ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Tüberküloz ve Sarkoidozun Ayırıcı Tanısı İçin Proteomik Profillerin Belirlenmesi

Burcu SAYGIDEĞER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Nisan, 2025

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ONAYI

Tüberküloz ve Sarkoidozun Ayırıcı Tanısı İçin Proteomik Profillerin Belirlenmesi

---

Burcu SAYGIDEĞER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Doktora Tezi 29/04/2025 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ (Danışman) ……

: Prof. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN ……

: Doç. Dr. Sedat KULECİ ……

: Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN ……

: Dr. Öğr. Üyesi Merve NENNİ ……

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: TDK-2023-15903

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ V
SİMGELER VE KISALTMALAR VII
1. GİRİŞ 1
1.1. Granülömatöz Hastalıklar 2
1.1.1. Tüberküloz 2
1.1.2. Sarkoidoz 5
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 21
3. MATERYAL VE METOT 25
3.1. Hematoksilen-Eozin boyama (HxE boyama) (Patolojik inceleme) 25
3.2. PET/BT Görüntülemesi 26
3.3. Doku örneklerinin temini 27
3.4. Deparafinizasyon 27
3.5. Doku Homojenizasyonu 28
3.6. 3 Fazlı çöktürme ile Protein izolasyonu 29
3.7. BCA Yöntemi ile Total Protein tayini 29
3.8. Proteomik numune hazırlanması 30
3.8.1. Indirgeme ve Alkilleme 30
3.8.2. Enzimatik parçalama 31
3.8.3. Peptit temizliği 31
3.9. LC-QTOFF-MS protokolü 32
3.10. LC-QTOFF-MS analizi için PEAKS Studio protokolü 32
3.10.1. İnsan FASTA'sı kullanılarak yapılan analiz protokolü 33
3.10.2. *Mycobacterium tuberculin* FASTA'sı kullanılarak yapılan analiz protokolü 34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 36
4.1. Örnek bir tüberküloz hastasının patolojik tanısı ve pet bulguları 36
4.1.1. Patolojik Tanı 36
4.1.2. Pet bulguları 37
4.2. Örnek bir sarkoidoz hastasının patolojik tanısı ve pet bulguları 37
4.2.1. Patolojik tanı 37
4.2.2. Pet bulguları 38
4.3. Proteomik analizler 39

4.3.1. İnsan FASTA'sı kullanılarak yapılan proteomik analiz sonuçları 39
4.3.2. Tüberküloz ve Sarkoidoz arasında farklılaşan proteinlerin etkileşimde olduğu diğer proteinler 49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 76
KAYNAKLAR 78
ÖZGEÇMİŞ 86

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Tüberküloz ve Sarkoidozun Ayırıcı Tanısı için Proteomik Profillerin Belirlenmesi

Burcu SAYGIDEĞER

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Tüberküloz ve sarkoidoz, klinik, radyolojik ve patolojik eş zamanlı değerlendirmelere rağmen bazen kesin tanı için yeterli kritere sahip olmayan iki granülomatöz hastalıktır. Tüberküloz ve sarkoidozun ayırıcı tanısı için, her iki hastalık grubundan kesin tanı alan 10'ar hastadan elde edilen toplam 20 parafinize lenf dokusu örneği, total protein izolasyonu ve ardından peptidlerine ayırmak üzere bir seri işlemden geçirilmiş ve LC-QTOFF-MS cihazı ile peptid analizi yapılmıştır. Sonuçlar, Peaks Studio 12 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Hem insan (human) proteomu hem de *Mycobacterium tuberculin* proteomu için database olarak UniProtKB kullanılmış, biyoinformatik ve istatistiksel olarak bu iki hastalık arasında anlamlı fark tespit edilen proteinler belirlenmiştir. İnsan proteomu temel alınarak yapılan analizde log2 değerleri anlamlı düzeyde fark gösteren (2 kat) proteinler dikkate alınmış, Tüberkülozda upregüle olurken sarkoidozda downregüle olan 5 farklı protein, sarkoidozda upregüle olup, tüberkülozda downregüle olan 7 farklı protein tespit edilmiş ve STRING programı ile yolak analizleri yapılarak ilişkili diğer proteinler tespit edilmiştir. Ayrıca tüberküloz hastalarına ait lenf dokularında ortak olarak sarkoidozdan farklı 6 *Mycobacterium tuberculin* proteinine rastlanmıştır. Bu çalışma, tüberküloz ve sarkoidozda farklılaşan proteinlerin tespit edilmesi ile bu iki hastalığın ayırıcı tanı kriterlerinin keşfedilmesi için bundan sonraki çalışmalara ışık tutmuştur.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz, Sarkoidoz, Proteomik, LC-QTOFF-MS, *Mycobacterium tuberculin.*

CUKUROVA UNIVERSITY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

PhD THESIS

Determination of Proteomic Profiles for Differential Diagnosis of Tuberculosis and Sarcoidosis.

Burcu SAYGIDEĞER

Advisor: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ

Department of Biotechnology

ABSTRACT

Tuberculosis and sarcoidosis are two granulomatous diseases that sometimes do not have sufficient criteria for definitive diagnosis despite simultaneous clinical, radiological and pathological evaluations. For the differential diagnosis of tuberculosis and sarcoidosis, a total of 20 paraffinized lymph tissue samples obtained from 10 patients with definitive diagnoses from each disease group were subjected to a series of processes to isolate total protein and then separate peptides, and peptide analysis was performed with the LC-QTOFF-MS device. The results were analyzed using the Peaks Studio 12 program. UniProtKB was used as a database for both human proteome and *Mycobacterium tuberculin* proteome, and proteins with significant differences between these two diseases were determined bioinformatically and statistically. In the analysis based on human proteome, proteins with significant differences in log2 values (2-fold) were taken into account, 5 different proteins that were upregulated in tuberculosis and downregulated in sarcoidosis, 7 different proteins that were upregulated in sarcoidosis and downregulated in tuberculosis were detected, and other related proteins were detected by performing pathway analyses with the STRING program. In addition, 6 *Mycobacterium tuberculin* proteins that were different from sarcoidosis were found in common in lymphoid tissues of tuberculosis patients. This study sheds light on future studies to discover the differential diagnosis criteria of these two diseases by detecting proteins that differ in tuberculosis and sarcoidosis.

Keywords: Tuberculosis, Sarcoidosis, Proteomics, LC-QTOFF-MS, *Mycobacterium tuberculin*.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarımda, tüm yardımseverliğiyle, bilgi ve ekipman donanımıyla benden desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Beni ikinci kez doktora yapmaya teşvik eden, tez konumun belirlenmesinde ve tezimin her aşamasında emeği geçen, bana laboratuvarının kapılarını ardına kadar açan, bilgi ve tecrübesiyle beni destekleyen ablam Doç. Dr. Yasemin Saygıdeğer'e şükranlarımı sunuyor, ayrıca emeği geçen Saygıdeğer Lab üyelerine çok teşekkür ediyorum. Meryem Köse ve Mehmet Yağız Çapanoğlu başta olmak üzere, laboratuvar ekibimizde emeği geçen tüm lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma ve doktora sonrası araştırmacı sayın Dr. Hamide Doğan'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yoğun tempomdan dolayı enerjimi ve ilgimi zaman zaman eksik ettiğim ve bana bu konuda sabır gösteren sevgili aile üyelerime (kedilerim dahil) başta canım kızlarım Simay ve Melis Demir'e teker teker minnet borçluyum. Her zaman arkamda duran, tüm öğrenim hayatımda maddi manevi destek olan, tecrübeleriyle bana ışık tutan, koca çınarlarım canım annem ve babama sonsuz kez teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. QTOF LC/MS Gradient elüsyon protokolü 32
Çizelge 4.1. Tüberküloz hastalarının FFPE dokularında tespit edilen *Mycobacterium tuberculin* proteinleri 73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. (A) İnsanlarda TB enfeksiyonunun patolojisi, (B) Anti-TB ilaçlarının uygulama yolları **(Grotz ve ark., 2018).** 5
Şekil 1.2. Sarkoidoza genetik ve çevresel faktörlerin etki edebileceği farklı yollar (Rossides ve ark., 2023). 6
Şekil 3.1. Deneysel akım diyagramı 25
Şekil 3.2. FFPE granülomatöz lenf doku örnekleri 27
Şekil 3.3. Deparafinizasyonun ardından elde edilen granülomatöz lenf doku örnekleri 28
Şekil 3.4. Sonikasyon ile dokuların homojenize edilmesi (Üst), Oluşan süpernatantın yeni bir tüpe aktarılması ve 3 fazlı sistemle protein izolasyon aşaması (Sağ alt) 29
Şekil 3.5. Protein standart grafiği (BCA yöntemi) 30
Şekil 3.6. Vakum konsantratör cihazı ve elüe edilmiş proteinlerin konsantratörde kurutulduktan sonraki görüntüsü (beyaz katı). 31
Şekil 4.1. Nekrotizan granülomatöz inflamasyon odağı. H&Ex40; H&Ex400 36
Şekil 4.2. Nekrotizan granülom odağında merkezde kazeifiye granülomatöz iltihap ve çevresinde langhans tipi dev hücreler görülmekte H&Ex400; H&Ex400....36
Şekil 4.3. Bir Tüberküloz hastasına ait PET-CT akciğer F-18 FDG Tutulumu Pet bulgusu.... 37
Şekil 4.4. Nonnekrotizan granülomatöz inflamasyon odağı.H&Ex100; H&Ex200 38
Şekil 4.5. Bir Sarkoidoz hastasına ait PET-CT akciğer F-18 FDG Tutulumu.... 39
Şekil 4.6. Tüberküloz ve Sarkoidoz proteinlerinin Heat Map grafiği ile karşılaştırılması 40
Şekil 4.7. MPDZ_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı. 41
Şekil 4.8. ABTB2_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı. 41
Şekil 4.9. P2RX3_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı. 42
Şekil 4.10. UBP37_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı. 43
Şekil 4.11. EMAL5_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.... 44
Şekil 4.12. RNFT2_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.... 45
Şekil 4.13. STRP1_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.... 45
Şekil 4.14. PPM1D_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı. 46
Şekil 4.15. CA2D2_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.... 47
Şekil 4.16. ZNF3_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.... 48
Şekil 4.17. IP6K3 proteininin üç boyutlu yapısı.... 48
Şekil 4.18. AHNK_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.... 49
Şekil 4.19. MPDZ proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler. 50
Şekil 4.20. ABTB2 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.... 52
Şekil 4.21. P2RX3 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.... 53
Şekil 4.22. USP37 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler. 55

Şekil 4.23. EML5 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler. 57
Şekil 4.24. RNFT2 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler. 59
Şekil 4.25. STRP1 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler. 61
Şekil 4.26. PPM1D proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler. 63
Şekil 4.27. CACNA2D2 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler. 65
Şekil 4.28. ZNF3 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler. 67
Şekil 4.29. IP6K3 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler. 69
Şekil 4.30. AHNAK proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler. 71

SİMGELER VE KISALTMALAR

LC-TOFF-MS : Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
LC : Sıvı kromatografisi
BCG : Bacillus Calmette-Guerin
MS : Kütle Spektrometrisi
TMT : Tandem kütle etiketi
TB : Tüberküloz
Mtb : Mycobacterium tuberculosis
COVID-19 : Corona virus disease (Korona virüs hastalığı)
HIV : İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
INH : İzoniazid
RIF : Rifampisin
BALF : Bronkoalveolar lavaj sıvısında
HLA : İnsan lökosit antijeni
LS : Löfgren sendromu
BT : Bilgisayarlı tomografi
MRG : Manyetik rezonans görüntüleme
18F-FDG-PET : Florin-18 florodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi
2DE : İki boyutlu jel elektroforezi
MudPIT : Çok boyutlu protein tanımlama teknolojisinin
SILAC : Kararlı izotopla etiketleme
ICAT: : İzotopla kodlanmış afinite etiketleri
ITRAQ : Göreceli ve mutlak ölçüm için izotop etiketleme
Da : Dalton
Arg : Arjinin
Lys : Lizin
His : Histidin
Asp : Aspartat
Glu : Glutamat
ESI : Elektrosprey İyonizasyon
MALDI : Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon
EI : Kimyasal iyonizasyon
CI : Elektron iyonlaşması

APCI : Atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon
UV : Ultraviyole
TOF : Uçuş zamanlı
QIT : Kuadropol iyon kapanı
LIT : Doğrusal iyon kapanı
FT-ICR : Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı
Q : Kuadropol
HCD : Yüksek Enerji Çarpışmasına Bağlı Ayrışma
FWHM : Full Width at Half Maximum
MS/MS : Tandem kütle spektrometrisi
HCD : Yüksek Enerji Çarpışmasına Bağlı Ayrışma
FASP : Filtre destekli örnek hazırlığı
SDS : Sodyum dodesil sülfat
TCA : Tri kloro asetik asit
RNA : Ribonükleik asit
ELISA : Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
ROC : Çalışma karakteristik eğrisi
SAA : Serum amiloid A
DEG : Farklı ifade edilen gen
BAL : Bronkoalveolar lavaj
PTB : Akciğer tüberkülozu
LRTI : Alt solunum yolu enfeksiyonu
MIP : Maximum Intensity Projection
FFPE : Formalin fiksasyonu ve parafin gömme
HxE : Hematoksilen-Eozin
µL : Mikrolitre
mL : Mililitre
µg : Mikrogram
nM : Nanomolar
mM : Miktomolar
BCA : Bikinkonik asit
DTT :1,4-Dithiothretiol
IAA : İyodoasetamid
TFA : Trifloroasetik asit

ACN : Asetonitril

FA : Formik asit

ANOVA : Varyans analizi

TIC : Toplam iyon kromatogramı

FASTA : Text formatında protein sekansı

Ppm : Milyonda bir

LAP : Lenfadenopati

SUV : Standardize edilmiş alım değeri

PET-CT : Pozitron Emisyon Tomografisi-Bilgisayarlı tomografi

GTPaz : Guanozin trifosfataz

ATP : Adenozin trifosfat

DNA : Deoksi ribonükleik asit

EMT : Epitelyal mezenkimal geçiş

Aa : Aminoasit

1. GİRİŞ

Mediastinal benign lenfadenopatinin en sık nedenleri sarkoidoz ve tüberküloz lenfadenit hastalıklarıdır. Sarkoidoz, çoğunlukla akciğer ve intratorasik lenf nodları olmak üzere birçok organ, doku ve sisteminde tutulum yapan granülamatöz bir hastalıktır. Hastalığın tanısı için klinik ve radyolojik bulguların uygun olması, histopatolojik olarak, kazeifikasyon içermeyen granülomların gösterilmesi, benzer klinik ve histopatolojik tabloların dışlanması gereklidir **(Hunninghake ve ark., 1999)**. Tüberküloz en çok akciğerleri tutmakla birlikte hastaların %15'inde en çok lenf nodları olmak üzere diğer organ ve dokuları da etkilemektedir. Bakteriyolojik tanı konulması oldukça zordur. Ekstrapulmoner tüberkülozda, basil sayısı azlığı ya da ulaşılması zor yerlerdeki tutulum nedeniyle, bakteriyolojik tanı konulması akciğer tüberkülozuna göre daha zordur. Radyolojik incelemeler de tanı koydurmaktan çok tanıyı yönlendirici olabilmektedir. Ayırıcı tanıda halen kullanılmakta olan tüberkülin cilt testi, BCG aşısı ve non tüberküloz mikobakteri enfeksiyonları nedeniyle yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir **(Özsarı ve ark., 2017)**.

Laboratuvar bulguları, Klinik ve radyolojik bulgular, serum anjiotensin konverting enzim düzeyi ve tüberkülin testi kombinasyonları ile büyük oranda ayırıcı tanı yapılabilse de sarkoidoz ve tüberkülozun birbirinden ayırt edilmesi tüberküloz prevalansının yüksek olduğu Türkiye gibi ülkelerde hiç de kolay değildir ve bu durum yanlış tanı konulmasına yol açmaktadır **(Tabak ve ark., 2001)**. Özellikle ileri yaşlardaki kronik sarkoidoz ile akciğer tüberkülozunun klinik tablosunu, ayırt etmek oldukça güçtür **(Aktoğu ve ark., 1996; Çağlayan ve ark., 1997)**. Klinik belirti ve bulguların birbirine benzemesi, sarkoidozun çok iyi tanınmaması ve nadir görülen bir hastalık olduğuna inanılması bu iki hastalığın tanısında güçlük yaratan konulardandır **(Aktoğu ve ark., 1996)**.

Akciğer tüberkülozu radyolojik olarak daha çok üst loblarda ve kavitasyonla seyreden infiltrasyonlar ile karakterizedir. Ancak erişkin yaşlarda görülen daha çok mediastinal lenfadenopati ile seyreden primer hastalık ya da akciğer parankim tutulumu olmayan tüberküloz olgularında radyolojik tanı güç olabilir. Tüberkülozda çoğunlukla asimetrik hiler lenfadenopati veya mediastinal izole lenfadenopati görülürken, sarkoidozda hemen hemen aynı büyüklükte bilateral hiler lenfadenopati ve çoğunlukla beraberinde sağ paratrakeal lenfadenopati görülmektedir **(Öğretensoy ve ark., 1990; Kocabaş ve ark., 1994; Jindal ve ark., 2000)**. Sarkoidozda bilateral hiler lenfadenopati genellikle asemptomatiktir ancak semptomatik hastalarda aynı tabloda tüberküloz tanısı konmadan önce sarkoidoz da düşünülmelidir.

Tüberkülin testi de ayırıcı tanıda yetersiz kalmaktadır. Sarkoidozlu hastalarda tüberkülin testinin negatif olması, tüberküloz infeksiyonu olmadığını göstermez. Tüberkülin testi pozitif olan hastalarda sarkoidoz gelişmesi ile tüberkülin testinin negatifleştiği gözlenmiştir (**Baran ve ark.,**

1996). Ancak sarkoidozlu hastalarda tüberkülin testi her zaman negatif olmayabilir. Bu duruma özellikle, BCG aşısının rutin olarak yapıldığı veya tüberküloz prevalansının yüksek olduğu Türkiye gibi ülkelerde çok rastlanır. Tüberkülin testinin pozitif olduğu sarkoidozlu hasta popülasyonu literatürde % 0-36 arasında belirtilmiştir **(Hudspith ve ark., 1987; Kataria ve Holter, 1994; Mert ve ark., 2000; Cotter ve Bredin, 1995)**.

Sarkoidozun histopatolojik morfolojisi nonkazeifiye granülomlarla karakterizedir. Nadiren granülomlar fokal koagülasyon nekrozu içerirler **(Kolek, 1994)**. Tüberkülozda ise karakteristik olan granülomlar içerisinde yaygın kazeifikasyon nekrozudur. Yine de her iki hastalıkta da klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik incelemeler birbirleriyle uyumlu olmadıkça morfolojik açıdan net bir ayrım yapmak mümkün değildir. Ayrıca her iki hastalık birlikte de görülebilir **(Kolek, 1994; Christ, 1987)**.

Proteom, biyolojik bir sistemdeki (örneğin hücre, doku, organizma) proteinlerin tamamını ifade eder. Proteomik, çoğunlukla büyük hassasiyet ve verim sağlayan kütle spektrometrisi ile gerçekleştirilen, proteinlerin ve proteomların büyük ölçekli deneysel analizidir. Özellikle karmaşık protein karışımları için aşağıdan yukarıya kütle spektrometrisi standart yaklaşımdır. Aşağıdan yukarıya proteomikte, proteinler spesifik bir proteaz ile peptitlere sindirilir ve ölçülen peptitler in silico karşılık gelen proteinlere yeniden birleştirilir. Kütle spektrometresinin içinde sadece peptitler ölçülmez (MS1 seviyesi), aynı zamanda peptitler de tekrar ölçülen daha küçük peptitlere bölünür (MS2 seviyesi). Bu, tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) olarak adlandırılır. Peptitlerin tanımlanması, girdi protein veri tabanından (fasta dosyası) üretilen teorik spektrumların ölçülen spektrumlarla peptit spektrum eşleştirmesi ile gerçekleştirilir. Peptit miktar tayini çoğunlukla MS1 seviyesindeki peptit tepe noktalarının eğrisinin altında kalan alan ölçülerek gerçekleştirilir, ancak TMT (Tandem kütle etiketi) gibi özel teknikler peptitlerin MS2 seviyesinde ölçülmesine izin verir. Günümüzde, aşağıdan yukarıya tandem-kütle spektrometrisi yaklaşımları, birkaç bin proteinin tanımlanmasına ve nicelenmesine izin vermektedir.

Bu çalışmada, tüberküloz ve sarkoidozun ayırıcı tanısı için biyobelirteç keşfedilmesi amaçlanmıştır. Bunun için kesin sarkoidoz ve kesin tüberküloz tanısı almış hastaların parafinize lenf dokusu proteinleri LC-QTOFF-MS cihazı ile analiz edilip sonuçlar Peaks Studio biyoinformatik analiz programı ile yorumlanmıştır. Bu sayede bu iki hastalığın proteomik profilleri birlikte kıyaslanarak, ortak ve ortak olmayan proteinler belirlenmiştir.

1.1. Granülomatöz Hastalıklar

1.1.1. Tüberküloz

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) etkeni ile oluşan tanısı, tedavisi ve engellenmesi oldukça güç olan bir akciğer hastalığıdır **(Bloom ve ark., 2017)**. Binlerce yıldır insan

patojeni olan TB, COVID-19 salgınıyla birlikte en yaygın bulaşıcı hastalıklar sıralamasında ikinci sırayı almıştır **(Pallett ve Houston, 2021)**. Mtb'nin tüberküloza neden olduğu 1882 yılında keşfedilmesine rağmen genom dizisi çok uzun yıllar sonra tamamlanabilmiştir. Tanısal Mantoux deri testi ve interferon-gama salınım testi (IGRA) gibi testler ile TB tanısı konulsa da karmaşık tanısal ölçütlere sahip olduğundan sınırlamalara sahiptir. Şöyle ki balgam ve doku örneklerinde bakterinin çoğalması yavaş ve az sayıda olması tanıyı güçleştirmektedir. Son zamanlarda üzerinde çalışmaların devam ettiği, moleküler nükleik asit amplifikasyon testlerinin (NAAT'ler), doğrulayıcı TB tanısında kullanımı bu zorluğu bir miktar engellemiştir **(Tobin ve Tristram, 2025)**.

Tanısı gibi tedavisi de oldukça güç olan TB'nin tedavi rejimleri; enfeksiyon evresine, anatomik lokalizasyonuna, konakçının bağışıklığına ve yaşına, komorbiditelerin varlığına, toksisite gelişimine, ilaç-ilaç etkileşimlerine ve bakterinin direnç durumuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Bu zorluklar ile birlikte TB'ye karşı ilk antibiyotiklerin geliştirilmesi 20. yüzyılı bulmuştur. Antibiyotik tedavileri ile direnci artan TB'nin tedavisinde yeni antibiyotik kombinasyonlarının uygulanması gerekmektedir. TB tedavisindeki diğer bir zorluk tedavi süresinin oldukça uzun olmasıdır **(Huaman ve Sterling, 2019)**.

Spesifik olmayan semptomları ve kolay bulaşması nedeniyle TB'nin fark edilmesi ve önlenmesi oldukça zordur. Ayrıca düşük gelirli ülkelerde, kamu sağlığı kaynakları zengin olan ülkelere oranla TB daha yaygın görülen bir hastalıktır **(Parsons ve ark., 2011)**. Dünya Sağlık Örgütü 2022 verilerine göre tüberküloz 1,3 milyon ölüme neden olmuştur **(Global tuberculosis report, 2023)**. 2022 yılında 7,5 milyon tüberküloz teşhisi konulmuş ve %46 ile en fazla vaka Güneydoğu Asya'da kaydedilmiştir. Bu sayı 1995'ten beri en yüksek vaka sayısıdır. Dünya genelinde tespit edilen 10,8 milyon aktif vakadan 6 milyonunu erkek, 3,5 milyonunu kadın ve 1,3 milyonunu çocuk oluşturmaktadır. Bununla birlikte 2024 Dünya Tüberküloz raporuna göre dünya nüfusunun %25'i Mtb ile enfekte durumda iken bu sayının %5-10'unda aktif tüberküloz ortaya çıkabilmektedir **(Global tuberculosis report, 2023)**.

2020 ve 2022 yılları arasında COVID-19 pandemisi nedeniyle TB tanısında ve vaka tespitinde ciddi aksamalar olmuştur. Halk sağlığındaki bu aksamalar nedeniyle latent vaka sayısında azalma ve aktif vaka sayısında artış meydana gelmiştir. COVID-19 pandemisi sürecinde bu aksamalar nedeniyle TB kaynaklı ölüm sayısında artış gerçekleşmiştir. Oysa TB kontrol çabaları neticesinde 1995 ile 2014 yılları arasında yaklaşık 300 bin kişinin TB'ye yakalanmasını önledi ve böylelikle yüksek miktarda maddi tasarrufu sağlamıştır **(Martin-Hughes ve ark., 2022)**.

TB Etiyolojisi

Tüberküloz nedeni olan *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), aerobik, spor üretmeyen, hareketsiz ve basil formunda bakterilerdir. Mtb'nin hücre duvarının lipit konsantrasyonu hızlı boyanmasını sağlarken besiyerinde yavaş büyümesi tanıda güçlüğe neden olabilmektedir. Genellikle insanları enfekte eden Mtb hayvanlarda da hastalığa neden olabilmektedir. Hücre içi patojen olan Mtb ile enfeksiyon sonrası bulaş insanlarda subakut ve ilerleyici bir yönde

ilerleyebilmektedir. Şöyle ki enfekte olan hücrelerde Mtb uzunca bir süre uykuda kalabilir, hastalık meydana getirebilir veya hiçbir hastalık bulgusu gözlemlenmeyebilir. Mtb'nin bu farklı davranış biçiminin immünolojik ve moleküler mekanizmaları henüz tam anlamıyla anlaşılamamaktadır **(Jilani ve ark., 2025)**.

TB Epidemiyoloji

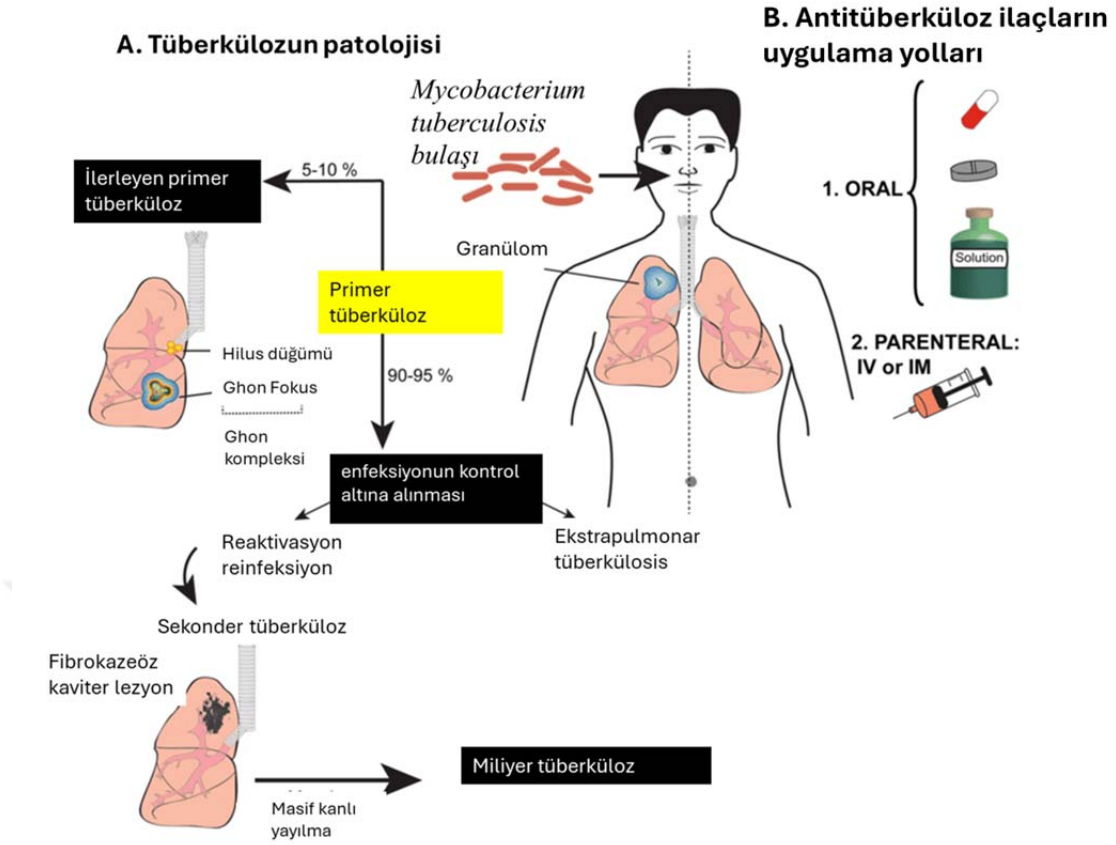
Mtb ile enfekte olan bireylerde hastalık %90 oranında uyku halindedir (latent). Mtb bulaşını takiben 2 yıl içinde hastalık ortaya çıkabilmektedir. Bazı insanlarda ise bu süre daha da uzayabilmektedir. Bağışıklık sisteminin baskılanması, alkol ve tütün kullanımı gibi faktöreler tüberkülozun aktifleşme süresini etkileyebilmektedir. Bağışıklık sistemi, yaşlılıkta birlikte bağışıklık sisteminin yaşlanması, genetik rahatsızlıklar, insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), kortikosteroidlerin uzun süreli kullanımı gibi nedenler ile baskılanabilmektedir **(Boom, Schaible, ve Achkar, 2021)**.

TB-İlaç Direnci

TB'de karşılaşılan en büyük problemlerden biri de ilaç direncidir. Ciddi bir halk sağlığı problemi haline gelen bu problem yeni olguların %13'ünde ve tekrarlayan olguların %17'sinde izoniazid (INH) ve rifampisin (RIF) direnciyle ortaya çıkmaktadır **(Palomino ve Martin, 2014)**.
TB'de ilaç direnci; Rifampisin dirençli, INH'ye dirençli, diğer TB ilaçlarına dirençli, RIF'e duyarlı-INH'ye dirençli, çoklu ilaca dirençli hem RIF'e hem de INH'ye dirençli, yaygın olarak ilaca dirençli olacak şekilde belirlenmiştir. Ayrıca RIF, INH, florokinolon ve kapreomisin, kanamisin ve amikasin gibi enjekte edilebilir ilaçlara dirençli TB tespit edilmiştir. TB'de ilaç direnci tedavi yöntemlerinde karmaşıklığa neden olmuş ve yeni stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır **(Salaam-Dreyer ve ark., 2021)**.

TB'nin Bulaşma ve Patofizyolojisi

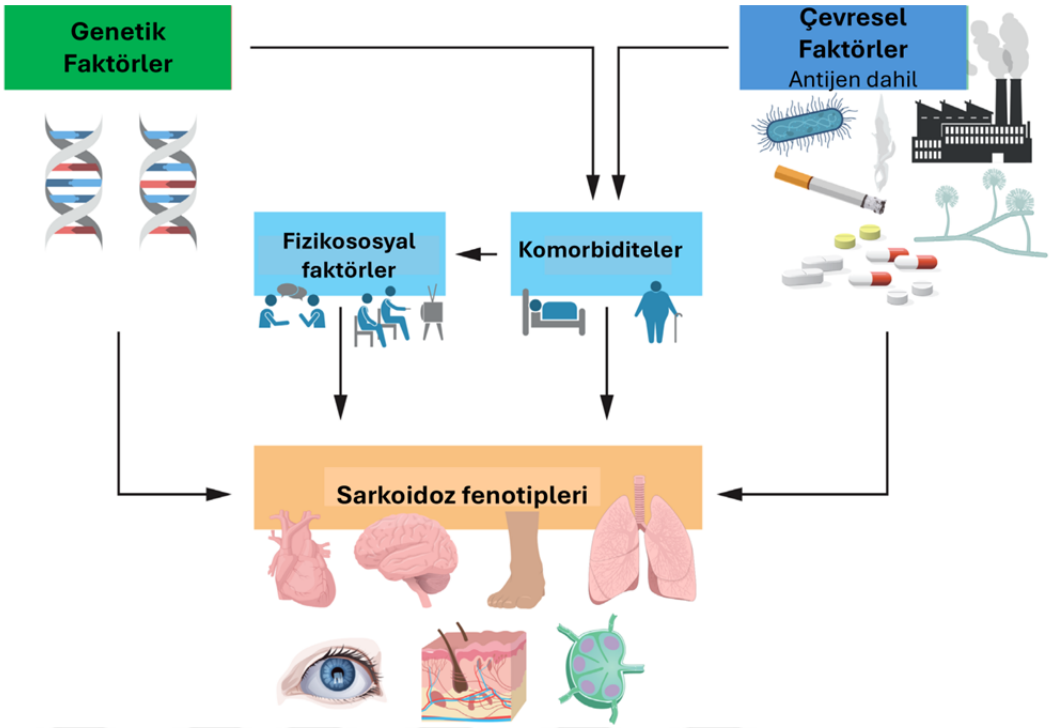
TB insandan insana, birkaç saat havada asılı duran damlacıklar ile bulaşabilmektedir. TB içeren damlacıklara maruz kalma süresi bulaşma oranını artırabilirken enfeksiyona oluşturma durumu değişkenlik gösterebilmektedir. Oldukça nadir görülen bulaş yolları ise kirli süt yutulması ve damlacıkların hasarlı deri teması ile olabilmektedir. Damlacıkların solunması yolu ile TB basili, üst solunum mukozasına veya alveollere ulaşabilmektedir (Şekil 1.1). Bu süreç sonrasında TB basilinin hastalık oluşturma kabiliyeti konağın immünomodülatör mekanizmalarının işleyişine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Şöyle ki, basil öldürülebilir, hastalık uzun süre latent kalabilir veya aktif tüberküloz gelişebilir. Bu karmaşık süreçte hala aydınlanmayı bekleyen birçok nokta bulunmaktadır **(Tobin ve Tristram, 2025)**.



Şekil 1.1. (A) İnsanlarda TB enfeksiyonunun patolojisi, (B) Anti-TB ilaçlarının uygulama yolları **(Grotz ve ark., 2018).**

1.1.2. Sarkoidoz

Genetik olarak duyarlı bireylerde, çevresel maruziyetler nedeniyle ortaya çıkabilen *Sarkoidoz*, kazeifiye özellik göstermeyen granülom karakterli, akciğerlerde ve torasik lenf düğümlerinde tutulum gösteren bir hastalıktır (Şekil 1.2) **(Rossides ve ark., 2023)**. Dünya üzerindeki dağılımı bölgeye ve ırka göre değişkenlik gösterse de erkeklerde ve kadınlarda hemen hemen eşit oranda hastalık meydana gelmektedir. Hastalık sürecindeki farklılıklar sarkoidoz tanı ve tedavisini güçleştirmektedir. Sarkoidoz; hastalığa özgü radyoloji, sistemik tutuluma dair veri, doğrulanmış nonkazeifiye granülomlar, bronkoalveolar lavaj sıvısında (BALF) sarkoidoz belirtileri ve granülomatöz inflamasyonun diğer nedenlerinin düşük olasılığı gibi bir veya birkaç kriter ile hastalığın tanısı konulabilmektedir **(Jain ve ark., 2020)**.



Şekil 1.2. Sarkoidoza genetik ve çevresel faktörlerin etki edebileceği farklı yollar (Rossides ve ark., 2023).

Sarkoidozun epidemiyolojisi

Sarkoidozun insidansı ve yayılımı, genetik, çevre ve tespit şekline göre değişkenlik gösterebilmektedir. Bölgelere bağlı olarak insidans oranı %0.001 ile %0,015 arasındadır. Doğu Asya ülkelerinde bu oran %0.0005-%0.001 iken Kuzey Avrupa ülkelerinde %0.011-%0.015 olabilmektedir. Sarkoidoz, yükü, tüberküloz gibi benzer hastalıklar, teşhis için teknoloji ve uzman yetersizliği gibi nedenlerin yanında vaka sayısının sınırlı olması nedeniyle Dünyanın pekçok yerinde halen tam olarak bilinmemektedir. Sarkoidozun dağılım cinsiyete bağlı olarak farklı yaşlarda farklı oranlarda kaydedilmiştir. Yaşı 20-45 arasında değişen erkeklerde teşhis edilen vaka sayısı kadınlara oranla daha fazladır. Ancak 50-65 yaşlarında kadınlarda görülme sıklığı büyük bir artış göstermektedir. Soy ve ırk farklılıkları da bu dağılımı etkileyebilmekte ancak vaka sayısının az olması ve sosyal sağlık yetersizlikler nedeniyle bu oran doğru bilgi vermemektedir **(Arkema ve Cozier, 2020)**.

Sarkoidoz'un Etiyolojisi

Genetik nedenler ve çevresel maruziyetler sonucu çok faktörlü olarak oluşabilen Sarkoidoz bağışıklık sisteminin düzensizlikleri neticesinde granülomlar oluşturmasıyla ve bağışıklığın otonom olarak bu süreçte etkisizliği nedeniyle ilerlemektedir **(Judson, 2020)**. Sarkoidoz duyarlılığı birkaç insan lökosit antijeni (HLA) aleli ile ilişkilendirilmektedir. Ancak bu bölgedeki güçlü bağlantı dengesizliği, sarkoidoz yer alan belirli farklılıkların belirlenmesini önlemektedir. HLA dışında

farklı genler ile de ilişkili olan Sarkoidoz, HLA-DRB1*03 ile güçlü ilişkisi nedeniyle klinik bir fenotip sergileyen Löfgren sendromu (LS) olan ve olmayan şeklinde gruplandırılmaktadır. Akut bir fizyolojojiye sahip ve iyi huylu bir süreçte ilerleyen olan bu fenotipli vakalar çoğunlukla İsveç'te görülse de dünyada yaygınlığı daha azdır **(Grunewald ve ark., 2010)**. Sarkoidoz nedenleri arasında antijenler, patojen mantarlar, birkaç bakteriyel antijen sayılabilmektedir. Bunların yanında antiretroviral tedavinin, bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin, immünoterapötik ajanların, interferonlar ve tümör nekroz faktörü-α antagonistlerinin granülomatöz inflamasyon süreçleriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Sarkoidoz için ailesel yatkınlık büyük bir risk grubunu teşkil ederken çevresel faktörler, sigara içme ve böcek ilacı gibi etkenler bu riski arttırabilmektedir. Granülomatöz inflamasyonu, obezite tetiklerken kadın hormonları büyük oranda engelleyebilir **(Rossides ve ark., 2023)**. Sarkoidoz tüberküloz, kanser, inflamatuar ve enfeksiyöz gibi farklı hastalıkları taklit etmesi tanıyı güçleştirmektedir. Tanısı genellikle göğüs röntgen ile tesadüfen belirlenebilmektedir. Neredeyse her organı etkileyen sarkoidoz özellikle akciğer tutulumu ve lenf nodu büyümesine neden olmaktadır. Göz, cilt, karaciğer, sinir sistemi, kalp gibi organları etkileyebilmektedir **(Narula ve Iannuzzi, 2020)**. İki veya daha fazla organ ya da sistemde granülamatöz inflamasyonun olması, biyopsi örneğinde nekrotik olmayan granülomların bulunması ve enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan etkenler ve hastalıkların ayırıcı tanıdan çıkarılması gerekmektedir **(Shah, Pritt, ve Alexander, 2017)**. Bilgisayarlı tomografi (BT), Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve florin-18 florodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi (18F-FDG-PET) gibi tanı yöntemleriyle belirlenen sarkoidozun ne yazık ki tanısal bir biyobelirteci bulunmamaktadır **(Kraaijvanger, 2020)**. Sarkoidozda granülomatöz inflamasyon ile ilişkili immünolojik hasar ve immünosüpresan kullanımı enfeksiyon riskini arttırmaktadır.Sarkoidoz teşhisi alan vakalarda özellikle hematolojik ve cilt kanserlerinde artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hastalarda sıklıkla şiddetli yorgunluk, anksiyete ve depresyon şikayetleri gözlenmiştir **(Loke, Herbert ve Thomas, 2013)**.

Sarkoidozun Tedavisi ve İlaç Direnci

Sarkoidozda ilaç tedavisi semptom şiddeti ve organ fonksiyonlarındaki dejenerasyonlara göre uygulanmaktadır. Sarkoidozun ortaya çıkış sebebine göre tedavi uygulansa da halen birçok eksiklikler bulunmaktadır. Bu heterojenliğe rağmen, intra- veya ekstra-torasik tezahür için benzer tedavi rejimleri birçok hasta için uygulanmaktadır. Steroid olmayan anti-inflamatuar tedavi, LS vakalarında genellikle iltihabı ve ilişkili semptomları azaltmaktadır. LS olmayan sarkoidoz tedavisinde ise sistemik kortikosteroidler kullanılabilmektedir. Kortikosteroid dozunun yan etkileri ve dozun azaltılamaması ikincil tedavi (metotreksat) uygulanmasını gerektirmektedir. Hamilelerde azatioprin, ve bazı ülkelerde leflunomid, mikofenolat mofetilin kullanılabilmektedir. Steroid ve metotreksata direnç gösteren hastalarda, tümör nekroz faktörü α antikoru (infliximab) tedaviye eklenmektedir. Sarkoidozda kullanılan ve kullanımı araştırılan diğer tedaviler Acthar Gel (domuz

adrenocorticotropic hormonu), efzofitimod, anakinra, tocilizumab, tofacitinib, rituximab, sirolimus veya antibiyotik kombinasyonudur **(Ungprasert, Ryu ve Matteson, 2019)**.

1.2. Proteomik

Hastalıkların tanı ve tedavisinde genomik araştırmaların sınırlılıklarını tamamlayan proteomik araştırmaların sayısı günümüzde artarak devam etmektedir. Proteinleri kodlayan mRNA dizilerinin bazıları kodlayıcı değildir ve dolayısıyla herhangi bir protein oluşturmaz. Dolayısıyla mRNA çalışmaları yetersiz kalmakta, proteinlerin bolluğunu ve fonksiyonel durumunu tam olarak yansıtamamaktadır. Hastalıkların altında yatan nedenlerin keşfi ve tedaviye yönelik araştırmalarda protein analizlerine mutlaka yer verilmelidir **(Shruthi ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2014)**. Proteomik araştırmalar oldukça geniş araştırma alanına sahip olup, disiplinler arası araştırmaları mümkün kılmaktadır.

İlk olarak 1990'ların ortalarında Marc Wilkins tarafından ortaya atılan "Proteom" terimi, belirli bir zamanda bir hücre, doku ya da organizmaya ait, sentezlenen tüm proteinlerin profili anlamını taşır. Proteomik ise protein profillerinin bir bütün olarak ele alındığı analizleri ifade eden bir terim olarak kullanılmaktadır **(Wilkins ve ark., 1996)**. Proteomik çalışmaların temel hedefleri arasında proteinlerin hücre içi dağılımlarının, post-translasyonel modifikasyonlarının, biyolojik işlevlerinin ve moleküler etkileşimlerinin ortaya konması bulunmaktadır. Bununla birlikte, doku, hücre veya organizma düzeyindeki protein profilleri, genetik yapının tersine, fizyolojik ve patolojik süreçlere bağlı olarak dinamik bir değişim gösterebilmektedir. İnsan proteomu, gen anlatımı sonrasında gerçekleşen modifikasyonlar nedeniyle genomun içerdiği protein kodlayıcı gen sayısından çok daha fazla (geniş ve dinamik bir protein aralığına sahiptir) sayıda protein içermektedir **(Shruthi ve ark., 2016, Marcus ve ark., 2004)**. Günümüzde proteinlerin tanımlanmasına ve yapılarının, işlevlerinin ve proteinlerin diğer moleküllerle olan etkileşimlerinin ortaya çıkarılması amacına yardımcı olacak "Bottom-up" ve "top-down" proteomik yaklaşımları benimsenmiştir. Top-down yaklaşımda, proteinlere proteolitik sindirim uygulanmaz ve intakt olarak karakterize edilir. Bottom-up ise proteinlerin belirli bölgelerden kimyasal ya da enzimatik olarak sindirilmesiyle elde edilen peptitlerin analizlerine dayanan bir yaklaşımdır. İnsan proteomundaki proteinlerin geniş konsantrasyon aralığı (dinamik yoğunluk dağılımı), karmaşık biyolojik örneklerin analizinde çok aşamalı yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir. **(Zhang ve ark., 2014)**. Proteomik araştırmalarının temeli, iki boyutlu jel elektroforezi (2DE) yöntemlerinin kullanıldığı ve 'birinci nesil proteomik' olarak tanımlanan çalışmalara dayanmaktadır. **(Griffin ve Aebersold, 2001)**. Son 20 yılda proteomik bilimindeki hızlı gelişmeler ve teknolojik yenilikler sayesinde, karmaşık biyolojik örneklerdeki proteinlerin çok daha duyarlı yöntemlerle karakterize edilmesini mümkün kılan ileri teknoloji cihazlar ve analitik yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. Kütle spektrometresi tabanlı yöntemlerin proteomik araştırmalara dahil edilmesi ve jel bazlı sistemlerle

bütünleştirilmesi hem hedef odaklı hem de kapsamlı proteomik incelemelerin gerçekleştirilmesine olanak tanımaktadır. **(Ayyub ve ark., 2016; Swietlik ve ark., 2020)**. Her iki yöntem de protein izolasyonu ile başlamaktadır. Bottom-up yaklaşımında, tripsin gibi endopeptidaz enzimleri kullanılarak proteinler peptitlere parçalanır. Örnek karmaşıklığını azaltmak için her iki stratejide de tek boyuttan çok boyutlu ayırma teknikleri (1D-2D-3D) uygulanabilmektedir. Proteomik analizler oldukça dinamik bir yapıya sahiptir ve hücresel mekanizmaların aydınlatılabilmesi için tek bir deneyde binlerce proteinin analiz edilmesi gerekmektedir. Bu hedef doğrultusunda, sıvı kromatografi ile kütle spektrometresinin entegrasyonu ve çok boyutlu protein tanımlama teknolojisinin (MudPIT) geliştirilmesi, serum ve doku gibi kompleks örneklerde yüzlerce proteinin eşzamanlı olarak tespit edilebilmesine imkan sağlamıştır. Proteinlerin tanımlanması, nicel analizlerin yapılması veya çeşitli fizyolojik/patolojik koşullardaki hücre proteomlarının karşılaştırılması; MS/MS spektrumlarından elde edilen peptit dizilerinin biyoinformatik araçlarla veri tabanlarında taranması yoluyla gerçekleştirilmektedir **(Chen ve ark., 2006; Pan ve ark., 2008; Wang ve ark., 2015)**. Kütle spektrometresi analizlerinin hızını ve güvenilirliğini artırmak için, kararlı izotop etiketleme yöntemlerinin yanı sıra etiketsiz teknikler de geliştirilmiştir. Günümüzde kantitatif protein analizlerinde, her birinin kendine özgü avantaj ve sınırlılıkları nedeniyle hem etiketli hem de etiketsiz yöntemler yaygın olarak tercih edilmektedir. **(Ankney ve ark., 2018)**. Kütle spektrometresi kullanılarak kararlı izotoplar ile yapılan kantifikasyon, etiketli ve etiketsiz iyonlar arasındaki kütle farkına dayanır. Numunelerin karıştırılmasından sonra, izotop varyantları arasındaki sinyal yoğunlukları oranı, miktarları arasındaki kat farkını yansıtır. Bir kütle spektrometresi tarafından tanınabilen ve aynı zamanda kantifikasyon için temel oluşturan spesifik kütle etiketleri metabolik katılım yoluyla, kimyasal ya da enzimatik olarak protein veya peptitlere dahil edilebilmektedir. Metabolik etiketlemenin yapıldığı SILAC gibi (Hücre kültüründe kararlı izotopla etiketleme) ve kimyasal etiketlemenin yapıldığı ICAT (izotopla kodlanmış afinite etiketleri), TMT (Tandem kütle etiketleri) ve iTRAQ (göreceli ve mutlak ölçüm için izotop etiketleme) gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir **(Zhang ve ark., 2014; Rodriguez ve Whetton, 2013)**. Kantitatif proteomik etiketli ve etiketsiz olarak temelde ikiye ayrılır. SILAC, ITRAQ ve TMT yaygın kullanılan etiketleme yöntemleridir.

1.2.1. Etiketli Yöntemler

Metabolik protein etiketleme yaklaşımında, izotopik olarak zenginleştirilmiş besin ortamları veya özel diyetler kullanılarak kararlı izotopların hücre proteinlerine dahil edilmesi sağlanır. Bu süreçte, metabolik yollarla hücreye alınan kararlı izotoplar, protein biyosentezi ve yenilenme mekanizmaları aracılığıyla proteomik yapıya entegre olmaktadır **(Bantscheff ve ark., 2012)**. Hücre Kültüründe Kararlı İzotoplarla Etiketleme (SILAC): SILAC, doğal (hafif) amino asitleri içeren hücre popülasyonu ile kararlı izotop etiketli (ağır) esansiyel amino asitleri içeren hücre popülasyonu proteomlarının karşılaştırılması esasına dayanır. Memeli hücrelerinde

sentezlenemeyen temel amino asitler olan lizin ve arginin (çoğunlukla $^{13}C_6{}^{15}N_2$-lizin ve $^{13}C_6{}^{15}N_4$-arjinin formlarında) metabolik etiketleme için kullanılır. Hücre kültürüne eklenen ^{13}C ve ^{15}N izotoplarıyla işaretlenmiş (ağır) bu amino asitler, 6-8 pasaj sonunda hücrelerdeki doğal (hafif) arginin ve lizin moleküllerinin yerini tamamen alır. Ağır ve hafif amino asitler içeren örnekler karıştırıldıktan sonra, tripsin enzimi kullanılarak bu amino asitlerin karboksil uçlarından proteolitik parçalanma sağlanır.

Proteinlerin Triptik Bölünme Ürünleri ve SILAC Yöntemi

Bir proteinin triptik bölünme ürünleri (C-terminal peptitler hariç), en az bir etiketli amino asit içerir. Bu etiketleme, proteinlerin kantitatif analizinde kullanılan kararlı izotop etiketleme yöntemlerinin temelini oluşturur. Kütle spektrometresi (MS) sürecinde, amino asitlerin kütle spektrumları karşılaştırılırken, $^{13}C_6{}^{15}N_4$-arjinin ile etiketlenmiş peptitlerde sırasıyla 6 ve 4 Dalton (Da) kütle kayması gözlemlenir. Bu kütle kayması, etiketli ve etiketlenmemiş peptitlerin ayırt edilmesini sağlar. İki numune arasındaki göreceli protein miktarı, "hafif" ve "ağır" peptitlerin iyon yoğunluklarının oranlanmasıyla belirlenir. İyon yoğunluklarının eş zamanlı ölçülmesi, sıvı kromatografisi (LC) ve kütle spektrometrisi (MS) performansındaki farklılıkları ortadan kaldırarak deneysel hataları azaltır **(Ong ve Mann, 2006; Cox ve Mann, 2008)**.

Klasik SILAC yöntemi, tek bir LC-MS analizi ile iki veya üç numunenin karşılaştırılmasına olanak tanır. Bu yöntem, hücre kültürlerinde izotopik olarak zenginleştirilmiş amino asitler kullanılarak proteinlerin etiketlenmesini sağlar. Ancak, dahili standartların kullanıldığı süper-SILAC yöntemi, daha fazla numunenin karşılaştırılmasını mümkün kılarak proteomik çalışmaların kapsamını genişletmiştir. Süper-SILAC, özellikle kanser proteomik çalışmalarında, farklı hasta örneklerinin karşılaştırılmasında büyük bir avantaj sağlar **(Geiger ve ark., 2010)**.

SILAC yöntemi, maya, zebra balığı, bakteri, yuvarlak solucan, meyve sineği ve fare gibi çeşitli organizmalara uyarlanmıştır. Bu organizmalar, model sistemler olarak kullanılarak protein ekspresyonu ve fonksiyonları hakkında önemli bilgiler sağlar. Bununla birlikte, kültürlenmiş hücrelerin metabolik hızı, fare ve sıçan gibi memelilere kıyasla çok daha yüksektir. Bu nedenle, güvenilir sonuçlar elde edebilmek için etiketleme oranının %100'e yakın olması gereklidir. SILAC yöntemi, etiketlemenin tam olmama riskine rağmen, hayvan deneylerinde nadiren de olsa kullanılmaktadır. Özellikle, fare modellerinde metabolik etiketleme, protein dinamiklerinin incelenmesinde önemli bir araçtır **(Krüger ve ark., 2008)**.

Kimyasal Etiketleme Yöntemleri: ICAT, TMT ve iTRAQ

Kimyasal etiketleme stratejileri, proteinlerin kantitatif analizinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Bu stratejiler, proteinlerin tiol (-SH) ve amin ($-NH_2$) grupları içeren amino asit

kalıntıları üzerinden yapısal olarak özdeş ancak farklı moleküler ağırlıklara sahip etiketlerle işaretlenmesini sağlar. Bu sayede, benzer ancak farklı kütlelere sahip peptitler karşılaştırılabilir hale gelir **(Gygi ve ark., 1999)**.

İzotopla Kodlanmış Afinite Etiketleme (ICAT)

ICAT tekniği, proteinlerdeki sistein amino asitlerinin sülfidril gruplarını hedef alır. Bu yöntemde, hafif (^{12}C) ve ağır (^{13}C) izotoplu ICAT reaktifleri kullanılarak proteinler etiketlenir. ICAT reaktifleri, sistein kalıntılarına kovalent olarak bağlanır ve bu sayede sadece sistein içeren peptitler etiketlenir. Bu özellik, peptit karışımının karmaşıklığını önemli ölçüde azaltır ve kompleks numunelerin analizini basitleştirir. ICAT yöntemi, özellikle düşük bolluktaki proteinlerin tespitinde büyük bir avantaj sağlar **(Gygi ve ark., 1999)**. Ancak, ICAT yönteminin önemli bir sınırlaması vardır: sadece sistein içeren peptitler etiketlenebilir. Sistein kalıntılarından yoksun peptitler, bu yöntemle tespit edilemez. Bu nedenle, ICAT yöntemi geniş ölçekli kantitatif çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaz. Bununla birlikte, özellikle sistein açısından zengin proteinlerin analizinde etkili bir araçtır **(Han ve ark., 2001)**.

Tandem Mass Tag (TMT) ve Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ)

TMT ve iTRAQ, izobarik etiketleme yöntemleridir. Bu yöntemlerde, proteinler genellikle sindirildikten sonra izobarik etiketlerle işaretlenir. İzobarik etiketler, aynı kütleye sahip olmalarına rağmen, parçalanma sırasında farklı kütleli iyonlar üretirler. Bu özellik, birden fazla numunenin aynı anda analiz edilmesine olanak tanır. Örneğin, iTRAQ yöntemi, sekiz farklı numunenin karşılaştırmalı analizini mümkün kılarak analitik süreyi önemli ölçüde kısaltır **(Ross ve ark., 2004)**. TMT ve iTRAQ yöntemleri, özellikle kompleks biyolojik örneklerde protein ekspresyon profillerinin karşılaştırılmasında yaygın olarak kullanılır. Bu yöntemler, yüksek verimlilik ve hassasiyet sunar, ancak veri analizi sürecinde karmaşık algoritmalar gerektirir **(Thompson ve ark., 2003)**. İzotop etiketleme yöntemleri, proteomik çalışmalarda göreceli ve mutlak ölçümler için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation), diğer etiketleme tekniklerinden farklı olarak sekiz farklı numunenin aynı anda karşılaştırmalı analizine olanak tanır. Bu özelliği sayesinde analitik süreç önemli ölçüde kısaltılabilir. iTRAQ yönteminde, tripsin ile sindirilmiş peptitler, afinite yakalama aşamasının ardından amin-spesifik reaktiflerle etiketlenir ve daha sonra kütle spektrometrisi (MS) analizi gerçekleştirilir **(Wiese ve ark., 2007)**.

18O Etiketleme

Bir diğer yaygın izotop etiketleme yöntemi ise 18O etiketlemedir. Bu yöntem, proteolitik peptitlerin C-terminal karboksil grubuna $H_2{}^{18}O$ solventinden iki oksijen atomunun eklenmesi prensibine dayanır. Etiketli ve etiketlenmemiş peptitler, kütle spektrometrisinde 4 Dalton (Da)

kütle farkı ile kolayca ayırt edilebilir. 18O etiketleme, uygulaması kolay ve maliyet açısından uygun bir yöntem olarak öne çıkar. Ancak, bir peptidin tek veya çift etiketlenme olasılığı, veri analizini karmaşık hale getirebilir ve bu durum analiz sürecini zorlaştırabilir **(Nayak ve ark., 2022)**. Her iki yöntem de proteomik araştırmalarda önemli avantajlar sunmakla birlikte, seçim yaparken çalışmanın hedefleri, maliyet ve analiz süresi gibi faktörler dikkate alınmalıdır. Özellikle iTRAQ, çoklu numune analizi gerektiren çalışmalarda tercih edilirken, 18O etiketleme daha basit ve ekonomik bir alternatif olarak değerlendirilebilir.

1.2.2. Etiketsiz Miktar Tayini (Label-Free Quantitation)

Etiketsiz kantitatif yöntemler, proteomik çalışmalarda numunelerin her birinin ayrı ayrı hazırlanmasını ve tek tek LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) analizlerinin gerçekleştirilmesini gerektirir. Bu yöntemler arasında peptit pik yoğunluğuna dayalı miktar tayini ve spektral sayım hesaplaması en yaygın olarak kullanılan tekniklerdir **(Nayak ve ark., 2022)**.

Peptit pik yoğunluğuna dayalı yöntem, bir kütle spektrometresinde parçalanma için seçilen peptit öncü iyonunun (prekürsör iyon) seçilme hızının, peptit miktarıyla doğru orantılı olduğu varsayımına dayanır. Bu yaklaşımda, öncü iyon düşük çarpışma enerjisinde, ürün iyonu ise yüksek çarpışma enerjisinde kaydedilir. Analiz sürecinde, peptit sinyalleri seçilir, elde edilen pik kromatogramları karşılaştırılır ve hizalanır. Daha sonra, oluşturulan spektrumlar, özel yazılım programları ve veritabanları kullanılarak analiz edilir. Aynı koşullarda hazırlanmış farklı örnekler arasındaki protein seviyeleri, göreceli olarak karşılaştırılır.

Spektral sayım stratejisinde ise bir proteinin parçası olan peptitlere karşılık gelen spektrumlar sayılır. Bu yöntem, bir protein ne kadar bol ve büyükse, o kadar çok peptidin tanımlanacağı gözlemine dayanır. Ancak, kompleks karışımlardaki protein değişikliklerinin doğru ve güvenilir bir şekilde saptanabilmesi için spektral sayım veri kümelerinin normalizasyonu ve istatistiksel analizi büyük önem taşır.

Etiketsiz kantitatif proteomik tekniklerin hızlı gelişimi, kompleks biyolojik numunelerde protein ekspresyon seviyelerinin hızlı, hassas ve düşük maliyetli bir şekilde ölçülmesine olanak sağlamıştır **(Hoang ve Pham, 2021)**. Bu yöntemler, özellikle büyük ölçekli proteomik çalışmalarda etiketleme gerektirmeden yüksek verimlilik sunar.

1.2.3. Bir Kütle Spektrometresinin Çalışma Prensibi ve Temel Enstrümanları

Bir kütle spektrometresi, temel olarak üç ana bileşenden oluşur: gaz fazı iyonların üretildiği bir iyon kaynağı, kütle/yük (m/z) oranına göre iyonların ayrıldığı bir kütle analizörü ve oluşan sinyali spektrum biçiminde kaydeden bir detektör. İki aşamalı MS sisteminden oluşan tandem kütle spektrometresi (MS/MS), proteomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılır. Bu sistem,

proteinlerin peptit dizileri ve post-translasyonel modifikasyonları hakkında detaylı bilgi sağlar **(Muradov, 2017)**.

Sıvı kromatografisi ile birleştirilmiş tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılan tipik bir iş akışında, fraksiyonlama, iyonizasyon, ayrımlama, parçalanma ve okuma basamakları gerçekleştirilir. Bottom-up proteomik yaklaşımlarında, kütle spektrometresi analizinden önce bir kesim enzimi (örneğin tripsin) yardımıyla proteinlerden triptik peptitler elde edilir **(Bilgili ve ark., 2018)**.

Peptitler, yüksek performanslı sıvı kromatografisinde polaritelerine ve molekül büyüklüklerine göre ayrımlanır ve iyon kaynağına taşınır. Pozitif veya negatif yükle yüklenen iyonize peptitler, kütle spektrometresine aktarılır. İlk kütle analizöründe tüm iyonların spektrumları saptanır ve öncü iyonlar seçilir. Öncü iyonlar, çarpışma hücresinde (collision cell) inert gaz (örneğin azot veya argon) yardımıyla parçalanır ve ürün iyonları ile nötr fragmentler oluşur. İkinci MS'de ürün iyonların spektrumları kaydedilir. Elde edilen spektrumlar, çeşitli algoritmalar kullanılarak veritabanlarındaki peptit dizileriyle karşılaştırılır. Analiz sırasında kullanılan algoritmalar, ilgili peptit dizisi için beklenen seviyeye ne kadar iyi uyduğuna ilişkin bir puan (skor) hesaplar. Anlamlılık sınırının üzerindeki skorlar kabul edilir **(Eng ve ark., 1994)**.

İyon Kaynağı

Peptitlerin iyonlaşması, iyon kaynağındaki elektrik potansiyeli ve analiz edildiği pH değeri gibi faktörlere bağlıdır. Düşük pH koşullarında, peptitler arjinin (Arg), lizin (Lys) ve histidin (His) gibi bazik amino asitlerin amonyak grupları vasıtasıyla protonlanır. Buna karşılık, yüksek pH değerlerinde ise aspartat (Asp) ve glutamat (Glu) gibi karboksil grupları içeren asidik amino asitler aracılığıyla deprotonize edilir. İyonizasyon işlemi, elektriksel potansiyelin pozitif olduğu pozitif iyon modu ve negatif olduğu negatif iyon modu olmak üzere iki temel modda gerçekleştirilir. Proteomik çalışmalarda, özellikle peptit ve protein analizlerinde pozitif iyon modu yaygın olarak tercih edilmektedir **(Aebersold ve Mann, 2016).**

Elektrosprey İyonizasyon (ESI) ve Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon (MALDI) Proteinlerin ve peptitlerin kütle analizörüne ulaşmadan önce iyonize edilmesi için kullanılan en yaygın iyon kaynakları, ESI ve (ALDI)yöntemleridir. ESI, sıvı fazdaki örneklerin ince bir damlacık halinde püskürtülerek iyonlaştırılması prensibine dayanır. Bu yöntem, özellikle yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerin analizinde etkilidir. MALDI ise, örneklerin bir matriks malzeme ile karıştırılıp lazer ışını ile iyonlaştırılması esasına dayanır. Bu yöntem, özellikle katı faz örneklerinin analizinde kullanılır **(Hillenkamp ve Karas, 2000)**.

Diğer İyonizasyon Teknikleri

ESI ve MALDI'ye ek olarak, kimyasal iyonizasyon (CI), elektron iyonlaşması (EI) ve atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) gibi farklı iyonizasyon teknikleri de mevcuttur. Kimyasal iyonizasyon (CI), gaz fazındaki moleküllerin reaktif iyonlarla etkileşime girerek iyonlaşmasını sağlar. Elektron iyonlaşması (EI) ise yüksek enerjili elektronların moleküllere çarparak iyonlaşma sürecini başlatması prensibine dayanır. APCI ise atmosferik basınç altında gaz fazındaki moleküllerin iyonlaştırılması için kullanılır ve özellikle uçucu bileşiklerin analizinde etkilidir **(Cech ve Enke, 2001)**. Bu iyonizasyon yöntemleri, analitlerin fizikokimyasal özelliklerine ve çalışmanın hedeflerine göre seçilir. Özellikle proteomik çalışmalarda ESI ve MALDI, yüksek hassasiyet ve doğruluk sağlamaları nedeniyle sıklıkla tercih edilir.

Elektrosprey İyonizasyon (ESI)

ESI, kütle spektrometresinde sıvı fazdaki örneklerin iyonlaştırılması için kullanılan yaygın bir tekniktir. Bu yöntemde, spektrometrenin iyonizasyon kaynağına gelen örneklere yüksek voltaj (genellikle 2-6 kV aralığında) uygulanır. Uygulanan voltajın polaritesine bağlı olarak örnekler pozitif veya negatif yükle şarj edilir. Püskürtme ucundan, analit iyonlarını içeren ve bir mikrometreden daha küçük boyutlarda olan damlacıklar üretilir. Bu damlacıklar, elektrostatik kuvvetler nedeniyle küçülür ve sonunda iyonlar serbest kalır **(Fenn ve ark., 1989)**.

Bu iyonizasyon sisteminde, buharlaştırıcı olarak azot gazı kullanılır. Azot gazı, damlacıkların boyutunu küçültür ve moleküller arasındaki mesafeyi azaltarak iyonlaşma verimliliğini artırır. Bu süreçte, aynı yükle yüklenmiş analitleri içeren damlacıkların boyutu giderek küçülür ve sonunda iyonlar serbest kalır. ESI tekniği, birden fazla yüklü iyonların (örneğin, +2, +3 gibi çoklu yükler) elde edilmesine olanak tanır. Bu özellik, özellikle yüksek moleküler ağırlıklı proteinler ve peptitler gibi büyük moleküllerin analizinde büyük avantaj sağlar **(Kebarle ve Verkerk, 2009)**.

ESI, yüksek hassasiyet ve düşük numune kaybı nedeniyle proteomik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir iyonizasyon yöntemidir. Ayrıca, sıvı kromatografisi (LC) ile kolayca entegre edilebilmesi, bu yöntemi kompleks biyolojik örneklerin analizinde oldukça etkili kılar. Bununla birlikte, ESI'nin performansı, örnek hazırlama süreçleri, çözücü seçimi ve voltaj ayarları gibi faktörlere bağlı olarak değişebilir **(Cech ve Enke, 2001)**.

Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon (MALDI)

MALDI, katı fazdaki örneklerin iyonlaştırılması için kullanılan etkili bir tekniktir. Bu yöntemde, analit örnekleri bir matriks malzeme (genellikle organik bir bileşik) içinde çözündürülür ve MALDI hedef plakası üzerine yerleştirilerek kurumaya bırakılır. Çözücünün buharlaşmasıyla birlikte, matriks ve analit kristalize bir yapı oluşturur. Daha sonra, bu kristal yapıya ultraviyole

(UV) lazer ışını tutularak analit molekülleri iyonize edilir. Lazer enerjisi, matriks tarafından emilir ve analit moleküllerinin desorpsiyonunu (yüzeyden ayrılmasını) ve iyonlaşmasını sağlar.

MALDI'nin darbeli yapısı, özellikle uçuş zamanlı (TOF) kütle analizörleri ile uyumlu olmasını sağlar. Bu kombinasyon, yüksek hassasiyet ve kütle çözünürlüğü sunar, bu da MALDI-TOF sistemlerini peptit ve protein analizleri için oldukça popüler hale getirir. MALDI-TOF, özellikle biyolojik örneklerdeki büyük moleküllerin (örneğin, proteinler ve peptitler) analizinde yaygın olarak kullanılır **(Hillenkamp ve Karas, 2000)**.

MALDI'nin Avantajları

Yüksek Hassasiyet: MALDI, düşük konsantrasyonlardaki analitlerin bile tespit edilmesini sağlar.Geniş Moleküler Ağırlık Aralığı: Büyük moleküllerin (örneğin, proteinler ve polimerler) analizine olanak tanır.Hızlı Analiz: Lazer atımları sayesinde hızlı ve etkili bir analiz süreci sunar.

TOF ile Uyum: MALDI-TOF kombinasyonu, yüksek çözünürlük ve kütle doğruluğu sağlar.

Kütle Analizörleri

Proteomik çalışmalarda kullanılan kütle analizörleri, iyonların kütle/yük (m/z) oranına göre ayrılmasını sağlar. Temel olarak üç tür kütle analizörü yaygın şekilde kullanılır:

1. **İyon Kapanları:** Kuadropol iyon kapanı (QIT), doğrusal iyon kapanı (LIT), Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı (FT-ICR) ve Orbitrap gibi iyon kapanları, iyonların hapsedilerek analiz edilmesini sağlar. Bu yöntemler, yüksek kütle çözünürlüğü ve hassasiyet sunar.
2. **Kuadropol (Q):** Kuadropol analizörler, elektrik alanları kullanarak iyonları filtreler ve belirli m/z değerlerine sahip iyonların geçişine izin verir.
3. **Uçuş Zamanlı (TOF):** TOF analizörleri, iyonların bir vakum tüpünde belirli bir mesafeyi katetme sürelerine göre kütlelerini belirler. Bu yöntem, yüksek hız ve geniş kütle aralığı sunar **(Muradov, 2017)**.

Kütle spektrometresi cihazları, tek bir analizör içerebileceği gibi, iki veya daha fazla analizörün kombinasyonundan da oluşabilir. Örneğin, QIT, LTQ, Q-q-Q, Q-TOF, TOF-TOF ve LTQ-Orbitrap gibi kombinasyonlar, farklı analizörlerin avantajlarını birleştirerek daha kapsamlı analizler yapılmasını sağlar. Her bir enstrümanın tasarım ve performans açısından güçlü ve zayıf yönleri bulunmaktadır **(Nayak ve ark., 2022)**. Örneğin, Q-TOF cihazları yüksek hız ve geniş kütle aralığı sunarken, Orbitrap cihazları yüksek çözünürlük ve hassasiyet sağlar **(Aebersold ve Mann, 2016)**.

Dedektör

Kütle analizöründen gelen iyonlar, bir elektrot üzerine düşerek iyon akımı oluşturur. Dedektör, bu iyon akımını elektriksel sinyallere dönüştürür ve bilgisayar ekranında spektrum şeklinde görüntülenmesini sağlar. Dedektörler, analiz sırasında elde edilen verilerin hassas ve güvenilir bir şekilde kaydedilmesinde kritik bir rol oynar **(Cox ve Mann, 2008)**.

1.2.4. Proteomik Çalışmalarda Kullanılan Bazı Kütle Spektrometreleri

Proteomik araştırmalarda kullanılan kütle spektrometreleri, analiz edilen örneklerin karmaşıklığına ve çalışmanın hedeflerine göre seçilir. Örneğin, Q-TOF ve LTQ-Orbitrap gibi cihazlar, yüksek kütle çözünürlüğü ve hassasiyet sağlayarak kompleks protein karışımlarının analizinde yaygın olarak kullanılır. Bu cihazlar, peptit dizileme, post-translasyonel modifikasyonların belirlenmesi ve kantitatif proteomik çalışmalar için idealdir **(Makarov, 2000)**.

İyon Kapanı Kütle Spektrometresi

İyon kapanı kütle spektrometresi, iyonların yakalanması, depolanması, manipüle edilmesi ve atılması gibi işlemlerin tekrarlanan döngülerini gerçekleştiren bir kütle analizörüdür. Bu sistem, merkezi bir tuzak mekanizması sayesinde iyonları kontrol eder. Kütle analizörüne giren çok sayıda peptit iyonu arasından belirli bir kütle/yük (m/z) oranına sahip olanlar izole edilirken, diğerleri sistemden atılır. İzole edilen peptit iyonlarının enerjileri artırılarak azot veya helyum gibi inert gazlarla çarpıştırılır ve parçalanmaları sağlanır. Ana peptit iyonundan elde edilen fragmanlar, dedektöre gönderilir ve m/z oranları kaydedilir. Bu yöntem, özellikle peptit dizileme ve post-translasyonel modifikasyonların analizinde yaygın olarak kullanılır **(Aebersold ve Mann, 2016)**.

Fourier Dönüşümlü İyon Siklotron Rezonans Kütle Spektrometresi (FT-ICR)

Fourier Dönüşümlü İyon Siklotron Rezonans (FT-ICR) kütle spektrometresi, iyonları güçlü bir manyetik alan ve yüksek vakum altında büyük silindirik bir hacimde depolayarak çalışır. Bu sistem, iyonların siklotron frekansında rezonansını sağlar ve bu frekansların ölçülmesiyle iyonların kütle/yük (m/z) oranları belirlenir. FT-ICR, iyonları yakalama, izole etme, parçalama ve MS^2 spektrumlarını kaydetme yetenekleriyle öne çıkar. Dedektör, tuzağın karşısına yerleştirilmiş plakalar boyunca geçen iyonların siklotron frekanslarını ölçer ve bu frekansları Fourier dönüşümü kullanarak m/z değerlerine dönüştürür **(Marshall ve Hendrickson, 2008)**.

FT-ICR kütle spektrometreleri, yüksek kütle çözünürlüğü, hassasiyet ve dinamik aralık sunar. Ancak, büyük boyutları, kullanım karmaşıklığı ve yüksek maliyetleri nedeniyle proteomik araştırmalarda rutin olarak kullanımı sınırlıdır. Bu dezavantajları aşmak için, FT-ICR ile karşılaştırılabilir performansa sahip olan ancak daha düşük maliyetli ve bakımı daha kolay olan

Orbitrap kütle spektrometreleri geliştirilmiştir. Orbitrap, özellikle yüksek çözünürlüklü proteomik analizlerde yaygın olarak tercih edilmektedir **(Makarov, 2000)**.

Triple-Quadrupole Kütle Spektrometresi

Triple-Quadrupole (Üçlü Kuadropol) kütle spektrometreleri, proteomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan gelişmiş bir analizör türüdür. MS^2 (tandem kütle spektrometrisi) yapabilme yeteneği, bu cihazları tek kuadropol analizörlerden ayıran en önemli özelliktir. Triple-Quadrupole cihazları, iki farklı tarama modu arasında geçiş yaparak çalışır. İlk mod olan "tam tarama" modunda, geniş bir kütle/yük (m/z) aralığındaki iyonların kuadropolden geçerek dedektöre ulaşması sağlanır. İkinci modda ise, ilk kuadropol bir kütle filtresi görevi görür ve belirli bir m/z değerine sahip iyonların ikinci kuadropole geçmesine izin verir. Bu iyonlar, ikinci kuadropolde azot veya helyum gibi inert gazlarla çarpıştırılarak parçalanır. Parçalanma ürünleri, üçüncü kuadropolden geçerek dedektörde tespit edilir. Triple-Quadrupole cihazları, ürün iyonu taraması, öncü iyon taraması ve nötr kayıp taraması gibi çok yönlü analizler yapabilme yeteneği ile öne çıkar **(Aebersold ve Mann, 2016)**.

Time of Flight (TOF) Kütle Spektrometresi

TOF kütle spektrometreleri, yüksek çözünürlük, kütle doğruluğu ve ölçüm hızı nedeniyle proteomik çalışmalarda sıkça tercih edilen bir analizör türüdür. TOF analizörlerinde, iyonlar elektriksel bir alanda hızlandırılır ve belirli bir mesafeyi katetmeleri sağlanır. İyonların dedektöre ulaşma süreleri, kütle/yük (m/z) oranlarıyla doğru orantılıdır; daha büyük iyonlar daha uzun sürede, daha küçük iyonlar ise daha kısa sürede dedektöre ulaşır. Dedektör, tüm iyonların uçuş sürelerini kaydeder ve bu veriler kütle spektrumu olarak sunulur. TOF analizörleri, özellikle MALDI-TOF-MS, MALDI-TOF-TOF ve ESI-Q-TOF-MS/MS gibi kombinasyonlarla proteomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılır **(Cox ve Mann, 2008)**.

Q-Exactive Orbitrap Kütle Spektrometresi

Orbitrap kütle spektrometresi, 2000 yılında Makarov tarafından geliştirilmiş ve proteomik alanında önemli bir devrim yaratmıştır. Orbitrap, eksenel simetrik yapıya sahip bir iyon tuzağı kütle analizörüdür ve iki dış elektrot ile bir merkezi elektrottan oluşur. Analizöre giren iyonlar, z ekseni boyunca harmonik bir yörüngede hareket eder. Dış elektrotlarda iyonların neden olduğu salınım frekansları ölçülür ve bu frekanslar Fourier dönüşümü kullanılarak kütle spektrumlarına dönüştürülür. Orbitrap teknolojisi, FT-ICR cihazlarına kıyasla daha küçük boyutlu, daha kolay kullanım ve daha düşük maliyet avantajları sunar. Bu özellikleriyle, yüksek çözünürlüklü proteomik analizlerde yaygın olarak tercih edilmektedir **(Makarov, 2000)**.

HCD (Yüksek Enerji Çarpışmasına Bağlı Ayrışma)

HCD (Higher Energy Collision-induced Dissociation), yüksek enerjili çarpışmalara dayalı bir iyon parçalama yöntemidir. Bu teknik, özellikle orbitrap kütle spektrometrelerinde kullanılarak peptit ve proteinlerin yüksek hassasiyetle analiz edilmesini sağlar. HCD, iyonların inert gazlarla (genellikle azot veya argon) yüksek enerjili çarpışmalar sonucu parçalanması prensibine dayanır. Bu yöntem, özellikle küçük moleküller ve post-translasyonel modifikasyonların analizinde etkilidir **(Eliuk, 2015).**

Orbitrap kütle spektrometreleri, TOF sistemlerine kıyasla çok daha yüksek çözünürlük sunar. Örneğin, m/z 200 değerinde 140.000 ila 1.000.000 FWHM (Full Width at Half Maximum) çözünürlük gücüne sahiptir. Bu yüksek çözünürlük, kompleks biyolojik örneklerdeki protein ve peptitlerin detaylı analizine olanak tanır. LTQ-Orbitrap, Orbitrap Velos, Orbitrap Elite, Fusion ve Q Exactive serisi gibi cihazlar, bu teknolojinin en gelişmiş örnekleridir **(Makarov, 2000).**

Q Exactive Plus Modeli

Proje çalışmalarında kullanılan Q Exactive Plus modeli, kuadropol-orbitrap kombinasyonuna sahip hibrit bir kütle spektrometresi sistemidir. Bu cihaz, altı ana bileşenden oluşur:

1. **İyon Kaynağı:** Örneklerin iyonlaştırıldığı bölgedir.
2. **Enjeksiyon Flatapolü:** İyonların sistem içine püskürtülmesini sağlar.
3. **Kuadropol:** Öncü iyon seçimi için kütle filtresi görevi görür.
4. **C-trap:** İyonların kinetik enerjisini azaltarak orbitrap analizörüne iletimini sağlar.
5. **Parçalama Hücresi (HCD Hücresi):** İyonların yüksek enerjili çarpışmalarla parçalanmasını sağlar.
6. **Orbitrap Analizörü:** Fourier dönüşümü kullanarak iyonların kütle/yük (m/z) oranlarını belirler.

İyon kaynağında üretilen iyonlar, sistem içine püskürtülür ve iyon optiği tarafından hızlandırılır. Kuadropol, elektriksel olarak bağlantılı dört çubuktan oluşur ve belirli m/z değerine sahip iyonların geçişine izin verir. İyonlar, C-trap bölgesine geldiğinde azot gazı ile çarpıştırılarak kinetik enerjileri azaltılır ve orbitrap analizörüne iletimi sağlanır. Orbitrap analizöründe, iyonların salınım frekansları ölçülerek yüksek çözünürlüklü kütle spektrumları elde edilir **(Michalski et al., 2011)**.

MS/MS Analizi ve Orbitrap İşleyişi

MS/MS (tandem kütle spektrometrisi) analizi için, iyonlar öncelikle C-trap içinden HCD (Yüksek Enerji Çarpışmasına Bağlı Ayrışma) çarpışma hücresine aktarılır. Burada, iyonlar yüksek enerjili çarpışmalara maruz bırakılarak parçalanır. Parçalanma sonrasında oluşan iyonlar tekrar C-trap'e geri gönderilir ve kütle spektrumlarının tespiti için orbitrap analizörüne iletilir. Orbitrap analizörü, merkezi bir elektrot ile iki dış elektrot arasında iyonların salınım hareketini sağlayan bir yapıya sahiptir **(Makarov, 2000)**.

Orbitrap analizöründe, iyonlar iki temel kuvvetin etkisi altında kalır: elektrostatik çekim ve merkezkaç kuvveti. Bu kuvvetler, iyonların eksenel salınımlar yapmasına neden olur. Farklı kütle/yük (m/z) oranına sahip iyonlar, farklı frekanslarda salınır ve bu sayede iyonlar birbirinden ayrılır. Dış elektrotlar, bu salınımları görüntü akımı olarak algılar. Elde edilen görüntü akımı, Fourier dönüşümü kullanılarak frekans alanına ve ardından kütle spektrumuna dönüştürülür. Bu süreç, FT-ICR teknolojisine benzer bir şekilde işler, ancak orbitrap daha kompakt bir yapıya ve daha düşük maliyete sahiptir **(Eliuk, 2015)**.

Q Exactive Plus Modelinin Avantajları

Q Exactive Plus modeli, yüksek çözünürlük, hassasiyet ve hızlı analiz yetenekleriyle proteomik çalışmalarda öne çıkar. Özellikle HCD parçalama yöntemi ile birlikte kullanıldığında, peptit ve proteinlerin detaylı karakterizasyonu mümkün hale gelir. Bu sistem, aynı zamanda yüksek verimlilik sunarak kompleks biyolojik örneklerin hızlı ve etkili bir şekilde analiz edilmesini sağlar **(Michalski et al., 2011)**.

1.2.5. Bottom-up Proteomik Yaklaşımına Göre Örnek Hazırlığı

Bottom-up proteomik yaklaşımı, proteinlerin tripsin gibi proteolitik enzimlerle parçalanarak peptitlere ayrılması ve bu peptitlerin kütle spektrometresi ile analiz edilmesi prensibine dayanır. Bu yöntemde, protein örneklerinin hazırlanması için üç temel metodoloji kullanılır: "in-gel digestion", "in-solution digestion" ve "filtre destekli örnek hazırlığı (FASP)". Her bir yöntemin kendine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır **(Surmen, 2018).**

In-Gel Digestion Yöntemi

In-gel digestion yöntemi, özellikle MALDI iyon kaynağı kullanılan kütle spektrometreleri için tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, proteinler önce jel elektroforezi ile ayrılır, ardından jel üzerindeki protein bantları kesilerek tüplere alınır. Kesilen jel parçaları üzerinde indirgeme, alkilasyon ve proteolitik sindirim işlemleri gerçekleştirilir. Bu yöntem, özellikle kompleks protein karışımlarının analizinde etkilidir, ancak işlem süresi uzun olabilir ve peptit geri kazanım verimi düşük olabilir **(Surmen, 2018)**.

In-Solution Digestion Yöntemi

In-solution digestion yöntemi, ESI iyon kaynağı kullanılan kütle spektrometreleri için sıklıkla tercih edilir. Bu yöntemde, proteinler önce 8 M üre gibi denatüre edici bir tampon içinde çözülür ve ardından amonyum bikarbonat gibi bir tamponla seyreltilir. SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) gibi güçlü deterjanlar kullanılarak proteinler çözünür hale getirilir, ancak SDS'in ve diğer protein dışı moleküllerin uzaklaştırılması gereklidir. Bu amaçla, aseton veya TCA/aseton çöktürme yöntemleri kullanılarak proteinler saflaştırılır. Sindirim öncesinde, proteinlerin indirgenmesi ve alkilasyonu gerçekleştirilir. Ancak, yüksek üre konsantrasyonu enzim aktivitesini azaltabileceğinden, üre konsantrasyonu amonyum bikarbonat tamponu ile seyreltilir. Sindirim işlemi sırasında tamponların pH aralığına dikkat edilmesi önemlidir **(Surmen, 2018).**

Filtre Destekli Örnek Hazırlığı (FASP) Yöntemi

FASP yöntemi, ESI iyonizasyon sistemleri kullanılan çalışmalarda yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, protein örnekleri filtreli kolonlar kullanılarak saflaştırılır. SDS gibi deterjanlar, filtreli kolonlar yardımıyla uzaklaştırılır. Üre ile yıkama işlemi sonrasında, filtreli kolon amonyum bikarbonat tamponu ile birkaç kez yıkanır ve ortamın pH'sı 7-9 aralığına ayarlanır. Bu yöntem, protein örneklerinin hızlı ve etkili bir şekilde saflaştırılmasını sağlar, ancak bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Örneğin, kolona yüklenebilecek protein miktarı sınırlıdır ve filtreler kirlenebilir veya tıkanabilir. Ayrıca, uzun santrifüj süreleri ve çok sayıda yıkama işlemi, deney süresini uzatabilir. Peptit geri kazanımı da bu yöntemde dikkat edilmesi gereken bir konudur **(Surmen, 2018).** FASP yönteminin geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalar, peptit geri kazanım verimini artırmayı hedeflemektedir. Bu çalışmaların bir kısmında, farklı enzimlerin kullanımı veya farklı tip filtreli kolonların etkisi incelenmiştir. Bu tür iyileştirmeler, FASP yönteminin daha verimli ve kullanışlı hale gelmesini sağlamıştır **(Surmen, 2018)**.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Zhang ve ark., 2013; Sarkoidozun serum protein biyobelirteçlerini aramak ve bunların ayırıcı tanıdaki klinik yararlılığını doğrulamak için sarkoidozlu hastalardan (n = 37) serum örnekleri toplanmış ve sarkoidoza özgü veya ilişkili protein ekspresyon profillerinin belirlenmesi için tüberkülozlu hastalarla (n = 20), diğer akciğer hastalıkları olanlarla (n = 20) ve sağlıklı gönüllülerle (n = 20) karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın ilk bölümü, kütle spektrometrisine dayalı ClinProt profilleme teknolojisi kullanılarak çalışılan popülasyonları ayırt edebilen bir peptit örüntüsü tanımlamak için sarkoidozlu hastaların serumunun proteomik analizine odaklanılmıştır. Daha sonra aynı hasta gruplarına ait örnekler Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi (ELISA) ile valide edilmiştir. Tanı için optimum kesme değerini belirlemek amacıyla alıcı çalışma karakteristik eğrisi (ROC) analizleri yapılmıştır. Akciğer dokusunda biyobelirteçlerin protein ekspresyon örüntülerini daha fazla doğrulamak için immünohistokimya yapılmıştır. Sarkoidoz ve kontrol grupları arasında M/Z 3.210 Dalton (Da) değerinde benzersiz bir protein zirvesinin farklı şekilde ifade edildiği bulunmuş ve serum amiloid A'nın (SAA) 29 amino asidinin (94-122) N-terminal peptidi olarak tanımlanmıştır. ELISA, serum SAA düzeyinin sarkoidoz grubunda diğer 3 kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu doğrulanmıştır ($p < 0,05$). ROC analizi ile belirlenen serum SAA konsantrasyonu için kesme değeri 101,98 ng/ml olup, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %96,3 ve %52,5 bulunmuştur. İmmünohistokimyasal boyama, sarkoidoz hastalarının akciğer dokusundaki SAA birikimlerinin sarkoid olmayan akciğer dokusuna kıyasla anlamlı derecede daha yoğun olduğunu göstermiştir ($p < 0,05$) **(Zhang ve ark., 2013)**.

Fitzgerald ve ark., 2019; Son yıllarda, biyomarkerlerin tüberküloz ve sarkoidozun ayırıcı tanısında kullanımı artış göstermiştir. Özellikle kan ve doku örneklerinde mikroRNA ve diğer protein seviyeleri üzerine çalışmalar geniş bir literatüre sahiptir. Yeni tüberküloz tedavilerinin değerlendirilmesi ve tedavi yanıtının izlenmesi için biyobelirteçler oldukça sınırlıdır. Fitzgerald ve arkadaşları, başarılı tüberküloz tedavisinin izlenmesi için bir biyobelirteç olarak 874,3547 Da moleküler kütleye sahip karakterize edilmemiş bir idrar metaboliti tespit etmişlerdir. Proteomik çalışmalarında ise, insan kökenli bir seril-lösin çekirdek 1 Oglikozile edilmiş peptit (SLC1G) karakterize ettiler. Aktif tüberkülozlu bireylerin idrarında, ev içi teması olan bireyler ve sağlıklı kontrollere kıyasla SLC1G önemli düzeyde fazla bulunmuştur. Ayrıca, başarılı tedavi sırasında tüberküloz

hastalarında ve tedavi başarısızlığı yaşayanlarda birinci haftada SLC1G seviyelerinde azalmalar gözlemlenmiştir **(Fitzgerald ve ark., 2018)**.

Casanova ve ark., 2020; Bu çalışmada, genomik biyobelirteçlerinin geliştirilmesini kolaylaştırmak için akciğer ve lenf nodu dokularındaki (en sık etkilenen organlar) sarkoidoz granülomlarının gen ekspresyon profili ve enfeksiyöz granülomlarla (koksidiodomikoz ve tüberküloz) karşılaştırması yapılmıştır. Bunun için akciğer ve mediastinal lenf nodu dokularındaki mikro diseksiyonlu sarkoidoz granülomların transkriptomik profilleri ve parafin gömülü bloklardan alınan enfeksiyöz granülomlar bağışıklıkla ilgili genleri karşılaştırılmıştır. Farklı ifade edilen genler (DEG'ler) profillendi, üç granülomatöz hastalık arasında karşılaştırıldı ve fonksiyonel zenginleştirme yolları açısından analiz edilmiştir. Histolojik benzerliklere rağmen, DEG'ler ve yol zenginleştirmesi, lenf nodları ve akciğerden gelen sarkoidoz granülomlarında belirgin şekilde farklı bulunmuştur. Lenf nodları belirgin bir immünolojik yanıt gösterirken, akciğerde yapısal rejeneratif yanıt gözlenmiştir. Sarkoidoz granülom gen ifadesi verileri daha önce bildirilen genomik biyobelirteçleri (STAB1, HBEGF ve NOTCH4) doğrulamış, akciğer ve lenf düğümlerinde bulunan yeni genomik belirteçler, ADAMTS1, NPR1 ve CXCL2 tanımlanmıştır **(Casanova ve ark., 2020)**.

Isa ve ark., 2018; Araştırmacılar, aktif pulmoner tüberkülozun aday idrar tabanlı tanı biyobelirteçlerini belirlemek için prospektif bir vaka kontrol çalışması yürütmüş (keşif kohortu) ve doğrulama için aktif pulmoner TB'nin doğrulanmış vakalarından ve tüberküloz olmayan akciğer hastalığı olan kontrollerden oluşan ayrı bir kör "doğrulama" kohortu elde etmişlerdir. Araştırma için, temiz idrar örnekleri toplanmış ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile birleştirilmiş uçuş süresi kütle spektrometrisi kullanılarak analiz edilmiştir. Keşif kohortundan alıcı-operatör karakteristiği (ROC) eğri altında kalan alan (AUC) değerleri N85% olan on molekül keşfedilmiştir. Bu 10 molekül, zamanla takip edilen 20 katılımcının bir alt grubunda 60 günlük tedaviden sonra önemli ölçüde azalmıştır. Bunlardan diacetylspermine, neopterin, sialik asit ve N-asetilheksosamin'in belirli bir kombinasyonu, aktif TB ve tüberküloz olmayan akciğer hastalığı olan katılımcıların kör doğrulama kohortunda N80% ROC AUC'leri sergilemiştir **(Isa ve ark., 2018)**.

Silva ve ark., 2013; Alveolar makrofajlar, sarkoidozun histolojik ayırt edici özelliği olan granülom oluşumu için önemlidir. Sarkoidozda antijen sunan hücreler olarak işlevlerinin hastalığın sonucuyla da ilgili olduğuna inanılmaktadır ve akciğerlerde remisyon veya uzun süreli kronik inflamasyonla sonuçlanmaktadır. Bu araştırmanın amacı

ise akciğer sarkoidozunda alveolar makrofajların çözünür proteomunun ifade düzeylerindeki değişiklikleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırarak incelemek ve hastalık mekanizmaları ve/veya hastalık fenotipi için önemli olan spesifik proteinleri ve yolları belirlemektir. Kütle spektrometrisine bağlı iki boyutlu jel jel elektroforezi kullanan kantitatif proteomik yaklaşım uygulanmıştır. Veriler çok değişkenli modelleme ve yol analizleri kullanılarak değerlendirilmiş, sarkoidoz ve sağlıklı kontroller arasında 69 protein noktasının önemli ölçüde değiştiği bulunmuştur. Bunlar arasında 25 benzersiz protein belirlenmiş, proteinlerin birkaçının, Fcγ aracılı fagositoz ve klathrin aracılı endositoz yolları dahil olmak üzere, önemli alveoler makrofaj işlevselliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Küresel proteomik analiz, sarkoidozda daha önce bildirilmemiş bir protein alt kümesinin değişikliklerinin tanımlanmasını sağlamıştır **(Silva ve ark., 2013)**.

Bhargava ve ark., 2020; Bu pilot çalışmada, akciğer sarkoidozunun gelişimi ve ilerlemesiyle bağlantılı yolları belirlemek için akciğere özgü protein ekspresyonlarını incelemişlerdir. Sarkoidoz vakalarında bronkoalveolar lavaj (BAL) hücreleri ve sıvı (BALF) proteinlerini karakterize etmişlerdir. BAL hücrelerinde 4.306 protein tanımlarken, bunlardan 272 protein sarkoidozda kontrollerle karşılaştırıldığında farklı şekilde ifade edilmiştir. Bu proteinler integrin bağlantılı kinaz ve IL-8 sinyalizasyonu gibi yeni yollara ve fagozom olgunlaşması, klatrin aracılı endositotik sinyalizasyon ve redoks dengesi gibi sarkoidozda daha önce belirlenmiş yollara eşlenir. BALF'de, farklı şekilde ifade edilen proteinler BAL hücrelerinde tanımlanan çeşitli yollarla eşleşmiştir. Farklı şekilde ifade edilen BALF proteinleri ayrıca aril hidrokarbon sinyalizasyonuna, doğuştan ve adaptif bağışıklık tepkisi arasındaki iletişime, integrin, PTEN ve fosfolipaz C sinyalizasyonuna, serotonin ve triptofan metabolizmasına, otofajiye ve B hücresi reseptör sinyalizasyonuna da eşlenir. BALF'de ilerleyici ve ilerleyici olmayan sarkoidoz arasında farklı olan ek yollar arasında CD28 sinyalizasyonu ve PFKFB4 sinyalizasyonu yer alır.

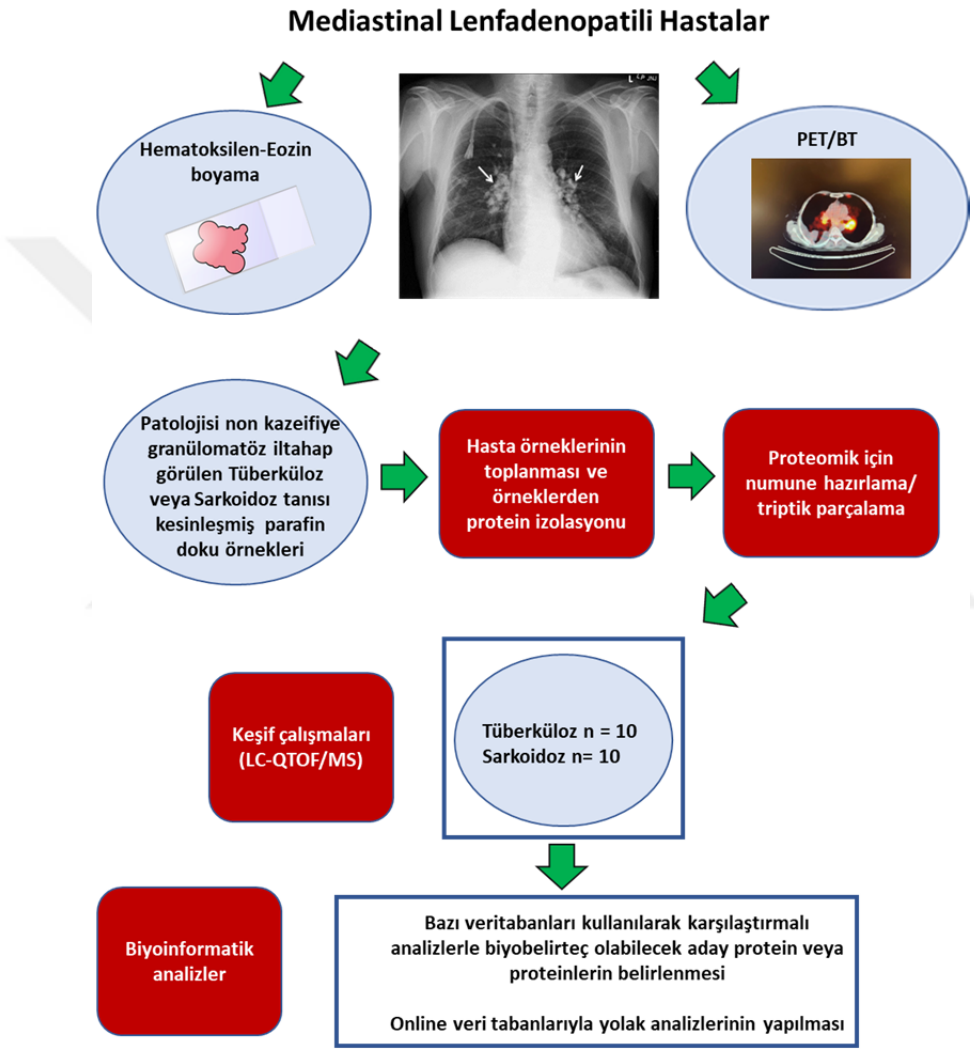
Pandey ve Ghosh, 2024 Bu derleme, TB hastalarının serum, balgam, tükürük ve idrar örneklerinden alınan konakçıya özgü biyobelirteçler için proteomik araştırmaları ve komorbiditesi olan hastaları özetlemektedir. Mevcut literatürden yapılan kapsamlı veri madenciliği, bağışıklık ve savunma, metabolik düzenleme, hücresel yapışma ve hareketlilik, inflamatuar yanıtlar ve doku yeniden şekillenmesinde yer alan konakçıya özgü proteinlerin *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) enfeksiyonu üzerine önemli bir düzensizlik gösterdiği sonucuna varmalarını sağlamıştır. Özellikle, immün düzenleyici protein orosomukoid (ORM), çeşitli örnek tiplerinden yapılan birden fazla çalışmada gözlemlendiği gibi, aktif TB'de TB olmayan bireylere kıyasla yukarı

düzenlenmiştir. Mannoz reseptörü C tip 2 (MRC2), iki bağımsız serum proteomik araştırmasında yukarı düzenlenmiş, tedavi yanıtı biyobelirteci olarak tanımlanmıştır **(Pandey ve Ghosh, 2024)**.

Dao ve ark., 2021; Çalışmada akciğer tüberkülozunu teşhis etmek amacıyla balgam üzerine uygulanan MALDI-TOF kütle spektrometrisi kullanılarak protein profillemesinin uygulanabilirliğini ve tanıya katkısını değerlendirmek için akciğer tüberkülozu olduğundan şüphelenilen hastalardan alınan balgam örnekleri MALDI-TOF-MS kullanılarak analiz edilmiştir. Farklı şekilde ifade edilen protein zirvelerini kullanarak, doğrulanmış akciğer tüberkülozu (PTB) olanlar, tüberkülozu olmayan ancak alt solunum yolu enfeksiyonu (LRTI) olan (TB olmayan LRTI) ve tüberkülozu olmayan ve LRTI olmayan (TB olmayan kontroller) olmak üzere üç hasta grubunu karşılaştırmışlardır. 25 protein PTB hastalarını ve TB olmayan kontrolleri birbirinden ayırmış, 10 protein ise PTB hastalarını TB olmayan LRTI hastalarından ayırmıştır. MALDI-TOF MS balgam analizinin negatif öngörü değerinin, TB olmayan kontroller için direkt balgam mikroskobik incelemesi ve balgam kültüründen (%78, %95 CI 62–89) daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (%96, %95 CI 80–100). MALDI-TOF MS balgam analizi ve direkt mikroskobik inceleme birleştirildiğinde, TB olmayan LRTI hastaları için negatif öngörü değeri %94'e, %95 CI 80–99'a ulaştı **(Dao ve ark.,2021)**.

3. MATERYAL VE METOT

Deneysel çalışmalar, laboratuvar çalışmaları ve biyoinformatik analizler olarak iki kısma ayrılmaktadır (Şekil 3.1). Laboratuvar çalışmalarının bir kısmı (Patolojik tanı ve parafin kesitlerin elde edilmesi ve radyolojik tanı) Çukurova Üniversitesi Hastanesinde gerçekleştirilmiştir. Proteomik işlemleri ve biyoinformatik analizler ise Ç.Ü. Biyoteknoloji Merkezi bünyesindeki pulmo-gastro laboratuvarında ve ÇÜMERLAB'da (LC-QTOF-MS analizleri) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Deneysel akım diyagramı

3.1. Hematoksilen-Eozin boyama (HxE boyama) (Patolojik inceleme)

Hematoksilen: 1 gram Kristal hematoksilen, 10 ml %95'lik etanolde çözüldü. 20 gram $KAl(SO_4)_2.12H_2O$ 200 ml distile suda kaynatılarak çözüldü.. Bu iki ayrı solüsyon yavaş bir şekilde karıştırılıp elde edilen karışım, koyu mor bir renk alana kadar tekrar kaynatıldı. Daha sonra karışıma 0.5 gram HgO eklendi. Karışımın bulunduğu kap alttan hızlıca soğutuldu.

Eozin: 1 gram Eosine-Y (Yellowish), 20 ml distile su içerisinde iyice homojenize olana kadar çözüldü. Karışıma, 80 ml %95'lik etanol eklendi. Bu stok eozin'dir. 1 kat stok eozin üzerine 3 kat %80'lik etanol eklenerek çalışma eozini (boyama işlemi için) elde edildi. Çalışma eozini üzerine 5 ml glasiel asetik asit eklendi.

Protokol

1. Deparafinizasyon: Dokular, 10'ar dakika sürelerle ksilen içerisinde bekletildi.

2. Dehidrasyon: Deparafinize edilmiş dokular sırasıyla absolute alkol, %95'lik etanol, %80'lik etanol ve %70'lik etanolden 10'ar dakika süreyle geçirildi.

3. Hematoksilen aşaması: Dokular hematoksilene alınıp 5-6 dakika boyunca tutuldu.

4. İlk yıkama: Hematoksilenden çıkarılan dokular akan su altında yaklaşık olarak 5-10 dakika boyunca yıkandı.

5. Asit alkol aşaması: Yıkanan dokular asit alkole daldırılıp birkaç saniye soluk mavi renk alana kadar tutuldu ve ikinci yıkamaya alındı. 5-10 dakika kadar akan suda yıkandı.

6. Eozin aşaması: İkinci yıkamaya tabi tutulan dokular eozine daldırılıp 3-4 dakika boyunca tutuldu.

7. Çıkış alkolü aşaması: Dehidrasyonda olduğu gibidir ancak alkollerin sırası terstir. Dokulardaki fazla eozini uzaklaştırmak için sırasıyla %70, %80, %95 ve absolut alkolden geçirildi. İlk 3 etanole dokular daldırılıp çıkarılırken absolute etanolde 15-20 dakika tutuldu.

8. Çıkış Xylol'ü aşaması: Dokular çıkış etanolünden alındı. Birkaç dakika dışarıda kurumaya bırakıldı ve çıkış Ksilenine alındı. 10'ar dakika 3 kez Ksilenden geçirildi.

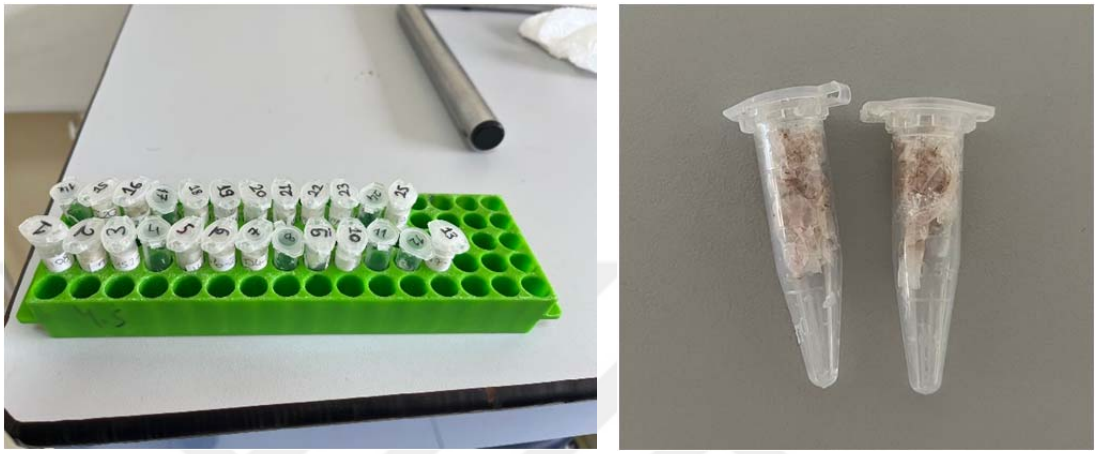
9. Yapıştırma: Çıkış ksilenindeki dokular yapıştırma Ksilenine alınarak teker çıkarılıp sentetik reçine (Entellan) ile yapıştırılıp kurumaya bırakıldı **(Luna, 1968)**. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelendi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda görevli iki bağımsız patolog tarafından değerlendirildi. Çalışmaya dahil edilen olguların parafin bloklarından hazırlanan kesitler proteomik analizler için ayrıldı.

3.2. PET/BT Görüntülemesi

47 yaşında mediastende LAP (C38) tanısı ile kliniğe başvuran 62 kg kadın hastanın 7.32 mCl, 45 yaşında akciğer nodüler lezyon (C34) tanısı ile kliniğe başvuran 87 kg kadın hastanın 9,03 mCi F-18 FDG enjeksiyonu sonrası sakin bir ortamda hastaların konuşma ve çiğneme yapmadan istirahat etmesi sağlanmıştır. Enjeksiyonu takiben ortalama 60dk sonra tüm vücut PET/BT görüntülemesi yapılmıştır. Elde edilen görüntülerin BT ile atenülasyon düzeltilmesi yapıldıktan sonra transaksiyal, koronal ve sagital düzlem görüntüleri yanı sıra MIP (Maximum Intensity Projection) görüntüleri değerlendirilmiştir.

3.3. Doku örneklerinin temini

Çukurova Üniversitesi Göğüs Hastalıkları, Göğüs cerrahisi ve Patoloji Anabilim Dalları iş birliği ile 10'u sarkoidoz uyumlu, 10'u Tüberküloz uyumlu 20 adet granülomatöz hastasından parafinize doku örneği elde edilmiştir (Şekil 3.2.). Bu dokulara sırasıyla, deparafinizasyon, ultrasonik homojenizasyon, 3 fazlı protein izolasyonu ve ardından proteomik işlem basamakları uygulanmıştır. Proteomik örnekleri elde edilmiş ve LC-MS cihazında analiz edilmek üzere Çukurova Üniversitesi Merkezi araştırma Laboratuvarına gönderilmiştir.



Şekil 3.2. FFPE granülomatöz lenf doku örnekleri

3.4. Deparafinizasyon

1. FFPE doku kesitleri (her biri yaklaşık 5-10 mm^3) üzerine 1'er mL xylene eklendi
2. Ardından 56°C'de 10 dk inkübe edildi.
3. 13.000 g'de 5 dakika santrifüjün ardından süpernatant pipetle çekildi ve tekrar üzerine 1mL xylene eklendi ve 56°C'de 10 dk tekrar inkübe edildi.
4. Aynı işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra (3 kez),
5. Sırasıyla; %100, %95 ve %70'lik etanol ile yıkama yapıldı.
6. Her yıkama ardından santrifüjlenip süpernatant atıldı.
7. Sonuç olarak deparafinize dokular elde edildi ve buz üzerinde, protein izolasyon aşamasına geçildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Deparafinizasyonun ardından elde edilen granülömatöz lenf doku örnekleri

3.5. Doku Homojenizasyonu

1. Proteaz inhibitörü içeren ripa buffer hazırlandı; Bir eppendorf tüpüne 1000 µL hazır satın alınan Ripa buffer ve 10 µL 100X Proteaz inhibitör kokteyl eklenip pipetajlandı ve karışmaları sağlandı.

NOT: 100X konsantrasyonundaki Proteaz inhibitör kokteyl' i kullanılacaksa ripa buffer'ın miktarına göre hesaplama yapılır. Örneğin 1000 µL ripa buffer kullanılacaksa;

$$100X * V = 1X*1000 \qquad V= 10\ \mu L\ 100X\ Proteaz\ inhibitör\ kokteyl$$

2. Örneklere 1. adımda hazırlanan proteaz inhibitörlü Ripa buffer eklendi ve vortekslendi. 5 mm^3 doku parçası, 500µL ripa buffer içerisinde ultrasonik homojenizatörle (Bandelin Sonopuls 2070) homojenize edildi (%35 amplitude, 1 dakika, Cycle 5) (Şekil 3.4).
3. Sonikasyonun ardından hücre süspansiyonu, +4°C'de maksimum devirde 20 dakika santrifüjlendi.
4. Santrifüjün ardından elde edilen süpernatant yeni bir eppendorf tüpüne alındı.



Şekil 3.4. Sonikasyon ile dokuların homojenize edilmesi (Üst), Oluşan süpernatantın yeni bir tüpe aktarılması ve 3 fazlı sistemle protein izolasyon aşaması (Sağ alt)

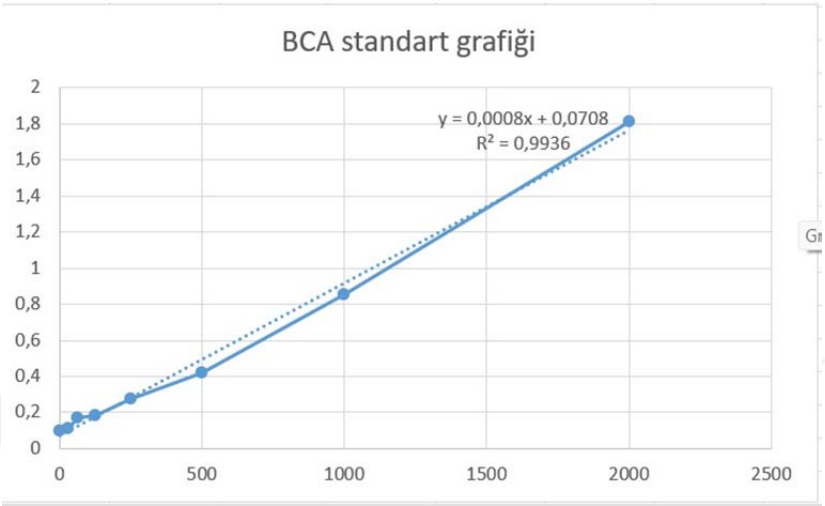
3.6. 3 Fazlı çöktürme ile Protein izolasyonu

1. 500 µL doku lizatı yeni bir falkon tüpe alındı ve üzerine 2mL (4 kat) Kloroform eklenip vortekslendi.
2. Ardından, üzerine 1 hacim (500 µL) metanol eklendi ve tekrar vortekslendi.
3. Son olarak 1,5 mL (3 kat) saf su eklenip vortekslendi.
4. Karışım 600g de 8 dk +4 °C'de santrifüjlendi.
5. 2 faz ayrımı ve ortada beyaz bir tabaka (İnterfaz) protein fazı görüldü.
6. Üst faz dikkatlice pipetle ayrıldıktan sonra, protein pelleti dikkatlice alındı ve üzerine 1 mL metanol eklenerek +4 °C'de 9000g de 5dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve ependorf tüpünün ağzı açık bırakılarak metanolün uçması sağlandı.
7. Kuruyan pellet 200 µL suda çözülerek proteomik işlem basamaklarına geçildi. Öncelikle BCA yöntemi ile protein miktarı tayin edildi.

3.7. BCA Yöntemi ile Total Protein tayini

Total protein tayini için BCA solüsyon kiti (Pierce, katalog no: 23225) kullanıldı. BSA (bovine serum albümin) ile 2000µg, 1000µg, 500µg, 250µg, 125µg, 62.5µg, 31.25µg ve 0 µg standartlar hazırlandı (Şekil 3.5). Ependorf içindeki proteinlerden 5'er µL alınarak 1/5 oranında distile su ile dilüe edildikten sonra hem standartlar hem de proteinler, 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 10'ar mikrolitre ve ikişerli olarak kuyucuklara aktarıldı. Üzerlerine 200uL BCA çalışma solüsyonu eklenip kaplar plate çalkalayıcısında çalkalandıktan sonra 30 dakika 37 ºC'de inkübe

edilip ve plate okuyucuda 562 nM dalga boyunda okutuldu. Çoğu örneğin protein miktarları bir sonraki basamağa geçebilecek nicelikteydi 8 adet örnekteki protein miktarı yetersizdi. Dokular tekrar temin edilip aşamalar tekrarlandı.



2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	0
1,814	0,855	0,418	0,276	0,183	0,171	0,1105	0,1005

Şekil 3.5. Protein standart grafiği (BCA yöntemi)

3.8. Proteomik numune hazırlanması

3.8.1. Indirgeme ve Alkilleme

1. 50-100mg/200 µL protein üzerine 20 µL 100 mM DTT (1,4-Dithiothretiol) eklendi ve 56 °C'de 1 saat inkübe edildi.
2. Oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra üzerine, 25 µL 550 mM IAA (İyodoasetamid) eklendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dk inkübe edildi.
3. Üzerine 25 µL 100 mM DTT eklenir ve 56 °C'de 30 dk inkübe edilir, oda sıcaklığına gelmesi beklenip bir sonraki aşamaya geçildi.

3.8.2. Enzimatik parçalama

- 50 µL Tripsin (Enzim:Protein= 1:20) eklenir ve 1 gece 37 °C'de çalkalayıcılı inkübatörde (Eppendorf, Thermomixer comfort) 600 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi.
- Reaksiyonu durdurmak için %1 nihai konsantrasyonda olacak şekilde TFA (Trifloroasetik asit) eklendi. (%15'lik TFA' dan 20 µL eklendi)

3.8.3. Peptit temizliği

- Boş peptid temizleme kolonu (Thermoscientific- Peptide desalting spin columns, Cat no: 89851 /52) toplama tüpüne takılarak, kendi protokolünde de belirtildiği üzere, 5000 g'de 1 dk santrifüjlendi.
- Daha sonra kolona 300 µL ACN (Asetonitril) eklendi ve 5000 g'de 1 dk santrifüjlendi. Toplama tüpünde, yani alttan kalan sıvı atıldı (Bu işlem 2 defa yapıldı).
- Kolona 300 µL %0,1'lik TFA çözeltisi eklendi ve tekrar 5000 g'de 1 dk santrifüjlendi (Bu işlem 2 defa yapıldı).
- 300 µL'lik peptit karışımı kolona yüklendi ve 3000 g'de 1 dk santrifüjlendi ve alttaki sıvı atıldı.
- Kolona 300 µL %0,1 TFA kondu ve 3000 g'de 1 dk santrifüjlendi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
- Yıkamadan sonra proteinleri elüe etmek için, kolon temiz bir eppendorf tüpüne yerleştirildi ve kolona 300 µL elüsyon tamponu (%50 ACN + %0,1 TFA) eklenerek 3000 g'de 1 dk santrifüj edildi (Bu işlem 2 defa tekrarlandı).
- Eppendorf tüpünde toplanan sıvı kapağı açık bir şekilde, 45 °C'de yaklaşık 3,5 saat boyunca vakum altında (Thermo/Savant SPD2010 SpeedVac Concentrator) kurutuldu (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Vakum konsantratör cihazı ve elüe edilmiş proteinlerin konsantratörde kurutulduktan sonraki görüntüsü (beyaz katı).

Not: LC-MS çalışmasına geçene kadar peptidler oda sıcaklığında saklandı. Kromotografik aşamaya geçildiğinde 100 µL resuspanse tamponu (%0,1 FA(formik asit) + %3 ACN) içerisinde çözüldü **(Jacek ve ark., 2009; Zheng ve ark., 2020)**.

3.9. LC-QTOFF-MS protokolü

Poroshell 120 EC-C18 (3.0x50 mm, parçacık boyutu 2.7 µm) kolon (Agilent Technologies) dan su içerisinde %0.1 formik asit (A) ve asetonitril içerisinde %0.1 formik asit içeren (B) hareketli fazlar kullanılarak 25 °C' de aşağıdaki zaman aralıklarında toplam 33 dakika süreyle 0.3 mL/dakika akış hızında gradient elüsyon gerçekleştirilmiştir. MS analizleri pozitif iyon kullanılarak aşağıdaki koşullarda Agilent 6545 Accurate- Mass Q TOF-MS cihazıyla gerçekleştirilmiştir (Anonymus 1). Bu amaçla Çukurova Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarları'ndan hizmet alımı yapılmıştır.

Cihaz: Agilent 6545 QTOF LC/MS

Kolon: Poroshell 120-C18 (3x50 mm, parçacık boyutu 2,7 µm)

Enjeksiyon hacmi: 5 µL

Akış: 300 nL/dakika analitik pompa, 3 µL/dakika yükleme pompası

Hareketli Fazlar: A: Su içerisinde %0,1 FA B: %90 ACN + %0,1 FA

Çizelge 3.1. QTOF LC/MS Gradient elüsyon protokolü

%3 B	97 A	0. dakika
%10 B	90 A	3. dakika
%12B	88 A	8.dakika
%30 B	70 A	42. dakika
%45 B	55 A	45. dakika
%70 B	30 A	50. dakika
%90 B	10 A	55. dakika
%3 B	97 A	55,1. Dakika
Stop time		60 dakika
Post time		10 dakika

3.10. LC-QTOFF-MS analizi için PEAKS Studio protokolü

Peptid ve protein analizi için Peaks Studio 12 programı kullanıldı. İlk olarak Sarkoidoz ve Tüberküloz proteomik dataları ayrı ayrı gruplandırılıp, insan FASTA'sı kullanılarak analiz yapıldı. Ardından iki grup arasındaki fark *Mycobacterium tuberculin* FASTA'sı kullanılarak analiz edildi. Aşağıda software de kullanılan protokollerin detayları listelenmiştir.

3.10.1. İnsan FASTA'sı kullanılarak yapılan analiz protokolü

Data Refinement Parameters

Skip Preprocessing: false

Mass Correction: true

Chimera Association: true

De Novo Parameters

Precursor Mass Error Tolerance: 30.00ppm

Fragment Mass Error Tolerance: 0.1Da

Enzyme: Trypsin

Max Variable PTM per Peptide: 2

Fixed Modifications:

Variable Modifications:

Database Search Parameters

Precursor Mass Error Tolerance: 30.00ppm

Fragment Mass Error Tolerance: 0.1Da

Enzyme: Trypsin

Max Missed Cleavage: 2

Digest Mode: Semi-Specific

Peptide Length Range: 6 - 45

Max Variable PTM per Peptide: 2

Fixed Modifications:

Variable Modifications:

Database

- Human
  - Taxonomy: all species
  - Searched Entries: 20596

Deep Learning Boost: Yes

Report Filter:

PSM -10LgP >= 10.0

Proteins -10LgP >= 10.0

Proteins Unique Peptides >= 1

De Novo Only ALC >= 50.0%

De Novo Only Tag Sharing: Disabled

De Novo Only Fully Matched: No

Confident Amino Acid Threshold: 2.00%

Protein

Significance Method: ANOVA

Modified Form Exclusion: Yes

Remove Outlier: Yes

Use Top 3 Peptide

Significance >= 0.0

Fold Change between: [1.0 - 64.0]

Has at least 1 Used Peptide

Samples: 2 Samples in 2 Groups

T: Tüberküloz;

S: Sarkoidoz;

Normalization Method: Use TIC

3.10.2. *Mycobacterium tuberculin* FASTA'sı kullanılarak yapılan analiz protokolü

Data Refinement Parameters

Skip Preprocessing: false

Mass Correction: true

Chimera Association: true

De Novo Parameters

Precursor Mass Error Tolerance: 20.00ppm

Fragment Mass Error Tolerance: 0.1Da

Enzyme: Specified by each sample

Max Variable PTM per Peptide: 2

Fixed Modifications:

- Carbamidomethylation (+57.02)

Variable Modifications:

- Oxidation (HW) (+15.99)

Database Search Parameters

Precursor Mass Error Tolerance: 20.00ppm

Fragment Mass Error Tolerance: 0.1Da

Enzyme: Specified by each sample

Max Missed Cleavage: 2

Digest Mode: Semi-Specific

Peptide Length Range: 6 - 45

Max Variable PTM per Peptide: 2

Fixed Modifications:

- Carbamidomethylation (+57.02)

Variable Modifications:

- Oxidation (HW) (+15.99)

Database

- Mycobacterium Tuberculosis (1584)
  - Taxonomy: all species
  - Searched Entries: 21531

Deep Learning Boost: Yes

Report Filter:

PSM -10LgP >= 20.0

Proteins -10LgP >= 15.0

Proteins Unique Peptides >= 1

De Novo Only ALC >= 50.0%

De Novo Only Tag Sharing: Disabled

De Novo Only Fully Matched: No

Confident Amino Acid Threshold: 2.00%

Protein

Significance Method: ANOVA

Modified Form Exclusion: Yes

Remove Outlier: Yes

Use Top 3 Peptide

Significance >= 0.0

Fold Change between: [1.0 - 64.0]

Has at least 1 Used Peptide

Samples: 2 Samples in 2 Groups

Group 1: Tüberküloz;

Group 2: Sarkoidoz;

Normalization Method: Use TIC

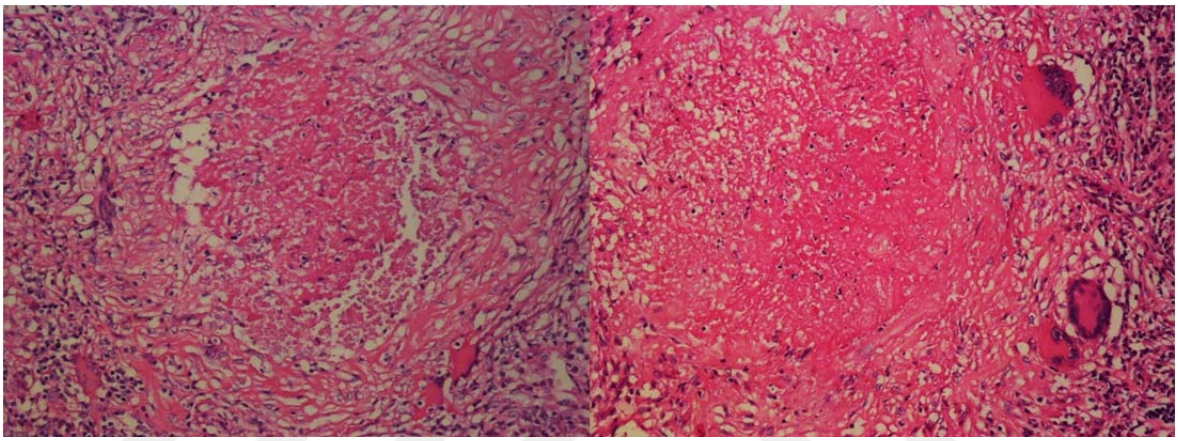
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Örnek bir tüberküloz hastasının patolojik tanısı ve pet bulguları

4.1.1. Patolojik Tanı

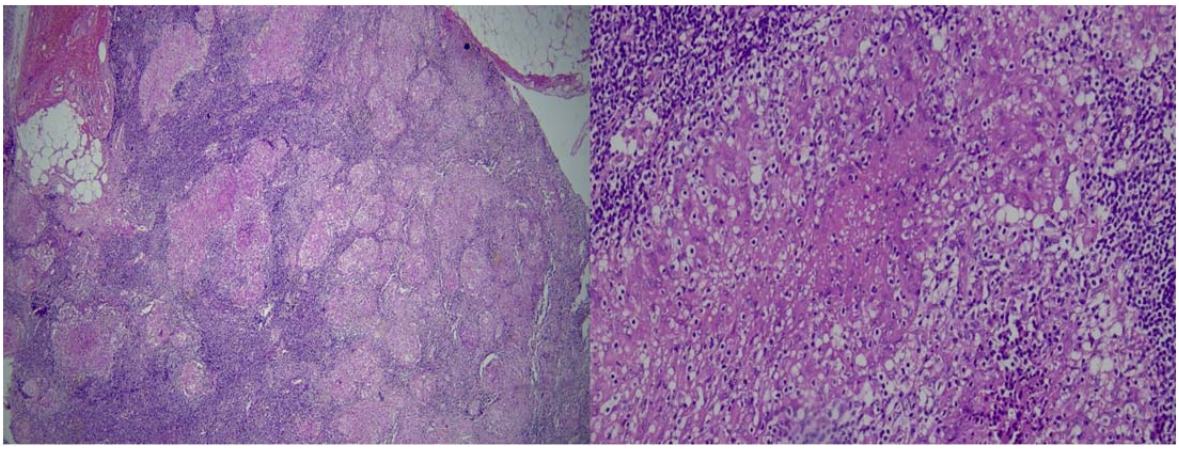
1. Granülomatöz iltihap, sağ orta lob wedge, biyopsi
2. Granülömatöz iltihap, 7 No'lu lenf nodu kayıtlı materyal, eksizyon.

Lenf nodu materyalinde görülen nekrotizan granülömatöz inflamasyon odağı (Şekil 4.1), tüberküloz şüpheli granülom yapan hastalık düşündürmüştür.



Şekil 4.1. Nekrotizan granülomatöz inflamasyon odağı. H&Ex40; H&Ex400

Şekil 4.2'de nekrotizan granülom odağının merkezindeki kazeifiye granülomatöz iltihap ve çevresinde görülen langhans tipi dev hücreler tüberküloz tanısını kesinleştirir niteliktedir.



Şekil 4.2. Nekrotizan granülom odağında merkezde kazeifiye granülomatöz iltihap ve çevresinde langhans tipi dev hücreler görülmekte H&Ex400; H&Ex400

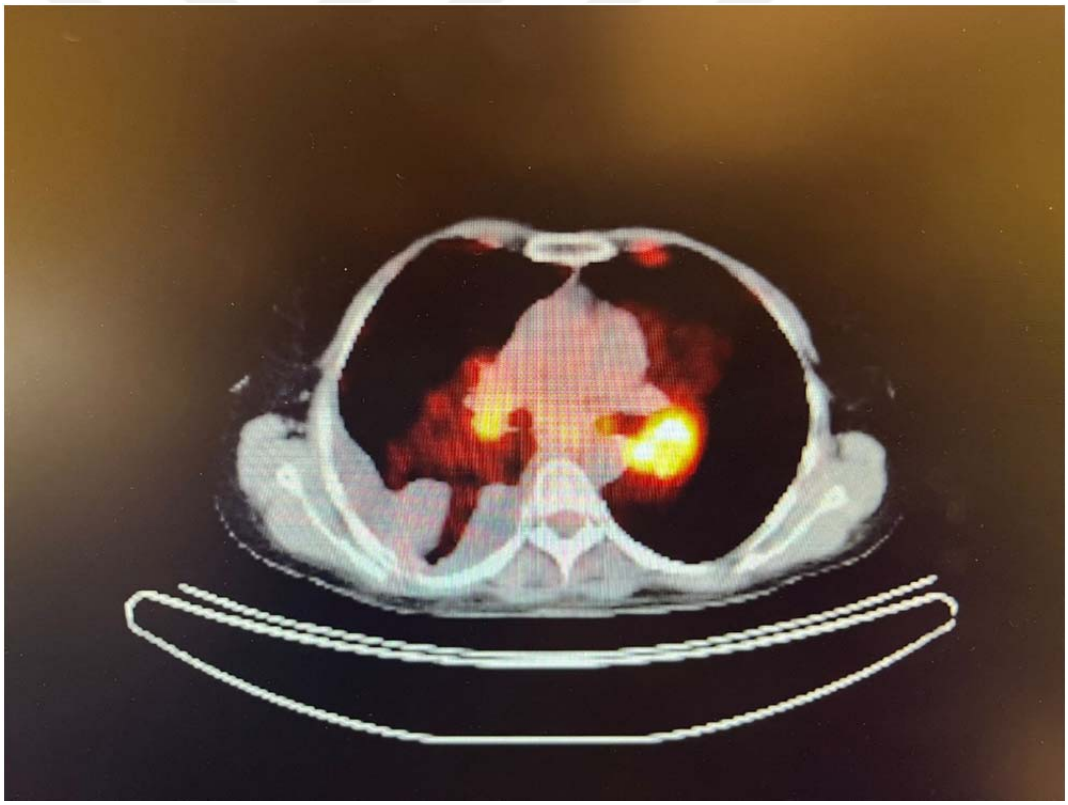
Patolojik bulgulara göre tüberküloz olduğu tespit edilen 10 hastanın parafinize dokularından kesitler proteomik analizler için ayrılmıştır.

4.1.2. Pet bulguları

Baş-Boyun ve Toraks Mediasten; Bilateral parotis lojunda, her iki servikal bölgede, mediastende tüm kompartmanlarda, bilateral internal mamaryan zincirde ve sol aksillada en büyüğü yaklaşık 2,5 cm boyutunda ölçülen, yer yer konglomere özellikte, artmış F-18 FDG tutulumu gösteren multiple LAP mevcuttur (SUVmax: 21.85).

Her iki akciğerde en büyüğü sağda alt lobda majör fissür komşuluğunda yaklaşık 13mm çapında ölçülen ve artmış F-18 FDG tutulumu gösteren multiple modüler lezyon görülmüştür (SUVmax: 10.33). Sağ hemitoraksta kalınlığı 4,5 cm'e ulaşan plevral efüzyon mevcuttur.

Batın-Pelvis; Karaciğer, dalak ve her iki sürrenal lojda patolojik F-18 FDG tutulumu izlenmedi. Paraaortik, parakaval, bilateral iliak ve bilateral femoral bölgelerde en büyüğü retropankreatik alanda yaklaşık 3cm boyutunda ölçülen bazıları konglomere özellikte artmış F-18 FDG tutulumu gösteren multiple LAP mevcuttur (SUVmax: 28.46) (Şekil 4.3.).



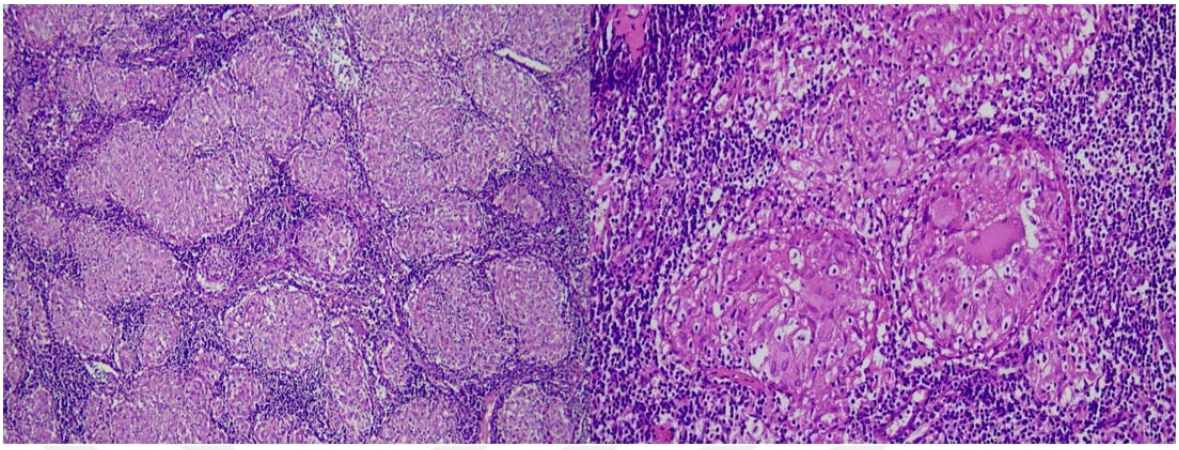
Şekil 4.3. Bir Tüberküloz hastasına ait PET-CT akciğer F-18 FDG Tutulumu Pet bulgusu

4.2. Örnek bir sarkoidoz hastasının patolojik tanısı ve pet bulguları

4.2.1. Patolojik tanı

1. Non-nekrotizan granülomatöz iltihap, sağ akciğer üst lob wedge rezeksiyon.
2. Non-nekrotizan granülomatöz iltihap, mediasten 4 ve 7 no'lu lenf nodları biyopsi

Morfolojik bulgular ön planda sarkoidoz ile uyumlu bulunmuştur. Nonnekrotizan granülomatöz inflamasyon odağı Şekil 4.4'te görülmektedir. Patoloji raporunda hastanın kliniği ile radyolojisinin korele değerlendirilmesi önerilmiştir.



Şekil 4.4. Nonnekrotizan granülomatöz inflamasyon odağı.H&Ex100; H&Ex200

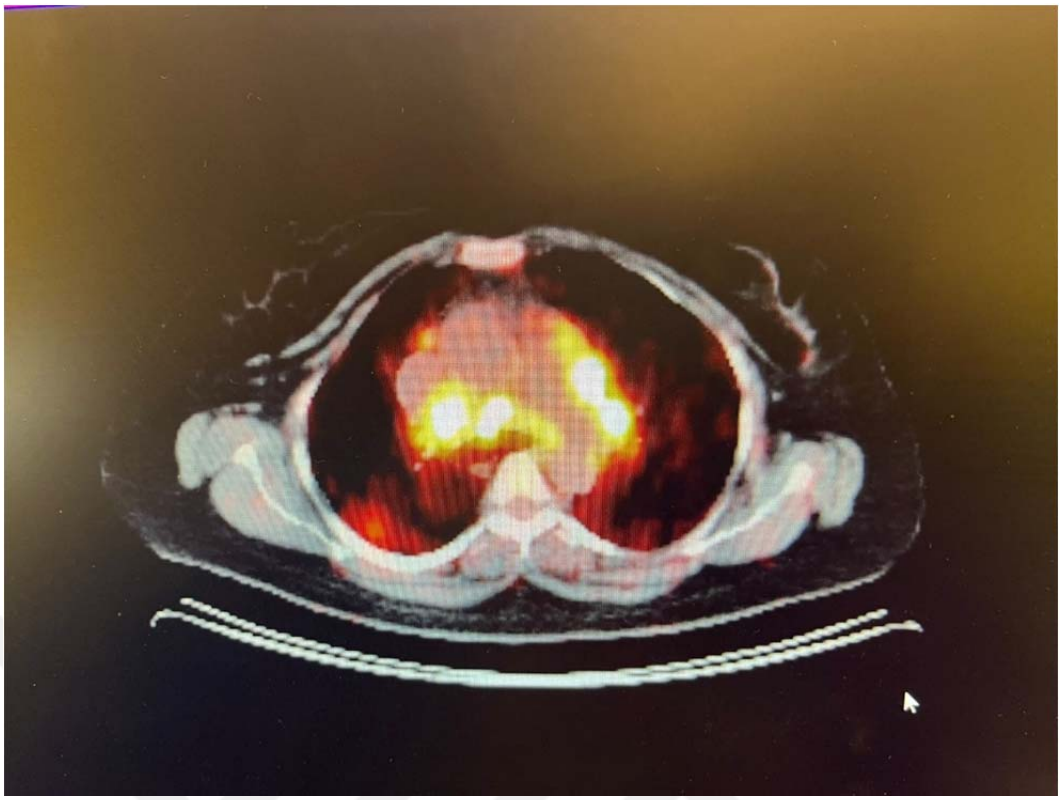
4.2.2. Pet bulguları

Baş-Boyun ve Toraks-Mediasten Kesitlerinde; Bilateral juguler, parastemal, mediastinal kompartmanlarda, bilateral hiler ve prekardiak bölgede büyüğü 37mm boyutlarında, multiple yer yer füzyone görünümde yoğun artmış F-18 FDG tutulumu gösteren lenf nodları izlenmiştir (SUVmax: 31.98).

Her iki akciğer parankimde büyüğü 25 mm boyutlarında artmış F-18 FDG tutulumu gösteren birkaç adet lezyon izlenmiştir (SUVmax: 18.04).

Batın-Pelvis; Karaciğer hilusunda, gastrohepatik aralıkta, perisplenik, peripankreatik, paraaortik, bilateral iliak ve inguinal bölgelerde büyüğü 2,5 cm boyutlarında artmış F-18 FDG tutulumu gösteren multiple lenf nodları izlenmiştir (SUVmax: 20.09). Dalakta F-18 FDG tutulumu karaciğere oranla diffüz olarak artmıştır (SUVmax karaciğer: 4.46, SUVmax dalak: 6.53).

Özetle bahsi geçen kompartmanlarda multiple malignite düzeyinde hipermetabolik lenf nodları, bilateral akciğer parankimde malignite düzeyinde hipermetabolik lezyonlar, dalakta karaciğere oranla



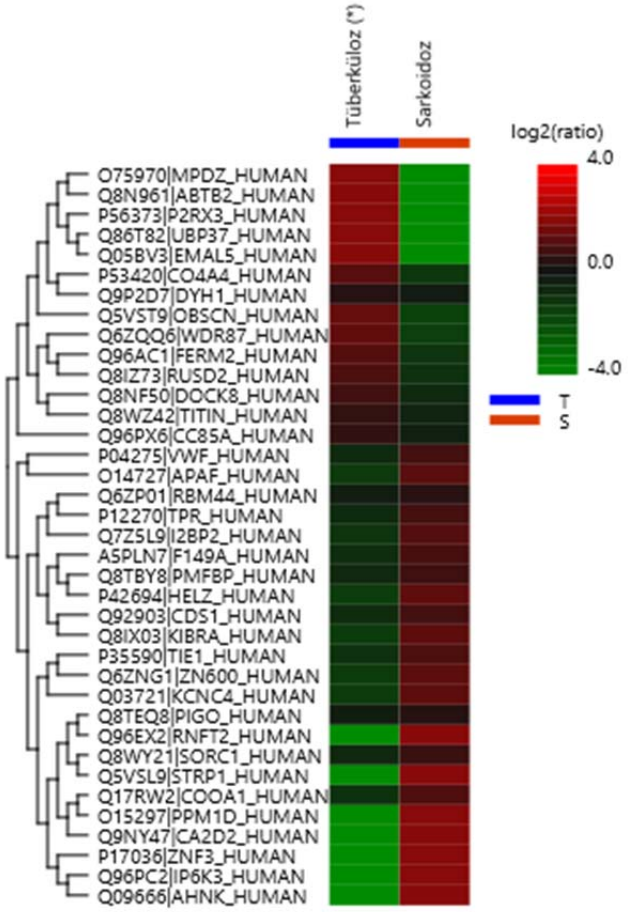
Şekil 4.5. Bir Sarkoidoz hastasına ait PET-CT akciğer F-18 FDG Tutulumu

Örnekte de görüldüğü gibi klinik bulgular, patoloji ve radyoloji sonuçlarının birlikte değerlendirilmesine rağmen bazen granülomatöz hastalıklarda tanı koymada zorlanılmaktadır. Bu probleme çözüm aramak adına bu çalışmanın da esas amacı olan proteomik profillerin belirlenmesi umut vadetmektedir.

4.3. Proteomik analizler

4.3.1. İnsan FASTA'sı kullanılarak yapılan proteomik analiz sonuçları

Tüberküloz ve Sarkoidoz tanısı almış hastaların FFPE doku örneklerinden elde edilen proteomik datalar, Peaks Studio 12analiz programıyla analiz edilmiş ve iki hastalık grubuna ait peptidler ve bunları içeren proteinler belirlenmiştir. Şekil 4.1'de İki hastalık grubu arasında farklılaşan proteinlerin analizi için oluşturulan Heat Map haritalaması görülmektedir.



Şekil 4.6. Tüberküloz ve Sarkoidoz proteinlerinin Heat Map grafiği ile karşılaştırılması

Log2 oranlarına göre oluşturulan Kırmızı-Yeşil skalada, kırmızıya doğru gidildikçe upregüle, yeşile doğru gidildikçe downregüle olan proteinler görülmektedir. Skalaya göre renkler arası mesafe açıldıkça aralarındaki anlamlı fark o kadar fazla anlamına gelmektedir. Buna göre tüberkülozda upregüle olup, sarkoidozda downregüle olan ve aralarındaki anlamlı fark fazla olan proteinler aşağıda listelenmiştir.

Tüberkülozda Upregüle olup, sarkoidozda downregüle olan proteinler, kodlandıkları genler ve özellikleri

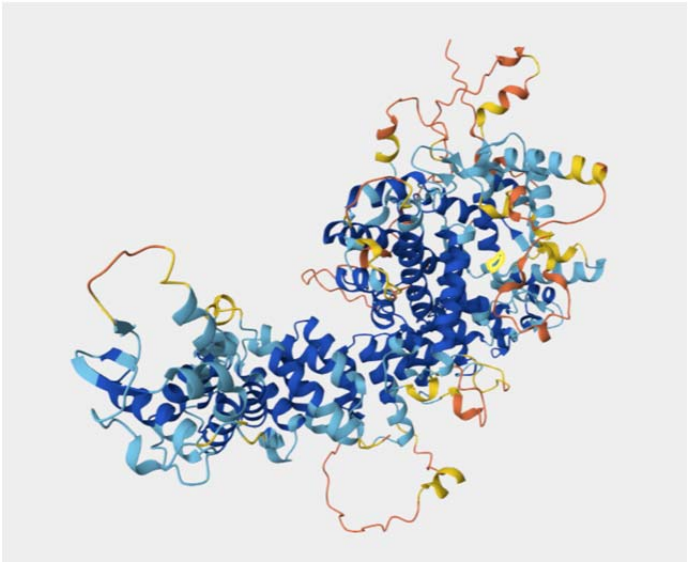
O75970 (MPDZ_HUMAN): Bu gen tarafından kodlanan proteinin, protein-protein etkileşimlerinin ayırt edici özellikleri olan birden fazla PDZ alanı vardır. Kodlanan proteinin HTR2C reseptörüyle etkileşime girdiği ve hücre yüzeyinde kümelenmesine neden olabileceği bilinmektedir. Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.2'de görülmektedir. Bu gen için farklı izoformları kodlayan birden fazla transkript varyantı bulunmuştur (Anonymus 1). Uyarıcı sinapslarda AMPAR potansiyasyonunun ve sinaptik plastisitenin kontrolünde rol oynayabilecek NMDAR sinyalleme kompleksinin üyesidir (Becamel ve ark., 2001; Krapivinsky ve ark., 2004).

Hücre yüzeyinde HT2RC kümelenmesini uyarır. MPDZ ile ilişkili hastalıklar arasında hidrosefali, diğer beyin anomalileri veya göz anomalileri yer almaktadır. Sertoli-Sertoli hücre bağlantı dinamikleri ve sitoiskelet yeniden şekillendirme Rho GTPaz'ları tarafından aktin sitoskeletonunun düzenlenmesi ile ilgili yolaklarda yer alır. Bu genin önemli bir paralogu PATJ'dir (Anonymus 3).



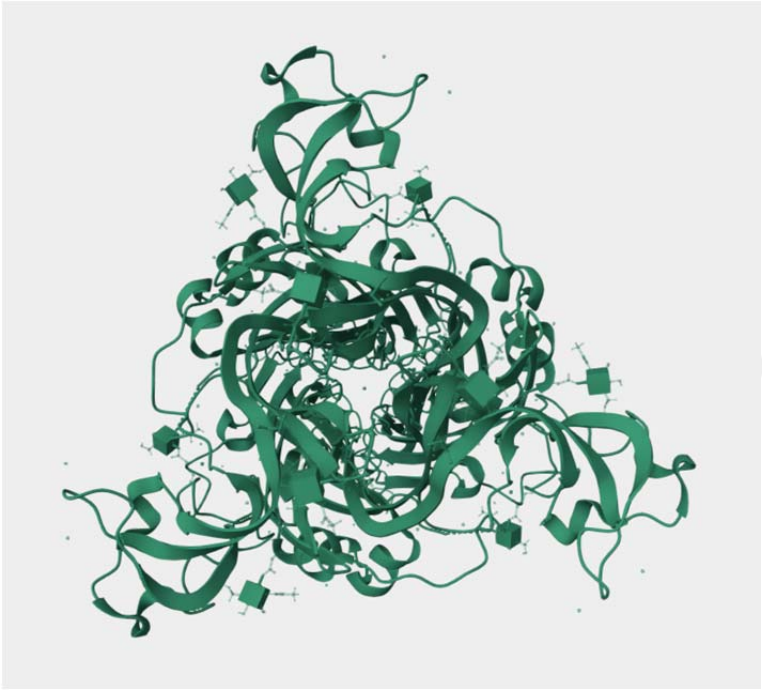
Şekil 4.7. MPDZ_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

Q8N961 (ABTB2_HUMAN): Protein heterodimerizasyon aktivitesini etkinleştirdiği ve toksik maddelere hücresel yanıtta rol aldığı öngörülmüştür (Anonymus 5). Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.3'de görülmektedir. Hepatosit büyümesinin başlatılmasında da rol oynayabilir. ABTB2 (Ankyrin Repeat And BTB Domain Containing 2) ile ilişkili hastalıklar arasında spermatogenik yetmezlik ve subkortikal kistli megalensefalik lökoensefalopati bulunur. Bu genin önemli bir paralogu ABTB3'tür (Anonymus 4).



Şekil 4.8. ABTB2_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

P56373 (P2RX3_HUMAN): Bu gen, yedi üyeyi (P2RX1 – P2RX7) içeren P2X purinerjik reseptör (purinoseptör) gen ailesinin bir üyesini kodlar. P2X purinoseptörleri, ekstraselüler adenozin 5'-trifosfatın (ATP) bağlanmasına yanıt olarak açılan katyon geçirgen, ligand kapılı iyon kanalları ailesidir. Kodlanan protein, duyusal veya otonomik nöronlar tarafından ifade edilen trimerik P2X3 reseptör iyon kanalının bir alt birimidir. Farelerde ortolog proteinin eksikliği, ağrıyla ilişkili davranışın azalması ve idrar kesesi hiporefleksisi ile ilişkili bulunmuştur (Anonymus 2). Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.4'de görülmektedir. Ligand kapılı katyon kanalı olarak görev yapan bir ATP reseptörüdür (Mansoor ve ark., 2016). Duyusal algıda rol oynar. Ağrının normal algılanması için gereklidir. Normal tat algısı için gereklidir. P2RX3 ile ilişkili hastalıklar arasında aşırı aktif mesane sendromu ve detrusor sfinkter dissinerjisi bulunur. İlgili yollar arasında Trombosit homeostazisi ve CREB yolu bulunur. P2RX2, bu genin önemli bir paraloğudur.



Şekil 4.9. P2RX3_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

Q86T82 (UBP37_HUMAN) (USP37): Sistein tipi endopeptidaz aktivitesini; protein kinaz bağlama aktivitesini ve tiyol bağımlı deubiquitinazı etkinleştirir. Mitotik hücre döngüsünün G1/S geçişinde; protein deubiquitinasyonunda; ve DNA replikasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Çekirdekte bulunur (Anonymus 5). Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.5'de görülmektedir. Hücre döngüsü düzenlemesi, DNA replikasyonu veya DNA hasar tepkisi dahil olmak üzere farklı süreçlerde rol oynayan deubiquitinaz (Yeh ve ark., 2015; Xiao ve ark., 2019). G1/S geçişi sırasında anafazı destekleyen kompleksi (APC/C) antagonize ederek siklin-A'nın (CCNA1 ve CCNA2) deubiquitinasyonunu aracılık eder ve böylece S fazına girişi teşvik eder. Özellikle APC/C kompleksi tarafından aracılık edilen spesifik bir ubiquitin bağlantı tipi olan 'Lys-11' bağlı

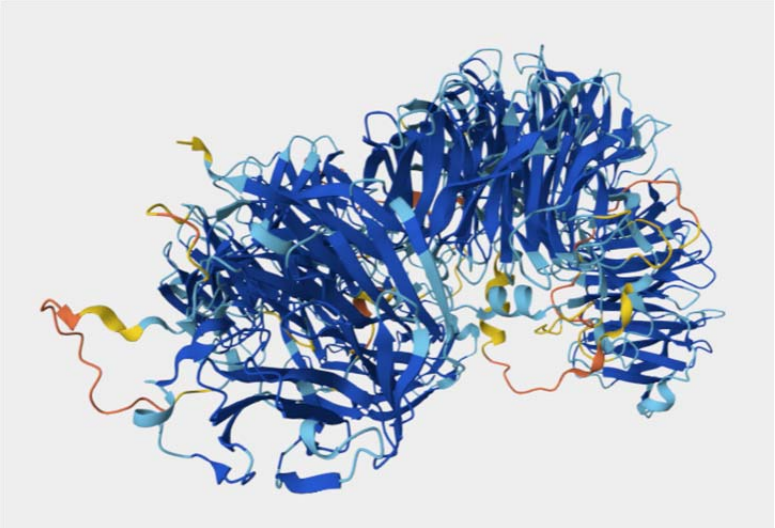
poliubiquitin zincirlerinin deubiquitinasyonunu aracılık eder. G1/S fazı sırasında Ser-628'deki fosforilasyon deubiquitinaz aktivitesini en üst düzeye çıkarır ve siklin-A'nın (CCNA1 ve CCNA2) bozunmasını önler (Huang ve ark., 2011). Lisanslama faktörü CDT1'i stabilize ederek DNA replikasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Hernandez ve ark., 2016). Ayrıca, kontrol noktası kinaz 1/CHK1'i deubiquitinleyerek replikasyonun verimliliğini ve doğruluğunu teşvik etmek için S-faz girişinin ötesinde önemli bir rol oynar ve stabilitesini destekler (Stromberg ve ark., 2021). ATP'ye bağımlı DNA helikaz BLM'yi deubiquitinleyerek ve stabilize ederek DNA hasar yanıtını (DDR) sürdürür (Wu ve ark., 2021). Mekanik olarak, DNA çift sarmallı kırıklar (DSB), USP37'nin ATM aracılı fosforilasyonunu teşvik eder ve USP37 ile BLM arasındaki bağlanmayı güçlendirir (Wu ve ark., 2021). Epitel-mezenkimal geçişi (EMT) indükleyen transkripsiyon faktörü SNAI'yi deubiquitinleyerek ve stabilize ederek hücre göçünü teşvik eder (Xiao ve ark., 2019). Kromatinle ilişkili WAPL ile ilişki kurarak ve deubiquitinasyon yoluyla stabilize ederek mitotik iğ ipliğinin bir araya getirilmesi ve mitotik ilerlemenin düzenlenmesinde rol oynar (Yeh ve ark., 2015). USP37 ile ilişkili hastalıklar arasında Machado-Joseph Hastalığı bulunur. İlgili yolları arasında deubiquitinasyon ve proteinlerin metabolizması bulunur. Bu genin önemli bir paralogu USP29'dur (Anonymus 4).



Şekil 4.10. UBP37_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

Q05BV3 (EMAL5_HUMAN): Hücre dışı eksozomda yer almaktadır. Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.6'da görülmektedir. Mikrotübül bağlanma aktivitesini etkinleştirdiği öngörülmüştür. Mikrotübüllerin birleşme dinamiklerini değiştirebilir, böylece mikrotübüller biraz daha uzun, ancak

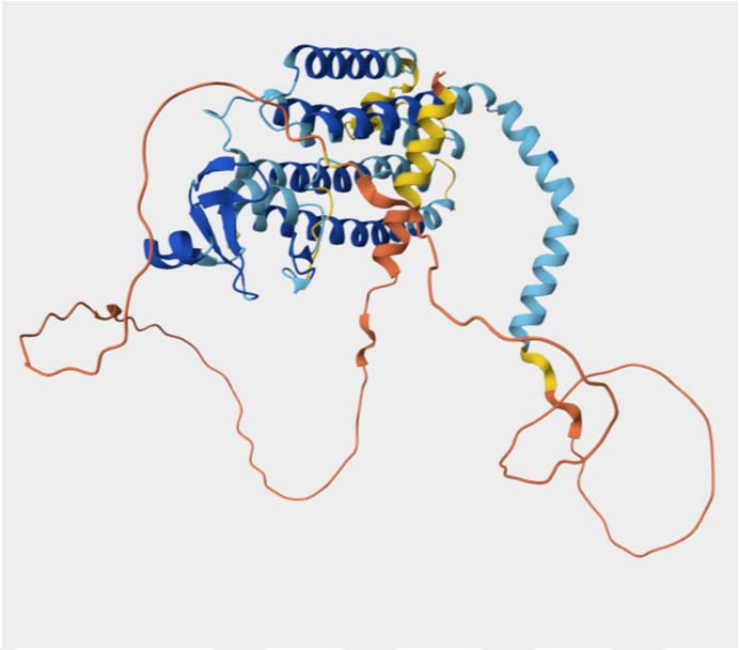
daha dinamik olur (Anonymus 5). EML5 ile ilişkili hastalıklar arasında Mucopolysaccharidosis Type IV (Morquio syndrome) bulunur. Bu genin önemli bir paralogu EML6'dır.



Şekil 4.11. EMAL5_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

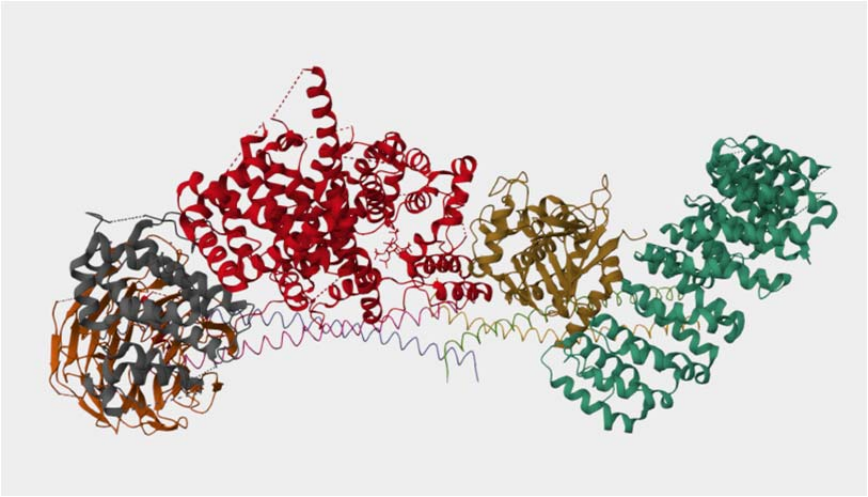
Tüberkülozda downregüle olup, sarkoidozda upregüle olan proteinler, kodlandıkları genler ve özellikleri

Q96EX2 (RNFT2_HUMAN): (Yüzük Parmak Proteini, Transmembran 2) Proteazom tarafından IL3RA ubikitinasyonu ve yıkımı yoluyla IL3'e bağlı hücresel yanıtları negatif olarak düzenleyen ve anti-inflamatuar etkiye sahip E3 ubikitin-protein ligazıdır. Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.7'de görülmektedir. Ubiquitin protein ligase aktivitesini etkinleştirdiği, ERAD yolunun ve protein ubiquitinasyonunun pozitif düzenlenmesinde yer aldığı öngörülmüştür. Membranın ayrılmaz bir parçası olduğu öngörülmüştür (Anonymus 5). Bu genin önemli bir paraloğu RNFT1'dir.



Şekil 4.12. RNFT2_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

Q5VSL9 (STRP1_HUMAN): Hücre morfolojisi ve sitoskeletal organizasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Kortikal aktin filament dinamikleri ve hücre şekli için gereklidir. Striatin-etkileşimli fosfataz ve kinaz (STRIPAK) komplekslerinin bir parçasıdır. STRIPAK kompleksleri protein (de)fosforilasyonunda kritik rollere sahiptir ve Hippo, MAPK, nükleer reseptör ve sitoskeleton yeniden şekillenmesi dahil olmak üzere birden fazla sinyal yolunun düzenleyicileridir. Farklı tipte STRIPAK kompleksleri hücre büyümesi, farklılaşma, apoptoz, metabolizma ve bağışıklık düzenlemesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer alır. Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.8'de görülmektedir.



Şekil 4.13. STRP1_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

Q15297 (PPM1D_HUMAN): Bu gen tarafından kodlanan protein, Ser/Thr protein fosfatazlarının PP2C ailesinin bir üyesidir. PP2C ailesi üyelerinin hücre stres tepkisi yollarının negatif düzenleyicileri olduğu bilinmektedir. Bu genin ifadesi çeşitli çevresel streslere yanıt olarak p53'e

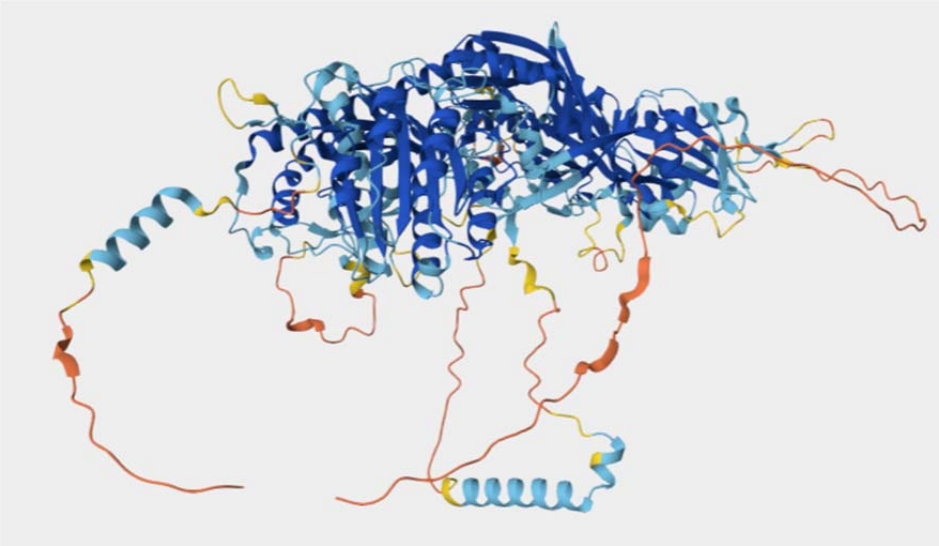
bağlı bir şekilde indüklenir. Tümör baskılayıcı protein TP53/p53 tarafından indüklenirken, bu fosfataz p38 MAP kinazının, MAPK/p38'in aktivitesini negatif olarak düzenler, bu sayede p53'ün fosforilasyonunu azaltır ve buna karşılık p53 aracılı transkripsiyonu ve apoptozu baskılar. Bu fosfataz böylece büyüme inhibisyonuna ve stres kaynaklı apoptozun baskılanmasına katkıda bulunan p38-p53 sinyallemesinin bir geri bildirim düzenlemesini aracılık eder. Bu gen, meme kanserinde çoğaldığı bilinen bir kromozomal bölgede yer almaktadır. Bu genin amplifikasyonu hem meme kanseri hücre dizisinde hem de birincil meme tümörlerinde tespit edilmiştir; bu da bu genin kanser gelişiminde bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Anonymus 2). Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.9'da görülmektedir.



Şekil 4.14. PPM1D_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

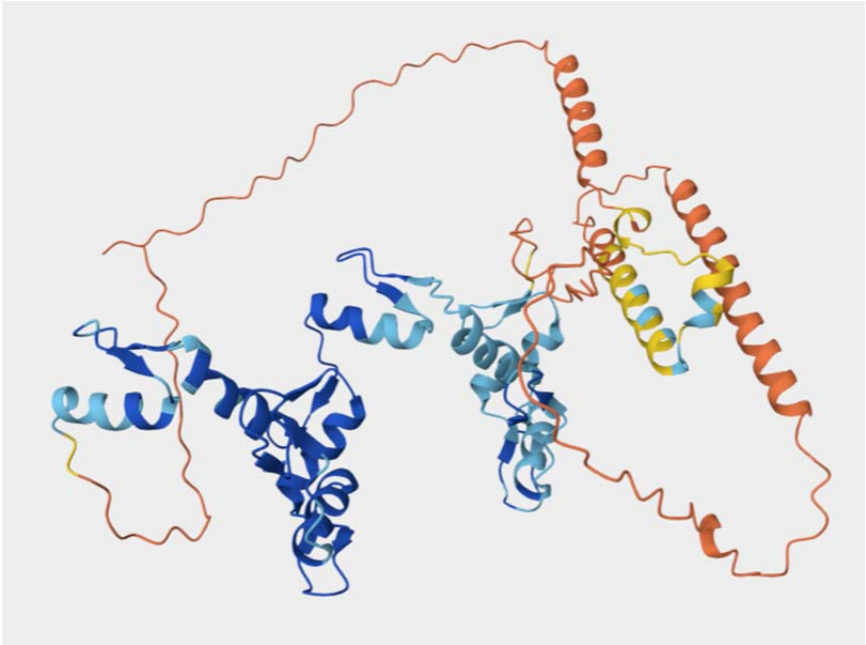
Q9NY47(CA2D2_HUMAN): (Kalsiyum Voltaj Kapılı Kanal Yardımcı Alt Birimi Alfa2delta 2) Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.10'da verilmiştir. Kalsiyum kanalları, kalsiyum iyonlarının membran polarizasyonu üzerine hücreye girişini sağlar. Bu gen, voltaj bağımlı kalsiyum kanalı kompleksinin alfa-2/delta alt birimini kodlar. Kompleks, ana kanal oluşturan alt birim alfa-1 ve yardımcı alt birimler alfa-2/delta, beta ve gamadan oluşur. Yardımcı alt birimler, kompleksin birleştirilmesinde ve membran lokalizasyonunda işlev görür ve kalsiyum akımlarını ve kanal aktivasyon/inaktivasyon kinetiğini düzenler. Bu gen tarafından kodlanan alt birim, ekstraselüler alfa-2 peptidi ve membrana bağlı bir delta polipeptidi üretmek için translasyon sonrası bölünmeye uğrar. Bu alt birim, antiepileptik ilaç gabapentin için bir reseptördür. Bu gendeki mutasyonlar erken infantil epileptik ensefalopati ile ilişkilidir. Bu gendeki tek nükleotid polimorfizmleri, opioid ilaçlara karşı artan duyarlılıkla ilişkilidir. Alternatif ekleme, farklı izoformları kodlayan çoklu transkript varyantlarıyla sonuçlanır (Anonymus 2). Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının alfa-2/delta alt birimi kalsiyum akım yoğunluğunu ve kalsiyum kanalının aktivasyon/inaktivasyon kinetiğini düzenler. P/Q tipi kalsiyum kanalı (CACNA1A), N tipi (CACNA1B), L tipi (CACNA1C VEYA CACNA1D) ve muhtemelen T tipi (CACNA1G) için düzenleyici bir alt birim görevi görür (Lacinová ve Klugbauer, 2004; Edvardson ve ark., 2013). Aşırı ifadesi apoptozu indükler.

CACNA2D2 ile ilişkili hastalıklar arasında nöbetler ve değişken gelişimsel gerilik ile serebellar atrofi ve erken infantil epileptik ensefalopati bulunur. İlgili yolları arasında DREAM Baskılanması ve Dinorfin Ekspresyonu ve TCR Sinyalizasyonu (Qiagen) bulunur. Bu genle ilişkili Gen Ontolojisi açıklamaları arasında voltaj kapılı kalsiyum kanalı aktivitesi ve kalsiyum kanalı düzenleyici aktivitesi bulunur. Bu genin önemli bir paraloğu CACNA2D1'dir.



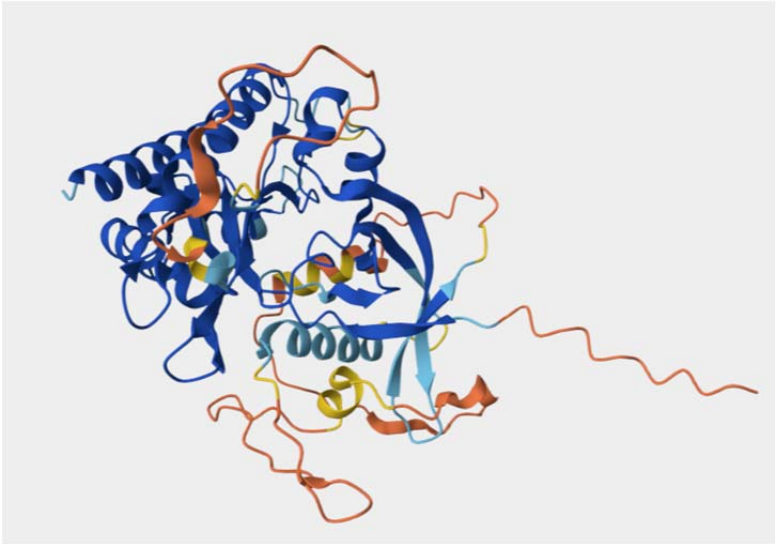
Şekil 4.15. CA2D2_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

P17036 (ZNF3_HUMAN): Hücre farklılaşması ve/veya çoğalmasında rol oynar. Aynı protein bağlanma aktivitesini sağlar. RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonun negatif düzenlenmesinde rol oynadığı tahmin edilmektedir. Çekirdekte yer aldığı tahmin edilmektedir (Anonymus 5). Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.11'de görülmektedir. ZNF3 ile ilişkili hastalıklar arasında trombosit tipi kanama bozukluğu ve gençlik diyabeti (Olgunluk çağı başlangıcı) (Tip 4) bulunur. Transkripsiyon yolağıyla ilişkilidir. Bu genin önemli bir paraloğu ZNF23'tür.



Şekil 4.16. ZNF3_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

Q96PC2 (IP6K3): (İnositol Hekzakisfosfat Kinaz 3) Bu gen, inositol fosfokinaz (IPK) ailesine ait bir protein kodlar. Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.12'de görülmektedir. Bu protein muhtemelen inositol hekzakisfosfatın (InsP6) difosfoinozitol pentakisfosfata (InsP7/PP-InsP5) dönüştürülmesinden sorumludur. Ayrıca 1,3,4,5,6-pentakisfosfatı (InsP5) PP-InsP4'e dönüştürebilir (Anonymus 2). IP6K3 ile ilgili yolaklar arasında İnositol fosfat metabolizması ve nükleer reseptörler meta yolu bulunur. Bu genin önemli bir paralogu IP6K1'dir.



Şekil 4.17. IP6K3 proteininin üç boyutlu yapısı.

Q09666 (AHNK_HUMAN): Bu gen tarafından kodlanan protein, 128 aa tekrarı olan merkezi bir alandan oluşan büyük (700 kDa) bir yapısal iskele proteinidir. Proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 4.13'de görülmektedir. Kodlanan protein, kan-beyin bariyeri oluşumu, hücre yapısı ve göçü,

kardiyak kalsiyum kanalı düzenlemesi ve tümör metastazı gibi çeşitli süreçlerde rol oynayabilir. Bu gen için 17 kDa izoformu kodlayan çok daha kısa bir varyant mevcuttur ve daha kısa izoformudur, bu genin alternatif eklenmesini düzenleyen bir geri bildirim döngüsü başlatır (Anonymus 2).



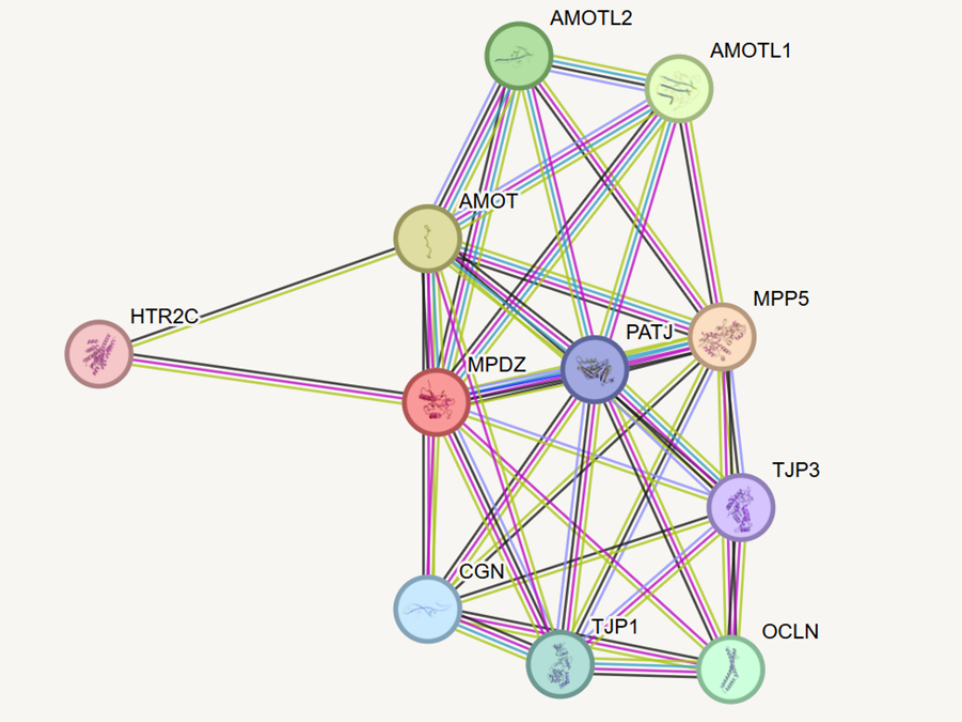
Şekil 4.18. AHNK_HUMAN proteininin üç boyutlu yapısı.

4.3.2. Tüberküloz ve Sarkoidoz arasında farklılaşan proteinlerin etkileşimde olduğu diğer proteinler

Tüberkülozda upregüle olup, sarkoidozda downregüle olan proteinlerin etkileşimde olduğu diğer proteinler

1. MPDZ: Çoklu PDZ domain proteini; HTR2C (5-Hidroksitriptamin (Serotonin) Reseptörü 2C) ile etkileşime girer ve hücre yüzeyinde kümelenmesini tetikler. Uyarıcı sinapslarda AMPAR potansiyasyonunun ve sinaptik plastisite kontrolünde rol oynayabilecek NMDAR sinyal kompleksinin üyesidir. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler tespit edilmiş (Şekil 4.14) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).

MPDZ proteininin tüberküloz ile sarkoidoz arasında anlamlı düzeyde farklılık görülmüş ve string programı ile etkileşimde olduğu diğer pro. Epitel, endotelyal hücre-hücre bağlantıları, sıkı bağlantılar ile ilgili yolak tespit edilmiştir. Tüberkülozla sarkoidoz arasındaki bu proteindeki anlamlı fark tüberkülozda kazeifikasyon mekanizmasının tetiklenmesiyle ilişkilendirilebilir.



Şekil 4.19. MPDZ proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

MPP5: MAGUK p55 alt familyası üyesi 5; Sıkı bağlantı biyogenezinde ve epitel hücrelerinde hücre polaritesinin kurulmasında rol oynar. Ayrıca, ekzosist kompleks proteini EXOC4/SEC8'in doğru lokalizasyonunu sağlayarak, yapışık bağlantı yapısal bileşeni CDH1'in hücre yüzeyine taşınmasını sağlayarak yapışık bağlantı biyogenezinde de rol oynar. Vasküler lümen oluşumunda ve endotel membran polaritesinde CDH5 ile etkileşimi yoluyla rol oynar. Embriyonik ve doğum sonrası retina gelişimi sırasında gereklidir. Serebellumun bakımı için gereklidir.

AMOT: Anjiomotin; ARHGAP17 ile oluşan kompleks aracılığıyla sıkı bağlantı bakımında merkezi bir rol oynar ve sıkı bağlantılarda polarite proteinlerinin alımını düzenleyerek etki eder. Endotel hücre göçünü ve tüp oluşumunu düzenlediği görülmektedir. Ayrıca endotel hücre-hücre bağlantılarının birleşmesinde de rol oynayabilir; Anjiomotin ailesine aittir.

AMOTL1: Anjiomotin benzeri protein 1; Muhtemelen CTNNB1'i geri dönüşümlü endosomlara dahil ederek ve böylece çekirdeğe taşınmasını önleyerek Wnt/beta-katenin sinyal yolunu inhibe eder; Anjiomotin ailesine aittir.

AMOTL2: Anjiyomotin benzeri protein 2; Fosforile edilmiş SRC'nin periferik hücre-matriks yapışma bölgelerine taşınmasını düzenler. Aktin filamentlerinin düzgün mimarisi için gereklidir. Muhtemelen CTNNB1'i geri dönüşümlü endosomlara çekerek ve dolayısıyla çekirdeğe taşınmasını önleyerek Wnt/beta-katenin sinyal yolunu engeller. Anjiyogenezde rol oynar. Endotel hücrelerinin polaritesinde, proliferasyonunda ve göçünde rol oynayabilir. SRC aracılığıyla FGF kaynaklı MAPK aktivasyonunu seçici olarak teşvik eder; Anjiyomotin ailesine aittir.

OCLN: Okludin; Sıkı bağlantı (TJ) paraselüler geçirgenlik bariyerinin oluşumunda ve düzenlenmesinde rol oynayabilir. Sıkı bağlantılardan yoksun hücrelerde ifade edildiğinde yapışmayı indükleyebilir.

TJP1: Sıkı bağlantı proteini ZO-1; TJP1, TJP2 ve TJP3, klaudinler, bağlantısal yapışma molekülleri ve okludin gibi sıkı bağlantı (TJ) transmembran proteinlerini aktin sitoskeletonuna bağlayan yakından ilişkili iskele proteinleridir. Sıkı bağlantı, maddelerin paraselüler boşluktan hareketini sınırlamak ve epitel ve endotel hücrelerinin kompozisyonel olarak farklı apikal ve bazolateral plazma membran alanları arasında bir sınır görevi görmek üzere işlev görür. Lümenogenez ve özellikle etkili epitel polarizasyonu ve bariyer oluşumu için gereklidir.

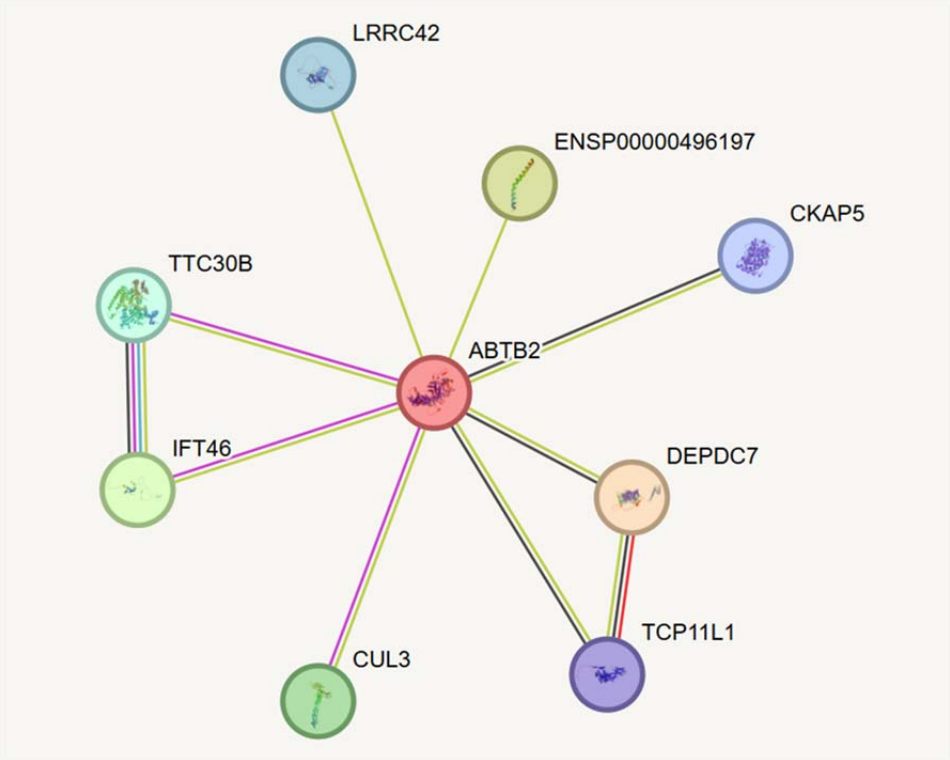
CGN: Cingulin; Muhtemelen sıkı bağlantı (TJ) paraselüler geçirgenlik bariyerinin oluşumu ve düzenlenmesinde rol oynar; Cingulin ailesine aittir.

PATJ: InaD benzeri protein; Hücre zarında farklı proteinleri bitişik pozisyonlara getirebilen iskele proteini (Muhtemel). Protein hedeflemesini, hücre polaritesini ve sıkı bağlantıların bütünlüğünü düzenleyebilir. Duyusal nöronlarda ASIC3'ün yüzey ifadesini ve/veya işlevini düzenleyebilir. ARHGEF18'i apikal hücre-hücre sınırlarına çekebilir.

TJP3: Sıkı bağlantı proteini ZO-3; TJP1, TJP2 ve TJP3, klaudinler, bağlantısal yapışma molekülleri ve okludin gibi sıkı bağlantı (TJ) transmembran proteinlerini aktin sitoskeletonuna bağlayan yakından ilişkili iskele proteinleridir. Sıkı bağlantı, maddelerin paraselüler boşluktan hareketini sınırlamak ve epitel ve endotel hücrelerinin kompozisyonel olarak farklı apikal ve bazolateral plazma membran alanları arasında bir sınır görevi görmek üzere hareket eder. PATJ'yi sıkı bağlantılara bağlar ve çeker; burada sıkı bağlantıların apikal ve lateral bileşenlerini birbirine bağlar ve sabitler.

HTR2C: 5-hidroksitriptamin reseptörü 2C; 5-hidroksitriptamin (serotonin) için G-protein bağlı reseptör. Ayrıca ergot alkaloid türevleri, 1-2,5,- dimetoksi-4-iyodofenil-2-aminopropan (DOI) ve liserjik asit dietilamid (LSD) dahil olmak üzere çeşitli ilaçlar ve psikoaktif maddeler için bir reseptör olarak işlev görür. Ligand bağlanması, guanin nükleotid bağlayıcı proteinler (G proteinleri) aracılığıyla sinyallemeyi tetikleyen ve aşağı akış efektörlerinin aktivitesini düzenleyen bir konformasyon değişikliğine neden olur. Beta-arrestin ailesi üyeleri, G proteinleri aracılığıyla sinyallemeyi engeller ve alternatif sinyalleme yolunun aktivasyonuna aracılık eder.

2. ABTB2: Ankrin tekrarı ve BTB/POZ alanı içeren protein 2; Hepatosit büyümesinin başlatılmasında rol oynayabilir. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler belirlenmiş (Şekil 4.15) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.20. ABTB2 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

DEPDC7: DEP alanı; DEPDC7 ailesine aittir.

ENSP00000496197: Tanımlanmamış protein

IFT46: İntraflagellar taşıma proteini 46 homologu; Primer sillerin bir araya getirilmesi, bakımı ve işlevi için gerekli parçacıkların iki yönlü hareketi olan intraflagellar taşımada (IFT) yer alan bir kompleksin parçasını oluşturur. Kondrosit olgunlaşmasında ve iskelet oluşumunda rol oynayabilir. IFT46 ailesine aittir.

CUL3: Cullin-3; Hedef proteinlerin ubikitinasyonunu ve ardından proteazomal bozunmasını aracılık eden çoklu cullin-RING tabanlı BCR (BTB-CUL3- RBX1) E3 ubikitin-protein ligaz komplekslerinin temel bileşenidir. BCR kompleksleri ve ARIH1, hedef proteinlerin ubikitinasyonunu aracılık etmek için birlikte çalışır. Bir iskele proteini olarak, substratın ve ubikitin-konjuge edici enzimin konumlandırılması yoluyla katalize katkıda bulunabilir.

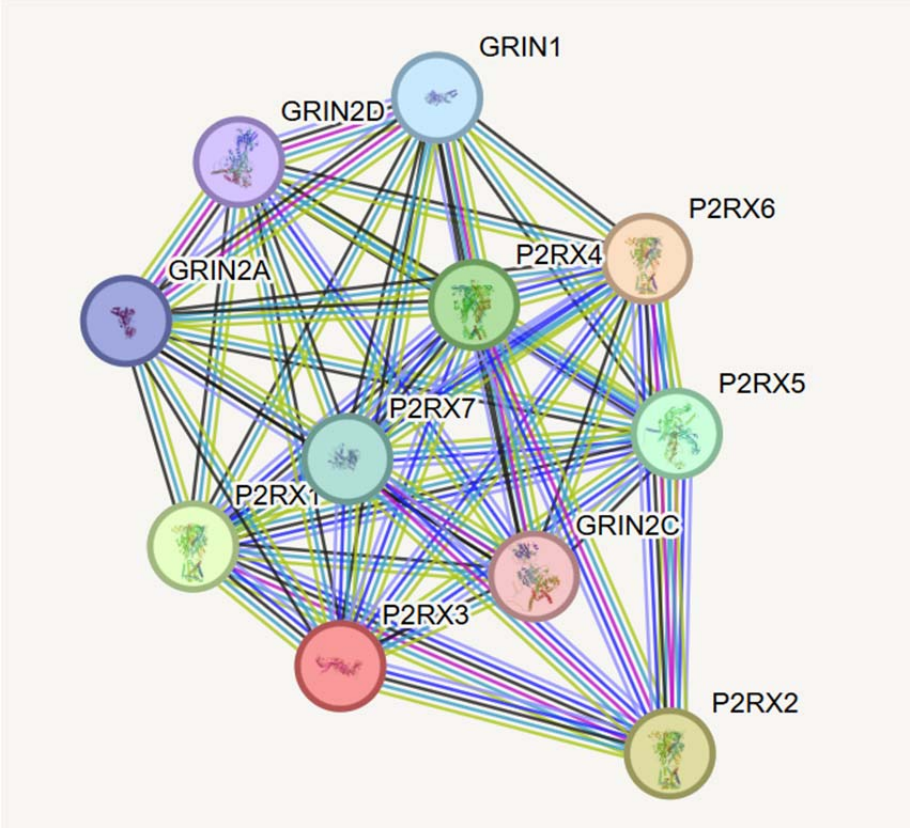
TTC30B: Tetratrikopeptit tekrar proteini 30B; Aksonal tubulinin poliglutamilasyonunda gereklidir. Anterograd intraflagellar transportta (IFT) rol oynar, bu işlem silya öncüllerinin silyum tabanından uçtaki birleşme yerlerine taşınmasını sağlar.

LRRC42: Lösin açısından zengin tekrar içeren protein 42; Lösin açısından zengin tekrar içeren 42; LRRC42 ailesine aittir.

CKAP5: Sitoiskelet ilişkili protein 5; Mikrotübüllerin artı ucuna bağlanır ve mikrotübül dinamiklerini ve mikrotübül organizasyonunu düzenler. İşlemsel mikrotübül polimerazı olarak görev yapar. Sitoplazmik mikrotübül çekirdeklenmesini ve uzamasını destekler. İğ kutuplarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. İğ oluşumunda kinetokor mikrotübüllerini KIF2C tarafından

depolimerizasyondan korur ve KIF2C aktivitesinden bağımsız olarak sentrozomal mikrotübül montajında önemli bir role sahiptir. Sentrozom bütünlüğüne katkıda bulunur. Stab'a katkıda bulunduğu önerilen TACC3/ch-TOG/klatrin kompleksinin bileşeni olarak görev yapar.
TCP11L1: T-kompleks protein 11 benzeri protein 1; T-kompleks 11 benzeri 1.

3. P2RX3: P2X purinoseptörü 3; Ligand kapılı katyon kanalı olarak görev yapan ATP reseptörü. Duyusal algıda rol oynar. Ağrının normal algılanması için gereklidir. Normal tat algısı için gereklidir. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler tespit edilmiş (Şekil 4.16) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.21. P2RX3 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

P2RX6: P2X purinoseptörü 6; Ligand kapılı iyon kanalı olarak görev yapan ATP reseptörü. P2X reseptör ailesine aittir.
P2RX2: P2X purinoseptör 2; Duyusal nöronlardaki uyarıcı postsinaptik yanıtlar, nöromüsküler kavşaklar (NMJ) oluşumu, işitme, tat algısı ve peristalsis gibi çeşitli hücresel yanıtlarla ilgili olan hücre dışı ATP tarafından kapılanan iyon kanalı. İç kulakta, ses iletimini ve işitsel nörotransmisyonu, dış tüy hücresi elektromotilitesini, iç kulak boşluk kavşaklarını ve K(+) geri dönüşümünü düzenler. Nöronlar arasında ve nöronlardan düz kaslara sinaptik iletimi sağlar.
P2RX1: P2X purinoseptörü 1; Nispeten yüksek kalsiyum geçirgenliğine sahip ligand kapılı iyon kanalı. ATP'ye bağlanma nöronlar arasında ve nöronlardan düz kaslara sinaptik iletimi sağlar. ATP

varlığında hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırarak programlanmış hücre ölümüne yol açarak apoptozisle bağlantılı görünmektedir.

P2RX4: P2X purinoseptörü 4; Ligand kapılı iyon kanalı olarak görev yapan ATP reseptörü. Bu reseptör antagonistler PPADS ve suramine duyarsızdır.

P2RX5: P2X purinoseptörü 5; Ligand kapılı iyon kanalı görevi gören ATP reseptörü; P2X reseptör ailesine aittir.

P2RX7: P2X purinoseptörü 7; Ligand kapılı iyon kanalı olarak görev yapan ATP reseptörü. Büyük moleküllere geçirgen membran gözeneklerinin oluşumu yoluyla makrofajların ATP'ye bağlı lizislerinden sorumludur. Hem hızlı sinaptik iletimde hem de antijen sunan hücrelerin ATP aracılı lizislerinde işlev görebilir. Doğal ligandı ATP olmadığında, apoptotik hücrelerin tanınması ve yutulmasında bir süpürücü reseptör olarak işlev görür.

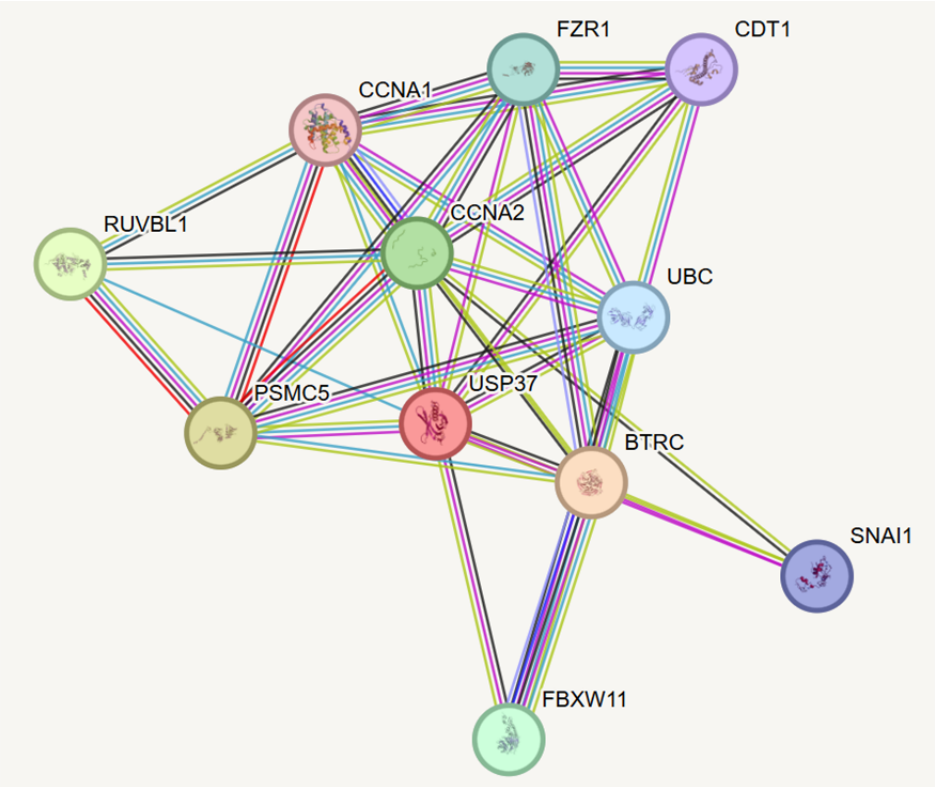
GRIN1: Glutamat reseptörü iyonotropik, NMDA 1; Yüksek kalsiyum geçirgenliği ve magnezyuma voltaj bağımlı duyarlılığı olan heterotetramerik, ligand kapılı iyon kanalları olarak işlev gören NMDA reseptör komplekslerinin bileşeni. Kanal aktivasyonu, nörotransmitter glutamatın epsilon alt birimine, glisinin zeta alt birimine bağlanmasını ve ayrıca Mg(2+) tarafından kanal inhibisyonunu ortadan kaldırmak için membran depolarizasyonunu gerektirir. Glutamat duyarlılığı ve kanal kinetiği alt birim bileşimine bağlıdır.

GRIN2A: Glutamat reseptörü iyonotropik, NMDA 2A; Heterotetramerik, ligand kapılı iyon kanalları olarak işlev gören ve yüksek kalsiyum geçirgenliği ve magnezyuma voltaj bağımlı duyarlılığı olan NMDA reseptör komplekslerinin bileşeni. Kanal aktivasyonu, nörotransmitter glutamatın epsilon alt birimine, glisinin zeta alt birimine bağlanmasını ve ayrıca Mg(2+) tarafından kanal inhibisyonunun ortadan kaldırılması için membran depolarizasyonunu gerektirir.

GRIN2D: Glutamat reseptörü iyonotropik, NMDA 2D; Yüksek kalsiyum geçirgenliği ve magnezyuma voltaj bağımlı duyarlılığı olan heterotetramerik, ligand kapılı iyon kanalları olarak işlev gören NMDA reseptör komplekslerinin bileşeni. Kanal aktivasyonu, nörotransmitter glutamatın epsilon alt birimine, glisinin zeta alt birimine bağlanmasını ve ayrıca Mg(2+) tarafından kanal inhibisyonunun ortadan kaldırılması için membran depolarizasyonunu gerektirir. Glutamat duyarlılığı ve kanal kinetiği alt birim bileşimine bağlıdır. Glutamat kapılı iyon kanalı (TC 1.A.10.1) ailesine aittir. NR2D/GRIN2D alt ailesi.

GRIN2C: Glutamat reseptörü iyonotropik, NMDA 2D; Yüksek kalsiyum geçirgenliği ve magnezyuma voltaj bağımlı duyarlılığı olan heterotetramerik, ligand kapılı iyon kanalları olarak işlev gören NMDA reseptör komplekslerinin bileşeni. Kanal aktivasyonu, nörotransmitter glutamatın epsilon alt birimine, glisinin zeta alt birimine bağlanmasını ve ayrıca Mg(2+) tarafından kanal inhibisyonunun ortadan kaldırılması için membran depolarizasyonunu gerektirir. Glutamat duyarlılığı ve kanal kinetiği alt birim bileşimine bağlıdır. Glutamat kapılı iyon kanalı (TC 1.A.10.1) ailesine aittir. NR2D/GRIN2D alt ailesi.

4. USP37: Ubiquitin karboksil-terminal hidrolaz 37; G1/S geçişi sırasında anafazı destekleyen kompleksi (APC/C) antagonize eden ve siklin-A'nın (CCNA1 ve CCNA2) deubiquitinasyonuna aracılık ederek S fazına girişi destekleyen deubiquitinaz. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler belirlenmiş (Şekil 4.17) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.22. USP37 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

BTRC: F-box/WD tekrar içeren protein 1A; SCF'nin (SKP1-CUL1-F-box protein) E3 ubikitin-protein ligaz kompleksinin substrat tanıma bileşeni, hedef proteinlerin ubikitinasyonuna ve müteakip proteazomal bozunmasına aracılık eder. Fosforile edilmiş hedef proteinleri tanır ve onlara bağlanır. SCF(BTRC), CTNNB1'in ubikitinasyonuna aracılık eder ve Wnt sinyalizasyonuna katılır. SCF(BTRC), fosforile edilmiş NFKB1, ATF4, CDC25A, DLG1, FBXO5, PER1, SMAD3, SMAD4, SNAI1 ve muhtemelen NFKB2'nin ubikitinasyonuna aracılık eder.

PSMC5: 26S proteazom düzenleyici alt birim 8; Ubiquitinlenmiş proteinlerin ATP'ye bağlı bozunmasında rol oynayan çok proteinli bir kompleks olan 26S proteazomun bileşeni. Bu kompleks, hücresel işlevleri bozabilecek yanlış katlanmış veya hasarlı proteinleri ve işlevleri artık gerekli olmayan proteinleri kaldırarak protein homeostazının korunmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle proteazom, hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz veya DNA hasarı onarımı dahil olmak üzere çok sayıda hücresel sürece katılır. PSMC5, AAA'nın heteroheksamerik halkasına aittir.

RUVBL1: RuvB benzeri 1; Tek zincirli DNA uyarılı ATPaz ve ATP'ye bağımlı DNA helikaz (3' ila 5') aktivitesine sahiptir; hekzamerizasyonun ATP hidrolizi için kritik olduğu düşünülmektedir ve halka benzeri yapıdaki bitişik alt birimler ATPaz aktivitesine katkıda bulunur. Başlıca nükleozomal histonlar H4 ve H2A'nın asetilasyonu yoluyla seçili genlerin transkripsiyonel aktivasyonunda yer alan NuA4 histon asetiltransferaz kompleksinin bileşeni. Bu modifikasyon hem nükleozom-DNA etkileşimlerini değiştirebilir hem de modifiye edilmiş histonların pozitif olarak düzenleyen diğer proteinlerle etkileşimini teşvik edebilir.

CCNA2: Siklin-A2; Hücre döngüsünün hem G1/S hem de G2/M geçiş fazlarını kontrol eden siklin. Siklin bağımlı protein kinazlar CDK1 veya CDK2 ile spesifik serin/treonin protein kinaz holoenzim komplekslerinin oluşumu yoluyla işlev görür. Siklin alt birimi bu komplekslerin substrat özgüllüğünü verir ve hücre döngüsü boyunca CDK1 ve CDK2 ile farklı şekilde etkileşime girer ve onları aktive eder.

FBXW11: F-box/WD tekrar içeren protein 11; SCF'nin (SKP1-CUL1-F-box protein) E3 ubikitin-protein ligaz kompleksinin substrat tanıma bileşeni, hedef proteinlerin ubikitinasyonunu ve ardından proteazomal bozunmasını aracılık eder. Muhtemelen fosforile edilmiş hedef proteinleri tanır ve onlara bağlanır. SCF(FBXW11), fosforile edilmiş CTNNB1'in ubikitinasyonunu aracılık eder ve Wnt sinyalizasyonuna katılır. SCF(FBXW11), fosforile edilmiş NFKBIA'nın ubikitinasyonunu aracılık eder, bu bozunma ilişkili NFKB1'in çekirdeğe taşınmasını ve transkripsiyonu aktive etmesini serbest bırakır.

FZR1: Fizzy ile ilişkili protein homologu; Anafazı destekleyen kompleks/siklozom (APC/C) E3 ubiquitin-protein ligase kompleksi için substrat-spesifik adaptör. Geç mitozda APC/C ile ilişki kurar, CDC20'nin yerini alır ve anafaz ve telofaz sırasında APC/C'yi aktive eder. APC/C, hücre döngüsünün pozitif düzenleyicilerinin erken birikmemesini sağlamak için substratları parçalamada aktif kalır. G1/S geçişinde FZR1 fosforile edilir ve bu da APC/C'den ayrılmasına yol açar.

UBC: Poliübikitin-C; [Ubikitin]: Başka bir proteine kovalent olarak bağlı veya serbest (bağlanmamış) olarak bulunur. Kovalent olarak bağlandığında, bir monomer (monoübikitin), ubikitin'in farklı Lys kalıntıları üzerinden bağlı bir polimer (poliübikitin zincirleri) veya ubikitin'in başlatıcısı Met üzerinden bağlı doğrusal bir polimer (doğrusal poliübikitin zincirleri) olarak bir izopeptit bağı yoluyla hedef proteinlere konjuge olur. Poliübikitin zincirleri, bir hedef proteine bağlandığında, bağlı olan ubikitin'in Lys kalıntısına bağlı olarak farklı işlevlere sahiptir: Lys-6-bağlı DNA onarımında yer alabilir.

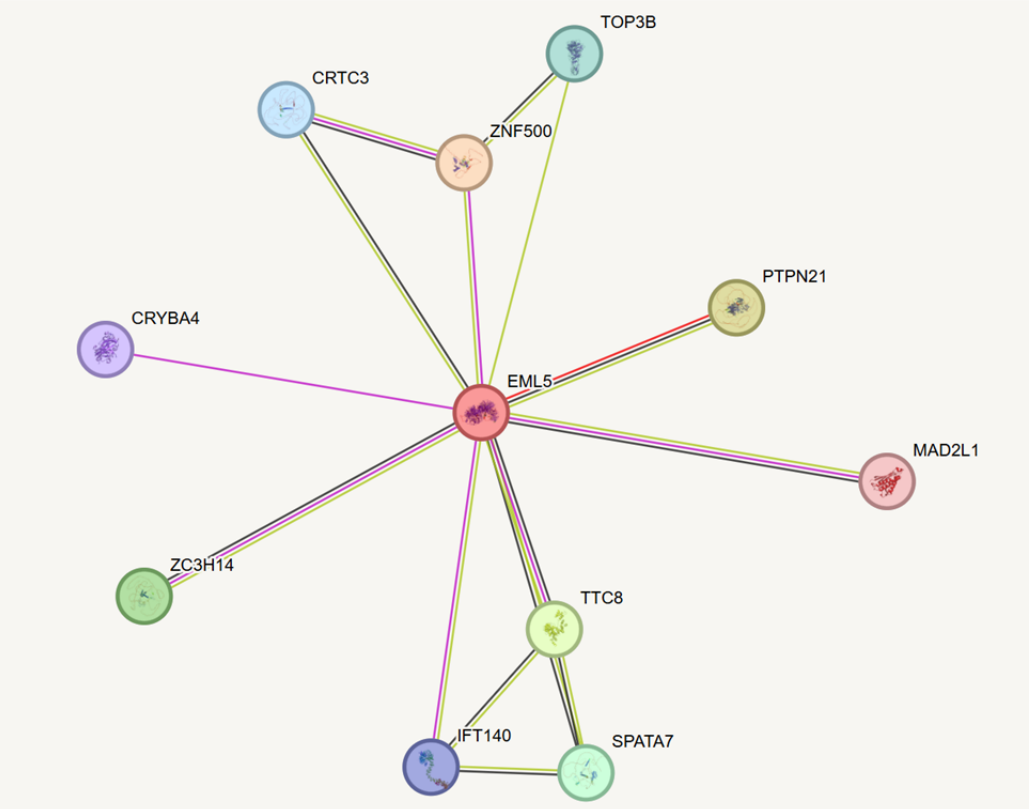
SNAI1: Çinko parmak proteini SNAI1; Epitelden mezenkimale geçişin (EMT) indüksiyonunda, embriyonik mezodermin oluşumu ve bakımında, büyümenin durdurulmasında, hayatta kalmada ve hücre göçünde rol oynar. E-kadherin/CDH1 gen promotörünün 3 E-kutusuna ve CLDN7 ve KRT8 promotörlerine bağlanır ve promotörlere çektiği histon demetilaz KDM1A ile birlikte dimetillenmiş H3K4 seviyelerinde bir azalmaya neden olur ve transkripsiyonu baskılar. N-terminal SNAG alanı,

KDM1A ve RCOR1 tarafından oluşturulan histon demetilaz kompleksindeki aynı bağlanma yeri için histon H3 ile rekabet eder.

CDT1: DNA replikasyon faktörü Cdt1; Hem DNA replikasyonu hem de mitoz için gereklidir. DNA replikasyon lisanslama faktörü, replikasyon öncesi kompleks montajı için gereklidir. Hücre döngüsünün G1 fazı sırasında CDC6 ve orijin tanıma kompleksi (ORC) ile iş birliği yaparak DNA'ya mini kromozom bakımı (MCM) kompleksinin yüklenmesini teşvik ederek pre-replikasyon kompleksleri (pre-RC) üretir. Ayrıca stabil kinetokor-mikrotübül bağlantılarını teşvik ederek mitoz için de gereklidir. Potansiyel onkogen. Cdt1 ailesine aittir.

CCNA1: Siklin-A1; G1/S (başlangıç) ve G2/M (mitoz) geçişlerinde hücre döngüsünün kontrolünde yer alabilir. Öncelikle germ hattı meiotik hücre döngüsünün kontrolünde ve ayrıca bazı somatik hücrelerde mitotik hücre döngüsünün kontrolünde işlev görebilir. Siklin ailesine aittir. Siklin AB alt ailesi.

5. EML5: Echinoderm mikrotübül ilişkili protein benzeri 5; Mikrotübüllerin birleşme dinamiklerini değiştirebilir, böylece mikrotübüller biraz daha uzun, ancak daha dinamik olabilir. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler belirlenmiş (Şekil 4.18) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.23. EML5 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

ZNF500: Çinko parmak proteini 500; Transkripsiyonel regülasyonda rol oynayabilir.

PTPN21: Protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 21.

TTC8: Tetratrikopeptit tekrar proteini 8; BBSome kompleksinin, birincil silyalara özgü zar proteinlerinin sıralanması için gerekli bir kaplama kompleksi olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. BBSome kompleksi siliyogenez için gereklidir ancak sentriolar uydu işlevi için vazgeçilmezdir. Bu siliyogenik işlev, kısmen bazal gövdeye yerleşen ve BBSome ile temas eden Rab8 GDP/GTP değişim faktörü tarafından aracılık edilir.

ZC3H14: Çinko parmak CCCH alanı içeren protein 14; Nöronal hücrelerde poli(A) kuyruk uzunluğu kontrolünde rol oynar. Poliadenozin RNA oligonükleotidlerini bağlar.

SPATA7: Spermatogenezle ilişkili protein 7; Hem çubuk hem de koni fotoreseptör hücrelerinin bakımında rol oynar. RPGRIP1'in silyum (CC) bağlayan fotoreseptöre alınması ve uygun şekilde lokalizasyonu ve ayrıca distal CC'de proksimal CC proteinlerinin fotoreseptöre özgü lokalizasyonu için gereklidir. Fotoreseptöre özgü distal CC'de protein lokalizasyonunun bakımı normal mikrotübül stabilitesi ve fotoreseptör dejenerasyonunu önlemek için gereklidir.

İLK3B: DNA topoizomeraz 3-beta-1; DNA replikasyonu ve transkripsiyonu sırasında ortaya çıkan DNA'nın süper sarmal ve burulma gerginliğini, DNA dupleksinin bir ipliğini geçici olarak keserek ve yeniden birleştirerek serbest bırakır. Dupleks DNA'daki bir hedef bölgede transesterifikasyon yoluyla tek iplikli bir kırılma başlatır. Kesilebilir fosfodiester, enzimin katalitik tirozini tarafından saldırıya uğrar ve bunun sonucunda bir DNA-(5'-fosfotirozil)- enzim ara maddesi oluşur ve bir 3'-OH DNA ipliği atılır.

CRTC3: CREB tarafından düzenlenen transkripsiyon koaktivatörü 3; Hem konsensüs hem de değişken cAMP yanıt elemanı (CRE) bölgeleri aracılığıyla transkripsiyonu aktive eden CREB1 için transkripsiyonel koaktivatör. SIK/TORC sinyal yolunda bir koaktivatör olarak görev yapar, defosforile edildiğinde aktif olur ve CREB1 'Ser-133' fosforilasyonundan bağımsız olarak hareket eder. CREB1'in TAF4 ile etkileşimini artırır. Steroidojenik gen StAR gibi spesifik CREB tarafından aktive edilen genlerin ekspresyonunu düzenler. PPARGC1A'nın güçlü koaktivatörü ve kas hücrelerinde mitokondriyal biyogenezin indükleyicisi. Ayrıca TAX aktivatörü için koaktivatördür.

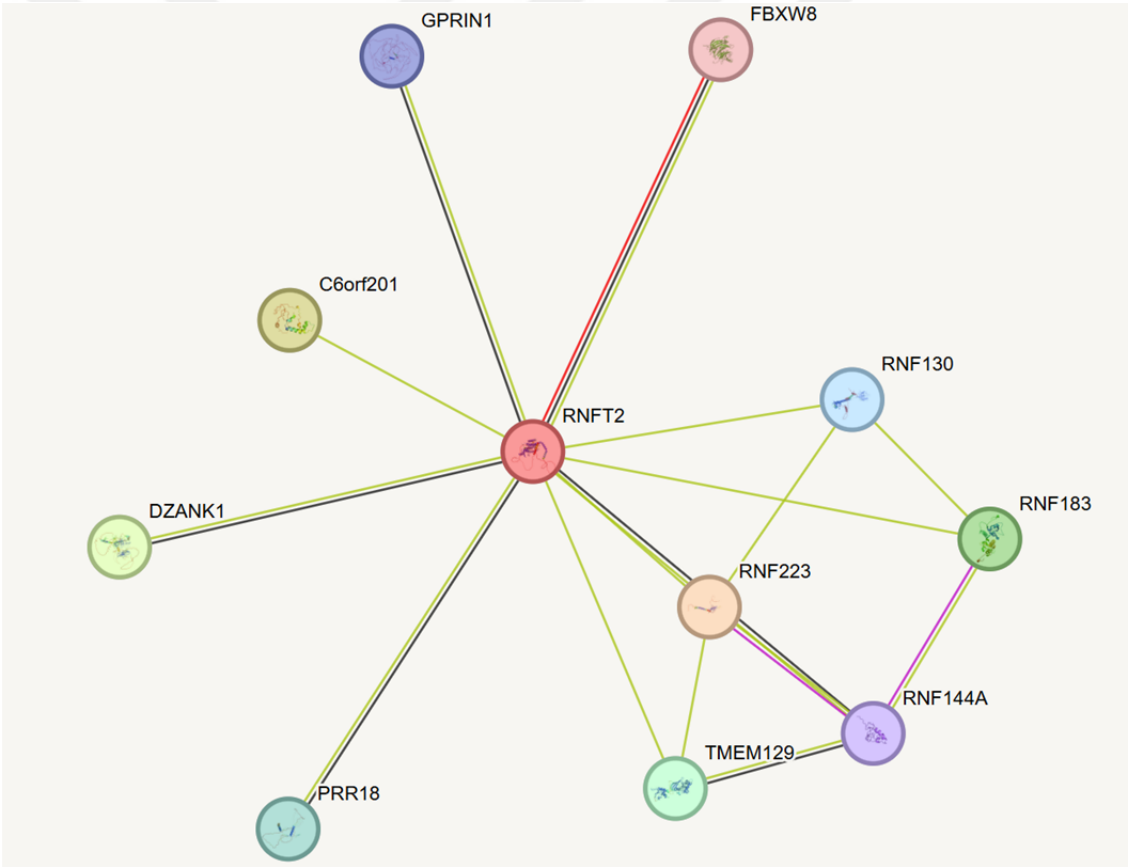
IFT140: İntraflagellar taşıma proteini 140 homologu; G proteinine bağlı reseptörlerin (GPCR'ler) geriye doğru siliyer taşınması ve silyalara girmesi için gerekli bir kompleks olan IFT kompleksi A'nın (IFT-A) bileşeni. Siliyogenez ve/veya silyum bakımındaki rolüyle silyalı hücrelerin düzgün gelişimi ve işlevinde önemli bir rol oynar. Çubuk ve koni fotoreseptör hücrelerinin dış segmentlerinin gelişimi ve bakımı için gereklidir. Opsinin fotoreseptör hücrelerinin dış segmentine bakımı ve iletilmesinde rol oynar.

CRYBA4: Beta-kristalin A4; Kristalinler, omurgalı göz merceğinin baskın yapısal bileşenleridir; Beta/gama-kristalin ailesine aittir.

MAD2L1: Mitotik iğ ipliği birleştirme kontrol noktası proteini MAD2A; Tüm kromozomlar metafaz plakasında düzgün bir şekilde hizalanana kadar anafazın başlamasını önleyen iğ ipliği birleştirme kontrol noktasının bileşenidir. Kinetokor-iğ ipliği bağlanma sürecini izleyen ve tüm kromozomlar metafaz plakasında hizalanana kadar CDC20'yi tecrit ederek anafazı ilerleten kompleksin aktivitesini inhibe eden mitotik kontrol noktasının yürütülmesi için gereklidir.

Tüberkülozda downregüle olup, sarkoidozda upregüle olan proteinlerin etkileşimde olduğu diğer proteinler

1. RNFT2: Halka parmak proteini, transmembran 2. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler belirlenmiş (Şekil 4.19) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.24. RNFT2 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

RNF223: Yüzük parmak proteini 223.

C6orf201: Tanımlanmamış protein C6orf201; Kromozom 6 açık okuma çerçevesi 201.

DZANK1: Çift çinko kurdele ve ankrin tekrar alanları 1.

RNF183: E3 ubikitin-protein ligaz RNF183; Ubikitin kısımlarının substrat proteinlerine kovalent bağlanmasını katalize eden bir E3 ubikitin ligazı gibi davranır. Poliübikitinasyonu ve ardından

BCL2L1'in proteazomal bozunmasını aracılık ederek uzun süreli ER stresine yanıt olarak apoptozu tetikler. BIK protein seviyelerini sınırlamak için FATE1 ile iş birliği yapabilir ve böylece apoptotik sinyallemeyi düzenler.

TMEM129: E3 ubikitin-protein ligaz TM129; ER ile ilişkili protein bozunumuna katılan E3 ubikitin-protein ligaz, tercihen E2 enzimi UBE2J2 ile ilişkilidir. HLA sınıf I proteinlerinin bozunmasını aracılık etmek için viral US11 proteinleri tarafından kullanılır.

PRR18: Prolin açısından zengin protein 18; Prolin açısından zengin 18.

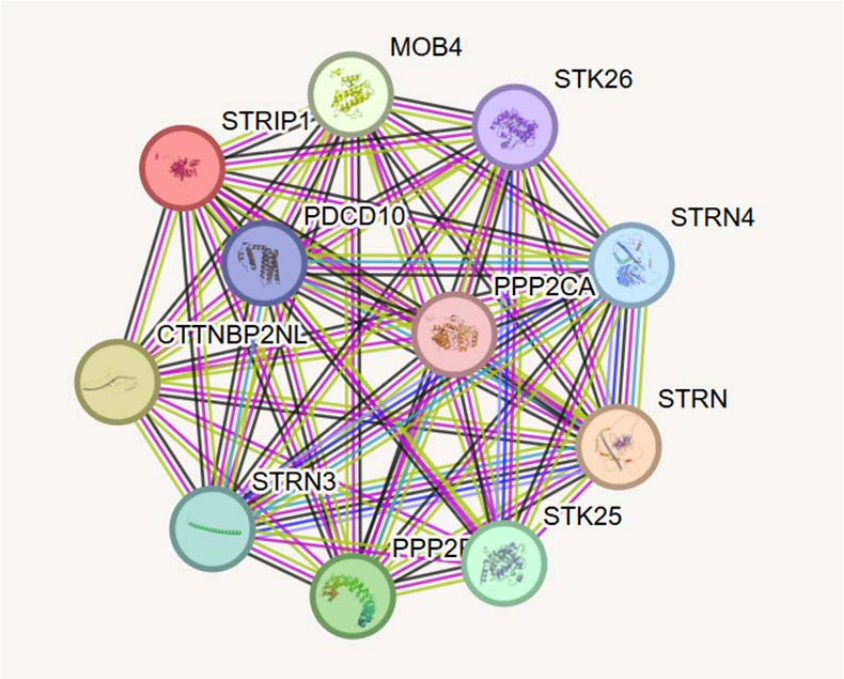
RNF130: E3 ubiquitin-protein ligaz RNF130; Hematopoietik hücrelerin programlanmış hücre ölümü sırasında rol oynayabilir. E3 ubiquitin-protein ligaz olarak etki eder.

GPRIN1: G proteini tarafından düzenlenen nörit çıkıntısının indükleyicisi 1; Nörit çıkıntısında rol oynayabilir.

RNF144A: E3 ubikitin-protein ligaz RNF144A; E2 ubikitin-konjuge edici enzimler UBE2L3 ve UBE2L6'dan ubikitini bir tiyoester formunda kabul eden ve daha sonra ubikitini doğrudan hedeflenen substratlara aktaran E3 ubikitin-protein ligazı. DNA hasar kinaz PRKDC'nin ubikitinasyonunu ve bozunmasını aracılık eder; RBR ailesine aittir. RNF144 alt ailesi.

FBXW8: F-box/WD tekrar içeren protein 8; Cul7-RING ubikitin-protein ligaz kompleksinin substrat tanıma bileşeni, hedef proteinlerin ubikitinasyonunu ve ardından proteazomal bozunmasını düzenler. Cul7-RING(FBXW8) kompleksi, GORASP1'in ubikitinasyonunu ve ardından bozunmasını düzenler, beyinde Golgi morfogenezi ve dendrit desenlemesini düzenleyen ubikitin ligaz yolunun bir bileşeni olarak hareket eder. IRS1'in mTOR'a bağlı bir şekilde ubikitinasyonunu ve bozunmasını düzenler.

2. STRP1: Striatin ile etkileşime giren protein 1; Hücre morfolojisi ve sitoskeletal organizasyonun düzenlenmesinde rol oynar. Kortikal aktin filament dinamikleri ve hücre şekli için gereklidir. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler belirlenmiş (Şekil 4.20) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.25. STRP1 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

STR: Striatin; İskele veya sinyal proteini olarak işlev görebilen ve dendritik Ca(2+) sinyallemesinde rol oynayabilen kalmodulin bağlayıcı protein; WD tekrarlayan striatin ailesine aittir.

CTTNBP2NL: CTTNBP2 N-terminal benzeri protein; CTTNBP2 N-terminal benzeri.

MOB4: MOB benzeri protein fosein; Membran trafiğinde, özellikle membran tomurcuklanma reaksiyonlarında rol oynayabilir; MOB1/fosein ailesine aittir.

PPP2R1A: Serin/treonin-protein fosfataz 2A 65 kDa düzenleyici alt birim A alfa izoformu; Protein fosfataz 2A'nın PR65 alt birimi, katalitik alt birim ve değişken düzenleyici B alt biriminin birleşmesini koordine etmek için bir iskele molekülü görevi görür. GNA12 ile etkileşime girdiğinde mikrotübül ilişkili protein TAU/MAPT'nin defosforilasyonunu teşvik eder. Uygun kromozom ayrımı ve mitozda SGO1'in sentromerik lokalizasyonu için gereklidir.

STK25: Serin/treonin-protein kinaz 25; Çevresel strese yanıtta rol oynayabilen oksidan stresle aktive olan serin/treonin kinaz. Protein taşıma olaylarını, hücre yapışmasını ve hücre göçü için önemli olan polarite komplekslerini düzenlediği görülen Golgi aygıtına hedefler. Protein kinaz süper ailesine aittir. STE Ser/Thr protein kinaz ailesi. STE20 alt ailesi.

STRN3: Striatin-3; Kalmodulini kalsiyum bağımlı bir şekilde bağlar. İskele veya sinyal proteini olarak işlev görebilir.

STRN4: Striatin-4; Kalsiyum bağımlı bir şekilde kalmodulini bağlar. İskele veya sinyal proteini olarak işlev görebilir; WD tekrar striatin ailesine aittir.

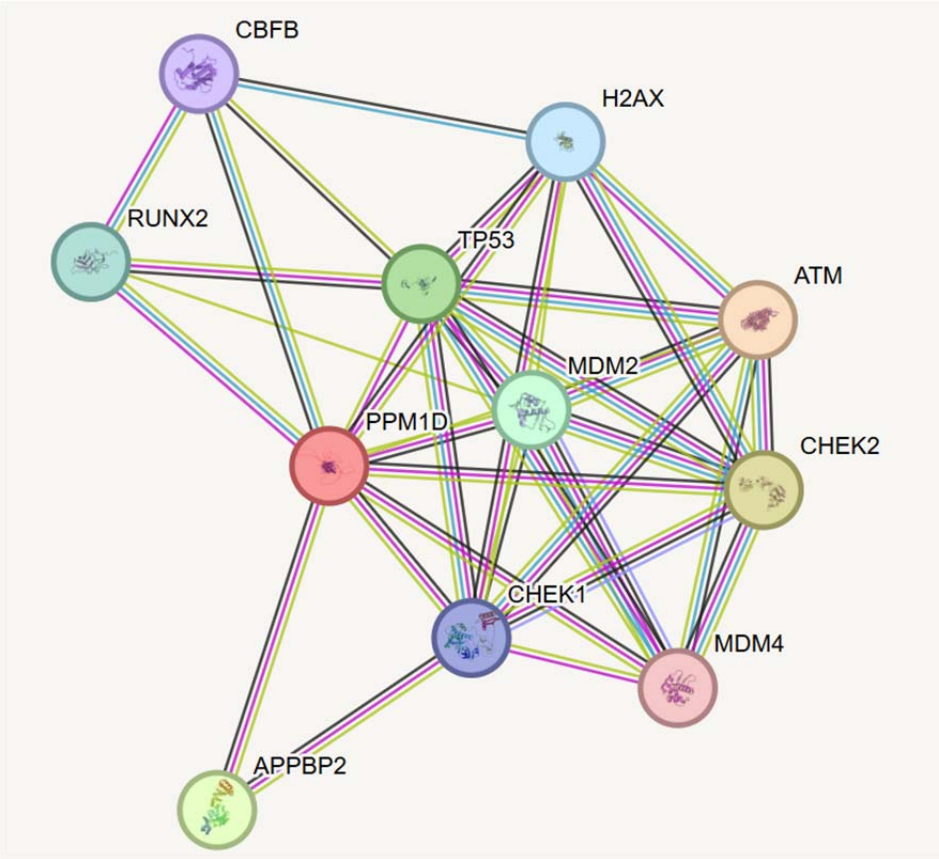
PCD10: Programlanmış hücre ölümü proteini 10; Hücre çoğalmasını destekler. Apoptotik yolları düzenler. Mitogenle aktive olan protein kinaz aktivitesini ve STK26 aktivitesini artırır. Hücre göçü ve Golgi kompleksinin normal yapısı ve birleşimi için önemlidir. KDR/VEGFR2 sinyallemesi için

önemlidir. KDR/VEGFR2'nin stabilitesini artırır ve bozulmasını önler. Normal kardiyovasküler gelişim için gereklidir. Embriyonik gelişim sırasında normal anjiyogenez, vaskülogenez ve hematopoez için gereklidir. PDCD10 ailesine aittir.

STK26: Serin/treonin-protein kinaz 26; Hücre büyümesinin aracısı. Apoptozu düzenler. STK24 ile birlikte RHO aktivasyonu üzerine polarize hücre göçünde Golgi yeniden yönelimini negatif olarak düzenler.

PPP2CA: Serin/treonin-protein fosfataz 2A katalitik alt birim alfa izoformu; PP2A, mikrotübül ilişkili proteinler (MAP'ler) için majör fosfatazdır. PP2A, fosforilaz B kinaz kazein kinaz 2, mitogenle uyarılan S6 kinaz ve MAP-2 kinazın aktivitesini düzenleyebilir. SGO2 ile iş birliği yaparak sentromerik kohezini oositlerde özellikle meiosis I sırasında separaz aracılı bölünmeden korur. SV40 büyük T antijenini ve p53/TP53'ü defosforile edebilir. RAF1'i 'Ser-259'da defosforile ederek aktive eder.

3. PPM1D: Protein fosfataz 1D; p53 ekspresyonunun negatif düzenlenmesinde rol oynar. p53'e bağlı kontrol noktası aracılı hücre döngüsü tutuklanmasının hafifletilmesi için gereklidir. TP53'ün 'Ser-15'ine ve CHEK1'in 'Ser-345'ine bağlanır ve bunları defosforile eder; bu da bu proteinlerin işlevsel inaktivasyonuna katkıda bulunur. MAPK14 defosforilasyonunu ve inaktivasyonunu düzenler. Ayrıca global heterokromatin susturulmasının önemli bir düzenleyicisidir ve genom bütünlüğünün korunmasında kritik öneme sahiptir. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler belirlenmiş (Şekil 4.21) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.26. PPM1D proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

ATM: Serin-protein kinaz ATM; Çift zincir kırıkları (DSB'ler), apoptoz ve iyonize edici ultraviyole A ışığı (UVA) gibi genotoksik stresler üzerine kontrol noktası sinyallemesini aktive eden ve böylece bir DNA hasar sensörü görevi gören serin/treonin protein kinazı. Substrat konsensüs dizisini [ST]- Q tanır. Çift zincir kırıklarında (DSB'ler) histon varyantı H2AX'in 'Ser-139'unu fosforile eder ve böylece DNA hasar tepki mekanizmasını düzenler.

CHEK2: Serin/treonin-protein kinaz Chk2; DNA çift sarmallı kırıkların varlığına yanıt olarak kontrol noktası aracılı hücre döngüsü tutuklanması, DNA onarımının aktivasyonu ve apoptoz için gerekli olan serin/treonin-protein kinaz. Ayrıca, bozulmamış hücre döngüleri sırasında hücre döngüsü ilerlemesini olumsuz yönde düzenleyebilir. Aktivasyonun ardından, çok sayıda efektörü tercihen konsensüs dizisinde [LXRXXS/T] fosforile eder. CDC25A, CDC25B ve CDC25C'nin fosforilasyonu yoluyla hücre döngüsü kontrol noktası tutuklanmasını düzenler ve aktivitelerini inhibe eder.

APPBP2: Amiloid protein bağlayıcı protein 2; Hücre içi protein taşınmasında rol oynayabilir. APP'nin mikrotübüller boyunca hücre yüzeyine doğru taşınmasında rol oynayabilir.

TP53: Hücresel tümör antijeni p53; Birçok tümör tipinde tümör baskılayıcı olarak etki eder; fizyolojik koşullara ve hücre tipine bağlı olarak büyüme durması veya apoptozu başlatır. Bu süreç için gerekli bir dizi geni kontrol ederek hücre bölünmesini negatif olarak düzenleyen bir trans-aktivatör olarak hücre döngüsü düzenlemesinde rol oynar. Aktifleştirilen genlerden biri siklin

bağımlı kinazların inhibitörüdür. Apoptozis indüksiyonu, BAX ve FAS antijen ifadesinin uyarılması veya Bcl-2 ifadesinin baskılanması yoluyla aracılık ediliyor gibi görünmektedir.

MDM2: E3 ubikitin-protein ligaz Mdm2; p53/TP53'ün ubikitinasyonunu ve proteazom tarafından parçalanmasını sağlayan E3 ubikitin-protein ligaz. Transkripsiyonel aktivasyon alanına bağlanarak p53/TP53 ve p73/TP73 aracılı hücre döngüsü tutuklanmasını ve apoptozu engeller. Ayrıca kendisine ve ARRB1'e doğru bir ubikitin ligaz E3 olarak hareket eder. p53/TP53'ün nükleer ihracatına izin verir. Retinoblastoma RB1 proteininin proteazom bağımlı ubikitin bağımsız parçalanmasını destekler. Ubikitinasyonunu ve parçalanmasını indükleyerek DAXX aracılı apoptozu engeller.

RUNX2: Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2; Osteoblastik farklılaşma ve iskelet morfogenezinde rol oynayan transkripsiyon faktörü. Osteoblastların olgunlaşması ve hem intramembranöz hem de endokondral kemikleşme için gereklidir. CBF, fare lösemi virüsü, poliomavirüs güçlendirici, T hücresi reseptör güçlendirici, osteokalsin, osteopontin, kemik siyaloproteini, alfa 1(I) kolajen, LCK, IL-3 ve GM-CSF promotörleri dahil olmak üzere bir dizi güçlendirici ve promotörün çekirdek bölgesi olan 5'-PYGPYGGT-3'e bağlanır. Osteoblastlarda transkripsiyon aktivasyonunu destekler: FGFR2- medyasını güçlendirmek için SPEN/MINT ile sinerji oluşturur

H2AX: Histone H2AX; Nükleozomların bir alt kümesinde geleneksel H2A'nın yerini alan varyant histon H2A. Nükleozomlar, DNA'yı kromatine sarar ve sıkıştırır, bu da DNA'yı şablon olarak gerektiren hücresel makinelere DNA erişilebilirliğini sınırlar. Histonlar bu sayede transkripsiyon düzenlemesinde, DNA onarımında, DNA replikasyonunda ve kromozomal stabilitede merkezi bir rol oynar. DNA erişilebilirliği, histonların karmaşık bir dizi translasyon sonrası modifikasyonu, ayrıca histon kodu ve nükleozom yeniden modellemesi yoluyla düzenlenir. Düşük doza yanıt olarak hücre döngüsü ilerlemesinin kontrol noktası aracılı durdurulması için gereklidir.

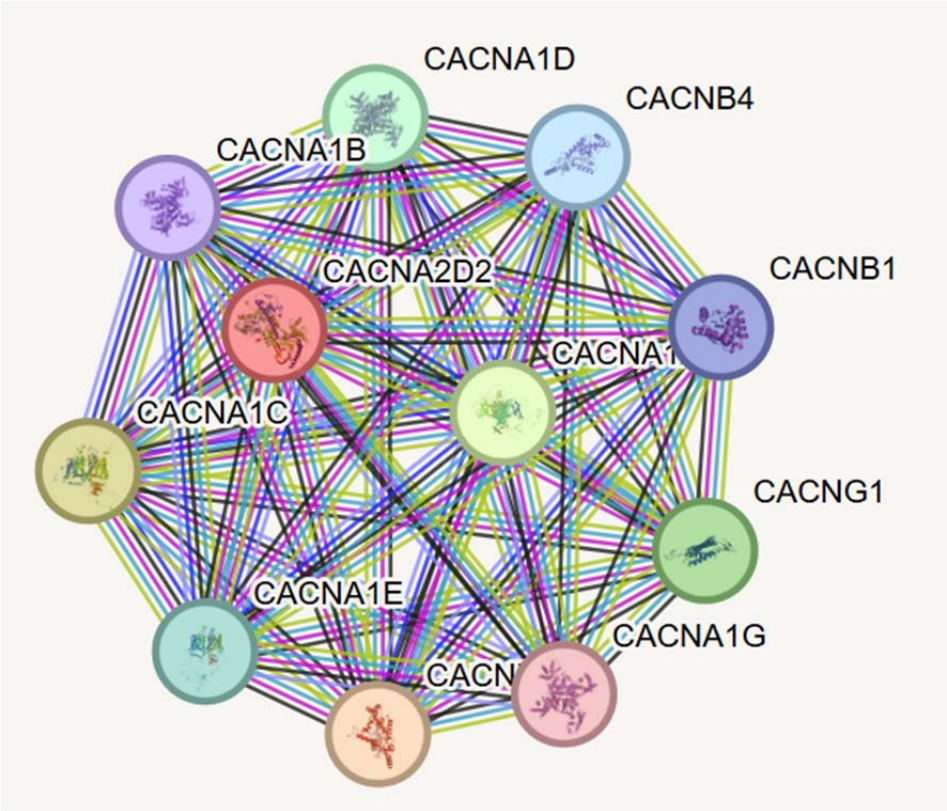
CHEK1: Serin/treonin-protein kinaz Chk1; DNA hasarı veya replike olmamış DNA'nın varlığına yanıt olarak kontrol noktası aracılı hücre döngüsü tutuklanması ve DNA onarımının aktivasyonu için gerekli olan serin/treonin-protein kinaz. Ayrıca, bozulmamış hücre döngüleri sırasında hücre döngüsü ilerlemesini olumsuz yönde düzenleyebilir. Bu düzenleme, birlikte genomun bütünlüğünü korumaya yardımcı olan bir dizi mekanizma tarafından sağlanır. Substrat konsensüs dizisini [RXXS/T] tanır. CDC25A, CDC25B ve CDC25C'ye bağlanır ve bunları fosforile eder.

CBFB: Çekirdek bağlayıcı faktör alt birimi beta; RUNX ailesi proteinleriyle (RUNX1, RUNX2 ve RUNX3) heterodimerik kompleks çekirdek bağlayıcı faktörü (CBF) oluşturur. RUNX üyeleri, düzenleyici bölgelerinde runt alanları aracılığıyla çekirdek konsensüs bağlayıcı dizi 5'-TGTGGT-3' veya çok nadiren 5'-TGCGGT-3'ü tanıyarak hedef genlerinin transkripsiyonunu düzenlerken, CBFB, RUNX'in diziye özgü DNA bağlama kapasitesini allosterik olarak artıran DNA bağlayıcı olmayan bir düzenleyici alt birimdir.

MDM4: Proteini Mdm4; Transkripsiyonel aktivasyon alanına bağlanarak p53/TP53 ve TP73/p73 aracılı hücre döngüsü tutuklanmasını ve apoptozu engeller. MDM2'nin bozunmasını engeller. TP53

transaktivasyonunu ve apoptotik fonksiyonları baskılayarak MDM2 hedefli TP53 bozunmasını tersine çevirebilir; MDM2/MDM4 ailesine aittir.

4. CACNA2D2: Voltaj bağımlı kalsiyum kanalı alt birimi alfa-2/delta-2; Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının alfa-2/delta alt birimi kalsiyum akım yoğunluğunu ve kalsiyum kanalının aktivasyon/inaktivasyon kinetiğini düzenler. P/Q tipi kalsiyum kanalı (CACNA1A), N tipi (CACNA1B), L tipi (CACNA1C VEYA CACNA1D) ve muhtemelen T tipi (CACNA1G) için düzenleyici bir alt birim görevi görür. Aşırı ifade apoptozu indükler. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler belirlenmiş (Şekil 4.22) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.27. CACNA2D2 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

CACNB2: Voltaj bağımlı L tipi kalsiyum kanalı alt birimi beta-2; Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının beta alt birimi, pik kalsiyum akımını artırarak, aktivasyon ve inaktivasyonun voltaj bağımlılıklarını kaydırarak, G protein inhibisyonunu düzenleyerek ve alfa-1 alt birimi membran hedeflemesini kontrol ederek kalsiyum kanalının fonksiyonuna katkıda bulunur.

CACNA1C: Voltaj bağımlı L tipi kalsiyum kanalı alt birimi alfa-1C; L tipi kalsiyum akımlarına yol açan voltaj kapılı kalsiyum kanalının gözenek oluşturan alfa-1C alt birimi. Kalsiyum iyonlarının sitoplazmaya akışını sağlar ve böylece sarkoplazmadan kalsiyum salınımını tetikler. Kalpte uyarılma-kasılma eşleşmesinde önemli bir rol oynar. Normal kalp gelişimi ve kalp ritminin

normal düzenlenmesi için gereklidir. Kan damarlarındaki ve bağırsaktaki düz kas hücrelerinin normal kasılması için gereklidir.

CACNA1A: Voltaj bağımlı P/Q tipi kalsiyum kanalı alt birimi alfa-1A; Voltaj duyarlı kalsiyum kanalları (VSCC), kalsiyum iyonlarının uyarılabilir hücrelere girişini sağlar ve ayrıca kas kasılması, hormon veya nörotransmitter salınımı, gen ifadesi, hücre hareketliliği, hücre bölünmesi ve hücre ölümü gibi çeşitli kalsiyum bağımlı süreçlerde yer alır. İzoform alfa-1A, P ve/veya Q tipi kalsiyum akımlarına yol açar. P/Q tipi kalsiyum kanalları 'yüksek voltajla aktive olan' (HVA) gruba aittir ve örümcek omega-agatoksin-IVA (AC P54282) tarafından özel olarak bloke edilir.

CACNG1: Voltaj bağımlı kalsiyum kanalı gama-1 alt birimi; İskelet kasında L tipi kalsiyum akımlarına yol açan voltaj kapılı kalsiyum kanalının düzenleyici alt birimi. Kanal inaktivasyon kinetiğini düzenler; PMP-22/EMP/MP20 ailesine aittir. CACNG alt ailesi.

CACNA1D: Voltaj bağımlı L tipi kalsiyum kanalı alt birimi alfa-1D; Voltaj duyarlı kalsiyum kanalları (VSCC), kalsiyum iyonlarının uyarılabilir hücrelere girişini sağlar ve ayrıca kas kasılması, hormon veya nörotransmitter salınımı, gen ifadesi, hücre hareketliliği, hücre bölünmesi ve hücre ölümü gibi çeşitli kalsiyum bağımlı süreçlerde yer alır. Alfa-1D izoformu, L tipi kalsiyum akımlarına yol açar. Uzun ömürlü (L tipi) kalsiyum kanalları, 'yüksek voltajla aktive edilen' (HVA) gruba aittir. Dihidropiridinler (DHP), fenilalkilaminler ve benzotiazepinler tarafından bloke edilirler.

CACNA1E: Voltaj bağımlı R tipi kalsiyum kanalı alt birimi alfa-1E; Voltaj duyarlı kalsiyum kanalları (VSCC), kalsiyum iyonlarının uyarılabilir hücrelere girişini sağlar. Ayrıca kas kasılması, hormon veya nörotransmitter salınımı, gen ifadesi, hücre hareketliliği, hücre bölünmesi ve hücre ölümü gibi çeşitli kalsiyum bağımlı süreçlerde de yer alırlar. Alfa-1E izoformu, R tipi kalsiyum akımlarına yol açar. R tipi kalsiyum kanalları 'yüksek voltajla aktive edilen' (HVA) gruba aittir ve nikel tarafından bloke edilir. Ancak dihidropiridinlere (DHP) duyarsızdırlar.

CACNB4: Voltaj bağımlı L tipi kalsiyum kanalı alt birimi beta-4; Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının beta alt birimi, pik kalsiyum akımını artırarak, aktivasyon ve inaktivasyonun voltaj bağımlılıklarını kaydırarak, G protein inhibisyonunu düzenleyerek ve alfa-1 alt birimi membran hedeflemesini kontrol ederek kalsiyum kanalının fonksiyonuna katkıda bulunur.

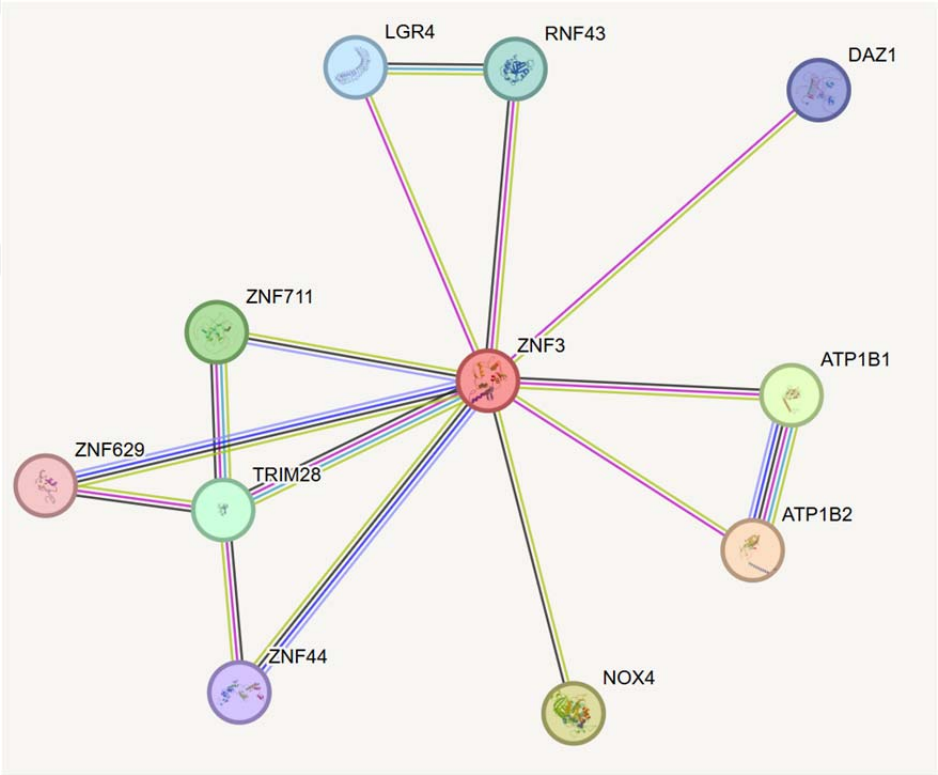
CACNB1: Voltaj bağımlı L tipi kalsiyum kanalı alt birimi beta-1; L tipi kalsiyum kanallarının düzenleyici alt birimi. Gözenek oluşturan alt birim olarak CACNA1A içeren L tipi kalsiyum kanallarının aktivitesini düzenler. Gözenek oluşturan alt birim olarak CACNA1C içeren L tipi kalsiyum kanallarının aktivitesini düzenler ve kanal kompleksinin hücre zarındaki varlığını artırır. İşlevsel ifade için gereklidir Gözenek oluşturan alt birim olarak CACNA1D içeren L tipi kalsiyum kanalları. Gözenek oluşturan alt birim olarak CACNA1B içeren L tipi kalsiyum kanallarının aktivitesini düzenler.

CACNA1B: Voltaj bağımlı N tipi kalsiyum kanalı alt birimi alfa-1B; Voltaj duyarlı kalsiyum kanalları (VSCC), kalsiyum iyonlarının uyarılabilir hücrelere girişini sağlar ve ayrıca kas

kasılması, hormon veya nörotransmitter salınımı, gen ifadesi, hücre hareketliliği, hücre bölünmesi ve hücre ölümü gibi çeşitli kalsiyum bağımlı süreçlerde yer alır. İzoform alfa-1B, N tipi kalsiyum akımlarına yol açar.

CACNA1G: Voltaj bağımlı T tipi kalsiyum kanalı alt birimi alfa-1G; Voltaj duyarlı kalsiyum kanalları (VSCC), kalsiyum iyonlarının uyarılabilir hücrelere girişini sağlar ve ayrıca kas kasılması, hormon veya nörotransmitter salınımı, gen ifadesi, hücre hareketliliği, hücre bölünmesi ve hücre ölümü gibi çeşitli kalsiyum bağımlı süreçlerde yer alır. Alfa-1G izoformu, T tipi kalsiyum akımlarına yol açar. T tipi kalsiyum kanalları 'düşük voltajla aktive edilen (LVA)' grubuna aittir ve mibefradil tarafından güçlü bir şekilde bloke edilir.

5. ZNF3: Çinko parmak proteini 3; Hücre farklılaşması ve/veya çoğalmasında rol oynar; Krueppel C2H2 tipi çinko parmak protein ailesine aittir. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler belirlenmiş (Şekil 4.23) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.28. ZNF3 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

ATP1B2: Sodyum/potasyum taşıyan ATPaz alt birimi beta-2; Bu, plazma membranı boyunca Na(+) ve K(+) iyonlarının değişimiyle birlikte ATP'nin hidrolizini katalize eden aktif enzimin katalitik olmayan bileşenidir. Beta-2 alt biriminin tam işlevi bilinmemektedir.
NOX4: NADPH oksidaz 4; CYBA/p22phox ile bir kompleks oluşumu üzerine hücre içinde süperoksit üreten yapısal NADPH oksidaz. Muhtemelen fosfataz inhibisyonu yoluyla sinyal kaskadlarını düzenler. KCNK3/TASK-1 potasyum kanalını ve HIF1A aktivitesini düzenleyen bir

oksijen sensörü olarak işlev görebilir. İnsülin sinyal kaskadını düzenleyebilir. Apoptozis, kemik rezorpsiyonunda ve lipolizakkarit aracılı NFKB aktivasyonunda rol oynayabilir. Çekirdekte süperoksit üretebilir ve hücre uyarımı üzerine gen ekspresyonunu düzenlemede rol oynayabilir. İzoform 3 işlevsel değildir.

ATP1B1: Sodyum/potasyum taşıyan ATPaz alt birimi beta-1; Bu, plazma membranı boyunca Na(+) ve K(+) iyonlarının değişimiyle birlikte ATP'nin hidrolizini katalize eden aktif enzimin katalitik olmayan bileşenidir. Beta alt birimi, alfa/beta heterodimerlerinin bir araya gelmesiyle plazma membranına taşınan sodyum pompalarının sayısını düzenler.

ZNF711: Çinko parmak proteini 711; Beyin gelişimi için gerekli transkripsiyon düzenleyicisi. Muhtemelen hedef genlerin promotörüne bağlanan ve PHF8 histon demetilazı çağıran bir transkripsiyon faktörü olarak hareket eder ve bu da nöron gelişiminde rol oynayan genlerin, örneğin KDM5C'nin ekspresyonunu aktive eder. Krueppel C2H2 tipi çinko parmak protein ailesine aittir.

TRIM28: Transkripsiyon aracı faktörü 1-beta; KRAB alanı içeren çinko parmak proteinleri (KRAB-ZFP'ler) için nükleer korepresör. Nükleozom yeniden şekillendirme ve deasetilasyon (NuRD) kompleksinin bir alt birimi olan CHD3 ve SETDB1'i (özellikle 'Lys-9'da (H3K9me) histon H3'ü metilleyen) KRAB hedef genlerinin promotör bölgelerine çekerek gen susturulmasını sağlar. H3K9me'deki artışı, histon H3 'Lys-9' ve 'Lys-14' asetilasyonundaki (sırasıyla H3K9ac ve H3K14ac) azalmayı ve HP1 proteinlerinin gen ifadesini susturma eğilimini koordine ederek transkripsiyonel baskılamayı artırır.

RNF43: E3 ubikitin-protein ligaz RNF43; Wnt reseptör kompleksi bileşenlerinin ubikitinasyonunu, endositozu ve sonraki bozunmasını aracılık ederek Wnt sinyal yolunun negatif düzenleyicisi olarak görev yapan E3 ubikitin-protein ligaz Frizzled. Hem kanonik hem de kanonik olmayan Wnt sinyal yolunda görev yapar. RSPO2 ve ZNRF3 ile birlikte uzuv spesifikasyonunu yöneten bir ana anahtar oluşturur

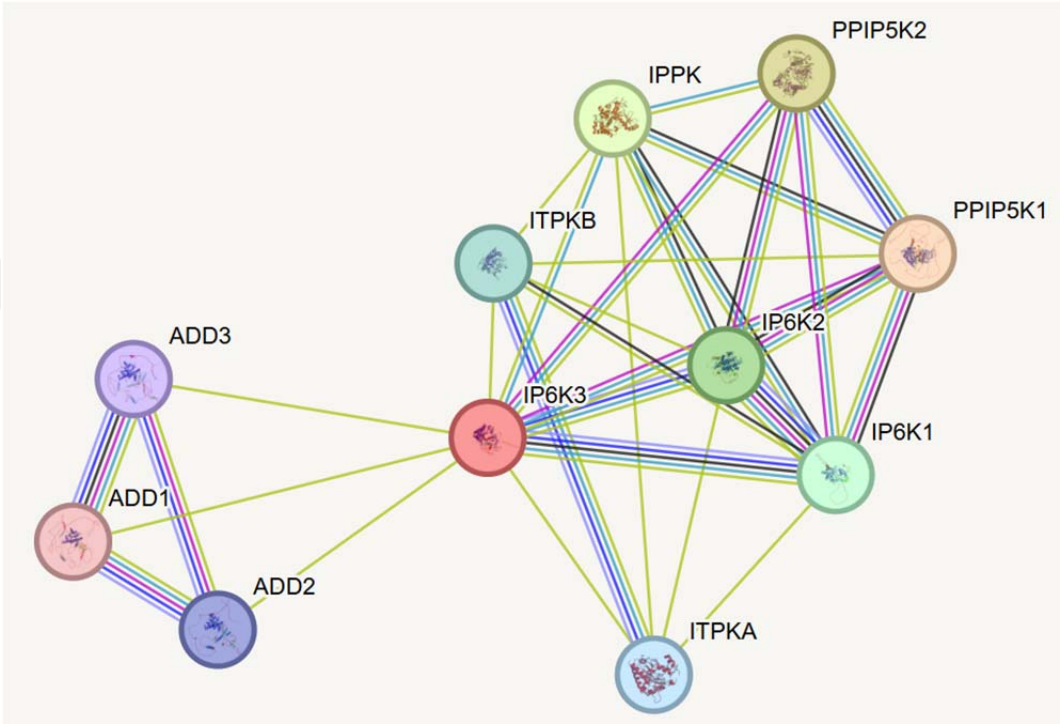
LGR4: Lösin açısından zengin tekrar içeren G-protein bağlı reseptör 4; Kanonik Wnt sinyal yolunu güçlendiren ve çeşitli organların oluşumunda rol oynayan R-spondinler için reseptör. R-spondinlere (RSPO1, RSPO2, RSPO3 veya RSPO4) bağlandıktan sonra, hücre dışı Wnt reseptörleri tarafından aktive edilen fosforile edilmiş LRP6 ve frizzled reseptörleriyle ilişki kurarak hedef genlerin ekspresyonunu artırmak için kanonik Wnt sinyal yolunu tetikler. Klasik G-protein bağlı reseptörlerin aksine, sinyali iletmek için heterotrimerik G-proteinlerini aktive etmez.

DAZ1: Azoospermi protein 1'de silinen bilgi; Spermatogenezde önemli bir rol oynayan RNA bağlayıcı protein. mRNA'ların 3'-UTR'sine bağlanarak ve translasyonunu düzenleyerek etki edebilir. Germ hücrelerinin mayoz ve haploid germ hücrelerinin oluşumuna ilerlemesini destekler.

ZNF44: Çinko parmak proteini 44; Transkripsiyonel düzenlemede rol oynayabilir.

ZNF629: Çinko parmak proteini 629; Transkripsiyonel düzenlemede rol oynayabilir; Krueppel C2H2 tipi çinko parmak protein ailesine aittir.

6. IP6K3: Inositol hexakisphosphate kinase 3; Converts inositol hexakisphosphate (InsP6) to diphosphoinositol pentakisphosphate (InsP7/PP-InsP5). Converts 1,3,4,5,6-pentakisphosphate (InsP5) to PP-InsP4. Belongs to the inositol phosphokinase (IPK) family. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler belirlenmiş (Şekil 4.24) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.29. IP6K3 proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

PPIP5K1: İnositol hekzakisfosfat ve difosfoinozitol-pentakisfosfat kinaz 1; IP6K kinazları IP6K1, IP6K2 ve IP6K3 ile birlikte hareket ederek difosfat grubu içeren inositol pirofosfatlar difosfoinozitol pentakisfosfat, PP-InsP5 ve bis-difosfoinozitol tetrakisfosfat, (PP)2-InsP4'ü sentezleyen bifonksiyonel inositol kinaz. PP-InsP5 ve (PP)2-InsP4, sırasıyla InsP7 ve InsP8 olarak da adlandırılır, apoptoz, vezikül trafiği, sitoskeletal dinamikler, ekzositoz, insülin sinyali ve nötrofil aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri düzenler.

PPIP5K2: İnositol hekzakisfosfat ve difosfoinozitol-pentakisfosfat kinaz 2; IP6K kinazları IP6K1, IP6K2 ve IP6K3 ile birlikte hareket ederek difosfat grubu içeren inositol pirofosfatlar difosfoinozitol pentakisfosfat, PP-InsP5 ve bis-difosfoinozitol tetrakisfosfat, (PP)2-InsP4'ü sentezleyen bifonksiyonel inositol kinaz. PP-InsP5 ve (PP)2-InsP4, sırasıyla InsP7 ve InsP8 olarak da adlandırılır, apoptozis, vezikül trafiği, sitoskeletal dinamikler, ekzositoz, insülin sinyali ve nötrofil aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri düzenler.

IPPK: İnositol-pentakisfosfat 2-kinaz; İns(1,3,4,5,6)P5'i 2. pozisyonda fosforile ederek İns(1,2,3,4,5,6)P6 (InsP6 veya fitat) oluşturur. InsP6, mRNA ihracatı, homolog olmayan uç

birleştirme, endositoz, iyon kanalı düzenlemesi gibi birçok süreçte yer alır. Ayrıca hücreleri TNF-alfa kaynaklı apoptozdan korur; IPK1 tip 2 ailesine aittir.

IP6K2: İnozitol hekzakisfosfat kinaz 2; İnozitol hekzakisfosfatı (InsP6) difosfoinozitol pentakisfosfata (InsP7/PP-InsP5) dönüştürür.

IP6K1: İnozitol hekzakisfosfat kinaz 1; İnozitol hekzakisfosfatı (InsP6) difosfoinozitol pentakisfosfata (InsP7/PP-InsP5) dönüştürür. 1,3,4,5,6-pentakisfosfatı (InsP5) PP-InsP4'e dönüştürür; İnozitol fosfokinaz (IPK) ailesine aittir.

ITPKB: İnozitol-trisfosfat 3-kinaz B.

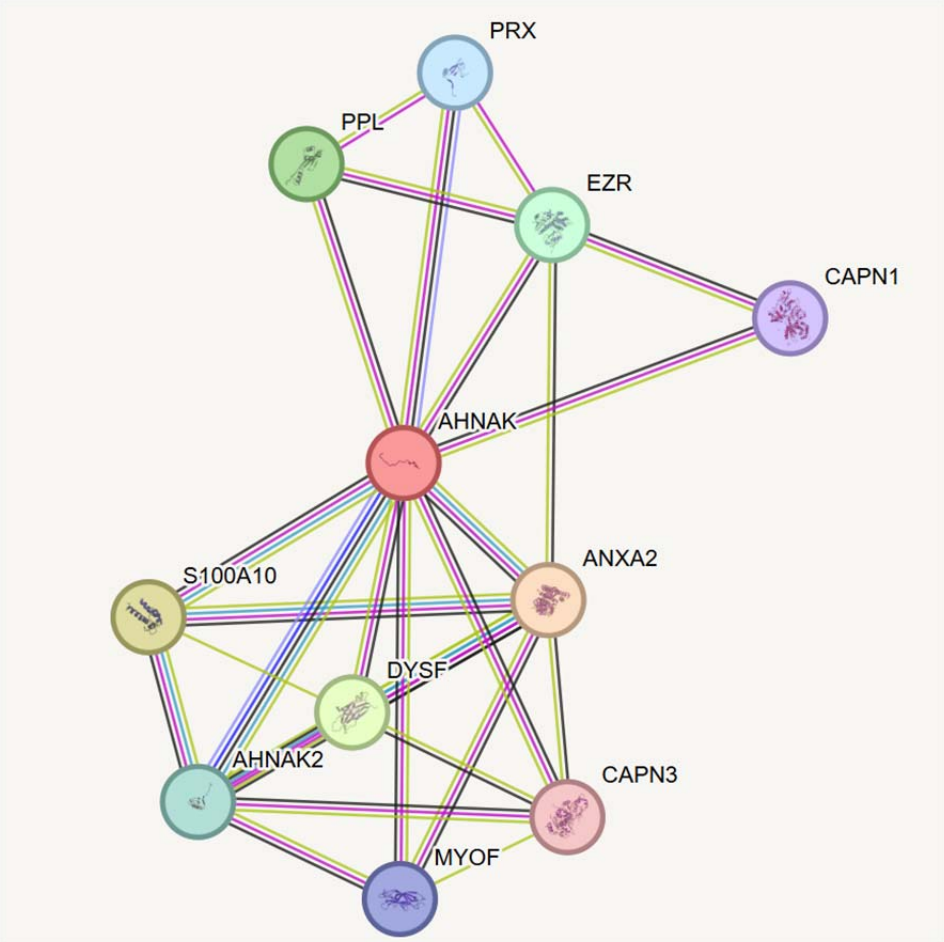
ITPKA: İnozitol-trisfosfat 3-kinaz A; İnozitol fosfokinaz (IPK) ailesine aittir.

ADD2: Beta-adducin; Spektrin-aktin ağının birleşmesini destekleyen membran-sitoiskelet ilişkili protein. Eritrosit membran reseptörü SLC2A1/GLUT1'e bağlanır ve bu nedenle spektrin sitoskeletonu ile plazma membranı arasında bir bağlantı sağlayabilir. Kalmodulin'e bağlanır. Kalmodulin tercihen beta alt birimine bağlanır. Aldolaz sınıf II ailesine aittir. Adducin alt ailesi.

ADD3: Gamma-adducin; Spektrin-aktin ağının birleşmesini destekleyen membran-sitoiskelet ilişkili protein. Aktin filamenti kaplamasında rol oynar. Kalmodulin'e bağlanır. Aldolaz sınıf II ailesine aittir. Adducin alt ailesi.

ADD1: Alfa-adducin; Spektrin-aktin ağının birleşmesini destekleyen zar-sitoiskelet ilişkili protein. Kalmodulin'e bağlanır.

7. AHNAK: Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK; May be required for neuronal cell differentiation. String programı ile etkileşimde olduğu diğer proteinler belirlenmiş (Şekil 4.25) ve bu proteinlerin özellikleri aşağıda sıralanmıştır (Anonymus 6).



Şekil 4.30. AHNAK proteininin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

ANXA2: Annexin A2; Kalsiyuma olan afinitesi anyonik fosfolipidler tarafından büyük ölçüde artırılan kalsiyumla düzenlenen membran bağlayıcı protein. İki kalsiyum iyonunu yüksek afiniteyle bağlar. Isı stresi tepkisinde rol oynayabilir. PCSK9 tarafından geliştirilen LDLR degradasyonunu engeller, muhtemelen bir translasyonel mekanizma yoluyla PCSK9 protein seviyelerini azaltır ancak PCSK9'a bağlanmak için LDLR ile de rekabet eder; Annexin ailesine aittir.

S100A10: Proteini S100-A10; S100A10, ANXA2/p36 dimerizasyonunu indüklediği için, ANXA2 monomerinin tirozin-spesifik kinazın tercih edilen hedefi (in vitro) olması nedeniyle protein fosforilasyonunun düzenleyicisi olarak işlev görebilir; S-100 ailesine aittir.

DYSF: Disferlin; Ca(2+) tetiklemeli sinaptik vezikül-plazma membran füzyonunda rol oynayan temel kalsiyum iyon sensörü. Hem iskelet kası hem de kardiyomiyositlerin sarkolemma onarım mekanizmasında rol oynar ve mekanik stresle bozulan membranların hızla yeniden kapatılmasını sağlar. Ferlin ailesine aittir.

PPL: Periplakin; Keratinositlerin kornifiye zarfının bileşeni. Kornifiye zarfı desmozomlara ve ara filamentlere bağlayabilir. PKB/AKT aracılı sinyallemede lokalizasyon sinyali olarak görev yapabilir. Plakin veya sitolinker ailesine aittir.

EZR: Ezrin; Muhtemelen majör sitoskeletal yapıların plazma membranına bağlanmasında rol oynar. Epitel hücrelerde, apikal kutupta mikrovillus ve membran kıvrımlarının oluşumu için gereklidir. PLEKHG6 ile birlikte normal makropinositoz için gereklidir.

AHNAK2: AHNAK nükleoprotein 2.

PRX: Periaxin; Schwann hücrelerinde distroglikan kompleksinin bir parçası ve göz merceği lif hücrelerinde EZR ve AHNAK içeren komplekslerin bir parçası olarak işlev gören iskele proteini. Sinir uyarılarının normal iletimi ve duyusal uyarıların normal algılanması için gerekli olan periferik miyelin kılıfının bakımı için gereklidir. MBP mRNA'nın perinükleerden paranodal bölgelere normal taşınması için gereklidir. Sinir yaralanmasından sonra normal remiyelinizasyon için gereklidir. Schwann hücrelerinin normal uzaması ve Ranvier düğümleri arasındaki internodların normal uzunluğu için gereklidir.

MYOF: Myoferlin; Endotel hücrelerinin plazmalemma onarım mekanizmasında rol oynayan ve mekanik stresle bozulan membranların hızla yeniden kapatılmasını sağlayan kalsiyum/fosfolipit bağlayıcı protein. Endositotik geri dönüşümde rol oynar. Reseptör KDR seviyelerini düzenleyerek VEGF sinyal iletiminde rol oynar.

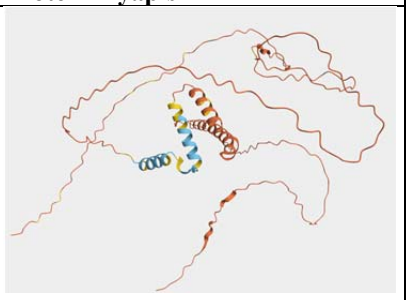
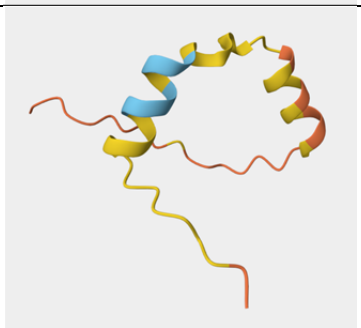
CAPN1: Kalpain-1 katalitik alt birimi; Sitoiskelet yeniden şekillenmesinde ve sinyal iletiminde rol oynayan substratların sınırlı proteolizini katalize eden kalsiyum düzenlemeli lizozomal olmayan tiyol-proteaz; Peptidaz C2 ailesine aittir.

CAPN3: Kalpain-3; Kalsiyum düzenlemeli lizozomal olmayan tiyol-proteaz; Peptidaz C2 ailesine aittir.

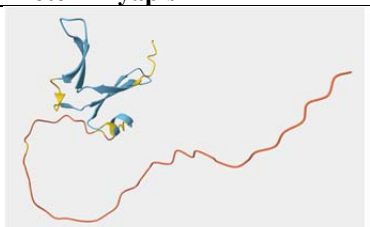
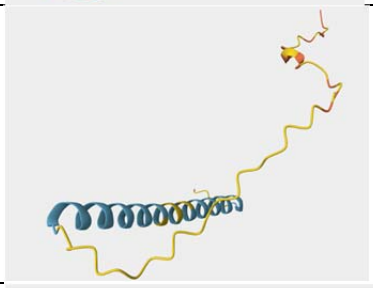
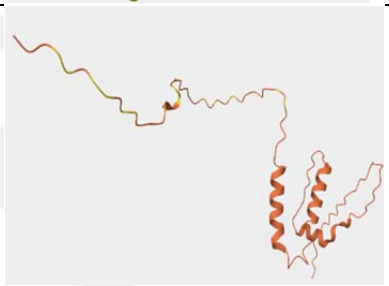
4.3.1. *Mycobacterium tuberculin* FASTA'sı kullanılarak yapılan proteomik analiz sonuçları

Tüberküloz hasta örneklerinde farklılaşan 6 *Mycobacterium tuberculin* proteini tespit edilmiştir. Proteinlerin tahmini için tespit edilen peptid dizileri, proteinlerin kodları ve üç boyutlu yapıları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Gri renkle taranan alanlar, LC-Q-TOFF ham datalarının Peaks Studio yazılımı kullanılarak analiz edilmesi ile tespit edilen piptid dizileridir.

Çizelge 4.1.Tüberküloz hastalarının FFPE dokularında tespit edilen *Mycobacterium tuberculin* proteinleri

Protein sekansı/ Peptid dizisi	**Protein**	**Proteinin yapısı**
MLQADAGQITGHELGRAALLSVRTH RGHHRDRGAGHDGRPGIEHAATFDQ VDTRRGFDLFGHRQRLTGERGLVDL HVDLLNHPGVGGNHLVGPHLDDVAG TQLLGADFDVPRLVVRAGQHLPGGW NLLSQQAIQPTFGTQPLAGRENRVS GEHRTDHHRVHRRTQHRTGHCTKRQ HRRQRVRQLRAHGLGQLPKRVQGCL GYLCAALRRVQATGQRTGRIRRRRC LRRCLLVRRRQSFADLLDRHCVPFM SGCRSRCLRVDDLACQQVSREQSGR RAGGHRAGPQSADPWQHQQGSQSRC TTGNFVTSLACGPGRRNRVQHPPGG SKIGQQDICVPGRCTGSRWWQHTKR HIGSRKRLLTNR MLQADAGQITGHELGRAALLSVRTH RGHHRDRGAGHDGRPGIEHAATFDQ VDTRRGFDLFGHRQRLTGERGLVDL HVDLLNHPGVGGNHLVGPHLDDVAG TQLLGADFDVPRLVVRAGQHLPGGW NLLSQQAIQPTFGTQPLAGRENRVS GEHRTDHHRVHRRTQHRTGHCTKRQ HRRQRVRQLRAHGLGQLPKRVQGCL GYLCAALRRVQATGQRTGRIRRRRC LRRCLLVRRRQSFADLLDRHCVPFM SGCRSRCLRVDDLACQQVSREQSGR RAGGHRAGPQSADPWQHQQGSQSRC TTGNFVTSLACGPGRRNRVQHPPGG SKIGQQDICVPGRCTGSRWWQHTKR HIGSRKRLLTNR	A0A655EKM2_MYCTX	
MLDRHCVPFMSGCRSRCLRVDDLAC QQVSREQSGRRAGGHRAGPQSADPW QHQQGSQSRCTTGNFVTSLACGPGR RNRVQHPPGGSKIGQQDICVPGRCT GSRWWQHTKRHIGSRKRLLTNR	A0A0U0QMA3_MYCTX	
MRPGDVVESIESRAIVGDADGGFRA VLGRRLKIPSDEHLVTLRCTVGVGY VDQD	A0A0U0SRB1_MYCTX	

Çizelge 4.1. Tüberküloz hastalarının FFPE dokularında tespit edilen *Mycobacterium tuberculin* proteinleri(devamı)

Protein sekansı/ Peptid dizisi	**Protein**	**Proteinin yapısı**
MATRHQRAGIDDRWHKRVKGPDGNR RTVRSAVCGRVSRWRVRWVDGGGEE HSKSFQRKPDAQVPDPCRTVDARQG HGPVRNAHLGARLLRLTAVYGSVRL LPCGASMWGI	Q8VK83_MYCTO	
MIERSEPTPAAAVNVSTSMASTTFS RVCAENTGASLVLAAAKRLTAMIKP ISPSSGVPLMKSSCQRRSTRHTSTA LPPRSWPGPRHGPDGNRGAD	A0A654TCX0_MYCTX	
MLEAPSATTRSAAVMAVFSGSGSSS GVGSASTSAPSPAAAAAAASSGVIT VIERSEPTPAAAVNVSTSMASTTFS RVCAENTGASLVLAAAKRLTAMIKP ISPSSGVPLMKSSCQRRSTRHTSTA LPPRSWPGPRHGPDGNRGAD	A0A654ZVQ7_MYCTX	

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular, tüberküloz ve sarkoidozun tanısında kullanılabilecek bazı protein biyobelirteçlerin keşfi açısından umut vaat etmektedir. Hem bireysel hem de kombine biyomarkerlerin, klinik uygulamalarda tanı süreçlerini iyileştirme potansiyeli yüksektir. Proteomik veriler, hastalıkların tedavisinde spesifik hedeflerin belirlenmesi ve yeni terapötik yöntemlerin geliştirilmesinde önemli bir kaynak sağlayabilir. Bu araştırma tüberküloz ve sarkoidoz hastalarının ve sağlıklı gönüllülerin kan, serum, lavaj sıvıları gibi diğer biyolojik materyallerde de tekrarlanabilir ve daha geniş örneklemlerle daha kesinliği yüksek sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca bu çalışmada tespit edilen proteinlerin validasyonu için, Western Blot ve ELISA yöntemlerinin kullanılması, ilerde bu proteinlerin klinikte tanı kriteri olarak kullanılmasına imkan tanıyabilecek bir adım olacaktır.

KAYNAKLAR

Aebersold, R., & Mann, M. (2016). Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. Nature, 537(7620), 347-355.

Aktoğu S, Yorgancıoğlu A, Çırak K, et al. Clinical spectrum of pulmonary and pleural tuberculosis: A report of 5480 cases. Eur Respir J 1996; 9: 2031-5.

Ankney JA, Muneer A, Chen X. Relative and Absolute Quantitation in Mass Spectrometry-Based Proteomics. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif). 2018 Jun 12;11(1):49-77.

Anonymus1:https://www.agilent.com/cs/library/applications/proteomics_ebook6495c_triple quadrupole-agilent.pdf [Son erişim tarihi: 22.05.2022]

Anonymus 2: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/ [Son erişim tarihi: 29.03.2025]

Anonymus 3: https://www.genecards.org/ [Son erişim tarihi: 29.03.2025]

Anonymus 4: https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot [Son erişim tarihi: 29.03.2025]

Anonymus 5: https://www.alliancegenome.org/ [Son erişim tarihi: 29.03.2025]

Anonymus 6: https://string-db.org/ [Son erişim tarihi: 29.03.2025]

Arkema, E. V., & Cozier, Y. C. (2020). Sarcoidosis epidemiology: recent estimates of incidence, prevalence and risk factors. Curr Opin Pulm Med, 26(5), 527-534.

Ayyub A, Saleem M, Fatima I, Tariq A, Hashmi N, Musharraf SG. Glycosylated Alpha-1-acid glycoprotein 1 as a potential lung cancer serum biomarker. Int J Biochem Cell Biol. 2016 Jan; 70:68-75.

Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. Anal Bioanal Chem. 2012 Sep;404(4):939-65.

Baran R, Tor M, Tahaoğlu K, et al. Intrathoracic tuberculous lymphadenopathy: Clinical and bronchoscopic features in 17 adults without parenchymal lesions. Thorax 1996; 51: 87-9.

Becamel C, Figge A, Poliak S, Dumuis A, Peles E, Bockaert J, Lubbert H, Ullmer C. Interaction of serotonin 5-hydroxytryptamine type 2C receptors with PDZ10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1. J Biol Chem. 2001 Apr 20;276(16):12974-82.

Bhargava, M., Viken, K.J., Barkes, B. et al. Novel protein pathways in development and progression of pulmonary sarcoidosis. Sci Rep 10, 13282 (2020).

Bilgili, M., et al. (2018). Hydroelectric power generation: Global and Turkish perspectives. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 81, 2027-2045.

Bloom, B. R., Atun, R., Cohen, T., Dye, C., Fraser, H., Gomez, G. B., . . . Yadav, P. (2017). Tuberculosis. In K. K. Holmes, S. Bertozzi, B. R. Bloom, & P. Jha (Eds.), Major Infectious Diseases. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and

Development / The World Bank© 2017 International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.

Boom, W. H., Schaible, U. E., & Achkar, J. M. (2021). The knowns and unknowns of latent Mycobacterium tuberculosis infection. J Clin Invest, 131(3).

Bryna L. Fitzgerald, M. Nurul Islam, Barbara Graham, Sebabrata Mahapatra, Kristofor Webb, W. Henry Boom, Stephanus T. Malherbe, Moses L. Joloba, John L. Johnson, Jill Winter, Gerhard Walzl, and John T. Belisle Elucidation of a Human Urine Metabolite as a Seryl-Leucine Glycopeptide and as a Biomarker of Effective Anti-Tuberculosis Therapy ACS Infectious Diseases 2019 5 (3), 353-364.

Casanova, N. G., Gonzalez-Garay, M. L., Sun, B., Bime, C., Sun, X., Knox, K. S., ... & Garcia, J. G. N. (2020). Differential transcriptomics in sarcoidosis lung and lymph node granulomas with comparisons to pathogen-specific granulomas. Respir Res, 21, 321.

CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Cech, N. B., & Enke, C. G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. Mass Spectrometry Reviews, 20(6), 362-387.

Chen EI, Hewel J, Felding-Habermann B, Yates JR 3rd. Large scale protein profiling by combination of protein fractionation and multidimensional protein identification technology (MudPIT). Mol Cell Proteomics. 2006 Jan;5(1):53-6.

Christ R. Present value of tuberculin tests in sarcoidosis. Z Erkr Atmungsorgane 1987; 169: 117-21.

Cotter TP, Bredin CP. The relationship between the tuberculin test and the Kweim test in sarcoidosis in Ireland. Ir J Med Sci 1995; 164: 25.

Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nature Biotechnology, 26(12), 1367-1372.

Divya Pandey, Dipanjana Ghosh. Tüberküloz için proteomik tabanlı konakçıya özgü biyobelirteçler: TB tanısının geleceği, Cilt 305, 15 Ağustos 2024, 105245.

Edvardson S, Oz S, Abulhijaa FA, Taher FB, Shaag A, Zenvirt S, Dascal N, Elpeleg O. Early infantile epileptic encephalopathy associated with a high voltage gated calcium channelopathy. J Med Genet. 2013 Feb;50(2):118-23.

Eliuk, S. (2015). High-resolution mass spectrometry: The evolution of proteomics. Journal of Proteome Research, 14(12), 1-10.

Eliuk, S., & Makarov, A. (2015). Evolution of Orbitrap mass spectrometry instrumentation. Annual Review of Analytical Chemistry, 8, 61-80.

Emine Özsarı, Hülya Şimşek, Ayşe Gözü, Belgin Samurkaşoğlu. Usefulness of the QuantiFERON-TB GOLD (in Tube) Test for the Differential Diagnosis of Sarcoidosis from Tuberculosis Lymphadenitis. Abant Med J 2017;6(3):93-99.

Eng, J. K., McCormack, A. L., & Yates, J. R. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 5(11), 976-989.

Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science, 246(4926), 64-71.

Flonza Isa, Sean Collins, Myung Hee Lee, Diessy Decome, Nancy Dorvil, Patrice Joseph, Lauren Smith, Stephen Salerno, Martin T. Wells, James M. Bean, Jean W. Pape, Warren D. Johnson, Daniel W. Fitzgerald, Kyu Y. Rhee. Mass Spectrometric Identification of Urinary Biomarkers of Pulmonary Tuberculosis. eBioMedicine, Volume 31, 157-165.

Geiger, T., Cox, J., Ostasiewicz, P., Wisniewski, J. R., & Mann, M. (2010). Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. Nature Methods, 7(5), 383-385.

Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence:

Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B (1985). Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin-embedded tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 130: 118–126.

Griffin TJ, Aebersold R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. J Biol Chem. 2001 Dec 7;276(49):45497-500.

Grotz, E., Tateosian, N., Amiano, N., Cagel, M., Bernabeu, E., Chiappetta, D. A., & Moretton, M. A. (2018). Nanotechnology in Tuberculosis: State of the Art and the Challenges Ahead. Pharm Res, 35(11), 213.

Grunewald, J., Brynedal, B., Darlington, P., Nisell, M., Cederlund, K., Hillert, J., & Eklund, A. (2010). Different HLA-DRB1 allele distributions in distinct clinical subgroups of sarcoidosis patients. Respiratory Research, 11(1), 25.

Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., & Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nature Biotechnology, 17(10), 994-999.

Han, D. K., Eng, J., Zhou, H., & Aebersold, R. (2001). Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. Nature Biotechnology, 19(10), 946-951.

Hernández-Pérez S, Cabrera E, Amoedo H, Rodríguez-Acebes S, Koundrioukoff S, Debatisse M, Méndez J, Freire R. USP37 deubiquitinates Cdt1 and contributes to regulate DNA replication. Mol Oncol. 2016 Oct;10(8):1196-206.

Hillenkamp, F., & Karas, M. (2000). Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. International Journal of Mass Spectrometry, 200(1-3), 71-77.

Huaman, M. A., & Sterling, T. R. (2019). Treatment of Latent Tuberculosis Infection-An Update. Clin Chest Med, 40(4), 839-848.

Huang X, Summers MK, Pham V, Lill JR, Liu J, Lee G, Kirkpatrick DS, Jackson PK, Fang G, Dixit VM. Deubiquitinase USP37 is activated by CDK2 to antagonize APC(CDH1) and promote S phase entry. Mol Cell. 2011 May 20;42(4):511-23.

Hudspith BN, Flint KC, Geraint-James D, et al. Lack of immune deficiency in sarcoidosis: Compartmentalisation of the immune response. Thorax 1987; 42: 250-5.

Hunninghake GW, Costabel V, Ando M, et al. ATS/ERS/WASOG statement of sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 1999; 16: 149-55.

Jacek R Wis´niewski, Alexandre Zougman, Nagarjuna Nagaraj & Matthias Mann. Universal sample preparation method for proteome analysis. NATURE METHODS | VOL.6 NO.5 | MAY 2009.

Jilani TN, Avula A, Zafar Gondal A, ve diğerleri. Active Tuberculosis. [Güncellendi 2023 26 Ocak]. İçinde: StatPearls [İnternet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Ocak

Jain, R., Yadav, D., Puranik, N., Guleria, R., & Jin, J. O. (2020). Sarcoidosis: Causes, Diagnosis, Clinical Features, and Treatments. J Clin Med, 9(4). doi:10.3390/jcm9041081

Jindal SK, Gupta D, Aggerwal AN. Sarcoidosis in developing countries. Curr Opin Pulm Med 2000; 6: 448-54.

Judson, M. A. (2020). Environmental Risk Factors for Sarcoidosis. Front Immunol, 11, 1340.

Karas, M., & Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Analytical Chemistry, 60(20), 2299-2301.

Kataria YP, Holter JF. Cutaneous anergy in sarcoidosis. In: James DG (ed). Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (vol 73, Lung Biology in Health Disease). New York: Marcel Dekker 1994: 181.

Kebarle, P., & Verkerk, U. H. (2009). Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. Mass Spectrometry Reviews, 28(6), 898-917.

Kocabaş A, Burgut R, Kibaroğlu E ve ark. Verem savaş dispanserlerinde tüberküloz tanı ve tedavi çalışmalarının etkinliği (ön rapor). Tüberküloz ve Toraks 1994; 42: 99-107.

Kolek V. Epidemiological study on sarcoidosis in Moravia and Silesia. Sarcoidosis 1994; 11: 110-2.

Kraaijvanger, R., Janssen Bonás, M., Vorselaars, A. D. M., & Veltkamp, M. (2020). Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Sarcoidosis: Current Use and Future Prospects. Front Immunol, 11, 1443.

Krapivinsky G, Medina I, Krapivinsky L, Gapon S, Clapham DE. SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. Neuron. 2004 Aug 19;43(4):563-74.

Krüger, M., Moser, M., Ussar, S., Thievessen, I., Luber, C. A., Forner, F., ... & Mann, M. (2008). SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. Cell, 134(2), 353-364.

Lacinová L, Klugbauer N. Modulation of gating currents of the Ca(v)3.1 calcium channel by alpha 2 delta 2 and gamma 5 subunits. Arch Biochem Biophys. 2004 May 15;425(2):207-13.

Levent TABAK, Zeki KILIÇASLAN, Esen KIYAN, Orhan ARSEVEN, Mustafa ERELEL, Çağlar ÇUHADAROĞLU, Dilek YILMAZBAYHAN. Analysis of 23 Cases of Sarcoidosis Misdiagnosed as Tuberculosis. Tüberküloz ve Toraks Dergisi 2001; 49(3): 373-379.

Loke, W. S., Herbert, C., & Thomas, P. S. (2013). Sarcoidosis: Immunopathogenesis and Immunological Markers. Int J Chronic Dis, 2013, 928601.

Luna, L.G. (1968) Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edition, McGraw-Hill, New York.

Makarov, A. (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. Analytical Chemistry, 72(6), 1156-1162.

Mansoor SE, Lü W, Oosterheert W, Shekhar M, Tajkhorshid E, Gouaux E. X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action. Nature. 2016 Oct 6;538(7623):66-71.

Marcus K, Schmidt O, Schaefer H, Hamacher M, van Hall A, Meyer HE. Proteomics--application to the brain. Int Rev Neurobiol. 2004; 61: 285-311.

Marshall, A. G., & Hendrickson, C. L. (2008). High-resolution mass spectrometers. Annual Review of Analytical Chemistry, 1, 579-599.

Martin-Hughes, R., Vu, L., Cheikh, N., Kelly, S. L., Fraser-Hurt, N., Shubber, Z., Wilson, D. (2022). Impacts of COVID-19-related service disruptions on TB incidence and deaths in Indonesia, Kyrgyzstan, Malawi, Mozambique, and Peru: Implications for national TB responses. PLOS Glob Public Health, 2(3), e0000219.

Mert A, Bilir M, Özaras R, et al. Results of hepatitis B vaccination in sarcoidosis. Respiration 2000; 67: 543-5.

Michalski, A., Cox, J., & Mann, M. (2011). More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC-MS/MS. Journal of Proteome Research, 10(4), 1785-1793.

Muradov, N. (2017). CO2 emissions reduction strategies in fossil fuel-based hydrogen production plants. Energy Conversion and Management, 150, 1-12.

Narula, N., & Iannuzzi, M. (2020). Sarcoidosis: Pitfalls and Challenging Mimickers. Front Med (Lausanne), 7, 594275.

Nayak, S., Hoang, T. T., & Pham, V. H. (2022). Isotopic Labeling Techniques in Proteomics: A Comprehensive Review. Journal of Proteome Research, 21(3), 456-472.

Ong, S. E., & Mann, M. (2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). Nature Protocols, 1(6), 2650-2660.

Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., & Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. Molecular & Cellular Proteomics, 1(5), 376-386.

Öğretensoy M, Akkurt İ, Canayış L, Togay N. Bir yıllık bir çalışmada erişkin tipi akciğer tüberkülozlu olguların klinik-laboratuvar ve radyolojik verilerine bakış. Erkan F, Tabak L, Kılıçaslan Z, Öztardeşler S (editörler). II. Akciğer Hastalıkları Kongresi Kitabı. İstanbul: Ertaş Yazı Merkezi, 1990: 485-94.

Pallett, S., & Houston, A. (2021). Tuberculosis. Medicine, 49(12), 751-755.

Palomino, J. C., & Martin, A. (2014). Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. Antibiotics (Basel), 3(3), 317-340.

Pan J, Chen HQ, Sun YH, Zhang JH, Luo XY. Comparative proteomic analysis of non-small-cell lung cancer and normal controls using serum label-free quantitative shotgun technology. Lung. 2008 Jul-Aug;186(4):255-261.

Parsons, L. M., Somoskövi, A., Gutierrez, C., Lee, E., Paramasivan, C. N., Abimiku, A., . . . Nkengasong, J. (2011). Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. Clin Microbiol Rev, 24(2), 314-350.

Rodríguez-Suárez E, Whetton AD. The application of quantification techniques in proteomics for biomedical research. Mass Spectrom Rev. 2013 Jan-Feb;32(1):1-26.

Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., ... & Pappin, D. J. (2004). Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. Molecular & Cellular Proteomics, 3(12), 1154-1169.

Rossides, M., Darlington, P., Kullberg, S., & Arkema, E. V. (2023). Sarcoidosis: Epidemiology and clinical insights. Journal of Internal Medicine, 293(6), 668-680.

Salaam-Dreyer, Z., Streicher, E. M., Sirgel, F. A., Menardo, F., Borrell, S., Reinhard, M., . . . Cox, H. (2021). Rifampicin-Monoresistant Tuberculosis Is Not the Same as Multidrug-Resistant Tuberculosis: a Descriptive Study from Khayelitsha, South Africa. Antimicrob Agents Chemother, 65(11), e0036421.

Shah, K. K., Pritt, B. S., & Alexander, M. P. (2017). Histopathologic review of granulomatous inflammation. J Clin Tuberc Other Mycobact Dis, 7, 1-12.

Silva E, Souchelnytskyi S, Kasuga K, Eklund A, Grunewald J, Wheelock ÅM. Quantitative intact proteomics investigations of alveolar macrophages in sarcoidosis. Eur Respir J. 2013 Jun;41(6):1331-9.

Stromberg BR, Singh M, Torres AE, Burrows AC, Pal D, Insinna C, Rhee Y, Dickson AS, Westlake CJ, Summers MK. The deubiquitinating enzyme USP37 enhances CHK1 activity to promote the cellular response to replication stress. J Biol Chem. 2021 Oct;297(4):101184.

Surmen, M. (2018). Sample preparation methods for bottom-up proteomics: A comprehensive review. Journal of Proteome Research, 17(12), 1-15.

Swietlik JJ, Sinha A, Meissner F. Dissecting intercellular signaling with mass spectrometry-based proteomics. Curr Opin Cell Biol. 2020 Jan 9;63:20-30.

Thi Loi Dao, Van Thuan Hoang, Tran Duc Anh Ly, Jean Christophe Lagier, Sophie Alexandra Baron, Didier Raoult, Philippe Parola, Johan Courjon, Pierre Marty, Hervé Chaudet, Philippe Gautret. Sputum proteomic analysis for distinguishing between pulmonary tuberculosis and non-tuberculosis using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): preliminary results. Clinical Microbiology and Infection, Volume 27, Issue 11, 2021, 1694.e1-1694.e6.

Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., ... & Hamon, C. (2003). Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. Analytical Chemistry, 75(8), 1895-1904.

Tobin, E. H., & Tristram, D. (2025). Tuberculosis Overview. In StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.

Ungprasert, P., Ryu, J. H., & Matteson, E. L. (2019). Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment of Sarcoidosis. Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes, 3(3), 358-375.

Wang H, Sun S, Zhang Y, Chen S, Liu P, Liu B. An off-line high pH reversed phase fractionation and nano-liquid chromatography-mass spectrometry method for global proteomic profiling of cell lines. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2015 Jan 1;974:90-5.

Wiese, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E., & Warscheid, B. (2007). Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. Proteomics, 7(3), 340-350.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF ve ark. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev. 1996;13:19-50.

Wu C, Chang Y, Chen J, Su Y, Li L, Chen Y, Li Y, Wu J, Huang J, Zhao F, Wang W, Yin H, Wang S, Jin M, Lou Z, Zhu WG, Luo K, Zhang J, Yuan J. USP37 regulates DNA damage response through stabilizing and deubiquitinating BLM. Nucleic Acids Res. 2021 Nov 8;49(19):11224-11240.

Xiao Z, Chang L, Kim J, Zhang P, Hang Q, Yap S, Guo Y, Zhou Z, Zeng L, Hu X, Siverly A, Sun Y, Ma L. USP37 is a SNAI1 deubiquitinase. Am J Cancer Res. 2019 Dec 1;9(12):2749-2759.

Yeh C, Coyaud É, Bashkurov M, van der Lelij P, Cheung SW, Peters JM, Raught B, Pelletier L. The Deubiquitinase USP37 Regulates Chromosome Cohesion and Mitotic Progression. Curr Biol. 2015 Aug 31;25(17):2290-9.

Yuan Zhang, Xianqiu Chen, Yang Hu, Shanshan Du, Li Shen, Yifan He, Yuxuan Zhang, Xia Zhang, Huiping Li and Rex C Yung. Preliminary characterizations of a serum biomarker for sarcoidosis by comparative proteomic approach with tandem-mass spectrometry in ethnic Han Chinese patients. Respiratory Research 2013, 14:18.

Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Paša-Tolić L. High-throughput proteomics. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif). 2014; 7:427-54.

Zheng Ser, Alex Kentsis. Three protein extraction methods for mass spectrometry proteomics of fresh frozen mouse tissue. Research Square, 2020.

ÖZGEÇMİŞ

Burcu SAYGIDEĞER; 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Kimya Lisans programını, 2005 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Yüksek Lisans programını, 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Doktora programını tamamlamış bulunmaktayım. Ayrıca 2003-2005 yılları arasında Çukurova Üniversitesi eğitim bilimlerinde formasyon (tezsiz yüksek lisans) eğitimi almış, özel ilgim gereği 2015-2017 yılları arasında Çağ Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Psikoloji Anabilim dalında yüksek lisans yapmış bulunmaktayım.

Doktoramı in vitro kanser ilaç araştırmaları üzerine yapmış olup, doktora sonrası araştırmalarımı da aynı konuda yapmaya devam etmekteyim. 2009-2016 yılları arasında Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde öğretim görevlisi olarak görev yaptım. Bu süre zarfında lisans ve yüksek lisans düzeyinde dersler verdim ve lisansüstü öğrenci tez danışmanlıkları yürüttüm. Ayrıca sosyal klüp danışmanlıkları, koro şefliği, yetenek ve müzik yarışmaları organizatörlüğü gibi birçok sosyal görev üstlendim. 2018 yılından itibaren Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı ve daha sonra Biyoteknoloji Merkezi bünyesinde, Tıp Fakültesi ve Translasyonel Tıp Anabilim Dalı ile iş birliği hainde akademik araştırmalarıma devam etmekteyim. Halen primer ve ticari hücre kültürü çalışmaları, metal komplekslerinin antikanser etkileri, bunların docking moleküler mekanizmaları ve proteomik araştırmalar üzerine çalışmaktayım.