

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL BİR ANTİKANSER PEPTİDİ OLAN LASIOGLOSSIN LL-III/37’NİN
KATI FAZ YÖNTEMİ İLE SENTEZİ VE MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN *IN VITRO* OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Elif İlknur ŞAHİN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

**KOCAELİ
2025**

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL BİR ANTİKANSER PEPTİDİ OLAN LASIOGLOSSIN LL-III/37’NİN
KATI FAZ YÖNTEMİ İLE SENTEZİ VE MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN *IN VITRO* OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Elif İlknur ŞAHİN

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Gürler AKPINAR

KOCAELİ

2025

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Doğal Bir Antikanser Peptidi Olan Lasıoglossin LL-III/37'nin Katı Faz Yöntemi ile Sentezi ve Meme Kanseri Üzerindeki Etkilerinin *in vitro* Olarak Araştırılması

Tez Yazarı: Elif İlknur ŞAHİN

Tez Savunma Tarihi: 30/05/2025

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gürler AKPINAR

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

SINAV KURULU ÜYELERİ		
ÜNVANI	ADI SOYADI	İMZA
BAŞKAN (ÜYE)		
DANIŞMAN		
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. Murat KASAP

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Doğal Bir Antikanser Peptidi Olan Lasioglossin LL-III/37'nin Katı Faz Yöntemi ile Sentezi ve Meme Kanseri Üzerindeki Etkilerinin *in vitro* Olarak Araştırılması

Bu çalışmada, antimikrobiyal etkileri literatürde tanımlanmış olan Lasioglossin LL-III peptidinin LL-III/37 adlı analogunun, meme kanseri üzerindeki potansiyel antikanser etkileri araştırılmıştır. Çalışma kapsamında, sağlıklı meme epitel hücre hattı MCF10A ve meme kanseri hücre hattı MCF7 kullanılarak, Lasioglossin LL-III/37 peptidinin her iki hücre tipi üzerindeki etkileri proteom düzeyinde karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve peptidin olası etki mekanizmalarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

LL-III/37 peptidi katı faz peptit sentez yöntemi ile sentezlenmiş, saflaştırılmış ve her iki hücre hattı için uygun dozlar doz-toksisite analizleriyle belirlenmiştir. Belirlenen dozda peptit, MCF10A ve MCF7 hücrelerine üçer tekrarlı olarak uygulanmıştır. Uygulama sonrası hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiş, izole edilen proteinler tripsin ile kesilerek peptitlere dönüştürülmüş ve bu peptitler nanoLC-MS/MS ile analiz edilerek protein tanımlamaları yapılmıştır.

LL-III/37 peptidinin MCF7 hücrelerinde 20µM gibi düşük bir konsantrasyonda belirgin sitotoksik etki gösterdiğini ve hücre canlılığını doz bağımlı şekilde azalttığını ortaya koyarken, aynı koşullarda MCF10A hücrelerinde anlamlı düzeyde daha az toksisite oluşturmuştur. MCF7 hücre hattında MCF10A hücre hattına kıyaslandığında LL-III/37'nin etkisiyle yukarı regüle olan 3 adet (HBA1, HBD, KDELR1), aşağı regüle olan 4 adet (CDC42EP4, ARMC1, ANXA3, HMGN2) protein saptanmıştır.

Elde edilen veriler, LL-III/37 peptidinin meme kanseri hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesini ortaya koymakta ve bu peptidin sağlıklı ve kanserli hücreler arasındaki proteomik farklılıkları üzerinden olası moleküler etki yollarına dair yeni bilgiler sunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Lasioglossin LL-III/37, antikanser peptit, proteomik analiz, meme kanseri, nanoLC-MS/MS

ABSTRACT

Solid-phase synthesis of the natural anticancer peptide Lasioglossin LL-III/37 and in vitro investigation of its effects on breast cancer

In this study, the potential anticancer effects of LL-III/37, an analogue of the antimicrobial peptide Lasioglossin LL-III, were investigated in the context of breast cancer. The effects of LL-III/37 on healthy breast epithelial cells (MCF10A) and breast cancer cells (MCF7) were comparatively evaluated at the proteomic level to elucidate possible mechanisms of action.

The LL-III/37 peptide was synthesized using the solid-phase peptide synthesis (SPPS) method, purified, and subjected to dose-toxicity assays to determine suitable treatment concentrations for each cell line. The peptide was applied to MCF10A and MCF7 cells under optimized conditions in triplicate. Following treatment, cells were harvested for protein extraction. The isolated proteins were enzymatically digested with trypsin into peptides, which were analyzed via nanoLC-MS/MS for protein identification.

While LL-III/37 peptide showed significant cytotoxic effect at a low concentration of 20 μ M in MCF7 cells and decreased cell viability in a dose-dependent manner, it caused significantly less toxicity in MCF10A cells under the same conditions. In MCF7 cell line, 3 proteins (HBA1, HBD, KDELR1) were up-regulated and 4 proteins (CDC42EP4, ARMC1, ANXA3, HMGN2) were down-regulated under the effect of LL-III/37 compared to MCF10A cell line.

The findings demonstrate the anticancer activity of LL-III/37 on breast cancer cells and provide insight into the molecular mechanisms by comparing proteomic alterations between healthy and cancerous breast cells.

Keywords: Lasioglossin LL-III/37, anticancer peptide, proteomic analysis, breast cancer, nanoLC-MS/MS

TEŞEKKÜR

Lise öğrencisi iken yolumun kesiştiği, ilerleyen yıllarda stajyer olarak tanışma fırsatı bulduğum ve yüksek lisansımda da aynı yolda yürüyebildiğim, akademik sürecimde gerek bilgi birikimi gerek hayat tecrübeleriyle yolumu aydınlatan değerli danışman hocam Prof. Dr. Gürler AKPINAR'a tüm süreç ve katkıları için teşekkür ederim. Yine bu süreçte danışman hocam gibi destek bulduğum Prof. Dr. Murat KASAP'a da teşekkürlerimi sunarım.

Kıymetli hocam Doç. Dr. Banu İSKENDER İZGİ ve Doç. Dr. Aylin KANLI'ya akademik camiada kadının rolünü en güzel şekilde gösterdikleri, desteklerini esirgemedikleri için; Dr. Mehmet SARIHAN'a ve kıymetli ailesine bu yolu yürürken destekleri, emeği ve yol göstericilikleri için teşekkür ederim.

Lisans hayatımdan bu yana desteklerini hissettiğim Soner KARABULUT, Büşra ÖZÇAY EKŞİ ve Bengi Su Rumeysa BARLAK'a; laboratuvarında bulunduğum süre zarfında çalışma ortamımızı güzelleştiren diğer çalışma arkadaşlarım Elifcan KOÇYİĞİT, Beyza Nur ÇOBANOĞLU, Zeynep Sude KONGUR ve Dr. Tuğcan KORAK'a destekleri için teşekkür ederim.

Bugünlere gelebilmemde küçüğünden büyüğüne emekleri çok büyük olan, varlıkları ve duaları ile gücüme güç, sırtıma dağ, gönlüme ferahlık olan sevgili annem, babam ve kardeşlerime ayrı ayrı tüm kalbi duygularıyla teşekkür ederim. İçinde bulunduğumuz her koşulda beni destekleyip büyük bir sevgi ve sabırla yanımda yer alan, yolumu güzelleştiren hayat arkadaşım, sevgili eşime teşekkür ederim.

ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Doğal Bir Antikanser Peptidi Olan Lasıoglossin LL-III/37'nin Katı Faz Yöntemi ile Sentezi ve Meme Kanseri Üzerindeki Etkilerinin in vitro Olarak Araştırılması” 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 vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

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

Elif İlknur ŞAHİN

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Meme Kanseri	2
1.3. Antimikrobiyal Peptitler	4
1.3.1. Antimikrobiyal Peptitlerin Kaynakları	5
1.3.2. Antimikrobiyal Peptitlerin Biyolojik Aktiviteleri	6
1.3.3. Antimikrobiyal Peptitlerin Antikanser Aktivitesi.....	6
1.4. Lasioglossin LL-III.....	7
2. AMAÇ	12
3. YÖNTEM.....	13
3.1. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Üretilmesi.....	14
3.1.1. Üretilcek Peptit Dizilerinin Belirlenmesi	14
3.1.2. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Katı Faz Peptit Sentezi	15
3.1.3. Sentezlenen Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Saflaştırılması ve LC-MS ile Kontrolü	16
3.1.4. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Liyofilizasyonu	16
3.1.5. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin SDS-PAGE Analizi ile Kontrolü	16
3.2. MCF10A ve MCF7 Hücre Hatlarının Kültür Edilmesi	18
3.2.1. Hücrelerin Kültür Edilmesi	18
3.2.2. Hücrelerden Saklama Alınması	18
3.3. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Hücre Canlılıklarına Etkisinin Belirlenmesi	19
3.4. Hücrelerin Peptit İnkübasyonu	19

3.5.	Protein Özütlerrinin Hazırlanması	20
3.6.	Protein Özütlerrinin Triptik Kesimi	21
3.7.	Peptitlerin Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	21
3.8.	nLC-MS/MS Analizleri	21
3.9.	nLC-MS/MS Veri Analizi	22
3.10.	Biyoinformatik Analizler.....	23
4.	BULGULAR	24
4.1.	Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Üretilmesi	24
4.2.	Sentezlenen Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Saflaştırma Sonrası LC-MS ile Kontrolü	25
4.3.	Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin SDS-PAGE Analizi ile Kontrolü	25
4.4.	Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Hücre Canlılıklarına Etkisinin Belirlenmesi	26
4.5.	Reaksiyon Sonrası Protein Özütlerrinin SDS-PAGE Analizi ile Kontrolü	27
4.6.	nLC-MS/MS Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	28
4.7.	Biyoinformatik Analizler.....	29
5.	TARTIŞMA	30
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	34
7.	KAYNAKLAR.....	35
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP: Antibakteriyel peptit

ACP: Antikanser peptit

ACN: Asetonitril

AFP: Antifungal peptit

AGC: Otomatik kazanç kontrolü

AmBic: Amonyum bikarbonat

AMP: Antimikrobiyal peptit

APD: Antimikrobiyal Peptit Veritabanı

APP: Antiparazitik peptit

AVP: Antiviral peptit

Da: Dalton

DCM: Diklorometan

DIPEA: N,N-Diizopropiletilamin

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF: N,N-Dimetilformamid

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

FA: Formik asit

FASP: Filtre Yardımlı Örnek Hazırlama

FBS: Fetal Bovin Serum

Fmoc: Florenilmetoksikarbonil

HCTU: 2-(6-Kloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminyum hekzaflorofosfat

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

I: İzolösin

IAA: İyodoasetamid

IF: İmmünoFloresan

K: Lizin

kDa: Kilo Dalton

MEGS: Mammary Epithelial Growth Supplement

mL: Mililitre

μ L: Mikrolitre

μ M: Mikromolar

MS: Kütle Spektrometresi

NCE: Çarpıřma enerjisi

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

PBS: Fosfat Tamponlu Salın

ppm: Milyonda Bir Partikül (parts per million)

P/S: Penisilin/Streptomisin

RIPA: Radyoimm nopresipitasyon Tahlil Tamponu (Radioimmunoprecipitation assay buffer)

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi

TFA: Trifloroasetik asit

TIS: Triizopropilsilan

V: Valin

W: Triptofan

ŞEKİLLER

Şekil 1.1: 2022 yılında kadınlarda (a) kanser insidansı (GLOBOCAN, 2022).	3
Şekil 1.2: Antimikrobiyal peptitlerin özellikleri (Ji ve diğerleri, 2024).	5
Şekil 1.3: Lasioglossin peptitlerinin sekansları, moleküler ağırlıkları ve ikincil α -sarmal yapısı (Čeřovský ve diğerleri, 2009; Slaninova ve diğerleri, 2012).	8
Şekil 1.4: Floresin-LL-III'ün HEP-G2 hücrelerine zaman kontrollü girişiminive lokalizasyonunu gösteren resim. Yeşil renk floresin-LL-III, kırmızı renk mitokondriyal matraste biriken ve membran potansiyeline bağımlı TMRE boyası, sarı renk yüksek miktarda Floresin-LL-III olduğu noktaları temsil eder (Slaninova ve diğerleri, 2012). (Görüntü ölçeği 30 μ m. min: dakika, s: saniye)	10
Şekil 1.5: Floresin-LL-III'ün HEP-G2 girişimini ve lokalizasyonunu ayrıntılı gösteren resim (Slaninova ve diğerleri, 2012). (Görüntü ölçeği 15 μ m)	11
Şekil 2.1: Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 peptitlerinin dizileri ve genel özellikleri.	15
Şekil 2.2: Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 peptitlerinin hücre canlılıklarına etkisinin belirlenmesi deney şeması (BioRender).	19
Şekil 2.3: Hücrelere yapılan peptit inkübasyonlarının deney şeması.	20
Şekil 2.4: nHPLC analizinde kullanılmış olan ayırma gradyanı.	22
Şekil 3.1: Katı faz yöntemi ile sentezlenmiş olan peptitlerin üretiminin LC-MS ile doğrulanması. (a) Lasioglossin LL-III/37, moleküler ağırlığı 1902,23 g/mol. (b) NSP10, moleküler ağırlığı 1597 g/mol.	24
Şekil 3.2: NGC kromatografi sisteminde saflaştırılan elüsyonların saflık durumunun LC-MS ile kontrolü. (a) Lasioglossin LL-III/37'nin major elüsyon fraksiyonu. (b) NSP10'in major elüsyon fraksiyonu.	25
Şekil 3.3: (a) Lasioglossin LL-III/37 ve (b) NSP10 peptitlerinin kalitatif analizi için SDS-PAGE analizi ile gösterilmesi (Hacimsel yükleme sırası her iki jel için de: 1- 1:5 seyreltilmiş 8 μ L, 2- 1:5 dilue 4 μ L, 3- 1:5 dilue 2 μ L, 4- 1:5 dilue 1 μ L, 5- Boş, 6- Protein markeri, 7- 8 μ L, 8- 4 μ L, 9- 2 μ L, 10- 1 μ L peptit).	26
Şekil 3.4: Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 peptitlerinin MCF10A ve MCF7 hücrelerine 24 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılıklarına etkisinin kritik dozunun belirlenmesi. ...	27

Şekil 3.5: Peptit inkübasyonları yapılan hücrelere ait protein özütlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri (20 µg konsantrasyonda yükleme sırası: 1- Protein markerı, 2- Negatif Kontrol 1, 3- Negatif Kontrol 2, 4- Negatif Kontrol 3, 5- Lasioglossin LL-III/37 1, 6- Lasioglossin LL-III/37 2, 7- Lasioglossin LL-III/37 3, 8- NSP 10 1, 9- NSP10 2, 10- NSP10 3 protein özütü). (a) MCF10A hücrelerine ait protein özütlerinin jel görüntüsü, (b) MCF7 hücrelerine ait protein özütlerinin jel görüntüsü..... **27**

Şekil 3.6: MCF7 meme kanseri hücrelerinde Lasioglossin LL-III/37 peptidine maruziyeti sonrası regüle olduğu belirlenen 7 protein. Kırmızı renk ile gösterilenler ifadesi artan (up-regule), mavi renk ile gösterilenler ifadesi azalan (down-regule) olmuş proteinlerdir. **29**

Şekil 3.7: MCF7 meme kanseri hücrelerinde Lasioglossin LL-III/37 peptidine maruziyeti sonrası regüle olduğu belirlenen 7 proteinin STRING analizi. **29**

TABLÖLAR

Tablo 1: Lasioglossin III ve analoglarının kanser hücrelerinde ve sağlıklı hücrelerdeki toksisitesi (Slaninova ve diğerleri, 2012).	8
Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar, kitler ve alındıkları firma adları.....	13
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	14
Tablo 2.3: TFA kokteyl içeriği. TIS: Triizopropilsilan. TFA: Trifloroasetik asit.....	16
Tablo 2.4: SDS-PAGE jel solüsyonlarının içerikleri.....	17
Tablo 2.5: Gümüş boyama solüsyonlarının içerikleri. Tüm solüsyon bileşenleri 100 mL solüsyon hazırlamak içindir. Verilen bileşenler 100 mL'ye ddH ₂ O ile tamamlanmaktadır.	18
Tablo 3: nLC-MS/MS analizi sonrası tanımlanan proteinler.	28

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser bir grup hastalığa verilen genel bir addır ve hücrelerin kontrolsüz şekilde büyüüp yayılmasını ifade eder (Brown ve diğerleri, 2023). Farklı organ ve dokularda ortaya çıkabilen kanserin tek tip bir tedavi şekli bulunmamaktadır. Bunun en temel nedeni her bir kanser türünün, hatta bir türe ait alt kanser tiplerinin özgün mekanizmalar geliştirmesi ve bu mekanizmaları kullanarak yayılım göstermesidir. Bu nedenle kanser tedavisinde çok sayıda farklı yöntem kullanılmakta ve halen yeni yöntemler geliştirilmeye ihtiyaç duyulmaya devam edilmektedir (Debela ve diğerleri, 2021). Olası kanser tedavileri, kanserin türüne, evresine ve hastanın genel sağlık durumuna bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu nedenle genellikle tedavi planları bir veya daha fazla yöntemin kombinasyonu şeklinde uygulanır (“Treatment strategies in cancer from past to present”, 2018).

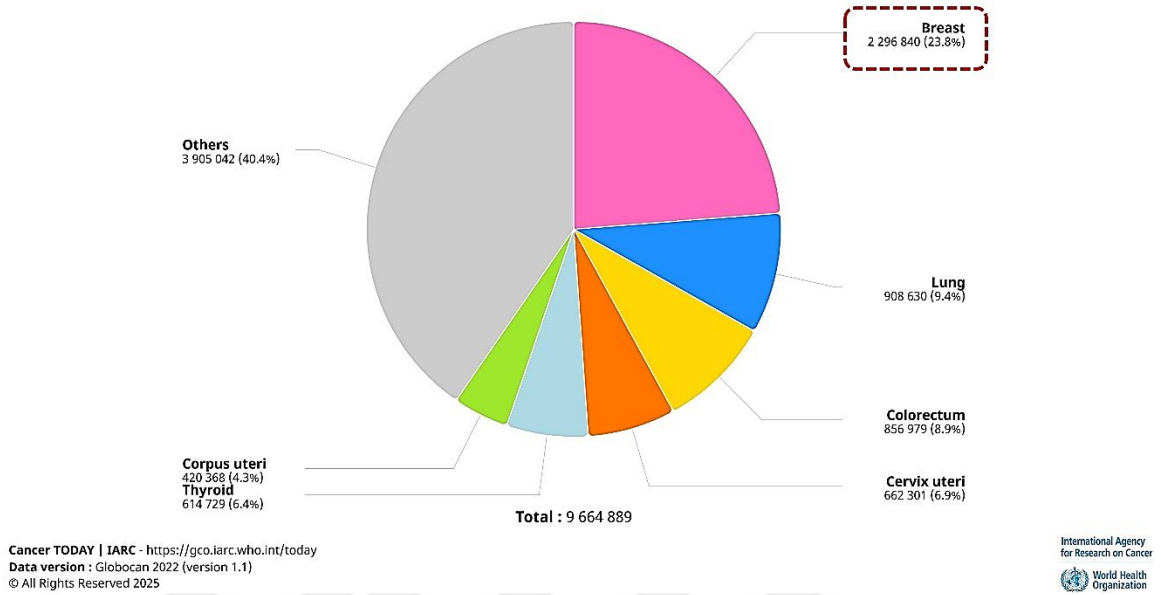
Kanser tedavisinde uygulanan ana yöntemler arasında cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler sayılabilir. Cerrahi müdahalede kanserli doku açık veya kapalı ameliyatla bulunduğu ortamdan kesilerek çıkartılır. Bu yöntem bazı kanser türlerinin tedavisinde önemli bir yaklaşım olmasına karşın, girişimsel bir tedavi şekli olması ve kanserli dokunun bazı durumlarda erişilebilir olmaması nedeniyle çıkartılamaması gibi dezavantajlar içermektedir (Tohme, Simmons ve Tsung, 2017). Ayrıca, cerrahi müdahale hiçbir zaman tek başına kanser tedavisinde yeterli olabilecek bir yaklaşım değildir ve mutlaka öncesinde veya sonrasında kemoterapi ya da radyoterapi uygulanmaktadır. Radyoterapi yüksek enerjili ışınlar kullanılarak tümör hücrelerinin öldürülmesi veya büyümesinin kontrol altına alınması temeline dayanan bir tedavi şekli olup yaygın olarak kullanılmaktadır (Baskar, Lee, Yeo ve Yeoh, 2012). Ancak bazı durumlarda radyoterapinin de kanser tedavisinde kullanılması mümkün olmamaktadır. Bu durumlar arasında hamilelik, çok yaşlı veya genel sağlık durumunun iyi olmama durumu, tümörün göz gibi radyasyona karşı hassas organlar üzerinde veya çevresinde bulunması, hastada radyoterapiye karşı hassasiyete neden olan genetik hastalıkların bulunması ve tümörün aşırı metastaz yaptığı durumlar sayılabilir. Kemoterapi kanser tedavisinde en sık kullanılan yöntem olup kanser hücrelerinin büyümelerini kontrol altına almak veya bu hücreleri öldürmek amacıyla kimyasal ajanlar kullanılarak uygulanmaktadır (Schirrmacher, 2019). Bu ilaçların çoğunluğu deoksiribonükleik asitin (DNA) yapısını veya replikasyonunu bozarak veya hücrelerinin metabolizmasına zarar vererek veya hücre büyümesini kontrol altına alarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir (“Cancer chemotherapy and beyond”, 2023). Kemoterapinin en önemli avantajlarından birisi vücudun farklı bölgelerine ulaşabilen sistemik bir tedavi yöntemi olmasıdır. Ancak genel

sağlık durumu zayıf olan hastalarda, hamilelerde, özellikle karaciğer ve böbrek yetmezliği olmak üzere organ yetmezliği bulunan hastalarda ve kemik iliği baskılanmış hastalarda kemoterapi uygulanamaz. Kemoterapinin başarı şansı, hastanın tedaviye ne kadar erken başladığına, kanserin türüne, hastanın genel sağlık durumuna ve tedaviye yanıtına bağlıdır. Her bireyin kemoterapiye verdiği yanıt farklıdır ve kemoterapinin etkisi kişiden kişiye değişebilir. Kemoterapik ajanların çoğu sağlıklı hücreleri de etkiledikleri için hasta üzerinde yorgunluk, saç dökülmesi, mide bulantısı ve kusma, iştah kaybı, bağışıklık sisteminin zayıflaması, cilt problemleri, sindirim sistemi problemleri, sinir sistemi problemleri ve psikolojik problemler gibi ağır yan etkileri görülmektedir (van den Boogaard vd., 2022.). Hormon tedavisi daha dar kullanım alanı bulan çoğunlukla meme, prostat ve rahim kanserlerinin tedavisinde kullanılan bir tedavi şeklidir (Sella ve diğerleri, 2021). Özellikle hormon salgılayan tümörleri tedavi etmek veya kanserin hormona duyarlılığını azaltmak için kullanılan bir tedavi şeklidir. Hormon tedavisinde de kemoterapide olduğu gibi kimyasal ajanlar ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle hormon tedavisi alan bireylerde sıcak basmaları, cinsel istekte azalma, osteoporoz ve ruh hali değişiklikleri gibi yan etkiler görülebilmektedir.

Bu etmenler ve tedavi yöntemleri göz önünde bulundurulduğunda, tümör büyümesini ve metastazını en az toksik yan etkiler ile kontrol altına alabilen ve eş zamanlı olarak tümör heterojenliği sorununu da aşabilecek yeni kanser önleyici ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın kanser türü olup, erkeklerde de daha nadir olmakla birlikte görülebilmektedir. Son yıllarda, risk teşkil eden yaş gruplarında mamografi taramasının daha sistematik olarak yapılması, meme kanseri insidansında %30-40'lık bir artış gözlemlenmesine neden olmuştur, bu durum hastalığın daha erken evrelerde tespit edilebilmesini sağlarken prognozu da iyileştirmiştir (Zaheer vd., 2019). Fakat kadınlarda meme kanseri, teşhis edilen tümör yapılarının dörtte birini oluşturmaktadır ve genel insidans 100.000 kadında yaklaşık 50 vaka olarak tespit edilmiştir (Şekil 1.1, GLOBOCAN 2022).



Şekil 1.1: 2022 yılında kadınlarda (a) kanser insidansı (GLOBOCAN, 2022).

Meme kanseri, memedeki süt kanallarında (duktal kanserler) veya süt bezlerinde (lobüler kanserler) gelişebilir. Bununla beraber, meme kanserinin farklı histolojik türleri ve moleküler alt gruplandırmaları bulunmaktadır, bu durum da tedavi yaklaşımlarının çeşitlenmesine ve tek tip tedavinin yetersizliğine yol açmaktadır (Perou ve diğerleri, 2000). Meme kanserinin gelişiminde birçok genetik ve çevresel faktör rol oynamaktadır. Yaş, cinsiyet, genetik yatkınlık (en sık bilinen ve karşılaşılan BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları), hormonal faktörler (östrojen ve progesteron düzeyleri), aile öyküsü, genetik mutasyonlar, radyasyona maruz kalma, sigara içme, sağlıklı beslenme, aşırı alkol tüketimi, erken yaşta adet görme, geç yaşta menapoz, emzirmeme ya da çocuk sahibi olmama gibi risk faktörleri kanser oluşumu ve gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Arnold ve diğerleri, 2022).

Meme kanseri genellikle erken safhalarda anlaşılabilir semptomlar vermemektedir. Bu sebeple düzenli tarama testleri, erken teşhis için hayati önem arz etmektedir. Mamografi, ultrasonografi ve MRI gibi görüntüleme yöntemleri, özellikle risk etmenleri altındaki bireylerde düzenli aralıklarla yapılması gereken taramalar arasında yer almaktadır. Erken evrelerde genellikle memede kitle, meme yapısında anormal şekil değişiklikleri, deride incelme veya kıvrıklık, meme başında akıntı gibi belirtiler gözlemlenebilmektedir (Duggan ve diğerleri, 2020.). Bu semptomlar kanserin ilerleyen evrelerinde daha belirgin hale gelmektedir.

Meme kanseri tedavisi, hastalığın bulunduğu evreye, histolojik türüne ve moleküler profiline göre değişiklik göstermektedir. Erken evrelerde cerrahi müdahale, genellikle kanserli dokunun çıkarılmasını içermektedir. Bu cerrahi işlemler mastektomi (memenin tamamının alınması) veya lumpektomi (kanserli kitlenin çıkartılması) şeklinde yapılabilir. Kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi ve biyolojik tedavi (hedefe yönelik tedavi ve immünoterapiler) gibi diğer tedavi seçenekleri ise kanserin evresine ve bireysel özelliklerine göre uygulanmaktadır (Akram vd, 2017).

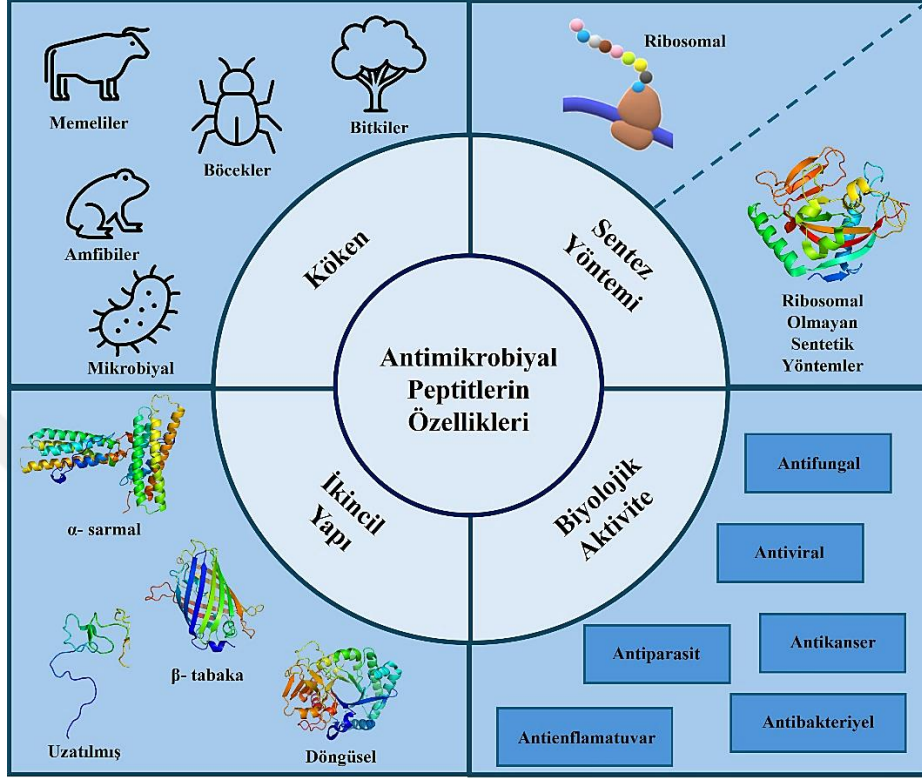
Kanser tedavisine yönelik yaklaşımlar ele alındığında kemoterapi, genellikle kanser hücrelerinin hızla bölünen yapısını hedef alırken, radyoterapi ise kanserli hücrelerin yayılmasını engellemeyi hedeflemektedir. Hormon tedavisi ise hormon reseptör pozitif kanser türleri için etkili bir seçenektir ve östrojenin olası etkilerini engelleyerek kanser hücrelerinin büyümesini baskılamaktadır (Smith ve diğerleri, 2007). Örneğin, HER2 pozitif kanserlerde kullanılan trastuzumab gibi hedeflenmiş tedaviler, kanserin tedavisinde önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir (Vogel ve diğerleri, 2002).

Meme kanseri, erken tanı ve tedavi ile kontrol altına alınabilmektedir ve birçok hasta bu sayede yaşamına devam edebilmektedir. Fakat, bazı kanser türleri, özellikle metastatik evrede daha dirençli hale gelebilmektedir. Bu sebeple, meme kanseri tedavisinde yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi, biyomoleküler belirteçlerin artması, immünoterapiler ve genetik hedeflenmiş tedavi yaklaşımları gibi farklı alanlarda önemli adımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Özetle, meme kanseri hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak, erken tanı yöntemlerini güçlendirebilmek ve tedavi seçeneklerini çeşitlendirebilmek adına daha fazla çalışma yapmak, hastalığın başarılı bir şekilde yönetilmesinde önemli rol oynamaktadır.

1.3. Antimikrobiyal Peptitler

Patojen özellik gösteren bakterilerin mevcut antibiyotiklere karşı artmakta olan direnci, mevcut antibiyotiklere alternatif, etki mekanizmaları farklı olan yeni antimikrobiyal ajanların araştırılmasına sebep olmaktadır. Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) birçok canlı türünde tanımlanmıştır ve enfeksiyon durumunda primer savunma hattı olarak görev almaktadırlar (Čeřovský ve diğerleri, 2009; Parisienve diğerleri, 2008). Ocak 2025'te yapılan son güncellemeler itibarı ile Antimikrobiyal Peptit Veritabanı (APD, <https://aps.unmc.edu/AP/>) altı yaşam aleminden doğal ve sentetik olmak üzere 5099 AMP içermektedir. Genel olarak bakıldığında fizyolojik pH'ta net yükleri pozitifdir, bu durum anyonik yapıdaki sitoplazmik membranla kolaylıkla etkileşime girebilmelerini sağlar. AMP'lerin parçalar halindeki hidrofobik ve hidrofilik kısımları peptitlerin amfipatik yapıda olmalarını sağlamaktadır. Böylelikle peptit, sitoplazmik zarla kolaylıkla por yapıları oluşturur ve zar yapısının geçirgenliğinin artmasına bağlı olarak hücre dejenerasyonuna yol açmaktadır. Ek olarak, AMP'ler birden fazla hedefe yönelik etki

kapasitesine de sahiptirler. Bu durumda AMP'lerin çeşitliliği ve modifiye edilmeye açık olmaları, diğer moleküler yapılarla kimyasal olarak etkileşime girebilmeleri ve belirli hücre tiplerine hedeflenerek çalışabilirliği tedavide özgüllük ve etkinlik sağlamaktadır (Ji ve diğerleri, 2024).



Şekil 1.2: Antimikrobiyal peptitlerin özellikleri (Ji ve diğerleri, 2024).

1.3.1. Antimikrobiyal Peptitlerin Kaynakları

AMP'ler doğal kaynakları göz önüne alınarak beş ana grupta incelenebilir: memeliler, amfibiler, böcekler, bitkiler ve mikrobiyal kaynaklar. Memeli AMP'ler katelisinler ve defensinler olarak iki ana grupta incelenirler. Bu AMP'ler memelilerde primer savunma hattı olarak faaliyet göstermenin yanı sıra bağışıklık sisteminin regülasyonu, apoptoz ve yara iyileşmesi gibi süreçlerde de faaliyet göstermektedir (G. Wang, 2014). Ana kaynağı kurbağa türleri olan amfibi AMP'lerinin en önemli rolü, amfibilerin popülasyonu için risk etmeni olan patojenlere karşı koruma sağlamalarıdır. Ek olarak amfibi kaynaklı AMP'ler, yapılan çalışmalar doğrultusunda klinik uygulamalarda kullanıma elverişli, kullanılabilirlik açısından güvenli ve antibiyotik direnciyle nadir olarak ilişkilendirilen AMP'ler olarak bilinmektedir (Ji ve diğerleri, 2024). Böceklerin hayatta kalabilmelerine olanak sağlayan güçlü adaptasyon yetenekleri, AMP'lerinin böceklerin yağ dokuları ve savunma ve onarım yardımcı olan hemosit adı verilen özelleşmiş kan hücrelerinden sentezlenmesinden kaynaklanmaktadır (Vilcinskis, 2013). Böcek AMP'leri de içerdikleri amino asitlerin yapısı ve bileşimlerine göre üç grupta incelenmektedir: sistein residüleri

içermeyen lineer α -heliks peptitler, küresel yapıdaki β -tabakalı peptitler ve prolin ya da glisin gibi spesifik amino asit residüleri içeren peptitler (Ji ve diğerleri, 2024). Bitkilerden elde edilen AMP'ler, güçlü mikrobiyosidal aktivitelerinin yanı sıra antikanserojenik aktivite gibi geniş spektrumda etki kabiliyetine sahip peptitlerdir. Bakteriyosinler, siklik peptitler, lipopeptitler ve glikopeptitler mikrobiyal kaynaklı AMP'lerdir. Ökaryot kaynaklı AMP'lerle kıyaslandıklarında, mikrobiyal kaynaklı AMP'ler ökaryot kaynaklı AMP'lerden daha düşük konsantrasyonlarda da etki gösterebilmektedir. Fakat ökaryotik AMP'ler mikrobiyal kaynaklı AMP'lere kıyasla daha fazla bakteri grubunu hedef alabilmektedir (Erdem Büyükkiraz ve Kesmen, 2022).

1.3.2. Antimikrobiyal Peptitlerin Biyolojik Aktiviteleri

AMP'ler biyolojik aktiviteleri gereği ele alındıklarında antifungal, antiviral, antikanser, antiparaziter, antibakteriyel ve antienfeksiyöz özellikleri kapsayan geniş ve spesifik aktiviteler göstermektedir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda onlarca AMP tıbbi, gıda ve tarım sektörlerinde yaygın olarak kullanılmakta ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirlikleri değerlendirilmeye devam etmektedir. Bunlara örnek verilecek olursa antibakteriyel peptitlerin (ABP) büyük bir çoğunluğu klinik tıpta yaygın patojenik bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahiptir (Li ve diğerleri, 2019). Antifungal peptitler (AFP) gelişmiş ilaç direnci ve mantar enfeksiyonlarına yönelik bir AMP alt sınıfıdır. Örnek olarak, AurH1 AFP'nin *C. albicans* enfeksiyonunu etkili bir biçimde tedavi edebileceği gösterilmiştir (Madanchi, 2020). Antiviral peptitler (AVP), birden fazla yol ile virüsler üzerinde öldürücü etki göstermektedir: i) virüs tutunmasını ve virüslerin hücre zarı füzyonunun inhibisyonu aracılığıyla, ii) virüslerin zarf yapısını tahrip ederek ve iii) virüslerin konak hücredeki replikasyonunu inhibe ederek (Jung ve diğerleri, 2019). Parazitik protozoanın çeşitli yollarla bulaşının kolay olması ve insan ve hayvanlarda parazit ilaç direncinin artması, antiparazitik peptitlerin (APP) kullanılması ile yüksek inhibisyon sağlanabilmektedir (Rhaïem ve Houïmel, 2016). Son olarak antikanser peptitler (ACP) çeşitli yollarla kanser ile savaşmaktadır: i) tümör hücrelerinin öldürülmesi için dendritik hücreler gibi bağışıklık hücrelerini harekete geçirerek, ii) kanser hücreleri için nekroz ya da apoptoz sürecini başlatarak, iii) tümör hücrelerinin besin kaynaklarını kesebilmek ve metastazı önleyebilmek için anjiyogenezi inhibe ederek ve iv) tümör hücrelerinin santral dogmasına etki edebilmek için belirli düzenleyici fonksiyonel proteinleri aktive ederek ya da inaktive ederek (Ma ve diğerleri, 2020).

1.3.3. Antimikrobiyal Peptitlerin Antikanser Aktivitesi

Kanser insidansının hızla artması global çerçevede endişe veren konular arasında yer almaktadır. Bunun temel sebebi, doğal ürünlerin, hormon türevlerinin ve çeşitli metabolitlerin de içinde bulunduğu kanser önleyici ilaçların, sağlıklı hücreler için yeterli

seçiciliğe sahip olmaması ve spesifik olmayan hedefleme sebebiyle mevcut ilaçlara olan direnci arttırmasıdır (Y. Wang ve diğerleri, 2009). Bu etmenler düşünüldüğünde, tümör büyümesini ve metastazını en az toksik yan etkiler ile kontrol altına alabilen ve eş zamanlı olarak tümör heterojenliği sorununu da aşabilecek yeni kanser önleyici ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sağlıklı hücrelerin plazma zarının iç yaprağında negatif yüklü fosfatidilserin (PS) fosfolipidi bulunmaktadır. Kanser hücrelerinde iç ve dış zar yaprakları arasındaki yük asimetrisi kaybolur ve PS dış yaprakta olacak şekilde yer değiştirmiş olur. PS, heparin sülfat, siyalinlenmiş gangliosidler ve O-glikolize musin varlığı, artan transmembran potansiyeli, yüzey alanı ve membran akışkanlığı gibi faktörlerle birleştiğinde ACP'lerin fizikokimyasal yapısı, tümör heterojenliğinden etkilenmeden kanser hücrelerine karşı olan aktivitesini desteklemektedir. Antimikrobiyal Peptit Veritabanı'nın (APD) Ocak 2025'te yayımladığı verilere göre, altı yaşam aleminde 3306'sı doğal AMP olmak üzere toplamde 5099 AMP bulunmaktadır. Bu AMP'lerin de 317 tanesi kanser önleyici aktiviteye sahiptir.

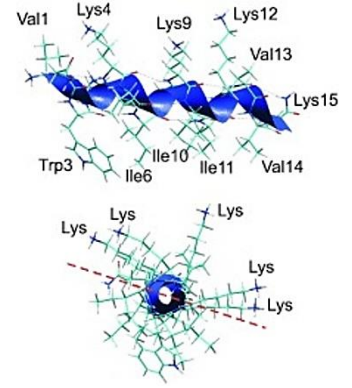
1.4. Lasioglossin LL-III

Çeşitli patojen bakterilerin mevcut antibiyotiklere karşı artmakta olan direnci, kullanılmakta olan antibiyotiklerden farklı etki mekanizmalarına sahip yeni AMP ajanlarına ihtiyaç duyurtmaktadır. Son yıllarda tüm yaşam formlarında ilk savunma hattı olarak tanımlanan AMP'lerin etki mekanizmaları araştırılmaya başlanmış ve AMP'lere olan ilgi giderek artmıştır. Örnek olarak, eşek arısı zehrinden izole edilen mastoparan, decoralin, ömenitin ve anoplin gibi AMP'ler bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren sitolitik peptitlerdir. Fakat bu peptitler ökaryotik hücrelerde hemolitik aktivite gösterdiği için antibiyotik olarak kullanılamamaktadır (Kuhn-Nentwig, 2003; Cerovsky ve diğerleri, 2008). Bunun yanı sıra doğal kaynakların yeni antimikrobiyal ajanlar arayışındaki çaba, yaban arılarından izole edilen zehrin farmakolojik olarak zengin bir kaynak olduğunu düşündürmektedir.

Cerovsky ve ekibi, yaban arısından (*Lasioglossum laticeps*) izole edilen zehrin içerdiği Lasioglossin peptitlerine odaklanmıştır. Lasioglossinler LL-I, LL-II ve LL-III olmak üzere üç peptit alt grubu olarak sınıflandırılmıştır. Bu peptitler yapısal olarak 12-18 amimo asitlik peptit zincirleridir ve katyonik α -sarmal amfipatik karakterdedirler (Şekil 1.3). Yapılan çalışmalar, bu peptitlerin mikrobiyosidal olduklarını, dört farklı bakteri türüne (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* ve *P. Aeruginosa*) karşı kıyaslanabilir antimikrobiyal aktivite, beş tip maya hücresinde (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*) antifungal aktivite ve düşük veya orta düzeyde hemolitik aktivite göstermektedir (Čerovský ve diğerleri, 2009; Slaninova ve diğerleri, 2012). Ayrıca yapılan modifikasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar, belirli enfeksiyonların tedavisinde bu peptitlerin

terapötik olarak daha etken olabilmesi için modifiye edilme potansiyeli yüksek bir AMP alt grubunun varlığını öne sürmektedir.

Peptit	Sekans	Moleküler Ağırlık (Da)
LL-I	H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH ₂	1722,14
LL-II	H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH ₂	1736,16
LL-III	H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH ₂	1764,19



Şekil 1.3: Lasioglossin peptitlerinin sekansları, moleküler ağırlıkları ve ikincil α -sarmal yapısı (Čerovský ve diğerleri, 2009; Slaninova ve diğerleri, 2012).

Slaninova ve ekibinin 2012’de yayımlamış olduğu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar incelendiğinde Lasioglossin LL-III ve analoglarının aktif ve sağlıklı hücreler için toksik olmadığını, bunun yanı sıra kanser hücrelerine karşı toksik olduğu gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: Lasioglossin III ve analoglarının kanser hücrelerinde ve sağlıklı hücrelerdeki toksisitesi (Slaninova ve diğerleri, 2012).

Varyant	IC50 (µM)					Hemoliziz (µM)
	HeLa S3	SW480	CEM	HUVEC	IEC	
LL-III/1	3±1	12±3	3±1	10±2	18±5	>200 / 55,1
LL-III/2	-	11	7±2	-	18	>200
LL-III/3	-	>40	-	20±1	22±4	>200 / 72,2
LL-III/4	7±1	>40	18	>80	>100	>200
LL-III/10	9±3	-	-	35±11	>=80	>200
LL-III/11	8±1	48	4±1	50	>=80	>200
LL-III/15	7±1	42	9±3	>=70	>=100	>200
LL-III/17	9	-	-	11±4	18±1	39,9
LL-III/23	4	15	6	12±3	15±6	71,5
LL-III/26	5±1	30	6	18±1	24±11	>200
LL-III/27	13±2	>100	18	>100	>100	>200
LL-III/34	5±2	37	5±3	52±7	40±5	>200
LL-III/37	5±1	13	4±1	18±2	17±3	>200



: Kanser hücre hatları



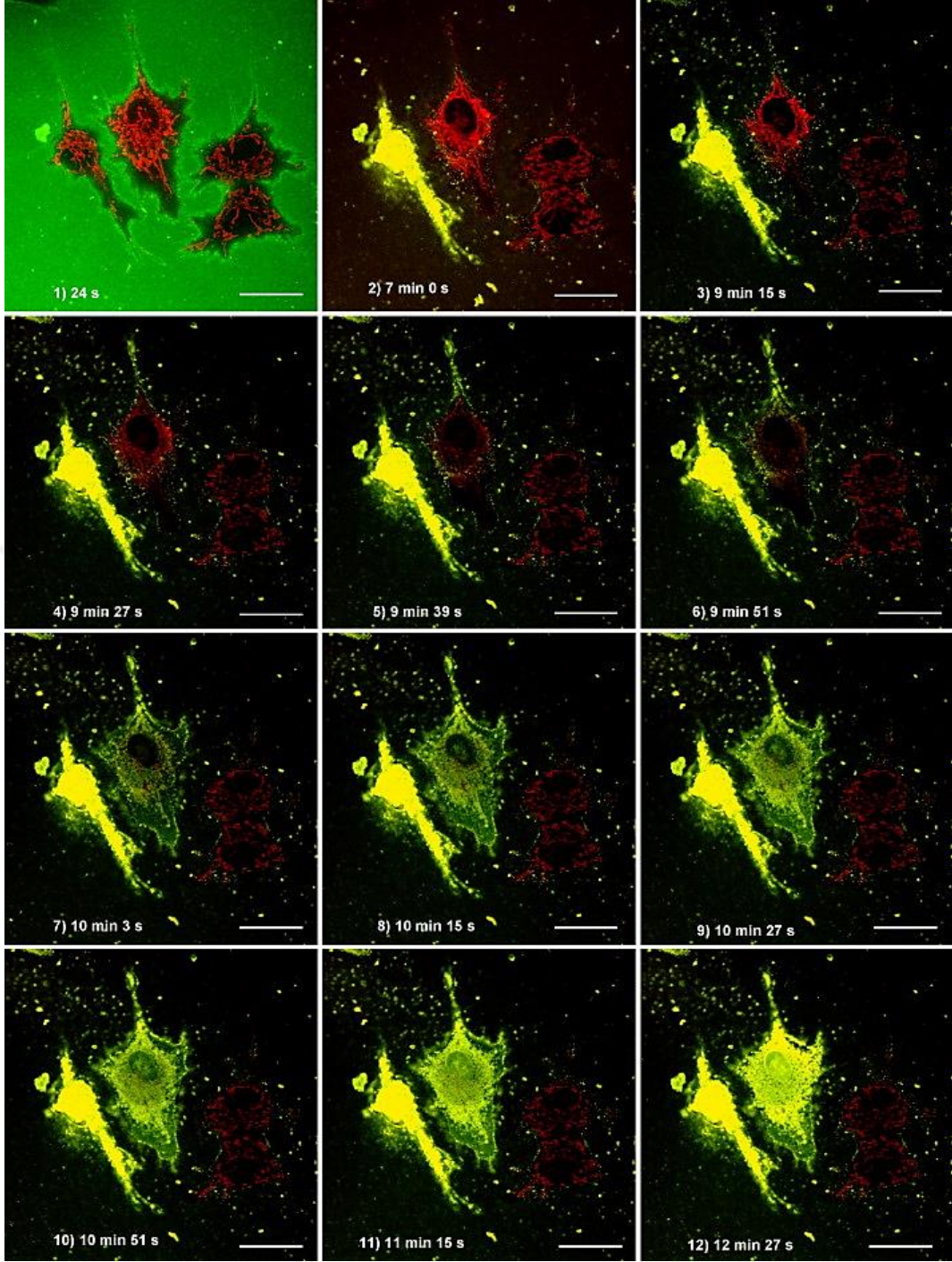
: Sağlıklı hücre hatları

Elde edilen bulgular incelendiğinde, normal memeli hücreleri için yapılmış olan toksisite analizlerinin, normal hücrelerin yarısını öldürebilen peptit konsantrasyonunun (IC50) bakteriler için zararlı olduğu tespit edilen konsantrasyonlardan çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu peptitlerin antimikrobiyal ilaçlar için umut vaat ettiği

düşünülmekte olup bu peptitler ile yeni *in vitro* ve *in vivo* deneylerin yapılarak güvenilirlikleri daha fazla test edilmelidir.

Tablo 1’de gösterildiği üzere, LL-III ve analogları özellikle HeLa S3 ve CEM gibi hassas kanser hücre hatlarına karşı, sağlıklı hücre hatlarına kıyaslandığında 3-5 kat daha yüksek toksisite göstermiştir. Bu farkın gözlemlenmesi durumunda, literatürde bu durum genellikle kanser hücreleri için daha yüksek anyoniklik ve daha düşük hücre zarı sertliği ile açıklanmaktadır. Kanser hücrelerinin bu fizyolojik özellikleri nedeni ile AMP’lerin kanser hücre zarları ile etkileşimlerinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

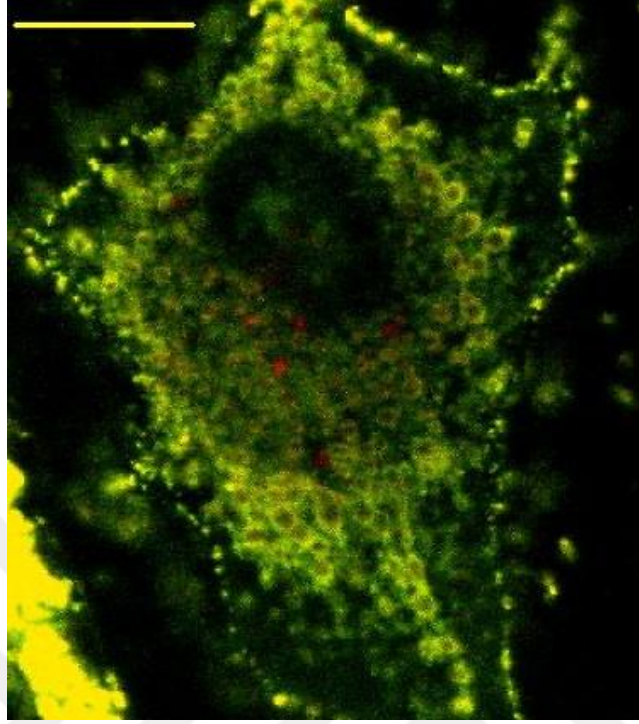
Slaninova ve ekibinin AMP ve hücre zarı geçirgenliğini ortaya koymak için gerçekleştirdiği bir çalışmada (Slaninova ve diğerleri, 2012), antikanser etkisinin yüksek olduğunu düşündükleri LL-III peptitini floresin ile işaretlemiş ve Tetrametilrodamin (TMRE) ile işaretlenmiş mitokondrilere sahip HEP-G2 hücrelerinin *in vivo* konfokal mikroskopisi ile peptitlerin hücre içerisine girişini, giriş hızını ve hücredeki lokalizasyonunu görmeyi amaçlanmıştır (Şekil 1.4). TMRE sinyali ve floresin sinyali arasında bir örtüşme gözlemlenmemiş, yalnızca hücrelerdeki çok yüksek konsantrasyonlu floresin birikimi nedeniyle her iki görüntüleme kanalında da gözlemlenerek sarı renk elde edilmiştir.



Şekil 1.4: Floresin-LL-III'ün HEP-G2 hücrelerine zaman kontrollü girişiminive lokalizasyonunu gösteren resim. Yeşil renk floresin-LL-III, kırmızı renk mitokondriyal matriste biriken ve membran potansiyeline bağımlı TMRE boyası, sarı renk yüksek miktarda Floresin-LL-III olduğu noktaları temsil eder (Slaninova ve diğerleri, 2012). (Görüntü ölçeği 30 µm. min: dakika, s: saniye)

Fakat Floresin-LL-III birikmiş olan HEP-G2 hücreleri daha detaylı ve yakından incelendiğinde peptitin çoğu membran sisteminin yakınında birikim sağladığı gözlemlenmiştir. Aşağıda verilen Şekil 1.5'te de görüldüğü üzere, yeşil ile sarı rengin bir

süre canlı kalan fakat sonrasında ölen parçalanmış mitokondrileri çevrelediği ve membran potansiyeline bağımlı olan kırmızı rengin artık gözlemlenmediği gösterilmiştir.



Şekil 1.5: Floresin-LL-III'ün HEP-G2 girişimini ve lokalizasyonunu ayrıntılı gösteren resim (Slaninova ve diğerleri, 2012). (Görüntü ölçeği 15 µm)

Elde edilen bulgular, peptitlerin etki mekanizmasının hücre zarının geçirgenleşmesini sağladığını ve peptitlerin hücreye girdikten sonra hücredeki zar sistemlerini bozduğunu göstermektedir. Bu bulgulara, endoplazmik retikulum gibi zarlı organellere spesifik belirteçler kullanılarak daha fazla kanıt oluşturulabileceği önerilmiştir (Slaninova ve diğerleri, 2012).

2. AMAÇ

Bu çalışmanın temel amacı, literatürde antimikrobiyal etkisi ile bilinen Lasioglossin LL-III peptidinin LL-III/37 analogunun, meme kanseri üzerindeki potansiyel antikanser etkilerini araştırmak ve bu konudaki literatür eksikliğini gidermektir. Bu kapsamda, LL-III/37 peptidinin sağlıklı meme hücreleri (MCF10A) ile ER (östrojen reseptör) pozitif meme kanseri hücreleri (MCF7) üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak proteom düzeyinde incelenmiş ve hücresel yollar üzerindeki olası etki mekanizmalarının ortaya konulması hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında LL-III/37 peptidi katı faz peptit sentez yöntemi ile sentezlenmiş ve saflaştırılmıştır. Daha sonra her iki hücre hattı için uygun dozajlar, doz-toksisite analizleri ile belirlenmiştir. Belirlenen dozlar, MCF10A ve MCF7 hücre hatlarına üçer tekrarlı olarak uygulanmış, ardından hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen proteinler tripsin ile sindirilerek peptitlere dönüştürülmüş ve bu peptitler nanoLC-MS/MS analizine tabi tutularak protein tanımlamaları yapılmıştır.

Bu çalışma ile LL-III/37 peptidinin meme kanseri hücreleri üzerindeki antikanser etkileri ortaya konulmuş ve söz konusu peptidin sağlıklı ve kanserli meme hücrelerindeki protein profilleri üzerindeki farklılıkları analiz edilerek, olası etki mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır.

3. YÖNTEM

Bu tez çalışması Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Proteomiks Laboratuvarında Ekim 2024- Mayıs 2025 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışması yürütülürken kullanılan kimyasal ve kitlerin alındığı firma adları ve çözeltilerin içerikleri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar, kitler ve alındıkları firma adları.

Kullanılan kimyasallar ve kitler	Firma Adı
Valin	Sigma
Asparajin	Aapptec
Triptofan	Sigma
Lizin	Aapptec
Lösin	Aapptec
Alanin	Sigma
İzolösin	Sigma
Fenilalanin	Aapptec
Tirozin	Aapptec
Glutamat	Aapptec
Fmoc-His(Trt)-Wang Resin	Aapptec
DMF	Merck
HCTU	Merck
DIPEA	Merck
DCM	Merck
TFA	Sigma
TIS	Sigma
Dietil eter	Merck
Piperidin	Merck
DMEM/F-12	Gibco
DMEM	Gibco
FBS	Gibco
Penisilin/Streptomisin	Multicell
L-Glutamin	Multicell
PBS	Capricorn Scientific
MEGS	Gibco
WST-1 Cell Proliferation Assay Kit	Cayman
Bradford Reagent	Biorad
Formaldehit	Sigma
RIPA Liziz Tamponu	Thermo Fisher Scientific
Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
FASP Kit	Abcam
Qubit Protein Assay	Invitrogen

Tablo 1.2: Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

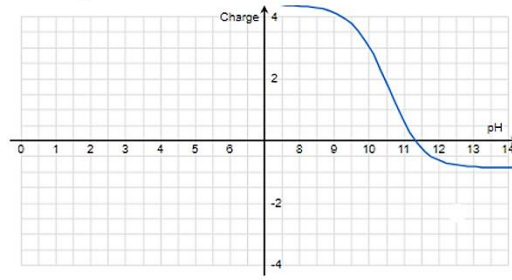
Çözeltiler	İçerik
6X protein yükleme tamponu	62,5 mM Tris-HCl, %2 SDS, %20 Gliserol, %5 β -merkaptoetanol, %0,5 bromofenol mavisi
10X yürütme tamponu	25Mm Tris-HCl, 192mM Glisin, %0.1 SDS
SDS-PAGE fiksatif solüsyonu	%40 Metanol, %10 asetik asit, %50 distile su
Colloidal Commassie Mavisi boya solüsyonu	757mM amonyum sülfat, 1,45mM Commassie blue, %20 metanol, %10 ortofosforik asit
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	500 mL için 146 g akrilamid, 4 g N,N'-Metilen-bis akrilamid

3.1. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Üretilmesi

3.1.1. Üretilcek Peptit Dizilerinin Belirlenmesi

Tez kapsamında kullanılacak Lasioglossin LL-III/37 peptiti (C'- Val- Asn- Trp- Lys- Lys- Val- Leu- Ala- Lys- Ile- Ile- Lys- Val- Val- Lys- N'), yapılan literatür taramaları sonucunda Slaninova ve ekibi tarafından gerçekleştirilen yabancı arı zehrinden elde edilmiş antimikrobiyal peptitler ve analogları arasından yüksek antikanserojen etkisi ve düşük hemolitik aktivite göstermesi gerekçesiyle seçilmiştir (Slaninova et al., 2012). NSP10 peptiti (C'- Asn- Lys- Phe- Tyr- Lys- Asp- Leu- Glu- Glu- Lys- Phe- N') ise laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilen "*Tmprss2 ve Katepsin L Proteinlerini Seçici Olarak Baskılayan ve Nsp10 Proteinini Parçalayan Geniş Etkili Yeni Anti-Korona Virüs Stratejilerinin Geliştirilmesi*" projesi kapsamında sentezlenmiş olması ve hücre penetrasyonu gerçekleştirmemesi gerekçesiyle pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere tercih edilmiştir (Şekil 2.1).

Lasioglossin LL-III/37



H-V-N-W-K-K-V-L-A-K-I-I-K-V-V-K

Sekans Uzunluğu	16
Hidrofobisite	38.59
GRAVY	0.27
MW Ortalaması	1903.4503 g/mol
MW Monoizotopik	1902.2296
pI	11.2

NSP10



H-N-K-F-Y-K-D-L-E-E-K-F

Sekans Uzunluğu	12
Hidrofobisite	27.55
GRAVY	-1.73
MW Ortalaması	1597.8033 g/mol
MW Monoizotopik	1596.7937
pI	7.7

Şekil 2.1: Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 peptitlerinin dizileri ve genel özellikleri.

3.1.2. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Katı Faz Peptit Sentezi

Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 peptitleri, katı faz desteği olarak Fmoc-His(Trt)-Wang Resin (0,5 mmol/g, 0,3g) üzerinde Aapptec Focus Xi peptit sentezleyici (sürüm 2.0) kullanılarak katı faz peptit sentezi ile kademeli olarak sentezlendi (Meienhofer ve Gross, 1979). Tüm amino asitlerde N-terminal koruması Florenilmetoksikarbonil (Fmoc) fonksiyonel grubu ile sağlandı.

N-terminali Fmoc grubu ile korumalı olan resin N,N-Dimetilformamid (DMF) ile 20 dakika muamele edildi. Daha sonra Fmoc grubu %20 piperidin ile kaldırıldı ve DMF ile yıkama yapıldı. Koruması kaldırılan resin/amino asit/peptidin N-terminalini sıradaki amino asitle birleştirmek için Fmoc amino asidi, 2-(6-Kloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminyum hekzaflorofosfat (HCTU) birleştirme reaktifi, peptit bağı oluşumunu destekleyen N,N-Diizopropiletilamin (DIPEA) ve N₂ gazı ile aktive edildi. Ardından 90 dakika birleşme reaksiyonu gerçekleştirildi. Valin (V), Triptofan (W), Lizin (K) ve İzolösin (I) amino asitleri için ikişer kez birleştirme reaksiyonu gerçekleştirildi.

Peptit zinciri tamamlandıktan sonra N-terminaldeki Fmoc grubunu uzaklaştırmak için peptit zinciri DMF ve N₂ gazı ile muamele edildi. Daha sonra resine bağlı peptit zincirinin yıkamaları yapıldı ve desikatörde kurumaya bırakıldı. Elde edilen peptit zincirinin resinden uzaklaştırılması için öncelikle diklorometan (DCM) ve metanolle üçer tekrarlı yıkaması gerçekleştirildi. Ardından %95'lik Trifloroasetik asit (TFA) kokteyli (Tablo 2.3) ile 1,5 saat

muamele edildi. Ham peptit, eter yardımıyla 3 tekrarlı olacak şekilde çöktürüldü. Uygun çözücü ile çözmeden önce kurumaya bırakıldı.

Tablo 2.3: TFA kokteyl içeriği. TIS: Triizopropilsilan. TFA: Trifloroasetik asit.

<i>TFA kokteyl</i>	Gerekli Olan Miktar	5 mL için
ddH ₂ O	2.5%	125 ul
TIS	2.5%	125 ul
TFA	95%	4,75 mL

3.1.3. Sentezlenen Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Saflaştırılması ve LC-MS ile Kontrolü

Ham Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 peptitleri, NGC Kromatografi Sistemi (BioRad) üzerinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile saflaştırıldı. Saflaştırma için PURIFLASH BIO 100 C18-T 5µm 250 x 4,6mm HPLC kolonu kullanıldı. 1 mL peptitin saflaştırılması, 3 mL/dakika akış hızında %0,1 TFA'da %40-60 CH₃CN'nin 60 dk'lık doğrusal gradyan kullanılarak yapıldı. Elüsyon yapılan peptit fraksiyonlarının analizi için Q-Exactive kütle spektrometresi (Thermo Scientific, CA) kullanıldı. Tüm sistem Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, CA) tarafından kontrol edildi. Majör piki içeren fraksiyonlar birleştirildi ve saflık açısından analiz edildi.

3.1.4. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Liyofilizasyonu

Major piki içeren peptitlere ait fraksiyonlar 3 mL'lik hacimlerde 4 adet 50'lik falkona alikotlandı ve sıvı azot kullanılarak donduruldu. -110°C'de çalışmakta olan liyofilizatörde (Scanvac CoolSafe 55-9) yaklaşık 3 gün liyofilize edilen peptitler, sonraki adımlarda kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

3.1.5. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin SDS-PAGE Analizi ile Kontrolü

Saflaştırılıp LC-MS ile kontrolü sağlanan peptitlerin kalitatif analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi) analizleri yapıldı. Peptitlerin safsızlıklarının ve genel profillerinin gözlemlenebilmesi için ayırma jelinin konsantrasyonu %20 ve sıkıştırma jelinin konsantrasyonu %8 olarak belirlenmiştir. Hazırlanan jellerin içeriği Tablo 2.4'te bulunmaktadır. Jel bileşenleri bir falkon tüp içerisinde karıştırılıp kasete yerleştirilmiş olan 1 mm boşluklu camların arasına pipet

yardımla döküldü. Dökülen jelin yüzeyinin düzgün olması ve jelin hava ile temasının kesilmesi için üzerine 200 μ L izopropanol eklendi. Ayrılma jeli polimerleştikten sonra izopropanol saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve sıkıştırma jeli dökülerek tarak yerleştirildi. Sıkıştırma jelinin de polimerleşmesi sonrası jel kullanıma hazır hale geldi. Hazır olan jel kullanılmak üzere ıslak bir peçeteye sarılarak kilitli bir poşet içerisinde +4°C’de 1 haftaya kadar saklandı.

Tablo 2.4: SDS-PAGE jel solüsyonlarının içerikleri.

Sıkıştırma Jeli		Ayrılma Jeli	
Jel yüzdesi (%)	8	Jel yüzdesi (%)	20
%30 Akrilamid/Bisakrilamid*	0,85 mL	%30 Akrilamid/Bisakrilamid	6,66 mL
0,5M Tris (pH 6,8)	0,625 mL	1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 mL
%10 Amonyum persülfat	0,05 mL	%10 Amonyum persülfat	0,1 mL
%10 SDS	0,05 mL	%10 SDS	0,1 mL
TEMED	0,005 mL	TEMED	0,004 mL
H ₂ O	3,4 mL	H ₂ O	0,63 mL
Toplam hacim	5 mL	Toplam hacim	10 mL

Jele yüklenecek olan peptitler 40 μ L %0,1’lik FA (formik asit) ile 15 dk çalkalayıcıda, 10 dk sonikasyon yardımıyla çözüldü. 4 ayrı hacim olmak üzere (1-2-4-8 μ L) hazırlanan örnekler dH₂O ile 20 μ L’ye tamamlandı ve üzerlerine 1X olacak şekilde stok 6X yükleme boyasından 4 μ L eklendi. Örnekler 95°C’de 3 dk kaynatıldı ve jele yüklemek üzere hazır hale getirildi.

Hazırlanan jel yürütme tankına yerleştirildi ve tank içerisine dH₂O ile 10X’ten 1X’e çekilmiş olan yürütme tamponu konuldu. Jel, örnekler ayırma jeline girene kadar 110V’ta, ayırma jeline girdikten sonra 180V’ta 20 dk yürütüldü. Yürümesi tamamlanan jel gümüş boyama yapmak için fiksatif solüsyonuna alınıp gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında gümüş boyama protokolü gereğince jel 20 dk yıkama solüsyonunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 2 dk duyarlaştırma solüsyonuyla inkübe edilen jel 2 kez soğuk ddH₂O ile yıkandı. Yıkama sonrası 20 dk gümüş boyama solüsyonuyla inkübe edilen jel 2 kez soğuk ddH₂O ile yıkandı. Jel yıkama sonrası bantlar görünür hale gelene kadar geliştirme solüsyonunda inkübe edildi ve durdurma solüsyonu ile reaksiyon durduruldu. Kullanılan solüsyon içerikleri Tablo 2.5’te verilmiştir. Daha sonra jel ddH₂O içerisine alınarak asetik asit ve diğer kimyasallardan uzaklaştırıldı ve jel üzerinde sadece peptit bantlarının kalması sağlandı. Jel görüntüsü VersaDoc (BioRad) cihazı ile çekildi.

Tablo 2.5: Gümüş boyama solüsyonlarının içerikleri. Tüm solüsyon bileşenleri 100 mL solüsyon hazırlamak içindir. Verilen bileşenler 100 mL'ye ddH₂O ile tamamlanmaktadır.

Fiksatif Solüsyonu	
Asetik asit	12 mL
%70 Etanol	50 mL
Formaldehit	50 µL
Yıkama Solüsyonu	
%70 Etanol	20 mL
Duyarlaştırma Solüsyonu	
Sodyumtiyo sülfat.5H ₂ O	31,4 mg
Boyama Solüsyonu	
Gümüş nitrat	0,2 g
Formaldehit	76 µL
Geliştirme Solüsyonu	
Sodyumtiyo sülfat.5H ₂ O	0,63 mg
Sodyum karbonat	6 g
Formaldehit	50 µL
Durdurma Solüsyonu-1	
Asetik asit	12 mL
Durdurma Solüsyonu-2	
Asetik asit	2 mL

3.2.MCF10A ve MCF7 Hücre Hatlarının Kültür Edilmesi

3.2.1. Hücrelerin Kültür Edilmesi

Deneylerde kullanılmış olan MCF-10A hücreleri; DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) besiyeri içerisinde, %10 Fetal Bovin Serum (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin (P/S) ve %1 MEGS (Mammary Epithelial Growth Supplement, Gibco) içeriği ile büyütüldü. MCF-7 hücreleri ise DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) besiyeri içerisinde, %10 Fetal Bovin Serum (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin içeriği ile büyütüldü. Kültür süresince hücre hatları %5'lik CO₂'de 37°C'de inkübe edildi. Hücreler ekim işlemi sonrasında 2-3 günde bir, hücre yoğunluğunun %75 olduğu zaman pasajlandı. Hücrelerden ileri süreçlerde yapılacak çalışmalar için saklama alındı ve sıvı azot içerisinde muhafaza edildi.

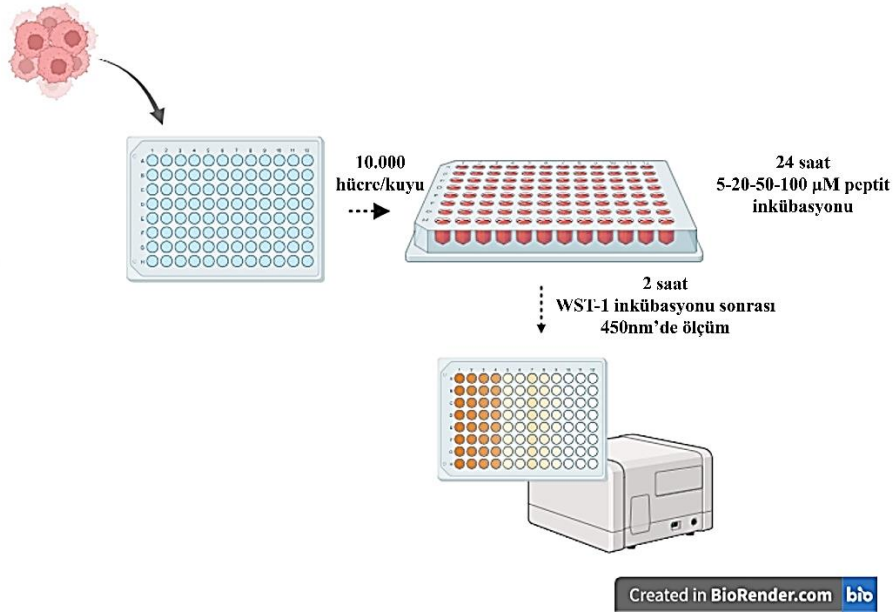
3.2.2. Hücrelerden Saklama Alınması

Tripsinize edilip kaldırılmış olan hücreler 400 x g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Ardından %70 DMEM, %20 FBS ve %10 DMSO (Dimetilsülfoksit) içeren saklama besiyeri hazırlandı ve hücreler besiyeri içerisinde çözüldü. Her bir kryotüpüne 1 mL olacak

şekilde hücreler dağıtıldı. Kriotüpler -80°C 'de kryo-dondurucu saklama kutusunda (Nalgene) gece boyu bekletildikten sonra sıvı azot içerisinde muhafaza edildi.

3.3. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Hücre Canlılıklarına Etkisinin Belirlenmesi

Çözüldükten sonra birkaç pasaj geçirilmiş hücreler 96 kuyulu plakada kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde 3 tekrarlı ekildi. 24-48 saat inkübasyon sonrasında besiyerleri uzaklaştırılıp literatür referans alınarak 100-50-20-5 μM olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda peptit 100 μL DMEM içerisinde hücrelere uygulandı. Yine literatür referans alınarak 24 saatlik inkübasyon yapıldı. 24 saatin sonunda peptit içeren besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyular PBS ile yıkandı. Daha sonra WST-1 hücre proliferasyon kiti (Cayman) kullanılarak kuyu başına 10 μL WST-1 karışımı total hacmi DMEM ile 100 μL 'ye tamamlanıp hücreler üzerine eklendi ve 2 saat %5'lik CO_2 'de 37°C 'de inkübe edildi. 450 nm absorbans değerinde ölçüm alındı (Şekil 2.2).

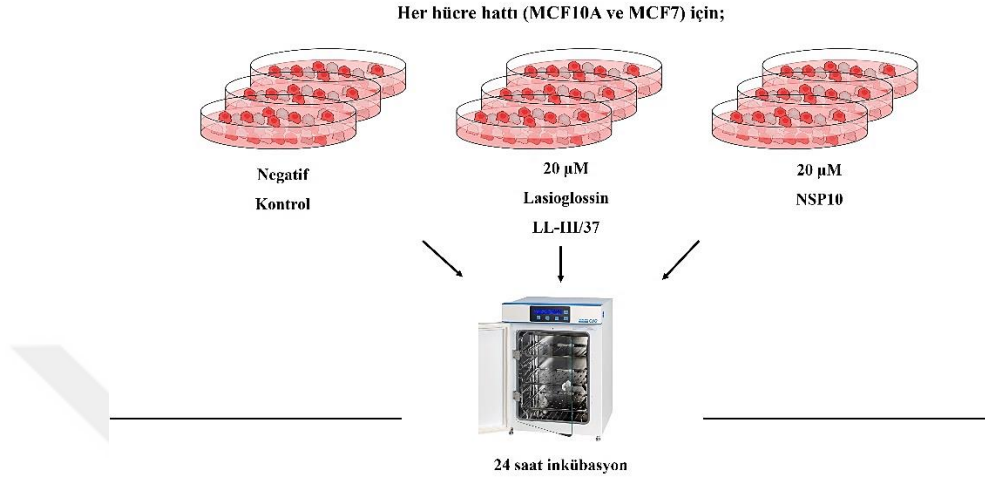


Şekil 2.2: Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 peptitlerinin hücre canlılıklarına etkisinin belirlenmesi deney şeması (BioRender).

3.4. Hücrelerin Peptit İnkübasyonu

MCF10A ve MCF7 hücreleri uygun koşullarda kültür edildi. Her hücre hattı için 9 adet ve toplamda 18 adet T-25 hücre kültür kaplarına yoğunluğu $0,7 \times 10^6$ hücre/kap olacak şekilde ekim yapıldı. Her hücre hattı için 9 adet kültür kabının 3 tanesi negatif kontrol, 3 tanesi Lasioglossin LL-III/37 peptit inkübasyonu ve 3 tanesi NSP10 peptit inkübasyonu olarak kullanıldı. Hücreler %60-70 yoğunluğa ulaşınca kadar kültür kaplarında büyütüldü ve peptit inkübasyonu öncesi 3 kez PBS ile yıkanarak ortamdaki besiyeri artıkları

uzaklaştırıldı. 6 adet kültür kabına 20 µM Lasioglossin içeren reaksiyon tamponu (DMEM veya DMEM/F-12 içerisine %10 FBS, %1 P/S ve DMEM/F-12 için %1 MEGS), 6 adet kültür kabına 20 µM NSP10 içeren reaksiyon tamponu eklendi. Negatif kontrol kaplarına ise peptit içermeyen reaksiyon tamponu eklendi ve tüm kültür kapları 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Deney şeması Şekil 2.3’te gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Hücrelere yapılan peptit inkübasyonlarının deney şeması.

3.5. Protein Özütlelerinin Hazırlanması

Peptitler ile inkübasyonu yapılan ve hiçbir şey uygulanmamış olan hücreler besiyerleri uzaklaştırılarak 3 kez fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanıp peptit kalıntılarından ve diğer kirliliklerden arındırıldı. Daha sonra hücrelerin üzerine 3 mL PBS eklendi ve hücre kazıyıcı (scraper) ile hücreler kazınıp 15 mL’lik falkon tüplerde toplandı. Toplanan hücreler 400 x g’de 10 dk santrifüj edildikten sonra üzerlerindeki süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletler, elde edilen pellet miktarı oranınca RIPA liziz tamponu ve son konsantrasyonu 1X olacak şekilde proteaz inhibitörü ile süspanse edildi. Hücre süspanسیونları 1 saat buz üzerinde inkübe edildi. Ardından hücre süspanسیونlarının içerisine 0,2 mm ve 0,5 mm çapındaki çelik boncuklar eklendi ve Bullet Blender cihazı ile 4 tur, 7 kuvvetinde, 4 dk koşullarında hücreler lizize uğratıldı. 2. ve 4. turlar sonrasında tüpler sıvı azota daldırıp çıkarılarak liziz işlemi desteklendi. Lizize uğrayan hücreler 10.000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar temiz tüplere alınarak 15.000 rpm’de 15 dk santrifüj işlemi tekrarlandı ve hücre atıkları uzaklaştırılarak protein özütleri elde edildi. Protein miktarları Bradford analizi ile ölçüldü ve 20 µg protein özütü kullanılarak %12’lik jel ile SDS-PAGE analizi yapıldı.

3.6. Protein Özütlelerinin Triptik Kesimi

SDS-PAGE ile kalitesi doğrulanan proteinler öncelikle havuz yapıldı ve nLC-MS/MS analizlerinde kullanılmak üzere filtre yardımlı örnek hazırlama (FASP) yönteminden faydalanılarak kesime tabii tutuldu. FASP kesimi için 200 µg protein özütü (30 µL hacmi aşmayacak şekilde) 200 µL 8 M üre solüsyonu ile karıştırılarak 30 kDa'luk membran filtre üzerine aktarıldı. Filtreler kit içindeki özel tüplere yerleştirilerek 10 dk 15 000 x g'de santrifüj edildi. Filtrelerin üzerine 8 M üre solüsyonundan 100 µL daha eklenerek santrifüj işlemi totalde iki kez tekrarlandı. Ardından filtre üzerindeki üre yardımıyla kopan disülfid bağlarının tekrar oluşumunun engellenmesi için 8M üre tamponu ile hazırlanan iyodoasetamid (IAA) tamponu membran üzerine eklendi ve tüpler karanlık ortamda 20 dk bekletildi. Ardından santrifüj işlemi tekrarlandı ve örneklerin yıkanması için filtre üzerine 2 kez 100 µL 50 mM amonyum bikarbonat (AmBic) solüsyonu eklendi ve santrifüj işlemleri tekrarlandı. Temizlenen örnekler üzerine 50 mM AmBic içinde çözülerek hazırlanan tripsin çözeltisi (53 ng/µL tripsin) eklendi. Kesim işlemi için örneklerin bulunduğu tüpler, kapakları parafilmlelenerek gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Kesim işlemi tamamlandıktan sonra peptitlerin elde edilmesi için örneklerin bulunduğu filtreler temiz tüplere aktarıldı ve üzerindeki örneklere sırasıyla ikişer kez 40 µL 50 mM AmBic ve 50 mM NaCl₂ eklenerek her seferinde santrifüj edildi ve elde edilen peptit örnekleri tüp içerisine toplandı. Toplanan peptit örnekleri vakum konsantratör cihazı kullanılarak kurutuldu. Daha sonra peptitlerin nLC-MS/MS analizleri için 30 µL %0,1'lik FA çözeltisi peptitler üzerine ilave edildi ve 15 dk sonik banyoya koyularak süspanse hale getirildi.

3.7. Peptitlerin Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Kesimi tamamlanan peptitlerin nLC-MS/MS analizleri için eşit konsantrasyonlarda peptit kullanılması gerekmektedir. Konsantrasyonlarının belirlenmesi için peptit örneklerinin Qubit cihazı kullanılarak konsantrasyon ölçümleri yapıldı. Bunun için çalışma solüsyonundan örnek başına 199 µL ve reaktiften de 1 µL konularak karışım hazırlandı. Mevcut karışım Qubit tüpü başına 199 µL olacak şekilde pay edildi. Daha sonra her tüpe 1 µL peptit örneği konuldu ve yavaşça pipetaj yapıldı. 15 dk'lık karanlık ortam inkübasyonu ardından tüpler Qubit Fluorometer cihazının (Qubit 4 Fluorometer) okuma haznesine yerleştirildi ve protein ölçüm programı seçilerek peptitlerin konsantrasyonları ölçüldü.

3.8. nLC-MS/MS Analizleri

Peptitler, Q-Exactive kütle spektrometresine (Thermo Scientific) bağlı olan Ultimate 3000 RSLC nano sistemi (Dionex, Thermo Scientific) kullanılarak nLC-MS/MS sistemi ile her örnek üçer tekrarlı olacak şekilde analize tabii tutuldu. Analiz süresinde sistemler Xcalibur

4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific) ile kontrol edildi. Öncelikle A (%0,1 FA) ve B (%80 asetonitril [ACN] ve %0,1 FA) mobil fazlarının kullanılması ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ayrımı yapıldı. Bunun için kesilmiş olan peptitler, tuzak (trap) kolonu üzerinden geçirilerek konsantre edildi ve tuzlar uzaklaştırıldı. Ardından peptitler Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonuna (75 μ m x 15 cm x 2 μ m, 100 Å ϕ çap, Thermo Scientific) gönderilerek kromatografik ayrılma işlemine tabi tutuldu. Analizler toplamda 120 dk'da 300 μ L/dk akış hızıyla gerçekleştirildi. Analiz süresince kullanılan ayırma gradyanı Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4: nHPLC analizinde kullanılmış olan ayırma gradyanı.

Tam tarama MS1 spektrumları şu 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 gerçekleştirildi. 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 analiz öncesinde standart bir pozitif kalibratör ile (LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution, Pierce) kalibre edildi.

3.9.nLC-MS/MS Veri Analizi

Elde edilen ham verilerin analizi ve protein tanımlaması için Proteom Discoverer 2.2 yazılımı (Thermo Scientific) kullanıldı. Analizler esnasında kullanılan parametreler 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 olacak şekilde ayarlandı. Her protein için tanımlanan minimum özgün peptit sayısı 1 olarak alındı. MCF10A NK, MCF10A Lasioglossin LL-III/37, MCF10A NSP10, MCF7 NK, MCF7 Lasioglossin LL-III/37 ve MCF7 NSP10 protein özütünden elde edilen kromatogramların kıyası kendi içlerinde yapılarak deneylerin tekrar edilebilirliği değerlendirildi. Her protein için

tanımlanan minimum özgün peptit sayısı 2 olarak alındı ve elde edilen veriler UniProt veribankasından elde edilen verilerle tarandı.

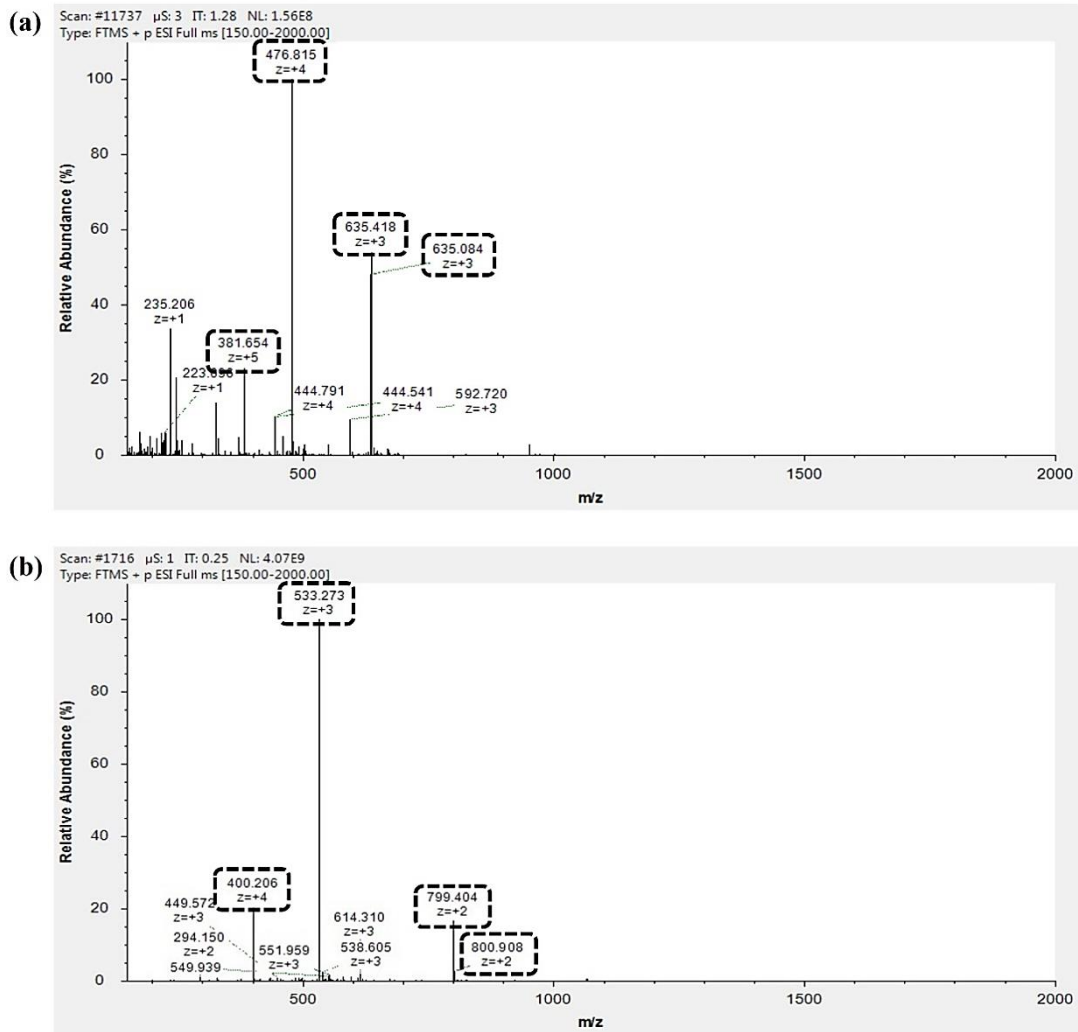
3.10. Biyoinformatik Analizler

nLC-MS/MS analizi sonucu elde edilmiş olan proteinlerin karşılaştırılmalı analizi etiketsiz miktar ölçümü (label-free quantification) yöntemi kullanılarak Proteom Discoverer 2.2 yazılımı ile yapıldı. Yapılan analizlerde her iki hücre hattına ait protein yoğunlukları birbirleri ile göreceli olarak karşılaştırıldı. Analizlerde tüm proteinleri içeren insan referans veri tabanı (Proteome ID UP000005640, Ocak 2024) kullanıldı. Etiketsiz miktar ölçümü analizleri ile elde edilmiş olan proteinlere ait sonuçlar değerlendirilerek anlamlı farklılık gösteren proteinler karşılaştırıldı. Elde edilen proteinlerin lokasyonlarının, sayısal ve kütesel kıyaslarının, kontrol ve karsinojenik hücre hatları arasında farklılık gösteren yolak ve mekanizmaların belirlenmesi için STRING (<https://string-db.org/>) ve PANTHER (<https://pantherdb.org/>) analizleri yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Üretilmesi

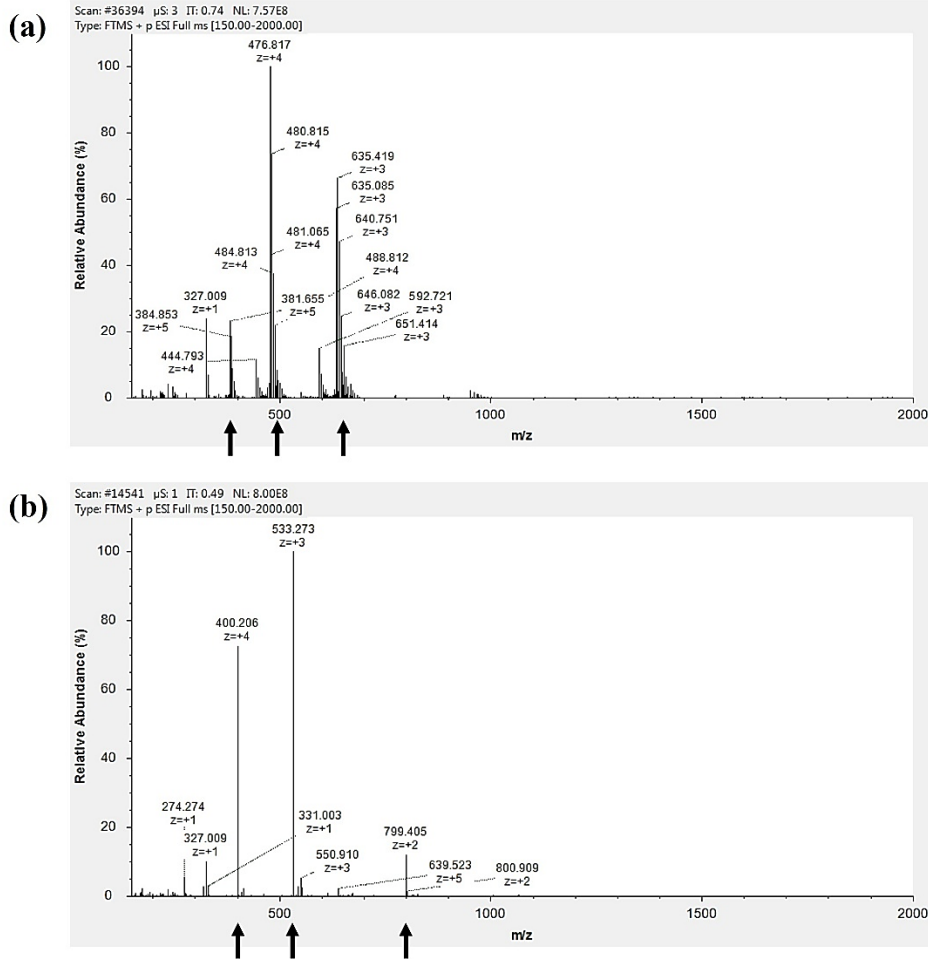
Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 peptitleri, katı faz desteği olarak Fmoc-His(Trt)-Wang Resin (0,5 mmol/g, 0,3g) üzerinde Aapptec Focus Xi peptit sentezleyici (Sürüm 2.0) kullanılarak katı faz peptit sentezi ile kademeli olarak sentezlendi. Yapılan sentez sonrası, saflaştırma adımından önce üretilen peptitlerin sentezlenebilirliği LC-MS analizi kullanılarak kontrol edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Katı faz yöntemi ile sentezlenmiş olan peptitlerin üretiminin LC-MS ile doğrulanması. (a) Lasioglossin LL-III/37, moleküler ağırlığı 1902,23 g/mol. (b) NSP10, moleküler ağırlığı 1597 g/mol.

4.2. Sentezlenen Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Saflaştırma Sonrası LC-MS ile Kontrolü

Katı faz desteği ile sentezlenmiş olan peptitler doğrulandıktan sonra NGC Kromatografi Sistemi üzerinde C18 kolon kullanılarak HPLC ile saflaştırıldı. Saflaştırılan peptitlerin elüsyonları 1 mL’lik elüsyonlar halinde toplandı. Major pikleri içeren elüsyonların saflık durumu LC-MS analizi ile kontrol edildi (Şekil 4.2). Her iki peptitin de yüksek saflıkta elde edildiği gözlemlendi.

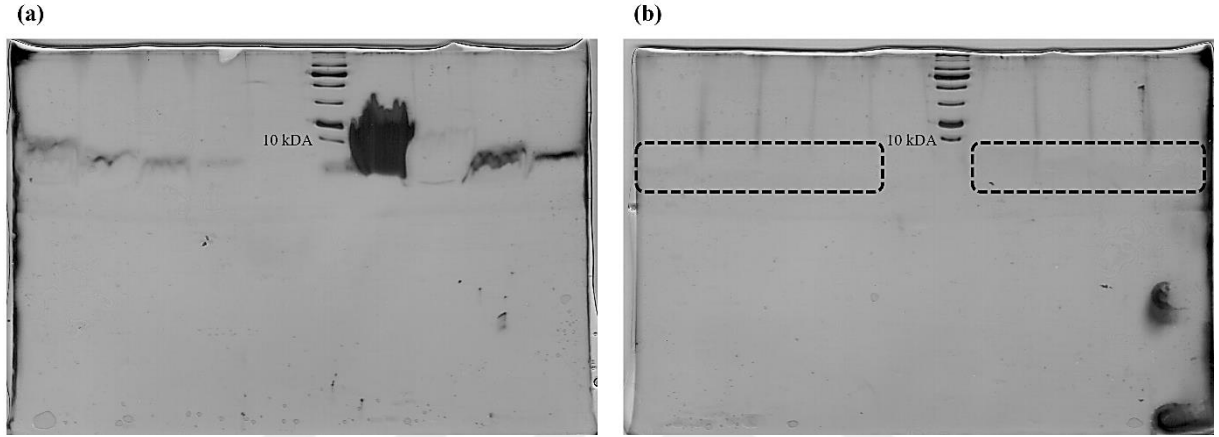


Şekil 3.2: NGC kromatografi sisteminde saflaştırılan elüsyonların saflık durumunun LC-MS ile kontrolü. (a) Lasioglossin LL-III/37’nin major elüsyon fraksiyonu. (b) NSP10’in major elüsyon fraksiyonu.

4.3. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin SDS-PAGE Analizi ile Kontrolü

Saflaştırılıp LC-MS ile kontrolü sağlanan ve daha sonra liyofilize edilen peptitlerin kalitatif analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla SDS-PAGE analizleri yapıldı. Peptitlerin

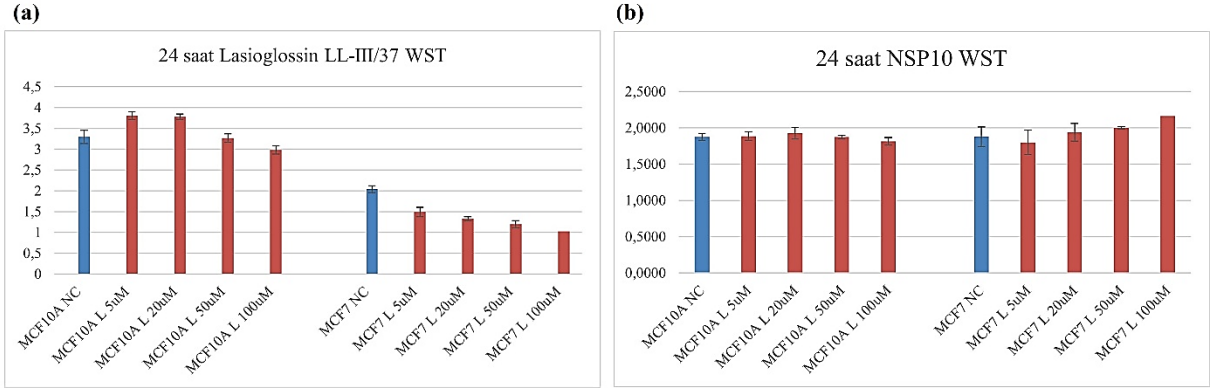
safsızlıklarının ve genel profillerinin gözlemlenebilmesi için ayırma jelinin konsantrasyonu sırayla %10- %15- %20 olacak şekilde kademeli ve istifleme jelinin konsantrasyonu %8 olarak belirlendi. Jele yüklenecek olan peptitler 40 µL %0,1'lik FA (formik asit) ile çözüldü. Bir miktar peptit 1:5 oranında FA ile dilüe edildi. 4 ayrı hacim olmak üzere (1-2-4-8 µL) hem derişik hem dilüe olan peptit numunelerinden hazırlanan örnekler dH₂O ve 6X yükleme boyası ile hazırlandı. Örnekler 95°C'de 3 dk kaynatıldıktan sonra jele yüklendi. Gümüş boyama ile boyanan jel görüntülenerek SDS-PAGE analizi ile kontrolü yapıldı. Jel görüntüsü Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3: (a) Lasioglossin LL-III/37 ve (b) NSP10 peptitlerinin kalitatif analizi için SDS-PAGE analizi ile gösterilmesi (Hacimsel yükleme sırası her iki jel için de: 1- 1:5 seyreltilmiş 8 µL, 2- 1:5 dilüe 4 µL, 3- 1:5 dilüe 2 µL, 4- 1:5 dilüe 1 µL, 5- Boş, 6- Protein markeri, 7- 8 µL, 8- 4 µL, 9- 2 µL, 10- 1 µL peptit).

4.4. Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 Peptitlerinin Hücre Canlılıklarına Etkisinin Belirlenmesi

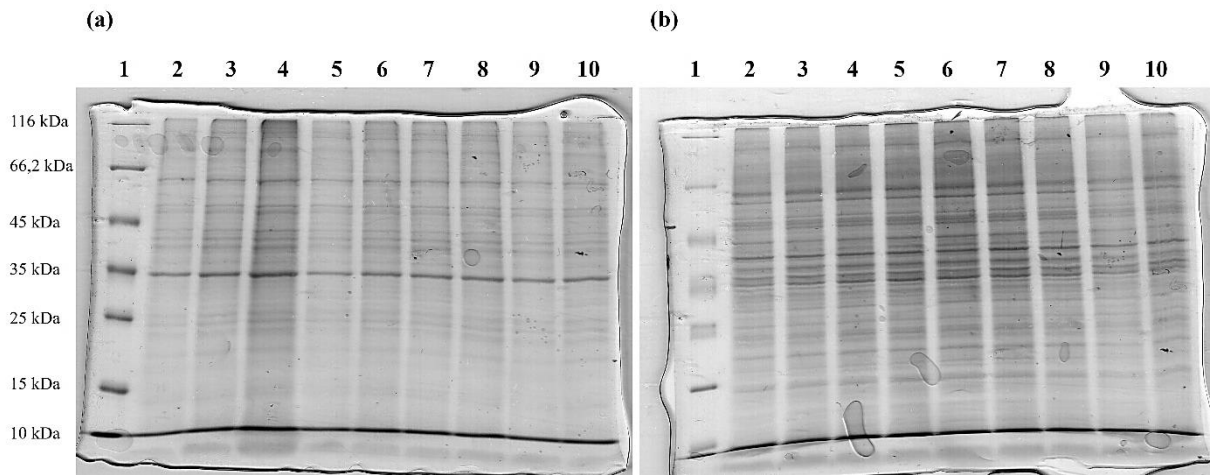
MCF10A ve MCF7 hücreleri 96 kuyulu plakada kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde 3 tekrarlı ekildi. 24-48 saat inkübasyon sonrasında besiyerleri uzaklaştırılıp literatür referans alınarak 100-50-20-5 µM olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda peptit 100 µL DMEM içerisinde hücrelere uygulandı. Yine literatür referans alınarak 24 saatlik zaman denemesi ile hücre canlılıkları incelendi. Farklı zamanlarda iki tekrarlı olarak gerçekleştirilen WST yöntemi sonrasında elde edilen sonuçlar değerlendirilerek hücrelere uygulanması gereken uygun doz her iki peptit için de 20 µM olarak belirlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Lasioglossin LL-III/37 ve NSP10 peptitlerinin MCF10A ve MCF7 hücrelerine 24 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılıklarına etkisinin kritik dozunun belirlenmesi.

4.5. Reaksiyon Sonrası Protein Özütlerinin SDS-PAGE Analizi ile Kontrolü

MCF10A ve MCF7 hücrelerinde, her hücre hattı için 9 adet kültür kabının 3 tanesi negatif kontrol, 3 tanesi Lasioglossin LL-III/37 peptit inkübasyonu ve 3 tanesi NSP10 peptit inkübasyonu olarak kullanıldı. Peptitler toksisite analizleri sonucu belirlenmiş uygun doz olan 20 μ M konsantrasyonda uygulandı. İnkübasyon süresi dolduktan sonra hücreler PBS ile yıkandı ve kazıyıcı ile kazınarak toplandı. Ardından hücreler fiziksel ve kimyasal olarak lizize uğrattıldı ve protein özütleri elde edildi. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile ölçüldükten sonra protein kalitesi SDS-PAGE analizi ile kontrol edildi. Jel Coomassie Blue Mavisi ile boyandı, yıkandı ve görüntüsü alındı (Şekil 4.6).



Şekil 3.5: Peptit inkübasyonları yapılan hücrelere ait protein özütlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri (20 μ g konsantrasyonda yükleme sırası: 1- Protein markerı, 2- Negatif Kontrol 1, 3- Negatif Kontrol 2, 4- Negatif Kontrol 3, 5- Lasioglossin LL-III/37 1, 6- Lasioglossin LL-III/37 2, 7- Lasioglossin LL-III/37 3, 8- NSP 10 1, 9- NSP10 2, 10- NSP10 3 protein özütü). (a) MCF10A hücrelerine ait protein özütlerinin jel görüntüsü, (b) MCF7 hücrelerine ait protein özütlerinin jel görüntüsü.

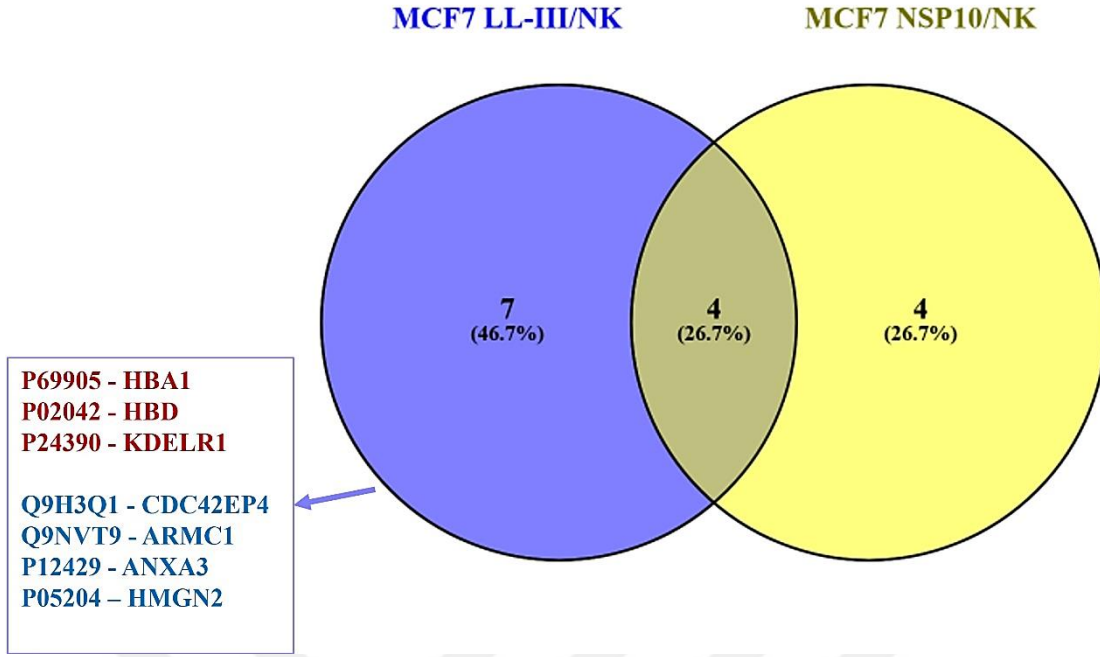
4.6. nLC-MS/MS Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Peptit reaksiyonları sonrasında MCF10A ve MCF7 hücrelerinin protein özütlerinin triptik kesimi ile elde edilen peptitlerin nLC-MS/MS analizleri 3 tekrarlı olarak yapıldı. Proteom Discoverer 2.2 programında yapılmış olan analizler birbirleriyle kıyaslanarak yapılan deneylerin tekrarlanabilirliği kontrol edildi. Proteom Discoverer programında *Homo sapiens*'e ait tüm proteom kullanılarak yapılmış olan analizden toplamda 3836 protein tanımlandı. Bu proteinler 5 grup halinde karşılaştırılarak incelendi: Grup 1) MCF10A LL-III/MCF10A NK, Grup 2) MCF10A NSP10/ MCF10A NK, Grup 3) MCF7 LL-III/MCF7 NK, Grup 4) MCF7 NSP10/ MCF7 NK ve Grup 5) MCF10A LL-III/ MCF7 LL-III. Tanımlanan proteinler arasından güvenilirliği arttırmak için sadece proteinlerde de bolluk oranı (abundance ratio) $1000 < x \leq 2$ ve $0,5 \leq x < 0,001$ arasında olanlar seçildi ve daha ileri analizlerde kullanıldı. Ayrıca tanımlanan peptit sayısı 2 ve üzeri olan proteinler seçilerek yapılan analizlerin güvenilirliği daha da güçlendirildi. Sonuç olarak analiz güvenliğini arttırıcı kısıtlamalar sonrasında Grup 1'de 32, Grup 2'de 31, Grup 3'te 11, Grup 4'te 8 ve Grup 5'te 1175 protein tanımlandı (Tablo 3).

Tablo 3: nLC-MS/MS analizi sonrası tanımlanan proteinler.

Grup No	Grup Adı	Protein Sayısı
Grup 1	MCF10A LL-III/MCF10A NK	32
Grup 2	MCF10A NSP10/ MCF10A NK	31
Grup 3	MCF7 LL-III/MCF7 NK	11
Grup 4	MCF7 NSP10/ MCF7 NK	8
Grup 5	MCF10A LL-III/ MCF7 LL-III	1175

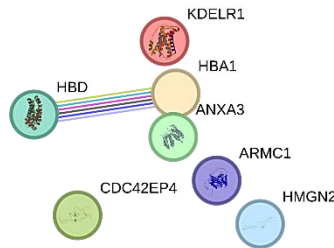
Tablo 3'te gösterilen proteinler Venn şemasına konularak elde edilen proteinlerin benzerlikleri belirlendi. Bu proteinlerin 7 tanesinin Lasioglossin LL-III/37 peptidine maruziyeti sonrası meme kanserinde sağlıklı meme hücrelerine kıyasla ifadelerinin değiştiği belirlendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: MCF7 meme kanseri hücrelerinde Lasioglossin LL-III/37 peptidine maruziyeti sonrası regüle olduğu belirlenen 7 protein. Kırmızı renk ile gösterilenler ifadesi artan (up-regule), mavi renk ile gösterilenler ifadesi azalan (down-regule) olmuş proteinlerdir.

4.7. Biyoinformatik Analizler

MCF7 meme kanseri hücrelerinde Lasioglossin LL-III/37 peptidine maruziyeti sonrası regüle olduğu belirlenen 7 proteinin lokasyonlarının, sayısal ve kütleli kıyaslarının, kontrol ve karsinojenik hücre hatları arasında farklılık gösteren yolak ve mekanizmaların belirlenmesi için STRING (<https://string-db.org/>) ve PANTHER (<https://pantherdb.org/>) analizleri yapıldı. STRING analizi sonucunda Şekil 3.7’de gösterilen bitmap elde edildi. Ortak bir yolak ve mekanizma elde edilemeyen proteinler literatürde var olan güncel çalışmalar ışığında ayrı ayrı araştırıldı.



Şekil 3.7: MCF7 meme kanseri hücrelerinde Lasioglossin LL-III/37 peptidine maruziyeti sonrası regüle olduğu belirlenen 7 proteinin STRING analizi.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en sık teşhis edilen kötü huylu tümörlerden biridir ve moleküler düzeyde ele alındığında da heterojen bir hastalıktır. Hem insidans hem de ölüm oranları açısından değerlendirildiğinde önem arz eden bir halk sağlığı problemidir (Harbeck ve diğerleri, 2019). Hormon reseptör durumu ve HER2 ekspresyonu gibi parametrelere göre sınıflandırılmaları sonucu hedefe yönelik tedavi yaklaşımları geliştirilmiş olmasına karşın özellikle tedaviye dirençli tümör alt tipleri için yeni biyoterapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Waks ve Winer, 2019). Bu bağlamda, AMP'ler, kanser hücrelerine karşı gösterdikleri seçici sitotoksosite nedeniyle alternatif tedavi stratejileri arasında son yıllarda öne çıkmaktadır ve gelecekteki kanser tedavileri için potansiyel adaylar olabilecekleri düşünülmektedir (Tian ve diğerleri, 2022).

Lasioglossin LL-III, *L. laticeps* türü yabani arılardan izole edilen katyonik bir antimikrobiyal peptittir. Bu peptitlerin etki mekanizmasının hücre zarının geçirgenleşmesini sağladığı ve peptitlerin hücreye girdikten sonra hücredeki zar sistemlerini bozduğu daha önce yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir (Slaninova ve diğerleri, 2012). Bu tip AMP'ler, özellikle anormal fosfolipid dağılımına sahip kanser hücre zarlarını hedef alarak membran geçirgenliğini bozar ve apoptotik süreçleri tetikleyebilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2001).

Bu çalışmada, Lasioglossin LL-III peptidinin LL-III/37 analogunun, ER pozitif MCF7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki antikanser etkileri ve MCF10A sağlıklı meme epitel hücre hattı üzerindeki seçiciliği değerlendirilmiştir. Böylece Lasioglossin LL-III/37'nin ER pozitif meme kanseri üzerindeki potansiyel antikanser etkileri araştırılmış ve bu konudaki literatür eksikliğini gidermek amaçlanmıştır. Bunun için tez çalışması kapsamında LL-III/37 peptidi katı faz peptit sentez yöntemi ile sentezlenmiş ve saflaştırılmıştır. Daha sonra her iki hücre hattı için uygun dozajlar, doz-toksosite analizleri (WST-1) ile belirlenmiştir. Öncelikle LL-III/37 için 20 µM olarak belirlenen uygun peptit dozunun, NSP10 peptiti için de uygunluğuna yapılan doz-toksosite analizleri sonucu karar verilmiştir. Belirlenen dozlar MCF10A ve MCF7 hücre hatlarına üçer tekrarlı olarak uygulanmış, 24 saatlik inkübasyon süresi ardından hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Protein özütleri, hücrelerin RIPA liziz tamponu ile patlatılması ile elde edilmiştir. İzole edilen proteinlerin SDS-PAGE analizi ile kaliteleri doğrulandıktan sonra tripsin ile sindirilerek peptitlere dönüştürülmüş ve bu peptitler nLC-MS/MS analizine tabi tutularak protein tanımlamaları yapılmıştır.

Elde edilen bulgular, LL-III/37'nin MCF7 hücrelerinde 20µM gibi düşük bir konsantrasyonda belirgin sitotoksik etki gösterdiğini ve hücre canlılığını doz bağımlı şekilde azalttığını ortaya koyarken, aynı koşullarda MCF10A hücrelerinde anlamlı düzeyde

daha az toksisite oluşturduğunu göstermektedir. Bu durum, Lasioglossin LL-III/37'nin hedefe özgü sitotoksosite potansiyelini desteklemektedir. AMP'lerin bu seçiciliği, özellikle sistemik toksisiteyi azaltma potansiyeli açısından önem arz etmektedir (Hoskin ve Ramamoorthy, 2008). MCF10A hücreleri, literatürde insan sağlıklı meme epitel dokusunun iyi bir modeli olarak tanımlandığı için (Qu ve diğerleri, 2015), elde edilen sonuçlar Lasioglossin LL-III/37'nin sağlıklı dokulara zarar vermeden kanser hücrelerini hedef alabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında, Lasioglossin LL-III/37 (LL-III/37) peptidinin meme kanseri hücreleri üzerindeki potansiyel antikanser etkilerini değerlendirmek amacıyla, özellikle kanserli hücrelerin protein ekspresyon profillerinde meydana gelen değişikliklerin ve olası etki mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik nano-sıvı kromatografiyle eşleştirilmiş tandem kütle spektrometrisi (nLC-MS/MS) analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda, normal meme epitel hücre hattı (MCF10A) ile ER pozitif meme kanseri hücre hattı (MCF7) arasında LL-III/37 uygulaması sonrasında protein ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılıklar gösteren proteinler tespit edilmiştir. Bu farklılık gösteren proteinler üzerinden LL-III/37'nin kanser hücre metabolizmasıyla ilişkili hücresel biyolojik süreçler üzerindeki etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Özellikle MCF7 hücre hattında, MCF10A'ya kıyasla LL-III/37 uygulamasıyla birlikte üç proteinin (HBA1, HBD, KDELR1) ekspresyonunun arttığı (yukarı regülasyon), dört proteinin ise (CDC42EP4, ARMC1, ANXA3, HMGN2) ekspresyonunun azaldığı (aşağı regülasyon) belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda ifadesini artmış olarak gördüğümüz Hemoglobin Alt Birimi Alfa 1 proteini (HBA1- P69905) ve Hemoglobin Alt Birimi Delta (HBD- P02042) proteini bağlayıcı, antioksidan aktivite, organik asit bağlayıcı, hem bağlayıcı, oksidoredüktaz aktivitesi gibi moleküler fonksiyonlarına sahiptir. Yapılan çeşitli çalışmalarda akciğer, yumurtalık ve kolorektal kanser dahil olmak üzere farklı şekilde ifade edilmektedir (Bignotti ve diğerleri, 2006; Kim, ve diğerleri, 2023). Literatürdeki güncel çalışmalar incelendiğinde HBA1 ve HBD proteinlerinin meme kanserinde protein ifadesine ilişkin doğrudan bir çalışma bulunmazken yumurtalık kanseri olan hastalarda sağlıklı bireylere kıyasla önemli ölçüde yüksek ifade edildiği gösterilmiştir (Woong-Shick ve diğerleri, 2005). Bu tez çalışmasında elde edilen protein ifadesinin artışına ilişkin bulguların literatürde diğer kanser türlerindeki paralel olması yapılan analizin doğruluğunu gösterdiği düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda ifadesini artmış olarak gördüğümüz ER Lümen Proteini Tutucu Reseptör 1 (KDEL1- P24390) proteini KDEL endoplazmik retikulum protein retansiyon reseptörleri ailesinin bir üyesidir, sinyal dizilerinin bağlanması gibi moleküler fonksiyonlara sahiptir; bağışıklık tepkileri ve kanserin ilerlemesinde rol oynamaktadır (Wang ve diğerleri, 2025). Literatürdeki güncel çalışmalar incelendiğinde KDELR1

proteini MCF7 meme kanseri hücre hattı ve meme kanseri ile daha önce ilişkilendirilmemiştir. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda KDELR1'in meme kanserinde yukarı regülasyonu ilk defa bizim çalışmamız ile ortaya konmuştur. Fakat bu regülasyonun Lasioglossin LL-III/37 peptitinin antikanser özelliği sonucu mu, meme kanserindeki anormal ifadesinin sonucu mu olduğu konusunun daha fazla çalışma yapılarak araştırılması gerekmektedir.

Bizim çalışmamızda ifadesini azalmış olarak gördüğümüz CDC42 Etkileyici Protein 4 (CDC42EP4- Q9H3Q1) proteini Rho ailesi GTPaz ailesinin efektörlerindendir; GTPaz bağlanması, gen ifadesi üzerindeki temel hücresel süreçlerde düzenleyiliği, sitoskeletal dinamikler gibi moleküler fonksiyonlara sahiptir (Farrugia ve and Calvo, 2017). Literatürdeki güncel çalışmalar incelendiğinde CDC42EP4 proteininin de meme kanserindeki rolü ve moleküler mekanizmaları henüz keşfedilmemiştir. Fakat prostat kanserinde yapılan bir çalışmada bu proteinin kritik bir tümör baskılayıcı gen olarak hareket ettiği ve prostat kanseri dokusunda normal prostat dokusuna kıyasla çok daha düşük ifade edildiği gösterilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2024). Bu açıdan, elde ettiğimiz veriler bu proteinin MCF7 meme kanseri hücre hattında da aşağı regüle olduğunu göstermektedir. Fakat yine, bu regülasyonun Lasioglossin LL-III/37 peptitinin antikanser özelliği sonucu mu, meme kanserindeki anormal ifadesinin sonucu mu olduğu konusunun daha fazla çalışma yapılarak araştırılması gerekmektedir.

Bizim çalışmamızda ifadesini azalmış olarak gördüğümüz Armadillo Tekrar İçeren Protein 1 (ARMC1- Q9NVT9) proteini memelilerde oldukça korunmuştur ve hücre yapışması, sinyal iletimi, mitokondriyal fonksiyonun düzenlemesi, tümör oluşumu ve diğer süreçler üzerinde önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Huang ve diğerleri, 2021). ARMC1 proteininin memeli mitokondriyal temas bölgesi ve krista düzenleme sistemi/mitokondriyal zarlar arası boşluk köprüleme kompleksinin (MICOS/MIB) bir alt birimi olduğu bildirilmiştir (Wagner ve diğerleri, 2019). Yapılan çalışmalar ARMC1 proteininin mitokondriyal hastalıklarla ilişkilendirilebileceğini göstermektedir (Wagner ve diğerleri, 2019). Artmakta olan çalışmalar, mitokondriyal işlev bozukluklarının glioma tümör oluşumunu teşvik edebileceğini göstermektedir (Chan, 2020; Jin ve diğerleri, 2017). Bu bağlamda, literatürdeki çalışmalar incelendiğinde ARMC1 proteinin meme kanserindeki rolü ve moleküler mekanizmaları henüz keşfedilmemiştir. Fakat prostat kanserinde yapılan bir çalışmada bu proteinin ifade düzeyinin sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Zhuo ve diğerleri, 2025). Literatürde meme kanserinde ARMC1 proteininin ekspresyonunun değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat Zhuo ve ekibinin yapmış olduğu prostat kanseri çalışması ele alındığında literatürün aksine, Lasioglossin LL-III/37 peptidine maruz bırakılan MCF7 meme kanseri hücrelerinde sağlıklı MCF10A hücrelerine kıyasla çok daha az ifade edildiği görülmüştür. Meme kanserinde ARMC1 proteininin anormal azalışına

ilişkin ifadesi ilk defa bizim çalışmamı ile ortaya koyulmaktadır. Protein ifadesindeki bu azalışın hücre canlılığını arttırdığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, elde ettiğimiz veriler doğrultusunda meme kanseri hücresinde azalan ARMC1 ekspresyonunun LL-III/37 peptitinin antikanser etkisi ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda ifadesini azalmış olarak gördüğümüz Annexin A3 (ANXA3-P12429) proteini fosfotidilserin bağlanmasında görev alır. Ayrıca annexinler, pıhtılaşma inhibisyonu, endositoz, ekzositoz, sinyal iletimi, proliferasyon ve apoptoz gibi hücre sel süreçlerde de yer almaktadır (Liemann ve Lewit-Bentley, 1995). Literatürde bulunan güncel çalışmalar incelendiğinde, ANXA3 ifadesinin meme kanseri hücrelerinde sağlıklı hücrelerle kıyaslandığında daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Ozturk, 2022). Bu tez çalışması kapsamında Lasioglossin LL-III/37 peptidine maruz bırakılan MCF7 meme kanseri hücreleri sağlıklı MCF10A hücreleri ile kıyaslandığında ANXA3 proteininin meme kanseri hücrelerinde aşağı regüle olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, meme kanserinin prognozu için önemli bir biyobelirteç olduğu düşünülen bu proteinin regülasyonunun, LL-III/37 peptitinin antikanser etkisi ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda ifadesini azalmış olarak gördüğümüz Non-Histone Chromosomal Protein HMG-17 (HMGN2- P05204) proteini güçlendiriciler (enhancer) ve promotörler de dahil olmak üzere kromatin bağlayıcı ve düzenleyici moleküler fonksiyonlara sahip bir protein ailesinin üyesidir (Hock ve diğerleri, 2007). HMGN ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin kanser hücrelerinde görülen transkripsiyonel değişikliklerin bir nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu henüz netlik kazanmamıştır (Nanduri ve diğerleri, 2020). Literatürdeki güncel çalışmalar incelendiğinde, HMGN2'nin prolaktin hormonuna yanıt olarak ifadesindeki artışın meme kanseri büyümesinde etkin rol oynadığı gösterilmiştir (Medler ve diğerleri, 2016; Schauwecker ve diğerleri, 2017). Yapılan daha detaylı analizlerde, HMGN2'nin K2 (Lizin-2) kalıntısının meme tümörlerinde deasetile olduğunu fakat sağlıklı meme dokusunda yüksek oranda asetillendiğini göstermektedir (Medler ve diğerleri, 2016). Bu tez çalışmasında elde edilen veriler, Lasioglossin LL-III/37 peptidine maruz bırakılan MCF7 meme kanseri hücreleri sağlıklı MCF10A hücreleri ile kıyaslandığında HMGN2 proteininin, literatürün aksine, meme kanseri hücrelerinde aşağı regüle olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, LL-III/37 peptitinin HMGN2 proteininin asetillenmesine ve böylelikle ifadesinin azalmasına sebep olabileceği ve bu durumun peptitin antikanser etkisi ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir. Fakat yapılmış olan çalışmalar LL-III/37 peptitinin HMGN2 proteininin kanser biyomekanizması ile ilişkisini anlamak için yeterli değildir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen malignite türlerinden biri olup, yeni vaka sayısı her geçen yıl artmaktadır. Moleküler sınıflandırmalar doğrultusunda geliştirilen hedefe yönelik tedavilere rağmen, özellikle tedaviye dirençli tümör alt tiplerinde etkinliği yüksek, seçici ve güvenli biyoterapötik ajanlara olan ihtiyaç devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında, arı kökenli antimikrobiyal peptitlerden biri olan Lasioglossin LL-III'ün LL-III/37 adlı analogunun, MCF7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki antikanser etkileri ile MCF10A sağlıklı meme epitel hücre hattı üzerindeki seçiciliği değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, LL-III/37'nin kanser hücrelerine özgü etkileri moleküler düzeyde analiz edilmiş, özellikle protein ekspresyon profillerindeki değişiklikler incelenerek potansiyel etki mekanizmalarının aydınlatılması hedeflenmiştir.

Yapılan nLC-MS/MS analizleri sonucunda, LL-III/37 peptidinin MCF7 hücre hattında anlamlı düzeyde antikanser aktivite gösterdiği, buna karşın MCF10A hücrelerinde düşük toksisite profili sergilediği belirlenmiştir. Özellikle, LL-III/37 uygulamasıyla birlikte MCF7 hücrelerinde ifade düzeyleri düzeyleri anlamlı biçimde azalan ARMC1, ANXA3 ve HMGN2 proteinleri dikkat çekmiştir. Bu proteinlerin farklı kanser türlerinde anormal biçimde düzenlendiği bilinmekle birlikte, meme kanseri biyolojisindeki rolleri literatürde yeterince aydınlatılmamıştır. Bu çalışma, söz konusu proteinlerin LL-III/37 ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde sağlıklı hücre hattına kıyasla daha düşük seviyelerde ifade edildiklerini ilk kez göstermiştir.

Elde edilen bulgular, ARMC1, ANXA3 ve HMGN2 proteinlerinin meme kanseri biyobelirteçleri olarak değerlendirilebileceğini ve LL-III/37 peptidinin antikanser etkisi ile bu proteinlerin ekspresyonundaki değişikliklerin ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu yönüyle LL-III/37, yeni nesil antikanser ajanlar arasında umut vadeden bir aday olarak öne çıkmaktadır.

Ancak, LL-III/37'nin terapötik potansiyelinin daha net bir şekilde ortaya konabilmesi için in vivo hayvan modelleri ve kapsamlı klinik öncesi çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca, klinik uygulamalara geçiş sürecinde karşılaşılabilecek bazı sınırlılıkların – örneğin kısa yarı ömür, proteolitik degradasyona yatkınlık, immünojenite ve hedef dokuya spesifik iletim zorlukları – dikkate alınması ve bu sorunlara yönelik çözüm stratejileri geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Bu bağlamda, LL-III/37 peptidinin farmakolojik özelliklerinin iyileştirilmesine yönelik taşıyıcı sistemler, peptit modifikasyonları ve hedefleme stratejileri gibi yaklaşımların gelecekteki araştırmalarda değerlendirilmesi önerilmektedir. Böylelikle LL-III/37'nin meme kanseri tedavisinde klinik uygulamalara kazandırılabilirliği artırılabilir.

7. KAYNAKLAR

2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: A randomised controlled trial. (2007). *The Lancet*, 369(9555), 29-36. doi:10.1016/S0140-6736(07)60028-2

A multi-omics analysis reveals KDELR1 promotes malignant progression and correlates with tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. (2025). *Cellular Signalling*, 127, 111613. doi:10.1016/j.cellsig.2025.111613

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. ve Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1), 33. doi:10.1186/s40659-017-0140-9

Annexins: A novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. (1995). *Structure*, 3(3), 233-237. doi:10.1016/S0969-2126(01)00152-6

Antimicrobial peptides: An alternative to traditional antibiotics. (2024). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 265, 116072. doi:10.1016/j.ejmech.2023.116072

Antimicrobial peptides of the vaginal innate immunity and their role in the fight against sexually transmitted diseases—ClinicalKey. (t.y.). 7 Mayıs 2025 tarihinde [https://www.clinicalkey.com/#!/content/playContent/1-s2.0-S2052297519301246?returnurl=https%3F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2052297519301246%3Fshowall%3Dtrue&referrer=adresinden erişildi](https://www.clinicalkey.com/#!/content/playContent/1-s2.0-S2052297519301246?returnurl=https%3F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2052297519301246%3Fshowall%3Dtrue&referrer=adresinden%20eri%20ildi).

Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R. ve Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193-199. doi:10.7150/ijms.3635

Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U. ve Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research*, 21(11), 1142-1147. doi:10.1158/1541-7786.MCR-23-0411

Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. (2023). *Genes & Diseases*, 10(4), 1367-1401. doi:10.1016/j.gendis.2022.02.007

Čeřovský, V., Buděšínský, M., Hovorka, O., Cvačka, J., Voburka, Z., Slaninová, J., ... Straka, J. (2009). Lasioglossins: Three Novel Antimicrobial Peptides from the Venom of the Eusocial Bee *Lasioglossum laticeps* (Hymenoptera: Halictidae). *ChemBioChem*, 10(12), 2089-2099. doi:10.1002/cbic.200900133

Chan, D. C. (2020). Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15(Volume 15, 2020), 235-259. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711

Chemotherapy Side-Effects: Not All DNA Damage Is Equal. (t.y.). 7 Mayıs 2025 tarihinde <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/3/627> adresinden erişildi.

Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. (2022). *The Breast*, 66, 15-23. doi:10.1016/j.breast.2022.08.010

Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., ... Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, 9, 20503121211034366. doi:10.1177/20503121211034366

Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: Identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. (2006). *Gynecologic Oncology*, 103(2), 405-416. doi:10.1016/j.ygyno.2006.03.056

Envelope-deforming antiviral peptide derived from influenza virus M2 protein. (2019). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 517(3), 507-512. doi:10.1016/j.bbrc.2019.07.088

Erdem Büyükkiraz, M. ve Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 1573-1596. doi:10.1111/jam.15314

Evolutionary plasticity of insect immunity. (2013). *Journal of Insect Physiology*, 59(2), 123-129. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.08.018

Farrugia, A. J. ve and Calvo, F. (2017). Cdc42 regulates Cdc42EP3 function in cancer-associated fibroblasts. *Small GTPases*, 8(1), 49-57. doi:10.1080/21541248.2016.1194952

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., ... Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1-31. doi:10.1038/s41572-019-0111-2

HDAC6 Deacetylates HMGN2 to Regulate Stat5a Activity and Breast Cancer Growth | Molecular Cancer Research | American Association for Cancer Research. (t.y.). 7 Mayıs 2025 tarihinde <https://aacrjournals.org/mcr/article/14/10/994/135872/HDAC6-Deacetylates-HMGN2-to-Regulate-Stat5a> adresinden erişildi.

Histone H1 and Chromosomal Protein HMGN2 Regulate Prolactin-induced STAT5 Transcription Factor Recruitment and Function in Breast Cancer Cells. (2017). *Journal of Biological Chemistry*, 292(6), 2237-2254. doi:10.1074/jbc.M116.764233

HMG chromosomal proteins in development and disease. (2007). *Trends in Cell Biology*, 17(2), 72-79. doi:10.1016/j.tcb.2006.12.001

Huang, Y., Jiang, Z., Gao, X., Luo, P. ve Jiang, X. (2021). ARMC Subfamily: Structures, Functions, Evolutions, Interactions, and Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. doi:10.3389/fmolb.2021.791597

In Vitro and MD Simulation Study to Explore Physicochemical Parameters for Antibacterial Peptide to Become Potent Anticancer Peptide. (2020). *Molecular Therapy—Oncolytics*, 16, 7-19. doi:10.1016/j.omto.2019.12.001

Interaction of Cationic Antimicrobial Peptides with Model Membranes. (2001). *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35714-35722. doi:10.1074/jbc.M104925200

- Jin, Y., Cui, D., Ren, J., Wang, K., Zeng, T. ve Gao, L. (2017). CACNA2D3 is downregulated in gliomas and functions as a tumor suppressor. *Molecular Carcinogenesis*, 56(3), 945-959. doi:10.1002/mc.22548
- Kim, K., Choi, E.-Y., Ahn, H.-M., Kim, D.-G. ve Kim, Y.-J. (2023). Hemoglobin Subunit Theta 1 Promotes Proliferation by Reducing Reactive Oxygen Species in Lung Adenocarcinoma. *Cancers*, 15(23), 5504. doi:10.3390/cancers15235504
- Kuhn-Nentwig, L. (2003). Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(12), 2651-2668. doi:10.1007/s00018-003-3106-8
- Nanduri, R., Furusawa, T. ve Bustin, M. (2020). Biological Functions of HMGN Chromosomal Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 449. doi:10.3390/ijms21020449
- New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. (2008). *Peptides*, 29(6), 992-1003. doi:10.1016/j.peptides.2008.02.007
- Novel alternatives to antibiotics: Bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides | Journal of Applied Microbiology | Oxford Academic. (t.y.). 7 Mayıs 2025 tarihinde <https://academic.oup.com/jambio/article/104/1/1/6718744> adresinden erişildi.
- Ozturk, A. (2022). Role of annexin A3 in breast cancer (Review). *Molecular and Clinical Oncology*, 16(6), 1-5. doi:10.3892/mco.2022.2544
- Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752. doi:10.1038/35021093
- Qu, Y., Han, B., Yu, Y., Yao, W., Bose, S., Karlan, B. Y., ... Cui, X. (2015). Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PLOS ONE*, 10(7), e0131285. doi:10.1371/journal.pone.0131285
- Schirmmacker, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 54(2), 407-419. doi:10.3892/ijo.2018.4661
- Sella, T., Weiss, A., Mittendorf, E. A., King, T. A., Pilewskie, M., Giuliano, A. E. ve Metzger-Filho, O. (2021). Neoadjuvant Endocrine Therapy in Clinical Practice: A Review. *JAMA Oncology*, 7(11), 1700-1708. doi:10.1001/jamaoncol.2021.2132
- Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. (2008). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes*, 1778(2), 357-375. doi:10.1016/j.bbamem.2007.11.008
- Targeting Leishmania major parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. (2016). *Acta Tropica*, 159, 11-19. doi:10.1016/j.actatropica.2016.03.018
- The Breast Health Global Initiative 2018 Global Summit on Improving Breast Healthcare Through Resource-Stratified Phased Implementation: Methods and overview—Duggan—2020—Cancer—Wiley Online Library. (t.y.). 7 Mayıs 2025 tarihinde <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.32891> adresinden erişildi.

- The Mixed Carbonic Anhydride Method of Peptide Synthesis. (1979). *Major Methods of Peptide Bond Formation* içinde (ss. 263-314). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-304201-9.50012-6
- Tian, Z., Yang, L., Huang, M., Sun, C., Chen, M., Zhao, W., ... Guo, G. (2022). Antitumor Activity and Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide AMP-17 on Human Leukemia K562 Cells. *Molecules*, 27(22), 8109. doi:10.3390/molecules27228109
- Tohme, S., Simmons, R. L. ve Tsung, A. (2017). Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. *Cancer Research*, 77(7), 1548-1552. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1536
- Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells. (2012). *Peptides*, 33(1), 18-26. doi:10.1016/j.peptides.2011.11.002
- Treatment strategies in cancer from past to present. (2018). *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems* içinde (ss. 1-37). William Andrew Publishing. doi:10.1016/B978-0-12-813689-8.00001-X
- Two optimized antimicrobial peptides with therapeutic potential for clinical antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. (2019). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 183, 111686. doi:10.1016/j.ejmech.2019.111686
- Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., ... Press, M. (2002). Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(3), 719-726. doi:10.1200/JCO.2002.20.3.719
- Wagner, F., Kunz, T. C., Chowdhury, S. R., Thiede, B., Fraunholz, M., Eger, D. ve Kozjak-Pavlovic, V. (2019). Armadillo repeat-containing protein 1 is a dual localization protein associated with mitochondrial intermembrane space bridging complex. *PLOS ONE*, 14(10), e0218303. doi:10.1371/journal.pone.0218303
- Waks, A. G. ve Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, 321(3), 288-300. doi:10.1001/jama.2018.19323
- Wang, G. (2014). Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals*, 7(5), 545-594. doi:10.3390/ph7050545
- Wang, Y., Li, D., Shi, H., Wen, Y., Yang, L., Xu, N., ... Wei, Y. (2009). Intratumoral Expression of Mature Human Neutrophil Peptide-1 Mediates Antitumor Immunity in Mice. *Clinical Cancer Research*, 15(22), 6901-6911. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0484
- Woong-Shick, A., Sung-Pil, P., Su-Mi, B., Joon-Mo, L., Sung-Eun, N., Gye-Hyun, N., ... Hyun-Sun, J. (2005). Identification of hemoglobin- α and - β subunits as potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Science*, 96(3), 197-201. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00029.x
- Zaheer, S., Shah, N., Maqbool, S. A. ve Soomro, N. M. (2019). Estimates of past and future time trends in age-specific breast cancer incidence among women in Karachi, Pakistan: 2004–2025. *BMC Public Health*, 19(1), 1001. doi:10.1186/s12889-019-7330-z

Zhang, X., Yu, T., Gao, G., Xu, J., Lin, R., Pan, Z., ... Feng, W. (2024). Cell division cycle 42 effector protein 4 inhibits prostate cancer progression by suppressing ERK signaling pathway. *Biomolecules and Biomedicine*, 24(4), 840-847. doi:10.17305/bb.2023.9986

Zhuo, G., Lin, S., Yuan, F., Zheng, Q., Guo, Y., Wang, Z., ... Chen, H. (2025). Comprehensive analysis of the expression and prognostic value of ARMCs in pancreatic adenocarcinoma. *BMC Cancer*, 25(1), 28. doi:10.1186/s12885-024-13365-5



8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Elif İlknur ŞAHİN
Doğum Yeri ve Tarihi	
İletişim Adresi	
Telefon	
E-posta	
Eğitim Bilgileri	Lisans: 2018-2022 Moleküler Biyoloji ve Genetik Karadeniz Teknik Üniversitesi Yüksek Lisans: 2022-2025 Tıbbi Biyoloji Kocaeli Üniversitesi
Mesleki Deneyim/İşyeri Bilgileri	-
Yabancı Dil Bilgileri	İngilizce, YÖKDİL 70,00
Üye Olduğu Mesleki/ Sosyal Kuruluşlar	-
Bilimsel Etkinlikler	
Makaleler	Şahin, E. İ., Nalkıran, İ., & Uzuner, S. Ç. (2025). The comparison of life compatibility between trisomy 2 and trisomy 21 (Down syndrome) by bioinformatic-based databases. The European Research Journal, 1-15. doi: 10.18621/eurj.1583797
Projeler	15.02.2021- 30.06.2021 (Stajyer ve Bursiyer) TÜBİTAK 1001- 119Z209, Chilo iridescent Virüs'e Ait 118L Geninin Virüsün Replikasyonu ve Hücreye Giriş-Füzyonundaki Rolünün Aydınlatılması Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ Karadeniz Teknik Üniversitesi 26.07.2021-06.09.2021 (Stajyer) Kocaeli Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Proteomik Laboratuvarı 18.10.2021- 06.07.2022 (Stajyer ve Bursiyer) TÜBİTAK 3501- 120Z227, İki Trichoderma Antifungal Proteinin Tanımlanması, Fonksiyonel Analizi, Heterologus Ekspresyonu ve Fungal Patojenlerle Mücadeledeki Rollerinin Aydınlatılması Doç. Dr. Uğur UZUNER Karadeniz Teknik Üniversitesi

	02.01.2023-01.08.2023 (Bursiyer) TÜBİTAK 1001- 220S017, Bakteriyal Kökenli Hok Proteini Kullanarak Yeni Bir Hücresel Mitofaji Modelinin Geliştirilmesi Prof. Dr. Gürler AKPINAR Kocaeli Üniversitesi 08.01.2024- 07.07.2024 (Bursiyer) TÜBİTAK 1002- 123Z748, Meme Kanseri Hücre Hatlarında Enzimatik Biotinilasyon Aracılığı İle Endoplazmik Retikulum İlişkili Proteom Analizi Ve Aday Biyobelirteçlerin Belirlenmesi Arş. Gör. Dr. Mehmet SARIHAN Kocaeli Üniversitesi 22.01.2024- 01.03.2025 (Araştırmacı) BAP- YopM ve iRGD Aracılı Hok Füzyon Proteinlerinin Üretimi ve Hücre İçine Girişimlerinin Gösterimi Arş. Gör. Dr. Mehmet SARIHAN Kocaeli Üniversitesi
Bildiriler	I. The Use of TurboID for Cel Surface Proteome Analysis in Breast Cancer. Şahin E. İ., Sarihan M., Koçyiğit E., Kasap M., Akpınar G. International Proteomics Congress// 5th National Proteomics Congress, Ankara, Turkey, 13-14 October 2023, pp.34. II. Enrichment and Identification of Bacterial Membrane Proteins by TurboID-Mediated Biotinylation. Koçyiğit E., Sarihan M., Şahin E. İ., Akpınar G., Kasap M. International Proteomics Congress// 5th National Proteomics Congress, Ankara, Turkey, 13 -14 October 2023, pp.59.
Ödüller	-
Diğer	-