNDK |
| 1290.7303 | 216-227 | 0 | | | DIAPTLTLYVGK |
| 1288.6242 | 380-391 | 0 | Cys_CAM: 381 | 1345.6456 | SCAVAEYGVYVK |
| 1273.6279 | 142-153 | 0 | Cys_CAM: 145, 149 | 1387.6708 | LPECEAVCGKPK |
| 1203.6368 | 392-401 | 0 | | | VTSIQDWVQK |
| 1146.5425 | 312-321 | 0 | | | HYEGSTVPEK |
| 987.5365 | 262-270 | 0 | Cys_CAM: 266 | 1044.5580 | VMPICLPSK |
| 980.4948 | 278-286 | 0 | | | VGIVSGWGR |
| 923.5308 | 162-170 | 0 | | | ILGGHLDK |
| 920.4624 | 171-178 | 0 | | | GSFPWQAK |
| 895.4744 | 154-161 | 0 | | | NPANPVQR |
| 858.4931 | 229-235 | 0 | | | QLVEIEK |
| 809.3788 | 271-277 | 0 | | | DYAEVGR |
| 760.3988 | 292-297 | 0 | | | FTDHLK |
| 703.3733 | 256-261 | 0 | | | VSVNER |
| 688.3777 | 73-77 | 0 | | | QWINK |
| 688.3777 | 132-136 | 0 | | | QWINK |
| 593.3042 | 287-291 | 0 | | | NANFK |
| 587.2824 | 54-57 | 0 | | | NYYK |
| 587.2824 | 113-116 | 0 | | | NYYK |
| 547.2722 | 402-406 | 0 | | | TIAEN |
| 541.2439 | 50-53 | 0 | Cys_CAM: 52 | 598.2653 | YQCK |
| 541.2439 | 109-112 | 0 | Cys_CAM: 111 | 598.2653 | YQCK |
| 3292.5174 | 19-49 | 0 | Cys_CAM: 33 | 3349.5389 | VDSGNDVTDIADDGCPKPPE IAHGVEHSVR |
| 2848.3028 | 83-108 | 0 | Cys_CAM: 86, 92 | 2962.3457 | LPECEADDGCPKPPEIAHGY VEHSVR |
| 1439.6648 | 119-131 | 0 | | | TEGDGVYTLNNEK |
| 1311.6063 | 60-71 | 0 | | | TEGDGVYTLNDK |
| 1273.6279 | 142-153 | 0 | Cys_CAM: 145, 149 | 1387.6708 | LPECEAVCGKPK |
| 739.3733 | 154-160 | 0 | | | NPANPVQ |
| 688.3777 | 73-77 | 0 | | | QWINK |
| 688.3777 | 132-136 | 0 | | | QWINK |
| 587.2824 | 54-57 | 0 | | | NYYK |
| 587.2824 | 113-116 | 0 | | | NYYK |
| 541.2439 | 50-53 | 0 | Cys_CAM: 52 | 598.2653 | YQCK |
| 541.2439 | 109-112 | 0 | Cys_CAM: 111 | 598.2653 | YQCK |

Fibrinojen gama

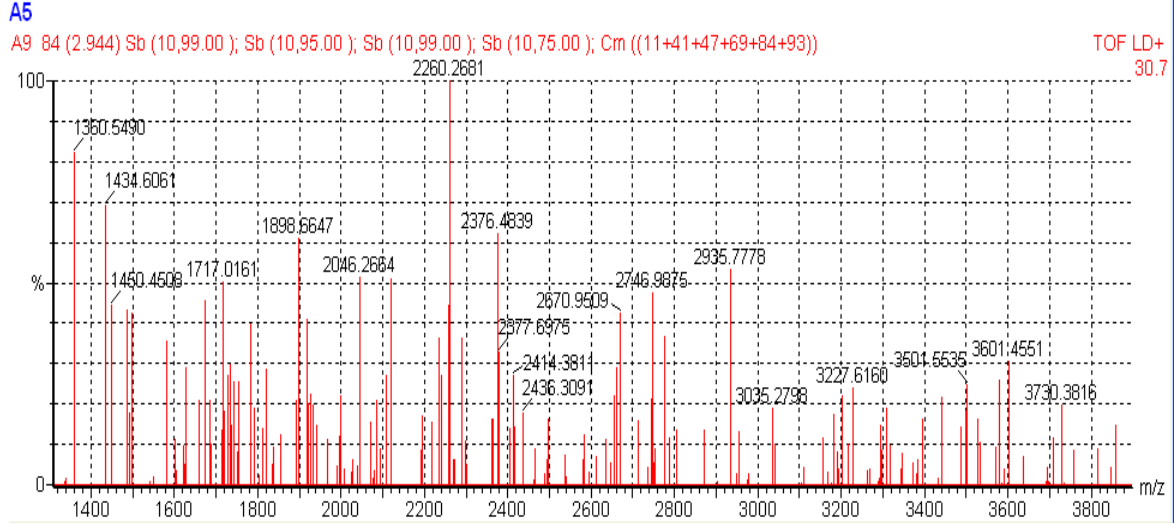


Şekil 3.20. Fibrinojen gama peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Çizelge 3.10. Fibrinojen gama için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

| mass | position | #MC | acil-modifikasyon | modifikasyon | peptide sequence |
|-----------|----------|-----|-------------------|--------------------------|------------------------------|
| 2834.1739 | 302-328 | 0 | | | LTYAYFAGGDAGDAFDGDFD GDDPSDK |
| 2604.2187 | 200-222 | 0 | Cys_CAM: 208 | 2661.2402 | ANQQFLVYCEIDGSGNGWTV FQK |
| 2520.2650 | 89-111 | 0 | | | AIQLTYNPDESSKPNMIDAA TLK |
| 2503.1259 | 433-453 | 0 | | SULF: 444, 448 2663.0395 | QVRPEHPAETEYDSLYPEDD L |
| 2303.0359 | 41-61 | 0 | Cys_CAM: 45, 49 | 2417.0788 | FGSYCPTTCGIADFLSTYQT K |
| 2290.9458 | 329-347 | 0 | | | FFTSHNGMQFSTWDNDNDK |
| 2207.0403 | 239-258 | 0 | | | EGFGHLSPTGTTEFWLGNEK |
| 1958.7796 | 348-364 | 0 | Cys_CAM: 352 | 2015.8010 | FEGNCAEQDGSWWWMNK |
| 1954.8864 | 365-382 | 0 | Cys_CAM: 365 | 2011.9079 | CHAGHLNGVYYQGGTYSK |
| 1893.9129 | 383-399 | 0 | | | ASTPNGYDNGIHWATWK |
| 1780.9075 | 65-79 | 0 | | | DLQSLEDILHQVENK |
| 1682.9588 | 259-273 | 0 | | | IHLISTQSAIPYALR |
| 1545.8132 | 418-432 | 0 | | | LTIGEGQQHHLGGAK |
| 1513.7281 | 135-146 | 0 | | | YLQEIYNSNNQK |
| 1491.7438 | 122-134 | 0 | | | YEASILTHDSSIR |
| 1446.6715 | 154-166 | 0 | Cys_CAM: 161, 165 | 1560.7145 | VAQLEAQCQEPCK |
| 1293.7565 | 189-199 | 0 | | | QSGLYFIKPLK |
| 1226.6375 | 167-177 | 0 | | | DTVQIHDITGK |
| 1134.5136 | 283-292 | 0 | | | TSTADYAMFK |
| 1117.5272 | 274-282 | 0 | | | VELEDWNGR |
| 1080.4448 | 32-40 | 0 | Cys_CAM: 34, 35 | 1194.4878 | DNCCILDER |
| 906.3985 | 178-185 | 0 | Cys_CAM: 179 | 963.4200 | DCQDIANK |
| 893.4471 | 115-121 | 0 | | | MLEEIMK |
| 880.4410 | 224-231 | 0 | | | LDGSVDFK |
| 851.4410 | 233-238 | 0 | | | NWIQYK |
| 759.4512 | 412-417 | 0 | | | IIPFNR |
| 715.3621 | 293-299 | 0 | | | VGPEADK |
| 714.3279 | 402-406 | 0 | | | WYSMK |
| 609.3355 | 27-31 | 0 | | | YVATR |
| 586.3922 | 147-151 | 0 | | | IVNLK |
| 563.3035 | 80-84 | 0 | | | TSEVK |
| 501.3395 | 85-88 | 0 | | | QLIK |

Alpha-1 antitripsin

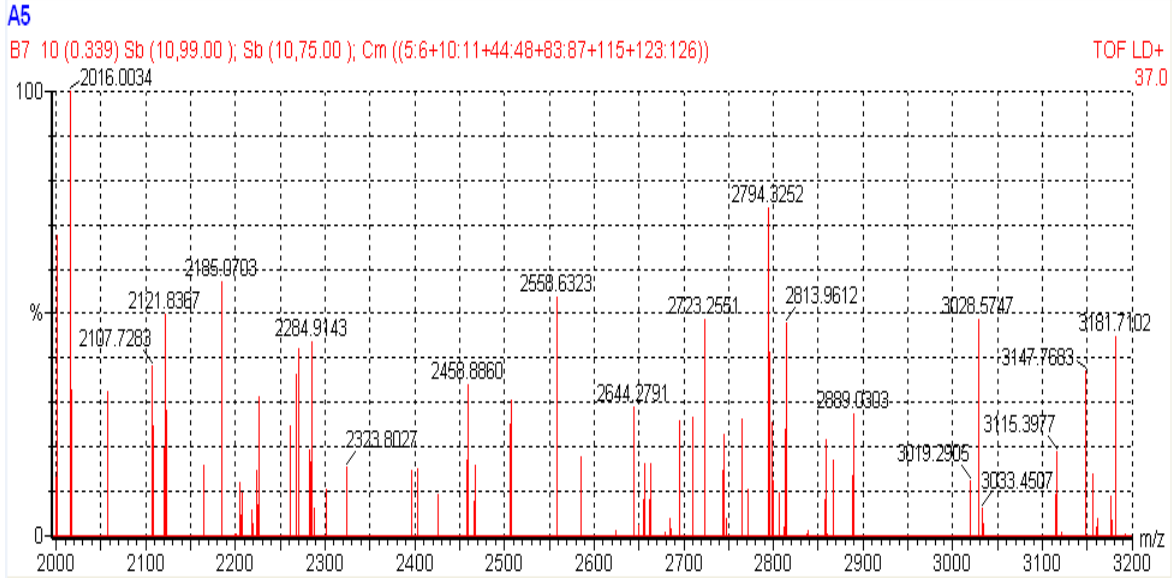


Şekil 3.21. α -1 antitripsin peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Çizelge 3.11. α -1 antitripsin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

| mass | position | #MC | artf.modifications | modifications | peptide sequence |
|-----------|----------|-----|------------------------|---------------|-------------------------------------|
| 3691.8238 | 94-125 | 0 | | | ADTHDEILEGLNFNLTPEIPE AQIHGEGFQELLR |
| 3181.6350 | 64-93 | 0 | | | QLAHQSNSTNIFFSPVSIAT AFAMLSLGTK |
| 2574.3409 | 126-149 | 0 | | | TLNQPDSQLQLTTGNGLFLS EGLK |
| 2259.1399 | 368-389 | 0 | | | GTEAAGAMFLEAIPMSIPPE VK |
| 2057.9450 | 161-178 | 0 | | | LYHSEAFVNFVGDTEEAKE |
| 1891.8555 | 226-241 | 0 | | | DTEEDFDHVDQVTTVK |
| 1855.9775 | 390-404 | 0 | | | FNKPFVFLMIEQNTK |
| 1833.9228 | 335-352 | 0 | | | VFSNGADLSGVTEEAPELK |
| 1803.9599 | 284-298 | 0 | | | LQHLENELTHDITK |
| 1779.7681 | 35-49 | 0 | | | TDTSHHDQDHPTFNK |
| 1755.8952 | 268-283 | 0 | | | YLGNATAIFFLPDEGK |
| 1641.8635 | 50-63 | 0 | | | ITPNLAFAFSLYR |
| 1576.8409 | 203-215 | 0 | | | DTVFAVNYIFFK |
| 1190.5809 | 248-257 | 0 | Cys_CAM: 256 1247.6023 | | LGMFNIQHCK |
| 1110.6041 | 315-324 | 0 | | | LSITGTYDLK |
| 1090.5680 | 218-225 | 0 | | | WERPFVVK |
| 1076.6172 | 259-267 | 0 | | | LSSWVLLMK |
| 1855.9775 | 390-404 | 0 | | | FNKPFVFLMIEQNTK |
| 1701.8954 | 375-389 | 0 | | | MFLEAIPMSIPPEVK |
| 785.4516 | 412-418 | 0 | | | VVNPTQK |
| 779.4120 | 405-411 | 0 | | | SPLFMGK |

Serotriferin

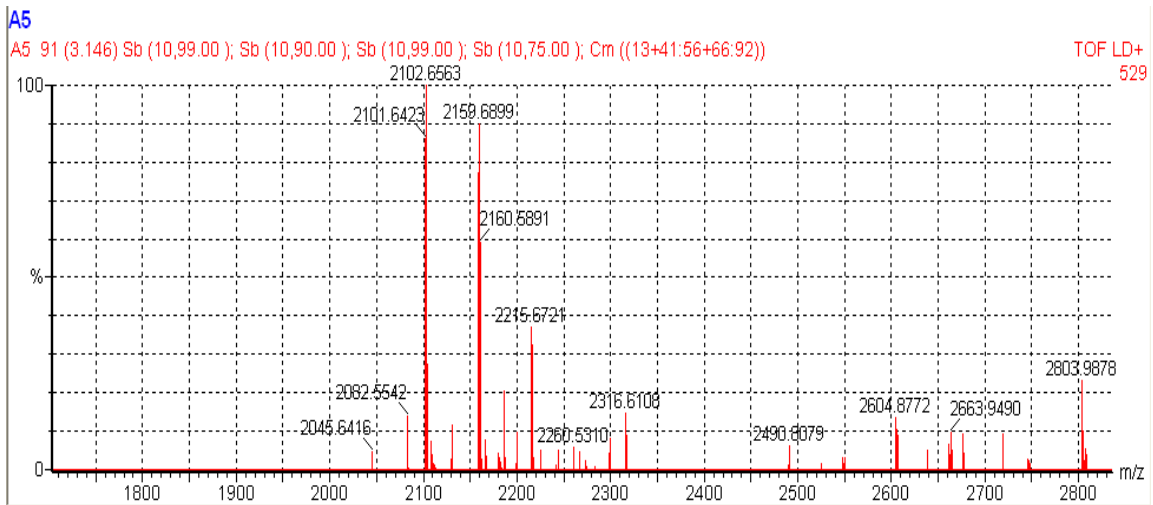
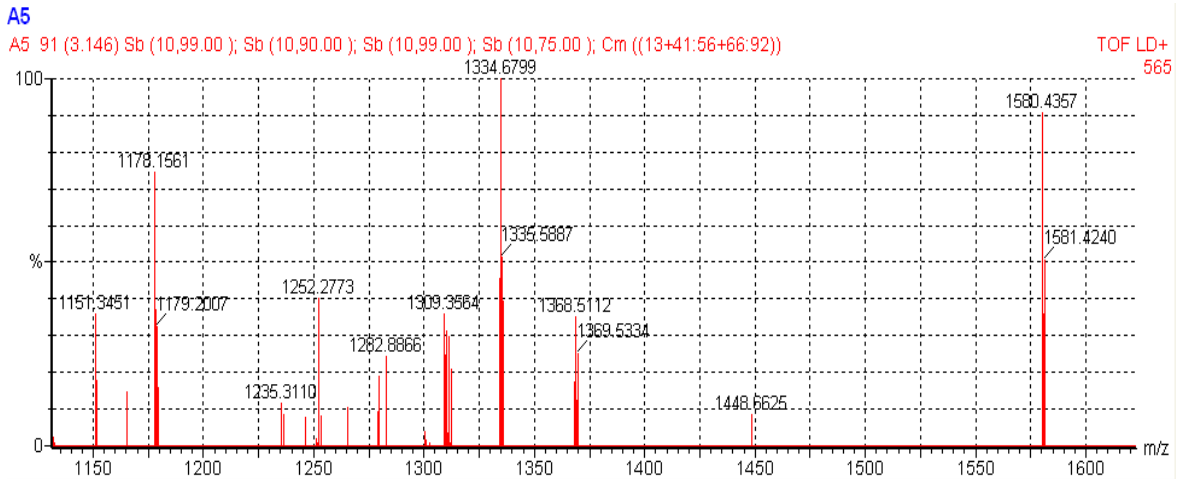
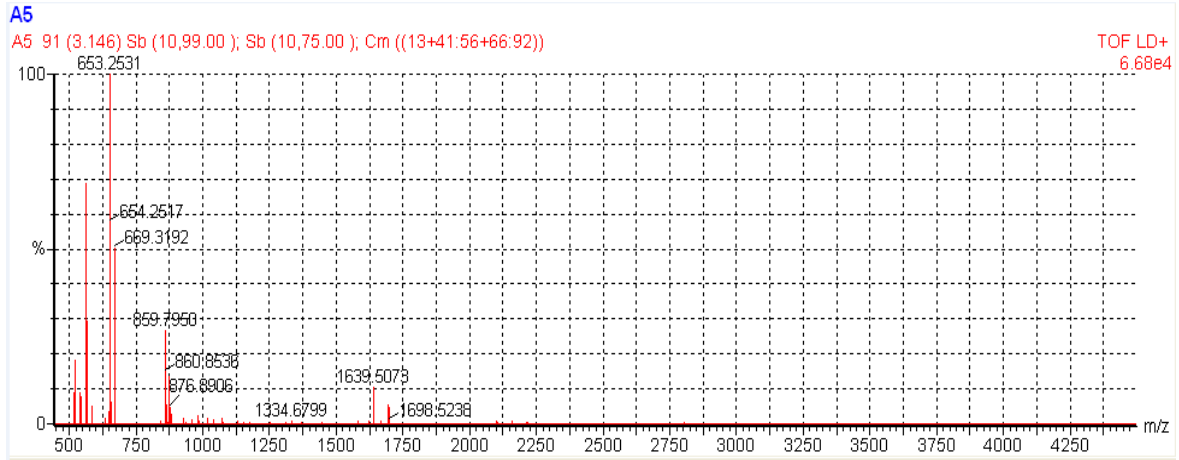


Şekil 3.22. Serotriferin peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Çizelge 3.12. Serotriferin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

| | | | | | |
|-----------|---------|---|-------------------|--------------|----------------|
| 635.3763 | 311-315 | 0 | | DLLFK | |
| 629.3729 | 677-682 | 0 | | AVGNLR | |
| 617.3253 | 572-576 | 0 | | NLNEK | |
| 614.3872 | 163-167 | 0 | | KPLEK | |
| 591.3170 | 542-546 | 0 | Cys_CAM: 542 | 648.3385 | CLVEK |
| 540.2888 | 660-663 | 0 | | LHDR | |
| 530.2391 | 43-46 | 0 | | DHMK | |
| 1520.6362 | 495-508 | 0 | Cys_CAM: 503 | 1577.6576 | FDEFFSEGCAPGSK |
| 1482.6893 | 240-251 | 0 | Cys_CAM: 246 | 1539.7108 | DQYELLCLDNTR |
| 1478.7348 | 332-343 | 0 | | MYLGYEYVTAIR | |
| 1419.7300 | 421-433 | 0 | Cys_CAM: 421 | 1476.7515 | CGLVPVLAENYNK |
| 1417.6450 | 684-696 | 0 | Cys_CAM: 684, 693 | 1531.6879 | CSTSSLLEACTFR |
| 1358.6984 | 47-60 | 0 | Cys_CAM: 58 | 1415.7198 | SVIPSDGPSVACVK |
| 1297.6092 | 577-587 | 0 | Cys_CAM: 582 | 1354.6307 | DYELLCLDGTR |
| 1283.5691 | 531-541 | 0 | | EGYYGYTGAFR | |
| 1276.6320 | 300-310 | 0 | | EFQLFSSPHGK | |
| 1273.6535 | 226-236 | 0 | | HSTIFENLANK | |
| 1260.5677 | 27-37 | 0 | Cys_CAM: 28 | 1317.5892 | WCAVSEHEATK |
| 1249.6059 | 454-464 | 0 | | SASDLTWDNLK | |
| 1223.5361 | 374-384 | 0 | Cys_CAM: 374 | 1280.5575 | CDEWSVNSVGK |
| 1195.5524 | 123-132 | 0 | | DSGFQMNQLR | |
| 1166.5912 | 554-564 | 0 | | HQTVPQNTGGK | |
| 1138.5210 | 363-371 | 0 | Cys_CAM: 364 | 1195.5425 | WCALSHHER |
| 1000.4986 | 669-676 | 0 | | YLGEYVK | |

Albumin

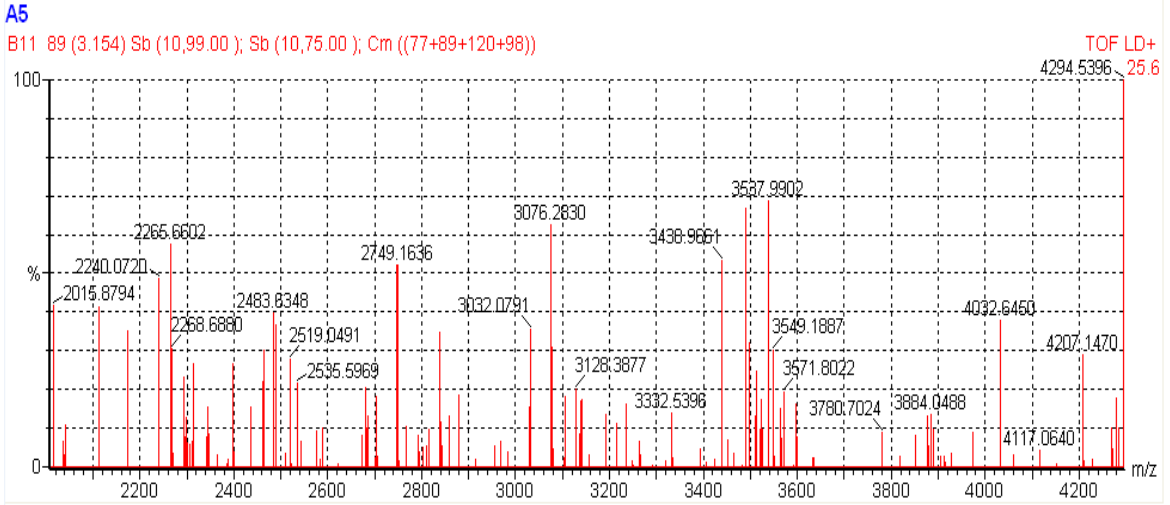


Şekil 3.23. Albumin peptidlerine ait Malde-TOF kütle spektrometresi spektrumu

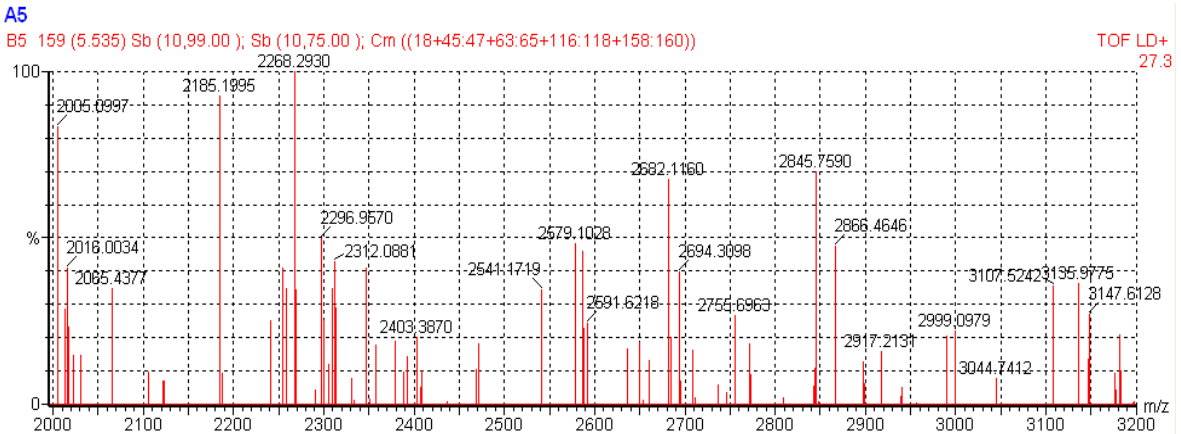
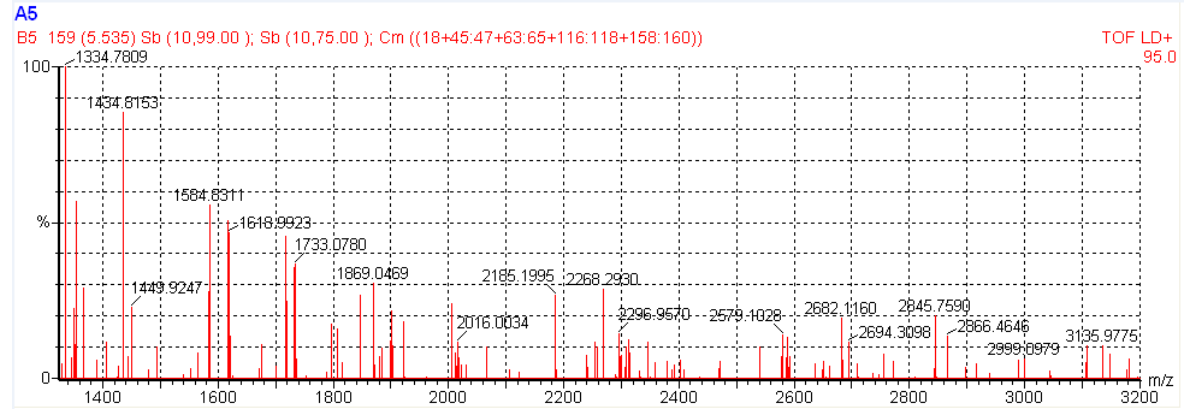
Çizelge 3.13. Albumin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

| mass | position | #MC | with modification(s) | modifications | peptide sequence | | |
|-----------|----------|-----|------------------------|---------------------|-------------------------------|----------------|----------------|
| 2917.3229 | 311-337 | 0 | Cys_CAM: 313 | 2974.3444 | SHCIAEVENDEMPADLP SLA ADFVESK | | |
| 2593.2425 | 139-160 | 0 | Cys_CAM: 148 | 2650.2639 | LVRPEVDVMCTAFHDNEETF LK | | |
| 2433.2635 | 45-65 | 0 | Cys_CAM: 58 | 2490.2849 | ALVLIAFAQYLQQCPFEDHV K | | |
| 2404.1709 | 470-490 | 0 | Cys_CAM: 472, 485 | 2518.2138 | MPCAEDYLSVVLNQLCVLHE K | | |
| 2203.0012 | 525-543 | 0 | Cys_CAM: 538 | 2260.0226 | EFNAETFTFHADICTLSEK | | |
| 2045.0953 | 397-413 | 0 | | | VFDEFKPLVEEPQNLIK | | |
| 1915.7731 | 265-281 | 0 | Cys_CAM: 269, 270, 277 | 2086.8375 | VHTECCHGDLLECADDR | | |
| 1853.9102 | 509-524 | 0 | Cys_CAM: 511 | 1910.9316 | RPCFSALEVDETYVVK | | |
| 1742.8940 | 170-183 | 0 | | | HPYFYAPELLFFAK | | |
| 1623.7875 | 348-360 | 0 | | | DVFLGMFLYEYAR | | |
| 1600.7312 | 414-426 | 0 | Cys_CAM: 416 | 1657.7526 | QNCELFEQLGEYK | | |
| 1511.8427 | 439-452 | 0 | | PHOS: 443, 444, 446 | 1751.7417 | VPQVSTPTLVEVSR | |
| 1386.6206 | 287-298 | 0 | Cys_CAM: 289 | 1443.6420 | PHOS: 294, 297 | 1546.5532 | YICENQDSISSK |
| 1384.5355 | 76-88 | 0 | Cys_CAM: 77, 86 | 1498.5784 | PHOS: 82 | 1464.5018 | TCVADESAENC DK |
| 1381.5333 | 384-396 | 0 | Cys_CAM: 384, 385, 393 | 1552.5977 | | | CCAAADPHECYAK |
| 1342.6347 | 570-581 | 0 | | | | | AVMDDFAAFVEK |
| 1320.4905 | 106-117 | 0 | Cys_CAM: 114, 115 | 1434.5334 | | | ETYGEMADCCAK |
| 1311.7419 | 362-372 | 0 | | | | | HPDYSVLLLLR |
| 1257.5238 | 187-198 | 0 | Cys_CAM: 192, 193 | 1371.5667 | | | AAFTECCQAADK |
| 1191.5748 | 301-310 | 0 | Cys_CAM: 302, 303 | 1305.6177 | | | ECCEKPLEK |
| 1149.6150 | 66-75 | 0 | | | | | LVNEVTEFAK |
| 1024.4550 | 500-508 | 0 | Cys_CAM: 500, 501 | 1138.4979 | | | CCTESLVNR |
| 1018.4775 | 123-130 | 0 | Cys_CAM: 125 | 1075.4989 | | | NECF LQHK |
| 1017.5363 | 89-97 | 0 | | | | | SLHTLFGDK |
| 1013.5989 | 599-609 | 0 | | | | | LVAASQAALGL |
| 1013.4244 | 589-597 | 0 | Cys_CAM: 591 | 1070.4459 | | | ETCFAEEGK |
| 1000.6037 | 550-558 | 0 | | | | | QTALVELVK |
| 984.4884 | 376-383 | 0 | | | | | TYETTLEK |
| 960.5625 | 427-434 | 0 | | | | | FQNALLVR |
| 951.4418 | 37-44 | 0 | | | | | DLGEENFK |
| 940.4483 | 131-138 | 0 | | | | | DDNPNLPR |
| 927.4934 | 162-168 | 0 | | | | | YLYEIAR |
| 880.4410 | 250-257 | 0 | | | | | AEFAEVSK |
| 876.4971 | 98-105 | 0 | Cys_CAM: 99 | 933.5186 | | | LCTVATLR |
| 789.4716 | 258-264 | 0 | | | | | LVTDLTK |
| 715.4171 | 199-205 | 0 | Cys_CAM: 201 | 772.4385 | | | AACLLPK |
| 698.3580 | 29-34 | 0 | | | | | SEVAHR |
| 695.3359 | 342-347 | 0 | | | | | NYAEAK |
| 674.3468 | 491-496 | 0 | | | | | TPVSDR |
| 673.3780 | 237-242 | 0 | | | | | AWAVAR |
| 658.3155 | 118-122 | 0 | | | | | QEPER |
| 649.3338 | 224-229 | 0 | Cys_CAM: 224 | 706.3552 | | | CASLQK |
| 645.3566 | 206-210 | 0 | | | | | LDEL R |
| 645.3566 | 206-210 | 0 | | | | | LDEL R |
| 581.3042 | 464-468 | 0 | | | | | HPEAK |
| 517.2980 | 566-569 | 0 | | | | | EQLK |
| 517.2980 | 282-286 | 0 | | | | | ADLAK |
| 509.3194 | 559-562 | 0 | | | | | HKPK |
| 508.2514 | 230-233 | 0 | | | | | FGER |
| 503.2936 | 243-246 | 0 | | | | | LSQR |

IgG ağır ve IgG hafif



Şekil 3.24. IgG hafif peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu



Şekil 3.25. IgG ağır peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Maldi-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin 2D jel elektroforezi profillerinde gözlenen deneysel pI ve Mr değerleri ile Mascot ve ExPasy veri tabanlarındaki teorik pI ve Mr değerleri veri tabanı skorları ile birlikte Çizelge 3.14'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.14. Maldi-Tof kütle spektrometresi ile tespit edilen proteinlerin teorik ve deneysel pI ve Mr değerlerinin karşılaştırması, eşleşen peptit sayısı ve skorları (Expasy'de eşleşen peptit sayıları, ilgili proteinlerin UniProtKB/Swiss-Prot veri tabanından elde edilen triptik peptit kütlelerinin MALDI-TOF spektrumlarıyla gözle karşılaştırılarak elde edilmiştir)

| Protein Adı | Erişim No | Teorik pI/Mr | Ölçülen pI/Mr | Mascot'ta score ve eşleşen peptit sayısı (sırasıyla) | Expasy'de eşleşen Peptid Sayısı |
|-----------------------------|-----------|---------------|---------------|--|---------------------------------|
| Albumin | P02768 | 5.67/ 66472.2 | 5.5/ 66100 | 44/37 | 14/24 |
| Transferin | P02787 | 6.7/ 75181.4 | 6.6/ 83600 | 48/39 | 12/25 |
| Haptogloblin | P00738 | 6.13/ 43349 | 5.6/ 43200 | 55/46 | 13/19 |
| α-1 antitripsin | P01009 | 5.37/ 44324.5 | 5.1/ 56900 | 69/19 | 5/14 |
| Fibrinojen beta zincir | P02675 | 7.95/ 50762.9 | 7.8/ 58100 | 55/14 | 10/16 |
| Fibrinojen gama zincir | P02679 | 5.24/48483 | 5.4/ 49800 | Bulunmadı | 6/18 |
| Immunoglobulin hafif zincir | P99007 | 6.43/ 25195 | 6.3/ 26900 | Bulunmadı | tanımlanmamış |
| Immunoglobulin ağır zincir | P99006 | 6.68/50930 | 6.8/54200 | Bulunmadı | tanımlanmamış |

Aşağıda Mascot veri tabanından alınan Haptogloblin proteininde eşleşen peptitler kırmızı olarak gösterilmiştir.

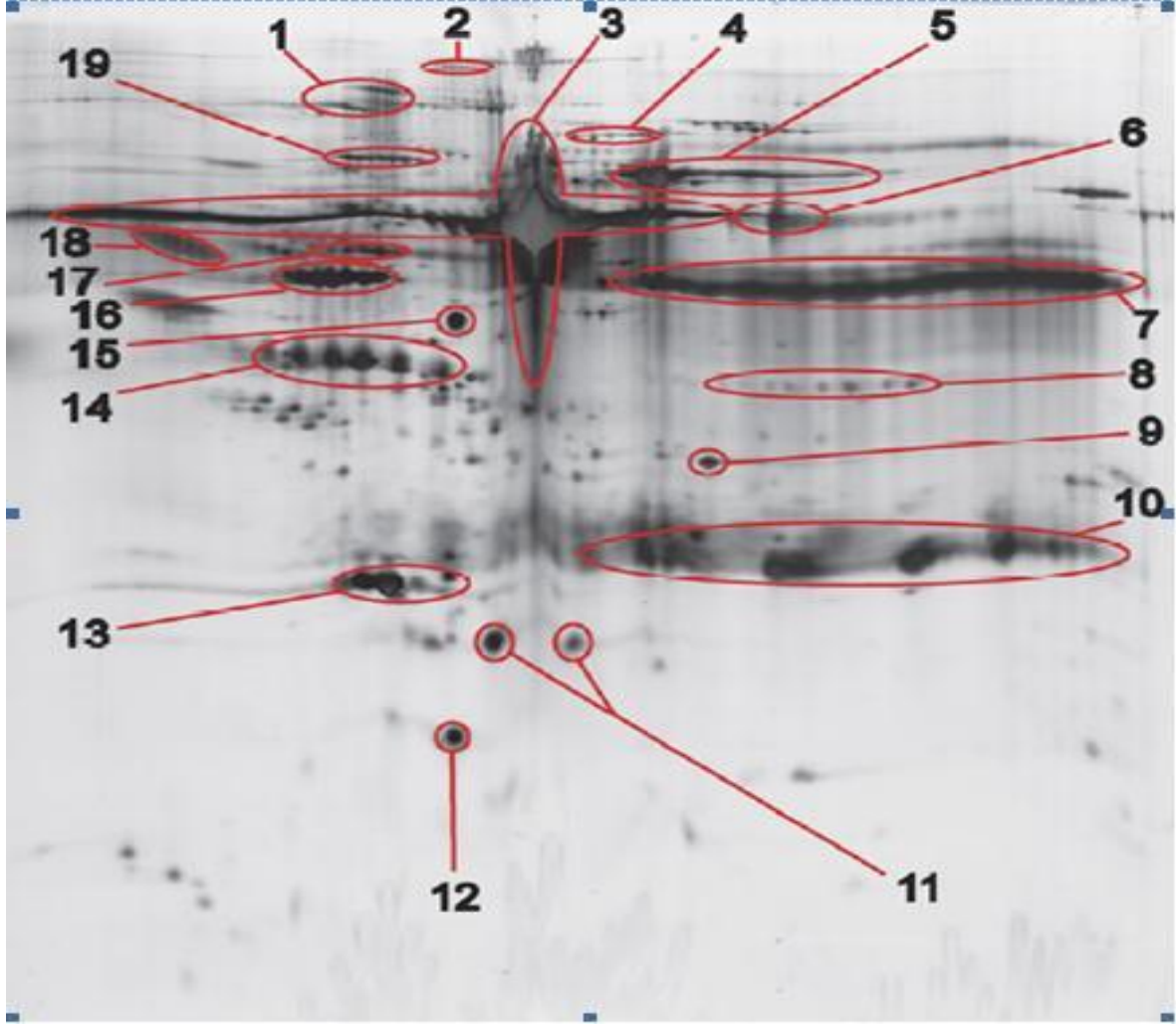
```

1 MSALGAVIAL LLWGQLFAVD SGNDVTDIAD DGCPKPPEIA HGYVEHSVRY
51 QCKNYKLRT EGDGVYTLND KKQWINKAVG DKLPECEADD GCPKPPEIAH
101 GYVEHSVRYQ CKNYYKLRTE GDGVYTLNNE KQWINKAVGD KLPECEAVCG
151 KPKNPANPVQ RILGGHLDAK GSFPWQAKMV SHHNLTTGAT LINEQWLLTT
201 AKNLFLNHSE NATAKDIAPT LTLYVGKKQL VEIEKVVLHP NYSQVDIGLI
251 KLKQKVSUNE RVMPICLPSK DYAEVGRVGY VSGWGRNANF KFTDHLKYVM
301 LPVADQDQCI RHYEGSTVPE KKTPKSPVGV QPILNEHTFC AGMSKYQEDT
351 CYGDAGSAFA VHDLEEDTWY ATGILSFDKS CAVAEYGVYV KVTSIQDWVQ
401 KTIAEN

```

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sağlıklı bireyde plazma 2D jel elektroforezi profilinde ifade olan abundant proteinlerin SDS-PAGE jel dağılımını aşağıdaki gibidir;



Şekil 4.1. Abundant protein konumları:1: seruloplasmin, 2: α -2 makroglobin, 3: albumin, 4: komplement faktör B, 5: Transferin, 6: complement c3, 7 ve 8: immünoglobulin ağır zincir γ , 9: c4 komplement, 10: immünoglobulin hafif zincir, 11 ve 14: haptoglobin, 12: prealbümin, 13: apolipoprotein A, 15: fibrinojen, 16: α -1 antitripsin, 17: α -1 antikimotripsin, 18: immunoglobulin ağır zincir α , 19: secretory immunoglobulin zincir α (Zolotarjova et al.2008).

Fibrinojen ve diğer inflamasyona duyarlı plazma proteinleri (ISPs) şiddetli ve sürekli inflamasyon bileşenlerdir. İnflamasyon, ateroskleroz gelişiminde rol alan ve kalp krizi (MI) riskini artıran bir bulgudur. Atheroskleroz ve özellikle erken MI olgularında ISPs (fibrinogen, alpha-1-antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin, ve orosomucoid) ifade düzeylerinin artışı gösterilmiştir (Engstrom et al 2003).

Endotel inflamasyonu sonucunda IL-6 ve IL-1 β gibi sitokinlerin ve fibrinojen sentezini arttıran TNF- α 'nın yapımı artar. IL-6 insandaki major prokoagulan sitokindir ve bir akut faz reaktanı olan ve IL-6'nın etkisiyle artan CRP (C reaktif protein) monositlerde doku faktörünün artışına neden olmaktadır (Wada et al 2003).

Kanda heparin ve heparine benzer diğer fibrinolizis ürünleriyle plazmada fibrinojen seviyesi düşer. Düşük fibrinojen seviyeleri; konjenital ve kazanılmış hipo- ve afibrinojenemi tablolarında görülür.

Bu proje kapsamında kontrol grubu içinde protrombin G20210A mutasyonu taşıyan bireyler ile taşımayan bireyler arasında yapılan PDQuest ve SPSS 9.0 analizlerinde, protrombin G20210A genetik değişimi olan ve olmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0.003). Ancak fibrinojen protein ifade azalışı olarak yansıyan bu fark (1.09) kontrol grubunda hiç bir tedavi alınmadığı (Heparin) ve birey sayısının az olduğu düşünülerek ihmal edilmiştir.

Fibrinojen beta spotunun iki izotopunun gruplar arası anlamlı fark göstermektedir. 7503 SSP numaralı fibrinojen beta spotu için, MI geçiren ve geçirmeyen gruplar arasında protrombin gen değişimini taşıyan gruplar arasındaki fark 2.22 kat, 8406 SSP numaralı fibrinojen beta spotu için MI geçiren ve geçirmeyen gruplar arasında protrombin gen değişimini taşıyan gruplar arasındaki fark 2.57 kattır ve fibrinojen beta ifadesinde MI geçiren hastalarda artış görülmektedir.

Yukarıda bahsedildiği gibi MI ve ateroskleroz hastalarında inflamasyon ilişkili proteinlerde, (ISPs) artış literatürde de yer almaktadır.

Yapılan analizlere göre 4404 SSP numaralı spot olan Alpha -1-antitripsin protein profilinde MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile diğer hasta grupları (MI olmayan protrombin gen değişimi olan) arasında anlamlı fark bulunmuştur. MI geçiren ve geçirmeyen gruplar arasındaki bu fark 3.494 kat MI geçiren hastalarda ifade artışı olarak gösterilmiştir.

İnflamasyonlarda destekleyici olarak komplement sistemleri önemli rol oynamaktadır. Komplement C1 bu kaskatın anahtar başlatıcısı olarak bilinmektedir. Komplement C1 aktivatörlere bağlanarak birincil antijen-antikor kompleksi oluşturarak bu yolağın başlamasını aktive etmektedir. Çalışmalara göre komplement C1 endotelial hücre reseptörüne bağlanarak inflamasyon sitokinlerini (IL-8, IL-6 ve MCP-1) indüklemektedir.

Komplement sisteminin aktif olması inflamasyonda anahtar rol olarak obezite ve şeker direncinin patojenite belirtisidir. Komplement C1 aktivasyonu adipoz hücrelerde düzenleyicidir, obezite ve şeker direnci hastalıklarında artarak regülatör rol oynamaktadır.

Kompleman sistemi, pıhtılaşma, kinin ve fibrinolitik sistem birbirileri ile ve bazı hücre zarı proteinleri ile etkileşim halindedir.

Hemostaz sisteminde yer alan bir çok protein ve bu proteinlerin hücre reseptörleri kompleman aktivasyonu, bağışıklık cevabı, sitokin salınımı, hücre proliferasyonu, büyüme ve farklılaşma gibi diğer sistemlerden etkilenmektedir. Kontak sisteminin, koagülasyon sisteminin yanı sıra fibrinolitik, kininogenez, kompleman ve anjiyogenez sistemleri gibi diğer kan plazma proteolitik sistemlerinin aktivasyonunu da tetiklediğini gösteren araştırmalar mevcuttur (Hergenç 2004).

C1 INB kompleman ve koagülasyon yolundaki serin proteazları inhibe etmektedir. Sağlıklı insan trombositlerinin alfa granülleri C1 INB içermektedir. C1 INB'nin trombosit aktivitesindeki düzenleyici rolü, eksikliğinin artmış trombosit kümeleşmesi, FXIIa ve protrombin fragman F1.2'ye yol açması ile izah edilebilir.

E. coli, *Trypanosoma*, diğer parazitler, virüsle infekte olmuş hücreler, maya hücre duvarı, kobra venom faktörü, nefritik faktör, dekstran sülfat, polivinil sülfat, nöraminidaz ile muamele edilmiş eritrositler, insanda diğer memelilerin eritrositleri, antijen-antikor kompleksleri, Ig A ve klasik yolu aktive eden immunglobulinler, lipopolisakkarid ve diğer bakteri ürünleri kompleman sistemini alternatif yol aracılığı ile aktive ederler. Alternatif yol bakteri hücumunda ön safta yer alır ve henüz konağın antikor

üretimi için yeterli zaman bulamadığı dönemde devreye girer. Klasik yolun etkinleştirilmesi sonucunda aktifleşen C3 de, alternatif yolu aktive edebilmektedir. C3 klasik ve alternatif yolun birleştiği noktada yer alır ve kompleman sisteminin en önemli üyelerinden biridir. Dolaşımında C3 proteolitik enzimlerin etkisi ile C3a ve C3b'ye ayrılmakta, ancak faktör I ve H ile sürekli olarak inaktive edilerek düşük düzeyde tutulmaktadır. Patojen mikroorganizmaların polisakkarid ve lipopolisakkaridleri varlığında bu denge bozulduğunda C3b, faktör B ve D ile etkileşime girer. Dolaşımında devamlı olarak hidrolize uğrayarak farklı bir konformasyona çevrilen C3, faktör B'ye, bu ikiliye de faktör D bağlanır ve sonuçta faktör B kırılır. Geride kalan kompleks, alternatif yol C3 konvertazdır. Properdin, bu konvertaza bağlanır ve onu stabilize eder ve kompleman kaskadının devamını sağlar. Faktör D, plazmada aktif halde bulunan bir proteazdır (Zhang et al 2007).

Bu proje kapsamında kontrol grubu içinde protrombin 20210 mutasyonu taşıyan bireylerde ve mutasyon taşımayan bireyler arasında yapılan PDQuest ve SPSS 9.0 istatistik analizlerinde inflamasyona karşı olarak kompleman C1'de Protrombin G20210A gen değişimi olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ve protrombin gen değişimi taşıyanlarda protein ifadesi artış göstermektedir (P=0.033). Kompleman C3'de protrombin G20210A gen değişimi ve protrombin gen değişimi olmayan kontrol grubu arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (P=0.016).

IgG ağır zinciri protein ifadesi gruplar arasında protrombin gen değişimi olan grup ile protrombin gen değişimi olmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir. Protrombin gen değişimi olan ve olmayan grup arasındaki fark (P=0.001) anlamlı bulunmuştur. Yani protrombin protein gen değişimi olanlar gen değişimi olmayanlara göre protein ifadelerinde artış göstermektedir.

Bağışıklık sisteminin bir ögesi olup, kan ve vücut yağları, pıhtılaşma, kinin ve fibrinolitik sistemlerle ilişkili, son derece karmaşık ve sıkı düzenlenen bir sistem olan kompleman sisteminin ateroskleroz ve trombozdaki rolü, yakın bir gelecekte yoğun çalışmalara konu olacaktır. Kompleman sisteminin bazı komponentlerinin ölçümü ateroskleroz ve trombozu öngörmede, erken miyokard infarktüsünün tersinir iskemiden ayırıcı tanısında ve MI sonrasındaki reperfüzyonun inflamatuvar boyutunun kontrolünde faydalı belirteç olmaya adaydır (Hergenç 2004) .

Ayrıca literatüre göre lipokarin-2 protein seviyesi ateroskleroz ve Myocardial infarction(MI) hasalarında artış göstermektedir. Aigner ve arkadaşlarının raporuna göre lipokalin-2, iskemi ve reperfusion olaylarında düzenleyici rol almaktadır. Lipokalin-2 ailesinden olan Retino binding protein

4 yağ dokusunda salgılanmaktadır ve son zamanlarda obezite ve insulin direncine sebep olarak gösterilmektedir (Choi et al. 2008).

Bu proje kapsamında 3 hasta grubu arasında yapılan istatistik analizlerinde MI geçiren grubunda Retino binding protein 4 protein profilinde diğerlerine göre artış görünmektedir. Bu artış MI geçiren protrombin gen değişimi olan grubunda MI geçirmeyen protein gen değişimi olan hasta gruba nazaran 1.684 kat artış göstermektedir.

Çalışma sonucu belirtilen protein profil farklılıklarının: Tromboz ile ilişkili moleküler değişikliklerin anlaşılmasında, hastalığın tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde, yeni hedef moleküllerin bulunmasına ve çoklu biyobelirteç geliştirilmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ulaşılan bilgiler ışığında verilerin kabul edilebilirliğinin artırılması veya doğruluğunun kanıtlanması için daha fazla hasta sayısı üzerinden çalışmanın devamı planlanmaktadır.

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

Sonuç olarak; proje kapsamında yapılan proteomik analizler ile tromboembolizm için risk faktörü olarak bilinen Protrombin G20210A gen değişiminin plazma protein profiline etkisinin özellikle ifadesi yüksek abundant proteinler üzerinden olduğu düşünülmektedir.

Bu gen değişiminin Atheroskleroz ve özellikle erken MI için, inflamasyon yolağı üzerinden abundant proteinlerin ifade değişimine neden olarak riski arttırdığı gösterilmiştir.

KAYNAKLAR:

Atahan, E., Çağlar, E., Şarkış, C., Uğurlu, S. 2009. Venöz tromboemboli ve kalıtsal trombofili. Turkish J Thorac Cardiovasc, 17(4); 302-311.

Akar,N., Akar, E., Mısıroğlu, M., Avcu, F., Yalçın, A., and Cın, Ş.1998. Search For Factors Favoring Thrombosis İn Turkish population. Thrombosis Research 92; 79-82

Akar N, Misirlioglu M, Akar E, Avcu F, Yalcin A, Sozuoz A. Prothrombin gene 20210 G-A mutation in the Turkish population. Am J Hematol, 1998 Jul;58(3):249.

Akar N, Akar E, Deda G, Sipahi T, Orsal A. Factor V1691 G-A, prothrombin 20210 G-A, and methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T variants in Turkish children withcerebralinfarct.J Child Neurol. 1999 Nov;14(11):749-51.

Aldreda, S., Grantb, M.M., Griffithsb, H.R.2004. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research, Clinical Biochemistry, 37; 943– 952.

Barcelo-Batlloori S, André M, Servis C. 2002. Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: implications for inflammatory bowel diseases, Proteomics 2; 551–60.

Bayır, A. and Ak. 2003. Acil olgularda trombolitik tedavi. Genel Tıp Dergisi, 13(2);81-88

Berber, E., Kavaklı, K., Akar, N., Berber, E., Çağlayan, S.H. 2003. R506Q (FV Leiden) and R485K Mutations in the Factor V Gene: Incidence in Deep Venous Thrombosis and Hemophilia A Patients. Turk J Haematol, 20(4); 221-225.

Bilguvar, K., Yasuno, K., et al. 2008. Susceptibility Loci For Intracranial Aneurysm İn European And Japanese Populations. Nat Genet, 40(12); 1472-7.

Choi, K M., Lee,J S., Kim,E J., Baik,S H., Seo, H S., Choi, D S., J, Oh and Park, C G.2008 Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease. European Journal of Endocrinology, 158; 203–207.

Çelebi, H. 2004. 20 Yaşında Bir Erkek Tromboz Geçirirse. XXXI.Ulusal Hematoloji Kongresi IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu, 53-60.

D.Blann, A., Y. H.Lip,G. 2006. Venous thromboembolism. BMJ Volume, 332.

Demiralp, D.Ö. 2009. Venöz Tromboembolizme proteomik Yaklaşımlar. Yeni Tıp dergisi, 26; 145-147.

Demiralp, D., Akar, N., C. Haznedaroğlu, İ., Gümüştekin, Ç ve Göker, H. 2008. Kanama durdurucu Ankaferd ve etki mekanizmasının proteomik yaklaşımı. 10. ulusal iç hastalıkları kongresi. So4 ; 176

Engström, G., Lind, P., Hedblad, B., Stavenow,L., Janzon, L., Lindgärde, F.2002. Effects of

Cholesterol and Inflammation-Sensitive Plasma Proteins on Incidence of Myocardial Infarction and Stroke in Men. *Circulation*, 105; 2632-2637

Günel, T., 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". *Türkiye Klinikleri J Med*, 27; 763-767.

Güran, Ş. 2005. Hastalıklara yeni bir tanı yaklaşımı: protein-çip teknolojisi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 47; 243-245

Günel, A., Danış, Ö., Demir, S., Ogan, A., Aker, R., Onat, F ve Gülçebi, M. 2009. Proteomiks Yaklaşımı Kullanılarak GAERS'lerde Farklılaşan Proteinlerin Tanımlanması. *Türk Norol Derg*, 15(Ek 1); 139-179.

Greco, M., Chiriaco, F., Del Boccio, P., Tagliaferro, L., Acierno, R., Menegazzi, P., Pinca, E., Pignatelli, F., Storelli, C., Federici, G., Urbani, A. and Maffia, M. 2006. A proteomic approach for the characterization of C677T mutation of the human gene methylenetetrahydrofolate reductase. *Proteomics*, 6; 5350-5361.

Ganıdağlı, S., Gedik, R., Koruk, S., Mızrak, A. 2008. Yoğun Bakımda Koagülasyon. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(1); 36-44.

Hamdan, M., Righetti, P. G (Eds). 2005. *Proteomics Today. Protein Assessment and Biomarkers Using Mass Spectrometry, 2D Electrophoresis, and Microarray Technology*. John Wiley & Sons, Inc., 426 p., New Jersey.

Hergenç, Gülay. 2004. Kompleman Sisteminin Aterosklerozdaki Rolü. *Türk Kardiyol Dern Arş*; 32; 28-37.

Kızılcın, Ö., Hacıevliyagil, S. S., Mutlu, L. C., Günen, H., Yıldırım, Z. 2002. Pulmoner Tromboembolide Genetik Risk Faktörleri (Beş Olgu Nedeniyle). *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3); 215-218.

Kılbaş, A. 2007. Genç Serebral İnfraktli Hastalarda Protrombotik Gen Mutasyonlarının Araştırılması. *Tıpta Uzmanlık Tezi*, 18-46.

Kurt, N. Tolunay, M. Yüzbaşıoğlu Aslan, B. Total Kalça Protezi Operasyonlarında Postperatif Venöz Yetmezlik ve Derin Ven Trombozu ve Epidural Anestezinin Etkileri. *Clinical Research*, Vol.13 No.4; 215-220

Özdağ, H., Yonca, E., Akar, N. 2006. Protrombin Gen 20209 C-T Along With The First Description Of A Homozygous Polymorphism At The 3' Downstream Region +4 C-T In Turkish population. *Laboratory Hematology*, 12; 131-133

Poort, R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H., and Bertina, R.M. 1996. A Common Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene Is Associated With Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis. *Blood*, Vol 88, NO 10 (November 15) PP; 3698-3703.

Silan, F., Ve Zafer, C. 2004. Faktör V Leiden Mutasyonu. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 1; 33-36.

Steel LF, Shumpert D, Trotter M.2003. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, 3; 601–9.

Sayinalp, N. 2007. Koagülasyonun ABC'si: Protein C. 6. İlk Basamak Kursu, 29-31.

Tangün, Y., Köroğlu, A. 2007. Kan Pıhtılaşması. <http://www.kanbilim.com>, (Erişim Tarihi; Nisan 2010).

Tangün, Y., Köroğlu, A. 2007. Kan Pıhtılaşması. <http://www.kanbilim.com/Trombofili.htm>, (Erişim Tarihi; Nisan 2010).

Türedi, A. 2006. Hemiplejik Serebral Palsili Çocuklarda Protrombotik Gen Mutasyonlarının Sıklığı. Uzmanlık Tezi, 19-36.

Uzun, Ş., Sarıcioğlu, F., Çeliker, V. 2007. Derin Ven Trombozu. *Turkiye Klinikleri J Med*, 27; 853-861.

Ulu, A., Yılmaz, E., Akar, E., Akar, N. 2003. Homozygosity For The HR2 Haptotype: Is It A Risk Factor For Thrombosis?. *turk J Haematol*, 20(4); 213-215

Yılmaz, E., Akar, E., Akar, N., Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thromboembolic patients with and without prothrombin 20210 G-A. *Turk J Haematol*, 21(2); 83-86.

Y.Güneştutar, L., C.Rodop, M. 2009 Elektroforezde Yeni Yaklaşımlar. *Sigma* 27;151-160.

Zolotarjova, N., mrozinski, P., Chen, H., Martosella, J.2008. Combination of affinity depletion of abundant proteins and reversed-phase fractionation in proteomic analysis of human Plasma/serum. *Journal of Chromatography A*, 1189;332-338

Zaatari, G.S., Otrrock, Z.K., Sabbagh, A.S., Mahfouz, R.A.R. 2006. Prevalence of factor V R2 (H1299R) polymorphism in the Lebanese population. *Pathology (October)* , 38(5) ; PP, 442-444.

Zhang, J., Wright, W., A.Bernlohr, D., W.Cushman, S and Chen, X. 2006. Alterations of the classic pathway of complement in adipose tissue of obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292; E1433–E1440.

Wada, H., Mori, Y., Okabayashi, K., C.Gabazza, E., Kushiya, F.,4 Masato Watanabe, M., Hiroshi Shiku, N. and Nobori, T. 2003. High Plasma Fibrinogen Level Is Associated With Poor Clinical Outcome in DIC Patients. *American Journal of Hematology*, 72; 1–7.

<http://www.expasy.ch>(erişim tarihi: 29 Mart 2010)

(<http://www.scribd.com/doc/24603098/IPG-Ready-Strip-Instructions>

<http://www.scribd.com/doc/24603098/IPG-Ready-Strip-Instructions>

[http:// www.kanbilim.com/kanpıh.htm](http://www.kanbilim.com/kanpıh.htm)

<dersetkinliklerii.blogcu.com/.../7137406>

www.muhteva.com/pihtilasmanin-ilk-adimlari-tr

[www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=g \)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=g)

www.kanbilim.com/Trombofili.htm

[http://www.wellsphere.com/general-medicine-article/warfarin-part-1/743626\)](http://www.wellsphere.com/general-medicine-article/warfarin-part-1/743626)

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Tromboz>

[http:// www.kanbilim.com/kanp1h.htm](http://www.kanbilim.com/kanp1h.htm)

EKLER

EK1**Deneylerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler**

| Kimyasal | Firma | Katalog No |
|-----------------------|----------------|------------|
| Agar | Sigma | |
| Akrilamid | Biorad | 161-0141 |
| Amonyum persülfat | Biorad | 161-0700 |
| Amonyum bikarbonat | Sigma | A6141 |
| Asetik asit | Riedel-de haen | 27225 |
| Asetonitril | Sigma | 34998 |
| Boyasız marker | Biolabs | P7703S |
| BSA | Sigma | A-9647 |
| DTT | Biorad | 161-0611 |
| EDTA | Sigma | E9884 |
| Etanol | Sigma | 34870 |
| Formik acit | Riedel-de Haen | 27001 |
| Glisin | Applichem | 4-1067 |
| İyodoasetamid | Biorad | 163-2109 |
| Metanol | Sigma | 34885 |
| Mineral oil | Biorad | 163-2129 |
| Sodyum dodesil sülfat | Biorad | 161-0302 |
| Sypro ruby | Biorad | 170-3138 |
| TEMED | Biorad | 161-0801 |
| TFA | Pierce | 28904 |
| Tiyöre | Sigma | 7875 |
| Tripsin | Progema | V511A |
| Trisma-Base | Sigma | T6066 |
| Üre | Biorad | 161-0731 |

EK 2**DeneYlerde kullanılan cihazlar ve programlar**

| Cihazın adı/modeli | Markası | Kullanım amacı |
|---|-------------------|--|
| Protean IEF Cell | Bio-Rad | 2 boyutlu jel elektroforezinde birinci boyutu oluşturan izoelektrik odaklama işlemi için |
| Protean Plus Dodeca Cell | Bio-Rad | İki boyutlu jel elektroforezinde 2. boyutu oluşturan moleküler ağırlığa göre ayırımın gerçekleştirilmesi için |
| Elektroforez güç kaynağı (PowerPac 1000) | Bio-Rad | Elektroforetik sistemlerde güç kaynağı olarak |
| Sirklatrl su banyosu | | Elektroforez sistemlerinde soğutucu olarak |
| MALDI-TOF kötü spektrometresi (Micromass M@LDI) | Waters | 2 Boyutlu jel elektroforezi sonrası elde edilecek protein kümelerinin jelden kesilip jel içinde peptitlere sindiriminden sonra protein tanımlaması yapmak amacıyla <i>m/z</i> değerlerini elde etmek |
| Mikroplaka okuyucu (SpectraMax) | Molecular Devices | Protein miktar tayini için |
| VersaDoc jel görüntüleme sistemi | Bio-Rad | Jellerin görüntülenmesi ve fotoğraflarının çekilmesi için |
| Proteome Works Spot Cutter | Bio-Rad | Kötü spektrometresi analizleri için jellerden proteinlerin geri kazanımı için |
| Soğutmalı santrifüjü | Sigma | rnek hazırlanmasında kullanılacaktır |
| Hassas tartı | Schimadzu | rnek ve kimyasal hazırlanmasında |
| -30 C derin dondurucu | Sanyo | DeneYlerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit, şerit ve örneklerin saklanması için |
| -80 C derin dondurucu | Sanyo | DeneYlerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit ve örneklerin saklanması için |
| +4 C buzdolabı | Sanyo | DeneYlerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit ve örneklerin saklanması için |
| Otomatik pipet seti | Gilson | rnek hazırlanması ve reaksiyonların kurulmasında gerekli olan pipetlemelerin yapılması için |
| Otomatik elektronik çok kanallı pipet seti | Gilson | Tripsinizasyon işleminde |
| Saf su sistemi | Millipore | Moleküler analizlerde kullanılan solüsyonları hazırlamak üzere kullanılacak ultra saf suyun elde edilmesi için |

| | | |
|-----------------------|-------------------|--|
| Manyetik karıştırıcı | Cimarec | Deneylerde kullanılacak tamponların ve çeşitli çözeltilerin hazırlanmasında |
| Ultrasonik su banyosu | Elma | MALDI-TOF plakalarının yıkanmasında, MALDI-TOF ölçümleri için matriks hazırlanmasında ve analizlerde kullanılacak bazı solüsyonların hazırlanmasında |
| Çalkalayıcı | Finepcr | Jellerin boyanması aşamasında |
| SoftMax | Molecular Devices | Protein miktar tayininde kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için |
| PDQuest 8.0.1 | Bio-Rad | Jel fotoğraflarının çekimi ve ifade analizlerinin yapılmasında |

EK 3**Genetik Tarama Sonuçları****KONTROL GRUBU**

| Sıra | Adı soyadı | Protrombin G20210A |
|------|------------|--------------------|
| 1 | A.K | G/G |
| 2 | A.E | G/G |
| 3 | A.K | G/G |
| 4 | A.Ö | G/G |
| 5 | A.S | G/G |
| 6 | A.T | G/A |
| 7 | A.C | G/G |
| 8 | A.Ö | G/G |
| 9 | A.Ö | G/G |
| 10 | A.E | G/G |
| 11 | A.B | G/G |
| 12 | A.E | G/A |
| 13 | A.Ö | G/G |
| 14 | B.E | G/G |
| 15 | B.A | G/G |
| 16 | B.A | G/G |
| 17 | A.U | G/G |
| 18 | A.S | G/G |
| 19 | B.C | G/G |
| 20 | B.A | G/G |
| 21 | C.K | G/G |
| 22 | D.G | G/G |
| 23 | E.A | G/G |
| 24 | E.U | G/A |
| 25 | R.G | G/G |
| 26 | Y.K | G/G |
| 27 | Y.E | G/A |
| 28 | A.Ç | G/G |
| 29 | B.D | G/G |
| 30 | D.A | G/G |
| 31 | E.Y | G/G |
| 32 | G.S | G/G |
| 33 | H.B | G/G |
| 34 | T.A | G/G |
| 35 | T.D | G/G |
| 36 | Y.Ç | G/G |
| 37 | Y.A | G/G |
| 38 | Z.Y | G/G |
| 39 | B.G | G/G |
| 40 | B.D | G/G |
| 41 | B.G | G/A |

| | | |
|----|-------|-----|
| 42 | C.K | G/G |
| 43 | C.Y | G/G |
| 44 | Ç.A | G/G |
| 45 | D.A | G/G |
| 46 | D.T | G/G |
| 47 | D.G | G/G |
| 48 | D.A | G/G |
| 49 | D.T | G/G |
| 50 | D.F.A | G/G |
| 51 | D.Ç | G/G |
| 52 | D.G.G | G/G |
| 53 | D.S | G/G |
| 54 | D.K | G/G |
| 55 | A.A | G/G |
| 56 | B.Ö | G/G |
| 57 | B.K.Y | G/G |
| 58 | C.A | G/G |
| 59 | C.K | G/A |
| 60 | F.D | G/G |
| 61 | F.Ç | G/G |
| 62 | G.Y | G/G |
| 63 | H.G | G/G |
| 64 | H.B | G/G |
| 65 | M.E | G/G |
| 66 | N.A | G/G |
| 67 | O.K | G/G |
| 68 | P.A | G/G |
| 69 | T.U | G/G |
| 70 | T.P | G/G |
| 71 | T.K | G/G |
| 72 | Z.U | G/G |
| 73 | E.K | G/G |
| 74 | Z.M | G/A |
| 75 | D.A | G/G |
| 76 | D.Ş | G/G |
| 77 | E.T | G/G |
| 78 | E.B | G/G |
| 79 | E.K | G/G |
| 80 | E.A | G/G |
| 81 | E.K | G/G |
| 82 | E.E | G/G |
| 83 | E.K | G/G |
| 84 | E.Ö | G/G |
| 85 | E.D | G/G |
| 86 | E.G | G/G |
| 87 | E.Y | G/G |
| 88 | E.K | G/G |
| 89 | F.H | G/G |

| | | |
|-----|-------|-----|
| 90 | F.A | G/G |
| 91 | F.E | G/G |
| 92 | F.Ö.E | G/G |
| 93 | F.E | G/G |
| 94 | G.Ö | G/G |
| 95 | G.A | G/G |
| 96 | G.Ş | G/G |
| 97 | H.Ö | G/G |
| 98 | H.Y | G/A |
| 99 | H.D | G/G |
| 100 | G.Ş | G/G |
| 101 | H.B | G/G |
| 102 | H.S | G/G |
| 103 | I.H | G/G |
| 104 | I.I | G/A |
| 105 | İ.A | G/G |
| 106 | İ.S | G/G |
| 107 | D.B | G/G |
| 108 | R.A | G/G |
| 109 | K.S | G/G |
| 110 | K.I | G/G |
| 111 | K.Y | G/G |
| 112 | K.Y | G/G |
| 113 | M.C | G/G |
| 114 | M.Ö | G/G |
| 115 | M.D | G/G |
| 116 | M.I | G/G |
| 117 | M.K | G/G |
| 118 | M.Ş | G/G |
| 119 | M.D | G/G |
| 120 | N.I | G/G |
| 121 | N.A | G/G |
| 122 | N.K | G/G |
| 123 | N.P | G/G |
| 124 | N.A | G/G |
| 125 | N.Ş | G/G |
| 126 | Ö.C | G/G |
| 127 | Ö.E | G/A |
| 128 | Ö.T | G/G |
| 129 | Ö.K | G/G |
| 130 | P.Ü | G/G |

HASTA GRUBU

| Sıra | Adı soyadı | Protrombin G20210A |
|------|------------|--------------------|
| 1 | N.M. | G/G |
| 2 | A.Z. | G/G |
| 3 | İ.A. | G/G |
| 4 | M.K. | G/G |
| 5 | M.G. | G/G |
| 6 | F.A. | G/G |
| 7 | M.E. | G/G |
| 8 | A.T. | G/G |
| 9 | B.S. | G/G |
| 10 | İ.Ö. | G/G |
| 11 | Y.G. | G/G |
| 12 | A.Ö. | G/G |
| 13 | C.S. | G/G |
| 14 | N.I. | G/G |
| 15 | M.Ö | G/G |
| 16 | Y.Ç. | G/G |
| 17 | K.K. | G/G |
| 18 | İ.Y. | G/G |
| 19 | Z.A. | G/G |
| 20 | C.S | G/G |
| 21 | O.K. | G/G |
| 22 | H.Y.Ö | G/G |
| 23 | M.Ü | G/G |
| 24 | V.Ş. | G/G |
| 25 | A.H. | G/G |
| 26 | A.Y. | G/G |
| 27 | C.Ç. | G/G |
| 28 | Ş.C. | G/G |
| 29 | Y.Ş. | |
| 30 | A.B. | G/G |
| 31 | N.B. | |
| 32 | M.S. | G/G |
| 33 | A.E. | G/G |
| 34 | Z.V. | G/G |
| 35 | M.İ.Ç. | G/G |
| 36 | V.K. | G/A |
| 37 | B.A. | G/G |
| 38 | A.A. | G/G |

| | | |
|----|--------|-----|
| 39 | M.A. | G/G |
| 40 | A.U.T. | G/G |
| 41 | M.B. | G/G |
| 42 | Y.P. | G/G |
| 43 | A.Y. | G/G |
| 44 | M.T. | G/G |
| 45 | T.Ö. | G/G |
| 46 | F.K. | G/G |
| 47 | M.E.Y. | G/G |
| 48 | V.A. | G/G |
| 49 | N.D. | G/G |
| 50 | E.E. | G/G |
| 51 | A.G. | G/G |
| 52 | M.K. | G/G |
| 53 | B.E. | G/G |
| 54 | M.A. | G/G |
| 55 | M.K. | G/G |
| 56 | Z.B. | G/G |
| 57 | H.E. | G/A |
| 58 | A.İ. | G/G |
| 59 | İ.K. | G/G |
| 60 | L.H.E. | G/G |
| 61 | L.E. | G/G |
| 62 | M.A. | G/G |
| 63 | İ.Ç. | G/G |
| 64 | M.F. | G/G |
| 65 | R.A. | G/G |
| 66 | Z.G. | G/G |
| 67 | S.U. | G/G |
| 68 | F.K. | G/G |
| 69 | A.T.Ö. | G/G |
| 70 | F.K. | G/G |
| 71 | Y.Ş. | G/G |
| 72 | Y.B. | G/G |
| 73 | İ.U. | G/G |
| 74 | İ.Y. | G/G |
| 75 | F.Ö. | G/G |
| 76 | M.S. | G/A |
| 77 | Y.Ç. | G/G |
| 78 | S.G. | G/G |
| 79 | B.B. | G/G |
| 80 | N.K. | G/G |

| | | |
|-----|--------|-----|
| 81 | İ.K. | G/A |
| 82 | İ.Y. | G/G |
| 83 | İ.B. | G/G |
| 84 | E.İ. | G/G |
| 85 | M.T. | G/G |
| 86 | M.T. | G/G |
| 87 | S.M. | G/G |
| 88 | F.K. | G/G |
| 89 | İ.G. | G/G |
| 90 | V.G. | G/G |
| 91 | M.K. | G/G |
| 92 | İ.O. | G/G |
| 93 | K.T. | G/G |
| 94 | H.O. | G/G |
| 95 | A.N. | G/G |
| 96 | H.D. | G/G |
| 97 | M.O. | G/G |
| 98 | İ.G. | G/G |
| 99 | G.S. | G/G |
| 100 | D.A. | G/G |
| 107 | M.E.T. | G/G |
| 108 | G.P. | G/G |
| 110 | F.G. | G/G |
| 111 | A.R.E. | G/G |
| 112 | O.H. | G/G |
| 113 | S.U. | G/G |
| 116 | K.K. | G/G |
| 117 | Y.E. | G/G |
| 118 | A.Y. | G/G |
| 101 | H.D. | G/G |
| 102 | M.Ü. | G/G |
| 103 | H.A. | G/G |
| 104 | M.G. | G/G |
| 105 | M.E. | G/G |
| 106 | M.T. | G/G |
| 109 | N.Ç. | G/G |
| 114 | Y.K. | G/G |
| 115 | İ.O. | G/G |
| 119 | N.Y. | G/G |
| 120 | T.A. | G/G |
| 121 | F.Y. | G/G |
| 122 | C.Ç. | G/G |

| | | |
|-----|--------|-----|
| 123 | O.Ü. | G/G |
| 124 | Ş.Ç. | G/G |
| 125 | S.K. | G/G |
| 126 | K.G. | G/G |
| 127 | M.L. | G/G |
| 128 | C.C.E. | G/G |
| 129 | D.H. | G/G |
| 130 | S.S. | G/G |

EK 4 Mali Bilanço ve Açıklamaları

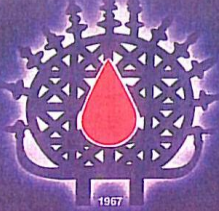
| Kod | Harcama Kalemi | Bütçe | Gider | Kalan |
|------------|--|---------------------|---------------------|-------------------|
| | Tüketime Yönelik mal ve Malzeme alımı | 98.080.00TL | 94.399.00 TL | 3.681.00TL |
| | Mamul Mal Alımı | | | |
| | Hizmet-Yolluk | 1.920.00TL | 1.120.00TL | 800.00TL |
| | Toplam | 100.000.00TL | | 4.481.00TL |

EK 5 Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Proje kapsamında alınması planlanan ELISA okuyucusu yerine Biyoteknoloji Enstitüsü merkez laboratuvarında bulunan Victor 3 spektrofotometresi iyileştirilerek BCA ve Bradford yöntemleriyle protein miktar tayini yapabilen 560-595 nm aralıklarında ölçüm yapan filtre alınmıştır. Filtre henüz teslim alınmadığından bu proje kapsamında kullanılamamış ancak Biyoteknoloji enstitüsü merkez laboratuvarında bundan sonra yapılacak tüm projelerde ELIS okuyucusuna muadil olarak kullanılabilir.

Ayrıca bu proje kapsamında alınan 6'lı SDS-PAGE jel elektroforezi sistemi de henüz teslim alınmadığından bu proje kapsamında kullanılamamış ancak Biyoteknoloji Enstitüsü merkez laboratuvarında gerçekleşecek tüm proje çalışmalarında özellikle iki boyutlu jel elektroforezi ile protein profillemesi çalışmalarında kullanılabilir.

EK 6 Sunumlar:



TURKISH JOURNAL OF HEMATOLOGY

The Official Journal of the Turkish Society of Hematology

ISSN 1300-7777





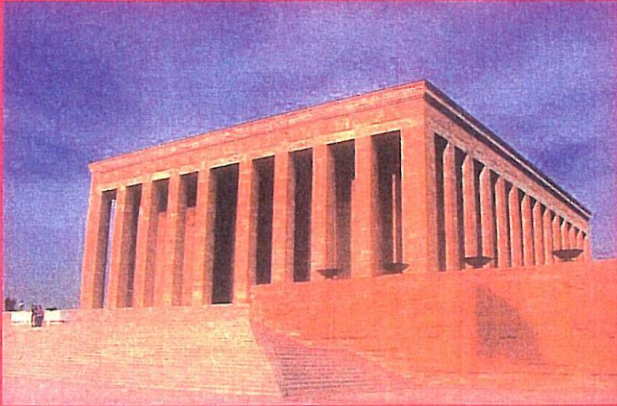
E6

Vol. 24 • No: 4 • 2007
Supplement 1

40. yıl

**Türk Hematoloji Derneği
33. Ulusal Kongresi**
16-19 Ekim 2007
Sheraton Otel,
Ankara, Türkiye

**Turkish Society of Hematology
33. Annual Meeting**
October 16-19, 2007
Sheraton Hotel,
Ankara, Türkiye



Published Quarterly • Üç Ayda Bir Yayınlanır

olan faktör V leiden (FVL) gen mutasyonu ve protrombin gen (PTH A20210) mutasyonları önemli rol oynamaktadır. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HKHT) sonrası sık görülen trombotik komplikasyonlar arasında kateter trombozu, pulmoner emboli ve derin ven trombozu yer almaktadır. Bu çalışmanın amacı allojenik-HKHT öncesi PC, PS, AT-III eksikliği, ve FVL ve PTH gen mutasyonunun transplantasyon sonrası erken ve geç dönem tromboembolik (TE) ve karaciğer sinoidal obstruksiyon sendromu (SOS) gelişimi üzerine etkisini değerlendirmektir. Kliniklerimizde allo-HKHT hazırlık için hastalarda trombofilik testleri rutin olarak bakılmaktadır. Nisan 1999-Ocak 2007 tarihleri arasında allojenik-HKHT yapılan 260 hastada (E/K: 145/115, ortanca yaş: 34 yıl) trombofilik varlığı ile TE ve karaciğer SOS gelişme sıklığı arasındaki ilişki olup-olmadığı değerlendirildi. İkizleldirdi hasta HLA uygun kardeş vericiden, 6 hasta HLA uygun akraba dışı vericiden allojenik HKHT (Periferik kan: 208, Kemik iliği: 52) yapılmıştı. Yüzdoksan dört hasta myeloablantif ve 66 hasta indirgenmiş yoğunlukta hazırlama rejimi almıştı. PC, PS ve AT-III aktivite düzeyi %50'nin altında görülmeye sıklığı sırası ile %5,8 (12/206), %15,7 (32/204) ve %25,4 (66/260) 'dı. Gen mutasyonu çalışılan 198 hastanın 23'ünde (%11,6) FVL (n=14) veya PTH (n=9) gen mutasyonu saptandı. Hastalarımızın hiçbirinde FVL-PTH mutasyonu birlikte pozitif değildi. Transplantasyon esnasında ve sonrasında 24 hastada venöz TE (17'si kateter ilişkili, 2 pulmoner emboli ve 5 derin ven trombozu), 23 hastada karaciğer SOS (SOS), bir hastada erken dönemde myokard enfarktüsü izlendi. PC aktivitesi düşük olan (< %50) 12 hastadan 4'ünde kateter ilişkili tromboz ve 1'inde karaciğer SOS gözlemlendi. Genetik mutasyonu olan hastaların 6 (%26) 'sında bir TE komplikasyonu (5 hastada santral venöz kateter ilişkili, 1 hastada PE) geliştiği görüldü. FVL mutasyonu olan 14 hastada 4'ünde kateter ilişkili tromboz, PTH mutasyonu olan 9 hastadan 1'inde kateter ilişkili ve diğer bir hastada pulmoner emboli gözlemlendi. Genetik mutasyonu olan yalnızca 1 hastada karaciğer SOS görüldü, ve bu hastada PTH gen mutasyonu heterozigot pozitif idi. Bu çalışma PC düşüklüğü veya genetik mutasyonu olan hastalarda transplantasyon sonrasında tromboemboli gelişme sıklığının arttığı (sıra ile, OR: 6,9 ve 3,7) ancak karaciğer SOS gelişimi üzerine bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, genetik mutasyonu olan hastalarda transplantasyon döneminde tromboprolifaksi verilmesi tartışmalı olup, vaka-kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

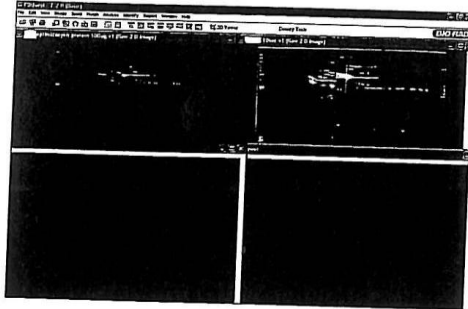
Bildiri: 42

Sözel No: S0042

PROTHROMBİN G20210A GEN DEĞİŞİMİ İLE PROTROMBİN KOMPLEKS PROTEİNLERİ VE PLAZMA PROTEİNLERİ DEĞİŞİMLERİNİN PROTEOMİK ANALİZLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ; Duygu Özel Demiralp, Nejat Akar, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prothrombin geninde 20210 pozisyonundaki G/A mutasyonu, mRNA'da 3' okunmayan poliadenilasyon bölgesini etkilemektedir. Venöz tromboembolizm için risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Günümüzde mRNA çalışmalarını ile tek bazlık bu değişimin neden bu denli önemli bir risk faktörü olarak karşımıza venöz tromboemboli tablosunda çıktığını, artmış yarılma tanımı bölgeleri ve değişen 3' yarılma/poliadenilasyon reaksiyon bölgesinin lokalizasyonu ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Ancak bu gen değişimini taşıyan ve taşımayan bireyler arasındaki farklılık tam olarak ortaya konulamamıştır. Genel popülasyona göre trombofilik hastalarda prothrombin

20210 G/A mutasyonu taşıma sıklığı %1-2/%6-12 olarak bilinmektedir. Venöz tromboemboli için 3-5 kat risk getirmektedir. Mutasyonun tromboz için plazma prothrombin seviyesinin artışına bağlı olarak etken olduğu önceleri düşünülmüş olsa da yapılan çalışmalar ile bu durumun tüm mutasyon taşıyan bireyler için gösterilememiş olması translyon aktivitesini etkileyecek farklı faktörlerin olduğunu düşündürmektedir. Bu farklılıkların ortaya konması amacı yapılan proteomik çalışmasına 2 prothrombin 20210 G/A mutasyonu taşıyan birey ve 2 kontrol bireyi dahil edilmiştir. EDTA'lı tüplere alınan 5 cc. kan örnekleri plazmaları ayrılarak, proteinlerinin basılanması amacı ile albumin ve Immüoglobulin serileri dahil, plazma seviyesi yüksek 20 temel protein için filtrelenerek (Sigma, ABD) iki boyutlu temel protein için getirilmiştir. 2D jel elektroforezi için 3-10 pH aralıklı IPG stripleri kullanılmıştır (Bio Rad, ABD). %12'lik SDS-PAGE ile ikinci boyutları tamamlanan örnekler Prothrombin 20210 G/A mutasyonunu taşıyan ve taşımayan bireyler açısından karşılaştırılmış ve protein profillerinde oluşan farklılıklar ortaya konulmaya çalışılmıştır. Üç boyutlu protein analizleri için PDquest programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirilerek farklı protein spotları MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanmış ve lazer bazlı iyonlaşmaya dayanan teknik ile en hafif izotopik kütle tayini yapılmıştır. PLGS programı ile Swiss-Prot data bankasına bağlanarak pH ve Kütle değerleri göre farklılıklar tanımlanmıştır. Sonuç olarak prothrombin 20210 G7A mutasyonunun prothrombin seviyesini taşıyan taşıyıcı bireyde artmadığı ancak verilerdeki kütle farklılıklarının glikolizasyondaki artışa bağlı olabileceği tespit edilmiştir.



Bildiri: 43

Sözel No: S0043

REKOMBİNANT FAKTÖR VIII KULLANAN ÇOCUK HEMOFİLİ-A HASTALARINDA İNİHİTÖR GELİŞME RİSKİNİN ARAŞTIRILMASI; Can Balkan, Deniz Yılmaz Karapınar, Mehmet Alan, Kaan Kavaklı, Ege Üniversitesi Çocuk Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı

İnhibitor gelişimi ağır hemofili-A tanılı hastalarda en sık rastlanan ve en çok sorun yaratan komplikasyon olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Yurdumuzda THD-Hemofili Alt Komitesi tarafından 1057 hemofili-A hastasında yapılan "İnhibitor tarama projesi" sonrası elde edilen rakamlar Hemofili-A grubu için %14 iken, ağır hemofili-A grubunda %21 bulunmuştur. Ege Hemofili Merkezi son 10 yılda yaptığı değerlendirmede ise 384 hemofili-A hastasında inhibitör saptanma prevalansı

%20 bulmuş düşük oranda piyasama kayma yıldır rek lanılmakt faktör ka geliştiğinda yapırl bulunma lanırken li-A hast ilgili ara Yurdum FS/Baye sonund sistemini sayda h Ege Herri yoğun p periyodd kullanm yapılan Hastalar yıldır. Hi uygulan bitör tar sonrası kadar l ma gün olmuş v testi uy tada in prospek çalışma yeni in bulunm rekomb saycağın

Bildiri: 44

SUBKUL

FIBRİN

Alanoğlu

Numar

tesli İç

Isparta

Dalı, 3E

Her

kardiyoc

ile birli

kuller r

tedavis

miş hi

miş FV

çalışılın

etkisin

hipotiri

ri açıs

sonucu

ve kot

tersi l

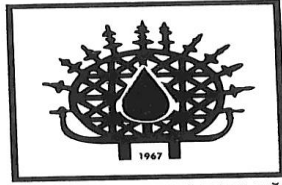
hastal

çalışım

(TAFI)

bir ka

THD'nin
40. Yılı



TÜRK HEMATOLOJİ DERNEĞİ

33. ULUSAL HEMATOLOJİ KONGRESİ

16-19 Ekim 2007
Sheraton Otel Kongre Merkezi
ANKARA

DUYGU DEMİRALP

*16 - 19 Ekim 2007 tarihlerinde
Türk Hematoloji Derneği'nin düzenlediği
33. Ulusal Hematoloji Kongresi'ne katılmıştır.*

*Doç. Dr. Mutlu Arat
Kongre Sekreteri*

*Prof. Dr. Muhit Özcan
Kongre Başkanı*

EK 7 Yayınlar ve Tezler

Tez

Afsar ABBASİ TAGHİDİZAJ, 10.7.2010. Venöz Tromboembolizme Proteomik Yaklaşım, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi