

3. Ulusal Proteomik Kongresi

27-29 Şubat 2020, Koç Üniversitesi, İstanbul



www.proteomikderneği.org

BİLDİRİ KİTABI

3 Ulusal
Proteomik
Kongresi

27-29 Şubat 2020
Koç Üniversitesi, İstanbul





Değerli Meslektaşlarım,

Proteomik Derneği 3. Ulusal Kongresi'ni 27 - 29 Şubat 2020 tarihinde Koç Üniversitesi, İstanbul'da gerçekleştiriyor olmanın heyecanını yaşıyoruz.

Proteinlerin işlevlerinin, yapısal özelliklerinin geniş ölçekte belirleyen proteomik teknolojisi baş döndüren bir hızda ilerlemekte ve birçok farklı alandaki uzmanları bir araya getiren multidisipliner bir bilim dalı haline gelmektedir. Ülkemizde de proteomik alanına ilgi ve proteomik alanında çalışmalar yapan merkezler her geçen gün artmaktadır. Proteomik Derneği ailesi olarak proteomik alanı ile ilgilenen tüm bilim insanlarının bilgi ve tecrübe alışverişine olanak sağlayacak etkinliklerle iletişimin artırılması gayretindeyiz.

Organizasyon komitesinde çalışan arkadaşlarımla büyük özveri ile düzenlediğimiz bu kongrede, farklı alanlarda çalışan, genç ve tecrübeli araştırmacıları proteomiks ekseninde bir araya getirerek alandaki güncel çalışmalarını ön plana çıkarmayı hedefliyoruz. Proteomik çalışmalarının genomik, biyoinformatik ve klinik uygulamalar gibi farklı alanlarla kesişmelerine çeşitli örnekler sunarak yeni işbirliği olanakları oluşturmayı umut ediyoruz.

Titizlikle oluşturulmuş bilimsel program kapsamında çok değerli akademisyenler ile tanışma ve bilimsel çalışmalarını dinleme olanağı sunulacaktır. Değerli katılımınız ve farklı proteomik çalışmaları içeren sözel ve poster bildiriler ile kongre programı güçlenmiş bulunmaktadır. Bu vesile ile organizasyon ekibine, bilimsel komiteye, sponsor olan firmalara ve tüm değerli katılımcılara teşekkürlerimi sunar, başarılı ve verimli bir kongre geçirmeyi dilerim.

Doç.Dr. Nurhan Özlü

3. Ulusal Proteomik Kongresi Başkanı

Kongre Düzenleme Kurulu

Kongre Başkanı

Doç.Dr. Nurhan Özlü

Kongre Genel Sekreteri

Doç. Dr. Nurcan Tunçbağ

Üyeler

Dr. Nazlı Ezgi Özkan Küçük

Büşra Aytül Akarlar

Aydanur Şentürk

Proteomik Derneği Yönetim Kurulu

Prof. Dr. Aysel Özpınar

Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal

Doç. Dr. Gizem Dinler Doğanay

Doç. Dr. Nurhan Özlü

Doç. Dr. Nurcan Tunçbağ

Bilimsel Komite

Leyla Aan
Ceyda Açılan Ayhan
Bünyamin Akgül
Nazlı Arda
Şerife Ayaz Güner
Ahmet Tarık Baykal
Murat Alper Cevher
Onur Çizmecioğlu
Gizem Dinler Doğanay
Saliha Durmuş
Batu Erman
Yasemin Furtun Uçal
Şermin Genç
Basri Gülbakan
Huray İşlekel
Ezgi Karaca
Nihal Karakaş
Elif Nur Karalar
Murat Kasap
Özlem Keskin
Ayşe Koca Çaydaşı
Çetin Kocaefe

Kemal Korkmaz
Aslı Kumbasar
Özgür Kütük
Mesut Muyan
Yavuz Oktay
Servet Özcan
Süreyya Özcan Kabasakal
F. Duygu Özel Demiralp
Seza Özen
Nurhan Özlü
Nesrin Özören
Aysel Özpınar
Rana Sanyal
Berna Saryıyar Akbulut
Uğur Sezerman
Öznur Taştan
Uygar Tazebay
Özlem Timirci Kahraman
Nurcan Tunçbağ
Elif Uz
Talat Yalçın

**Bilimsel Komite soyad alfabetik sırasına göre listelenmiştir.*

Bilimsel Program

27 Şubat 2020
Perşembe

09:00-18:00

Proteomik Kursu

28 Şubat 2020
Cuma

08:15

Kayıt Masası Açılış

Açılış

09:00-09:30

Doç.Dr. Nurhan Özlü, 3. Ulusal Proteomik Kongresi Başkanı
Prof.Dr. Levent Demirel, Koç Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanı
Prof.Dr. Aysel Özpınar, Proteomik Derneği Başkanı

09:30-10:30

Proteomik Uygulamalar Paneli

Moderatör: Dr. Nazlı Ezgi Özkan Küçük, *Koç Üniversitesi*
Proteomik Çalışmalarda Örnek Kalitesinin Değerlendirilmesinin Önemi
Prof. Dr. Murat Kasap, Kocaeli Üniversitesi
Doç. Dr. Nurhan Özlü, Koç Üniversitesi
Doç. Dr. Gürler Akpınar, Kocaeli Üniversitesi
Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi

10:30-11:00

Kahve Arası

11:00-12:30

Yapısal Proteomik Oturumu

Oturum Başkanı: Prof. Dr. Dilek Kazan, *Marmara Üniversitesi*
Dr. Öğr. Üyesi Hasan Demirci, Koç Üniversitesi
Ribozom Komplekslerinin Ortam Sıcaklığındaki Seri Femtosaniye X-ışını Kristalografik Çalışmaları
Doç. Dr. Gizem Dinler Doğanay, İstanbul Teknik Üniversitesi
Hidrojen Doteryum Değişimi Kutle Spektrometresi ile Protein Yapı Tayini (HDX-MS)
Sözlü Sunum 01
Kütle Spektrometresi ile Biyobenzer İlaçlarda Birincil Yapı Karakterizasyonu
MSc. Ali İhsan Seçkin, Arven İlaç
Sözlü Sunum 02
Huntington Hastalığı Beyin Proteomunun MALDI-MS Görüntüleme Tekniği ile Araştırılması
MSc. Merve Karayel Başar, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi

12:30-13:30

Uydu Sempozyumu
Bruker / Terra Analiz
Dr. Dirk Wunderlich

Tuzaklanmış İyon Hareketliliği Kütle Spektrometresi ile detaylı LC-MS Proteomik ve MALDI-Görüntüleme Uygulamaları



12:30-14:00

Öğle Arası / Poster Oturumu

Bilimsel Program

28 Şubat 2020
Cuma

14:00-15:30

Protein Etkileşimleri ve Fonksiyonel Proteomik Oturumu

Oturum Başkanı: Prof. Dr. Murat Kasap, *Kocaeli Üniversitesi*

Dr. Öğr. Üyesi Murat Alper Cevher, Bilkent Üniversitesi

NTD-MED14 içeren çekirdek insan Mediatorü RNA Polimeraz II'nin RPB1 alt-birimiyle doğrudan etkileşim göstererek Pol II'yi bazal ve aktive transkripsiyonu sağlamak için promotöre çeker.

Doç. Dr. Evren Önay Uçar, İstanbul Üniversitesi

Stres Proteinleri ve Kansere İlişkisi

Sözlü Sunum 03

Desmin ve LaminB: Farklı Konumlanan İki Proteinin Bağlanma Partnerlerinin Proteomik Analizi

Prof. Dr. Pervin Dinçer, Hacettepe Üniversitesi

Sözlü Sunum 04

Embriyonik Kök Hücrelerde Setd3 Proteinini İlişkili Proteinlerin Proteomik Açısından Belirlenmesi

MSc. Ezgi Gül Keskin, Orta Doğu Teknik Üniversitesi

15:30-16:00

Kahve Arası

16:00-17:30

Biyoinformatik Oturumu

Oturum Başkanı: Doç. Dr. Nurcan Tunçbağ, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi*

Dr. Öğr. Üyesi Ezgi Karaca, Dokuz Eylül Üniversitesi & İzmir Biyotip ve Genom Merkezi

Protein Fonksiyonunu tanımlayan "Parmak İzi" Moleküler Etkileşim Örüntüleri

Doç. Dr. Tunca Doğan, Hacettepe Üniversitesi

Protein Veri Biliminde Yapay Öğrenme Yaklaşımları

Sözlü Sunum 05

Hücre Bölünmesi Sürecince Fosfo-Proteinlerin Yapısal Özelliklerinin Sistemik Analizi

BSc. Altuğ Kamacıoğlu, Koç Üniversitesi

Sözlü Sunum 06

Tümöre Özgü Alternatif Uç Birleştirme Olayları ve Bunların Etkileşimlere Etkisi

Arş. Gör. Habibe Cansu Demirel, Orta Doğu Teknik Üniversitesi

17:30-18.00

Kariyer Paneli

Oturum Başkanı: Doç. Dr. Nurhan Özlü, *Koç Üniversitesi*

Dr. Jale Şahin, TÜBİTAK

Yaşam Bilimleri Alanında Uluslararası Destekler

19:00-23:00

Kongre Yemeği

Bilimsel Program

29 Şubat 2020
Cumartesi

09:30-11:00

Hücre Biyolojisi ve Proteomik Oturumu

Oturum Başkanı: Prof. Dr. Uygur Tazebay, *Gebze Teknik Üniversitesi*

Doç. Dr. Nuri Öztürk, Gebze Teknik Üniversitesi

Sirkadiyen Saatin İnteraktomu

Prof. Dr. Ayşe Elif Erson Bensan, Orta Doğu Teknik Üniversitesi

mRNA 3'UTR'ler ve Proteoma Olası Etkileri

Sözlü Sunum 07

Beyin Hasarı Sonrası Bmal1 Proteininin Etkilediği Sinyal Yolaklarının Proteomik Analizi

MSc. Elif Özbay, İstanbul Medipol Üniversitesi

Sözlü Sunum 08

Plazma membran ve kortikal aktin ağ arasında köprü kuran

CLIC4 ve CLIC1 başarılı bir sitokinez için gereklidir.

Dr. Nazan Saner, Koç Üniversitesi

11:00-11:30

Kahve Arası

11:30-12:30

Kanser Biyolojisi ve Proteomik Uygulamaları

Oturum Başkanı: Prof. Dr. Hüray İşleklel, *Dokuz Eylül Üniversitesi*

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Çimen, Yeditepe Üniversitesi

Mitokondriyal Proteomiks: Kanserde Kombinasyon Terapileri

Sözlü Sunum 09

Şeffaf Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinomun Kantitatif Proteomik Analizi

MSc. Aydanur Şentürk, Koç Üniversitesi

Sözlü Sunum 10

SerpinB1 Ekspresyonunun Gliomaların Prognozu ve IDH1 Mutasyonu İle İlişkisi

BSc. Ozan Topçu, İstanbul Medipol Üniversitesi

12:30-13:30

Uydu Sempozyumu

Redokslab/ Thermo Scientific

M. Tekin Şenoy

Yeni Orbitrap Modelleri ile Protein Analizlerinde

Üstün Kalitatif ve Kantitatif Performans

redoks
LAB

ThermoFisher
SCIENTIFIC

12:30-13:30

Öğle Arası / Poster Oturumu

Bilimsel Program

**29 Şubat 2020
Cumartesi**

13:30-15:00

Proteomikte Yeni Yaklaşımlar

Oturum Başkanı: Prof.Dr. Aysel Özpınar, *Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi*
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Furtun Uçal, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi

Doku Proteomiğine Bakış: Güncel Durum ve Yeni Yaklaşımlar

MSc. Özge Karayel, Max Planck Biyokimya Enstitüsü

Parkinson Hastalığına Proteomiks Yaklaşımlar: Laboratuvaradan Klinik Uygulamaya

Sözlü Sunum 11

Monoklonal Antikor Yapısındaki Biyobenzer ve Referans İlaçların Stres Koşullarındaki Davranışlarının Kütle Spektrometresi ile İncelenmesi

Dr. Ahmet Emin Atik, Turgut İlaçları A.Ş

Sözlü Sunum 12

İnsan Kan Plazmasında Kalabalık Eden Proteinleri Nasıl Uzaklaştırmalı?

Dr. Melike Dinç, İstanbul Medipol Üniversitesi

15:00-15:30

Kahve Arası

15:30-16:30

Hastalıklar ve Klinik Uygulamalar Oturumu

Oturum Başkanı: Prof. Dr. Halide Akbaş, *Akdeniz Üniversitesi*

Prof. Dr. Hülya Kayserili Karabey, Koç Üniversitesi

Yeni Fenotiplerin Etyopatogenezinin Tanımlanmasında Omiks Verilerinin Rolü

Dr. Öğr. Üyesi Süreyya Özcan Kabasakal, Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Klinik araştırmalarda Güncel Omics Yaklaşımları

16:30-16:45

Kapanış

Doç. Dr. Nurhan Özlü, Koç Üniversitesi

MSc. Busra Akarlar, Koç Üniversitesi

|

SÖZLÜ BİLDİRİ ÖZETLERİ

*Sözlü bildiri özetleri,
bilimsel program akışına göre sıralanmıştır.*

|

S01

Kütle Spektrometresi İle Biyobenzer İlaçlarda Birincil Yapı Karakterizasyonu

Ali İhsan Seçkin, Zeynep Bor Tekdemir, Serim Erdem, Turgay Kaçar, Emine Yılmaz
Arven İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş., Ar-Ge Merkezi

Amaç: Biyobenzer ilaç geliştirme sürecinde, biyobenzerin referans ürüne benzerliği kalite testleri ile gösterilmeli ve ortogonal testler ile doğrulanmalıdır. Biyobenzerler için kalite verisi ne kadar kuvvetli olursa klinik çalışmaların maliyeti de daha düşük olacaktır. Biyobenzerlerin referans ürün ile benzerliği, fizikokimyasal, yapısal ve biyolojik aktivite açısından mutlaka gösterilmelidir. Bu çalışmanın amacı, Ar-Ge çalışmalarının tamamı yurtiçinde yapılmış, 2 farklı biyobenzerin birincil yapılarının referans ile karşılaştırmalı olarak gösterilmesi, glikan yapılarının birden fazla yöntem ile gösterilmesi ve aktivite benzerliğinin birden fazla yöntem ile gösterilmesidir.

Yöntem: Bu çalışmada 18 kDa'lu bir biyobenzer protein ile yaklaşık 150 kDa'luk bir biyobenzer monoklonal antikor kullanılmıştır. Her iki molekül için referans ile biyobenzerlik çalışmaları yapılmıştır. Tam kütle, peptid haritalama, aminoasit sekans doğrulama ve glikan tespiti analizleri Xevo G2 QTof (Waters) cihazı ile yapılmıştır. Antikor/antijen bağlanması Biocore T100 (GE Healthcare) cihazı ve hücre tabanlı analizler ile gösterilmiştir. Ayrıca glikanların tespitine yönelik yurtiçi ve yurtdışı kurumlardan hizmet alımı yapılmış ve kendi sonuçlarımızla karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Geliştirme çalışmaları sonucunda elde edilen iki farklı biyobenzerin referansla olan benzerliği çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir. Yapılan kütle spektrokopisi ile kütle tayini analizlerinde İndirgenmiş ve indirgenmemiş tam kütle değerleri referans ürün ile benzerlik göstermiştir. Geliştirdiğimiz biyobenzer moleküllerin amino asit dizilimi referans ile %100 oranında örtüşmüştür. Glikanların tespitine yönelik birden fazla ortogonal yöntem ile glikanlar tespit edilmiştir. 17 farklı seri referans analizlenmiş ve kalite verileri profili çıkartılmıştır. Elde edilen sonuçlar biyobenzer molekül ile karşılaştırılmış ve referans ve biyobenzer ürün arasındaki benzerlik gösterilmiştir. Biyobenzer ürünün aktivitesi Hücre tabanlı analizler ve bağlanma afinitelerine yönelik yapılan analizler sonucunda belirlenmiş ve geliştirilen biyobenzer moleküller ile referans ürünlerinin benzer olduğu gösterilmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada yurtiçinde geliştirilmiş iki farklı biyobenzer ilacın referans ürünleri ile karşılaştırılması farklı ortogonal güncel yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda geliştirilen biyobenzer ürünlerin fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik aktivitesi açısından referans ürüne benzerliği gösterilmiştir.

S02

Huntington Hastalığı Beyin Proteomunun MALDI-MS Görüntüleme Tekniği ile Araştırılması

Merve Karayel Başar¹, Emel Akgün¹, İrep Uras¹, Nagehan Ersoy Tunalı², Ahmet Tarık Baykal¹

¹ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

² Medeniyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Huntington Hastalığı, Htt genindeki CAG dizi tekrarının artışıyla ortaya çıkan otozomal dominant kalıtım gösteren nörodejeneratif bir hastalıktır. Çeşitli çalışmalarda hastalığın mekanizması genetik araştırmalarla aydınlatılmıştır. MALDI görüntüleme sistemi (MALDI-IMS) yeni ve gelişmekte olan bir proteomik alanıdır. Hastalığa ait proteomik alanda yapılan çalışmaların sayısı az olmakla birlikte MALDI-IMS ile ifadesi değişen proteinlerin gösterimi henüz yapılmamıştır. Bu amaçla, 12 aylık YAC128 transgenik fare modeline ait beyin dokularında gerçekleşen protein değişikliklerinin MALDI-IMS ile gösterimi gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Yöntemler: Üretimi gerçekleştirilen transgenik ve transgenik olmayan (LM) farelerin 12. ayda lokomotor aktivite ve anksiyetelerinin değerlendirilmesi için açık alan testi uygulanmıştır. Davranış deneyleri sonrasında disekte edilen beyin dokularından MALDI-IMS için slayt üzerine kesitler alınmıştır. Ardışık kesitlerle LC-MS/MS için doku lizatları hazırlandıktan sonra analizler gerçekleştirilmiştir. Transgenik (n=6) ve LM (n=6) beyinlerine ait MALDI görüntüleme analizlerinden elde edilen m/z değerleri birbirleri arasında gruplandırıldıktan sonra çeşitli istatistiksel testler (t test, Cohen's d test) uygulanmıştır.

Bulgular: Davranış testleri gerçekleştirilmiş olan 12 aylık farelerde, transgenik ve LM fareler birbirlerinden belirgin şekilde ayırım göstermişlerdir. MALDI-IMS analizinden elde edilen m/z değerleri ile LC-MS/MS analizinden elde edilen proteinler eşleştirilerek transgenik ve LM farelerini birbirinden ayıran proteinler belirlenmiştir.

Sonuç: LC-MS/MS ile tüm kesite ait beyin lizatından protein ifade farklılıkları belirlenirken, MALDI-IMS ile bölgesel protein ifade farklılıkları tespit edilebilmiştir.

Teşekkür: Sunulan veriler 114S906 No'lu TÜBİTAK-Uluslararası COST projesi tarafından desteklenen "Nörodejeneratif Beyin Dokusundaki Protein Değişikliklerinin MALDI-MS Görüntüleme Tekniği ile Belirlenmesi" başlıklı proje kapsamında elde edilmiştir.

S03

Desmin ve LaminB: Farklı Konumlanan İki Proteinin Bağlanma Partnerlerinin Proteomik Analizi

Ecem Kural Mangıt¹, Neşe Ünver², Pervin Dinçer³

¹ Hacettepe Üniversitesi, Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi, Zebra Balığı Ünitesi

² Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Desmin kas kasılmasında görevli, z-diskleri birbirine bağlayan bir ara filament proteini'dir. Lamin B ise çekirdek zarfının iç kısmında bulunan çekirdek zarfı bütünlüğünün korunması, replikasyonun düzenlenmesi gibi görevler üstlenen bir ara filament proteini'dir. Çekirdekte yerleşim gösteren lamin B ve sitoplazmik bir ara filament proteininin olan desminin birlikte çöktüğü daha önce tarafımızca yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı ise etkileşim ağında yer alan diğer proteinlerin yüksek ölçekli kütle spektrometrisi kullanılarak tespit edilmesi ve desmin ve lamin B proteinlerinin görev aldıkları ortak yolların analizi ile etkileşimin fonksiyonunun aydınlatılmasıdır.

Yöntem: Çalışmada zebra balığı (Danio rerio) iskelet kası dokusundan protein izole edilerek desmin ve lamin B proteinlerine yönelik antikolar kullanılmış ve birlikte-immün çöktürme yapılmıştır. İmmünçöktürme lizati poliakrilamid jelde yürütülerek örnekler moleküler ağırlıklarına göre 5 fraksiyona ayrılmıştır. Fragmente edilen jel InGel digestion ile parçalanmıştır. Analizler için Thermo Scientific Q Exactive Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with nano Liquid Chromatography cihazı kullanılmıştır. Analiz sonrası elde edilen ham veri MaxQuant Proteome Discoverer programı kullanılarak işlenmiştir.

Bulgular: Desmin ve lamin B için olası etkileşim partnerleri belirlendikten sonra, elde edilen protein listeleri farklı veri tabanları kullanılarak analiz edilmiştir. Bağlanma partnerlerinin genel olarak aktin-, kalsiyum iyonu-, ATP-bağlayıcı, motor aktivitesi olan ve sitoskelet organizasyonu, iskelet kası ve kardiyosit farklılaşması ile kas kasılmasında görevli proteinler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ilgi çekici bir biçimde transkripsiyonel bir kofaktör ve stres yanıtına cevapta görevli bir protein de listede görülmüştür.

Sonuç: Desmin ve lamin B etkileşim ağında yer alan yeni aday proteinlerin tespit edilmesi ile bu iki proteinin etkileşiminin iskelet kası farklılaşması ve kasılmasında görev alabileceğine dair ilk defa öncül veriler elde edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında fonksiyonel analizlerin yapılmasıyla kas fiziolojisine dair yeni bilgiler elde edilebilecektir. Çalışma Hacettepe Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenmiştir (THD-2018-17210).

S04

Embriyonik Kök Hücrelerde Setd3 Proteiniyle İlişkili Proteinlerin Proteomik Açından Belirlenmesi

Gözde Güven, Ezgi Gül Keskin, Emre Balbaşı, Nihal Terzi Çizmecioğlu
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Amaç: Embriyonik gelişim gen ifadesinin yüksek oranda regüle edildiği bir aşamadır. Gelişimin ilk evrelerinde pluripotentiği sağlayan belirli transkripsiyon faktörleri yüksek miktarda ifade edilirken hücre farklılaşmaya gittiğinde bu genlerin ifadesi yerini farklılaşmaya spesifik genlere bırakır. Gen ifadelerinin bu regülasyonu belirli epigenetik faktörler ile düzenlenir. Projenin ön çalışmasında, fare EKH'lerinin farklılaşmasında görev alan epigenetik faktörlere karşı shRNA taraması yapılmıştır. Bu tarama sonucunda Setd3 proteinini ifade eden gen susturulduğunda fare EKH'lerinin mezoderm ve endoderm tabakalarına farklılaşmadığı görülmüştür. Projenin amacı ise fare EKH'lerde Setd3 ile ilişkili proteinleri proteomik açıdan belirlemektir. Bu sonuç, Setd3 proteininin EKH farklılaşmasındaki rolünü anlamamızda yardımcı olacaktır.

Yöntem: Öncelikle SETD3 proteini ile ilişkili proteinlerin belirlenmesi için biyotinleme enzimi BirA'yi stabil bir biçimde ifade eden hücrelerden (J1BirA) biyotin etiketli Setd3 sentezleyen fare EKH hattı oluşturuldu. Streptavidin yardımı ile çöktürülen biyotinlenmiş Setd3 proteini için kütle spektrometre analizi yapıldı. Elde edilen proteinler için biyoinformatik analiz yapıldı; proteinlerin hücre içindeki konumu, kompleks ve yolak bilgisi, ifade miktarı göz önüne alındı. Seçilen proteinler için J1BirA arka planında Setd3 immunoçökeltmesi yapıldı. Setd3 ile fiziksel etkileşimi bulunan proteinlerin endojenik Setd3 ile etkileşimi için protein G kaplı manyetik boncuklar ile CJ9 ata hücresi arka planında çöktürme yapıldı.

Bulgular: Kütle spektrometre sonucunda elde edilen proteinlerin biyoinformatik analizi sonucunda elimizde Setd3 ile etkileşimi immunoçökeltme ile kontrol edilebilecek 10'a yakın protein bulundu. Streptavidin çöktürmesi sonucunda Brd2 ve Tfcp211 proteinlerinin biyotinlenmiş Setd3 ile fiziksel etkileşimi görüldü. Ardından yapılan protein G immunoçökeltmesinden de aynı sonuçlar elde edilerek endojen Setd3 ile Brd2 ve Tfcp211 proteinlerinin etkileşimi teyit edildi.

Sonuç: Metiltransferaz görevi olan Setd3 proteininin fare EKH'lerinde Brd2 ve Tfcp211 ile fiziksel etkileşimi bulunmuştur. Brd2, yüksek miktarda asetile olmuş kromatin bölgelerine bağlanır, bu nedenle Setd3 ile etkileşimi kromatin regülasyonunda önemli olabilir. Tfcp211 ise fare EKH'lerinin pluripotentiğinin korumasında önemli bir proteindir. Bu etkileşimler kök hücrelerin pluripotenti-k farklılaşma döngüsünde önemli bir rol oynayabilir.

S05

Hücre Bölünmesi Sürecince Fosfo-Proteinlerin Yapısal Özelliklerinin Sistemik Analizi

Altuğ Kamacıoğlu¹, Nurhan Özlü¹, Nurcan Tunçbağ²

¹ Koç Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

² ODTÜ Enformatik Enstitüsü Biyoinformatik Anabilim Dalı Sağlık Bilişimi Bölümü

Amaç: Fosforilasyon, hücre bölünmesi sürecindeki en önemli düzenleyicilerden biridir. Fosforile olabilen proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları, hücre bölünmesini birçok alanda düzenler; örneğin proteinlerin aktivasyonu ile genetik materyalin bölünmesinde, kromozomların bölünmesinde ve sitokinezin gerçekleşmesinde rol alırlar. Şimdiye kadar proteinlerin hücre bölünmesi sırasında dinamik olarak düzenlenen, fosforile veya defosforile olan bölgelerini içeren birçok büyük çaplı kantitatif fosfoproteomik analizler yapılmıştır. Bu analizler sonucunda farklı mitoz evrelerine özgü değişime uğrayan fosforilasyon-bölgeleri ve bu bölgelere özgü kinazlar bulunmuştur. Bunun yanında tek bir protein yapısı ve fosforilasyon-bölgesine odaklanan çalışmalar yapılmış olsa da, sistemik olarak bütün mitoz fosforilasyonlarını kapsayan bir yapısal fosfoproteomik analiz bulunmamaktadır. Bu sebeple bu çalışmada, fosforilasyon-bölgelerinin göreceli solvent erişilebilirliklerine göre fosforilasyonun yapısal mekanizmasına odaklanılmıştır.

Yöntem: Data; mitozda fosforile olan, sitokinezde fosforile olan ve mitozda fosforilden arınan proteinlerin kantitatif fosfoproteomik analizi yapılarak oluşturulmuştur. Bu çalışma sürecinde farklı hücre bölünmesi evrelerindeki yapısal modelleri bulabilmek için önemli ölçüde fosforilasyon değişimi olan fosfo-proteinler, PDB veritabanındaki yapılarına göre araştırılmaktadır.

Bulgular: Fosforilasyon-bölgeleri kararsız yapılarından dolayı, proteinlerin yapısal verilerinde fosforilasyon-bölgeleri az sayıda bulunmuştur. Merkeze dönük fosforilasyon-bölgeleri ender olup çoğunluğu yüzeye yakın yerlerde konumlanmış olarak bulunmuştur. Fosforilasyon-bölgelerinin tamamının kinazların/fosfotazların erişebileceği bölgede olmaları beklenirken; aksine, protein merkezinde de fosforilasyon-bölgeleri tespit edilmiştir. Göreceli fosforilasyon-bölgesi konumu ve bu konumun hücre bölünmesinde görevli olan proteinlerin fosforilasyon ve defosforilasyon oranı arasındaki ilişki, bu bölgelerin kinaz/fosfotaz etkileşim modelini de kapsayacak şekilde araştırılmaktadır.

Sonuç: Fosforilasyon-bölgelerinin proteindeki konumunun, hücre bölünmesinde görevli olan proteinlerin fosforile ve defosforile olmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

S06

Tümöre Özgü Alternatif Uç Birleştirme Olayları ve Bunların Etkileşimlere Etkisi

Habibe Cansu Demirel¹, Nurcan Tunçbağ²

¹ Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Enformatik Enstitüsü, Sağlık Bilişimi Anabilim Dalı, Tıp Bilişimi Bölümü

² Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Enformatik Enstitüsü, Sağlık Bilişimi Anabilim Dalı

Amaç: Alternatif uç birleştirme bir genden, farklı yapılara sahip proteinlerin üretilmesine imkân verir. Etkileşim ağları açısından bakıldığında bu yapısal değişiklikler yeni etkileşimlerin kazanılmasına veya var olan etkileşimlerin kaybedilmesine yol açabilir. Alternatif uç birleştirme olaylarındaki değişimler kanser de dahil olmak üzere farklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada amacımız bu olayların protein yapısında meydana getirdiği değişiklikleri ve gen anlatım seviyelerini kullanarak her bir hastaya özgü tümör mekanizmasını daha iyi temsil eden etkileşim ağları oluşturmaktır.

Yöntem: Bu çalışmada, TCGA'den elde ettiğimiz 400 meme kanseri ve 112 sağlıklı doku RNA-seq verisini kullanarak tümör örneklerinde artmış ekspresyon gösteren transkriptleri bulduk. Bunları UniProt'ta bulunan izoformlarla eşleştirdik. Ayrıca, farklı kaynaklarla bir yapısal interaktom oluşturduk ve izoformlarda bulunan eksik bölgeleri protein etkileşim arayüzleriyle karşılaştırarak potansiyel etkileşim kayıplarını çıkardık. Böylece, her bir örnek için, biri baskın izoformların (terminal seti) yol açtığı etkileşim kayıplarına göre, diğeriye ekspresyona göre filtrelenmiş iki interaktom elde ettik. Sonrasında, Omics Integrator aracını her iki interaktom için aynı terminal setiyle çalıştırarak her bir örnek için iki farklı etkileşim ağı seti elde ettik. Son olarak çıkan iki farklı etkileşim ağını ve oluşturulan tüm etkileşim ağlarını karşılaştırarak hastaları benzerliklerine göre gruplandırabilecek yolak, etkileşim ve protein düzenlerini açığa çıkardık.

Bulgular: Etkileşim kaybeden proteinler üzerinde yapılan zenginleştirme analizinin sonuçlarını kümeleyerek hastalarımızın alt gruplara ayrılabilceğini ve en belirgin gruplarından birinin telomerlerle ilgili gen setlerini içerdiğini gösterdik. Ayrıca, her hastada bu proteinlerin en az birinin kanser yolaklarında bulunduğunu ve kaybedilen protein yüzeylerini protein-ilaç ve protein-DNA arayüzleriyle karşılaştırarak tüm hastalarda benzer dağılım gösteren etkileşimleri çıkardık. Devam eden çalışmamızda kaybedilen DNA-transkripsiyon faktörü etkileşimlerinin genlerin ifadelerinde sebep olduğu değişimleri incelemeyi ve hastaların yaşları, yaşam süreleri gibi bilgileri entegre ederek hastaya özel tedavi yaklaşımlarına fayda sağlayacak gruplandırmalar ve ilişkiler elde etmeyi hedefliyoruz.

Sonuç: Alternatif uç birleştirme olayları etkileşim ağlarında belirgin değişikliklere sebep olabilir ve yeni eklenen veya kaybedilen etkileşimler sayesinde hasta gruplarına özgü yaklaşımlar geliştirilebilir.

S07

Beyin Hasarı Sonrası Bmal1 Proteininin Etkilediği Sinyal Yolaklarının Proteomik Analizi

Elif Özbay¹, Mustafa Çağlar Beker², Ahmet Burak Çağlayan³, Melike Dinç¹, Ertuğrul Kılıç²

¹ İstanbul Medipol Üniversitesi, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER)

² İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı

³ İstanbul Medipol Üniversitesi, Uluslararası Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Sirkadiyen ritmin belirlenmesi ve sürdürülmesinde önemli bir görevli olan Aril Hidrokarbon Reseptör Taşıyıcı-1 (Bmal1)'in özellikle beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojilerinde de bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada lentiviral vektörler vasıtasıyla protein seviyesi artırılmış veya azaltılmış Bmal1'in farelerde gerçekleştirilen beyin felci modeli sonrasında DNA hasarı ve hücre içi sinyal yolakları üzerine olan etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Yöntem: Lentiviral vektörler vasıtasıyla Bmal1 protein seviyesi artırılmış (n=7) veya azaltılmış (n=7) 8-12 haftalık erkek C57BL/6 farelere 30 dakikalık orta serebral arter tıkanması modeliyle beyin felci gerçekleştirilmiştir. İskemi sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan fareler sakrifiye edildikten sonra alınan koronal beyin kesitlerinden TUNEL boyamasıyla apoptotik hücre sayısı belirlenmiştir. Bmal1 protein seviyesindeki artışın veya azalışın beyin felci sonrasındaki sinyal iletim yolakları üzerine olan etkilerinin proteomik incelemesi için; beyin dokularından protein ekstraksiyonu yapılmış, ardından FASP (Filtre yardımcı örnek hazırlama) protokolü ile elde edilen triptik peptitler, yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (LC-MS/MS) şeklinde ACQUITY UPLC M-Class SYNAPT G2-Si (Waters) cihazında analiz edilmiştir. Progenesis QI-P programı kullanılarak işaretlemesiz bağıl kantifikasyon yöntemi ile fark gözlenen diferansiyel proteinler tespit edilmiştir.

Bulgular: Bmal1 protein seviyesi artırılmış farelerde apoptotik hücre sayısının azaldığı, protein seviyesi azaltılmış farelerde apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı gözlenmiştir. Yapılan proteomik analizler vasıtasıyla her bir grup için yaklaşık olarak 1400 protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinler içerisinde Bmal1 proteininin seviyesinin artışına bağlı olarak 20 proteinin, Bmal1 ifadesinin azaltılması sonucu 32 proteinin istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05 ve en az 1.4 kat fark) ölçüde ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir.

Sonuç: Çalışmadan elde edilen sonuçlar, Bmal1 protein seviyesindeki değişiklikler beyin felci sonrasında gelişen hasar mekanizmalarını etkilediği gösterilmiştir. Proje kapsamında elde edilen sonuçların tedavi amaçlı yeni hedef moleküllerin tespitine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmektedir (118S306).

S08

Plazma Membran ve Kortikal Aktin Ağ Arasında Köprü Kuran CLIC4 ve CLIC1 Başarılı Bir Sitokinez İçin Gereklidir

Zeynep Cansu Üretmen Kagıralı, Nazan Saner, Mehmet Akdağ, Erdem Şanal, Beste Senem Değirmenci, Gürkan Mollaoğlu, Nurhan Özlü
Koç Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

CLIC4 ve CLIC1 proteinleri, yapısal olarak glutatyon S-transferaz (GST) ile benzerlik gösteren ve türler arasında iyi korunmuş olan klorid hücre içi kanalları (Chloride Intracellular Channel, CLIC) protein ailesinin üyeleridir. Hücresel faaliyetlerinde kortikal aktin sitoskeleton ile ilişkilendirilen CLIC proteinlerinin sitokinez sırasındaki çalışma mekanizması ilk kez bu çalışmada tanımlanmıştır. CLIC4 proteininin sitokinez başlangıcında RhoA'ya bağlı bir şekilde önce kesim oyuğuna, daha sonra da iç kalıntısına yerleştiği gözlenmiştir. CLIC4 proteininin hücre döngüsü temelli dinamik yerleşiminin, GST ile ilişkili olan amino asitlerinin (C35A ve F37D) mutasyona uğratılmasıyla ortadan kalktığı görülmüştür. CLIC4 proteininin sitokinez sırasındaki yer değişiminde etkin olabileceği düşünülen proteinlerin keşfedilebilmesi için yakınlığa bağlı BioD yöntemi kullanılarak normal ve mutant CLIC4 (C35A) etkileşim ağları sistematik olarak karşılaştırıldı. Hücre bölünmesinde rol oynadığı bilinen ezrin, anillin ve ALIX proteinleri, yapılan proteomik analiz sonucunda normal CLIC4 proteinine özgü etkileşim partnerleri olarak tanımlanmıştır. CLIC4-ezrin etkileşimi incelendiğinde, pozitif bir geribildirim döngüsünün ezrin fosforilasyonu ile CLIC4 proteininin kesim oyuğu yerleşimini düzenlediği gözlenmiştir. CLIC1 ve CLIC4 genlerinin tahribi, hücrelerin kutup korteksinde anormal hücre zarı uzantılarına ve geç sitokinezde gerçekleşen kesim oyuğu regresyonuna, dolayısıyla çok çekirdekli hücre oluşumuna neden olmuştur. Özetle, CLIC proteinleri kortikal stabilitenin sağlanması ve sitokinezin başarılı bir şekilde tamamlanabilmesi için hücre kutup korteksinde ve kesim oyuğundaki plazma membran ve aktin sitoskeleton arasında ezrin ile birlikte köprü görevi görmektedir.

S09

Şeffaf Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinomun Kantitatif Proteomik Analizi

Aydanur Şentürk¹, Ayşe Tuğçe Şahin¹, Ayşe Armutlu², Murat Can Kiremit³, Selçuk Erdem⁴,
Ömer Acar³, Nurhan Özlü¹

¹ Koç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

² Koç Üniversitesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı

³ Koç Üniversitesi Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı

⁴ İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı

Renal hücreli karsinom (Renal Cell Carcinoma, RCC) hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen onkanser türünden biridir. Aynı zamanda ürolojik kanserler arasında en yaygın ve öldürücü olanıdır. Ancak RCC’de, kemoterapi veya radyoterapi gibi geleneksel tedaviler yetersiz kaldığı için direkt cerrahi yöntem ile tümörün çıkarılması yoluna gidilmektedir. Biyobelirteçler kansere neden olan mekanizmaları tanımlamaya ve tümör heterojenliği sorununu aşmaya yardımcı olabilir, fakat şu anda şeffaf hücreli RCC (clear cell RCC) için klinikte kullanılabilecek evrensel biyobelirteçler bulunmamaktadır. Bu çalışmada, RCC hastaları için beş proteinden oluşan bir panel tanımlanmış ve karakterize edilmiştir.

On üç hastadan elde edilen donmuş tümör ve çevresindeki normal doku ile yapılan dimetilasyon bazlı kantitatif proteomik analiz sonucunda toplam 10,160 protein tanımlandı. Normal doku ile karşılaştırıldığında tümör dokusunda toplam 955 protein ifadesinin önemli seviyede değiştiği tespit edildi. Kanserle ilişkili yollar arasında tümör kitlesinde en belirgin artış gösterenler Tip II interferon sinyal yolu, DNA hasar tepkisi, HIF1α sağ kalım sinyal yolu, EPO reseptör sinyal yolu, PI3K-Akt-mTOR sinyal yolu ve integrin aracılı hücre adezyonudur.

Seçilen tümörlerde önemli seviyede artmış olan beş biyobelirteç adayı hem keşif kohorttan alınan tümör ve çevre normal doku örneklerinde hem de daha geniş bağımsız bir hasta kohorttan alınan dokularda immünoyoblotlama, immünohistokimyasal boyama ve kütle spektrometrisi bazlı paralel reaksiyon izleme ile doğrulandı. Ayrıca sonuçlarımız aday protein ifadelerinin intratümör heterojenliğinden etkilenmediğini ve dolayısıyla evrensel biyobelirteç olarak uygun olduklarını göstermektedir. Bir başka önemli bulgu olan biyobelirteçlerin RCC’nin alt tiplerinde farklı ifade olması, bu biyobelirteçlerin patoloji temelli RCC alt tiplerini ayırt etmekteki kullanımını güçlendirecektir.

Ayrıca, ccRCC hastalarının heterojen proteom profillerine göre bilişimsel bir yaklaşım ile üç ayrı grupta kümelendirilmesi öngörüldü. Önerilen gruplar hiyerarşik kümeleme ve temel bileşen analizi (principal component analysis) yapılarak incelendi ve grupların, tümör derecesinden ve evresinden bağımsız bir karakter sergilediği gözlemlendi. Kümeler, mTOR, Nrf2, TGFβ ve PDGFR yolları gibi kanser seyri ile ilişkili sinyal aktivitelere belirgin farklılıklar göstermektedir.

S10

SerpinB1 Ekspresyonunun Gliomaların Prognozu ve IDH1 Mutasyonu ile İlişkisi

Ozan Topcu¹, Damla Uludağ¹, Aslı Çakır², Ahmet Başak³, Nazlı Çakıcı³, Alican Tahta³, Nihal Karakaş⁴

¹ İstanbul Medipol Üniversitesi, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER)

² İstanbul Medipol Üniversitesi, Uluslararası Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

³ İstanbul Medipol Üniversitesi Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı

⁴ İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Glioblastoma, yetişkinlerde sık görülen oldukça agresif ve invazif karakterli malign bir beyin tümürüdür. Glioblastoma (GB) için uygulanan güncel tedavi yöntemi; cerrahi rezeksiyonu takiben adjuvan radyoterapi ve kemoterapidir. Ancak tedavi sonrasında bile hastaların sağ kalım süreleri ortalama 12-15 ay ile sınırlı kalmaktadır. Ayrıca mevcut tedaviye rağmen nükseden GB için yeni biyobelirteçlerin keşfine yönelik stratejik yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Farklı kanserlerde prognostik belirteç olduğu belirtilen SerpinB1, bir serin proteaz inhibitörüdür. Doğuştan gelen immün yanıtlarda, enflamasyonda ve hücresel homeostazda önemli bir rol oynamaktadır. SerpinB1'in çeşitli tümör hücrelerindeki ekspresyonu; kanser hücre göçü ve invazyonu ile bağlantılı bulunmuştur. Ancak gliomanın SerpinB1 ilişkili patofizyolojisi ve hastaya özgü genetik arka planı üzerinde yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu sebep ile çalışmamızda SerpinB1'in glioma hastalarının patolojik belirteçlerinden IDH1 mutasyon durumu ve dolayısıyla hastalığın prognozu ile ilişkisi aydınlatılmak istenmiştir.

Yöntem: Çalışmamızda, SerpinB1 ekspresyonu ile hastalığın progresyonu arasındaki olası bağlantıyı araştırmak için gliomalar, glioblastoma (GB) ve glioblastoma olmayan gliomalar (non-GB) olarak gruplandırılmıştır. Bu gruplardan elde edilen tümör doku izatları kütle spektrometrisi ile analiz edilmiştir. Tümör dokusu örneklerinin SerpinB1 ekspresyonu western blot ve immünohistokimyasal yöntemler ile analiz edilmiş, gruplar arası farklılıklar Student t-test ile hesaplanmıştır.

Bulgular: SerpinB1'in, GB'lerde diğer gliomalara kıyasla daha az ifade edildiği gösterilmiş ve bununla birlikte immünohistokimyasal boyamalar sonucu SerpinB1 negatif olan yüksek grad glioma ve GB'lerin tamamında mutant IDH1 gözlemlenmemiştir. Buna karşılık SerpinB1 pozitif yüksek gradlı gliom olgularının tamamında IDH1 mutasyonu saptanmıştır. Dolayısıyla SerpinB1'in artan ekspresyonun gliomalarda iyi prognozla bağlantılı olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu bulgular ile gliomalarda SerpinB1 ekspresyonunun azalığının kötü prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır. Böylece, SerpinB1'in GB'ler için yeni bir terapötik hedef olabileceği gösterilmiştir.

S11

Monoklonal Antikor Yapısındaki Biyobenzer ve Referans İlaçların Stres Koşullarındaki Davranışlarının Kütle Spektrometresi İle İncelenmesi

Ahmet Emin Atik

Turgut İlaçları A.Ş. Biyoteknoloji Geliştirme Merkezi

Amaç: Monoklonal antikorlar immünglobulin (IgG) glikoprotein yapısına sahip biyoteknolojik ilaçlardır. Referans (orijinatör) ilaçların patent sürelerinin dolması biyobenzer ilaçların ruhsatlandırılıp satışa sunulmasına olanak sağlamıştır. Biyobenzer ilaç daha önce ruhsatlandırılan biyofarmasötik ilaç ile kalite, etkinlik ve güvenlik bakımından benzerlik gösteren ilaçlardır. Stres koşulları altındaki (kimyasal oksidasyon veya yüksek sıcaklık) referans ve biyobenzer ürünlerin peptit haritalama analizleri ile translasyon sonrası modifikasyon (PTM) miktarları karşılaştırılmıştır.

Yöntem: Peptit haritalama analizleri için ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) ile birleştirilmiş kuadrupol-uçuş zamanı (Q-TOF) kütle spektrometresi kullanılmıştır. IgG1 yapısına sahip referans ve biyobenzer ilaç iki farklı stres koşuluna ayrı ayrı maruz bırakılmıştır. Birinci stres koşulu, farklı hidrojen peroksit (H₂O₂) konsantrasyonları ile her iki ürününde 24 saat boyunca inkübe edilmesidir. İkinci stres koşulu olarak da +37 °C ve +50 °C'de 3 gün ve 1 hafta süre inkübasyondur. PTM'lardaki değişiklikleri doğru ve güvenilir bir şekilde hesaplanabilmesi için peptit haritalama analiz metodu optimize edilmiştir.

Bulgular: Peptit haritalama analizleri sırasında glikoproteine tripsin enzimi eklenmeden önce enzimatik parçalanmayı hızlandıracak bir sürfaktant eklenmiştir ve bu kimyasalın yardımıyla tripsin enziminin 30 dakika içinde etkili çalışması sağlanmıştır.

Kimyasal oksidasyon sonucunda glikoproteindeki metiyonin amino asitlerinin (Met, M) oksidasyona uğradığı gözlemlenmiştir. Özellikle glikoproteinlerin Fc bölgesinde bulunan iki metiyonininde (M256 ve M432) 0.5%'lik H₂O₂ stresinde tamamen oksidasyona uğradığı gösterilmiştir. H₂O₂ konsantrasyonundaki artış ile metiyonin oksidasyonu miktarları arasında doğru orantılı bir artış olduğu saptanmıştır.

Sıcaklık stresi ile asparajin amino asitinde (Asn, N) gözlemlenen deamidasyon ve glikoproteinin ağır zincir N-ucu tarafındaki glutamik asitin (Glu, E) halkalaşma reaksiyonu ile piroglutamik asite (pE) dönüşmesine ait PTM'lar belirlenmiştir. Sıcaklık stresi ile özellikle deamidasyon ve piroglutamik asit modifikasyonlarında artışlar gözlemlenmiştir.

Sonuç: Optimize edilen analiz metodu ile hem referans hem de biyobenzer ilaçdaki PTM seviyeleri doğru ve güvenilir bir şekilde tespit edilmiştir. Her iki ilaçdaki PTM seviyelerinin aynı stres koşullarında benzer modifikasyon eğilimleri göstermesi referans ve biyobenzer ilacın üç

S12

İnsan Kan Plazmasında Kalabalık Eden Proteinleri Nasıl Uzaklaştırmalı?

Melike Dinç¹, Gürkan Öztürk²

¹ İstanbul Medipol Üniversitesi REMER

² İstanbul Medipol Üniversitesi Uluslararası Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilimdalı

Amaç: Kan plazması, içerdiği proteinlerin ifadenleme düzeyleri bakımından oldukça heterojen bir dağılım göstermektedir öyle ki miktar olarak fazla bulunan bazı proteinler (HAP), miktarca az bulunan diğer proteinler (LAP) üzerinde maskeleyerek onların tespitini güçleştirmektedir. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için literatürde alternatif metotlar yer alsa da ticari ön hazırlama kit kullanımı sık başvurulan yöntemlerin başında gelir. Bu çalışmada, farklı prensiplerle çalışan iki ürünün; protein sayısı, kullanım kolaylığı ve maliyet gibi unsurlar dikkate alınarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Seçilen ürünlerden HighSelect TOP14 (Thermo), önceden belirlenmiş 14 fazla proteini uzaklaştırmaya dayanırken, diğer ürün Proteominer (BioRad) eşseviyeli peptid ligandları kullanarak protein seviyesinde dengenin oluşmasını sağlar. Deney düzeneği, iki biyolojik tekrar, iki örnek hazırlama tekrarı ve iki teknik tekrar içerir dolayısıyla toplamda 12 adet hplc enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Mikro akışlı Acquity UPLC ve iyon mobilite özellikli Synapt G2-Si Kütle Spektrometresi (Waters) cihazlarından DIA ile toplanan datalar MSE yöntemi ile Proteominer QIP programında biyoinformatik olarak incelenmiştir.

Bulgular: Tek enjeksiyona dayalı analizde, tanımlanmış protein sayısı bakımından Proteominer nispeten daha fazla sayıda sonuç verse de bunun için 200 mikrolitre plazma tüketimi gerçekleşir. Oysa HighSelect TOP14 için orta boyutta kullanıldığında 100, ufak boyutta kullanıldığında 10 mikrolitre plazma yeterlidir.

Sonuç: İnsan kanı, vücudun her yerine erişmesi sebebiyle bireyin sağlık durumuna dair içerdiği bilgi bakımından çok değerli bir biyolojik örnektir. Proteomik araştırmalarının klinik sahadaki uygulamalarında, kan ve özellikle kan ürünlerinden plazma/serum önemli bir yer teşkil eder. Bilhassa iki ya da daha fazla durumun karşılaştırılmasına dayanan diferansiyel proteomik çalışmalarında, belirli bir hastalığa yönelik biyobelirteç görevi gören farklı proteinlerin tespiti için tercih edilir. İki farklı, protein uzaklaştırma kitinin karşılaştırıldığı bu çalışmada Proteominer ile tespit edilen tekrarlı protein sayısının ~30-35% oranında daha yüksek olduğunu gözlemledik ne var ki örnek miktarı azlığı, pratiklik, esnek kullanım seçenekleri ve maliyet gibi unsurlar özellikle numune boyutunun büyük olduğu klinik proteomik projelerinde HighSelect TOP14 ün tercih edilebilirliğini artırabilir.

|

**POSTER
BİLDİRİ
ÖZETLERİ**

|

P01

Gossypium Hirsutum Format Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Bölge Doğunluk Mutasyonu Uygulamaları

Kübra Atik, Emel Ordu

Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Amaç: NAD⁺-bağımlı format dehidrogenazlar (FDH, EC 1.2.1.2), format ve NAD⁺’ın karbondioksit ve NADH’ye dönüşümünü katalize etmektedir. Dolayısıyla kiral olarak saf alkollerin oluşturulması için aldehitlerin ve ketonların enzimatik indirgenmesinde kullanılması gereken ve pahalı bir koenzim olan NADH’nin rejenerasyonunda önemli bir potansiyele sahiptir. NAD⁺ - bağımlı format dehidrogenazlarla ilgili literatür incelendiğinde FDH ile ilgili çalışmaların mikroorganizmalar üzerinde yoğunlaştığı, bitki kaynaklı FDH’lerin biyoteknolojik kullanılabilirliğinin değerlendirilmesinde önemli bir boşluk olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda pamuk bitkisinden izole edilerek E.coli konakçı hücresinde rekombinant olarak ekspresyonu yapılmış olan Gossypium hirsutum FDH (GhFDH) enziminin NAD(P)H rejenerasyonu ya da karbondioksit redüksiyonu gibi biyoteknolojik uygulamalarda kullanılma potansiyelinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, koenzim spesifitesini geliştirmek üzere Arabidopsis thaliana FDH enziminin üç boyutlu yapısına dayalı olarak oluşturulan homoloji model üzerinde koenzim bağlanma spesifitesinden sorumlu bölge tespit edilerek doğunluk mutasyonu uygulanması yapılmıştır.

Yöntem: Bölge doğunluk mutasyonu ile hedef bölgeye uygun dejenere primerler kullanılarak PCR yoluyla akıllı mutant kütüphane oluşturulmuştur. Aktivite taramasıyla başarılı mutantlar seçilmiş ve seçilen mutantların overekspresyonu gerçekleştirilerek yüksek saflıkta proteinler elde edilmiştir.

Bulgular: Mutant GhFDH’nin overekspresyonunun ardından SDS-PAGE yöntemi ile mutant proteinin >%95 oranında saflaştırılabildiği tespit edilmiştir. Aktivite taramaları sonucu belirlenen bazı mutantların yabanıl tip GhFDH’ye göre daha yüksek aktivite değerleri gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç: Mutant GhFDH enzimlerinin aktivite ve stabilite karakterizasyonu çalışmaları devam etmektedir. Elde edilecek mutantların koenzim spesifitelerinin geliştirilmiş olması beklenmektedir.

Bu çalışma Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmektedir: Proje Numarası: FYL-2020-3787.

P02

Metagenomik Yaklaşımla Elde Edilen Endoglukanaz Enziminin Karakterizasyonu

Furkan Abdullah Çalış, Hasan Demirci, Günseli Kurt-Gür, Emel Ordu
Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Amaç: Küresel biyoyakıt üretimi oldukça büyük bir sektör haline gelmişse de üretim sürecinde halen teknolojik tıkanıklıklar mevcuttur. Biyoetanol üretim sürecinde fermentasyon işleminden önce, selüloz ve hemiselüloz gibi bitki polisakkaritlerinin hidrolize edilerek pentoz, heksoz gibi fermente edilebilir monosakkaritlere dönüştürülmesi bitkisel biyokütlenin biyoetanole dönüştürülebilmesinde en kritik adımı oluşturmaktadır. Dolayısıyla, dünya çapında biyoetanol üretim rakamları da gözönüne alındığında endüstriyel biyoetanol üretim sürecinde lignoselülozik biyokütkenin biyodegradasyonunu arttırmak üzere bitkisel materyalin etkin bir şekilde hidrolizini sağlayan ve endüstriyel üretim koşullarına dayanıklı yeni enzimlerin araştırılmasına ve geliştirilmesine dünya çapında ihtiyaç duyulmaktadır. Selülozun biyodegradasyonu için 3 farklı selüloz enziminin birleşimi gereklidir. Bunlar selüloz zincirindeki internal bölgelere etki eden endoglukanazlar (EC 3.2.1.4), uçlara etki eden eksoglukanazlar (EC 3.2.1.91) ve çözünebilir sellodekstrin ve sellobiyozu glukozu hidrolize eden β -glukosidazlar (EC 3.2.1.21) dir. Çalışmamızda CopyControl™ Fosmid Library Production Kit kullanılarak hazırlanan kompost toprak metagenomik kütüphanesinden tespit edilerek klonlanan ve ekspresyon için pQE-2 vektörüne aktarılan prokaryotik bir endoglukanaz enzimin karakterizasyonu amaçlanmaktadır.

Yöntem: Metagenomik kütüphane aktivite taramaları sonucu selüloz aktivitesi gösterdiği tespit edilen fosmid klonu kalıp olarak kullanılarak uygun primerler vasıtasıyla yeni endoglukanaz geni pJET vektörüne klonlandı. Dizi analizi ile tam nükleik asit dizisi belirlenen gen ekspresyon için pQE-2 vektörüne aktarıldı ve Dh5 α E.coli hücrelerine transformasyon yapıldı. Uygun şartlarda sıvı kültürde büyütülen hücrelerin SDS –PAGE ile ekspresyon seviyelerine bakıldı.

Bulgular: SDS- PAGE sonucu overekspresyon görülen hücreler saflaştırma ve karakterizasyon analizleri için daha büyük ölçekte kültüre alınarak çoğaltılmakta ve aktivite analizleri devam etmektedir.

Sonuç: Metagenomik yaklaşımla biyoetanol üretiminde bitkisel lignoselülitik biyokütleli parçalayabilecek endüstriyel üretim koşullarına dayanıklı yeni bir rekombinant endoglukanaz enzimi karakterize edilmiş olacaktır. Enzim karakterizasyonu çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışma Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2013-01-07-KAP02 Proje Numarası ile desteklenmiştir.

P03

Halofilik Bir *Candida* Türünden NAD(P)⁺-Bağımlı Format Dehidrogenaz Klonlanması

Özge Başsaraç, Günseli Kurt-Gür, Emel Ordu

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Amaç: Format dehidrogenazlar (FDH, EC 1.2.1.2) metilotrofik mikroorganizmalar ve yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan enzimlerdir. NAD(P)⁺-bağımlı ve NAD(P)⁺-bağımsız olmak üzere başlıca iki FDH enzim grubu bulunmaktadır. NAD(P)⁺-bağımsız FDH'ler yüksek CO₂ indirgeyici aktiviteye sahiptir fakat tungsten ya da molibden gibi metal iyonları, demir-sülfür grupları, selenosistein gibi yüksek derecede oksijenlenebilen katalitik komponentler içermelerinden dolayı endüstriyel uygulamalar için uygun değildir. Bu nedenle son dönemde CO₂ indirgeme sistemlerinde, hem atmosferik CO₂ seviyesinin düşürülmesi, hem de hidrojen enerjisi depolama sistemleri araştırmalarında, NAD(P)⁺-bağımlı FDH'ler tercih edilmektedir. NAD(P)⁺-bağımlı FDH'ler aynı zamanda formatın CO₂'e oksidasyonu sırasında NAD(P)⁺ koenzimini kullanarak NAD(P)H'e indirgemektedir. Böylece, hem CO₂ indirgeme sistemlerinin geliştirilmesindeki hem de kiral moleküllerin optikçe saf olarak sentezlenmesi esnasında kullanılan NAD(P)H koenziminin yeniden eldesindeki önemi iki katına çıkmaktadır. Doğal FDH'lerin endüstriyel üretimin zorlu koşullarında etkili bir biçimde kullanılabilmesi için bazı yönleri yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle bu zorlu koşullarda daha aktif ve dayanıklı olabilecek ekstrem ortamlardan yeni FDH enzimlerinin kizolasyonu ve rekombinant ekspresyonu önemlidir.

Yöntem: Bu çalışmada laboratuvarımızda halofilik bir ortamdan izole edilmiş ve bir *Candida* türü olduğu tespit edilmiş mikroorganizmadan format dehidrogenaz enzimini kodlayan gen bölgesinin izolasyonu ve pQE-2 ekspresyon vektöründe ekspresyonunun yapılması amaçlanmaktadır. Korunmuş bölgelerine göre dizayn edilen primerler kullanılarak PCR vasıtasıyla genomdan izole edilen gen ile pGEmt vektörüne klonlanmıştır.

Bulgular: Sanger dizi analizi ile pGEmt vektörüne klonlandığı doğrulanan gen bölgesi ekspresyon için uygun primerler kullanılarak çoğaltılmış ve pQE-2 vektörüne aktarılmıştır. Ligasyon ürünü *E. coli* Dh5alfa hücrelerine transforme edilmiştir. Pozitif klonların taranması devam etmektedir. Ardından ekspresyon ve aktivite çalışmalarına geçilecektir.

Sonuç: Halofilik bir mikroorganizmadan izole edilerek rekombinant olarak eksprese edilen bu yeni FDH enziminin farklı endüstriyel üretim koşullarında gerekli olan düşük pH ve yüksek sıcaklık altında daha yüksek aktiviteye ve kararlılığa sahip olması beklenmektedir.

P04

Rekombinant MetE Alerjeninin IgE Bağlanma Aktivitesi ve In Siliko Epitop Tahmini

Yunus Aksüt¹, Nazlı Arda²

¹ İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

² İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Amaç: Polenler, alerjik hastalıkların ortaya çıkmasındaki en önemli aeroalerjenler arasında sayılmaktadır. Günümüzde polen alerjisinin tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere rekombinant alerjenler üretilmektedir. Ayrıca alerjene spesifik immünoterapi stratejilerinden biri de alerjenlerin B ve T hücre epitoplarının aydınlatılmasıdır. Bu çalışma, daha önce *Morus alba* L. (akdut) poleninde bulunan ve rekombinant olarak ürettiğimiz kobalamin bağımsız metiyonin sentaz (metE) alerjeninin alerjik hastalardaki spesifik IgE duyarlılığının gösterilmesini ve in siliko temelli B ve T hücre epitoplarının belirlenmesini amaçlamıştır.

Yöntem: Rekombinant metE'nin spesifik IgE duyarlılığının gösterilmesi için hasta serumları ile Western blot analizi yapıldı. MetE proteinin B hücre epitoplarını belirlemek için BepiPred 2.0 ve Bioinformatics Predicted Antigenic Peptides (BPAP) sistemleri kullanıldı. T hücre epitoplarını belirlemek için ise NetMHCIIpan-3.2 ve NetMHCII 2.3 in siliko araçları kullanılarak analiz yapıldı.

Bulgular: Rekombinant metE'ye, 11 hastanın spesifik IgE duyarlılığı gösterdiği belirlendi. MetE proteinin BepiPred 2.0 ve BPAP araçlarına göre olası 5 B hücre epitopu belirlendi. NetMHCIIpan-3.2 ve NetMHCII 2.3 in siliko araçları ile yapılan analiz sonucunda 7 tane T hücre epitopu tahmin edildi.

Sonuç: Sonuçlarımız, rekombinant metE'nin doğal metE gibi hastalarda spesifik IgE duyarlılığına neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca in siliko araçlar ile elde ettiğimiz B ve T hücre epitopları alerjene spesifik immünoterapi için aday epitop dizileridir.

P06

Derin Öğrenme İle Meme Kanseri Alt Sınıflarının Proteomik Verilerine Dayalı Olarak Tahmini

Şeyma Yaşar, Cemil Çolak, Saim Yoloğlu

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilimdalı

Amaç: Meme kanseri, kadınlarda en sık rastlanan kanser türüdür. Tanı ve tedavide yeni gelişmelerin artmasına rağmen, günümüzde hala önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Proteinlere ilişkin ilgili bilgileri topluca ele alan proteomik, son zamanlarda üzerinde durulan önemli çalışma alanlarından. Derin öğrenme, mevcut veriler üzerinde çok sayıda katmanlı yapay sinir ağı ile model oluşturarak, yeni veriler için özelliklerin öğrenimi yardımıyla tahmin yapmaya imkân sağlayan bir yapay zekâ yaklaşımıdır. Bu çalışmanın amacı, proteomik verileri kullanılarak, meme kanserinin moleküler alt tiplerini (Bazal benzeri, HER2 pozitif, Luminal A, Luminal B) tasarlanan derin öğrenme algoritması ile sınıflandırmaktır.

Yöntem: Bu çalışmada kullanılan veri seti, Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (NCI/NIH) tarafından, 77 meme kanseri örneğinin yayınlanmış Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) proteom profillemesinden oluşmaktadır. Verilerdeki eksik değerler, ortalamaya dayalı kayıp değer atama yöntemi ile tamamlanmıştır. Değişken seçiminde “Lasso Regresyon Modeli” kullanılmış ve 10 kat çapraz geçerlilik yöntemi ile 100 kez tekrara bağlandıktan sonra modele 15 defadan fazla alınan proteinler çalışmaya dahil edilmiştir. Son olarak meme kanserinin moleküler alt tiplerini sınıflamada derin öğrenme algoritması kullanılmıştır. Elde edilen sınıflandırma bulguları, doğruluk, F-skor, Matthews Korelasyon Katsayısı (MCC) ve G-ortalama performans metrikleri ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Önerilen modelin meme kanserini sınıflandırmadaki genel doğruluk oranı %91.53 olarak bulunmuştur. Bu modelin meme kanserinin moleküler alt tiplerini sınıflandırma performansları sırasıyla; Bazal benzeri için doğruluk %96.43, F-skor %93.33, MCC %91.29, G-ortalama %93.54, HER2 pozitif için doğruluk %94.74, F-skor %84.21, MCC %81.23, G-ortalama %92.30, Luminal A için doğruluk %98.18, F-skor %96.97, MCC %95.76, G-ortalama %98.71 ve Luminal B için doğruluk %93.10, F-skor %88.89, MCC %83.89, G-ortalama %91.89 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Derin öğrenme algoritması kullanılarak tasarlanan modelin, meme kanserinin moleküler alt tiplerini sınıflandırmada oldukça iyi performansa sahip olduğu belirlenmiştir. İlerleyen çalışmalarda farklı derin öğrenme mimarileri, meme kanserinin moleküler alt tiplerini daha yüksek doğrulukla sınıflandırılmasında kullanılabilir.

P07

Hücre Döngüsü Yolağı İle İlişkili Genlerin Biyoinformatik Analiz İle Over Kanserinde Belirlenmesi Kütle Spektrometresi İle Biyobenzer İlaçlarda Birincil Yapı Karakterizasyonu

Özlem Timirci Kahraman¹, Güldal İnal Gültekin², Esin Bayralı¹, Murat İşbilen³, Saliha Durmuş³, Tunahan Çakır³, İlhan Yaylım¹, Turgay İsbir⁴

¹ İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

² İstanbul Okan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı

³ Gebze Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

⁴ Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Bu çalışmada biyoinformatik analiz ile erken ve ileri evre over kanseri ile ilişkili hücre döngüsü yolağının tanımlanması, bu yolakta farklı eksprese edilen genlerin belirlenmesi ve bu genlerin prognostik değerlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Erken ve ileri evre over kanseri örneklerini içeren mikroarray veri setlerinden “GSE6008ve GSE14764” deney seti olarak,“GSE23603” ise validasyon seti olarak ArrayExpress veri tabanından alınmıştır. Normalizasyonun ardından, farklı eksprese edilen genler (DEG) R yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir. DEG’lerin gen seti zenginleştirme analizinde (gen ontolojisi ve yolak analizi) DAVID veri tabanı, protein-protein etkileşim (PPI) analizinde ise STRING veri tabanı kullanılmıştır.

Bulgular: ArrayExpress veritabanından alınan 3 verisetinde 66 upregüle ve 40 downregüle olmak üzere 106 ortak DEG tespit edilmiştir. Gen ontolojisi analizi sonucunda DEG’lerin 21 biyolojik proses, 10 moleküler fonksiyon ve 12 hücresel bileşen grubu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. KEGG yolak analizi sonucunda ise DEG’lerin hücre döngüsü yolağında içeren 4 farklı yolak ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca protein-protein etkileşim analizi sonrası networklere bakıldığında,hücre döngüsü yolağında farklı eksprese olan 4 genden (RAD21,CHEK1,TFDP2,YWHAZ) özellikle CHEK1’in merkezi bir role sahip olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Hücre döngüsü yolağı ile ilişkili bu genlerin ileri evre over kanserinin tanı ve tedavisinde prediktif bir biyobelirteç ve terapötik bir ajan olabileceği düşünülmektedir. Tanımlanan genlerin fonksiyonunu doğrulamak için biyolojik deney gereksinimine ihtiyaç vardır.

P08

Pan-Kanser Datasındaki Saklı Sürücü Mutasyonların Saptanması

Bengi Ruken Yavuz, Nurcan Tunçbağ
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Amaç: Kanser genomisinde sürücü (driver) ve yolcu (passenger) mutasyonlara ek olarak kanser hücresine tek başınayken büyüme avantajı sağlamayan, ancak yeni gelişen bir mutasyonla birlikte bir kanser hücresi fenotipi oluşmasına neden olan mutasyonlar olarak tanımlanan saklı (latent) sürücü mutasyonları tespit etmeyi amaçlıyoruz.

Yöntem: TCGA, GENIE ve MSK Pan-Kanser datalarında, aynı veya farklı proteinler üzerinde tekrar eden anlamlı mutasyon ikililerini Fisher Exact Test kullanarak belirliyoruz. Bu anlamlı ikilileri 3D protein yapısına eşleyerek, birlikte hareket etme eğilimi gösteren ikililerin protein konformasyonu, fonksiyonu ve etkileşimleri üzerindeki etkilerini değerlendiriyoruz. Ayrıca bu ikili mutasyonları taşıyan ve taşımayan hastaların yaşam sürelerini karşılaştırıp, tümör ilerleyişini hızlandıran veya yavaşlatan ikilileri belirliyoruz. Bunlara ilave olarak hücre hatlarından faydalanarak ikili mutasyonların ilaç direnci veya hassasiyetini nasıl etkilediğini buluyoruz. Son olarak da mutasyon ikilileri arasındaki epistatik ilişkileri tespit etmek amacıyla kanser yollarında bu ikililerin yakınlıklarını buluyoruz.

Bulgular: Yaklaşık olarak 1000 tane anlamlı mutasyon ikilisi tespit ettik. Bunların yaklaşık 850 tanesi ayrışık, 150 tanesi birlikte bulunma eğiliminde. Bazı ayrışık ikililere sahip hücre hatlarında ilaç direncinde azalma olduğunu, bazılarında da ilaç hassasiyetinin ortadan kalktığını tespit ettik. Ayrıca belli kanser türlerinde ikili mutasyonlara sahip olan hastaların yaşam sürelerinin önemli ölçüde kıaldığını gözlemledik. Çalışmamızın bundan sonraki kısmında bulmuş olduğumuz bütün anlamlı ikililerin proteinin yapısı ve etkileşimleri üzerindeki etkilerini hasta odaklı olarak incelemeyi planlıyoruz.

P09

Oligodendrosit ve İmmün Hücreleri Arasında Etkileşen Proteinlerin Belirlenmesi

Kübra Yurduseven¹, Melis Serdar², Işıl Kurnaz³, Bilal Ersen Kerman⁴

¹ Gebze Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü

² İstanbul Medipol Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü

³ Gebze Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü

⁴ İstanbul Medipol Üniversitesi, Uluslararası Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Miyelin kılıfı nöronların etkili bilgi aktarımını sağlar ve nöronların fonksiyonu ve hayatta kalması için gereklidir. Multipl sklerozda (MS) immün sistemin miyelin hasarına (demyelinizasyon) neden olması ile nöronların sinyal iletimi aksar ve kalıcı fonksiyonel bozukluklar ortaya çıkar. MS'te etkili sinyal yollarını belirlemek amacıyla oligodendrosit-immün hücreleri arasındaki önemli protein-protein etkileşimlerini (PPI'ları) tanımladık.

Yöntem: Yayınlanmış proteome datalarının toplanıp birleştirilip MS hastalığında önemli olabilecek proteinlerin analiz edilmesi. Ve bunların içinden etkileşimde olabilecek proteinlerin belirlenmesi için hücre dışında bulunanların dolayısıyla yüzey proteinlerinin ve membran proteinlerinin ve hücre dışına salınan proteinlerin seçilmesi.

Yayınlanmış veriler toplanarak oligodendrosit, makrofaj ve T hücrelerinin proteom veritabanlarını oluşturduk. Python programlama dilinde yazdığımız bir program ile UniProt veritabanından bu proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarını belirledik. Diğer hücrelerin proteinleri ile etkileşebilecek konumda olan, membran ve salgı proteinlerini seçtik. BioGRID Homo sapiens protein etkileşim veritabanını kullanarak, oligodendrosit proteinleri ile etkileşen tüm proteinleri analiz ettik. Bu etkileşim açısından makrofaj ve T hücrelerine ait olan membran ve salgı proteinlerini çektik. Bu şekilde oligodendrosit-makrofaj ve oligodendrosit-T hücreli protein-protein interaksiyon (PPI) veritabanlarını elde ettik.

Bulgu: 2217 oligodendrosit proteini arasından 397, 250 makrofaj proteini arasından 76 ve 1505 T hücreli proteini arasından 288 membran ve salgı proteini belirledik. Oligodendrosit - makrofaj arasında bulunan 585 PPI, 57 makrofaj proteini ve 155 oligodendrosit proteini arasında gerçekleşmektedir. Oligodendrosit - T hücreli arasında bulunan 1828 PPI, 228 T hücreli ve 273 oligodendrosit proteini arasında gerçekleşmektedir.

Sonuç: Hücreler arası PPI analizi, MS gibi çok-hücre-tipli hastalıkların incelenmesi için umut verici bir yöntem olmuştur.

P10

İdrarda Globotriaosilsfingozin (Lizo-Gb3) Düzeylerinin Sıvı Kromatografi - Kütle Spektrometresi ile Belirlenmesi

Bilge Karatoy Erdem, Halide Akbaş
Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Amaç: Fabry hastalığı, α -galaktosidaz A enzim aktivitesinin eksikliğinden kaynaklanan kalıtsal bir lizozomal depo hastalığıdır. Enzimatik eksiklik, nötral sfingolipitlerin bozulmuş katabolizmasına ve çeşitli dokularda birikmesine neden olur. Enzim eksikliği nedeniyle idrarda artışı gözlenen iki güncel biyobelirteç bildirilmektedir. Bunlar; globotriaosilsferamid (Gb3) ve Globotriaosilsfingozin (Lizo-Gb3)'dir. Bu çalışmada, idrar Lizo-Gb3 analizi için sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile hızlı ve non-invaziv bir yöntem geliştirilmesi amaçlandı.

Yöntem: Standart olarak lyso-seramid triheksosid; Lizo-Gb3 (Matreya 1520), internal standart olarak N-omega-CD3-Oktadekanoil-seramid triheksosid; C18-CD3-Gb3 (Matreya 1537) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için farklı konsantrasyonlarda standart içeren çözeltiler hazırlandı. İdrar örnekleri ve kalibratörlere internal standart çözeltisi eklenerek katyonik kartuşlarla katı faz ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Eluatlar azot gazı altında kurutuldu ve % 0.1 formik asit içeren asetonitril:su karışımı ile yeniden çözüldü. LC-MS/MS'de (Shimadzu-8040) pozitif elektrosprey iyonizasyonu ile multipl reaksiyon izleme modunda analizler yapıldı.

Bulgular: Gün içi ve günler arası analizin kesinlik ve doğruluk değerleri sırasıyla % 10'un altında ve % 80 ila % 100 arasındaydı. Kalibrasyon eğrisi çizildi ve Lizo-Gb3 için r-kare (r^2) değeri 0,988 olarak bulundu. Analiz süresi 4 dk olarak belirlendi.

Sonuç: Bu yöntem idrar örneklerinde Lizo-Gb3 analizi için güvenilir bir alternatiftir. İdrar Gb3 düzeyleri ile birlikte değerlendirilerek Fabry hastalığının tanı ve izleminde yararlı olabilir. Hasta popülasyonu ile yapılacak geniş ölçekli araştırmalara ihtiyaç vardır.

P11

İdrar Globotriaosilseramid (Gb3) Düzeylerinin Sıvı Kromatografi – Ardışık Kütle Spektrometresi ile Ölçümü

Bilge Karatoy Erdem, Halide Akbaş
Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Amaç: Fabry hastalığı, glikosfingolipid yıkımında görevli α -galaktosidaz A enziminin kalıtsal eksikliğinden kaynaklanan X'e bağlı bir lizozomal depo hastalığıdır. Fabry hastalarının tanı, izlem ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde yeni bir biyobelirteç olarak globotriaosilseramid (Gb3) önerilmektedir. Bu çalışmada, filtre kağıdına alınmış idrar örneklerinde Gb3 düzeylerinin, sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi ile hızlı ve non-invaziv olarak analizi amaçlanmıştır.

Yöntem: Filtre kağıtlarına taze ve dondurulmuş idrar örnekleri ve internal standart (N-omega-CD3-oktadekanoil-seramid triheksosid; C18-CD3-Gb3) eklenerek kurutuldu. Eş zamanlı olarak farklı konsantrasyonlarda Gb3 standart çözeltileri hazırlandı. Metanol ile yapılan ekstraksiyon, örnek homojenizasyonu ve kütle spektrometrik optimizasyon işlemleri sonrasında standart eğri oluşturuldu ve örneklerdeki Gb3 düzeyleri, LC-MS/MS'de (Shimadzu-8040), pozitif elektrosprey iyonizasyonda, multipl reaksiyon izleme modu kullanılarak analiz edildi.

Bulgular: Gün içi ve günler arası analizin kesinlik ve doğruluk değerleri sırasıyla % 10'un altında ve % 80 ila % 100 arasındaydı. 6 farklı konsantrasyonda standart ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri en az 3 kez tekrarlanarak Gb3 için r2 değeri 0,998 bulundu. Analiz süresi 4 dk olarak belirlendi.

Sonuç: Çalışma sonuçlarımız, çoklu idrar örneklerinde Gb3 analizi için güvenilir, hızlı ve pratik bir alternatif yaratmaktadır. Ayrıca örnek alımı, saklanması ve transportu konusunda da kolaylık sağlayacaktır. LC-MS/MS ile çok sayıda örnek, kısa sürede yapılacak Gb3 analizi, hem Fabry hastalarının tanı ve izleminde hem de yenidoğan taramalarında etkin bir şekilde kullanılabilir.

P12

Meme Kanseri Doku Steroidogenez Yolak Profilleri ve Klinikopatolojik Bulgularla Karşılaştırılması

Mete Bora Tüzüner¹, Gonca Candan², Jülide Coşkun¹, Begüm Ceviz², Tülin Öztürk³, Ahmet Tarık Baykal¹, Hülya Yılmaz Aydoğan², Oğuz Öztürk²

¹ Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarı, Ar-Ge Merkezi

² İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

³ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

Amaç: Steroid hormonlar ve meme kanseri arasındaki ilişki on yıllardan beri bilinmektedir. Çalışmamız meme kanseri hastalarından alınan taze tümör ve çevre doku örneklerindeki steroid seviyelerinin ve bu steroidlerin sentezlenmesinde rol alan enzimlerin ekspresyonunun çalışılmasını hedeflemektedir. Lokal steroid sentez yolağının klinik parametrelerle birlikte incelenerek meme kanseri hastalarının tanı, teşhis ve tedavi stratejileri için destekleyici/ tamamlayıcı modeller geliştirmeyi amaçlamaktadır.

Yöntem: Meme kanseri hastalarından bir tümör ve tümöre yakın bir çevre meme doku örneği alındı. Hastalar klinikopatolojik özelliklerine göre gruplara ayrıldı. Kontrol grubu olarak, meme küçültme ameliyatı olan ve herhangi bir kanser geçmişi olmadığı bilinen, menopoz öncesi hastaların rezeksiyon materyalleri kullanıldı. Sıvı-sıvı ekstraksiyon ve çöktürme temelli yöntemler denenerek dokulardan steroid ekstraksiyon yöntemi optimize edildi. Steroidogenez yolağındaki 8 hedef metabolitin ölçümü APCI yoluyla, MRM modu kullanılarak üçlü-kuadrupol ardışık kütle spektrometresi üzerinde gerçekleştirildi. İlgili steroid sentez yolağı enzimlerinin hasta ve kontrol gruplarındaki ekspresyonları western blot analizleriyle belirlendi.

Bulgular: Hekzan-etil asetat yöntemi ile geliştirilen yöntemin ekstraksiyonda daha etkili olduğu görülmüştür. Hedef metabolit düzeyleri tümör, çevre ve sağlıklı dokularda karşılaştırmalı olarak gözlenmiştir. Steroid 5-alfa redüktaz enzim ekspresyonu için yaptığımız ön çalışmaya ait bulgular tümör dokusunda 5 kat artış göstermektedir.

Sonuç: Daha önce postmenapozal invaziv duktal meme kanseri hastalarına ait taze meme tümör ve çevre dokusunda gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar meme tümörü mikroçevresinde gerçekleşen ve kötü huylu meme kanseri epitel hücrelerinin proliferasyonunda temel bir rol üstlenen steroid hormon 17-beta östradiolün biyosentezinin CYP19A1 gen ifadesi ve lokal aromatazasyon aktivitesi tarafından etkilendiğini göstermiştir. Aromataz enzimi meme kanseri için önemli bir biyobelirteç adaydır ancak tanı ve teşhis açısından tek başına yeterli gözükmemektedir. Büyük resmi görmek için çevre ve tümör dokularının steroid profili ve ilişkili enzim ekspresyonlarının birlikte değerlendirilmesi gerektiği anlaşılmıştır. Steroidogenez yolağının meme kanserinin farklı subtiplerinde nasıl etkilendiğini ve klinikopatolojik verilerle birlikte değerlendirilerek kişisel tedaviyi yönlendirici klinik test

P13

Alzheimer Hastalığı'Nda Periferik Mitokondriyal Disfonksiyonun Proteomik Methodlarla Araştırılması

Sebile Arabacı¹, İrem Kırış¹, Gülsen Babacan Yıldız², Betül Şahin³, Haşmet Hanağası⁴, Ahmet Tarık Baykal¹

¹ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD

² Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji AD

³ Acıbadem Labmed Ar-Ge Merkezi

⁴ İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji AD

Amaç: Alzheimer Hastalığı demans ve bilişsel gerileme ile ölüme sebebiyet veren ve yaşa bağlı olarak en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın mekanizmasının tam olarak bilinmemesinden dolayı tedaviler nöropatolojik durumu değiştirmekte yetersiz kalmaktadır. Yapılan çalışmalar bireydeki patofizyolojik sürecin semptomların açığa çıkmasından daha önce başladığını desteklemektedir. Bireydeki erken patolojik süreçte mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin rol oynadığı gösterilmiştir. Oksidatif stresin, beyin AH ile ilişkili bölgelerini ve periferik bölgelerini etkilediği ayrıca Aβ plaklarından önce oluştuğu gösterilmiştir. Bunun dışında AH'nın immün sistem ve immün sisteme dahil olan periferik kan hücrelerinden de etkilendiği düşünülmektedir. Projemizde mitokondriyal disfonksiyon AH bireylerden alınan kan hücreleri ile (Lenfositlerden; B-hücreleri ve T-hücreleri (CD4, CD8), Granülositlerden; monosit hücreleri) çalışılmaktadır. Proje mitokondriyal disfonksiyonun kan hücrelerindeki hem global hem mitokondriyal proteomu nasıl etkilediğini açıklarken, bu değişimin sebebini de aydınlatılmak için oksidatif stres ölçümü, mitokondriyal disfonksiyon tayini, immünolojik panel ve immün sistemde aktif rolü olan sitokinlerin kantitatif analizini içermektedir. Projemiz periferik mitokondriyal disfonksiyon ve nörodejenerasyon arasındaki ilişkiyi aydınlatmayı amaçlamaktadır.

Geçer ve Yöntem: Hekim gözetiminde 60 adet uygun AH'sı ve kontrol bireylerinden sodyum-heparinli tüplerde 40 ml kan toplanacaktır. Kan FACS Cell Sorting tekniği ile CD4, CD8, CD14 ve CD19 olmak üzere 4 farklı hücre alt grubuna ayrıştırılacaktır. Ayrılmış hücre gruplarında LC-MS/MS temelli proteomik yöntemlerle protein ekspresyon analizi yapılacaktır. Ayrıca hücre gruplarında akış sitometrisi ile membran potansiyeli testleri ile mitokondriyal disfonksiyon tespiti gerçekleştirilecektir. Mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili olarak da reaktif oksijen türlerinin analizi yapılacaktır. Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres immün sistemi tetikleyebileceğinden toplanan kanlardan ayrılan plazmalar ile 20 adet sitokin taraması yapılacaktır.

P14

Alzheimer Hastalığının Teşhisine Yönelik Proteomik Temelli Metot Geliştirme

Zelal Zuhul Kaya¹, Mete Bora Tüzüner², Betül Şahin², Emel Akgün¹, Muhittin Serdar³, İhsan Yozgat⁴, Büşra Köse¹, Ahmet Tarık Baykal³

¹ Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Bölümü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Acıbadem Üniversitesi

² Acıbadem Labmed Laboratuvarları, ARGE Merkezi

³ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Acıbadem Üniversitesi

⁴ Medikal Biyoteknoloji Bölümü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Acıbadem Üniversitesi

Amaç: Alzheimer hastalığı (AD) hafıza kaybına ve diğer düşünme becerilerinin azalmasına yol açarak ilerleyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığının tanınması zorluklarının üstesinden gelmek için yeni biyobelirteçlerin tanımlanması gerekmektedir. Bu nedenle Alzheimer hastalığı tanısını iyileştirebileceği düşünülen yeni biyobelirteç olarak serumdaki total hafif zincir (TLC) monomer ve dimerlerin analizini içeren yeni bir teknik geliştirdik.

Yöntem: Çalışmaya AD (n=98) ve sağlıklı (n=86) olan hastalar katıldı. AD tanısı nörodejenerasyon belirteçleri, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ile ölçülen beyin atrofisini, florodeoksiglukoz (FDG) PET tarafından değerlendirilen azalmış glikoz metabolizmasını ve Tau ve nörofilament ışık (Nfl) gibi hasar gösterebilecek CSF proteinlerindeki artış bulgularına dayanıyordu. Hasta ve sağlıklıların serumundaki total LC seviyesini ölçmek için MALDI-TOF kütle spektrometrisine dayalı bir test geliştirdik. Bu testte, TLC monomer ve dimer için TLC düzeyleri ve κ / λ TLC oranlarının tanımlanabildiği, izotiplendiği ve nicelleştirilebildiği bilgi açısından zengin kütle spektrumları oluşturmak için nanobody immüno-zenginleştirilmesi ile kombinasyon halinde benzersiz moleküler parmak izlerini kullandık.

Bulgular: Çalışmada AD hastalarının serumdaki total κ / λ LC oranları, kontrollere kıyasla anlamlı ilişki göstermiştir (% 95 CI: -1,00505- -0,11495, p=0.017). Serumdaki κ / λ TLC seviyeleri, AD'nin sağlıklılardan ayırtılması için AUC değerini 0.813 olarak verdi. Düşük κ / λ TLC oranları, AD tanısı için potansiyel bir biyobelirteç olabilir.

Sonuç: Önerilen yöntem Alzheimer hastalığı prognozuna önemli ölçüde katkıda bulunabilir. Bu teknik, AD tanısını %62.5 hassasiyet ve % 75.0 özgüllük ile sağlıklılardan ayırarak hastalık durumunu teşhis etmek için yeni bir invaziv olmayan tanımlayıcı test olarak kullanılabilir. Ancak, öncelikle prospektif validasyon gereklidir.

P15

Formalinde Fikse Edilmiş Parafine Gömülü Endoskopik Biyopsi Örneğinin MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi İle Peptit Profilinin Analizine Yönelik Örnek Hazırlama Basamaklarının Optimizasyonu

Büşra Ergün¹, Sinem Öktem Okullu², Arzu Tiftikçi³, Ümit İnce⁴, Aysel Özpinar¹, Yasemin Uçal¹

¹ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

² Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

³ Acıbadem Maslak Hastanesi, Gastroenteroloji

⁴ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Amaç: Formalinde fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) dokular, hasta verileri ile ilişkili olarak retrospektif moleküler araştırmalara olanak tanıdıklarından proteomik çalışmalar için değerlidir. Proteomik tekniklerden matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon (MALDI) uçuş zamanı (TOF) kütle spektrometresi görüntüleme (MSI) yönteminde, kütle spektrometresinden gelen yüksek çözünürlük ve doğruluk ile histolojik bilgi birleştirilmekte olup, analitlerin doku üzerindeki uzamsal dağılımları belirlenmektedir. MALDI-MSI, uzun numune hazırlığına gerek kalmadan doku örneklerini analiz etmek için yüksek kapasiteli olması ve homojenizasyon gerektirmemesinden dolayı diğer proteomik tekniklere göre avantajlıdır. Bu çalışmada, FFPE örneğinin MALDI-MSI ile peptit profilinin analizi için örnek hazırlanmasına yönelik optimizasyon çalışmasının yapılması amaçlanmıştır.

Yöntem: FFPE biyopsi örneğinden MALDI-MSI analizi için mikrotomda 3 µm'lik ve 5 µm'lik kesitler indiyum kalay oksit (ITO) kaplı lamlara alınmıştır. Dokunun hazırlanması için ksilen ve azalan alkol konsantrasyonlarında yıkama işlemi ve ardından 10 mM Tris-HCl (pH 9) ve 10 mM Sitrat (pH 6) tampon çözeltileri olmak üzere iki farklı antijen geri kazanım prosedürü uygulanmıştır. Proteinlerin peptitlere parçalanması için tripsin enzimi kullanılmış ve sonrasında doku %50 asetonitril ve %0.1 trifluoroasetik asit içinde 7 mg/mL α-CHCA ile kaplanmıştır. Dokular, RapifleX MALDI Tissue Typer (Bruker Daltonics) ile analiz edilmiş ve hematoksilin&eoşin ile boyanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde, monoizotopik peptit sayısı, histolojik özelliklerle ilişkili olarak peptit lokalizasyonları ve hiyerarşik kümeleme analizleri (FlexImaging ve SciSLab (Bruker Daltonics)) kullanılmıştır.

Bulgular: Spektrumda, 5 µm'lik kesitte 3 µm'lik kesite göre daha fazla sayıda monoizotopik peptit tespit edilmiştir. 10 mM Sitrat (pH 6) tampon çözeltisi ise peptit sayısı açısından daha iyi sonuç vermiştir. Ancak; hiyerarşik kümeleme analizine göre iki antijen geri kazanım prosedüründe peptit lokalizasyonlarının doku histolojisi ile korelasyon gösterdiği görülmüştür.

Sonuç: MALDI-MSI, gastrointestinal hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli dokularda peptitlerin lokalizasyonunun belirlenmesini sağlamakta ve moleküler profillerinin analizine imkan tanımaktadır. FFPE dokularda formalin fiksasyonundan kaynaklanan metilen çapraz bağlarının

P16

Anne Sütünde Proteomik: Örnek Hazırlamada Optimizasyon

Büşra Yüksel, Yasemin Furtun Uçal, Aysel Özpınar

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Temel Bilimler Bölümü

Amaç: Son yıllarda, anne sütü sağlanamadığında yerini alabilecek süt içeriğinin bulunma çabası ve iyi bir non-invasive örnek olan sütün çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda incelenmesi, anne sütünün araştırmalardaki yerini, proteomik tekniklerinin de gelişmesiyle, giderek arttırmaktadır. Süt örneği araştırmalar için hazırlanırken ilk olarak santrifüj ile içeriğinde farklı yüzlerce proteine sahip Whey, Kazein ve Milk Fat Globular Membrane (MFGM) fraksiyonlarına ayrıştırılmaktadır. Ancak anne sütünün kolay ayrıştırılmayan kazein ve laktozdan zengin yapısı, proteomik çalışmaları için süt proteinlerinin saflaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Özellikle, Label-free-LC-MS/MS çalışmalarında optimize edilmiş süt örneği hazırlama metodlarının sayısı oldukça azdır. Bu nedenle çalışmamızda, anne sütü proteom analizi için örnek hazırlamada DNA kontaminasyonunu önlemede kullanılan, ticari bir nükleaz olan benzonase ve sonikasyon yöntemleri ile kazein presipitasyonu ve laktozun ayrıştırılma yöntemlerini karşılaştırmak ve Whey ve MFGM fraksiyonlarından elde edilen proteinlerin farklılıklarını ortaya koymak hedeflenmektedir.

Yöntem: Çalışmada anne sütünün hazırlığında kullanılan 150 U/ml benzonase ve sonikasyon yöntemleri ile herhangi bir yöntem uygulanmamış örneklerden elde edilen protein konsantrasyonları ve SDS-Page jel görüntüleri karşılaştırılmıştır. 0.06 M CaCl₂ (pH 4.6) ile kazein presipitasyonu ve laktozun diyaliz yöntemi ile ayrıştırılmasıyla elde edilen protein konsantrasyonları ölçülmüştür. Ayrıca, Whey ve MFGM proteinlerinin izolasyonu sonucunda protein konsantrasyonlarındaki ve SDS-Page jel görüntülerindeki farklılıklar karşılaştırılmıştır. Araştırmada örnekler 3 teknik tekrarlar çalışılmıştır.

Bulgular: Benzonase ile elde edilen proteinlerin konsantrasyonun, sonikasyon yöntemine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca SDS-Page'te proteinlerin bant dağılımları benzer iken, bantların kalınlıklarında farklılıklar saptanmıştır. Kazein presipitasyonu ve laktozun uzaklaştırılmasından sonra ise protein konsantrasyonunun azaldığı görülmüştür. Whey fraksiyonundan elde edilen proteinlerin konsantrasyonu MFGM'e göre daha fazla bulunmuştur. Bu fraksiyonlar, farklı proteinlere sahip fraksiyonlar olduklarından SDS-Page jel görüntülerindeki bant dağılımlarının farklı olduğu gözlenmiştir.

Sonuç: Benzonase/Sonikasyon yöntemlerinin DNA kontaminasyonu önlemede etkin olduğu ancak benzonase yönteminin protein saflaştırmada daha verimli olduğu söylenebilir. Ancak, kazein ve laktozun uzaklaştırılması protein varlığını azaltmıştır. Optimizasyon sonucu hazırlanan örneklerin analizi, ilerleyen çalışmalarda LC-MS/MS ile yapılacaktır.

P17

Mukopolisakkaridoz Tip VI Hastalarında ‘Yeni’ Bir Patolojik ARSB Mutasyonu (C.870 C>A, P.Trp290Ter)

Hüseyin Ayhan¹, Veysel Sabri Hançer¹, Murat Büyükdöğün², Anıla Babameto-Laku³

¹ İstinye Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

² İstinye Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

³ Tirana Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Laboratuvarı

Amaç: Mukopolisakkaridoz tip VI (MPS VI) diğer adıyla Maroteaux-Lamy Sendromu, otozomal geçişli lizozomal depo hastalığıdır. Hastalıkta dermatan sülfatın yıkımı için gerekli olan N asetilgalaktozamin -4-sülfataz (Aril Sülfataz B, ASB) enziminin eksikliği ile karakterize bir hastalıktır. ARSB genindeki mutasyondan kaynaklı olan eksiklik, intralizozomal birikimine, bir glikozaminoglikan olan dermatan sülfatın üriner ekskresyonuna neden olmaktadır.

MPS VI’ nın klinik özellikleri değişkenlik göstermekle birlikte genellikle, büyüme geriliği, kalın yüz özellikleri, sert eklem, iskeletsel malformasyonlar, solunum zorlukları, korneal bulanıklaşma, hepatosplenomegal ve kalp anomalileri gözlemlenmektedir.

Diğer lizozomal depo hastalıklarının aksine, mental gelişim çoğunlukla normal olmasına rağmen duyma kaybı gibi gelişimsel gecikmeler bazı bireylerde saptanmıştır. Çalışmamızda bu hastalığa sahip Arnavut kardeşler moleküler ve biyokimyasal yönden incelenerek mutasyon taraması yapılmıştır.

Yöntem: Aile üyelerinin periferik kan örneklerinden (II.4. amniyon sıvısı) izole edilen gDNA örnekleri kullanılarak

ARSB geninin tüm eksonları PCR ile çoğaltılıp Sanger temelli DNA dizileme yöntemi ile analiz edilmiştir.. ASB aktivitesinin analizi, florometrik assay ile saptanmıştır.

Bulgular: c.870 G>A (p.Trp290Ter, p.W290*) için uygulanan in silico analizler (Mutation tester, PolyPhen, SIFT) ‘hastalık nedeni’ sonucunu verdi. Enzim aktivite ölçümleri de bu sonuçları desteklemektedir. Bu nedenle varyant tarafımızdan ‘patolojik mutasyon’ olarak tanımlanmıştır.

Sonuç: Sonuç olarak homozigot c.870 G>A genotipinin enzim aktivitesinin kaybindan sorumlu olduğu gösterildi.

POSTER 3.LÜK ÖDÜLÜ

P18

Alzheimer Hastalarının Nöron Derive Ekzozomlarının Proteomik Analizi

Burak İbrahim Arioz¹, Kemal Uğur Tüfekçi¹, Devrim Yağmur Durur¹, Melis Ölçüm¹, Nurhan Özlü², Görsev Yener³, Sermin Genç¹

¹ İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Merkezi

² Koç Üniversitesi

³ Dokuz Eylül Üniversitesi Nöroloji

Alzheimer hastalığı dünya çapında demansın en yaygın nedeni olan kronik ve progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. Amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar hastalığın bilinen ayırt edici özellikleri olmasına rağmen, bu moleküller sadece ölüm sonrası görüntüleme ile tanıda kullanılabilir. Ekzozomlar, hücre dışı boşluğa salgılanan, hücre-hücre iletişimi dahil olmak üzere sağlıklı ve patolojik koşullarda temel rol oynayan küçük veziküllerdir. Çalışmamızda Alzheimer hastalarından nöron derive ekzozomların protein içeriğini araştırmayı ve Alzheimer hastalığı tanısında kullanılabilecek biyobelirteçler tanımlanması amaçlanmıştır. Alzheimer hastalarının nöron derive ekzozomlarında LC-MS / MS proteomik analizi ile sağlıklı kontrollere kıyasla alfa-globin, beta-globin ve delta-globin toplam sayım artışı tespit edilmiştir. Daha sonra, bu örneklerdeki hemoglobin artışını ELISA yöntemi ile doğrulanmıştır. Çalışmaya dair ROC analizi ile eğri altındaki alanı 0,6913 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamız, hemoglobinin Alzheimer hastalığında tanı koymada biyobelirteç olarak kullanımının %69 başarıya sahip olduğunu ve nöron derive ekzozomlardaki hemoglobin düzeyinin Alzheimer hastalığı tanısı için alt düzeyinin 27,69 ng/ml olması gerektiğini göstermiştir. Hemoglobinin Alzheimer hastalarında biyomarkır olarak değerlendirilebilmesi için daha çok sayıda ve değişik bölgelerden hastalar ile fonksiyonel analizler yapılmalıdır.

P19

DNA Onarım Proteinini PARP1'In İnsan Yumurtalık Kanseri Dokusunda LC-MS/MS ile Tanımlanması ve Kantitasyonu

Erdem Coşkun¹, Gamze Tuna², Pawel Jaruga³, Alessandro Tona³, Onur Erdem⁴, Miral Dizdaroğlu³

¹ Institute For Bioscience & Biotechnology Research, University Of Maryland

² Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp AD.

³ National Institute Of Standards And Technology

⁴ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji AD.

Amaç: Poli (ADP riboz) polimeraz 1 (PARP1), baz kesme çıkarma onarım yolunun çok fonksiyonlu bir DNA onarım proteinidir ve DNA zincir kırıklarının onarımında önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalar çeşitli kanser türlerinde PARP1 ekspresyonunun prediktif ve prognostik değerini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, PARP1 proteini kanser tedavisinde önemli bir hedef haline gelmiş ve antikanser ilaçlar olarak PARP-1 inhibitörlerin geliştirilmesi söz konusu olmuştur. PARP1'in normal dokularda ve hastaların malign tümörlerinde doğru ölçümü, PARP1'in kanser ve diğer hastalıklarda bir biyobelirteç olarak değerlendirilmesi ve kanser tedavisinde inhibitörlerinin geliştirilmesi ve kullanımı için gerekli olacaktır. Bu çalışmada normal/kötü huylu yumurtalık dokularında ve üç farklı insan hücre hattında PARP1'i tanımlamak ve doğru bir şekilde ölçmek için sıvı kromatografisi-izotop-seyreltme tandem kütle spektrometrisini (LC-MS/MS) içeren bir yaklaşım sunulmaktadır.

Yöntem: PARP1 proteini, insan normal yumurtalık dokularında ve kötü huylu yumurtalık tümörlerinde ve her bir çift normal hücre hattından ve kanserli muadilinden oluşan üç çift insan hücre hattında LC-MS/MS (Thermo-Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC, Thermo-Scientific Finnigan TSQ Quantum Ultra triple quadrupole MS/MS) ile tanımlandı ve ölçüldü. Ayrıca PARP1 ve diğer bir DNA onarım proteini olan apürinik/apirimidinik endonükleaz (APE1)'in eşzamanlı ölçümü de gerçekleştirildi.

Bulgular: Kötü huylu yumurtalık dokularında, normal dokulara göre PARP1 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterildi ($p=0.001$). Ayrıca hücre hatlarında yapılan çalışmalar sonucunda, insan HeLa hücrelerinde Ect1/E6E7 hücrelerine göre PARP1 ekspresyonu anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0003$). Ayrıca kanserli yumurtalık doku protein ekstraktında PARP1 and APE1 'in eşzamanlı ölçümü gerçekleştirildi. Her iki proteinin spesifik triptik peptitlerine ait LC-MS/MS sonuçları elde edildi.

Sonuç: İlk kez, insan dokularında ve hücre hatlarında PARP1'in pozitif tanımlanması ve mutlak olarak ölçülmesi için sağlam bir metodoloji geliştirildi. Gelecek çalışmalarda, hasta örneklerinde PARP1'in ve gerektiğinde APE1 ile aynı anda mutlak miktarının tayini için geliştirilen bu yaklaşımın kullanılabilmesi söz konusudur. Geliştirilen metodun doku biyopsileri

P20

Terapötik Monoklonal Antikoron Stres Koşulları Altında Bağlanma Özelliklerinin İncelenmesi

Gülipek Güven¹, Zeynep Zülfiye Yıldırım Keleş², Ahmet Emin Atik², Deniz Bayçın², Özge Can³, Recep Serdar Alpan², Tunç Turgut²

¹ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Medikal Biyoteknoloji Doktora Programı

² Turgut İlaçları A.Ş., Biyoteknoloji Geliştirme Merkezi

³ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Tıp Mühendisliği Bölümü

Amaç: Son yıllarda monoklonal antikorumların mekanizmalarının anlaşılması birçok hastalığın tedavisi için umut olmuştur. Terapötik amaçla kullanılan monoklonal antikorumların (mAb) bağlanma özelliklerinin belirlenmesi medikal biyoteknoloji alanında büyük önem taşımaktadır. Piyasada yer alan referans ilaçlar ile yeni geliştirilen biyobenzer ilaçların benzer karakteristik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bu moleküllerin aynı stres koşulları altında gösterdikleri bozunmalar, uzun dönemli stabilite özelliklerine ışık tutmaktadır. Yapılan çalışmada antikor/antijen ve antikor/reseptör bağlanma davranışları yüzey plazmon rezonansı tekniği ile incelenmiştir. Bu teknik sayesinde, in vitro olarak terapötik ilaçların hedef molekül veya reseptör ile bağlanma kinetik analizleri gerçek zamanlı olarak normal koşullarda ve stres uygulanarak molekül üzerinde meydana gelen değişiklikler gözlemlenmiştir.

Yöntem: Yapılan çalışmada yüzey plazmon sistemi olarak Biacore T200, GE Lifesciences kullanılmıştır. CM5 çipine, Protein A/G immobilize edilmesi ile IgG/TNF- α bağlanmasını ve anti histidin antikor ile immobilize edilmesi ile biyotinlenmiş Fc reseptörlerinin (Fc γ R1a ve Fc γ R111a) IgG'ye bağlanmasını kapsamaktadır. Metot optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra IgG1 formundaki mAb'lara kimyasal deamidasyon stresi uygulanarak (pH3 ve pH9, 24 ve 72 saat) bu iki yaklaşım ile Fc bölgesinin bağlanma davranışları incelenmiştir.

Bulgular: Bu çalışma ile immobilizasyon, IgG-TNF- α ve IgG- Fc γ reseptörlerinin bağlanma kinetiği analizleri optimize edilmiş olup referans ve biyobenzer ürünün stres koşullarındaki bağlanma davranışı incelenmiştir. Çalışma sonucunda, Fc bağlanma kapasitesi karşılaştırıldığında, belirgin olarak pH 3 koşullarında değişim gözlemlenirken pH 9 koşullarında ise hafif bir değişime neden olmuştur. Zamana bağlı değişim karşılaştırıldığında ise pH 3 seviyesindeki değişiklik 72 saat örnekleri daha dikkat çekerken 24 saat seviyelerinde daha hafif değişimler gözlemlenmiştir.

Sonuç: Referans ve biyobenzer ürünün normal koşullarda ve pH stresleri altında Protein A/G'ye ve Fc γ reseptörlere bağlanma kinetiği verileri açısından benzer davrandığı yüzey plazmon tekniği ile gösterilmiştir. Bu veriler ile uygulanan stres koşullarının mAb'in farklı bölgeleri üzerinde gösterdiği etkiler ile bağlanma kinetiğine etki ettiğini göstermektedir.

P21

Glioma Hücrelerinde Rosmarinik Asitin Hsp Anlatımı ve Apoptoz İndüksiyonu Üzerine Etkileri

Aslıhan Şengelen¹, Evren Önay Uçar²

¹ İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

² İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Amaç: Glioblastoma (GBM, IV.derece) en agresif malign beyin tümörüdür. GBM’de stres proteinlerinin (ısı şoku proteinleri, “Heat shock protein”, Hsp) ve bunların transkripsiyon faktörü HSF-1’in (“heat shock factor-1”) anlatımları tümör hücresi proliferasyonu ile yakından ilişkilidir. Doğal bir bileşik olan Rosmarinik asit (RA), GBM’ye karşı antitümör etkiler sergiler, ancak gliomalarda Hsp anlatımı üzerindeki antikanser etki mekanizması belirsizliğini halen korumaktadır. Bu çalışmanın amacı, RA’nın GBM hücrelerinde Hsp anlatımı ve apoptoz üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Yöntem: Çalışma kapsamında U-87 MG insan glioblastoma hücre hattı kullanıldı. HSF-1 gen anlatımını susturmak için spesifik siRNA’lar ile transfeksiyon yapıldı. RA ve siRNA uygulamalarının hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlendi. RA (80 ve 215 µM) tek başına veya siRNA’lar (25 ve 50 nM) ile kombinasyon halinde U-87 MG hücrelerine uygulandıktan sonra, Hsp anlatımı üzerindeki etkileri Hsp60, Hsp70 ve HSF-1, apoptoz üzerindeki etkileri ise Bax, Bcl-XI ve kaspaz-3 protein seviyelerindeki değişimler belirlenerek değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi ile analiz edildi.

Bulgular: RA’nın hücre proliferasyonunu doza ve zamana bağlı bir şekilde engellediği belirlendi. HSF-1 siRNA uygulaması tek başına HSF-1 protein seviyesinde %70’lik bir azalmaya neden olurken, RA ile kombine şekilde uygulandığında HSF-1’in neredeyse tükenmesine neden oldu. Yapılan uygulamalar test edilen Hsp ekspresyon seviyelerinin azalmasına ve apoptozun tetiklenmesine yol açtı. Bununla birlikte, sonuçlar HSF-1 inhibisyonunun U-87 MG hücrelerini RA uygulaması sırasında apoptoz indüksiyonuna karşı aşırı derecede savunmasız hale getirdiğini gösterdi.

Sonuç: Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar, RA’nın tek başına ve HSF-1 susturma ile birlikte GBM tedavisi için aday olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Teşekkür: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2019-32757 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

P22

Drosophila Hücrelerinde Proksimal Olarak Biotinleme Tekniği İle Protein-Protein Etkileşimlerinin Tanımlanması

Gözde Özçelik, Nuri Öztürk

Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Proksimal olarak biotinleme tekniği (BioID) avcı proteine bağlı bir biyotin ligaz ile hedef proteinlerin etiketlenmesi ve biyotin afinitesinden yararlanılarak indirilen proteinlerin kütle spektrometresi ile tanımlanması tekniğidir.

Amaç: Bu çalışmada Drosophila sirkadiyen saat sisteminde ışığa bağımlı ve bağımsız etkileşimleri tanımlamak için mutant bir biyotin ligaz enzimi olan miniTurbo (MT) ile BioID tekniği uygulanmıştır. Buradaki amaç Drosophila Kriptokrom (CRY) proteini ve onun ışık bağımlı etkileştiği Timeless (TIM) proteinine füzyon olarak anlatımı yapılan miniTurbo enzimi ile fotoreseptör kompleksindeki ışığa bağımlı zayıf ve geçici etkileşimleri tespit etmek ve protein hedeflemesini karanlık ve aydınlık koşullar altında gerçekleştirerek fotoreseptördeki moleküllerin tanımlanması sağlamaktır.

Yöntem: Bu doğrultuda, S2 Drosophila hücre hattında Kriptokrom ile etkileşenler için CRY-miniTurbo, Timeless ile etkileşenler için TIM-miniTurbo,CRY,JET ve Period (PER) birlikte anlatımı kalıcı olarak yapıldıktan sonra karanlık ve ışık altında kısa süreli biyotin uygulanması ile işaretlenmiş moleküller Streptavidin manyetik boncukları ile izole edilerek kütle spektrometresi ile kimliklendirilmiştir.

Bulgular: Kütle Spektrometresi sonucunda CRY ve TIM ile etkileştiği düşünülen anlamlı proteinler listelenmiştir. Tanımlanan moleküllerin fotoreseptör kompleksinde bulunduğu ve bunların hangilerinin gerçekten CRY veya TIM ile etkileştiği klasik immunopresipitasyon (IP) ve Bi-moleküler Floresan Tamamlama (BiFC) tekniği ile test edilecektir.

Sonuç: Bu çalışmanın sonunda Drosophila fotoreseptörünün çalışmasına dair modeldeki eksiklerinin tamamlanması ve fotoreseptör kompleksinde yeni faktörlerin tanımlanması beklenmektedir.

Bu çalışma 215Z278 numaralı proje numarası ile TÜBİTAK destek programınca desteklenmiştir.

P23

Temozolomidin Glioma Hücrelerinde Eksozomal Hsp70 Anlatımı ve Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi

Cansu Kılıç¹, Aslıhan Şengelen¹, Murat Pekmez²

¹ İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

² İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Amaç: Glioblastoma multiform (GBM), yüksek ölüm oranlarına sahip birincil, oldukça agresif bir beyin malignitesidir. Isı şoku proteinleri (Hsp) GBM’de aşırı eksprese edilirler, tümör hücresi proliferasyonunda ve ilerlemesinde etkilidirler. Bu nedenle tedaviye artan bir direnç gösterirler. Eksozomal Hsp70 ise, tümör büyümesinde, hücre göçünde ve metastazında anahtar rol oynar. Temozolomid (TMZ) GBM tedavisi için bir kemoterapi ajanıdır. TMZ’nin eksozomal Hsp’ler, özellikle Hsp70 üzerindeki etkisi henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bu çalışmanın amacı TMZ’nin eksozomal ve hücrel Hsp70 ekspresyon profili ve tümör hücresi göçü üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Yöntem: TMZ’nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi MTT analizi ile belirlendi. Eksozom izolasyonunu doğrulamak için Western Blot yöntemi ve Taramalı Elektron Mikroskopisi ile görüntüleme yapıldı. TMZ’nin Hsp70 üzerindeki etkisi ise Western Blot yöntemi ile değerlendirildi. Hücrelerin göç kabiliyeti in vitro çizik testi (in vitro scratch assay) ile değerlendirildi. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi ile yapıldı. Anlamlılık sınırı $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

Bulgular: TMZ uygulamaları (25 ve 200 μM), hücre içi Hsp70’in ekspresyonunu artırırken eksozom içinde bulunan Hsp70’in anlatımının ise azaldığı görüldü ve 750 μM TMZ tedavisi sonucunda ise hem hücrede hem de eksozom içinde Hsp70 seviyelerinin azaldığı gözlemlendi. Ekstrasellüler ortamda ise arttığı görüldü. Kontrol grubunun hücre içi ve eksozomal Hsp70 düzeyleri karşılaştırıldığında, Hsp70 düzeyleri eksozomlardan 6 kat daha yüksek saptandı. TMZ ile 48 saatlik tedaviden sonra, migrasyon hızının doza bağlı bir şekilde azaldığı belirlendi. Göç oranı 25 μM TMZ için % 95.1, 200 μM için % 84.6 ve 750 μM için ise % 44.8 olarak bulundu.

Sonuç: Eksozomal Hsp70 seviyelerinin TMZ ile azaldığı, hücrel Hsp70 ekspresyonunun doza bağlı bir şekilde arttığı gösterildi. TMZ’nin hücre göçü üzerinde önemli bir etkisi olduğu bilinmekle birlikte elde edilen verilere göre, TMZ konsantrasyonu arttıkça hücre göçünün yavaşladığı ve azaldığı gözlemlendi.

Teşekkür: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 29087 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

P24

Vazoaktif İntestinal Polipeptid'in Yüzey Adsorpsiyonu Varlığında Lc-MS/Ms Yöntemi İle Karakterizasyonu

Sema Koyutürk¹, Erol Şener²

¹ Abdi İbrahim İlaç A.Ş. Araştırma & Geliştirme (Ar-Ge) Merkezi

² Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı

Amaç: Vazoaktif intestinal polipeptidin (VIP) nörolojik dokularda düşük konsantrasyonlarda bulunması nedeniyle, çalışmalar sırasında meydana gelen yüzey adsorpsiyonuna rağmen, hassas ve yüksek duyarlıktaki LC-MS/MS ile analizi için yöntem geliştirilmesi ve karakterizasyonunun sağlanması hedeflenmiştir.

Yöntem: VIP'in analizi için LC-MS/MS (1290 LC ve 6460 Triple Quad MS sistemi, Agilent Technologies) ile yöntem optimize edilmiştir.

- C18, 100*2.1mm, 2.7µm, 160Å
- %0.2 formik asit-su (A hattı) %0.2 formik asit-ACN (B hattı)
- 0.2 ml/dak
- 2µl
- 30°C
- MS parametreleri:
- Scan, SIM, Product iyon ve MRM modunda analizler gerçekleştirilmiştir.
- Fragmentör voltajı: 120V
- Parçalama enerjisi (CE): 20V
- Hücre içi hızlandırıcı voltaj (CAV): 5V
- Peptidin temas ettiği yüzeylere (pipet ucu, tüp, vial vb.) adsorpsiyonunun meydana gelmesinin engellenmesi için deneysel malzemeler %1 BSA ile kaplanmıştır.
- %1 Asetik asit-%50 ACN içeren seyreltme çözeltileri kullanılarak VIP çözeltileri hazırlanmıştır.
- VIP standart çözeltisi için farklı saklama koşullarındaki stabilitesinin adsorpsiyon üzerine etkisi incelenmiştir.

Bulgular: 3325 Da molekül ağırlığına sahip VIP'in M+5 yüklü iyonu olan 665.9 kütlesi MRM yöntemi ile parçalandığında 799.5 ve 770.7 fragment kütleleri başarılı bir şekilde karakterize edilmiştir.

Sonuç: VIP'e ait temel iyonun yanında peptidin parçalanması sonucu elde edilen çoklu yüklenmiş türleri de gözlemlenmiştir. VIP'in yüzeye adsorpsiyonu tam olarak engellenemese de farklı seyreltme çözeltileri ve BSA ile kaplı malzemeler kullanılarak VIP pikinin adsorpsiyon varlığında MS'te gözlemlendiği gösterilmiştir.

P25

Poliarjinin Etiketli TEV Proteaz (TEV-C9R) Enziminin Bakteriyel Üretim Proses Optimizasyonu

Latif Akbulut, Baran Dingiloğlu, Gizem Dinler Doğanay
İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Amaç: TEV proteaz enzimi, rekombinant proteinlerden afinite etiketlerinin veya proteinlerin çözünürlüğünü arttıran füzyon proteinlerinin uzaklaştırılmasında sıkça kullanılan viral bir enzimdir. Afinite etiketlerin ve füzyon proteinlerin kesiminde sıkça kullanılan Faktör Xa, Enterokinaz ve Thrombin gibi diğer alternatifler olmasına karşın TEV proteaz, yedi amino asitlik peptid motifine (E-X-X-Y-X-Q-(G/S); X herhangi bir amino asit) olan yüksek seçiciliği nedeniyle daha fazla tercih edilmektedir. TEV proteazın üretim sürecinde karşılaşılan en büyük problem hücre içindeki düşük çözünürlüğüdür. Literatürde bulunan TEV proteaz rekombinant protein üretimine ait çalışmalarda, çözünürlüğü arttıran birçok füzyon protein denendiği görülmüştür. Bu aşamada karşılaşılan en büyük problem füzyon proteininin büyüklüğünden kaynaklanan TEV proteaz aktivite düşüşüdür. Bu çalışmada, C-ucunda çözünürlüğü arttırmak için poliarjinin etiketi ve N-ucunda 6xHis-etiketi içeren TEV proteazın üretim prosesinin optimizasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Yöntem: Poliarjinin-etiketli TEV proteaz enziminin (TEV-C9R) ifadesini ve çözünürlüğünü arttırmak için hücre hattı, inkübasyon sıcaklığı, indükleyici konsantrasyonu ve besi yeri optimize edilecek parametreler olarak belirlenmiştir. Hücre hattı olarak Escherichia coli W3110 ve Rosetta (DE3) kullanılmıştır. Hücre lizatının çözünür ve çözünür olmayan kısımları her bir parametre için SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. TEV-C9R proteazı afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ürünün karakterizasyonu ortogonal teknikler ile yapılmış ve son ürünün aktivitesi ölçülmüştür.

Bulgular: Kullanılan farklı besi yerlerinde TEV-C9R ifadesinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Inkübasyon sıcaklığının düşürülmesiyle birlikte TEV-C9R ifadesinin çözünür fazda arttığı gözlenmiştir. W3110 hücre hattının, Rosetta (DE3) hücre hattına kıyasla protein ifadesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: TEV-C9R proteazın büyük bir miktarının hücre lizatının çözünür olmayan kısmında olduğu saptanmıştır. C9R etiketinin protein çözünürlüğünü arttırmada istenilen seviyede olmadığına karar verilmiştir. İleriye dönük çalışmalarda çözünürlüğü arttıran farklı etiketlerin denenerek, üretim proseslerinin optimizasyonu hedeflenmiştir.

P26

Bag-1S:VCP/P97 Etkileşiminin Meme Kanseri Hücre Hattında İncelenmesi

Ezgi Baştürk, Özge Tatlı, Miray Türk, Gizem Dinler Doğanay
İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Amaç: Protein kalite kontrolü (PQC), hücre sağ kalımına katkıda bulunan proteostazinin sağlanmasında kritik öneme sahip hücresel bir mekanizmadır. Yanlış katlanmış/katlanmamış salgı ve membran proteinleri, VCP/p97 aracılığıyla endoplazmik retikulumdan (ER) sitoplazmaya taşınarak ER-ilişkili degradasyon (ERAD) mekanizması yoluyla yıkım için ubiquitin/proteazom sistemine (UPS) hedeflenir. BAG ve ubiquitin-benzeri (UbL) olmak üzere iki fonksiyonel domenden oluşan ve meme kanseri hücrelerinde aşırı ifade edilen çok fonksiyonlu Bag-1 proteininin proteostazi üzerindeki etkisini belirleyen çok sayıda etkileşim partneri vardır. Bag-1'in, Hsp70 ve UPS etkileşimleri aracılığıyla protein katlanması ve yıkım süreçleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Laboratuvarımızdaki ön bulgular Bag-1'in ERAD proteinleri ile etkileşimini ortaya koymuştur. Bu çalışmada, farklı kanser türlerinin tedavisinde potansiyel hedeflerden biri olan PQC sisteminde yer alan VCP/p97'nin anti-apoptotik Bag-1 ile olası etkileşiminin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Olası Bag-1:VCP/p97 etkileşimi in silico olarak PRISM web sunucusu aracılığıyla incelenmiştir. İnsan VCP/p97 ve Bag-1S proteinlerine ait gen dizileri, N-ucuna 6xHis-etiketi ve TEV kesim bölgesi eklenerek pcDNA3.1 memeli ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Oluşturulan plazmitler meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücrelerine transfekte edilerek Bag-1S ve VCP/p97 proteinlerinin aşırı ifadesi sağlanmıştır. MCF-7 hücrelerinde hedef proteinlerin aşırı ifadelerinin hücre canlılığına etkisi MTT ile incelenmiştir. 6xHis-etiketli VCP/p97 ve Bag-1S proteinleri, His-etiketiyle çöktürülmüş ve Bag-1S:VCP/p97 kompleksi immün-blotlamayla araştırılmıştır. İmmünositokimya deneyleri ile, 6xHis-etiketli VCP/p97 ve Bag-1S proteinlerinin hücre içi ko-lokalizasyonları in situ incelenmiştir.

Bulgular: İn silico analizler sonucunda Bag-1'in BAG domeni ile monomerik VCP/p97'nin D1 ATPaz domeninin etkileşebileceği öngörülmüştür. Çöktürme analizleri ve immünositokimya deneyleri değerlendirildiğinde VCP/p97 ve Bag-1 proteinlerinin aynı komplekste yer aldığı ve hücre içinde ko-lokalize oldukları tespit edilmiştir.

Sonuç: Bag-1 proteininin ERAD yolağı proteini olan VCP/p97 ile etkileşiminin Hsp70 şaperonun aracılığı olmadan doğrudan da gerçekleşebileceği ihtimali doğmuştur. Devam etmekte olan çalışmalarımızın ışığında Bag-1 ve VCP/p97 proteinlerinin ilişkisi açıklık kazanarak, kanserde protein yıkım mekanizmalarının önemi vurgulanmış olacaktır. Bu yönüyle literatüre ve yeni hedef moleküllerin keşfine katkı sağlayacaktır.

Bu çalışma TÜBİTAK 119Z261 numaralı 1001 projesi tarafından desteklenmektedir.

P27

Anti-Apoptotik Bag-1 Isoformlarının Raf Kinazlarla Fosforilasyon Bağımlı Etkileşimi Formalinde

Özge Tatlı¹, Miray Türk², Ecnur Çebi², Zeynep Şahin², Gizem Dinler Doğanay²

¹ İstanbul Medeniyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik

² İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik

Amaç: Hücreleri apoptotik uyarılardan koruyan ve sıklıkla insan kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen Bag-1 proteini, BAG ailesinin önemli bir üyesidir. Bag-1'in bilinen etkileşim ortakları olan C-Raf ve B-Raf serin/treonin-protein kinazlar, çoğalmayı ve hücre sağ kalımını regüle eden MAPK yolağında yer alır. Bag-1'in, iki Raf izoformu olan C-Raf ve B-Raf ile olan etkileşimi, kanser hücrelerinin uzun süreli sağ kalımında kritik rol üstlenmektedir. Ancak Bag-1'in fosforilasyona bağlı Raf aktivasyon döngüsündeki kesin rolü bilinmemektedir. Bu çalışmada, meme kanseri hücrelerinde Raf kinazlar ve anti-apoptotik Bag-1 proteini arasındaki etkileşimlerin Raf aktivasyon döngüsündeki yeri araştırılmıştır.

Yöntem: İlk olarak, His6 etiketli Bag-1S, Bag-1L, C-Raf ve B-Raf cDNA dizileri memeli ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. C-Raf ve B-Raf'ın aktivasyon döngüsünün ilk adımında görev alan S-338 ve S-446 amino asitleri yönlendirilmiş mutagenез yoluyla fosforini taklit eden aspartat amino asitiyle değiştirilmiştir. Aynı serin amino asitleri alanine çevrilerek fosforilasyonun inhibe edildiği inaktif Raf kinaz formları oluşturulmuştur. MCF-7 hücrelerinde hedef proteinlerin aşırı ifadelerinin hücre canlılığına ve proliferasyona etkisi MTT ve koloni formasyon deneyleriyle incelenmiştir. Transfekte edilen hücrelerden elde edilen protein lizati ile His-çöktürme deneyleri yapılarak Bag-1/Raf etkileşimleri test edilmiştir. İmmünotokimya deneyleri ile Bag-1'in Raf'larla fosforilasyon-bağımlı hücre içi ko-lokalizasyonu in situ ortamda değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda, Bag-1/Raf kinaz etkileşimlerinin fosforilasyona bağımlılığını araştırmak için, aktif veya inaktif Raf kinazların Bag-1S ve Bag-1L izoformları ile etkileşimleri His-çöktürme deneyleri yoluyla incelenmiştir. His-çöktürme deneyleri, Bag-1L'nin tamamen inaktif C-Raf ve B-Raf ile etkileşime girerken, ağırlıklı olarak Bag-1S'nin Raf kinazların fosfomimetik olarak aktif formları ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Bag-1S ile gerçekleştirilen immünotokimya deneyleri, Bag-1/Raf kinaz etkileşiminin fosforilasyona bağıllığını doğrulamıştır.

Sonuç: Bag-1'in aktif ve inaktif Raf kinaz formları ile fosforilasyon bağımlı izoform-spesifik etkileşimi, Bag-1 proteininin Raf kinazları aktiveleştirmekten ziyade aktif formlarını stabilize ettiğini düşündürmektedir. Bag-1'in fosforilasyona bağlı Raf aktivasyon döngüsündeki rolünün aydınlatılması kanser hücrelerinin uzun süreli sağ kalımında görev alan MAPK yolağının hedeflenmesi çalışmalarına katkıda bulunacaktır.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmektedir (117Z848).

P28

Bag-1'in Otofajik Hücre Sağkalımında İzof orm-Spesifik Regülatör Rolü

Miray Türk¹, Özge Tatlı², Gizem Dinler Doğanay¹

¹ İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

² İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

Amaç: Anti-apoptotik Bag-1, alternatif translasyon mekanizması ile üretilen, N-ucu farklı, C-ucu ortak üç major izoformdan oluşan adaptör bir proteindir. İzof ormlar taşıdıkları domainlere göre hücrede nukleusta veya stoplazmada bulunabilirler. Bu sayede, farklı proteinlerle etkileşim kurarak apoptoz, proliferasyon veya hücre sağ kalımı gibi farklı yolların kontrolünde göre alırlar. Bag-1'in Hsp-70 ve Raf-1 kinaz dışında en çok bilinen etkileşim partnerlerinden biri olan Bcl-2, BH3-aile üyeleri ile etkileşerek apoptozu, Beclin 1 ile etkileşerek de otofaji mekanizmasını kontrol etmektedir. Bu sebeple Bcl-2/Beclin 1 etkileşimi hücre ölüm/sağ kalım mekanizmalarının kontrolü için kilit rol oynamaktadır. Çalışmamız kapsamında, Bcl-2'nin bilinen etkileşimlerinden yola çıkarak, Bag-1'in Bcl-2 ve Beclin 1 kompleksindeki olası varlığının MCF-7 ve BT474 insan meme kanseri hücre hatlarında araştırılması amaçlanmıştır. Bag-1'in Beclin 1 üzerinden Bcl-2/Beclin 1 kompleksine katılarak hücre sağ kalımının regülasyonunda görev alabileceği düşünülmektedir.

Yöntem: Olası Bag-1/Beclin 1 etkileşiminin MCF-7 ve BT-474 insan meme kanseri hücre hatlarında incelenmesi için His6-etiketli Bag-1S, Bag-1L ve Beclin 1 proteinlerinin MCF-7 ve BT-474 hücre hatlarında overekspresyonunu ve Ni-NTA reçineye bağlanmasını içeren çift yönlü çöktürme deneyleri yapılmıştır. Proteinlerin hücre içi ko-lokalizasyonları ise immünohistokimya deneyleri ile in situ olarak gösterilmiştir. Bag-1 ve Beclin 1'in hücre sağ kalımı üzerindeki etkisi ise koloni formasyon ve MTT deneyleri ile gösterilmiştir.

Bulgular: Bag-1/Beclin 1 etkileşimlerinin incelenmesi için her iki hücre hattında da Ni-NTA çöktürme deneyleri yapılmış, bunun sonucunda hem Bag-1S'nin hem de Bag-1L'nin Beclin 1 ile birlikte çöktüğü gözlenmiştir. İmmünohistokimya deneyleri sonucunda ise Bag-1S ve Beclin 1 sitoplazmada birlikte gözlemlenirken Bag-1L nakteusta gözlenmiştir. Koloni formasyon ve MTT deneyleri sonucunda, Beclin 1'in ve her iki Bag-1 izoformunun hücre proloferasyonu üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir.

Sonuç: Bag-1'in Ni-NTA çöktürme deneylerinde Beclin 1 ile birlikte gözlemlenmesi, kanserde hücre sağ kalımında etkili olduğu gösterilmiş olan Beclin 1'in regülasyonu üzerinde etkili olabileceği, dolayısıyla Bcl-2 ve Raf-1 etkileşimlerine ek bir mekanizma ile de hücre sağ kalımını sağlayabileceği düşünülmektedir.

P29

WST-1 Canlılık Testinin Limitasyonları: Topotekanın Sitotoksik Etkisinin Ölçülmesinde Yanlış-Pozitif Sonuçlar

Sevinç Yanar, Murat Kasap, Aylin Kanlı
Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Mitochondriyal enzimler ile indirgenerek formazan kristalleri oluşturan tetrazolyum tuzları hücre canlılığı ve sitotoksite araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tetrazolyum tuzu temelli bir test olan WST-1 testi benzerlerine kıyasla daha hassas olması sebebiyle kültürdeki hücrelerin nispi proliferasyon oranlarını değerlendirmek için son yıllarda sıklıkla tercih edilmektedir. Bu çalışmanın amacı WST-1 testinin, bir kemoterapi ilacı olan topotekanın hücre canlılığına etkisini değerlendirmede güvenli bir şekilde kullanılıp kullanılmayacağını araştırmaktır.

Yöntem: Küçük hücreli akciğer kanser hücre hattı olan DMS114 hücrelerine artan dozlarda topotekan uygulanmış, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonunda canlılık analizi önce WST-1 testi ile yapılmıştır. Ardından sonuçlar metabolik aktiviteden bağımsız çalışan Trypan Blue Exclusion (TBE) testi ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları standart ANOVA prosedürü kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Yapılan analizlerde topotekan dozundaki artışla orantılı olarak hücre canlılığında düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Ancak WST-1 testi sonucundaki canlılık oranlarının TBE testiyle elde edilen sonuçlara kıyasla çarpıcı bir şekilde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel analizler iki farklı test ile elde edilen sonuçların önemli ölçüde farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bu fazla tahmin edilen canlılık oranları, WST-1 ile topotekan arasında ciddi bir enterferans olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç: Elde edilen bulgulara dayanarak, topotekan ya da başka ilaçların hücre canlılığına etkisi araştırılırken WST-1 testinden elde edilen verilere dikkat edilmesi önemle tavsiye edilmektedir. Sonuçların yanlış yorumlanmasını önlemek için tetrazolyum tuzu temelli testlerin metabolik olmayan diğer testlerle desteklenmesi önerilmektedir.

P30

Serum-Tabanlı Biyobelirteç Keşfinde Yeni Bir Metodolojik Yaklaşım

**Mehmet Sarıhan, Merve Gülsen Bal Albayrak, Murat Kasap, Güler Akpınar
Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Amaç: Kan; zengin içeriği, kolay ulaşılabilirliği ve canlı organizmadaki tüm sistemler ile etkileştiğinden dolayı pek çok hastalığın tanı ve takibinde kullanılabilecek biyobelirteçleri içeren değerli bir biyolojik sıvıdır. Ancak günümüzde klinik uygulamalarda kısıtlı sayıda serum-tabanlı biyobelirteç rutin olarak kullanılabilir. Bu biyobelirteçler serumun proteomunun yaklaşık %1-1,5'lük dilimini oluşturan düşük miktartlı protein grubu içerisinde yer aldıklarından tanımlanmaları zordur. Aynı zamanda serum proteinlerinin %95'den fazlasını oluşturan albümin, immüoglobulin ve transferrin gibi yüksek miktartlı proteinler grupları tarafından maskelenmeleri, biyobelirteçlerin belirlenmesini ve analizlerini ciddi anlamda etkilemektedir. Günümüzde yapılan biyobelirteç keşif çalışmalarında kandaki yüksek miktarda bulunan proteinler afinite-koromotografisi gibi yöntemlerle uzaklaştırılarak yeni biyobelirteçler tanımlanmaya çalışılmaktadır. Ancak bu konuda bazı başarılar elde edilse de bu yöntemlerin getirdiği ciddi dezavantajlar bulunmaktadır. Bu neden çalışmamızda serum-tabanlı biyobelirteç keşfinde daha verimli bir metodolojik yaklaşım geliştirdik.

Metod: Taze alınan kan örneklerinden serum sıvısı elde edildi. Serum, içerisindeki immüoglobulinlerin uzaklaştırılması için HiTrap Protein G HP kolondan geçirildi ve sonrasında PrepCell Model 491 sistemi kullanılarak albumin içermeyen 65 kDa altındaki fraksiyon toplandı. Elde edilen fraksiyonlar birleştirildi. Stir-cell sistemi kullanılarak proteinler konsantre edildi ve aynı zamanda tampon değişimi gerçekleştirildi. Elde edilen proteinler kullanılarak iki boyutlu jel elektroforezi ve LC/MS analizleri yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

Bulgular: Geliştirdiğimiz yaklaşımla, albümin ve immüoglobulinlerin maskeleyen etkilerinin oldukça azaltıldığı ve aday biyobelirteçlerin de aralarında bulunduğu düşük miktardaki kan proteinlerinin hem sayısal hem de kalitatif anlamda ciddi bir artış gösterdiği belirlendi. Yapılan analizler sonucunda diğer metotlarla tespit edilemeyen ve biyobelirteç değeri olabilecek proteinler tanımlandı.

Sonuç: Geliştirdiğimiz bu yöntemle serum-tabanlı biyobelirteç çalışmalarında minimal protein kaybıyla çok daha verimli sonuçlar elde edebildiğimiz görüldü. Bu yöntemle aynı zamanda serum proteinlerinin %55'den fazlasını oluşturan ve yüksek miktarda protein bağlama kapasitesinden dolayı "sünger etkisi" yapan albüminin etkisinin ciddi anlamda azaltılabildiği gözlemlendi. Geliştirilen yöntemin iki boyutlu jel elektroforezi ve LC/MS analizi gibi yöntemler içinde uygun olması geniş kullanılabilirlik alanı sağlamaktadır.

POSTER 1.LİK ÖDÜLÜ

P31

Glypican-3 ve 5 Proteinlerinin Hücre Bölünmesindeki Fonksiyonel Rollerinin Belirlenmesi

Ezgi Memiş¹, Nazan Saner¹, Nurhan Özlü¹, Ulrike Eggert²

¹ Koç Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

² King'S College London Randall Division Of Cell & Molecular Biophysics

Amaç: Hücre bölünmesi; kromozomların, hücre bölünmesiyle ilişkilendirilmiş çeşitli proteinlerin, hücre iskeletinin ve hücre zarının koordineli çalışmaları ile gerçekleşen bir süreçtir. Hücre bölünmesinin moleküler biyolojisi uzun zamandır araştırılmasına rağmen, hücre yüzeyi proteinleriyle hücre içi bölünme mekanizmasının özellikle sitokinez sırasında nasıl iletişim kurduğu üzerine yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. Hücre bölünmesi bozukluklarının kanser gibi pek çok hastalığa neden olduğu bilindiğinden, bu hastalıkların tanı ve tedavisinde hücre yüzeyi proteinlerinin fonksiyonel ve komünikatif rollerinin öğrenilmesi hayati önem taşımaktadır. Bunun yanında, hücre yüzeyi proteinlerinin, biyomarker olarak ve tedavisel amaçlarla kullanılmak için oldukça uygun adaylar olduğu pek çok kez gösterilmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada, iki hücre yüzeyi proteininin, Glypican 3 ve 5 (GPC3 ve GPC5), hücre bölünmesindeki rolleri araştırılmaktadır.

Yöntem: HRP'ye bağlı yakınlık bazlı biyotinleme (HRP dependent proximity-based biotinylation) yöntemi kullanılarak, kütle spektrometresi yardımıyla söz konusu proteinlerin etkileşim partnerleri belirlenmeye çalışılmaktadır. Bunun yanında, bu proteinleri kodlayan genlerin insan hücrelerinde indüklenebilir CRISPR/Cas9 (inducible CRISPR/Cas9) yöntemiyle susturulmasının (knock-out) veya proteinlerin aşırı ifade edilmesinin (overexpression) hücre biyolojisine etkileri çeşitli biyokimyasal yöntemlerle (immünofloresan ve immünoemdirim (immunoblotting) gibi) incelenmektedir.

Bulgular: Hücre bölünmesinin çeşitli evrelerinde, yeşil floresan etiketli ilgili proteinlerin lokalizasyonları belirlenmiştir. Bu proteinlerin ifadelerinin susturulması sonucunda hücrelerde çok-çekirdeklilik ve kusurlu kromozom ayrımı gözlemlenirken, aşırı ifade edilmesi durumunda ise hücrelerin yüzey yapışkanlıklarını kayb ettikleri gözlemlenmiştir. Kütle spektrometresi kullanılarak yapılan ve ilgili proteinlerin etkileşim partnerlerini bulmayı amaçlayan proteomik incelemeler devam etmektedir.

Sonuç: Yukarıda bahsi geçen bulgular, GPC-3 ve GPC-5 proteinlerinin hücrelerin yüzey yapışkanlığı, kromozom ayrımı ve hücre bölünmesi gibi süreçlerde etkili olduklarını göstermektedir.

P32

SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattında In Vitro Nörojenik Farklılaştırma Sırasında Proteom Karakterizasyonu

Eylül Ece İşlek Camadan, Murat Kasap, Gürler Akpınar
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Giriş: SH-SY5Y insan kökenli nöroblastoma hücre hattı in vitro Parkinson Hastalığı (PH) çalışmalarında sıklıkla model olarak kullanılmaktadır. SH-SY5Y hücrelerinin PH çalışmalarında özellikle tercih edilmesinin sebebi ise PH'na ait metabolik yollarda bulunan genlerin büyük bir kısmının bu hücre hattının genomunda korunur durumda olmasıdır. Ayrıca, SH-SY5Y hücreleri dopamin transporterlerini ve reseptörlerini ifade edebilmektedirler. Bununla beraber, SH-SY5Y hücreleri 'nöron' olarak tanımlanmaktan ise çok uzaktırlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu hücrelerin 'nöron-benzeri' hücrelere farklılaştırılabildiğini göstermektedir. Bu sebepten dolayı farklılaştırma sürecine tabii tutulan SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırma sürecine tabii tutulmayan hücrelere göre PH için daha iyi bir in vitro model olabileceğine kanaat getirmektediriz.

Amaç: Biz de bu çalışmamızda SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerini kendi oluşturmuş olduğumuz kısa ve etkili bir nörojenik farklılaştırma protokolüne tabii tutarak 'nöron-benzeri' yapılar elde etmeyi amaçladık.

Yöntem: Farklılaştırma sırasında TH, DDC, DRD1, DRD2, PARK2, DJ1 ve PINK1 gibi PH ile ilgili genlerin, daha önceden belirlenmiş olan farklı zaman aralıklarında, mRNA ve protein düzeylerindeki ifadeleri gözlemlendi. Ayrıca, farklılaştırma protokolü Immünfloresan mikroskopu kullanılarak Nestin, NeuroD1, NeuN, TH ve Nurr1 gibi mature nöron markörleri ile karakterize edildi. 2DE ve nLC-MS/MS çalışmaları da farklılaştırma süreci esnasında oluşan proteom farklılıklarını gözlemlemek için uygulandı.

Bulgular: Çalışmamız SH-SY5Y hücrelerinde nörojenik farklılaştırma sürecini daha etkili bir biçimde sunan ilk çalışmadır.

Sonuç: Sonuç olarak; nörojenik olarak farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinin PH için kesinlikle daha iyi bir in vitro model oldukları saptanmıştır.

Bu çalışma TÜBİTAK ARDEB 1002 Hızlı Destek programı kapsamında 118S806 kodu ile desteklenmektedir.

P33

Sınıf IA PI3K İzoformlarının Sinyal İletimindeki Özgün Hedefleri

Hazal Beril Çatalak Yılmaz, Onur Çizmecioğlu
Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Amaç: PI3K sinyal yolağı kanserde sıklıkla etkinleşen yollardan birisidir. Bütün Sınıf IA PI3K'ler, katalitik ve düzenleyici altbirimlerden oluşmakta, ve plazma membranındaki PIP2 moleküllerini PIP3'e fosforile etmektedir. Sınıf IA katalitik altbirimleri -p110α, p110β, ve p110δ-, kanserde mutasyona ya da amplifikasyona uğrar. Bütün Sınıf IA katalitik izoformlarının topyekün inhibisyonu yaygın bir toksisiteye yol açtığından, özellikle p110α ve p110β'nin izoforma özel hedeflerinin belirlenmesi, PI3K mutant kanserlerde hedeflere yönelik terapinin gelişmesine büyük katkı sağlayacaktır.

Yöntem: İzogenik fare embriyonik fibroblastları (MEFler), genetik olarak stabil ve transforme olmamış fenotiplerinden yararlanılarak hücre içi sinyalizasyon deneylerinde, özgün modeller olarak kullanılmıştır. MEFler, p110α ve p110β'yi kodlayan PIK3CA ve PIK3CB'nin ilk ekzonlarına LoxP bölgeleri yerleştirilecek şekilde geliştirilmiştir. Bu şekilde, p110α ve p110β'nin genomdan silinmesi kontrollü, ve izoform spesifik hedeflerin çalışılmasına olanak sağlanacak biçimde gerçekleştirilebilir. Bir lipidasyon modifikasyonu olan Miristoilasyon (Myr), proteinlerin plazma membranına bağlanmasını sağlamakla beraber belli kinazların sürekli aktivasyonunu tetikler. Bu çalışmada, MEFler 5'-uçlarında Myr sinyali bulunan sınıf 1A p110'larla transfekte edilip izoforma özel hedefler çalışılmıştır. Proliferasyon deneyleri, farmakolojik inhibisyonlar, ve fosfospesifik antikolarlar ile bağlaşıp immünoblotlar, izoformlara özel hedeflerin bulunmasında kullanılan yöntemlerdir.

Bulgular: Miristoile olmuş p110lar hem ortak hem de izoformlara özgü Akt substratlarını fosforile etmişlerdir. Bahsedilen spesifik hedeflerin varlığı Doksorubisin, Sisplatin, ve MK2206 (pan-Akt inhibitörü) kullanılarak belirlenmiştir. Rapamisin'le mTORC1, Everolimus'la mTORC1 ve 2, EHT1864'le Rac1 inhibisyonu aktif PI3K izoformlarının, farklı sinyalizasyon bileşenleri kullandıklarına yönelik bulguları güçlendirmiştir.

Sonuç: Bu çalışma, sınıf 1A PI3K izoformlarının özgün aşağı akım sinyal bileşenlerini kontrol ettiğini, ve translasyonel regülasyonu, metabolizma ve hatta sağkalımda birbirinden farklı rollerinin olduğunu göstermektedir.

POSTER 2.LİK ÖDÜLÜ

P34

Serebral Kortekste Göç Eden Nöronal Hücrelerin Proteomu: Heterotopi Hastalıklarının İncelemesi

Berfu Nur Yiğit¹, Nazlı Ezgi Özkan Küçük¹, Büşra Aytül Akarlar¹, Ayda Şentürk¹, Ceyda Seren Ceyhan¹, Cansu Akkaya¹, Ali Yurtseven¹, Esther Klingler², Denis Jabaudon², Fiona Francis³, Nurhan Özlü¹

¹ Koç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Departmanı

² Cenevre Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sinir Bilim Bölümü

³ Fer A Moulin Enstitüsü, Sinir Bilim Bölümü

Amaç: Kortikogenezin sırasında göç eden nöronal hücrelerin, hedef lokasyonları dışında yerleşimleri serebral korteks bölgesinde bant veya noduler kitle oluşumuna neden olmaktadır. Epileptik nöbetler, zeka ve gelişim geriliği ile ilişkilendirilen bu hastalıklar ile ilgili literatürde DNA ve transkripsiyon seviyelerinde çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmadaki amacımız, literatürde eksik kalan subkortikal bant heterotopi ve periventriküler nodüler heterotopi hastalıklarının; fare modelleri ve hücre hatları aracılığı ile proteom, interaktom ve fosfoproteom analizlerinin yapılması: hastalığın protein seviyesindeki farklılıklarının ortaya konulmasıdır.

Yöntem: Korkeksin farklı katmanlarında yer alan hücre popülasyonlarını embryonik ve gelişim dönemlerine ayırarak proteomik analizler yapabilmek; hücre sayısı limitasyonu dolayısı ile zorlu olmaktadır. Bu sebeple, öncelikle kütle spektrometresinde geniş proteome analizi yapabilmek için gereken minimum nöron sayısı saptanmıştır. Kütle spektrometresi için test edilen nöron ataları; FlashTag adı verilen özel bir teknik ile embriyonik farelerden toplanmıştır. Bu örneklerde proteinlerden, peptit yapılarına geçişlerde yaşanan kayıpları engellemek amacı ile farklı kimyasal içerikli tampon solüsyonlar denenerek, nöronlara özel kütle spektrometresi yöntemi geliştirilmiştir. Örneklerde, yüksek miktarda bulunan proteinlerin, düşük olanları baskılanmasını engellemek ve tespit edilen protein sayısını arttırmak için; yüksek pH-HPLC kullanılmıştır. Farklı deney koşullarını kantitatif karşılaştırmak amacıyla, TMT adı verilen peptit seviyesinde etiketleme yapan kimyasallar kullanılmıştır.

Bulgular: Göç eden hücrelerin geniş proteom analizi için gereken minimum nöron sayısı 1 milyon olarak tespit edilmiştir. Hafif deterjan içeren tampon çözelti kullanımının kütle spektrometresi analizlerinde protein sayısını arttırdığı tespit edilmiştir. Yüksek pH-HPLC ile 1500 nicel protein sayısı 5800 nicel proteine yükselmiştir.

Sonuç: Günümüzde, nöron göç hastalıkları üzerine mutasyon tespit çalışmaları hastalar üzerinde devam etmektedir. Hastalık ile ilişkilendirilen mutasyon sayısının artmasına karşın, protein seviyesindeki değişimler bilinmemektedir. Çalışmamız, subkortikal bant heterotopi ve periventriküler nodüler heterotopi hastalıklarının farklılıklarına ilişkin fare modelleri ve hücre hatları aracılığı ile ilk bulguları sunmaktadır.

P35

Kanser Hücre Döngüsü Aşamalarında Keratin 8 İnteraktörlerinin Araştırılması

Ceyda Seren Ceyhan, Büşra Harmanda, Berfu Nur Yiğit, Büşra Aytül Akarlar, Altuğ Kamacıoğlu, Nazlı Özkan, Ayda Şentürk, Ali Yurtseven, Nurhan Özlü
Koç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Amaç: Keratin reorganizasyonunun hücre bölünmesi sırasında nasıl bir moleküler mekanizması olduğunu daha detaylı anlayabilmek için, GFP etiketli Keratin 8 proteininin, kanser hücre döngüsünün farklı aşamalarında yakalanması ve GFP immüno-presipitasyonu yapılarak interaktör proteinlerin analiz edilmesi amaçlanmaktadır.

Yöntem: HeLa S3 hücreleri Keratin 8-GFP ve boş GFP vektörleri aracılığıyla Lipofectamin kullanılarak transfekte edildi ve 400 ug/ml genetisinli besiyer içinde seleksiyona bırakılarak GFP pozitif hücreler büyütüldü. Stabil olarak Keratin 8-GFP ve boş GFP ifade eden HeLa hücreleri timidin kullanılarak interfaz, S-tritil-L-sistein kullanılarak mitoz ve purvalanol a kullanılarak sitokinez evresine senkronize edildi ve peletlendi. Toplanan hücreler patlatıldıktan sonra tüm hücre lizatları GFP-Trap rezinler ile inkübe edilerek Keratin 8-GFP ve GFP kaynaşık proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Safaştırılan kaynaşık proteinler triptik olarak kesilerek peptit karışımı elde edildi ve nano-sıvı kromatografisine bağlı Q-Exactive Orbitrap kütle spektrometri ile analiz edildi.

Bulgular: HeLa S3 hücre hattında yapılan deneyler ve kütle spektrometri analizleri sonucunda, hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki Keratin 8 interaktörleri tespit edilmiş ve haritalanmıştır.

Sonuç: Keratin reorganizasyonunun hücre bölünmesindeki moleküler mekanizmasını anlayabilmek için detaylı bir interaktom oluşturulmuştur.

P36

Sitokinez Sırasında CLIC4 İle Etkileşen Proteinlerin BioID Metodu İle Tespit Edilmesi ve Tanımlanan Etkileşimlerin Araştırılması

Beste Senem Değirmenci, Zeynep Cansu Üretmen Kağıalı, Nazan Saner, Mehmet Akdağ, Erdem Şanal, Gürkan Mollaoğlu, Nurhan Özlü
Koç Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik

Amaç: CLIC (Chloride-Intracellular-Ion-Channel) proteinlerinin hücre bölünmesindeki rolü pek bilinmemektedir. Hücre bölünmesi sırasında hücre yüzey proteomundaki değişiklikleri analiz eden bir çalışma, CLIC4 ve CLIC1 proteinlerinin mitotik hücrelerin yüzeyinde arttığını göstermiştir (Ozlu vd., 2014). Çalışmamızda CLIC4 ve CLIC1 proteinlerinin hücre bölünmesine sırasında etkileştiği proteinler ve bu etkileşimlerin rolünün araştırılması hedeflenmiştir.

Yöntem: Yakınlığa bağlı biyotinleme (Proximity-dependent-biotin-identification, BioID) ve kütle spektrometresiyle CLIC4'ün hücre bölünmesindeki olası etkileşim partnerleri belirlenmiştir. Deneyde CLIC4'ün hücre yüzeyine localize olamayan mutant versiyonları kontrol olarak kullanılmıştır. Bio-ID sonuçlarında, CLIC4'ün mutasyonda görülmeyen, doğal versiyonlarına özgü olası etkileşim partnerlerinden sitokinezde görevli proteinler seçilmiştir. Floresan mikroskopuyla, CLIC4'ün ve etkileşim proteinlerin konumu sitokinezdeki hücrelerde görüntülenip analiz edilmiştir. CLIC4 ile etkileşim partnerleri arasındaki yakınlığı göstermek amacıyla yakınlık ligasyonu deneyi (Proximity-Ligation-Assay, PLA) yapıp analiz edilmiştir.

Bulgular: Bio-ID deneyiyle CLIC4'ün olası etkileşim partnerleri olarak, sitokinezde önemli rolleri olduğu bilinen Anillin, ALIX ve Ezrin proteinleri bulunmuştur. İmmünofloresan boyamalarla, CLIC4 ve etkileşim partnerlerinin bölünme boğumunda aynı yere konumlandığı görülmüştür. PLA deneyi, Anillin ALIX ve Ezrin proteinlerinin CLIC4 ile çok yakın konumlandığını ispatlamıştır. Kontrol hücrelerde aktif Ezrin bölünme boğumunda konumlanırken, CLIC4 ve CLIC1 proteinleri susturulmuş hücrelerde, aktif Ezrin proteinin bölünme boğumunda konumlanmadığı görülmüştür.

Sonuç: Bulgular, CLIC4 ve CLIC1'in bölünme boğumunda konumlanmasının, sitokinezin başarılı gerçekleşmesi için önemli bir aşama olduğunu göstermiştir. BioID deneyleriyle bulunan etkileşim partnerlerinden Ezrin proteini ile CLIC4'ün karşılıklı etkileşiminin hücrenin başarılı sitokinez gerçekleştirmesinde rol oynadığı belirlenmiştir (Üretmen Kağıalı vd., 2019).

P39

Alzheimer Hastalığı 5XFAD Modellemesi ile Metaproteomik Yöntemler Kullanılarak Bağırsak Florasının Araştırılması

Esra Ayan, Emel Akgün, Ahmet Tarık Baykal
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Bölümü

Amaç: Mantarlar, bakteriler, parazitler ve virüslerin kompozisyonundan oluşan insan bağırsağı, bireyden bireye değişen mikroçeşitlilik sergilese de, her bireyde sağlıklı olmanın azami koşulunu sağlayan çekirdek hükmünde bir mikrobiyota komünü vardır. Bu simbiyotik mikro-çevrenin miktarı ve kalitesindeki disbiyotik değişiklikler çok çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. Bunların başında nörodejeneratif hastalıklar da bulunmaktadır ki; kronik seyirli progresif bir Merkezi Sinir Sistemi dejenerasyonu olan ve zamanla bilinen patogenez neticesinde ölümlü karakterize olan Alzheimer Hastalığı (AH) bunlardan birisidir. Bu çalışmada, erken - geç evre (3 ve 12 aylık), AH hastası [5XFAD transgenik(tg)] ve normal fare modellerinin, birbirleri ve kendi içlerindeki kıyası neticesinde bağırsak flora farklılıkları ve bu farklılıkların beraberinde getirdiği proteom profil devinimleri nanoLC-MS/MS kullanılarak araştırılmıştır.

Yöntem: Biyolojik örneklerin dışkılarında tüm mikrobiyota izole edilmiş, yaklaşık 25 mg mikroorganizma izolatından da protein ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyondan 100 µg protein kullanılarak FASP (Filter Aided Sample Preparation) yöntemiyle peptitler elde edilmiştir. 200 ng/µL olacak şekilde de peptitler cihaza enjekte edilmiş 120 dk analize bırakılmıştır. Ham verilerden peptit tanımlanması ve kantitasyonu için Progenesis-QIP yazılımı kullanılmıştır. Analiz sonrası mikroorganizma taksonlarının ve proteinlerin ayrıntılı analizi için Unipept 4.0 yazılımı kullanılmıştır.

Bulgular: Erken - geç evre normal yaşlanma veya tg fare yaşlanması (3aylık'dan 12aylığa) kıyasında taxa ve proteom profillerinde değişimler gözlenmiştir. Aynı şekilde erken evreyi temsilen 3 aylıkların veya geç evreyi temsilen 12 aylıkların kendi içlerinde normal ve tg fare kıyasında taxa ve proteom profillerinde değişimler gözlenmiştir. Ayrıca normal yaşlanma sürecinde ortak olan veya hasta yaşlılığı sürecinde ortak olan taxa ve proteom profilleri birbirlerine göre devinim sergilemiştir.

Sonuç: Bu çalışma ilk olma özelliği ile literatüre ışık tutacaktır, ayrıca daha fazla tekrar edilebilirliğe olan ihtiyacı ile birlikte; hastalık semptomları kendini belli etmeden çok önceki dönemlerde bağırsakta gerçekleşen mikrobiyota, proteom ve dolayısıyla moleküler devinimler analiz edilerek, hem potansiyel biyobelirteç adaylarını tespit edilebilmek hem de hastalığın oluşum mekanizmasına ışık tutmak mümkün olabilir.

P40

Yenidoğan 5XFAD Transgenik Fare Modeli Beyin Dokusunda MALDI Görüntüleme Çalışmaları

İrep Uras¹, Merve Karayel Başar¹, Betül Şahin², Ahmet Tarık Baykal¹

¹ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

² Acıbadem Labmed Ar-Ge Merkezi

Amaç: Alzheimer Hastalığı (AH) yaş ilerledikçe unutkanlıkla ortaya çıkan, hafızada ve konuşmada bilişsel bozulmaların görüldüğü, en yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biridir. AH'nin ileri dönemleri üzerine yapılan çalışmalar birçok bilinmezi aydınlatırsa da hastalık patolojisinin hangi noktada başladığını ve bu başlangıç noktasında moleküler seviyede nasıl değişimler olduğu henüz aydınlatılamamıştır. Önceki proteomik çalışmalarımızda, yenidoğan proteomunun, literatürdeki postmortem AH insan proteomik çalışmalarıyla ve transgenik fare modellerinin semptomatik dönem proteomik çalışmalarıyla benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, AH'nin doğum kadar erken bir dönemde var olup, bazı mekanizmalarla susturulmuş gizli bir periyoda girerek, beynin hasarlara daha açık olduğu yaşlılık döneminde tekrar ortaya çıkıyor olabileceği fikrini doğurmuştur. Bu çalışmada, yenidoğan AH fare modeli beyindeki değişimlerin ayrıntılı incelenmesi ve AH patolojisinin erken evredeki moleküler izlerinin MALDI-IMS görüntüleme tekniği kullanılarak ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Yaşa bağlı motor fenotip ve hafıza kayıpları göstermesinin yanı sıra intranöral Aβ birikimi ve yaşa bağlı aksonal dejenerasyon gösterdiği için AH çalışmalarında kullanışlı bir in-vivo model olan 5 mutasyonlu AH transgenik fare modeli (5XFAD) kullanılmıştır. Yenidoğan (24saat) 5XFAD farelerden disekte edilen beyin dokularından cryostat (Thermo) yardımıyla kesitler Indium tin oxide (ITO) kaplı cam slaytlar üzerine alınmıştır. Tripsin uygulamasını takiben slaytlar, tripsinizasyon için inkübasyona bırakılmış ve ardından slaytlar üzerine peptit analizine uygun matrix olan DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid) uygulanmıştır. MALDI-IMS analizleri Bruker RapiFlex TissueTyper MALDI TOF/TOF cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MALDI-IMS ile elde edilen dokuya ait data SCILS 2D (Bruker) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular ve Sonuç: MALDI-IMS analizleri sonucunda elde edilen görüntülerin SCILS 2D yazılımı kullanılarak segmentasyon analizi yapılmış ve dokularda belirgin bir bölgesel ayrılma gözlemlenmiştir. Bu sonuç, bölgelerin birbirinden farklı proteomlara sahip olarak birbirinden ayrılabilirdiğini göstermektedir. MALDI-IMS görüntüleme analizleri, bize yenidoğan 5XFAD fare modelindeki beyin fizyolojisinin nasıl değiştiği konusunda ekspresyon çalışmalarıyla elde edilemeyen bölgesel bilgiler vermiştir. Bu ön çalışma sonucunda elde edilen verilerin erken evrede AH patolojisinin oluşum mekanizmalarını ortaya çıkaracağı düşünülmektedir.

P41

Doğal Alkaloid Bir Bileşiğin Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Üzerindeki Terapötik Etkisi

İrem Kırış¹, Merve Karayel Başar¹, Büşra Gürel¹, Betül Şahin², Jülide Coşkun², Tomasz Mroczek³, Ahmet Tarkan Baykal¹

¹ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya AD

² Acıbadem Labmed Ar-Ge Merkezi

³ Lublin University, Pharmacognasy

Amaç: Alzheimer Hastalığı (AH), yaşlılarda görülen demansın en yaygın formu olup, bilişsel bozulma, ileri davranışsal bozukluklar ve ölüm ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Dünyada en sık görülen ölüm sebeplerinde 5. sıradadır ve hala hastalığın ilerleyişini durduran ya da tersine çeviren bir tedavi bulunmamaktadır. Bu projedeki amaç, AH için umut vaadeden doğal bileşiklerin, ileri evre AH fare modelinde uygulanarak potansiyel ilaçların tespit edilmesini ve iyileştirici mekanizmalarının ortaya çıkarılmasını sağlamaktır.

Yöntem: 6 farklı doğal bileşik, 12 aylık (patolojik evre) 5 farklı ailesel Alzheimer mutasyonu taşıyan 5xFAD transgenik farelere i.p uygulandı (n=6-8). Pozitif kontrol olarak FDA onaylı AH ilacı, Galantamine kullanıldı. Morris Su Labirenti testi ile hafıza ve öğrenme üzerine etkileri araştırılarak, içlerinde en iyi gelişme gösteren bileşik seçildi. Kan-beyin bariyeri geçişi TSQ-MS ile araştırıldı. Hipokampus, korteks ve serebellum bölgelerinde LC-MS/MS ile protein ekspresyonundaki değişiklikler üzerinden ilacın etki mekanizması araştırıldı ve ilişkili yollar açığa çıkarıldı.

Bulgular: Bileşik 3 öğrenme ve hafızada istatistiksel olarak anlamlı iyileşme gösterirken, galantaminde anlamlı bir değişiklik bulunamadı. LC-MS/MS analizleri sonucunda, her beyin bölgesinden 2000'in üzerinde protein tanımlaması gerçekleştirildi ancak sadece korteks bölgesinde Bileşik 3 için 145, galantamine için 36 anlamlı ifade farklılığı gösteren protein tespit edildi ($p < 0.05$, $q < 0.05$, değişim kat sayısı > 1.3). Bu proteinlerden 26 tanesinin iki bileşikte ortak olduğu bulundu. Galantamine ve Bileşik 3 enjeksiyonu ile ortak değişen proteinler ve Bileşik 3'e özgü proteinlere ilişkin yolların AH'nin temel göstergelerinden amyloid beta ve tau patolojisi ile ilişkili olduğu belirlendi.

Sonuç: Bileşik 3'ün günümüzde ilaç olarak kullanılan galantamineden daha yüksek potansiyeli olduğu ve öğrenme ve hafızayı geliştirdiği açıkça gözlemlenmiştir.

Teşekkür: Sunulan datalar 215S168 No'lu TÜBİTAK-Polonya Araştırma Kurumu (NCBR) İkili İş Birliği çerçevesinde desteklenen "Alzheimer Hastalığı Tedavisine Yönelik Yeni Doğal Bileşiklerin Tanımlanması Ve Nörodejenerasyon Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi" başlıklı proje kapsamında elde edilmiştir.

P42

Multi-Omik Yaklaşımla İskelet Kası Rejenerasyon ve Farklılaşmasında Rol Oynayan Faktörlerin Meta-Analizi

Hasan Basri Kılıç, Çetin Kocaefe
Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Hücre dışı matris (ECM), iskelet kası gelişimi ve hasar tamirinde temel bir yapısal rol oynamaktadır. Bu süreçlerde kas hücreleri ve diğer stroma hücrelerden salgılanan yapısal proteinler ECMi şekillendirmektedir. Kronik hasar etkisi ile uzamış tamir süreci, geri dönüşümsüz protein birikimine yol açar ve fibrozis olarak isimlendirilir. Tüm organlarda, fibrozisin benzer bir şekilde ilerlediği bilinmekte, işlev kaybı ve organ yetmezliklerine neden olmaktadır. Moleküler temellerinin aydınlatılması ile fibrozisin durdurulması veya yavaşlatılması mümkün olabilir. Bu amaçla, ECM birikimi ve olgunlaşması sürecini düzenleyen faktörlerin anlaşılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, iskelet kasında fizyolojik ve patolojik süreçlere ait transkriptom ve proteom verilerini kullanarak, ECM birikimi, olgunlaşması ve fibrozis sürecindeki yeni oyuncuları ve düzenleyicileri tanımlamaktır.

Yöntem: İnsan, fare ve sıçana ait in vivo ve in vitro iskelet kası gelişimi, hasar tamiri ve patolojilerine ait yedi transkriptom verisi BRB Array Tools ile incelenmiş, bioconductor paketleri ve DAVID arayüzü ile adlandırılmıştır. Anlamlılık koşullarını ($p < 0.01$) sağlayan genler, iki kat değişimi ve ECM yerleşimine göre (sinyal dizisi) filtrelenmiş ve ortak ifade ağı ortaya konmuştur. Bu bulguların protein düzeyinde doğrulanması amacıyla myoblast ve myotüp salgı proteomları (sekretom) ve kemik iliği kökenli mezenkimal stromal hücreleri sekretomları karşılaştırılmıştır. MaxQuant (1.6.10) ile ham MS verileri analiz edildikten sonra Perseus (1.6.10) yardımıyla istatistiksel olarak anlamlandırılmıştır.

Bulgular: Gerçekleştirilen meta-analiz, iskelet kası gelişimi ve tamiri süreçlerine dahil olan ortak ve farklı kolajen proteinlerini ortaya koymuştur. Fibrozis süreci ile ilişkili bilinen ECM düzenleyicileri (TIMPLer, BMPLer vd.) gözlenmiştir. Güdümsüz kümeleme analizi yaklaşımla ECM gelişimi ve düzenlenmesi ile ilişkisi bilinmeyen 108 yeni gen keşfedilmiştir. Proteom verileri bu genlerin önemli bir kısmını desteklenmektedir. Bu doğrultuda, Bilinen yapısal genler ve sinyal iletim süreci yanında olası bir tedavi hedefi olarak değerlendirilebilecek yeni sinyal molekülleri ve yeniden modelleme düzenleyicileri tanımlanmıştır.

Sonuç: Bu çalışma ile elde edilen yeni sinyal moleküllerinin işlevsel kavram kanıtlarının ortaya konması ile fibrozis tedavisine yönelik yeni hedefler tanımlanmış olacaktır.

P43

Tiroid Kanseri İçin Metabolizma Tabanlı Yeni Nesil Tanı Modeli

Dilek Kazan, Dilan İnan, Dilara Yerli, Rahime Ersoy, Kazım Yalçın Arga
Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

Amaç: Bir endokrin organı olan Tiroid bezi, vücut fonksiyonlarının düzenlenmesinden büyüme ve gelişime kadar pek çok metabolik aktivitede etkin rol alan çok önemli bir organımızdır. Tiroid bezinin az ya da fazla çalışması durumunda ortaya çıkan hastalıkların yanı sıra, nodüller ve tiroid kanserleri sık görülen tiroid hastalıklarıdır. Son yıllarda, tiroid kanseri vakaları dünya çapında artış göstermektedir. Papiller (PTC), foliküler (FTC), zayıf farklılaşmış (PDTC) ve anaplastik (ATC) olmak üzere dört ana alt-tipte sınıflandırılan tiroid kanserleri arasında, PTC tipi tüm vakaların yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Öte yandan, ATC tipi ise en ölümcül alt-tip olarak karşımıza çıkmaktadır. Ultrason ile tanılmanın tiroid kanserlerindeki artışa sebep olmasının yanı sıra iyonize radyasyona maruz kalma, iyot eksikliği ve ailede benzer kanser türlerinin görülmesi başlıca risk faktörleri olarak rapor edilmektedir. Bunun yanı sıra, yaşam tarzı ve çevresel risk faktörleri de tiroid kanserindeki artışın sebepleri arasında yer almaktadır. Metabolom, gen-çevre etkileşiminin son ürünlerinden biri olarak ortaya çıkması sebebi ile tiroid kanserlerinin birbirine dönüşümünü anlamakta ve ortak biyobelirteçlerin belirlenmesinde yardımcı olabilir.

Yöntem: Yukarıdaki açıklamalar ışığında, bu çalışmada 2006-2019 yılları arasında Science Direct, PubMed, Google Scholar vb. veri tabanlarında yayınlanan çalışmaların kapsamlı bir taraması yapılmış ve yüksek güvenilirlikli deneysel yöntemlerle tiroit kanseri türleri ile ilişkisi ortaya konmuş metabolitler belirlenmiştir.

Bulgular ve Sonuç: Metabolitlerin biyokimyasal ve metabolik yolak bazlı sınıflandırmaları yapılmış, biyolojik süreçlerle ilişkileri ortaya konmuş; böylelikle tiroid kanser alt-tiplerinin metabolizma seviyesinde moleküler benzerlikleri ve farklılıkları araştırılmış, tiroid kanserleri ile ilişkili metabolik yollar tespit edilmiş ve yapay zeka yaklaşımları ile metabolizma tabanlı tanı modellerinin geliştirilmesi için gerekli kurgu oluşturulmuştur.

P44

DnaK ATPaz Domeni Nükleotit Bağlanma Dinamiklerinin IM-MS İle İncelenmesi

Baran Dingiloğlu¹, Melis Korkmaz¹, Gizem Dinler Doğanay²

¹ İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji

² İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Amaç: Bir ısı şoku proteini olan Hsp70, şaperon ailesinde en çok korunan ve hücre içinde aktif olarak ifade edilen proteinlerden biridir. Hsp70 en temel görevi olan protein katlanmasını, allosterik modülasyona dayanan, substrat bağlanma domeni (SBD) ve nükleotit bağlanma domeni (NBD) arasındaki çift yönlü iletişim ile sağlar. Diğer bir deyişle, ATP molekülünün NBD'ye bağlanması, SBD'de substrat yüksek ilgili kapalı-kapak konformasyonundan, substrat düşük ilgili açık-kapak konformasyonuna geçişini uyarır. Bu çalışmada, iki domen arası köprü vazifesini gören

388VLLL392 amino asit dizisini içeren ve içermeyen iki farklı NBD'den oluşan DnaK (Hsp70 bakteriyel homoloğu) 388 ve 392 moleküllerinin pH ve kon gerilimi (cone voltage) değişimlerine ek olarak ATP bağlanmasının molekülün yapısal dinamiklerinin üzerindeki etkisinin açıklanması amaçlanmıştır.

Yöntem: DnaK-388(linker-) ve DnaK-392(linker+) içeren vektörler BB1553 (Δ dnaK) hücrelerine aktarılmıştır. Rekombinant olarak üretilen bu iki Hsp70 nükleotit bağlanma domeni homoloğu FPLC yardımıyla saflaştırılmıştır. Saflaştırılan rekombinant DnaK 388 ve 392'nin farklı pH ve kon gerilimleri altında, ATP varlığında ve yokluğundaki dinamikleri IM-MS tekniği ile incelenmiştir.

Bulgular: Bu çalışmada elde edilen veriler neticesinde, DnaK 388 ve 392 molekülleri arasındaki temel farklılık olan NBD ve SBD domenleri arası bir nevi köprü görevi gören amino asit sekansının DnaK'nin konformasyonel dağılımlarını düzenlediği ve NBD'nin değişen ortam şartlarına gösterdiği dinamik değişimlerde görev aldığı bulunmuştur.

Sonuç: Tüm bu çalışmalar sonucunda DnaK'nin linker üzerinden pH'a bağlı olarak nükleotit bağlanma domeni (NBD) dinamiğini etkilemekte olduğu gösterilmiştir. Hsp70 linker bölgesinin protein-protein etkileşimlerine bağlı hastalıklarda olası ilaç hedefi olma potansiyeli vurgulanmıştır.



Proteomik Derneği

İçerenköy Mah. Kayışdağı Cad. No: 32 Ataşehir, İstanbul

T: 0216 500 4060

F: 0216 576 5468

E. turkishproteomicssociety@gmail.com

www.proteomikderneği.org



Ergenekon Mah. Poyraz Sok. No:15 D:2 34373

Harbiye, Şişli, İstanbul

W: www.evronas.com

E: info@evronas.com

T: 0212 296 0460

F: 0212 296 0461