

Farklı biyolojik organizmalarda proteomik uygulamalar

Proteomic applications of different biological organisms

Sinem ÖZENOĞLU, Hatice YILDIZHAN, Duygu ÖZEL-DEMİRALP, Demet CANSARAN-DUMAN

ÖZET

Marc Wilkins tarafından ilk defa 1994 yılında açıklanan proteomiks terimi bir organizma, doku veya hücrede herhangi bir zamanda bulunan proteinlerin tamamının, geniş çaplı protein ayırma ve tanımlama yöntemleri kullanılarak analiz edilmesi esasına dayanmaktadır. Proteom; belli bir zaman ve mekânda bir organizmanın sahip olduğu ve ifade ettiği bütün farklı proteinlerin toplamıdır. Proteomik; belli bir zamanda belli bir yerde bulunan tüm proteinlerin yapılarını, yerleşimlerini, miktarlarını, translayon sonrası modifikasyonlarını, doku ve hücrelerdeki işlevlerini, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşimlerini ifade eder. Farklı doku ve organların hücrelerinde bulunan DNA'lar birbirine benzese de proteinler birbirine benzememektedir. Bu nedenle özellikle çeşitli hastalıkların tanısında sadece genetik bilimi yeterli olmamakta, aynı zamanda proteomiks bilimine ihtiyaç da gün geçtikçe artmaktadır. Bu derleme kapsamında öncelikle farklı protein ekstraksiyon yöntemleri, iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) ve kütle spektrometresi teknolojilerini içeren proteomik uygulamalar ele alındı. Daha sonra; farklı organizma veya doku kullanımı ile tıbbın farklı alanlarında proteomik yöntemler uygulanarak gerçekleştirilen çalışmalardan bahsedildi. Ayrıca, son yıllarda proteom analizi ile farklı biyolojik

ABSTRACT

Proteomics described in 1994 for the first time by Marc Wilkins is based on the analysis all proteins present at any time in an organism, tissue or cell by using a large-scale protein separation and identification methods. The proteome is all the different proteins that an organism possesses and expresses at a certain time and place. Proteomic expresses the structures of all proteins at a certain time and place, placements, quantities, the post-translational modifications, functions in tissues and cells, and the interactions of other proteins and macro molecules. DNAs in cells of different tissues and organs are similar, but proteins are dissimilar. Therefore, science of genetics is not sufficient for the diagnosis of various diseases. For this reason, there is increasing interest in the science of proteomics day by day. In this review, firstly, we evaluated different protein extraction methods, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), and proteomic applications which include mass spectrometry (MS) techniques. Secondly, it is mentioned that the studies carried out by proteomics in different field of medicine through using of different organism or tissue. In addition, in recent years, the studies have been evaluated to determine the response of different

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Merkez Laboratuvarı, Tandoğan, Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Demet CANSARAN-DUMAN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Merkez Laboratuvarı, Tandoğan, Ankara, Türkiye 06100 Ankara - Türkiye Tel : +90 533 344 47 44 E-posta / E-mail : dcansaran@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 06.07.2015
Kabul Tarihi / Accepted : 22.04.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.35761

Özenoğlu S, Yıldızhan H, Özel-Demiralp D, Cansaran-Duman D. Farklı Biyolojik Organizmalarda Proteomik Uygulamalar Türk Hij Den Biol Derg, 2016; 73(4): 405-418

organizmaların biyotik veya abiyotik strese maruz kalınca verdiği yanıtın ve savunma mekanizmalarında kullanılan proteinlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar üzerine değerlendirmeler yapıldı.

Anahtar Kelimeler: proteom, proteomiks, iki boyutlu jel elektroforezi (2DE), izoelektrik odaklama (IEF), MALDI-TOF

biological organisms and protein used in defense mechanisms when expose to biotic or abiotic stresses by proteome analyses.

Key Words: proteom, proteomics, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), isoelectric focusing (IEF), MALDI-TOF

GİRİŞ

Son yıllarda araştırmacılar genomik çalışmalar üzerine yoğunlaşarak özellikle hastalık ve diğer süreçlerle ilgili gen tanımlama yolunda hızla ilerlemişlerdir. Fakat devam eden bilimsel çalışmalar bir organizmada tanımlanan genlerin organizmanın ne kadar oranda kullandığı konusunda yeterli bilgi sağlayamamıştır. Bu nedenle genomik çalışmalarının devamı olan proteomik biyolojik iş ve işleyişin açıklanmasında oldukça önem kazanmıştır. Buna ilaveten bir diğer önemli noktada bir gen ürününün sentezi sonrası değişime uğrayabilmesi ve kesinleştirilemeyen miktarının tespiti için proteomik uygulamalarına gereksinim vardır.

Proteom, terimi ilk kez 1994 yılında Marc Wilkins tarafından önerilmiş ve genom tarafından kodlanan proteinleri tanımladığı şeklinde belirtmiştir (1,2). **Proteom**, bir hücre, organ veya organizmanın farklı gelişim evreleri, çevresel koşullar, çeşitli hastalıklar, yaşlılık gibi süreçlerde bir organizmanın sahip olduğu ve ifade ettiği sadece genler tarafından kodlanan polipeptit yapıları değil, aynı zamanda sentez sonrası modifikasyonları da içeren proteinlerin toplamı olarak ifade edilmektedir (3). **Proteomik** ise proteomun tanımlanmasıdır. Proteomik çalışma ilkesi

önce proteinin izolasyonu ve saflaştırılması, ayrılması (Elektroforez ve Kromatografiye dayalı teknikler), kütle spektrometresi (MS), proteinlerin tanımlanması, olası değişimlerin belirlenmesi ve veri analizine dayanmaktadır. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) proteinlerin moleküler büyüklüğünü analiz etmek için kullanılmaktadır. Poliakrilamid jellerle yapılan elektroforez, örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmalarını sağlar. Western Blot ise protein ifade değişimlerini doğrulamak için farklı örneklerdeki protein miktarının belirlenmesinde ve yardımcı immünopresipitasyon deney sonuçlarının analizinde kullanılmaktadır. MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) kütle spektrometresinde kullanılan iyonizasyon tekniğidir. Biyomoleküllerin ve büyük organik moleküllerin analizinde kullanılmaktadır.

Belli koşullar altında bütün bir organizmanın, özel bir dokunun veya herhangi bir hücresel kısmın protein boyutunda değişiklikleri belirlenebilmesine dayanan proteom çalışmalarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle son yıllarda stres moleküler biyoloji alanında bitkilerde strese dayalı proteom boyutundaki farklılaşmalar başta olmak üzere farklı

biyolojik organizmalarda değişik amaçlı birçok çalışma literatürde yer almaktadır.

Farklı Biyolojik Organizmalarda Proteomik Uygulamalar

Bakteri Proteom Uygulamaları

Tang ve arkadaşları (2008), süksinonitril uygulanmasından sonra *Klebsiella oxytoca*'nın proteomik analizini araştırmışlardır. Bu çalışma, *K. oxytoca* türünün süksinonitril sonucu etkisinin fizyolojik cevabının oluşturacağı değişimin belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization Time-of-flight) ve iki boyutlu PAGE teknikleri kullanılarak, amonyum ile muamele edilmiş hücrelerle karşılaştırıldığında, süksinonitril ile muamele edilmiş *K. oxytoca* türünde yedi tane farklı ifade vermiş protein belirlenmiştir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST) ve bir metal bağlama protein olan PsaA gibi proteinlerin artan ifadesi, oksidatif stresin oluşumuna eşlik eden süksinonitrilin biyodegradasyonunda önerilen süksinonitrilin detoksifikasyon sürecine de dahil olabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Ayrıca *in vivo* koşullarda süksinonitril toksisitesinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (4).

Alg Proteom Uygulamaları

Srivastava ve arkadaşları (2008), *Anabaena doliolum*'da tuzluluğa bağlı fizyolojik ve proteomik değişiklikleri gözlemlemişlerdir. Bu çalışma, *A. doliolum*'da tuzluluğa bağlı fizyolojik değişkenlerin inhibisyonu, proteom değişiklikleri ve glikolat metabolizmasının indüksiyonu hakkında bilgiler sunmaktadır. O₂ evrimi, karbon fiksasyonu, klorofil ve NADPH/NADH seviyesinde azalma ve hücre içi Na⁺ ile solunumdaki artış bir ve 24 saat süreyle 150mM NaCl uygulamasının ardından gözlenmiştir. MALDI-TOF kütle spektrometresi ve iki boyutlu jel elektroforezi, demir süperoksit dismutaz, süperoksit dismutaz, fikosiyanın alfa zinciri, uzama faktörü-Tu

(EF-Tu), ribuloz 1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz ve fosforibulokinaz ile önemli değişiklikler gösteren altı protein seti belirlemiştir. Artan Rubisco aktivitesi ve azalan karbon fiksasyonu, glikolat metabolizma çalışmasını gerektirdiğini belirlemişlerdir. Bunun sonucunda artan glikolat oksidaz aktivitesi, glisin, serin ve amonyum içeriklerinin artışı, serbest ve fosfogliseric asidin birikimi ile teyit edilmiştir (5).

Tran ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada, *Haematococcus lacustris*'de astaksantin birikimi sırasında ifadesi artmış proteinlerin belirlenmesini amaçlamışlardır. Bunun için *H. lacustris* hücreleri altı gün boyunca normal ışık altında fotobiyoreaktörde yetiştirilmiş ve ardından hücreler azotun tükenmiş olduğu bir koşulda sabit faza ulaştıktan sonra ışık kaynağı gibi florasan lambalarla sürekli yüksek ışınım maruz bırakılmıştır. Üç gün boyunca astaksantin birikimi meydana gelmiştir. Bu koşullar altında, üç günlük indüksiyondan sonra her bir hücrede ortalama astaksantin içeriği 91 mg/L'den 406 mg/L'ye yükselmiştir. İki boyutlu elektroforetik karşılaştırma ile proteomik veriler, azot kaynağının tükenmesi ve bir saat daha yüksek ışık kombinasyonunun *H. lacustris*'te protein ifadesini belirgin bir şekilde değiştirdiğini göstermiştir. 49 protein noktası bir saatlik indüksiyondan sonra seçilmiştir. Bu proteinlerin 13 tanesi ifadesi azalan proteinlerden, 36 tanesi ise ifadesi artan proteinlerden oluşmaktadır. Yüksek seviyede ifadesi artan 15 protein MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar astaksantin biyosentezi yolunun daha fazla analizi için takip edilebilir ilginç proteinleri işaret etmiştir (6).

Tran ve arkadaşları (2009), *H. lacustris* (*Chlorophyceae*) yeşil alg türünün azot yetersizliği ve yüksek ışınım stresi altında proteinlerin ifade analizleri araştırılmıştır. Tek hücreli yeşil alg *H. lacustris* değiştirilmiş bazal ortamında (MBBM) ışık özümsele olarak ekimi gerçekleştirilmiştir. *H. lacustris* hücreleri altı gün boyunca normal ışık radyasyonuna maruz bırakılmış daha sonra floresan

ışık kaynağı olarak kullanılarak üç gün daha devam eden ışık radyasyonuna maruz bırakılarak astaksantin birikmesi beklenmiştir. Protein izolasyonundan sonra SDS-PAGE ardından protein noktaları kendi içinde kontrol grubu ya da normal örnek ile karşılaştırılmış 2 kat üzerinde sapmanın istatistiksel olarak önemli fark olması nedeniyle belirlenmiştir. Elde edilen peptitlerin MALDI-TOF-MS analizi ile karakterizasyonu sağlanmıştır. Bu aşamada veri tabanındaki eşleşen proteinlerin deneysel triptik sindirimi ve teorik sindirimi MASCOT ara yüzü kullanılarak uygulanmıştır (7).

Fungus Proteom Uygulamaları

Rustichelli ve arkadaşları (2008), *Physica adscendens* (Fr.) liken türünün kadmiyum (Cd) stresine proteomik açıdan oluşacak yanıtı detaylı olarak incelemişlerdir. Liken tallusu altı, 18, 24 ve 48 saat boyunca 36µM Cd konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. İki boyutlu elektroforez ve kütle spektrometresi analizi sonucunda farklı zaman aralığında, Cd stresi uygulama sonucunda %80-85 oranında farklı spot kimlik göstermiştir. Genel olarak ısı-şok proteinleri ve glutasyon S-transferaz tüm Cd stresi uygulamalarında ifadelerini artırmışlardır. ABC taşıma proteinlerinin ise altı ve 18 saat Cd stres koşulları altında ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (8).

Bitki Proteom Uygulamaları

Zörb ve arkadaşları (2004), kök ve sürgündeki protein seviyesinde tuz stresine karşı mısır bitkisinin (*Zea mays L.*) biyokimyasal farklılaşmasını ilk defa göstermişlerdir. Mısır tuza duyarlı bir bitki olarak kabul edilmektedir. Zörb ve arkadaşları iyon etkilerini en aza indirmek için düşük NaCl konsantrasyonu ve Na⁺ derişimi kullanmışlardır. *Zea mays*'dan elde edilen total protein, iki boyutlu PAGE kullanılarak analiz edilmiştir. Mısır bitkisine yüksek NaCl

uygulanması kök ve sürgünde farklı düzenlenmiş proteinlerin sayısında beklenmedik bir artışa yol açmıştır. Ortalama tuz stresi (25mM NaCl), bitkilerde Na⁺ ve Cl⁻ konsantrasyonları ve morfolojilerine olan etkileri dışında, kök proteinlerinin %45'inde ve sürgün proteinlerinin %31'inde diferansiyel bir düzenlemeye yol açmıştır. Yüksek tuz stresi ise (100mM NaCl) proteinlerin %80'inden daha fazlasında değişikliklere yol açmıştır. Tuz stresinden dolayı ifade artışı gösteren protein, MALDI-TOF kullanılarak peptit kütle parmak izi ile belirlenmiştir. Düşük tuz stresi altında farklı olarak düzenlenmiş üç grup protein belirlenmiştir: birincisi, kinazlar tarafından protein modifikasyonları ve protein biyosentezini de içeren proteinler, ikincisi karbon metabolizma enzimleri ve üçüncüsü ise azot metabolizmasındaki enzimlerdir. Bu 14 proteinin sekiz tanesi transkripsiyon, translasyon ya da metabolizma seviyesindeki yüksek tuz stresi altında literatüre farklı ifade vermiş olarak rapor edilmiştir (9).

Ahsan ve arkadaşları (2007a), çalışmalarında çimlenmiş pirinç tohumlarında bakır (Cu) stresine bağlı fizyolojik ve proteomik değişiklikleri araştırmışlardır. Araştırma sonucunda çimlenme oranı, sürgün uzaması, bitki biyokütlesi ve su içeriğinde azalma gözlenirken, tohumlarda Tiyoobarbiturat reaktif maddeler (TBARS) içeriği ve bakır birikimi, çimlenme aşamasını takiben 0.2mM'dan 1.5 mM'a artan farklı Cu konsantrasyonlarında önemli bir artış göstermiştir. SDS-PAGE yöntemi ile Cu stresi altında polipeptit zincirindeki değişiklikler gösterilmiştir. İki boyutlu jel elektroforezi ile analiz edilen protein profilleri sonucunda, Cu ile muamele edilmiş örneklerde farklı bir şekilde ifade düzeyi gösterdiği ortaya çıkmıştır. 25 protein noktasından, 18'inde ifade artışı, 7'sinde ise ifade azalması görülmüştür. Diferansiyel olarak gösterilen bu proteinler MALDI-TOF kütle spektrometresi ile kimliklendirilmesi yapılmıştır. Bazı antioksidanların miktarındaki artış ve DNAK-

tipi moleküler şaperonlar, U1P1 proteaz ve reseptör benzeri kinazlar gibi bazı regülatör proteinler ile glikolaz I, peroksiredoksin ve aldoz redüktaz gibi stres ile ilişkili proteinler, yüksek konsantrasyonlarda Cu stresinin oksidatif stresi üretebildiğini açıkça gösterilmiştir. Ayrıca alfa-amilaz ya da enolaz gibi anahtar metabolik enzimlerin ifadesinin azalması, Cu stresinden sonra tohum çimlenmesinin inhibisyonunu etkilediği ve aynı zamanda yedek mobilizasyon süreçlerinin başarısızlıkla sonuçlandığını ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlar ışığında yoğun Cu stresine maruz bırakılan çimlenmiş pirinç tohumlarında fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir (10).

Ahsan ve arkadaşları (2007b), Cd toksisitesine maruz bırakılan pirinç fidelerinin çimlenmesinin fizyolojik ve protein profillerindeki değişimini araştırmışlardır. Bu çalışmada, Cd stresini takiben çimlenme aşaması sırasında protein profilindeki değişimleri araştırmak için proteomik yaklaşımların morfolojik ve fizyolojik parametreler ile birlikte araştırılması amaçlanmıştır. Tohumlar 0.2mM ve 1.0mM arasında farklı konsantrasyonlarda Cd stresine maruz bırakılmışlardır. Ortamda Cd konsantrasyonunun artışı, tohumlarda TBARS içeriği ve artan Cd katyonu birikimi ile sonuçlanırken, çimlenme oranı, sürgün uzaması, biyokütle ve su içeriği önemli oranda azalmıştır. Farklılık gösteren 21 protein MALDI-TOF kütle spektrometresi ile belirlenmiştir. Belirlenmiş proteinler savunma ve detoksifikasyon, antioksidant, protein biyosentezi ve çimlenme süreci gibi birçok süreçte yer almaktadırlar. Cd stresine maruz kalan örneklerde tespit edilen proteinlerin belirlenmesi, çimlenme aşamasında tohumların ağır metal stresine karşı oluşturdukları yanıtların moleküler temelini anlamaya yol açabilen yeni bir görüş açısı sağlamıştır (11).

Leea ve arkadaşları (2009) kütle spektrometresi ve iki boyutlu jel elektroforezi ile soğuk stresine yanıt olarak pirinç köklerinin protein ifadesini

araştırmışlardır. Pirinç fideleri 10°C'ye tabii tutulmuştur ve örnekler 24 ve 72 saatlik uygulamadan sonra toplanmıştır. Kök dokularında düşük miktardaki proteinleri tespit etmek için, örnekler %15'lik polietilen glikol (PEG) ile ayrılmışlardır ve gümüş ya da Coomassie brilliant blue (CBB) boyama ile görüntülenmiştir. İfadesi artan 27 protein MALDI-TOF kütle spektrometresi ve ESI-MS/MS analizleri ile belirlenmiştir. Daha önce tanımlanmış soğuk stresinde ifade vermiş proteinler ile birlikte, asetil transferaz, fosfoglukonat dehidrojenaz, spesifik NADP izositrat dehidrojenaz, fruktokinaz, PrMC3 ve glikolaz I'i içeren bir grup yeni protein belirlenmiştir. Bu proteinler belirli hücresel süreçlere katılmaktadır. Bazı seçilmiş proteinlerin mRNA seviyesindeki gen ifadesinin, transkripsiyon seviyelerinin her zaman transkripsiyon seviyelerine eşlik etmediğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bazı yeni proteinlerin belirlenmesi ve kökte meydana gelen proteom ifadesinin araştırılması, bitkilerde soğuk stresine olan yanıtın moleküler temelini daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilmektedir (12).

Natarajan ve arkadaşları (2009) soya fasulyesi tohumlarındaki proteinlerin doğal çeşitliliğini anlamak, genetik olarak değiştirilmiş soya fasulyesindeki transgenik modifikasyonlardan dolayı istenmeyen değişiklikleri değerlendirmek için gereklidir. Soya fasulyesi proteinlerinin farklı sınıflarını ayırmak, belirlemek ve ölçmek için iki boyutlu PAGE, MALDI-TOF ve Tandem kütle spektrometresi ile birlikte sıvı kromatografisi kullanılmıştır. 4 farklı alt gruba ait, dört yabancı ve 12 kültür genotiplerini de içeren 16 soya fasulyesi genotipi ise protein profillerini belirlemek için model olarak kullanılmıştır. Önemli allerjen çeşitleri ve anti-besin protein profilleri iki farklı grup arasında gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar genetiği değiştirilmiş organizmalar ve genetiği değiştirilmemiş organizmalar arasında karşılaştırma yapmak için kullanışlı olabilmektedir (13).

Toorchi ve arkadaşları (2009) soya fasulyesi köklerinde osmotik stresle ilişkili proteinlerin

belirlenmesi için proteomik teknikleri kullanmışlardır. Osmotik strese cevap veren bitkilerin mekanizmalarını araştırmak için PEG ile muamele edilen soya fasulye bitkilerinin protein profilleri proteomik tekniklerle görüntülenmiştir. %10'luk sulu PEG muamelesi kök uzunluklarını ve soya fasulyesi tohumlarının hipokotil uzunluklarını azaltmıştır. Soya fasulyesi kökleri proteinleri iki boyutlu PAGE ile ayrılmıştır ve 415 protein CBB boyama ile belirlenmiştir. PEG muamelesi ile değişen 37 protein Edman sekanslama ve peptit kütle parmak izi kullanılarak analiz edilmiştir. 17 protein kümeleme analizi sonuçları ve bolluk değişiminin kütesel analizi kullanılarak daha fazla deneysel çalışmalar için seçilmiştir. Diğer abiyotik streslerin etkileriyle yapılan karşılaştırma sırasıyla kafeoil-COA-O-metiltransferaz ve 20S protozom alfa altünite A'nın artan abiyotik strese karşı azaldığını göstermektedir (14).

Zhang ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada, *Agrobacterium* ile somatik embriyoların ve üzümün embriyojenik kallusunun (EC) ortak yetiştirilmesi, genellikle doku esmerleşmesi ve ardından hücre ölümünü gösteren negrogeneze yol açmaktadır. İlginç bir şekilde üzümün embriyojenik olmayan kalluslarının (NEC) ortak yetiştirilmesi ise herhangi görünür bir belirti göstermemektedir. Bu çalışma *Vitis vinifera* L.'nin EC ve NEC kalikus tiplerinde proteom boyutundaki altında yatan mekanizmayı amaçlamışlardır. İki boyutlu jel analizi 1180 nokta ortaya çıkarmıştır ve bunların 154 tanesi EC'ye karşı NEC'te farklı şekilde tepki veren proteinler olarak belirlenmiştir. 108 tane proteinin kimliği belirlenmiştir. Özel ya da ağırlıklı olarak EC'de belirlenenler demir eksikliğine duyarlı proteinler, asidik askorbat peroksidaz ve izoflavon redüktaz benzeri proteinlerdir. Özel ya da baskın olarak NEC'te belirlenen proteinler ise temel askorbat peroksidaz, katalaz, kalsinorin-B benzeri protein, 1,3- B glukanaaz ve siklin bağımlı kinaz A1'lerdir. PR-10 proteini EC'de NEC'e göre son derece düşük seviyede bulunmaktadır. Bu sonuçlar, farklı stres yanıtı yollarının NEC'ten EC'ye

aktif olduğunu göstermektedir (15).

Ahsan ve arkadaşları (2010), pirinç yapraklarında kütle spektrometresi ve iki boyutlu jel elektroforezi ile arsenik (As) stresi altında pirinç yapraklarındaki protein ifade profillerini araştırmışlardır. İki haftalık pirinç tohumları iki farklı arsenat konsantrasyonuna (50 ve 100 μM) maruz bırakılmıştır ve yaprak örneklerine stres uygulamasından sonra dördüncü günde toplanmıştır. Pirinç yapraklarında strese bağlı olarak oluşan farklı protein ifadelerinin gösterilmesi için, önce kontrol ve stres uygulanmış örneklerden protein ekstrakte edilmiştir, sonrasında iki boyutlu jel elektroforezi ile protein bantları ayrılmıştır ve CBB ile boyanarak görünür hale getirilmiştir. Kontrol örneği ile arsenik stresi uygulanmış örnekler karşılaştırıldığında toplam 14 farklı protein noktasında en az 1.5 kat ifade değişiminin tekrarlanabilirliği gösterilmiştir ve her iki uygulama benzer bir ifade değişimini göstermektedir. Arsenik (As) stresine maruz kalmış örneklerde 14 protein noktasının sekiz tanesinde ifade artışı, altı tanesinde ise azalmış ifadenme olduğu MALDI-TOF kütle spektrometresi cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Metabolizma ve enerji üretimi ile ilişkili çeşitli proteinlerin artan ifadesi, As stresine maruz kalan bitki yapraklarının metabolik süreçlerin aktivasyonu için gerekli olan yüksek enerjiden olduğu düşünülmektedir. Diğer bir deyişle, 2-DE analizleri sonucunda, immunoblotlama yöntemi ile rubisko enziminin geniş alt ünitesinin As stresi altında önemli derecede azaldığını açıkça ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, Rubisko enziminin ifadesindeki azalma ve kloroplastdaki ribonükleoproteinler, As stresinden dolayı fotosentez oranında azalmaya neden olabileceği gözlemlenmiştir. Diğer bir deyişle, immunoblotlama ile birlikte 2-DE sonuçları Rubisco'nun büyük alt ünitesinin As stres koşulları altında önemli bir azalma gösterdiğini açıkça ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, Rubisco'nun ifadesinin azalması 29 kDa kloroplast ribonükleoproteinleri As stres koşulları altında fotosentez oranının azalmasının ana nedeni olarak görülmektedir (16).

Lee ve arkadaşları (2010) pirinçte Cd etkisini araştırmak için, yaprak ve kök üzerine Cd'nin proteom boyutunda etkisini gözlemişlerdir. Farklı dozlarda Cd uygulanmasından sonra kök ve yaprak dokuları ayrı ayrı toplanmıştır ve yapraktan protein izolasyonu sırasında PEG kullanılmıştır. Görüntü analizinden sonra farklı düzenlenmiş proteinler seçilmiştir ve MALDI-TOF kütle spektrometresi cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Cd uygulamasından sonra 36 proteinin ifadesinde artma ya da azalma görülmüştür. Cd uygulanmış olan kök örneklerinde toplam glutasyon seviyesi azalmıştır ve köklerde ifadesi artmış proteinlerin yaklaşık yarısı oksidatif strese karşı cevap oluşturmuşlardır. Elde edilen bu sonuçlar ile köklerdeki antioksidatif etkinin, oksidatif stresin azalması için gerekli olabileceğini önermişlerdir. Ayrıca RNA jel blot analizi sonucunda proteom analizlerde belirlenmiş proteinlerin transkripsiyonel seviyede farklı düzenlendiği gösterilmiştir (17).

Monagas ve arkadaşları (2010), bitki proantosiyanidinlerin MALDI-TOF analizlerini araştırmışlardır. Proantosiyanidin polifenol bir bileşendir ve kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserin önlenmesinde önemli rol oynadıkları belirlenmiştir. Bitki proantosiyanidinlerin biyolojiksel aktivitesi, kimyasal yapıları ve konsantrasyonlarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Fakat yapısının çeşitliliği ve kompleksliliğinden dolayı, proantosiyanidinlerin kalitatif ve kantitatif analizlerini yapmak oldukça güç olduğu belirlenmiştir. MALDI-TOF yöntemi ile gerçekleştirilen bu çalışmada, bitki proantosiyanidin uygulaması kapsamlı bir şekilde açıklığa kavuşturulmuştur (18).

Wen ve arkadaşları (2010), yaptıkları analizlerde giberillik asidin (GA3) kök dokularının uzunluğu dahil olmak üzere, konsantrasyona bağımlı bir biçimde pirinçte (*Oryza sativa* L.) NaCl kaynaklı

büyüme inhibisyonunun azaldığını belirlemişlerdir. Wen ve arkadaşları GA3 aktivitesinin mekanizmasını aydınlatmak için karşılaştırmalı bir proteomik analizi kullanmışlardır. 48 saat tuz ve giberillik asit uygulanan beş günlük fideler proteomik analizler için kullanılmışlardır. Tuz ve GA3 tarafından farklı düzenlenmiş 11 protein iki boyutlu PAGE ile ortaya çıkarılmıştır ve MALDI-TOF kütle spektrometresi ile belirlenmiştir. Bu proteinler glutamil-tRNA redüktaz, enolaz, tuz proteinleri, varsayımsal protein, şaperon 21, ribuloz bifosfat karboksilaz, izoflavon redüktaz benzeri protein ve fosfoglukomutazdır. Bu proteinlerin bazıları fotosentez ve glikoliz gibi biyokimyasal yollara katılmaktadır, fakat diğerleri pirinçte tuz stresine yanıt olarak özellikle yeni proteinler olarak bulunmuştur. Yaptıkları çalışma, pirinçte tuz stresi üzerinde GA3'ün modüle etkisini ortaya çıkarmada yeniden önem kazanmasını sağlamaktadır (19).

Fana ve arkadaşları (2011), koyun salyası uygulanmasından sonra farklı ifade edilmiş proteinleri çalışmak için model olarak pirinç bitkisi kullanılmıştır. İki haftalık fidelerin sürgünleri enine kesilmiştir ve alt kısımlarındaki kesme yüzeyine koyun salyası sürülmüştür. İki, altı, 12 ve 24 saatlik uygulamadan sonra, proteomik analizler, koyun salyası uygulanan sürgünlerden ekstrakte edilen proteinler kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar proteinlerin, katalaz, peroksiredoksin, ATP sentaz, gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz ve ribuloz 1,5-bifosfat karboksilaz/ oksijenaz (Rubisco)'ı da içeren koyun salyasına yanıt olarak farklı ifade edilmişlerdir. Ayrıca RT-PCR verileri genlerin birçoğunun ayrıca transkripsiyon seviyelerinde düzenlendiğini göstermektedir. Bu çalışma protein seviyesinde pirinç fidelerinin koyun salyasına olan yanıtı hakkında bilgiler sağlamıştır (20).

Hwang ve arkadaşları (2011) pirinç tohumlarında ritmik proteinleri belirlemek için proteomik analiz yöntemlerini kullanmışlardır. Pirinçte ritmik proteinleri

belirlemek için periyodiksel olarak yetiştirilen tohumlar (12 saat ışık/12 saat karanlık döngü) 6 saatlik aralıklarla üç gün boyunca saklanmıştır. Sürekli karanlığa adapte olmuş bitkiler ise iki gün boyunca saklanmıştır. Her bir jelde yaklaşık 3000 yeniden üretilebilir proteinler arasında, proteomik analizler sonucu ışık-ayarlı ritmik proteinler gibi 354 tane nokta tespit edilmiştir. Sürekli karanlık koşullar altında bu 354 tespit edilmiş ritmik protein noktaları, 74 günlük noktalar ve 10 uzun sürekli ritmik noktalar MALDI-TOF cihazı ile gerçekleştirilen analizler ile belirlenmiştir. Ritmik proteinler fonksiyonel olarak fotosentez, merkezi metabolizma, protein sentezi, azot metabolizması, stres dirençliliği ve sinyal transdüksiyonuna ayrılmıştır. Ritmik proteinlerin RT-PCR analizi ve mikrodizin veri tabanı ile proteomik verinin karşılaştırmalı analizi, RNA ve protein arasında farklı ritmik proteinlerin ifade fazının olduğunu göstermiştir ve ayrıca pirinçte saat ayarlı proteinlerin sadece transkripsiyonel olarak değil aynı zamanda post-transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel süreçlerle de modüle edilebildiği önerilmiştir (21).

Zhao ve arkadaşları ise (2011), *Phytolacca americana* hiperakümülatör bitkisinin yapraklarında Cd stresine bağlı proteomik değişimleri incelemiştir. Bu çalışmada, *P. americana*'da protein ifadesi modellerinin Cd stresine bağlı olarak etkileri, 2-DE ile araştırılmıştır. Hem kontrol hem de Cd stresi uygulanmış (400 µM, 48 saat) tohumların sonrasında yaprak proteinlerinin 2-DE profilleri kantitatif ImageMaster yazılımı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Toplamda, 25 gen ürününe karşılık gelen, 32 tane farklı ifade edilmiş protein noktaları, MALDI-TOF/TOF kütle spektrometresi kullanılarak tespit edilmiştir. Ortaya çıkan 25 gen ürününün 14 tanesinin ifadesi Cd stresi altında artmışken 11 tanesinde azalma göstermiştir. Protein ifadesindeki değişim, immunoblot analizleri ile de birçok protein için doğrulanmıştır. Büyük değişiklikler, sülfür ve GSH-ilişkili metabolizmaların yanı sıra fotosentetik yollarda rol oynayan proteinlerde görülmüştür. İfadesi artmış proteinlerin

%33'ü kalretikulin ailesine ait bir protein de dahil olmak üzere transkripsiyon, translasyon ve moleküler şaperonlara bağlanmıştır (22).

Li ve arkadaşları (2012) proteomik bir yol kullanılarak salatalık köklerinde hipoksik duyarlı proteinlerin belirlenmesini araştırmışlardır. Hipoksik stresinde salatalık tohumlarının mekanik yanıtını aydınlatmak için, bitkiler ya normoksik koşulda ya da hipoksik koşullar altında yetiştirilmiştir. Beklendiği gibi, bitki biyokütlesi hipoksik stres koşulları altında önemli ölçüde azalmaktadır. Salatalık köklerinin proteomik profilleri 72 saat muameleden sonra çalışılmıştır ve sırasıyla normoksik ve hipoksik uygulanması yapılmış bitkilerden 316 ve 425 protein noktaları PAGE kullanılarak belirlenmiştir. Normoksik uygulanmış bitkilerle karşılaştırıldığında, hipoksik uygulanmış bitkilerde 12 proteinin protein bolluğu azalmışken 22 proteinin protein bolluğu önemli ölçüde ifadesinde artış tespit edilmiştir. İfadesinde değişim olmuş 21 protein MALDI-TOF/TOF kütle spektrometresi kullanılarak belirlenmiştir. Bu proteinler enerji ve metabolizma proteini, transkripsiyon faktör proteinleri, savunma stres proteinleri, yapısal proteinler ve regülatör proteinlere karşılık gelen sınıflara kategorize edilmişlerdir. Hipoksik stres koşulları altında, glikoliz uyarılmıştır, ikincil yollar ile azot metabolizma yolları baskılanmış enerji, birincil metabolizmaya iletilmiştir. Salatalık bitkilerinden antioksidanlar yardımıyla reaktif oksijen türleri uzaklaştırılmıştır ve reaktif oksijen türlerine karşı savunma gösteren asil-dezaturaz miktarı artmıştır. Bu çalışma, salatalık bitkilerinin hipoksik strese karşı tepki mekanizmasının anlaşılmasında öncülük etmektedir (23).

Ngara ve arkadaşları (2012), *Sorghum bicolor* fidelerinde tuz stresine duyarlı proteinlerin belirlenmesini araştırmışlardır. Bu çalışmada, tatlı sorgum çeşitlerinin tohumları ekilmiştir ve 100mM NaCl ile ya da olmadan katı bir büyüme ortamında yetiştirilmiştir. Isı şok proteinleri immün testi, tuz uygulamasının deneysel materyaller için doğal

fizyolojik parametreler içinde strese bağımlılığını göstermektedir. MS/MS proteomik teknikler ile birlikte iki boyutlu PAGE kombinasyonu genç sorgum yapraklarında görüntülenmiştir ve tuz stresine duyarlı proteinler belirlenmiştir. Coomassie boyası ile belirlenebilen 281 nokta dışında, 118 nokta istatistiksel olarak tuz stresine karşı anlamlı yanıtlar göstermiştir. Bu 118 noktanın 79'u iyi çözünürlük ve miktar fazlalığından dolayı kütle spektrometresi belirlemeler için seçilmiştir ve bunlardan 55 tanesi tam olarak belirlenmiştir. Belirlenen proteinler, hem bilinen hem de yeni strese duyarlı proteinleri de içeren altı fonksiyonel kategoriye ayrılmıştır (24).

Sarhadi ve arkadaşları (2012), tuz stresi altında pirinç anterlerinin proteomik analizini araştırmışlardır. Üreme aşamasında tuz toleransının moleküler mekanizmasını belirlemek için, tuz stresi altında birbirine zıt iki pirinç olan IR64 (tuza duyarlı) ve Cheriviruppu (tuza toleranslı)'nin anterlerinde proteomik modeller karşılaştırılmıştır. Kontrolde anter örnekleri toplanmıştır ve stres uygulanacak örnekler 100mM NaCl tuz stresi uygulanmıştır. Tuz stresi altındaki IR64 anterlerinde Na⁺/K⁺ oranı kontrol örneklerindeki anterlerden 1.7 kat daha büyük olduğu, ancak Cheriviruppu'da herhangi bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca IR64'te polen canlılığında %83 oranında azalma olduğu gözlemlenmiş iken, Cheriviruppu'da bu oranın %23 olduğu tespit edilmiştir. 2-DE üzerinde tekrarlanabilir 454 protein noktasının tespitinden 38 tanesinde, strese tepki olarak en az bir genotipte önemli değişiklikler göstermiştir. MALDI-TOF/TOF kütle spektrometresi kullanılarak, karbonhidrat/enerji metabolizması, protein sentezi gibi tuz stresine karşı bitki adaptasyonunu artıracak birçok süreçler de dahil 18 protein noktası tespit edilmiştir. Fruktokinaz-2'nin üç izomorfuna tuz stresi altında sadece Cheriviruppu'da ifadesi artmıştır. Sonuçlar anter ve polen duvar modeli/metabolizma proteinlerinin tuz stresine karşı pirincin toleransında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (25).

Wang ve arkadaşları (2012) soya fasulyesinin yüksek sıcaklık ve kuraklık stres koşulları altında hasat öncesi metabolizmasının ortaya çıkmasında karşılaştırmalı proteomik analizlerini araştırmışlardır. Soya fasulyesinin tohum gelişimi ve olgunlaşması sırasında yüksek sıcaklık ve kuraklık stresi, hasat öncesi tohumların bozulmasına neden olmaktadır. Fakat gelişmekte olan soya fasulyesinde, proteinleri ve ilgili yolları sistematik olarak nasıl bozduğu hala tam olarak anlaşılmamaktadır. Ortaya çıkarmak için, 2-DE ile bunlara karşılık gelen farklı HTH stres zaman noktalarında (24, 96 ve 168 saat), hasat öncesi tohum bozulmasına duyarlı soya fasulyesi çeşidi ile gelişmekte olan tohumun proteom bileşimi karşılaştırılmıştır. Farklı bir şekilde ifade edilmiş 42 protein noktası bulunmuştur ve 31 farklı protein türü başarılı bir şekilde MALDI-TOF kütle spektrometresi ile belirlenmiştir. Bu proteinler karbonhidrat metabolizması, sinyal transdüksiyonu, protein biyosentezi, fotosentez, protein katlanması, enerji yolu, hücrenin kurtarılması ve savunması, hücre döngüsü, azot metabolizması, lipit metabolizması, aminoasit metabolizması, transkripsiyon regülasyonu ve sekonder metabolit biyosentezini içeren 13 hücresel cevap ve metabolik süreçlere katılmaktadır. Bu proteinlerin fonksiyonlarına ve ilgili yollarına dayanarak, fizyolojik, kimyasal ve metabolik veriler, hasat öncesi tohumun bozulma mekanizmasını önermiştir. Böyle bir mekanizma, gelişmekte olan tohumlara HTH-stresi uygulandığında hücresel aktivitesinde meydana gelen olası yönetim stratejisini anlama olanağı sağlamaktadır (26).

Zheng ve arkadaşları (2012), düşük sıcaklık stresine bağlı olarak pamuğun lif uzaması sırasında protein ifadesindeki değişiklikleri araştırmışlardır. Düşük sıcaklık stresinde pamuğun lif uzamasının adaptasyon mekanizmasını araştırmak için, iki pamuk çeşidi olan Kemian 1 (düşük sıcaklığa toleranslı) ve Sumian 15 (düşük sıcaklığa duyarlı) ekilmiştir. Her iki pamuk çeşidi arasındaki temel farklılık, özellikle günlük minimum sıcaklıkta (MDT_{min}), sıcaklık olmuştur. Ekim günleri ertelendiğinde günlük

minimum sıcaklık 26.9°C'den (Kemian 1) 20.6°C'ye (Sumian 15) düşmüştür. Düşük sıcaklık stresi özellikle iki pamuk çeşidinde de lif uzamasını kısaltmıştır, fakat azalma derecesi Sumian 15'te Kemian 1'e göre daha fazladır. Üç gelişim aşamasının proteomik analizleri sonucunda 37 noktanın, düşük sıcaklık stresi altında değiştiğini göstermiştir ve bunlar kütle spektrometresi kullanılarak belirlenmiştir. Bu proteinler malat metabolizması, çözümlü şeker metabolizması, hücre duvarı gevşemesi, selüloz sentezi, sitoskeleton ve hücre duvarı gevşemesi, selüloz sentezi, sitoskeleton ve hücre duvarı gevşemesi, hücre duvar bileşenlerinin biyosentezi ve sitoskeleton homeostasisin düşük sıcaklık stresi uygulanan pamuk liflerinin toleransında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (27).

Rana ve Sreenivasulu (2013), *Aconitum heterophyllum*'da etanol kaynaklı tohum çimlenmesi sırasında protein değişikliklerini gözlemlemiştir. Saf peptitlerin kütle spektrometresi ile analizleri, AB SCIEX TOF/TOF-5800 sistemi (AB SCIEX, USA) kullanılarak uygulanmıştır. Bu çalışmada, tohumlar oda sıcaklığında (25°C, %60 bağıl nem) %10-12 nem seviyesine ulaşılmadan kurutulmuştur. Tohumların yaşayabilirlikleri, 25°C'de ISTA (Uluslararası Tohum Test Birliği)'yı takiben tetrazolium ile renklendirilerek test edilmiştir. Tohumlar hava geçirmez kaplarda farklı zaman dilimlerinde etanol (%99) ile muamele edilmiş ve daha sonra tohumlar bir gece boyunca etanol kalıntılarının buharlaşma olanağını sağlayan hava geçirmez kaplarda saklanmıştır. Keratin içerikli peptit öncül iyonları ve tripsin otoliz ürünleri, iyon büyük toleransı (0.5Da) dışında bırakılmıştır. Protein belirlemesi için, uygun MS ve MS/MS verisi Protein Pilot™ yazılımı v3.0 (Applied Biosystems, USA) üzerine yüklenmiş ve NCBI atıksız protein dizisi veri tabanı (NCBI-nr) ve SwissProt veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. Eşleşen peptit sayısı kapsamı yanı sıra, pI (Eş gerilim noktası) ve gözlemlenene en yakın büyüklük değeri kimliğini yayınlamak için göz önünde bulundurulmuştur. *Aconitum*'da tohum çimlenmesi %87 oranında etanol uygulaması ile başarılmıştır. Çimlenmenin ikinci fazında etanol uygulaması

yapılmış ve yapılmamış tohum protein profillerinin karşılaştırmalı 2-DE analizi, 40 tane farklı olarak ifade edilmiş proteini ortaya çıkarmıştır. 40 proteinin 27'si indüklenmiş, beş tanesi artmış ve sekiz tanesi baskılanmıştır. Kütle spektrometresi ve sonraki tanımlamalar bu proteinlerin metabolizma, DNA regülasyonu, stres toleransı ve plazma membran/hücre duvarı biyosentezi/uzaması süreçlerinde etkin rol oynadığını belirlemiştir. Bu protein değişiklikleri çimlenme yüzdesinin artışıyla sonuçlanan fizyolojik ve fiziksel değişimlerden sorumlu olabilmektedir (28).

Müller ve arkadaşları (2014), çevre sıcaklığı artmış bitki hücrelerinin tepkilerindeki erken sinyal adımları anlamak için, 2-DE yapmıştır. *Arabidopsis* fide mikrozomlarda proteinleri incelemek için kullanılmıştır. Isı muamelesi tespit edildikten sonra 5 dakika içinde değiştirilmiş bir sentezlenme seviyesi gösterilmiştir. Kütle spektrometresi kullanılarak 19 mikrozomal proteinden, anksin 1 (AtANN1) proteinin ısı-şok tedavisinden sonra hızla miktarının arttığı tespit edilmiştir. Fonksiyonel çalışmalar AtANN1 aşırı ifade eden bitkilerin bu tedaviye daha fazla direnç göstermiştir. AtANN1 ve yakın homolog AtANN2 için kayıp fonksiyon-mutantlar, tedavi-şok ısı daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Buna uygun olarak, ısı-şok proteinleri ve ısı-şok faktörleri ısı ile uyarılan ifadesi, ann1/ann2 çift mutant ve sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunda ısıyla harekete geçen artış önlenmiştir. Birlikte ele alındığında ise bu sonuçlar, AtANN1 [Ca²⁺] Cyt ısı ile uyarılan artışı düzenlenmesinde ve ısı stresine *Arabidopsis* fide yanıt olarak önemli olduğunu göstermiştir (29).

Hayvan Proteom Uygulamaları

Doğanay (2005), *Hydatidosis*'de konak hassasiyetinin belirlenmesini amaçlamıştır. Koyun ve eşek orijinli protoskoleks verilerek sekonder *hydatidosis* oluşturulan beyaz farelerden elde edilen kist sıvıları ile koyun ve eşeklerdeki primer kistlerden elde edilen kist sıvıları SDS-PAGE yöntemi ile antijenik fraksiyonlarına ayırma işleminden sonra,

Western blot tekniği kullanımı ile enfekte fare ve insan serumları kullanarak spesifik protein bantları tespit edilmiştir. Fare serumu kullanılarak saptanan spesifik bantlar; eşek primer kist sıvısında 116, 24, 18 ve 8 kDa, eşek orijinli fare kist sıvısında 116, 24 ve 8 kDa, koyun primer kist sıvısında 8 kDa, koyun orijinli fare kist sıvısında 8 kDa olarak saptanmıştır. İnsan serumu kullanılarak saptanan spesifik bantlar; eşek primer kist sıvısında 116, 98, 88, 56 ve 8 kDa, eşek orijinli fare kist sıvısında 116, 98, 88, 8 kDa, koyun primer kist sıvısında 56, 48 ve 24 kDa, koyun orijinli fare kist sıvısında 24 kDa olarak tespit edilmiştir (30).

Gülaçtı ve arkadaşları (2005), sığır vebasası virüsünün (RPV) hemaglutinin proteinine (H) karşı monoklonal antikor (MA)'ların üretimine ve bu antikorların karakterize edilmesini amaçlayan bir çalışma planlamışlardır. Gerçekleştirilen çalışmada, ilk olarak, RPV'nin aşı suşuyla immunize edilen farelerin dalak hücreleriyle myeloma hücreleri polietilen glikol-dimetil sülfoksit (PEG-DMSO) yardımıyla füzyon işlemi tamamlanmıştır. "Limiting dilüsyon" işlemi takiben gerçekleştirilen SDS-PAGE ve immun blotting ile H proteinine karşı antikor salgılayan klonlar çalışma sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca klonlara ait antikorların alt tipleri ve nötralizasyon etkileri gibi bazı özellikleri bu çalışma ile karakterize edilmiştir. Çalışma sonucunda, RPV virüsünün hemaglutinin proteinine karşı MA'ların üretilmesi ve bu antikorların karakterize edilmesi gerçekleştirilmiştir (31).

Koç ve arkadaşları (2013), Kars Çayı'ndan yakalanan Siraz balığı (*Capoeta capoeta*) ve Tatlısu kefali (*Squalius cephalus*) üzerine hegzavalent kromun Cr(VI) etkileri histopatolojik ve elektroforetik yöntemlerle araştırmayı amaçlamışlardır. Daha sonra, her bir balık türü için her grupta 10'ar adet olmak üzere üç grup oluşturulmuştur. Birinci gruptaki (kontrol) balıklar çeşme suyu içeren tankta, ikinci gruptaki balıklar 10 gün süreyle, üçüncü gruptaki balıklar ise 20 gün süreyle 10 mg/L dozunda Cr(VI) içeren tanklarda bekletilmiştir. Bu süre sonunda, balıklardan kan ve doku örnekleri alınmış ve analizleri

yapılmıştır. Histopatolojik inceleme sonucunda Cr(VI)'a maruz kalan *Capoeta capoeta* ve *Squalius cephalus*'ların karaciğer dokularında fokal nekroz alanları, hidropik ve vakuolar dejenerasyonlar belirlenmiştir. Bu dejenerasyonların şiddetinin Cr(VI) maruz kalma süresiyle artış gösterdiği tespit edilmiştir. Serum proteinlerinin SDS PAGE'inde ise 10 gün süreyle Cr(VI) uygulamasına maruz kalan *Capoeta capoeta*'nın bazı protein bantlarında hafif kalınlaşma olduğu, *Squalius cephalus*'un protein bantlarında ise belirgin bir değişikliğin şekillenmediği saptanmıştır. Hekzavalent kromun 20 gün süreyle uygulandığı *Capoeta capoeta*'nın birçok protein bantlarında incelemede, bazı protein bantlarında ise belirgin derecede kalınlaşmalar tespit edilmiştir. *Squalius cephalus*'da ise bazı protein bantlarında hafif derecede kalınlaşma meydana geldiği gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, potasyum dikromat uygulamasının zamana bağlı olarak artan derecelerde *Capoeta capoeta* ve *Squalius cephalus* karaciğer dokularında ve protein ekspresyonlarında bozulmalara neden olduğu gösterilmiştir (32).

Ünübol-Aypak ve Uysal (2014) tarafından koyun ve farelerde kist hidatik proteinlerinin, antijenik proteinler ve antijenik glikoproteinler yönünden karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla 20'şer adet enfekte ve 10'ar adet sağlıklı koyun ve fare kullanılmıştır. Hidatidozisli koyunlardan ve deneysel enfekte farelerden elde edilen kist sıvısı, kist membranı ve protoskolekslere ait proteinler SDS-PAGE yöntemi ile ayırt edilmiştir. Ayırt edilen proteinlerden hangilerinin hastalığa spesifik antijenler içerdiği immunblot tekniği ile tespit edilmiştir. Koyun kist sıvısı, membran ve protoskolekslerde 116 kDa ile 26 kDa arasında, fare kist sıvısı ve membranlarında 106 ile 30 kDa arasında değişik sayılarda antijenik bantlar gözlemlenmiştir. Koyun kist sıvısı ile fare kist sıvısı arasındaki ortak antijenik bantların 40 kDa ve 26 kDa, koyun kist membranı ile fare kist membranı arasındaki ortak antijenik bantların 48 kDa ve 40 kDa olduğu belirlenmiştir. Koyunlarda her üç kist materyalinde de (kist sıvısı, kist membranı, protoskoleks) 116 kDa,

68kDa, 48 kDa'luk proteinlerin, farelerde her iki kist materyalinde de (kist sıvısı, kist membranı) 106 kDa, 48, 40 kDa'luk proteinlerin ortak glikoproteinler olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlara göre; koyun ve farelerin kist materyalleri arasında yapılan karşılaştırmada ortak bantların, molekül büyüklüğü, glikoprotein varlığı ve şeker yapıları yönünden benzerlikler ve farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir (33).

SONUÇ

Günümüzde klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmayan proteomik çalışmalar ölçüm sistemlerindeki teknolojik ilerlemelere paralel olarak kullanılmaya başlamıştır. Proteomik çalışmalar doğrultusunda özellikle protein haritaları çıkarılmaktadır. Bu protein haritaları ile inceleme alanları arasındaki yapısal farklılıkların belirlenmesi ve bu farklılıklar arasındaki bağlantının açığa çıkarılması amaçlanmaktadır. Son yıllarda özellikle proteomik çalışmalar hastalıklar, enfeksiyonlar, toksik ajanlar

veya ilaç gibi etkiler sonucu oluşan proteinlerin seviyeleri ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi ve işlevlerinin aydınlatılmasını amaçlayan çalışmalarda bulunmaktadır.

Diğer taraftan proteom ile ilgili yapılan diğer çalışmalar farklı alanlarda da hızla ilerlemektedir. Özellikle; ekosistemde özellikle organik kirleticiler ve ağır metaller gibi diğer stres koşullarından birincil olarak etkilenen canlı grubu bakteri, liken, fungus ve bitki gibi organizmalardır. Bu biyolojik organizmalar biyotransformasyon ve biyobirikimde anahtar rolü oynamaktadır. Proteom analizi ile abiyotik veya biyotik stres yanıtın belirlenmesiyle ilgili çalışmalar henüz çok yeni olmakla birlikte bazı biyolojik organizmaların herhangi bir stres kaynağına maruz kalınca verdiği yanıtın ve savunma mekanizmalarında kullanılan proteinlerin araştırıldığı çalışmalar oldukça fazlaşmıştır. Özellikle ağır metal, tuzluluk, kuraklığa bağlı olarak proteomik değişiklikleri içeren proteom çalışmaları son yıllarda dikkat çeken araştırma alanlarından biri olmuştur.

TEŞEKKÜR

Finansal destek için TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu)'a teşekkür ederiz. (Proje No: 115Z041)

KAYNAKLAR

1. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by genome should be identified and how to do. *Biotechnol Gen Engin Rev*, 1995; 13: 19-50.
2. Wilkins MR, Gasteiger E, Gooley AA, Herbert BR, Molloy MP, Binz PA, et al. High through put mass spectro. *Anadolu Uni J Sci Technol*, 1999; 6 (2): 135.
3. Özcengiz G. Proteomik: Post-genomik dönemin en güçlü teknolojisi. *ODTÜ Haber*, 2007; 15: 13-9.
4. Tang P, Liu JK, Chou SM, Hor LI, Chen WJ, Ching-Chen S. A proteomic analysis of *Klebsiella oxytoca* after exposure to succinonitrile. *Process Biochem*, 2008; 43: 753-7.
5. Srivastava AK, Bhargava P, Thapar R, Rai LC. Salinity-induced physiological and proteomic changes in *Anabaena doliolum*. *Environ Experimen Bot*, 2008; 64: 49-57.
6. Tran NP, Park JK, Hong SJ, Lee CG. Proteomics of protein associated with astaxanthin accumulation in the green algae *Haematococcus lacustris* under the influence of sodium orthovanadate. *Biotechnol Lett*, 2009; 12: 1917-22.
7. Tran, NP., Park, JK., Lee, CG. Proteomics analysis of proteins in green alga *Haematococcus lacustris* (Chlorophyceae) expressed under combined stress of nitrogen starvation and high irradiance. *Enzyme Microb Technol*, 2009; 45: 241-6.
8. Rustichelli C, Visioli G, KosteckaD, Vurro E, Sanita di Toppi L, Marmioli N. Proteomic analysis in the lichen *Psysica adscendens* expose to cadmium stress. *Environ Pollut*, 2008; 156(3): 1121-7.
9. Zörb C, Yan F, Schubert S, Sümer A. Evidence of Na⁺ toxicity for the vegetative growth of maize (*Zea mays* L.) during the first phase of salt stress. *Appl Bot Food Qual*, 2004; 78: 135-9.
10. Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Kim PJ, et al. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere*, 2007a; 67: 1182-93.
11. Ahsan N, Lee SH, Lee DG, Lee H, Lee SW, Bahk JD, et al. Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. *Biologies*, 2007b; 330: 735-46.
12. Leea DG, Ahsana N, Leea SH, Leeb JJ, Bahka JD, Kanga KY, et al. Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. *Plant Physiol*, 2009; 166: 1-11.
13. Natarajan SS, Xu C, Cregan P, Caperna TJ, Garrett MW, Devanand L. Utility of proteomics techniques for assessing protein expression. *Regulat Toxicol Pharmacol*, 2009; 54: 32-6.
14. Toorchi M, Yukawa K, Nouri MZ, Komatsu S. Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. *Peptides*, 2009; 30: 2108-17.
15. Zhang J, Ma H, Chen S, Ji M, Perl A, Kovacs L, et al. Stress response proteins 'differential expression in embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon -A proteomic approach. *Plant Sci*, 2009; 2: 103-13.
16. Ahsan N, Lee DG, Kim KH, Alam I, Lee SH, Lee KW, et al. Analysis of arsenic stress induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere*, 2010; 78: 224-31.
17. Lee K, Bae DW, Kim SH, Han HJ, Liu X, Park HJ, et al. Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. *Plant Physiol*, 2010; 167: 161-8.
18. Monagasa M, Quintanilla-López JE, Gómez-Cordovésa C, Bartoloméa B, Lebrón-Aguilarc R. MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *Pharmac Biomed Anal*, 2010; 51: 358-72.
19. Wen FP, Zhang ZH, Bai T, Xu Q, Pan YH. Proteomics reveals th effecets of giberellic acid (GA3) on salt-stressed rice (*Oryza sativa* L.) shoots. *Pl Sci*, 2010; 2: 170-5.
20. Fana W, Cuia W, Lia X, Chena S, Liua G, Shena S. Proteomics analysis of rice seedling responses to ovine saliva. *Pl Physiol*, 2011; 168: 500-9.

21. Hwang H, Cho MH, Hahn BS, Lim H, Kwon YK, Hahn TR, et al. Proteomic identification of rhythmic proteins in rice seedlings. *Biochim Biophysica Acta*, 2011; 1814: 470-9.
22. Zhao L, Sun YL, Cui SX, Chen M, Yang HM, Liu HM, et al. Cd-induced changes in leaf proteome of the hyper accumulator plant *Phytolacca americana*. *Chemosphere*, 2011; 1: 56-66.
23. Li J, Sun J, Yang Y, Guo S, Glick BR. Identification of hypoxic-responsive proteins in cucumber roots using a proteomic Approach *Pl Physiol Biochem*, 2012; 51: 74-80.
24. Ngara R, Ndimbab R, Borch-Jensenc J, Jensenc ON, Ndimbaa O. Identification and profiling of salinity stress-responsive proteins in *Sorghum bicolor* seedlings. *Proteom*, 2012; 75 (13): 4139-50.
25. Sarhadi E, Bazargani MM, Sajise AG, Abdolahi S, Vispo NA, Arceta M, et al. Proteomic analysis of rice anthers under salt stres. *Pl Physiol Biochem*, 2012; 58: 280-7.
26. Wang L, Ma H, Song L, Shu Y, Gu W. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stres. *Proteom*, 2012; 7: 2109-27.
27. Zheng M, Wang Y, Liu K, Shu H, Zhou Z. Protein expression changes during cotton fiber elongation in response to low temperature stres. *Pl Physiol*, 2012; 4: 399-409.
28. Rana B, Sreenivasulu Y. Protein changes during ethanol induced seed germination in *Aconitum heterophyllum*. *Pl Sci*, 2013; 198: 27-38.
29. Müller A, Langklotz S, Lupilova N, Kuhlmann K, Bandow JE, Leichert LI. Activation of Rida chaperone function by N-chlorination. *Nature Commun*, 2014; 17(5): 5804.
30. Doğanay A. Hydatidosisin Serodiagnozunda Kist Sıvısı Antijenlerinin SDS-PAGE ve Western Blotting Yöntemleri İle Karşılaştırmalı Analizi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje no: 08-10-059. 2005.
31. Gülaçtı İ, Bulut H, Bolat Y. Sığır vebası virüsünün hemaglutinin proteinine karşı monoklonal antikorun üretimi ve karakterizasyonu. *Fırat Üniv Sağ Bilim Vet Derg*, 2005; 19(1): 1-5.
32. Koç E, Yılmaz M, Ersan Y, Alaş A. Hekzavalent Kromun *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773) ve *Squalius cephalus* (Linnaeus 1758) üzerine olan etkisinin histopatolojik ve elektroforetik yöntemlerle saptanması. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 2013; 19 (6): 979-84.
33. Ünübol-Aypak S, Uysal H. Koyun ve farelerde kist hidatik proteinlerinin karşılaştırmalı analizi ve antijenik proteinlerde glikoprotein varlığının değerlendirilmesi. *Ank Üniv Vet Fak Derg*, 2014; 61: 243-8.