

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

MULTİPLE MYELOMA (PLAZMA HÜCRE KANSERİ)'NİN SPEKTROMETRİK VE
SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

Beycan AYHAN

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. F. Duygu Özel DEMİRALP

AĞUSTOS
2013

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmamın; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

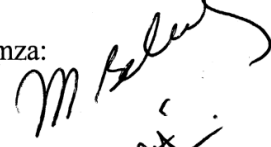
Beycan AYHAN



Doç. Dr. F. Duygu Özel DEMİRALP danışmanlığında, Beycan AYHAN tarafından hazırlanan bu çalışma 12/08/2013 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Meral BEKSAÇ

İmza:



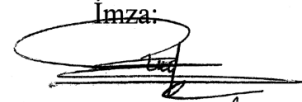
Üye :Doç. Dr. F.Duygu Özel DEMİRALP

İmza:



Üye :Doç. Dr. Murat KASAP

İmza:



Üye :Yrd. Doç. Dr. Klara DALVA

İmza:



Üye :Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN

İmza:

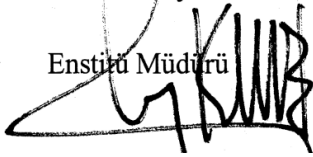


Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Adı Soyadı

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü



ÖZET

Doktora Tezi

Multiple Myeloma (Plazma Hücre Kanseri)'nin Spektrometrik ve Spektroskopik Yöntemler ile Araştırılması

Beycan AYHAN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç. Dr. F. Duygu Özel DEMİRALP

Multipl myelom (MM), kemik iliğinden köken alan ve immün sisteminin önemli bir parçası olan plazma hücrelerinin anormalleşmesi ve kontrolsüz çoğalması ile meydana gelen bir kanser türüdür. Kan ile ilgili en yaygın görülen ikinci kanserdir ve kanserleşmiş plazma hücrelerinin kemik iliğinde yayılması, kemik ağrıları, litik kemik bölgeleri, kolay enfeksiyona yakalanma, kanda yüksek düzeyde kalsiyum ve monoklonal (M) protein seviyesi, böbrek yetmezliği ve anemi ile karakterize edilir. Belirsiz monoklonal gamopati (Monoclonal gammopathy of undetermined significance/MGUS) ve sessiz myelom (Smoldering Multiple Myeloma/SMM) MM'nin öncüsü olarak kabul edilen myelom tipleridir.

Bu tez kapsamında, Ankara Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı'nda, MGUS, SMM ve MM tanısı konulmuş bireylerden rutin işlemler için alınmış kemik iliği, serum ve idrar örneklerinden artan materyaller kullanılmıştır. Kemik iliği örneklerindeki plazma hücreleri Whole Blood CD138 Microbeads (130-093-062) kullanılarak izole edilmiş ve proteomik çalışmalara başlanmıştır.

Proteomik çalışmalarla plazma hücrelerinden proteinler izole edildikten sonra hastalığa yeni yakalanmış bireyler kemik iliğinden bulunan plazma hücreleri yüzdelere göre, 0-9, 10-20 ve +20 olarak havuzlanmıştır. 2-D jel elektroforezi kullanılarak grupların protein profilleri çıkarılmış ve PDQuest analiz programı kullanılarak gruplar birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında önemli oranda farklılık gösteren protein kümeleri jellerden kesilip, tripsin ile peptidlerine ayrılmış ve Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) kütle spektrometresi Peptid Kütle Parmakizi (PMF) analizi yapılmıştır. Bu protein kümeleri içinde Mascot yazılımı ile protein katlanmalarında, Apoptotik yolun inhibisyonunda, Ca^{+2} metabolizmasında ve hücre proliferasyonunda önemli rolleri olan dokuz protein tanımlanmıştır. Gruplara göre önemli ifade farklılıkları gösteren proteinler; Kalretikulin, Protein disülfid izomeraz(PDIA1), Endoplazmin, MZB1(Marginal zone B and B1 cell specific protein/pERp1), Aktin sitoplazmik1(ACTB), Miyeloblastin, Thioredoxin domain-containing protein 5 (TXNDC5), Peroksiredoksin-4 ve Apoptosis regulator B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)'dir.

Ayrıca Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi ile yapılan çalışmalarda idrar örnekleri genel spektrumlarında 5 bölgede, serum örneklerinde ise Amid 1 spektrum bölgesi ikincil protein yapılarında önemli farklılıklar saptanmıştır.

2013, 131 sayfa

Anahtar Kelimeler: FTIR, MALDI-TOF, MGUS, Multipl Myelom, Plazma hücreleri, 2-D jel elektroforezi

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Spectrometric and Spectroscopic Investigation of Multiple Myeloma

Beycan Ayhan

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Doç. Dr. F. Duygu Özel DEMİRALP

Multiple myeloma (MM) is a type of cancer that is mainly caused by abnormality and uncontrolled proliferation of bone marrow-derived plasma cells which are important parts of the immune system. It is the second most common blood cancer type and characterized by the clonal expansion of malignant plasma cells in the bone marrow, bone pain, lytic bone lesions, susceptibility to infections, high levels of calcium and monoklonal (M) protein in blood, renal failure and anemia. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and Smoldering Multiple Myeloma (SMM) are type of myelom that are known as precursor of MM.

In this research, residual bone marrow, serum and urine samples were collected from MGUS, SMM and Multiple Myeloma patients that are taken for the purpose of routine processes at Ankara University Hematology Department. Plasma cells in the bone marrow were isolated by Whole Blood CD138 Microbeads (Miltenyi Biotech) and after that proteomics studies was started.

In the proteomic studies, after the protein extraction was carried out using plasma cells obtained from the individuals who were recently diagnosed, the protein samples were pooled as 0-9, 10-20 and +20 according to percentage of plasma cell in the bone marrow. By using two dimensional gel electrophoresis, protein profiles were obtained from the groups and gel comparisons were performed by PDQuest (Bio-Rad) gel analyzing software. Protein spots showing significant differences were determined by comparing the groups and they were excised from gels, digested into their peptides using trypsin and PMF (Peptide Mass Fingerprinting) analyses were carried out in MALDI-TOF mass spectrometer. Among these protein spots, nine proteins having significant role in protein folding, inhibition of the apoptotic pathway, Ca⁺² metabolism and cell proliferation were identified by using Mascot. These proteins showing different expression among groups are; Calreticulin, Protein disulfide isomerase(PDIA1), Endoplasmin, MZB1(Marginal zone B and B1 cell specific protein/pERp1), Actin cytoplasmic1(ACTB), Myeloblastin(Leukocyte proteinase3), Thioredoxin domain-containing protein 5(TXNDC5), Peroxiredoxin-4 and Apoptosis regulator B-cell lymphoma 2 (Bcl-2).

Additionally, in the studies carried out by using FTIR spectroscopy, the general spectrums showed differences at five regions in urine samples, and secondary protein structures showed differences at amide 1 spectrum region in serum.

2013, 131 pages

Keywords: FTIR, MALDI-TOF, MGUS, Multiple Myeloma, Plasma Cells, 2-D gel elektrophoresis

ÖNSÖZ

Bu çalışmada proteomik temelli spektrometrik çalışma yöntemleri ve FTIR spektroskopisi kullanılarak bir tür kemik iliği kanseri olan Multipl Myelom'un tanı, tedavi ve gelişiminde rol oynayabilecek biyobelirteçlerin bulunması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda Türkiye'deki hastalara ait plazma hücrelerinin protein profilleri çıkarılmış ve hastalıkla ilgili olduğu düşünülen protein kümeleri saptanmıştır. Ayrıca FTIR spektroskopisi yöntemi kullanılarak, serum ve idrar örnekleri de analiz edilmiş ve erken dönem tanıya yönelik kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

Çalışma 111S337 numaralı 1002 projesi olarak Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, tez çalışmalarım da bilgisiy le ve önerileriyle beni yönlendiren ve laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. F.Duygu ÖZEL DEMİRALP'e,

Tez çalışmalarım süresince bana engin bilgileriyle katkıda bulunan ve tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Meral BEKSAÇ'a,

Doktora tez çalışmama desteklerinden dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK, Yrd. Doç. Dr. Klara DALVA ve Yrd. Doç. Dr. Engin DORUK'a,

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Naşit İĞCİ, Selen PEKER, Hatice YILDIZHAN, Aslınur YALINKILIÇ, Didem ÖZDEMİR, Seçil KARAHİSAR, Pınar BARKAN, Duygu ÖZÜ ve Yekta FERNANDEZ'e

Tez çalışmamın deneysel aşaması için her türlü imkan ve olanakları bana açan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı çalışanlarına,

111S337 numaralı 1002 projesi kapsamında verdiği maddi desteğinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK)'na

Eğitimim süresince gösterdikleri destek, anlayış ve hoşgörü için sevgili dostlarıma, sevgili aileme, eşim Kamuran Ayhan ve canım kızım Lusinya' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beycan AYHAN

ANKARA, Ağustos 2013

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
ÖNSÖZ	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XIII
SİMGELER DİZİNİ	XIV
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Amaç.....	2
2 KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Myelom.....	3
2.1.1 Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance(MGUS).....	3
2.1.2 Aseptomatik Myelom (Smoldering Myelom/ SMM).....	3
2.1.3 Semptomatik myelom	4
2.2 Multipl Myelom.....	4
2.2.1 Multipl Myelom'un görülme sıklığı.....	5
2.2.2 Multipl myelom tanı kriterleri ve evreleme sistemleri	6
2.2.3 Multipl myelom'a yakalanma riskini artıran faktörler	8
2.2.4 Multipl Myelom'un belirti, bulgu ve nedenleri.....	9
2.3 Proteomik.....	12
2.3.1 Kütle Spektrometreleri	16
2.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy/FT-IR).....	19
2.5 Literatür Özeti.....	21
2.5.1 Multipl myelom.....	21
2.5.1.1 Multipl Myelom'un belirtileri ve tanısı (Diagnosis).....	21
2.5.2 Multipl myelom ile ilgili proteomik çalışmalar.....	24
2.5.3 Multipl myelom ile ilgili FT-IR çalışmaları.....	25
3 GEREKÇE VE AMAÇ.....	26
3.1 Hipotez	26
4 MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
4.1 Materyal.....	27
4.2 Yöntem	29
4.2.1 Plazma hücrelerinin kemik iliğinden izole edilmesi	29
4.2.2 Plazma hücrelerinden protein izolasyonu.....	31
4.2.3 Protein miktar tayini (BRADFORD)	31
4.2.4 Proteinlerin saflaştırılması/ayırıştırılması (İki yönlü jel elektroforezi/2-DE)	33
4.2.5 Jel üzerindeki proteinlerin tespiti/boyama(Oriole Fluorescent Gel Stain)	35
4.2.6 Jellerin görüntüsünün alınması (VERSA DOC).....	35
4.2.7 Jellerin analizi (PDQUEST 8.0.1).....	35

4.2.8	Jel üzerinden protein kümelerinin kesilmesi ve proteinlerin tripsin ile peptitlerine ayrılması (Protein eldesi/kazanımı).....	36
4.2.9	Kütle Spektrometresi cihazında (MALDİ-TOF MS) peptit kütlelerinin belirlenmesi. 36	
4.2.10	Biyoinformatik analiz.....	38
4.2.11	Materyal ve Yöntem(FT-IR)	40
4.2.11.1	Materyal	40
4.2.11.2	Yöntem	40
5	BULGULAR	43
5.1	Proteomik(Spektrometrik) Çalışmalar	43
5.1.1	Kütle Spektrometrisi ile kimliklendirmesi(tanımı) yapılan protein kümeleri	50
5.1.1.1	0706 numaralı protein kümesi-Kalretikulin	52
5.1.1.2	1606 numaralı protein kümesi-Protein disulfide isomerase	56
5.1.1.3	1904 numaralı protein kümesi-Endoplazmin	60
5.1.1.4	2011 numaralı protein kümesi-Marginal Zone B and B1 cell specific protein	64
5.1.1.5	2507 numaralı protein kümesi- Aktin	68
5.1.1.6	2508 numaralı protein kümesi	72
5.1.1.7	3108 ve 3110 numaralı protein kümeleri	76
5.1.1.8	8110 numaralı protein kümesi(Miyeloblastin).....	84
5.2	FT-IR (Spektroskopik) Çalışmalar.....	88
5.2.1	Serum	88
5.2.2	24 saatlik idrar örnekleri	90
5.2.2.1	Durumu deney aşamasında bilinmeyen (kör) üç örneğin yeni yöntem ile tanımlanması..	94
5.2.2.2	Belirlenen yöntem ile hastalık seyri takibi.....	95
6	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	98
6.1	Proteomik.....	98
6.2	FT-IR.....	111
6.3	Tartışma ve Sonuç Özet.....	114
KAYNAKLAR.....		116
EKLER		122
EK 1 Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu Değerlendirme Formu		122
ÖZGEÇMİŞ		124

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kan hücrelerinin oluşumu. Kemik iliğindeki kök hücresi çeşitli aşamalardan sonra kırmızı kan hücreleri, pelletleri ve beyaz kan hücrelerini oluştururlar ²	5
Şekil 2.2. Antikor yapısı. Birbirlerine benzeyen iki ağır (H) iki tane de hafif (L) zincirden oluşur.....	10
Şekil 2.3. Plazma hücreleri ve kemik hücreleri arasındaki madde döngüsü ¹³	12
Şekil 2.4. İnsan Proteomu ¹⁸	13
Şekil 2.5. Proteomun tarihsel gelişimi ¹⁹	15
Şekil 2.6. MALDI lazer ışınının katı matriksi uyarması ve analitleri iyonize etmesi ²⁰	17
Şekil 2.7. İki peptid arasındaki amid bağında bulunan C=O ve N-H bağlarının kızılötesi ışığı soğurması ve bu soğurmanın sinyal olarak gösterilmesi	20
Şekil 4.1. a) Protein assay ve 96 kuyucuklu plaka, b) Elisa okuyucusu.....	33
Şekil 4.2. Kalibrasyon peptitlerinin MALDI-TOP MS spektrumu.	38
Şekil 4.3. Mascot yazılımı peptid araştırma arayüzü.....	39
Şekil 5.1. Protein miktar tayini A) Örneklerin plakaya yüklenme sırası B) Standartların OD değerleri C) Örneklerin OD değerleri ve protein miktarları, D) Standart grafik	46
Şekil 5.2. 0-9 grubuna ait 2-DE jel protein profili (Protein profileleri analiz edilen jel bölgelerini içirmektedir. Bu nedenle marker bölgeleri de dâhil olmak üzere analize alınmamış bölgeler görülmemektedir)	46
Şekil 5.3. 10-20 grubuna ait 2-DE jel protein profili	47
Şekil 5.4. +20 grubuna ait 2-DE jel protein profili.....	47
Şekil 5.5. PDQuest programında küme(spot) eşleştirilmesi (matchset) sonucu bulunan protein spotları ve deneysel değerler.....	48
Şekil 5.6. 0-9 grubu ile 10-20 grubunun karşılaştırmalı analizi sonucu ortaya çıkan serpm çizim (scatter plot) verileri.	49
Şekil 5.7. 0-9 grubu ile +20 grubunun karşılaştırmalı analizi sonucu ortaya çıkan serpm çizim (scatter plot) verileri	49
Şekil 5.8. 10-20 grubu ile +20 grubunun karşılaştırmalı analizi sonucu ortaya çıkan serpm çizim (scatter plot) verileri	50
Şekil 5.9. 0706 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi C) Protein kümelerinin üç boyutlu görünümü....	52
Şekil 5.10. 0706 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması	53
Şekil 5.11. 0706 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri	53
Şekil 5.12. 0706 numaralı protein kümesinde mascot yazılımı araştırması sonucu tespit edilen protein.....	54

Şekil 5.13. 0706 numaralı protein kümesinden tespit edilen Kalretikulin proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları	55
Şekil 5.14. 1606 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü	56
Şekil 5.15. 1606 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.	57
Şekil 5.16. 1904 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDİ TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri	57
Şekil 5.17. 1606 numaralı protein kümesinde mascot yazılımı araştırması sonucu tespit edilen protein.....	58
Şekil 5.18. 1606 numaralı protein kümesinden tespit edilen Endoplazmin proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları	59
Şekil 5.19. 1904 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü	60
Şekil 5.20. 1904 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.	61
Şekil 5.21. 1904 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDİ TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri	61
Şekil 5.22. 1904 numaralı protein kümesinin mascot araştırma sonucu	62
Şekil 5.23. 1904 numaralı protein kümesinden tespit edilen Endoplazmin proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları	63
Şekil 5.24. 2011 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi, C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü	64
Şekil 5.25. 2011 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.	65
Şekil 5.26. 2011 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDİ TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri	65
Şekil 5.27 2011 numaralı protein kümesinin mascot araştırma sonucu	66
Şekil 5.28. 2011 numaralı protein kümesinden tespit edilen MZB1 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları.....	67
Şekil 5.29. 2507 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü	68
Şekil 5.30. 2507 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması	69

Şekil 5.31. 2507 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDİ TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri	69
Şekil 5.32. 2507 numaralı protein kümesinin mascot araştırma sonucu	70
Şekil 5.33. 2507 numaralı protein kümesinden tespit edilen Aktin proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları.....	71
Şekil 5.34. 2508 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi, C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü	72
Şekil 5.35. 2508 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması	73
Şekil 5.36. 2508 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDİ TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri	73
Şekil 5.37. 2508 numaralı protein kümesinin mascot araştırma sonucu	74
Şekil 5.38. 2508 numaralı protein kümesinden tespit edilen Thioredoxin domain-containing protein 5 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları	75
Şekil 5.39 3108 ve 3110 numaralı protein kümeleri. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir, B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü.	76
Şekil 5.40 3108 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması	77
Şekil 5.41. 3110 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması	77
Şekil 5.42. 3108 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDİ TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri	78
Şekil 5.43. 3110 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDİ TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri	78
Şekil 5.44. 3108 numaralı protein kümesindene elde edilen peptitlerin mascot araştırma sonucu.....	79
Şekil 5.45. 3108 numaralı protein kümesinden tespit edilen Peroksiredoksin-4 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları	80
Şekil 5.46. 3110 numaralı protein kümesindene elde edilen peptitlerin mascot araştırma sonucu.....	81
Şekil 5.47. 3110 numaralı protein kümesinden tespit edilen Peroksiredoksin-4 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları	82
Şekil 5.48: 3110 numaralı protein kümesinden tespit edilen Apoptosis regülatör Bcl-2 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları.....	83

Şekil 5.49. 8110 protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir, B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi, C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü	84
Şekil 5.50. 8110 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması	85
Şekil 5.51. 8110 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDİ TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri	85
Şekil 5.52. 3110 numaralı protein kümesinden elde edilen peptitlerin mascot araştırma sonucu.....	86
Şekil 5.53. 8110 numaralı protein kümesinden tespit edilen Myeloblastin proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları	87
Şekil 5.54. 3500-800 dalga sayısı (cm ⁻¹) aralığında oluşan spektrumların genel görüntüsü. Grupların genel spektrumları birbirlerine benzemektedir.	88
Şekil 5.55. Grupların protein Amid 1 bölgesi ikincil yapı karşılaştırmaları ve intensite değerleri.....	89
Şekil 5.56. 3500-800 dalga sayısı (cm ⁻¹) aralığında oluşan spektrumların genel görüntüsü. Farkların görüldüğü spektrum bölgeleri oklarla işaretlendirilmiş ve numaralandırılmıştır.	91
Şekil 5.57. Analiz için kullanılan 1.bölge sinyalleri.....	92
Şekil 5.58. Analiz için kullanılan 3.bölge(Amid 1) sinyalleri.	92
Şekil 5.59. 10 numaralı bireyin farklı zamanlarda alınmış idrar örneklerinin genel spektrumlarının karşılaştırılması, sinyal oranlarına göre belirlenmiş tanıları(kırmızı ile gösterilmiştir)	97
Şekil 5.60. 03 numaralı bireyin farklı zamanlarda alınmış idrar örneklerinin genel spektrumlarının karşılaştırılması, sinyal oranlarına göre belirlenmiş tanıları(kırmızı ile gösterilmiştir)	97
Şekil 6.1. Kalretikulinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.....	99
Şekil 6.2. PD1A1'in gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.....	102
Şekil 6.3. PD1A1'in bulunduğu hücre bölgeleri ve işlevleri ⁶³	102
Şekil 6.4: Endoplazminin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.....	103
Şekil 6.5. MZB1 proteinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması	104
Şekil 6.6. Aktin'in gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.....	106
Şekil 6.7. TXNDC5 proteininin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.....	107
Şekil 6.8. A) Peroksiredoksin proteinin gruplara göre densite değerlerinin değişimi, B) Peroksiredoksin ve Bcl-2 proteininin gruplara göre densite değerlerinin değişimi ...	108
Şekil 6.9. Myeloblastin proteinin gruplara göre densite değerlerinin değişimi.....	110

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Plazma hücresi anormalliklerinin sınıflandırılması.....	4
Çizelge 2.2. Irklara ve toplumlara göre Multipl myelom'a yakalanma olasılığı* ⁵	6
Çizelge 2.3. Multipl myelom için kabul edilmiş Durie-Salmon ve Uluslararası evreleme sistemleri ^{5,7}	7
Çizelge 2.4. Multipl Myelom'da risk sınıflaması.....	8
Çizelge 2.5. Multipl Myelom'un belirtileri ve bu belirtilerin nedenleri(Multiple Myeloma Research Foundation, 2013'ten uyarlanmıştır ¹).....	11
Çizelge 4.1. 0-9 grubu. Kemik iliğinde plazma hücresi yüzdesi 0 ile 9 arasında olan örnekler.....	27
Çizelge 4.2. 10-20 grubu. Kemik iliğinde plazma hücresi yüzdesi 10 ile 20 arasında olan örnekler.....	28
Çizelge 4.3. +20 grubu. Kemik iliğinde plazma hücresi yüzdesi 20 ve üzeri olan örnekler (En ileri seviyede olduğu kabul edilen hasta grubu).....	28
Çizelge 4.4. 2-D jel elektroforezi için kullanılan gruplar ve gruplar ile ilgili veriler.....	34
Çizelge 4.5. MALDİ-TOF MS cihazının kalibrasyonunda kullanılan peptidler.....	37
Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan serum örnekleri.....	41
Çizelge 4.7. Çalışmada kullanılan idrar örnekleri	42
Çizelge 5.1. Kütle spektrometresi ile tanımı yapılan protein kümeleri ve bu kümelere ait bilgiler	51
Çizelge 5.2. 1700-1600 cm ⁻¹ spektrum aralığında (Amid 1 protein bölgesi) bulunan sinyallerin kaynaklandıkları protein alt yapıları.....	90
Çizelge 5.3. Şekil 5.56, 5.57 ve 5.58'te österilen 1 ve 3 numaralı bölgeye ait sinyal alan değerleri.....	93
Çizelge 5.4. Şekil 5.56, 5.57 ve 5.58'te gösterilen 1 ve 3 numaralı bölgeye ait sinyal intensite değerleri.....	93
Çizelge 5.5. Çizelge 5.3'te verilen 1 ve 3 numaralı bölgedeki sinyal alanlarının birbirlerine oranları.	94
Çizelge 5.6. Tanı için oluşturulmuş grup alan ve intensite aralıkları.....	94
Çizelge 5.7. Deneyler aşamasında durumu bilinmeyen 3 örneğin 1 ve 3 bölgedeki sinyal alanlarının oranı.....	95
Çizelge 5.8. Deneyler aşamasında durumu bilinmeyen 3 örneğin 1 ve 3 bölgedeki sinyal intensitelerinin oranı.....	96
Çizelge 5.9. Örnekler için sinyal oran aralığı ile belirlenen tanı ile kesin tanıların karşılaştırılması.	96
Çizelge 6.1. Tespit edilen proteinlerin fonksiyonları ve buldukları kümelerin densite değişimleri ⁹⁵	114

SİMGELER DİZİNİ

2-DE	Two-Dimensional Gel Electrophoresis
Cys_CAM	Sistein Karbomidometil
FISH	Floresan Insitu Hibridizasyon
FTIR	Fourier Transform Infrared
Ig	İmmünoglobulin
IgM	İmmünoglobulin M
ISS	International Staging System
M	Monoklonal protein
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MASCOT	Matrix Sciense
MGUS	Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance
MM	Multipl Myelom
MS	Mass Spectrometry
SMM	Aseptomatik Myelom/Smoldering Myelom
SSP	Sample spot protein
PCLI	Plazma Cell Labeling Index
PMF	Peptide Mass Fingerprint/Peptit Kütle Parmakizi
TOF	Time of Flight

1 GİRİŞ

Multipl myelom (MM), kemik iliğinden köken alan ve immün sisteminin önemli bir parçası olan plazma hücrelerinin anormalleşmesi ve kontrolsüz çoğalması ile meydana gelen bir kanser türüdür. Plazma hücreleri bağışıklık sisteminin en temel hücre gruplarından biri olan B lenfositlerinden köken alırlar. B lenfositler herhangi bir enfeksiyona maruz kalındığında değişime uğrayarak plazma hücrelerini oluştururlar. Plazma hücreleri ise immünoglobulin olarak adlandırılan antikorlar üreterek hastalık etkenlerini etkisiz hale getirilmesine yardımcı olurlar. MM kan ile ilgili en yaygın görülen ikinci kanserdir ve kanserleşmiş plazma hücrelerinin kemik iliğinde yayılması, kemik ağrıları, litik kemik bölgeleri, kolay enfeksiyona yakalanma, kanda yüksek düzeyde kalsiyum ve monoklonal (M) protein seviyesi, böbrek yetmezliği ve anemi ile karakterize edilir. Bazı durumlarda tanı sırasında kemik iliğinde klonal plazma hücreleri ve idrar ve/veya kanda düşük miktarda monoklonal antikor proteinleri saptanabilir ancak tümör oluşumu ve herhangi bir hastalık belirtisi görülmez, bu tür vakalar klonal plazma hücre yüzdelere ve M protein miktarlarına bağlı olarak Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) ya da Asemptomatik myelom (Smoldering myelom/ SMM) olarak adlandırılır. Tedavi gerektirmezler ancak tanı almış kişiler belirli aralıklarla kontrol edilirler.

Bu tez çalışmasında MM kanseri spektrometrik ve spektroskopik yöntemler ile incelenmiştir. Spektrometrik yöntemlerin temelini proteomik çalışmalar oluşturmaktadır. Proteomik çalışmalarla kemik iliğindeki plazma hücreleri yüzdesine bağlı olarak oluşturulan grupların karşılaştırmalı proteom analizi yapılmıştır. Karşılaştırma sonucu MM kanserinin gelişim özelliklerinin protein düzeyinde araştırılmış ve hastalıkla ilişkili protein değişiklikleri saptanmaya çalışılmıştır. Proteomik çalışmalara ek olarak Fourier Transform Infrared spektroskopisi (FTIR) yöntemi ile de kontrol(sadece idrarda), MGUS, SMM ve MM olarak gruplandırılarak serum ve idrar örnekleri analiz edilmiş, daha ucuz ve kolay bir tanı yöntemi ya da belirteç bulunmaya çalışılmıştır.

Proteomik çalışmalar ile Türkiye'deki hastaların protein profilleri ilk defa ortaya çıkarılmıştır. Bu profiller karşılaştırmalı olarak analiz edilerek hastalıkla ilgili olduğu düşünülen önemli proteinler tespit edilmiştir. Hastalıkla ilişkili (hastalık spesifik) bulunan bu proteinlerin tespit edilmesinin öncelikle tanı amacıyla, ileri aşamalarda ise yeni ilaç ve

tedavilerin geliştirilmesinde öncü rol oynayabileceği düşünülmektedir. MM kanserinin teşhis ve tedavisi ile ilgili her geçen gün yeni yöntemler ve teknikler geliştirilmekte beraber hala kolay, ucuz ve insanları rahatsız etmeyen bir yöntem arama çalışmaları sürmektedir. Bu tür bir yöntemin büyük oranda hastalığa özel belirteçlerin saptanması ile geliştirileceği düşünülmektedir. Bu nedenle daha iyi bir biyobelirteç ve tedavi şekli bulmak için proteomik yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Araştırmada, proteomik çalışmaların yanında MM hastalığının araştırılmasında FTIR spektroskopisi yöntemi de kullanılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu yöntemin kanserleri çok önceden daha moleküler düzeyde iken tespit edebileceğini göstermiştir. Araştırma, MM kanserinin araştırılmasında FTIR yönteminin kullanılması ile ilgili en geniş ve özgün araştırma niteliğindedir. Birkaç dar kapsamlı FTIR çalışması dışında, gerek kapsamı ve amacı, gerekse uygulanan yöntem açısından henüz literatürde böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tüm kanser tiplerinde olduğu gibi MM kanserinde de hastalığın erken teşhisi ve seyrinin takibi çok önemlidir. Teşhis ve tedavide de en önemli rolü biyobelirteçler oynamaktadır. Son yıllarda bazı önemli biyobelirteçler tespit edilse de hala literatürde ciddi bir boşluk vardır. Bu nedenle kullanışlı belirteçlerin tanımlanmasına ve hastalıkla ilişkili protein profil değişimlerinin ilgili oldukları moleküler mekanizmaların anlaşılmasına büyük bir ihtiyaç ve ilgi vardır. Yeni belirteçlerin bulunması hem hastalığın daha erken safhada teşhisinde hem de ileri de bir tedavi geliştirilmesinde yardımcı olacaktır.

1.1 Amaç

Tez kapsamındaki proteomik tabanlı spektrometrik çalışmalar ile; MM hastalarının protein profillerinin çıkarılması, gruplar arasından önemli değişim gösteren proteinlerin tespiti ve tanımlanması, gruplar arasında ayırımı sağlayacak belirteçlerin saptanabilmesi ve bu belirteçlerin hastalığın tanısı, evresi ve tedavisindeki rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

FTIR spektroskopisi kullanılarak hastalığın tanı ve tedavi sürecinin izlenmesinde kullanılabilecek yöntemler oluşturulmaya çalışılmıştır. Örnekler FTIR spektroskopisi ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiş ve hastalık derecesine bağlı olarak oluşmuş bir kısım karakteristik değişimler saptanmıştır. FTIR yöntemi oldukça ucuz, uygulanması kolay ve rutin uygulamalara çok elverişli olmasının yanında özellikle kanser hastalıklarını çok önceden (moleküler düzeyde değişikliklerden) saptayabilecek bir yöntemdir.

2 KURAMSAL TEMELLER

2.1 Myelom

Myelom terimi normal olmayan plazma hücreleri için kullanılır. Bu tip hücreler klonal plazma hücreleri yani kanserleşmiş hücreler olarak kabul edilirler. Myelom denince akla genellikle MM kanseri gelmekle birlikte, kanser olarak kabul edilmeyen ve tedavi gerektirmeyen ancak kanser riski barındıran bazı farklı myelom tipleri de (Çizelge 2.1) vardır.

Multiple Myeloma Research Foundation¹ (2013)'e göre, myelom 3 kategoride sınıflandırılabilir: Monoklonal gammopathy of undetermined significance(MGUS), Smoldering myelom olarak bilinen asemptomatik myelom(SMM) ve semptomatik myelom. Bu sınıflandırma önemlidir çünkü hastalığın türünün belirlenmesi gereksiz tedavi uygulamalarını önler. Terimlerin türkçe ifadeleri üzerinde henüz bir ortak karar alınmamış olsa da, genellikle MGUS için anlamı belirlenemeyen önemi olan monoklonal gamopati ya da benign monoklonal gamopati, SMM için sessiz ya da sinsi myelom, semptomatik myelom için ise aktif myelom ifadeleri kullanılmaktadır. MGUS ve SMM Multipl myelom'un öncül dönemleri olarak kabul edilebilirler çünkü bu tanılara sahip kişilerin hastalığa yakalanma oranları sağlıklı bireylere göre daha fazladır.

2.1.1 Monoklonal Gammopathy of Undetermined Significance(MGUS)

Bazı durumlarda tanı sırasında kemik iliğinde klonal plazma hücreleri ve idrar ve/veya kanda düşük miktarda monoklonal antikor proteinleri (M) saptanabilir ancak tümör oluşumu ve herhangi bir hastalık belirtisi görülmez, bu tür vakalar Monoklonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) olarak adlandırılır. Tedavi gerektirmez ancak tanı almış kişiler belirli aralıklarla kontrol edilirler.

2.1.2 Asemptomatik Myelom (Smoldering Myelom/ SMM)

Sinsi myelom MGUS'a benzer bulgular gösterir fakat klonal plazma hücreleri ve monoklonal protein oranları daha fazladır. Henüz bir tedavi uygulanmamakla birlikte

sinsi myelomun MGUS'a oranla semptomik myeloma yani multipl myeloma dönüşme olasılığı daha yüksektir. Bu tanıyı almış kişilerde belirli aralıklarla kontrol edilirler.

2.1.3 Semptomatik myelom

Klonal plazma hücreleri ve aşırı monoklonal proteinleri yanında, kanda yüksek kalsiyum düzeyi, böbrek yetersizliği, kansızlık ve kemik hastalıkları belirtilerinden en az biri daha görülüyorsa semptomatik myelom olarak adlandırılır. Sistemik tedavi gerektirir. Multipl myelom semptomatik myelom sınıfına girmektedir.

Çizelge 2.1. Plazma hücresi anormalliklerinin sınıflandırılması

MYELOM TİPİ	KRİTERİ
MGUS	Serum monoklonal protein < 3 g/dL Klonal kemik iliği plazma hücresi < %10 Herhangi bir hastalık bulgusu ya da organ hasarı yok
Asemptomatik myelom	Serum monoklonal protein > 3 g/dL Klonal kemik iliği plazma hücresi > %10 Herhangi bir hastalık bulgusu ya da organ hasarı yok
Semptomatik myelom	Serum ve/veya idrarda monoklonal protein bulunması* Klonal kemik iliği plazma hücresi > %10 Aşağıdaki organ hastalıklarından** en az biri var ✓ Kalsiyum yüksekliği > 10mg/L ✓ Böbrek fonksiyon bozukluğu- kreatinin >2mg/L ✓ Anemi- hemoglobin >10g/dL ✓ Kemik hastalıkları (litik lezyonlar, osteoporez)

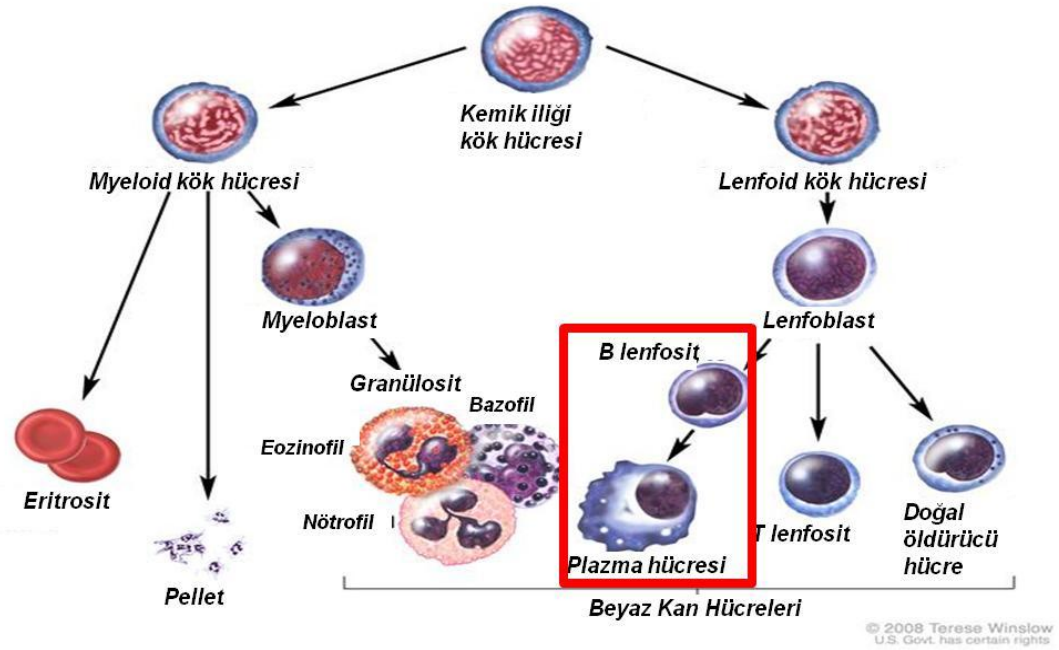
*Bu kriter non-sekretuar Multipl myelom için geçerli değildir

** Bu organ hasarları "CRAB" olarak adlandırılır(C-Calsium, R-Renal disfonksiyon, A-Anemi, B-Bone lesions).

2.2 Multipl Myelom

Multipl myelom, beyaz kan hücrelerinin bir grubu olan plazma hücrelerinin anormalleşmesi, kontrolsüz şekilde çoğalması ile meydana gelen kanser türüdür. Bu nedenle plazma hücresi kanseri olarak ta adlandırılır. Ayrıca MM'nin ilk detaylı klinik araştırmasını yayınlayan araştırmacı adına hitaben "Kahler hastalığı" olarak da adlandırılır.

Bağışıklık sisteminin en temel hücre gruplarından biri lenfositlerdir. Lenfositler T lenfositler ve B lenfositler olmak üzere 2 temel gruba ayrılırlar. Herhangi bir enfeksiyona maruz kalındığında B lenfositler değişime uğrayarak plazma hücrelerini oluştururlar (Şekil 2.1.). Plazma hücreleri ise immünoglobulin olarak adlandırılan antikorlar üreterek hastalık etkenlerini etkisiz hale getirilmesine yardımcı olurlar.



Şekil 2.1. Kan hücrelerinin oluşumu. Kemik iliğindeki kök hücresi çeşitli aşamalardan sonra kırmızı kan hücreleri, pelletleri ve beyaz kan hücrelerini oluştururlar².

Plazma hücreleri kanserleşip çoğalmaya başladıklarında plazmasitom olarak adlandırılan tümörü oluştururlar. Bu tümörler çoğunlukla kemik iliğinde bulunmalarına rağmen nadir olarak diğer dokularda da görülebilirler. Eğer plazmasitom sadece bir tane ise izole(soliter) plazmasitom, birde fazla ise MM olarak adlandırılır.

2.2.1 Multipl Myelom'un görülme sıklığı

Multipl Myelom nispeten nadir görülen bir kanser olmakla beraber batı dünyasında kan ile ilgili kanserler arasında en yaygın görülen ikinci kanser türüdür ve tüm kanser olguları içindeki oranı %1, kanserlerin neden olduğu ölümler içindeki oranı ise %2'dir³. Diğer hastalıklarda olduğu gibi MM hastalığı ile ilgili de en kapsamlı istatistiksel veriler gelişmiş

ülkelerdeki araştırmalara dayanmaktadır. American Cancer Society⁴ 2013'e göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde 2013 yılı içerisinde 22.350 yeni olgu meydana gelecek(12.440 erkek ve 9.910 kadın) yaklaşık 10.710 kişi hayatını kaybedecektir. İnsan ırkları ve toplumları arasında hastalığa yakalanma riski oranlarında önemli farklar bulunmaktadır(Çizelge 2.2) .

Çizelge 2.2. Irklara ve toplumlara göre Multipl myelom'a yakalanma olasılığı*⁵

İrk/Toplum	Multipl Myelom'a yakalanma olasılığı (100.000 kişi de)
ABD ortalaması	3 - 4
Siyah (Afrika kökenli ABD'li)	9.8
Kafkas kökenli ABD'li	4.3
Beyaz ırk (Batı ülkeleri)	4
Çin	<1

*Çizelge, Concise Review of the Disease and Treatment Options Multiple Myeloma kitapçığındaki bilgilere göre uyarlanmıştır.

2.2.2 Multipl myelom tanı kriterleri ve evreleme sistemleri

Multipl myelom için hastalığın seyrini (prognozunu) gösteren iki farklı sınıflama sistemi vardır. Uluslararası Evreleme Sistemi (International Staging System/ISS) ve eski olmasına rağmen hala kullanılan Durie-Salmon sınıflama sistemi(Çizelge 2.3). Bu iki sistem hastalığın seyri hakkında bilgi vermekle birlikte tedavi yöntemi hakkında bilgi verememektedir.

Son yıllarda hastalıkla ilgili genetik verilerin artması, bu verilerin sınıflandırma da kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bu veriler ışığında Mayo Klinik Grubu hastalığı standart risk ve yüksek risk olmak üzere iki gruba ayırmış ve her iki risk grubuna farklı tedavi yöntemleri uygulanmıřtır⁶. Çizelge 2.4'te gösterildiği gibi Plazma hücre Floresan İn situ Hibridizasyon (FISH), metafaz sitogenetiği ve plazma hücre döngüsü (plazma cell labeling index/PCLI) testlerinin sonuçlarına göre yüksek risk grubu belirlenmektedir.

Çizelge 2.3. Multipl myelom için kabul edilmiş Durie-Salmon ve Uluslararası evreleme sistemleri^{5,7}

EVRE	Uluslararası Evreleme Sistemi (International Staging System, ISS)	Durie-Salmon Evreleme Sistemi*
I	Serum β -2 mikroglobin <3.5 mg/L Albumin >3.5 g/L	Aşağıdaki tüm kıstaslar olmalı <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hemoglobün seviyesi >10mg/dl ✓ Serum kalsiyum seviyesi normal ✓ Normal kemik yapısı ✓ Monoklonal protein seviyesi düşük <ul style="list-style-type: none"> ➤ Ig G <5g/dl* ➤ Ig A <3g/dl ➤ İdrarda hafif zincir <4g/24 saat**
II	Serum β -2 mikroglobin <3.5 mg/L Albumin <3.5 g/L veya Serum β -2 mikroglobin 3.5-5.5 mg/L	I ve III. evreye uymayanlar
III	Serum β -2 mikroglobin >5.5 mg/L	Aşağıdaki kıstaslardan en az biri <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hemoglobün seviyesi <10mg/dl ✓ Serum kalsiyum seviyesi >12mg/dl ✓ En az 3 bölgede kemik hasarı ✓ Monoklonal protein seviyesi yüksek <ul style="list-style-type: none"> ➤ Ig G >7g/dl* ➤ Ig A >5g/dl ➤ İdrarda hafif zincir <12g/24 saat**

*Ig=Imminogloblin.

**Bence-jones proteini.

Çizelge 2.4. Multipl Myelom'da risk sınıflaması

Standart Risk (%75)	Yüksek Risk (%25)
<ul style="list-style-type: none">✓ Aşağıdaki olguları<ul style="list-style-type: none">➤ Hiperdiploid➤ t(11;14)➤ t(6;14)	<ul style="list-style-type: none">✓ FISH<ul style="list-style-type: none">➤ Del 17p➤ t(14;14)➤ t(14;16)✓ Sitogenetik Delesyon 13✓ Sitogenetik hipodiploidi✓ PCLI > %3

2.2.3 Multipl myelom'a yakalanma riskini artıran faktörler

Araştırmalar bazı etmenlerin Multipl myelom'a yakalanma riskini arttırdığını göstermiştir. Çalışmalarda tespit edilen önemli risk etmenleri aşağıda sıralanmıştır².

Yaş : Bu hastalığa yakalananların büyük çoğunluğu 65 yaş üzerindedir. Bu durum yaşlanmanın Multipl myelom'a yakalanmada en önemli etmen olduğunu göstermektedir. Multiple Myelom Research Foundation¹, 2013'e göre hastaların %96'sı 45 yaşın, %75'i ise 70 yaşın üzerindedir.

İrk : Amerikan toplumu içinde siyah ırkın(Afrika kökenli) beyaz ırka göre hastalığa yakalanma riski 2 kat fazladır. Asya kökenli Amerikalılar ise en düşük orana sahiptir⁴. Şu anda ki veriler, Çinde yaşayanların en düşük yakalanma olasılığına sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 2.2).

Cinsiyet: Erkeklerin kadınlara göre MM'ye yakalanma riski daha fazladır. Bu oran yaklaşık 1.25/1'dir⁵. Amerika birleşik devletlerinde 2013 yılı içerisinde tahminen 22.350 yeni vaka beklenmektedir. Bunlardan 12.440 tanesinin erkek 9.910 tanesinin ise kadın olacağı tahmin edilmektedir⁴.

MGUS ya da SMM tanısı almak: Yapılan araştırmalar sonucu MM'ye dönüşme riskleri MGUS için %1, SMM için %10 olarak bildirilmiştir⁸. Sağlıklı bireyler için yakalanma

olasılığının en yüksek olduğu siyah ırkta bile risk yaklaşık 100.000'de 10 civarındadır(Çizelge 2.2). Tüm sağlıklı insanlar için MM'ye yakalanma olasılığını 100.000'de 4 olarak kabul edersek, MGUS 250 kat, SMM ise 2500 kat daha fazla risk taşımaktadır.

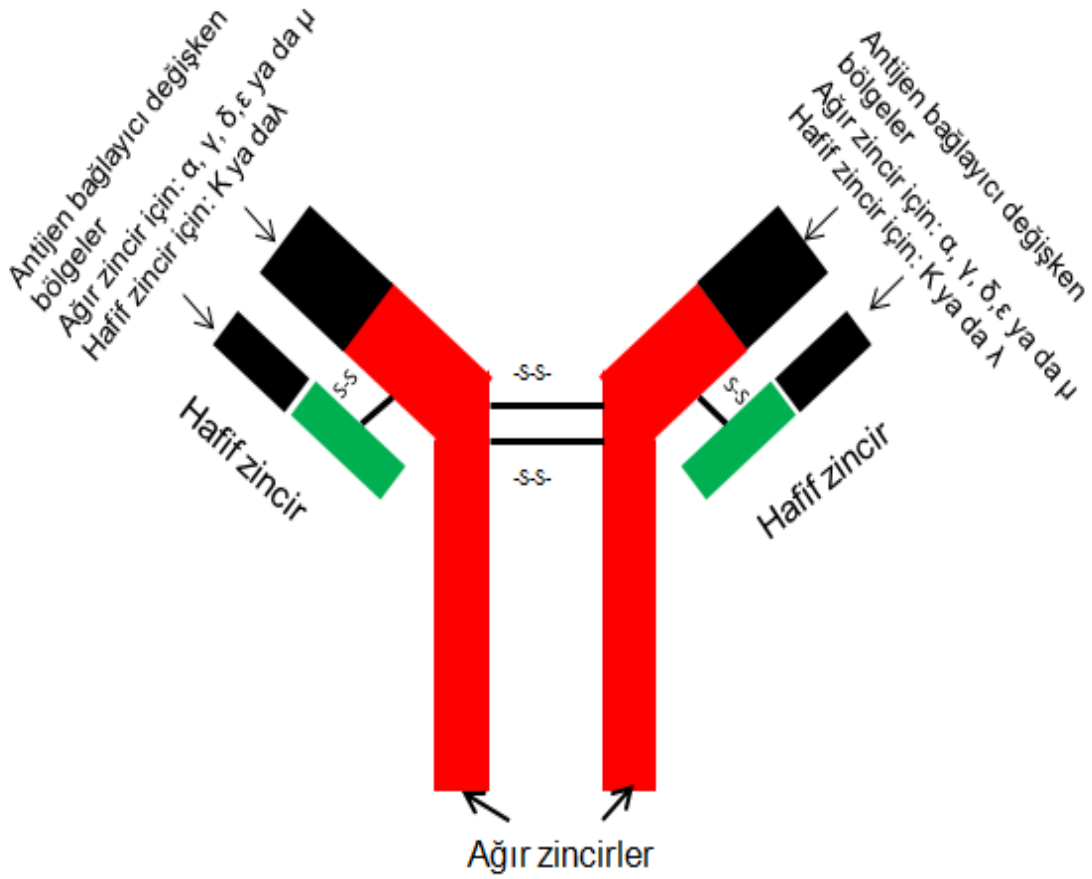
Aile de Multipl Myelom kanserinin görülmesi: Multipl Myelom hastası olan yakınları bulunan bireylerin Multipl Myelom'a yakalanma riski diğer insanlara göre daha fazladır.

Bazı araştırmacılar, olası bazı nedenlerle bağışıklık sisteminin zayıflamasının, özel mesleklerin, belirli kimyasallara ve radyasyona maruz kalmanın Multipl Myelom'u tetikleyebileceğini ileri sürmüşlerdir. Örneğin tarım mesleklerinde¹⁰, ham petrol, deri ve kosmetik alanlarında çalışanların Multipl myelom'a yakalanma olasılığı daha fazladır. Herbisitlere, insektisitlere⁹ petrol ürünlerine, ağır metalleri, plastıklere ve asbest gibi kirleticilere maruz kalma hastalık riskini artırır. Bununla birlikte bu ilişkili durumlardan hiçbiri MM'nin tek başına güçlü ve en önemli nedeni değildir. Genetik faktörler de Multiple Myelom'un gelişmesine neden olabilir. Araştırmacılar bir çok faktörün birlikte rol alması ile Multiple Myelom'un ortaya çıktığını düşünmektedirler^{1,10,11,12}.

2.2.4 Multipl Myelom'un belirti, bulgu ve nedenleri

Belirtiler doktor muayenesi ve laboratuvar testleri sonucunda tespit edilen vücut değişimleridir. Bulgu ise hastanın kendisinin hissettiği vücut değişimleridir. Klonal plazma hücresi yüzdesi, monoklonal protein düzeyi gibi belirtiler Çizelge 2.3 ve 2.4' te verilmiştir.

Monoklonal protein: Normal plazma hücreleri immunoglobulin olarak adlandırılan antikorlar üretirler(Şekil 2.2). Bu antikorlar immün sistemde önemli rol oynamaktadır. Myelom hücrelerinde genellikle immunoglobulin üretiminden sorumlu gen bölgelerinde bir ya daha fazla mutasyon olmakta ve bu durum monoklonal olarak adlandırılan aminoasit dizi değişmiş 3 boyutlu yapısı bozulmuş ve antikor fonksiyonlarını yerine getiremeyen protein üretimine neden olmaktadır.



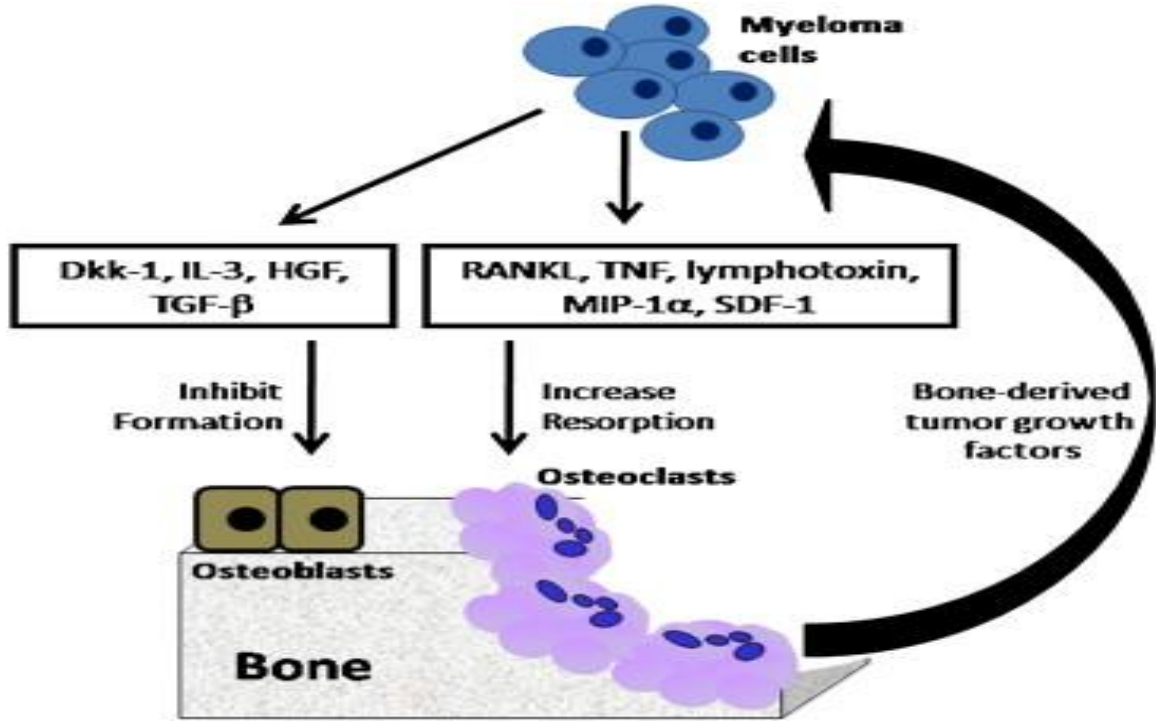
Şekil 2.2. Antikor yapısı. Birbirlerine benzeyen iki ağır (H) iki tane de hafif (L) zincirden oluşur

MM’de hastanın kendisinin farketmediği birçok bulgu vardır. Bu bulgular nedenleri ile birlikte aşağıda Çizelge 2.5’te verilmiştir. En yaygın olarak görülen belirti ve bulguların başında osteolitik kemik bölgeleri ve buna bağlı olarak oluşan kemik ağrıları sayılabilir. Osteolitik kemik bölgeleri, Multipl Myelom’da kesin tanı konmasını sağlamasa da, hastalığın en önemli belirtilerindendir. Çeşitli kemik ağrıları, patolojik kırıklar, hiperkalsemi ve osteoporozis Multipl myelom hastalarında en sık görülen rahatsızlıklardandır. Kemik iliğinde çoğalan myeloma hücreleri ile kemik hücreleri olan osteoblast ve osteoklast hücreleri arasında madde alışverişine dayalı çok yakın bir ilişki vardır. Aşağıda Şekil 2.3’te gösterilen bu ilişki kemik dokusunun zayıflamasına neden olmanın yanında MM hücrelerinin gelişmesini ve hayatta kalmasını da sağlamaktadır.

Çizelge 2.5. Multpl Miyelom'un belirtileri ve bu belirtilerin nedenleri(Multiple Myeloma Research Foundation, 2013'ten uyarlanmıştır¹)

BULGULAR	NEDENLERİ
EN YAYGIN BULGULAR	
Kemik ağrıları	Plazma hücrelerinin birikmesi kemik yapımını olumsuz etkiler, bu durum kemik lezyonlarında başlayıp kırıklara kadar gidecek bir duruma neden olabilir.
Halsizlik (aşırı yorgunluk)	Kanda kan hücrelerinin düşük sevide olması veya yüksek düzeyde kalsiyum bulunması
İştah azalması, susuzluğun ve idrarın artması, huzursuzluğu artması, düşünmede zorluk ve karışıklık, mide bulantısı ve kusma	Kanda kalsiyum düzeyinin yüksek olması
Enfeksiyon (zatürece, zona, idrar yolu enfeksiyonu)	Myelom hücrelerinin aşırı artışına bağlı olarak bağışıklık sisteminde görevle kan hücrelerinin sayısının azalması
YAYGIN OLMAYAN BELİRTİLER	
Nefes yetmezliği, göğüs ağrıları, akıl karışıklığı	Hipervizkosite sendromu: Kanda bir proteinin yoğun bulunması, kanı yoğun ve yapışkan hale getirir
Soğuk havalarda parmak ve topuklarda hissizlik	Cryoglobulinamia: Soğuk havalarda anormal proteinler jel haline gelirler ve küçük kan damarlarını engelleyebilirler
Sinir sistemi hastalığı-nöropati (hissizlik, karıncalanma ve/veya özellikle el ve ayaklarda ağrı)*	Amilodiosiz: Daha çok Bence Jones proteinin görüldüğü myeloma hastalarında tespit edilmekle beraber nadir görülen bir belirtidir. Bu protein diğer proteinlerle etkileşerek nişasta benzeri amiloid proteinin üretimine neden olur. Amiloid çeşitli organlarda birikerek bu organların işlevlerini olumsuz etkiler.

*Amiloid aynı zamanda düşük kan basıncına yol açarak, böbrek, kalp ve karaciğer yetmezliğine neden olur



Şekil 2.3. Plazma hücreleri ve kemik hücreleri arasındaki madde döngüsü¹³.

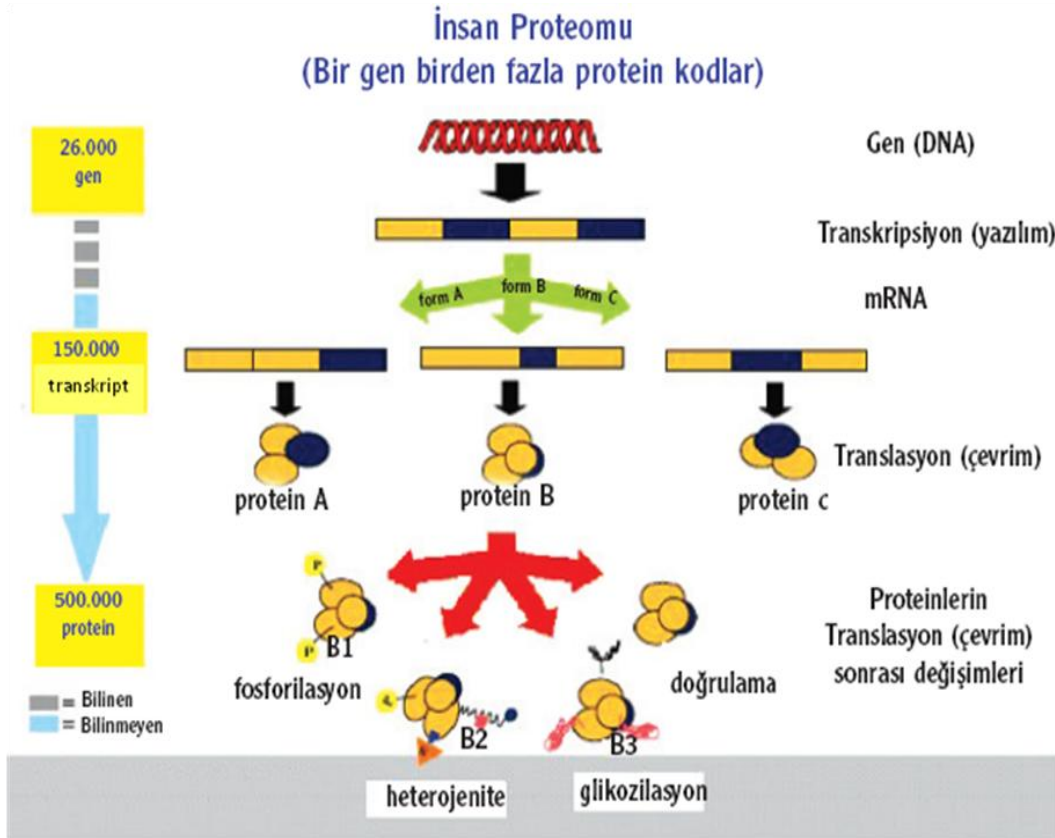
Şekil 2.3'te görüldüğü gibi myeloma hücreleri kemik gelişiminde ve kararlığında rol oynayan osteoblast ve osteoklast hücreleri arasındaki döngüyü etkilemektedir. Kemik matriksinin oluşumunda etkili osteoblast hücreleri gelişimi inhibe edilirken kemik yıkımında rol olan osteoklast hücrelerinin aktiviteleri artmakta ve bu durumda kemik dokusunun zayıflamasına neden olmaktadır¹³.

2.3 Proteomik

Protein ismi Yunancada “baş, birinci” anlamına gelen “proteos” sözcüğünden türetilmiştir. Proteinler 20.yüzyılın başlarında yaşamsal faaliyetlerin en önemli taşıyıcısı olarak kabul edildikleri için oldukça popülerlerdi.

Watson ve Crick'in¹⁴, 1953 yılında Nature dergisinde yayınladıkları Nükleik asitlerin moleküler yapısı ile ilgili makale bilim dünyası ve biyoloji için önemli bir dönüm noktasıdır. Tüm canlılarda (canlılığı tartışmalı olan virüslerin bir kısmında RNA) DNA'nın kalıtsal bilgiyi yani yaşamın şifresinin taşıdığının belirlenmesi ile çalışmaların büyük çoğunluğu doğal olarak bu alan üzerinde yoğunlaşmış, proteinler kısmen önemini yitirmiştir. 1990'lı yıllarda teknolojinin gelişmesi ve yeni araçların keşfiyle genomik

çalışmalar ve DNA dizilimlerinin belirlenmesi çalışmaları hız kazandı. 1990 yılında “insan genom projesi” başlatıldı. 2000’li yılların başında insan gen haritası çıkarıldı yani gen şifreleri tam olarak belirlendi. Gen diziliminin belirlenmesi ile özellikle hastalıkların engellenmesi tespiti ve tedavisinde büyük ilerlemelerin olması bekleniyordu. Ancak gelişmeler beklenen kadar hızlı olmadı. Genomik çalışmalar, bir organizmanın kalıtsal bilgilerini detaylı biçimde gösterebiliyordu ancak sadece kod çözmekle çok sınırlı bilgilere ulaşılabileceği anlaşıldı. İnsan Genom Projesinin bitirilmesi ile insan genlerinin sayısının sanıldığından çok daha az olduğunu ortaya çıkırdı. Daha önceleri sayısının yaklaşık 100000 olduğu düşünülen genlerin Human Genome Project Information¹⁵ (2010)’a göre 20000-25000 arasında olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan elde edilen proteinlerin sayısı 100000 den çok fazladır. Bu sayının 400 hatta 500 binlere çıkacağı düşünülmektedir^{16,17}. Doğal olarak bu durum bir gen bir protein hipotezini çürütmüş (Şekil 2.4) ve ilginin tekrar proteinler üzerine yoğunlaşmasını sağlamıştır.



Şekil 2.4. İnsan Proteomu¹⁸

Genom araştırmaları birçok bilgi birikimine neden olmuştu ancak elde edilen DNA dizilimleri tek başlarına, genlerin ne zaman kullanıldığı, hangi koşullarda kullanıldığı, ne oranda kullanıldığı konusunda bilgi vermiyordu. Bu çalışmalardaki bilgiyi işleyecek yeni teknolojilerin ortaya çıkması gecikmedi. Araştırmalar RNA üzerine yoğunlaştı, bu alanda da bilgi birikimi oluştu ancak bu bilgilerde tek başlarına organizmanın işlevi hakkında tam bilgi veremiyordu. Yeni bir teknolojiye ihtiyaç vardı...Proteomik.

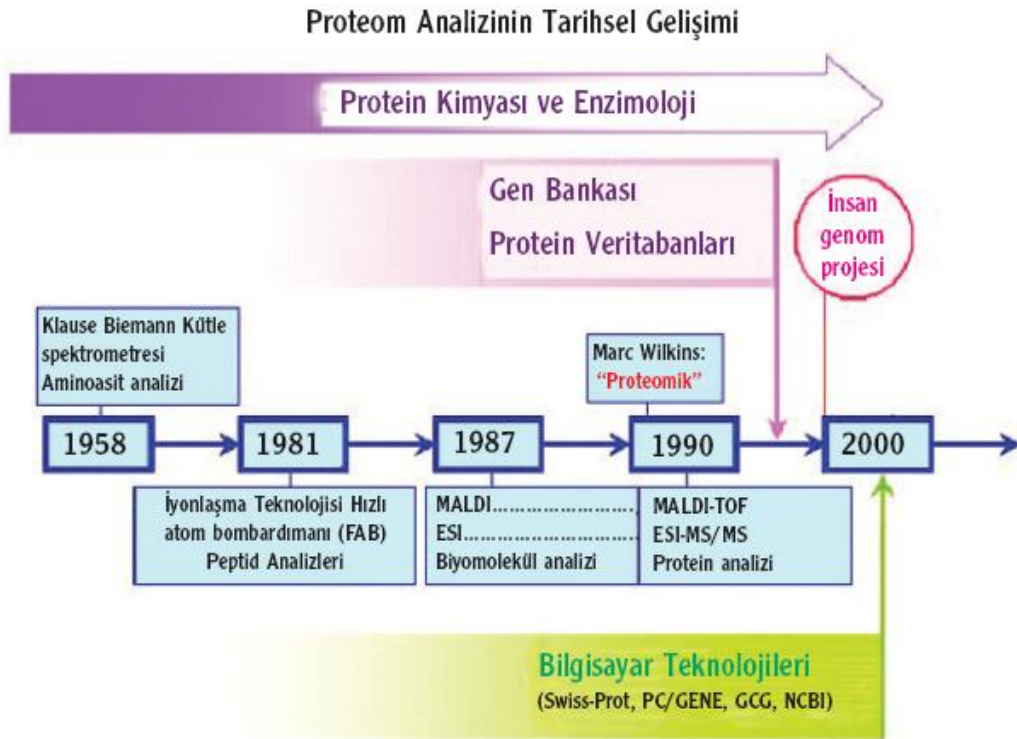
Proteom szğünde bulunan “Om” eki Yunan dilinde, bütünü, tamamı anlamı veren bir ektir ve szklerin sonuna eklendiğinde o szğn ifade ettiği varlıkların ya da oluşumların tamamı anlamını verir. Örneğin genom szğ bir organizmaya ait tüm genleri ifade eder, ya da başka bir anlatımla organizmanın sahip olduğu kalıtsal bilgilerin tümü anlamındadır. Proteom szğ ise biraz daha karışık bir tanımlama gerektirir. Farklı zaman ve koşullarda (gelişim evresi, hastalıklar vb.), farklı hücre kompartımanlarında, farklı hücre tiplerinde ya da dokularda farklı proteinler bulunabilir. Bu nedenle genom tanımından farklı olarak proteom tanımına zaman ve yer faktörlerini de katmak zorunludur. Proteom, belirli bir zamanda (embriyo, fetüs, tohum, fide, stres, hastalık dönemi vb.), bir organizmanın belirli bir bölgesinin (organel, zar, hücre, doku, organ...) ya da tamamının sahip olduğu ve ifade ettiği proteinlerin tümü anlamına gelmektedir. Günümüzde “om” getirilerek türetilmiş szkler hızla çoğalmaktadır. Örneğin metabolom, glikolom, nutrigenom gibi.

Bu alanlar üzerinde yapılan çalışmalar, bir biyolojik yapıyı, özelliği ya da işlevi total olarak inceleyen yeni biyoteknoloji dallarını ortaya çıkarmaktadır. Genomik, genleri ve gen dizilimlerini yapısal ve işlevsel olarak inceleyen bir biyoteknoloji dalıdır. Proteomik, belirli bir zamanda, bir organizmanın tamamında ya da hücre, doku ya da organ gibi kısımlarında bulunan proteinlerin tümünü inceleyen bir teknoloji olarak tanımlanabilir.

Proteomik için özünde aynı olmakla birlikte, farklı kaynaklarda farklı tanımlamalar yapılabilmektedir. Proteinlerin, ifade edilip edilmemesi, ifade edilen polipeptid yapısı, sentez sonrası geçirdiği değişimler (2 boyutlu yapı, 3 boyutlu yapı, yapıya fosfat, şeker ve doymamış hidrokarbon türevlerinin katılması...) gibi değişkenliklerinin çok olması, kısacası proteinlerin dinamikliği tanımlamayı biraz zorlaştırmaktadır. Proteinlerin bu dinamikliği nedeniyle, proteom çalışmaları, genom çalışmalarına oranla biraz daha zordur.

Sonuç olarak organizmanın kalıtsal bilgisinin çözülmesi, o organizmanın işlevleri hakkında çok sınırlı bilgi vermektedir. Kalıtsal bilgiye bakılarak proteinlerin yapıları ve işlevleri hakkında kesin bir bilgiye ulaşılamaz. Ayrıca bir organizmanın tüm kalıtsal bilgisini taramak oldukça uzun zaman alan zahmetli bir iştir. Hücresel işlevlerin tam olarak anlaşılması için ifade edilen proteinlerin tanımlanması, sentez sonrası geçirdikleri değişimlerin saptanması ve organizmada buldukları yerler ve miktarlarını belirlenmesini proteomik çalışmalar sağlayacaktır. Bir organizmanın tüm protein profiline bakıp olumsuz koşullarda değişen proteinleri tespit edip sadece onlar üzerine yoğunlaşmak amaca ulaşılmasında daha az zaman, emek ve para harcamak anlamına gelmektedir.

Proteinlerin belirlenmesi daha ileriki çalışmalar içinde belirleyici olacaktır. Bu tez kapsamında elde edilecek bilgiler genomik çalışmalara da ışık tutacaktır. Tüm genoma bakmak yerine ilgili proteinlerin kodlarını içeren gen bölgelerini bakıp, değişiklikleri tespit etmek çok daha kolay olacaktır.



Şekil 2.5. Proteomun tarihsel gelişimi¹⁹

2.3.1 Kütle Spektrometreleri

Kütle spektrometreleri proteomik çalışmalarında önemli rol oynayan cihazlardır. Proteinlerin tanımlanması, post-translasyonel değişimlerin ve protein-protein etkileşimlerinin tespit edilmesi için oldukça yaygın biçimde kullanılmaktadırlar.

Kütle spektrometreleri iyon oluşturma ve bu iyonları kütle/yük oranlarına (m/z) göre ayırma yeteneğine sahip cihazlardır. Ayırmanın sağlanabilmesi için cihaz içinde elektriksel ya da manyetik alanlar oluşturulmuştur. Elektromanyetik alanlar iyon hareketini iyonun kütlesiyle ters orantılı ve iyonun yüküyle doğru orantılı olarak etkiler. Böylece moleküler kütlelerin tespit edilebildiği, iyon bolluğuna (abundance) karşı m/z oranını gösteren kütle spektrumları elde edilir.

Kütle spektrometreleri üç temel bileşenden oluşmaktadır; iyonlaştırma kaynağı, analizör ve detektör. Ayrıca çok gelişmiş bir bilgisayar ağı ve vakum pompalarında spektrometrelerin önemli aksesuarlarından.

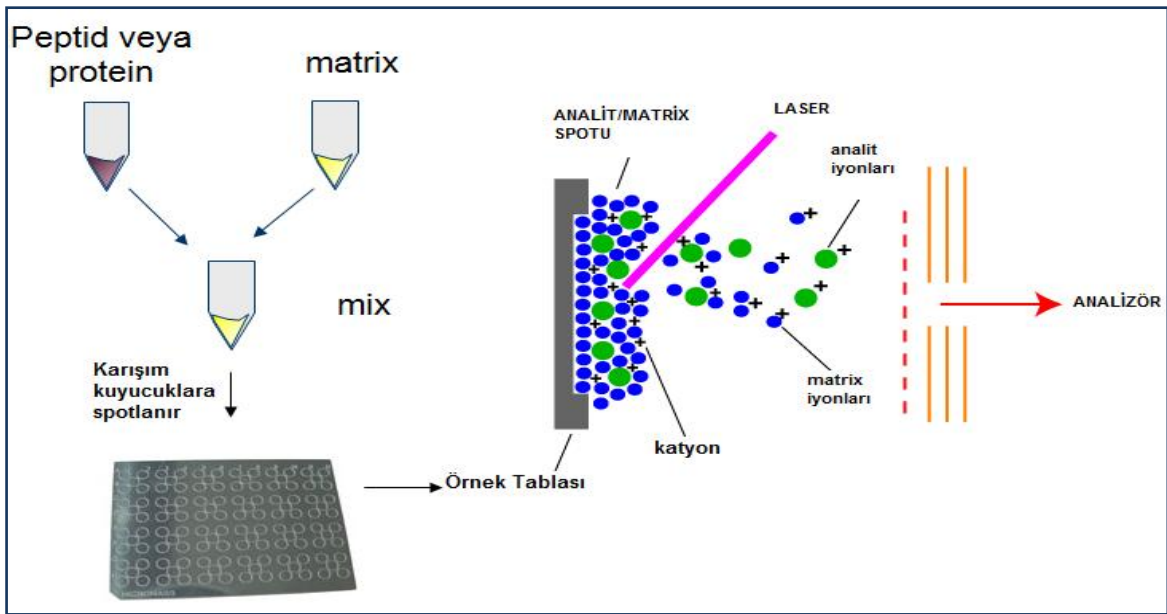
Elektromanyetik alanlarda ayırmanın sağlanabilmesi için nötral moleküllerin iyonlara dönüştürülmesi ve ihtiyaç halinde gaz faz haline geçmeleri gerekmektedir. İyonlaşma, iyonlaştırma kaynağının türüne göre atmosferik basınç ya da vakum altında gerçekleştirilebilir¹⁹. Peptid ve proteinlerin yüksek moleküler ağırlıkları ve polar yapıları göz önüne alındığında, iyonlaştırıcı kaynak protein ya da peptidleri hem iyon haline hem de gaz faza geçirmelidir. Çeşitli iyonlaştırıcı kaynaklar arasında sadece ESI (elektrosprey iyonizasyon) ve MALDI (matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon) proteinlerle çalışmaya uygundur. ESI ile iyonlar atmosferik basınç altında oluşturulurken, MALDI'de atmosferik basınç veya vakum altında oluşturulabilir.

Analizör, iyonlaştırıcı kaynakta elde edilen iyonların ayrılmasını sağlayan cihaz kısmıdır. Bu kısımda elektrik veya manyetik alanlar kullanılabilir. Tüm analizörler uygun bir iyonlaştırıcı kaynak ile birleştirildiğinde peptid ve proteinlerle çalışmaya uygundur. Kullanım kolaylığı ve düşük maliyetleri nedeniyle en yaygın kullanılan analizörler kuadropoller, uçuş süresi (TOF-time of flight) cihazları ve iyon tuzaklarıdır¹⁹.

Çeşitli kütle spektrometreleri arasında protein çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan sistemler; MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight), ve ESI-TOF (Elektro Spray Ionization Time Of Flight)'dır. Bu cihazlar ile:

- Protein dizileri
- Protein kütleleri
- Posttranslasyonel değişimler (fosforilasyon, glikolizasyon, N ve C terminal modifikasyonları belirlenebilir)

Tez çalışması kapsamında kullanılan MALDI TOF cihazının çalışma prensibi, ultraviyole ışınları absorblama özelliğine sahip bir matriksin kullanılmasına dayalıdır (Şekil 2.6). Peptid karışımı ve matriks uygun bir bir çözücünde çözülerek karıştırılır ve örnek yükleme plakalarına aktarılır. Daha sonra çözücünün buharlaşmasına izin verilir ve böylece kristalleşmiş matriks molekülleri arasına gömülü peptidler elde edilmiş olur. Örnek plakası cihaza yerleştirilir ve vakum altında, genellikle nitrojen kaynaklı UV lazeri ile uyarılır (pulse) yapılır. Matriks molekülleri lazerin enerjisini absorblar ve peptid moleküllerini de beraberinde taşıyarak gaz fazda iyon haline geçerler.



Şekil 2.6. MALDI lazer ışınının katı matriksi uyarması ve analitleri iyonize etmesi²⁰

İyonlaşmış moleküller TOF analizörü içerisinde hızlandırılırlar ve dedektöre ulaşırlar. 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. Bu zaman farkına bağlı olarak peptit kütleleri belirlenmekte daha sonra biyoinformatik analizler ile protein tanımlamaları yapılabilmektedir. Bu tip tanımlamaya peptit kütle parmak izi(PMF-Peptid Mass Fingerprint) yöntemi denilmektedir.

Deneysel olarak elde edilen peptit kütleleri, veri tabanlarında bulunan proteinlerin aynı enzimle teorik olarak kesilmiş peptit kütleleri karşılaştırılır. Veri tabanında bulunan proteinler, eşleşen peptid oranlarına göre belirli bir kütle hata toleransı ile sıralanırlar. Ancak bir proteinin parmak izi beklenen tüm teorik peptid kütlelerini içermez. Ayrıca tripsin otolizinden ve keratin kontaminasyonundan hatalı pikler oluşabilir. Başarılı bir protein tanımlaması için, MALDI piklerinin doğruluğunun yüksek olması ve zengin bir veri tabanı kullanılması gerekmektedir. Bir proteinin başarı ile tanımlanması için, beş ya da daha fazla peptidin 30 ppm'den düşük hassasiyet ile belirlenmesi, deneysel ve teorik dizinlerin % 15 oranında eşleşmesi gerekmektedir¹⁹.

1993 yılından bu yana, peptid kütle parmak izi (PMF) ve MALDI-TOF kombinasyonu en hassas, hızlı ve güvenilir protein tanımlama yöntemi olmuştur. Son yıllarda tanımlanan proteinlerin çoğu bu yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Ancak daha sonra gelişen MS/MS sistemleriyle günümüzde daha fazla peptid(fragment) üzerinden daha yüksek bir yüzdeyle tanımlamalar gerçekleştirilmektedir. Ayrıca bu sistemlerin öncesinde kullanılan kromatografik ayırım basamağı jel dökülmeden kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına olanak sağlamaktadır.

PMF ile protein tanımlanmasında iki yaklaşım vardır: (1) “bottom-up”, (2) “top-down”. “Bottom-up” yaklaşımında peptitlerden yola çıkılarak veritabanları ayırdımıyla protein bilgisine ulaşılır ki günümüzde en çok tercih edilen yaklaşımdır. “Top-down” yaklaşımında ise direkt olarak proteinin kendisinden yola çıkılır.

2.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy/FT-IR)

Kızılötesi spektroskopisi, molekül yapı ve etkileşimlerinin incelenmesini sağlayan bir yöntemdir. Polimer filmler, fiberler, su, proteinler, düşük molekül kütleli hidrokarbonlar, tarım, gıda ve petrol ürünleri gibi birçok organik ve anorganik bileşiklerin tayinlerinde kullanılır.

Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4000\sim 14000\text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4\sim 400\text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır .

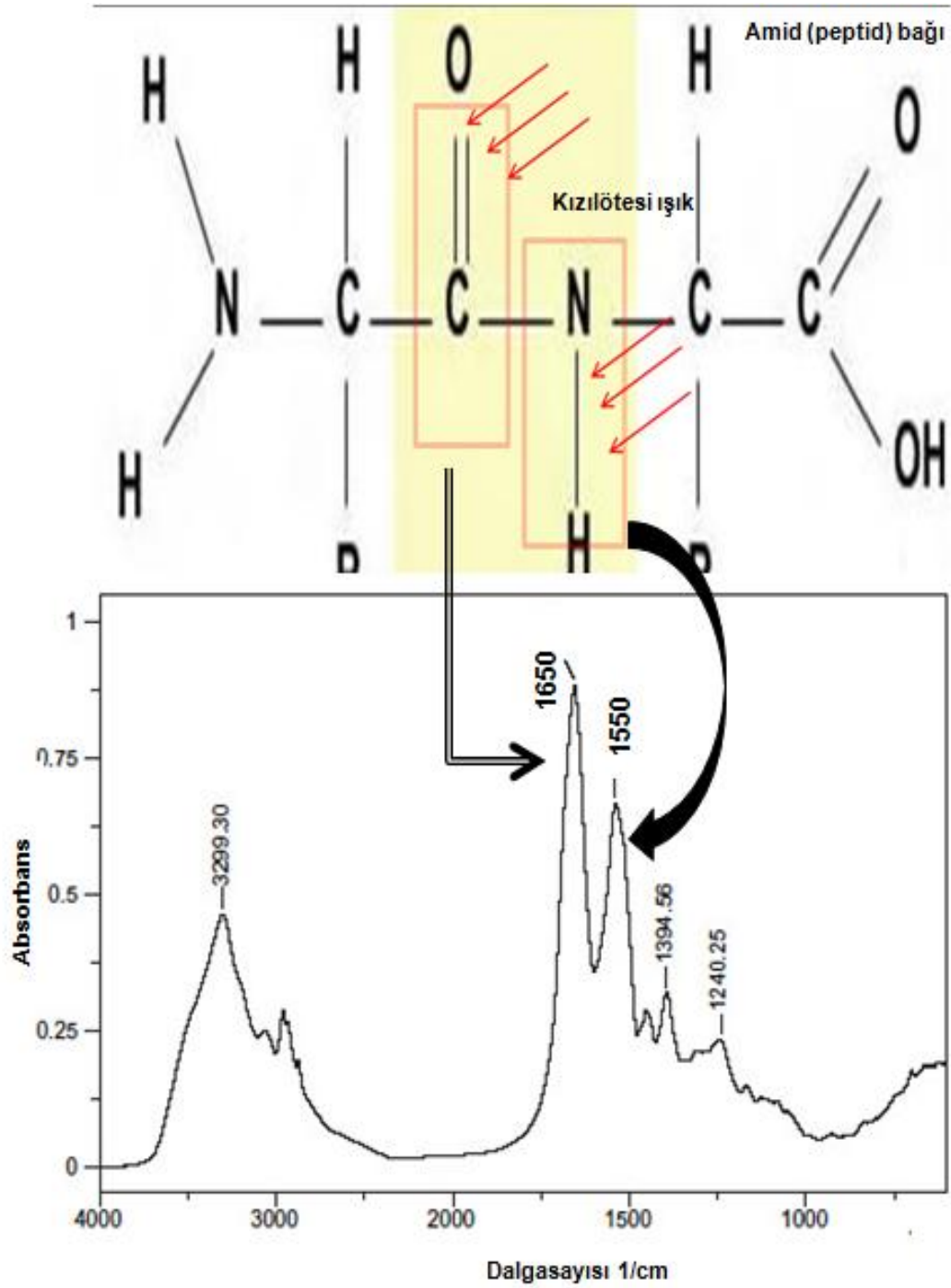
FT-IR fonksiyonel gruplardaki değişikliklerin ekranda izlenebilmesini sağlayan, yapısal ve fonksiyonel çalışmalar için hızlı, hassas ve zararlı olmayan bir tekniktir ve aşağıdaki bilgileri sunar

- ✓ Peak pozisyonları → Yapısal bilgi
- ✓ Order/disorder → Konformasyonel değişiklikler
- ✓ Bant alanı → Konsantrasyon

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi tekniği;

- ✓ Analiz edilecek maddenin içerdiği kimyasal bağlar tarafından kızılötesi ışığı soğurması
- ✓ Bu soğurmanın belirli frekans değerlerinde karakteristik sinyalleri (bant/pik) oluşturması
- ✓ Bu sinyallerin şiddetinde, bant genişliğinde ve frekans değerinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi esasına dayanır

Örneğin şekil 2.7'de görüldüğü gibi proteinler üzerine gönderilen ışınlar Amid bağlarında bulunan C=O ve N-H bağları tarafından emilirler ve bu emilim yaklaşık 1650 (çoğunlukla C=O) ve 1550 (çoğunlukla N-H) dalgasıyılı frekansta sinyal olarak algılanır. Bu sinyaller sırası ile Amid 1 ve Amid 2 olarak adlandırılırlar.



Şekil 2.7. İki peptid arasındaki amid bağında bulunan C=O ve N-H bağlarının kızılötesi ışığı soğurması ve bu soğurmanın sinyal olarak gösterilmesi

2.5 Literatür Özeti

2.5.1 Multipl myelom

Multipl Miyelom, kemik iliğinde bulunan ve immün sistemin önemli bir parçası olan plazma hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan bir kanser türüdür. Kan ile ilgili kanserler arasında ikinci en yaygın, kemik kanserleri (esas kanser bölgesi kemik olan) arasında ise en yaygın olanıdır. Kemik iliğinde başladığı için kemik iliği kanseri olarakta bilinir^{21,22,23}.

Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 20.000 insana MM tanısı konmaktadır. MM tanısı konmuş erkeklerin yaş ortalaması 62, kadınların ise 61'dir ve hastaların sadece %2'si 40 yaş altındadır. Bu ülkede hastalığın erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla daha fazladır. Beyazlara göre 2 kat daha fazla MM olgusuna rastlanan siyah ırkta her 100.000 erkek içinde MM görülme sıklığı 7.1 iken kadınlarda bu oran 4.6'dır. Gelişmiş ülkelerde MM yakalanma olasılığı ortalama 4 iken, Çinde 1'e kadar düşmektedir^{22,24,25}. MM görülme sıklığının toplumlara, ırklara ve cinsiyete göre farklı olmasının nedeni henüz bilinmemektedir. Geleneksel tedavi yöntemleri ile yaşam uzunluğu 3-4 yıl arasında iken, hastanın kendisinden alınıp yapılan kök hücre transplasyonu ve sonrasındaki yüksek dozlu tedavi ile bu süre 5-7 yıl arasına uzatılabilmektedir²⁶.

2.5.1.1 Multipl Myelom'un belirtileri ve tanısı (Diagnosis)

Multipl myelom aşağıdaki belirtiler ile nitelendirilir^{8,27,28,29,30}.

- ✓ Kemik iliğinde aşırı plazma hücresi birikimi, tümör oluşumu
- ✓ Plazma hücrelerini kemiğe infiltrasyonu sonucu oluşan ağrılar, osteolitik kemik bölgeleri, patolojik kırıklar ve hiperkalsemi
- ✓ Kemik iliğinde aşırı plazma birikimi sonucu diğer kan hücrelerinin üretiminin azalması ile görülen anemi ve lökopeni
- ✓ Amiloidoz ve böbrek yetmezliği
- ✓ Tek tip antikör üretimi
- ✓ Bağışıklık sisteminin zayıflaması

Plazma hücreleri kanserleşip kontrol dışı çoğalmaya başladıklarında genellikle kemik iliği çevresindeki dokuda plazmasitom olarak adlandırılan tümörleri oluştururlar. Plazmasitom tek bir tane ise soliter, birden fazla ise Multipl myelom olarak adlandırılır. Bazı durumlarda tanı sırasında anormal plazma hücreleri ve aşırı miktarda salınan antikor proteinleri (M) saptanabilir ancak tümör oluşumu ve herhangi bir hastalık belirtisi görülmez, bu tür vakalar Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) olarak adlandırılır⁴

Bazı araştırmacılar, olası bazı nedenlerle bağışıklık sisteminin zayıflamasının, özel mesleklerin, belirli kimyasallara ve radyosana maruz kalmanın Multipl myelomu tetikleyebileceğini ileri sürmüşlerdir. Örneğin tarım mesleklerinde⁹, ham petrol, deri ve kosmetik alanlarında çalışanların MM'a yakalanma olasılığı daha fazladır. Herbisitlere, insektisitlere¹⁰, petrol ürünlerine, ağır metalleri, plastiklere ve asbest gibi kirleticilere maruz kalma hastalık riskini artırır. Bununla birlikte bu ilişkili durumlardan hiçbiri MM'yalının tek başına güçlü ve en önemli nedeni değildir. Genetik faktörler de Multipl miyelom'un gelişmesine neden olabilir. Araştırmacılar bir çok faktörün birlikte rol alması ile Multiple myelom'un ortaya çıktığını düşünüyorlar^{1,10,11,12}.

Multipl Miyleom'a yakalanma da en önemli risk faktörü yaştır. Hastaların %96'sı 45 yaşın, %63'i ise 65 yaşın üzerindedir¹. Hastaların ortalama yaşı 66'dır ve sadece %2'si 40 yaşın altındadır. Ayrıca birinci derece akrabası MM hastası olan kişilerin, bu hastalığa yakalanma oranları diğer insanlara göre 3.7 kat daha yüksektir^{10,31}.

MM için yapılan alt grup sınıflandırmalarının çoğunda genetik yeniden düzenlenmeler dikkate alınmıştır. Ancak bu gruplandırma sistemleri zamanla hastalıkla ilişkili bilgiler arttıkça geçerliliğini kaybedebilmektedir. Bu anlamda alt grupların net sınırlar çizilerek daha iyi şekilde birbirinden ayrılması hem hastalığın erken teşhisinde yararlı olacak hem de kişiye yönelik tedavi uygulamalarından istenen verim alınabilecektir.

Genetik değişimler

Genetik değişimler çoğunlukla hastalıklara neden olurlar. Delesyonlar, insersiyonlar, duplikasyonlar, kopya sayısı değişimleri (CNVs) veya kopya sayısı polimorfizmleri (CNPs) insanlar da dahil olmak üzere memelilerde görülmektedir. İnsan genomundaki genetik değişimler, tek nükleotid değişimlerinden mikroskobik olarak görülebilen kromozomal anormalliklerine kadar değişik formlarda olabilmektedir. DNA

segmentlerinde kilobazdan (kb) megabaza (Mb) kadar farklı boyutlarda bulunan submikroskopik kopya sayısı değişimleri bol miktarda bulunmaktadır. Multipl myelom hastalarında da bu tür genetik bozukluklar saptanmıştır.

66 yaşın altında ve yeni teşhis almış 192 MM hastasından elde edilen kanser plazma hücrelerindeki kopya sayısı değişimleri Single Nucleotide Polymorphism (SNP) arrayleri ile araştırılmıştır. Sonuçlar hastaların %98'inde çeşitli delesyon ve amplifikasyonların olduğunu göstermiştir. Bu çalışma moleküler karyotiplemenin hastalık hakkında önemli ipuçları elde etme konusundaki gücünü ve uygulanabilirliğini göstermiştir³².

Array Comparative Genomic Hybridization (CGH) tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada 20 hastadan (MM, MGUS veya amiloidozis) alınan kanserli kemik iliği hücrelerinin 13. kromozomunda DNA kopya sayısı kayıplarının bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca del[13] taşıyan ve taşımayan 262 hastanın ekspresyon verileri değerlendirilmiştir. del[13] bulunan hastaların hastalıklı ilişkili olduğu bilinen RB1(Retinoblastoma) geni ve kanserle henüz herhangi bir rolü olduğu bilinmeyen NBEA(Neurobeachin) genlerinin ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir³³.

Benzer çalışmalarda Multipl Miyelom'a yakalanma riskini artıran başka genetik değişimler de bulunmuştur ve bu genetik değişimler MM'nin sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. MM sınıflandırmasında kullanılan genetik değişimler daha önce oluşturdukları risklere göre Çizelge 2.4'te(sayfa 15) verilmiştir.

Tedavi

Hastalığın oluş nedenine ve hasta olan kişiye bağlı değişik tedavi yöntemleri vardır. Son yıllarda Bortezomib^{34,35,36}, Talidomid³⁷ ve lenalidomid^{38,39} gibi hem MM hücrelerini hem de kemik iliği mikroçevresini hedefleyen ilaçlar tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte ilaçlar bir takım yan etkilere sahiptir ve hastaların önemli bir kısmında sağlık durumunun kötüye gittiği görülmektedir. Sürdürülen prelinik araştırmalarla yeni tedavi alternatiflerinin tanımlanması, patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılması, ilaç direncinin önlenmesi, tümör sitotoksitesinin artırılması ve hasta sonuçlarının iyileştirilmesi hedeflenmektedir²². Diğer bir önemli tedavi yöntemi ise hastanın kendi kök hücrelerinin transplantasyonudur^{40,41,42}. Bu yöntemle hasta yaşam süreleri uzatılabilmektedir.

2.5.2 Multipl myelom ile ilgili proteomik çalışmalar

Kanser çalışmalarındaki proteomik çalışmalar, kanserleşmiş hücrelerdeki protein karakterleri hakkında bilgi edinmeyi amaçlar. Proteomik çalışmalar sonucunda elde edilen bilgiler, metabolik ve sinyal yollarındaki gen ifadeleme bilgileri ile karşılaştırılarak, kansenin başlama ve gelişmesinin mekanizmasının anlaşılacağı düşünülmektedir. Prensipite proteomik çalışmaların, kanser hücrelerindeki normal dışı davranan proteinleri saptama potansiyeli vardır⁴³.

Proteomik teknolojileri, aynı zamanda yüksek iş hacmi ile binlerce biyomolekülün analizini yaparak, erken tanı, gelişim safhasının belirlenmesi ve tedavi için gerekli olan biyobelirteçlerin tespit edilebilmesine olanak sağlarlar⁴⁴. Proteomik çalışmaları gen ekspresyon çalışmalarının tamamlayıcısı niteliğindedir. Güngeçtikçe önemi artan proteomik çalışmalar; gen ekspresyon profillemesi ile anlaşılamayan ve hücre fonksiyonun anlaşılmasında önemli yeri olan protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, post-translasyon sonraki değişimlerin saptanması, protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesi gibi fizyolojik olayların belirlenmesini sağlar. Üstelik birçok çalışma gen/ protein ifade profillerinin tam olarak çakışmadığını göstermiştir^{45,46,47}. Bu sebeplerden dolayı MM hastalarının protein profillerinin çalışılması gereklidir.

Multipl Miyelom ile ilgili proteomik çalışmalar henüz çok yenidir ve çok az sayıda araştırma yapılmıştır. Lu ve arkadaşları²¹ (2010), iki yönlü jel elektroforezi ve Maldi-Tof/Tof kütle spektrometresi kullanarak, 8 yenitani MM hastasının plazma hücrelerinin protein profillerini çıkarmışlardır. 507 tane jel spotunu keserek Maldi Tof/Tof ve data bank analizleri ile 268 proteini tanımlamışlardır. Bu proteinler biyolojik proseslerine ve fonksiyonlarına göre değişik kategorilerde sınıflandırılmışlardır ve Proteomics Identifications Database (PRIDE)'da MM plazma hücreleri proteinleri 2-D haritası olarak kaydetmişlerdir. Bu bilgiler ilerideki çalışmalar ve karşılaştırmalar için bir kaynak oluşturacaktır.

Wang ve arkadaşları⁴⁸ (2009), serum örnekleri ile yaptıkları proteomik çalışmalarla 3 biyobelirteç tespit etmişlerdir. Bu biyobelirteçler, 34 normal donörün tamamını doğru olarak tespit ederken 30 MM hastasının 26'sını doğru olarak tespit edebilmiştir. Ancak biyobelirteçler MM ile diğer plazma hücresi bozukluklarını (MGUS, soliter plazmasitoma

vd.,) ayıracak nitelikte bulunmamıştır. Yine de bu çalışma proteomik çalışmaların yeni biyobelirteçlerin bulunmasında yararlı olduğunu göstermiştir.

Kütle spektrometresi ile çalışan diğer bir grup, 48 MM hastasının (24'ünde hastalığın iskelet üzerinde etkisi var 24'ünde yok) serum örneklerini incelemişler ve iskelet hasarı olan hastaları Partial least squares discriminant (PLS-DA) analizini kullanarak %100-96 oranında tespit edebilmişlerdir⁴⁹. Bu çalışma da proteoin profilinin çıkarılmasının, tanı ve tedaviye yönelik biyobelirteçlerin bulunmasında kullanışlı olduğunu göstermektedir.

2.5.3 Multipl myelom ile ilgili FT-IR çalışmaları

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi kullanılarak farklı kanser dokuları üzerinde yapılan birçok araştırma, bu yöntemin diğer yöntemlere göre bazı avantajları olduğunu göstermiştir. Servikal⁵⁰, kolon⁵¹ ve prostat⁵² kanseri dokuları ile yapılan çalışmalar, FTIR'ın bu hastalıkların tanısı konusunda oldukça yüksek düzeyde başarılı olduğunu göstermiştir.

Sankari ve arkadaşları⁵³ (2011) yaptıkları çalışmada, normal bireylere ait kan plazmaları ile Multipl Miyelom hastalarının kan plazmaları FTIR tekniği ile karşılaştırılmış ve özellikle IgA ve IgG antikorlarının bulunduğu spektral bölgelerde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Yayınladıkları makalelerinde FTIR tekniğinin Multipl Miyelom'un tanısında kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

3 GEREKÇE VE AMAÇ

Kalıtısal bilgiye bakılarak proteinlerin yapıları ve işlevleri hakkında kesin bir bilgiye ulaşılamaz. Hücresel işlevlerin tam olarak anlaşılması için ifade edilen proteinlerin tanımlanması, sentez sonrası geçirdikleri değişimlerin saptanması ve organizmada buldukları yerler ve miktarlarını belirlenmesini proteomiks çalışmalar sağlayacaktır. Proteinlerin belirlenmesi daha ileriki çalışmalar içinde belirleyici olacaktır. Proteomiks çalışmalar ile elde edilecek bilgiler genomik çalışmalara da ışık tutacaktır.

Tez kapsamındaki spektrometrik çalışmaların temelini proteomik çalışmalar oluşturmaktadır. Bu çalışmalar ile; Multipl Miyelom hastalarının protein profillerinin çıkarılması, gruplar arasından önemli değişim gösteren proteinlerin tespiti/tanımlanması, ve bu proteinlerin (biyobelirteçlerin) hastalığın tanısı, evresi ve tedavisindeki rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

Ayrıca Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektroskopisi kullanılarak hasta idrarı ve serumunda hastalığın tanı ve tedavi sürecinin izlenmesinde kullanılabilecek yeni belirteçlerin belirlenmesine çalışılacaktır. Hasta örneğinin içeriğinde tedavi sürecinde, önce ve sonrasında olan tüm moleküler değişimler FTIR spektroskopisi ile karşılaştırılmalı olarak incelenecek ve karakteristik değişimler belirlenecektir. Bu yöntem oldukça ucuz, uygulanması kolay ve rutin uygulamalara çok elverişli bir yöntemdir. Hastalığın tanısında ve izlenmesinde uygulanabilecek FTIR tabanlı bir yöntem geliştirilebildiği yöntemin hızlı ve sarf maliyetinin çok düşük olması nedeniyle tanı, tiplendirme ve tedavi izlemede kullanılabilecek yeni ve özgün bir yaklaşım sunulabilecektir.

3.1 Hipotez

Hipotez: Spektrometrik ve spektroskopik yöntemler Multipl myelom'un tanısı, gelişimi ve tedavisinde rol oynayabilecek biyobelirteçlerin bulunmasını sağlarlar.

Bu hipotez daha önce yapılan proteomik tabanlı çalışmalar ile de sınanmıştır. Bu çalışmalar ile ilgili literatür özetine 2.5.2 alt başlık altında yer verilmiştir. Multipl myelom ile ilgili FTIR çalışmaları ise oldukça azdır, bu kadar geniş kapsamlı bir inceleme ilk kez bu tez kapsamında yapılacaktır.

4 MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyal

Proje kapsamında, 23 Aralık 2010 tarihli ve 20-411 karar no'lu etik kurulu onayı (EK 1) ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı yönetiminde, Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesi Hematoloji ve İmmünoloji bilim dalı laboratuvarlarından gönderilen kemik iliği, serum ve idrar örnekleri kullanılmıştır. Materyallerin tamamı rutin kontroller için alınmış örneklerden arta kalanlardır. Tez kapsamında yapılan değişiklikler aşağıda sıralanmıştır.

- ✓ Kemik iliği materyallerinden izole edilmiş plazma hücrelerinin incelenmesi için oluşturulması düşünülen Kontrol, MGUS, SMM ve MM gruplarında, yeterli MGUS ve SMM örneğinin toplanamaması (MGUS ve SMM tanısı konmuş bireylerden zorunlu haller dışında kemik iliği alınmamaktadır, deney amacı ile alınması da etik bulunmamıştır) sebebi ile zorunlu değişiklik yapılmıştır. Yeni gruplar kemik iliğinde bulunan plazma hücreleri oranlarına göre 0-9, 10-20 ve +20 oluşturulmuştur(Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3). Normal durumlarda kemik iliğinde plazma hücresinin bulunmaması gerekir. Genellikle klonol plazma hücre artışı ile kanser evresi arasında doğrusal orantı vardır ve +20 grubu en ileri seviyeyi ifade etmektedir. Her grup için yaşları 30 ile 75 arasında değişen yeni tanı almış (tedavi görmemiş) 5 erkek, 5 kadın toplam 10 bireyin kemik iliği örnekleri çalışmalarda kullanılmıştır.
- ✓ Proje kapsamında proteomik çalışmalar dahilinde düşünülen serum çalışmaları, daha özgün olacağı düşünülen FT-IR çalışmasına dahil edilmiştir.

Çizelge 4.1. 0-9 grubu. Kemik iliğinde plazma hücresi yüzdesi 0 ile 9 arasında olan örnekler

Sayı	Örnek kodu	Plazma hücresi yüzdesi	Tarih	Cinsiyet*	Tanı
1	44-GS	%0.6	Ekim 2012	E	Takip**
2	95-ZK	%1.5	Eylül 2012	E	Yeni tanı MM
3	88-NK	%4-5	Ağustos 2012	K	Yeni tanı MM
4	03-EE	%6	Kasım 2012	E	Yeni tanı MM
5	100-HU	%6	Ekim 2012	E	Yeni tanı MM
6	117-FG	%6	Aralık 2012	K	Yeni tanı MM

7	29-BY	%6.5	Ocak 2012	E	Yeni tanı MM
8	101-SD	%6.5	Ekim 2012	K	Yeni tanı MM
9	12-RB	%7	Ağustos 2012	K	SMM****
10	79-EG	%7.2	Mayıs 2012	K	Yeni tanı MM

*E=Erkek, K=Kadın, ** Tedavi sonrası takipte, ****SMM hastaları tedavi almazlar

Çizelge 4.2. 10-20 grubu. Kemik iliğinde plazma hücresi yüzdesi 10 ile 20 arasında olan örnekler

Sayı	Örnek kodu	Plazma hücresi yüzdesi	Tarih	Cinsiyet	Tanı
1	116-İÇ	%10	Kasım 2012	E	Yeni tanı MM
2	72-ZU	%12	Nisan 2012	K	Yeni tanı MM
3	80-MY	%12	Mayıs 2012	E	Yeni tanı MM
4	73-CE	%13	Mart 2012	K	Yeni tanı MM
5	83-CA	%13	Haziran 2012	K	Yeni tanı MM
6	71-GYO	%13	Nisan 2012	K	Yeni tanı MM
7	72-ZU	%14	Eylül 2012	K	Yeni tanı MM
8	94-TK	%14	Ağustos 2012	E	Yeni tanı MM
9	34-MÇ	%17.5	Ocak 2012	E	Yeni tanı MM
10	97-SG	%20	Eylül 2012	E	Yeni tanı MM

Çizelge 4.3. +20 grubu. Kemik iliğinde plazma hücresi yüzdesi 20 ve üzeri olan örnekler (En ileri seviyede olduğu kabul edilen hasta grubu)

Sayı	Örnek kodu	Plazma hücresi yüzdesi	Tarih	Cinsiyet	Tanı
1	84-KP	%23	Haziran 2012	K	Yeni tanı MM
2	26-BO	%24	Ocak 2012	E	Yeni tanı MM
3	82-MAY	%30	Haziran 2012	E	Yeni tanı MM
4	35-UI	%32	Ocak 2012	K	Yeni tanı MM
5	76-ND	%35	Mayıs 2012	K	Yeni tanı MM
6	85-DK	%40	Ağustos 2012	K	Yeni tanı MM
7	107-MU	%40	Ekim 2012	E	Yeni tanı MM
8	118-GSİ	%40	Kasım 2012	E	Yeni tanı MM
9	75-HHY	%47	Mayıs 2012	E	Yeni tanı MM
10	83-CA	%55	Kasım 2012	K	Yeni tanı MM

4.2 Yöntem

Uygulanan yöntem aşağıda sıralanmıştır

- ✓ Plazma hücrelerinin kemik iliğinden izole edilmesi
- ✓ Plazma hücrelerinden protein izolasyonu
- ✓ İzole edilmiş protein karışımının protein miktarının Bradford yöntemi ile belirlenmesi
- ✓ Proteinlerin ayrıştırılması (2-DE jel elektroforezi)
- ✓ Jellerin/proteinlerin boyanması
- ✓ Jellerin analizi
- ✓ Jellerden protein peptitlerinin eldesi/Tripsinizasyon
- ✓ Peptit kütlelerinin belirlenmesi(Maldi Tof MS)
- ✓ Biyoinformatik analiz ile protein kimliklendirmesi

4.2.1 Plazma hücrelerinin kemik iliğinden izole edilmesi

Tez kapsamında, Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesi Hematoloji bilim dalından gönderilen ve akış sitometrisi ile plazma hücresi oranlı belirlenmiş kemik iliği örneklerinden (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3) aşağıda belirtilen kit ve protokole göre plazma hücreleri elde edildi. Uygulanan protokol *Whole Blood Column Kit* (# 130-093-545) kitapçığında belirtilen protokolden uyarlanmıştır.

Uygulama

Manuel ayırma için gerekli kimyasal ve gereçler

- ✓ *Whole Blood Column Kit* (# 130-093-545): İçinde *Whole Blood Kolonları* ve *Whole Blood Column Elution Buffer* var.
- ✓ *MidiMACS Separator*
- ✓ *HEPES-tamponlu hücre kültür mediumu*(100 U/mL heparin içiren)
- ✓ *Filtre* (30 µm çaplı): Kemik parçalarını ve hücre kümelerini kaldırmak için.

A. Kemik İliği Hücrelerinin İzolasyonu (hazırlanması)

Not: Protokol başlangıç hacmi 1 ml olan kemik iliği için oluşturulmuştur. Gelen materyaller 0.5 mL ile 4 mL arasında değişmektedir.

1. 1ml kemik iliği örneği içinde eşit hacimde HEPES tamponlu hücre kültür mediumu bulunan 50mL lik konik tüpe alındı.

2. Kemik parçaları ve hücre yığınlarından kurtulmak için örnek filtreden (30 µm delik çaplı) geçirildi. Bu işlemde önce filtre ayırma tamponu (autoMACS Running Buffer) ile ıslatıldı
3. 20 °C’de, 445g’de 10dakika swingin bucketli rotorda frenleme (without brake) olmadan santrifüj edildi.
4. Üstte kalan sıvı kısım (süpernatant) pellete dokunulmadan dikkatlice alındı. Hücre pelleti başlangıç hacmi olan 1mL’yi geçmemek şartı ile orijinal ayırma tamponu ile seyreltildi.
5. Bu aşamadan sonra magnetik işaretleme (magnetic labeling) uygulandı

B. Kemik İliğinden Plazma Hücrelerinin İzolasyonu

Magnetik İşaretleme (Magnetic Labeling)

1. 1mL kemik iliği için 50 µL Whole Blood CD138 MicroBeads eklendi.
2. İyice karıştırdı ve buzdolabında (2–8 °C) 15 dakika inkübe edildi
3. Örneğe 4mL (1mL kemik iliği için) ayırma tamponu eklenerek 445g’de 10 dakika oda sıcaklığında swinging bucket rotor ile frenleme olmadan santrifüj edildi.
4. Hücre pelleti dağıtılmadan dikkatlice üst sıvı alındı. Hücre kaybını engellemek için 1-2 mm yüksekliğinde süpernatant bırakıldı
5. Toplam da 1mL hacim olacak şekilde ayırma tamponu (autoMACS Running Buffer) eklendi ve hücreler tekrar karıştırılarak homojen hale getirdi.
6. Magnetik ayırma uygulandı

Magnetik Ayırma (Magnetic separation)

1. Kolon Macs separator içindeki magnetik alana yerleştirildi
2. Kolon 3mL ayırma tamponu yıkanarak hazırlandı.
3. CD138 antikoru bağlanmış örnek mikropipet yardımı ile kolon haznesine eklendi.
4. Magnetik işaretli plazma hücreleri kolon tarafından tutuldu, geri kalanlar kolondan aktı ve 15 mL bir tüpte toplandılar ve plazma hücresi olmayan kemik iliği örnekleri olarak etiketlenip saklandılar
5. Kolon 3 kez 3mL ayırma tamponu ile yıkandı.
6. Kolon seperatörden alındı ve örneğin isminin yazılı olduğu yeni 15 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi.

7. Kolon haznesine 5 mL Whole Blood Column Elution Buffer eklendi ve hemen magnetik işaretli hücreler piston ile itilerek çıkarıldı.

4.2.2 Plazma hücrelerinden protein izolasyonu

- ✓ Elution tamponlu plazma hücreleri 5 dakika 3000g'de santrifüj edildi, üst sıvı pellete dokunulmadan alındı
- ✓ Pellet soğuk sükrözlu yıkama tamponu ile 1 kez, Fosfat tamponu (PBS) ile de 2 kez yıkandı.

***Yıkama işlemi:** Tampon içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra 2000g de 5 dakika santrifüj edildi ve tampon dikkatlice alınarak atıldı)*

***Sükrözlu Yıkama Tamponu:** 10mM Tris-HCl + 250mM Sükröz pH:7.0- (Lu ve ark. 2010)*

***Fosfat tamponu:** 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, and a pH of 7.4.*

- ✓ Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine (pelletin miktarına bağlı olarak 300-500 µl lizis tamponu (7M Üre, 2M Thiüre, %4 Chaps, %1 DTT, %2 Amfolit IPS buffer ve proteaz inhibitör cocktail tablet-Roche-) eklendi ve 15 dakika buz içinde bekletildi. Sonifikasyon işleminden sonra örnekler -80 derecede alındı.
- ✓ -80 dereceden alınan plazma hücreleri oda sıcaklığın 10 dakika bekletildi, daha sonra varteks ile karıştırıldı. ile plazma hücreleri parçalandı ve 20000g'de 45 dakika santrifüj edildikten sonra homojen protein karışımı elde edildi.

4.2.3 Protein miktar tayini (BRADFORD)

Protein karışımı içindeki toplam protein miktarı; Bradford (Bradford protein assay kit Sigma_Aldrich US) yöntemi ile Elisa reader (SpectraMax, Molecular Devices) cihazı kullanılarak mikrolitredeki mikrogram protein olarak belirlendi. Protein miktarını saptamak amacı ile BSA (Bovine Serum Albumine) standartları kullanıldı. Protein miktarlarının belirlenmesinde aşağıdaki aşamalar uygulandı

1. Öncelikle tüm örneklerin tek tek protein miktarlarının belirlendiği bir protein miktar tayini yapıldı.

2. Her örnekten 100ug protein bulunan karışımlar alındı ve 0-9, 10-20 ve +20 grup havuzları (10 örnek karışımı) oluşturuldu.
3. Oluşturulmuş grup havuzları, üre, tuz gibi ileri aşamalarda deneyleri etkileyebilecek ajanlardan kurtulmak ve konsantrasyonu artırmak amacı ile ultrafiltrasyon tüplerinden geçirildiler. Bu amaç için vivaspin 500 (Z614017) 5000 MWCO (Molecular Weight Cut Off) ultrafiltrasyon tüpleri kullanıldı.
4. Tüm bu işlemlerden sonra aşağıdaki protokol uygulanarak grupların protein miktarları tekrar tespit edildi.

Uygulama

- ✓ Uygulama süresince buz üzerinde çalışıldı
- ✓ 5X stoğu halinde bulunan Bradford protein assayı distile su ile 1X'e seyreltildi ve filtreden geçirildi
- ✓ Blank için 4 tekrar şeklinde 5'er µL distile su elisa plakası kuyucuklarına (Şekil 4.1.a) pipetlendi
- ✓ BSA Standartlar 0, 250, 500, 750 ve 1000µg şeklinde hazırlandı ve 4'er tekrar olarak elisa plakası kuyucuklarına 5'er µL konuldu.
- ✓ Plazma hücresi proteinleri gerekli seyreltmeler yapılarak (bilimselliği artırmak için iki seyrelte yapıldı) 5µL konulur.
- ✓ Tüm örneklerin üzerine 245µL 1X protein assay konuldu. Deneyler süresince 20, 25 ve 30.dakikalarda okuma yapıldı.
- ✓ Plaka elisa okuyucusuna(Şekil 4.1.b) yerleştirildi ve protein miktarları belirlendi.

Protein miktarı tespitinin doğruluğunu artırmak için aşağıdaki yöntemler uygulanmıştır.

- *Okumalar 20, 25 ve 30.dakikalarda yapılmış, en uygun olduğu düşünülen 25.dakika okumaları protein miktarları olarak kabul edilmiştir.*
- *Tüm örnekler 4 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmış ve bu tekrarların ortalamaları alınmıştır*

- *Protein karışımları farklı iki noktada seyreltilerek bu seyreltmelerin ortalamaları alınmıştır*



Şekil 4.1. a) Protein assay ve 96 kuyucuklu plaka, b) Elisa okuyucusu

4.2.4 Proteinlerin saflaştırılması/ayırıştırılması (İki yönlü jel elektroforezi/2-DE)

Protein saflaştırması, bir protein karışımından tek bir tip proteini izole etmek için uygulanan bir süreçtir. Elektroforez; proteinlerin elektriksel bir alan içerisinde büyüklüklerine, molekül ağırlıklarına, şekillerine, yüklerine bağlı olarak elektrik akımının etkisi ile hareket etmeleri esasına dayanır. Proteomik analizlerde ve protein ayırıştırmasında ise iki yönlü jel elektroforezi (Two-dimensional gel electrophoresis/2-DE) kullanılmaktadır. 2-DE, karmaşık protein karışımlarının ayrılmasında kullanılan en önemli tekniklerdendir. 2D-PAGE (İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi) olarak da adlandırılan bu yöntem proteinlerin izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayırımına olanak sağlayan protein profillemesi metodudur. Birinci yönde IEF elektroforezi ile pH gradientinde yük bağımlı ayırma(izoelektrik noktalarına göre) ve ikinci yönde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığına bağımlı ayırma yöntemi uygulanır. Her iki tekniğin kullanılması ile binlerce protein birbirinden ayrılabilir. Bu yöntem ile, proteinlerin tek tek ayırıştırılması mümkün olmamakla birlikte çözünürlüğü en yüksek ayırıştırma tekniklerinden biridir. Jel üzerlerinde boyama işlemleri sonrasında leke(spot) şeklinde protein kümeleri belirir.

Tez kapsamında 17 ya da 7 cm'lik IPG (Izoelektrik focusing gel) şerit jellerin kullanılacağı belirtilmiştir. Yapılan protein tayinleri eldeki proteinlerin 7 cm'lik şerit jeller için yeterli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle çalışmalar 7cm'lik jeller üzerinden yürümüştür. Her grup için 6 jel tekrarı yapılmış bunlardan 4 tanesi ileri analizler için alınmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. 2-D jel elektroforezi için kullanılan gruplar ve gruplan ile ilgili veriler

Gruplar	Grupları oluşturan örnek sayısı	Jel tekrarı	Yüklenen protein miktarı (jel başına)
0-9	10	6	75µg
10-20	10	6	75µg
+20	10	6	75µg

Uygulama

A.İzoelektrik noktalarına göre ayırma(IEF)

İzoelektrik noktalarına göre ayırma, örneklerin yüklenmesi (Rehidratasyon) ve yürütülmesi (IEF) olarak iki ayrı aşamada yapıldı

Plazma hücreleri 7cm'lik kullanıldı ve her stripe 75µg protein yüklendi.

- ✓ **Rehidratasyon:** Protein karışımı 7 M üre, 2 M tiyoüre , %4 CHAPS , %1 amfolit (pH 3-10), 10 mM DTT bromophenolblue boyası içeren rehidratasyon tamponu ile toplamda 125µL olacak şekilde karıştırılarak uygun trayler üzerinde 7 cm'lik IPG şerite tespit edildi. Tespit işlemi BIO-RAD protean IEF(US) cihazında 16 saat 50mV akımda bekletilerek yapıldı
- ✓ **İzoelektrik odaklama (IEF-izoelektiric focusing-):** Tespit edilmiş proteinler bu aşamada aynı strip üzerinde BIO-RAD protean IEF(US)cihazında şeritin boyutuna bağlı belirli basamaklarda belirli voltajlarda akıma tabi tutuldu ve izoelektrik noktalarına göre ayrıldı

B.SDS Page jel (Molekül ağırlıklarına göre ayırma)

Şerit jeller SDS Page jele yüklenmeden önce iki farklı dengeleme tamponu ile 15'er dakika sallayıcıda inkübe edildi

Dengeleme tamponu 1(Alkilleme): 6M Üre, 1.5M Tris-HCL, %2 Sodium dodecyl sulfate(SDS), %20 Gliserol, %2 Dithiothreitol (DTT)

Dengeleme tamponu 2(Redükleme): 6M Üre, 1.5M Tris-HCL, %2 Sodium dodecyl sulfate(SDS), %20 Gliserol ve %2.5 iodoacetamide(taze)

- ✓ SDS-PAGE jeli %4'lük toplama jeli (5M Tris-HCl tamponu, akrilamid-bisakrilamid (%40), %10 SDS, ultra saf su, %10 amonyum persülfat-APS- ve N'-tetramethylenediamine-*TEMED*-) ve %12 lik ayırma jelinden (1.5M Tris-HCl tamponu, akrilamid-bisakrilamid -%40-, %10 SDS, ultra saf su, %10 APS ve *TEMED*) oluşmaktadır
- ✓ Şerit jelle page jel üzerine %05'lik ısıtılmış agar yardımı ile tespit edildi
- ✓ Moleküler ağırlığı bilinen bir standart protein karışımı (BioLabs P7703S) marker kuyucuğuna 5mL yüklendi.
- ✓ Elektroforez işlem sabit akımda yapıldı. İlk yarım saat jel başına 15mA, daha sonra ise 18mA akım altında proteinler yürütüldü.
- ✓ Bromphenolblue boyası jel kısmının sonuna geldiğinde yürüme sonlandırıldı

4.2.5 Jel üzerindeki proteinlerin tespiti/boyama(Oriole Fluorescent Gel Stain)

Tez kapsamında Sypro ruby boyasının kullanılacağı ifade edilmiştir ancak daha yeni bir florescent boyama yöntemi olan Oriole Fluorescent Gel Stain (161-0497) boyası ile protein kümeleri jel üzerinde tespit edilmiştir. Yapılan ön çalışmalarda bu boyanın Sypro ruby ile aynı hassasiyette oldu tespit edilmiştir. Ancak fiksatif işlemleri gerektirmemesi ve sadece 90 dakika da işlemin bitmesi gibi avantajlı yönleri bulunduğu için deneylerde bu boya kullanılmıştır.

Uygulama

Her bir jel içlerinde 40mL Oriole boyası bulunan kaplarda 90 dakika süre ile çalkalanmış ve daha sonra distile su ile 3 kez yıkanırık görüntüleme işlemine geçilmiştir.

4.2.6 Jellerin görüntüsünün alınması (VERSA DOC)

Jel üzerindeki protein kümelerinin görüntüleri Bio-Rad Versadoc İmaging System Model 1000 cihazı ile alınmıştır

4.2.7 Jellerin analizi (PDQUEST 8.0.1)

PDQuest 8.0.1 software (Bio-rad) kullanılarak protein kümelerinin analizi yapılmıştır. Bu

program ile gruplar arasında önemli farklılıklar gösteren protein kümeleri tespit edilmiştir. Protein kimliklendirmeleri(tanımları) yapılan protein kümelerinin yoğunlukları SPSS(Statistical Package for the Social Sciences) istatistik paket programı ile analiz edilmiştir.

4.2.8 Jel üzerinden protein kümelerinin kesilmesi ve proteinlerin tripsin ile peptitlerine ayrılması (Protein eldesi/kazanımı)

İlgilenilen protein kümeleri jelden robotik bir sistem olan Spot Cutter (Bio-Rad) ile kesilmiştir. Elde edilen jel parçaları tripsin enzimi ile sindirim (tripsinizasyon) işlemine tabi tutularak proteinlerin peptitler halinde jelden çıkarılması sağlanmıştır. 2 gün süren ve tüm aşamaları laminar akışlı kabinde yapılan tripsinizasyon uygulaması aşağıda ana başlıkları ile sıralanmıştır.

- I. Öncelikle amonyum bikarbonat ve asetonitril ile jel parçalarından boya uzaklaştırılmıştır (destaining).
- II. Daha sonra DTT ile redükleme, iyodoasetamid ile alkilleme yapılmıştır.
- III. Bu işlemlerin ardından her bir kuyucuğa 30 µl tripsin solüsyonu (50 mM amonyum bikarbonat çözücüsü ile hazırlanmış ve içinde 150 ng. tripsin içeren solüsyondur) konulmuştur. Enzimin kendi kendini sindirmeden jele geçmesini sağlamak için 4°C'de(bu sıcaklıkta enzimin aktif olmadığı kabul edilir) 1 saat bekletilmiş ve enzimin sindirim işlemini gerçekleştirebilmesi için de gece boyu 37°C'de inkübe edilmiştir.
- IV. Daha sonra ekstraksiyon tamponu (%1 formik asit, %2 asetonitril) ile muamele edilmiş, böylece jel içinde hapsolmuş peptidler tampon ile açığa çıkarılmış ve sıvı halde temiz bir 96 kuyucuklu plakaya alınarak kurumaya bırakılmıştır. Tripsinizasyon işleminin bütün basamakları laminar akışlı kabinde yapılmıştır.

4.2.9 Kütle Spektrometresi cihazında (MALDI-TOF MS) peptit kütlelerinin belirlenmesi.

Örnek yükleme plakalarına (Waters) yükleme yapılmadan önce aşağıdaki hazırlıklar yapılmıştır.

- I. MALDI-TOF örnek yükleme plakası ultrasonik su banyosunda sırasıyla; % 3-4' lük amonyum hidroksit çözeltisi, ultra saf su, metanol ve asetonitril ile 5'er dakika muamele edilerek temizlenmiş ve örnek yüklemeye uygun hale getirilmiştir.
- II. İyonlaşmayı sağlayacak matriks olarak rekristalize edilmiş alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) kullanılmıştır. CHCA, 50 µl/1mg olacak şekilde (%75 asetonitril, %0.1 trifloro asetik asit (TFA) ve %25 HPLC su karışımından oluşan matriks tamponu içerisinde çözülmüştür.

96 kuyucuklu plaka içerisinde tripsinizasyon sonrası kuru halde bulunan peptid karışımları, ZipTip C18(Milipore ZTC 18S960) kolonundan geçirilmiş ve bu işlem sonunda matriks tamponu ile 1:1 oranında karıştırılmıştır. Daha sonra MALDI-TOF örnek yükleme plakasının kuyucuklarına 1,5 µl. yükleme yapılmıştır. Yükleme sonrası plaka 1 saat kadar kurumaya bırakılmıştır.

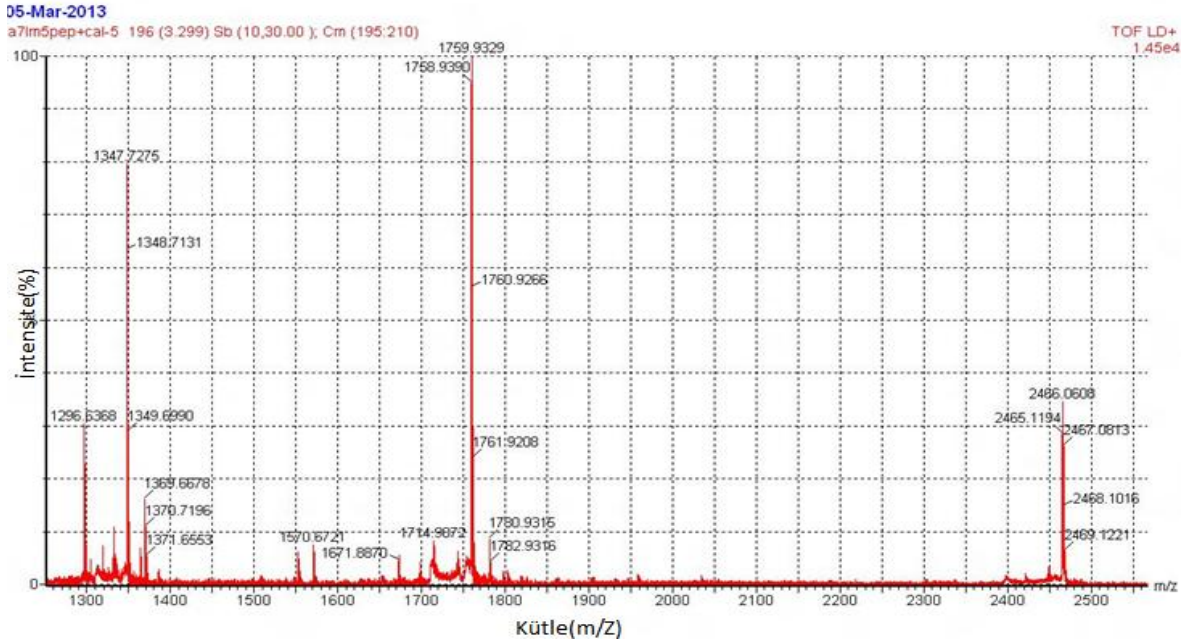
MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonu örnek plakasında bulunan “Lock Mass” kalibrasyon kuyucuklarına yüklenen beş peptid karışımı ile yapılmıştır (dış kalibrasyon). Kütleleri bilinen bu peptidler aracılığı ile cihazın kalibrasyonu yapılarak kütle okumalarındaki kaymalar engellenmiştir. Bu amaçla, kullanılan Adrenokortikotropik Hormon (ACTH), Glu1-fibrinopeptid B (Glu-Fib), Substance P, renin-14 ve Anjiyotensin-1 peptitlerinin kütleleri Çizelge 4.5’de verilmiştir. Bu peptitlerin MALDI TOF kütle spektrometresinde belirlenen kütleleri ise şekil 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. MALDI-TOF MS cihazının kalibrasyonunda kullanılan peptidler

Peptidin adı	Kütlesi (Da)
ACTH	2465.1989
Glu-Fib	1570.6774
Substance P	1347.7360
Renin-14	1758.9326
Anjiyotensin 1	1286.6853

Tüm yüklemeler yapıldı, plakanın kurumması tamamlandıktan sonra cihaz üzerinde ölçümlere geçilmiştir. Tüm ölçümler MassLynx 4.0 programı aracılığı ile Waters Micromass MALDI-TOF kütle spektrometresinde 500-3000 *m/z* arasında ve reflektyon

pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. M/z oranı kütle/yük oranını ifade etmektedir. Tüm peptid ölçümleri +1 yüklü olarak iyonlaştırılıp ölçüldüğü için m/z değeri doğrudan kütle olarak ifade edilebilir.



Şekil 4.2. Kalibrasyon peptitlerinin MALDI-TOP MS spektrumu.

4.2.10 Biyoinformatik analiz

MassLynx 4.0 programında spektrumlar elde edildikten sonra spektrum üzerindeki en uygun kütle okuma aralıklarını ortalaması alınmış (combine) ve tüm örnek spektrumları arkaplan çıkarımı(substract) işlemine tabi tutulmuştur. Peptid kütle değerlerinin karşılaştırmalı analizi için Mascot (Software for protein identification using mass spectrometry data) yazılımı, UniProtKB bilgi tabanlı sistemi ve referans jel kütüphanesi kullanılmıştır.

Mascot yazılımı ile protein tanımlaması: MALDI-TOF spektrumlarından elde edilen m/z değerleri belirtilen Mascot veritabanında taranırken yazılım üzerinde yapılanlar aşağıda sıralanmıştır.

- Peptid örneklerine iyodoasetamid ile alkilleme yapıldığı(bu durum peptid kütlelerinde artışa neden olur) için sistein karbamidometillenmesi sabit modifikasyon olarak seçilmiştir. Değişken modifikasyonlar olarak da metiyonin oksidasyonu ve fosforilasyonlar araştırılmıştır.

- Çalışılan canlı insan olduğu için yazılımda taksonomi bölümü Homo sapiens (Human) olarak seçilmiştir. Böylece verilen m/z değerleri ile eşleşen peptidlerden yalnızca insanda bulunanların listelenmesi sağlanmıştır. Peptid toleransı ± 0.4 ile ± 0.8 Da aralığında seçilmiş, en fazla 1 kaçırılan kesime(missed cleavages) izin verilmiştir (Şekil 4.3).

Home Mascot database search Products Technical support Training News Blog Contact

Access Mascot Server | Database search help

Mascot database search > Access Mascot Server > Peptide Mass Fingerprint

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name [REDACTED]@N Email [REDACTED]@.com

Search title [REDACTED]

Database(s) SwissProt NCBI nr contaminants cRAP Enzyme Trypsin Allow up to 1 missed cleavages

Taxonomy Homo sapiens (human)

Fixed modifications Carbamidomethyl (C) Acetyl (K) Acetyl (N-term) Acetyl (Protein N-term) Amidated (C-term) Amidated (Protein C-term) Ammonia-loss (N-term C) Biotin (K) Biotin (N-term) Carbamyl (K) Carbamyl (N-term) Carboxymethyl (C)

Variable modifications Oxidation (M) Phospho (Y) Phospho (ST)

Protein mass [REDACTED] kDa Peptide tol. \pm 1.2 Da

Mass values MH⁺ M_r M-H⁻ Monoisotopic Average

Data file

Query

883.061800
913.774100
1043.015900
1135.243400
1291.422900
1798.741300

Decoy Report top AUTO hits

Şekil 4.3. Mascot yazılımı peptid araştırma arayüzü.

4.2.11 Materyal ve Yöntem(FT-IR)

4.2.11.1 Materyal

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ve İbn-i Sina Hastanesi Hematoloji ve İmmünoloji laboratuvarlarından yaşları 30-75 arası değişen hastalardan toplanan serum ve 24 saatlik idrar örnekleri (Çizelge 4-6 ve 4-7) kullanılmıştır.

Tez İçeriğindeki Değişimler

- ✓ FT-IR çalışmasında sadece idrar örnekleri kullanılacağı belirtilmiştir. Ancak daha sonra serum çalışmalarında FT-IR çalışmasına kaydırılmıştır.

4.2.11.2 Yöntem

Çalışma öncesi, deney grup ve koşullarının belirlenmesi ve kaliteli spektrumlar alınması için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda aşağıdaki yöntem oluşturulmuş ve uygulanmıştır.

- İdrar ve serum örnekleri Freeze Dryer (Millrock Technology BT53B) cihazında 4 gün tutularak liofilize edildi
- Liofilize idrar ve serum örneklerinin ölçümleri, orta kızılötesi bölgede, oda sıcaklığında ZnSe kristale sahip ATR (Pike Miracle ATR Cell) aparatı ile Tensor 27 (Bruker) cihazında yapıldı.
- Örnek ölçümlerinden önce, boş bir ölçüm(hava ve cihazdan kaynaklanan arkaplan) alındı.
- Arkaplan alındıktan sonra örnek doğrudan ATR kristali üzerindeki örnek okuma hücreğine konuldu ve uygun aparat ile sıkıştırılarak ölçüm yapıldı. Örnekler 3 tekrarlı olarak ölçüldü ve ortalamaları alındı. Tüm ölçümler ve spektrum üzerindeki analizler OPUS 5.5 (Bruker) programı ile yapılmıştır

Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan serum örnekleri

GRUPLAR	MATERYAL NO	ALINMA TARİHİ	CİNSİYET
MGUS	01	Aralık 2011	Kadın
7 kadın + 3 erkek = 10 birey	10	Nisan 2012	Kadın
	13	Aralık 2011	Erkek
	22	Mart 2012	Kadın
	36	Haziran 2012	Kadın
	37	Mart 2012	Kadın
	52	Mart 2012	Kadın
	64	Mart 2012	Erkek
	81	Haziran 2012	Kadın
	113	Ekim 2012	Erkek
SMM	04	Mart 2012	Erkek
5 kadın + 2 erkek = 7 birey	06	Nisan 2012	Kadın
	09	Ocak 2012	Erkek
	12	Nisan 2012	Kadın
	21	Nisan 2012	Kadın
	50	Şubat 2012	Kadın
	53	Nisan 2012	Kadın
MM	03	Ocak 2012	Erkek
7 kadın + 3 erkek = 10 birey	14	Şubat 2012	Kadın
	16	Şubat 2012	Kadın
	19	Ocak 2012	Kadın
	20	Aralık 2011	Erkek
	48	Şubat 2012	Kadın
	54	Nisan 2012	Erkek
	65	Nisan 2012	Kadın
	72	Ağustos 2012	Kadın
	76	Nisan 2012	Kadın

Çizelge 4.7. Çalışmada kullanılan idrar örnekleri

	GRUPLAR	ÖRNEK KODLARI
1	Kontrol	5-AY
		8-AA
		24-HA
		67-KA
2	MGUS	01-ZO
		07-ST
		09-MAT
		10-ASK*
		13-AD
		22-AK
		37-ZS
		64-MB
3	SMM	04-EK-rpls
		06-SO
		12-RB
		21-NE
		53-SK
4	MM	
	Yenit tanı(nd)	03-EE-nd*
		14-MK-nd
		17-GY-nd
		54-MC-nd
		76-ND-nd
	Nüks(rpls)**	20-HIC-rpls
		48-EES-rpls
5	Bilinmeyen(kör)	
		49-HU
		50-ZA
		66-HIP

*İşareti örneklerin farklı zamanlarda alınan örnekleri hastalık seyrinin takibinde kullanılmıştır.

**Nüks: Tamamen iyileştikten belirli bir süre sonra tekrar MM tanısı almış bireyler.

5 BULGULAR

Çalışmalar sonucunda tespit edilen bulgular proteomik ve FTIR çalışmaları bulguları olarak iki ana başlık altında ele alınmıştır.

5.1 Proteomik(Spektrometrik) Çalışmalar

Daha önce belirtildiği gibi (bölüm 4.1 Materyal) çalışma grupları kemik iliğindeki plazma hücreleri yüzdelere göre belirlenmiştir. Plazma hücrelerinin oranındaki artış hastalığın ilerlemesi anlamına gelmektedir ve +20 grubu hastalığın en ağır evresi olarak belirlenmiştir.

Gruplar için yapılan 20. dakika protein miktar tayinleri Şekil 5.1'de verilmiştir. Şekil 5.1C'de verilmiş protein miktarları 4 tekrar ortalamalarıdır. Her grup için 20 ve 30 kat seyreltmelerdeki protein miktarlarının aritmetik ortalamaları alınarak kesin protein miktarları saptanmıştır. Protein miktarları belirlendikten sonra yine her grup için toplamda 75µ protein içeren 6 adet 2-DE jel hazırlanmış ve bunlardan 4'er tanesi PDQuest 8.01 programı ile analiz edilmiştir. Gruplara ait karakteristik protein profilleri içeren jellere ait birer örnek Şekil 5.2, 5.3, ve 5.4'te. Şekil 5.5'te ise PDQuest programında gruplara ait protein kümelerinin(spot) karşılaştırmalı (matchset) sonuçları ve değerleri verilmiştir. Programda her gruptan 4'er jel tekrarı analize alınmış, her jel üzerindeki protein kümelerinin diğer jel üzerindeki protein kümeleri ile büyük oranda eşleştiği (match rate) tespit edilmiştir. Yıldız (*) ile işaretli 0-9 grubu jeli program tarafından master jel olarak seçilen jeli ifade etmektedir. Master olarak seçilen jel analizlerde normal olarak bulunmaktadır, sadece bir kopyası program tarafından master jeli olarak birinci sıraya alınmakta ve bu jel üzerindeki protein kümelerini baz alarak diğer jel protein kümelerini karşılaştırmaktadır. Analizler sırasında her protein kümesine program tarafından SSP(sample spot protein) olarak adlandırılan bir numara verilmektedir.

Şekil 5.6, 5.7 ve 5.8'de verilen serpm çizim sonuçları ise her grubun ayrı ayrı birbirleri ile karşılaştırılması sonucu yoğunluğu en az 2 kat değişim gösteren protein kümelerini (çember ile gösterilmiştir) göstermektedir. Paralel çizgiler karşılaştırılan grupları temsil etmektedir. Paralel çizgiler arasında kalan protein kümelerinde önemli bir değişim yoktur. Çizgiler dışındakiler ise en az 2 kat artan(üst bölge) ya da yarıya düşen (alt bölge) protein kümelerini ifade etmektedir. Programın çalışma biçimine bir örnek teşkil etmesi açısından,

scotter plot üzerinde seçilen (çarpı ile işaretli) protein kümelerinin sol tarafta jel üzerindeki görüntüleri sarı çerçeve içine alınmıştır. Tüm bu veriler ışığında protein kümeleri tek tek incelenmiş ve önemli değişim gösterenler saptanmıştır.

Bradford Protein Assay

Customizing this Protocol:

1. Select your specific reader model using the Edit:Preferences menu item.
2. Modify your specific reader options using the Control:Instrument Setup menu item.
3. Select each Plate section below and click the [Template] button to assign any default or new Groups. You can print and use this template to facilitate microplate preparation.
4. With a Plate section selected below, specify your desired Reduction and Display (Raw vs. Reduced) parameters by pressing the [Reduction] and [Display] buttons.
5. Save this modified protocol with a different name and with "SoftMax Pro Protocol" selected for format in the Save dialog. This new protocol must reside in the same folder as the SoftMax Pro application. Your modified protocol can now be accessed through the Assays menu item.

A

	Plate#1															
	1	2	3	4	5	6	7	8								
A	0,003	-0,004	-0,000	0,002	0,150	0,167	0,173	0,158	<table border="1"> <tr><td>Endpoint</td></tr> <tr><td>Absorbance</td></tr> <tr><td>Lm1 595</td></tr> <tr><td>Automix: Off</td></tr> <tr><td>Calibrate: Off</td></tr> <tr><td>Column Priority</td></tr> <tr><td>Plate Last Read: 16:56 11.01.2013</td></tr> </table>	Endpoint	Absorbance	Lm1 595	Automix: Off	Calibrate: Off	Column Priority	Plate Last Read: 16:56 11.01.2013
Endpoint																
Absorbance																
Lm1 595																
Automix: Off																
Calibrate: Off																
Column Priority																
Plate Last Read: 16:56 11.01.2013																
B	0,148	0,206	0,160	0,166	0,163	0,131	0,144	0,136								
C	0,281	0,324	0,333	0,330	0,270	0,292	0,264	0,240								
D	0,407	0,471	0,439	0,401	0,194		0,189	0,191								
E	0,539	0,528	0,556	0,593												
F	0,663	0,692	0,695	0,699												
G	0,196	0,232	0,221	0,187												
H	0,125	0,136	0,145	0,148												

Wavelength Combination: !Lm1

Mean Temperature: 26,0

Data Mode: Absorbance

Plate Blank Used Lm1 = 0,32

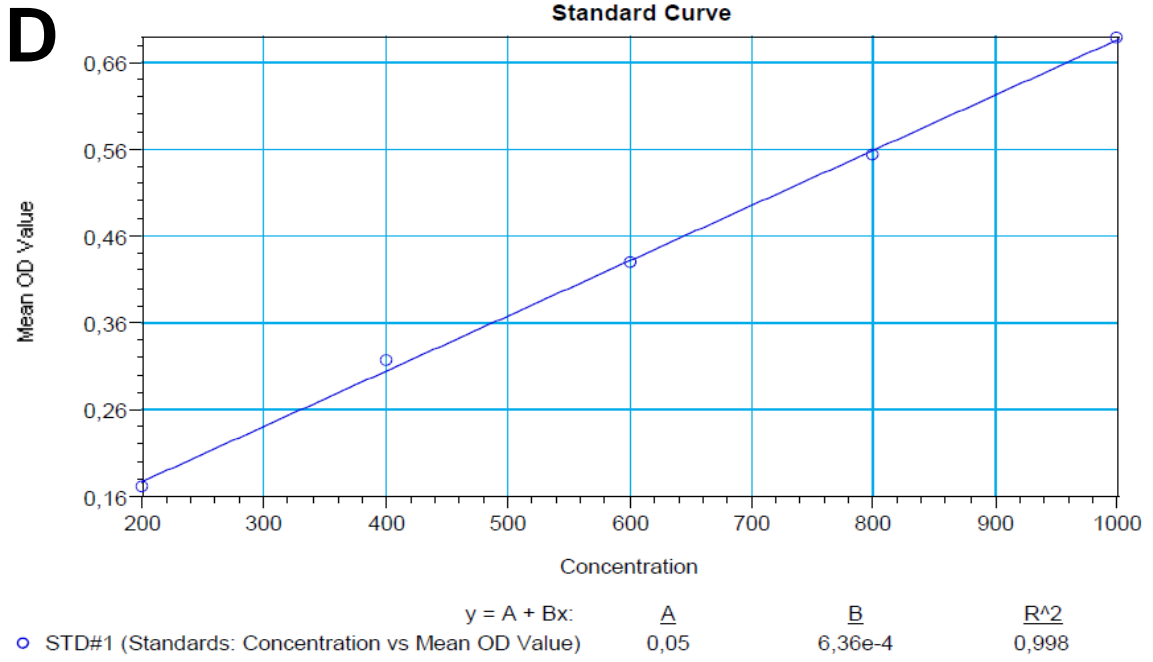
Reader: SPECTRAmax M2 ROM v2.00c73 05Aug04

B**Standards (µg/ml)**

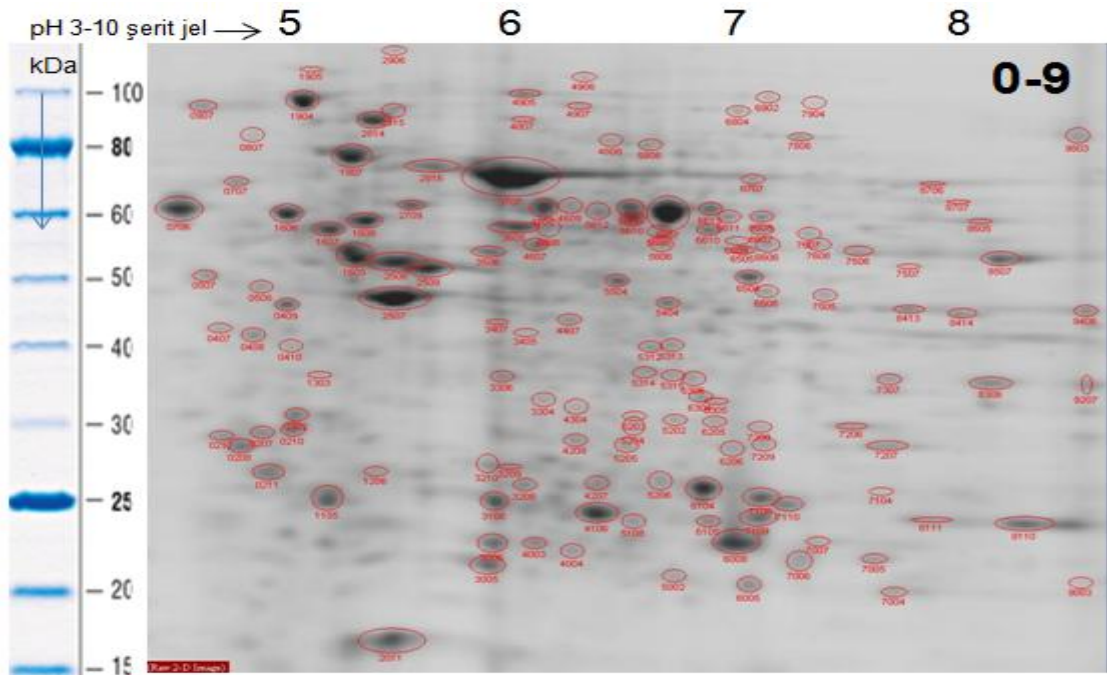
Sample	Concentration	Back Calc Conc	Wells	OD Values	Mean OD Value	Std.Dev.	CV%
St01	200,000	153,659	B1	0,148	0,170	0,025	14,7
		244,595	B2	0,208			
		173,482	B3	0,160			
		182,135	B4	0,166			
St02	400,000	363,850	C1	0,281	0,317	0,024	7,6
		431,029	C2	0,324			
		445,503	C3	0,333			
		439,525	C4	0,330			
St03	600,000	561,926	D1	0,407	0,430	0,032	7,5
		661,830	D2	0,471			
		611,328	D3	0,439			
		552,015	D4	0,401			
St04	800,000	769,443	E1	0,539	0,554	0,028	5,1
		751,350	E2	0,528			
		796,503	E3	0,556			
		853,299	E4	0,593			
St05	1000,000	963,566	F1	0,663	0,687	0,017	2,4
		1009,841	F2	0,692			
		1014,403	F3	0,695			
		1020,697	F4	0,699			

C**Unknowns**

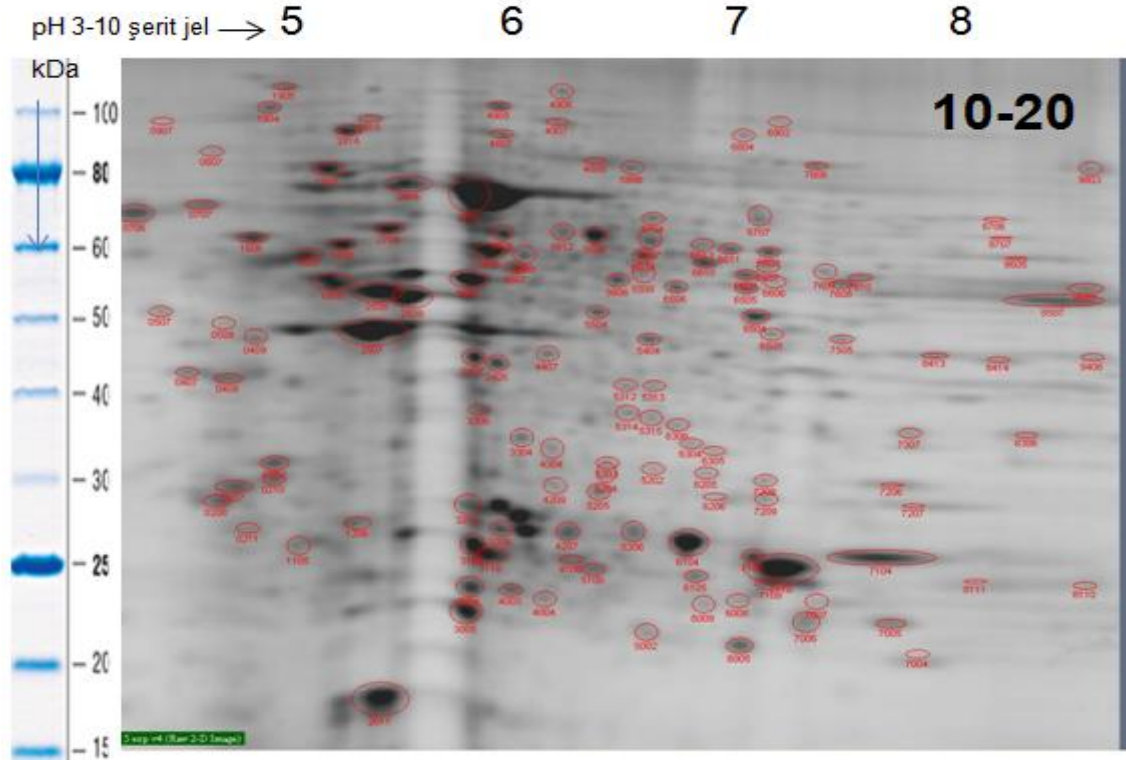
Sample	Wells	OD Values	Concentration	Mean Conc.	Std.Dev.	CV%	Dilution	Adj. Conc.
+20 20dk 20dl	C5	0,270	346,386	340,762	33,828	9,9	20,0	6815,237
	C6	0,292	380,999					
	C7	0,264	336,947					
	C8	0,240	298,716					
+20 20dk 30dl	D5	0,194	226,030	222,044	3,578	1,6	30,0	6661,331
	D7	0,189	219,108					
	D8	0,191	220,995					
0-9 20dk 20dl	G1	0,196	228,862	249,708	32,980	13,2	20,0	4994,159
	G2	0,232	286,130					
	G3	0,221	268,194					
	G4	0,187	215,646					
0-9 20dk 30dl	H1	0,125	117,159	138,909	16,613	12,0	30,0	4167,280
	H2	0,136	135,094					
	H3	0,145	149,096					
	H4	0,148	154,288					
10-20 20dk 20dl	A5	0,150	157,592	175,921	15,496	8,8	20,0	3518,417
	A6	0,167	183,866					
	A7	0,173	192,676					
	A8	0,158	169,549					
10-20 20dk 30dl	B5	0,163	178,045	146,854	22,325	15,2	30,0	4405,632
	B6	0,131	127,070					
	B7	0,144	146,894					
	B8	0,136	135,409					



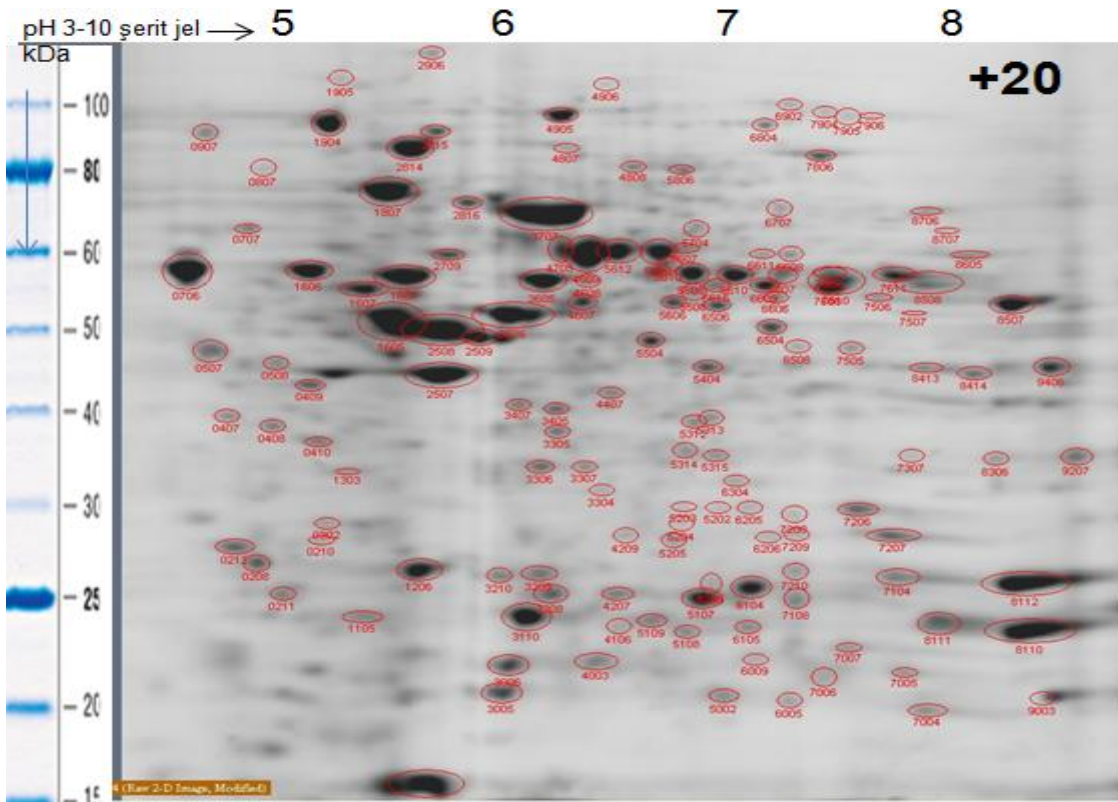
Şekil 5.1. Protein miktar tayini A) Örneklerin plakaya yüklenme sırası B) Standartların OD değerleri C) Örneklerin OD değerleri ve protein miktarları, D) Standart grafik



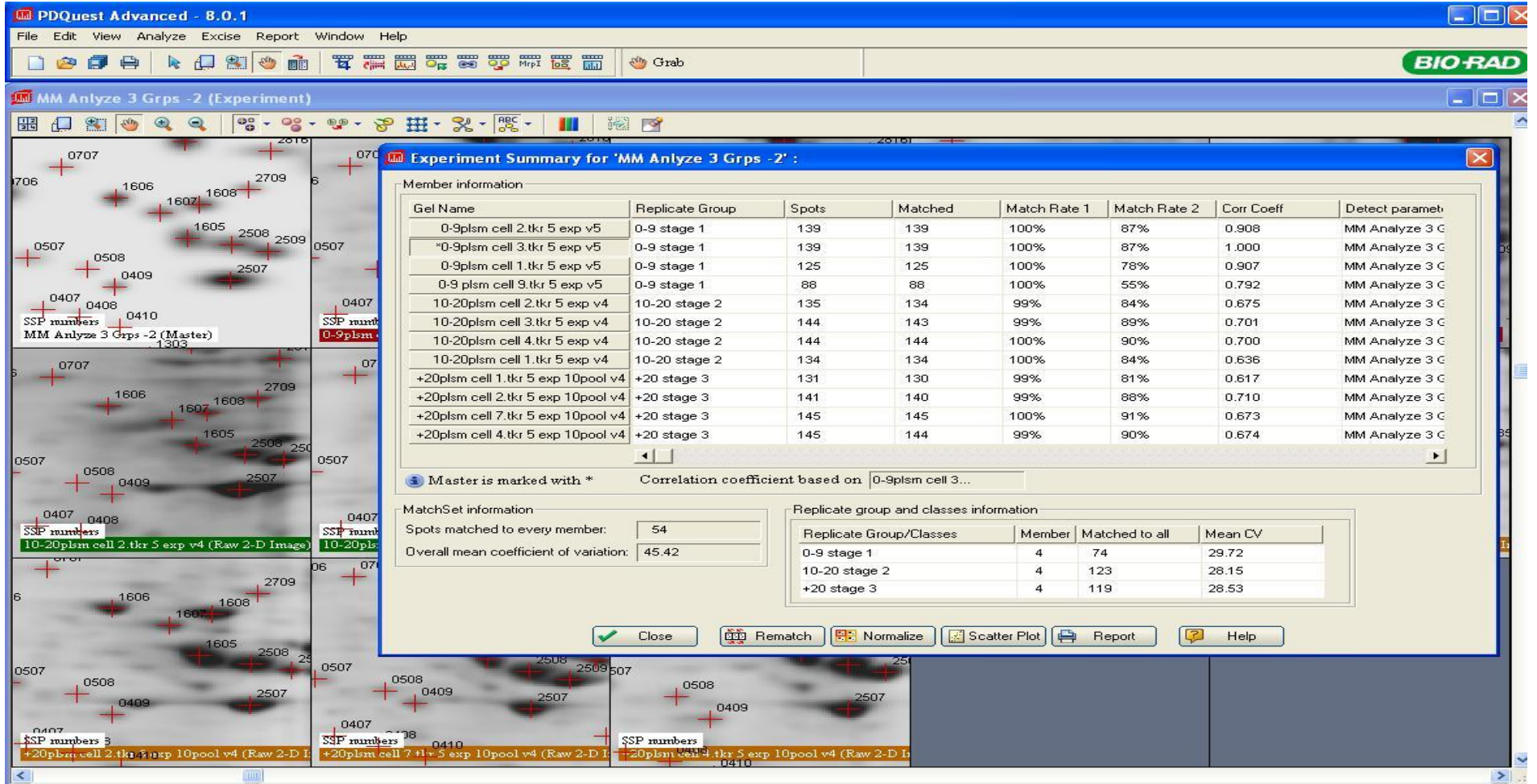
Şekil 5.2. 0-9 grubuna ait 2-DE jel protein profili (Protein profilleri analiz edilen jel bölgelerini içirmektedir. Bu nedenle marker bölgeleri de dâhil olmak üzere analize alınmamış bölgeler görülmemektedir)



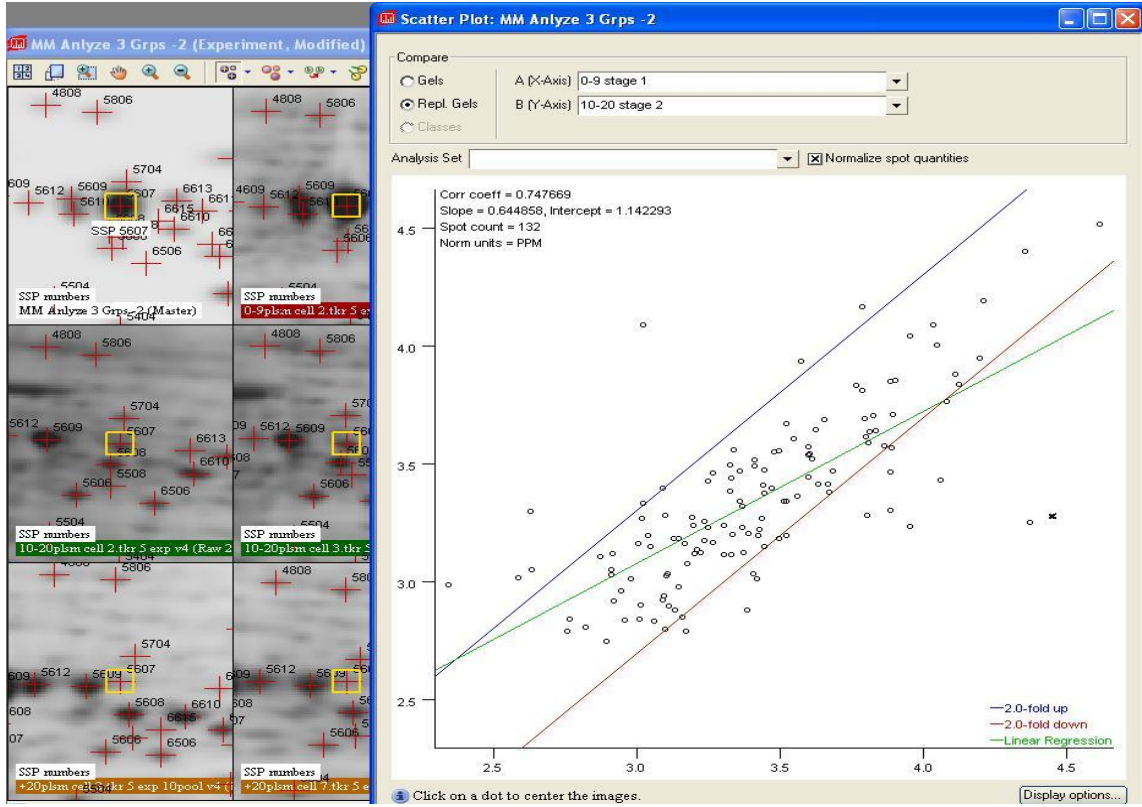
Şekil 5.3. 10-20 grubuna ait 2-DE jel protein profili



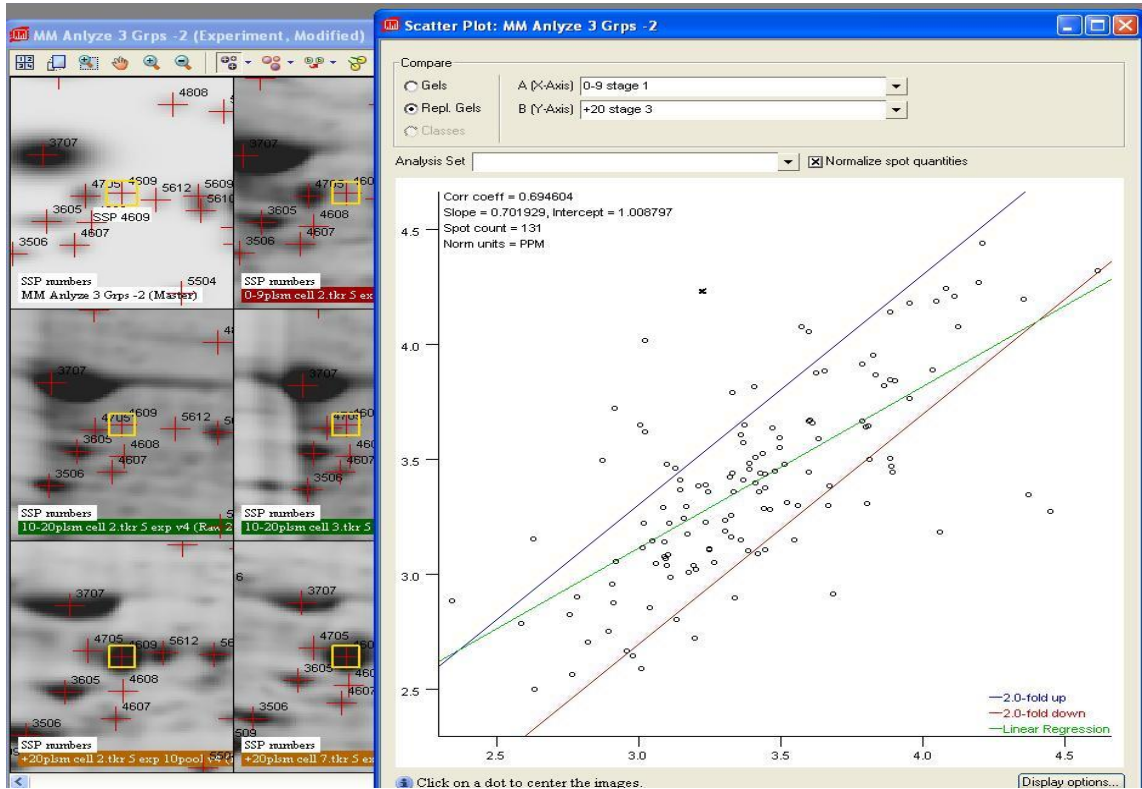
Şekil 5.4. +20 grubuna ait 2-DE jel protein profili



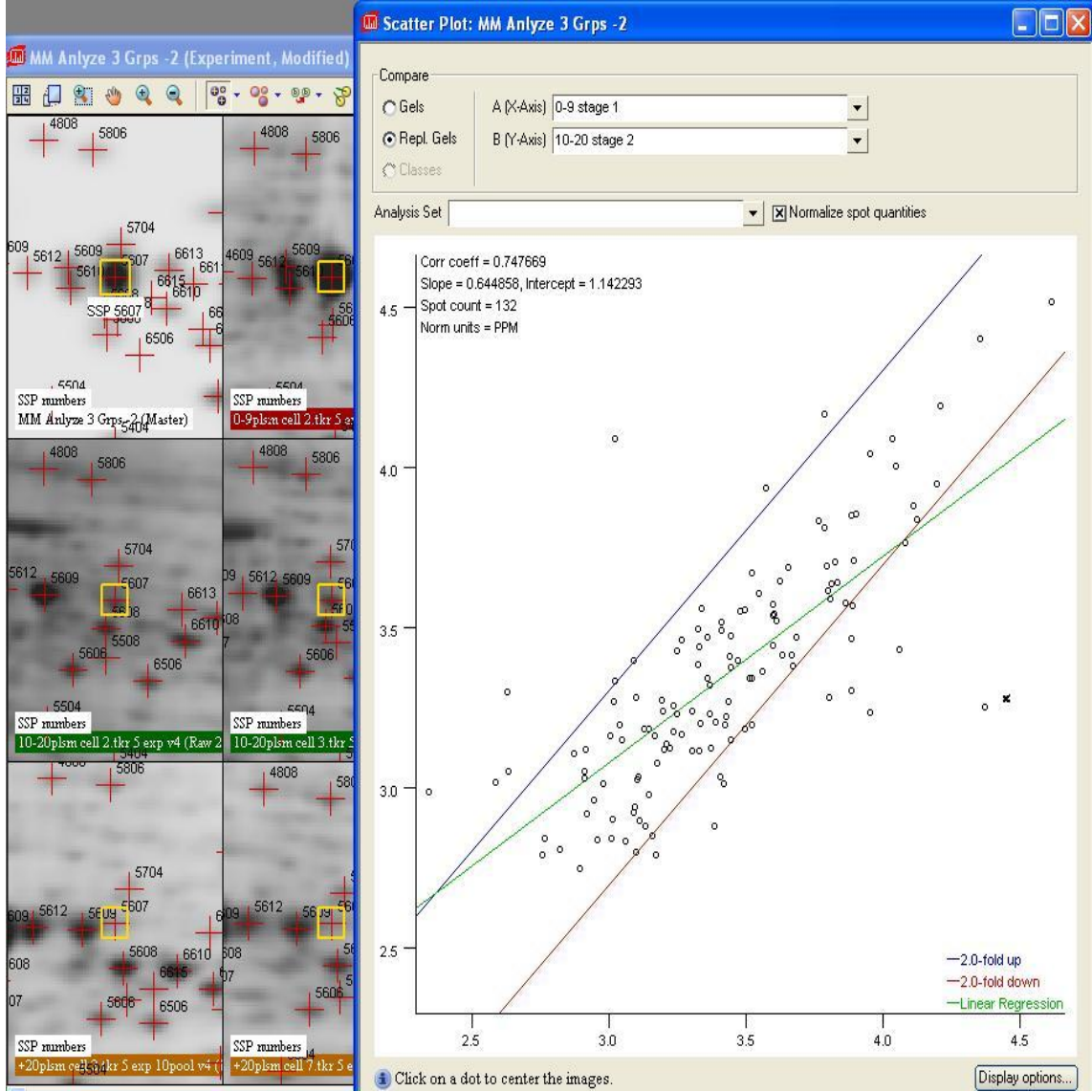
Şekil 5.5. PDQuest programında küme(spot) eşleştirilmesi (matchset) sonucu bulunan protein spotları ve deneysel değerler.



Şekil 5.6. 0-9 grubu ile 10-20 grubunun karşılaştırmalı analizi sonucu ortaya çıkan serpmе çizim (scatter plot) verileri.



Şekil 5.7. 0-9 grubu ile +20 grubunun karşılaştırmalı analizi sonucu ortaya çıkan serpmе çizim (scatter plot) verileri



Şekil 5.8. 10-20 grubu ile +20 grubunun karşılaştırmalı analizi sonucu ortaya çıkan serpmeye çizim (scatter plot) verileri

5.1.1 Kütle Spektrometrisi ile kimliklendirmesi(tanımı) yapılan protein kümeleri

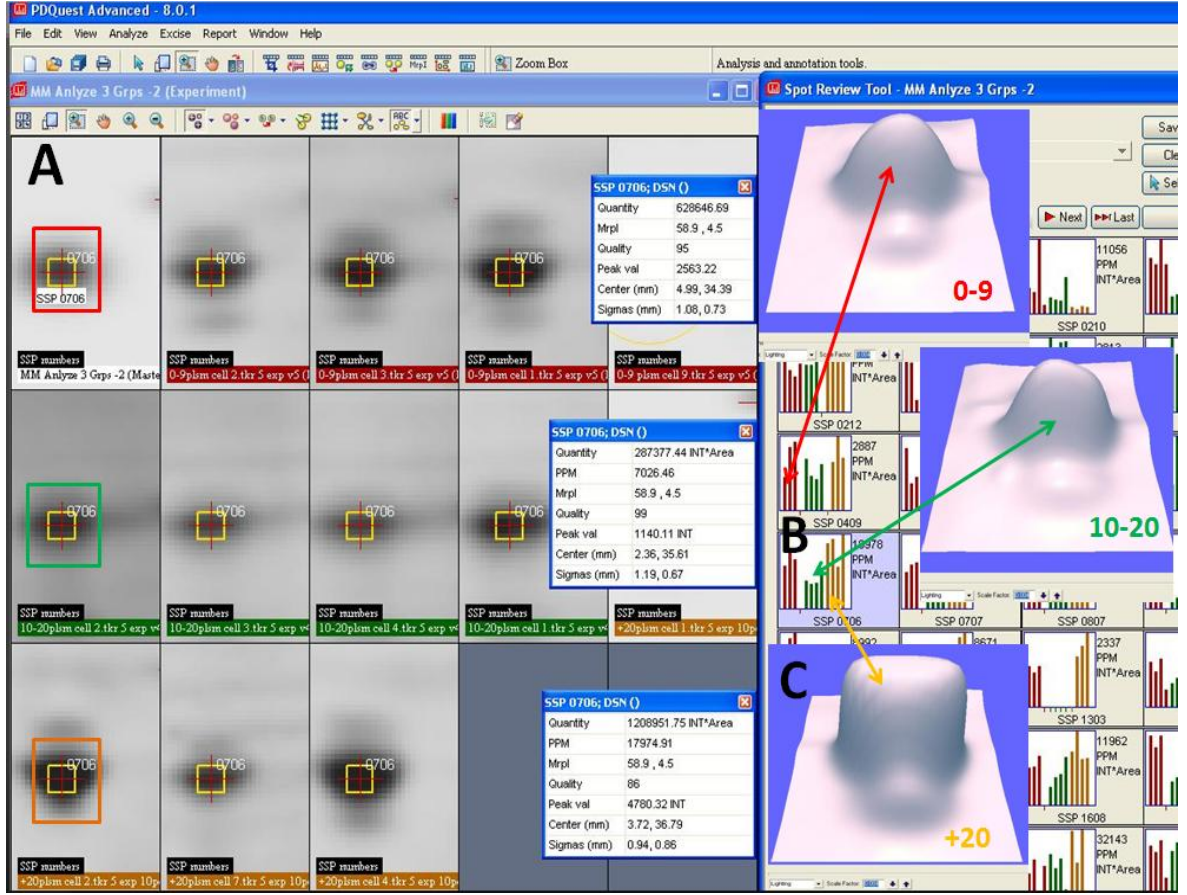
Maldi ToF MS kütle spektrometrisi ile tanımlaması yapılan proteinler aşağıda çizelge halinde gösterilmiştir (Çizelge 5.1)

Çizelge 5.1. Kütle spektrometresi ile tanımı yapılan protein kümeleri ve bu kümelere ait bilgiler

SSP	Protein	UniProt numarası	Gözlenen kütle(Da)	Teorik kütle(Da)	Gözlenen pI	Teorik pI	Skor	Protein sekans sapsamı (%)	Araştırılan peptid sayısı /Eşleşen peptit sayısı
0706	Calreticulin	P27797	58900	48230	4.50	4.59	102	32	10/8
1606	Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	58080	57480	5.02	4.76	82	14	10/7
1904	Endoplasmin/Tumor rejektion antigen gp96	P14625	108100	92569	5.01	4.76	100	14	10/10
2011	Marginal zone B and B1 cell specific protein	Q8WU39	19300	21023	5.49	5.37	106	52	10/7
2507	ACTB-HUMAN, Actin, cytoplasmic1	P60709	45300	42052	5.5	5.29	153	34	10/8
2508	Thioredoxin domain-containing protein 5 ER protein 46	Q8NBS9	50470	48283	5.50	5.63	142	24	10/8
3108	Peroxiredoxin -4	Q13162	26170	30749	5.93	5.86	105	38	10/7
3110	Peroxiredoxin -4	Q13162	25900	30749	6.00	5.86	123	58	25/10
3110-2	Apoptosis regulator Bcl-2	P10415	25900	26363	6.00	6.75	65	48	25/6
8110	Myeloblastin, Leukocyte proteinase 3	P24158	25020	28245	8.5	8.45	96	33	10/5

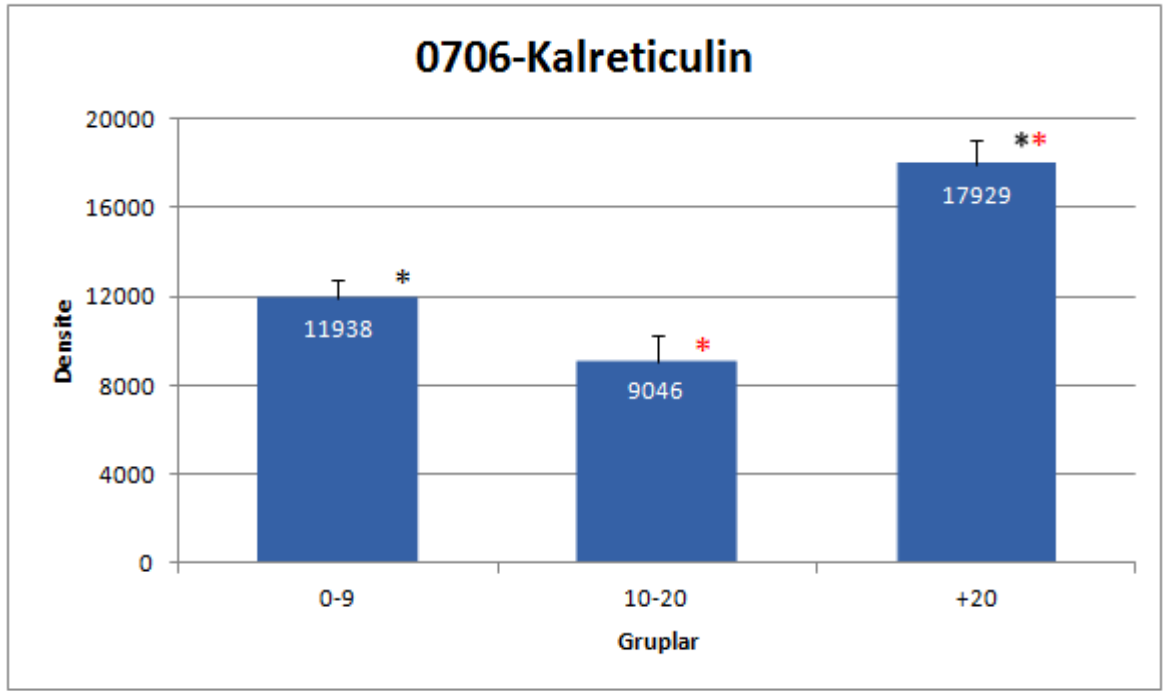
*PDQuest tarafından belirlenen kütle ve izoelektrik noktaları kesin değerler olarak kabul edilmezler, önemli sapmalar olabilir. Ancak mascot gibi yazılımlar sonucu bulunan protein listesi içerisinde doğru proteinin bulunmasında yol gösterici olabilir.

5.1.1.1 0706 numaralı protein kümesi-Kalretikulin



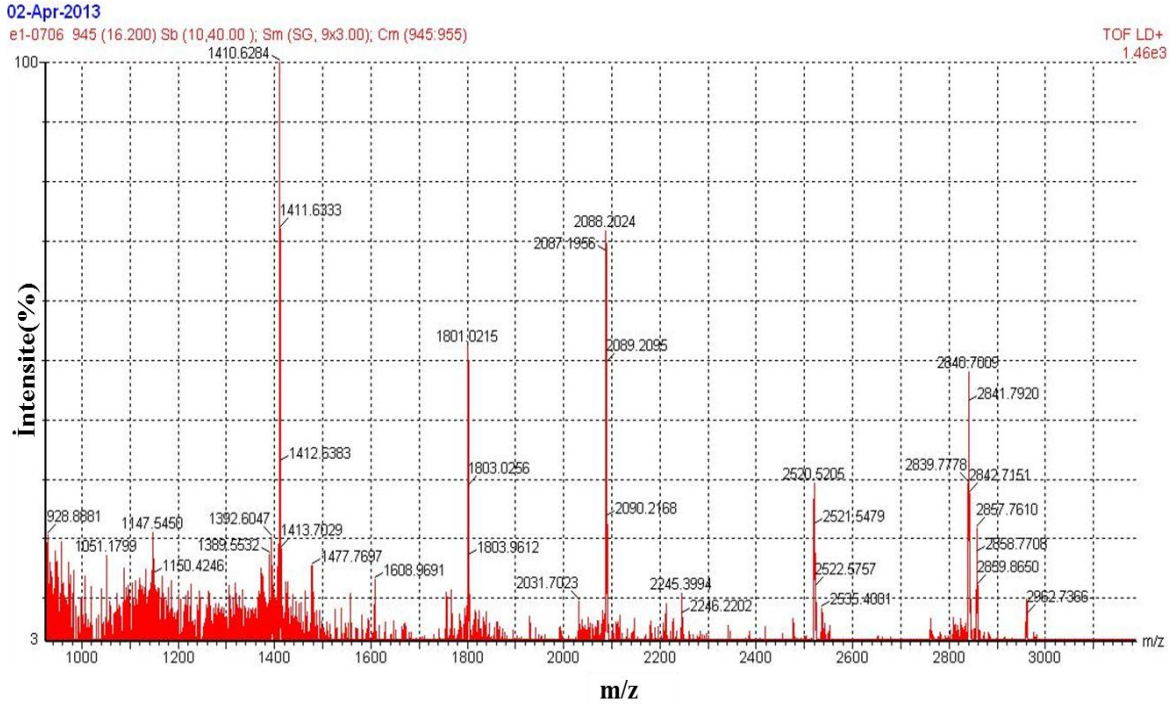
Şekil 5.9. 0706 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi C) Protein kümelerinin üç boyutlu görünümü

0706 numaralı protein kümesi densitesinde(yoğunluk/şiddet) en ileri seviyede hasta örneklerinin bulunduğu +20 grubunda diğer iki gruba göre önemli bir artış olmuştur (Şekil 5.9). Gruplar arasındaki densite değerlerinin grafiksel değişimi Şekil 5.10'da verilmiştir. Kütle spektrometresi ile peptit kütleleri belirlendikten sonra(Şekil 5.11) Mascot yazılımı ile protein tanımlanması yapılmış ve çok yüksek bir skorla bu kümede bulunan proteinin Kalretikulin (Şekil 5.12) olduğu saptanmıştır. Araştırmaya alınan 10 peptitten 8 tanesinin Kalretikulin proteinine ait olduğu bulunmuş ve bu peptitlerin toplam protein sekansının % 32'sini oluşturduğu tespit edilmiştir(Şekil 5.13).



*P< 0.05, *P< 0.05

Şekil 5.10. 0706 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması



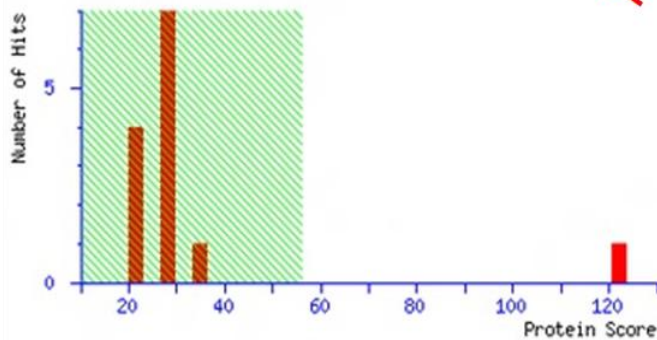
Şekil 5.11. 0706 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin MALDİ TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : SwissProt 2013_06 (540261 sequences; 191876607 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20258 sequences)
Timestamp : 13 Jun 2013 at 18:31:09 GMT
Top Score : 122 for **CALR_HUMAN**, Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As: Concise Protein Summary [Help](#)
Significance threshold p<: 0.05 Max. number of hits: AUTO
Preferred taxonomy: All entries

Re-Search All Search Unmatched

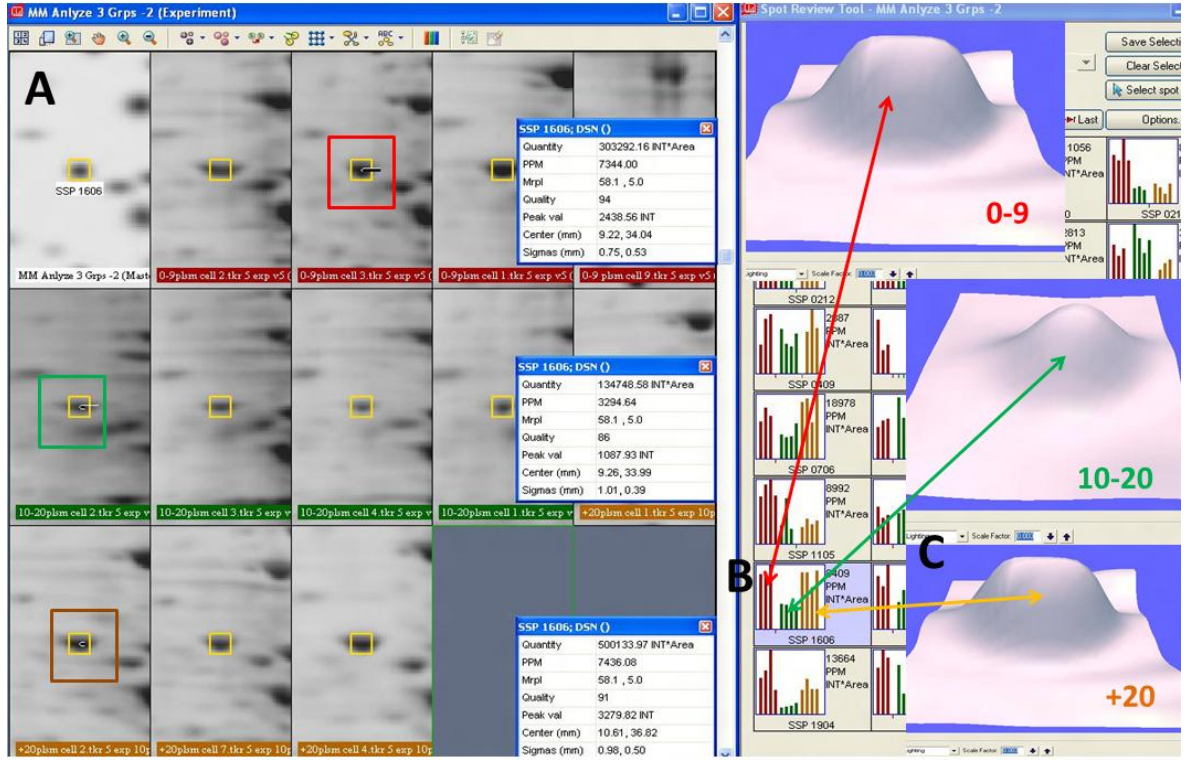
1. **CALR_HUMAN** Mass: 48283 Score: 122 Expect: 1.3e-08 Matches: 8
Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1
PP5D1_HUMAN Mass: 19895 Score: 43 Expect: 1.1 Matches: 3
Protein PPP5D1 OS=Homo sapiens GN=PPP5D1 PE=2 SV=2
F198B_HUMAN Mass: 58257 Score: 39 Expect: 2.8 Matches: 4
Protein FAM198B OS=Homo sapiens GN=FAM198B PE=2 SV=1
TRM6_HUMAN Mass: 56049 Score: 31 Expect: 15 Matches: 3

Şekil 5.12. 0706 numaralı protein kümesinde mascot yazılımı araştırması sonucu tespit edilen protein

Protein	P27797-CALR_HUMAN, Calreticulin, CRP55, Calregulin, Endoplasmic reticulum resident protein 60(ERp60), HACBP, grp60			
Veri Tabanı	UniProtKB/Swiss-Prot (2013)			
Yazılım	Mascot			
Mascot skor	122 (56'nın üzerindeki skorlar anlamlıdır-p<0.05-)			
Teorik pI	4.29			
Gözlenen pI	4.50			
Teorik kütle	48283			
Gözlenen kütle	58.90			
Araştırma Parametreleri				
Enzim	Tripsin			
Sabit Modifikasyon	Karbamidometil(CAM)			
Araştırılan peptit	10			
Eşleşen peptit	8			
Protein sekans kapsamı	% 32 (Eşleşen sekanslar kırmızı ile gösterilmiştir)			
1	MLLSVPLLLG	LLGLAVAEP	VYFK EQFLDG	DGWTSRWIES KHKSDFGK FV
51	LSSGKFY GDE	EKDKGLQTSQ	DAR FYALSAS	FEPFSNKGQT LVVQFTVK HE
101	QNIDCGGGYV	KLFPNSLDQT	DMHGDSEYNI	MFGPDICGPG TK KVHVIFNY
151	KGKNVLINKD	IRCKDDEFTH	LYTLIVRPDN	TYEVKIDNSQ VESGSLEDDW
201	DFLPPKKIKD	PDASKPEDWD	ERAKIDDPD	SKPEDWDKPE HIPDPDAK KP
251	EDWDEEMDGE	WEPPVIQNPE	YKGEWKPRQI	DNPDYKGTWI HPEIDNPEYS
301	PDPSIYAYDN	FGVLGLDLWQ	VKSGTIFDNF	LITNDEAYAE EFGNETWGV T
351	KAAEKQMKDK	QDEEQLKKEE	EEDKKRKEEE	EAEDKEDDED KDEDEEDED
401	KEEDEEEDVP	GQAKDEL		
Gözlenen Peptit Kütlesi(Da)	Teorik Peptit Kütlesi(Da)	Başlangıç -Bitiş	Modifikasyon	Sekans
1410.6287	1410.6287	25-36		K.EQFLDGDGWTSR.W
1607.8960	1607.7740	74-87		R.FYALSASFEPFSNK.G
1476.7413	1476.6536	99-111	Cys-CAM(105)	K.HEQNIDCGGGYVK.L
1147.5450	1147.6622	143-151		K.KVHVIFNYK.G
2856.4141	2856.3872	163-185	Cys-CAM(163)	R.CKDDEFTHLYTLIVRPDNT YEVK.I
2519.4929	2519.1936	186-207		K.IDNSQVESGSLEDDWDFLP PKK.I
1801.0215	1800.8398	208-222		K.IKDPDASKPEDWDER.A
2959.3950	2960.2634	223-248		R.AKIDDPDTSKPEDWDKPE HIPDPDAK.K

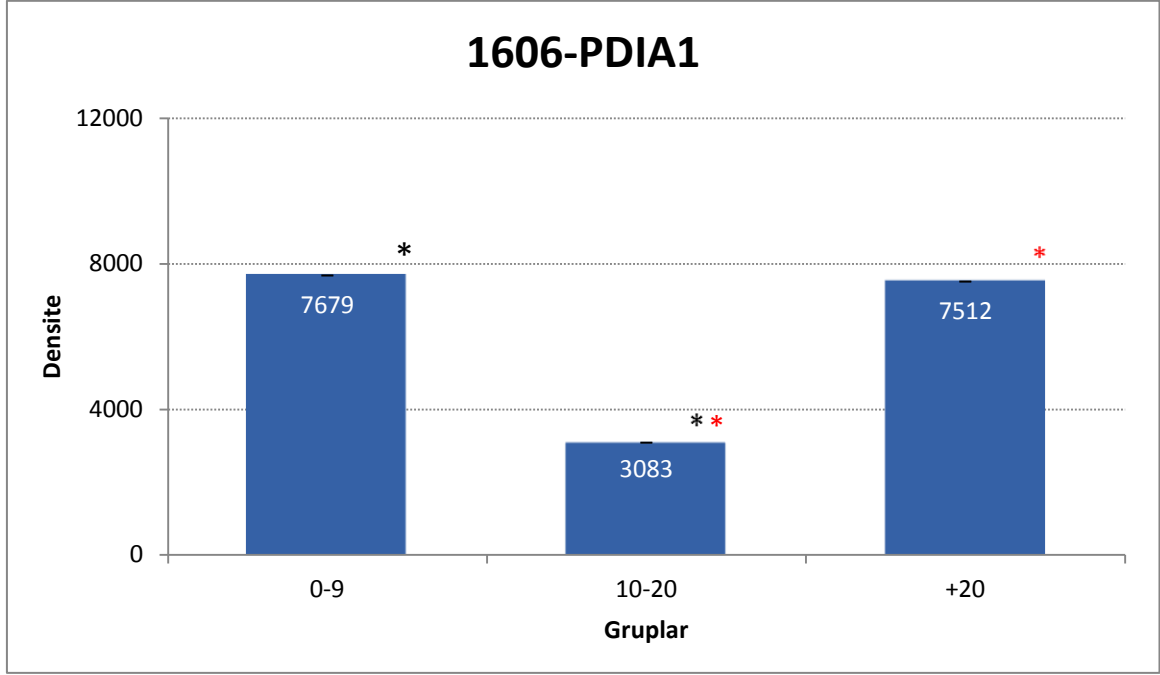
Şekil 5.13. 0706 numaralı protein kümesinden tespit edilen Kalretikulin proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

5.1.1.2 1606 numaralı protein kümesi-Protein disulfide isomerase



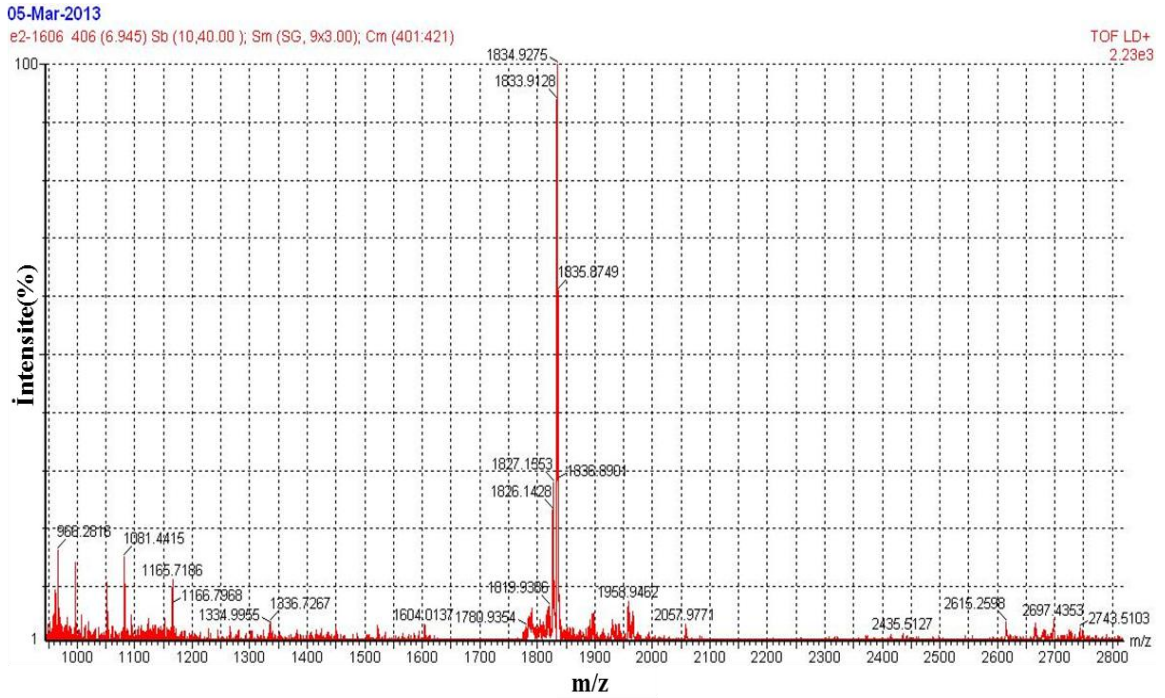
Şekil 5.14. 1606 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü

1606 numaralı protein kümesi densitesi 0-9 grubuna oranla 10-20 grubunda belirgin şekilde azalmıştır. En ileri seviyede hasta örneklerin bulunduğu +20 grubunda da 10-20 grubuna göre önemli bir artış göstererek, 0-9 grubu seviyesine ulaşmıştır (Şekil 5.14). Gruplar arasındaki densite değerlerinin grafiksel değişimi Şekil 5.15'te verilmiştir. Maldi Tof kütle spektrometresi ile peptitler belirlendikten sonra (Şekil 5.16) Mascot yazılımı ile veri tabanları araştırılmış ve çok yüksek bir skorla bu kümede bulunan proteinin Protein disulfide-isomerase precursor (EC 5.3.4.1) olduğu saptanmıştır (Şekil 5.16, 5.17). Araştırmaya alınan 10 peptitten 7 tanesi tanımlanan proteinin peptitleri ile eşleşmiştir ve bu eşleşen peptitler total protein sekansının % 16'sını oluşturmaktadır.



*P< 0.05, *P<0.05

Şekil 5.15. 1606 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.



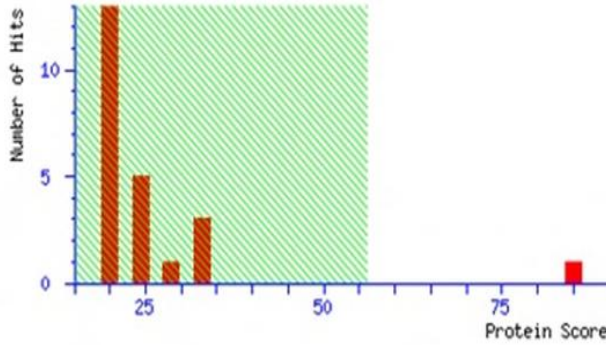
Şekil 5.16. 1904 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptidlerin, MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : BEYCAN AYHAN
Email : beycanayhan@gmail.com
Search title :
Database : SwissProt 2013_06 (540261 sequences; 191876607 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20258 sequences)
Timestamp : 13 Jun 2013 at 20:08:40 GMT
Top Score : 85 for **PDIA1_HUMAN**, Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As Concise Protein Summary [Help](#)
Significance threshold p< 0.05 Max. number of hits AUTO
Preferred taxonomy All entries

Re-Search All Search Unmatched

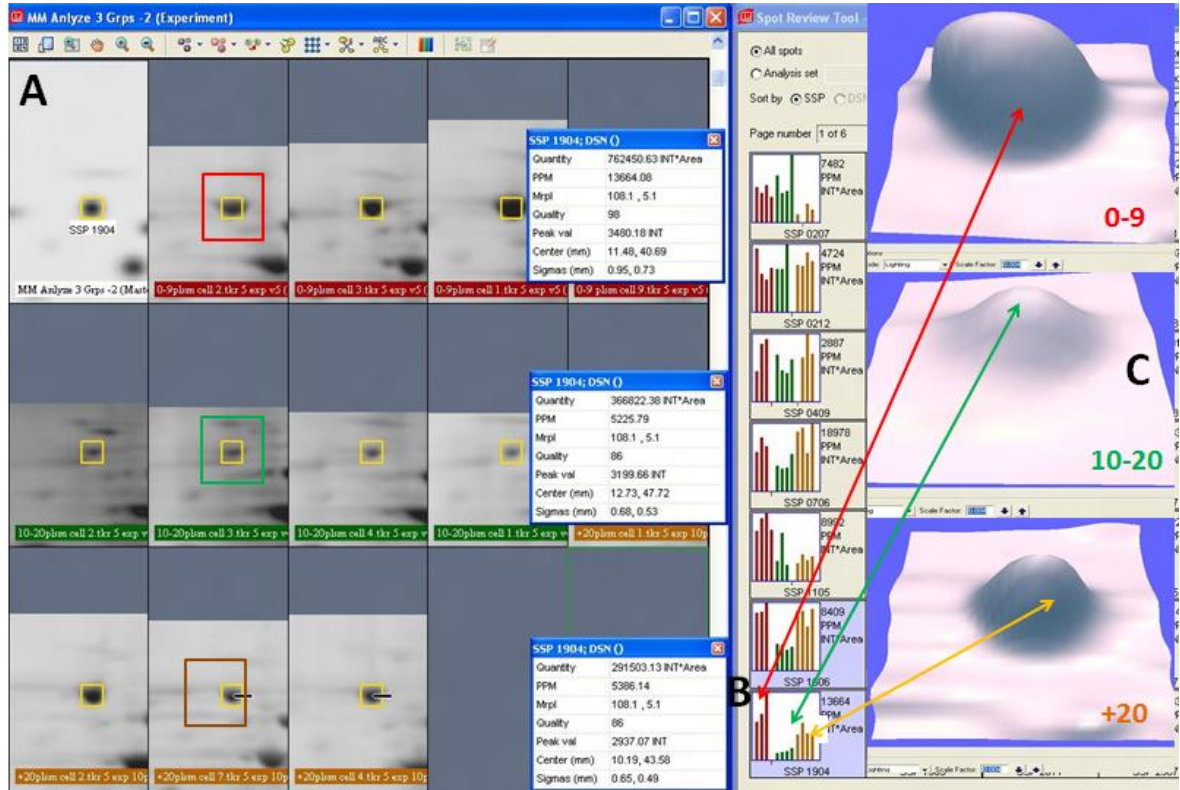
- PDIA1_HUMAN** Mass: 57480 Score: 85 Expect: 6.4e-05 Matches: 7
Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3
MAPK1_HUMAN Mass: 40000 Score: 21 Expect: 21 Matches: 2
Putative uncharacterized protein encoded by MAPKAPK5-AS1 OS=Homo sapiens GN=MAPKAPK5-AS1
KCD19_HUMAN Mass: 106068 Score: 29 Expect: 26 Matches: 4
BTB/POZ domain-containing protein KCD19 OS=Homo sapiens GN=KCD19 PE=2 SV=1
B4GN3_HUMAN Mass: 115359 Score: 29 Expect: 27 Matches: 4
Beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase 3 OS=Homo sapiens GN=B4GN3 PE=1 SV=2

Şekil 5.17. 1606 numaralı protein kümesinde mascot yazılımı araştırması sonucu tespit edilen protein

Protein	P07237-PDIA1_HUMAN, Protein disulfide-isomerase precursor (EC 5.3.4.1), Cellular thyroid hormone-binding protein, Prolyl 4-hydroxylase subunit beta, p55				
Veri Tabanı	UniProtKB/Swiss-Prot (2013)				
Yazılım	Mascot				
Mascot skor	85 (56'nın üzerindeki skorlar anlamlıdır-p<0.05-)				
Teorik pl	4.76				
Gözlenen pl	5.02				
Teorik kütle	57480				
Gözlenen kütle	58080				
Araştırma Parametreleri					
Enzim	Tripsin				
Sabit Modifikasyon	Karbamidometil(CAM)				
Araştırılan peptit	10				
Eşleşen peptit	7				
Protein sekans kapsamı	% 16 (Eşleşen sekanslar kırmızı ile gösterilmiştir)				
1	MLRRALLCLA	VAALVRADAP	EEEDHVLVLR	KSNFAEALAA	HKYLLVEFYA
51	PWCGHCKALA	PEYAKAAGKL	KAEGSEIRLA	KVDATEESDL	AQQYGVRYGP
101	TIKFFRNGDT	ASPKEYTAGR	EADDIVNWLK	KRTGPAATTL	PDGAAAESLV
151	ESSEVAVIGF	FKDVESDSAK	QFLQAAEAID	DIPFGITSNS	DVFSKYQLDK
201	DGVVLFKKFD	EGRNFEGEV	TKENLLDFIK	HNQLPLVIEF	TEQTAPKIFG
251	GEIKTHILLE	LPKSVSDYDG	KLSNFKTAAE	SFKGKILFIF	IDSHTDNQR
301	ILEFFGLKKE	ECPAVRLITL	EEEMTKYKPE	SEELTAERIT	EFCHRFLGK
351	IKPHLMSQEL	PEDWDKQPVK	VLVGKNFEDV	AFDEKKNVTV	EFYAPWCGHC
401	KQLAPIWDKL	GETYKDHENI	VIAKMDSTAN	EVEAVK VHSF	PTLKFFPASA
451	DRTVIDYNGE	RTLDGFKKFL	ESGGQDGAGD	DDDLEDLEEA	EEPDMEEEDD
501	QKAVKDEL				
Gözlenen Peptit Kütle (Da)	Teorik Peptit Kütle (Da)	Başlangıç-Bitiş	Modifikasyon	Sekans	
1965.1033	1965.0440	231-247		HNQLPLVIEFTEQTAPK	
1826.1428	1826.0938	248-263		IFGGEIKTHILLFLPK	
1081.4415	1081.4415	255-263		THILLFLPK	
1833.9128	1833.6768	286-300		ILFIFIDSDHTDNQR	
1094.4059	1094.6608	301-309		ILEFFGLKK	
1819.9386	1819.9489	437-452		VHSFPTLKFFPASADR	
1957.9674	1957.9402	445-461		FFPASADRTVIDYNGER	

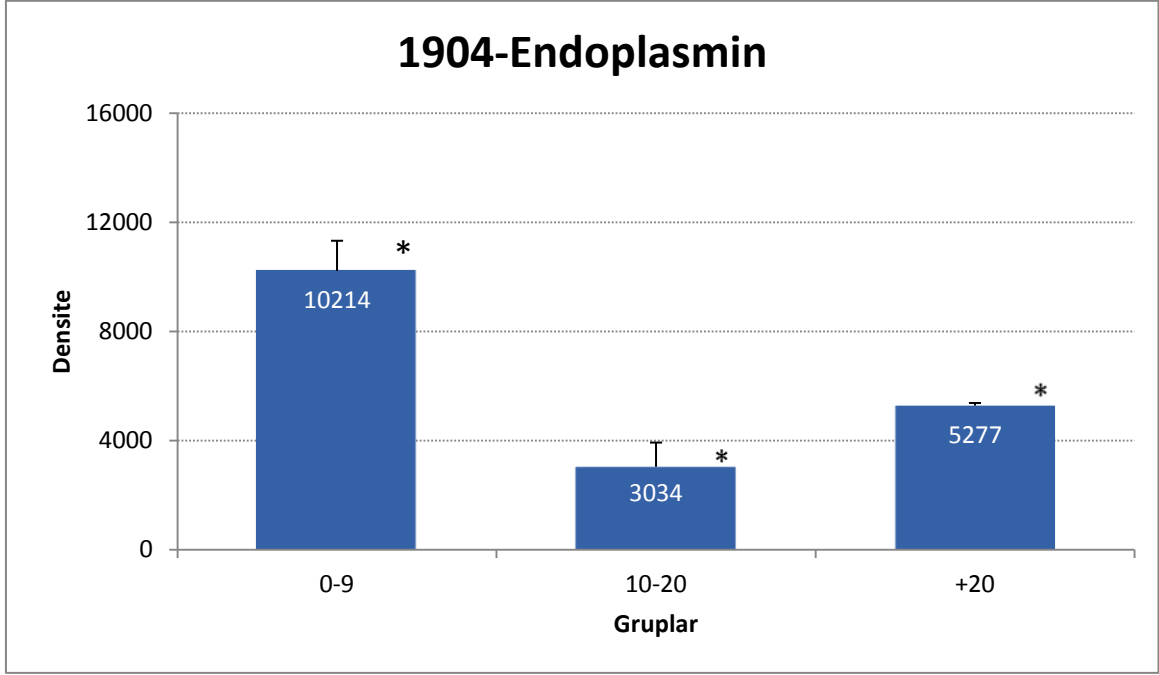
Şekil 5.18. 1606 numaralı protein kümesinden tespit edilen Endoplazmin proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

5.1.1.3 1904 numaralı protein kümesi-Endoplasmın



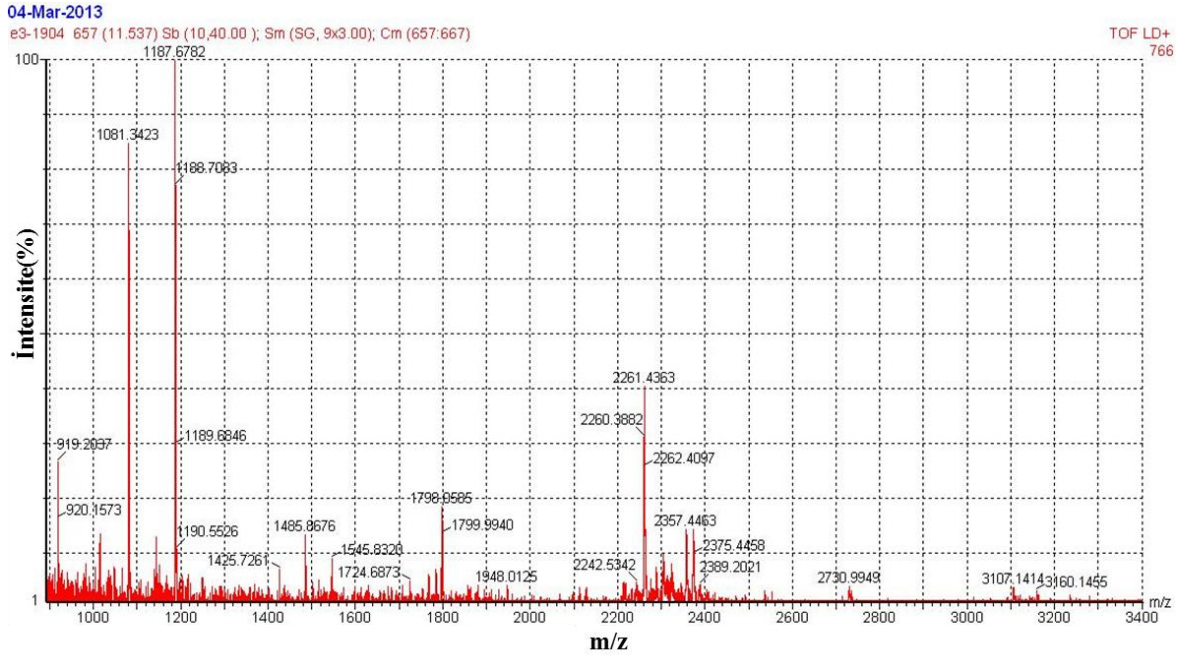
Şekil 5.19. 1904 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü

1904 numaralı protein kümesi densitesi 0-9 grubuna oranla 10-20 grubu ve en ileri seviyede hasta örneklerin bulunduğu +20 grubunda önemli oranda azalmıştır (Şekil 5.19). Gruplar arasındaki densite değerlerinin grafiksel değişimi Şekil 5.20’de verilmiştir. Protein kümesinin yoğunluğundaki bu değişim kümenin içerdiği proteinlerin kanser ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Kütle spektrometresi ile peptitler belirlendikten sonra (Şekil 5.21) Mascot yazılımı ile araştırılmış ve çok yüksek bir skorla bu kümede bulunan proteinin Tümör rejection antijen gp96 olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 5.22 ve 5.23). Araştırmaya alınan 10 peptitten tamamı bu proteinin peptitleri ile eşleşmiş ve sekans eşleşmesi ise %14 olarak bulunmuştur. Endoplasmın, 94 kDa glucose-regulated protein, Heat shock protein 90 kDa beta member 1, Tumor rejection antigen 1 olarak da adlandırılan bu protein hücrede genellikle ER’de bulunur, bir şaperondur ve proteinlerin katlanmalarından/ taşınmalarından sorumludur.



*P < 0.05

Şekil 5.20. 1904 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.



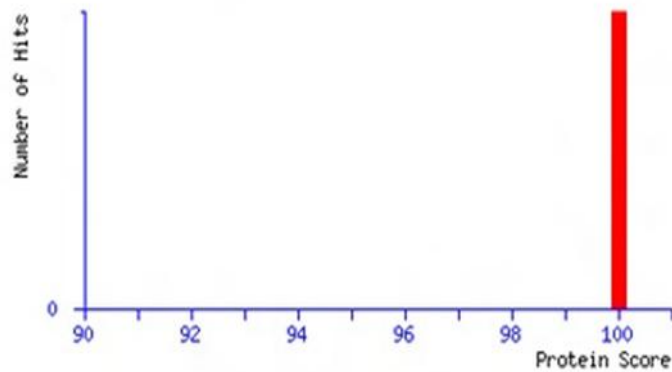
Şekil 5.21. 1904 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : BEYCAN AYHAN
Email : beycanayhan@gmail.com
Search title :
Database : SwissProt 2013_06 (540261 sequences; 191876607 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20258 sequences)
Timestamp : 15 Jun 2013 at 19:35:09 GMT
Top Score : 100 for **ENPL_HUMAN**, Endoplasmin OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As	Concise Protein Summary	Help	
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits	AUTO
Preferred taxonomy	All entries		

Re-Search All Search Unmatched

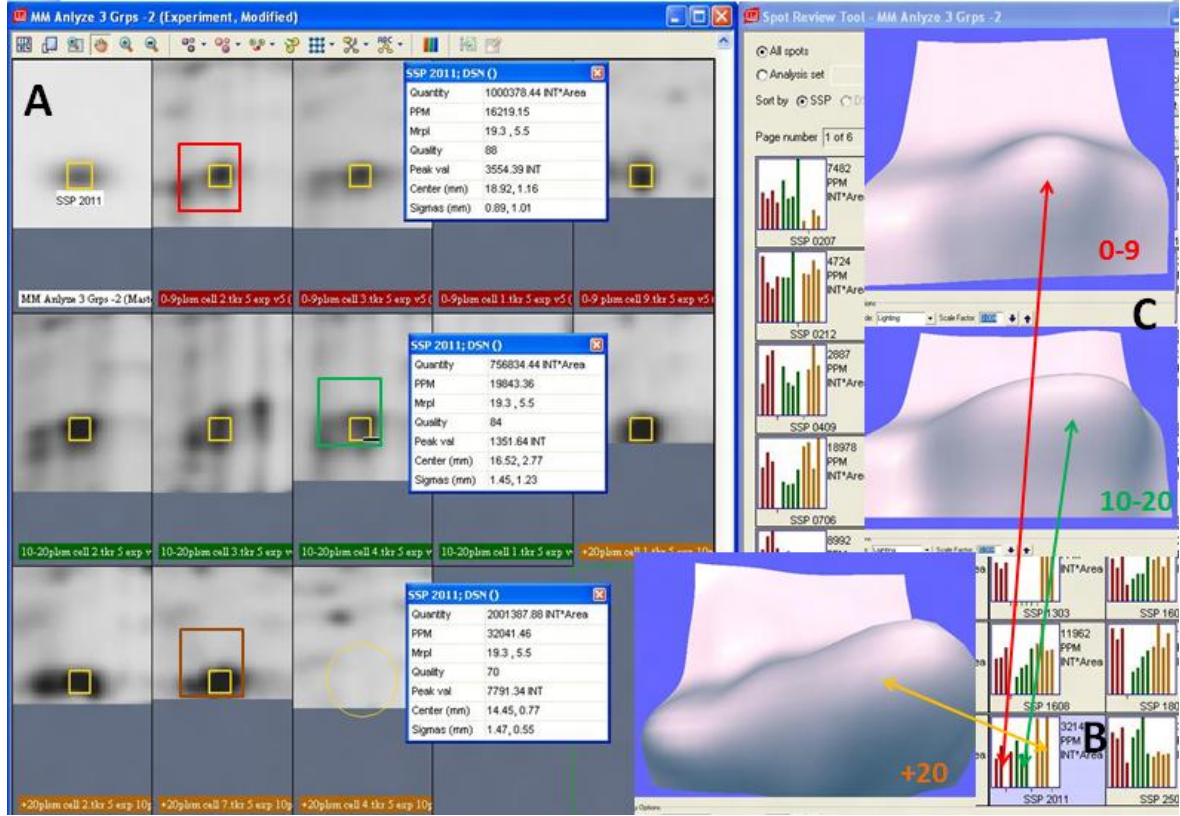
1	ENPL_HUMAN	Mass: 92696	Score: 100	Expect: 2e-06	Matches: 10
	Endoplasmin OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1				
	CCND_HUMAN	Mass: 30961	Score: 32	Expect: 12	Matches: 3
	Cytochrome c-type heme lyase OS=Homo sapiens GN=HCCS PE=1 SV=1				
	CTLA4_HUMAN	Mass: 25153	Score: 31	Expect: 15	Matches: 3
	Cytotoxic T-lymphocyte protein 4 OS=Homo sapiens GN=CTLA4 PE=1 SV=2				

Şekil 5.22. 1904 numaralı protein kümesinin mascot araştırma sonucu

Protein	P14625-ENPL_HUMAN, Endoplasmin, 94 kDa glucose-regulated protein (GRP-94), Heat shock protein 90 kDa beta member 1, Tumor rejection antigen 1, gp96 homolog				
Veri Tabanı	UniProtKB/Swiss-Prot (2013)				
Yazılım	Mascot				
Mascot skor	100 (56'nın üzerindeki skorlar anlamlıdır-p<0.05-)				
Teorik pl	4.76				
Gözlenen pl	5.01				
Teorik kütle	92696				
Gözlenen kütle	108100				
Araştırma Parametreleri					
Enzim	Tripsin				
Sabit Modifikasyon	Karbamidometil(CAM)				
Araştırılan peptit	10				
Eşleşen peptit	10				
Protein sekans kapsamı	% 14 (Eşleşen sekanslar kırmızı ile gösterilmiştir)				
1	MRALWVLGLC	CVLLTFGSVR	ADDEVVDVGT	VEEDLGKSRE	GSRTDDEVVQ
51	REEEAIQLDG	LNASQIRELR	EKSEK FAFQA	EVNR MMKLII	NSLYKNKEIF
101	LRELISNASD	ALDKIR LISL	TDENALSGNE	ELTVKIKCDK	EKNLLHVTDT
151	GVGMTREELV	KNLGTIAKSG	TSEFLNKMTE	AQEDGQSTSE	LIGQFVGIFY
201	SAFLVADKVI	VTSKHNDTQ	HIWESDSNEF	SVIADPRGNT	LGRGTTITLV
251	LKEEASDYLE	LDTIKNLVKK	YSQFINFPIY	VWSSKTETVE	EPMEEEEEAAK
301	EEKEESDDEA	AVEEEEEEEK	PKTKKVEKTV	WDWELMNDIK	PIWQRPSKEV
351	EEDEYKAFYK	SFSK ESDDPM	AYIHFTAEGE	VTFKSILFVP	TSAPRGLFDE
401	YGSKK SDYIK	LYVRRVFITD	DFHDMMPKYL	NFVKGVVDS	DLPLNVSRET
451	LQQHKLKVI	RKKLVRKTL	MIKKIADDKY	NDTFWKEFGT	NIKLGVIEDH
501	SNRTRLAKLL	RQSSHPTD	ITSLDQYVER	MKEKQDKIYF	MAGSSRKEAE
551	SSPFVERLLK	KGYEVIYLTE	PVDEYCIQAL	PEFDGKRFQN	VAKEGVKFDE
601	SEKTESREA	VEKEFEPILLN	WMKDKALKDK	IEKAVVSQRL	TESPCALVAS
651	QYGSWGNMER	IMKAQAYQTG	KDISTNYAS	QKKTFEINPR	HPLIRDMLRR
701	IKEDDDKTV	LDLAVVLFET	ATLRSGYLLP	DTKAYGDRIE	RMLRLSLNID
751	PDAK VEEEPE	EEPEETAEDT	TEDTEQDEDE	EMDVGTDEEE	ETAKESTAEK
801	DEL				
Gözlenen Peptit Kütlesi(Da)	Teorik Peptit Kütlesi(Da)	Başlangıç-Bitiş	Modifikasyon	Sekans	
1081.3423	1081.5425	76-84		FAFQAEVNR	
1544.8320	1544.8278	103-116		ELISNASDALDKIR	
2303.3311	2303.0172	365-384	Oxidation(M):370	ESDDPMAYIHFTAEGEVTFK	
1187.6782	1187.6782	385-395		SILFVPTSAPR	
1015.2144	1015.4731	396-404		GLFDEYGSK	
1143.5479	1143.5680	396-405		GLFDEYGSKK	
2260.3882	2260.0629	512-530		FQSSHPTDITSLDQYVER	
2356.3762	2356.0696	640-660	Cys-CAM(645)	LTESPCALVASQYGSWGNMER	
2371.9788	2370.0853	640-660	Oxidation(M):650	LTESPCALVASQYGSWGNMER	
1485.8676	1485.7543	742-754		RMLRLSLNIDPAK	

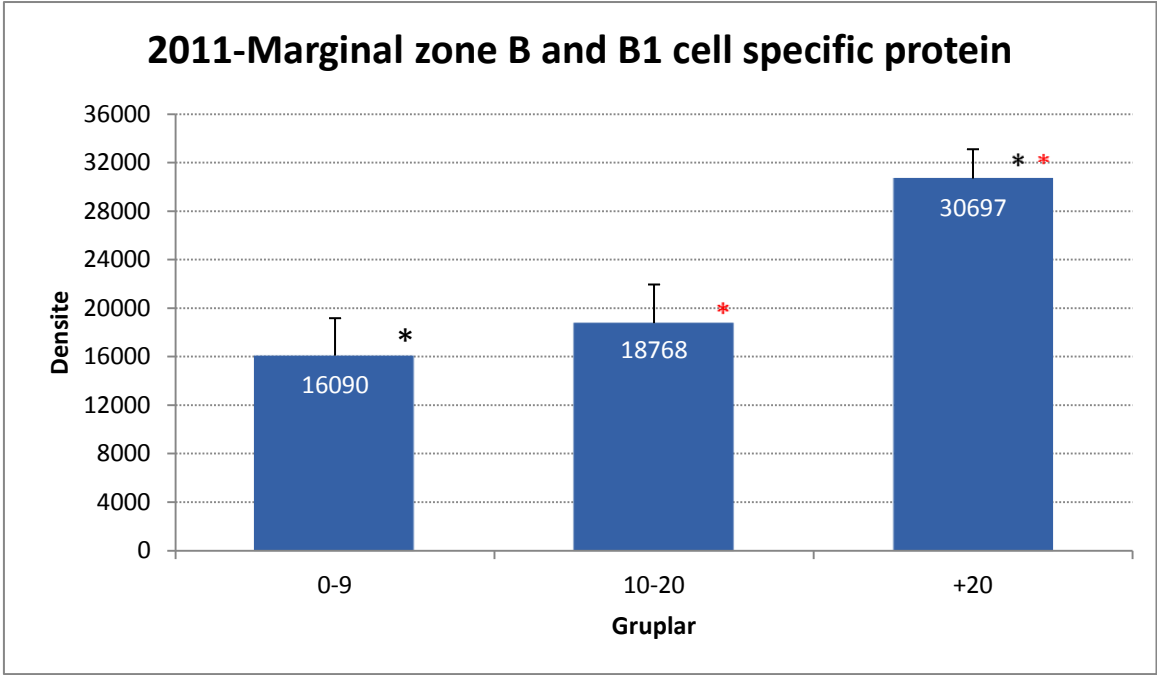
Şekil 5.23. 1904 numaralı protein kümesinden tespit edilen Endoplasmin proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

5.1.1.4 2011 numaralı protein kümesi-Marginal Zone B and B1 cell specific protein



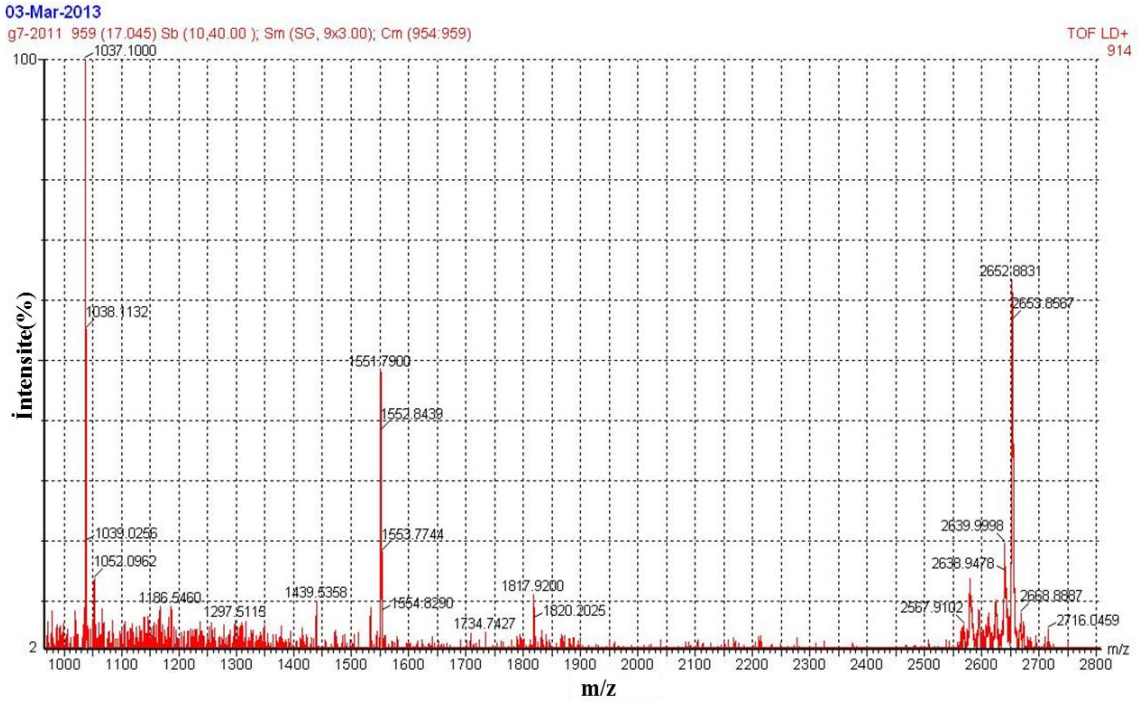
Şekil 5.24. 2011 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi, C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü

2011 numaralı protein kümesi densitesi 0-9 grubuna oranla 10-20 grubunda artış göstermiş ve en ileri seviyede hasta örneklerin bulunduğu +20 grubunda da bu artış önemli seviyeye ulaşmıştır (Şekil 5.24). Gruplar arasındaki densite değerlerinin grafiksel değişimi Şekil 5.25'te verilmiştir. Maldi Tof kütle spektrometresi ile peptitler belirlendikten sonra(Şekil 5.26) Mascot yazılımı ile veri tabanları araştırılmış ve çok yüksek bir skorla bu kümede bulunan proteinin Marginal zone B and B1 specific proteini (MZB1) olduğu olduğu saptanmıştır (Şekil 5.27, 5.28). Araştırmaya alınan 10 peptitten 7 tanesi tanımlanan proteinin peptitleri ile eşleşmiştir ve bu eşleşen peptitler total protein sekansının % 52'sini kapsamaktadır. MZB1 proteini ayrıca Plasma cell-induced resident ER proteini ve Proapoptotic caspase adapter protein olarakta bilinmektedir.



*P<0.05, *P<0.05

Şekil 5.25. 2011 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.



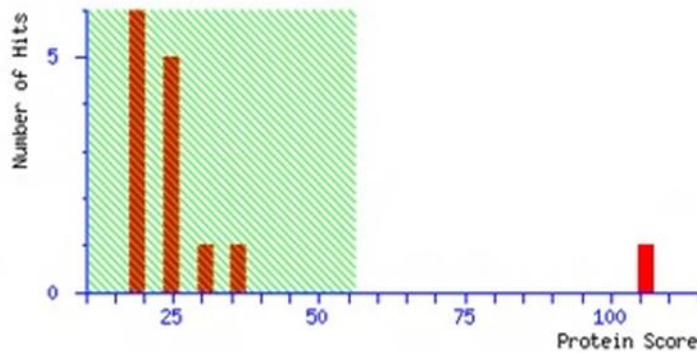
Şekil 5.26. 2011 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : SwissProt 2013_06 (540261 sequences; 191876607 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20258 sequences)
Timestamp : 16 Jun 2013 at 11:26:12 GMT
Top Score : 106 for **MZB1_HUMAN**, Marginal zone B- and B1-cell-specific protein OS=Ho

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)
Significance threshold p < Max. number of hits
Preferred taxonomy

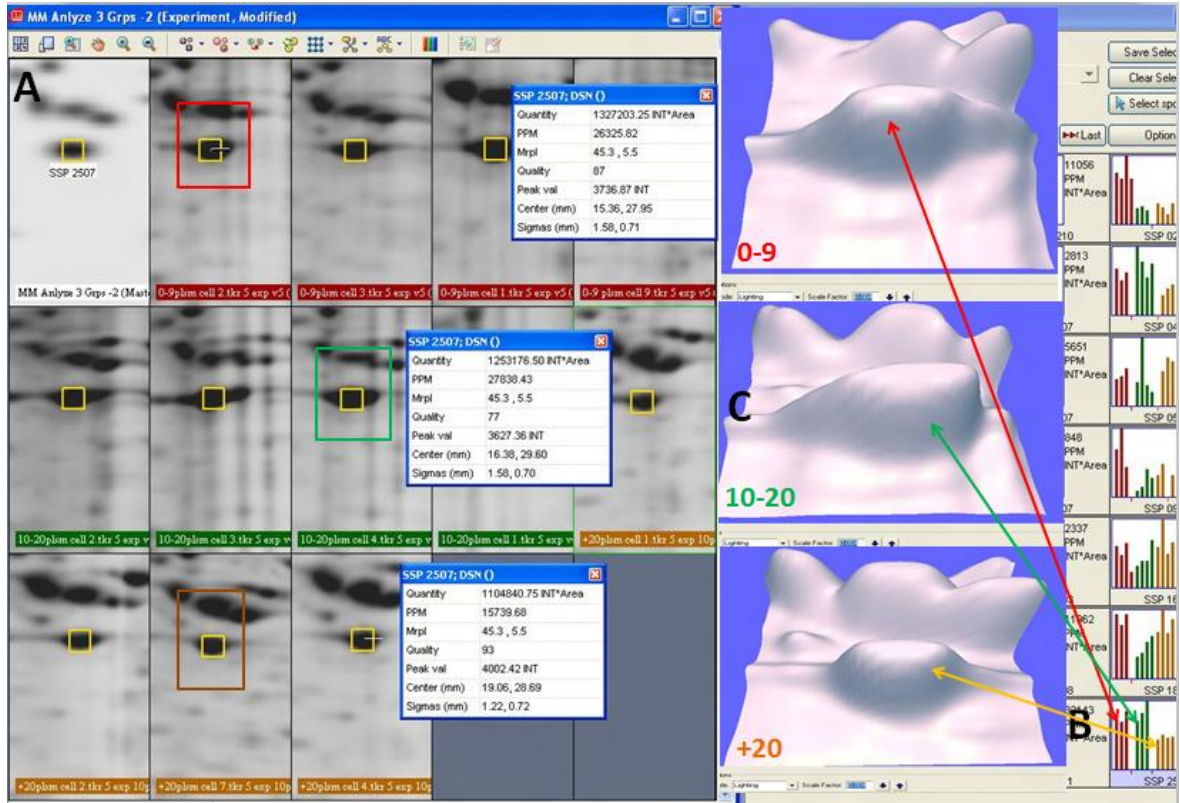
- | | | | | |
|--|-------------|------------|-----------------|------------|
| MZB1_HUMAN | Mass: 21023 | Score: 106 | Expect: 5.1e-07 | Matches: 7 |
| Marginal zone B- and B1-cell-specific protein OS=Homo sapiens GN=MZB1 PE=1 SV= | | | | |
| TRIM2_HUMAN | Mass: 82506 | Score: 37 | Expect: 4.4 | Matches: 4 |
| Tripartite motif-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=TRIM2 PE=1 SV=1 | | | | |
| NET1_HUMAN | Mass: 70042 | Score: 33 | Expect: 10 | Matches: 3 |
| Netrin-1 OS=Homo sapiens GN=NTN1 PE=1 SV=2 | | | | |

Şekil 5.27 2011 numaralı protein kümesinin mascot araştırma sonucu

Protein	Marginal zone B- and B1-cell-specific protein, Plasma cell-induced resident ER protein(pERp1), Mesenteric estrogen-dependent adipose 7(MEDA-7), Proapoptotic caspase adapter protein			
Veri Tabanı	UniProtKB/Swiss-Prot (2013)			
Yazılım	Mascot			
Mascot skor	106 (56'nın üzerindeki skorlar anlamlıdır-p<0.05-)			
Teorik pI	5.37			
Gözlenen pI	5.49			
Teorik kütle	21023			
Gözlenen kütle	19300			
Araştırma Parametreleri				
Enzim	Tripsin			
Sabit Modifikasyon	Karbamidometil(CAM)			
Araştırılan peptit	10			
Eşleşen peptit	7			
Protein sekans kapsamı	% 52 (Eşleşen sekanslar kırmızı ile gösterilmiştir)			
<p>1 MRLSLPLLLL LLGAWAIPGG LGDRAPLTAT APQLDDEEMY SAHMPAHLRC</p> <p>51 DACRAVAYQM WQNLAKAETK LHTSNSSGRR ELSELVYTDV LDRSCSRNWQ</p> <p>101 DYGVREVDQV KRLTGPGLSE GPEPSISVMV TGGPWPTRLS RTCLHYLGEF</p> <p>151 GEDQIYEAHQ QGRGALEALL CGGPQGACSE KVSATREEL</p>				
Gözlenen Peptit Kütleli(Da)	Teorik Peptit Kütleli(Da)	Başlangıç -Bitiş	Modifikasyon	Sekans
1438.7003	1438.7147	55-66	Oxidation(M):60	AVAYQMWQNLA K
1551.7900	1551.7900	81-93		ELSELVYTDV LDR
1037.4799	1037.1000	98-105		NWQDYGV R
2623.0330	2622.3231	113-138		LTGPGLSE GPEPSISVMVTG GPW PTR
2638.9478	2638.9478	113-138	Oxidation(M):129	LTGPGLSE GPEPSISVMVTG GPW PTR
2651.9905	2651.9905	142-163	Cys-CAM(143)	TCLH YLGEFGED QI YEAHQ QGR
1817.9200	1817.8520	164-181	Cys-CAM(171,178)	GALEALLCGGPQ GACSEK

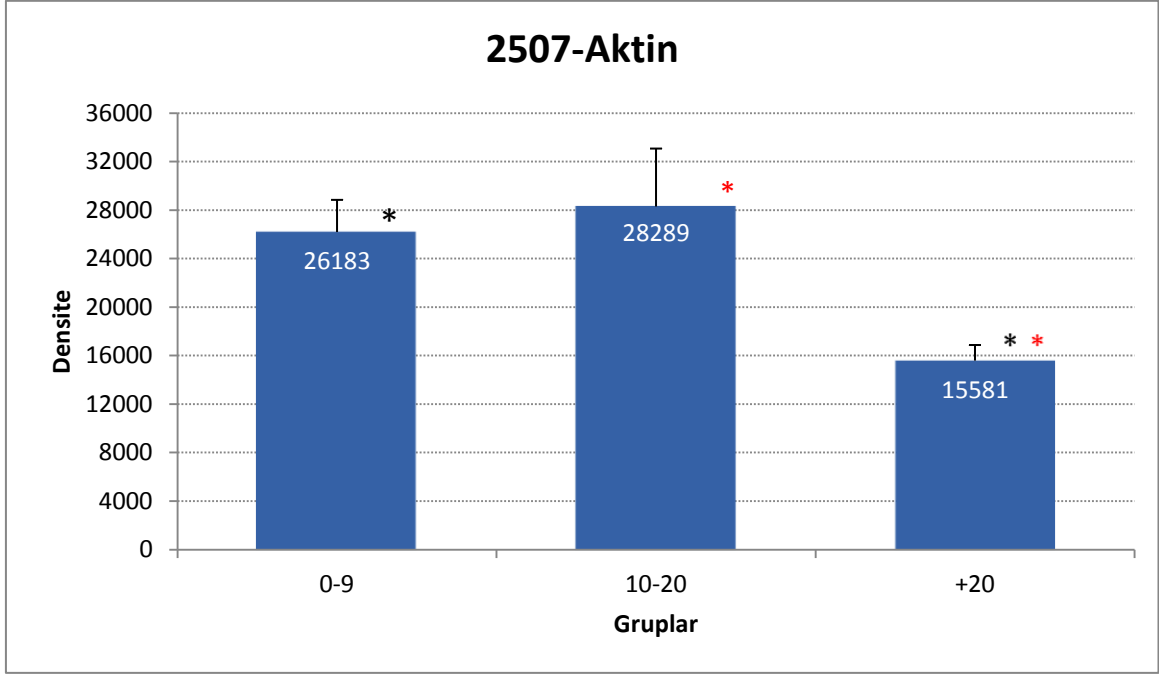
Şekil 5.28. 2011 numaralı protein kümesinden tespit edilen MZB1 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

5.1.1.5 2507 numaralı protein kümesi- Aktin



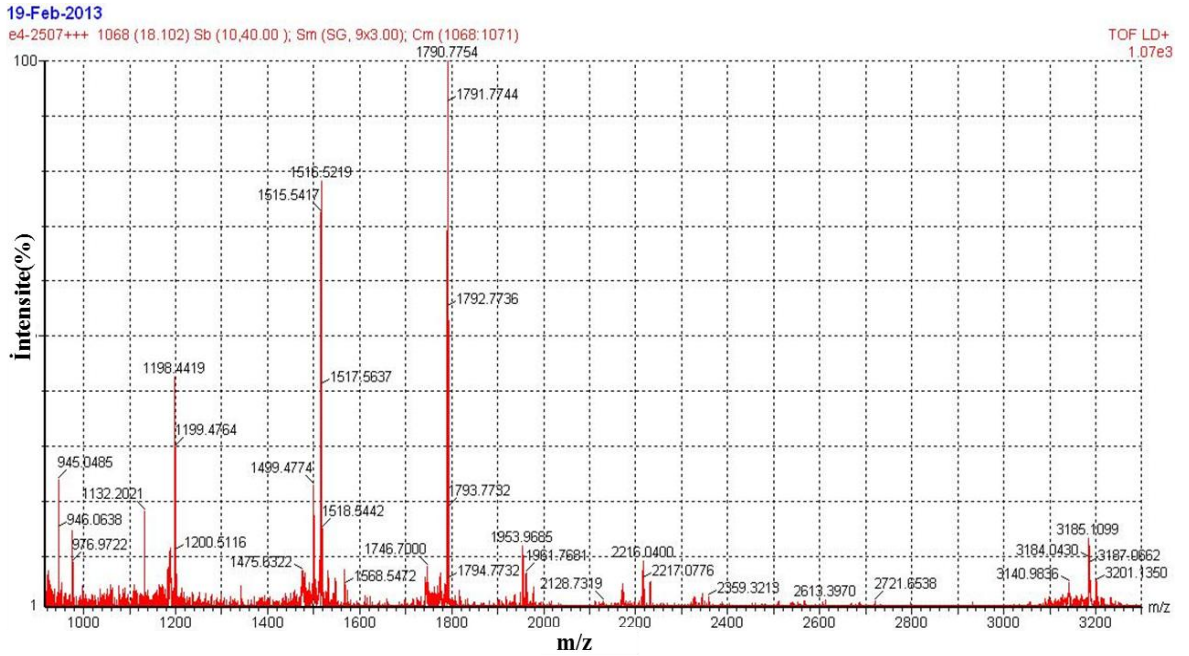
Şekil 5.29. 2507 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü

2507 numaralı protein kümesi(Şekil 5.29) densitesi 0-9 grubuna oranla 10-20 grubunda artış göstermiş ancak bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. En ileri seviyede hasta örneklerin bulunduğu +20 grubunda ise diğer iki gruba göre önemli bir oranda azalış olmuştur. Gruplar arasındaki densite değerlerinin grafiksel değişimi Şekil 5.30'da verilmiştir. Maldi Tof kütle spektrometresi ile peptitler belirlendikten sonra(Şekil 5.31) Mascot yazılımı ile veri tabanları araştırılmış ve çok yüksek bir skorla bu kümede bulunan proteinin Actin cytoplasmic1 (Beta Aktin) olduğu saptanmıştır (Şekil 5.32, 5.33). Araştırmaya alınan 10 peptitten 8 tanesi tanımlanan proteinin peptitleri ile eşleşmiştir ve bu eşleşen peptitler total protein sekansının % 34'ünü kapsamaktadır.



*P<0.05, *P<0.05

Şekil 5.30. 2507 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması



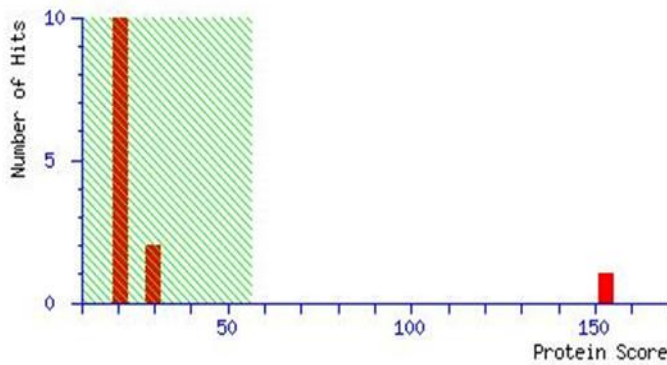
Şekil 5.31. 2507 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : SwissProt 2013_05 (540052 sequences; 191770152 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20256 sequences)
Timestamp : 10 May 2013 at 16:09:42 GMT
Top Score : 153 for **ACTB_HUMAN**, Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As: Concise Protein Summary [Help](#)

Significance threshold p<: 0.05 Max. number of hits: AUTO

Preferred taxonomy: All entries

Re-Search All Search Unmatched

ACTB_HUMAN Mass: 42052 Score: 153 Expect: 1e-11 Matches: 8
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1

ACTG_HUMAN Mass: 42108 Score: 153 Expect: 1e-11 Matches: 8
Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1

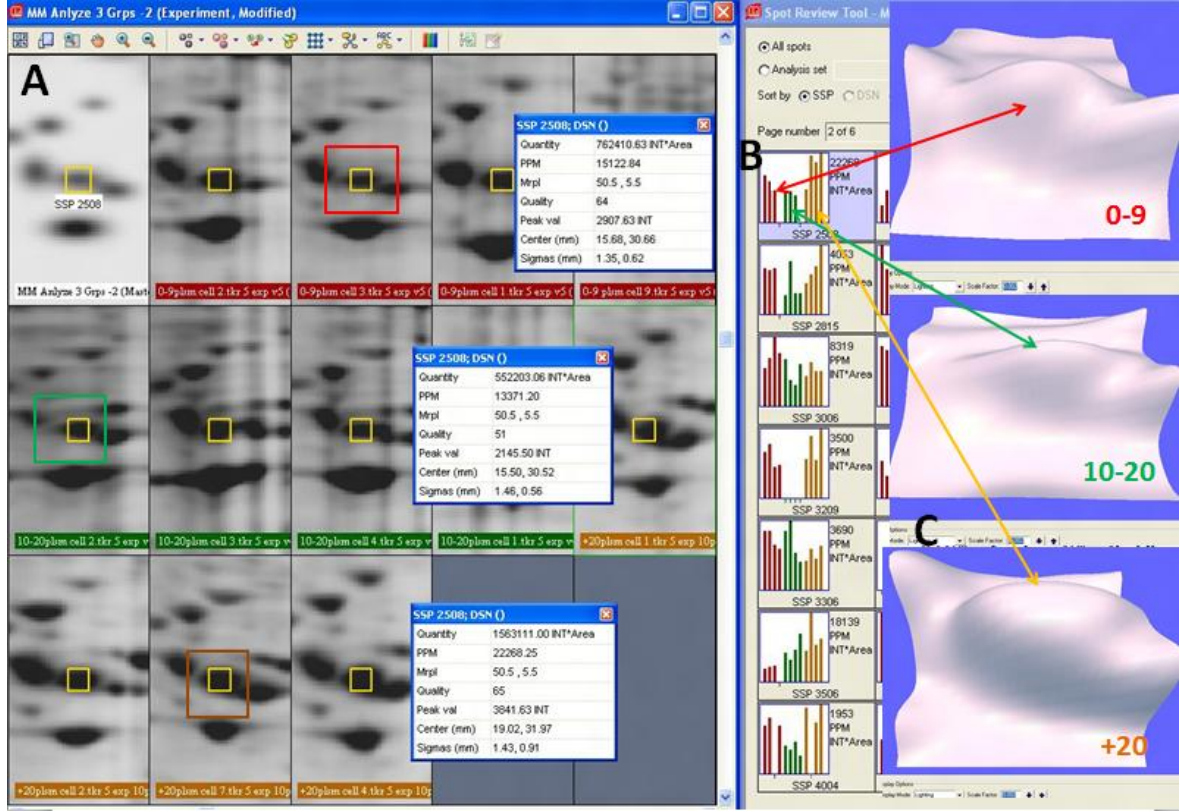
ACTBM_HUMAN Mass: 42331 Score: 39 Expect: 2.8 Matches: 3
Putative beta-actin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=POTEKP PE=5 SV=1

Şekil 5.32. 2507 numaralı protein kümesinin mascot araştırma sonucu

Protein	P60709- ACTB-HUMAN, Actin cytoplasmic1, Beta actin.			
Veri Tabanı	UniProtKB/Swiss-Prot (2013)			
Yazılım	Mascot			
Mascot skor	153 (56'nın üzerindeki skorlar anlamlıdır-p<0.05-)			
Teorik pI	5.29			
Gözlenen pI	5.50			
Teorik kütle	42052			
Gözlenen kütle	45300			
Araştırma Parametreleri				
Enzim	Tripsin			
Sabit Modifikasyon	Karbamidometil(CAM)			
Araştırılan peptit	10			
Eşleşen peptit	8			
Protein sekans kapsamı	% 34 (Eşleşen sekanslar kırmızı ile gösterilmiştir)			
<p>1 MDDDIAALVV DNGSGMCKAG FAGDDAPRAV FPSIVGRPRH QGVMVGMGQK</p> <p>51 DSYVGDEAQS KRGILTLKYP IEHGIVTNWD DMEKIIWHHTF YNELRVAPEE</p> <p>101 HPVLLTEAPL NPKANREKMT QIMFETFNTP AMYVAIQAVL SLYASGRTTG</p> <p>151 IVMDSGDGVT HTVPIYEGYA LPHAILRLDL AGRDLTDYLM KILTERGYSF</p> <p>201 TTTAEREEIVR DIKEKLCYVA LDFEQEMATA ASSSSLEKSY ELPDGQVITI</p> <p>251 GNERFRCPEA LFQPSFLGME SCGIHETTFN SIMKCDVDIR KDLYANTVLS</p> <p>301 GGTTMYPGIA DRMQKEITAL APSTMKIKII APPERKYSVW IGGSILASLS</p> <p>351 TFQQMWISKQ EYDESGPSIV HRKCF</p>				
Gözlenen Peptit Kütleşi(Da)	Teorik Peptit Kütleşi(Da)	Başlangıç-Bitiş	Modifikasyon	Sekans
1198.4419	1198.5222	51-61		DSYVGDEAQS K
1515.5417	1515.7991	85-95		IWHHTFYNELR
1953.9685	1954.0643	96-113		VAPEEHPVLLTEAPLNPK
3184.0430	3183.6142	148-177		TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYAL PHAILR
1132.2021	1132.5269	197-206		GYSFTTAER
1790.7754	1790.8919	239-254		SYELPDGQVITIGNER
2215.0767	2215.0699	292-312		DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
1516.5219	1516.7026	360-372		QEYDESGPSIVHR

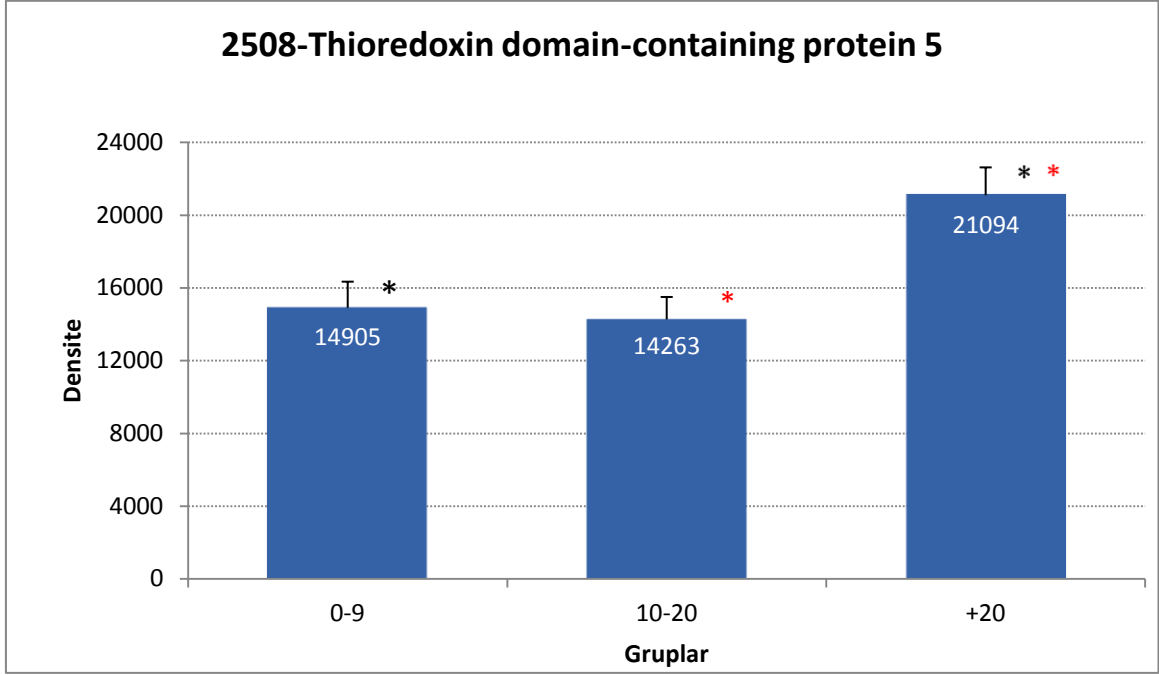
Şekil 5.33. 2507 numaralı protein kümesinden tespit edilen Aktin proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

5.1.1.6 2508 numaralı protein kümesi



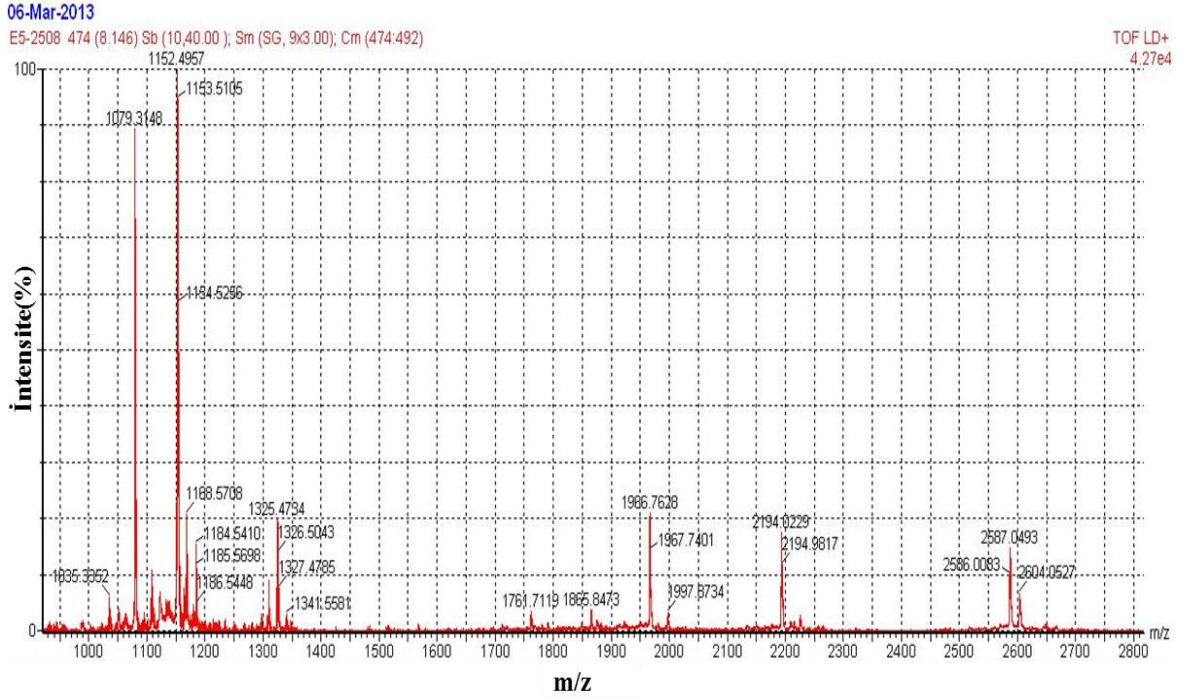
Şekil 5.34. 2508 numaralı protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir), B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi, C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü

2508 numaralı protein kümesi(Şekil 5.34) densitesi 0-9 grubu ve 10-20 grubunda benzer bulunmuştur. En ileri seviyede hasta örneklerin bulunduğu +20 grubunda ise diğer iki gruba göre önemli bir oranda artış saptanmıştır. Gruplar arasındaki densite değerlerinin grafiksel değişimi Şekil 5.35'te verilmiştir. Maldi Tof kütle spektrometresi ile peptitler belirlendikten sonra(Şekil 5.36) Mascot yazılımı ile veri tabanları araştırılmış ve çok yüksek bir skorla bu kümede bulunan proteinin Thioredoxin domain-containing protein 5(TXND5_HUMAN) olduğu saptanmıştır (Şekil 5.37 ve 5.38). Araştırmaya alınan 10 peptitten 8 tanesi tanımlanan proteinin peptitleri ile eşleşmiştir ve bu eşleşen peptitler total protein sekansının % 24'ünü kapsamaktadır.



*P<0.05, *P<0.05

Şekil 5.35. 2508 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması



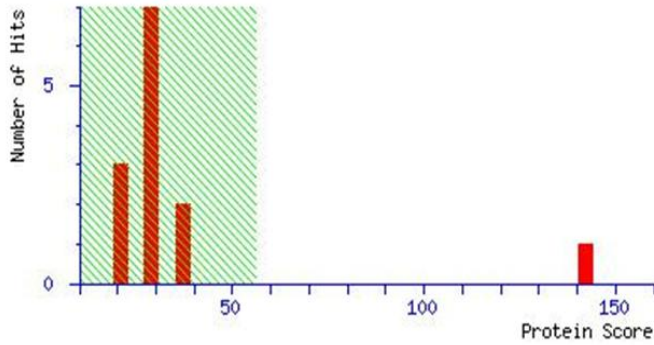
Şekil 5.36. 2508 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : SwissProt 2013_06 (540261 sequences; 191876607 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20258 sequences)
Timestamp : 5 Jun 2013 at 15:37:20 GMT
Top Score : 142 for **TXND5_HUMAN**, Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Homo

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As: Concise Protein Summary [Help](#)

Significance threshold p< 0.05 Max. number of hits AUTO

Preferred taxonomy All entries

Re-Search All Search Unmatched

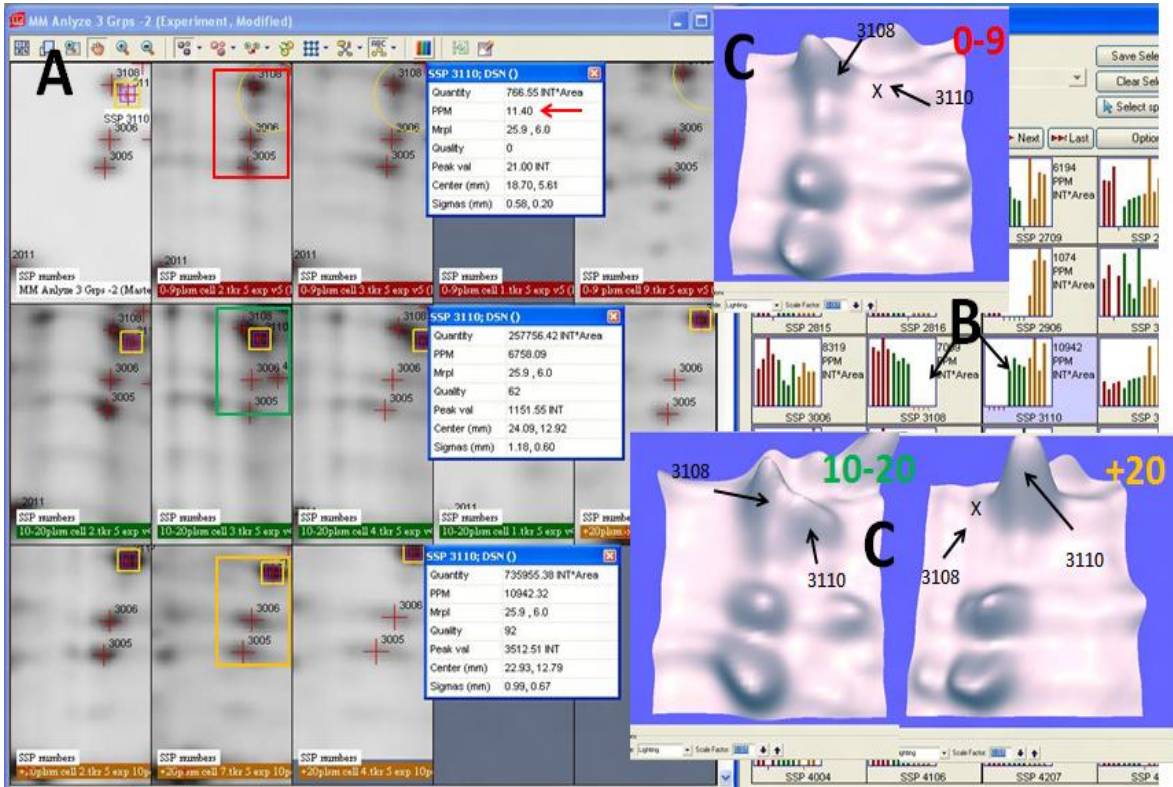
- TXND5_HUMAN** Mass: 48283 Score: **142** Expect: 1.3e-10 Matches: 8
Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=TXND5 PE=1 SV=2
- R51A2_HUMAN** Mass: 135761 Score: 31 Expect: 17 Matches: 3
RAD51-associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=RAD51AP2 PE=1 SV=1
- PRKY_HUMAN** Mass: 31916 Score: 29 Expect: 27 Matches: 2
Putative serine/threonine-protein kinase PRKY OS=Homo sapiens GN=PRKY PE=5 SV=1
- FACE1_HUMAN** Mass: 55063 Score: 29 Expect: 27 Matches: 2

Şekil 5.37. 2508 numaralı protein kümesinin mascot araştırma sonucu

Protein	Q8NBS9 (TXND5_HUMAN), Thioredoxin domain-containing protein 5, Endoplasmic reticulum resident protein 46(ER protein 46), Thioredoxin-like protein p46			
Veri Tabanı	UniProtKB/Swiss-Prot (2013)			
Yazılım	Mascot			
Mascot skor	142 (56'nın üzerindeki skorlar anlamlıdır-p<0.05-)			
Teorik pI	5.63			
Gözlenen pI	5.50			
Teorik kütle	48283			
Gözlenen kütle	50470			
Araştırma Parametreleri				
Enzim	Tripsin			
Sabit Modifikasyon	Karbamidometil(CAM)			
Araştırılan peptit	10			
Eşleşen peptit	8			
Protein sekans kapsamı	% 24 (Eşleşen sekanslar kırmızı ile gösterilmiştir)			
1	MPARPGRLLP	LLARPAALTA	LLLLLLGHGG	GGRWGARAQE AAAAAADGPP
51	AADGEDGQDP	HSKHLYTADM	FTHGIQSAAH	FVMFFAPWCG HCQRLQPTWN
101	DLGDKYNSME	DAKVYVAKVD	CTAHSDVCSA	QGVRGYPTLK LFKPGQEAVK
151	YQGPRDFQTL	ENWMLQTLNE	EPVTPEPEVE	PPSAPELKQG LYELSASNFE
201	LHVAQGDHFI	KFFAPWCGHC	KALAPTWEQL	ALGLEHSETV KIGKVDCTQH
251	YELCSGNQVR	GYPTLLWFRD	GKKVDQYK GK	RDLESLREYV ESQLQR TETG
301	ATETVTPSEA	PVLAAEPEAD	KGTVLALTEN	NFDDTIAEGI TFIK FYAPWC
351	GHCKTLAPTW	EELSKKEFPG	LAGVKIAEVD	CTAERNICSK YSVR GYPTLL
401	LFRGGKKVSE	HSGGRDLDSL	HRFVLSQAKD	EL
Gözlenen Peptit Kütle (Da)	Teorik Peptit Kütle (Da)	Başlangıç-Bitiş	Modifikasyon	Sekans
2603.0081	2603.2888	189-211		QGLYELSASN FELHVAQGDHFIK
1309.4854	1309.5605	212-221	Cys_CAM: 217, 220	FFAPWCGHCK
2192.9910	2193.1549	222-241		ALAPTWEQLALGLEHSETVK
1965.7859	1965.8541	245-260	Cys_CAM: 247, 254	VDCTQH YELCSGNQVR
1152.4957	1152.6200	261-269		GYPTLLWFR
1151.5347	1151.5691	288-296		EYVESQLQR
1325.4734	1325.5554	345-354	Cys_CAM: 350, 353	FYAPWCGHCK
1079.3148	1079.6248	395-403		GYPTLLLFR

Şekil 5.38. 2508 numaralı protein kümesinden tespit edilen Thioredoxin domain-containing protein 5 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

5.1.1.7 3108 ve 3110 numaralı protein kümeleri

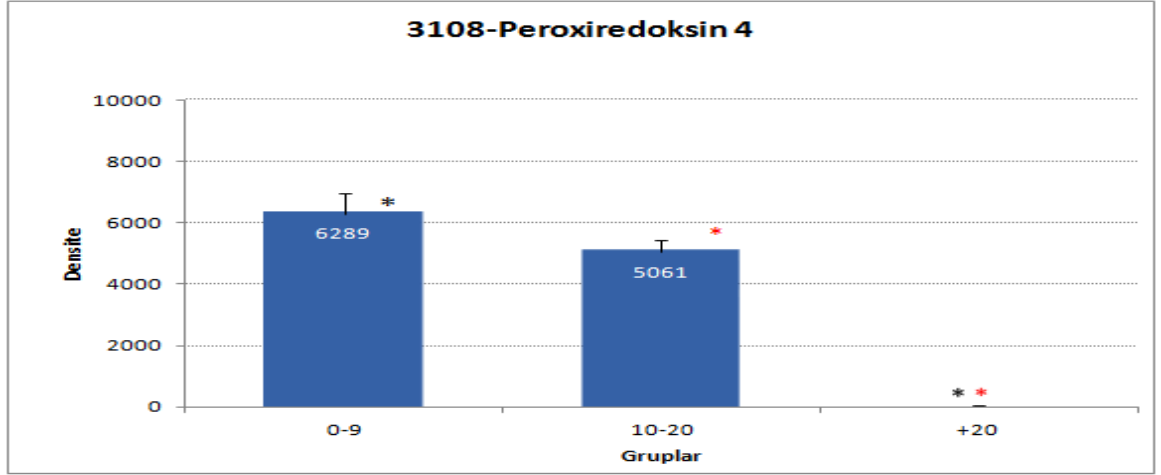


Şekil 5.39 3108 ve 3110 numaralı protein kümeleri. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir, B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü.

0-9 grubunda bulunan 3108 numaralı protein kümesi, 10-20 grubunda azalmış ve hemen bu kümenin bitişiğinde 3110 numaralı protein kümesi belirmiştir(Şekil 5.39C). +20 grubunda 3108 numaralı protein kümesi tamamen yok olurken, 10-20 grubunda belirmeye başlanan 3110 numaralı protein kümesinin yoğunluğunda önemli bir artış olmuştur(Şekil 5-39C). Her iki protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin değişimi grafiksel olarak Şekil 5.40 ve 5.41’de verilmiştir.

3108 numaralı protein kümesi(Peroksiredoksin-4)

Maldi Tof kütle spektrometresi ile peptitler belirlendikten sonra (Şekil 5.42) Mascot yazılımı ile yapılan veri tabanları araştırmasında, yüksek bir skorla bu kümede bulunan proteinin Peroksiredoksin-4 proteini olduğu saptanmıştır (Şekil 5.44, 5.45). Araştırmaya alınan 10 peptitten 7 tanesi tanımlanan proteinin peptitleri ile eşleşmiştir ve bu eşleşen peptitler total protein sekansının % 38’ünü kapsamaktadır

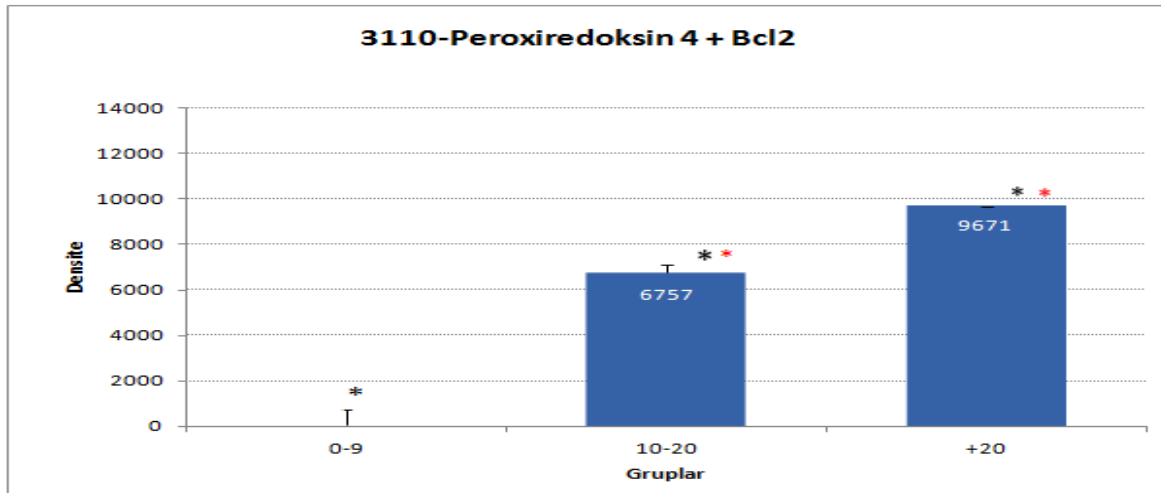


*P<0.05, *P<0.05

Şekil 5.40 3108 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması

3110 numaralı protein kümesi(Peroxsiredoksin-4)

Maldi Tof kütle spektrometresi ile peptitler belirlendikten sonra (Şekil 5.43) Mascot yazılımı ile yapılan veri tabanları araştırmasında, bu protein kümesinde 2 tane protein yüksek skorlarla tanımlanmıştır. Bu proteinlerden ilki 3108 protein kümesinde de tanımlanan Peroxsiredoksin-4 diğeri ise Bcl-2 proteinidir (Şekil 5.46, 5.47 ve 5.48). Bu protein kümesinde çok sayıda peptit tespit edildiği için araştırmaya 25 peptit alınmıştır. 25 peptitten 10 tanesi Peroxsiredoksin peptitleri ile eşleşerek toplam protein sekansının %58'ini oluşturmuştur. Diğeri taraftan 6 tane peptit ise Bcl2 proteini peptitleri ile eşleşmiş ve toplam protein sekansının %48'ini kapsamıştır.



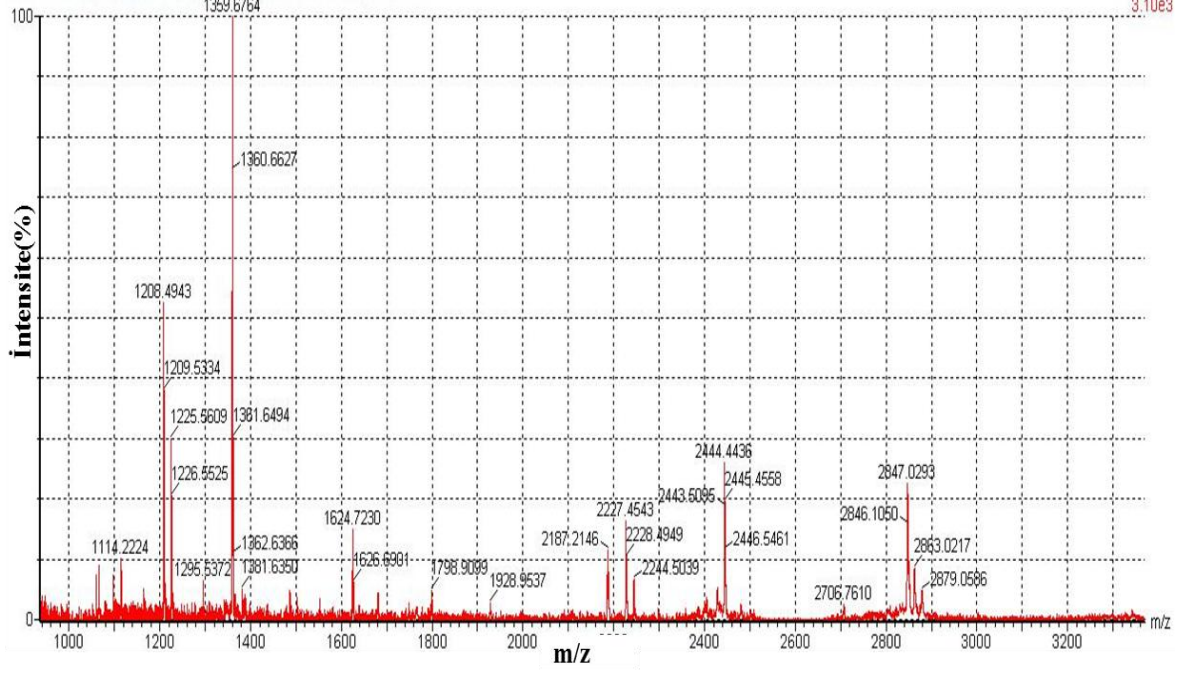
*P<0.05, *P<0.05

Şekil 5.41. 3110 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması

04-Mar-2013

h7-3108 335 (5.802) Sm (SG, 9x3.00); Sb (10.40.00); Cm (335.340)

TOF LD+
3.10e3

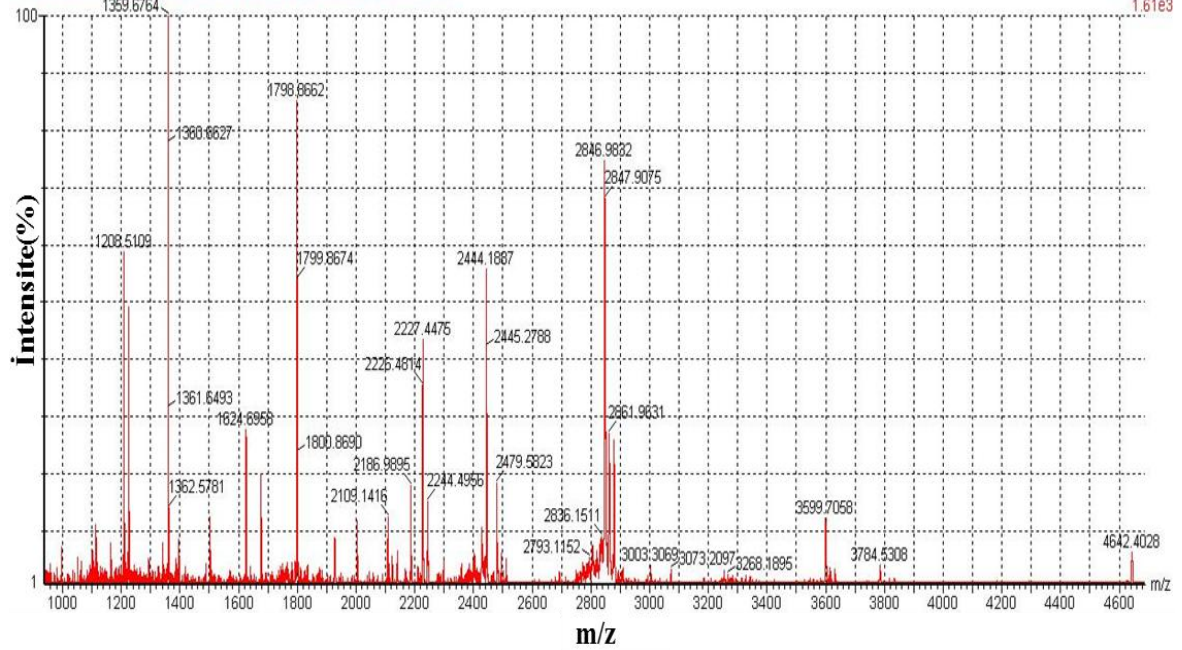


Şekil 5.42. 3108 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri

04-Mar-2013

e7-3110 1317 (22.600) Sb (10.40.00); Sm (SG, 9x3.00); Cm (1317.1322)

TOF LD+
1.61e3



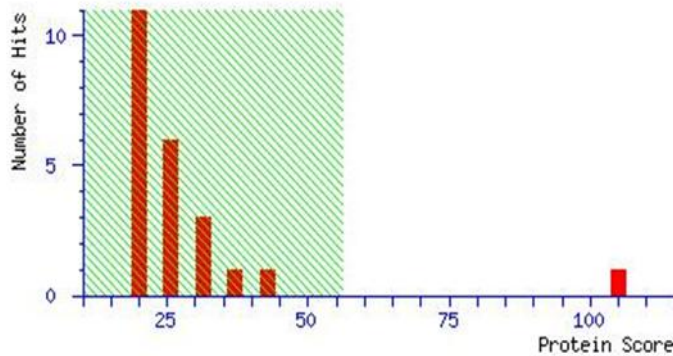
Şekil 5.43. 3110 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : SwissProt 2013_06 (540261 sequences; 191876607 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20258 sequences)
Timestamp : 10 Jun 2013 at 15:37:36 GMT
Top Score : 105 for **PRDX4_HUMAN**, Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As Concise Protein Summary
Significance threshold p< Max. number of hits
Preferred taxonomy

- PRDX4_HUMAN** Mass: 30749 Score: **105** Expect: 6.4e-07 Matches: 7
Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1
VILL_HUMAN Mass: 96418 Score: 31 Expect: 17 Matches: 4
Villin-like protein OS=Homo sapiens GN=VILL PE=2 SV=3
BSPRY_HUMAN Mass: 45038 Score: 30 Expect: 21 Matches: 3
B box and SPRY domain-containing protein OS=Homo sapiens GN=BSPRY PE=1 SV=1
PRDX4_HUMAN Mass: 30749 Score: 30 Expect: 21 Matches: 3

Şekil 5.44. 3108 numaralı protein kümesindene elde edilen peptitlerin mascot araştırma sonucu

Protein	Peroxiredoxin-4 precursor (EC 1.11.1.15), Thioredoxin peroxidase, Thioredoxin-dependent peroxide reductase			
Veri Tabanı	UniProtKB/Swiss-Prot (2013)			
Yazılım	Mascot			
Mascot skor	105 (56'nın üzerindeki skorlar anlamlıdır-p<0.05-)			
Teorik pl	5.86			
Gözlenen pl	5.93			
Teorik kütle	30749			
Gözlenen kütle	26170			
Araştırma Parametreleri				
Enzim	Tripsin			
Sabit Modifikasyon	Karbamidometil(CAM)			
Araştırılan peptit	10			
Eşleşen peptit	7			
Protein sekans kapsamı	% 38 (Eşleşen sekanslar kırmızı ile gösterilmiştir)			
1	MEALPLLAAT	TPDHGRHRL	LLLPLLLFLL	PAGAVQGWET EERPR TREEE
51	CHFYAGGQVY	PGEASRV SVA	DHSLHLSKAK	ISKPAPYWEG TAVIDGEFKE
101	LKLTDIRGKY	LVFFFYPLDF	TFVCPTEIIA	FGDRLEEFRS INTEVVACSV
151	DSQFTHLAWI	NTPRRQGLG	PIRIPLSDL	THQISKDYGV YLED SGHTLR
201	GLFIIDDKGI	LRQITLNDLP	VGR SVDETLR	LVQAFQYTDK HGEVCPAGWK
251	PGSETIIPDP	AGKLKYFDKL	N	
Gözlenen Peptit Kütle (Da)	Teorik Peptit Kütle (Da)	Başlangıç-Bitiş	Modifikasyon	Sekans
2443.4316	2443.0731	46–66	Cys-CAM:51	TREEECHFYAGGQVYPGEASR
2186.1841	2185.9245	48–66	Cys-CAM:51	EEECHFYAGGQVYPGEASR
2845.9368	2845.3937	140–164	Cys-CAM:148	SINTEVVACSVDSQFTHLAWINTPR
2243.6089	2243.2870	166–186		QGGLGPIRIPLSDLTHQISK
1624.7177	1624.7601	187–200		DYGVYLED SGHTLR
1359.6764	1359.6764	201–212		GLFIIDDKGILR
1225.5609	1225.6899	213–223		QITLNDLPVGR

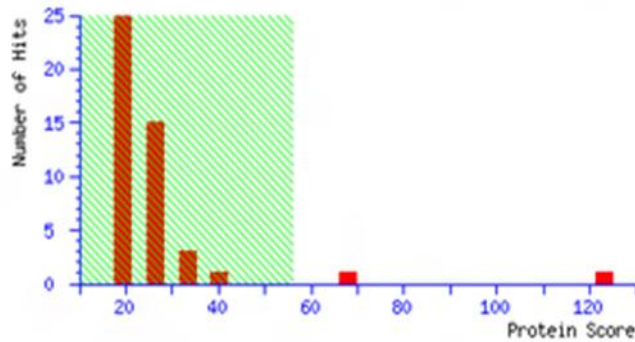
Şekil 5.45. 3108 numaralı protein kümesinden tespit edilen Peroksiredoksin-4 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : SwissProt 2013_06 (540261 sequences; 191876607 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20258 sequences)
Timestamp : 16 Jun 2013 at 20:48:45 GMT
Top Score : 123 for **PRDX4_HUMAN**, Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As: Concise Protein Summary [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits: AUTO

Preferred taxonomy: All entries

Re-Search All Search Unmatched

- PRDX4_HUMAN** Mass: 30749 Score: **123** Expect: $1e-08$ Matches: 10
Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1
CD032_HUMAN Mass: 14757 Score: 22 Expect: $1.3e+02$ Matches: 2
Uncharacterized protein C4orf32 OS=Homo sapiens GN=C4orf32 PE=2 SV=2
- BCL2_HUMAN** Mass: 26363 Score: **65** Expect: 0.0069 Matches: 6
Apoptosis regulator Bcl-2 OS=Homo sapiens GN=BCL2 PE=1 SV=2
CRABP1_HUMAN Mass: 15727 Score: 24 Expect: 86 Matches: 3
Cellular retinoic acid-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=CRABP1 PE=2 SV=2

Şekil 5.46. 3110 numaralı protein kümesinden elde edilen peptitlerin mascot araştırma sonucu

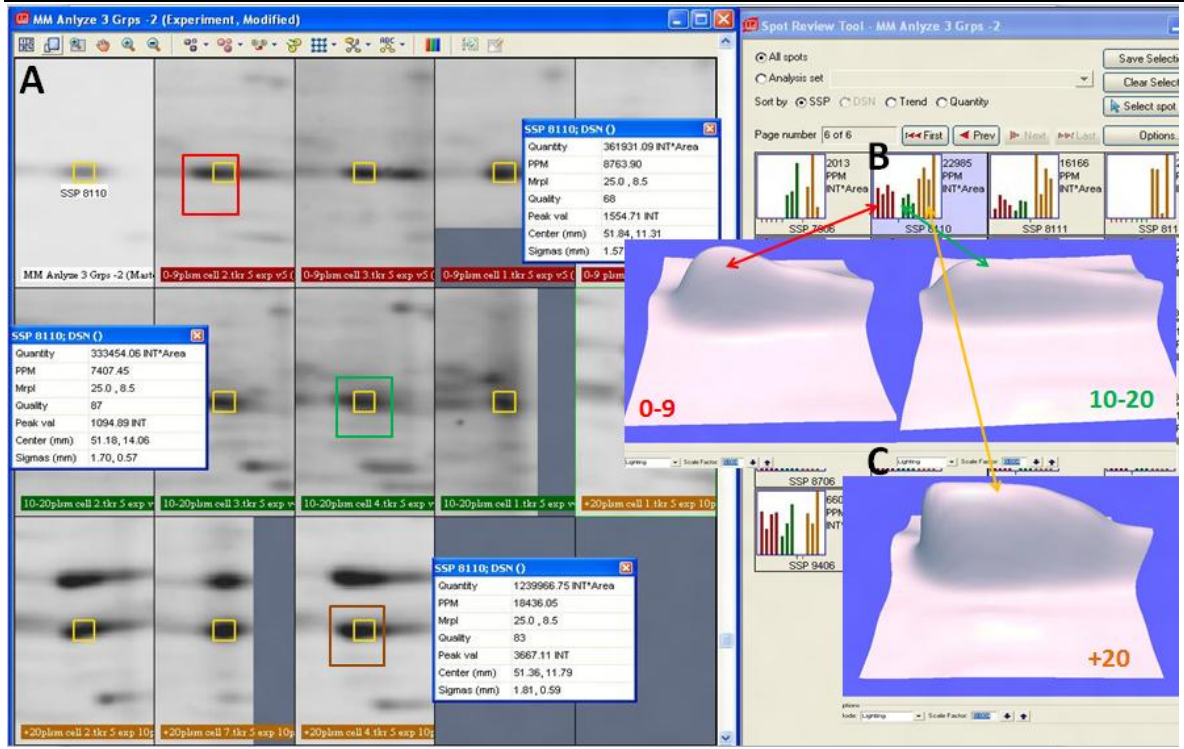
Protein	Peroxiredoxin-4 precursor (EC 1.11.1.15), Thioredoxin peroxidase, Thioredoxin-dependent peroxide reductase			
Veri Tabanı	UniProtKB/Swiss-Prot (2013)			
Yazılım	Mascot			
Mascot skor	123 (56'nın üzerindeki skorlar anlamlıdır-p<0.05-)			
Teorik pl	5.86			
Gözlenen pl	6.00			
Teorik kütle	30749			
Gözlenen kütle	25900			
Araştırma Parametreleri				
Enzim	Tripsin			
Sabit Modifikasyon	Karbamidometil(CAM)			
Araştırılan peptit	25			
Eşleşen peptit	10			
Protein sekans kapsamı	% 58 (Eşleşen sekanslar kırmızı ile gösterilmiştir)			
1	MEALPLLAAT	TPDHGRHRL	LLLPLLLFLL	PAGAVQGWET EERPR TREEE
51	CHFYAGGQVY	PGEASRV SVA	DHSLHLSKAK	ISKPAPYWEG TAVIDGEFKE
101	LK LTDYRGKY	LVFFFYPLDF	TFVCPTEIIA	FGDRLEEFRS INTEVVACSV
151	DSQFTHLAWI	NTPR QGLG	PIR IPLLSDL	THQISKDYGV YLED SGHTLR
201	GLFI DDKGI	LRQIT LNDLP	VGR SVDETLR	LVQAFQYTDK HGEVCPAGWK
251	PGSETI IPDP	AGK LKYFDKL	N	
Gözlenen Peptit Kütle (Da)	Teorik Peptit Kütle (Da)	Başlangıç-Bitiş	Modifikasyon	Sekans
2443.4316	2443.0731	46–66	Cys-CAM:51	TREEECHFYAGGQVYPGEASR
2186.1841	2185.9245	48–66	Cys-CAM:51	EEECHFYAGGQVYPGEASR
2107.5113	2108.0698	81-99		ISKPAPYWEGTAVIDGEFK
2478.5630	2478.2914	81-102		ISKPAPYWEGTAVIDGEFKELK
2845.9368	2845.3937	140–164	Cys-CAM:148	SINTEVVACSVDSQFTHLAWINTPR
2243.6089	2243.2870	166–186		QGGLGPIRIPLLSDLTHQISK
1624.7177	1624.7601	187–200		DYGVYLED SGHTLR
1359.6764	1359.6764	201–212		GLFI DDKGI
1225.5609	1225.6899	213–223		QITL NLDPVGR
3596.5859	3596.7841	231-263	Cys-CAM:245	LVQAFQYTDKHGEVCPAGWK GSETI IPDPAGK

Şekil 5.47. 3110 numaralı protein kümesinden tespit edilen Peroksiredoksin-4 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

Protein	P10415 (BCL2_HUMAN), Apoptosis regulator Bcl-2			
Veri Tabanı	UniProtKB/Swiss-Prot (2013)			
Yazılım	Mascot			
Mascot skor	65 (56'nın üzerindeki skorlar anlamlıdır-p<0.05-)			
Teorik pI	6.75			
Gözlenen pI	6.00			
Teorik kütle	26363			
Gözlenen kütle	25900			
Araştırma Parametreleri				
Enzim	Tripsin			
Sabit Modifikasyon	Karbamidometil(CAM)			
Araştırılan peptit	25			
Eşleşen peptit	6			
Protein sekans kapsamı	% 48 (Eşleşen sekanslar kırmızı ile gösterilmiştir)			
1	MAHAGRTGYD	NREIVMKYIH	YKLSQRGYEW	DAGDVGAAPP GAAPAPGIFS
51	SQPGHTPHPA	ASRDPVARTS	PLQTPAAPGA	AAGPALSPVP PVVHLTLRQA
101	GDDFSRRYRR	DFAEMSSQLH	LTPFTARGRF	ATVVEELFRD GVNWGRIVAF
151	FEFGVMCVE	SVNREMSPLV	DNIALWMTEY	LNRHLHTWIQ DNGGWDAFVE
201	LYGPSMRPLF	DFSWLSLKTL	LSLALVGACI	TLGAYLGHK
Gözlenen Peptit Kütle (Da)	Teorik Peptit Kütle (Da)	Başlangıç-Bitiş	Modifikasyon	Sekans
1207.4722	1207.6582	18-26		YIHYKLSQR.G
3596.5859	3596.6941	27-63		GYEWDAGDVGAAPPGAAPAPGIFS SQPGHTPHPAASR
1051.2784	1051.4915	99-107		QAGDDFSRR
2107.5113	2107.0389	110-127		RDFAEMSSQLHLTPFTAR
2845.7227	2845.3548	140-164	Cys-CAM:158	DGVNWGRIVAFFEFGVMCVESV NR
2295.2986	2295.1148	165-183		EMSPLVDNIALWMTEYLNLR

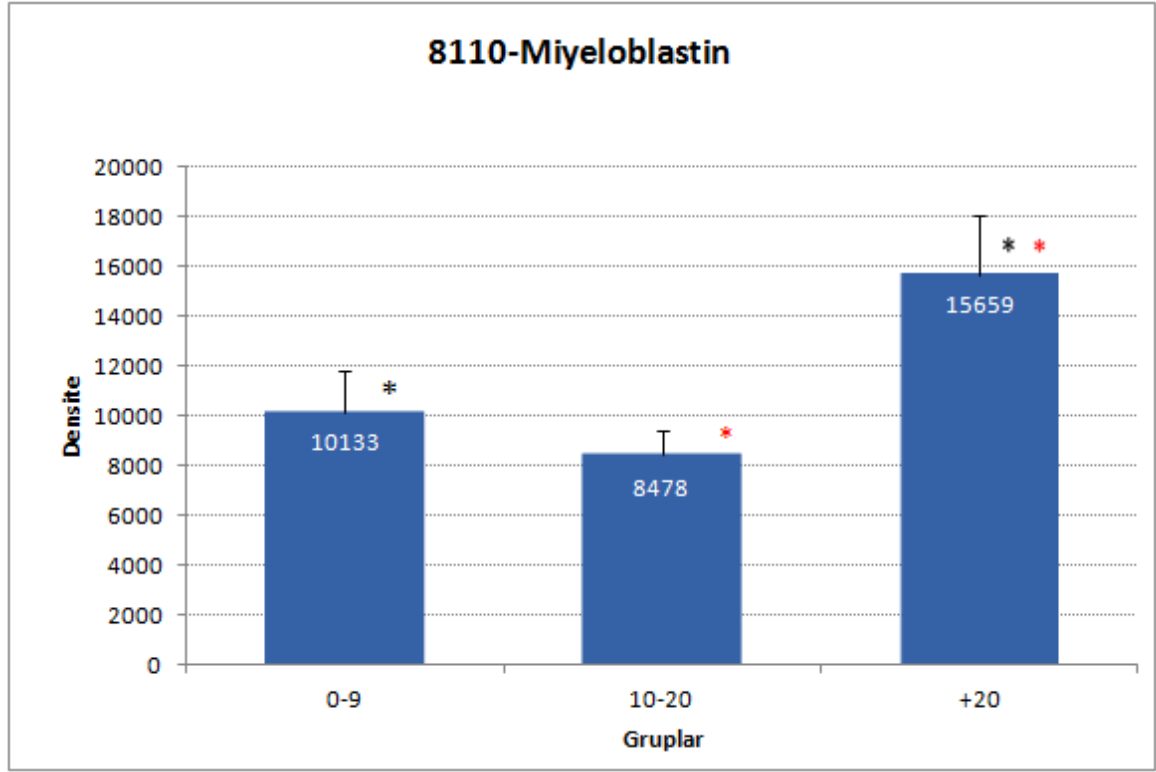
Şekil 5.48: 3110 numaralı protein kümesinden tespit edilen Apoptosis regülör Bcl-2 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

5.1.1.8 8110 numaralı protein kümesi(Miyeloblastin)



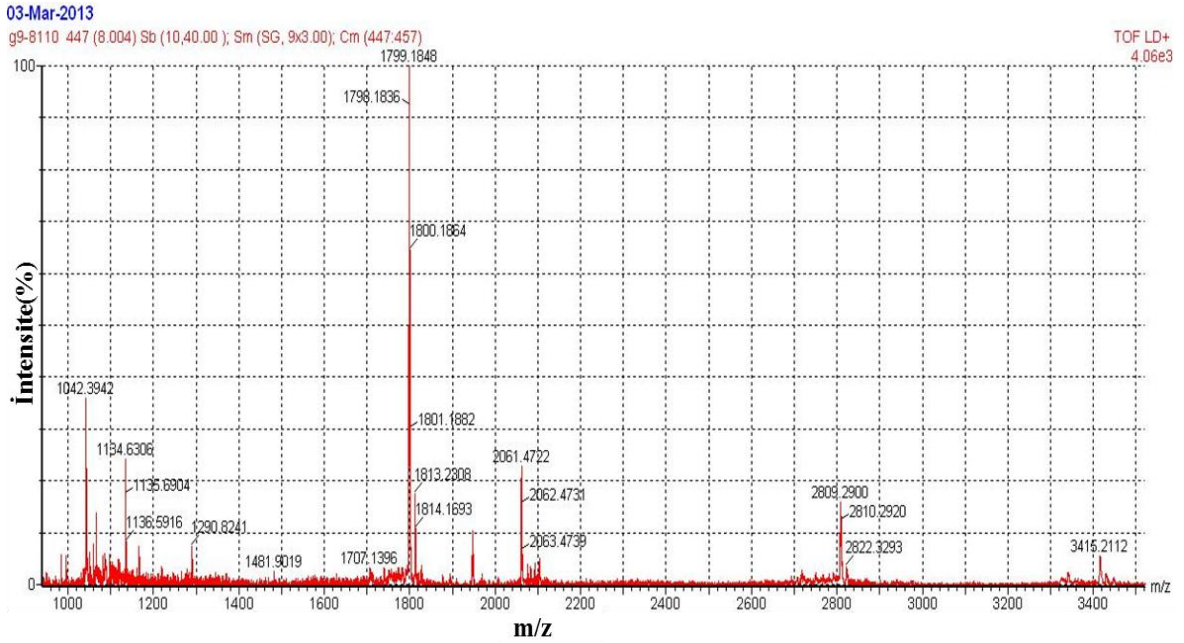
Şekil 5.49. 8110 protein kümesi. A) Jel üzerinde buldukları bölgeler çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir, B) Küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi, C) Protein kümelerinin buldukları bölgelerin üç boyutlu görünümü

8110 numaralı protein kümesi(Şekil 5.49) densitesi 0-9 grubu ve 10-20 grubunda benzer bulunmuştur. En ileri seviyede hasta örneklerin bulunduğu +20 grubunda ise diğer iki gruba göre önemli bir oranda artış olmuştur. Gruplar arasındaki densite değerlerinin grafiksel değişimi Şekil 5.50'de verilmiştir. Maldi Tof kütle spektrometresi ile peptitler belirlendikten sonra(Şekil 5.51) Mascot yazılımı ile veri tabanları araştırılmış ve yüksek bir skorla bu kümede bulunan proteinin Miyeloblastin olduğu saptanmıştır (Şekil 5.52 ve 5.53). Araştırmaya alınan 10 peptitten 5 tanesi tanımlanan proteinin peptitleri ile eşleşmiştir ve bu eşleşen peptitler total protein sekansının % 33'ünü kapsamaktadır. Bu protein C-ANCA antigen, Leukocyte proteinase 3(PR-3), Neutrophil proteinase 4(NP-4) ve Wegener autoantigen olarak da isimlendirilmektedir



*P<0.05, * P<0.05

Şekil 5.50. 8110 numaralı protein kümesinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması



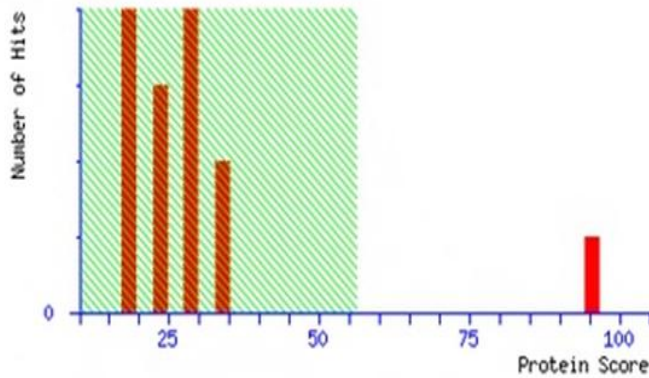
Şekil 5.51. 8110 numaralı protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleleri

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : SwissProt 2013_06 (540261 sequences; 191876607 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20258 sequences)
Timestamp : 17 Jun 2013 at 01:27:18 GMT
Top Score : 96 for **PRTN3_HUMAN**, Myeloblastin OS=Homo sapiens GN=PRTN3 PE=1 SV=3

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)
Significance threshold $p <$ Max. number of hits
Preferred taxonomy

- [PRTN3_HUMAN](#)** Mass: 28245 Score: **96** Expect: 5.7e-06 Matches: 5
Myeloblastin OS=Homo sapiens GN=PRTN3 PE=1 SV=3
[AKCL1_HUMAN](#) Mass: 14578 Score: 29 Expect: 27 Matches: 2
Aldo-keto reductase family 1 member C-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=AKR1CL1 PE=
[ZCHC9_HUMAN](#) Mass: 31141 Score: 24 Expect: 77 Matches: 2
Zinc finger CCHC domain-containing protein 9 OS=Homo sapiens GN=ZCCHC9 PE=2 SV=2
[MRP_HUMAN](#) Mass: 19574 Score: 24 Expect: 88 Matches: 1

Şekil 5.52. 3110 numaralı protein kümesindene elde edilen peptitlerin mascot araştırma sonucu

Protein	P24158 (PRTN3_HUMAN), Myeloblastin, C-ANCA antigen, Leukocyte proteinase 3(PR-3), Neutrophil proteinase 4(NP-4), P29 Wegener autoantigen			
Veri Tabanı	UniProtKB/Swiss-Prot (2013)			
Yazılım	Mascot			
Mascot skor	96 (56'nın üzerindeki skorlar anlamlıdır-p<0.05-)			
Teorik pI	8.45			
Gözlenen pI	8.50			
Teorik kütle	28245			
Gözlenen kütle	25920			
Araştırma Parametreleri				
Enzim	Tripsin			
Sabit Modifikasyon	Karbamidometil(CAM)			
Araştırılan peptit	10			
Eşleşen peptit	5			
Protein sekans kapsamı	% 33 (Eşleşen sekanslar kırmızı ile gösterilmiştir)			
<p>1 MAHRPPSPAL ASVLLALLLS GAARAAEIVG GHEAQPHSRP YMASLQMRGN</p> <p>51 PGSHFCGGTL IHPSFVLTA A HCLRDIPQRL VNVVLGAHNV RTQEPTQQHF</p> <p>101 SVAQVFLNNY DAENKLNDVL LIQLSSPANL SASVATVQLP QQDQVPVPHGT</p> <p>151 QCLAMGWGRV GAHDPPAQVL QELNVTVVTF FCRPHNICTF VPRRKAGICF</p> <p>201 GDSGGPLICD GIIQGIDSFV IWGCATRLFP DFFTRVALYV DWIRSTLRRV</p> <p>251 EAKGRP</p>				
Gözlenen Peptit Kütleşi(Da)	Teorik Peptit Kütleşi(Da)	Başlangıç-Bitiş	Modifikasyon	Sekans
1290.8241	1290.7640	80-91		LVNVVLGAHNV R
2808.2833	2808.3223	92-115		TQEPTQQHFSVAQVFLNNYDAENK
3413.0015	3412.6122	196-227	Cys_CAM: 199, 209	AGICFGDSGGPLICDGI IQGIDSFVIW GCATR
1042.3942	1042.5356	228-235		LFPDFFTR
1134.6306	1134.6306	236-244	Cys-CAM(163)	VALYVDWIR

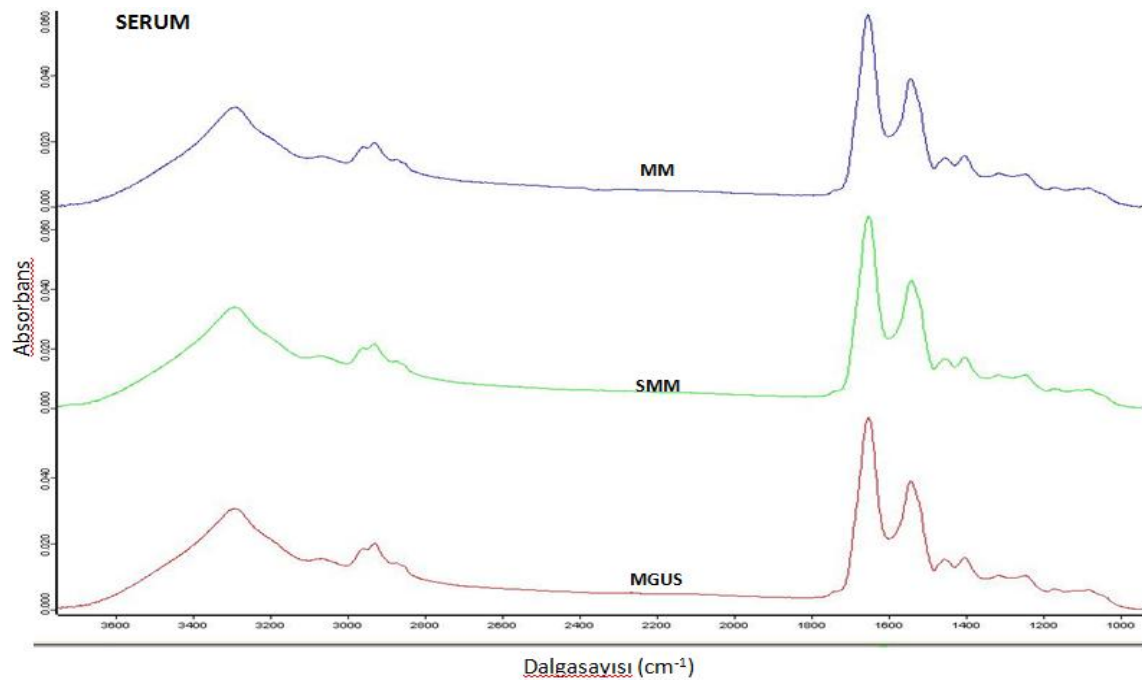
Şekil 5.53. 8110 numaralı protein kümesinden tespit edilen Myeloblastin proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

5.2 FT-IR (Spektroskopik) Çalışmalar

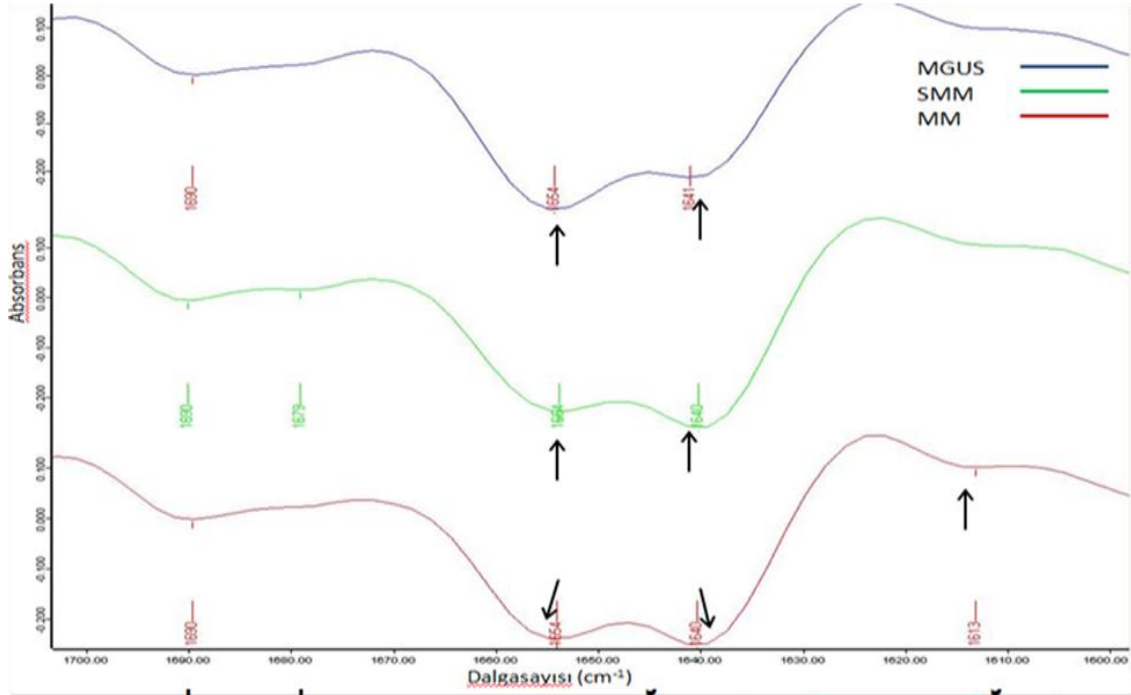
Liyofilize serum ve idrar örnekleri FT-IR'da (MCT detektörlü Bruker Tensor 27) ortakızılötesi bölgede 3 tekrarlı ölçüldü, analizi OPUS 5.5 (Bruker Optics) ile yapıldı. Bulgularda bahsedilecek olan sinyal(bant/pik) intensite ve relatif intensite değerleri, absorbanlara bağlı olarak programca belirlenen değerlerdir. Second derivate(2d) analizi ise bir sinyal altında bulunan alt sinyallerin(altyapıların) tespitini sağlar.

5.2.1 Serum

Serum analizlerinde grupların genel spektrumları benzer bulunmuştur(Şekil 5.54), sadece Amid 1 bölgesinin (1700-1600 cm^{-1}) alt yapı analizi sonucu protein ikincil yapılarında değişiklik saptanmıştır(Şekil 5.55). Amid 1 bölgesi canlı materyallerde büyük oranda proteinlerden kaynaklan sinyalleri ifade eder ve büyük oranda proteinlerin peptit bağında bulunan C=O bağından kaynaklanır.



Şekil 5.54. 3500-800 dalga sayısı (cm^{-1}) aralığında oluşan spektrumların genel görüntüsü. Grupların genel spektrumları birbirlerine benzemektedir.



Gruplar/Amid 1 (1700-1600) protein bölgesi altyapı intensite değerleri	1612	1640	1654	1679	1690
MM	0,020	0,410	0,074		0,087
SMM		0,414	0,055	0,007	0,093
MGUS		0,078*	0,424*		0,092

Şekil 5.55. Grupların protein Amid 1 bölgesi ikincil yapı karşılaştırmaları ve intensite değerleri

Bu bölgedeki altyapıların neler ifade ettikleri Çizelge 5.2’de verilmiştir. Şekil 5.55’de görüldüğü gibi alfa sarmal yapıdan random coil(rastgele-düzensiz yapı) yapı ve beta yaprak yapıya bir kayma gözlenmektedir. Bu durum Multipl Miyelom’da proteinlerin alt yapılarında değişiklik olduğunu ifade etmektedir. Monoklonal proteinlerin etkisi alt yapılarda bu şekilde görülebilmektedir.

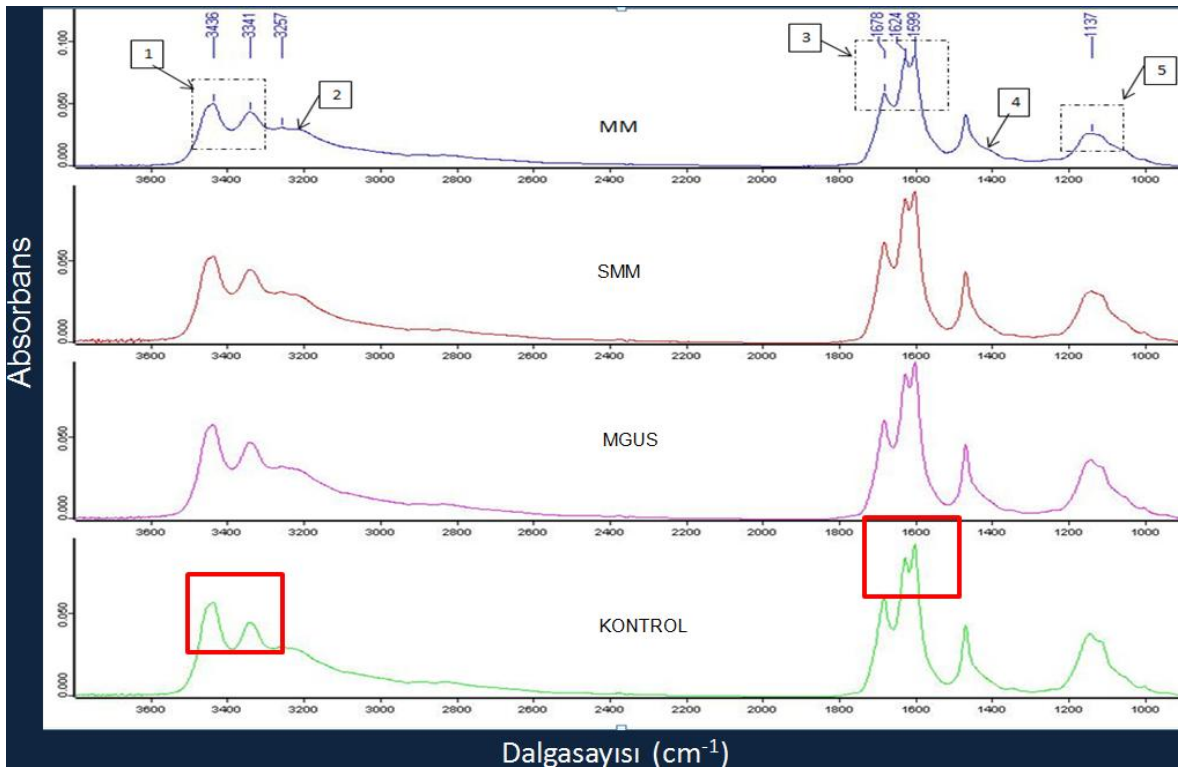
Çizelge 5.2. 1700-1600 cm^{-1} spektrum aralığında (Amid 1 protein bölgesi) bulunan sinyallerin kaynaklandıkları protein alt yapıları

	a)	b)
İkincil yapı	Ortalama	Bölge
<i>turns</i>	1694	
	1688	
	1683	1682-1662
	1670	
	1663	
<i>Alfa-sarmal</i>	1654	
		1662-1645
<i>Düzensiz yapı</i>	1645	1645-1637
<i>Beta yaprak</i>	1624	
	1631	1637-1613
	1637	
	1675	1689-1682

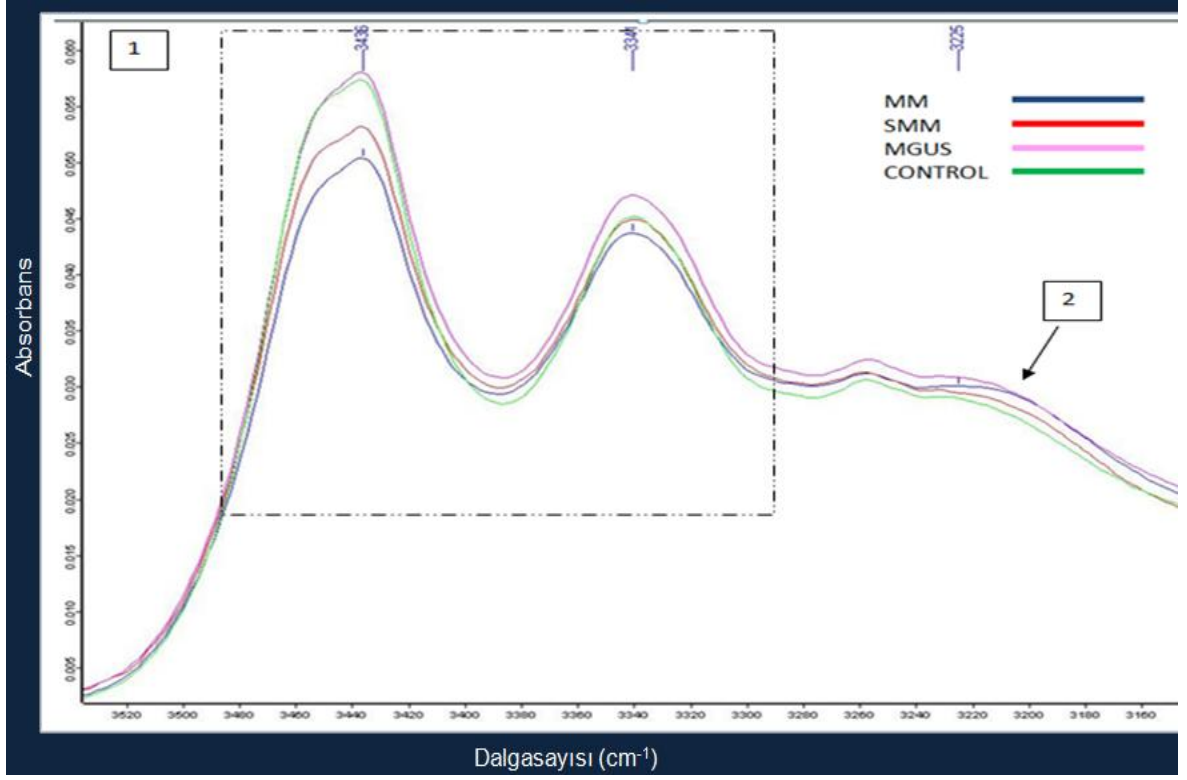
5.2.2 24 saatlik idrar örnekleri

Grupların genel spektrum karşılaştırmaları Şekil 5.56'da gösterilmiştir. Serum örneklerinin aksine idrar örnekleri genel spektrumlarında gruplar arasında önemli farklılıklar saptanmıştır. Farklılık gösteren 5 spektrum bölgesi tespit edilmiştir. 1. ve 3. bölgedeki(Şekil 5.57 ve 5.58) sinyallerin alan ve intensite farklarına bakılmıştır. Çalışmada spektrumlardaki farkların tanıya yönelik olarak kullanılıp kullanılmayacağı ile ilgili yeni bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Genel olarak kullanılan alan

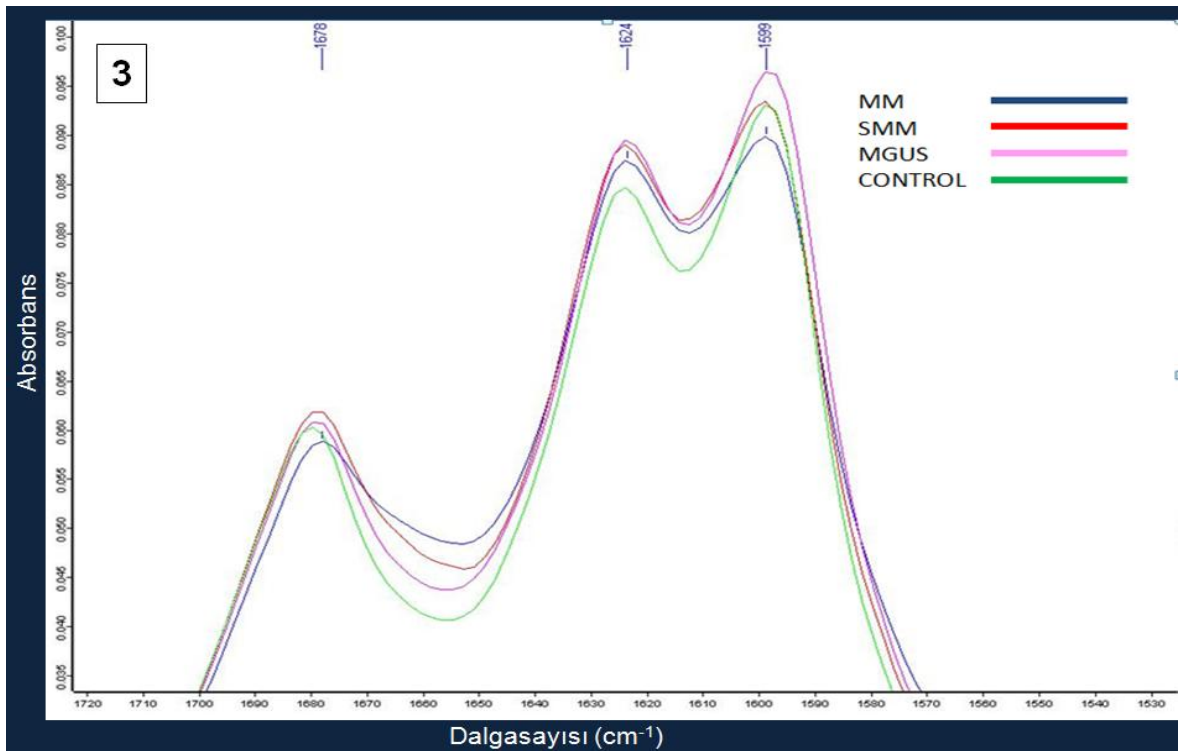
hesaplamaları, sinyal intensitesi değerleri doğrudan gruplararası karşılaştırılmada kullanılmamıştır. Daha bilimsel olduğu düşünüldüğü için, öncelikle grup içinde önemli farklılık gösteren sinyaller birbirine oranlanmış ve daha sonra bu oranların gruplararası değişimine bakılmıştır. Oranlama da alan ve intensite değeri olmak üzere iki kriter kullanılmıştır. Oranlama için belirlenen sinyaller ve sinyallerin oranları Çizelge 5.3, 5.4, 5.5 ve 5.6'da gösterilmiştir. Son olarak Çizelge 5.7'de bu oranlar ile oluşturulmuş tanı aralıkları verilmiştir. Belirlenen bu tanı aralıklarına göre kör olarak çalışılan 3 örnek tanımlanmaya çalışılmıştır.



Şekil 5.56. 3500-800 dalga sayısı (cm^{-1}) aralığında oluşan spektrumların genel görüntüsü. Farkların görüldüğü spektrum bölgeleri oklarla işaretlendirilmiş ve numaralandırılmıştır.



Şekil 5.57. Analiz için kullanılan 1.bölge sinyalleri.



Şekil 5.58. Analiz için kullanılan 3.bölge(Amid 1) sinyalleri.

Çizelge 5.3. Şekil 5.56, 5.57 ve 5.58’te österilen 1 ve 3 numaralı bölgeye ait sinyal alan değerleri.

	1 numaralı bölge		3 numaralı bölge	
DALGA SAYISI	3436	3341	1624	1599
MM	0.974	0.717	0.226	0.259
SMM	1.135	0.748	0.240	0.286
MGUS	1.305	0.817	0.220	0.309
KONTROL	1.460	0.823	0.236	0.352

Çizelge 5.4. Şekil 5.56, 5.57 ve 5.58’te gösterilen 1 ve 3 numaralı bölgeye ait sinyal intensiti değerleri.

	1 numaralı bölge		3 numaralı bölge	
DALGA SAYISI	3436	3341	1624	1599
MM	0.020	0.014	0.007	0.009
SMM	0.024	0.015	0.008	0.011
MGUS	0.027	0.016	0.009	0.016
KONTROL	0.029	0.016	0.008	0.018

Çizelge 5.5. Çizelge 5.3'te verilen 1 ve 3 numaralı bölgedeki sinyal alanlarının birbirlerine oranları.

Sinyal alan	3436/3341	1599/1624
MM	1,358	1,146
SMM	1,517	1,192
MGUS	1,597	1,405
KONTROL	1,774	1,492

Çizelge 5.4'te verilen 1 ve 3 numaralı bölgedeki sinyal intensitelerinin birbirlerine oranları.

Sinyal intensite	3436/3341	1599/1624
MM	1,429	1,286
SMM	1,600	1,375
MGUS	1,688	1,778
KONTROL	1,813	2,250

Çizelge 5.6. Tanı için oluşturulmuş grup alan ve intensite aralıkları

Sinyal alan aralığı	3436/3341	1599/1624	Sinyal intensite aralığı	3436/3341	1599/1624
MM	<1,437	<1,169	MM	<1,514	<1330
SMM	1,438-1,1557	1,170-1299	SMM	1,515-1,644	1,331-1576
MGUS	1,558-1,1686	1,300-1449	MGUS	1,644-1,750	1,576-2014
KONTROL	>1686	>1450	KONTROL	>1750	>2014

5.2.2.1 Durumu deney aşamasında bilinmeyen (kör) üç örneğin yeni yöntem ile tanımlanması

Kör olarak çalışılan örneklerin sinyal intensite ve alan oranları belirlenmiş hangi grup aralıklarına girdikleri saptanmıştır(Çizelge 5.8 ve 5.9). 49 numaralı örnek hem alan, hemde intensite aralığına göre Multipl myelom olarak gözükmektedir. 50 numaralı örnek ise 1.bölge sinyal oranlarına göre MGUS, 3.bölge sinyal oranlarına göre kontrol kriterlerine uymaktadır. Son olarak 66 numaralı örnek ise sağlıklı birey olarak tespit edilmiştir.

Hastaların örnek alım tarihindeki gerçek tanıları Çizelge 5.10’da belirtilmiştir. Her 3 hastanın durumunda doğru olarak teşhis edilebilmiştir. Özellikle 66 numaralı örnek hangi aşamada olduğu bilgisi verilmeyen hasta olarak gönderildiği halde kontrol yani sağlıklı birey olarak tespit edilmiştir. Aslında bireyin iyileştiği bir remisyon döneminde olduğu daha sonradan bildirilmiştir. Bu durum bu tanı yönteminin kullanılabilirliğini göstermektedir. Ancak doğal olarak birkaç örnekle yapılan sınamalar kabul edilemez, örnek sayısının arttırılması gerekmektedir.

Çizelge 5.7. Deneyler aşamasında durumu bilinmeyen 3 örneğin 1 ve 3 bölgedeki sinyal alanlarının oranı.

Alan oranı/ Örnek	3436/3341	1599/1624		MM	SMM	MGUS	KONTROL
49-HU	0,945	0,995	3346/3341	<1,437	1,438-1,1557	1,558-1,1686	>1686
			1599/1624	<1,169	1,170-1299	1,300-1449	>1450
50-ZA	1,649	1,619	3346/3341	<1,437	1,438-1,1557	1,558-1,1686	>1686
			1599/1624	<1,169	1,170-1299	1,300-1449	>1450
66-HİP	1,809	1,722	3346/3341	<1,437	1,438-1,1557	1,558-1,1686	>1686
			1599/1624	<1,169	1,170-1299	1,300-1449	>1450

5.2.2.2 Belirlenen yöntem ile hastalık seyri takibi

Yöntemin hastalığın seyri ile ilgili bilgi verip vermeyeceğini kontrol etmek için 03 ve 10 numaralı örnekler kullanılmıştır. Bu örneklerin geliş tarihlerine göre oluşturulmuş genel spectrum karşılaştırmaları ve sinyal oranları yöntemi ile teşhisleri Şekil 5.59 ve 5.60’ta verilmiştir. Kesin tanısı MGUS olan 10 numaralı örnek düzenli aralıklarla kontrol edilmektedir. Çalışma da ilk analiz edilen 10 numaralı örneğin(Kasım) SMM kriterlerine uyduğu saptanmıştır. Daha sona alınan aynı hastaya ait ikinci numunenin(nisan) sinyal oranları ise MM kriterleri içinde bulunmuştur. Her iki durumda da bu çalışma da belirlenen yöntemin tanısı, kesin tanıya uymamıştır. Ancak yakın zamanda hastanın artık SMM olarak izlenmeye başlandığı bildirilmiştir. Bu durum yöntemin aylarca önceden hastalık seyrini bildirme ihtimalinin olduğunu düşündürmektedir(Şekil 5.59).

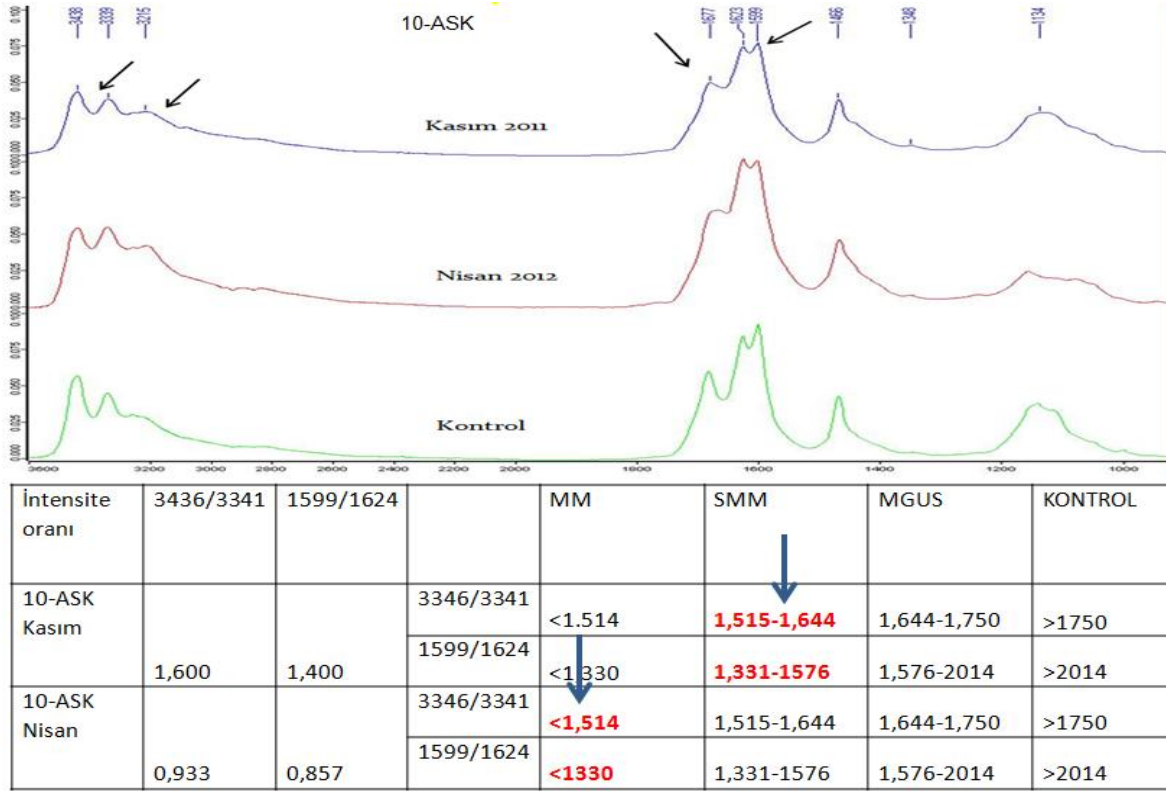
Çizelge 5.8. Deneyler aşamısında durumu bilinmeyen 3 örneğin 1 ve 3 bölgedeki sinyal intensitelerinin oranı.

İntensite oranı/Örnek	3436/3341	1599/1624		MM	SMM	MGUS	KONTROL
49-HU	1,154	1,167	3346/3341	<1,514	1,515-1,644	1,644-1,750	>1750
			1599/1624	<1330	1,331-1576	1,576-2014	>2014
50-ZA	1,700	2,100	3346/3341	<1,514	1,515-1,644	1,644-1,750	>1750
			1599/1624	<1330	1,331-1576	1,576-2014	>2014
66-HİP	1,885	2,250	3346/3341	<1,514	1,515-1,644	1,644-1,750	>1750
			1599/1624	<1330	1,331-1576	1,576-2014	>2014

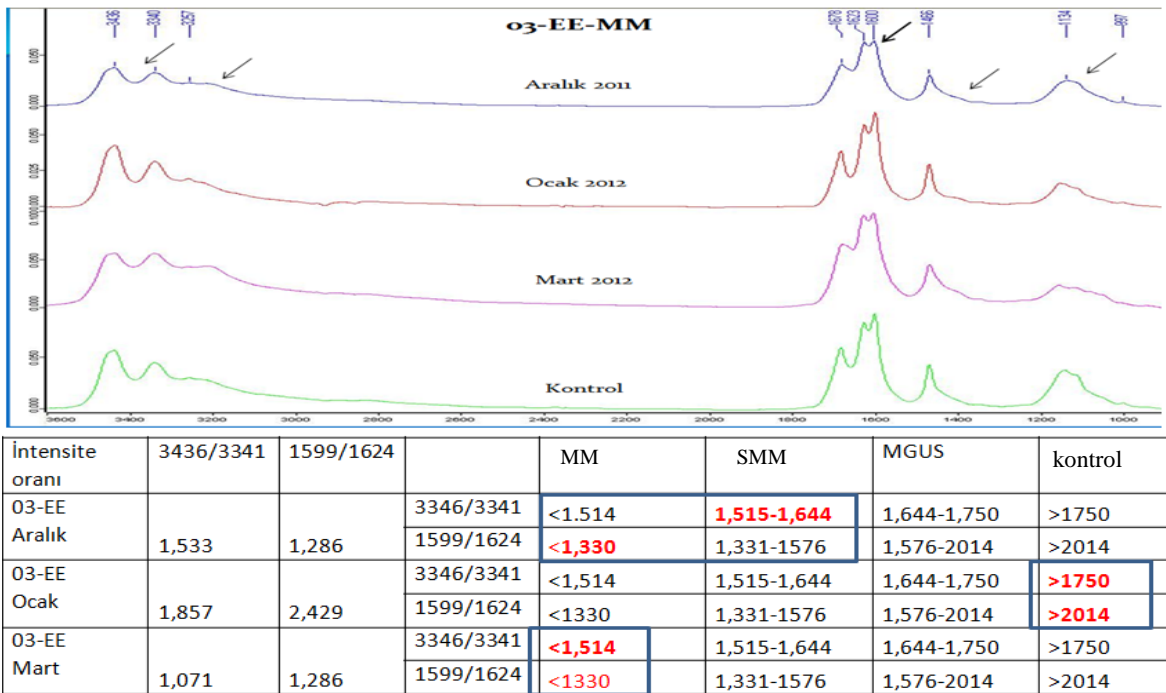
Çizelge 5.9. Örnekler için sinyal oran aralığı ile belirlenen tanı ile kesin tanıların karşılaştırılması.

Örnekler/TANI	Sinyal oran aralığına göre belirlenen TANI	Örnek alım tarihinde belirlenen kesin TANI
49-HU	MM	MM
50-ZA	MGUS/KONTROL	MGUS
66-HİP	KONTROL	REMİSYON

Diğer bir benzer çalışma da ise, 03 kodlu, aynı hastadan 3 farklı zamanda alınmış idrar örneklerinin FTIR genel spektrum karşılaştırmaları da Şekil 5.60'ta verilmiştir. Aralık 2011 sonunda yeni tanı olarak bildirilen ve ilk örneğinin analizi uyumlu sonuç veren (MM-SMM) bu hastanın, yaklaşık ikişer ay ara ile alınan ikinci örneğinde sağlıklı birey kriterlerine uyduğu, sonraki örnekte ise tekrar MM durumuna döndüğü belirlenmiştir. Bu durum hastanın tedaviye hızlı yanıt verdiğini göstermektedir. Hastane verilerine göre ise hasta tedaviye yanıt vermiş ancak kısmi bir iyileşme görülmüş ve sonrada otolog kemik iliği nakli yapılmıştır.



Şekil 5.59. 10 numaralı bireyin farklı zamanlarda alınmış idrar örneklerinin genel spektrumlarının karşılaştırılması, sinyal oranlarına göre belirlenmiş tanıları(kırmızı ile gösterilmiştir)



Şekil 5.60. 03 numaralı bireyin farklı zamanlarda alınmış idrar örneklerinin genel spektrumlarının karşılaştırılması, sinyal oranlarına göre belirlenmiş tanıları(kırmızı ile gösterilmiştir)

6 SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tartışma proteomik ve FT-IR olmak üzere iki başlık altında yapılacaktır.

6.1 Proteomik

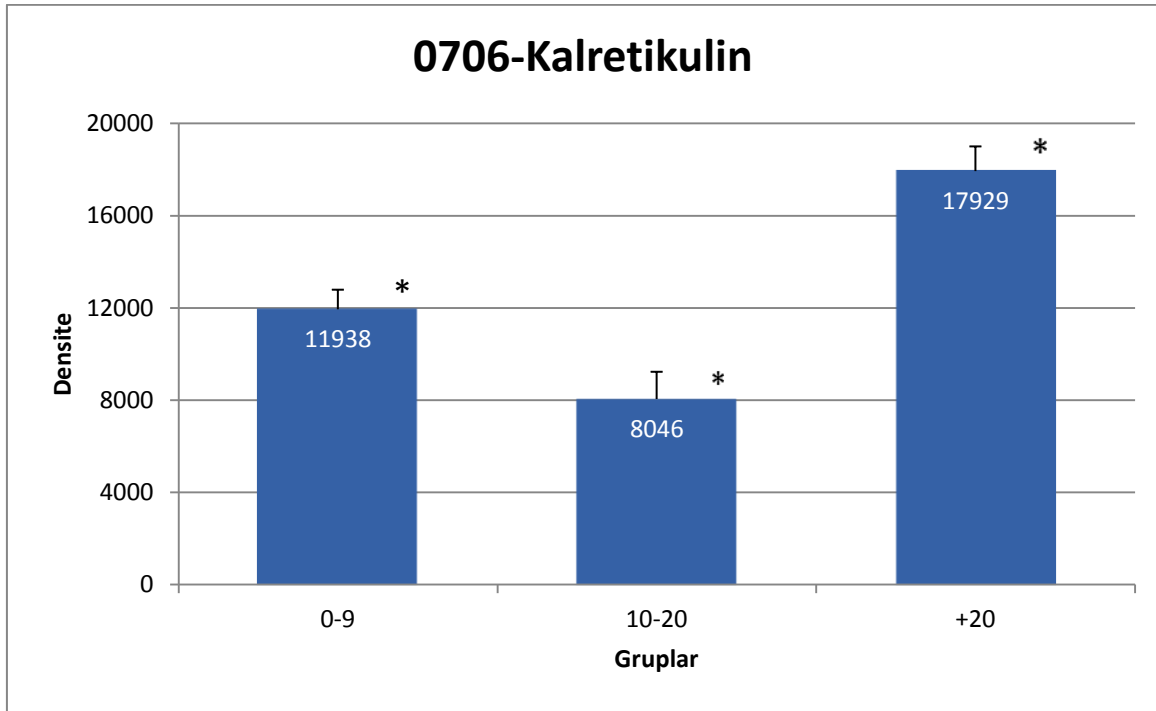
2000’li yılların başında insan gen haritasının çıkarılması ve gen diziliminin belirlenmesi ile özellikle hastalıkların engellenmesi, tespiti ve tedavisinde büyük ilerlemelerin olması bekleniyordu. Ancak gelişmeler beklenen kadar hızlı olmadı. Genomik çalışmalar, bir organizmanın kalıtsal bilgilerini detaylı biçimde gösterebiliyordu ancak sadece kod çözmekle çok sınırlı bilgilere ulaşılabileceği anlaşıldı. Genomik çalışmalardan elde edilen bilgilerin sınırlı olduğunun anlaşılmasından sonra, genomun devamı olan proteomik biyolojik olayların açıklanmasında önem kazanmıştır. Proteomik belli şartlar altında ve belli bir dokuda genom tarafından kodlanan tüm proteinlerin, yani proteomun analiz edilmesi işlemidir. Proteomik çalışmalarının esas amacı bütün hücre, doku ve vücut sıvılarındaki proteinleri, özellikleri ve seviyelerini de içerecek şekilde belirleyerek tanımlanmaktır. Son çeyrek asırda özellikle kanser çalışmalarında proteomik teknolojisi büyük umut olmuştur. Proteomik çalışmaları çok büyük keşiflere ışık tutmuştur ancak yeni teknolojiler geliştirmede hala çok büyük iş yükü gerektirmektedir. Yüzbinlerce proteinin olması, bir proteinin kendisinin bile onlarca varyantının bulunması, birçok modifikasyonlara uğraması araştırmaları güçleştirmektedir. Ayrıca aynı anda birçok teknolojinin kullanılması deney tekrarlığında etkilemektedir ve aylarca yıllarca süren optimizasyon süreçleri ve çalışmalar sonucunda başarıya ulaşılabilmektedir.

Bu çalışma da kemik iliğinden plazma hücresi izolasyonu, plazma hücrelerinden protein izolasyonu, 2-DE jel elektroforezi ve diğer ölçümler aşamasında, birçok protokol denenmiş aylarca süren çalışmalar sonucunda uygun deneysel yöntemler oluşturulmuştur. Bu yöntemler benzer konularda araştırma yapan araştırmacılara yol gösterici olması açısından ileride makale olarak araştırmacılara sunulacaktır. Araştırma sonucunda ilk defa kapsamlı olarak Türkiye’deki MM hastalarının plazma hücrelerine ait protein profili haritaları çıkarılmıştır. Bu protein profilinde noktasal olarak belirlenen protein kümeleri tek tek incelenerek içlerinde önemli değişim gösterenler istatistiksel olarak belirlenmiştir. Değişim

önemli bulunanlardan 34 tanesinin protein kimliklendirilmesi(tanımlanması) yapılmaya çalışılmış ve 9 tanesinin tanımı yapılmıştır.

Kalretikulin

CALR geni tarafından kodlanan Kalretikulin; Kalregulin, CRP55, Kalsequestrin-like protein ve Endoplazmik retikulum resident protein 60 (ERp60) olarak da adlandırılmaktadır. Kalretikulin, Endoplazmik retikulumda bulunan, 46 kDa ağırlığında Ca^{+2} bağlayan multifonksiyonel bir proteindir. Afinitesi düşük olmakla birlikte depo kapasite yüksek olduğundan dolayı yüksek oranda kalsiyumu tutarak inaktif hale getirir ve kalsiyum dengesinin sağlanmasına yardımcı olurlar.



*P< 0.05

Şekil 6.1. Kalretikulinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması

ER'de kalneksin ile birlikte N-bağlı glikoproteinlerin şaperonu olarak görev alması Kalretikulin'in diğer önemli fonksiyonudur. Spesifik karbonhidrat yapıları için bir tanıma bölgesine sahip olan Kalretikulin; oligosakkaritleri tanıyarak katlanmamış glikoproteinlere bağlanan, doğru katlanmalarını kontrol eden, organellere geçişini kolaylaştıran ve stres durumunda proteinlerin agregasyonunun engelleyen bir heat shock proteinidir^{54,55,56,57}.

Araştırmalarımız klonal plazma hücresi yüzdesi arttıkça, kalretikulun protein ifadesinin önemli oranda arttığını göstermektedir(Şekil 6.1). Bu durumun MM kanserinin ilerlemesine bağlı olarak bir tepki olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir ve Kalretikulun proteinin ileri aşamalarda hastalığın tanı ve tedavisinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Özellikle N-bağlı glikoproteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olması, immunogloblün yapısındaki bozulmalara bağlı olarak oluşan plazma hücresi hastalıklarında Kalretikulun aktivitesinin rolü olduğunu düşündürmektedir. Antikor olarak fonksiyon gören immünoglobulinler de glikoprotein yapısındadırlar ve bir çifti ağır zincir (H) diğer bir çifti ise hafif zincir(L) olmak üzere 4 polipeptid zincirinden oluşmaktadır. İmmunglobulinler üç büyük (IgA, IgG ve IgM) ve iki küçük (IgD ve IgE) sınıfa ayrılır⁵⁸. Bu immünoglobulinlerin fonksiyonundaki ya da yapısındaki herhangi bir bozukluk Kalretikulun proteininin aktivitesindeki değişimle doğrudan ilgili olabilir. Aşağıda verilen araştırma örneğinde olduğu gibi bu proteinin ifadesini engeleyecek bir mutasyon sistematik hafif ya da ağır zincir amilodiosisine yol açabilmektedir.

Zhou ve arkadaşları⁵⁴ (2008) yaptıkları bir çalışmada Hafif zincir (AL) amilodiosis hastalarında Kalretikulun proteininin melfalan tedavisindeki rolünü irdelemişlerdir. Primer sistematik amilodiosis ya da primer amiloidoz olarak da adlandırılan, hafif zincir amiloidoz, kemik iliğindeki plazma hücreleri tarafından üretilen immünoglobulin hafif zincirleri veya zincir parçaları öncü proteinlerin değişimi ve katlanmalarının bozulması ile oluşan bir hastalıktır. Bu hafif zincir parçaları, AL tipi amiloid fibrillerine dönüşerek vücuttaki tüm organlarda birikime uğrar. Araştırmacılar eş zamanlı PCR ile yaptıkları gen ifadeleme çalışmalarında, Melfalan tedavisi görmüş 9 hastadan tedaviye yanıt veren 4 tanesinde, Kalretikulun ifadesinin yanıt vermeyen 5 hastadaki ifade seviyesine göre 2.9 kat fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmalarını daha ileri götürerek wildtype murin embriyonik fibroblast hücreleri ile Kalretikulun knock-out murin fibroblast hücrelerini Melfalana maruz bıraktıklarında wildtype hücrelerinin Melfalan'a çok daha hassas olduğunu bildirmişlerdir.

Kalretikulun özellikle immünoglobülin gibi N-bağlı glikoproteinlerin doğru katlanmasında önemli rol oynayan bir şaperon proteindir. Azlığı bu tür proteinlerin yapısal olarak bozulmasına neden olarak monoklonal protein birikimine neden olacaktır. Bu proteinin aşırı ifadesi de bir hastalığın bulgusu olarak değerlendirilebilir. Aşırı immünoglobülin sentezi doğal olarak kalretikulun sentezini artıracaktır. Ancak belli bir aşamadan sonra bu

durumda yeterli olmayacaktır. Çalışmamızda en ileri hasta grubunda meydana gelen önemli miktarda artış bu şekilde yorumlanabilir.

Diğer taraftan Kalretikulin'in kalsiyum bağlama özelliğinin de MM'de önemli rol oynadığı düşünülebilir. Zira bu hastalığın en önemli bulgularından biri de kemik lezyonları ve buna bağlı olarak oluşan kalsiyum fazlalığıdır. Kanserleşmiş plazma hücreleri ile kemik hücreleri arasından sıkı bir ilişki vardır. Plazma hücreleri salgıladıkları maddeler ile kemik yapım-yıkım dengesini, yıkım yönünde bozmakta kemiklerin erimesine ve kalsiyum çözülmesine neden olmaktadır¹³. Ortamda kalsiyum artışına paralel olarak plazma hücrelerine daha fazla kalsiyum girişi olması muhtemeldir ve bu durum kalretikulin artışının nedeni olarak düşünülebilir. Kalretikulin proteinin daha çok kalsiyum tutma işlevinin ön plana çıkmak zorunda kalması, diğer çok önemli işlevi olan imminoglobulinlerin doğru katlanması işlevinin aksamasına sebep olabileceğide göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak söylenebilir ki, Kalretikulin proteini Multiple Miyelom'un tanısında ve ileri aşamalarda tedavisinde kullanılabilecek hedef bir biyobelirteç olabilir.

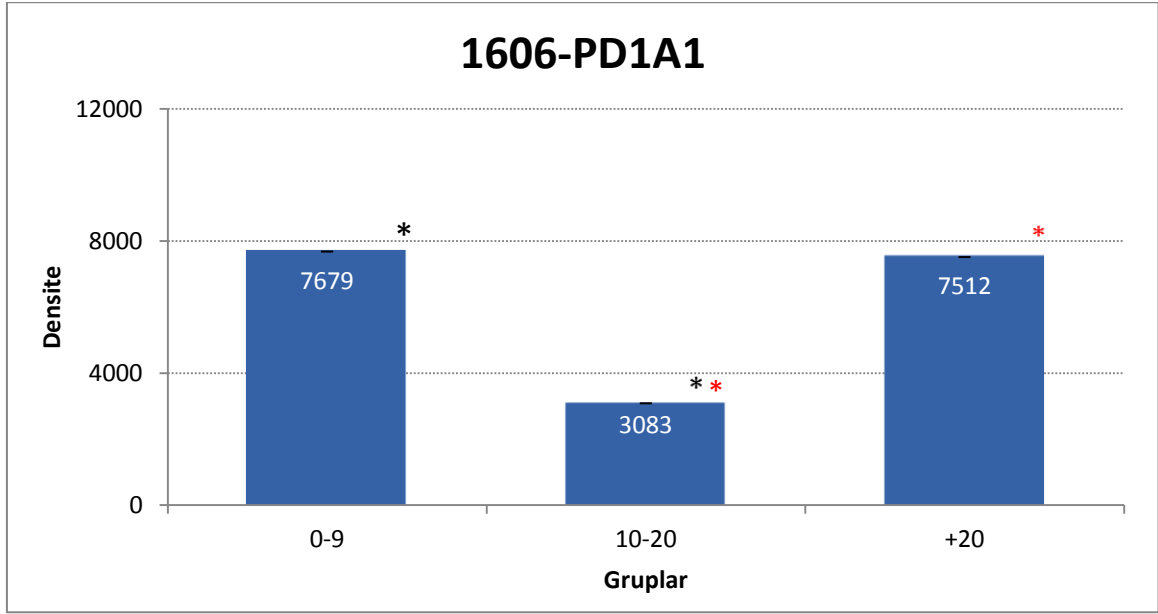
Protein disulfide-isomerase precursor

PD1A1 proteinlerde sistein kalıntıları arasındaki disülfid bağlarının oluşumunu, yıkımını ve yeniden yapılandırılmasını katalizleyen çok işlevli bir proteindir.

Hücre dışında hücre yüzeyine bağlı proteinlerin disülfid bağlarını ayıran ve modifikasyonuna neden olan bir indirgen olarak, hücre içinde ise henüz 3 boyutlu yapısına kavuşmamış proteinlerin disülfid bağlarının oluşmasını ve yeniden düzenlenmesini katalizleyen bir protein olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda katlanmamış proteinlerin agregasyonunu engellerken, düşük konsantrasyonlarda tam tersi bir etki (antişaperon) ile agregasyona neden olabilmektedir. Ayrıca bu protein prolyl 4-hidroksilaz ve mikrozomal triaçilgliserol transfer protein (MTTP) gibi bazı proteinlerin alt yapılarına da katılmaktadır^{59,60,61,62,62}.

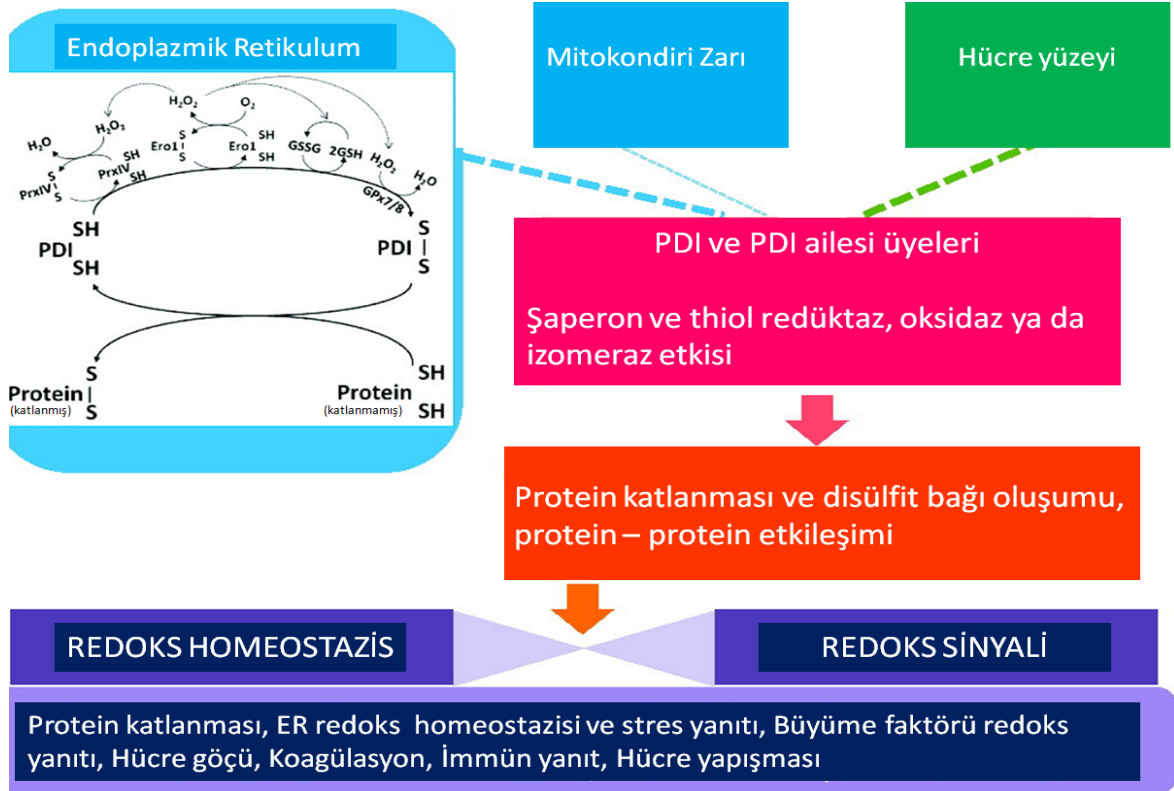
Araştırmamızda 10-20 grubunda önemli bir azalış olmuş ancak +20 grubunda tekrar 0-9 grubu seviyesine bir yükseliş olmuştur (Şekil 6.2). Bu proteinin protein katlanmalarından

sorumlu olduğu düşünülürse 10-20 grubunda azalmasını hücre anormalleşmesinin ve kanserleşmesinin nedenleri arasında olabileceğinin bir göstergesi olabilir.



*P< 0.05, *P<0.05

Şekil 6.2. PD1A1'in gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.

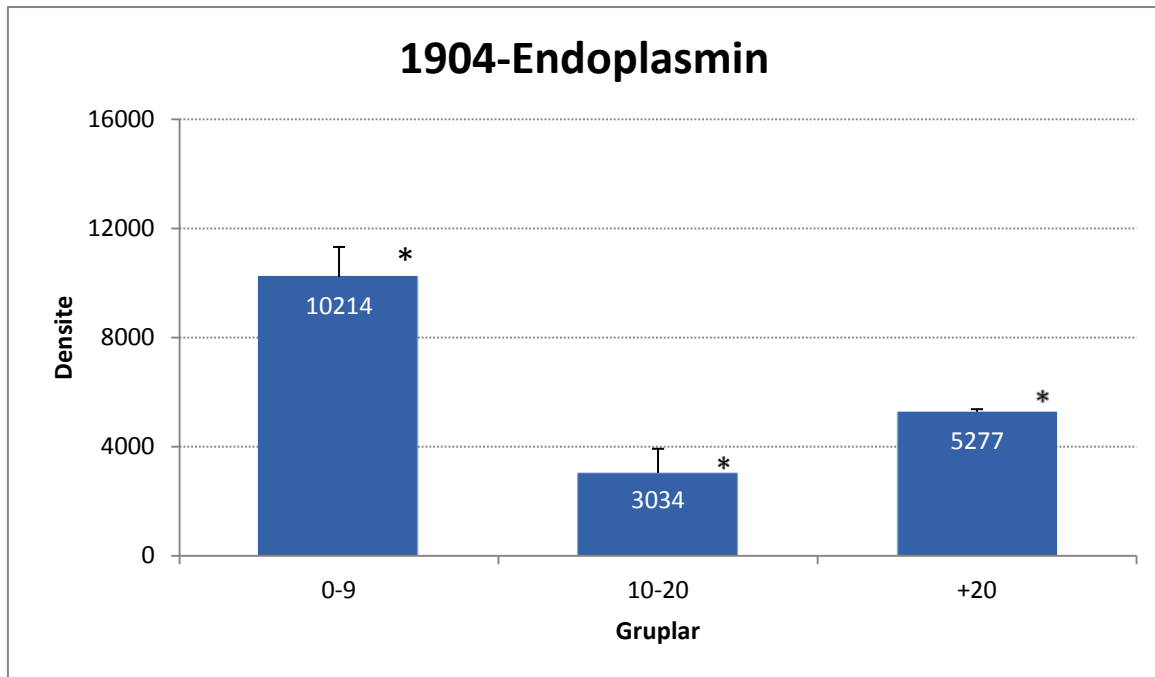


Şekil 6.3. PD1A1'in bulunduğu hücre bölgeleri ve işlevleri⁶³

Endoplasmin/Tumor rejection antigen gp96

94 kDa glucose-regulated protein olarak da adlandırılan bu protein hsp90 ailesine ait bir heat shock proteindir.

Daha önce bulgular kısmında da verilmiş olan bar grafiğine bakıldığında (Şekil 6.4), bu şaperon proteinin yoğunluğunun ve şiddetinin göstergesi olan densite değerlerinde kanserli plazma hücrelerinin artışına bağlı olarak önemli değişimler gözlenmektedir. 2. ve 3. grupta Tumor rejection antigen gp96 densitesinde densitesinde önemli bir azalış meydana gelmiştir.



*P < 0.05

Şekil 6.4: Endoplazminin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması.

Tumor rejection antigen (Gp96), oldukça korunmuş olan bir glikoproteindir. Genellikle endoplazmik retikulumda(ER) bulunur ve şaperon olarak protein katlanmalarından sorumludur. Birçok antijenle de ilişkili olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar; bu proteinin büyük doku uygunluk kompleksi sınıf-1-(MHC/ major histocompatibility complex class I) kısıtlı antijen sunum yolağınının bir parçası olduğunu göstermiştir. Antijenlerin gp96 tarafından şaperonlanması, MHC-1 peptitlerinin ER lümeninde oluşmasını tetiklemektedir. Ayrıca kansere özel- koruyucu T-hücreleri(cancer-

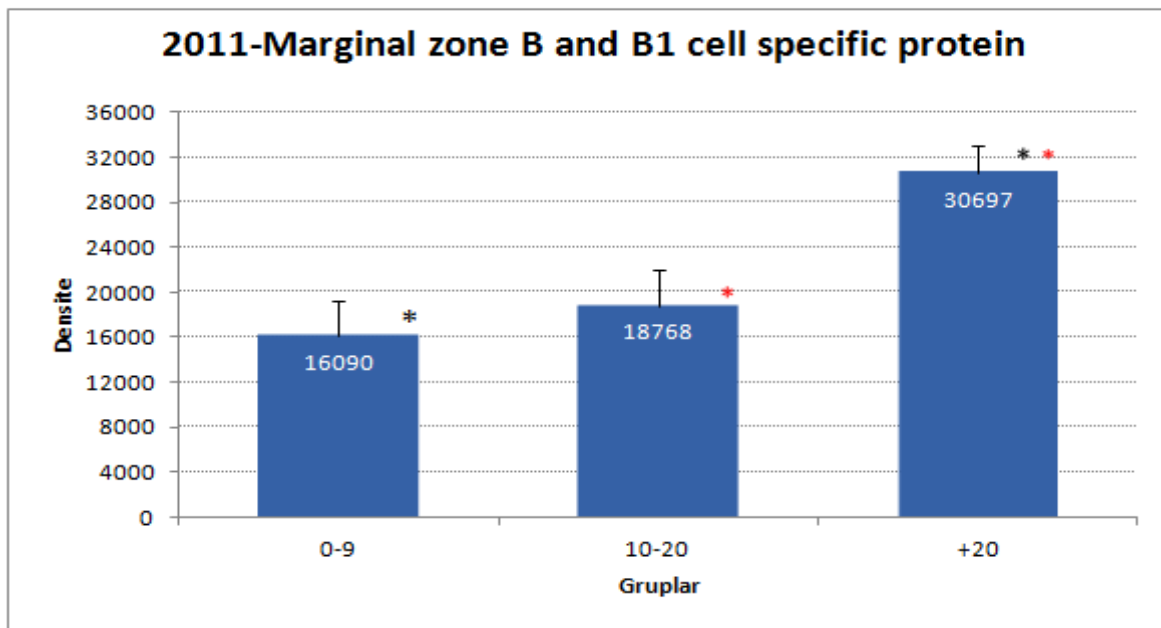
specific protective T cell immune response) yanıtını da aktive ettiği bildirilmiştir^{64,65}. Tüm bu araştırmalar gp96'nın immün sistem yanıtının oluşmasında kanser gelişiminin engellenmesinde çok önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

Multipl Miyelom'da bağışıklık sisteminin çökmesi, monoklonal protein ifadesinin artması olguları çok sık ratlanan bulgulardır. Araştırmada bu protein ifadesinde tespit edilen azalış bu bulguların nedenlerinden biri olarak düşünülmektedir.

Araştırma sonucunda iki önemli sonuç üzerinde tartışılabilir. Birincisi bu proteinin hastalığa bağlı olarak değişimi, tanıya yönelik bir parametre olarak kullanılabilirliğini akla getirmektedir. İkincisi ve çok daha önemlisi Multipl myelom'un semptomlarının giderilmesinde iyileştirici bir ilaç rolü de üstlenebileceğide gözardı edilmemelidir. Nitekim çok yakın zamanlarda bu proteinin immün sistemi aktive edip kansere yanıt oluşturucu etkisi üzerine araştırmalar yayınlanmaya başlamıştır^{66,67}.

Marginal zone B and B1 cell specific protein(MZB1)

Plasma cell-induced resident ER protein(pERp1) ve Proapoptotic caspase adapter protein(PACAP) ve HSPC190 olarakda bilinen bu protein Endoplazmik retikulumda bulunan katlanmalardan sorumlu şaperon proteinlerden biridir.



*P< 0.05, *P<0.05

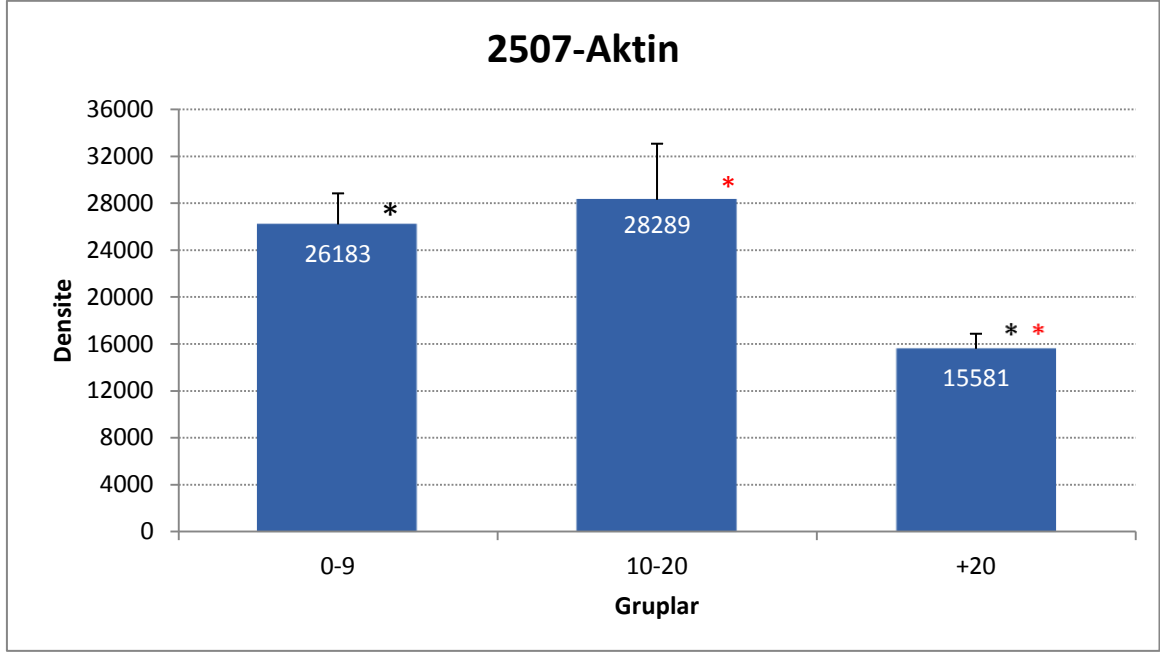
Şekil 6.5. MZB1 proteinin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması

MZB1 proteini BİP(Binding immunoglobulin protein/GRP78) şaperon ünitesinin bir parçasıdır. B hücrelerinin plazma hücrelerini değişimi sırasında ifadesi artmaktadır⁶⁸ Moleküler şaperon ve oksidoredüktaz olarak immünoglobülinlerin(Ig) yapımında, özellikle de IgM'nin yapımı ve salgılanmasında rol almaktadır^{69,70}. Apoptoz regülasyonunda da görevlidir. Kalsiyum depo miktarını ve integrin aktivasyonunu etkileyerek Periferel B-hücrelerinin farklılaşmasında da rol almaktadır⁷¹

Araştırmada bu proteinin hastalık derecesine bağlı olarak önemli oranda arttığı tespit edildi. MZB1, B hücrelerine özgün multifonksiyonel bir proteindir, ifadesinin artması antikör sentezinin arttığını ve hücrenin değişime uğradığını göstermektedir. Normalde antikör sentezinin artması ve B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşmesi periferel lenf dokularında bir enfeksiyon sırasında olması gereken bir durumdur. Kemik iliğinde böyle bir durumun gerçekleşmesi kanserin habercisidir. Multipl Myelom'un önemli bulgularından olan, immünoglobulin sentezinin bozulması, tek tip monoklonol protein sentezi, B hücrelerinin kemik iliğinde plazma hücrelerine dönüşmesi ve Ca⁺² miktarındaki değişimleri içeren bulguların hepsinin bir şekilde bu proteinli ilişkili olduğu görülmektedir. Bu açıdan MZB1 Multipl Myelom kanserinin tanı, gelişim ve tedavisinde çok önemli rol oynayabilecek bir biyobelirteç olmaya adaydır. Sadece Multipl Myelom için değil, diğer tüm lenfoid kökenli kanserlerde bu proteinin ifadesindeki değişikliklerin izlenmesi gereklidir. Foliküler limfoma(FL), Büyük B hücreli limfoma(DLBCL), Multipl Miyelom ve Akut Miyeloid Lösemi (AML) gibi kanser türlerinde ifadesinin arttığı tespit edilmiştir⁷². Sonuç olarak MZB1 proteinin fonksiyonları göz önüne alındığına B hücresi ve plazma hücrelerinin anormalliklerinde önemli bir rol aldığı görülmektedir. Bu önemi nedeni ile ilerde tedavi amaçlı kullanımında hedef proteinlerden biri olacaktır.

ACTB-HUMAN, Actin, cytoplasmic1

Beta Aktin olarak bilinen ACTB insanda tanımlanan 6 farklı aktin izoformundan biridir. Kas kökenli olmayan iki Aktin formundan birisi olan bu kasılma özelliğine sahip koruyucu sitoplazmik protein hücre hareketliliği, hücre yapı ve bütünlüğünde önemli rol almaktadır⁷³.



*P< 0.05, *P<0.05

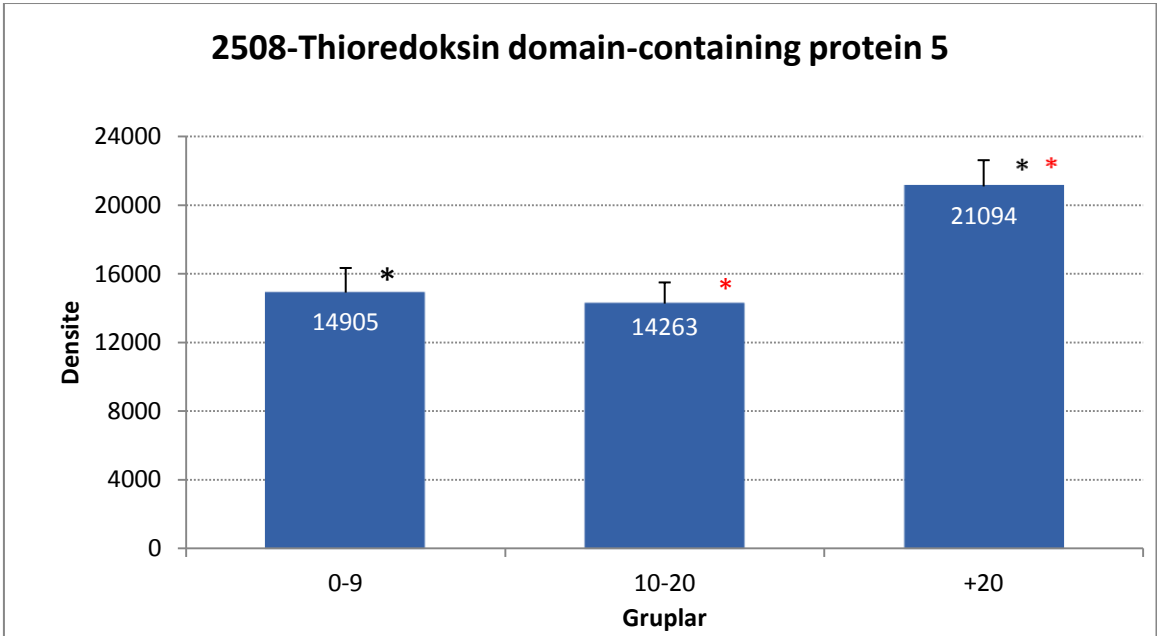
Şekil 6.6. Aktin'in gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması

Araştırmamızda ileri seviye +20 grubunda Aktin seviyesinde önemli miktarda düşüş tespit edildi(Şekil 6.6). Aktinin ifadesinin azalması hücre hareketinin(motilite) ve göçünün azaldığı anlamına gelmektedir. Bu durum Aktin'in, normalde kemik hücresi içinde bulunmayıp periferel lenf dokulara göç etmesi gereken plazma hücrelerinin, hareket kabiliyetlerini kaybederek kemik iliğinde toplanmasının etkenlerinden birisi olabileceğini akla getirmektedir. Nitekim bir çok araştırmada bu proteinin, hücre göçünde, hücrelerin bir arada bulunmasında(adhesion), hücre bölünmesinde ve bazı genlerin ifadesinin kontrolünde rol aldığı bildirilmiştir^{74,75,76}. Bu araştırmalardan bir tanesinde Bunnell ve arkadaşları⁷⁷ (2011), Aktin genleri susturulmuş(knockout) fareler ile yaptıkları çalışmalarda, embriyonik fibroblast hücrelerinin göç kabiliyetlerinin azaldığı ve ilave olarak hücre zarı dinamikliğinin azalarak hücrelerin birbirlerine bağlı kaldıklarını rapor etmişlerdir. Aktin'in hücre motilitesi ve hücreler arası ilişkideki rolleri gözönüne alındığında aktivitesinde azalma hücrelerin bir araya gelip koloni şeklinde yapılaşmaya gitmesine sebep olacaktır. Bu özelliği ile Multipl Miyelom'da ve diğer kanser türlerinde biyobelirteç olmaya aday bir proteindir.

Thioredoxin domain-containing protein 5

Thioredoxin domain containing protein 5, thioredoxin domaini içeren protein ailesine ait olan TXNDC5 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Kanser gelişiminde etkili bir proteindir. Akciğer kanserinde ve endotelial hücre kanserinde arttığı tespit edilmiştir. Temel olarak apoptozisi engellediği için kanser gelişimini tetiklediği ileri sürülmüştür^{78,7978}

Kanser hücrelerinin gelişiminde en önemli faktörlerden biri apoptozisin engellenmesidir. Kanser hücreleri apoptozisi engellemek çeşitli mekanizmalar kullanılmaktadırlar. Bunlardan biri de TXNDC5 proteininin ifadesinin artırılmasıdır. Araştırmamızda +20 grubunda bu protein ifadesinin önemli miktarda arttığının tespit edilmesi Multipl Miyelom'da da bu mekanizmanın kullanıldığını göstermektedir. Apoptozisi inhibe edici özelliği ile bu proteinde biyobelirteç olmaya adaydır.



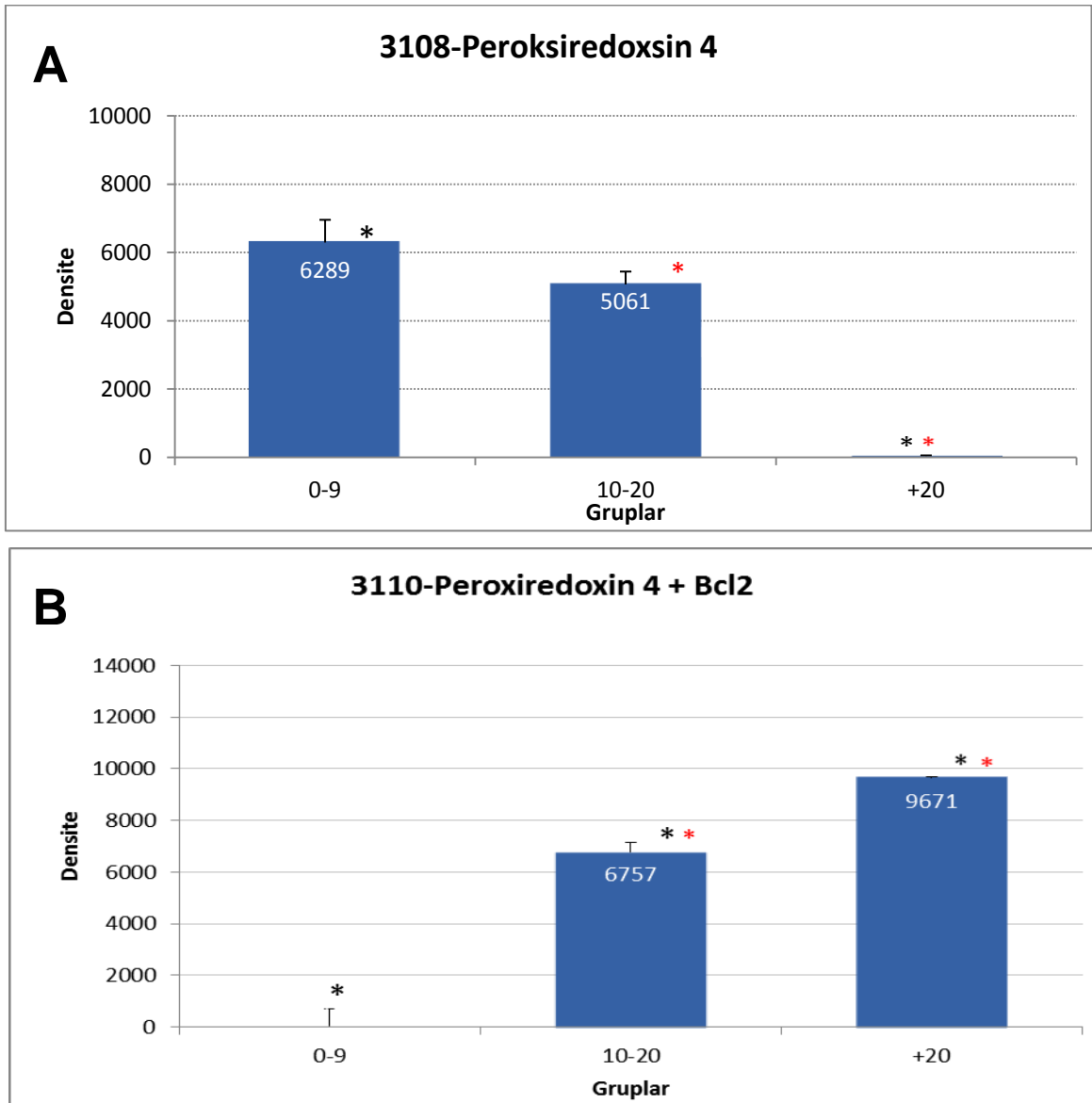
*P< 0.05, *P<0.05

Şekil 6.7. TXNDC5 proteininin gruplara göre densite değerlerinin karşılaştırılması

Peroksiredoksin-4 ve Bcl-2

PRDX4 geninden sentezlenen peroksiredoksin ailesine ait bir proteindir⁸⁰ ve stoplazmada bulunur. Fonksiyonlarından biri hidrojen peroksidi ve alkil hidroperoksidi suya ve alkole indirgemektir⁸¹. Peroksiredoksin-1 ile bağlantısı olduğu bilinmektedir. Temel görevi hücredeki redoks reaksiyonlarını yürütmektir, antioksidan görevi yapmaktadır ve adı ile

ilişkisi buradan gelmektedir. NF-Kappa-B adlı transkripsiyon faktörünün aktive edilmesinde düzenleyici rol oynar. Hücre farklılaşması sırasında geçirilen değişiklikler nedeniyle Endoplazmik retikulumda hidrojenperoksit üretilir. Hücrede peroksit detoksifikasyonu olmadığı zaman hücre ölümü olabileceği bilinmektedir. Peroksiredoksin 4 bu detoksifikasyonu gerçekleştirmektedir. Peroksiredoksin 1 ve 4 aktivitesi ile myelom hücrelerindeki immunoglobulin zinciri sentezi arasında ilişki olduğu bilinmektedir. Multipl Miyelom ve lenfomaya neden olabilecek immunoglobulin zinciri üretiminin peroksiredoksin sentezi kontrolü ile tedavi edilebileceği düşünülmektedir⁸².



*P< 0.05, *P<0.05

Şekil 6.8. A) Peroksiredoksin proteininin gruplara göre densite değerlerinin değişimi, B) Peroksiredoksin ve Bcl-2 proteininin gruplara göre densite değerlerinin değişimi

Apoptosis regulator Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2)

18. kromozonda BCL2 geni tarafından kodlanan bu protein hücre ölümünü düzenleyen BCL2 (B hücresi lenfoma 2) ailesine ait bir düzenleyici proteindir. Bu gen ailesi, 14. ve 18.kromozamlar arasındaki trasnslokasyonunun foliküler lenfoma kanserine neden olması nedeni ile Bcl-2 olarak isimlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, Bcl-2'nin, mitokondri zarı geçirgenliğini düzenleyip Stokrom C'nin sitoplazmaya geçişini azaltarak ve apoptosiz aktivasyon faktörlerine (APAF-1) bağlanıp onları inhibe ederek, apoptozisi (programlanmış hücre ölümü) engellediği gösterilmiştir⁸³. Bcl-2 anti-apoptatik (programlanmış hücre ölümünü engelleyen) bir proteindir. Bcl-2 gen bölgesindeki değişimler, Bcl-2 proteininin ifadesini artırmakta ve programlanmış hücre ölümü baskılanmaktadır. Bu durum akciğer, yumurtalık, deri, prostat, kronik lenfotik lösemi, meme kanseri gibi birçok kanser türünde tanımlanmıştır^{84,85}.

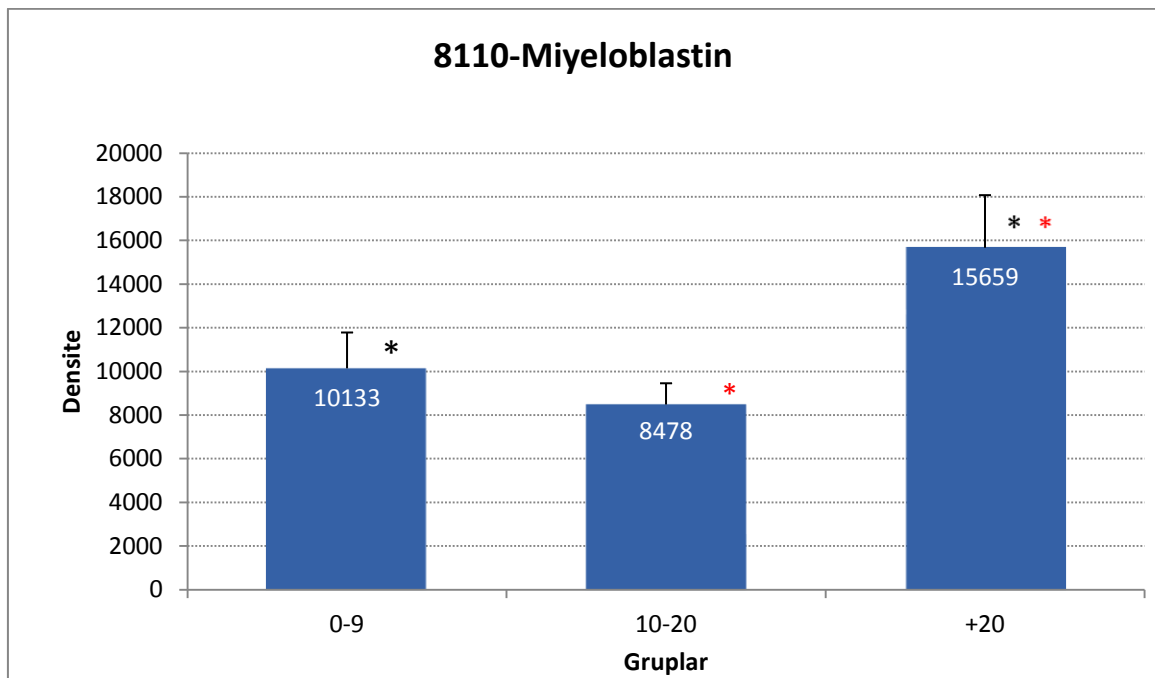
Araştırmamızda hastalık seviyesine bağlı olarak ortaya çıkan ve en ileri seviye kabul edilen +20 grubunda maksimum densiteye ulaşan 3110 numaralı protein kümesinde Bcl-2 tespit edilmiştir(Şekil 6.8B). Bu durum Bcl-2 proteininin hastalığa bağlı olarak ortaya çıktığı ve arttığını göstermektedir. Daha öncede belirtildiği gibi bir çok kanser türünde bu proteinin artışının kanserleşmede önemli rol aldığı bildirilmiştir. Multipl Miyelom kanserinde de böyle bir durumun olması olağandır. Çalışmamızda saptandığı gibi Multipl Miyelom'a bağlı olarak ortaya çıkan ve ifadesi artan Bcl-2 plazma hücrelerinde apoptosizi engeleyerek kanserli hücrelerin hayatta kalmasına neden olmaktadır. Bu protein diğer kanser hastalıklarında olduğu gibi Multipl Miyelom'da da biyobelirteç olarak kullanılabilir, özellikle bu protein artışının inhibe edilmesi kanserin gerilemesine neden olabilecektir. Nitekim Multipl Miyelom ile ilgili çalışmalar 2000'li yıllardan itibaren başlamıştır. Çalışmalarda uygun maddeler ile Bcl-2 ifadesinin artırılmasının ya da inhibe edilmesinin kanser hücrelerinin gelişiminde ve tedaviye yanıtında önemli etkileri olduğu bildirilmiştir^{86,87,88}.

Miyeloblastin, Leukocyte proteinase 3

Lökosit proteinaz 3 ve Nötrofil proteinaz 4 olarak da isimlendirilen bu protein 19.kromozon üzerinde bulunan ve 5 ekzon içeren gen bölgesinden üretilen bir serin proteinazdır. İlk kez insan lösemi hücre hattı olan HL-60(human leukemia cell line HL-60

cell) hücre hattında tanımlanmıştır⁸⁹. Bu enzimle ilgili özellikle myeloid kökenli hücre grupları ile yapılan bir çok araştırma bulunmaktadır.

Kantari ve arkadaşları⁹⁰ (2007) bu proteinin nötrofil azurofilik granüllerinde bulunduğunu, sentezinin artırılarak hücre zarındaki bazı proteinlerle etkileştiğinde hücrenin apoptoze girmesini engellediğini aynı zamanda makrofajların fagositoz yeteneklerini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca bu proteinin ifadesinin artmasının bazı hücre gruplarının farklılaşmasını ve olgunlaşmasını hızlandırdığı da bildirilmiştir^{89,91}. Bunlar dışında interlekin 2 ve 18 proteininin bioaktif forma dönüşmesinde ve TNF- α 'nın ayrılmasında görev aldığını gösteren çalışmalarda vardır^{92,93}.



*P< 0.05, *P<0.05

Şekil 6.9. Myeloblastin proteinin gruplara göre densite değerlerinin değişimi

Bu protein her ne kadar myeloid kökenli hücrelerde tanımlanmış olsa da araştırmamızda Lenfoid kökenli olan plazma hücrelerinde de bu proteinin ifade edildiğini ve ifadesinde +20 grubunda önemli miktarda bir artış olduğunu tespit ettik. Myeloid kökenli hücre kanserlerinde aşırı ifadesinin apoptosizi engellediği, fagositoz yeteneğini düşürdüğü ve farklılaşmayı hızlandırdığı göz önüne alınırsa, plazma hücresi kanserinde de artışının benzer sebeplerle etkili olduğu düşünülebilir. Özellikle kemik iliğinde, B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşması ve kanserleşmiş plazma hücrelerinin diğer immün sistem hücreleri tarafında fagosite edilememesi bu enzimin artışı ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca bu

enzimin indüklediği interlekün ve TNF- α seviyesindeki değişimlerde Multipl Miyelom'da önemli yer tutmaktadır.

6.2 FT-IR

FT-IR ile yapılan idrar analizlerinde gruplar arası çok önemli farklar saptanmıştır. Bu farklılıklar spektrum üzerinde 5 ayrı bölgede gösterilmiştir(Şeki 5.56). Özellikle 1. ve 3.bölgedeki piklerin hastalığa bağlı olarak farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle 1. ve 3. bölge deki(Şekil 5.57 ve 5.58) sinyallerin alan ve intensite farklarına bakılmış ve spektrumlardaki farkların tanıya yönelik olarak kullanılıp kullanılmayacağı ile ilgili yeni bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. 3.bölge Amid I bölgesi olarak bilinir ve bu bölgenin büyük oranda proteinlerin peptit bağında bulunan C=O bağından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Ancak idrarda bu bölgede kristallerin etkisinde olduğu tespit edilmiştir. 3436 ve 1622 piki büyük oranda kalsiyum mono okzalat(COM) kristalinde bulunan C=O bağlarından kaynaklanmaktadır⁹⁴.

Analizlerde klasik yöntemlerden olan bir bölgedeki alan hesaplamaları, ya da sinyal intensitesi değerlerinin diğer gruplar ile karşılaştırılıp farkın bulunması işlemleri yapılmamıştır. Çünkü intensite değerleri tamamen ölçümü yapılan maddenin nemi, miktarı ve yoğunluğu ile ilgilidir. Ölçümü yapılan maddeler tamamen eşit miktarda, eşit nemde ya da eşit konsantrasyon da olmalıdır, en ufak bir fark intensite farkı olarak yansımaktadır ki doğal olarak bu fark analiz sonuçlarında yanlış yönlendirmelere sebep olmaktadır. Bu nedenle bu tür klasik yöntem analizlerinden vazgeçilmiş daha bilimsel bir yöntem uygulanmıştır. Öncelikle grup içinde önemli farklılık gösteren sinyaller birbirine oranlanmış ve daha sonra bu oranların gruplar arası değişimine bakılmıştır ki son zamanlarda literatürde de bu tür çalışmaların olduğu görülmektedir. Oranlama da alan ve intensite değeri olmak üzere iki kriter kullanılmıştır.

Birinci bölgedeki 3436 ve 3341 dalga numaralı piklerin birleşim yerinden yatay olarak geçen çizgi taban olarak kabul edilmiş ve piklerin alanları ile bu taban çizgiden pik tepesine giden yükseklik intensiteleri hesaplanmıştır. Aynı şekilde 3. bölgedeki 1599 ve 1624 dalga sayılı piklerinde benzer şekilde alan yükseklik intensiteleri hesaplanmıştır(Çizelge 5.3 ve 5.4). Daha sonra birinci bölgedeki pikler 3436/3341 ve üçüncü bölgedeki pikler ise 1599/1624 olacak şekilde oranlanmış, oran alan ve intensite

değerleri ayrı ayrı belirlenerek gruplara göre değişimleri saptanmıştır(Çizelge 5.5 ve 5.6). Son olarak Çizelge 5.7'da bu oranlar ile oluşturulmuş tanı aralıkları verilmiştir. Bu aralıklar grupların intensite oranlarının birbirine uzaklığının aritmetik ortalaması alınarak oluşturulmuştur. Belirlenen bu tanı aralıklarına göre kör olarak çalışılan 3 örnek tanımlanmaya çalışılmıştır.

Kör olarak çalışılan örneklerin sinyal intensite ve alan oranları belirlenmiş hangi grup aralıklarına girdikleri saptanmıştır(Çizelge 5.8 ve 5.9) . 49 numaralı örnek hem alan, hemde intensite aralığına göre Multipl Miyelom olarak gözükmektedir. 50 numaralı örnek ise 1.bölge sinyal oranlarına göre MGUS, 3.bölge sinyal oranlarına göre kontrol kriterlerine uymaktadır. Son olarak 66 numaralı örnek ise sağlıklı birey olarak tespit edilmiştir. Hastaların örnek alım tarihindeki gerçek tanıları Çizelge 5.10'da belirtilmiştir. Her 3 hastanın durumunda doğru olarak teşhis edilebilmiştir. Özellikle 66 numaralı örnek hangi aşamada olduğu bilgisi verilmeyen hasta olarak gönderildiği halde kontrol yani sağlıklı birey olarak tespit edilmiştir. Aslında bireyin iyileştiği bir remisyon döneminde olduğu daha sonradan bildirilmiştir. Bu durum bu tanı yönteminin kullanılabilirliğini göstermektedir. Ancak doğal olarak birkaç örnek ile yapılan denemeler yetersizdir, çok daha fazla örnek sayısı tekrarlanması gerekmektedir. Araştırma genişletilerek devam etmektedir.

Çalışmada belirlenen bu tanı aralıklarının hastalık seyrinde de başarılı olup olmadığı 2 ayrı hastanın farklı zamanda alınan örnekleri ile test edilmiştir. Yöntemin hastalığın seyri ile ilgili bilgi verip vermeyeceğini kontrol etmek için 03 ve 10 numaralı örnekler kullanılmıştır. Bu örneklerin geliş tarihlerine göre oluşturulmuş genel spectrum karşılaştırmaları ve sinyal oranları yöntemi ile teşhisleri Şekil 5.59 ve 5.60'da verilmiştir. Kesin tanısı MGUS olan 10 numaralı örnek düzenli aralıklarla kontrol edilmektedir. Çalışma da ilk analiz edilen 10 numaralı örneğin (kasım ayı örneği) SMM kriterlerine uyduğu saptanmıştır. Daha sonra alınan aynı hastaya ait ikinci numunenin(nisan ayı örneği) sinyal oranları ise MM kriterleri içinde bulunmuştur. Her iki durumda da bu çalışmada belirlenen yöntemin tanısının, kesin tanıya uymadığı düşünülmüştür. Ancak yakın zamanda hastanın artık SMM olarak izlenmeye başlandığı bildirilmiştir ki bu durum yöntemin aylar önceden hastalık seyrini bildirme ihtimalinin olduğunu düşündürmektedir. Benzer bir tanı karşılaştırması 03 kodlu örneklerde de yapılmıştır. Aynı hastadan 3 farklı zamanda alınmış idrar örneklerinin FT-IR genel spektrum karşılaştırmaları da Şekil

5.60'da verilmiştir. Aralık 2011 sonunda yeni tanı olarak bildirilen ve ilk örneğinin analizi uyumlu sonuç veren bu hastanın, yaklaşık ikişer ay ara ile alınan ikinci örneğinde sağlıklı birey kriterlerine uyduğu, sonraki örnekte ise tekrar MM durumuna döndüğü belirlenmiştir. Bu durum hastanın tedaviye hızlı yanıt verdiğini göstermektedir. Hastane verilerine göre ise hasta tedaviye yanıt vermiş ancak kısmi bir iyileşme görülmüş ve sonrada otolog kemik iliği nakli yapılmıştır.

FTIR çalışmasında idrar dışında serum örnekleri analizi de yapılmıştır. Serum çalışmalarında grupların spektrumları benzer bulunmuştur (Şekil 5.54), sadece Amid I bölgesinin (1700-1600 cm⁻¹) alt yapı analizi sonucu protein ikincil yapılarında değişiklik saptanmıştır. İkincil yapılar ve ilgili sinyaller(pik, bant) Şekil 5.55'te verilmiştir. Amid I bölgesi canlı materyallerde büyük oranda proteinlerden kaynaklanan sinyalleri ifade eder ve proteinlerin peptid bağında bulunan C=O bağından kaynaklanır. Bu bölgedeki altyapıların neleri ifade ettikleri ise Çizelge 5.2'de verilmiştir ve görüldüğü gibi alfa sarmal yapıdan random koil(rastgele-düzensiz) yapı ve beta yaprak yapıya bir kayma gözlenmektedir. Bu durum monoklonal protein ifadesini bir göstergesi olabilir. Normal plazma hücreleri bağışıklık sisteminde rol oynayan düşük molekül ağırlık çok farklı sayıda protein (antikor) salgırlar, ancak kanserleşmiş olanlarda genelde tektip bir protein yoğun olarak salgılanır. Multipl Miyelom'un en önemli belirtilerinden biri monoklonal proteinler, paraprotein, bence jones proteinleri gibi değişik isimlerde alabilirler. Bu proteinlerin altyapılarında beta yaprak ve rastgele sarım yapısının önemli yer tuttuğu bilinmektedir. Çalışmadaki betayaprak ve rondon koil yapıdaki artma bu durumun göstergesi olarak ifade edilebilir.

Araştırmada, idrar ve serum örnekleri kullanılarak FT-IR cihazında MM tanısının konulabilme olasılığının varlığını göstermektedir. Özellikle serum örnekleri çalışmasındaki betayaprak ve rastgele sarım yapısının artması monoklonal protein ifadesinin artışını göstermektedir ve bu özelliği ile önemli bir biyobelirteç olmaya adaydır. Ancak tez kapsamında yapılan çalışmalar içerdiği birey sayısı açısından sadece bir önçalışma niteliğindedir ve yöntemin gerçek anlamda sınanması için yüzlerce örneğe ihtiyaç duyulmaktadır.

6.3 Tartışma ve Sonuç Özet

Proteomik çalışmalarda hastalığa bağlı olarak tespit edilen proteinlerin büyük kısmı şaperon özellikte olup ER stresi ile ilişkilidir ve aynı zamanda apoptosiz yolunu inhibe edici özellikleri de bulunmaktadır (Çizelge 6.1). Bu açıdan ileride tanı ve tedavide hedef protein konumunda olabileceklerdir.

Çizelge 6.1. Tespit edilen proteinlerin fonksiyonları ve buldukları kümelerin densite değişimleri⁹⁵

Protein	Kromozom	Fonksiyonları				
		Protein katlanması, şaperon	Apoptotik yol	Oksidoreduktaz	Ca ⁺² Regülasyonu	Hücre çoğalması ve farklılaşması
Kalretikulin	19p13.2	+			+	+
PD1A1	17q25.3	+				
Endoplazmin	12q23.3	+	+		+	
MZB1	5q31.2	+	+	+	+	+
Aktin	7p22.1					+
TXND5	6p24.3		+	+		
Peroksiredoksin -4	Xp22.11			+		
Apoptosiz regülatör Bcl-2	18q21.33		+		+	+
Miyeloblastin	19p13.3					+

Endoplazmik retikulumun en önemli görevi proteinlerin doğru katlanmasının sağlanmasıdır. Plazma hücreleri gibi çok miktarda protein sentezleyen hücrelerde özellikle ER kapasitesini aşan miktarlarda protein sentezlenmesi lümende katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimini artırmaktadır ve bu durum ER stresi olarak isimlendirilmektedir. ER stresi hücre içerisinde oluştuktan sonra hücrenin hayati fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için katlanmamış protein cevabı (UPR) adı verilen sinyal yolları devreye girmektedir. Bu sinyal yollarının Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF6), inozitol gerektiren

kinaz 1 (IRE1) yollarıdır. Bu üç yolak ER stresini engellemekte yetersiz kalır ise normal olarak hücre apoptoza girmektedir. Ancak kanser hücreleri bir şekilde ER stresinin üstesinden gelmekte ve apoptotik yolun çalışmasını engellemektedir. Çalışmada tespit edilen proteinlerin çoğunluğunun protein katlanmasında ve apoptozisin engellenmesinde rol olması, kanserleşmiş plazma hücrelerinin bu proteinlerin sentezini regüle ederek ER stresinin üstesinden geldiğini ve apoptoza gitmekten kurtulduğunu göstermektedir. Özellikle MZB1 proteini Multipl Miyelom'da hayatsal bir rol almaktadır. B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşümü, kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesi, adhezyon proteinlerinin ifadesinin artışı, immünooglobulinlerin sentezi ve sekresyonu, apoptozisin inhibasyonu gibi tüm kritik olgularda rol almaktadır. Bunun dışında diğer bir kanser belirteci olan Bcl-2'nin Multipl Miyelom'da artış gösterdiğini tespit edilmiştir. Bu protein apoptozisi engellemedeki rolü nedeni ile zaten Multipl Miyelom'unda dahil olduğu bir çok kanser türünde tedaviye yönelik araştırmalarda hedef proteindir.

Araştırmanın FT-IR aşamasında da hızlı ve ucuz bir tanı yöntemi olarak kullanılabilir belirteç ve yöntemler tanımlanmaya çalışıldı. Serum örneklerinde protein alt yapılarından betayaprak ve rastgele sarım yapısının arttığı tespit edildi. Bu bölge kandaki monoklonal protein artışını göstermektedir ve monoklonal protein ifadesinin olduğu hastalarda tanıya yönelik kullanılabilir. İdrarda ise özellikle kalsiyum artışına bağlı olarak oluşan sinyallerin tanıya yönelik kullanılabilirliği gösterildi.

Araştırmanın sonuçları aşağıda özet olarak sıralanmıştır.

- ✓ MM hastalığı ile ilgili proteomik çalışmalar da kullanılacak yeni yöntemler geliştirildi
- ✓ Türkiye'deki MM hastalarının plazma hücrelerine ait protein profilleri belirlendi
- ✓ Multipl Miyelom hastalığının tanısı, gelişimi ve tedavisinde biyobelirteç olarak rol oynayabilecek 9 tane protein tanımlandı
- ✓ FTIR tekniği, ilk defa bu kadar geniş ölçekli olarak MM kanserinin incelenmesinde kullanıldı ve tanıda kullanılmaya aday biyobelirteç ve yöntemler tespit edildi.

KAYNAKLAR

1. Multiple Myeloma Research Foundation. Living with Multiple Myeloma. What is the Multiple Myeloma? 25.02.2013. <http://www.themmr.org/living-with-multiple-myeloma/newly-diagnosed-patients/what-is-multiple-myeloma>.
2. National Cancer Institute. Cancer topics. All cancer types. Multiple Myeloma/Plasma Cell Neoplasm. Patient. 18.02.2013. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/myeloma/patient>.
3. Collins CD. Problems monitoring response in multiple myeloma. *Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society*. 2005;5 Spec No A:S119-126.
4. American Cancer Society. Cancer. Multiple Myeloma. 18.02.2013. <http://www.cancer.org/cancer/multiplemyeloma/detailedguide/multiple-myeloma>.
5. Durie BGM. *Concise Review of the Disease and Treatment Options Multiple Myeloma, published by International Myeloma Foundation*. 2011/2012 ed. 12650 Riverside Drive Suite 207 North Hollywood.
6. Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*. Dec 2009;84(12):1095-1110.
7. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. Sep 1975;36(3):842-854.
8. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The New England journal of medicine*. Feb 21 2002;346(8):564-569.
9. Lee WJ, Hoppin JA, Blair A, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to alachlor in the Agricultural Health Study. *American journal of epidemiology*. Feb 15 2004;159(4):373-380.
10. Mahindra A, Hideshima T, Anderson KC. Multiple myeloma: biology of the disease. *Blood reviews*. Nov 2010;24 Suppl 1:S5-11.
11. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiation research*. Feb 1994;137(2 Suppl):S68-97.
12. Bourguet CC, Grufferman S, Delzell E, DeLong ER, Cohen HJ. Multiple myeloma and family history of cancer. A case-control study. *Cancer*. Oct 15 1985;56(8):2133-2139.
13. Edwards CM, Zhuang J, Mundy GR. The pathogenesis of the bone disease of multiple myeloma. *Bone*. Jun 2008;42(6):1007-1013.
14. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. April 25 1953;17:737-738.
15. Human Genome Project Information. What is the Human Genome Project? 27. 02. 2013. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/about.shtml.
16. Stein LD. Human genome: end of the beginning. *Nature*. Oct 21 2004;431(7011):915-916.
17. Hollon T. Human Genes: How Many? . *TheScientist*. Vol 152001:1.
18. Akbaba G. Prof. Dr. Ali Denizli Anlatıyor. *Bilim ve Teknik Dergisi*. Vol Temmuz2007:66-68.

19. Canas B, Lopez-Ferrer D, Ramos-Fernandez A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in functional genomics & proteomics*. Feb 2006;4(4):295-320.
20. The University of Bristol SoC. Mass Spectrometry Resource. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI). 10.08.2013. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/maldi-ionisation.html>
21. Lu CH GF, Liu Z, Li R, Xiao CL, Zeng HL, Lu XP, and He QY. Detection of Abundant Proteins in Multiple Myeloma Cells by Proteomics. *Journal of Proteomics&Bioinformatics*. 2010;3:5-9.
22. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet*. Jul 25 2009;374(9686):324-339.
23. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. Oct 28 2004;351(18):1860-1873.
24. Cohen HJ, Crawford J, Rao MK, Pieper CF, Currie MS. Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly. *The American journal of medicine*. May 1998;104(5):439-444.
25. Malpas JS BD, Kyle R, Anderson K. . *Myeloma: Biology and Management* 3ed. Oxford: Elsevier; 2004.
26. Munshi NC. Plasma cell disorders: an historical perspective. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. 2008:297.
27. Zhou Y, Chen L, Barlogie B, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Apr 27 2010;107(17):7904-7909.
28. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*. Jan 2003;78(1):21-33.
29. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature reviews. Cancer*. Mar 2002;2(3):175-187.
30. Rajkumar SV, Dispenzieri A, Fonseca R, et al. Thalidomide for previously untreated indolent or smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. Aug 2001;15(8):1274-1276.
31. Brown LM, Linet MS, Greenberg RS, et al. Multiple myeloma and family history of cancer among blacks and whites in the U.S. *Cancer*. Jun 1 1999;85(11):2385-2390.
32. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Sep 20 2009;27(27):4585-4590.
33. O'Neal J, Gao F, Hassan A, et al. Neurobeachin (NBEA) is a target of recurrent interstitial deletions at 13q13 in patients with MGUS and multiple myeloma. *Experimental hematology*. Feb 2009;37(2):234-244.
34. Moreau P, Coiteux V, Hulin C, et al. Prospective comparison of subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with multiple myeloma. *Haematologica*. Dec 2008;93(12):1908-1911.
35. Berenson JR, Jagannath S, Barlogie B, et al. Safety of prolonged therapy with bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *Cancer*. Nov 15 2005;104(10):2141-2148.

36. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England journal of medicine*. Jun 26 2003;348(26):2609-2617.
37. Palumbo A, Facon T, Sonneveld P, et al. Thalidomide for treatment of multiple myeloma: 10 years later. *Blood*. Apr 15 2008;111(8):3968-3977.
38. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. Nov 22 2007;357(21):2123-2132.
39. Weber DM, Chen C, Niesvizky R, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *The New England journal of medicine*. Nov 22 2007;357(21):2133-2142.
40. Azais I, Brault R, Debiais F. New treatments for myeloma. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. Jan 2010;77(1):20-26.
41. Roussel M, Moreau P, Huynh A, et al. Bortezomib and high-dose melphalan as conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with de novo multiple myeloma: a phase 2 study of the Intergroupe Francophone du Myelome (IFM). *Blood*. Jan 7 2010;115(1):32-37.
42. Cavo M, Tosi P, Zamagni E, et al. Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Jun 10 2007;25(17):2434-2441.
43. Boyd RS, Dyer MJ, Cain K. Proteomic analysis of B-cell malignancies. *Journal of proteomics*. Sep 10 2010;73(10):1804-1822.
44. Kolialexi A, Anagnostopoulos AK, Mavrou A, Tsangaris GT. Application of proteomics for diagnosis of fetal aneuploidies and pregnancy complications. *Journal of proteomics*. Jul 21 2009;72(5):731-739.
45. Micallef J, Dharsee M, Chen J, et al. Applying mass spectrometry based proteomic technology to advance the understanding of multiple myeloma. *Journal of hematology & oncology*. 2010;3:13.
46. Ideker T, Thorsson V, Ranish JA, et al. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*. May 4 2001;292(5518):929-934.
47. Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*. Mar-Apr 1997;18(3-4):533-537.
48. Wang QT, Li YZ, Liang YF, et al. Construction of a multiple myeloma diagnostic model by magnetic bead-based MALDI-TOF mass spectrometry of serum and pattern recognition software. *Anatomical record*. Apr 2009;292(4):604-610.
49. Bhattacharyya S, Epstein J, Suva LJ. Biomarkers that discriminate multiple myeloma patients with or without skeletal involvement detected using SELDI-TOF mass spectrometry and statistical and machine learning tools. *Disease markers*. 2006;22(4):245-255.
50. Wood BR, Chiriboga L, Yee H, Quinn MA, McNaughton D, Diem M. Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium. *Gynecologic oncology*. Apr 2004;93(1):59-68.
51. Lasch P HW, Lewis N, Kidder LH, Naumann D. . Characterization of colorectal adenocarcinoma sections by spatially resolved FT-IR microspectroscopy *Appl Spectrosc*. 2002;48:1-10.

52. Gazi E, Baker M, Dwyer J, et al. A correlation of FTIR spectra derived from prostate cancer biopsies with gleason grade and tumour stage. *European urology*. Oct 2006;50(4):750-760; discussion 760-751.
53. Sankari G AT, Gunasekaran S, Surapaneni KM. Analysis of Multiple Myeloma by FTIR Spectroscopy Coupled with Statistical Analysis *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2011;5(5):1001-1007.
54. Zhou P, Teruya-Feldstein J, Lu P, Fleisher M, Olshen A, Comenzo RL. Calreticulin expression in the clonal plasma cells of patients with systemic light-chain (AL-) amyloidosis is associated with response to high-dose melphalan. *Blood*. Jan 15 2008;111(2):549-557.
55. Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiological reviews*. Oct 2007;87(4):1377-1408.
56. Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *International review of cytology*. 2005;245:91-121.
57. Ö. Y. Glikoproteinler ve biyomedikal önemi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*. 2001;21(6):517-522.
58. Ünibol SA UH. Glikoproteinlerin yapısı ve özellikleri. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.* . 2010;24(2):107 - 114.
59. Lumb RA, Bulleid NJ. Is protein disulfide isomerase a redox-dependent molecular chaperone? *The EMBO journal*. Dec 16 2002;21(24):6763-6770.
60. Ko HS, Uehara T, Nomura Y. Role of ubiquilin associated with protein-disulfide isomerase in the endoplasmic reticulum in stress-induced apoptotic cell death. *The Journal of biological chemistry*. Sep 20 2002;277(38):35386-35392.
61. Fenouillet E, Barbouche R, Courageot J, Miquelis R. The catalytic activity of protein disulfide isomerase is involved in human immunodeficiency virus envelope-mediated membrane fusion after CD4 cell binding. *The Journal of infectious diseases*. Mar 1 2001;183(5):744-752.
62. Mezghrani A, Courageot J, Mani JC, Pugniere M, Bastiani P, Miquelis R. Protein-disulfide isomerase (PDI) in FRTL5 cells. pH-dependent thyroglobulin/PDI interactions determine a novel PDI function in the post-endoplasmic reticulum of thyrocytes. *The Journal of biological chemistry*. Jan 21 2000;275(3):1920-1929.
63. Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes Dde C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free radical biology & medicine*. May 1 2012;52(9):1954-1969.
64. Li Z, Srivastava PK. Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *The EMBO journal*. Aug 1993;12(8):3143-3151.
65. Peibin Y, Shude Y, Changzhi H. Heat shock protein gp96 and cancer immunotherapy. *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences*. Dec 2002;17(4):251-256.
66. Pawaria S, Messmer MN, Zhou YJ, Binder RJ. A role for the heat shock protein-CD91 axis in the initiation of immune responses to tumors. *Immunologic research*. Aug 2011;50(2-3):255-260.
67. Binder RJ, Zhou YJ, Messmer MN, Pawaria S. CD91-Dependent Modulation of Immune Responses by Heat Shock Proteins: A Role in Autoimmunity. *Autoimmune diseases*. 2012;2012:863041.

68. Shimizu Y, Meunier L, Hendershot LM. pERp1 is significantly up-regulated during plasma cell differentiation and contributes to the oxidative folding of immunoglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Oct 6 2009;106(40):17013-17018.
69. Bonfoco E, Li E, Kolbinger F, Cooper NR. Characterization of a novel proapoptotic caspase-2- and caspase-9-binding protein. *The Journal of biological chemistry*. Aug 3 2001;276(31):29242-29250.
70. Zhang H, Chen X, Sairam MR. Novel hormone-regulated genes in visceral adipose tissue: cloning and identification of proinflammatory cytokine-like mouse and human MEDA-7: implications for obesity, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Diabetologia*. Sep 2011;54(9):2368-2380.
71. Flach H, Rosenbaum M, Duchniewicz M, et al. Mzb1 protein regulates calcium homeostasis, antibody secretion, and integrin activation in innate-like B cells. *Immunity*. Nov 24 2010;33(5):723-735.
72. Herold T, Mulaw MA, Jurinovic V, et al. High expression of MZB1 predicts adverse prognosis in chronic lymphocytic leukemia, follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma and is associated with a unique gene expression signature. *Leukemia & lymphoma*. Aug 2013;54(8):1652-1657.
73. Hanukoglu I, Tanese N, Fuchs E. Complementary DNA sequence of a human cytoplasmic actin. Interspecies divergence of 3' non-coding regions. *Journal of molecular biology*. Feb 5 1983;163(4):673-678.
74. Dugina V, Zwaenepoel I, Gabbiani G, Clement S, Chaponnier C. Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *Journal of cell science*. Aug 15 2009;122(Pt 16):2980-2988.
75. Lammermann T, Sixt M. Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Current opinion in cell biology*. Oct 2009;21(5):636-644.
76. Peckham M, Miller G, Wells C, Zicha D, Dunn GA. Specific changes to the mechanism of cell locomotion induced by overexpression of beta-actin. *Journal of cell science*. Apr 2001;114(Pt 7):1367-1377.
77. Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM. beta-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular biology of the cell*. Nov 2011;22(21):4047-4058.
78. Vincent EE, Elder DJ, Phillips L, et al. Overexpression of the TXNDC5 protein in non-small cell lung carcinoma. *Anticancer research*. May 2011;31(5):1577-1582.
79. Sullivan DC, Huminiecki L, Moore JW, et al. EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. *The Journal of biological chemistry*. Nov 21 2003;278(47):47079-47088.
80. Jin DY, Chae HZ, Rhee SG, Jeang KT. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry*. Dec 5 1997;272(49):30952-30961.
81. Sasagawa I, Matsuki S, Suzuki Y, et al. Possible involvement of the membrane-bound form of peroxiredoxin 4 in acrosome formation during spermiogenesis of rats. *European journal of biochemistry / FEBS*. May 2001;268(10):3053-3061.
82. Demasi AP, Martinez EF, Napimoga MH, et al. Expression of peroxiredoxins I and IV in multiple myeloma: association with immunoglobulin accumulation. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. Jul 2013;463(1):47-55.

83. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell*. Jun 20 2008;30(6):678-688.
84. Real PJ, Cao Y, Wang R, et al. Breast cancer cells can evade apoptosis-mediated selective killing by a novel small molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer research*. Nov 1 2004;64(21):7947-7953.
85. Hsu SY, Lin P, Hsueh AJ. BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Molecular endocrinology*. Sep 1998;12(9):1432-1440.
86. van de Donk NW, Bloem AC, van der Spek E, Lokhorst HM. New treatment strategies for multiple myeloma by targeting BCL-2 and the mevalonate pathway. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(3):327-340.
87. Chanan-Khan AA. Bcl-2 antisense therapy in multiple myeloma. *Oncology*. Nov 2004;18(13 Suppl 10):21-24.
88. Jourdan M, De Vos J, Mechti N, Klein B. Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1. *Cell death and differentiation*. Dec 2000;7(12):1244-1252.
89. Bories D, Raynal MC, Solomon DH, Darzynkiewicz Z, Cayre YE. Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cell*. Dec 22 1989;59(6):959-968.
90. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Amir-Moazami O, et al. Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis. *Blood*. Dec 1 2007;110(12):4086-4095.
91. Csernok E, Ai M, Gross WL, et al. Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood*. Jun 1 2006;107(11):4440-4448.
92. Sugawara S, Uehara A, Nochi T, et al. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *Journal of immunology*. Dec 1 2001;167(11):6568-6575.
93. Armstrong L, Godinho SI, Uppington KM, Whittington HA, Millar AB. Contribution of TNF-alpha converting enzyme and proteinase-3 to TNF-alpha processing in human alveolar macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. Feb 2006;34(2):219-225.
94. Deng F, Ouyang J-M. Comparative investigations of ultrafine crystals in urine of healthy human and lithogenic patients. *Materials Science and Engineering: C*. 5// 2006;26(4):688-691.
95. Nextprot, Exploring the universe of human proteins, 10.08.2013. <http://www.nextprot.org/>

EKLER

EK 1 Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu Değerlendirme Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEğERLENDİRME KURULU DEğERLENDİRME FORMU

DEğERLENDİRME KURULUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/Ankara
TELEFON	0312 310 30 10/227
FAKS	0312 310 63 70
E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Multiple miyeloma (Plazma hücre kanseri)'nin spektrometrik ve spektroskopik yöntemler ile araştırılması		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI			
	SORUMLU ARAŐTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Uz.Dr.Klara Dalva Sabah		
	KOORDİNATORÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Hematoloji		
	KOORDİNATORÜN UZMANLIK ALANI			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ			
	BAŐVURULAN DEğERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input checked="" type="checkbox"/>		
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
	FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
	FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
	BE/BY	<input type="checkbox"/>		
	DİğER	<input type="checkbox"/>	Diğer ise belirtiniz:	
ARAŞTIRMA MERKEZLERİ	İLAC DİŐİ ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/>	Belirtiniz:		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEğERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	06.12.2010	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŐURÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	06.12.2010	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

DEğERLENDİRİLEN DİğER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>	
	İLAN	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
	DİğER	<input type="checkbox"/>	

Hasan AYNA
C.Ü. Tıp Fakültesi
Etik Kurul Üyesi
28 Nisan 2009

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:20-411	Tarih: 13 Aralık 2010
	Uz.Dr.Klara Dalva Sabah'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu dikkate alınarak incelenmiş, bütçesi temin edildiği takdirde çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

DEĞERLENDİRME KURULU BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu ve SOP
DEĞERLENDİRME KURULU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ	
DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Mehmet Melli	Tıbbi Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>M. Melli</i>
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbi Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>A. Demirkazık</i>
Prof.Dr.Ajlan Tükün	Tıbbi Genetik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>A. Tükün</i>
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Derste
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbi Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>H. Öztürk</i>
Prof.Dr.H.Serap Sivri	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Derste
Prof.Dr.Muharrem Özen	Avukat- Öğr.Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Derste
Prof.Dr.Banu Çakır	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>B. Çakır</i>
Öğr.Gör.Dr.Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>V. Kavas</i>
Gülsüm Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli	-----	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>G. Aslan</i>

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

Hasan UNK
A. Ü. Tıp Fakültesi
dari Personel Bürosu Şefi
20 Aralık 2010

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Beycan AYHAN
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 12.09.1970
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Altındağ Yıldırım Bayezıt Lisesi (1984-1987)
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji (1999-2003)

İş Tecrübesi

Kurumu	Görevi	Yılları
Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü,	Yüksek Lisans Doktora	2003-2006 2007-2013

Yayımlar

Ayhan B, Ekmekçi Y, and Tanyolaç D. Preliminary Studies on Maize (*Zea mays* L.) Cultivars Exposed to Cadmium Stres at Seedling Stage, II. International Environmental Protection Symposium. Kütahya, Turkey, 2005 September 8-10 (Poster).

Ayhan B. Mısır (*Zea mays*)'ın Bazı Çeşitlerinde Ağır Metal (Cd+2, Pb+2) Stresinin Etkilerinin Belirlenmesi, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006, YL 3719.

Ayhan B, Ekmekçi Y, and Tanyolaç D. Bitkilerde Ağır Metal Zararları ve Korunma Mekanizmaları. *Anadolu Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2006,1(7), 1-16

Ayhan B, Ekmekçi Y, and Tanyolaç D. Erken Fide Evresindeki Bazı Mısır Çeşitlerinin Ağır Metal (Kadmiyum & Kurşun) Stresine Karşı Dayanıklılığının Araştırılması. *Anadolu Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 2007, 8(2) : 411-422.

Ekmekçi Y, Tanyolaç D, and Ayhan B. Effect of Cadmium on Antioxidant Enzyme and Photosynthetic Activities in Leaves of Two Maize Cultivars. *J. Plant Physiol.* 2008,165/6, p:600-611.

Ekmekçi Y, Tanyolaç D, and Ayhan B. A crop tolerating oxidative stress induced by excess lead: maize. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2009, 31,(2): 319-330

Özel-Demiralp D, İgci N, Ayhan B, Eğin Y, Haznedaroğlu İC, Akar N. Pro-Hemostatic and Anti-Thrombin Activities of Ankaferd Hemostat Are Linked to Fibrinogen Gamma Chain and Prothrombin by Functional Proteomic Analyses. *Clinical and Applied Thrombosis and Hemostasis*. 2011, DOI: 10.1177/1076029612436672

Özel-Demiralp D, İgci N, Ayhan B, Eğin Y, Haznedaroğlu İ, Akar N. Fonksiyonel Proteomik Analizlerle Ankaferd Kanama Durdurucunun Pro-Hemostatik ve Anti-Trombin Aktivitesinin Fibrinojen Gama Zinciri ve Protrombin ile İlişkilendirilmesi. 37. Ulusal Hematoloji Kongresi. 19-22 Ekim 2011, Ankara Sheraton Otel, Ankara, 37. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı, p. 60, Türk Hematoloji Derneği. (poster sunumu)

İgci N, Özel Demiralp D, Ayhan B, Akgüç N, Çöl B. Preliminary Proteomic Analysis of *Bacillus boroniphilus* and Analysis of a Protein Spot by MALDI-TOF Mass Spectrometry. The International Congress on Bioinformatics and Biomics (ICBB-2011). 2011 May; 18-22. Pine Bay Holiday Resort, Kuşadası/Turkey (Poster).

B Ayhan, K Dalva, S İpek, D Ozu, A Ugurbilgin, M Ozen, D Ozel Demiralp, M Beksac, A Fourier Transform Infrared Spectroscopic Investigations on The Molecular Profiling of Multiple Myeloma, 17th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam. The Netherlands, 2012, abstract no: 489, p:591-592

Beycan Ayhan, Klara Dalva, Duygu Özel Demiralp, Meral Beksaç, Multipl Meylom'un Teşhis, Tedavi ve Prognozunda Kullanılabilir Biyobelirteçlerin Metabolomik ve Proteomik Tabanlı Yöntemler İle Araştırılması, 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2012, abstract no: 0270, s:35-36 (Sözlü sunum)

SCI'da Yer Alan Makaleler:

Ekmekçi Y, Tanyolaç D, and Ayhan B. Effect of Cadmium on Antioxidant Enzyme and Photosynthetic Activities in Leaves of Two Maize Cultivars. *J. Plant Physiol*. 2008,165/6, p:600-611.

Ekmekçi Y, Tanyolaç D, and Ayhan B. A crop tolerating oxidative stress induced by excess lead: maize. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2009, 31,(2): 319-330

Özel-Demiralp D, İgci N, Ayhan B, Eğin Y, Haznedaroğlu İC, Akar N. Pro-Hemostatic and Anti-Thrombin Activities of Ankaferd Hemostat Are Linked to Fibrinogen Gamma Chain and Prothrombin by Functional Proteomic Analyses. *Clinical and Applied Thrombosis and Hemostasis*. 2011, DOI: 10.1177/1076029612436672

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

Ayhan B, Ekmekçi Y, and Tanyolaç D. Bitkilerde Ağır Metal Zararları ve Korunma Mekanizmaları. *Anadolu Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2006,1(7), 1-16

Ayhan B, Ekmekçi Y, and Tanyolaç D. Erken Fide Evresindeki Bazı Mısır Çeşitlerinin Ağır Metal (Kadminyum & Kurşun) Stresine Karşı Dayanıklılığının Araştırılması. Anadolu Üniversitesi, *Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 2007, 8(2) : 411-422.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Ayhan B, Ekmekçi Y, and Tanyolaç D. Preliminary Studies on Maize (*Zea mays* L.) Cultivars Exposed to Cadmium Stres at Seedling Stage, II. International Environmental Protection Symposium. Kütahya, Turkey, 2005 September 8-10 (Poster).

İgci N, Özel Demiralp D, Ayhan B, Akgüç N, Çöl B. Preliminary Proteomic Analysis of *Bacillus boroniphilus* and Analysis of a Protein Spot by MALDI-TOF Mass Spectrometry. The International Congress on Bioinformatics and Biomics (ICBB-2011). 2011 May; 18-22. Pine Bay Holiday Resort, Kuşadası/Turkey (Poster).

B Ayhan, K Dalva, S İpek, D Ozu, A Ugurbilgin, M Ozen, D Ozel Demiralp, M Beksac, A Fourier Transform Infrared Spectroscopic Investigations on The Molecular Profiling of Multiple Myeloma, 17th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam. The Netherlands, 2012, abstract no: 489, p:591-592

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Özel-Demiralp D, İgci N, Ayhan B, Eğin Y, Haznedaroğlu İ, Akar N. Fonksiyonel Proteomik Analizlerle Ankaferd Kanama Durdurucunun Pro-Hemostatik ve Anti-Trombin Aktivitesinin Fibrinojen Gama Zinciri ve Protrombin ile İlişkilendirilmesi. 37. Ulusal Hematoloji Kongresi. 19-22 Ekim 2011, Ankara Sheraton Otel, Ankara, 37. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı, p. 60, Türk Hematoloji Derneği (Poster).

Beycan Ayhan, Klara Dalva, Duygu Özel Demiralp, Meral Beksac, Multipl Meylom'un Teşhis, Tedavi ve Prognozunda Kullanılabilir Biyobelirteçlerin Metabolomik ve Proteomik Tabanlı Yöntemler İle Araştırılması, 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2012, abstract no: 0270, s:35-36 (Sözlü sunum)

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

1. B Ayhan, K Dalva, S İpek, D Ozu, A Ugurbilgin, M Ozen, D Ozel Demiralp, M Beksac, A Fourier Transform Infrared Spectroscopic Investigations on The Molecular Profiling of Multiple Myeloma, 17th Congress of the European Hematology Asscociation, Amsterdam. The Netherlands, 2012, abstract no: 489, p:591-592

2. Beycan Ayhan, Klara Dalva, Duygu Özel Demiralp, Meral Beksac, Multipl Meylom'un Teşhis, Tedavi ve Prognozunda Kullanılabilir Biyobelirteçlerin Metabolomik ve Proteomik Tabanlı Yöntemler İle Araştırılması, 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2012, abstract no: 0270, s:35-36 (Sözlü sunum)

dose-dependent manner in both MS-5 and BMSCs, as analyzed by Western blotting and confirmed by measuring SDF-1 concentrations in the 3-day culture supernatants of the cells. In line with these results, the supernatants from bortezomib-treated MS-5 cells induced MO7e cell chemotaxis to a much lower extent compared with non-treated cells. MS-5 cell monolayers were treated with bortezomib for 24 h, washed, and then overlaid with RPMI8226 cells. The migration of RPMI8226 cells under the monolayer was checked 24 h later, and the number of cobblestone areas was checked 5 days later. Both were reduced significantly in the bortezomib-treated monolayers compared with the non-treated monolayers, indicating that bortezomib-induced downregulation of SDF-1 was functionally active *in vitro*. **Conclusions.** Bortezomib affects not only myeloma cells but also BMSCs. Most notably, it downregulates the expression and production of SDF-1 in the cells irrespective of the presence of myeloma.

1487

HEAVY/LIGHT CHAIN (HLC) NEPHLOMERIC ASSAYS EFFECTIVELY MONITORS OLIGOSECRETORY MULTIPLE MYELOMA PATIENTS WHO CANNOT BE MEASURED BY OTHER SEROLOGICAL MARKERS

H Ludwig¹, P Young², L Mirbaha², N Zojer³, D Milosavljevic⁴, W Hüb⁴, S Harding²

¹Wilhelminenspital, Wien, Austria
²The Binding Site Group Ltd, Birmingham, United Kingdom
³Wilhelminenspital/Department of Medicine I / Center for Oncology and Hematology, Vienna, Austria
⁴Wilhelminenspital / Central Laboratory (with bloodbank), Vienna, Austria

Background. Effective monitoring of multiple myeloma (MM) patients enables physicians to accurately assess patient's responses to therapy and make timely decisions regarding treatment changes. Approximately 1% of MM patients are oligosecretory, defined as less than 10g/L monoclonal immunoglobulin. Monitoring these patients using standard electrophoretic techniques represents a significant challenge. The introduction of the polyclonal serum free light chain (FLC) test (Freelite®) has improved the ability to monitor these patients and international guidelines now recommend their use when >100mg/L FLC can be measured at presentation. However, in a small subset of patient's FLC testing is of limited utility. Here we assess the utility of novel IgAk / IgAl nephelometric immunoassays and comment on their utility in oligosecretory patients. **Aims.** To assess the utility of HLC IgA measurements to monitor patients with IgA oligosecretory MM. **Methods.** HLC and FLC assays were performed retrospectively on stored sera from 11 oligo-MM patients (5 IgAk and 6 IgAl). Patients were followed from start of therapy and monitored in regular intervals during the course of their disease. **Results.** 5/11 IgA oligo-MM patients had IFLC >100mg/L at presentation (median 298mg/L, range 125-6700mg/L); each patient achieved a partial response (PR; >50% reduction FLC concentrations). 6/11 IgA patients had IFLC <100mg/L at presentation (median 32mg/L, range 16-57mg/L); all 6 of these patients had an abnormal HLC ratio at presentation. Overall, changes in HLC ratios were in accordance with the clinical assessment during patient monitoring. 5/6 patients responded to therapy; at maximum response 3 patients achieved a PR, 1 patient achieved a very good partial response (VGPR) and 1 patient achieved a near complete response (nCR). In each case the HLC IgA ratio reduced but remained abnormal. The remaining patients failed to respond to therapy, and maintained a stable, abnormal HLC ratio throughout monitoring. In 3/6 patients (2 IgAk / 1 IgAl), increasingly abnormal HLC ratios identified disease progression before either an increase in monoclonal proteins was identifiable by SPE (median: 195 days, range 104-445 days). One IgAk patient achieved a VGPR after 284 days; the response was maintained for 168 days before a relapse was identified by a 101% increase in monoclonal immunoglobulin. Increases in the HLC ratio indicated a relapse after 340 days, 112 days earlier than the traditional assessment. The patient responded to second line therapy and achieved a second VGPR after 601 days. Again increasingly abnormal HLC ratio identified a second relapse 104 days earlier than traditional assessment confirmed progression. In a second IgAk patient achieved a PR after 1941 days and increasingly abnormal HLC ratio identified relapse after 2341 days, 445 days before clinical assessments. Finally, in 1 IgAl patient who initial failed to respond to therapy, achieved a PR after 510 days. An increase in the patient's HLC ratio after 560 days indicated disease progression, 120 days before clinical assessments. **Conclusions.** HLC analysis allows the sensitive detection of monoclonal protein in oligosecretory MM patients. This sensitivity is a reflection of both the tumor production and isotype matched suppression and may aid in oligosecretory patient monitoring.

1488

ANALYSIS OF SERUM LEVELS OF THYMIDINE KINASE IN MONOCLONAL GAMMOPATHY OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE AND MULTIPLE MYELOMA COMPARISON WITH IMAGING Methods 99mTc-MIBI SCINTIGRAPHY AND 18F-FDG PET/CT

J Bacovsky
 University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

Background. Proliferation is a independent prognostic factor and target for risk adapted treatment in multiple myeloma. Increased activity of thymidine kinase in serum is associated with higher proliferation rate in hematological malignancies. The imaging methods as 99mTc-MIBI scintigraphy or 18F-FDG PET/CT can imagine active myeloma lesions and their positivity is negative prognostic factor. **Materials and Methods**The analyzed group of 51 patients consisted of 14 (27,5%) individuals with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and 37 (72,5%) patients with multiple myeloma (MM). There were 25 female (49%) a 26 male (51%) in the group. The average age in the group was 63 years. Thymidine kinase (TK) in serum was evaluated by TK REA and TK 'the novel technique' We analyzed correlation of serum TK with biochemical markers reflecting activity of multiple myeloma (MM), e. g. B2M, LDH, free light chains ratio: kappa/lambda K/L, infiltration of bone marrow by plasma cells (Pl. b). The imaging methods as MIBI or PET/CT which imagine active myeloma lesions were done at the time of diagnosis in 20 patients. **Results.** We found a strong positive correlation between TK values by TK REA and TK 'the novel technique' (r=0,822). After extreme values were excluded, the correlation coefficient r=0,787. There was clear correlation of serum thymidine kinase with biochemical markers reflecting activity of multiple myeloma (MM), e. g. B2M, LDH, free light chains ratio: kappa/lambda K/L, infiltration of bone marrow by plasma cells (Pl. b). Correlation TK 'the novel technique' vs. B2M, LDH, K/L, Pl. b. TK REA - positive correlation of medium strength with B2M (r=0,527) and LDH (r=0,553). TK 'the novel technique' - positive correlation of medium strength with B2M (r=0,456), LDH (r=0,573) and weak to positive correlation of medium strength with Pl. b. (r=0,386). Mann-Whitney U test showed at the group of patients with MM (stage I, II or III) significantly higher values of TK REA and TK 'the novel technique' in comparison to patients in stage MGUS. Median TK REA was 6,0 at MGUS, resp. 9,5 at MM (p=0,004), median TK 'the novel technique' was 27,6 at MGUS, resp. 135,9 at MM (p = 0,008). Imaging methods MIBI or PET/CT were positive in 13 patients, and negative in 7 patients. Increased levels of serum thymidine kinase were observed in MIBI or PET/CT positive patients, but correlation did not reached significance level. TK 'the novel technique' vs. PET/CT, MIBI (0=negative / 1 or 2 =positive) (without extreme values of TK 'the novel technique' Mann-Whitney U test did not show significant difference in values of TK REA or TK 'the novel technique' between group of patients with positive and negative PET, MIBI result (p=0,501, resp. p=0,285). AUC = 0,775 - it means TK 'the novel technique' could be used as a predictor for multiple myeloma. **Conclusions.** Statistical analysis revealed significant correlation between serum levels of thymidine kinase and LDH and B2M. Increased levels of serum thymidine kinase were observed in MIBI or PET/CT positive patients, but correlation did not reached significance level. **Supported by grant IGA MZ ČR NT 12215-4/2011.**

1489

A FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPIC INVESTIGATIONS ON THE MOLECULAR PROFILING OF MULTIPLE MYELOMA

B Ayhan¹, K Dalva², S Ipek², D Ozu², A Ugurbilgin³, M Ozen², D Ozel Demiralp⁴, M Beksac⁵

¹Ankara university Biotechnology Institute, Ankara, Turkey
²Ankara University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey
³Selcuk University Meram Medical School, Ankara, Turkey, Ankara, Turkey
⁴Ankara University-Biotechnology Institute, Ankara, Turkey
⁵Ankara University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey, Ankara, Turkey

Background. In the past several years, multiple recurring translocations, deletions and amplifications have been defined and mapped to the earliest stages of the developing MM clone. However gene expression profiling using SNPs have identified further abnormalities defining multiple clusters. Despite of all these efforts the molecular pathogenesis is still unclear. A complementary approach to the study of gene expression profiling is proteomic and molecular profiling. Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy is a widely used and preferred method of infrared spectroscopy due to their speed and sensitivity for molecular profiling. With FT-IR, a complete molecular diversity of the samples (all types of organic and many types of inorganic compound) can be studied comparatively with a knowledge of the origins of the peaks (such as

lipids, proteins, carbohydrates, nucleic acids etc) and also the amount of the particular compounds, secondary-structures of proteins, post-translational modifications and protein-protein interactions can be determined. **Aims.** The aim of this study is to achieve molecular characterization of biomolecules in MM by using FT-IR spectroscopy and cluster analysis. **Methods.** Study group consisted of 6-MM, 4- monoclonal gammopathy of unknown significance (MGUS), 4-smoldering multiple myeloma (SMM) patients and 2-healthy controls who were selected from Ankara University Department of Hematology. Infrared spectra were obtained by Bruker-Tensor-27-FT-IR (Bruker-Optics, GmbH, Germany). Spectra from urine samples recorded in the mid-infrared-region, between 3800-850 cm^{-1} wave numbers and interferograms were accumulated for 32 scans at 4- cm^{-1} resolution at 22°C in the single-bounce-ATR mode. All data collection, manipulation and analyses were performed by OPUS software (Bruker Optics). **Results.** According to our results, there are 9-significant peaks in FT-IR spectra of MM, SMM, MGUS and control samples (Figure 1A). It has been found out that absolute intensity of peaks were decreased in MM group compared to others groups. Second derivatives of absorbance spectra were calculated using Savitzky-Golay algorithm with 9-smoothing points. Relative intensity values of second derivative peaks in the Amid-I-region (1700-1590 cm^{-1}) which were obtained by automated peak-picking were used to compare protein secondary structures (Figure-1C). Relative intensity of peaks in MM group were found to be decreased in 1680 cm^{-1} and increased in 1650 cm^{-1} compared to other groups (Figure-1D). These regions are known to represent C=O bonds in secondary structures of proteins. Cluster analysis (hierarchical clustering) was carried out by OPUS software and the results demonstrated two significant separation between MM, and SMM, MGUS and control groups (Figure-1B) and found to be clustered together as expected in normal diagnostic outcomes. Our preliminary findings show that FT-IR is feasible and replicable. During the congress comparison of findings between active-MM, SMM, MGUS and controls will be presented with protein profile data. **Conclusions.** The current molecular technologies such as proteomics and molecular profiling are under development and is may be the reason why there is only one report on proteomics in MM (Micallef et al-2010). The advantages of overcoming the problem of unocded genetic aberrations or inhibition by micro-RNAs and leading to direct measurement of proteins in quantity as well as demonstration of chemical structural changes may enhance the role of this technology in MM where secretory proteins and cytokines are essential elements.

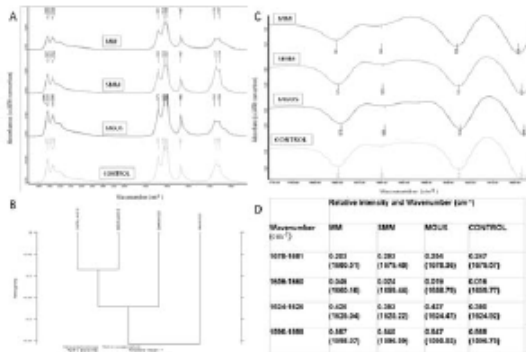


Figure 1.

1490

EARLY B LYMPHOPOIESIS IN BONE MARROW IS SUPPRESSED WITH MULTIPLE MYELOMA PROGRESSION

M. Ichii¹, K. Oritani¹, Y. Habuchi¹, H. Sata¹, T. Maeda¹, P. Kincade², Y. Kanakura¹
¹Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan
²Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma, United States of America

Background. Detailed analysis of lymphoid lineage subsets is helpful for evaluation of immune status. We previously described subpopulations of CD34⁺ early lymphocyte progenitors in marrow that differ in CD10 expression. CD10 intensity correlated well with ability to proliferate in vitro and with lymphoid-lineage gene expression. In addition, CD34⁺ CD10^{Hi} and CD34⁺ CD10^{Low} populations had unique patterns depending on their sources; cord blood, bone

marrow (BM) and G-CSF mobilized peripheral blood. We have now analyzed other B-lymphocyte precursors, collectively termed hematogones. Their numbers are known to vary in hematological malignancy, marrow regeneration and immunodeficiency. Our CD34⁺ CD10⁺ subpopulations in part overlapped with early stage hematogones. Although it might have clinical relevance, levels of hematogones in multiple myeloma (MM) patients are poorly understood due to the difficulty in distinguishing them from MM cells. **Aims.** To evaluate percentages of hematogones in MM patients using multi-color flow cytometry and to study the association with disease characteristics. **Methods.** BM samples were collected after informed consent, using protocols approved by the Investigational Review Board of Osaka University Hospital. Samples from patients with measurable MM cells, after an interval of more than 2 months from the last chemotherapy or 1. 5 years after high-dose chemotherapy with auto PBSCT, were immunophenotyped by 5-color (CD34/CD38/CD10/CD20/CD45) flow-cytometric analysis. Hematogones were divided into 4 maturation stages: CD34⁺ CD10^{Hi} stage 1, CD34⁺ CD10^{Hi} CD20⁻ stage 2-1, CD34⁺ CD10^{Low} CD20^{Low} stage 2-2 and CD34⁺ CD10⁺ CD20^{Hi} stage 3. We sought correlations with age, percentages of MM cells in BM, albumin, β 2microglobulin (B2M), creatinine and hemoglobin. *p* values < . 05 were considered to be significant. **Results.** There were 19 patients aged 52 to 78 years. Eleven were newly diagnosed, and 5 received high-dose chemotherapy following auto PBSCT. MM cells were clearly detected with CD38, CD20 and CD45 intensities, and percentages determined by flow cytometric analysis were consistent with those from microscopic evaluation. This isolation strategy made us possible to study normal lymphopoiesis in MM patients. Age, albumin, creatinine and hemoglobin showed no significant relevance. However, patients with high B2M (> 3. 5 mg/dl) had significantly lower percentages of stage 1, 2-1 and 3 hematogones, while mature lymphocyte counts in peripheral blood were not associated. The same was true for untreated patients. The burden of MM cells (>30% in BM) also affected the distribution among hematogone stages. Percentages of CD34⁺ CD38⁺ hematopoietic stem cells and CD34⁺ CD38⁺ hematopoietic progenitor cells did not show any correlation with B2M or tumor mass, indicating that the suppression of early hematopoiesis in MM is lymphoid lineage restricted. **Summary and Conclusions.** Most studies concerning impairments in cellular and humoral immunity in MM focused on regulation of mature lymphocyte function. We now show that early stages in normal B lymphopoiesis are suppressed in myeloma BM. In addition, there was a negative correlation between hematogones and the prognostic factor, B2M. Our study suggests that BM hematogone percentages may be useful for predicting MM patient outcome.

1491

PROTEASOME 20S CONCENTRATION IN NEWLY DIAGNOSED MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

A. Kostur, A. Kulczyńska, M. Galar, J. Kłoczko
 Medical University of Białystok, Białystok, Poland

Background. The proteasome is a multicatalytic complex found in all eukaryotic cells. It is responsible for the degradation of many proteins which take part in cell development. During rapid cell turnover and growth proteasomes are released into the circulation and they can be measured in plasma by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) techniques. Abnormally high level of proteasomes has been observed in leukemias, multiple myeloma and some solid tumors. Moreover, the concentration of circulating proteasome correlates with the disease state, and may have prognostic significance. **Aims.** The aim of our study was the assessment of the proteasome 20S concentration in the plasma of patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM). **Materials and Methods.** The study included 30 patients with newly diagnosed MM (14 females, 16 men; mean age, 67. 3 years) and 15 healthy subjects (7 females, 8 men; mean age, 65. 7 years). The patients were followed-up in the Department of Hematology at the Medical University of Białystok, Poland. All patients were divided into three groups based on international staging system (ISS): three patients at 1st stage, ten patients at 2nd stage and seventeen at 3rd stage. Approval for this study was obtained from the Local Ethic Committee. The concentration of proteasome 20S in the plasma was assayed using commercial test (20S/26S proteasome ELISA Kit, Enzo Life Sciences). Statistical analysis was done using Shapiro-Wilk, Mann-Whitney and Spearman's tests. The statistical significance of the measured differences was determined using an alpha index of 0. 05. **Results.** Proteasome 20S concentration was significantly elevated in the patients with MM in comparison to healthy subjects (6. 63±4. 51 μ g/ml vs 3. 04±1. 34 μ g/ml, *p*=0. 004). Statistically significant correlations were found between proteasome 20S and albumin concentrations as well as between proteasome 20S concentration and serum LDH activity, but no correlation was found between proteasome 20S and β 2-microglobulin concentrations (*p*=0. 64). The highest level of proteasome 20S was observed at 3rd stage of ISS score and the lowest at 1st stage. **Conclusions.** Our results confirm reports about increased concentrations of proteasome 20S in plasma of patients with

kemik iliğinde kemik formasyonu adı verilen mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşması ve osteoklastik aktivite sonucu oluşan kemik yıkımı bir denge halindedir. MM hücreleri ise bu dengeyi çeşitli inhibitör faktörler salgılayarak bozmaktadırlar. Buna ek olarak yapılan klinik çalışmalarda MM hastalarında alkalen fosfataz gibi kemik oluşumu belirteçlerinin normalden az olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, MM hastalarından ve sağlıklı vericilerden elde edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin (Kİ-MKH) osteojenik farklılaşma kapasitesi çeşitli yöntemlerle karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

MM hastalarından (n=3) ve sağlıklı vericilerden (n=3) gradiyent yöntem ile Kİ-MKH'ler izole edilip, pasaj 3'e kadar uygun koşullarda kültüre edildiler. Akım sitometri aygıtında karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra MKH'ler 30 gün süresince osteojenik farklılaşma için uyarılmıştır. Alkalen fosfataz aktivitesi uyarımdan itibaren 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerde ölçülmüştür. Absorbanslar 405 nm'de okunmuş ve toplam protein konsantrasyonlarına oranlanmıştır. Buna ek olarak osteojenik farklılaşma Alizarin Red S gibi kemik oluşumunu gösteren belirteçlerle histokimyasal olarak gösterilmiştir. BMP-2, BMP-4 ve ALPL genlerinin ekspresyonları Real Time PCR ile ölçülmüştür.

Sağlıklı donörlerin kemik iliğinden elde edilen MKH'lerde osteojenik farklılaşmanın 3. gününden 14. gününe kadar ALP aktivitesinde artış görülürken, MM hasta grubunda 21. güne kadar ALP aktivitesi gözlenmemiştir. Alizarin Red S boyamasında ise, sağlıklı Kİ-MKH'lerine göre çok az miktarda kalsifiye kemik nodülü izlenmiştir. Gen ekspresyon (BMP-2, BMP-4 ve ALPL) çalışmaları bu verilerimizi onaylamıştır.

Sonuç olarak, MM hastalarının kemik iliğindeki tümörjenik mikroçevrenin etkisine ek olarak MKH'lerin ALP aktivitelerinin olmayışı ve osteojenik farklılaşmayla ilişkili gen ekspresyonlarındaki azalmanın MM'deki kemik defektleri ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Abstract0270

S-44

MULTİPL MYELOM'UN TEŞHİS, TEDAVİ VE PROGNOZUNDA KULLANILABİLİR BİYOBELİRTEÇLERİN METABOLOMİK VE PROTEOMİK TABANLI YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI. *Beycan Ayhan¹, Klara Dalva², Duygu Özel Demiralp¹, Meral Beksaç². ¹Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Proteomik Bilim Birimi, ²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara*

Amaç: Multipl myelom(MM) plazma hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasıyla oluşan kemik iliği kanseridir. Belirsiz monoklonal gamopati (Monoclonal gammopathy of undetermined significance/MGUS) ve sessiz meyelom (Smoldering Multiple Myeloma/SMM) MM'nin öncüsü olarak kabul edilen myelom tipleridir.

Çalışmanın amacı, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (Fourier Transform Infrared/FT-IR) spektroskopisi ve proteomik teknolojisinin kullanılması ile MM'nin tanı, gelişim ve tedavisinde kullanılabilecek biyobelirteç ve yöntemlerin araştırılmasıdır. FT-IR molekül yapı ve etkileşimlerinin incelenmesinde kullanılır. Proteomik ise belli bir zamanda belli bir yerde bulunan tüm proteinlerin yapılarını, değişimlerini ve etkileşimlerini inceleyen bilim dalıdır. MM'nin FT-IR spektroskopisi ve proteomik teknolojisi kullanılarak araştırılmasına ilgi artmakla beraber henüz çok kısıtlı sayıda araştırma vardır.

Yöntem-Gereçler: sÇalışmada Ankara Üni. Tıp Fak. Hematoloji B.D. yönetiminde, MGUS, SMM ve MM hastalarından alınan kemik iliği, idrar ve serum örnekleri kullanılmıştır. İdrar ve serumlardan MGUS, SMM ve MM grupları oluşturulurken, kemik iliği materyallerinden ise plazma hücre oranlarına göre gruplar oluşturulmuştur (Tablo1 ve 2).

FT-IR çalışmasında(MCP detektörlü Bruker Tensor 27) liyofilize edilmiş serum ve idrarlar orta-kızılötesi bölgede 3 tekrarlı ölçülmüş, analizi OPUS 5,5(Bruker Optics) ile yapılmıştır. Bulgularda bahsedilen bant ve relatif intensite değerleri, absorbansa bağlı olarak programca belirlenen değerlerdir. Second derivate(2d) analizi ise bir bant altında bulunan altbantların tespitini sağlamaktadır.

Proteomik aşamasında ise kemik iliklerinden, plazma hücreleri ayrılmış (WholeBlood CD138 MicroBeads) sonra bu hücrelerden lizis tamponu ile proteinler izole edilmiştir. Protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiş ve iki boyutlu jel elektroforezi(Two-dimensional gel electrophoresis/2-DE) ile protein profilleri çıkarılmıştır. Jeller Bio-Rad Versadoc İmaging System Model 100 ile görüntülenip, PDQuest 8.0.1 yazılımı ile analiz edilmiştir.

Bulgular ve Sonuç: İdrar örneklerinde elde edilen FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında 5 bölgede farklılıklar tespit edilmiş (Şekil1) ve sayısal veri haline dönüştürülmüştür(Tablo 3 ve 4). 1 ve 3. bölgedeki bant intensite oranlarının kontrolden MM'ye doğru azalması bu oranların tanıda kullanılabileceğini göstermektedir. Bantların kaynaklandığı organik bileşikler Tablo 5'de verilmiştir. Yapılan yığın (cluster) analizinde kontrol ve MM'deki örnekler iki tanesi hariç tam olarak ayrılmıştır(Şekil 2). Serum örneklerinin analizinde ise Amid I bölgesinin (1700-1600 cm-1) protein ikincil yapılarında değişiklik saptanmıştır(Şekil 4). İkincil yapılar ve ilgili bantlar Tablo 7'de verilmiştir.

Proteomik çalışmalarda da grupların protein profilleri arasında önemli farklar bulunmuştur (Şekil 4,5). İleri aşamalarda farklı protein kümelerinde bulunan proteinler kütle spektrometresi ile tanımlanacak ve hastalıkla ilgisi araştırılacaktır.

Tablo 1. FT-IR çalışmasında kullanılan idrar ve serum materyallerinden oluşturulmuş gruplar ve içerdikleri birey sayısı.

Deney grubu(Materyal türleri ve sayısı)	İDRAR	SERUM
KONTROL	4 (2 kadın, 2 erkek)	yok
MGUS	8 (5 kadın, 3 erkek)	4(3kadın, 1 erkek)
SMM	5 (4 kadın, 1 erkek)	4(4kadın)
MM	7 (3 kadın, 4 erkek)	6(6kadın)

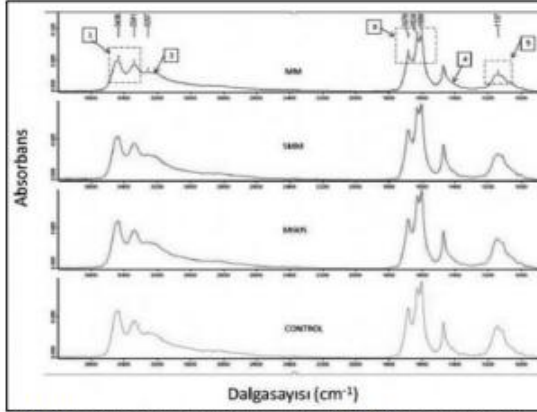
Tablo 2. Proteomik çalışma aşamasında kullanılan gruplar ve gruplardaki birey sayısı.

Klonal plazma hücresi yüzdesine göre oluşturulan gruplar	Gruplardaki birey sayısı
0-10	4 (3 kadın, 1 erkek)
11-20	4 (3 kadın, 1 erkek)
>21	4 (2 kadın, 2 erkek)

Çalışmada kullanılmak üzere oluşturulan bu gruplar, kemik iliği materyallerindeki klonal plazma hücreleri yüzdesine göre oluşturulmuştur.

Yayın 2 (devam)

SÖZEL BİLDİRİLER



Şekil 1. İdrar örneklerinden oluşturulmuş grupların 3500-800 dalgasayı (cm⁻¹) aralığında oluşan FT-IR spektrumlarının karşılaştırılması. Farklılıkların görüldüğü spektrum bölgeleri sadece MM grubu üzerinde oklarla gösterilmiş ve numaralandırılmıştır. Absorbans kuzültesi ışığın örnek tarafından soğurulmasının şiddetini ifade eder, genellikle birimsiz kullanılır. Santimetredeki dalgasayı işe kuzültesi ışığın soğurulduğu dalgaboyu/frekansı belirtmektedir. Santimetredeki dalgasayı arttıkça dalga boyu azalmakta, frekans artmaktadır.

Tablo 3. İdrar örneklerinde farklılık gösteren FT-IR spektrum bölgelerinin analizi.

Gruplar/ Bölgelere göre intensite değerleri	1.Bölge 3436 ve 3341 dalgasayılı bantların 3436/3341 intensite oranı	2.Bölge 3212 dalgasayılı bandın 2d relatif intensite değerleri	3.Bölge 1599 ve 1624 dalgasayılı bantların 1599/1624 intensite oranı	4.Bölge 1398 dalgasayılı bandın 2d relatif intensite değeri	5.Bölge 1138 dalgasayılı bandın relatif intensite değeri
MM	1,429	0,012(3002)	1,286	0,30(1393)	0,008(1136)
SMM	1,600	0,010(3214)	1,375	0,30(1399)	0,020(1136)
MGUS	1,688	0,09(3212)	1,778	0,08(1399)	0,027(1137)
KONTROL	1,813	-	2,250	0,06(1397)	0,048(1136)

Şekil 1'de gösterilen spektrum bölgelerindeki bazı bantların gruplara göre belirlenen intensite değerleri

Tablo 4. İdrar örneklerinin FT-IR spektrumlarında belirlenen gruplar arası farklar

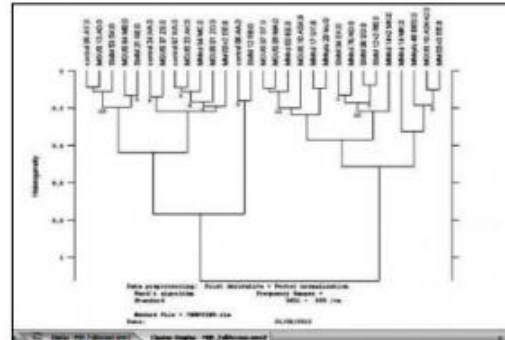
Spektrum Bölgesi	Açıklama
1	Bu bölgede 3436 dalgasayılı bandın intensite değerinin 3341 numaralı pik intensite değerine oranı (3436/3341), Kontrol>MGUS>SMM>MM olarak sıralanmıştır.
2	Bu bölgede 3212 dalgasayılı bandın 2d relatif intensite değeri kontrolde tespit edilemezken, diğer gruplarda MGUS < SMM < MM olacak şekilde sıralanmıştır.
3	Bu bölgede 1599 dalgasayılı bandın intensite değerinin, 1624 dalgasayılı bandın intensite değerine oranı (1599/1624), Kontrol>MGUS>SMM>MM olarak sıralanmıştır.
4	Bu bölgede 1398 dalgasayılı bandın 2d relatif intensite değeri Kontrol<MGUS<SMM=MM olarak sıralanmıştır. Ayrıca MM grubu bandında kayma gözlenmiştir.
5	Bu bölgede özellikle 1138 dalgasayılı bandın 2d relatif intensite değerleri Kontrol<MGUS<SMM=MM olarak sıralanmıştır.

İdrar örneklerinde bu bölgelerin çoğunda kristallerin etkisi de bulunmaktadır. Örneğin 3436 ve 1624 dalgasayılı bantların büyük oranda kalsiyum mono okzalat(COM) kristalinde bulunan C=O bağlarından kaynaklandığı bilinmektedir (Deng, F. and Ouyang, JM, 2006). Bu bantlardaki değişimler büyük oranda kalsiyum ile ilişkilidir ve MM'ye yakalanmış hastaların önemli bir kısmında kanda kalsiyum seviyesinin arttığı bilinmektedir.

Tablo 5. Kuzültesi ışığı soğurarak FT-IR spektrum bantları oluşmasına neden olan bağlar ve ait oldukları organik bileşikler

Dalga sayısı (cm ⁻¹)	Açıklama	Kaynak organik bileşik
3294	Amid A bandı. Genel olarak proteinlerde bulunan N-H bağının soğurulmasından kaynaklanır ancak polisakkaritlerdeki D-H ve molüküller arası H bağından da etkilenir.	Çoğunlukla proteinler
3060	Amid B bandı. Çoğunlukla proteinlerin N-H bağından kaynaklanır	Proteinler
3011	Olfenik =CH bağı	Doymamış yağlar
2957	asimetrik CH3 bağı	Çoğunlukla yağlar, çok az proteinler
2929	asimetrik CH3 bağı	Çoğunlukla yağlar, çok az proteinler
2907	CH	Yağlar
2871	asimetrik CH3 bağı	Çoğunlukla yağlar, çok az proteinler
2858	asimetrik CH3 bağı	Çoğunlukla yağlar, çok az proteinler
2843	CH	Çoğunlukla yağlar
1732	Doymuş ester =C=O bağı	Kolesterol esterleri, fosfolipitler ve yağların fonksiyonel ester grupları
1653	Amid II; 80%C=O, 10%N-H bending, 10%C-N	Proteinler
1544	Amid II; 60%N-H, 40% C-N	Proteinler
1455	CH2	Yağlar
1396	simetrik COO- bağı	Yağ asitleri
1241	asimetrik PO2- bağı (tümüyle hidrojen bağı)	Nükleik asitler, fosforile olmuş proteinler ve fosfolipitler
1147	C-O	Karbonhidratlar, glikojen, nükleik asitler
1094	iyonize simetrik PO2- bağı ve C-O bağı	Nükleik asitler, fosfolipitler, glikojen, oligosakkaritler ve glikolipitler
1041	Karbonhidratlardaki C-OH gruplarında bulunan C-O bağları	Oligosakkaritler ve polisakkaritler
1021	Karbonhidratlardaki C-OH gruplarında bulunan C-O bağları	Oligosakkaritler ve polisakkaritler
976-875	C-N+ -C	Nükleik asitler, RNA ribozofat zincirleri, fosfat monoesterleri

Literatürden derlenmiş, spektrum bantlarının oluşmasına neden olan bağlar ve ait oldukları organik bileşikler (Schmitt and Flemming 1998, Severcan et al. 2000; Ramesh et al. 2001; Colley et al. 2004; Toyran et al. 2006; Akkas et al. 2007; Baker et al. 2008. İdrar örneklerinde bu bölgelerin çoğunda kristallerin etkisi de bulunmaktadır (Deng, F. and Ouyang, JM, 2006).



Şekil 2. FT-IR yoğun analizi

MM grubunda bulunan örnek sayısı 10'a çıkarılmış ve gruplarda bulunan bireylerle ait her idrar örneği spektrumu, yoğun (cluster) analizi ile karşılaştırılmıştır. İki MM örneği dışında tüm kontrol ve MM grubu bireyleri net olarak iki farklı kola ayrılmıştır. Kontrol ile MM grubu arasında kabul edilen risk grupları olan MGUS ve SMM bireyleri ise her iki kola da dağılım göstermişlerdir.