

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI VE KANSERLİ MEME HÜCRE HATLARINDA BİYOTİNİLİLYON  
YARDIMIYLA KARŞILAŞTIRMALI SEKRETOM ANALİZİ

Elif AKINCI

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2023



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAĞLIKLI VE KANSERLİ MEME HÜCRE HATLARINDA  
BİYOTİNİLİLASYON YARDIMIYLA KARŞILAŞTIRMALI SEKRETOM  
ANALİZİ**

Elif AKINCI

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Gürler AKPINAR

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No:3082)  
Tarafından Desteklenmiştir

KOCAELİ

2023



## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Sağlıklı ve Kanserli Meme Hücre Hatlarında Biyotininilasyon Yardımıyla Karşılaştırmalı Sekretom Analizi

Tez Yazarı: Elif AKINCI

Tez Savunma Tarihi:

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gürler AKPINAR

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

| SINAV KURULU ÜYELERİ |            |      |
|----------------------|------------|------|
| UNVANI               | ADI SOYADI | İMZA |
| BAŞKAN (ÜYE)         |            |      |
| DANIŞMAN (ÜYE)       |            |      |
| ÜYE                  |            |      |
| ÜYE                  |            |      |
| ÜYE                  |            |      |

### Onay

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

.... /.... /20...

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### **Sağlıklı ve Kanseri Meme Hücre Hatlarında Biotinilasyon Yardımıyla Karşılaştırmalı Sekretom Analizi**

Meme kanseri insidansı ve mortalitesi yüksek olan genellikle kadınlarda görülen ve GLOBOCAN 2020 veri analizlerine göre akciğer kanserinden sonra en çok görülen kanser türüdür. Kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla bulundukları nişi değiştirdikleri ve enzimler, büyüme faktörleri ve hücreler arası matriks proteinleri gibi farklı molekülleri hücre dışına salgıladıkları bilinmektedir. Bu moleküller immün sistemden kaçış, hipoksik çevrenin oluşturulması, metastaz ve invazyon gibi pek çok farklı süreçte kritik roller üstlenmektedir. Bu nedenle normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde değişiklik gösteren salgı moleküllerinin belirlenmesi hem süreç içerisindeki mekanizmaların anlaşılması hem de bu mekanizmaların hedeflenmesi ile tanı ve tedavi alanlarında yeni hedeflerin ortaya çıkartılması için oldukça önemlidir. Kanser hücre biyolojisinin anlaşılmasında ve tanıya yönelik biyobelirteçlerinin keşfinde sekretom proteinleri değer taşımaktadır. Ancak hücre kültüründe yapılan sekretom analizinde karşılaşılan bazı zorluklar mevcuttur. Kısaca özetlemek gerekirse; hücre kültürü medyasındaki sekretom proteinlerinin yüksek dilüsyonu, hücre lizisi ve hücre ölümü kaynaklı proteinlerin sekretom proteinleri ile karışması sonucu salgı proteinlerinin maskelenmesi, kültür medyasında bulunan serum proteinlerinin salgı proteinlerini baskılaması dolayısı ile yaşanan güçlükler literatürdeki çalışmalarda yer almaktadır.

Bu tez çalışmasında, salgı proteinlerinin endoplazmik redikulumda (ER) biotinilasyon aracılığıyla işaretlenmesi ve daha sonrasında kültür medyasından biyotinile haldeki salgı proteinlerinin streptavidin kaplı manyetik boncuklar kullanarak zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece ölü hücrelerden salınan proteinlerin ve sitozolik proteinlerin, salgı proteinlerini maskeleyişinin önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda biyotinilasyon gerçekleştiren TurboID biotin ligaz enzimi kullanılmıştır. Sağlıklı meme epitel hücresi MCF-10A, non-invaziv özellikteki MCF-7 ve invaziv özellikteki MDA MB 231 hücrelerine pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmiti transfekte edilmiş ve Genetec'in antibiyotiği ile seçim yapılmıştır. Hücreler uygun yoğunluğa geldiğinde 300mM ATP, 500mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM biotin, %2 FBS içeren medyada 16 saatlik biyotinilasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

İmmüñfloresan boyamalarla TurboID ifadesi ve ER proteinlerinin biyotinilasyonu gösterilmiştir. Sekretom ortamından biyotinile haldeki proteinler streptavidin kaplı manyetik boncuklar kullanılarak zenginleştirilmiştir. Biyotinilasyonun etkinliği, sekretom örneklerinde Western Blot (WB) analizleri yapılarak doğrulanmıştır. nLC-MS/MS analizleri sonucunda invaziv özellikteki MDA MB 231 hücrelerinde non-invaziv özellikteki MCF-7 hücrelerine kıyasla yukarı regüle olan 5 adet protein tanımlanmıştır. Bu proteinler arasında Kardiyak Troponin I protein ekspresyonu hücre özütleri, sekretom örnekleri ve doku örneklerinde WB analizleri yapılarak incelenmiştir. nLC-MS/MS ve WB analizleri sonucunda, troponin sekresyonunun invaziv özellikteki MDA MB 231 hücrelerinde daha fazla olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuç literatürde yer alan troponin ve kanser ilişkisini destekler ve tamamlayıcı nitelikte bilgiler edinilmiştir. Bu tez çalışmasında tanımlanmış olan metaztaz ile ilişkilendirilebilecek proteinler sayesinde literatüre güñcel bilgiler kazandırılmış ve meme kanseri tanı ve tedavisine yönelik çalışmalara öncülük edebilecek veriler elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Endoplazmikretikulum, Meme kanseri, Sekretom, TurboID

## **ABSTRACT**

### **Comparative Secretome Analysis With The Aid of Biotinylation in Healthy and Cancerous Breast Cell Lines**

According to GLOBOCAN 2020 data analysis, it is the most common type of cancer after cancer with a high incidence and death of breast cancer. They are known to change the niche in which they compare usual constraints of cancer growth and to produce different types of cells such as enzymes, growth replications and interstructural matrix proteins. These departments play critical roles in many different processes such as escape from the immune system, regulation of the hypoxic environment, metastasis and invasion. Therefore, comparing normal structures and identifying the secretory regions that show changes in cancer cells is very important both throughout the processes and targeting these results for the diagnosis and revealing extremely new goals. Secretome proteins hold value in the maintenance of cancer cell biology and in the control of recognition biomarkers. However, there are some difficulties in secretome analysis in cell cells. To summarize; High dilution of the secretome proteins in the cell culture media, masking the secretome proteins released as a result of the effects of the proteins originating from cell lysis and cell death, and suppressing the proteins released by the serum proteins in the culture media are among their duties in the literature.

This thesis is designed for the purpose of labeling secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) via biotinylation and then enriching the biotinylated secretion proteins from culture media using streptavidin-coated magnetics. Thus, it is aimed to prevent the masking of secretory proteins and cytosolic proteins released from dead organisms. TurboID biotin ligase enzyme was used, which performs biotinylation in these cells. Healthy breast epithelial groups MCF-10A, non-invasive MCF-7 and invasive MDA MB 231 cells were transfected with pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plasmid and formed with Geneticin antibiotic. When it became dense enough for cells, it did not perform 16 biotinylations in media containing 300mM ATP, 500mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM biotin and 2% FBS.



Based on TurboID expression and biotinylation of ER proteins by immunofluorescent staining. Biotinylated proteins from the secretome medium were enriched using streptavidin-coated magnetic beads. The success of biotinylation was verified by structuring Western Blot (WB) analyses on secretome samples.

As a result of nLC-MS/MS analysis, invasive MDA MB 231 cells have 5 proteins that are regulated above according to the non-invasive MCF-7 chart. Among these proteins, Cardiac Troponin I protein expression was investigated by performing WB analyses in cell extracts, secretome samples and tissue samples. As a result of nLC-MS/MS and WB analysis, the invasive feature of troponin secretion is more in MDA MB 231 cells. This result we obtained has realized the relationship between troponin and cancer in the literature and got permanent information. Thanks to the proteins that can produce proteins with metastasis, which defines the individuals of this thesis, up-to-date information has been brought to the literature and the main points of the sections for the diagnosis and treatment of the breast part have been obtained.

Keywords: Breastcancer, Endoplasmicreticulum, Secretome, TurboID

## TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca cesaretlendirici ve yol gösterici yaklaşımlarıyla her zaman desteğini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a, akademik ve hayat tecrübeleriyle aydınlandığım samimiyeti ve anlayışıyla her zaman yanımda hissettiğim kıymetli hocam Prof. Dr. Murat KASAP'a ve değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Aylin KANLI'ya eğitim hayatıma ve kişisel gelişimime sağladıkları katkılar için içtenlikle teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda bulunduğum süre boyunca, laboratuvarı bana yuva gibi hissettiren başta gönül dostlarım Fatma Zehra ÖZEN, Humeyra Şeyma ÜNLÜ, Elifcan KOÇYİĞİT, Beliz ERDAL, Elif İlknur ŞAHİN ve tecrübelerini paylaşmayı esirgemeyen değerli büyüklerim Dr. Mehmet SARIHAN, Dr. Merve Gülsen BAL ALBAYRAK, Dr. Sevinç YANAR, Dr. Candan Yılmaz ÖZDOĞAN'a değerli katkıları için teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca tüm zorluklara benimle birlikte göğüs gerdikleri, maddi manevi desteklerini hiç esirgemedikleri, her başarımda ve başarısızlığımda arkamda duran. varlıkları için minnettar olduğum canım ailem, biricik kardeşim Rabia AKINCI, kıymetli babam Sait AKINCI ve kıymetli annem Gülcan AKINCI'ya canı gönülden teşekkür ederim.

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destek için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: 3082) teşekkür ederim.

## ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sağlıklı ve Kansersiz Meme Hücre Hatlarında Biyotininasyon Yardımıyla Karşılaştırmalı Sekretom Analizi” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

.../.../2023

Elif AKINCI

İmza

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                        |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET .....                                                                                                             | iv   |
| ABSTRACT .....                                                                                                         | vi   |
| TEŞEKKÜRLER.....                                                                                                       | viii |
| ORJİNALLİK BİLDİRİMİ .....                                                                                             | ix   |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                                                       | x    |
| SİMGELER ve KISALTMALAR.....                                                                                           | xiii |
| ŞEKİLLER .....                                                                                                         | xv   |
| TABLolar.....                                                                                                          | xvii |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....                                                                                                  | 1    |
| 1.1. Kanser Etiyolojisi .....                                                                                          | 1    |
| 1.1.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi .....                                                                              | 2    |
| 1.1.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....                                                                               | 4    |
| 1.1.4. Meme Kanseri Tanısında Kullanılan Biyobelirteçler .....                                                         | 8    |
| 1.1.5. Meme Kanseri Moleküler Sınıflandırma .....                                                                      | 11   |
| 1.2. Endoplazmik Retikulum (ER) Nedir ve Görevleri Nelerdir? .....                                                     | 13   |
| 1.2.1. Endoplazmik Retikulumda Protein Sentezi ve Taşınması.....                                                       | 15   |
| 1.2.2. Endoplazmik Retikulum ve Kanser İlişkisi .....                                                                  | 16   |
| 1.3. Sekretom nedir? .....                                                                                             | 17   |
| 1.3.1. Sekretom Çalışmalarının Önemi ve Kanser Araştırmalarındaki Yeri .....                                           | 18   |
| 1.3.2. Sekretom Analizinde Karşılaşılan Zorluklar .....                                                                | 20   |
| 1.3.3. Mevcut Sekretom İnceleme Metodolojileri .....                                                                   | 21   |
| 1.4. Biotinilasyon Nedir ve Kullanım Yerleri Nelerdir? .....                                                           | 23   |
| 1.5. TurboID Biotin Ligaz Enzimi Özelliği .....                                                                        | 24   |
| <b>2. AMAÇ</b> .....                                                                                                   | 26   |
| <b>3. YÖNTEM</b> .....                                                                                                 | 28   |
| 3.1. pDisplay_KDEL_ER_TurboID Plazmitinin Amplifikasyonu ve Saflaştırılması....                                        | 28   |
| 3.1.1. pDisplay_KDEL_ER_TurboID Plazmitinin E.Coli'ye ait XL1Blue Suşuna Elektroporasyon Yolu ile Transformasyonu..... | 28   |
| 3.1.2. Transformasyon Yapılan Bakterilerin Büyütülmesi ve Plazmid İzolasyonu ....                                      | 29   |
| 3.2. Hücre Kültürü Deneyleri .....                                                                                     | 30   |
| 3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Büyütülmesi.....                                                                        | 31   |
| 3.2.2. Hücrelerin Hatlarının Pasajlanması .....                                                                        | 32   |
| 3.2.3. Hücrelerin Saklanma için Dondurulması .....                                                                     | 32   |
| 3.2.4. Thoma Lamı İle Hücre Sayımı .....                                                                               | 33   |

|                                                                                                                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.5. Kill-Curve Deneyleri İle Seçilim İçin Uygun Antibiyotik Dozunun Belirlenmesi .....                                                                                                    | 34        |
| 3.3. pDisplay_KDEL_ER_TurboID Plazmitinin MCF-10A, MCF-7 ve MDA MB 231 Hücrelerine Neon-Transfeksiyon Yöntemiyle Aktarımı .....                                                              | 35        |
| 3.3.1. Geçici-Transfeksiyonun Gerçekleştirilmesi ve Hücrelerin Seçilime Tabi Tutulması.....                                                                                                  | 35        |
| 3.3.2. Biyotinyasyon Reaksiyonunun Kurulması .....                                                                                                                                           | 37        |
| 3.3.3. Transfeksiyonun İmmün Floresan Boyama(IF) İle Doğrulanması.....                                                                                                                       | 37        |
| 3.3.4. Transfeksiyonun Western Blot(WB) Analizi İle Doğrulanması .....                                                                                                                       | 39        |
| 3.3.4.1. RIPA Tamponu İle Protein Özütünün Elde Edilmesi.....                                                                                                                                | 39        |
| 3.3.4.2. Bradford Analizi .....                                                                                                                                                              | 40        |
| 3.3.4.3. SDS-Page Jel elektroforezi .....                                                                                                                                                    | 40        |
| 3.4. Western Blot .....                                                                                                                                                                      | 42        |
| 3.4.1. Herbir Hücre Hattına Biyotinyasyon Reaksiyonu Kurulması ve Sekretomlarının Toplanması .....                                                                                           | 43        |
| 3.4.2. Biyotinile Proteinlerin Manyetik Boncuklar Aracılığıyla Zenginleştirilmesi ve Doğrulanması .....                                                                                      | 44        |
| 3.5. nLC-Ms/Ms Analizi için Proteinlerin Triptik Kesimi .....                                                                                                                                | 46        |
| 3.5.1. nLC-Ms/Ms Analizi.....                                                                                                                                                                | 46        |
| 3.5.2. nLC-MS/MS Veri Analizi ve Bioinformatik Analizler .....                                                                                                                               | 48        |
| 3.6. nLC-MS/MS Analizi Sonucunda Belirlenen Proteinin Verifikasyonu .....                                                                                                                    | 48        |
| 3.6.1. Hücre Özütlerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu .....                                                                                                       | 48        |
| 3.6.2. Sekretom Örneklerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu .....                                                                                                   | 49        |
| 3.6.3. Doku Örneklerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu .....                                                                                                       | 49        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                                                                                                                                                     | <b>50</b> |
| 4.1. pDisplay_KDEL_ER_TurboIDPlazmitininAmplifiye Edilmek Üzere, E.Coli'ye ait XL1Blue Suşuna Elektroporasyon Yolu ile Transforme Edilmesi ve Plazmid İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi ..... | 50        |
| 4.2. MCF-10A, MCF-7 ve MDA MB 231 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi ve Uygun Seçilim Dozunun Belirlenmesi .....                                                                                  | 51        |
| 4.3. pDisplay_KDEL_ER_TurboIDPlazmitinin MCF-10A, MCF-7 ve MDA MB 231 Hücrelerine Neon-Transfeksiyon Yöntemiyle Aktarılması ve Seçilimin Sağlanması ....                                     | 52        |
| 4.4. Transfeksiyonun Western Blot(WB) Analizleri ve İmmüno Floresan Boyamalarla Verifikasyonu .....                                                                                          | 53        |
| 4.5. Biyotinyasyon Reaksiyonlarının Kurulması, Sekretom Toplanması ve Salgı Proteinlerinin Zenginleştirilmesi .....                                                                          | 56        |
| 4.6. nLC-MS/MS Veri Analizi ve Bioinformatik Analizler .....                                                                                                                                 | 58        |
| 4.7. Hücre Özütlerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu .....                                                                                                         | 62        |

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.8. Sekretom Örneklerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu ..... | 64        |
| 4.9. Doku Örneklerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu ....      | 65        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                                                  | <b>67</b> |
| <b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>                                                      | <b>71</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR.....</b>                                                                 | <b>72</b> |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                 | <b>75</b> |
| <b>EKLER .....</b>                                                                       | <b>76</b> |



## SİMGELER ve KISALTMALAR

ACN: Asetonitril

AmBic: Amonyum Bikarbonat

ATP: Adenozin Trifosfat

BC: Breast Cancer

BRCA: Breast Cancer Susceptibility

BSA: Bovin Serum Albümin

Da: Dalton

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsülfoksit

DTT: Dithiothreitol

E. coli: Escherichia coli

EDTA: Etilendiamintetraasetik Asit

EGF: Epidermal Büyüme Faktör

ER: Östrojen Reseptörü

FA: Formik Asit

FBS: Fetal Bovin Serum

HER2: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

IF: İmmünofloresan

IPTG: Isopropyl  $\beta$ - d-1-thiogalactopyranoside

KDa: Kilo Dalton

LB: Luria-Bertani

MEGM: Mammary Epithelial Cell Growth Medium

mL: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

MS: Kütle Spektrometresi

Ni: Nikel

nLC-MS/MS: Nano Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi

nM: Nanomolar

OD: Optik Densite

PBS: Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi

PL: Proximity Labeling

ppm: Milyonda Bir Partikül (parts per million)

PR: Progesteron Reseptörü

RE: Restriksiyon Endonükleaz

RIPA: Radyoimmünopresipitasyon Tahlil Tamponu (Radioimmunoprecipitation assay buffer)

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat –Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SOB: Süper Optimal Besiyer

TBS-T: Tris-Tamponlu Salin, 0.1%Tween 20

TFA: Trifloroasitik Asit

WB: Western Blot



## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. 1. GLOBACAN 2020 yılına ait bölgelere özgü meme kanseri insidans ve mortalite oranları.....                                                                                                                 | 3  |
| Şekil 1. 2. Meme kanseri risk faktörleri dağılımı.....                                                                                                                                                               | 5  |
| Şekil 1. 3. Endoplazmik retikulum organel yapısı. ....                                                                                                                                                               | 14 |
| Şekil 1. 4. Endoplazmik retikulum ve kanser ilişkisi. ....                                                                                                                                                           | 16 |
| Şekil 1. 5. Ribozomlarda protein üretimi. ....                                                                                                                                                                       | 18 |
| Şekil 1. 6. Sekretom inceleme metodolojileri. ....                                                                                                                                                                   | 21 |
| Şekil 1. 7. Biotin - avidin/streptavidin etkileşimi .....                                                                                                                                                            | 23 |
| Şekil 1. 8. Biotinilasyon reaksiyonu.....                                                                                                                                                                            | 24 |
| Şekil 1. 9. TurboID Enziminin moleküler yapısı. ....                                                                                                                                                                 | 25 |
| Şekil 3. 1. Thoma Lamı .....                                                                                                                                                                                         | 33 |
| Şekil 3. 2. Hücrelere farklı dozlarda antibiyotik uygulaması.....                                                                                                                                                    | 34 |
| Şekil 3. 3. Transfeksiyonun şematik gösterimi. ....                                                                                                                                                                  | 36 |
| Şekil 3. 4. Immün floresan boyamanın şematik gösterimi. ....                                                                                                                                                         | 38 |
| Şekil 3. 5. Transfeksiyonun Western Blot (WB) analizi ile doğrulanmasının şematik gösterimi. ....                                                                                                                    | 39 |
| Şekil 3. 6. Biotinilasyon reaksiyonu kurulması ve sekretom hazırlama prosedürlerinin şematik gösterimi.....                                                                                                          | 44 |
| Şekil 3. 7. Salgı proteinlerinin zenginleştirilmesi ve doğrulanması prosedürlerinin şematik gösterimi. ....                                                                                                          | 45 |
| Şekil 3. 9. nLC-Ms/Ms cihaz sistemi. ....                                                                                                                                                                            | 47 |
| Şekil 4. 1. Transformasyon sonrası tek düşen koloni seçimi. ....                                                                                                                                                     | 50 |
| Şekil 4. 2. Her bir hücre hattına ait doza bağlı hücre ölüm grafikleri. ....                                                                                                                                         | 52 |
| Şekil 4. MCF-10A, MCF-7, MDA MB 231 hücre hatlarına ait pDisplay_KDEL_ER_TurboID plazmitini içeren ve içermeyen hücrelerde IF analizi ile biyotinilasyonun, TurboID üretimi ve lokalizasyonunun gösterilmesi. ....   | 54 |
| Şekil 4. 4. Transfeksiyonun doğrulanması amacıyla 1:1000 dilüsyon oranı ile hazırlanmış BirA antikoru ve 1:3000 dilüsyon oranıyla hazırlanmış Streptavidin-HRP kullanılarak yapılan WB analizlerinin sonuçları. .... | 55 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4. 5.</b> Manyetik boncuklar ile zenginleştirilen salgı proteinlerine ait 1:3000 dilüsyon oranı ile Streptavidin-HRP kullanılarak yapılan WB görüntüleri. ....                                                                                                                                 | 57 |
| <b>Şekil 4. 6.</b> nLC-MS/MS analizi sonucunda tanımlanan proteinlere ait STRING analizi....                                                                                                                                                                                                            | 60 |
| <b>Şekil 4. 7.</b> nLC-MS/MS analizi sonucunda tanımlanan proteinlere ait PANTHER analizi. ....                                                                                                                                                                                                         | 61 |
| <b>Şekil 4. 8.</b> Hücre özütlerinde troponin seviyesini saptamak için yeterli örnek konsantrasyonunu belirlemek üzere yapılan WB analizi görüntüsü. ....                                                                                                                                               | 62 |
| <b>Şekil 4. 9.</b> A. Her bir hücre hattına ait hücre özütlerindeki troponin seviyesi ve aktin normalizasyonuna ait WB görüntüsü. Üstteki görüntüde aktin bantları, alttaki görüntüde troponin bantları yer almaktadır. B. Bu WB görüntüleri kullanılarak oluşturulmuş bar grafiği bulunmaktadır.. .... | 63 |
| <b>Şekil 4. 10.</b> A. Herbir hücre hattına ait hücre sekretomlarındaki troponin seviyesini gösteren WB görüntüsü ve Ponceus boyamasına ait görüntü. B. Bu görüntüler kullanılarak oluşturulmuş bar grafiği.. ....                                                                                      | 64 |
| <b>Şekil 4. 11.</b> Her bir meme kanseri tipine ait dokulardaki troponin seviyeleri ile her grubun sağlıklı dokusundaki troponin seviyelerini gösteren WB görüntüsü.....                                                                                                                                | 65 |
| <b>Şekil 4. 12.</b> Her bir hücre hattına ait hücre sekretomlarındaki troponin seviyesini gösteren WB görüntüsü ve Ponceus boyamasına ait görüntü. ....                                                                                                                                                 | 66 |

## TABLÖLAR

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1. 1.</b> Meme kanseri risk faktörlerinin sınıflandırılması .....                                                 | 4  |
| <b>Tablo 1. 2.</b> Meme kanseri tanısında kullanılan biyobelirteçler.....                                                  | 8  |
| <b>Tablo 1. 3.</b> Meme kanserinin moleküler alt tipleri. ....                                                             | 11 |
| <b>Tablo 3. 1.</b> Elektroporasyon işleminde kullanılan kimyasallar. ....                                                  | 28 |
| <b>Tablo 3. 2.</b> Hücre kültürü deneylerinde kullanılan kimyasallar.....                                                  | 31 |
| <b>Tablo 3. 3.</b> Protein boyutlarına uygun jel konsantrasyonları. ....                                                   | 40 |
| <b>Tablo 3. 4.</b> SDS –Page jel solüsyonları içeriği ve miktarları.....                                                   | 41 |
| <b>Tablo 3. 5.</b> Western Blot Analizinde Kullanılan Malzemeler. ....                                                     | 42 |
| <b>Tablo 4. 1.</b> Maxiprep ile elde edilen plazmitlerin saflık ve konsantrasyonunun ölçümü. ...                           | 51 |
| <b>Tablo 4. 2.</b> nLC-MS/MS analizini öncesinde protein konsantrasyonu belirlemek için yapılan A280 ölçümü sonuçları..... | 58 |
| <b>Tablo 4. 3.</b> nLC-MS/MS analiz sonucunda tanımlanan proteinlere ait gen numarası ve işlev bilgisi.....                | 59 |

# 1. GİRİŞ

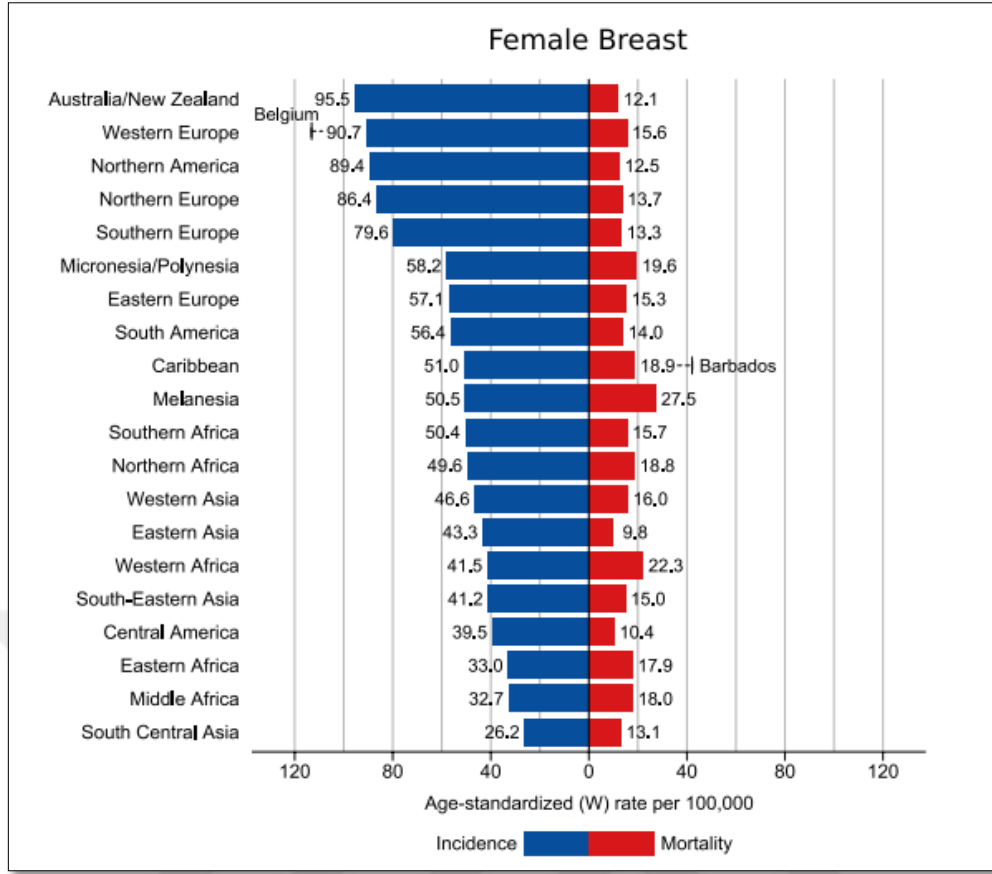
## 1.1. Kanser Etiyolojisi

Kanser, bir hücrenin normal büyüme ve replikasyon süreçlerindeki kontrol mekanizmalarında meydana gelen aksaklıklar sebebiyle ortaya çıkmaktadır (Açıkgöz ve Yıldız, 2017). Normal bir hücrenin tümör hücresine dönüşme ve çoğalarak bir kitle oluşturma süreci, karsinogenez kavramı ile ifade edilmektedir. Karsinogenez; başlangıç, ilerleme ve gelişme evreleri olmak üzere 3 evrede gerçekleşmektedir (Deniz, 2020). Başlangıç evresinde hücrede ilk olarak bir genetik mutasyon gerçekleşmektedir. Gen yapısındaki mutasyonlar, normal hücrelerdeki biyolojik homeostazı bozmaktadır. Karsinogenez sürecinde onkogenler, süpressör genler, onarım genleri ve modifiye genler, genel kanser biyomekanizmasında rol oynamaktadır. Onkogeller arasında büyüme faktörleri (Sis, int, hst), büyüme faktörü reseptörleri (erb-B, erb-B1, erb-B2), uyarı düzenleyici faktörler (Ret, Scr, Abl, N-ras, Ki-ras), transkripsiyon faktörleri (c-myc, n-myc, L-myc), hücre siklusu düzenleyiciler (bcl-1/PRADI, mdm-2) ve apoptozis inhibitörleri (bcl-2 inhibitörleri) yer almaktadır. Tümör süpressör (baskılayıcı) genler arasında DNA hasarı olan hücrenin mitozunu engelleyen genler (Rb-retinoblastoma, p53, MTS1-p16), hücre proliferasyonunu baskılayıcı genler (NF-1/ras antagonisti, BRCA1, BRCA2, WT-1, APC), apoptozisi uyaran genler (bcl-2) ve MSH2, LH1 genleri yer almaktadır. Normal bir hücrede onkogenler, hücreleri çoğalmaya yönlendirmekte iken süpressör genler ise hücre çoğalmasını denetleme ve kısıtlama işlemlerinde görev almaktadır. Onkogenler ve süpressör genler arasındaki homeostaz, sağlıklı hücre siklusundan sorumlu olmaktadır. Kanseri tiplerinin çoğu bu iki gen ailesi arasındaki homeostazın bozulması neticesinde kontrolsüz hücre çoğalması ile oluşmaktadır. Onarım genleri ise herhangi bir DNA hasarında onarım için gerekli uyarıları yapmaktan sorumludur. Onarım genleri DNA'sı hasar gören hücrenin bölünmesiklusunu durdurmakta ve onarım sürecini başlatmaktadır. Onarım işlemi uygun zamanda ve yerde başarılı olamazsa hücrenin apoptozis süreci tetiklenmektedir. Apoptozis girişimi başarısız olduğu takdirde mutasyonlu genleri içeren ve DNA yapısı değişmiş hücreler bölünerek çoğalmaktadır (Açıkgöz ve Yıldız, 2017; Deniz, 2020).

Karsinogenezin ilerleme evresinde mutasyonlu hücrelerin bölünmesiyle oluşan yeni hücreler, bağımsız olarak beslenme ve çoğalma yeteneği kazanmaktadır. Gelişme evresinde ise hücreler bağımsız büyüme sinyali, büyüme karşıtı sinyallerin duyarsızlığı, apoptozdan kaçınma, anjiogenezin sürdürülmesi gibi özellikler geliştirerek tümör kitlesi gittikçe gelişmektedir (Açıkgöz ve Yıldız, 2017). Tümör hücrelerinin büyüme, invazyon, metastaz gibi gelişim aşamaları “tümör progresyonu” terimi ile ifade edilmektedir. Normal hücrelerin rejenerasyonunda bir hücre başka bir hücreye temas ettiğinde kontakt inhibisyonu denilen, hücre gelişiminin durdurulduğu bir süreç meydana gelmektedir. Tümör hücrelerinde ise kontakt inhibisyonu gerçekleşmemektedir. Kontakt inhibisyonun gerçekleşmemesi ve hücre apoptozis mekanizmalarının devreye girmemesi sonucunda tümör hücreleri proliferasyonu artmaktadır (Sung, 2021). Tüm tümör hücreleri aynı hızda büyümektedir. Yavaş büyüyen tümör hücreleri benign tümörler olarak adlandırılmakta ve metastaz oluşturmamaktadır. Hızlı büyüyen tümör hücreleri ise malign tümörler olarak adlandırılmakta ve metastatik özellik göstererek kanserleşme meydana getirmektedir (Olgun, 2021).

### **1.1.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi**

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBACAN 2020 verilerine göre global çapta ve ülkemizde insidansı en yüksek olan kanser türü akciğer kanserinden sonra meme kanseridir. Yine GLOBACAN 2020 verilerine göre 685.000 ölümle dünya çapında kanser ölümlerinin beşinci önde gelen nedeni meme kanseri olmaktadır. Kadınlar arasında meme kanseri, 4 kanser vakasından 1'inden ve 6 kanser ölümünün 1'inden sorumludur. Aynı zamanda 110 ülkede kanser mortalitesi açısından meme kanseri ilk sırada yer almaktadır. Şekil 1.1'de görüldüğü üzere, Avustralya/Yeni Zelanda ve Batı Avrupa yüksek insidans oranlarına (100.000'de >80) sahiptir. Özellikle Belçika meme kanserinde dünyanın en yüksek insidansına sahiptir. En düşük insidans oranları (100.000'de <40) ise Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa ve Orta Amerika, Doğu ve Orta Afrika ve Güney Orta Asya'da görülmektedir. İsrail ve belirli Avrupa popülasyonlarında, BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonların yüksek prevalansı, oradaki yüksek meme kanseri insidansından sorumludur (Sung, 2021).



**Şekil 1. 1.** GLOBACAN 2020 yılına ait bölgelere özgü meme kanseri insidans ve mortalite oranları (Sung, 2021).

Meme kanseri insidansı ve mortalite riski coğrafi yapı, kültür, ırk, etnik kökene göre farklılık göstermektedir. Diğer ırklarla karşılaştırıldığında, beyaz kadınlarda meme kanseri insidansının daha yüksek olduğu görülmektedir. Siyah ırkın beyaz ırka göre daha yüksek mortalite oranına sahip olduğu görülmektedir. İspanyol/Asyalı/Pasifik Adalı kadınlarda, beyaz ve siyah ırka sahip kadınlara göre daha düşük meme kanseri insidansı ve mortalitesi görülmektedir (Deniz, 2020). Bu durumun nedenleri arasında genetik faktörlerin ilk sıra yer aldığı düşünülmektedir. Meme kanserlerinin %5-10'undan genetik faktörler sorumludur. Kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %50-60'ından, BRCA1 (Breast Cancer-1) ve BRCA-2 (Breast Cancer-2) genlerinde meydana gelen mutasyonların sorumlu olduğu bilinmektedir (Olgun, 2021).

Kalıtısal meme kanserlerinin geri kalan yaklaşık %40'ından p53 genindeki mutasyonlar sorumludur (Demircan ve Mater, 2019). Genetik faktörlere ek olarak, erken menarş, geç menopoza yaşı, ilk doğumda ileri yaş, daha az çocuk, daha az emzirme, menopozal hormon tedavisi, oral kontraseptifler ve alkol alımı, aşırı vücut ağırlığı, fiziksel hareketsizlik gibi yaşam tarzı risk faktörlerinin yüksek insidansın sorumlu olduğu bilinmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021). Dünya çapında meme kanseri insidansını azaltmada yönelik öneriler arasında aşırı vücut ağırlığını ve alkol tüketimini azaltmak, fiziksel aktiviteyi ve emzirmeyi teşvik etmek yer almaktadır. Aynı zamanda meme kanseri tarama programları ve erken teşhis meme kanseri mortalitesini azaltmada önem taşımaktadır (Sung, 2021).

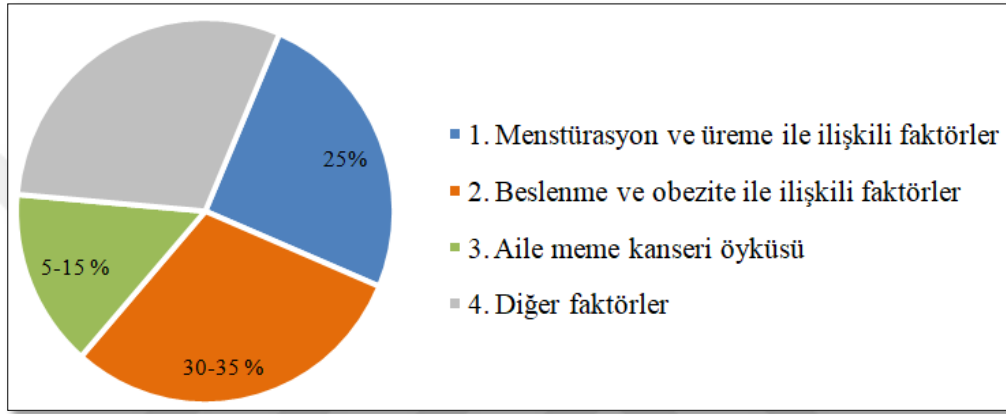
### 1.1.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri risk faktörleri, değiştirilebilir ve değiştirilemez faktörler olmak üzere iki grupta değerlendirilebilmektedir. Tablo 1.1.'de belirtildiği üzere değiştirilemez faktörler arasında cinsiyet, yaşlılık, meme veya yumurtalık kanseri içeren aile öyküsü, ırk/etnik köken, hamilelik - emzirme, adet dönemi - menopoza, meme dokusunun yoğunluğu, daha önce yaşanmış meme kanseri öyküsü, kanser ile ilişkili olmayan meme hastalıkları ve radyasyon maruziyeti yer almaktadır. Değiştirilebilir meme kanseri risk faktörleri arasında hamilelik esnasında diyetstilbestrol alımı, düşük fiziksel aktivite, alkol ve sigara tüketimi, yetersi vitamin takviyesi, işlenmiş gıda tüketimi, yapay ışığa maruz kalma, kimyasallara maruz kalma, antibiyotikler, antidepresanlar, statinler, antihipertansif ilaçlar kullanımı yer almaktadır (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Tablo 1. 1.** Meme kanseri risk faktörlerinin sınıflandırılması.

| Değiştirilemez Faktörler             | Değiştirilebilir Faktörler |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Cinsiyet, Yaşlılık                   | Seçilmiş ilaçlar           |
| Radyasyon maruziyeti                 | Fiziksel aktivite          |
| Aile öyküsü                          | Obezite                    |
| İrk/Etnik köken                      | Alkol ve sigara tüketimi   |
| Üreme                                | İşlenmiş gıda tüketimi     |
| Metabolik sendrom ve insülin direnci | Yapay ışığa maruz kalma    |
| Meme dokusunun yoğunluğu             | Kimyasala maruz kalma      |

Meme kanserlerinde değiştirilemez faktörler %30-40 risk oluştururken değiştirilebilir faktörler yaklaşık %60-70 oranında risk oluşturmaktadır. Değiştirilemez faktörlerden kalıtsal risk faktörleri yaklaşık %5-15, üreme ile ilişkili olan risk faktörleri ise yaklaşık %25 oranında risk oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra değiştirilebilir risk faktörleri arasında ki diyetin risk azaltıcı etkisi yaklaşık %30-35 civarındadır (Açıkgöz ve Yıldız, 2017; Deniz, 2020). Meme kanseri risk faktörlerinin dağılımını gösteren grafik şekil 1.2.'de verilmiştir.



şekil 1. 2. Meme kanseri risk faktörleri dağılımı.

#### Değiştirilemez faktörler:

**Cinsiyet:** Kadınlarda meme kanserine yakalanma riski erkeklerden yaklaşık 100 kat dahafazla olmakta ve tüm meme kanserlerinin %1'i erkeklerde görölmektedir (Açıkgöz ve Yıldız, 2017).

**Yaşlılık:** Kadınlarda yař artışı meme kanseri riskini arttırmaktadır. 50 yař üstü bireyler meme kanseri hastalarının yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Meme kanserinin moleküler alt tipleri ile hastanın yaşı arasında ilişki gözlemlenmiştir. Agresif dirençli üçlü negatif meme kanseri alt tipi en sık 40 yaşın altındaki gruplarda teşhis edilmekte iken 70 yař ve üzeri hastalarda lüminal A alt tipi meme kanseri ile karşılaşılmaktadır. Yař ile paralel meme kanseri riski artış nedeni, diğer kanser türlerinde olduğu gibi çok sayıda hücresel değişimlerin birikmesi ve potansiyel karsinojenlere maruziyetin artması olabileceği düşünölmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021; Olgun, 2021).

**Aile öyküsü:** Meme kanserine yakalanan hastaların yaklaşık %13-19'unda aynı aile öyküsüne rastlandığı görölmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021).



**Genetik mutasyonlar:** BRCA-1, BRCA-2, TP53, CDH1, PTEN ve STK11 genlerindeki mutasyonların meme kanseri riskinin artmasıyla yüksek oranda ilişkili olduğu bildirilmiştir (Łukasiewicz ve ark., 2021; Olgun, 2021).

**İrk-Etnik köken:** İrk ve etnik kökenle meme kanseri ilişkisinin nedeni tam olarak henüz anlaşılamamış olsa da genetik yatkınlıkların payı olduğu düşünülmektedir. Meme kanseri insidans oranı, Hispanik olmayan beyaz kadınlar arasında en yüksek iken en yüksek mortalite oranı ise siyahi kadınlarda daha yüksektir (Łukasiewicz ve ark., 2021). Ayrıca bu coğrafik insidans ve mortalite oranlarının, tanı ve tedaviye erişebilirlik açısından sosyo-ekonomik gelişmişlik düzeyi ile bağlantılı olduğu da düşünülmektedir (Açıkgöz ve Yıldız, 2017).

**Üreme:** Kadınlarda endojen hormonlara maruziyet ile meme kanseri riski artışında paralellik görülmektedir. Gebelik, emzirme, ilk adet görme (menarj) ve menopoz gibi spesifik olayların meydana gelmesi, bunların süresi ve beraberindeki hormonal dengesizlik, meme mikroçevresinde potansiyel karsinojenik olayların indüksiyonuna sebep olabilmektedir. Erken menarj yaşı meme kanseri riskini arttırmaktadır. Doğal erken menopoz yaşı, erken yaşta hamilelik, hamilelik sayısındaki artış ve emzirme süresinin uzun olması ise meme kanseri riskini azaltmaktadır (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Metabolik sendrom ve İnsülin direnci:** Düşük HDL kolesterol, yüksek kan şekeri, yüksek trigliserit seviyesi, hipertansiyon, insülin, C-peptid ve insülin benzeri büyüme faktör-1 seviyelerinde yükseklik meme kanseri riski ile ilişkilendirilmektedir (Açıkgöz ve Yıldız, 2017). Artmış progesteron ve azaltmış östrojen seviyeleri meme karsinogenezi için koruyucu etki göstermektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Meme dokusunun yoğunluğu:** Genel olarak meme dokusundaki yoğunluk meme kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Radyasyon maruziyeti:** Radyasyon maruziyeti meme kanseri riskini arttırıldığı bildirilmiştir (Açıkgöz ve Yıldız, 2017).

## Değiştirilebilir Faktörler

**Seçilmiş İlaçlar:** Hamilelik sırasında dietilstilbestrol alımının anne ve çocuk için meme kanserini arttırıcı risk teşkil ettiği görülmüştür. Paroksetin, trisiklik antidepresanlar, seçici serotonin geri alım inhibitörleri ve uzun süreli antibiyotik kullanımı, meme kanseri riskini arttırdığı görülmüştür (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Fiziksel aktivite:** Fiziksel aktivitenin endojen seks hormonlarına maruziyeti azalttığına, bağışıklık sistemi tepkilerini veya büyüme faktörü seviyelerini değiştirerek kanseri önleyici etki gösterdiğine dair hipotezler mevcuttur (Łukasiewicz ve ark., 2021)

**Obezite:** Obezitenin menopoza öncesi kadınlarda daha yüksek ölüm oranlarıyla ve daha yüksek kanser nüksetme olasılığıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Vücut yağındaki artış, enflamatuar durumu artırabilmekte ve pro-karsinojenik olayları kolaylaştıran dolaşımdaki hormonların seviyelerini etkileyebilmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Alkol tüketimi:** Alkol tüketiminin östrojen seviyelerinde artışa sebebiyet verdiği ve dolayısıyla hormonal dengesizlik oluşturarak karsinogenez riskini arttırdığı düşünülmektedir. Alkol tüketiminin östrojen pozitif meme kanseri riskini arttırdığı gözlemlenmiştir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Sigara tüketimi:** Tütün içeriğindeki karsinojenler meme dokusuna taşınarak, onkogenler ve supressör genlerdeki (özellikle p53) mutasyonlara yatkınlığı arttırmaktadır. Aktif içiciliğin yanı sıra pasif içicilik de pro-karsinojenik olayları indükleyerek, meme kanseri riskini arttırmaktadır (Olgun, 2021).

**İşlenmiş gıda tüketimi:** Diyetle ultra-işlenmiş gıdaların %10 artmasının, %11 daha fazla meme kanseri riski ile ilişkili olduğu görülmüştür. Sebzeler, meyveler, baklagiller, kepekli tahıllar ve yağsız protein açısından yüksek bir diyet, meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda son zamanlarda yapılan çalışmalar ile vitamin takviyelerinin özellikle D vitaminin meme kanserini önleyici etkiler sağlayabileceği düşünülmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Yapay ışığa maruz kalma:** Geceleri yapay ışığa maruziyetin melatonin ritmini bozarak epigenetik değişikliklere neden olabileceği ve dolayısıyla meme kanseri riskini arttırabileceği düşünülmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Kimyasala maruz kalma:** Diklorodifeniltrikloroetan (DDT) ve poliklorlu bifenil (PCB) gibi kimyasallara erken maruz kalmanın meme bezlerinin gelişimini bozduğuna dair araştırmalar mevcuttur. Polisiklik aromatik hidrokarbonlara (PAH), sentetik liflere, organik çözücülere, yağ buharına ve insektisitlere artan maruz kalmanın da meme kanseri riskini artırıcı potansiyel bulundurduğu görülmüştür (Łukasiewicz ve ark., 2021)

#### 1.1.4. Meme Kanseri Tanısında Kullanılan Biyobelirteçler

Meme kanseri tanısında kullanılan prognostik biyobelirteçler Tablo 1.2.'de verilmiştir.

**Tablo 1. 2.** Meme kanseri tanısında kullanılan biyobelirteçler.

| Prognostik Biyobelirteçler                        |
|---------------------------------------------------|
| Östrojen reseptörü                                |
| Progesteron reseptörü                             |
| İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) |
| Antijen Ki-67                                     |
| Mib1 (Ki-67'ye karşı antikor)                     |
| Dolaşımdaki dairesel RNA'lar (circRNA'lar)        |
| TP53 (P53)                                        |
| MikroRNA'lar (miRNA)                              |
| Tümörle ilişkili makrofajlar                      |
| Enflamasyon bazlı modeller                        |

**Östrojen reseptörü:** İnvaziv meme karsinomlarının yaklaşık %70-75'i önemli ölçüde artmış östrojen reseptörü(ER) ekspresyonu görülmektedir. Meme kanseri aile öyküsü olan hastalarda risk durumunu değerlendirmek için ER ekspresyon seviyeleri biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Xu ve ark., 2020).

**Progesteron reseptörü:** Östrojen reseptörü pozitif hastalarda progesteron reseptörü yüksek oranda eksprese edilirken, östrojen reseptörü negatif hastalarda ise oldukça nadir eksprese edilmektedir. Yüksek progesteron ekspresyonu genel sağkalım, nüksetme süresi, iyi prognoz ile paralel olarak ilişkilendirilirken düşük progesteron seviyesi hastalığın daha agresif seyri ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Xu ve ark., 2020).

**İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2):** Meme kanserlerinin yaklaşık %15-25'inde HER2 ekspresyonu görülür. HER2 amplifikasyonu, proonkojenik sinyal yollarının aşırı aktivasyonuna yol açmakta ve kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine sebep olmaktadır. Serum HER2 düzeyleri, tümör varlığı veya nüksetme durumu hakkında bilgi veren biyobelirteç görevi taşımaktadır (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Antijen Ki-67:** Ki-67 proteini, kanser hücrelerinin çoğalması hakkında bilgi veren bir belirteç görevi taşımaktadır. Ki-67 ile bağlantılı proliferatif aktiviteler, tedaviye yanıt ve nüks süresi ile ilişkilendirilmekte ve kanserin agresifliğini yansıtmaktadır. Ki-67'nin aşırı ekspresyonu hastaların daha kötü klinik sonuçları ile ilişkilendirilmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021; Park ve ark., 2022).

**Mib1 (Ki-67'ye karşı antikor):** Mib1 (Ki-67'ye karşı antikor) meme kanserinde tanısal biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Mib1 ve Ki-67 seviyelerinde azalma ameliyat öncesi tedaviye iyi bir yanıt verilmesi ile ilişkilendirilmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021; Park ve ark., 2022).

**E-kadherin:** Epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT) e-kadherin proteini önemli bir rol oynamaktadır. E-kadherin ekspresyonundaki azalış, metastaz riskinde artış ile ilişkilendirilmektedir (Smolarz, Nowak ve Romanowicz, 2022).

**Dolaşımdaki dairesel RNA'lar (circRNA'lar):** Dolaşımdaki dairesel RNA'lar (circRNA'lar), apoptoz, proliferasyonda artış, metastazda artış ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, TNBC, HER2-pozitif ve ER-pozitif gibi farklı meme kanseri türlerinde spesifik circRNA'lar rapor edilmiştir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**TP53 (P53):** P53 proteini, hücre döngüsünü durdurma, apoptoza yönlendirme, DNA onarımı ve hücre yaşlanma gibi hücre stresine tepki mekanizmalarında rol almaktadır. TP53 (P53) genindeki işlev kaybı mutasyonları, meme kanseri dahil olmak üzere pek çok kanser türü ile ilişkilendirilmektedir. Meme kanserinde, TP53 mutasyonlarının prevalansı, TNBC'li hastalarında yaklaşık %80 ve Luminal A tipi meme kanseri hastalarında %10 şeklindedir (Xu ve ark., 2020).

**MikroRNA'lar (miRNA):** Bazı miRNA'lar tümörün gelişimi, ilerlemesi ve tedaviye yanıtı ile ilişkilendirilmektedir. Meme kanseri doku örneklerinde anormal şekilde eksprese edilen miRNA'ların biyobelirteçler olarak araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Smolarz, Nowak ve Romanowicz, 2022).

**Tümörle ilişkili makrofajlar:** Makrofajlar, immünomodülatör özellik taşımaktadırlar. Fenotiplerine göre M1 veya M2 olarak ikiye ayrılmaktadırlar. M1 benzeri fenotipe sahip makrofajlar, iyi hastalık seyri ile ilişkilendirilmekte iken, M2 benzeri fenotip, potansiyel olarak immünosupresyon, anjiyogenez, tümör hücresi proliferasyonu ve invazyonunun teşvik etmesi ile ilişkilendirilmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Enflamasyon bazlı modeller:** Tümör mikroçevresindeki inflamasyonlar ve immün yanıtlar, kanser gelişimi ve ilerlemesinde rol oynamaktadır (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Nötrofil-Lenfosit Oranı:** Kanser hastalarında nötrofil-lenfosit oranı ile hayatta kalma arasında ilişki kurulmuştur. Nötrofiller, lenfositlerin sitolitik aktivitesini baskılamakta, anjiyogenezi arttırmakta, tümör büyümesi ve ilerlemesine yol açmaktadır.

**Lenfosit-Monosit Oranı:** Kanser prognozu ile lenfosit-monosit oranları ile ilişkilendirilmektedir. Tümör mikroçevresinde, monositler ve makrofajlar tarafından salgılanan sitokinler ve serbest radikaller, anjiyogenez, tümör hücresi invazyonu ve metastaz ile ilişkilendirilmektedir.

**Trombosit- Lenfosit Oranı:** Yüksek trombosit sayısı, çeşitli kanser türlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Trombositler, tümör anjiyogenezinin ve tümör büyümesini uyarabilmektedir.

### 1.1.5. Meme Kanserinde Moleküler Sınıflandırma

Genetik yüzdeki farklılıklar, benzer kanserlerde farklı klinik seyirlere sebep olmaktadır. Gen ekspresyonu çalışmaları sonucu yapılan moleküler sınıflandırmaya göre meme kanserlerini 5 moleküler alt tipte tanımlamak mümkündür. Bunlar; Luminal A, Luminal B, TNBC, Her2 pozitif, Her2 negatif meme kanserleridir (Smolarz, Nowak ve Romanowicz, 2022). Meme kanserinin moleküler alt tipleri Tablo 1.3.'de verilmiştir.

**Tablo 1. 3.** Meme kanserinin moleküler alt tipleri.

|                                   | Östrojen<br>Reseptörü (ER) | Progesteron<br>Reseptörü (PR) | HER2 Reseptörü |
|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------|
| Luminal A                         | +                          | +                             | -              |
| Luminal B                         | +                          | -                             | -/+            |
| TNBC                              | -                          | -                             | -              |
| HER2-Pozitif                      | -                          | -                             | +              |
| HER2-Over Eksprese                | -                          | -                             | ++             |
| HER2-Negatif/<br>Claudin-low (CL) | -                          | -                             | -              |

#### Luminal Tip Meme Kanserleri:

Batı popülasyonlarındaki tüm meme kanseri vakalarının neredeyse %70'ini Luminal meme kanserleri oluşturmaktadır. Luminal meme kanserleri, östrojen reseptörü (ER) -pozitif tümörlerdir. Luminal benzeri tümörler, proliferasyon ile ilişkili yolların ya da lümen tarafından düzenlen yolların aktivasyonuna göre Luminal A ve Luminal B olmak üzere 2 alt tipe ayrılmaktadır. Östrojen reseptörü (ER), Luminal A ve B alt tipi tümörlerde benzer ekspresyon seviyeleri göstermektedir ve luminal tip tümörler ile olmayanlar arasında ayırıcı özellik oluşturmaktadır (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Luminal A Meme Kanseri:**

Luminal A tümörleri, östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif, HER2reseptörü negatiftir. Östrojen reseptörü aktivitesi ile bağlantılı genlerin yüksek aktivasyonu ve HER2 reseptörü ile bağlantılı genlerin düşük ekspresyonu söz konusudur. Lümen epiteli ile ilişkili genlerin veya proteinlerin yüksek ekspresyonu görülürken proliferasyon ile ilişkili genlerin düşük ekspresyonu görülmektedir. Bu alt tipte, yavaş büyüme ve en iyi prognoza sahip olma eğilimi görülmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

**Luminal B Meme Kanseri:**

Luminal B tümörleri, östrojen reseptörü (ER) pozitif, progesteron reseptörü (PR) negatif ve HER2 pozitif olabilmektedirler. Proliferasyonla ilişkili genlerin (MKI67, AURKA) yüksek ekspresyonu söz konusu iken lümen epiteli ile ilişkili genlerin( PR, FOXA1) veya proteinlerin daha düşük ekspresyonu söz konusudur. Bu alt tipe ait tümörler daha yüksek dereceli olduğu ve daha kötü prognoza sahip olduğu görülmektedir (Smolarz, Nowak ve Romanowicz, 2022).

**Bazal Benzeri/Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC):**

Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC), östrojen reseptörü (ER) negatif, progesteron reseptörü (PR) negatif ve HER2 negatif tümörlerdir. Bu tip tümörler meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Łukasiewicz ve ark, 2021). Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC), 40 yaşından genç kadınlar ve Afrikalı-Amerikalı kadınlar arasında daha yaygın olarak görülmektedir. Bu tip kanserler BRCA1 genindeki mutasyon ile ilişkilidir. TNBC biyolojik olarak agresif olma eğilimi göstermekte ve genellikle daha kötü bir prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Smolarz, Nowak ve Romanowicz, 2022).

**HER2-Zenginleştirilmiş Meme Kanseri:**

HER2 ile zenginleştirilmiş grup, meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturmaktadır. Östrojen reseptörü (ER) negatif, progesteron reseptörü (PR) negatif ve HER2 pozitif/aşırı eksprese tümörlerdir. ER ve PR'nin yokluğu ile HER2'nin yüksek ekspresyonu ile karakterize edilir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

Bu tip meme kanserlerinde proliferasyonla ilişkili genlerin ve proteinlerin (ERBB2/HER2,GRB7) ekspresyonu görülmekte ve APOBEC3B aracılı mutajeneze dair kanıtlar bulunmaktadır. HER2 ile zenginleştirilmiş kanserler, lümen kanserlerinden daha hızlı büyümektedir. Fakat HER2-hedefli tedavilerin gelişimi ile bu tip meme kanserinin prognozu iyileştirilmiştir (Smolarz, Nowak ve Romanowicz, 2022).

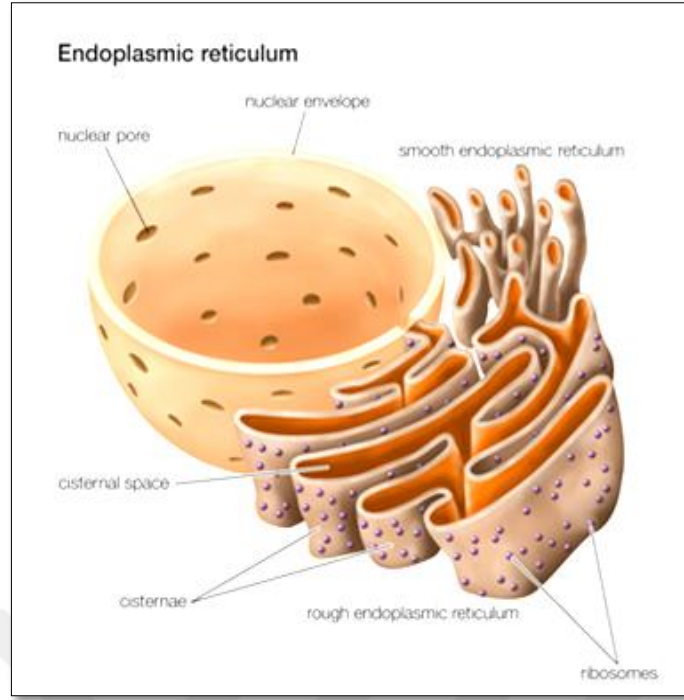
### **Claudin-Düşük Meme Kanseri:**

Claudin-low (CL) meme kanserleri, östrojen reseptörü (ER) negatif, progesteron reseptörü (PR) negatif ve HER2 negatif tümörlerdir. CL tümörleri, tüm invaziv meme kanserlerinin %7-14'ünü oluşturmaktadır. CL alt tipi tümörlerde, claudin 3, 4 ve 7, okludin ve e-cadherin gibi hücre-hücre yapışmasında yer alan genlerin düşük ekspresyonu görülmektedir. Ayrıca, bu tümörlerde epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) genlerinin yüksek ekspresyonunu ve kök hücre benzeri gen ekspresyon paternleri görülmektedir. Ayrıca, CL tümörleri belirgin immün ve stromalhücre infiltrasyonuna sahiptir (Smolarz, Nowak ve Romanowicz, 2022).

### **1.2. Endoplazmik Retikulum (ER) Nedir ve Görevleri Nelerdir?**

Endoplazmik Retikulum (ER), ökaryotik hücrelerdeki en büyük organelidir. ER, nükleer zarıdan sitoplazma içine uzanan, zarla çevrili, boru ve keselerden oluşan bir ağ yapısındadır. ER, hücre içerisinde farklı işlevlere sahip olan kesintisiz halde 3 zar alanı bulundurmaktadır. Bunlar kaba ER, transsilyonel ER, düz ER'dır (Schwarz ve Blower, 2016). ER komponentleri Şekil 1.3.'de görülmektedir. Kaba ER, proteinlerin sentezlendiği, dış yüzeyi ribozomlarla kaplı alandır. Transsilyonel ER, protein işlenmesinde rol oynayan, veziküllerin golgi aygıtına girmek üzere ayrıldığı yerdir. Düz ER, lipid metabolizmasında görevlidir (Schwarz ve Blower, 2016).





**Şekil 1. 3.** Endoplazmik retikulum organel yapısı (Schwarz ve Blower, 2016).

Nükleer zarf, iç nükleer membran ve dış nükleer membran olmak üzere iki lipit çift tabakasından oluşmakta ve periferik ER ile ortak bir lümeni paylaşmaktadır. Nükleer zarfın iç ve dış membranında bulunan yüzlerce nükleer gözenek, molekülün boyutuna bağlı olarak çeşitli difüzyon veya düzenlenmiş taşıma hızlarında, RNA'lar ve proteinler dahil pek çok moleküllerin taşınmasına izin vermektedir. ER' i oluşturan farklı yapılar, hücre içinde çok çeşitli ve özel işlevler yerine getirmektedir. ER alanlarının şekli ve dağılımı, çeşitli entegre zar proteinleri, diğer organeller ve hücre iskeleti ile etkileşimler tarafından düzenlenmektedir. Bu etkileşimler dinamiktir ve hücre döngüsü, hücre farklılaşması, hücre içi sinyaller veya protein etkileşimleri yoluyla hücre içindeki değişiklikleri yansıtmaktadır (Schwarz ve Blower, 2016). ER, kolesterol, triaçilgliserol ve fosfolipitler gibi lipid türlerinin biyosentezi, glikojenin parçalanması, detoksifikasyon ve  $\text{Ca}^{2+}$  homeostazının korunması, protein sentezi ve taşınması, protein katlanması dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlemlerde görev almaktadır (Karamyshev, Tikhonova ve Karamysheva, 2020). ER, diğer tüm hücresel organellerle temas halindedir ve bu organellerle koordinasyon halinde çalışarak, hücresel homeostazi korumaya yönelik roller üstlenmektedir (Shnyder ve Hubbard, 2002; (Karamyshev, Tikhonova ve Karamysheva, 2020)

Fiziksel olarak mitokondri ile bağlantılıdır ve  $Ca^{2+}$  + homeostazının kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Plazma zarı ile temas halindedir, endozomlarla birleşir ve endozomlarda kolesterolün korunmasına katkıda bulunmaktadır. ER, fagoforla temas halindedir ve olgun bir otofagozom oluşturabilir, bu sebeple otofajiye dahil olduğunu düşünülmektedir. ER kendi başına veya diğer hücrel organellerle uyum içinde, hücrede sentezlenen tüm proteinlerin yaklaşık üçte birini oluşturan salgı ve transmembran proteinlerin biyosentezi, katlanması, birleştirilmesi ve taşınmasında görev almaktadır. Ayrıca ER, protein yıkımı, sinyal iletimi, lipid metabolizması ve hücre-hücre iletişimini içeren önemli hücrel ve organizmal süreçlerde de görev almaktadır (Schwarz ve Blower, 2016; Karamyshev, Tikhonova ve Karamysheva, 2020).

### **1.2.1. Endoplazmik Retikulumda Protein Sentezi ve Taşınması**

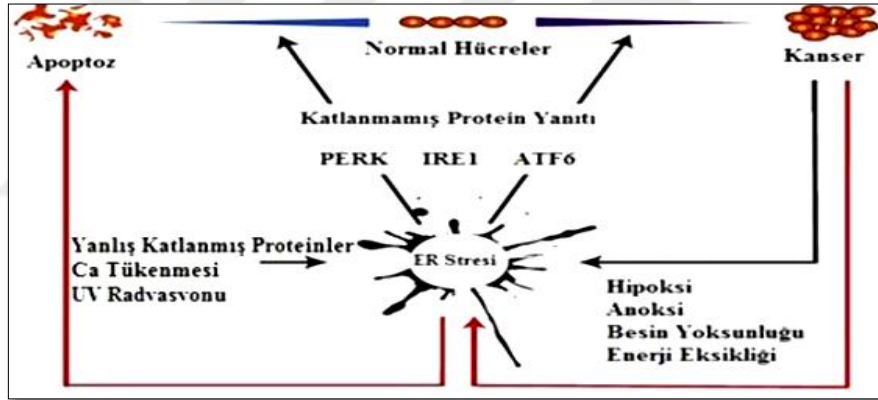
Endoplazmikretikuluma, Golgiaygıtına, lizozomlara ve plazma zarına hedeflenecek veya salgılanacak olan pek çok protein ER zarına bağlı ribozomlarda sentezlenmektedir. Translasyon sürecinde sentezlenen polipeptid zincirleri, protein katlanması ve işlenmesi için, ER içerisine girmektedir. Proteinlerin hangi organellerin yapısına katılacağı veya nereye gönderileceği ER'da hedeflenmektedir (Schwarz ve Blower, 2016).

Protein sentezi, ER'nin sitozolik yüzüne lokalize olan ribozomlarda gerçekleşmektedir. Salgı veya bütünleyici zar proteinlerinin translasyonu sitozolde başlamaktadır. Ardından bu mRNA'ları içeren ribozomlar, sinyal tanıma partikülü (SRP) tarafından tanınmakta ve yeni oluşan polipeptitin amino terminali içindeki bir sinyal sekansı aracılığıyla ER zarına alınmaktadır. Translasyon ER'de devam etmekte ve ortaya çıkan polipeptit, birkaç Sec proteini içeren ve lipid çift katmanını kapsayan bir kanal olan translokon yoluyla birlikte translasyonel olarak ER'ye girmektedir. Protein sentezi ve ER lümenine translokasyonun ardından, salgılanacak bir protein, şaperonlar ve katlama enzimlerinin yardımıyla uygun katlanma ve modifikasyonlardan geçmektedir. Bu modifikasyonlar, N-bağlı glikosilasyon, disülfid bağı oluşumu ve oligomerizasyonu içermektedir. Salgılanacak olan proteinler, paketlenme ve taşıma işlemleri için şaperonlar tarafından salınarak golgiye gönderilmektedir (Shnyder ve Hubbard, 2002; Schwarz ve Blower, 2016).

Sitoplazma içinde serbest kalacak veya mitokondri, kloroplast, peroksizom yapısına katılacak proteinler ise serbest ribozomlarda sentezlenmekte ve proteine çevrim bittiğinde sitoplazma içine salınmaktadır (Shnyder ve Hubbard, 2002).

### 1.2.2. Endoplazmik Retikulum ve Kanser İlişkisi

Proteinlerin hücre içinde birçok görevi vardır. Proteinlerin işlevsel özellik kazanabilmeleri için görevlerine uygun üç boyutlu yapılar katlanması gerekmektedir. Doğal ve fonksiyonel formuna ulaşamayan proteinler, yanlış kanlanmakta veya kümelenerek agregat oluşturmaktadır. Proteinlerin anormal katlanması ve agregat oluşturma hücreler için toksik olma potansiyeli taşımaktadır. Agregasyonu önleme ve etkin katlanmayı teşvik etmeye yönelik, hücre koruma mekanizmaları mevcuttur (Tatar ve Tatar, 2018). ER'nin protein kalite kontrol mekanizmaları; yeterli protein katlanmasının hızlandırılması, katlanmamış protein yanıtının (UPR) aktivasyonu ve ER ile ilişkili bozunma (ERAD) yoluyla protein klirensi veya otofaji şeklindedir. Bu mekanizmaların yeterli olamaması sonucunda ER stres tepkileri ortaya çıkmaktadır. (Schwarz ve Blower, 2016; Karamyshev, Tikhonova ve Karamysheva, 2020). Endoplazmik retikulum ve kanser ilişkisini gösteren görsel Şekil 1.4.'de verilmiştir.



Şekil 1. 4. Endoplazmik retikulum ve kanser ilişkisi (Tatar ve Tatar, 2018).

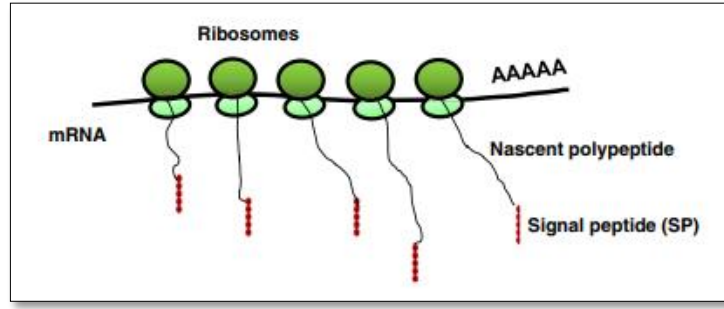
Kanser hücreleri hem intrinsik hem de ekstrinsik faktörler nedeniyle ER stresine maruz kalmaktadır. Kanser hücreleri ER stres yanıtlarından yararlanarak, hayatta kalmayı ve büyümeyi sağlayabilmektedir. ER şaperon proteini BİP'nin çeşitli kanserlerde yüksek miktarda eksprese edildiği bilinmekte ve sağkalım ile ilişkilendirilmektedir. Hipoksi, düşük pH, düşük besin öğeleri ile karakterize tümör mikroçevresi, ER stresine neden olmaktadır. Normal şartlarda bu mikroçevrenin devamlılığı apoptoz yoluyla hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Fakat kanser hücreleri UPR'de değişiklik oluşturduğundan dolayı kronik strese uyum sağlayabilmekte ve hücre ölümünden kaçınabilmektedir. (Karamyshev, Tikhonova ve Karamysheva, 2020).

ER'nin normal işlevindeki aksaklıklar sonucunda meydana gelen ER stresi, birçok hastalığın patogenezi tetiklemektedir. Bu durum, immün sisteminde bozukluklar, metabolik hastalıklar, nörodejenatif hastalıklar ve kanser ile ilişkilendirilmiştir (Tatar ve Tatar, 2018; Karamyshev, Tikhonova ve Karamysheva, 2020).

### 1.3. Sekretom nedir?

Sekretom terimi 2004 yılında Tjalsma ve arkadaşları tarafından literatüre kazandırılmıştır. Sekretom terimi salgı yolağının bileşenleriyle birlikte hücre tarafından dışarı salgılanan tüm faktörleri kapsamaktaydı. 2010 yılında ise bu terim, sadece hücre dışı boşluğa salgılanan proteinler olarak revize edilmiştir. İnsanlarda hücre dışına salgılanan proteinler, tüm proteomun yaklaşık %13-20'sini oluşturmaktadır (Uhlén ve ark, 2019). Hücre sekretomunda büyüme faktörleri, kemokinler, sitokinler, adezyon molekülleri, proteazlar, interferonlar (IFN'ler), tümör nekroz faktörleri (TNF'ler) ve bazı reseptörler yer almaktadır (Lai ve ark, 2010). Hücre dışına salgılanacak proteinler, ribozom bağlı kaba endoplazmik retikulumda (RER) sentezlenmektedir. Endoplazmik retikulumda proteinlerin sentezlenmesi, katlanması, olgunlaştırılması ve transportu gerçekleştirilmektedir (Tatar ve Tatar, 2018). Salgı proteinleri, sırasıyla kaba ER'dan golgi aygıtına oradan salgı veziküllerine ve oradan da hücre dışına aktarımı izleyen bir salgı yolağını takip etmektedirler (Shnyder ve Hubbard, 2002; Schwarz ve Blower, 2016).

Salgı proteinleri, içerdikleri bir amino terminal sinyal peptidi (SP) sayesinde ER'a yönlendirilmektedir. SP'ler, 16-45 amino asit uzunluğunda, 1-2 bazik amino asit içeren, pozitif yüklü bir amino terminal alana sahiptir. Bu bölgenin etrafında 7-15 hidrofobik a-sarmal oluşturan amino asitlerden oluşan hidrofobik çekirdek bulunur, devamında küçük amino asitlere sahip polar C-terminali ve sonunda sinyal peptidaz bölünme bölgesi yer almaktadır. SP, translasyon sırasında sinyal peptidazı tarafından parçalanır ve olgun protein, sentezin sonunda ER lümenine salınır. SP'lerin uzunluğu oldukça değişken olmakla beraber belirgin bir dizi homolojisi göstermemektedir (Mukherjee ve Mani, 2013). Ribozomlarda protein üretimini gösteren görsel Şekil 1.5'de verilmiştir.



**Şekil 1. 5.** Ribozomlarda protein üretimi (Uhlén ve ark., 2019).

Sekretomda yer alan proteinler, hücreler arasındaki sinyalizasyonda, hücreiletişiminde ve migrasyonunda önemli roller oynamaktadır (Makridakis ve Vlahou, 2010). Sekretom proteinlerinin insan vücudundaki fizyolojik ve patolojik rollerini anlamak, doğal biyolojik süreçlerin anlaşılması, diyagnozun ve prognozun anlaşılması ve terapötik stratejilerin geliştirilmesi için oldukça önemli kaynaklardır. Ayrıca salgı proteinleri, dolaşıma girme ihtimali taşıyan hücrelerden salgılanmaları sebebiyle serolojik belirteçler olarak kullanılabilme potansiyeli bulundurmaktadır (Makridakis ve Vlahou, 2010; Uhlén ve ark, 2019).

### **1.3.1. Sekretom Çalışmalarının Önemi ve Kanser Araştırmalarındaki Yeri**

ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından yapılan tanıma göre, biyobelirteç, normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya terapötik bir maddeye verilen farmakolojik tepkilerin bir göstergesi niteliğinde objektif olarak ölçülen ve değerlendirilen bir özelliktir (Pavlou ve Diamandis, 2010). Biyobelirteç keşiflerinde genellikle kaynak olarak plazma/serum, doku, idrar, BOS, tükürük, hücre kültürü materyalleri kullanılmaktadır (Köse ve Maden, 2013). Biyobelirteç keşfi çalışmalarında, DNA/RNA elde edilmesi ve çalışılması kolay örnekler olmasına rağmen, bunlardan elde edilen bilgide sınırlamalar mevcuttur (Kasap ve Akpınar, 2011). Canlı bir organizmada genom değişmeden aynı kalırken, proteom değişkendir ve modifikasyonlara uğramaktadır (Nenni, Çelebir ve Süslü, 2020). Proteinler ribozomlarda sentezlendikten sonra basit kimyasal grupların veya kompleks moleküllerin eklenmesi ile translasyon sonrası modifikasyonlara uğramaktadırlar. Genom projesinde elde edilen bilgiler sonucunda insanda yaklaşık 20 ile 25 bin arasında protein kodlayan genin var olduğu tahmin edilmektedir (Pavlou ve Diamandis, 2010). Ancak protein çeşitliliği açısından bakıldığında, alternatif birleştirme (alternatif splicing) ve translasyon sonrası modifikasyonlar göz önüne alındığında, bu sayı iki milyon protein veya protein fragmentinin bulunma olasılığı mevcuttur (Kasap ve Akpınar, 2011).

Proteomik çalışmalarla sadece proteinlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi değil, aynı zamanda yerleşimlerinin, değişimlerinin, diğer protein ve makro moleküllerle etkileşimlerinin, aktivitelerinin ve nihayetinde işlevlerinin belirlenmesi sağlanabilmektedir. Herhangi bir biyokimyasal sürecin aydınlatılmasında yalnızca genom analizi yeterli olmamakta, proteom analizlerini de içine alan bütünsel bir değerlendirme gerekmektedir. Bu durum, RNA seviyesindeki regülasyonların proteine yansımayaabilmesi ve genomik temelli yaklaşımlarla genler arası ilişkinin bir kısmının aydınlatılabilesine rağmen son ürün olan proteinlerin çoğunun translasyon sonrası modifikasyonlarının ön görülememesinden kaynaklanmaktadır (Kasap ve Akpınar, 2011).

Kanserli hücrelerden salgılanan proteinler, farklılaşmayı, invazyonu, metastazı, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşimlerini düzenleyerek kanserin anjiyogenezinde rol alan önemli moleküllerdir. Aynı zamanda kanserli hücrelerden salgılanan bu proteinler kan ve idrar gibi vücut sıvılarına girmekte ve ölçülebilmektedirler (Uysal, 2015). Bu nedenle biyopsi gibi girişimsel uygulamalara gerek kalmadan vücut sıvılarından analiz edilmeleri mümkündür. Bu özelliklerinden dolayı sekretom, kanserli hücrelerde biyobelirteç keşfi için çalışılabilecek önemli bir alandır (Pavlou ve Diamandis, 2010). Son 50 yılda yapılan araştırmalar, karsinoembriyonik antijen (CEA), alfa-fetoprotein (AFP), prostat spesifik antijen (PSA), kanser antijeni 125 (CA 125), CA 15-3 ve CA 19-9 gibi klinik olarak yararlı kanser biyobelirteçlerinin tanımlanmasına olanak vermiştir. Mevcut biyobelirteçlerin birçoğu, tarama amaçlarına uygun yeterli özgüllük ve duyarlılık göstermemektedir. Mevcut ilaçlar ile özellikle üçlü negatiflik (triple-negative) gösteren hastalarda, ilacın etki mekanizmasına bağlı olarak direnç geliştirebilmekte ve hastalıktan kurtulma oranını düşürmektedir. Bu sebeplerden dolayı mevcut teşhis yöntemlerinin geliştirilmesine ve daha yüksek performanslı tedavi stratejilerin oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Pavlou ve Diamandis, 2010; Lai ve ark, 2010). Normal meme hücrelerinin tümör hücrelerine dönüşümü ve metastazın, hem transkripsiyon hem de translasyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Tümör başlangıcı ve metastaz ile bağlantılı moleküler mekanizmaları daha iyi anlamak için normal meme hücreleri, invaziv olmayan meme kanseri hücreleri ve invaziv meme kanseri hücreleri arasındaki gen ekspresyon ifadeleri ve protein ekspresyon ifadelerini tanımlamaya yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur (Lai ve ark, 2010; Mukherjee ve Mani, 2013).

Bu alışmalar neticesinde meme kanseri sürecinde görev alan sinyal yolaklarının ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması ile meme kanseri tedavisine yönelik önemli gelişmeler gerçekleşmeye başlamıştır. Literatürdeki çalışmaların sonuçlarında, benign ve malign tümörler arasında protein ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılıklar grlmektedir. Meme kanserinde ölüm genellikle metastaz ile ilişkili olduğundan, erken tanı için biyobelirteçlerin keşfedilmesine duyulan ihtiyaç oldukça önemlidir (Makridakis ve Vlahou, 2010). Kanser hücrelerinin normal hücelere kıyasla bulundukları nişi değiştirdikleri ve enzimler, büyüme faktörleri, hücreler arası matriks proteinleri gibi farklı moleküller hücre dışına salgıladıkları bilinmektedir. Tümör oluşumu ve metastazı sırasında hücre dışı boşluğa salgılanan proteinler, hücre istilas ve g, hücre hareketliliği, hücre büyümesinin kontrolü, anjiyogenez, matris bozulması ve hücre yapışmasında görev almaktadır. Bu moleküler immün sistemden kaçış, hipoksik çevrenin oluşturulması, metastaz ve invazyon gibi pek çok farklı süreçte kritik roller üstlenmektedir. Tümör tarafından salgılanan proteinlerin analizi, kanser biyobelirteçlerini belirlemek için yüksek potansiyel barındırmakla beraber; kanser tedavisi için ilaç hedefleri ve potansiyal belirteçler için kaynak niteliği taşımaktadır (Makridakis ve Vlahou, 2010; Lai ve ark, 2010).

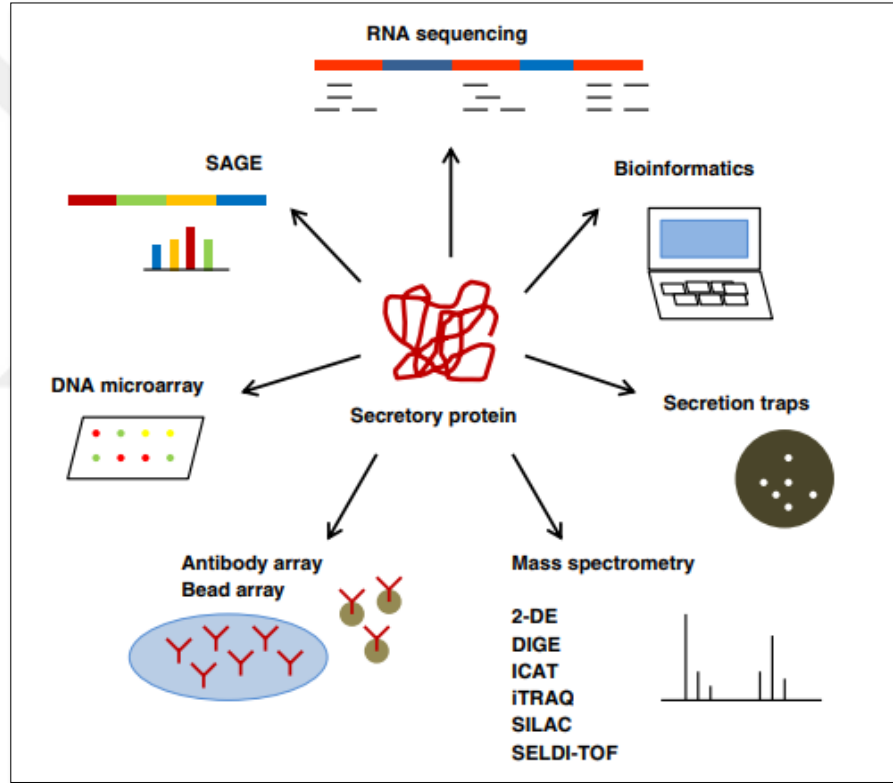
### **1.3.2. Sekretom Analizinde Karşılaşılan Zorluklar**

Sekretom analizinde karşılaşılan bazı zorluklar mevcuttur. Bunlar; hücre kültürü medyasındaki yüksek dilüsyon dolayısıyla düşük protein konsantrasyonu, hücre lizisi ve ölümünden salınan proteinler veya sitoplazmik kontaminasyonlar kaynaklı salgı proteinlerinin maskelenmesi ve kültür medyasında bulunan serum proteinlerinin salgı proteinlerini baskılaması şeklindedir (Makridakis ve Vlahou, 2010). Sekretom çalışmalarında, ölen hücrelerden kaynaklanan sitoplazmik kirlilikler gibi etmenlerin varlığı biyobelirteç değeri taşıyan düşük miktardaki proteinleri belirlenmesini engellemekte ve ya hatalı proteinlerin bu anlamda değerlendirilmesine yol açmaktadır. Serum açlığı hücreler için metabolik stres oluşturabilmekte; hücreler proliferasyon hızını azaltabilmekte, apoptoz yolaklarını aktive edebilmekte veya sinyal iletimini ve tümör hücresinin büyümeye devam etmesine izin veren gen ekspresyonu “hayatta kalma” mekanizmalarını indükleyebilmektedir (Makridakis ve Vlahou, 2010).

Hücre kültürü koşullarının seçimi, hücre sekretomunun bileşimi için belirleyici bir faktördür. Herhangi bir proteomiks analizden önce, serum açılığının hücreler üzerindeki etkisini araştıran ön çalışmalar yapılmalıdır (Pavlou ve Diamandis, 2010).

### 1.3.3. Mevcut Sekretom İnceleme Metodolojileri

Protein, DNA ve RNA tabanlı sekretom inceleme metodolojileri bulunmaktadır. Tez çalışmasının protein tabanlı metotları barındırması kapsamında sadece protein sekretom inceleme yöntemlerine değinilmiştir. Mevcut sekretom inceleme metodolojileri Şekil 1.6.'da verilmiştir.



Şekil 1. 6. Sekretom inceleme metodolojileri (Mukherjee ve Mani, 2013).

#### 1.3.3.1. Sekretom numune hazırlama yaklaşımları

Genel olarak literatürdeki çalışmalarda salgı proteinlerinin serum proteinleri tarafından maskelenmemesi amacıyla, hücreler %60-70 yoğunluğa ulaşınca kadar %10 FBS varlığında büyütülmüş daha sonrasında yaklaşık 3-5 defa PBS ile hücreler yıkanmış ve ardından FBS içermeyen medya ile 37°C'deki etüvde inkübe edilmiştir (Makridakis ve Vlahou, 2010).



### **1.3.3.2. Medyum toplama yöntemleri**

Literatürdeki çalışmalarda, hücrelerin FBS'siz medya ile inkübasyon süresinin genellikle 12 saat ile 24 saat arasında değişiklik gösterdiği görülmüştür (Mukherjee ve Mani, 2013). Serum açıklığının hücreler üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, farklı inkübasyon sürelerinde toplanan FBS'siz medyadaki LDH ve -tubulin salınımını tespit edilerek hücre açıklığının neden olduğu hücre otolizinin gerçekleştiği zaman aralığı belirlenmeye çalışılmıştır. Genel olarak hücre tiplerine göre farklılık göstermekle birlikte hücre otolizinin gerçekleştiği zaman aralığının 24. saatten sonra arttığı görülmektedir (Lai ve ark, 2010). Literatürdeki tüm çalışmalarda sekretom toplarken, kalkan hücreleri ve hücre atıklarını uzaklaştırmak amacıyla, medya satrifüjlenmiştir. Daha sonrasında proteazların aktivitesini engellemek amacıyla sekretom örneklerine çeşitli proteaz inhibitörleri eklenerek -80C°'de saklanmıştır (Makridakis ve Vlahou, 2010).

### **1.3.3.3. Salgı proteinlerini konsantre etme yöntemleri**

Kültür medyasında düşük konsantrasyonda bulunan salgı proteinlerini zenginleştirmek için literatürde çeşitli metotlar kullanılmıştır. Bu metotlar arasında ultrafiltrasyon, iki atomlu toprağa adsorpsiyon, hidrofobik rezine adsorpsiyon, fenol ekstraksiyonu ve çeşitli (DOC-TCA ve NLS-TCA) TCA çöktürmesi yer almaktadır. Bu metotların çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu metotlarda karşılaşılan genel problem zayıf geri kazanım ya da çözünürük kaybı olmuştur. 10 kDa'luk filtrelerle ultrafiltrasyon yapılması neticesinde düşük protein konsantrasyonuna rağmen filtrelerin tıkanıdığı görülmüştür. Fenol ekstraksiyonu ile nispeten iyi sonuçlar elde edilmiştir. En iyi sonuç DOC/NLS gibi detarjanların eklendiği TCA çöktürmesi metodu ile elde edilmiştir (Makridakis ve Vlahou, 2010).

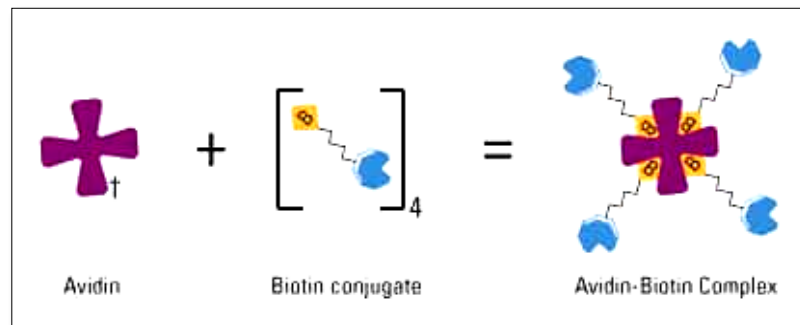
Nanoproteomik temelli yöntemler içerisindeki nanozeolitlerin, ortamda bulunan tuzlar gibi diğer maddelere kıyasla, yüksek afinite ve elektivite ile salgılanan proteinlerle etkileşime girebildiği ve LC-ESI-MS/MS kullanılarak yapılan analizlerin neticesinde yüksek miktarda protein analizine olanak sağladığı görülmüştür. Bu yeni yaklaşım, verimli bir protein konsantre etme yöntemi olabilme potansiyeli barındırmaktadır (Makridakis ve Vlahou, 2010; Mukherjee ve Mani, 2013).

#### 1.3.3.4. Sekretom analizi için proteomiks tabanlı ayırma yöntemleri

Jel bazlı yöntemler (1-DE, 2-DE, DIGE) ile kütle spektrometrisi yöntemlerinin birleştirildiği birçok protein tabanlı ayırma yöntemleri mevcuttur. Jelden bağımsız yöntemler olan izotop kodlu afinite etiketi (ICAT), göreceli ve mutlak niceleme (iTRAQ) için izobarik etiket, hücre kültüründe (SILAC) amino asitlerle kararlı izotop etiketlemesi, SELDI-TOF MS. SELDI-TOF MS yöntemleri de sekretom analizi için kullanılan proteomiks tabanlı ayırma yöntemleri arasında yer almaktadır (Mukherjee ve Mani, 2013). Literatürde sekretom analizi için antikor dizileri ve boncuk tabanlı diziler gibi DNA ve RNA tabanlı ayırma yöntemlerinin de sıklıkla kullanıldığı görülmektedir (Makridakis ve Vlahou, 2010).

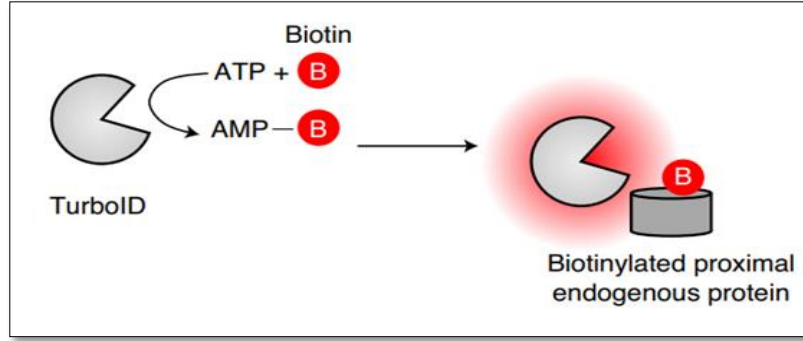
#### 1.4. Biotinilasyon Nedir ve Kullanım Yerleri Nelerdir?

Biyotin (B7, vitamin H.), bir imidazol halkası, bir tiyofen halkası ve bir valerik asit zincirinden oluşan hidrofilik özellikte bir moleküldür. İnsanlarda biyotin biyosentezi gerçekleşmediği için dışarıdan beslenme yolu ile temin edilmektedir. Biyotin molekülünün insan vücudundaki kullanım amacı, bazı enzimler ile birleşerek, bu enzimlerin bikarbonattaki CO<sub>2</sub>'yi organik asitlere transfer edebilmesini sağlamaktır (Donald ve ark., 2007). Biyotin bağımlı enzimler karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında, biyotini koenzim olarak kullanmaktadır. Biyotin molekülü aynı zamanda hücre büyümesi, DNA ve RNA replikasyonu için gereklidir. Biyotin ile avidin/streptavidin arasında bilinen en güçlü nonkovalent etkileşimlerden oluşan bir bağ kurulmaktadır (Boone-Villa ve ark., 2015). Bu etkileşime ait görsel, Şekil 1.7.'de verilmiştir.



Şekil 1. 7. Biyotin - avidin/streptavidin etkileşimi (Schwarz ve Blower, 2016).

Bu etkileşim sayesinde biyotin, birçok alanda moleküler araç olarak kullanılabilir. Bu güçlü etkileşimden yararlanılarak proteinleri biyotin ile işaretleme metodolojileri geliştirilmiştir (T. Kuhn ve ark., 2020). Biyotinyasyon reaksiyonunun görseli Şekil 1.8.'de verilmiştir.



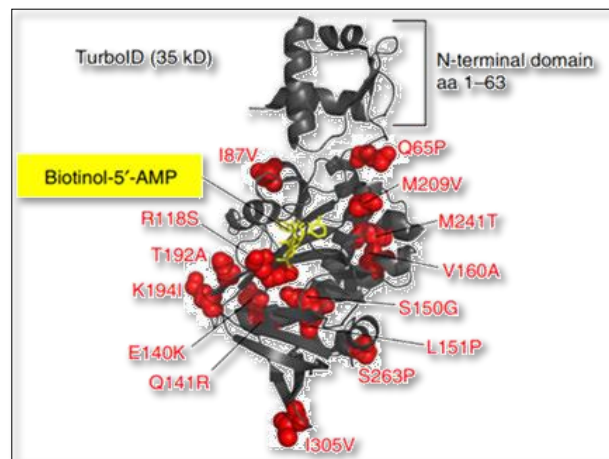
**Şekil 1. 8.** Biyotinyasyon reaksiyonu (Cho ve ark., 2020)

Biyotin ile işaretleme yöntemi, kimyasal veya enzimatik yollar ile yapılabilir. Kimyasal biyotinyasyon daha hızlı reaksiyon gösterse de homojenite problemleri, hedef dışı biyotinyasyon, tahmin edilemeyen etkileşimler ve toksik yan etkiler gibi dezavantajlar barındırmaktadır. Enzimatik biyotinyasyon kolay işaretleme protokolü, yüksek homojenitesi ve toksik özelliğinin olmamasından dolayı daha avantajlıdır (Roux ve ark., 2012). Enzimatik biyotinyasyonun avantajları, dizi spesifikliğinin olması ve biyotinyasyon için enzimin hedef bölgeye 10 angstrom kadar yaklaşması gerekliliğidir. Ancak yeni geliştirilen TurboID biyotin ligaz enzimi yapılan mutasyonlar ile dizi spesifikliğinin ortadan kaldırılması ve yabancı tip BirA enzimine göre çok yüksek enzimatik hızından dolayı enzimatik biyotinyasyonun bu dezavantajlarının ortadan kaldırmasını sağlamıştır (Kyle ve ark., 2012).

### **1.5. TurboID Biotin Ligaz Enzimi Özelliği**

Biyotin bağımlı enzimlerin(biyotin ligazların) katalizlediği reaksiyon olan biyotinyasyon, evrim sürecince yüksek oranda korunmuş, yüksek özgünlüğe sahip bir reaksiyondur. Biyotin ligazlar arasında en yaygın olarak kullanılan E.Coli'ye ait olan BirA enzimidir (Smith ve Cronan, 1999).

BirA, monomerik bir protein olup 35.5 kDa büyüklüğündedir. BirA ileri derecede özgünlüğe sahip bir enzimdir. E. coli içerisinde sadece tek bir proteini biyotinlemektedir. Bu protein asetil-KoA karboksilaz enziminin alt ünitesi olan biyotin karboksil taşıyıcı proteinidir (BCCP) (Sutton ve ark., 1977). BirA enzimi mutasyona uğratarak dizi özgüllüğü olmayan sadece lizin aminoasidi bulunduran proteinleri biyotinleyen promiscuous BirA (BirA\*) üretilmiştir (Branon ve ark., 2018). Non-spesifik biyotiniasyon yapabilen BirA (BirA\*) biyotin ligazı ile mesafe bağımlı etiketleme sayesinde protein- protein etkileşimlerini incelemestratijleri geliştirilmiştir. BirA\* biyotin ligazı, sadece 10 nm'lik bir alanda biyotiniasyon yapılabilmesi sebebiyle sadece hedef protein ile doğrudan temas halinde olan proteinler tanımlanabilmektedir. BirA\* enziminin, yönlendirilmiş evrim (directed-evolution) yöntemi kullanılarak iki farklı mutant formu olan miniturbo ve TurboID enzimleri geliştirilmiştir (Boone-Villa ve ark., 2015). Miniturbo, 28 kDa luk bir protein iken TurboID 35 kDa'luk bir proteindir. TurboID enziminin moleküler yapısına ait görsel Şekil 1.9.'da verilmiştir. Miniturbo ve TurboID, hücre kültüründe 10 dakika veya daha kısa sürede etiketleme yapabilmekte ve böylece dinamik biyolojik süreçlerin araştırılmasına imkan sağlamaktadır. Miniturbo, daha aktif ve özgün olmasına karşın kararlılık problemi barındırmaktadır. Miniturbo'nun biyotine karşı daha düşük afinitesi olması sebebiyle biyotin yokluğunda etiketleme yapamamaktadır. TurboID endoplazmik retikulum gibi indirgenme potansiyeli sitoplazmadan farklı ortamlarda dahi aktivite gösterebilmektedir (Cho ve ark., 2020; T. Kuhn ve ark., 2020)



Şekil 1. 9. TurboID Enziminin moleküler yapısı (Cho ve ark., 2020).

## 2. AMAÇ

Meme kanseri oluşumu ve gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmaların aydınlatılması yeni tanı ve tedavi olanaklarının geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Günümüzde bu kanserin tanı ve tedavisinde büyüme faktörleri inhibitörleri, belirlenmiş sinyal yollarını hedef alan ajanlar, apoptozu uyaran matriks metalloproteinaz inhibitörleri gibi meme kanserinden sorumlu genleri, invazyon ve metastazı hedefleyen yaklaşımlar mevcuttur (Park ve ark., 2022). Kanserli hücrelerden salgılanan proteinler, farklılaşmayı, invazyonu, metastazı, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşimlerini düzenleyerek kanserin anjiyogenezinde rol almaktadır (Pavlou ve Diamandis, 2010). Aynı zamanda kanserli hücrelerden salgılanan bu proteinler kan ve idrar gibi vücut sıvılarına girmekte ve ölçülebilmektedirler (Uhlén ve ark., 2019). Bu nedenle biyopsi gibi girişimsel uygulamalara gerek kalmadan vücut sıvılarından analiz edilmeleri mümkündür. Bu özelliklerinden dolayı sekretom, kanserli hücrelerde biyobelirteç keşfi için çalışılabilecek önemli bir alandır.

Bu çalışmada salgı proteinlerinin endoplazmik redikulumda biyotin ile işaretlenmesi ve daha sonrasında kültür medyasından biyotinle haldeki salgı proteinlerinin streptavidin kaplı manyetik boncuklar kullanarak zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece ölü hücrelerden salınan proteinlerin ve sitozolik proteinlerin, salgı proteinlerini maskeleyen önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda biyotininilasyonu gerçekleştirmesi için TurboID enzimi kullanılmıştır. Meme kanseri hücrelerine pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmiti transfeke edilmiş ve Genetecin antibiyotiği uygulaması ile seçim sağlanmıştır. Hücreler uygun yoğunluğa geldiğinde biyotininilasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve immünfloresan boyamalarla TurboID üretimi ve biyotininilasyonu gösterilmiştir. Sekretom ortamından biyotinle haldeki proteinler streptavidin kaplı manyetik boncuklar kullanılarak zenginleştirilmiş ve biyotininilasyonun verifikasyonu WB analizleri ile yapılmıştır.

Bu tez çalışması ile sağlıklı meme epitel hücresi olan MCF-10A, agresif olmayan non-invaziv özellikteki MCF-7 ve agresif olan invaziv özellikteki MDA MB 231 meme kanseri hücre hatları arasında, ER içerisinde biyotin ile işaretlenen salgı proteinlerinin hücre sekretomlarından izolasyonu, zenginleştirilmesi ve karşılaştırmalı proteom analizleri yapılarak meme kanseri tanısına ve tedavisine yönelik biyobelirteç adaylarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz veriler sonucunda, Non-invaziv özellikteki MCF-7 hücre hattı ile invaziv özellikteki MDA MB 231 hücre hattı arasındaki proteom farklılıkları belirlenerek, meme kanserindeki metastatik süreç hakkında literatüre yeni bilgiler ile katkı sağlanacaktır. Bu tez sonucunda elde edilen veriler ile meme kanseri ile ilişkili olabilecek proteinlerin saptanması, tanı ve tedaviye yönelik ileri çalışmalara öncülük edecektir.



### 3. YÖNTEM

#### Kullanılan Plazmid

TurboID enziminin meme kanseri hücreleri içerisinde üretilmesi amacıyla kullanıldı olan pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmiti, Stanford Üniversitesi'nden Dr.Tess C. Branon tarafından hibe edilmiştir.

#### 3.1. pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID Plazmitinin Amplifikasyonu ve Saflaştırılması

##### 3.1.1. pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID Plazmitinin E.Coli'ye ait XL1Blue Suşuna Elektroporasyon Yolu ile Transformasyonu

pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmiti, çoğaltılmak amacıyla elektrokompotent haldeki E.Coli'nin XL1Blue suşuna elektroporasyon yoluyla transforme edildi. 50uL elektrokompotent haldeki XL1Blue bakterisi için 0.5uL(200-500ng) pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmiti kullanıldı. Transformasyon işlemi Tablo 3.1.'de belirtilen malzemeler kullanılarak, laboratuvarımız tarafından geliştirilen aşağıdaki transformasyon protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

**Tablo 3. 1.** Elektroporasyon işleminde kullanılan kimyasallar.

| Kimyasallar        | Firma                |
|--------------------|----------------------|
| LB Broth with agar | Sigma Lot:#SLCC0182  |
| LB Broth           | Sigma Lot: BCBN9308V |
| Ampicillin         | Sigma EC200-709-7    |

Transformasyon protokolü;

- ❖ 50 µl'lik %20 gliserol içeren elektrokompotent haldeki XL1Blue bakterileri ile pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmiti homojenize edildi ve elektroporasyon küveti içerisine eklendi.
- ❖ Plazmit homojenatını içeren elektroporasyon küveti Elektroporatör cihazına (Eppendorf, Almanya) yerleştirildi ve 1750 volt akım uygulandı.

- ❖ Plazmit aktarımı yapılan elektrokompentant hücreler üzerine 300 µl SOB (super optimal broth) eklendi ve 37 °C’de çalkalamalı etüvde 1 saat boyunca inkübe edildi.
- ❖ SOB içerisindeki bakteriler, inkübasyon sonrasında 1:1000 oranında ampisilin içeren LB Agar besiyerine ekilerek seleksiyona tabi tutuldu. Böylece ampisilin antibiyotiğine karşı direnç geni aktarımı sağlanmış bakteriler, ampisilin varlığında üredi.
- ❖ LB Agar besiyerine ekilen bakteriler 37°C etüvde gece boyu inkübe edildi.

### 3.1.2. Transformasyon Yapılan Bakterilerin Büyütülmesi ve Plazmid İzolasyonu

Bakterilerin,ampisilin içeren LB Agar besiyerinde inkübasyonu sonrasında, petri içinde sadece ampisilin antibiyotiğine karşı direnç gösterebilen bakteriler üreyebildi. Bu bakterilerin oluşturduğu kolonilerden bir tanesi seçilerek, ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekildi ve 37°C’deki çalkalamalı etüve gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün, santrifügasyon ile bakteri pelletleri elde edildi. Bu bakteri pelletlerinden hücre kültürü deneylerinde kullanılmak üzere. EndoFree Plasmid Maxi Kiti (Lot:151036440) kullanılarak aşağıdaki protokol uygun olacak şekilde plazmit izolasyonu gerçekleştirildi.

Maxiprep Protokolü:

- ❖ Bakteri pelleti 10ml Resuspension Buffer P1 ile çözüldü ve steril 50ml’lik falkona alındı.
- ❖ Falkon içerisine 10 ml Lysis Buffer P2 eklendi ve falkon ters düz yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyon sonrasında falkon içerisine 10 ml Neutralization Buffer P3 eklendi ve falkon ters düz yapıldı.
- ❖ Hazırlanan lizat, kit içerisinde çıkan QIA filter Maxi Cartridges filtreli kolon içerisine aktarıldı. Kolonun altında bulunan tıpa kapatıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyon sonrasında QIA Filter Plungers ile basınç uygulanarak lizat 50ml’lik steril falkon içerisine filtre edildi. Böylece hücreler atıklar kolon içerisinde tutuklu kaldı.



- ❖ Falkona toplanan filtrelenmiş lizat üzerine endotoksinlerin uzaklaştırılması amacıyla 2.5ml ER Buffer eklendi ve falkon ters düz edilerek 30 dakika buz üzerine inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyon süresi beklenirken QIAGEN Tip filtreli kolon 10ml Equilibration Buffer QBT eklenerek dengelendi.
- ❖ Dengelenen kolona inkübasyonu biten lizat eklendi.. Yer çekimi kuvveti ile akıp gidenler çöp olarak ayrılırken plazmid kolona tutundu.
- ❖ Plazmitin tutunduğu kolondan hücresel atıkların uzaklaştırılması amacıyla kolon 2 defa 30 ml QC Buffer ile yıkandı.
- ❖ Kolona tutunan plazmit 15ml Elute Buffer QN ile 50ml'lik steril falkona toplandı.
- ❖ Elute edilen örnek üzerine 10ml izopropanol eklenerek 15000rpm 30 dakika 4C'de santrifüj edildi.
- ❖ Santrifüstasyon sonrası supernatant uzaklaştırıldı ve plazmid pellet halinde elde edildi.
- ❖ Pellet üzerine, DNA'dak, safsızlıkları azaltmak amacıyla 5ml %70 Etil Alkol eklendi ve 15000rpm 10 dakika 4C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılarak yıkama yapıldı.
- ❖ Elde edilen pellet uygun hacimde Endotoksin-free TE Buffer ile süspanse edildi.

Plazmit konsantrasyonuölçümü Nanodrop(marka model)ile yapıldı ve 1300ngolarak hesaplandı.

### 3.2. Hücre Kültürü Deneyleri

Tez çalışmam kapsamında kullanılan MCF-10A, MCF-7, MDA MB 231 hücre hatları laboratuvarımızın mevcut envanterinde bulunmaktadır. Çalışma boyunca envanter stoğunu korumak adına, belirtilen hücre hatlarından hücre dondurma yöntemi ile saklama alınmıştır. Tüm hücre kültürü deneylerinde, her hücrenin kendine özgü farklı besiyeri komponentlerine ihtiyaç duyması sebebiyle, MCF-7 ve MDA MB 231 hücreleri; yüksek glukozlu (%4.5) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bazal medyasının kullanıldığı besiyerinde büyütülürken MCF-10A hücreleri ise; MEGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium) bazal medyasının kullanıldığı besiyeri içerisinde büyütülmüştür. Tüm hücreler %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C sıcaklık uygulandığı kültür koşullarında kültüre edilmiştir. Hücre kültürü deneylerinde kullanılan kimyasallar Tablo 3.2.'de verilmiştir.

**Tablo 3. 2.** Hücre kültürü deneylerinde kullanılan kimyasallar.

| Kimyasallar                    | Katalog Numarası                          |
|--------------------------------|-------------------------------------------|
| DMEM                           | Multicell, Katalog No: 319-015-CL         |
| MEGM Bazal medya ve Supplement | Lonza, Katalog No: CC-3151,CC-4136        |
| Penisilin/Streptomisin         | Biochrome, Katalog No: A2212              |
| L-Glutamin                     | Biochrome, Katalog No: K0282              |
| FBS                            | Capricorn Scientific, Katalog No: FBS-11B |
| Trypsin/ EDTA                  | GIBCO, Invitrogen, Katalog No: 25200-072  |
| Fosfat Tamponlu Salin (PBS)    | Biochorome, Katalog No: L1825             |
| Dimetil Sülfoksit (DMSO)       | Appllichem, Katalog No: A1584             |
| Tripan Mavisi                  | GIBCO, Invitrogen, Katalog No: 15250061   |
| Geneticin (50 mg/mL)           | GIBCO, Invitrogen, Katalog No: 10131027   |

### 3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Büyütülmesi

MCF-10A, MCF-7, MDA MB 231 hücreleri birer Kryo tüp içerisinde, sıvı azot tankından donmuş halde çıkartıldı. 37°C'deki su banyosunda bekletilerek bir kısmı çözülür hale getirildi. Yarı çözünmüş haldeki hücreler, steril falkon içerisinde hazırlanmış %20 FBS içeren bazal medya içerisine eklendi. Ardından 1500rpm oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra elde edilen hücre pelleti önceden hazırlanmış olan besiyeri (%10 FBS, 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin, 2 mM L-Glutamin, içeren bazal medya ile çözülerek 10 cm'lik hücre kültür kaplarına aktarıldı. Kültür kapları, 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi.

### 3.2.2. Hücrelerin Hatlarının Pasajlanması

Hücrelerin besiyerleri, hücre yoğunluğuna ve büyüme hızlarına bağlı olarak her 2-3 günde bir yenilendi. Hücre yoğunluğu %70-80 aralığında iken hücreler uygun boyuttaki petri kaplarına ya da flasklara pasajlandı. Bu işlem için petri yüzeyindeki ölü hücreleri ve hücrel atıkları uzaklaştırmak amacıyla 3 kez yeterli miktarda PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra petri yüzeyine tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyonu petri yüzeyine eklendi. Tripsin aktivitesi için uygun sıcaklık olan 37°C'deki etüvde, MCF-7 ve MDA MB 231 hücreleri için 5 dakika; MCF-10A hücreleri için 10 dakikainküasyon gerçekleştirildi.

Süre sonunda hücreler 10ml PBS solüsyonu ile steril falkon içerisine toplandı ve 1500rpm oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve elde edilen hücre pelleti taze hazırlanan besiyeri ile süspanse edilip uygun yeni kültür kaplarına aktarıldı. Daha sonra hücreler 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi.

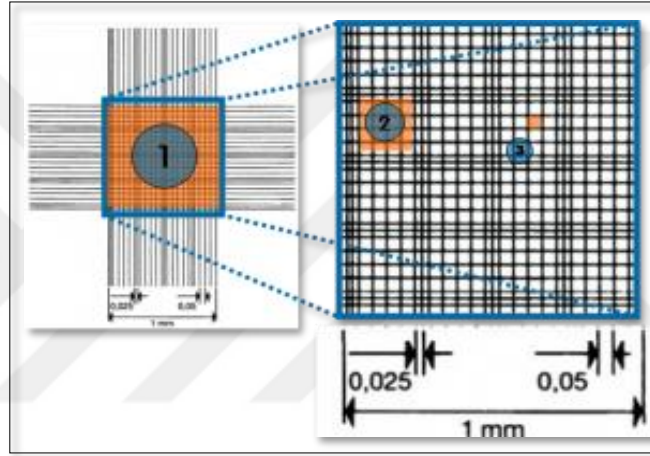
### 3.2.3. Hücrelerin Saklanma için Dondurulması

Devam çalışmalarda kullanılabilmesi ve envanter stoğunun devamlılığının sağlanabilmesi için yaklaşık %70-80 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlanırken, bir kısmı donduruldu. Hücreler azot tankında kademeli dondurma yöntemi kullanılarak donduruldu. Bu amaç doğrultusunda, % 70 DMEM/MEGM, % 20 FBS ve % 10 DMSO içeren dondurma besiyeri hazırlandı.

Hücrelerin üzerindeki eski besiyeri uzaklaştırıldı, iki kez kalsiyum magnezyum içermeyen yeterli miktarda PBS (Biochrome, İngiltere) ile yıkama yapıldı. Ardından 1 ml % 0.25 Tripsin / EDTA (Biochrome, İngiltere) solüsyonu hücrelerin bulunduğu petri/flask yüzeyineeklendi Yaklaşık 7-10 dakika 37°C'de inkübatörde bekletildikten sonra mikroskop altında hücrelerin tamamen kalkıp kalkmadığı kontrol edildi.Petri/flask yüzeyinden kalkan hücrelerin üzerine 10 ml PBS eklenerek hücreler bir falkon içine toplandı ve 1500xg de 10 dakika santrifüj edildi.Falkon dibine çöken hücrelerin üzerine, hücre miktarına bağlı olarak belirlenen miktarda dondurma solüsyonu eklendi ve her bir Kryotüpe 1 ml olacak şekilde dağıtıldı. Tüpler - 80°C'de Kryo-freezer saklama kabında (Nalgene, ABD) bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına yerleştirildi.

### 3.2.4. Thoma Lamı İle Hücre Sayımı

Thoma laminın yüzeyinde Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi 16 büyük kare ve her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplamda 400 kare bulunmaktadır. Bu kısmın hacmi 0.1 mm<sup>3</sup>'tür. Thoma laminın prensibi 0.1 mm<sup>3</sup> alanda yapılan sayımın mililitre başına düşen hücre sayısına çevrilmesine dayanmaktadır. Thoma lamında mililitrede bulunan hücre sayısı;  $A \times SF \times 10000$  fomülü ile hesaplanmaktadır. Burada; A: 16 karede sayılan mikroorganizma sayısı, SF: Seyreltme Faktörü, 10000 ise mm<sup>3</sup>' ün mL'ye çevrilmesinde kullanılan sabit sayıyı ifade etmektedir. Tez çalışması kapsamında thoma lamı ile hücre sayımı için tripan mavi boyası kullanılmıştır.



Şekil 3. 1. Thoma Lamı (Ljungberg ve ark., 2015).

Canlı hücreler yüksek moleküler ağırlığa sahip olan tripan mavi boyasını, hücre içine alamamaktadır. Yalnızca ölü hücreler, tripan mavi boyasını hücre içine alarak mavi renge boyanmaktadır. Bu sebeple, kareler içerisindeki açık renkli parlak hücreler sayılmaktadır. Hücreleri saymak için aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

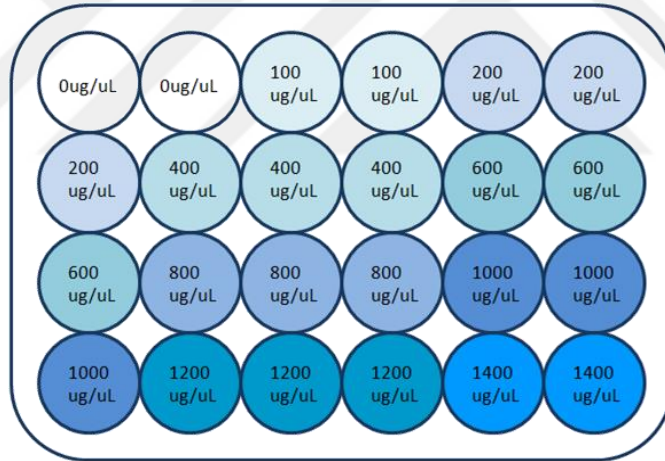
Hücre sayma protokolü;

- ❖ Hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı ve hücre yüzeyi 3 kez PBS ile yıkandı.
- ❖ Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyonu, tüm petri yüzeyini kaplayacak şekilde eklendi. Tripsin aktivasyonu için 37°C'de 4 dakika boyunca inkübe edildi. Süre sonunda hücreler 10ml PBS solüsyonu ile petri yüzeyinden toplanarak steril falkon tüpe alındı. 1500rpm oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi.

- ❖ Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet halindeki hücreler 2ml PBS ile çözüldü. Ardından 50µl hücre solüsyonu, pipet yardımıyla temiz bir ependorfa aktarıldı.
- ❖ Ependorf içindeki hücre solüsyonu üzerine 250 µl tripan mavi boyası eklendi ve pipetaj yapılarak boya ile hücreler homojenize edildi.
- ❖ Hüce-boya homojenatından 10 µl alınarak thoma lamına aktarıldı. Daha sonra mikroskop altında canlı hücreler sayıldı ve not edildi. Formül üzerinden hesaplama yapılarak 1mL ‘deki hücre sayısına ulaşıldı.

### 3.2.5. Kill-Curve Deneyleri İle Seçilim İçin Uygun Antibiyotik Dozunun Belirlenmesi

Geneticin antibiyotiğine karşı direnç geni içeren pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmitini, transfeksiyon sonrasında içine alan hücrelerinin seçimini sağlayabilmek amacıyla; tüm hücre hatlarına kill-curve yöntemi ile Şekil 3.2.’de gösterildiği üzere farklı doz aralıklarında geneticin antibiyotiği uygulanarak zaman-ölüm eğrileri oluşturulmuştur.



Şekil 3. 2. Hücrelere farklı dozlarda antibiyotik uygulaması.

#### Kill-Curve Protokolü:

- ❖ 24 kuyulu hücre kabına, hücre başına yaklaşık 30.000 olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Ekim sonrası hücrelerin yüzeye tamamen yapışması için 1 gün boyunca etüvde inkübe edildi.

- ❖ Ertesi gün hücre yoğunluğu yaklaşık %50 iken hücrelere, 0 ug/uL – 100 ug/uL– 200 ug/uL – 400 ug/uL – 600 ug/uL – 800 ug/uL– 1000 ug/uL– 1200 ug/uL– 1400 ug/uL olacak şekilde farklı dozlarda antibiyotik uygulaması yapıldı.
- ❖ 0, 100 ug/uL ve 1400 ug/uL dozları 2 tekrarlı, diğer tüm dozlar 3 tekrarlı olacak şekilde uygulama yapıldı (Şekil 3.2.'deki gibi).
- ❖ Antibiyotik uygulamasından yaklaşık 48 saat sonra, tüm hücre ölümünün gerçekleştiği bir antibiyotik dozu saptandıktan sonra, her kuyudaki hücreler ayrı ayrı olacak şekilde Thoma lamı yöntemi ile sayıldı.
- ❖ Her hücre hattının antibiyotik uygulamasından sonrakihücre sayısı kullanılarak, doza bağlı ölüm oranını gösteren grafikler oluşturuldu. Bu grafiklere göre hücrelerin öldüğü antibiyotik dozunun yarısı, seçilim dozu olarak belirlendi.

### **3.3. pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID Plazmitinin MCF-10A, MCF-7 ve MDA MB 231 Hücrelerine Neon-Transfeksiyon Yöntemiyle Aktarımı**

#### **3.3.1. Geçici-Transfeksiyonun Gerçekleştirilmesi ve Hücrelerin Seçilime Tabi Tutulması**

Transfeksiyon, kararlı ve geçici transfeksiyon olmak üzere iki ayrı başlıkta incelenebilmektedir. Kararlı transfeksiyon, yabancı DNA'yı konak nükleer genomuna entegre ederek bir transgenin uzun vadeli ekspresyonunu sürdürmeyi ifade etmektedir. Geçici transfeksiyonda ise nükleik asitlerin konakçı hücre genomuna entegre edilmesi gerekmemektedir. Kullanacağımız plazmitin bir biyotin ligaz kodlaması sebebiyle uzun süreli ekspresyonunun hücre toksisitesini arttırabileceği ve hücrelerin normal fizyolojilerini etkileyebileceği göz önünde bulundurularak, geçici transfeksiyon yapılmasına karar verilmiştir.

MCF-10A, MDA MB 231, MCF-7 hücre hatlarına pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmitinin aktarımı Neon-Transfeksiyon sistemi kullanılarak yapıldı. Hücrelerin yoğunluğu % 70-80 ulaştığında, hücrelere Neon-Transfeksiyon sistemi protokolüne uygun olarak plazmit aklatımı gerçekleştirildi. Transfeksiyonun şematik gösterimi Şekil 3.3.'de verilmiştir.



**Şekil 3. 3.** Transfeksiyonun şematik gösterimi.

Aktarım sonrasında elde edilen transfeksiyon ürünleri, içine coverslip yerleştirilmiş, antibiyotiksiz büyüme besiyeri içeren petrilere ekildi. Ertesi gün besiyerlerine antibiyotik ilavesi yapıldı. Transfeksiyon sonrası hücrelerin seleksiyonu için hücrelerin besiyeri ortamları uygun konsantrasyonlarda Geneticin (G418) eklenerek 4-6 hafta seçilime tabi tutuldu.

#### Neon Transfeksiyon Protokolü;

- ❖ % 70-80 yoğunlukta olan hücreler, besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez yeterli miktarda PBS ile yıkandı.
- ❖ Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyonu homojenize olacak şekilde petri yüzeyine eklendi. Tripsin aktivasyonu için 37°C'deki etüvde 5 dakika inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyon sonrası Tripsin EDTA aktivitesi FBS ile durduruldu. Thoma lamı ile hücre sayımı yöntemi kullanılarak hücreler sayımı yapıldı.  $1.5 \times 10^7$  hücre/ml olacak şekilde hücre solüsyonundan alınarak falkon tüpe aktarıldı. 1500rpm oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve elde edilen hücre pelleti 2 kez PBS ile yıkandı.
- ❖ Yıkamaların ardından santrifügasyon ile elde edilen hücre pelleti 100µl Resuspansiyon Buffer R ile çözüldü. Bu sırada pipet istasyonundaki Neon tüp içerisine 3ml Electrolytic Buffer E2 eklendi.
- ❖ Steril ependorfta süspanse edilen hücreler üzerine hazırlanan uygun miktarda plazmit DNA'sı eklendi ve yavaşça pipetaj yapılarak homojenize edildi.

- ❖ Neon tip takılmış pipet içerisine plazmit-hücre karışımı çekildi ve pipet istasyonunayyerleştirilerekher bir hücre hattı için uygun olan programda transfeksiyon gerçekleştirildi.
- ❖ Transfekte edilen hücreler önceden hazırlanmış antibiyotiksiz besiyeri (%10 FBS, 2 mM L-Glutamin içeren DMEM/MEGM) ortamına ekildi ve 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi.
- ❖ Ertesi gün seçilimin sağlanabilmesi için besiyeri ortamına 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin, uygun seçim konsantrasyonunda Geneticin (MCF-10A için 150ug/uL, MCF-7 için 800ug/uL, MDA MB 231 için 700ug/uL) eklendi.

Hücreler 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde seçilimin sağlanması ve büyümeleri için 4-6 hafta boyunca inkübe edildi.

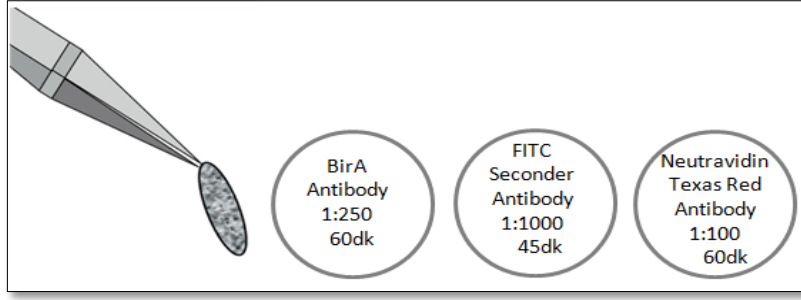
### **3.3.2. Biotinilasyon Reaksiyonunun Kurulması**

Biyotinilasyon reaksiyonu için %70-80 yoğunluğa sahip pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmiti transfekte edilmiş hücreler ve transfeksiyona tabi tutulmamış normal hücreler kullanıldı. Hücreler önce 3 kez PBS ile yıkandı. Biotinilasyon için 3mM ATP, 50mM biyotin, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, %2 FBS ve bazal medya (DMEM/MEGM) içeren reaksiyon ortamı hazırlandı. Reaksiyon, 16 saat boyunca 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde gerçekleştirildi.

### **3.3.3. Transfeksiyonun Immün Floresan Boyama(IF) İle Doğrulanması**

Transfeksiyon işlemi ve antibiyotik eklenmesiile seçim sağlanmasının ardından hücreler biyotinilasyon reaksiyonuna tabi tutuldu. Hücre üzerinde, biyotinilasyonun ve TurboID üretiminin gösterilmesi amacıyla aşağıdaki protokol takip edilerek immün floresan boyamayapıldı. Coverslip yerleştirilmiş petrilerin içine ekilen hücrelerin yoğunluğu %70-80'e ulaştığında, immün floresan boyamaları aşağıdaki protokole uygun olarak yapılmıştır. Immün floresan boyamanın şematik gösterimi Şekil 3.4.'de verilmiştir.





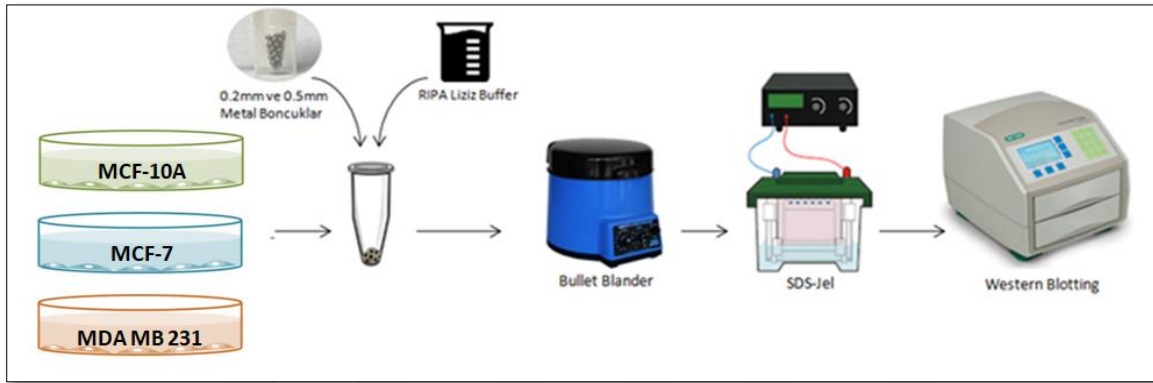
**Şekil 3. 4.** Immün floresan boyamanın şematik gösterimi.

#### IF Protokolü;

- ❖ Coverslip yerleştirilmiş petrilerin içine ekilen hücrelerin yüzeyinden besiyeri uzaklaştırıldı, ardından PBS ile yıkama yapıldı.
- ❖ Petri içerisinden alınan coverslip, %4 formaldehit damlatılmış parafilm yüzeyine yerleştirildi ve 20 dk muamele edilerek, hücrelerin coverslip üzerinesabitlenmesi sağlandı.
- ❖ Coverslip 100 uL PBS'te 5 dk bekletildi ve formaldehitin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla 100 uL 50mM amonyum klorür ile 5 dk muamele edildi.
- ❖ Coverslipe sabitlenmiş olan hücreler %0.5'lik triton-X ile 2 dk muamele edildi. PBS ile yıkma sonrasında 1:250 dilüsyon oranıyla hazırlanmış BirA antikoru ile 60 dakika muamele edildi.
- ❖ Süre sonunda PBS ile yıkama işlemi tekrarlandı ve 1:1000 dilüsyon oranıyla hazırlanmış antimouse- FITC anikoru ile 60 dakika boyunca karanlıkta muamele edildi.
- ❖ Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve sonrasında 1:1000 dilüsyon oranıyla hazırlanmış Neutroavidin-Texas-Red anikoru ile 60 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi.
- ❖ Ardından hücreler PBS ile yıkandı ve DAPI (1:20000) ile 10 dk muamele edildi, PBS ile yıkandı ve 5 dakika ddH<sub>2</sub>O ile muamele edildi.
- ❖ Coverslibi lam yüzeyine sabitlemek için moviole kullanıldı.

### 3.3.4. Transfeksiyonun Western Blot(WB) Analizi İle Doğrulanması

Biyotinilasyon reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra hücre kazıyıcı kullanılarak kaldırılan hücrelerden, RIPA Lizis Tamponu kullanılarak protein özütleri elde edildi. Bradford analizi ile hücre özütlerindeki protein konsantrasyonu belirlendi. Sekretom çalışmasına geçmeden önce elde edilen protein özütlerinde, TurboID proteinini üretimini ve biyotinlenen proteinleri görmek, transfeksiyonu doğrulamak, amacıyla western blot analizleri yapıldı. Transfeksiyonun Western Blot (WB) analizi ile doğrulanmasının şematik gösterimi Şekil 3.5.'de verilmiştir.



**Şekil 3. 5.** Transfeksiyonun Western Blot (WB) analizi ile doğrulanmasının şematik gösterimi.

#### 3.3.4.1. RIPA Tamponu İle Protein Özütünün Elde Edilmesi

Reaksiyon sonrası hücre kazıyıcı kullanılarak elde edilen hücre pelletleri 300ul RIPA tamponu (25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) ile süspanse edildi. Hücre süspanسیونu safe-lock ependorfların içerisine aktarıldı ve içerisine 0.2mm paslanmaz çelik boncuklar ilave edildi.

Bullet Blender cihazı (NextAdvance, Troy, NY) kullanılarak hücreler mekanik olarak parçalandı. Boncukları uzaklaştırmak ve protein özütünü elde etmek için 10000 rpm 4°C’de 2 kez 10 dakika santrifiuj edildi ve süpernatant kısmı alındı. Elde edilen protein özütünün konsantrasyonu Bradford analizi ile belirlendi.

### 3.3.4.2. Bradford Analizi

Bradford analizinde kullanılan bromofenol mavisi, öncelikle arjinin olmak üzere proteinlerdeki amino asitler ile etkileşime girerek renk değişimi meydana getirmektedir. Meydana gelen renk değişikliği, spektrofotometrik okuyucu ile 595 nm dalga boyunda ölçülerek protein örneğinin konsantrasyonu belirlenmektedir. Protein konsantrasyonunun hesaplanması, sığır serum albümin protein (BSA) çözeltisinin farklı konsantrasyonlardaki absorbans değerleri baz alınarak yapılmaktadır. Bradford assay boyası (BioRad) 1:5 oranında seyreltilip filtre kağıdından geçirilerek hazırlandı. Protein örneği temiz ependorf içerisinde 1:20 oranında 2D Rehidrasyon tamponu ile seyreltildi ve üzerine 980µl Bradford boyası eklendi. Analiz için kör solüsyon olarak protein örneği içermeyen tampon- boya karışımı kullanıldı. Örneklerin absorbansı 595nm’de Nanodrop cihazı ile 3 tekrar olacak şekilde ölçüldü ve BSA standart eğrisine göre konsantrasyonları belirlendi.

### 3.3.4.3. SDS-Page Jel elektroforezi

SDS-Page jel elektroforezi, bir örnek içerisinde bulunan proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre sıralanmasını sağlayarak protein profilinin ve kalitesinin anlaşılması amacıyla kullanılan jel tabanlı bir ayırım metodudur. Elektroforez için öncelikle örneğin ayırımına uygun konsantrasyonda SDS jeller hazırlanır. Protein boyutlarına uygun jel konsantrasyonları Tablo 3.3.’de verilmiştir.

**Tablo 3. 3.** Protein boyutlarına uygun jel konsantrasyonları.

| Protein boyutu     | 4–40 kDa | 12–45 kDa | 10–70 kDa | 15–100 kDa | 25–200 kDa |
|--------------------|----------|-----------|-----------|------------|------------|
| Jel konsantrasyonu | 20%      | 15%       | 12.5%     | 10%        | 8%         |

Bu amaç doğrultusunda jellerin hazırlanacağı camlar %70’lik etil alkol ile temizlenerek kasete yerleştirildi. Tablo 3.4.’de verilen solüsyonlar ve miktarları göz önüne alınarak %12’lik Ayırıcı jel ve %4’lük İstifleme jeli hazırlandı. İlk önce %12’lik ayırıcı jel döküldü ve jelin üst yüzeyinin düzgün bir şekilde polimerleşmesi için izopropanol ile jel yüzeyi kaplandı. Ayırıcı jel polimerleştikten sonra izopropanol uzaklaştırıldı ve ayırıcı jelin üzerine %4’lük istifleme dökülerek 1.0 mm’lik kuyucuklu tarak yerleştirildi ve jelin polimerleşmesi için beklenildi.

**Tablo 3. 4.** SDS –Page jel solüsyonları içeriği ve miktarları.

| %12'lik Ayırıcı Jel Solüsyonu İçeriği |        | %4'lük İstifleme Jel Solüsyonu İçeriği |         |
|---------------------------------------|--------|----------------------------------------|---------|
| Distile su                            | 3.3 mL | Distile su                             | 3 mL    |
| 1.5 MTris-HCl (pH 8.8)                | 2.5 mL | 1.5 MTris-HCl (pH 6.8)                 | 1.25 mL |
| %30 Akrilamid-Bis akrilamid           | 4 mL   | %30 Akrilamid-Bis akrilamid            | 670 uL  |
| %10 SDS                               | 100 uL | %10 SDS                                | 50 uL   |
| %10 APS                               | 100 uL | %10 APS                                | 50 uL   |
| TEMED                                 | 5 uL   | TEMED                                  | 5 uL    |

Hazırlanan jel, elektroforez tankı içerisine yerleştirildi. Örnekleri, jele yüklemeye hazırlamak için 20µg protein örneğine 6X yükleme tamponundan (0.5M Tris-HCl, %10SDS, Gliserol, β-merkaptoetanol, bromofenol mavisi) 1 X olacak şekilde ilave edildi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Örnekler 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek proteinler denatüre edildi. SDS-Page analizi için renksiz marker protein (Western Blot analizi için önceden renklendirilmiş marker protein) ve örnekler kuyucuklara uygun sırayla yüklendi. **jjl**Elektroforez tankı 1X Yürüme tamponu (10X yürüme tamponu; 25Mm Tris-HC dolduruldu. Elektroforez, 180 Voltta 50 dakika şeklinde gerçekleştirildi. SDS analizinin şematik gösterimi Şekil 3.3.4.3.1.'de verilmiştir. Protein örneklerini görünür hale getirmek içinjeller öncelikle Fiksatif solüsyonunda (%40 Metabol, %10 asetik asit, %50 distile su) minimum 1 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Ardından Commassie Blue boya solüsyonu (757mM amonyum sülfat, 1.45mM Commassie blue, %20 metanol, %10 ortofosforik asit) içerisinde gece boyu çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Jel üzerinde protein bantları tamamen görünür hale geldikten sonra fazla boya distile su ile arındırıldı. Jelin görüntüsü VersaDoc 4000 MP görüntüleme cihazı ile alındı.

### 3.4. Western Blot

Transfeksiyon sonucunda plazmitin aktarıldığı hücrelerde, TurboID proteininin eksprese ettiğini ve biyotinyasyon reaksiyonu sonucuna proteinlerin biyotinlendiğini doğrulayabilmek amacıyla; BirA antikoru ve Streptavidin-HRP kullanarak western blot analizi yapıldı. Yapılan tüm Western Blot deneyleri için kullanılan antikorların ve malzemelerin listesi Tablo 3.5.'de verilmiştir.

**Tablo 3. 5.** Western Blot Analizinde Kullanılan Malzemeler.

| Kullanılan Malzemeler                  | Firma (Katalog No)      |
|----------------------------------------|-------------------------|
| BirA Antikoru (1:1000 dilüsyon)        | Novus NBP2-59939        |
| Sekonder Anti-Mouse (1:10000 dilüsyon) | Bio-Rad, 170-5047       |
| Streptavidin HRP (1:3000 dilüsyon)     | Thermo Scientific, N100 |
| Actin Antikoru (1:2000 dilüsyon)       | SantaCruz sc-69879      |
| Filtre kağıtları                       | BioRad, 1703969         |
| Nitroselüloz Membran                   | Bio-Rad, 170-5041       |
| Biorad ECL                             | BioRad, 1705060         |
| Cardiac Troponin I Antikoru            | Novus, 19C7             |
| Blotting Grade Blocker                 | BioRad, 1706404         |
| Prestained Protein Ladder              | Thermo, 26616           |

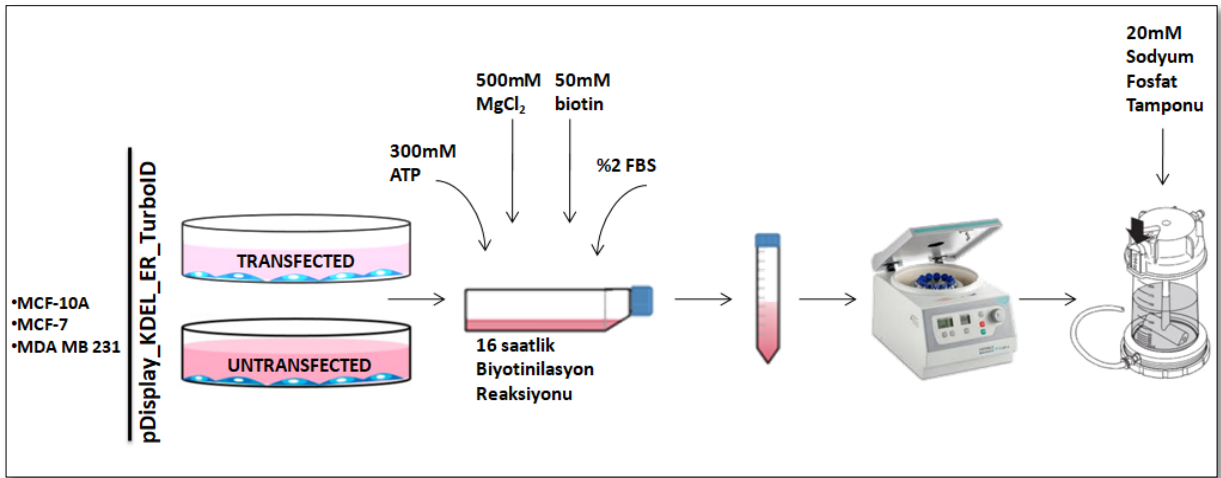
Western Blot deneyi için örnekler %12'lik SDS-Page jelde yürütüldükten sonra aşağıdaki adımlar takip edilmiştir. Trans-Blot Turbo (BioRad) yarı-kuru transfer sistemi ile proteinlerin membrana transferi gerçekleştirilmiştir.

- ❖ Kullanılan filtre kağıtları ve nitroselüloz membran, jel transfer tamponu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 1,3 mM SDS, %20 metanol) ile ıslatıldı. Transfer kaseti içerisine sırasıyla filtre kağıdı, membran, jel ve filtre kâğıdı koyuldu ve transferi engelleyebilecek hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.
- ❖ Transfer kaseti, cihaza yerleştirildi. 25 voltta 30 dakika süre ile transfer gerçekleştirildi ve sonunda transferin gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için membran Ponceau S boyası (1.5mM Ponceau S, 0.5ml Asetik asit) ile boyandı.
- ❖ Protein bulunmayan yüzeylerin bloklanması amacıyla membran, %5'lik Süt tozu içeren TBS-T tamponu (10X TBS çözeltisi; 25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.6: TBS-T tamponu; 1X TBS çözeltisi; %0.1 Tween 20) içerisine alınarak 1 saat boyunca inkübe edildi.
- ❖ Bloklama sonrası membran 3 kez 10 dakika TBS-T tamponu ile membran yıkanarak süt tozunun fazlası uzaklaştırıldı.
- ❖ Birincil antikor TBS-T tamponu içerisinde uygun dilüsyonu oranında hazırlandı. Membran birincil antikor solüsyonu ile gece boyu inkübe edildi.
- ❖ Ertesi gün membran 3 kez 10'ar dakika TBS-T tamponu ile yıkandı. Sekonder antikor TBS-T tamponu içerisinde uygun dilüsyon oranında hazırlandı. Membran sekonder antikor solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyon sonrasında membran, 3 kez 10'ar dakika TBS-T tamponu ile yıkandı.
- ❖ Protein bantlarının görünür hale getirilmesi amacıyla X-ray film kullanıldı. X-ray film görüntüsünün alınabilmesi için membran Biorad ECL solüsyonları ile muamele edildi.

#### **3.4.1. Her Bir Hücre Hattına Biyotininilasyon Reaksiyonu Kurulması ve Sekretomlarının Toplanması**

%70-80 hücre yoğunluğuna sahip transfekte edilmiş hücreler ile transfekte edilmemiş kontrol hücrelerine daha önce bahsedilen koşullarda biyotininilasyon reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon süresi sonunda sekretom steril falkon içerisine toplandı. Kalkan hücreleri ve hücresel atıkları uzaklaştırmak amacıyla 1500 rpm 10 dakika 4°C'de santrifüjasyon yapıldı.

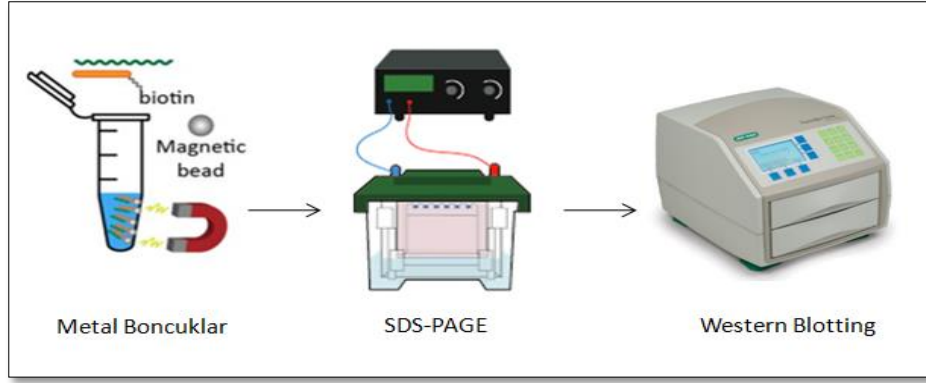
Besiyeri konsantre etmek ve içerisinde bulunan fenol kırmızısını uzaklaştırmak amacıyla Stirred Cell Sistemi (Millipore, CA, USA) kullanıldı. Stirred cell sistemi yüksek hacimdeki örnekleri yüksek akış hızının kullanıldığı ve yüksek geri kazanıma izin veren farklı por çapına sahip membranların kullanılabildiği bir sistemdir. Bu sistem örnekleri konsantre etme, tampon değiştirme ve tuzdan uzaklaştırma amacıyla kullanılabilmektedir. Herbir hücre hattına ait sekretom örnekleri ayrı ayrı 5 kDa'lık membran kullanıldığı stirred cell sistemi ile konsantre edildi ve 20mM sodyum fosfat tamponu ile tampon değişikliği yapıldı. Biyotinilasyon reaksiyonu kurulması ve sekretom hazırlama prosedürlerinin şematik gösterimi Şekil 3.6.'da verilmiştir.



**Şekil 3. 6.** Biyotinilasyon reaksiyonu kurulması ve sekretom hazırlama prosedürlerinin şematik gösterimi.

### 3.4.2. Biyotinile Proteinlerin Manyetik Boncuklar Aracılığıyla Zenginleştirilmesi ve Doğrulanması

Sekretom örneklerinden streptavidin kaplı manyetik boncuklar aracılığıyla biyotinile proteinlerin saflaştırılması işlemi Kelvin F. Choa ve arkadaşlarının (2020) bildirdiği şekilde gerçekleştirildi. Salgı proteinlerinin zenginleştirilmesi ve doğrulanması prosedürlerinin şematik gösterimi Şekil 3.7.'de verilmiştir. Uygulanan adımlar aşağıda verilmiştir.



**Şekil 3. 7.** Salgı proteinlerinin zenginleştirilmesi ve doğrulanması prosedürlerinin şematik gösterimi.

#### Manyetik Boncuklar Aracılığı İle Zenginleştirme Protokolü;

- ❖ Çalışma ve negatif kontrol grubundan elde edilen protein özütlerinden eşit konsantrasyonda ve dengeli hacimde alınarak, öncesinde 2 defa 10'ar dakika sodyum fosfat tamponu ile yıkanan streptavidin kaplı boncuklarla 4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Ardından boncuklar iki kez sodyum fosfat tamponu, bir kez 1M KCl, bir kez 0.1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , bir kez içerisinde 2M üre bulunan 10mM Tris-HCl ve iki defa sodyum fosfat tamponu ile yıkandı.
- ❖ Üzerine 100  $\mu\text{l}$  elüsyon tamponu (30mM biotin, %2 SDS, 300mM NaCl, 25mM Tris-HCl) eklenen boncuklar 95°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edildi ve biyotinile proteinlerin bulunduğu elüsyon fraksiyonu temiz bir ependorfa alındı.

Biyotinile proteinleri zenginleştirebildiğini görmek amacıyla negatif kontrol ve çalışma grubunun fraksiyonlarından eşit hacimde örnekler alınarak uygun görülen miktar ve sıralama ile %12'lik SDS-Page jellerde yürütüldü. Ve daha sonra 1:3000 oranında Streptavidin HRP Antibody'si kullanılarak Western Blot analizi yapıldı. Zenginleştirilmenin başarıyla gerçekleştirildiği görüldü.



### 3.5. nLC-Ms/Ms Analizi için Proteinlerin Triptik Kesimi

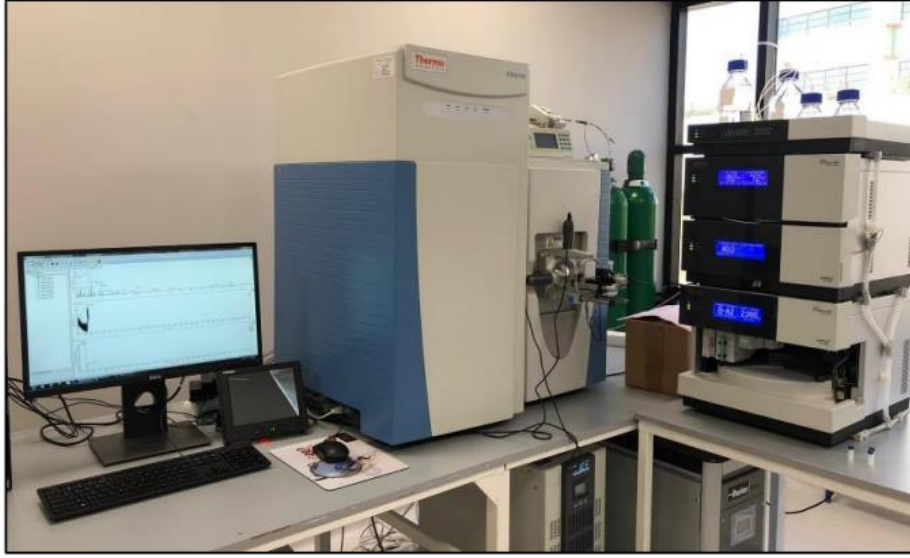
Çalışma ve Negatif Kontrol grubuna ait biyotinile protein fraksiyonlarından eşit hacim alınarak, Thermo 89895 numaralı In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination Kit'ine"ait protokolüne uygun olarak LC-MS/MS analizi için triptik kesime tabi tutulmuştur. Kısaca aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

Jel-içi Triptik Kesim Protokolü;

- ❖ Protein örneği, 100 mM DTT ve ultra saf su ile 27 µl'ye tamamlanarak 95°C'de 5 dakika inkübe edildi.
- ❖ Ardından, son konsantrasyon 10mM olacak şekilde alkilasyon ajanı olarak IAA eklendi ve 20 dakika karanlıkta ve oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Alkilasyon aşamasından sonra enzimatik parçalamaya geçildi. Bu amaç doğrultusunda örneklerin üzerine 100ng/µl tripsin eklendi ve 30°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Enzimatik parçalamadan sonra vortekslenen örnekler SpeedVac (Eppendorf, ABD) ile buharlaştırılarak peptitler konsantre edildi.
- ❖ Peptitler, nLC-MS/MS analizi yapılmak üzere %0,1 formik asit içerisinde çözüldü ve -80C'de saklandı.

#### 3.5.1. nLC-Ms/Ms Analizi

Peptitler, Q-Exactive kütle spektrometresine (Thermo Scientific, ABD) bağlı Ultimate 3000 RSLC nano sistemi (Dionex, Thermo Scientific, CA, ABD) kullanılarak nLCMS/MS sistemi ile analiz edildi. nLC-Ms/Ms cihaz sistemine ait görsel Şekil 3.8.'de verilmiştir. Tüm sistem Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) aracılığıyla kontrol edildi. A (%0,1 FA) ve B (%80 Asetonitril + 30 %0,1 Formik Asit) mobil fazları kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ayrımı yapıldı. Kesilmiş peptitler, bir tuzak (trap) kolonu üzerinden geçirilerek konsantre edildi ve tuzlardan arındırıldı. Daha sonra peptidler Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonuna (75 µm x 15 cm x 2 µm, 100 Å çap, Thermo Scientific, CA, ABD) aktararak kromatografik ayrılma işlemine tabi tutuldu.



**Şekil 3. 8.** nLC-MS/MS cihaz sistemi.

Bu süreçte aşağıda özetlenen ayırma gradyanı kullanıldı. On dakika için %6 B, 60 dakika için %6-10 B, 150 dakika için %10-30 B, 40 dakika için %30-50 B, 20 dakika için %50-90, 10 dakika için %90, 10 dakika için %90-6 B ve 5 dakika için %6 B olacak şekilde 300 dakikalık toplam çalışma süresinde 300 nL/dakika akış hızıyla analizler gerçekleştirildi.

Tam tarama MS1 spektrumları aşağıdaki parametrelerle elde edildi: çözünürlük 70.000, tarama aralığı 400- 2000 m/z, hedef otomatik kazanç kontrolü (AGC)  $3 \times E6$ , maksimum enjeksiyon süresi 60 ms, püskürtme voltajı 2.3 kV. MS/MS analizi, ilk on öncü iyonun seçilmesiyle veriye bağlı edinim yoluyla gerçekleştirilmiştir.

Aşağıdaki parametrelerle çarpışma kaynaklı ayrışmadan (yüksek enerjili çarpışmalı ayrışma, higher-energy collisional dissociation (HCD)) oluşan MS2 analizi; çözünürlük 17.500, AGC  $1E6$ ; maksimum enjeksiyon süresi 100 ms, izolasyon penceresi 2.0 m/z normalleştirildi ve çarpışma enerjisi (NCE) 27 olacak şekilde gerçekleştirildi. Cihaz, her analizden önce standart bir pozitif kalibratör ile (LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution, Pierce, ABD) kalibre edildi.

### 3.5.2. nLC-MS/MS Veri Analizi ve Bioinformatik Analizler

Ham verilerin analizi ve protein tanımlaması için Proteom Discoverer 2.5 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı ve analizler sırasında aşağıdaki parametreler uygulandı; Peptit kütle toleransı 10 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sabit değişiklikler sistein karbamidometilasyonu, kararsız değişiklikler metionin oksidasyonu ve asparajin deaminasyonu. Her protein için tanımlanan minimum özgün peptit sayısı 1 olarak alındı ve elde edilen veriler Uniprot veri tabanından elde edilen veri bankalarında tarandı. nLC-MS/MS veri analizi ile tanımlanan proteinlerden ifade düzeyi anlamlı şekilde değişenler, moleküler rollerine, görev aldıkları biyolojik süreçlere, ait oldukları protein sınıflarına ve işlev gördükleri yollara göre sınıflandırmada “PANTHER analizi” kullanıldı. (<http://pantherdb.org>). Her bir sınıflandırma için ayrı ayrı değerlendirmeler yapıldı ve etkilenen metabolik olaylar ve sistemler belirlendi. Ayrıca, tanımlanan proteinlerin birbirleri ile olan etkileşiminin (protein-protein) belirlenmesi için ise “STRING” analizi kullanıldı. (<https://string-db.org>). Elde edilen veriler western blotlama yöntemi ile doğrulandı.

### 3.6. nLC-MS/MS Analizi Sonucunda Belirlenen Proteinin Verifikasyonu

#### 3.6.1. Hücre Özütlerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu

Hücre özütlerindeki troponin seviyelerini tespit etmek için yeterli protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla örnekler 5ug, 20ug ve 40 ug olmak üzere %12’lik SDS jelle yüklendi. 1:1000 dilüsyon oranında Kardiyak Troponin I Antikoru kullanılarak western blot analizi yapıldı. Yapılan WB analizi sonucunda 20 ug protein örneğinin troponin seviyelerini saptamak için yeterli olduğu tespit edildi.

Yeterli protein konsantrasyonu belirlendikten sonra 3 tekrarlı olacak şekilde tüm hücre hatlarına ait protein özütü örneklerinde troponin seviyeleri western blot analizleri ile tespit edildi. Farklı hücre tipine ait hücre özütlerindeki troponin seviyelerini karşılaştırmak amacıyla bar grafiği çıkartıldı.

### **3.6.2. Sekretom Örneklerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu**

Hücre sekretomlarındaki dilüsyon göz önünde bulundurularak 60'ar ug örnek, %12'lik SDS-jele yüklendi. 1:1000 dilüsyon oranında Kardiyak Troponin I Antikoru kullanılarak 3 tekrarlı olacak şekilde western blot analizi yapıldı. Farklı hücre tipine ait sekretomlardaki troponin seviyelerini karşılaştırmak amacıyla bar grafiği çıkartıldı.

### **3.6.3. Doku Örneklerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu**

Farklı tip meme kanseri doku örnekleri (TNBC, Luminal A, Luminal B Her2-, Luminal B Her2+, Her2 Over Ekspresyon) ve her tipe ait sağlıklı doku örnekleri 60'ar ug olacak şekilde %12'lik SDS jellere yüklendi. 1:1000 dilüsyon oranında Kardiyak Troponin I Antikoru kullanılarak 3 tekrarlı olacak şekilde western blot analizi yapıldı. Farklı tip meme kanseri doku örneklerindeki ve her tipe ait sağlıklı doku örneklerindeki troponin seviyelerini karşılaştırmak amacıyla bar grafiği çıkartıldı.

#### 4. BULGULAR

##### 4.1. pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboIDPlazmitininAmplifiye Edilmek Üzere, E.Coli'ye ait XL1Blue Suşuna Elektroporasyon Yolu ile Transforme Edilmesi ve Plazmid İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi

Plazmitin elektrokompotent haldeki XL1Blue bakterilerine aktarımı elektroporasyon yoluyla gerçekleştirildi. Transformatlar 1:1000 oranında ampisilin içeren LB Broth agar besiyerine yayma ekim yöntemiyle ekildi. Gece boyu inkübasyon sonrasında Şekil 4.1.'de görüldüğü üzere tek düşen bir koloni seçildi.



Şekil 4. 1. Transformasyon sonrası tek düşen koloni seçimi.

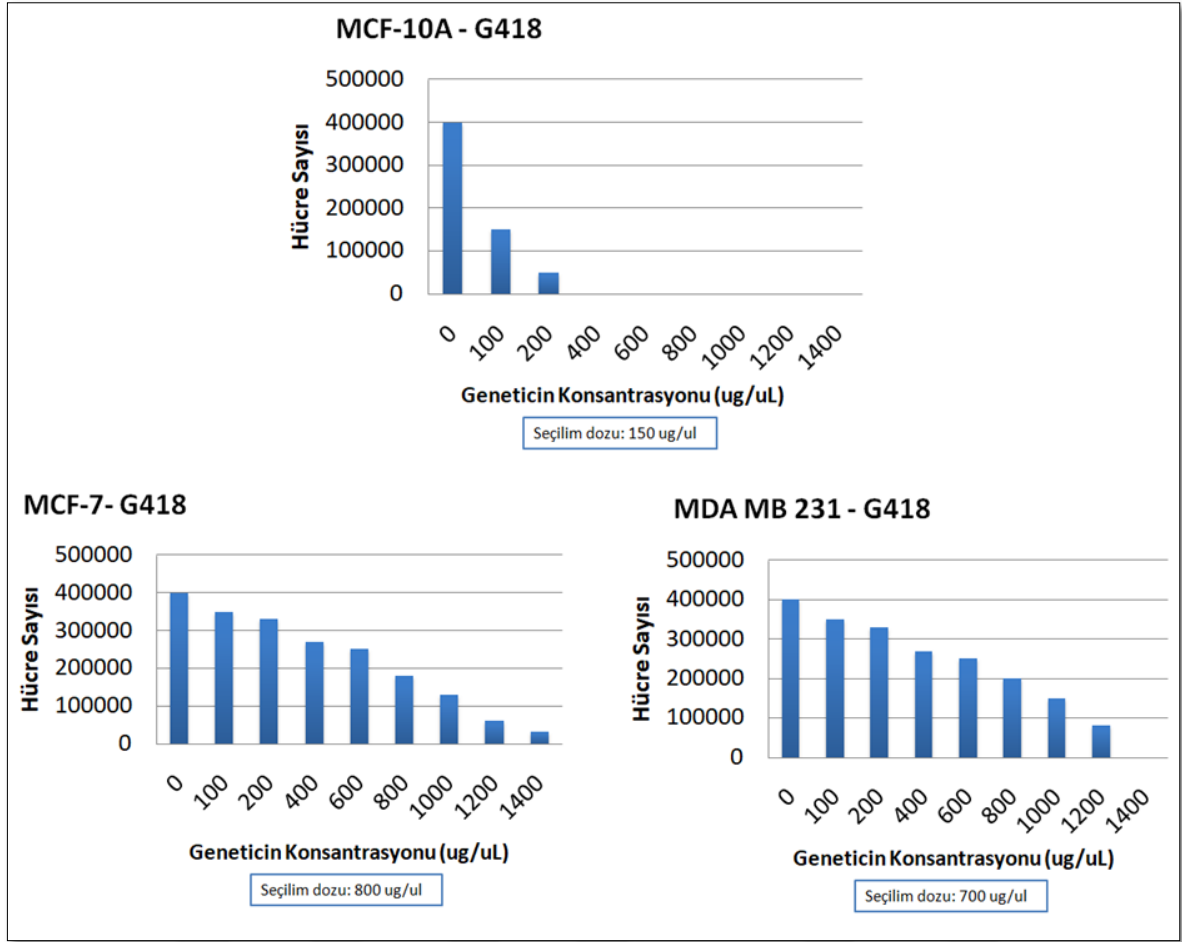
Seçilen koloni, 1:1000 oranında Ampisilin ile hazırlanmış 2ml LB Broth sıvı besiyeri içerisinde ön kültüre alındı. Gece boyu 37C°'de çalkalayıcı etüvde inkübe edildi. Ertesi gün ön kültürden alınan 1mL bakteri-besiyeri karışımı, 100mL'lik 1:1000 oranında Ampisilin ile hazırlanmışLB Broth sıvı besiyerine ekildi ve gece boyu 37C°'de çalkalayıcı etüvde gün boyu inkübe edildi. Ardından bakteri-besiyeri karışımı 4500 rpm 15 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi ve besiyeri uzaklaştırıldı. Elde edilen bakteri pelletleri ile EndoFree Plasmid Maxi Kiti (Lot:151036440) kullanılarak belirtilen protokole uygun olacak şekilde plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen plazmitlerin konsantrasyonu ve saflığı nanorop cihazı ile ölçüldü. Ölçüm sonuçları Tablo 4.1.' de verilmiştir.

**Tablo 4. 1.** Maxiprep ile elde edilen plazmitlerin saflık ve konsantrasyonunun ölçümü.

| Nanodrop ölçüm sonuçları- K1 |      |
|------------------------------|------|
| 260/280                      | 1,88 |
| 260/230                      | 2,34 |
| ng/uL                        | 1300 |

#### **4.2. MCF-10A, MCF-7 ve MDA MB 231 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi ve Uygun Seçilim Dozunun Belirlenmesi**

MCF-7 ve MDA MB 231 hücreleri; kontaminasyonu önlemek amacıyla antibiyotik olarak, %1 Penisilin/Streptomisin karışımı ve zengin bir protein çözeltisi olarak, %10 Fetal Bovin Serum (FBS) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri içerisinde %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C koşullarında kültüre edildi. MCF-10A hücreleri ise; MEGM besiyeri içerisinde, %10 FBS (Fetal Bovin Serum), %1 Penisilin/Streptomisin varlığında %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C koşullarında kültüre edildi. Hücreler uygun yoğunluğa ulaştığında tripsinize edilerek petri yüzeyinden kaldırıldı. Hücreler Thoma lamı kullanılarak sayıldı ve kuyucuk başına yaklaşık 30.000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu petri kaplarına ekildi. Hücrelerin petri kaplarına yapışması için 1 gün beklendi. Ertesi gün belirli doz aralıklarında antibiyotik uygulaması yapıldı. Herbir hücre hattına özgü, tüm hücre ölümünün gerçekleştiği antibiyotik dozu belirlendi. Ardından her kuyudaki hücreler ayrı ayrı olacak şekilde tripsinize edilerek kaldırıldı ve Thoma lamı kullanılarak sayıldı. Hücre sayıları ve uygulanan antibiyotik dozları baz alınarak, doza bağlı hücre ölüm grafikleri çıkartıldı. Herbir hücre hattına ait doz-ölüm grafikleri Şekil 4.2.'de verilmiştir. Hücrelerin öldüğü dozun yarısı seçilim dozu olarak hesaplanmıştır. MCF-10A için seçilim dozu 150 ug/uL, MCF-7 için seçilim dozu 800 ug/uL, MDA MB 231 için seçilim dozu 700 ug/uL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 2. Her bir hücre hattına ait doza bağlı hücre ölüm grafikleri.

#### 4.3. pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboIDPlazmitinin MCF-10A, MCF-7 ve MDA MB 231 Hücrelerine Neon-Transfeksiyon Yöntemiyle Aktarılması ve Seçilimin Sağlanması

Hücrelerin yoğunluğu % 70-80 ulaştığında, MCF-10A, MDA MB 231, MCF-7 hücre hatlarına pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmitinin aktarımı, Neon-Transfeksiyon sistemi protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Transfeksiyon ürünleri, içine coverslip yerleştirilmiş, antibiyotiksiz büyüme besiyeri içeren petrilere ekildi. Ertesi gün, plazmiti içine alan hücrelerin seleksiyonu için besiyerlerine belirlenen dozlarda Geneticin (G418) antibiyotiği eklendi. Hücrelerin büyümesi ve seçilimin sağlanması için 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 4-6 hafta boyunca inkübasyon gerçekleştirildi.

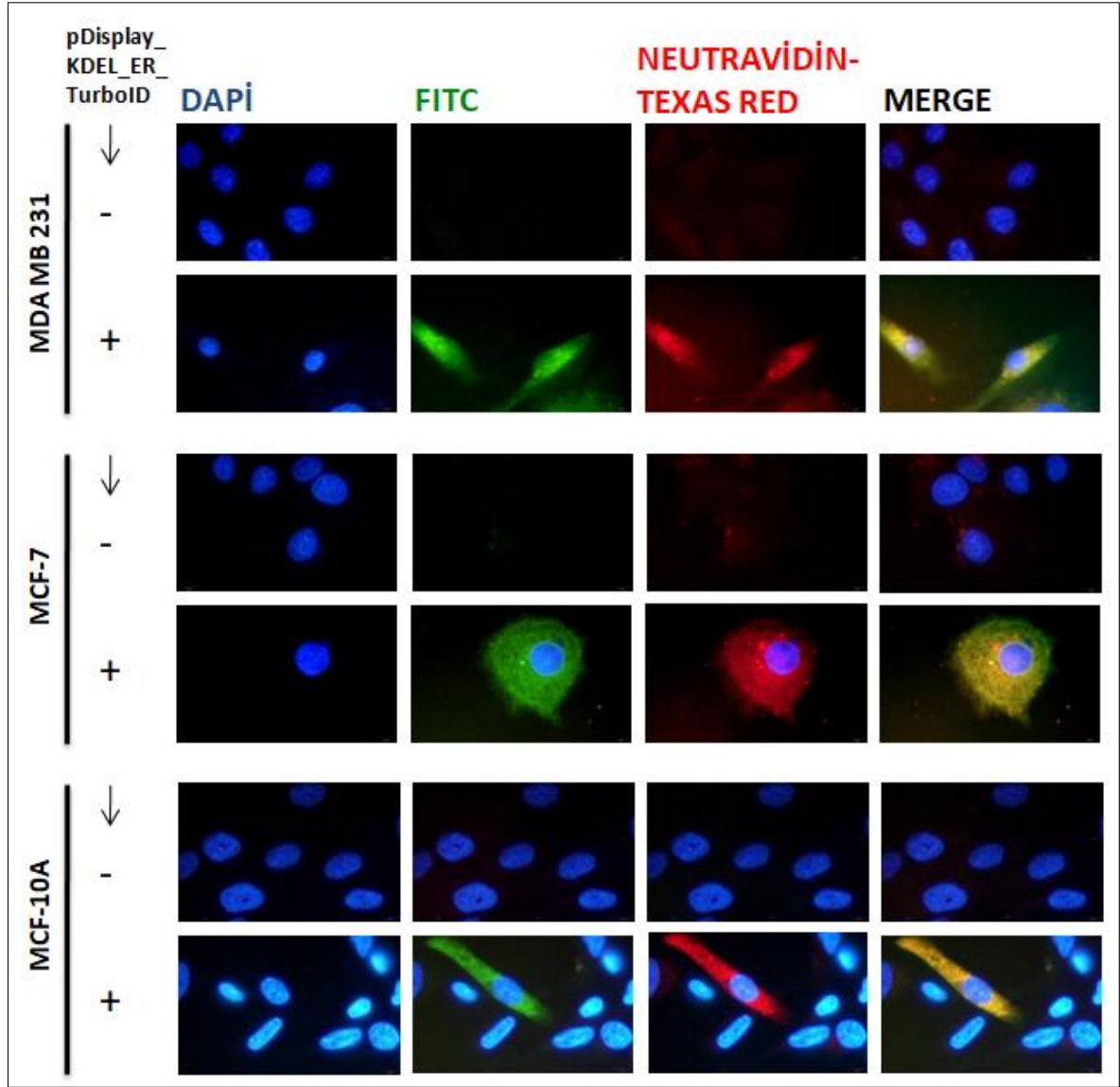
#### **4.4. Transfeksiyonun Western Blot(WB) Analizleri ve Immunfloresan Boyamalarla Verifikasyonu**

Hücrelerde biyotinitilasyonun gerçekleştiğini, TurboID üretimini ve lokalizasyonunu görmek amacıyla Immunfloresan boyama (IF) deneyleri yapıldı. Bu amaç doğrultusunda, pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmiti transfekte edilmiş hücreler ve transfeksiyona tabi tutulmamış normal hücreler kullanıldı. Coverslip yüzeyine yapışmış hücrelere biyotinitilasyon reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon sonrasında yapılan Immunfloresan boyamaya ait görüntüler Şekil 4.3.'de verilmiştir.

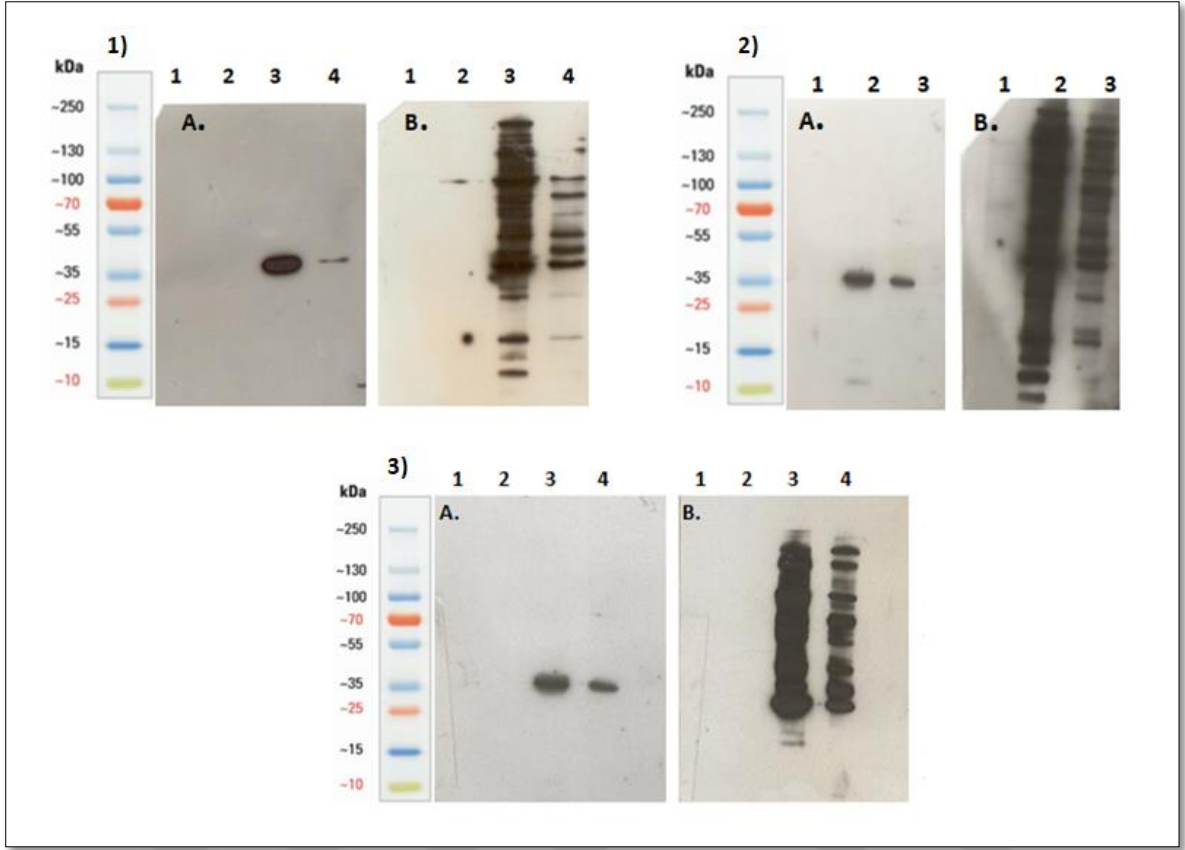
DAPI boyaması ile hücrelerin çekirdekleri belirgin hale getirildi. IF analizinde 1:1000 oranında FITC antikoru kullanılarak TurboID'nin ER'daki lokalizasyonu belirlendi. 1:1000 oranında Neutravidin Texas Red antikoru kullanılarak hücre içindeki biyotinitilasyon görüntülendi. Şekil 4.4.1.'de görüldüğü üzere, MDA MB 231 ve MCF-7 hücrelerinde başarılı bir şekilde, Neutravidin Texas Red kullanılarak biyotinitilasyon, FITC kullanılarak TurboID üretimi ve ER çevresinde halka profili görüntülendi. MCF-10A hücrelerinde ise bu başarı oranı diğerlerine kıyasla daha düşük olarak görüldü.

IF deneyleri ile elde edilen sonuçları desteklemek için WB analizleri yapıldı. Seçilim sonrasında plazmiti içine alan hücrelerde TurboID üretimini ve biyotinitlenen proteinlerin profilini görmek amacıyla BirA antikoru ve Streptavidin-HRP kullanılarak WB analizleri yapıldı. WB analizi sonuçları Şekil 4.4.'de verilmiştir.





Şekil 4. 3.MCF-10A, MCF-7, MDA MB 231 hücre hatlarına ait pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmitini içeren ve içermeyen hücrelerde IF analizi ile biyotininilasyonun, TurboID üretimi ve lokalizasyonunun gösterilmesi.

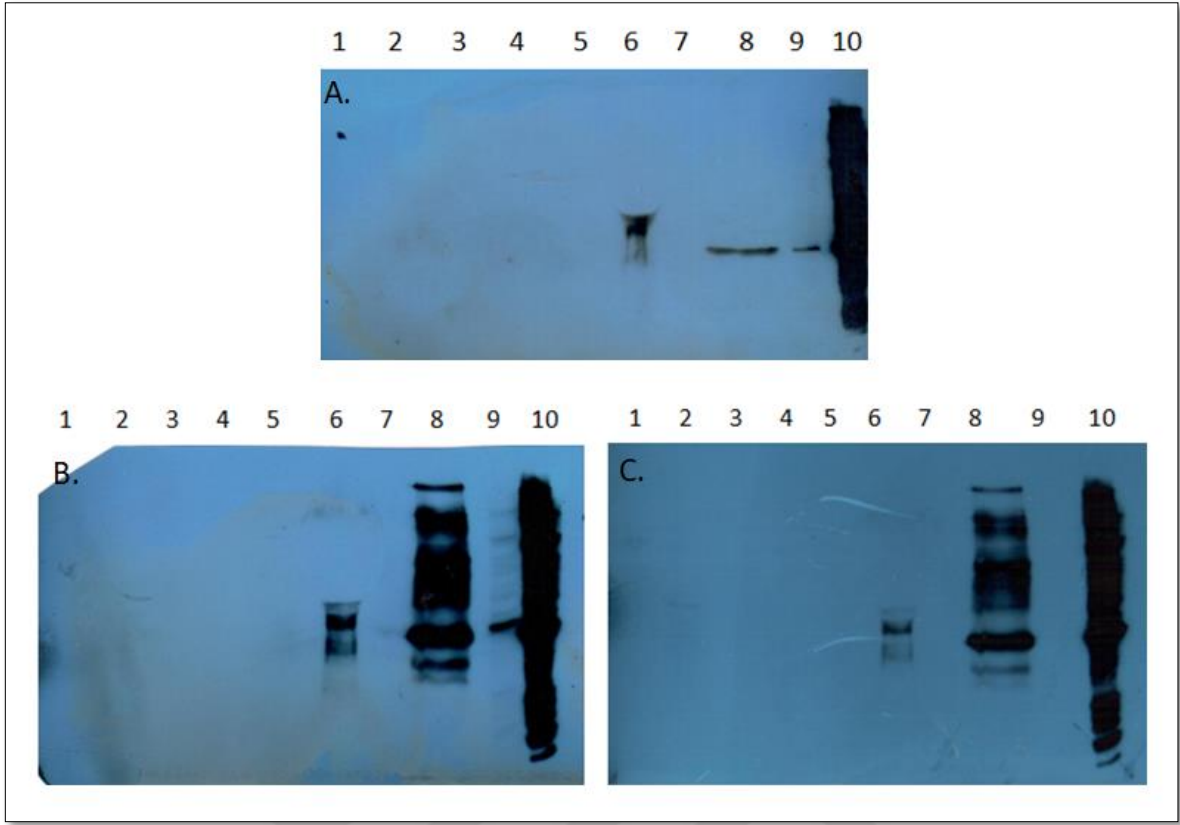


**Şekil 4. 4.** Transfeksiyonun doğrulanması amacıyla 1:1000 dilüsyon oranı ile hazırlanmış BirA antikor ve 1:3000 dilüsyon oranıyla hazırlanmış Streptavidin-HRP kullanılarak yapılan WB analizlerinin sonuçları. Şekil A. BirA Antikoru uygulamasına ait görüntüleri, Şekil B. Streptavidin-HRP uygulamasına ait görüntüleri ifade etmektedir. 1) MCF-10A hücrelerine ait, 2) MCF-7 hücrelerine, 3)MDA MB 231 hücrelerine ait WB görüntüleridir. Yükleme sırası tüm jellerde aynı olmak üzere; 1) Önceden boyalı marker, 2) Negatif Kontrol (Antibody'nin test edilmesi için, 20µg), 3) Pozitif Kontrol (Antibody'nin test edilmesi için, 20µg), 4) pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID aktarılmış MCF-10A hücre özütü, 20ug) şeklindedir.

#### **4.5. Biotinilasyon Reaksiyonlarının Kurulması, Sekretom Toplanması ve Salgı Proteinlerinin Zenginleştirilmesi**

Transfeksiyon işemi IF deneyleri ve WB analizleri ile doğrulandıktan sonra sekretom toplama deneyleri yapıldı. Bu amaç doğrultusunda, her bir hücre hattı için T175'lik flasklarda yer alan yaklaşık %70-80 yoğunluğa ulaşmış, plazmid içeren ve içermeyen normal hücreler üzerine biotinilasyon reaksiyonları kuruldu. Reaksiyon süresi bitiminde sekretom örnekleri toplandı, tampon değişimine tabi tutuldu ve konsantre edildi. Ardından manyetik boncuklar kullanılarak zenginleştirildi. Zenginleştirme işleminin verimini görmek amacıyla Streptavidin-HRP kullanılarak WB analizi yapıldı. Bu deney sonucunda elde edilen, sekretomdan zenginleştirilmiş biyotinitle proteinlerinlere ait genel protein profili görüntüleri figür 5'de verilmiştir.

Şekil 4.5.'deki B ve C bölümlerinde görüldüğü üzere MCF-7 ve MDA MB 231 hücre sekretomlarından nLC-MS/MS analizi için yeterli miktarda biyotinitle salgı proteini elde edilmiştir. Şekil 4.5. A'da görüldüğü üzere MCF-10A hücre sekretomlarından az miktarda biyotinitle protein zenginleştirilebilmiştir. Bu protein miktarının nLC-MS/MS analizi için yeterli olmaması sebebiyle MCF-10A hücre hattı çalışma grubundan çıkartılmıştır. Çalışmaya non-invaziv özellikteki MCF- 7 hücre hattı ile invaziv özellikteki MDA MB 231 hücre hatlarının karşılaştırmalı sekretom analizini yapma kararı alınarak devam edilmiştir.



**Şekil 4. 5.** Manyetik boncuklar ile zenginleştirilen salgı proteinlerine ait 1:3000 dilüsyon oranı ile Streptavidin-HRP kullanılarak yapılan WB görüntüleri. Şekil A. MCF-10A hücre sekretomlarına ait, Şekil B. MCF-7 hücre sekretomlarına ait ve Şekil C. MDA MB 231 hücre sekretomlarına ait görüntüleri içermektedir. Tüm jellerin yükleme sıraları aynı olmak üzere 1) Önceden boyalı marker, 2) Plazmid içermeyen hücre sekretomlarına ait boncuklara bağlanmayan fraksiyon, 3)Plazmid içermeyen hücre sekretomlarına ait yıkama fraksiyonu (15µl), 4)Plazmid içermeyen hücre sekretomlarına ait elüsyon fraksiyonu (15µl), 5)Plazmid içermeyen hücre sekretomlarına ait boncuklarda kalanlar (15µl), 6) Plazmid aktarımı yapılmış hücre sekretomlarına ait bağlanmayan fraksiyon (15µl), 7) Plazmid aktarımı yapılmış hücre sekretomlarına ait yıkama fraksiyonu (15µl), 8)Plazmid aktarımı yapılmış hücre sekretomlarına ait elüsyon fraksiyonu (15µl), 9) Plazmid aktarımı yapılmış hücre sekretomlarına ait boncuklarda kalanlar (15µl), 10)Pozitif kontrol (20ug)

#### 4.6. nLC-MS/MS Veri Analizi ve Bioinformatik Analizler

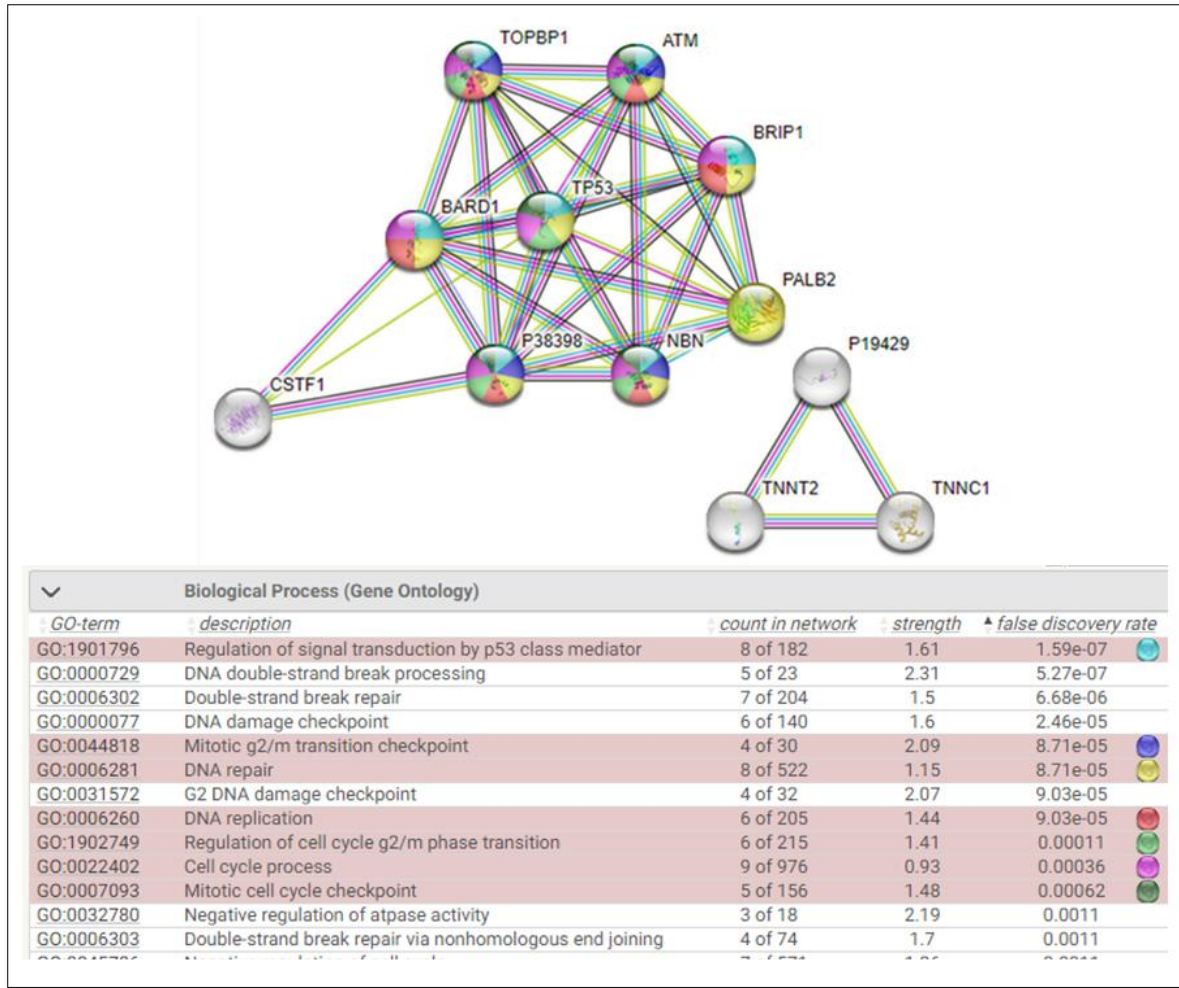
Zenginleştirilen salgı proteinleri, nLC-MS/MS analizi ile tanımlanmak üzere triptik kesime tabi tutuldu. Protein konsantrasyonunun düşük olması sebebi ile solüsyon içi triptik kesim tercih edildi. Triptik kesim öncesinde konsantrasyon ölçümü, proteinlerin içinde bulunduğu elüsyon bufferındaki SDS varlığı sebebiyle Bradford analizi ile yapılamadı. Protein konsantrasyonu çok düşük olduğu için daha fazla protein kaybına sebep olmamak adına herhangi bir tampon değişimi girişimde bulunulmadı. Sonuç olarak, protein konsantrasyonu ölçümü, Nanodrop cihazı kullanılarak A280 ölçümü ile yapıldı. Blank olarak elüsyon tamponu kullanıldı ve bu sonuçlara göre kesim öncesi protein konsantrasyonları eşitlendi. A280 ölçümü sonuçları Tablo 4.2.'de verilmiştir. Hazırlanan peptit örnekleri, nLC-MS/MS analizine tabi tutulduktan sonra, Proteom Discoverer 2.5 yazılımı programı ve sekretom veri bankaları kullanılarak tanımlamalar gerçekleştirildi. Yapılan veri analizleri sonucunda tanımlanan proteinler, işlevleri ve gen numaralarıyla birlikte Tablo 4.3.'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre invaziv özellikteki MDA MB 231 hücrelerinde non-invaziv özellikteki MCF-7 hücrelerine kıyasla yukarı regüle olan 5 adet protein tanımlandı. Yukarı regüle olan proteinlere ait yapılan STRING analizleri Şekil 4.6.'da ve PANTHER analizleri Şekil 4.7.'de verilmiştir.

**Tablo 4. 2.** nLC-MS/MS analizini öncesinde protein konsantrasyonu belirlemek için yapılan A280 ölçümü sonuçları.

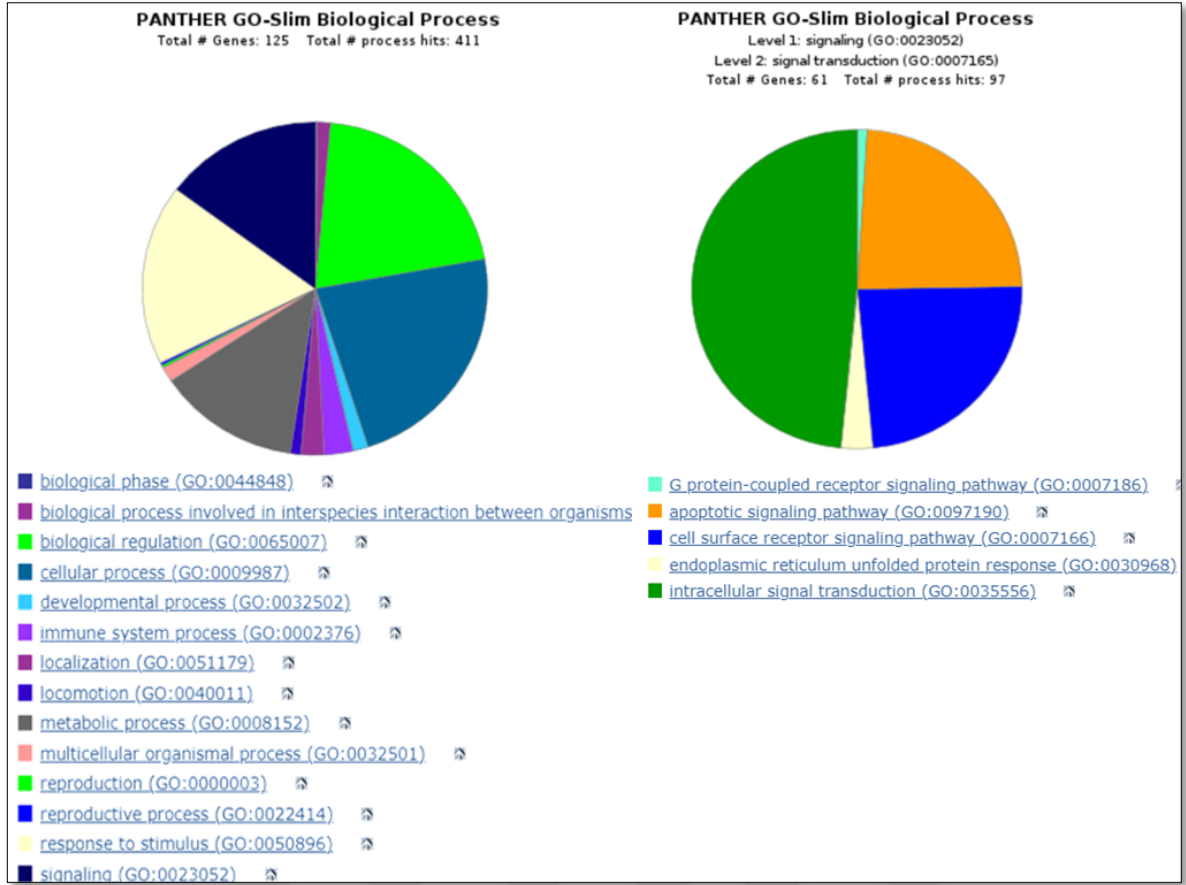
| A280 ÖLÇÜMÜ                   |                   |
|-------------------------------|-------------------|
| Negatif Kontrol MCF-7         | 0,06 mg/mL (75uL) |
| Transfekte Edilmiş MCF-7      | 0,08 mg/mL (75uL) |
| Negatif Kontrol MDA MB 231    | 0,24 mg/mL (20uL) |
| Transfekte Edilmiş MDA MB 231 | 0,25 mg/mL (20uL) |

**Tablo 4. 3.** nLC-MS/MS analizisnucunda tanımlanan proteinlere ait gen numarası ve işlev bilgisi.

| Gen Numarası       | Protein İsmi                                                                  | Protein İşlevi                                                                                                                       |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>GN=BRCA1</b>    | Breast cancer type 1 susceptibility protein (Fragment)                        | Hücre döngüsü, DNA tamiri, Lipid biyosentezi,ubi bağlantılı yolaklar, transkripsiyonun düzenlenmesi                                  |
| <b>GN=PNPLA6</b>   | Patatin-like phospholipase domain-containing protein 6                        | Lipid metabolizması ve degradasyonu                                                                                                  |
| <b>GN=MARCHF7</b>  | E3 ubiquitin-protein ligase                                                   | Ubi bağlantılı yolaklar                                                                                                              |
| <b>GN=IFRD2</b>    | Interferon-related developmental regulator 2                                  | İskelet kası hücre farklılaşması                                                                                                     |
| <b>GN=ATF7</b>     | Cyclic AMP-dependent transcription factor                                     | Konak-virüs bağlantıları, Transkripsiyonun düzenlenmesi                                                                              |
| <b>GN=TNNI3</b>    | Cardiac troponin I                                                            | aktin bağlama, kalp kası kasılması, ATP'ye bağlı aktivitenin negatif regülasyonu                                                     |
| <b>GN=FBXL15</b>   | F-box/LRR-repeat protein 15 (Fragment)                                        | Ubi bağlantılı yolaklar                                                                                                              |
| <b>GN=CDC42EP3</b> | Cdc42 effector protein 3 (Fragment)                                           | Hücre şekillenmesi                                                                                                                   |
| <b>GN=CEP41</b>    | Centrosomal protein of 41 kDa (Fragment)                                      | Protein taşınması,Kalsiyum biyosentezi ve talınması                                                                                  |
| <b>GN=C2CD6</b>    | C2 calcium-dependent domain-containing protein 6                              | Silyumdaki tübülün glutamillasyonu                                                                                                   |
| <b>GN=EPS8L2</b>   | Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2 (Fragment) | SOS1'in guanin değişim aktivitesini uyarır. Aktin hücre iskeletinin zarının kıvrılmasında ve yeniden şekillenmesinde rol oynayabilir |



Şekil 4. 6. nLC-MS/MS analizi sonucunda tanımlanan proteinlere ait STRING analizi.



Şekil 4. 7. nLC-MS/MS analizi sonucunda tanımlanan proteinlere ait PANTHER analizi.

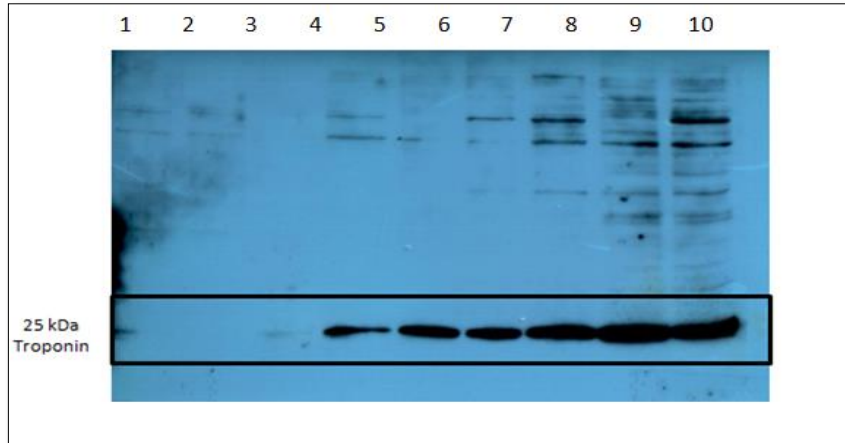
LC-MS/MS analizi sonuçlarıyla kullanılarak yapılan biyoinformatik analizler neticesinde kardiyak troponin I'nın doğrudan kanserle bir ilişkisi görülememesine rağmen ayrıntılı yapılan literatür taramasında kanser ile ilişkisinin yeni araştırılıyor olduğu görüldü. TNNT3 tarafından kodlanan kardiyak troponin I (cTnI), kalp kasında eksprese edilen troponin kompleksinin inhibe edici bir alt birimidir ve kalp kasılmasının düzenlenmesinde merkezi rolü bulunmaktadır (Tsuruda ve ark., 2022). Literatürdeki bir çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) dokularında, insan adenokarsinoma hücrelerinde SPCA-1 (akciğer) ve BGC 823'te (mide) cTnI ekspresyonu, immünohistokimya çalışmaları, western blot analizleri ve gerçek zamanlı PCR analizleri ile incelenmiş ve troponin ekspresyonunda anlamlı değişiklikler saptanmıştır (Chen ve ark., 2014). Literatürdeki bazı çalışmalarda kardiyak troponin I'nın, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularında ve insan karsinom hücrelerinde anormal ekspresyonu bildirilmiş olmasına rağmen, kanserlerdeki rolleri hala büyük ölçüde bilinmemektedir (Cong ve ark., 2022).



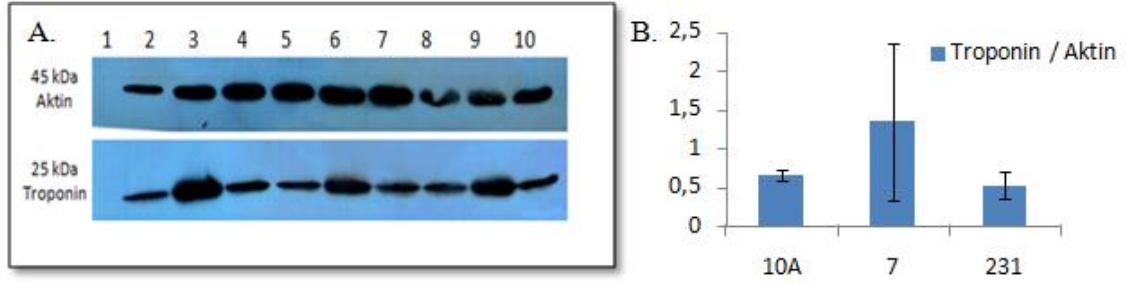
Literatürde meme kanserinde troponin proteinin ekspresyonunu araştırmaya yönelik bir çalışma bulunmadığı görülmüş ve meme kanseri dokularında, meme kanseri hücre hatlarında ve sekretomlarında Kardiyak troponin I proteinin ekspresyon seviyelerinin incelenmesine karar verilmiştir.

#### 4.7. Hücre Özütlerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu

MCF-10A, MCF-7, MDA MB 231 hücre hatlarında Kardiyak troponin I proteinin ekspresyon seviyelerini kıyaslamak amacıyla her bir hücre hattına ait hücre özütleri kullanılarak WB analizleri yapıldı. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak, troponin seviyelerini saptamak için yeterli konsantrasyonu belirlemek amacıyla tüm örnekler 5 ug, 20 ug ve 40 ug olmak üzere %12'lik SDS jele yüklendi. 1:2000 oranında Aktin, 1:1000 oranında Kardiyak Troponin-I ve 1:10000 oranında Anti-mouse antikoru kullanılarak WB analizleri yapıldı. Yeterli örnek konsantrasyonunu belirlemek üzere yapılan analize ait WB görüntüsü, Şekil 4.8.'de verilmiştir. Yapılan WB analizi sonucunda 20 ug protein örneğinin troponin seviyelerini saptamak için yeterli olduğu tespit edildi. Her bir hücre tipine ait hücre özütlerindeki troponin seviyelerini karşılaştırmak amacıyla, 20 ug protein kullanılarak deney 3 tekrarlı olarak yapıldı, Şekil 4.9.'da verilmiştir.



**Şekil 4. 8.** Hücre özütlerinde troponin seviyesini saptamak için yeterli örnek konsantrasyonunu belirlemek üzere yapılan WB analizi görüntüsü. 1) Marker, 2) MCF-10A hücre özütü 5 ug, 3 )MCF-7 hücre özütü 5 ug, 4) MDA MB 231 hücre özütü 5 ug, 5) MCF-10A hücre özütü 20 ug, 6) MCF-7 hücre özütü 20 ug, 7) MDA MB 231 hücre özütü 20 ug, 8) MCF-10A hücre özütü 40 ug, 9) MCF-7 hücre özütü 40 ug, 10) MDA MB 231 hücre özütü 40 ug.

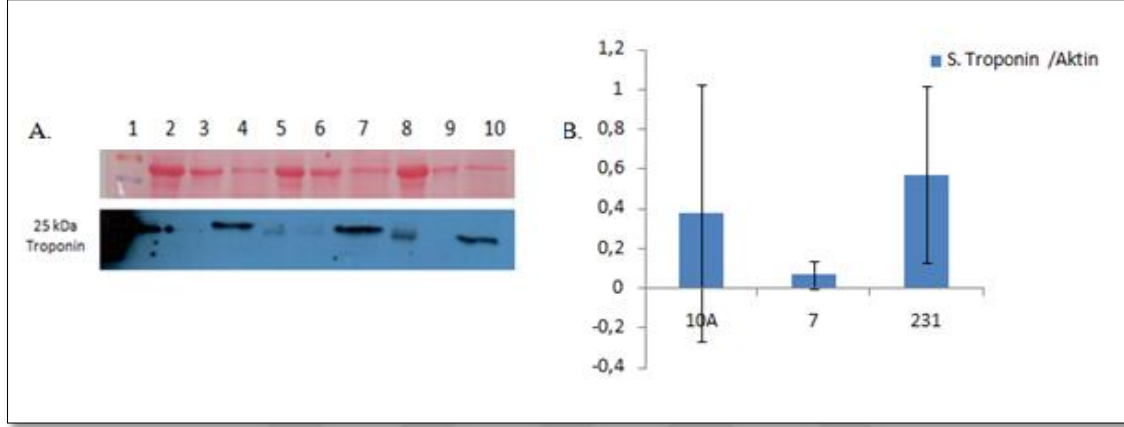


**Şekil 4. 9.** A. Her bir hücre hattına ait hücre özütlerindeki troponin seviyesi ve aktin normalizasyonuna ait WB görüntüsü. Üstteki görüntüde aktin bantları, alttaki görüntüde troponin bantları yer almaktadır. B. Bu WB görüntüleri kullanılarak oluşturulmuş bar grafiği bulunmaktadır. 1)Marker, 2) MCF-10A hücre özütü 20 ug, 3) MCF-7 hücre özütü 20 ug, 4) MDA MB 231 hücre özütü 20 ug, 5) MCF-10A hücre özütü 20 ug, 6) MCF-7 hücre özütü 20 ug, 7) MDA MB 231 hücre özütü 20 ug, 8) MCF-10A hücre özütü 20 ug, 9) MCF-7 hücre özütü 20 ug, 10)MDA MB 231 hücre özütü 20 ug.

nLC-Ms/Ms analizi sonucunda, sekretom örneklerinde troponin proteinin MDA MB 231 hücrelerinde MCF-7 hücreleri ile karşılaştırıldığında yukarı regüle olduğu görülmüştü. Yapılan WB analizi sonucunda 3 tekrardan benzer şekilde, MCF-7 hücre özütündeki troponin miktarının metastatik olan MDA MB 231 hücrelerindekiinden daha yüksek olduğu görüldü. Bunun sebebinin Troponin proteininin metastaz ile ilişkili olabileceği ve metastatik özellikteki MDA MB 231 hücrelerinde sekresyonunun artmasından ötürü hücre içerisindeki troponin seviyesinin daha az olabileceğine dair bir hipotez öne sürmemize neden oldu. Bu hipotezimizin doğruluğunu değerlendirmek amacıyla sekretom örneklerinde WB analizi ile troponin seviyelerine bakıldı.

#### 4.8. Sekretom Örneklerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu

Herbir hücre hattına ait sekretom örnekleri 60'şar ug olacak şekilde %12'lik SDS jellere yüklendi. 1:1000 oranında Kardiyak Troponin-I kullanılarak WB analizleri gerçekleştirildi. Jeldeki yüklemeyi görmek amacıyla Ponceus Boyaması yapıldı. Sekretom örneklerindeki troponin seviyelerini gösteren WB görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiştir.

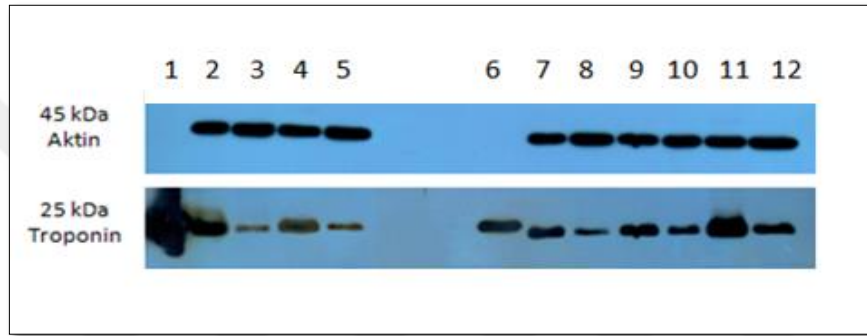


**Şekil 4. 10.** A. Herbir hücre hattına ait hücre sekretomlarındaki troponin seviyesini gösteren WB görüntüsü ve Ponceus boyamasına ait görüntü. B. Bu görüntüler kullanarak oluşturulmuş bar grafiği. 1) Marker, 2) MCF-10A sekretom örneği 20 ug, 3)MCF-7 sekretom örneği 20 ug, 4) MDA MB 231 sekretom örneği 20 ug, 5) MCF-10A sekretom örneği 20 ug, 6) MCF-7 sekretom örneği 20 ug, 7) MDA MB 231 sekretom örneği 20 ug, 8) MCF-10A sekretom örneği 200 ug, 9) MCF-7 sekretom örneği 20 ug, 10) MDA MB 231 sekretom örneği 20 ug.

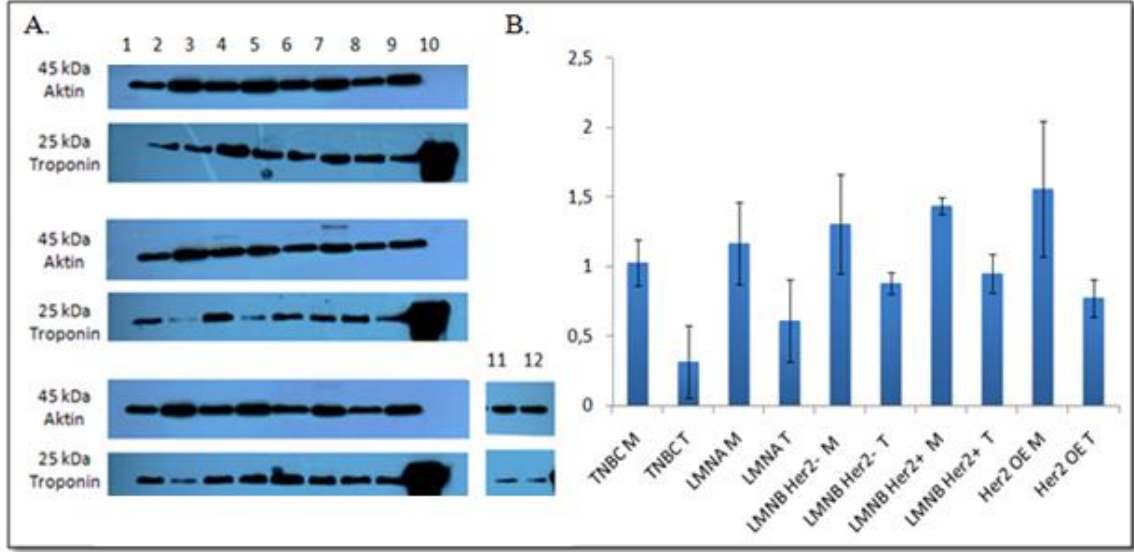
Sekretom örnekleri ile yapılan WB analizi sonucunda 3 tekrarda uyumlu olarak, MDA MB 231 sekretom örneklerinde MCF-7 ve MCF-10A sekretomundan daha fazla miktarda troponin görüldü. Troponin sekresyonunun metastasla ilişkili olduğu düşünüldü. Hücre özütlerinde troponin seviyesi non- invaziv olan MCF-7 hücrelerinde invaziv olan MDA MB 231 hücrelerinden daha fazla görülmüştü. Bu sonuç doğrultusunda, MCF-7 hücre özütündeki troponin miktarının metastatik olan MDA MB 231 hücrelerindeki daha yüksek olmasının sebebini, metastatik hücrelerde troponin sekresyonunun artması neticesinde hücre içerisindeki troponin miktarının azılıyor olabileceği hipotezimiz ile açıklamak mümkündür.

#### 4.9. Doku Örneklerinde Troponin Ekspresyonlarının WB Analizi İle Verifikasyonu

Hücre özütleri ve sekterom örnekleriyle yapılan WB analizleri sonuçlarını desteklemek üzere farklı tip meme kanserlerine ait doku örneklerinde troponin seviyeleri WB analizleri yapılarak değerlendirildi. Her bir meme kanseri tipine ait örneklerdeki troponin seviyeleri her grubun sağlıklı dokusundaki troponin seviyeleri ile karşılaştırıldı. Bu amaç doğrultusunda, 60 ug doku örneğinin troponin seviyesini saptamak için yeterli olup olmadığını görmek üzere yapılan ön deneme çalışmasına ait görüntü Şekil 4.11’de verilmiştir.



**Şekil 4. 11.** Her bir meme kanseri tipine ait dokulardaki troponin seviyeleri ile her grubun sağlıklı dokusundaki troponin seviyelerinin gösteren WB görüntüsü. 1) Pozitif Kontrol (Saf Troponin, 150 ng), 2) TNBC tipi sağlıklı dokuya ait protein örneği, 3) TNBC tipi kanserli dokuya ait protein örneği 4) LMNA tipi sağlıklı dokuya ait protein örneği 5) LMNA tipi kanserli dokuya ait protein örneği, 6) Pozitif Kontrol (Saf Troponin, 150 ng), 7) LMNB Her2- tipi sağlıklı dokuya ait protein örneği, 8) LMNB Her2- tipi kanserli dokuya ait protein örneği, 9) LMNB Her2+ tipi sağlıklı dokuya ait protein örneği 10) LMNB Her2+ tipi kanserli dokuya ait protein örneği, 11) LMNB Her2 OE (aşırı ekspresyon) tipi sağlıklı dokuya ait protein örneği 12) LMNB Her2 OE (aşırı ekspresyon) tipi kanserli dokuya ait protein örneği.



**Şekil 4. 12.** Her bir hücre hattına ait hücre sekretomlarındaki troponin seviyesini gösteren WB görüntüsü ve Ponceus boyamasına ait görüntü. B. Bu görüntüler kullanılarak oluşturulmuş bar grafiği. 1)Marker, 2) MCF-10A sekretom örneği 20 ug, 3) MCF-7 sekretom örneği 20 ug, 4) MDA MB 231 sekretom örneği 20 ug, 5) MCF-10A sekretom örneği 20 ug, 6) MCF-7 sekretom örneği 20 ug, 7) MDA MB 231 sekretom örneği 20 ug, 8) MCF-10A sekretom örneği 200 ug, 9) MCF-7 sekretom örneği 20 ug, 10) MDA MB 231 sekretom örneği 20 ug.

Şekil 4.12.'de görüldüğü üzere WB analizinin 3 tekrarında ön denemeyle uyumlu sonuçlar elde edildi. Her bir meme kanseri tipine ait doku örnekleri kendi grubunun sağlıklı dokusuyla karşılaştırıldığında, sağlıklı dokularda troponin seviyelerinin tümörlü dokulardan daha fazla olduğu görüldü. Bar grafiğine bakıldığında benzer şekilde, MCF-7'ı temsil eden LMNA-T doku örneğinde MDA MB 231'i temsil eden TNBC-T doku örneğinden daha yüksek troponin seviyesi görüldü. Bu sonuç, tümörlü dokularda troponin sekresyonunun artması neticesinde hücre içindeki troponin seviyesinin azalıyor olabileceği hipotezimizi destekler niteliktedir.

## 5. TARTIŞMA

Meme kanseri oluşumu ve gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmaların aydınlatılması yeni tanı ve tedavi olanaklarının geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Bu amaca yönelik yapılan biyobelirteç keşfi çalışmaları ile erken ve doğru tanının koyulabilmesi, tedavi etkinliğinin artması, hastalığın takibi ve olası tedavi çalışmaları için hedef moleküllerin belirlenmesi mümkün kılınmaktadır. Günümüzde bu kanserin tanı ve tedavisinde büyüme faktörleri inhibitörleri, belirlenmiş sinyal yollarını hedef alan ajanlar, apoptozu uyaran matriks metalloproteinaz inhibitörleri gibi meme kanserinden sorumlu genleri, invazyon ve metastazı hedefleyen yaklaşımlar mevcuttur (Çetikkaya, 2020). Hücrelerin özellikleri ve dahil olduğu hücresel mekanizmalar hakkında bilgi sağlayabilme potansiyeli barındırması sebebiyle sekretom, kanser biyomekanizmalarının aydınlatılması için çalışılabilecek önemli bir alandır (Uhlén ve ark., 2019). Kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla bulundukları nişi değiştirdikleri ve enzimler, büyüme faktörleri, hücreler arası matriks proteinleri gibi farklı molekülleri hücre dışına salgıladıkları bilinmektedir. Bu moleküler immün sistemden kaçış, hipoksik çevrenin oluşturulması, metastaz ve invazyon gibi pek çok farklı süreçte kritik roller üstlenmektedir (Makridakis ve Vlahou, 2010). Bu nedenle kanser mekanizmalarının aydınlatılması ve yeni hedeflerin ortaya çıkarılabilmesi için daha fazla sekretom inceleme çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Ancak sekretom çalışmalarında bazı zorluklarla karşılaşmaktadır. Ölen hücrelerden kaynaklanan sitoplazmik kirlilikler gibi etmenlerin varlığı biyobelirteç değeri taşıyan düşük miktardaki proteinleri belirlenmesini engellemekte ve ya hatalı proteinlerin bu anlamda değerlendirilmesine yol açmaktadır (Mukherjee ve Mani, 2013). Tez çalışmam kapsamında bu zorluğu aşmak adına, salgı proteinlerini endoplazmik retikulum (ER) içerisinde biyotin ile işaretlenmesi, ardından hücre medyasından bu biyotini salgı proteinlerinin streptavidin kaplı manyetik boncuklar kullanarak zenginleştirilmesi hedeflendi. Daha sonra nLC-MS/MS analizleri ile tanımlama yaparak, sağlıklı meme epital hücresi ile non-invaziv meme kanseri ve invaziv meme kanseri arasındaki proteom farklılığının değerlendirilmesi planlandı. Fakat çalışma sırasında, IF ve WB deneyleri sonucunda, sağlıklı meme epital hücresine ait olan MCF-10A hücre hattında pDisplay\_KDEL\_ER\_TurboID plazmiti aktırımının zayıf olduğu görüldü. (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.)

Bu tez çalışmasında zenginleştirilen sekretom örnekleri kullanılarak sağlıklı meme hücreleri ile kanserli meme hücrelerindeki salgı proteinlerinin nLC-MS/MS analizleri yapılarak karşılaştırması amaçlandı. Fakat düşüktransfeksiyon verimine sahip MCF-10A hücrelerinden zenginleştirilen salgı proteini miktarı, nLC-MS/MS analizleri için yeterli miktarda olmadı. Bu durum neticesinde, tez bütçesi ve zaman sınırlaması sebebiyle, tez çalışmasına non-invaziv özellikteki meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve invaziv özellikteki MDA MB 231 meme kanseri hücre hatları arasında karşılaştırmalı proteom analizleri yapılmasına karar verilerek devam edildi. Yapılan nLC-MS/MS analizleri sonucunda MCF-7 ve MDA MB 231 hücre hatları arasında ekspresyon seviyelerinde anlamlı değişiklikler saptanan proteinler belirlendi. Belirlenen bu proteinler, kanser metabolizmasında yer alan hücresel boyuttaki biyolojik süreçler ile ilişkilendirilmeye çalışıldı. MDA MB 231 hücre hattında MCF-7 hücre hattına göre yukarı regüle olan 5 adet protein saptandı. Bunlar; EPS8L2, C2CD6, FBXL15, TNNT3, CEP41.

Epidermal büyüme faktörü reseptör kinaz substratı 8- benzeri protein 2 (EPS8L2), aktin bağlama, kaderin bağlama, katalitik aktivitenin düzenlenmesi, Rho protein sinyal iletiminin düzenlenmesi, sesin duyuşsal algısı gibi moleküler fonksiyonlara sahiptir (Sutton ve ark., 1977; Chen ve ark., 2010). EPS8L2, aynı zamanda SOS1'in guanin değişim aktivitesini uyarmakta, aktin hücre iskeletinin zarının kıvrılmasında ve yeniden şekillenmesinde rol oynamaktadır (Anwar ve ark., 2018).

Kalsiyum bağımlı doamin içeren protein 6 (C2CD6), tübülün glutamilasyonu için gereklidir. Muhtemelen bir tubulin poliglutamilaz olan TTLL6'nın bazal gövde ile silyum arasında taşınmasına katılarak işlev görmektedir. Ayrıca protein poliglutaminasyonu, protein taşıma, silyum biyogenezi/bozunması, mitotik sentrozom proteinleri ve komplekslerinin alımı, G2/M geçişinde PLK1 aktivitesinin düzenlenmesi gibi moleküler fonksiyonları bulunmaktadır (Farrugia ve Calvo, 2016). Literatürdeki bir çalışmada normal meme dokusuna kıyasla meme kanseri dokusunda C2CD6 ile benzer familyadan olan C2CD3 ekspresyonunun fazla olduğu görülmüştür (Han ve ark., 2022).

F-box/LRR-tekrarlı protein 15 (FBXL15), kemik mineralizasyonu, dorsal/ventral patern oluşumu, mitotik hücre döngüsünün G2/M geçişi, BMP sinyal yolunun pozitif düzenlemesi, proteozomal yıkım gibi süreçlerde rol oynamaktadır (Zheng, Wang ve Wei, 2016).

F-box proteinlerinin biyolojik fonksiyonları, hücrelerde, fare modellerinde ve insan kanser dokularında iyi karakterize edilmiştir (Tekcham ve ark., 2020). Birçok F-box proteininin, doğrudan tümör baskılayıcılar/onkogenler veya dolaylı kanser düzenleyiciler olarak hareket ettiği bulunmuştur (Uddin ve ark., 2016; Song ve ark., 2019).

F-box proteinlerinin hücre döngüsü, DNA hasarı, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) gibi süreçlerde görev aldığı bilinmektedir (Tan ve ark., 2018). Bu tez çalışması ile nLC-MS/MS analizleri sonucunda elde ettiğimiz verilerde, metazatik özellikteki MDA MB 231 hücrelerinde metastatik özellikte olmayan MCF-7 hücrelerine göre FBXL15 regülasyonunun arttığı görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgular literatür ile uyumlu ve katkı sağlayıcı özelliktedir.

Sentrozomal protein 41 (CEP41), protein poliglutaminasyonu, protein taşıma, silyum biyogenezi/bozunması, G2/M Geçişinde PLK1 aktivitesinin düzenlenmesi gibi moleküler süreçlerde görev almaktadır (Froidevaux-Klipfel ve ark., 2015). CEP ailesi proteinleri, sentrozomun ana bileşenlerini oluşturmakta ve sentriyol biyogenezinde ve hücre replikasyonunda belirgin bir roller oynamaktadır (Ki ve ark., 2020). CEP genlerindeki değişiklik, kansere neden olabilecek hücre döngüsünün bozulmasına ve kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olmaktadır (Gopalakrishnan, Kamaraj, ve Purohit, 2014). Ayrıca, sentrozomal protein 41 (CEP41) kaybının, insan hücre hatlarında ve zebra balığında vasküler bozulmaya yol açtığını ve CEP41 için daha önce bilinmeyen bir pro-anjiyojenik role sahip olabileceğini öne süren bir çalışma bulunmaktadır (Barfield ve ark., 2022). Bu çalışmada, Cep41'in hücre anjiyogenezi için gerekli olduğu, eksikliğinde damarlanmanın azaldığı görülmüştür. Dolayısıyla CEP41'in yukarı regülasyonunun metazatik ile ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür. Bizim çalışmamız ile nLC-MS/MS analizleri sonucunda elde ettiğimiz verilerde, metazatik özellikteki MDA MB 231 hücrelerinde metastatik özellikte olmayan MCF-7 hücrelerine göre CEP41 regülasyonunun arttığı görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgular literatür ile uyumlu ve tamamlayıcı özelliktedir.

Kardiyak troponin I, aktin bağlama, kalsiyum kanalı inhibitör aktivitesi, kalsiyum bağımlı protein bağlanması, metal iyonu bağlama, protein kinaz bağlanması, hücresel kalsiyum iyon homeostazı, kalp kası kasılması, ATP'ye bağlı aktivitenin negatif regülasyonu, Kalsiyum iyon sinyali ile kalp kası kasılmasının düzenlenmesi gibi moleküler fonksiyonlara sahiptir (Chen ve ark., 2014).



Literatürdeki güncel çalışmalarda mide ve akciğer kanserlerinde troponin seviyelerinde anormal değişiklikler saptanmış ve troponin proteininin kanser biyomekanizması ile ilişkisi araştırılmıştır (Tsuruda ve ark., 2022). Fakat bu ilişki henüz net olarak bulunamamıştır. Başka bir literatür çalışmasında TNNI3'nin potansiyel onkogenik fonksiyonları araştırılmış ve TNNI3 transfekte edilmiş hücrelerde hücre proliferasyonunun ve migrasyonunun arttığı görülmüştür (Zhao ve ark., 2021).

Literatürdeki yine başka bir çalışmada karaciğer kanserinde TNNI3'nin ifadesinin yüksek olduğu görülmüş ve TNNI3, immün infiltrasyon seviyesi ile ilişkilendirilmiş ve bağışık düzenlemesine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür (Cong ve ark., 2022). Literatürdeki çalışmalar troponin proteininin kanser biyomekanizması ile ilişkisi net olarak ortaya koymak için yeterli değildir.

Literatürde troponin ve kanser ilişkisini araştırmaya yönelik daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde meme kanserinde troponin ekspresyonunun değerlendirilmesine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki bu açığı gidermek adına meme kanseri tiplerine ait hücrelerin besiyerinden elde edilen sekretom örneklerinde ve doku örneklerinde troponin ekspresyonlarını inceledik. Bu tez çalışması sonucunda invaziv özellikteki MDA MB 231 hücrelerinde troponin sekrasyonunun non-invaziv özellikteki MCF-7 hücrelerindeki kadar daha fazla miktarda olduğu görüldü. Meme kanserinde troponin ekspresyonundaki anormal değişiklik ilk defa bizim çalışmamız ile ortaya konmuştur. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda artan troponin ekspresyonunun hücredeki metastatik yollarla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanserli hücrelerden salgılanan proteinler, invazyon, metastaz, anjiyogenez gibi kanser metabolizmasına özgü hücreyel olaylar üzerinde etki göstermektedir. Bu tez aişmasında sağıklı meme huresi, invaziv ve non-invaziv kanser hurelerinin sekretomlarından elde edilen protein özütleri ile karşılaştırmalı proteome analizleri yapılması planlanmıştır. Bu analiz ile elde edilen sonuçlara göre gruplar arasında ekspresyon seviyelerinde anlamlı değışiklikler saptanan proteinlerin, kanser metabolizmasında yer alan huresel süreçler ile ilişkilendirilmesi ve biyobelirteç değıri taşıyan proteinlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Fakat MCF-10A hücre sekretomlarından nLC-MS/MS analizi için yeterli konsantrasyonda protein elde edilememesi sebebiyle, non-invaziv özellikteki MCF-7 meme kanseri hücreleri ile invaziv özellikteki MDA MB 231 meme kanseri hücrelerinin nLC-MS/MS analizleri yapılarak sekretom profilleri karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak, metastatik zellikleki MDA MB 231 hücrelerinde non-invaziv özellikteki MCF-7 hücrelerine kıyasla yukarı regüle olan 5 adet protein saptanmıştır. Bu yukarı regüle proteinler arasından Kardiyak Troponin I 3 (TNNT3) seviyeleri, hücre özütleri, doku ve sekretom örneklerinde WB analizleri yapılarak değılendirilmiştir. Literatürdeki güncel çalışmalarda mide ve akciğer kanserlerinde troponin seviyelerinde anormal değışiklikler görülmüş ve troponin proteininin kanser biyomekanizması ile ilişkisi araştırılmıştır. Fakat bu ilişki henüz net olarak ortaya çıkarılamamıştır. Bu tez çalışması sonucunda invaziv özellikteki MDA MB 231 hücrelerinde troponin sekresyonunun non-invaziv özellikteki MCF-7 hcrelerindekiinden daha fazla miktarda olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler ışığında, meme kanserinde troponin ekspresyonundaki anormal değışiklik ilk defa bu tez çalışması ile gösterilmiştir. Bu tez çalışması ile elde edilen veriler neticesinde troponin sekresyonunun hücrelerdeki metastatik yollarla bağılantılı olabileceğı düşünülmektedir. Bu alışma, meme kanseri metabolizmasında yer alan huresel boyuttaki biyolojik süreçler ile ilişkili olabilecek proteinlerin saptanması, meme kanseri tanı ve tedavisine yönelik ileri çalışmalara öncülük etme potansiyeli taşımaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

- Açıkgöz, A., & Yıldız, E. A. (2017). Meme kanseri etiyolojisi ve risk faktörleri. *Ergoterapi ve Rehabilitasyon Dergisi*, 5(1), 45-56.
- Anwar, T., Arellano-Garcia, C., Ropa, J., Chen, Y. C., Kim, H. S., Yoon, E., ... & Kleer, C. G. (2018). p38-mediated phosphorylation at T367 induces EZH2 cytoplasmic localization to promote breast cancer metastasis. *Nature communications*, 9(1), 2801
- Barfield, R., Huyghe, J. R., Lemire, M., Dong, X., Su, Y. R., Brezina, S., ... & Hsu, L. (2022). Genetic regulation of DNA methylation yields novel discoveries in GWAS of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 31(5), 1068-1076.
- Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., ... & Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature biotechnology*, 36(9), 880-887.
- Chapman-Smith, A., & Cronan, J. E. (1999). The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends in biochemical sciences*, 24(9), 359-363.
- Chen, C., Liu, J. B., Bian, Z. P., Xu, J. D., Wu, H. F., Gu, C. R., ... & Yang, D. (2014). Cardiac troponin I is abnormally expressed in non-small cell lung cancer tissues and human cancer cells. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(4), 1314
- Chen, H., Wu, X., Pan, Z. K., & Huang, S. (2010). Integrity of SOS1/EPS8/ABI1 Tri-Complex Determines Ovarian Cancer Metastasis. *Cancer research*, 70(23), 9979-9990.
- Cho, K. F., Branon, T. C., Rajeev, S., Svinkina, T., Udeshi, N. D., Thoudam, T., ... & Ting, A. Y. (2020). Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(22), 12143-12154.
- Cho, K. F., Branon, T. C., Udeshi, N. D., Myers, S. A., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2020). Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. *Nature Protocols*, 15(12), 3971-3999.
- Cong, M., Yu, T., Zhu, L., Zhang, J., Li, Y., Quan, X., & Shen, X. (2022). TNIN3 expression and prognostic value and correlation with tumor-infiltrating immune cells in LIHC: A bioinformatics analysis.
- Demircan, G., & Mater, Y. (2019). İki farklı meme kanseri hücre hattında floresan işaretli maackia amurensis-lektin-1 ve wheat germ agglutinin hücre yüzey glikan profillerindeki farklı etkileri. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 82(2), 89-95.
- Farrugia, A. J., & Calvo, F. (2016). The Borg family of Cdc42 effector proteins Cdc42EP1-5. *Biochemical Society Transactions*, 44(6), 1709-1716.
- Froidevaux-Klipfel, L., Targa, B., Cantaloube, I., Ahmed-Zaid, H., Poüs, C., & Baillet, A. (2015). Septin cooperation with tubulin polyglutamylation contributes to cancer cell adaptation to taxanes. *Oncotarget*, 6(34), 36063.
- Gopalakrishnan, C., Kamaraj, B., & Purohit, R. (2014). Mutations in microRNA binding sites of CEP genes involved in cancer. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70, 1933-1942.
- Han, F., Qian, L., Zhang, Y., Liu, P., Li, R., & Chen, M. (2022). C2CD4A/B variants in the predisposition of lung cancer in the Chinese Han population. *Functional & Integrative Genomics*, 22(3), 331-340.
- Jia, L., & Sun, Y. (2011). SCF E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Current cancer drug targets*, 11(3), 347-356.

- Karamyshev, A. L., Tikhonova, E. B., & Karamysheva, Z. N. (2020). Translational control of secretory proteins in health and disease. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2538.
- Kasap, M., & Akpinar, G. (2011). Parkinson Hastalığı Tanısında Proteomiks Yaklaşımlarının Yeri ve Biyobelirteç Arayışları/Proteomics Approaches to Parkinson's Disease and Search for Potential Biomarkers. *Türkiye Klinikleri. Tıp Bilimleri Dergisi*, 31(3), 691
- Ki, S. M., Kim, J. H., Won, S. Y., Oh, S. J., Lee, I. Y., Bae, Y. K., ... & Lee, J. E. (2020). CEP 41-mediated ciliary tubulin glutamylation drives angiogenesis through AURKA-dependent deciliation. *EMBO reports*, 21(2), e48290.
- KÖSE, S. İ., & MADEN, M. (2013). Biyomarkerlar ve Klinik Kullanımları. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2), 30-37.
- Lai, T. C., Chou, H. C., Chen, Y. W., Lee, T. R., Chan, H. T., Shen, H. H., ... & Chan, H. L. (2010). Secretomic and proteomic analysis of potential breast cancer markers by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Journal of proteome research*, 9(3), 1302-1322.
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—an updated review. *Cancers*, 13(17), 4287.
- Makridakis, M., & Vlahou, A. (2010). Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *Journal of proteomics*, 73(12), 2291-2305.
- Marchetta, P., Möhrle, D., Eckert, P., Reimann, K., Wolter, S., Tolone, A., ... & Rüttiger, L. (2020). Guanylyl cyclase A/cGMP signaling slows hidden, age-and acoustic trauma-induced hearing loss. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 83.
- McMahon, R. J. (Ed.). (2008). *Avidin-biotin interactions: methods and applications* (Vol. 418). Springer Science & Business Media.
- M-R-3: Deniz, E. B. (2022). Kanser Epidemiyolojisi. *Turkey Health Literacy Journal*, 3(2), 102-111.
- Mukherjee, P., & Mani, S. (2013). Methodologies to decipher the cell secretome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(11), 2226-2232.
- Nenni, M., Çelebir, M., & Süslü, İ. (2020). Proteomik Çalışmalara Genel Bakış. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 40(1), 48-58 (Pavlou ve Diamandis, 2010).
- OLGUN, Ş. (2021). Meme kanserinde genetik risk faktörleri: BRCA1 VE BRCA2 genleri. *ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 8(1), 23-25.
- Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast cancer metastasis: Mechanisms and therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6806.
- Pavlou, M. P., & Diamandis, E. P. (2010). The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers?. *Journal of proteomics*, 73(10), 1896-1906.
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences*, 73, 79-94.
- Shnyder, S. D., & Hubbard, M. J. (2002). ERp29 is a ubiquitous resident of the endoplasmic reticulum with a distinct role in secretory protein production. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(4), 557-566.
- Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, 14(10), 2569.

- Song, Y., Lin, M., Liu, Y., Wang, Z. W., & Zhu, X. (2019). Emerging role of F-box proteins in the regulation of epithelial-mesenchymal transition and stem cells in human cancers. *Stem Cell Research & Therapy*, 10, 1-11.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Sutton, M. R., Fall, R. R., Nervi, A. M., Alberts, A. W., Vagelos, P. R., & Bradshaw, R. A. (1977). Amino acid sequence of *Escherichia coli* biotin carboxyl carrier protein (9100). *The Journal of Biological Chemistry*, 252(11), 3934-3940.
- Sutton, M. R., Fall, R. R., Nervi, A. M., Alberts, A. W., Vagelos, P. R., & Bradshaw, R. A. (1977). Amino acid sequence of *Escherichia coli* biotin carboxyl carrier protein (9100). *The Journal of Biological Chemistry*, 252(11), 3934-3940.
- Tan, Y., Liu, D., Gong, J., Liu, J., & Huo, J. (2018). The role of F-box only protein 31 in cancer. *Oncology Letters*, 15(4), 4047-4052.
- Tatar, M., & Tatar, T. (2018). Endoplazmik retikulum stresi ve ilişkili hastalıklar. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 41(3), 294-303.
- Tekcham, D. S., Chen, D., Liu, Y., Ling, T., Zhang, Y., Chen, H., ... & Liu, H. (2020). F-box proteins and cancer: an update from functional and regulatory mechanism to therapeutic clinical prospects. *Theranostics*, 10(9), 4150.
- Tsuruda, T., Sato, Y., Tomita, M., Tanaka, H., Hatakeyama, K., Otsu, M., ... & Kaikita, K. (2022). Aberrant Expression of Cardiac Troponin-T in Lung Cancer Tissues in Association With Pathological Severity. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9.
- Uddin, S., Bhat, A. A., Krishnankutty, R., Mir, F., Kulinski, M., & Mohammad, R. M. (2016, February). Involvement of F-BOX proteins in progression and development of human malignancies. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 36, pp. 18-32).
- Uhlén, M., Karlsson, M. J., Hober, A., Svensson, A. S., Scheffel, J., Kotol, D., ... & Sivertsson, Å. (2019). The human secretome. *Science signaling*, 12(609), eaaz0274.
- Uysal, P. E. L. İ. N., Yurt, S., Erman, H., Korkmaz, G. G., Yiğitbas, B. A., Koşar, F., & Uzun, H. (2015). The role of chitotriosidase activity as a prognostic biomarker in sarcoidosis. *Acta Medica Mediterranea*.
- Wang, Y., Chen, X., Xu, X., Du, M., & Wu, C. (2023). Reducing disulfide bonds as a robust strategy to facilitate the self-assembly of cod protein fabricating potential active ingredients-nanocarrier. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 222, 113080.
- Xu, X., Zhang, M., Xu, F., & Jiang, S. (2020). Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Molecular cancer*, 19, 1-35.
- Zhao, W., Yang, L., Chen, X., & Huang, W. (2021). Cardiac-Specific Gene *TNNI3* as a Potential Oncogene for Kidney Cancer and Its Involvement in Wnt Signaling Pathway.
- Zheng, N., Wang, Z., & Wei, W. (2016). Ubiquitination-mediated degradation of cell cycle-related proteins by F-box proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 73, 99-110.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler      |  |
|-----------------------|--|
| Adı Soyadı            |  |
| Doğum Yeri ve Tarihi  |  |
| Adres                 |  |
| İletişim Bilgileri    |  |
| Eğitim Bilgileri      |  |
| Yabancı Dil Bilgileri |  |
| Yayınlar              |  |
| Projeler              |  |

## EKLER

### EK-1. nLC-MS/MS analizleri sonucunda elde edilen proteinler

| Description                                                                                                               | Coverage [%] | # Unique Peptides | MW [kDa] | Score Sequest HT: Sequest HT | Abundance Ratio: (MDA MB 231 T) / (MDA MB 231 NK) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------------|----------|------------------------------|---------------------------------------------------|
| Centrosomal protein of 41 kDa (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CEP41 PE=1 SV=2                                       | 2            | 1                 | 35,8     | 0                            | 1000                                              |
| Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPS8L2 PE=1 SV=1 | 6            | 1                 | 18,7     | 0                            | 1000                                              |
| F-box/LRR-repeat protein 15 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FBXL15 PE=1 SV=1                                        | 6            | 1                 | 22,3     | 0                            | 1000                                              |
| Cardiac troponin I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNNT3 PE=1 SV=1                                                             | 4            | 1                 | 25       | 0                            | 1000                                              |
| Kinetochore-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KNTC1 PE=1 SV=1                                               | 0            | 1                 | 250,6    | 0                            | 52,75                                             |
| Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VAT1 PE=1 SV=2                                 | 4            | 1                 | 41,9     | 0                            | 5,673                                             |
| Enoyl-CoA hydratase domain-containing protein 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECHDC2 PE=1 SV=2                | 4            | 1                 | 31,1     | 0                            | 5,054                                             |
| Insulin-like growth factor-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFBP3 PE=1 SV=2                                  | 3            | 1                 | 31,7     | 0                            | 0,338                                             |
| Beta-taxilin OS=Homo sapiens                                                                                              | 1            | 1                 | 76,5     | 0                            | 0,162                                             |

|                                                                                                      |   |   |       |   |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|-------|---|-------|
| OX=9606 GN=TXLNB PE=1 SV=3                                                                           |   |   |       |   |       |
| Werner syndrome ATP-dependent helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WRN PE=1 SV=2                      | 1 | 1 | 162,4 | 0 | 0,001 |
| Spermatogenesis-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPATA1 PE=2 SV=4                     | 2 | 1 | 52,9  | 0 | 0,001 |
| Tetratricopeptide repeat protein 19, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTC19 PE=1 SV=4        | 3 | 1 | 42,4  | 0 | 0,001 |
| Pleckstrin homology domain-containing family H member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEKHH1 PE=2 SV=2 | 1 | 1 | 151,1 | 0 | 0,001 |
| Transmembrane protein 198 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM198 PE=1 SV=1                    | 5 | 1 | 24,3  | 0 | 0,001 |
| Tumor protein p53-inducible protein 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TP53I13 PE=1 SV=1                  | 2 | 1 | 42,2  | 0 | 0,001 |
| FYN-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FYB1 PE=1 SV=2                                      | 2 | 1 | 85,3  | 0 | 0,001 |
| Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAMK4 PE=1 SV=1       | 2 | 1 | 51,9  | 0 | 0,001 |
| KAT8 regulatory NSL complex subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KANSL1 PE=1 SV=1                    | 1 | 1 | 120,9 | 0 | 0,001 |
| Spindle and kinetochore-associated protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SKA3 PE=1 SV=2               | 2 | 1 | 46,3  | 0 | 0,001 |



|                                                                                                               |    |   |       |   |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|---|-------|---|-------|
| Protein FAM189A2<br>OS=Homo sapiens OX=9606<br>GN=FAM189A2 PE=1 SV=2                                          | 1  | 1 | 64,6  | 0 | 0,001 |
| Histone lysine demethylase<br>PHF8 OS=Homo sapiens<br>OX=9606 GN=PHF8 PE=1<br>SV=3                            | 1  | 1 | 117,8 | 0 | 0,001 |
| Amino acid transporter<br>(Fragment) OS=Homo sapiens<br>OX=9606 GN=SLC1A3 PE=1<br>SV=1                        | 11 | 1 | 11,8  | 0 |       |
| Patatin-like phospholipase<br>domain-containing protein 6<br>OS=Homo sapiens OX=9606<br>GN=PNPLA6 PE=1 SV=3   | 1  | 1 | 150,9 | 0 |       |
| Breast cancer type 1<br>susceptibility protein<br>(Fragment) OS=Homo sapiens<br>OX=9606 GN=BRCA1 PE=1<br>SV=1 | 1  | 1 | 67,5  | 0 |       |
| Interferon-related<br>developmental regulator 2<br>OS=Homo sapiens OX=9606<br>GN=IFRD2 PE=1 SV=3              | 2  | 1 | 54,8  | 0 |       |
| Coiled-coil domain-containing<br>protein 150 OS=Homo sapiens<br>OX=9606 GN=CCDC150<br>PE=4 SV=2               | 12 | 1 | 7,9   | 0 |       |
| C2 calcium-dependent<br>domain-containing protein 6<br>OS=Homo sapiens OX=9606<br>GN=C2CD6 PE=1 SV=1          | 2  | 1 | 71,1  | 0 |       |
| Lethal(3)malignant brain<br>tumor-like protein 4<br>OS=Homo sapiens OX=9606<br>GN=L3MBTL4 PE=1 SV=2           | 1  | 1 | 71,1  | 0 |       |
| E3 ubiquitin-protein ligase<br>LNX (Fragment) OS=Homo<br>sapiens OX=9606 GN=LNX1<br>PE=4 SV=1                 | 11 | 1 | 11,2  | 0 |       |

|                                                                                                  |    |   |      |   |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|---|------|---|--|
| Neurensin-2 OS=Homo sapiens<br>OX=9606<br>GN=NRSN2 PE=1 SV=1                                     | 3  | 1 | 22   | 0 |  |
| Cdc42 effector protein 3 (Fragment) OS=Homo sapiens<br>OX=9606 GN=CDC42EP3<br>PE=4 SV=1          | 71 | 1 | 1,5  | 0 |  |
| E3 ubiquitin-protein ligase MARCHF7 OS=Homo sapiens<br>OX=9606 GN=MARCHF7<br>PE=1 SV=1           | 1  | 1 | 70,1 | 0 |  |
| E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like (Fragment) OS=Homo sapiens<br>OX=9606 GN=NEDD4L PE=1 SV=1 | 26 | 1 | 4,3  | 0 |  |