

Proteomik Çalışmalara Genel Bakış

An Overview of Proteomic Studies

Merve NENNİ¹
Mustafa ÇELEBİER^{2*}
İncilay SÜSLÜ²

¹Cukurova University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Adana, Turkey

²Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Ankara, Turkey

Corresponding author:
Mustafa ÇELEBİER
Hacettepe University, Faculty of Pharmacy,
Department of Analytical Chemistry, 06100,
Ankara, Turkey
E-mail: celebier@hacettepe.edu.tr
Tel: +90 312 305 1499
Fax: +90 312 305 1499

ÖZET

Proteomik; belirli şartlarda organizmada, dokuda ve hücre içerisinde genler tarafından kodlanan tüm proteinlerin analizi, tanımlanması ve fonksiyonlarıyla ilgilendirilir. Günümüzde herhangi bir biyokimyasal sürecin aydınlatılmasında yalnızca genom analizinin yeterli olmadığı ve bunun yerine proteom analizlerini de içine alan bütünsel bir değerlendirmenin akılcı olduğu bilinmektedir. Bu derleme çalışmasında, genlerle ilgili ortaya atılan ilk hipotezlerden başlayıp günümüzdeki proteomik çalışmalara kadar gelişen süreç üzerine genel bir bakış sunulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Protein, Proteomik, Genomik, 2 boyutlu jel elektroforez

ABSTRACT

Proteomics deals with the analysis, identification and functions of all proteins encoded by genes in the organism, tissue and cell under certain conditions. Today, it is known that not only genome analysis is sufficient in illuminating any biochemical process, but instead, a holistic evaluation including proteom analysis is rational. In this review study, an overview of the process starting from the first hypotheses about genes to proteomic studies today is presented.

Keywords: Protein, Proteomics, Genomics, 2 dimensional gel electrophoresis

1. Gen Hipotezleri ve İnsan Genom Projesi'nden Beklentiler

Eski çağlardan beri canlıların kalıtsal özelliklere sahip olduğu düşüncesi, çeşitli bitki ve hayvanlar üzerindeki gerçekleştirilen gözlemlerle ortaya konmuştur. Mendel, dayandığı temel fiziksel nedenini açıklayamasa da bu kalıtsal özelliklerin birbirine bağlı olmayan birimler olarak aktarılabilmesini bildirmiştir. Bu birimler, DNA'daki belli bölgelerdir, nükleotitlerden oluşur ve günümüzde gen adı verilmektedir. DNA'daki farklı nükleotid dizilişleri, farklı aminoasit zincirlerini oluşturur. Genetik kod, proteinlerdeki aminoasit zincirlerinin sırası ile gendeki nükleotidlerin sırası arasındaki ilişkilidir.

1948 yılında tek gen - tek enzim hipotezi, Beadle ve Tatum'un başlattığı çalışmalarla ortaya atılmıştır [1]. Bu hipotezde, tek bir gen tek bir proteini kodlamaktadır. İlk kez *Neurospora crassa* mutantlarındaki mutasyonla protein deformasyonu arasındaki ilişki keşfedilmiştir. Bu çalışma ile tek gen - tek enzim hipotezi, basit ve gelişmiş canlılarda kabul edilmiştir [2]. Sonraki yıllarda protein dizileme çalışmaları (protein fingerprint) ile farklı mutasyon çeşitleri gözlenmiştir. Nokta mutasyonu modifikasyonu ile beklenen aksine protein zincirinin tamamı yerine tek bir polipeptit zinciri üzerinde olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle 1958'de Davis tek gen - tek polipeptit hipotezinin geçerli olabileceğini belirtmiştir [3]. DNA'nın yapısının aydınlatılmasından sonra gerçekleştirilen çalışmalar bu hipotezin farklı şekilde yorumlanmasına neden olmuştur. DNA dizilerinin analiziyle, genlerin yapısı ve kontrol mekanizmaları ile ilgili bilgiler sağlanmaktadır.

1990'lı yıllarda "İnsan Genom Projesi" başlatılmıştır. Bu projedeki amaç; insan DNA'sında yer alan genleri tanımlamak, tedavisi olmayan genetik hastalıklara yatkınlığın belirlenmesi, bu hastalıklarla ilgili genlerin yapılarını aydınlatıp, yerlerini belirleyerek tanı ve tedaviyi olanaklı hale getirmektir [4]. 2003 yılında İnsan Genom Projesi tamamlanmış ve böylece fiziksel özellikleri belirleyen öğelerle birlikte çeşitli hastalıkların genler aracılığıyla meydana geldiği anlaşılmıştır [5, 6]. Proje kapsamında gerçekleştirilen genomik çalışmalarla insan genomundaki yapısal ve işlevsel fonksiyonları kodlayan genlerin tamamı tanımlanarak, genlerin birbirleri ve çevreyle etkileşimi bütünsel olarak ortaya çıkartılmaya çalışılmıştır [7]. Proje sonunda elde edilen veriler, bilgisayar veri bankalarına işlenmiştir [8, 9]. Bu projenin başlıca

amacı, insan genomunun şifrelerinin çözülmesidir. Şifrenin çözülmesi ile kast edilen; DNA bazlarının dizilişinin belirlenmesi, doğuştan var olan kalıtsal özelliklere ait genleri tanımlanmak ve günümüzde tedavisi olmayan binden fazla genetik hastalığa yatkınlığı belirlemektir [10]. İnsan Genom Projesi ile tüm dünya kamuoyunda hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde yeni ufukların açılacağı, yeni ilaçların geliştirilebileceği yönünde, yüksek beklentiler oluşmuştur. Bu durumun nedeni kronik hastalıklarla ilgili genlerin proje sonunda ortaya çıkartılacağı düşüncesidir. Ancak; kronik hastalıkların oluşumunda genlerin etkisi düşünülenenden azdır ve bununla birlikte sadece genomik çalışmalarla organizmanın, ilgili geni hangi oranda kullandığı hakkında bilgi elde edilebilmesi mümkün değildir. Çünkü bir gen, farklı biyolojik işleve sahip birden fazla proteini kodlar ve bu proteinler de translasyon sonrası değişimlere (post translasyonel modifikasyonlar, PTM) uğrar. Çoğu zaman PTM'ler gen işlevinden bağımsız olarak meydana gelir [11]. Proteinlerin fonksiyonları ve işlevlerinde önemli olan etkenler; hücre içindeki yerleri, fizyolojik uyaran sonucu yerlerinde meydana gelen değişiklikler ve PTM'lerdir. Bu bilgilere ise ancak proteomik çalışmalar ile ulaşılabilmektedir [11, 12].

2. Proteomik, Proteomik Teknolojileri ve Stratejileri

Genom tarafından ifade edilen protein tamamlayıcısına "proteom" denir [13]. Canlı bir organizmada genom değişmeden aynı kalırken, proteom değişkendir ve modifikasyonlara uğrar. Proteom, genom ekspresyonu, tek bir gene ait proteinlerin farklı formlarını ve PTM'lerinin çeşitliliğinden oluşur.

Fields [14] 2001'de proteomik kavramını "Proteomik, sadece proteinlerin tanımlanmasını ve miktarının belirlenmesini değil, aynı zamanda yerleşimlerini, değişimlerini, diğer protein ve makro moleküllerle etkileşimlerini, aktivitelemlerini ve nihayetinde işlevlerini belirlemektedir" şeklinde tanımlamıştır.

Proteomik, bir hücre veya dokudaki biyolojik süreçlerin sonucunda, protein ve protein çeşitliliğinin nitel ve nicel analizleridir. Proteomik teknolojisi, örneklerdeki proteinlerin ayrılması, belirlenmesi ve tanımlanması prensiplerine dayalıdır. Proteomik teknolojileri birbirlerine bağımlı ve ilişki içerisindedir. Proteomik teknolojileri, kıyaslamalı proteomik, ya-

pisal proteomik ve işlevsel proteomik olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir.

Kıyaslamalı (ekspresyon) proteomik, iki veya daha fazla farklı koşullardaki protein ekspresyonunun (ifadesinin) nitel ve nicel analizidir. Hücrede belirli bir iç veya dış faktörlere maruziyette (hastalık durumu, ilaç kullanımı, kimyasal veya fiziksel uyarılar ... gibi) etkilenen proteinlerin incelenmesi etkilenen proteinlerin tespiti, incelenmesi ve karşılaştırılması, kıyaslamalı proteomik alanıdır.

Örneğin, hasta ve sağlam bir bireye ait örneklerdeki protein ifadelerinin belirlenmesi için kıyaslamalı proteomik kullanılabilir. Sadece hasta hücrelerde bulunup veya sağlam hücrelerde bulunmayan proteinler, eksik veya fazla miktarda bulunan proteinler saptanabilir ve kıyaslanarak değerlendirilebilir. Bireyselleştirilmiş tıp uygulamalarında spesifik ilaç ile tedavide sürecin ilerleyişinin tespiti ve sonuca varılmasında kıyaslamalı proteomik önemli verilere sahip olacaktır.

Yapısal (structural) proteomik, proteinlerin üç boyutlu yapıları ile ilgilenmektedir. Hücre içinde tüm organellerde, sitozolde ve hücre dışındaki vücut sıvılarındaki spesifik ve spesifik olmayan proteinlerin yapıları, fonksiyonları ve birbirleri arasındaki etkileşimler aydınlatılmaktadır.

Yapısal proteomikle proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları aydınlatılarak çeşitli etkileşimlerdeki fizikokimyasal özellikler hakkında bilgiye sahip olunmaktadır. Bu etkileşimlerin başında protein yapısındaki enzim ile substrat etkileşimi gelmektedir. Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte bilgisayar destekli ilaç tasarımı da gelişmektedir. Enzimlerin yapısı aydınlatılarak yüksek afiniteye sahip ilaç molekülleri tasarlanmaktadır. Yeni ilaç moleküllerinin tasarlanması ve keşfinde yapısal proteomik önemli yere sahiptir [15, 16].

İşlevsel (functional) proteomik' de, bir proteinin tek başına veya diğer proteinlerle birlikte sahip olduğu fonksiyonu incelenmektedir. Protein-protein etkileşimleri, modifiye proteinlerin yerleri protein ağ haritaları ile ortaya konmaktadır. Çevresel faktör, ilaçlar ve endojen kimyasallar faktörler protein modifikasyonuna neden olup proteinlerin yapısını ve o bölgedeki fonksiyonunu değiştirmektedir. Protein modifikasyon çalışmaları işlevsel proteomik çalışmalarla gerçekleştirilmektedir [17, 18].

Kompleks yapıdaki protein karışım numunelerinin nitel ve nicel analizi, günümüzde alt yapısı yüksek

olan, tanınmış birçok araştırma laboratuvarında çalışılan popüler konulardan biri haline gelmiştir. Proteomik çalışmalarda, yukarıdan aşağıya (*top-down*) ve aşağıdan yukarıya (*bottom-up*) araştırma stratejileri bulunmaktadır. Ayrıca yakın zamanlarda ortadan aşağıya (*middle-down*) araştırma stratejisi ortaya çıkmıştır. Bu stratejiler, temelde numunedeki proteinlerin aminoasitlere parçalanarak ya da parçalanmadan analiz edilmesine dayanmaktadır.

“Yukarıdan aşağıya” proteomik stratejisinde, numunedeki proteinler başlangıçta peptitlerine parçalanmazlar. Kompleks numunelerdeki peptitlerine parçalanmamış proteinlerin analizi yapmak için kütle spektrometrisi (MS) temelli analizler kullanılır [19].

“Aşağıdan yukarıya” proteomik, numunedeki proteinler proteazlarla parçalanarak (proteolitik) amino asit sekanslarının elde edilmesi ve daha sonra bu sekansların karakterizasyonunun yapılmasıdır. Proteinlerin peptit zincirlerinin parçalanmasında tripsin gibi proteaz enzimi kullanılır. Lizin veya arjinin gibi tanımlanan bölgelerden parçalanmış peptit karışımları elde edilir. Kütle spektrometrisi kullanılarak proteolitik parçalamayla amino asit sekanslarının karakterizasyonu aracılığıyla proteinler tanımlanır. Burada ilk olarak, biyolojik örnek, proteinlerin peptit zincirini parçalayan proteolitik enzim (örn. tripsin) tarafından peptit karışımları oluşturmak için tanımlanan bölgelerinden (lizin veya arjinin) parçalanır. Elde edilen peptit karışımı, kromatografik veya elektroforetik yöntemlerle ayrılır ve bir tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) ile karakterize edilir [20]. İki boyutlu (2D) jel elektroforez ile yapılan analiz, “Aşağıdan yukarıya” proteomik çalışma stratejisinde ayırıma ek olarak MS’ in kombine kullanılarak proteinin yapısını ve PTM kombinasyonlarını tespit etmeye yardımcı olur.

“Ortadan aşağı” proteomik stratejisinde ise, numunedeki proteinlerin peptitlerine parçalanması, tripsinden daha az sıklıkta peptitlerine parçalayan proteolitik enzimler kullanılarak, kimyasal parçalama ya da mikrodalga destekli asit hidrolizi gibi yöntemlerle yapılabilir [21, 22].

3. Proteom Araştırmasında Kullanılan Teknikler

Proteinler, aminoasitlerin birbirlerine peptit bağlarıyla bağlanmasıyla meydana gelen polimerlerdir. Her bir proteinin kendine özgü özellikleri vardır ve bu özelliklerle ilgili proteinin özel aminoasit dizilimine bağlıdır. 22 çeşit aminoasidin farklı dizilimleriyle proteinler elde edilir. Proteinlerin tanımlanması için öncelikli olarak hücre içerisindeki ortamından uzaklaştırılarak ayrılmalı, sonrasında ise fizikokimyasal özellikleri aracılığıyla ayrılması gereklidir [23].

Elektroforetik veya kromatografik tekniklerle ayrımı gerçekleştirilen proteinlerin, spektroskopik olmayan tekniklerle [23] (Edman yıkımı gibi) veya MS'lerle aminoasit dizilimi belirlenerek, proteinlerin birincil yapıları belirlenebilir. Proteinlerin üç boyutlu yapıları ile ilgili bilgilere sadece MS kullanarak ulaşmak mümkün değildir; ancak aminoasit dizilimi saptanmış protein setleri için farklı online veritabanları aracılığıyla önceden belirlenmiş protein yapısına ulaşılabilir ve ayrıca çeşitli yazılımlarla yapı önerileri elde edilebilir [24]. Proteinin üç boyutlu yapısını direk öğrenebilmek için X-ışını kristalografisi (XRC), X-ışını kırınımı [25] veya nükleer manyetik rezonans (NMR) teknikleri kullanılabilir [26]. Bu durumlar değerlendirildiğinde, istenen bilginin içeriğine göre proteinlerin belirlenmesinde farklı yaklaşım ve tekniklere ihtiyaç vardır.

Kompleks yapıları nedeniyle tek seferde karışım halindeki numunelerin içindeki proteinleri belirleyen ve miktarını tespit eden belirli bir metot bulunmamaktadır. Bu nedenle protein setlerinin analizinde öncelikle yüksek duyarlılıkta bir ayırım yapılmakta ve daha sonra gene yüksek duyarlılıktaki çeşitli MS'lerle kombine kullanılmaktadır. Bu analiz yönteminde yüksek ayırım gücüne sahip 2D jel elektroforezi ve yüksek duyarlılığa sahip MS kullanımı, son 20 yıldır proteomikte en güçlü stratejilerden biridir [27].

Elektroforetik ve kromatografik teknikler, proteomik çalışmalarda kompleks örnekleri ayırmada temel araçlardır. Peptit karışımları, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), (normal faz kromatografisi (NP), iyon değişim kromatografisi (IEX), boyut eleme kromatografisi (SCX), afinite veya ters faz kromatografisi (RP) gibi HPLC teknikleri kullanılabilir), nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kapiler elektroforez (CE) ile ayrılır. Elektroforetik ve kromatografik tekniklerin kullanılmasının bir avantajı,

kompleks protein/peptit karışımlarının fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılmasıdır [28].

Kıyaslamalı proteomikte de proteinlerin tanımlanmasında analiz öncesi hedef proteinin diğer proteinlerden ya da tüm proteinlerin birbirlerinden ayrılması gereklidir. Birçok protein ayırım metotları vardır. Bunlar 2D jel elektroforez, iki boyutlu diferansiyel jel elektroforez (2D DIGE), tek boyutlu sıvı kromatografisidir (1D LC) ve iki boyutlu sıvı kromatografisi (2D LC) protein ayırım metotlarıdır. Ancak en sık kullanılan tekniklerin başında 2D jel elektroforez gelmektedir [29-32]. 2D jel elektroforez, temel elektroforez mantığına sahip proteinlerin ayırımıdır. Birinci boyut, proteinlerin izoelektrik nokta (pI)'larına göre ayrıldığı izoelektrik odaklama (isoelectric focusing (IEF)), ikinci boyut ise proteinlerin kütlelerine göre ayrıldığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezidir (SDS-PAGE). Birbirinden ayrılan ve analizi istenen proteinler, MS gibi ileri analitik teknikler kullanılarak analiz edilir ve çeşitli yazılımlar kullanılarak tanımlanır.

4. Elektroforez ve Türleri

Elektroforez, moleküllerin birbirinden ayrılması için kullanılan yöntem olarak kısaca tanımlanabilir. Proteom analizinde 1937 yılında Tiselius tarafından ilk kez tanımlanarak kullanılmış, serbest çözelti elektroforezi (frontal elektroforez) olarak isimlendirilmiştir [33]. Elektroforez, uygun pH' daki tampon çözeltilerde bulunan amino asit, protein, nükleik asit ve nükleotidlerin ortama uygulanan elektrik akımıyla; elektriksel yüküne, molekül büyüklüğüne ve şekillerine göre ayrılmasına dayanan bir yöntemdir [34]. Günümüzde hala elektroforetik hareketlilikte ve protein - protein etkileşimiyle ilgili araştırmalarda kullanılmaktadır.

Bileşenin molekül ağırlığının saptanması, saflaştırılması, saflığının kontrolü, genetik hastalıkların ve yatkınlığın saptanması, popülasyonlardaki genetik çeşitliliğin saptanması, protein ve enzim seviyelerinin analizleri, immünoloji, tıbbi ve moleküler biyoloji elektroforezin kullanım alanlarıdır [35]. Kâğıt elektroforezi, selüloz asetat elektroforezi, jel elektroforezi (poliakrilamid jel elektroforezi ve (PAGE) agaroz jel elektroforezi) ve kapiler elektroforez başlıca olmak üzere 4 çeşit elektroforez türü vardır.

Proteomik, kompleks protein setlerinin (polipeptitlerin) ayrılması, ayırımı yapılan polipeptitlerin karak-

terizasyonu ve veribankaları ile protein hakkındaki araştırma basamaklarından oluşur. Kompleks protein setlerinin ayrımında 2D jel elektroforez, günümüzde aynı anda binlerce proteini ayırabilen tek yöntemdir. İyi bir proteomik analiz için, hücre, doku veya vücut sıvısındaki proteom ifadesindeki değişikliklerin istatistiksel olarak yüksek güven düzeyinde saptanması için tekrarlanabilir 2D jel haritalarının ve 2D referans jel haritalarının oluşturulması; Maksimum spot (leke, protein) sayısını saptamak ve bir spotta kümeleşmiş proteinlerin birikiminin engellenmek için optimum ayırıcılık parametrelerinin sağlanması; Proteinlerin ayırma ve saflaştırılması için maksimum yükleme kapasitesinin belirlenmesi; Basitleştirilmiş kompleks olmayan işlemler ile yüksek verimlilikteki proteom analizlerin olması gibi koşulların sağlanması gereklidir.

5. Jel Temelli Ayırma Yaklaşımları

1937 yılında, Tiselius proteinlerin elektroforez yöntemi ile ayrılmasını incelemiş ve bu ayrımı yeni bir cihaz aracılığıyla gerçekleştirmiştir. Bu cihaz U şeklinde bir hücredir. Bu hücre tampon çözeltisi ile doldurulmuş ve iki ucuna elektrotlar yerleştirilmiştir. U şeklindeki hücrenin içine yüklü bileşiklerden oluşan numune yerleştirildikten sonra hücreye elektrik alanı uygulanmıştır. Numunedeki iyonlar yüklerine bağlı olarak anot veya katoda doğru ilerlemiştir. Bu çalışmada proteinlerin ayrılması için, elektroforetik hareketlilik ve ortamın gösterdiği direnç parametrelerine bağlı olarak farklı elektroforez türleri kullanılmıştır [33].

1956 yılında, 15' den fazla bileşenin aynı anda analizinin yapılabileceği iki elektroforetik yöntemin birleşimini Smities ve Poulik tarafından önerilmiştir [36]. Bu iki elektroforetik yöntem 2 boyut oluşturmuştur. 1. boyutta filtre kâğıdı, 2. boyutta ise nişasta jeli kullanılmıştır. Serum proteinlerini önce serbest çözelti hareketliliği sonrasında molekül ağırlığına göre ayırmışlardır. 1957 yılında Ashton, serum proteinlerini ayırmak için 1. boyutta agar ve 2. boyutta ise nişasta jeli kullanmıştır [37].

1962 yılında, Raymond ve Aurell, serum proteinlerinin ayrılmasında farklı konsantrasyondaki akrilamid jelleri kullanmıştır [38]. 1964 yılında ise akrilamid jeller ortogonal jel elektroforezi olarak adlandırılmıştır. Bu teknik günümüzde yeterliliğini yitirmeyen önemli proteomik tekniklerdendir [39].

1970' li yılların başında, geliştirilen 2 teknik kısa bir süre sonra birleştirileceklerden habersiz çalışmalarına başlanmıştır. SDS varlığında proteinlerin zon elektroforez tekniği ile ayrılması Laemmli tarafından geliştirilmiştir [40], IEF tekniği ise Gronow ve Griffith [41] tarafından geliştirilmiştir.

1975 yılında, birbirinden bağımsız iki araştırmacı (O'Farrel ve Klose) tarafından 2D jel elektroforez ilk kez önerilmiştir. Proteinlerin ayrılmasında 2D jel elektroforezin geliştirilmesi proteomik çalışmalarda dönüm noktası haline gelmiştir; çünkü bu yöntem ile kompleks protein karışımları kendi içinde tek adımda ayrılabilir. Bu teknikte proteinler öncelikle bir şerit (strip) üzerinde birbirinden ayrılır. Bu şerit üzerinde elektrik alan uygulandığında proteinler, pH gradyan içerisinde pI' larına göre ayrılırlar. Bu işlem 1. boyuttur. pI' larına göre şerit üzerinde ayrılan proteinler poliakrilamid jel üzerinde kütlelerine (molekül ağırlığı) göre ayrılırlar. Bu işlem 2. boyuttur. Böylece analizi yapılmak istenen protein jel üzerinde kendine özgü bir bölgede konumlanmış olur. 2D jel elektroforeze özgü bu konumlama, kıyaslamalı proteomikte yöntemin sıklıkla kullanılmasına yol açmıştır [42].

2D jellerde proteomik çalışmalarla saptanmış ve karakterize edilmiş proteinlerin çoğu online veribankalarında depolanır. Bu veribankalarına örnek olarak Swiss-2D PAGE verilebilir [43]. Optik (imaj) veriler ve tanımlanan proteinlere ait bilgilere bu veri bankaları aracılığıyla ulaşılabilmektedir.

- *Optik veriler:* Biyolojik numuneler için bir veya daha fazla referans jel haritasını içermektedir. Ayrıca, hücre doku veya vücut sıvıları gibi numuneler için bulunan jel haritaları tek bir 2D jel veya daha fazla 2D jellerin birleştirilerek farklı pH, moleküler kütle bölgelerini kapsayan mozaik form bulunabilir.
- *Proteinlere ait bilgiler:* Jeller üzerindeki her bir spota ait molekül kütlesi, izoelektrik noktası, protein ismi, analiz ve tanımlanma yöntemi ve referansları ilgili proteinin aminoasit dizisi, post-translasyonel modifikasyonlar, protein ve nükleotid dizi analizleri, ikincil ve üçüncül yapılar, metabolik yollar gibi bilgiler içermektedir.

6. 2D Jel Elektroferezde Proteomik Çalışmalar

2D jel elektroferez emek yoğunluğu, düşük verim ve nispeten yüksek miktarda örnek gerektiren bir teknik olarak tanımlanmaktadır. Ancak çoğu güncel kaynaklar, kompleks protein setlerinin ayrılması için hala geçerli olduğu ve yüksek oranda tercih edildiğini göstermektedir. Bu tekniğin en büyük avantajı mümkün olan en iyi çözünürlüğü sunmasıdır. Teknik proteinleri 2 bağımsız fizikokimyasal özelliğe göre 'pI' ve 'kütle' ayırır. Bununla birlikte jeller proteinleri depolayan etkili bir fraksiyon toplayıcısı olarak görev yapmaktadır. Genel olarak 2D jel elektroferezin uygulama basamakları şu şekilde ifade edilir. Her bir numune için bir en az 3 veya 5 adet tekrarlı 2D jel haritası üretilerek, protein ekspresyonu 2 farklı numunede (örneğin biri normal ve diğeri patolojik) karşılaştırılır. Çeşitli boyama ve optik yoğunluğun gösterilmesi işlemlerinden sonra PDQuest™, Z3, Z4000, Phoretix ve Progenesis gibi ticari olarak mevcut istatistiksel paketlerden biri ile çalışmaya devam edilir. Bu analizlerle, 2 farklı numune (örneğin biri normal ve diğeri patolojik) için 1 tane sanal ana (master, referans) 2D harita üretilir. Daha sonrasında optik yoğunluklarındaki spotlar yani lekeler, düşük ve yüksek miktarda ifade edilmiş proteinleri tanımlamak için karşılaştırılır [44].

2D jel elektroferez uygulamaları genel olarak 10 temel basamaktan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla proteinlerin izolasyonu, proteinlerin çöktürülmesi, numune hazırlama, uygun miktarda proteinin hareketsiz pH gradyanı (IPG: immobilize pH gradient) şeritlerine tatbik edilmesi ve IEF tekniği ile pI'larına göre ayrılması, IPG şerit üzerinde pI'larına göre ayrılan proteinlerin SDS-PAGE tekniği ile kütlelerine göre ayrılması, poliakrilamid jel üzerinde ayrılmış proteinlerin renklendirilmesi, imaj görüntüleme ile jel haritalarının belirlenmesi ve spotların tespiti, analiz edilmek istenen proteinlere ait spotların kesilmesi ve proteinin tripsin vb. bir enzimle peptitlerine parçalanması, peptitlerine parçalanmış proteinin kütle spektroskopisi ile analiz edilmesi, analiz edilen proteinin veribankaları yardımı ile teşhis edilmesi basamaklarından oluşmaktadır [45, 46].

6.1. 1. Boyut '1D' İzoelektrik Odaklama (IEF)

Proteinler aminoasit yapısında polipeptitlerdir. Aminoasit zincirlerinin üzerindeki yan gruplar proteinlerin buldukları ortamda iyonize halde (bazı ortamlarda anyonik; asidik ortamda katyonik yapıda) olmalarına neden olur. Ancak proteinlerin hem anot hem de katot tarafından eşit olarak çekildikleri bir nokta vardır ki bu noktada aminoasit yan zincirlerinin üzerindeki iyonlaşabilen gruplar en üst düzeyde iyonlaştığı halde proteinin toplamına ait net yük sıfırdır. Proteinin pI değeri, o noktadaki pH değeridir. Proteinin net yükü yani pI değeri, asitlik kuvvetine (örneğin asitlik veya bazlık ayrışma sabiti) ve protein dizisi içerisindeki diğer aminoasitlerle etkileşimlerine bağlıdır. Bir pH gradyanı oluşturulan IPG şerit üzerinde, elektriksel alan uygulandığında numunedeki proteinler kendilerine ait pI değerine kadar hareket (göç) eder. Yani yüklü proteinler, pH gradyanı boyunca zıt yüklü elektroda doğru göç etmeye zorlanır. Proteinin net yükü, pH gradyanına bağlı olarak göç sırasında sürekli değişir. pI değerine eşit bir pH değerine sahip bir ortama ulaşıldığında, protein artık elektrik alanın altında göç etmez, hareketsiz kalır [47].

IEF, amfoterik türlerin sabit bir pH gradyan ortamında, elektrik alan altında pI değerlerine göre ayrılmasına dayanmaktadır [48]. Bir proteinin pI değeri hem net yükün hem de proteinin elektroforetik hareketliliğinin sıfır olduğu pH' dır. IEF tarafından peptitler, proteinler, bakteri hücreleri veya amfoterik nanopartiküller gibi yapılar ayrılabilir [49]. pH gradyanları ile düşük tekrarlanabilirlik ve az örnek yükleme kapasitesi IEF' teki sınırlamalardır. 1. Boyutta IPG şeritlerin kullanımıyla, çözünürlük, tekrarlanabilirlik ve yükleme kapasitesi parametreleri üzerindeki sınırlandırmalar azaltılmıştır [50].

6.2. 2. Boyut '2D' Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferezi (SDS - PAGE)

SDS denatüre edici ajan olarak, proteinlerin ayrılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. SDS, proteinler için yüksek afiniteye sahiptir. Ayrıca, SDS, negatif yüklü deterjan molekülleridir ve proteinlerin etrafını sararak doğal yüklerini maskeleymektedir. Bu sebeple, SDS - PAGE ile ayrılan proteinler, yüküne göre değil molekül ağırlığına göre göç eder. Tek başına SDS - PAGE, kompleks protein karışımlarının analizinde yetersizdir. Çünkü ayırma işlemi yetersiz

kalmaktadır. Bu sebeple, başka bir ayırma tekniği ile birlikte kullanılır. Ayırıcılığı arttırmak için 2 boyutlu SDS - PAGE (2D SDS-PAGE) geliştirilmiştir [51]. Bu teknikte; ilk basamakta IEF uygulanır, ikinci basamakta 90 derecelik yönde çevrilerek SDS - PAGE uygulanır. Ancak protein tanımlamasında duyarlılığı arttırmak için 2D jel elektroferezle ayırım yapıldıktan sonra spotlar MS aracılığıyla tanımlanmaktadır.

Proteinlerin görselleştirilmesindeki (boyama) çeşitli yaklaşımlar, amaca göre optimize edilmiştir. Proteinlerin jellerde görselleştirilmesi için en çok Coomassie mavisi ve gümüş boyama gibi kolorimetrik yöntemler kullanılır. Coomassie mavisi ile boyama işlemi düşük maliyet ve gözle görünecek şekilde spotların boyanması nedeniyle tercih edilmektedir. Floresan boyalarla daha yüksek duyarlılık ve daha geniş doğrusallık aralığı elde edilebilir [52, 53].

2D imaj analizleri spotların istatistiksel değerlendirilmesini sağlar. Numuneler arasındaki protein ifadesinin farklılığını değerlendirmek, spot yoğunluklarını incelemek için yüksek kalitede görüntüler ve tekrarlanabilir 2D jeller gereklidir. İmaj analizinde kullanılan yazılımların çoğu otomatik veri işleme için tasarlanmış olsalar da, analizi tarafından tekrar gözle düzeltme yapılması da gereklidir [54].

7. Proteomik Çalışmalarda Kütle Spektrometrisi

Kütle spektroskopisi bir molekülün kütlelerini çok yüksek duyarlılıkta saptar. Bu sebeple analitik teknikler için yaygın bir kullanımı mevcuttur. 1980' li yıllardan beri MS kullanılmaktadır. Ancak 1990' lı yıllardan sonra biyolojik materyallerde kullanımı artmış ve biyolojik numunelerin analizinde önemli bir yere sahip olmuştur. Başından beri biyolojik numunelerde MS kullanılmamasının başlıca nedeni MS analizinde kullanılacak olan numunenin yüklü gaz moleküllerinin olması zorunluluğudur [55]. Peptit ve protein gibi büyük biyomoleküllerin analizinde karşılaşılan problem kararsız, uçucu olmayan bu numuneleri gaz fazına geçirememek ve herhangi bir parçalanma olmadan iyonize forma dönüştürmektir [56].

Biyolojik materyallerde büyük yapıda ve kutupsal olmakla birlikte, kolaylıkla gaz fazına geçemezler ve iyonize olamazlar. MS ile peptit analizinde duyarlılık, bir pmol (10^{-12} mol) ve fmol (10^{-15} mol) seviyesine kadar yükselmiştir. Ayrıca kütleleri 100 kDa'

ya kadar polipeptitlerin analizi de yapılmaktadır [56, 57]. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI), kimya, biyoloji, arkeoloji gibi daha birçok alanda kullanılan iyonizasyon teknikleridir [55, 57]. Bu iki iyon kaynağı kuadrupol, iyon tuzağı, fourier-dönüşüm iyon siklotron rezonansı, orbitrap ve uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF) gibi kütle analizörüne bağlanarak proteomik analizlerde önemli bir yere sahip olmuştur. MS' lere, birden fazla analizörler, örneğin üçlü kuadrupol, kuadrupol - TOF ve Tandem TOF eklenebilir [56, 58].

1993 yılından beri proteinlere ait MS verileri toplanıp bir araya getirilerek gen dizilimlerinin korelasyonunu sağlayan yazılım algoritmaları geliştirilmiştir. Bu algoritmalarla MS, fonksiyonel genomik analizlerde yerini almıştır. Son birkaç yılda, moleküler biyolojinin talepleri doğrultusunda protein karakterizasyonu için yüksek duyarlılıkta spesifik cihaz ve algoritmalar geliştirilmiştir [59].

Günümüzde, proteomik çalışmalarda MS, başlıca proteinlerin tanımlanması, rekombinant proteinlerin ve diğer makro moleküllerin karakterizasyonu ve kalite kontrolü kullanımı mevcuttur. MS, proteinin moleküler ağırlığını ölçmesi nedeniyle, PTM' lerin saptanması ve karakterizasyonunda kullanılır ve proteinin kütlelerini değiştiren herhangi bir kovalent modifikasyon belirleyebilir [60].

Şimdiye kadar proteinlerin amino asit dizilimleri, zaman alan ve yoğun emek isteyen Edman yıkımı ile dizilenmiştir [61]. Peptit dizileme yöntemi (PMF)' nin gelişimiyle analizi hızı artırmış ve daha fazla veriye ulaşılmıştır. Numunedeki protein, spesifik bir proteazla parçalandıktan sonra, proteinin sahip olduğu amino asit dizisine göre peptit setleri üretir. Bu setler, veri bankalarından türetilen teorik kütlelerle karşılaştırılır. Bu yaklaşım avantajı düşük numune miktarı ve protein karakterizasyonunun hızlı olmasıdır. Ancak bu yaklaşımında bazı dezavantajları mevcuttur. Protein setinin kullanılacak olan yazılımın veri bankasında bulunması gerekmektedir. Kompleks proteinler analizi karmaşık hale getirdiği için proteinlerin homojen olması gerekir [62].

İki kütle analizörü içeren Tandem MS' le analizi yapılan proteinlerden seçilen peptitlerin parçalanma spektrumları verilir. Birinci analizör, çarpışma hücresindeki parçalanmış öncül iyonunu ayırır. Sonra parçalanma ürünleri ikinci bir analizöre kütle analizi için geçer. Tandem MS, üçlü kuadrupol, kuadrupol-

TOF ve Tandem TOF cihazları ile proteomik analizler gerçekleştirilebilir. Düşük enerjili çarpışma kaynaklı ayrışma (CID), amit bağına parçalayarak peptit fragmentleri oluşturmak için kullanılan bir yöntemdir. Çarpışma hücrelerinde gaz halindeki helyum veya argon atomları ile öncü iyonlarının çarpışmasıyla CID' da parçalanma gerçekleştirilir. Elektron transferi ayrışması, kullanılan anyon moleküllerinin (ant-rasen gibi) reaksiyona girdiği ve bir elektronu peptit iyonuna transfer ettiği başka bir parçalama tekniğidir. Aktarılan elektron, peptit iskeletinin rastgele parçalanmasına sebep olur [63]. Peptitlerin parçalanma spektrumları, farklı veri bankalarındaki parçalanma modelleri ile eşleştirilir. Tandem MS kullanımıyla yüksek kaliteli MS/MS spektrumları ile bilinmeyen proteinin tanımlanması De Novo peptit dizilemesi ile mümkündür [56, 64].

8. Peptit Dizileme Çalışmaları (Peptit Mass Fingerprint) ve De Novo Dizileme

Proteomikte proteinler, tripsin ile parçalanarak peptit setleri oluşturulur. Oluşan peptit setlerinin peptit kütleleri yüksek tekrarlanabilirlik ve doğrulukta MALDI-TOF-MS veya ESI-TOF-MS ile saptanabilmektedir [65]. Peptitlere ait kütleler proteom veri bankalarında bilinen proteinlerin ait peptit dizilerinin kütle değerleriyle karşılaştırılarak protein analizinin gerçekleştirilmesine peptit dizileme çalışmaları (peptit mass fingerprint) denilmektedir. Diğer bir alternatif ise Tandem-MS kullanılarak De Novo dizileme yapılmasıdır. De Novo dizileme, kütle spektroskopisinde izole edilerek kütlesi tespit edilen peptit iyonu (MS1) çarpışma hücrelerinde ayrılarak fragmentlerine (MS2) dönüşür. Fragment iyonların kütlelerinden hareketle ilgili peptide ait aminoasit dizisi elde edilir. Burada dikkat edilmesi gereken husus, her bir MS2 spektrumunun kendisiyle ilgili kütlesi bilinen peptide (MS1) ait olduğudur.

Peptidin parçalanmasıyla iyonlar meydana gelir [66]. Bu tür iyonlara "b" ve "y" türü iyonlar denir ve peptit hakkında bilgi verir. Bununla birlikte "a, c, x ve z" türü iyonlar da meydana gelmektedir. Ancak gözlemlenmesi yüksek olanlar "a, b ve y" türü iyonlardır. Peptit parçalanırken var olan yük hangi terminalde kalmasına göre iyonlar oluşur. Eğer yük amino terminalinde kalırsa "b" türü, karboksi terminalinde kalırsa "y" türü iyonlar oluşur. "b" ve "y" türü iyonların oluşmasıyla peptit iskeletindeki C-N ve N-C yönünde her iki taraftan aynı anda fragmentlerine ayrılmaktadır [67-69].

Gerek peptit dizileme çalışmaları gerekse de De Novo dizileme çalışmaları için geliştirilmiş birçok ticari yazılım ve online açık veribankaları bulunmaktadır. Örneğin; SwissPort, UniPort, NCBIInr, MatrixScience bunlardan bazılarıdır.

9. Proteomik Çalışmaların Eczacılık Bilimine Katkıları

İlaç keşfi ve geliştirme çalışmalarının hız kazanmasıyla hücre kültürü ve kıyaslamalı proteomik çalışmalarının önemi artmış ve gelecekte de artmaya devam edecektir. Bireyselleştirilmiş tıp uygulamaları son dönemin popüler konularındandır. Bu uygulamalarda çeşitli hastalıklar üzerinde var olan ya da yeni geliştirilen ilaçlar hücre kültürü ortamında uygulanıp proteomik çalışmalarla etkiler gözlenmektedir. Kıyaslamalı proteomikte 2D jel elektroforez teknolojileri kullanılarak kanserin patofizyolojisini açıklamak için çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda, bu teknolojiler, kanser patogenezinin ortaya çıkması, ilaç toksisitesinin, etkinliğinin ve direncinin belirlenmesinin yanı sıra yeni tanı tümör biyoreaktifleri geliştirilmesiyle de dikkat çekmiştir. Bu nedenle bu tür çalışmalar, kanserin erken tanı, teşhis ve tedavisinde ve ayrıca kanserin mekanizmasının açıklanmasında önemlidir [70]. Ibanez ve arkadaşları biberiyenin HT-29 kolorektal karsinoma hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesini [71], Ercan ve arkadaşları siklodekstrin nanopartiküllerin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesini [72], Nenni ve arkadaşları Ankaferd Hemostatın HEPG2 hepatosellüler karsinoma hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesini [73] ' 2D jel elektroforez yöntemiyle araştırmışlardır. Bireyselleştirilmiş tıp uygulamaları, alt yapı yetersizliği ve kalifiye araştırmacıların eksikliği nedeniyle zaman alıcı ve pahalı uygulamalardır. Ancak hali hazırda 2D jel elektroforez yöntemi kullanılarak kıyaslamalı proteomikle gerçekleştirilen çalışmalar bu sorunların gelecekte üstünden gelinebileceğini göstermektedir.

AÇIKLAMALAR

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan Merve Nenni' nin doktora tezinin bir parçasıdır (2019, Ankara). Tübitak 114S500 nolu proje ve Hacettepe Üniversitesi

Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no. 17656).

REFERANS

1. Horowitz N: The one gene-one enzyme hypothesis. *Genetics* 1948. 33(6): 612.
2. Mishra NC: Introduction to proteomics: principles and applications. John Wiley & Sons; Place, 2011.
3. Davis RH: Beadle's progeny: Innocence rewarded, innocence lost. *Journal of biosciences* 2007. 32(2): 197-205.
4. Crawford MH, Baer A, Hall R, Omenn G, Thomson G, and Wilson A: The Human Genome Project. *Human biology* 1990. 62(4): iii-v.
5. Bentley DR: The human genome project—an overview. *Medical research reviews* 2000. 20(3): 189-196.
6. Çelebier M: Ht29 Ve K562 Kanser Hücrelerinde Protein Ve Metabolitlerin Analizi İçin Çeşitli Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi. 2013.
7. Kennedy MA: What does the human genome project mean for medicine? *New Zealand medical journal* 2001. 114(1130): 190.
8. Lele R: The human genome project: its implications in clinical medicine. *JOURNAL-ASSOCIATION OF PHYSICIANS OF INDIA* 2003. 51: 373-381.
9. Aldhous P: Human Genome Project: Database Goes On-Line. *Nature* 1990. 347(6288): 9.
10. Roberts L: Timeline: A History of the Human Genome Project. *Science* 2001. 291(5507): 1195-1200.
11. Tyers M and Mann M: From genomics to proteomics. *Nature* 2003. 422(6928): 193.
12. Lottspeich F, Introduction to proteomics, in *Proteomics*. 2009, Springer. pp. 3-10.
13. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, and Humphery-Smith I: Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995. 16(1): 1090-1094.
14. Fields S: Proteomics in genomeland. *Science* 2001. 291(5507): 1221-1224.
15. Jung J-W and Lee W: Structure-based functional discovery of proteins: structural proteomics. *Journal of biochemistry and molecular biology* 2004. 37(1): 28-34.
16. Renfrey S and Featherstone J, *Structural proteomics*. 2002, Nature Publishing Group.
17. Monti M, Cozzolino M, Cozzolino F, Vitiello G, Tedesco R, Flagiello A, and Pucci P: Puzzle of protein complexes in vivo: a present and future challenge for functional proteomics. *Expert review of proteomics* 2009. 6(2): 159-169.
18. Biliková K, Mirgorodskaya E, Bukovská G, Gobom J, Leh-rach H, and Šimúth J: Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2. *Proteomics* 2009. 9(8): 2131-2138.
19. Tran JC, Zamborg L, Ahlf DR, Lee JE, Catherman AD, Durbin KR, Tipton JD, Vellaichamy A, Kellie JF, and Li M: Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature* 2011. 480(7376): 254.
20. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, and Yates JR: Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature biotechnology* 1999. 17(7): 676.
21. Wu C, Tran JC, Zamborg L, Durbin KR, Li M, Ahlf DR, Early BP, Thomas PM, Sweedler JV, and Kelleher NL: A protease for 'middle-down' proteomics. *Nature methods* 2012. 9(8): 822.
22. Taouatas N, Drugan MM, Heck AJ, and Mohammed S: Straightforward ladder sequencing of peptides using a Lys-N metalloendopeptidase. *Nature methods* 2008. 5(5): 405.
23. Edman P: A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* 1949. 22: 475-476.
24. Guillonneau F, Guieysse A, Le Caer J, Rossier J, and Praseuth D: Selection and identification of proteins bound to DNA triple-helical structures by combination of 2D-electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Nucleic acids research* 2001. 29(11): 2427-2436.
25. MacArthur MW and Thornton JM: Conformational analysis of protein structures derived from NMR data. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 1993. 17(3): 232-251.
26. Ratnaparkhi GS, Ramachandran S, Udgaonkar JB, and Varadarajan R: Discrepancies between the NMR and X-ray structures of uncomplexed barstar: analysis suggests that packing densities of protein structures determined by NMR are unreliable. *Biochemistry* 1998. 37(19): 6958-6966.
27. Issaq HJ: The role of separation science in proteomics research. *Electrophoresis* 2001. 22(17): 3629-3638.
28. Lescuyer P, Hochstrasser DF, and Sanchez JC: Comprehensive proteome analysis by chromatographic protein prefractionation. *Electrophoresis* 2004. 25(7-8): 1125-1135.
29. Ong S-E and Pandey A: An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomolecular engineering* 2001. 18(5): 195-205.
30. Rabilloud T: Two-dimensional gel electrophoresis in proteo-

- mics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *PROTEOMICS: International Edition* 2002. 2(1): 3-10.
31. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, and Lelong C: Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *Journal of proteomics* 2010. 73(11): 2064-2077.
 32. Wittmann-Liebold B, Graack HR, and Pohl T: Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics* 2006. 6(17): 4688-4703.
 33. Tiselius A: Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochemical Journal* 1937. 31(9): 1464.
 34. Shaw CR and Prasad R: Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes. *Biochemical Genetics* 1970. 4(2): 297-320.
 35. Kapiler Elektroferezin İlaç Analizlerine Uygulanması. 2018.
 36. Smithies O and Poulik M: Two-dimensional electrophoresis of serum proteins. *Nature* 1956. 177(4518): 1033.
 37. Ashton G: Serum protein differences in cattle by starch gel electrophoresis. *Nature* 1957. 180(4592): 917.
 38. Raymond S, Nakamichi M, and Aurell B: Acrylamide gel as an electrophoresis medium. *Nature* 1962. 195(4842): 697.
 39. Raymond S: Acrylamide gel electrophoresis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1964. 121(2): 350-365.
 40. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 1970. 227(5259): 680.
 41. Gronow M and Griffiths G: Rapid isolation and separation of the non-histone proteins of rat liver nuclei. *Febs Letters* 1971. 15(5): 340-344.
 42. Klein E, Klein JB, and Thongboonkerd V, Two-dimensional gel electrophoresis: a fundamental tool for expression proteomics studies, in *Proteomics in Nephrology*. 2004, Karger Publishers. pp. 25-39.
 43. SWISS-2DPAGE.; 2020 April 20. Available from: <https://world-2dpage.expasy.org/swiss-2dpage/>.
 44. Hamdan MH and Righetti PG: Proteomics today: protein assessment and biomarkers using mass spectrometry, 2D electrophoresis, and microarray technology. John Wiley & Sons; Place, 2005.
 45. Görg A, Postel W, and Günther S: Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988. 9(9): 531-546.
 46. Regula JT, Ueberle B, Boguth G, Görg A, Schnölzer M, Herrmann R, and Frank R: Towards a two-dimensional proteome map of *Mycoplasma pneumoniae*. *ELECTROPHORESIS: An International Journal* 2000. 21(17): 3765-3780.
 47. Girault HH: Analytical and physical electrochemistry. EPFL press; Place, 2004.
 48. Ek K, Bjellqvist B, and Righetti PG: Preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients. I. General principles and methodology. *Journal of biochemical and biophysical methods* 1983. 8(2): 135-155.
 49. Suchkov S, Nikol'skaia I, and Debov S: Isoelectric focusing of DNA-methylases from *Shigella sonnei* 47. *Voprosy meditsinskoi khimii* 1983. 29(4): 117-122.
 50. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeyer R, and Postel W: Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of biochemical and biophysical methods* 1982. 6(4): 317-339.
 51. O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry* 1975. 250(10): 4007-4021.
 52. Harris LR, Churchward MA, Butt RH, and Coorsen JR: Assessing detection methods for gel-based proteomic analyses. *Journal of proteome research* 2007. 6(4): 1418-1425.
 53. Miller I, Crawford J, and Gianazza E: Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 2006. 6(20): 5385-5408.
 54. Penque D: Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. *Proteomics—Clinical Applications* 2009. 3(2): 155-172.
 55. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, and Whitehouse CM: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989. 246(4926): 64-71.
 56. Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, and Calvo E: Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in Functional Genomics* 2006. 4(4): 295-320.
 57. Chaurand P, Luetzenkirchen F, and Spengler B: Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1999. 10(2): 91-103.
 58. Gygi SP and Aebersold R: Mass spectrometry and proteomics. *Current opinion in chemical biology* 2000. 4(5): 489-494.
 59. Pandey A and Mann M: Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000. 405(6788): 837.
 60. Bull P, Morgan R, Sagovsky A, and Hughes G: The transfer and persistence of trace particulates: experimental studies using clothing fabrics. *Science and Justice* 2006. 46(3): 185-195.
 61. Matsudaira P: Sequence from picomole quantities of proteins

- electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. Journal of Biological Chemistry 1987. 262(21): 10035-10038.
62. Henzel WJ, Watanabe C, and Stults JT: Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 2003. 14(9): 931-942.
63. Matthiesen R: Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics. Humana Press, Totowa, New Jersey.(ISBN 978-1-58829-563-7). Journal of Mass Spectrometry 2007. 42(4): 545-545.
64. Aebersold R and Goodlett DR: Mass spectrometry in proteomics. Chemical reviews 2001. 101(2): 269-296.
65. Matthiesen R: Mass spectrometry data analysis in proteomics. Springer; Place, 2007.
66. Vékey K, Telekes A, and Vertes A: Mass spectrometry instrumentation and techniques. Medical Applications of Mass Spectrometry 2008: 93.
67. Roepstorff P and Fohlman J: Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomedical mass spectrometry 1984.
68. Biemann K: Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. Biomedical & environmental mass spectrometry 1988. 16(1-12): 99-111.
69. De Novo Peptide Sequencing Tutorial.; 2020 April 26. Available from: http://ionsource.com/tutorial/DeNovo/b_and_y.htm.
70. Jain KK: Innovations, challenges and future prospects of oncoproteomics. Molecular oncology 2008. 2(2): 153-160.
71. Ibáñez C, Valdés A, García-Cañas V, Simó C, Celebier M, Rocamora-Reverte L, Gómez-Martínez Á, Herrero M, Castro-Puyana M, Segura-Carretero A, Ibáñez E, Ferragut JA, and Cifuentes A: Global Foodomics strategy to investigate the health benefits of dietary constituents. Journal of Chromatography A 2012. 1248: 139-153.
72. Ercan A, Çelebier M, Varan G, Öncül S, Nenni M, Kaplan O, and Bilensoy E: Global omics strategies to investigate the effect of cyclodextrin nanoparticles on MCF-7 breast cancer cells. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2018. 123: 377-386.
73. Merve N, Selin Ö, Ayşe E, Mustafa Ç, İncilay S, and İbrahim Celalettin H: Exposure of Hepatocellular Carcinoma Cells to Ankaferd Blood Stopper® Alters Cell Death Signaling Networks Confirmed by Oncoproteomic and Genomic Profiling Studies. Current Traditional Medicine 2020. 6: 1-13.