



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FORMALİNLE FİKSE EDİLMİŞ VE PARAFİNE GÖMÜLMÜŞ
MİDE BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDE MALDI-GÖRÜNTÜLEME
YÖNTEMİ OPTİMİZASYONU**

BÜŞRA ERGÜN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Furtun Uçal

İSTANBUL-2021



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FORMALİNLE FİKSE EDİLMİŞ VE PARAFİNE GÖMÜLMÜŞ
MİDE BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDE MALDI-GÖRÜNTÜLEME
YÖNTEMİ OPTİMİZASYONU**

BÜŞRA ERGÜN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Furtun Uçal

İSTANBUL-2021

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

15.12.2021

Büşra ERGÜN

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bilimsel literatür içerisinde formalinle fikse edilip parafine gömülmüş mide dokularının MALDI-Kütle spektrometresi görüntüleme yöntemi analizi ile peptit profillerinin incelendiği çalışmalar limitli olduğundan ve optimize edilmiş protokollerin olmaması nedeni ile optimizasyon çalışmalarının yapılması önem arz etmektedir. Bu nedenle ileri proteomik teknikleri kullandığımız bu çalışmada formalinle fikse edilip parafine gömülmüş mide biyopsi örnekleri ile MALDI Görüntüleme yöntemi optimizasyon çalışmasının yapılması amaçlanmış ve literatüre katkı sağlaması hedeflenmiştir.

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi'ndeki lisansüstü eğitimime Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans programında başladığım ilk günden beri kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile, çalışma disiplini ile, bana yol gösteren, tezimin planlanması ve her türlü deneysel aşama ve teorik kısımda bana sevgi ile destek olan, birlikte çalışmaktan her gün gurur duyduğum değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yasemin UÇAL'a,

Lisansüstü eğitimimin ilk gününden itibaren, tecrübeleri ve bilgi birikimleri ile deneysel aşamalarda bize yol gösterici olan, öğrenim sürecim boyunca ilgi ile her türlü desteğini hiç esirgemeyen çok kıymetli hocam Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR'a,

Deneyler ve analizler için sonsuz bilgi birikimi ile bana destek olan Emel AKGÜN ile laboratuvar imkanlarını kullanmama izin veren Prof. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL'a,

Lisansüstü eğitimimde büyük emeği geçen Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Programı'nın değerli öğretim üyelerine,

Bu tez çalışmasında kullanılan örnekler de dahil olmak üzere kıymetli biyopsi örneklerinin toplanmasında destek olan Prof. Dr. Ümit İnce ve Acıbadem Maslak Hastanesi ekibine,

Bugüne kadar maddi ve manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen, varlıklarını en içten hissettiğim sevgili annem Yasemin ERGÜN, sevgili babam Aydın ERGÜN ve küçük kardeşim Selim ERGÜN'e gönülden teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TUBİTAK tarafından desteklenen ve yürütücülüğünü Dr. Öğr. Üyesi Sinem Öktem Okullu'nun yaptığı 119S169 numaralı (TUBİTAK 1001 Projesi) “Dış zar İnflamatuvar Protein A (OipA)’nın açık ve kapalı olduğu *H.pylori* suşları ile enfekte mide organoid modelindeki protein profillerinin belirlenmesi ve bu profillerin OipA’nın açık ve kapalı olduğu suşlar ile enfekte hasta mide dokularında MALDI Görüntüleme yöntemi ile elde edilecek protein profilleri ile karşılaştırılması” başlıklı proje kapsamında yapılmıştır. TUBİTAK’a projeye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
TABLolar LİSTESİ	xv
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Tarihçe.....	6
2.2 Mide ile İlgili Genel Bilgiler.....	7
2.3 Mide ile İlgili Hastalıklar	8
2.3.1 Mide kanseri.....	8
2.3.2 Ülser	10
2.3.3 Gastrit.....	11
2.4 Formalinle Fikse Edilmiş ve Parafine Gömülmüş (FFPE) Dokular	12
2.4.1 Formaldehit ve kullanım alanı	13
2.4.2 Formaldehit'in proteinler üzerindeki etkisi.....	14
2.5 Proteomik Teknikler	15
2.5.1 Proteomik çalışmalarda kütle spektrometresi	15
2.5.1.1 Kütle spektrometresi ile protein tanımlaması.....	17

2.5.1.2	Yukarıdan aşağıya (top-down) proteomik	18
2.5.1.3	Aşağıdan yukarıya (bottom-up) proteomik	18
2.5.2	Jel bazlı proteomik teknikler	19
2.5.2.1	İki boyutlu jel elektroforezi (2D-GE).....	19
2.5.2.2	İki boyutlu diferansiyel jel elektroforezi (2D-DIGE)	20
2.5.3	Jel içermeyen proteomik teknikler	21
2.5.3.1	LC-MS/MS	21
2.5.3.2	Peptit dizileme ve de novo dizileme.....	22
2.5.4	MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi	23
2.5.4.1	Tarihçesi	23
2.5.4.2	Prensibi.....	23
2.5.5	MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi çalışmaları	25
3	GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1	Çalışma Dizaynı.....	26
3.2	Gereçler	26
3.3	Yöntem.....	30
3.3.1	Antijen geri kazanımı.....	30
3.3.2	İmmünohistokimya.....	32
3.3.3	Peptit konsantrasyonu tayini.....	34
3.3.4	LC-MS/MS ile protein tanımlaması.....	35
3.3.5	MALDI-TOF analizi.....	36
3.3.6	MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi analizi.....	37
4	BULGULAR	40
4.1	Antijen Geri Kazanımı Optimizasyonu	40
4.1.1	Örneklere ait uygun antijen geri kazanımı tamponlarının belirlenmesi	40
4.1.2	Antijen geri kazanımı tamponuna geçen proteinlerin tespiti.....	42
4.1.3	İmmünohistokimya analizi	45
4.2	Tripsin Miktarı Optimizasyonu	47
4.2.1	Peptit konsantrasyonlarının belirlenmesi	47

4.2.2	LC-MS/MS yöntemi ile peptit tanımlaması	50
4.3	MALDI-Matriks Konsantrasyonu Optimizasyonu	55
4.3.1	Kristal yapı ve boyutlarının incelenmesi	55
4.3.2	Farklı matriks konsantrasyonlarının peptit profillerine etkisi	56
4.4	FFPE Mide Biyopsi Örneklerinin LC-MS/MS ile Peptit Profillerinin Belirlenmesi.....	58
4.5	FFPE Mide Biyopsi Örneklerinin MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi Yöntemi ile Analizi	59
4.5.1	Doku kesit kalınlığı optimizasyonu	59
4.5.2	Farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltileri ile MALDI-Görüntüleme analizi	62
4.5.3	Farklı enzim konsantrasyonları ile MALDI-Görüntüleme analizi.....	65
5	TARTIŞMA.....	69
6	SONUÇ	78
7	KAYNAKLAR.....	79
8	EKLER	85
	EK 1 Etik Kurul Onayı	85
	EK 2 Farklı Konsantrasyon ve Kompozisyonlarda Hazırlanan 30 Farklı α -CHCA Matriksin Analizinden Elde Edilen Spektrumlar.....	87
9	ÖZGEÇMİŞ	90

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

A-CHCA	Alfa-siyanohidroksisünamik asit
ACN	Asetonitril
BSA	Bovın serum albumin
Da	Dalton
DIGE	İki Boyutlu Diferansiyel Jel Elektroföresi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTT	Ditiyotretol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ESI	Elektrosprey iyonizasyonu
EtOH	Etanol
FA	Formik asit
FASP	Filtre destekli örnek hazırlama
FDH	Formaldehit dehidrogenaz
FFPE	Formalinle sabitlenmiş parafine gömülmüş
FTICR	Fourier dönüşümsel iyon siklotron rezonans
GC	Gaz kromatografisi
GE	Gastroözofageal
HIAR	Isı ile indüklenen antijen geri kazanımı
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
H. Pylori	Helikobakter Pylori
H&E	Hematoksilen ve eosin
HCl	Hidroklorik asit
IAA	İyodoasetamid
IEF	İzoelektrik fokuslama
IT	İyon tuzağı
ITO	İndiyum kalay oksit
kDa	Kilodalton
LADG	Laparoskopi destekli distal gastrektomi
LC-MS	Likit kromatografisi-kütle spektrometresi
MALDI	Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon

MS	Kütle spektrometresi
MS/MS	Ardışık kütle spektrometresi
m/z	Kütle/yük
PIC	Proteaz inhibitör kokteyl
PMF	Peptit kütle parmak izi
PFF	Peptit fragment parmak izi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
TFA	Trifluoroasetik asit
2D-GE	İki boyutlu jel elektroforezi
2D-DIGE	İki boyutlu diferansiyel jel elektroforezi
2D-PAGE	İki boyutlu poliakrilamit jel elektroforezi
TBS	Tris-buffered saline
Tris	Hidroksimetil aminometan
TOF	Uçuş zamanlı
Q	Kuadropol

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1 Mide Topografisi (21)	7
Resim 2 Mide Kanseri için koruyucu faktörler ve risk faktörleri (29)	9
Resim 3 Kütle spektrometresinde bulunan temel bileşenler.....	16
Resim 4 2D-GE yönteminde proteinlerin iki boyutlu ayırımı	20



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1 Endoskopik mide biyopsilerinin antrum örneklerinin H&E boyaması sonrasında elde edilen dijital görüntüler26
- Şekil 2 ITO kaplı lam üzerine alınmış sırasıyla 5 mikron ve 3 mikron olmak üzere iki farklı kalınlıktaki dokunun optik görüntüsü38
- Şekil 3 BSA standartlarının konsantrasyonlarına karşı absorbands değerleri kullanılarak çizilen grafik ile hesaplanan eğri denklemi ve R^2 değeri.....41
- Şekil 4 Dört farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltisi sonucunda elde edilen protein konsantrasyonlarının karşılaştırılması41
- Şekil 5 10 mM Sitrat (pH 6) antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile muamele edilmiş örneklerin LC-MS/MS analizi ile belirlenen farklı m/z değerlerine sahip çeşitli peptitlerin kromatogram görüntüsü42
- Şekil 6 Antijen geri kazanımı tamponunda tespit edilen proteinlerin; protein sınıflandırması(A) ve moleküler fonksiyonları(B) gösteren pasta grafik dağılımı.....44
- Şekil 7 Dört farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltisinin α -SMA antikor ile immünohistokimya analiz görüntüleri (0.2x objektif büyütme ile).....45
- Şekil 8 Dört farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltisinin α -SMA antikor ile immünohistokimya analizi görüntüleri (1.5x objektif büyütme ile 5.dokuya aittir) ..46
- Şekil 9 Dört farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltisinin α -SMA antikor ile immünohistokimya analizi görüntüleri (6.9x objektif büyütme ile 5.dokuya aittir) ..46
- Şekil 10 BSA standartlarının konsantrasyonlarına karşı absorbands değerleri kullanılarak çizilen grafik ile hesaplanan eğri denklemi ve R^2 değeri48
- Şekil 11 Dört farklı enzim konsantrasyonu sonucunda elde edilen peptit konsantrasyonlarının karşılaştırılması48
- Şekil 12 75 ng/ μ l + %10 ACN ve 75 ng/ μ l enzim konsantrasyonu sonucunda elde edilen peptit konsantrasyonlarının karşılaştırılması (A, 1.gün ve B, 2.gün yapılan deney sonucunu göstermektedir)49
- Şekil 13 75 ng/ μ l + %10 ACN ve 75 ng/ μ l enzim konsantrasyonu sonucunda pozitif kontrol olarak kullanılan BSA proteininden elde edilen peptit konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....49

Şekil 14 Farklı konsantrasyonlarda tripsin enzimi uygulanan örneklerin LC-MS/MS analizi ile belirlenen farklı m/z değerlerine sahip çeşitli peptitlerin kromatogram görüntüleri.....	50
Şekil 15 LC-MS/MS analizi sonucunda tespit edilen tüm proteinlerin; protein sınıflandırması(A) ve moleküler fonksiyonları(B) gösteren pasta grafik dağılımı.....	51
Şekil 16 25 ng/µl, 50 ng/µl, 75 ng/µl ve 100 ng/µl olmak üzere dört farklı tripsin konsantrasyonuna ait LC-MS/MS analizi sonucunda tespit edilen proteinlerin venn diyagramı	52
Şekil 17 25 ng/µl ve 25 ng/µl + %10 ACN tripsin konsantrasyonlarına ait LC-MS/MS analizi sonucunda tespit edilen proteinlerin venn diyagramı.....	52
Şekil 18 75 ng/µl ve 75 ng/µl + %10 ACN tripsin konsantrasyonlarına ait LC-MS/MS analizi sonucunda tespit edilen proteinlerin venn diyagramı.....	53
Şekil 19 LC-MS/MS analizi sonucunda dört grup arasında tespit edilen ortak proteinlerin; protein sınıflandırması(A) ve moleküler fonksiyonları(B) gösteren pasta grafik dağılımı	54
Şekil 20 5 mg/ml α-CHCA matriks konsantrasyonuna ait matriks kristallerinin yapı ve boyutları.....	55
Şekil 21 7 mg/ml α-CHCA matriks konsantrasyonuna ait matriks kristallerinin yapı ve boyutları.....	55
Şekil 22 Hazırlanan 30 farklı α-CHCA matriks konsantrasyonu ve kompozisyonlarının içeriği	56
Şekil 23 Farklı matriks konsantrasyonlarından elde edilen spektrumların karşılaştırılması.....	56
Şekil 24 1479.7 m/z değerinde farklı matriks konsantrasyonlarında sinyal yoğunluğunun değişimi	57
Şekil 25 1479.7 ve 1567.7 m/z değerlerinde farklı matriks konsantrasyonlarındaki sinyal yoğunluğunun değişimi.....	57
Şekil 26 5 mg/ml ve 7 mg/ml α-CHCA matriks konsantrasyonlarında değişen ACN ve TFA konsantrasyonlarındaki sinyal yoğunluğunun değişimi	58
Şekil 27 Mide biyopsi örneklerinin LC-MS/MS analizi ile belirlenen farklı m/z değerlerine sahip çeşitli peptitlerin kromatogram görüntüsü	59
Şekil 28 İki farklı kalınlıktaki kesitlerde olan FFPE dokularının ortalama peptit piklerinin sayısı (standart sapma, sinyal yoğunluklarına göre hesaplanmıştır).....	60

Şekil 29 Matriks ve dokuya ait m/z değerlerinin hiyerarşik kümeleme analizi.....	60
Şekil 30 Sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptide ait doku görüntüleri	61
Şekil 31 10 mM Sitrat (pH 6) ve 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltileri ile yapılan antijen geri kazanımlarına ait spektrumlar.....	62
Şekil 32. 10 mM Sitrat (pH 6) ve 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltileri ile yapılan antijen geri kazanımlarına ait ortalama peptit piki sayılarına ait histogramlar.....	63
Şekil 33 10 mM Sitrat (pH 6) tampon çözeltisine ait sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptide ait doku görüntüleri.....	63
Şekil 34 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltisine ait sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptide ait doku görüntüleri.....	64
Şekil 35. 75 ng/µl + %10 ACN ve 100 ng/µl + %10 ACN konsantrasyonlarına ait spektrumlar	66
Şekil 36. 75 ng/µl + %10 ACN ve 100 ng/µl + %10 ACN konsantrasyonlarına ait ortalama peptit piki sayılarına ait histogramlar	66
Şekil 37. 75 ng/µl + %10 ACN enzim konsantrasyonuna ait sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptide ait doku görüntüleri.....	67
Şekil 38. 100 ng/µl + %10 ACN enzim konsantrasyonuna ait sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptide ait doku görüntüleri.....	67

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1 Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri .27	27
Tablo 2 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındıkları firmalar28	28
Tablo 3 10 mM Sitrat (pH 6) antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile muamele edilmiş örneklerin LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinler.....43	43
Tablo 4 MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin listesi 61	61
Tablo 5 Sitrat antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile yapılan MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin listesi64	64
Tablo 6 Tris-HCl antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile yapılan MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin listesi.....65	65
Tablo 7 75 ng/µl + %10 ACN enzim konsantrasyonu uygulanan MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin listesi68	68
Tablo 8 100 ng/µl + %10 ACN enzim konsantrasyonu uygulanan MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin listesi68	68

ÖZET

Formalinle Fikse Edilmiş ve Parafine Gömülmüş Mide Biyopsi Örneklerinde MALDI-Görüntüleme Yöntemi Optimizasyonu

Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) görüntüleme kütle spektrometresi (MSI) yöntemi, kütle spektrometresinden elde edilen yüksek çözünürlük ve doğruluğu histolojik bilgilerle birleştirerek analitlerin doku üzerindeki uzamsal dağılımını belirler. Son yıllarda kullanımı hızla artan MALDI-MSI yöntemi için laboratuvarlar arasında standart operasyon prosedürleri açısından farklılık olması yöntemin kliniğe adaptasyonunda zorluklara neden olmaktadır. Bununla birlikte formalinle fikse edilip parafine gömülmüş (FFPE) doku biyopsilerinin örnek miktarındaki yetersizlik, özellikle MALDI-MSI tabanlı proteomik çalışmalar için farklı optimizasyon yaklaşımlarını ortaya çıkarmaktadır. Tez çalışmasında, biyopsi örneklerinin hem az miktarda doku içermesi ve hem de literatürde optimize edilmiş protokollerin yer almaması sebebi ile FFPE mide biyopsi örnekleri kullanılarak MALDI-MSI yöntemi için uygun parametrelerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda dokulara uygulanacak tripsin ve matriks konsantrasyonu, yıkama koşulları, kesit kalınlığı ve antijen geri kazanım basamakları ayrı aşamalarda optimize edilmiştir. Tez çalışması sonucunda, optimize edilmiş parametrelerle MALDI-MSI yöntemi kullanılarak farklı antijen geri kazanım tampon çözeltileri ve farklı enzim konsantrasyonları karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Ek olarak, bu analizlerin m/z değerlerine karşılık gelen protein tanımlamaları LC-MS/MS yöntemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, FFPE mide biyopsi örneklerinde çok sayıda ortak protein bulunmuştur. Tanımlanan proteinler arasında aktin iskelet proteinleri, protein katlanması ve stabilizasyonunda yer alan şaperon proteinleri ve hücrel metabolik süreçlerde yer alan proteinlerin önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: FFPE, Biyopsi, Proteomik, MALDI-Görüntüleme, Optimizasyon

ABSTRACT

MALDI-Imaging Method Optimization in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Gastric Biopsy Tissues

Matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry imaging (MSI) combines the high resolution and high mass accuracy obtained from mass spectrometry with histological information to determine the spatial distribution of tissue analytes. The differences in MALDI-MSI standard operating procedures between laboratories, which has been rapidly used in recent years, causes difficulties in the clinical adaptation of the method. However, the insufficient sample size of formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue biopsies reveals different optimization approaches, especially for MALDI-MSI-based proteomic studies. In this study, we aimed to determine the appropriate sample preparation parameters for MALDI-MSI optimization by focusing on FFPE gastric biopsy samples due to the insufficient sample size and lack of information in the literature. For this purpose, trypsin, and matrix concentration to be applied to the tissues, washing conditions, section thickness, and antigen retrieval steps were optimized in separate stages. As a result of the study, different antigen retrieval buffer solutions and different enzyme concentrations were compared and analyzed using the MALDI-MSI method with optimized parameters. In addition, protein identifications corresponding to the m/z values of these analytes were evaluated by LC-MS/MS method. According to the results obtained, numerous common proteins were found in FFPE gastric biopsy samples. Among the identified proteins, actin skeleton proteins, chaperone proteins involved in protein folding and stabilization, and proteins involved in cellular metabolic processes have been shown to play important roles.

Keywords: FFPE, Biopsy, Proteomics, MALDI-Mass spectrometry imaging, Optimization

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Formalinle fikse edilip parafine gömülmüş (FFPE) örneklerinin tarihsel geçmişi 1893 yılına kadar uzanmaktadır. Farklı amaçlar doğrultusunda arşivlenen insan doku örneklerinin çoğu, yıllar içerisinde halen stabil olduğu kanıtlanan ve genellikle histoloji, tanı, tedavi geçmişi ile klinik verilerle ilişkilendirilen FFPE bloklardır (1). Taze dondurulmuş doku örnekleri için ise, FFPE dokulara kıyasla bu tür kapsamlı veriler daha az bulunmaktadır ve taze dondurulmuş dokular için moleküler stabilite ile ilgili endişeler mevcuttur (2,3).

FFPE dokular formalin ile fiksasyon aşamasında dokular metilol eklentileri ve metilen köprülerine bağlı olarak oluşan çapraz bağlanma ile sabitlenir. Bu nedenle sabitlenmiş dokular bozulma endişesi olmadan uzun yıllar sabit kalabilmektedir (4). Bu doku türü bu sebep ile hasta verileri ile de ilişkili olarak retrospektif araştırmalara olanak tanıdıklarından paha biçilemez bir kaynaktır (5). Literatürde de FFPE dokular ile genomik, transkriptomik, proteomik teknikler kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalar mevcuttur (6–13).

FFPE örnekleri dünya çapında DNA, RNA, protein ölçümleri için yaygın olarak kullanılmakta olup bu ölçümleri etkileyen preanalitik faktörler tanımlanmıştır (14). Bu tür doku örneklerinin hazırlanması esnasında dokular çeşitli kimyasal ajanlara maruz kalmaktadır. Örneğin, fiksasyon esnasında kullanılan formalin, peptitler ve proteinler ile reaksiyona girer ve lizin, arjinin ve sistein tiyol kalıntıları üzerinde metilol oluşumunu indükler. Bu protein çapraz bağlanma reaksiyonu sonucunda oluşan metilen köprüleri, proteinlerin başlangıç konformasyonlarını büyük ölçüde değiştirir ve bazı epitoplara maskeleyebilir (1).

Ancak antijen geri kazanımı yaklaşımları sayesinde metilen çapraz bağlarının hidrolizi gerçekleşmekte ve epitoplara maskesini kaldırılabilir (1,4). Antikorların kullanılarak FFPE dokularına ait proteinlerin analizi çalışmaları, ısı ile indüklenen antijen geri kazanımı (HIAR) tekniğinin geliştirilmesi ile 1991 yılında başlamıştır (15).

HIAR tekniği, ısı yardımıyla metilen çapraz bağlarının hidrolizi ile epitoplarnn maskesini kaldırabileceği ve byylelikle immnoreaktiviteyi artırabileceği fikrine dayanmaktadır. Ancak tüm bu gelişmelerin yanı sıra FFPE örneklerine ait formalin kaynaklı kimyasal modifikasyonlar nedeniyle protein kalitesinde taze dondurulmuş doku örneklerine göre daha fazla varyasyon barındırabileceği kaygıları halen devam etmektedir (1,16).

İleri proteomik tekniklerden MALDI-Görüntüleme Ktle Spektrometresi, dokular üzerinde protein analizleri için bir teknik olarak 1997 yılında uygulanmaya başlanmıştır (17). Bu teknik, moleküllerin bir lazer ile ışınlandığında iyon oluşturma yeteneğine dayanmaktadır. Temel prensip olarak, matriks lazer enerjisini absorbe ederek analitleri gaz faza aktarmaktadır. Tüm bu süreç iyonlaşmayı indükleyerek iyonlaşan analitlerin dedektör tarafından tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Dokuya ait tüm kesitin bu Şekilde tarandığı düşünülürse, elde edilen spektrum ile tüm dokuya ait ktle spektrometresi verilerinin histoloji korelasyon ile tespiti sağlanmaktadır. Bu sayede, yüksek znrlkl ktle spektrometresi verileri ile dokuya ait histolojik veri arasında köprü kuran MALDI-Görüntüleme Ktle Spektrometresi proteinlerin, peptitlerin, lipidlerin ve metabolitlerin dokulardaki dağılımlarını yüksek uzamsal znrlkle tanımlamaktadır (17).

MALDI-Görüntüleme Ktle Spektrometresi'nin en önemli avantajlarından biri ise, uzun örnek hazırlığına gerek kalmadan doku örneklerini doğrudan analiz etme konusunda yüksek kapasiteli olmasıdır. Son on yılda, MALDI-Görüntüleme Ktle Spektrometresi hızla gelişerek dünya çapında bilim insanları tarafından hem tıbbi hem de temel araştırmalarda başarıyla kullanılmaktadır. Başta kanser olmak üzere bir çok hastalığın araştırılmasında kullanılan MALDI-Görüntüleme Ktle Spektrometresi'nin klinik uygulamaları mevcuttur (18). Yöntemin klinik adaptasyonunun yüksek olmasına rağmen, MALDI-Görüntüleme Ktle Spektrometresi uygulamasındaki önemli noktalardan biri de, örnek hazırlığı için genel protokollerin yeterli olmaması ve uygun optimizasyon çalışmaları yapılmadan tekrarlanabilir sonuçların elde edilememesidir (19,20).

FFPE dokular ile MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi uygulamalarında başarılı sonuç elde etmek büyük ölçüde örnek hazırlama basamaklarında yapılan optimizasyon çalışmalarına bağlıdır. Bilimsel literatür içerisinde FFPE mide biyopsi dokuları kullanılarak yapılan MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi analizi ile elde edilen peptit profillerinin incelenmesinde optimize edilmiş bir protokol olmaması ve kullanılacak örneklerin biyopsi materyalleri olduğundan çok az miktarda örnek barındırması ve farklı optimizasyon yaklaşımlarının uygulanmasını gerektirmesi nedeni ile bu çalışmada, formalinle fikse edilip parafine gömülmüş mide biyopsi örnekleri ile MALDI Görüntüleme yöntemi optimizasyon çalışmasının yapılması amaçlanmıştır.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

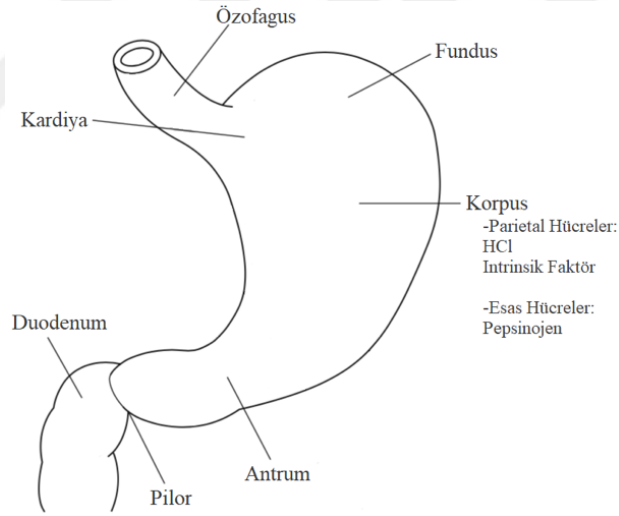
İç organlar arasında mide, anatomistler, doktorlar tarafından tanımlanmış ve fizyologlar, kimyagerler tarafından işlevi incelenmiş ilk organlar arasındadır. Eski mısırlılar midenin tüm anatomisini ve hassasiyetini tanımlayarak, bu organı cenaze törenleri sırasında “canopic jars” adı verilen kavanozlarda korumuşlardır. Tıbbın babası olarak anılan İyon hekim Hipokrat ise, midenin ısısının yiyeceklerin parçalanmasından sorumlu olduğunu öne sürerek sindirimi “pepsis” olarak tanımlamıştır. Gastrik yapı ve fonksiyonun bilimsel dayanağı Andreas Vesalius’un insan mide ve bağırsaklarının anatomik olarak doğru tanımladığı 1547 yıllarına dayanmaktadır (21).

Gastrik dokulara uygulanan endoskopinin tarihi Hipokrat’a kadar dayanmaktadır. Endoskopinin tarihçesinde Hipokrat, muayene esnasında rektal spekulum kullandığını belirtmiştir. Modern endoskopi ise Frankfurt’ta 1805 yılında Bozzini tarafından geliştirilen yansıtıcı ayna, çift lümenli ventral kanül ve mumdan oluşan, Bozzini’nin “Lichtleiter” adını verdiği aletin kullanılması ile başlamıştır. Endoskopik yöntem ile, bu alet kullanılarak mesane taşları ve neoplazmlar indirekt olarak görülebilmıştır. 1843 yılında Avery İngiltere’de vokal kordları, özofagus, mesane ve üretrayı incelemek için çeşitli aletler kullanmıştır. Dosormeaux ise 1865 yılında, karosen bir lamba, bir baca deliği ve bir aynadan oluşan çok amaçlı bir endoskop oluşturmuştur ve bu alet yardımı ile mesane, uterus ve serviksi incelemiştir. Kelling ve Resenheim 1879 yılında klinikte iç organların muayenesi için bükülebilir endoskop oluşturduklarını belirtmişlerdir. Günümüzde kullanılan bu bükülebilir endoskopların 1932 yılında kullanıma girmesi ve endoskopi uygulamaları yaygınlaşana kadar Nitze, Mikülicz, Elsner ve Schindler’in bu alanda önemli katkıları olmuştur. 1932 yılında Wolf ve Schindler, bu aletin gelişmesine katkı sağlayarak optik ekseni de bükülebilen gastroskopi geliştirmişlerdir. Ancak geliştirilen bu alet sayesinde, midenin büyük bir kısmının endoskopik muayenesi mümkün olmuştur. Endoskopi alanındaki bu çalışmalarından dolayı, Rudolf Schindler gastrointestinal endoskopinin babası olarak kabul edilmektedir (22).

Hastanelerde teşhis amacıyla arşivlenen insan doku örneklerinden FFPE doku örneklerinin de tarihsel geçmişinin 1893 yılına dayandığı Zhu ve arkadaşları tarafından 2019 yılında bildirilmiştir (1).

2.2 Mide ile İlgili Genel Bilgiler

Mide, yetişkinlerde 1000-1500 ml kapasiteli olan sindirim tüpünün en genişlemiş kısmı olup özofagusun sonu ile duodenum arasında bulunur ve ince bağırsağın başlangıcını oluşturur. Midenin temel işlevi, yiyeceği asit, mukus ve pepsin ile karıştırmak ve sonuç olarak salınan kimus'un absorpsiyon işlemi için kontrollü bir şekilde duodenuma serbest bırakmaktır. Midenin diğer fonksiyonları arasında, B12 vitamininin absorpsiyonu için gerekli olan intrinsik faktörlerin salgılanması yer alır (23). Topografik olarak mide, kardiya ve gastroözofageal (GE) kavşağı, fundus, korpus, antrum ve pilor olmak üzere beş bölgeden oluşur (Resim 1) (21).



Resim 1 Mide Topografisi (21)

Kuvvetli kas yapısında olup depolama görevi gören fundus ve korpus, yapısında asit salgılayan bezleri içerirken, besin iletiminde görev alan antrum alkali salgılayan yüzey epitelyumu, endokrin ve gastrin salgılayan G hücrelerini içerir. HCl, pepsinojenin aktivasyonu için gerekli iken pepsinojen, proteinlerin sindirimde görev alır. Intrinsik faktörler ise ileumdan B12 emilimini sağlar.

Cerrahi bir laparotomi işlemi esnasında bir laparoskop yardımı ile midenin yapısı incelendiğinde GE kavşağı, düz özofagus tüpü ve fundusun yuvarlak yapısı arasında kolaylıkla tanınabilir. Pilonun kolayca tanımlanabilen işaretleri yoktur ancak mideyi ve duodenumu ayıran bir kas halkası olarak tanınabilir. Asit salgılayan korpus ile asit salgılamayan antrum arasındaki kavşağı da nispeten kolaylıkla ayırt edilebilir (21).

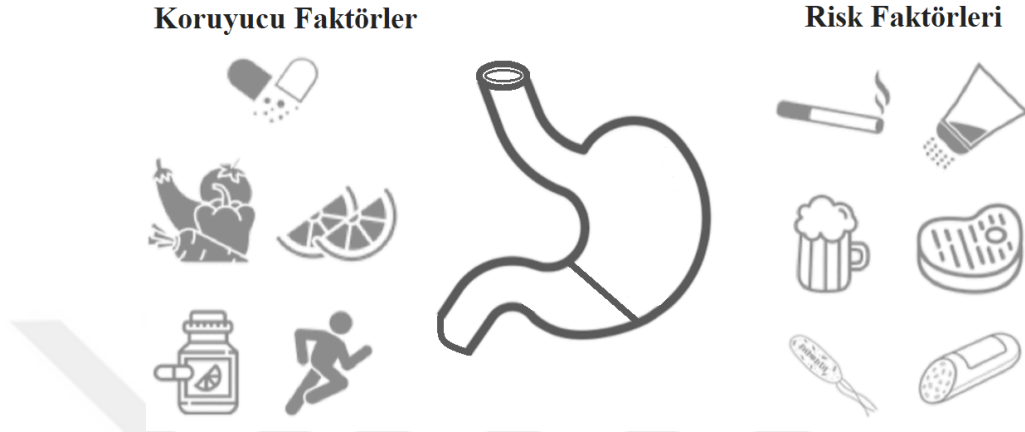
2.3 Mide ile İlgili Hastalıklar

Mide fonksiyon bozuklukları, midenin fundus, korpus, antrum, pilor ve antroduodenal bölgelerinin koordinasyonunu kapsayan mide hareketliliğindeki anormalliklerini ifade eder. Bu bozukluklar genellikle yeme bozuklukları ile ilgilidir. Gastrointestinal hastalıklar özellikle tropikal bölgelerde yaşayan kişilerde gözlemlenen en yaygın problemlerden biridir. Bu hastalıkların en yaygın belirtileri ishal, karın ağrısı, gastrointestinal kanama ve kilo kaybıdır (24). İç organlar arasında mide genellikle bakteriyal kolonizasyona elverişli olmayan bir ortam olarak kabul edilir fakat bir istisna olarak *Helicobacter Pylori* (*H.pylori*) enfeksiyonu kronik gastrit, peptik ülser ve gastrik adenokarsinoma sebep olabilir (25).

2.3.1 Mide kanseri

Mide kanseri, enfeksiyonla ilişkili kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmakla birlikte, dünya çapında bir halk sağlığı sorunlarından biri olup Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, 172 ülkenin 91'inde ikinci en yaygın ölüm nedenidir (26). Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre erkeklerde en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımında mide kanseri Dünyada dördüncü, Türkiyede beşinci sırada yer almaktadır. Kadınlarda en sık görülen ilk beş kanser türünde ise mide kanseri yer almamaktadır (27). Dünya genelinde mide kanserinin insidansı %8 ve mortalitesi %10'dur. Daha da önemlisi, bu oranların çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde meydana gelmiştir ve yaşla birlikte giderek artmaktadır. Mide kanseri karsinogenezinde yaşam tarzı, diyet gibi dış faktörlerin rolü tartışma konusu olup, mide kanserine yakalanma riskinde birincil risk faktörü *H. pylori* enfeksiyonudur.

Diğer risk faktörleri arasında coğrafi konum, etnik köken, yaş, cinsiyet, sosyoekonomik durum, tütün kullanımı, yüksek tuzlu gıdalar ve genetik faktörler bulunmaktadır (Resim 2) (28,29).



Resim 2 Mide Kanseri için koruyucu faktörler ve risk faktörleri (29)

Mide kanseri histolojisi, “Lauren Kriterleri” olarak bilinen bir sınıflandırma yöntemi kullanılarak sınıflandırılır. Mide kanseri genellikle kardiya ve kardiya olmayan mide kanseri olmak üzere ikiye ayrılır. Kardiya mide kanseri gastroözofageal kavşağının yakınlarında oluşurken, kardiya olmayan mide kanseri midenin alt kısmında görülür ve bu tip kanser özellikle Doğu Asya bölgesinde daha yaygındır. Bununla birlikte erkeklerde görülme oranı genellikle kadınlardan iki kat daha yüksektir. Kardiya olmayan mide kanseri ya bağırsak tipi ya da yaygın tip olabilir. Bağırsak tipi, erkeklerde ve yaşlı erişkinlerde daha fazla görülürken, yaygın tip erkeklerde ve kadınlarda ve tüm yaş gruplarında görülebilir. Bağırsak tipi kardiya olmayan mide kanseri ile karşılaştırıldığında yaygın tip kardiya olmayan mide kanseri daha hızlı ilerlemeye ve daha kötü prognoza sahiptir (28). Bu hastalıkta en sık görülen semptomlar kilo kaybı ve karın ağrısıdır. Diğer belirtiler arasında disfaji, erken tokluk ve kronik kan kaybına bağlı demir eksikliği anemisi bulunur (24). Mide mukozasının neoplastik transformasyonu çok aşamalı bir süreç olmakla birlikte erken evrelerde bu neoplastik lezyonların belirlenmesi için mide kanseri insidansı ile ilgili çeşitli tarama stratejileri önerilmiştir. Bu amaç ile kullanılabilecek çoklu tarama testleri vardır ancak tanı için standart tarama yoktur.

Kanserin erken evrelerinde hastaların yaklaşık %80'i asemptomatik olduğundan, ilk tanı genellikle gecikmektedir. Sadece lokal invazyon ilerledikten sonra tanı konulabilir duruma gelir. Mide kanseri için kullanılan tarama testlerinde en yaygın iki tip endoskopik ve radyolojik incelemelerdir. Özofagogastroduodenoskopi; yemek borusu, mide ve duodenumun endoskopik muayenesidir ve kanser vakalarının tanısı için en doğru sonucu verir. Endoskopik ultrasonografi ise midenin içine infiltrasyonu ve lokal lenf nodlarına metastazı belirlemek için en iyi tarama yöntemidir. Radyolojik incelemeler ise bilgisayarlı tomografi taramalarını, ultrason-rehberli karaciğer biyopsisini, kontrastlı karaciğerin ultrasonunu, PET taramasını ve MRI'ı kapsar. Bilgisayarlı tomografi taramaları küçük tümörleri tespit etmeye karşı duyarlı iken ultrason-rehberli karaciğer biyopsisi ve kontrastlı karaciğerin ultrasonu yalnızca tanı belirsiz olduğunda kullanılır. Tüm bunlar günümüzde en yaygın kullanılan tarama testleridir.

Mide kanserinin tedavisi hastalığın evresine bağlıdır. Tümör erken bir aşamada, özellikle II. evrede tespit edilirse, ameliyat ile tedavi edilebilir. Laparoskopi destekli distal gastrektomi (LADG), mide kanseri için en yaygın cerrahi yaklaşımdır. Fakat mide kanseri genellikle ileri aşamalarda teşhis edildiğinden, LADG yapmak zor olabilir. Diğer iki yaygın tedavi yöntemi radyoterapi ve kemoterapidir. İleri mide kanseri olan hastalar için, kemoterapi uygulaması hayatta kalma süresini uzatmak, semptomları hafifletmek ve yaşam kalitesini artırma amacıyla tercih edilen tedavi yöntemidir. Mide kanseri olan hastaların çoğu teşhis edildiğinde zaten ileri aşamadır ve metastaz yapmış olduğundan cerrahi şansını çoğunlukla yitirmiştir fakat bilimsel araştırmaların derinleşmesiyle, mide kanseri için giderek daha fazla hedefe yönelik tedaviler oluşmuştur (28).

2.3.2 Ülser

Peptik ülser hastalığı, pepsin ve mide asidi sekresyonuna ikincil mukozal hasar ile karakterize olan bir gastrointestinal sistem bozukluğudur. Peptik ülser hastalığı genellikle mide ve proksimal duodenumda görülmekte olup daha az yaygın olarak alt özofagusta, distal duodenumda veya jejunumda da görülür.

Mide ülserlerinin dört kat daha fazla duodenum ülseri teşhis edilir. Sigara kullanımı, kahve, düzenli aspirin kullanımının ve uzun süreli steroid kullanımının peptik ülser gelişimi ile yakından ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır. Bunun yanı sıra, genetik faktörler hem duodenum ülserinde hem de mide ülserinde etkilidir. Bu nedenle duodenum ülseri olan kişilerin birinci dereceden yakın akrabalarının, duodenum ülserine yakalanma riski 2-3 kat artarken benzer şekilde mide ülseri olan kişilerin yakın akrabaları da yüksek mide ülseri olma riskine sahiptir (30).

Hem mide ülseri hem de duodenal ülser hastalığı *H. pylori* enfeksiyonu ile yakından ilişkilidir. Duodenum ülseri olan kişilerin %90-100'ünde ve mide ülseri olan kişilerin ise %60-100'ünde *H. pylori* enfeksiyonu tanısı konulabilir. Enfekte olan kişilerde peptik ülser riskini etkileyebilecek diğer faktörler, duodenal ülser hastalığında artan ve mide ülseri hastalığında azalan şekilde seyreden mide asidi üretiminin miktarı, duodenal bölgede gastrik metaplazi varlığı, sigara içilmesi ve 0 kan grubu gibi genetik faktörlerdir (31).

Peptik ülser hastalığının gelişme riskinin, kişilerin yaşam şekilleri, stres, sosyal durumları ve genetik kalıtımı ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle *H. Pylori* gibi enfeksiyonlara yatkın çevresel faktörler ve sosyoekonomik faktörleri kontrol etmek, dengeli bir diyet yapmak, düzenli egzersiz yapmak, sigara içmemek, alkol alımını sınırlandırmak, analjezik ilaçların ve glukokortikoidlerin kullanımını sınırlamak, stres ile baş etmek ve yeterli gece uykusu uyumak bu hastalığın önlenmesi ve iyileşmesi için gerekli koşullardır (32).

2.3.3 Gastrit

Gastrit, insanlarda sıklıkla görülebilen hayat boyu sürebilen ve gizli seyreden hastalıklardan biri olarak kabul edilir (33). Gastrit, mide mukozasında oluşan bir inflamatuvar durumdur. Gastrit, toplumsal sağlık sorunlarından biri kabul edilmektedir ve Dünya Sağlık Örgütü'ne göre gastrit insidansı Kanada'da %35, Çin'de %31, İngiltere'de %22, Japonya'da %14.5 ve Fransa'da %29.5'tir.

Gastritin başlıca risk faktörleri, *H. pylori* enfeksiyonu, aspirin veya NSAID kullanımı, sigara, alkol kullanma alışkanlığıdır (34,35).

H. pylori, mideyi kolonize eden önemli bir patojen olup gastrit başta olmak üzere peptik ülser ve mide kanseri ile ilişkilidir (36). *H.pylori*, Mide mukozasındaki iltihaplanma sürecini aktive edebilir veya hastalıklı bir mukoza içinde yaşayan masum bir seyirci olabilir (37).

Fazla kahve tüketiminde kahvenin içeriğinde bulunan kafein, gastrite sebep olabilecek mide asidi üretimini uyarabileceğinden gastrite neden olabilen faktörler arasında kabul edilmektedir. Bununla birlikte stres de kortizon hormonu üretimi ile lenfositlerde azalmaya neden olabileceğinden ve gastrite neden olabilecek yabancı maddelere karşı bağışıklık sistemini düşüreceğinden risk faktörleri arasında kabul edilmektedir (34).

Warren ve Marshall tarafından *H.pylori*'nin keşfedilmesinden sonra kronik gastrit olarak teşhis edilen vakaların çoğunluğunda bakterinin gastritin sebebi olduğu anlaşılmıştır. Hastalığın atrofik son aşamalara kadar gelişmediği klinik durumlarda, gastritin *H. pylori* eradikasyonu ile tedavi edilebileceği ve inflamasyona uğrayan gastrit mukozasının normalize edilebileceği zaman içerisinde gösterilen tedavi sonuçlarından olmuştur (33).

2.4 Formalinle Fikse Edilmiş ve Parafine Gömülmüş (FFPE) Dokular

Hastanelerde farklı amaçlar doğrultusunda arşivlenen insan doku örneklerinin çoğu, yıllar içerisinde halen stabil olduğu kanıtlanan ve genellikle histoloji, tanı, tedavi geçmişi ile klinik verilerle ilişkilendirilen FFPE bloklarıdır. FFPE örneklerinin tarihsel geçmişi 1893 yılına kadar uzanmaktadır (1). FFPE dokular formalin ile fiksasyon aşamasında dokular metilol eklentileri ve metilen köprüleri yolu ile fiksasyona bağlı olarak oluşan çapraz bağlanmayla sabitlenir. Bu nedenle sabitlenmiş dokular bozulma endişesi olmadan uzun yıllar sabit kalabilmektedir (4).

Bu doku türü bu sebep ile hasta verileri ile de ilişkili olarak retrospektif araştırmalara olanak tanıdıklarından paha biçilemez bir kaynaktır (5).

FFPE örnekleri dünya çapında yaygın olarak kullanılmakta olup, FFPE örnekleri ile yapılan analizleri etkileyen preanalitik faktörler tanımlanmıştır (14). Bu faktörlerden en önemlisi FFPE örneklerinin hazırlanması esnasında dokuların formalin gibi çeşitli kimyasal ajanlara maruz kalmasıdır (1).

Dokuların fiksasyonu amacıyla kullanılan formalin, peptitler ve proteinler ile reaksiyona girer ve lizin, arjinin ve sistein tiyol kalıntıları üzerinde metilol oluşumunu indükler. Bu protein çapraz bağlanma reaksiyonu sonucunda oluşan metilen köprüleri, proteinlerin başlangıç konformasyonlarını büyük ölçüde değiştirir ve bazı epitoplari maskeleyebilir (1) Bu reaksiyonları geri çevirmek antijen geri kazanımı yaklaşımları sayesinde mümkün olabilmektedir. Isı yardımıyla antijen geri kazanımı uygulanması ile metilen çapraz bağlarının hidrolizi gerçekte ve epitoplari maskesini kaldırabilmektedir (1,4). Antikorların kullanılarak FFPE dokularına ait proteinlerin analizi çalışmaları, ısı ile indüklenen antijen geri kazanımı (HIAR) tekniğinin geliştirilmesi ile 1991 yılında başlamıştır (15). HIAR tekniği, ısı yardımıyla metilen çapraz bağlarının hidrolizi ile epitoplari maskesini kaldırabileceği ve böylelikle immünoreaktiviteyi artırabileceği fikrine dayanmaktadır. Ancak tüm bu gelişmelerin yanı sıra FFPE örneklerine ait formalin kaynaklı kimyasal modifikasyonlar nedeniyle protein kalitesinde taze dondurulmuş doku örneklerine göre daha fazla varyasyon barındırabileceği kaygıları halen devam etmektedir (1,16).

2.4.1 Formaldehit ve kullanım alanı

Aldehit ailesinin üyesi olan formaldehit CH_2O formülüne sahip bir organik bileşiktir ve karbonil grubunun iki bağına bir hidrojen bağlanması ile oluşmaktadır. Formaldehit kuvvetli elektrofilik özellik göstermesi sebebi ile oldukça reaktif özelliğe sahiptir. Oda sıcaklığında gaz haline geçebilen, suda iyi çözünebilen, renksiz ve keskin kokulu, yanıcı ve zehirli bir gazdır (38,39).

Dehidrogenaz enzimi aracılığıyla karaciğer ve eritrositlerde formik asite metabolize olabilen formaldehit, vücuda dışarıdan alınması durumunda depo edilmeden karbondioksite okside olarak solunum yoluyla ya da idrar ve dışkı yoluyla atılır (38,40). Formaldehit nonenzimatik yolla protein, nükleik asitler, doymamış yağ asitleri ile güçlü bir şekilde birleşme eğilimindedir. Bu birleşme sonucunda, proteinlerde denatürasyon oluşturarak sitotoksik ve mutajenik etkinin görülmesine neden olur (40–42).

Formaldehit kimyasal özellikleri nedeniyle çok yaygın kullanım alanlarına sahip olan bir kimyasal maddedir. Endüstriyel alanda, tekstil ve temizlik endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır (38,40).

Kimya alanında formaldehit, proteinleri sabitleyerek çürümelerin önüne geçildiğinden biyolojik örneklerin saklanması için kullanılmaktadır. Tıp alanında ise formaldehitin en yaygın kullanımı laboratuvarlarda mevcuttur. Anatomide kadavranın tespiti ve bozulmadan uzun süre saklanması, histoloji ve patoloji laboratuvarlarında dokuların fiksasyon aşamasında kullanılmaktadır. Laboratuvarlarda FFPE dokuların hazırlanması esnasında formalin ile fiksasyon aşamasında dokular metilol eklentileri ve metilen köprüleri yolu ile fiksasyona bağlı olarak oluşan çapraz bağlanma nedeni ile bu sabitlenmiş dokular bozulma endişesi olmadan yıllarca sabit kalabilmektedir (4).

2.4.2 Formaldehit'in proteinler üzerindeki etkisi

Formaldehit laboratuvar kullanımında dokuların fiksasyonu aşamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Formaldehit fiksasyonu ortaya çıktığından beri, klinik örneklerden olan dokuların korunması için standart bir yöntem haline gelmiştir (43). Formalin ile fiksasyon sayesinde, FFPE dokular metilol eklentileri ve metilen köprüleri yoluyla fiksasyona bağlı çapraz bağlanma nedeniyle bozulma endişesi olmadan uzun süre stabil kalabilmektedir (43,44). Ancak, fiksasyon esnasında kullanılan formalin, peptitler ve proteinler ile reaksiyona girmekte ve lizin, arjinin ve sistein tiyol kalıntıları üzerinde bir metilol oluşumunu indüklemektedir.

Gerçekleşen, protein çapraz bağlama reaksiyonu sonucunda oluşan metilen köprüleri, proteinlerin başlangıç konformasyonlarını önemli ölçüde değiştirir ve bazı epitoplari maskeleyebilir. FFPE dokularda formalin fiksasyonundan kaynaklanan metilen çapraz bağlarının ortadan kaldırılması ancak antijen geri kazanımı yaklaşımları sayesinde metilen çapraz bağlarının hidrolizi ile gerçekleşmekte ve epitoplariın maskesi kaldırılabilir (1,4).

2.5 Proteomik Teknikler

Proteom, ilk defa Marc Wilkins tarafından 1994 yılında yapılan bir bilimsel bir toplantıda önerilmiş olup bir organ, doku veya hücrede herhangi bir anda, izoformları ve modifikasyonları ile birlikte ifade edilen proteinlerin tümü olarak tanımlanmıştır.

Proteomik; belirli şartlar altında organizmada, dokuda ve hücre içerisinde genler tarafından kodlanan tüm proteinlerin kapsamlı analizi olup proteinlerin tanımlanması ve fonksiyonlarıyla ilgilenir. Proteomik teknikler, molekülleri doğrudan ve kapsamlı şekilde ele aldığından genom tabanlı teknolojilere göre birçok avantaj sunmaktadır (45). Proteom transkripsiyon, translasyon ve translasyon sonrası modifikasyonların kombinasyonunun sonucunda oluşan proteinlerin tümünü ifade eden dinamik bir kavramdır. Bu nedenle günümüzde biyokimyasal süreçlerin aydınlatılmasında genom analizinin tek başına yeterli olmadığı, bununla birlikte proteom analizlerini de içeren bütünsel değerlendirmelerin yapılması gerektiği bilinmektedir. Proteomik yöntemlerin yaygın kullanımı klinik proteomik alanında tıpta kullanılmaktadır ve bu alanda yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu belirli hastalıklara özgü belirli biyobelirteç çalışmalarından oluşmaktadır.

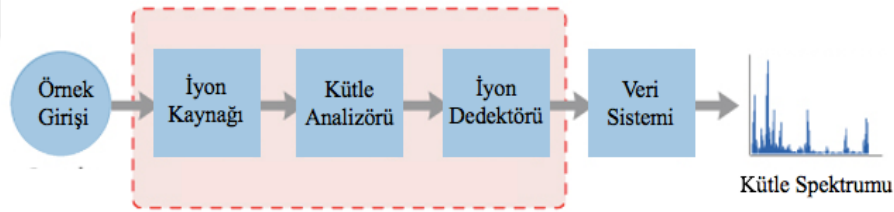
2.5.1 Proteomik çalışmalarda kütle spektrometresi

Proteomik teknikler kullanılarak birçok alanda araştırmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda proteomik teknikler arasında, proteinlerin geniş kapsamlı araştırılabilmesine olanak sağlayan kütle spektrometresi yöntemleri öne çıkmaktadır. Kütle spektrometresinin kullanıldığı 3 temel yaklaşım proteomik çalışmaları içermektedir.

Bunlar; protein etkileşimlerinin tanımlanması, protein ekspresyonunun belirlenmesi, ve protein modifikasyonlarının yerlerinin belirlenmesidir (46).

Kütle spektrometresi, J. J. Thompson tarafından 1913 yılında geliştirilmiştir. Kütle spektrometresi, yüksüz moleküllerin çeşitli kaynaklar yardımı ile iyonlaştırılması ve yüklü iyonların manyetik ya da elektrik alandan geçerken kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılması prensibine dayanmaktadır. Yüklü olmayan moleküller, bu yöntemde iyonizasyon işlemi sonucu uyarılarak yüklü, iyonize moleküller haline dönüştürülür. Oluşan her iyon kendine özgü bir moleküler kütle ve yüke sahip olup m/z oranlarının okunabildiği bir spektrum ile tanımlanır. Analiz sonucunda oluşan kütle spektrumu, protein örneğindeki bileşenlerin pozitif iyonlara dönüştürülmesi ve m/z değerlerine göre sıralanması sonucu elde edilir.

Kütle spektrometreleri temel olarak örnek girişi, iyon kaynağı, kütle analizörü, iyon dedektörü ve veri sistemi olmak üzere beş ana bölümden oluşmaktadır (Resim 3).



Resim 3 Kütle spektrometresinde bulunan temel bileşenler

Örnek girişi, analiz edilmek üzere örneğin kütle spektrometresine verildiği kısım olup bu bölümde örneklerin iyonizasyon kaynağına iletilmesi amaçlanır. Örnek girişi yaygın olarak GC (Gas Chromatography) veya HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ile yapılmaktadır. İyonizasyon kaynağı ise analit iyonlarının üretildiği kısımdır. İyonlar kütle spektrometresi vakumu altında analiz edildiğinden, en önemli reaksiyonlardan biri ilgili analitlerin gaz fazında iyonlarına dönüştürülmesidir (47). İyonlaştırma yöntemi analit çeşidine ve analizin amacına göre belirlenir. Son yıllar içerisinde moleküllerin gaz fazı iyonlarına dönüşmesini sağlayan çeşitli iyonizasyon teknikleri gelişmiştir.

Proteomik analizlerde kullanılan birçok iyonizasyon kaynağı olmakla birlikte sıklıkla kullanılan iki yöntem elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI)'dur. ESI, atmosferik basınç altında, MALDI vakum altında çalışan iyonizasyon kaynaklarıdır (48).

İyonizasyon kaynağında üretilen iyonlar m/z değerlerine göre ayrılması amacıyla kütle analizörüne gönderilir. Elektrik veya manyetik alanların kullanılabildiği kütle analizörü vakum altında çalışır. Proteomik analizlerde kullanılan kütle analizörleri uçuş zamanlı (time-of-flight, TOF), iyon tuzağı (ion trap, IT), fourier dönüşümsel iyon siklotron rezonans (fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR), “quadropole (Q)”dür.

İyonizasyon sonucu m/z değerlerine göre ayrılan moleküller dedektöre gönderilir. Dedektör genellikle vakum altında çalışan bir elektron çoğaltıcısıdır ve burada farklı m/z oranlarına sahip iyonlar yoğunluklarına göre bir spektrum oluşturur. Spektrum, m/z değerine karşılık gelen iyonların oluşturduğu grafikdir ve birim yük başına Dalton (Da) cinsinden gösterilmektedir. Spektrumdaki her pik ise farklı m/z değerini gösterir. Kütle spektrometresine ait son bölüm olan veri sisteminde, elde edilen kütle spektrumu m/z oranlarının x ekseninde, yoğunlukların ise y ekseninde bulunduğu pikler halinde düzenlenmektedir.

Kütle spektrometresinde kullanılan iyon kaynakları MALDI-TOF, ESI-FTICR ya da ESI-Ion Trap gibi farklı kütle analizörleri ile birleştirilebilmektedir. Birleşik bu sistemlerin analizin duyarlılığını ve spesifikliğini arttırmak gibi avantajları olabilmektedir. Bununla birlikte proteomik teknikler arasında kullanılan en yaygın sistemlerden biri de Likit Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) (48).

2.5.1.1 Kütle spektrometresi ile protein tanımlaması

Proteinlerin iki boyutlu jel elektroforezi (2D-GE) ya da likit kromatografi (LC) gibi yöntemlerle ayrılmasının ardından kütle spektrometreleri ile tanımlanmaları

günümüzde proteomik araştırmaların temelini oluşturmaktadır. Protein araştırmalarında yontemsel olarak iki temel yaklaşımdan bahsedilmektedir. Bunlar etiketli (labeled) ve etiketsiz (label-free) proteomiktir.

Etiketli proteomikte, proteinlerin yapı taşı olan amino asitler, ağır izotoplar gibi belirli etiket molekuller ile işaretlenir ve kütle spektrometreleri ile protein analizleri yapılır. Etiketsiz alışmalar temel olarak dört aşamada toplanabilir. Bunlar, protein izolasyonu, ayrılması, tanımlamaları ve yapısal analizlerden oluşmaktadır. Günümüzde, kütle spektrometrelerinden elde edilen veriler kullanılarak proteinlerin tanımlanmasında üç temel yaklaşım mevcuttur. Bunlar, yukarıdan aşağıya (top-down), aşağıdan yukarıya (bottom-up) proteomik ve *de novo* dizilemedir (49–51).

2.5.1.2 Yukarıdan aşağıya (top-down) proteomik

Protein bilgisi kullanılarak, intakt proteinlerin sahip olduğu moleküler ağırlıklarının protein veri tabanlarında eşleştirilerek bu proteinlere ait tanımlamaların yapıldığı yaklaşımdır. LC ya da 2D-GE gibi ayırma teknikleri kullanılarak ardından kütle spektrometresi analizi kullanılarak intakt proteinlerin ayrılmasını içerir (49).

2.5.1.3 Aşağıdan yukarıya (bottom-up) proteomik

Proteinlerin tripsin veya kimotripsin gibi çeşitli enzimlerle kesilmesinin ardından elde edilen peptitlerin protein veri tabanlarında eşleştirilerek tanımlamaların yapıldığı yaklaşımdır. Bu yontem kütle spektrometresi ile analizden önce proteinleri proteolitik sindirim yolu ile tanımlamak ve translasyon sonrası modifikasyonları analiz etmek için yaygın kullanılmaktadır (50). Aşağıdan yukarıya proteomik yaklaşımı, günümüzde kütle spektrometresi temelli araştırmalarda protein tanımlamaları için en sık tercih edilen yontemdir. Bu yaklaşımda peptit kütle parmak izi (PMF) ve peptit fragment parmak izi (PFF) olmak üzere iki tip strateji kullanılmaktadır. Ancak genel olarak MALDI-TOF-MS ile triptik peptitlerin analizi ile PMF elde edilir. İkinci tip PFF ise genel olarak hedef olarak ilgilenilen peptidin m/z değerinin MS/MS fragmentasyonu ile elde edilir.

Son yıllarda protein tanımlamalarının yapılabilmesi için güçlü biyoinformatik araçlar bulunmakta olup bu yöntemlerin geliştirilmesi yönündeki araştırmalar devam etmektedir.

2.5.2 Jel bazlı proteomik teknikler

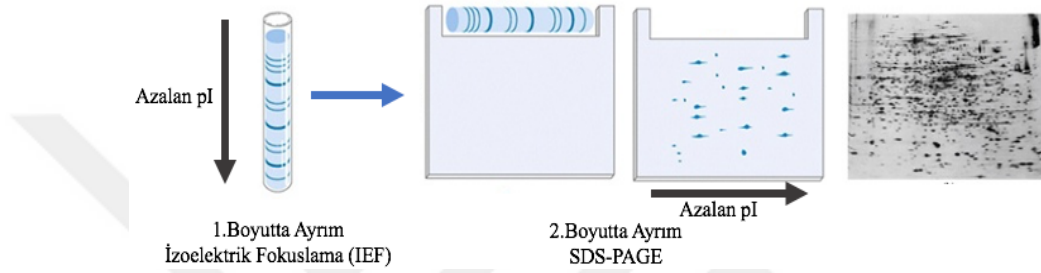
2.5.2.1 İki boyutlu jel elektroforezi (2D-GE)

O'Farell ile arkadaşları Scheele ve Klose tarafından 1975 yılında keşfedilen iki boyutlu jel elektroforezi (2D-GE) yöntemi proteomik tekniklerden en yaygın olarak kullanılan yöntemdir (52). 2D-GE, 1950'li yılların sonunda izoelektrik odaklama tekniğinin gelişmesi ile gelişmeye başlamıştır ve daha sonra poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) tekniği ile birleştirilmiştir.

Ardışık olarak iki aşamadan oluşan bu yöntemde proteinler öncelikle birinci boyutta izoelektrik odaklama (IEF) ile pH gradienti içerisinde yüklerine göre ayrılmaktadır. Bu ilk aşamada proteinlerin denatürasyonu ile birlikte ayırımı için çözülmesi gerçekleştirilmektedir. Bu basamakta kullanılan tampon çözelti içerisindeki üre ve tiyoüre gibi kimyasal ajanlar proteinlerin non-kovalent bağlarını zayıflatarak kırılmasına yardım etmektedir. Ardından ikinci boyutta, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile proteinler moleküler ağırlıklarına göre ayrılmakta ve jelden kesilen protein spotları kütle spektrometresi ile analiz edilmektedir (Resim 4) (53).

Proteomik analizlerde proteinlerin yüksek çözünürlükte birbirinden ayrılması oldukça önemlidir. Ayrım ne kadar fazla ve iyi çözünürlükte olursa yapılan karşılaştırmalı analizlerde protein farklılıklarını yakalama şansı o kadar yüksek olacaktır. Bu nedenle iki boyutlu jel elektroforezi tekniği proteomik çalışmalar için önemli dönüm noktalarından biri olmuştur. 2D-GE çalışmalarında karşılaşılan protein çözünürlüğü probleminde dolayı bu çalışmalar denatüre edici koşullar altında yapılmaktadır. Proteinlerin denatürasyonunu sağlamak ve çözünürlüğünü arttırmak için çeşitli ajanlar kullanılarak denatürasyon sağlanmaktadır (53,54).

1975 yılında geliştirilmesinin ardından zamanla proteinlerin iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi ile tanımlanabilmesi için metodolojik geliştirmeler yapılmıştır (53). O'Farrel tarafından 2D-PAGE yönteminin tanıtılmasının ardından günümüze kadar sayısız teknik geliştirilmiştir ancak halen en yaygın kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir (52). Örneğin SDS-PAGE gibi tek boyutlu bir yöntem kullanılarak 80-100 protein grubu ayrılabilirken, 2D-PAGE yöntemiyle bu sayı 5000'lere kadar çıkabilmektedir.



Resim 4 2D-GE yönteminde proteinlerin iki boyutlu ayrımı

2.5.2.2 İki boyutlu diferansiyel jel elektroforezi (2D-DIGE)

2D-PAGE, biyolojik bir örneğe ait proteomu incelemek için günümüzde sıklıkla kullanılan, çok yönlü tekniklerden biridir. Özellikle, protein örneklerinin üç adede kadar floresan etiketlerle etiketlemesini sistemini kullanan iki boyutlu diferansiyel jel elektroforezi (2D-DIGE) yöntemi, geleneksel 2D-PAGE yöntemine göre daha hassastır. Her iki yöntem de, protein izoformları ve translasyon sonrası modifikasyonlar dahil olmak üzere çok sayıda proteinin birbirinden ayrılması ve tanımlanmasında öne çıkan avantajlara sahiptir. Teknik, tek bir 2D jel üzerinde iki veya üç adet floresan ile etiketlenmiş protein örneklerinin ayrılmasını sağlayarak jelden jele varyasyonu en aza indirmektedir (55). 2D-DIGE tekniğinde, proteinlere bağlanan floresan boyalar kullanılarak aynı jel üzerinde proteinlerin ekspresyon farklılıklarının ortaya çıkartılması sağlanmaktadır. Karşılaştırılacak protein örneklerinden biri Cy3 floresan boyası ile, diğeri ise Cy5 floresan boyası ile boyanır. Farklı ışımaya gösteren boyalar ile boyanmasının ardından örnekler karıştırılır ve tek 2D-PAGE yapılır.

Tek bir jel üzerinde, kullanılan boyalara uygun olarak farklı dalga boylarında görüntüleme yapılır ve belirli programlarda boyalar farklı renklerde görüntülenerek protein ekspresyon farklılıkları incelenebilir.

Bugüne kadar, 2D-PAGE ve 2D-DIGE, doku ve kanser hastalarından alınan serum örnekleri gibi likit örnekler de dahil olmak üzere birçok biyolojik örneğin farklı proteomik analizine başarılı bir şekilde uygulanmıştır (55). Likit kromatografisi kütle spektrometresi tabanlı kantitatif proteomik tekniklerde gelişmeler sebebi ile son yıllarda kullanımının azalmasına rağmen 2D-PAGE ve 2D-DIGE, birçok hücrel sistemin proteomunu incelemek için sıklıkla kullanılan bir teknik olmaya etmektedir.

2.5.3 Jel içermeyen proteomik teknikler

2.5.3.1 LC-MS/MS

Jel içermeyen proteomik çalışmaların temelinde likit kromatografi ve kütle spektrometresi birleştirilen likit kromatografisi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi gelmektedir (56).

LC-MS/MS, laboratuvarında çok sayıda analize uygulanabilen bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır ve çeşitli bileşiklerin tanımlanmasına ve miktarının belirlenmesine izin veren iyon üretimi, vakum altında m/z değerlerinin oluşması ve iyon tanımlaması içeren 3 temel basamaktan oluşur (57,58).

LC-MS/MS tabanlı tekniklerde analiz edilecek protein karışımları, analiz öncesinde tripsin gibi belirli amino asitlere özgü olan proteazlarla proteolitik sindirime tabi tutularak peptitlere parçalanmalıdır. Böylelikle kütle spektrometresine uygun kütle/yük değerine sahip olması sağlanır. Bu yöntemdeki kromatografik bölüm, enzimatik sindirim ile oluşturulan peptitlerin kütle spektrometresine girmeden önce ayırma uğradığı yerdir. Sonrasında ayrılan peptitler kütle analizörlerine gönderilmektedir.

Ardışık MS/MS sistemlerinde birinci kütle analizöründen ayrılan peptitler parçalanarak ikinci kütle analizörüne girer. Böylelikle amino asit sekansı belirlenir. MS/MS sistemleri kullanılarak yapılan peptit analizleri veya proteomik bazlı analizler sonucunda elde edilen ham veriler güncel veri tabanları ile karşılaştırılmakta ve spesifik yazılımlar kullanılarak işlenmiş veri elde edilmektedir (48). 1989 yılında laboratuvarlar uygulamalarına dahil edilen LC-MS/MS yönteminin temel avantajları, yüksek özgüllük ve geniş analit yelpazesi ile hassas analitik yöntemlerin geliştirilebilmesidir (57).

2.5.3.2 Peptit dizileme ve de novo dizileme

Proteomik araştırmalar boyunca proteinler, tripsin enzimi gibi proteolitik enzimler ile parçalanarak peptitler oluşturulur. Peptit kütlelerinin güncel veri bankalarında bilinen proteinlere ait peptit dizilerinin kütleleri ile karşılaştırılarak analizinin gerçekleştirilmesine peptit dizileme (peptit mass fingerprint, PMF) denir. Diğer bir alternatif ise MS/MS sistemleri kullanılarak de novo dizileme yapılmasıdır. De novo dizileme, ardışık kütle spektrometreleri analizleri ile örneklerden elde edilen peptit ve fragment kütlelerinden protein/peptit dizisinin elde edilmesidir. MS/MS yöntemi ile peptit dizileme yapılması, proteomik teknikler ile protein tanımlamak en kuvvetli araçlardan biridir (51).

MS/MS yönteminde ilk kademede tek başına MS analizi yapılır. Sonrasında ölçümü yapılan iyonlar seçilerek ikinci kademeye geçilir. Bu aşamada her peptit rastgele fragmente olur. Bu fragmentasyon için farklı metotlar mevcut olup proteomik araştırmalarda en yaygın olanı CID (collision induced dissociation)'dir ve fragmentasyon argon gibi inert bir gazla çarpıştırılarak gerçekleşir. MS/MS sisteminde analiz sonucu elde edilen molekülün tamamına öncül iyon (precursor ion), fragmentasyon sonucu oluşan iyonlara ürün iyon (product ion) denilmektedir. Fragment iyonların kütlelerinden hareketle ilgili peptide ait aminoasit dizisi elde edilir. Peptitlerin fragmentasyonu ile "b" ve "y" iyonları oluşur ve oluşan bu iyonlar peptitler hakkında bilgi verir. Peptit parçalanırken mevcut yükün hangi terminalde kaldığında göre iyonlar oluşmaktadır.

Yüklü peptitlerden amino terminal içeren iyonlara “b” iyonları, karboksil terminal içeren iyonlara “y” iyonları denilmektedir. Dizileme sonrası elde edilen verilerin analiz edilmesi farklı veri tabanları kullanılmaktadır. Hem peptit dizileme hem de de novo dizileme çalışmaları için geliştirilen, SwissPort, UniPort, NCBIInr, MatrixScience gibi çeşitli veri tabanları bunlara örnek olarak verilebilir.

2.5.4 MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi

2.5.4.1 Tarihçesi

MALDI iyonizasyon tekniği, Tanaka ve arkadaşları, Karas ve Hillekamp tarafından 1980’li yılların sonunda matriks varlığında moleküllerin iyonlaştırılması için lazer enerjisinin kullanıldığı iyonizasyon tekniği olarak tanımlanmıştır. ESI ve MALDI iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesi sonucunda 2002 yılında Nobel Kimya ödülünü John Fenn ile birlikte Koichi Tanaka almıştır.

Yüksüz moleküllerin çeşitli kaynaklar yardımı ile iyonlaştırılması ve yüklü iyonların manyetik ya da elektrik alandan geçerken m/z oranlarına göre ayrılması prensibi ile çalışan kütle spektrometreleri ileri proteomik tekniklerinden MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresini içerir.

2.5.4.2 Prensibi

MALDI, matriks desteği ile analiz edilecek molekülün iyonlaştırılması için lazer enerjisinin kullanıldığı bir iyonizasyon tekniğidir. Temel prensip olarak, matriks lazer enerjisini absorbe ederek analitleri gaz fazına aktarmaktadır. Bu süreç iyonlaşmayı indükleyerek lazer atışlarında oluşan iyonlar TOF kütle analizöründe analiz edilmektedir. Bu teknikte her lazer atımında oluşan iyonların ayrılması ve çözümlenmesi için kütle analizörü mevcuttur. MALDI kütle spektrometresi ile birlikte kullanılan en basit kütle analizörü, iyonların kütleleri ile orantılı olarak belirli süre içerisinde dedektöre ulaşmasını sağlayan TOF tüpüdür.

TOF tüpü içerisinde analiz, tüm iyonlara aynı miktarda enerji verilmesinin ardından dedektöre doğru hızlanan iyonlar ile yapılmaktadır. Teoride iyonların hepsi iyon kaynağı içerisinde aynı zamanda ve aynı yerde oluşturulmakta olup sonrasında TOF tüpünde hızlandırılmaktadır. Aynı yüke sahip iyonlar hızlandıktan sonra aynı kinetik enerjiye sahip olmakla birlikte farklı kütlelere sahip olduklarından dedektöre ulaşma zamanları birbirinden farklıdır. En az kütleyle sahip iyonların hızı fazla olduğundan dedektöre ilk ulaşırken, daha fazla kütleyle sahip iyonlar dedektöre daha geç ulaşmaktadır (59).

İleri proteomik tekniklerden MALDI-TOF, proteinlerin tanımlanmasında tercih edilen yaklaşımlardan PMF analizlerinde kullanılmak üzere verilerin üretildiği kütle spektrometresidir. Bu yaklaşımda öncelikle 2D-PAGE yöntemi ile proteinler yüksek çözünürlük altında ayrılmakta olup, analiz sonrası ilgili protein spotu jelden kesilir. Tripsin enzimi ile proteolitik sindirime tabi tutulduktan sonra kesilen peptit kütleleri MALDI-TOF kütle spektrometresi analizi ile m/z değeri olarak elde edilir. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile yapılan peptit analizlerinde küçük moleküler ağırlığa sahip molekülleri tanımlamak için analiz modlarından “reflektron” modu kullanılırken intakt proteinlerin kütleleri “lineer” modda ölçülmektedir. Bu yöntem sıklıkla saflaştırılmış proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır.

MALDI-TOF kütle spektrometresinde matriks olarak sıklıkla alfa-siyano-4-hidrosinamik asit (α -CHCA), sinapinik asit (SA), 2,5-dihidroksi benzoik asit (DHB) kullanılmaktadır. Matriksler lazeri soğurma özelliğine sahip olup peptit analizlerinde reflektron modunda α -CHCA matriks yaygın kullanıma sahiptir. SA ise daha büyük moleküllerin iyonizasyonunda daha iyi sonuçlar vermektedir. Matriks uygulaması kütle spektrometresinde ileri analizlerde desorpsiyon/iyonizasyona yardımcı olmaktadır.

İleri proteomik tekniklerden MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi birçok açıdan avantajlı bir kütle spektrometresi tekniğidir. Bunlardan başlıcaları, MALDI’de genellikle tekli protonlanmış analitler olduğundan TOF kütle analizörleri ile birlikte bir ya da birden fazla analit için hızlıca moleküler ağırlık bilgisi sağlanabilmektedir.

Bu yöntem tuzlara ve tampon çözeltilere karşı nispeten yüksek toleranslıdır (47). Ayrıca uzun numune hazırlığına gerek kalmadan doku örneklerini analiz etmek için yüksek kapasiteli olması ve homojenizasyon gerektirmemesinden dolayı da diğer proteomik tekniklere göre avantajlıdır (60).

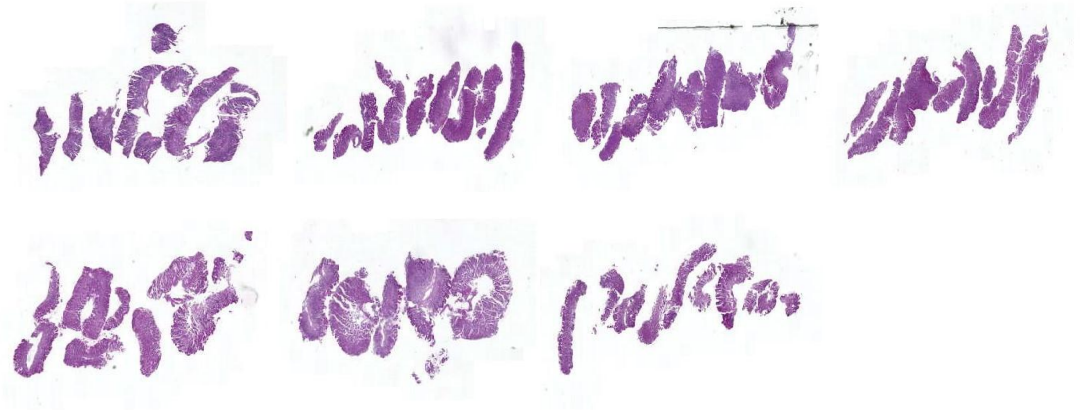
2.5.5 MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi çalışmaları

Kütle spektrometresinin yüksek hassasiyet ve duyarlılık ile proteinlerin analiz edilmesine olanak sağlaması, analitik yetenek ile birlikte doku içerisindeki spesifik hücre tiplerinde gerçekleşen moleküler değişimleri araştırma ve anlama kolaylığı sağlar. İleri proteomik tekniklerden olan MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresinde, dokuların üzeri bir matriks ile kaplanmakta olup ileri analizlerde iyonizasyona yardımcı olmaktadır. İyonizasyon süreci boyunca, spesifik bir dalga boyundaki lazer matriks tabakasına vururken, alttaki doku sağlam kalmakta, ölçüm sonrası aynı doku üzerinde histolojik analiz gerçekleştirilmektedir. MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi yöntemi ile lipitlerin, proteinlerin, peptitlerin, ilaç ve ilaç metabolitleri gibi birçok analit rahatlıkla analiz edilebilmektedir (60).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Dizaynı

Bu tez dahilinde yapılması planlanan deneysel çalışmalar Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Değerlendirme Kurulu(ATADEK) tarafından 13/09/2018 tarihinde incelenmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur (Karar No: ATADEK-2018/13) (Ek 1). Optimizasyon çalışmalarına dahil edilen 7 doku örneği, Maslak Acıbadem Hastanesi Patoloji Laboratuvarından alınmıştır. Çalışma için gerekli olan doku örnekleri cerrahi operasyon esnasında çıkarılmış olup formalin içinde sabitlenerek parafine gömülmüştür. Daha sonrasında çalışmanın yapılacağı güne kadar oda sıcaklığında saklanmıştır. Endoskopik mide biyopsilerinin antrum örneklerinin Hemotoksilen&Eosin (H&E) boyaması sonrasında elde edilen dijital görüntüleri Şekil 1’de sunulmuştur.



Şekil 1 Endoskopik mide biyopsilerinin antrum örneklerinin H&E boyaması sonrasında elde edilen dijital görüntüler

3.2 Gereçler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri, malzemeler ve kimyasallar Tablo 1 ve Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 1 Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Marka/Model
MALDI TOF/TOF Kütle Spektrometresi	RapifleX MALDI Tissue Typer Bruker Daltonics
LC-MS/MS Kütle Spektrometresi	Waters Corporation, Acquity UPLC M-Class SYNAPT XeVo G2-XS
UPLC Kolon	Waters Corporation, ACQUITY HSS T3
Matriks ve Tripsin Uygulama İstasyonu	SunCollect SunChrom GmbH
İnkübasyon İstasyonu	SunDigest SunChrom GmbH
ITO Kaplı Lam	Bruker Daltonics
Santrifüj	MicroL17 Thermo Fischer Scientific
Derin Donduruculu Buzdolabı (+4 °C ve -20°C)	Kirsch Medical - Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	Haier Biomedical, DW-86L729
Hassas Analitik Terazî	Kern ABJ
Etüv (37°C)	Hera Term Oven Thermo Scientific
Otoklav	Nüve SteamArt
Sonikatör	Hielscher UP200St
Thermoshaker	Grant-Bio PC MT-HC24N
Ultrasonik Banyo	VWR USC-TH
Hassas Terazî	Kern ABJ
Eğimli Pens - 150 mm	Isolab
Mikrosantrifüj	Biosan FVL-2400N-Combismin
pH Metre	Thermo Scientific
Vorteks	VWR VV3
Mikroplate Spektrofotometre	BioTek-Synergy H1 Hybrid Reader
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
0.5, 1.5 ve 5 mL Hacimli Kapaklı Tüpler	Axygen ve Eppendorf

Tablo 1 Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri (Devamı)

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Marka/Model
Dikey ve Yatay Şale	Isolab
Mikrokapiller Steril Pipet Ucu 1/200 ul	VWR
96 Kuyucuklu Mikroplate	Isolab
Çeşitli Hacimlerde Pipet Uçları (0.1-1000 µL)	Axygen
5, 10 ve 25 mL hacimli Steril Serolojik Pipetler	Isolab
Çeşitli Cam Malzemeler	Isolab
Mikrotom	Leica Biosystems
İmmünohistokimya Cihazı	Benchmark XT Ventana Medical
Dijital Patoloji Lam Tarayıcısı	Systems Panoromic 250 Flash III 3D Histech Digital Pathology Company

Tablo 2 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındıkları firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma/Kodu
Tris(hidroksimetil)aminometan	Sigma, 252859
Sodyumdodesil Sülfat (SDS)	Sigma, 862010
Metanol (CH ₃ OH)	Sigma, 322415
Kloroform (CHCl ₃)	Sigma, 288306
İyodoasetamit (C ₂ H ₄ INO)	GE Healthcare, RPN6302
Asetonitril (C ₂ H ₃ N)	Thermo Fisher, LSG-51101
Amonyum Bikarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Merck, 5.33005
UPX Universal Protein Extraction Kit	Expedeon, 44101
FASP Protein Digestion Kit	Expedeon, 42250

Tablo 2 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındıkları firmalar (Devamı)

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma/Kodu
Tripsin Gold, MS Grade	Promega, V5280
Trisodyum Sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	Merck, 567446
P-Ksilen >99 %HPLC-Grade	Sigma, 317195
Etanol >99% HPLC-Grade	Interlab
Su, LC-MS Grade	Thermo Fisher, LSG-51140 ve Merck, 115333
Proteaz Inhibitor	Thermo Fisher, LSG-A32955
Pierce™ Quantitative Kolorimetrik Peptit Assay Kit	Thermo Fisher, 23275
BSA Protein Standardı	BioRad, 5000007
Tripsin	Promega, V5111
Trifloroasetik Asit (TFA) ($\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$)	Sigma, T6508
A-siyano-4-hidroksisinamik asit (α -CHCA)	Proteochem, p9100 ve Bruker, 8255344
Bovin Serum Albumin (BSA)	Bruker Daltonics, 8217498
Peptit Standardı	Bruker Daltonics, 8222570
Formik Asit (HCOOH)	Sigma, 106526
Ksilen	Sigma, 214736 ve JT Baker, 80802500
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)	Merck, 111727

3.3 Yöntem

3.3.1 Antijen geri kazanımı

Optimizasyon çalışmalarının ilk basamağında antijen geri kazanımı için optimizasyon çalışmaları yapılarak, MALDI-Görüntüleme yöntemi için tüp içerisinde en iyi antijen geri kazanımı tamponunu mide biyopsi örnekleri için tespit etmek hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda, farklı antijen geri kazanımı tamponları ile muamele edilmiş biyopsi örneklerinin protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

Optimizasyon çalışmalarına dahil edilen 7 adet midenin antrum bölgesine ait doku örnekleri, Maslak Acıbadem Hastanesi Patoloji Laboratuvarından alınmıştır. Çalışmada kullanılacak dokuların kesitleri 42 mikron kalınlığında ve Acıbadem Sağlık Grubu Merkez Patoloji Laboratuvarında LEICA RM2245 Mikrotom cihazı ile alınmıştır.

1. Protokol: 98 °C su banyosu içerisinde 10 mM Sitrata (pH 6) + %2 SDS tampon çözeltisi ile 30 dakika boyunca muamele edilmiştir.
2. Protokol: 98 °C su banyosu içerisinde 10 mM Tris-HCl (pH 9) + %2 SDS tampon çözeltisi ile 30 dakika boyunca muamele edilmiştir.
3. Protokol: 98 °C su banyosu içerisinde 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 9) + %2 SDS tampon çözeltisi ile 30 dakika boyunca muamele edilmiştir.
4. Protokol: 98 °C su banyosu içerisinde 0.1 M EDTA (pH 8.4) + %2 SDS tampon çözeltisi ile 30 dakika boyunca muamele edilmiştir.

Çalışmada kullanılacak doku kesitlerinden protein ekstraksiyonu için antijen geri kazanımı işlemine geçmeden önce Guo ve arkadaşlarının 2012 yılında uyguladıkları protokol göre tüm örneklerin deparafinizasyon, rehidrasyon basamakları tamamlanmıştır (61). Bu doğrultuda;

Oda sıcaklığında lobind tüp içerisinde saklanan 42 mikron kalınlığındaki doku örneklerine kimyasal deparafinizasyon için 1 ml ksilen ile muamele edilmiştir. Ardından 1 dakika 1400 g'de santrifüj yapılmıştır. Ksilen uzaklaştırılıp bu adım tekrarlanmıştır. Rehidrasyon için 2x3 dakika %100 EtOH, 2x3 dakika %70 EtOH, 2x3 dakika %30 EtOH ve 2x3 dakika dH₂O işlemleri tamamlanıp su uzaklaştırılmıştır.

Tüm antijen geri kazanım solüsyonlarına 1X Proteaz Inhibitörü (Thermo Fisher) eklenmiştir ve 98 °C'ye ayarlanmış Thermoshaker'a alınarak (Grant-Bio PCMT-HC24N) 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Farklı tampon çözeltiler kullanılarak farklı antijen geri kazanım protokolleri sonrasında örneklerin bir süre oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır ve bu aşamadan sonra mikrosantrifüj tüpleri 15.000 g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar yeni lobind tüplere aktararak metanol/kloroform presipitasyonu yöntemi ile temizlenmiştir (62). Metanol/kloroform presipitasyonu sonucu elde edilen protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile ölçülmüştür.

25-1 µg/ml çalışma aralığı olan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası ile kompleks yapma esasına dayanan bu yöntem için Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Fisher) kullanılmış ve üretici firmanın tavsiye ettiği protokol izlenmiştir. Analiz için 96 kuyucuklu mikrolaka kullanılmış ve 7 adet Bovine Serum Albumin (BSA) standardı hazırlanmıştır. Standartlardan ve ölçüm yapılacak örneklerden 150 µl alınarak 3'er tekrarlı olacak şekilde kuyulara dağıtılmış ve üzerlerine 150 µl Coomassie Plus Reagent solüsyonu eklenerek 30 saniye boyunca mikrolaka çalkalayıcısında karıştırılmıştır. Ardından 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında BioTek PowerWave HT mikrolaka okuyucu spektrofotometreye yerleştirilerek 595 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonrası konsantrasyonu önceden belirli BSA standartlarından elde edilen değerlerin oluşturduğu grafiğin lineer denklemi kullanılarak miktarı belirlenmek istenen proteinlerinin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.3.2 İmmünohistokimya

Antikor bir floresan boya ile işaretlenerek doku antijenlerinin lokalizasyonlarının gösterilmesi sağlanan immünohistokimya yöntemi ile 4 farklı antijen geri kazanımı tamponlarının immünohistokimya seviyesinde biyopsi örnekleri analiz edilmiştir.

Kesit alma ve 4 farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltilerinin boyama ile etkisine bakılması için endoskopik mide biyopsilerinin antrum örneklerine ait 6 dokudan LEICA RM2245 Mikrotom cihazı ile 3 µm kalınlığında kesitler alınarak 37°C su banyosunda kesitlerin açılması sağlanıp (+) yüklü lamalar üzerine doku kesitleri alınmıştır. Alınan kesitler 62°C etüvde 1 saat bekletilerek deparafinizasyona hazır hale getirilmiştir. Kesitlere ait genel yapıyı izlemek amacıyla daha önceden uygulanmış H&E boyamasına ek olarak hücre iskeletinin önemli bir bileşeni olan aktine spesifik “Actin, Alpha-Smooth Muscle” monoklonal antikor ile mideye ait doku kesitlerinde miyofibroblastları ve miyoepitelyal hücreleri boyayan immünohistokimyasal boyama yapılmıştır.

Boyanacak kesitlere Polimer/HRP çalışma yöntemi uygulanmıştır.

1. 1 saat boyunca 62 °C’lik etüvde lamaların fiziksel deparafinasyonu yapılmıştır.
2. Kimyasal deparafinasyon için 2x5 dakika boyunca ksilen ile muamele edilmiştir.
3. Sırasıyla %100 EtOH, %96 EtOH, %80 EtOH içerisinde 1x5 dakika kesitler hidrate edilmiştir.
4. 1x3 dakika dH₂O içerisinde bekletilmiştir.
5. İmmünohistokimya ön işlem kabul edilen antijen geri kazanımı uygulaması için sırasıyla 10 mM Sitrat (pH 6) + %2 SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 9) + %2 SDS, 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 9) + %2 SDS ve 0.1 M EDTA (pH 8.4) + %2 SDS tampon çözeltiler içerisinde alınan lamalar sırasıyla düdüklü tencere içerisinde 5 dakika süreyle bırakılmıştır.
6. Kesitler dH₂O ile yıkanmıştır.
7. Actin, α-Smooth Muscle; Clone 1A4 Ready-To-Use (Scytek Laboratories, A00002-IFU-IVD) boyama kitinde bulunan Peroxidase Block (RE7101) kullanılarak kesitlerin

üzerine birkaç damla damlatıp nemli ortam kabında 5 dakika süreyle endojen peroksidaz blokajı yapılmıştır.

8. Tris-buffered saline (TBS) ile kesitler 2x5 dakika süreyle yıkanmıştır.

9. Kullanıma hazır kit içinde bulunan Protein Block (RE7102) kullanılarak kesitlerin üzerine birkaç damla damlatıp nemli ortam kabında 5 dakika süreyle protein blokajı yapılmıştır.

10. Tris-buffered saline (TBS) ile kesitler 2x5 dakika süreyle yıkanmıştır.

11. Kullanıma hazır primer antikör Actin, α -Smooth Muscle; Clone 1A4, Ready-To-Use (Scytek Laboratories, Inc.) kesitlerin üzerine birkaç damla damlatılarak nemli ortam kabında 30 dakika süreyle bekletilmiştir.

12. Tris-buffered saline (TBS) ile kesitler 2x5 dakika süreyle yıkanmıştır.

13. Kesitlere primer antikör ile uyumlu Post Primary Block (RE7111) damlatılarak nemli ortam kabında 30 dakika süreyle bekletilmiştir.

14. Tris-buffered saline (TBS) ile kesitler 2x5 dakika süreyle yıkanmıştır.

15. Kullanıma hazır kit içinde bulunan HRP Konjuge Polimer (RE7112) kesitlerin üzerine birkaç damla damlatılarak nemli ortam kabında 30 dakika süreyle bekletilmiştir.

16. Tris-buffered saline (TBS) ile kesitler 2x5 dakika süreyle yıkanmıştır.

17. 150 μ l DAB Kromojen (RE7105) : 3000 μ l DAB Substrat (RE7143) karıştırılarak DAB çalışma çözeltisi hazırlanmıştır ve karanlık, nemli ortam kabında kesitler üzerine birkaç damla damlatılarak 5 dakika süreyle dokuların renk alması için beklenmiştir.

18. 1x3 dakika dH₂O içerisinde lamalar yıkanmıştır.

19. Mayer çözeltisi (RE7107) 3 dakika süreyle beklenerek çekirdek boyaması yapılmıştır.

20. 1x3 dakika dH₂O içerisinde lamalar yıkanmıştır.

21. Tris-buffered saline (TBS) ile kesitler mavileştirilmiştir.

22. Sırasıyla %80 EtOH, %96 EtOH, %100 EtOH içerisinde kesitler bırakılmıştır.

23. Ksilene bırakılan kesitler alınarak non-aqueous kapama maddesi olarak balzam damlatılıp lamel ile kapatılmıştır.

24. Boyanan lamalar mikroskop ile incelenmiştir ve dijital görüntüleri alınmıştır.

3.3.3 Peptit konsantrasyonu tayini

FFPE doku örnekleri ile yapılan optimizasyon çalışmalarında örnek yıkama koşulları ve antijen geri kazanımı basamağı gibi tripsin miktarının da optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda optimizasyon çalışmalarında FFPE biyopsi örnekleri için uygun antijen geri kazanımı tamponu belirlendikten sonra, MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi ile ön optimizasyon çalışmalarına devam edilerek tripsinizasyonun en etkili gerçekleştiğı tripsin konsantrasyonu araştırılmıştır.

Yapılan ön optimizasyon çalışması ile tripsin uygulama parametreleri belirlenmiştir. Doku üzerine tripsin uygulaması, pozitif kontrol olarak BSA kullanılarak (+) yüklü lam üzerinde, antijen geri kazanımının ardından uygulanmıştır. Bu amaçla, uygun konsantrasyonda tripsin çözeltisinin belirlenebilmesi için 25 ng/μl, 50 ng/μl, 75 ng/μl ve 100 ng/μl olmak üzere dört farklı tripsin konsantrasyonu dakikada 10 μl tripsin doku üzerine 8 katman olarak püskürtülmüştür. Bu işlem için, SunCollect (Sunchrom GmbH, Germany) tripsin uygulama istasyonu kullanılmıştır. Ardından, tripsin ile inkübasyon, nem ve sıcaklık dengesinin korunduğı bu yöntem için özel olarak geliştirilmiş olan SunDigest Incubation Chamber (Sunchrom GmbH, Germany) kullanılarak 50 °C derecede 2 saat yapılmıştır. Tripsin proteazı ile doku proteinlerinin peptitlere parçalanmasının ardından, doku yüzeyinden ikişer kere %20 ACN ile gel loading pipette tip yardımıyla toplanan peptitler 0.5 ml tüplere aktararak Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay kit ile peptit konsantrasyonu tayin edilmiştir.

1000-25 μg/ml çalışma aralığı olan ve biüret reaksiyonu sonucu 480 nm absorbansa sahip parlak kırmızı bir kompleks oluşturma esasına dayanan bu kolorimetrik tayin yönteminde spektrofotometre cihazı kullanılarak 480 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Ölçüm sonrası konsantrasyonu önceden belirli peptide digest standartlarından elde edilen değerlerin oluşturduğu grafiğın lineer denklemi kullanılarak miktarı belirlenmek istenen peptitlerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.3.4 LC-MS/MS ile protein tanımlaması

İlk olarak 10 mM Sitrata (pH 6) antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile muamele edilmiş örnekler ile antijen geri kazanımı tamponuna geçen potansiyel proteinlerin tespiti için LC-MS/MS analizi yapılmıştır. Daha sonrasında 25 ng/μl, 50 ng/μl, 75 ng/μl, 100 ng/μl, 25 ng/μl + %10 ACN, 75 ng/μl + %10 ACN konsantrasyonlarında tripsin, dokular üzerine 8 katman olarak püskürtüldükten sonra lam üzerinden toplanan peptitlerin profillerinin belirlenmesi için LC-MS/MS analizi yapılmıştır. Son olarak, optimizasyonda kullanılan tüm FFPE mide biyopsi örneklerinin protein profilleri LC-MS/MS analizi ile tespit edilmiştir.

LC-MS/MS analizi için örnekler FASP yöntemi ile hazırlanmıştır. Dokularının homojenizasyonu için UPX Universal Protein Extraction Kit (Expedeon) kullanılmış ve üretici firmanın tavsiye ettiği protokol izlenmiştir. 30 kDa cut-off'lu filtreler kullanılarak uygulanan bu filtreli sistemde örnek hazırlığı örneklerin üzerine proteaz inhibitör kokteyli (PIC) eklenerek başlamıştır. Sonrasında örnekler Hielscher UP200St (Hielscher Ultrasound Technology) sonikatöre alınarak 5 döngü olacak şekilde 5 saniye sonikasyona bırakılmıştır. Her döngü arasında örneklerin bulunduğu mikrosantrifüj tüpleri 20 saniye buzda bekletilmiştir. Ardından örnekler spin atılarak buz üzerine alınmıştır ve 50 mM Amonyum Bikarbonat ile birlikte PIC eklenerek vortekslenmiştir. 10 saniye boyunca sonikasyon aşaması tekrarlanarak örnekler yeniden vortekslenmiştir. Sonrasında disülfid bağlarının redüksiyonu için dithiothreitol (DTT) ajanı eklenerek vortekslenmiş ve örnekler 55°C'ye ayarlanmış Thermoshaker'a alınarak 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşama ile homojenizasyonun bitmesinin ardından örnekler 4°C dolapta soğumaya bırakılmıştır. Daha sonrasında sülfhidril gruplarının alkalizasyonu için iodoacetamide (IAA) ajanı eklenerek örnekler 1 dakika boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir ve sonrasında karanlık bir ortamda 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerin üzerine tripsin enzimi eklenerek, tüpler parafilm ile sarılmış ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takip eden günde örnekler 18.000 g'de 10 dakika boyunca 25°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası örnekler yeni lobind tüplere aktararak etiketlenmiştir ve santrifüj aşaması tekrarlanmıştır.

Daha sonraki aşamada, örnekler %0.1 formik asit (FA) ile seyreltilerek cihaza uygun vial tüplere aktarılmıştır. Analiz için Acquity UPLC M-Class SYNAPT Xevo G2-XS Q TOF (Waters) cihazı kullanılmış ve analizden önce cihaza özgü olan MassLynx yazılımı (V4.1-Waters) kullanılarak kalibrasyon ve dedektör ayarları yapılmıştır. Metot SONAR mod ile, pozitif iyon ve sensitivite moduna getirilerek üretilen triptik peptitler HSS T3 (Waters) nano kolon içerisinde yaklaşık 300 nL/dk akış hızında ters faz kromatografisine tabi tutulmuştur. %5-95 gradient aralığında peptitlerin hidrofobikliğine göre arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlanmış ve iyonlaşma sonucu kütle spektrometresinde 50-2000 m/z aralığında analiz edilmiştir. Analiz esnasında, MS analizi gerçekleştirilerek peptidin bütünü hakkında bilgi toplanmasının ardından MS/MS analizi yapılarak peptitler parçalanıp sekans bilgisi elde edilmiştir. LC-MS/MS analizi sonucu elde edilen hem veriler, Progenesis QI yazılımı (Waters) ile analiz edilmiştir. Protein tanımlamaları ise güncel UniProt veri bankasındaki protein sekans bilgisi ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Panther analizi ile tayin edilen proteinlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırma yapılmıştır (63). Elde edilen proteinlerin sınıflandırmaları ve moleküler fonksiyonları Panther-Gene List Analysis (<http://www.pantherdb.org/>) ile yapılmıştır.

3.3.5 MALDI-TOF analizi

MALDI-Görüntüleme yönteminin matriks basamağının optimize edilmesine yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları aşağıda özetlendiği gibi yapılmaya devam edilmiştir.

İlk olarak farklı α -CHCA matriks konsantrasyonu ve kompozisyonlarının peptit profillerine etkisi dried-droplet yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu doğrultuda; Bovine serum albumin (BSA) %0.1 trifloroasetik asit (TFA) ile üreticinin talimatlarına göre çözdürülerek hazır hale getirilmiştir. 5 mg/ml, 7 mg/ml ve 10 mg/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda α -CHCA, %50 ve %70 asetonitril (ACN) ve değişen trifloroasetikasit (TFA) (%2, %1, %0.5, %0.2 ve %0.1) konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. BSA protein digest solüsyonu dried-droplet yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır.

Kısaca, 1 µl BSA protein digest AnchorChip Target'ta (Bruker Daltonics) hidrofobik halka ile çevrili hidrofilik core üzerine el ile spotlanmıştır. Sonrasında BSA üzerine 1 µl farklı konsantrasyonlarda MALDI matriks solüsyonları spotlanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Matriks ile 1:1 oranında eklenen BSA triptik peptitlerinin sinyal yoğunlukları karşılaştırılmıştır. Analiz, RapifleX MALDI Tissue Typer (Bruker Daltonics) kütle spektrometresinde ve pozitif iyon reflektör modunda 900-3500 m/z aralığında gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometresi verileri, her spot başına 2000 laser shot kullanılarak elde edilmiştir. BSA protein digest analizi bağımsız olarak 2 tekrarlı çalışılmıştır. Pik listeleri FlexAnalysis (Bruker Daltonics) yazılımı kullanılarak oluşturulmuş olup her pik için, sinyal/gürültü (signal-to-noise, S/N) oranı 3'ten daha yüksek, bağıl yoğunluk (relative intensity) eşiği (%) 0.5'ten daha yüksek seçilmiştir. BSA peptit piklerinin mutlak yoğunluklarının (absolute intensity) karşılaştırılması için, üretici tarafından sağlanan BSA triptik digestlerinin ana fragmanları ve bunların moleküler kütleleri kullanılmıştır. BSA triptik peptitleri için mutlak yoğunluklar, ücretsiz olarak temin edilebilen açık-kaynaklı yazılım mMass ([//www.mmass.org](http://www.mmass.org)) kullanılarak elde edilmiştir.

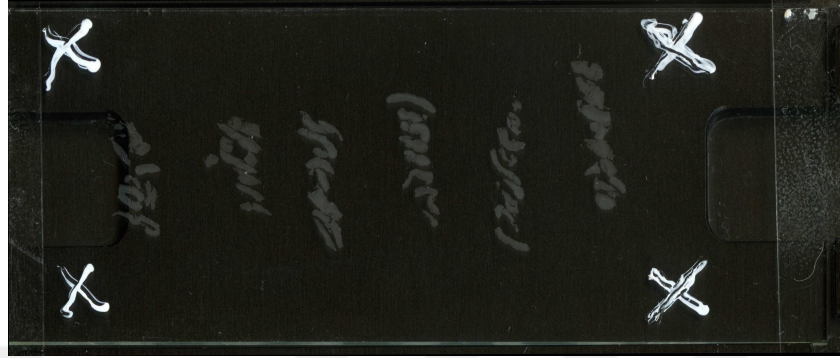
İkinci olarak, α-CHCA matriks kristallerinin şekilleri ve boyutları ışık mikroskobu ile farklı objektifler altında incelenmiştir.

3.3.6 MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi analizi

MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi analizi için protein konsantrasyonu en yüksek çıkan antijen geri kazanımı tamponlarından, 10 mM Sitrata (pH 6) tampon çözeltisi kullanılarak İndiyum Kalay Oksit (ITO) kaplı lam üzerine alınan biyopsi örneklerinin doku kesit kalınlığının belirlenmesine yönelik çalışma yapılmıştır.

FFPE dokulardan elde edilen 3 µm ve 5 µm'lik kesitler MALDI-Görüntüleme analizi için İndiyum Kalay Oksit (ITO) kaplı lamlara (Bruker Daltonics, Almanya) alınmıştır. 3 µm ve 5 µm'lik kesitler aynı deneysel prosedürün uygulanması ve olası biasın engellenmesi adına ITO kaplı lamların üzerine incelenmek üzere yan yana yerleştirilmiştir (Şekil 2).

Böylece, iki farklı kalınlıktaki dokuya aynı anda tüm işlemler uygulanmakta ve ardından aynı anda RapifleX MALDI Tissue Typer (Bruker Daltonics) cihazında analizi karşılaştırmalı olarak aynı koşullar altında analiz edilmektedir.



Şekil 2 ITO kaplı lam üzerine alınmış sırasıyla 5 mikron ve 3 mikron olmak üzere iki farklı kalınlıktaki dokunun optik görüntüsü

Dokunun MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi yöntemine hazırlanması için, dokunun deparafinizasyon, rehidrasyonu ve antijen geri kazanımı aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

1. 1 saat boyunca 60 °C'lik etüvde lamların fiziksel deparafinizasyonu
2. Kimyasal deparafinizasyon için 2x5 dakika ksilen ile muamele
3. Rehidrasyon:
 - 2x3 dakika %100 EtOH
 - 1x3 dakika %70 EtOH
 - 1x3 dakika %30 EtOH
 - 2x3 dakika dH₂O
4. 10 mM Sitrat (pH 6) tampon çözeltisi veya 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltisi ile antijen geri kazanımı yapılmıştır.

Daha sonrasında, 25 ng/µl, 75 ng/ul + %10 ACN veya 100 ng/ul + %10 ACN tripsin enzimi SunCollect örnek hazırlama istasyonu (SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Almanya) ile doku üzerine püskürtülmüştür.

SunDigest inkübasyon istasyonunda (SunChrom Wissenschaftliche Gerate GmbH, Almanya) 50 °C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonrasında ise, biyopsi dokularının üzerine 5 mg/ml veya 7 mg/ml konsantrasyonda α -CHCA matriks %70 ACN ve %1 TFA kompozisyonlarında hazırlanarak uygulanmıştır.

Uygulanan protokol sonucunda elde edilen peptitler RapiFlex MALDI Tissue Typer (Bruker Daltonics) ile analiz edilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde, monoizotopik peptit sayısı, histolojik özelliklerle ilişkili olarak peptit lokalizasyonları ve hiyerarşik kümeleme analizleri (FlexImaging ve ScilSLab (BrukerDaltonics)) kullanılmıştır.

Tüm çalışma dokularına Total Ion Count (TIC) normalizasyonu uygulanmıştır. Dokularda farklı peptitler görüntülenmiş ve peptit lokalizasyonları FlexImaging yazılımı (Version 4.1, Bruker Daltonics) kullanılarak belirlenmiştir.

Sitrat antijen geri kazanımı uygulanan 3 μ m ve 5 μ m'lik kesitlerdeki dokularda sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptit ± 0.5 Da aralığında seçilmiştir.

MALDI-Görüntüleme optimizasyon basamaklarından 10 mM Sitrat (pH 6) ile yapılan antijen geri kazanımına ait spektrum Comma Seperated Values (CSV) dosyası olarak mMass Open Source For Mass Spectrometry yazılımına aktarılmıştır. Aktarılan spektrumdan pikler aşağıdaki parametreler baz alınarak ve de-isotoping yapılarak seçilmiştir.

- Signal/Noise Threshold: 3.5
- Abs. Intensity threshold: 0.0
- Rel. Intensity Threshold: 0.5
- Picking height: %80

4 BULGULAR

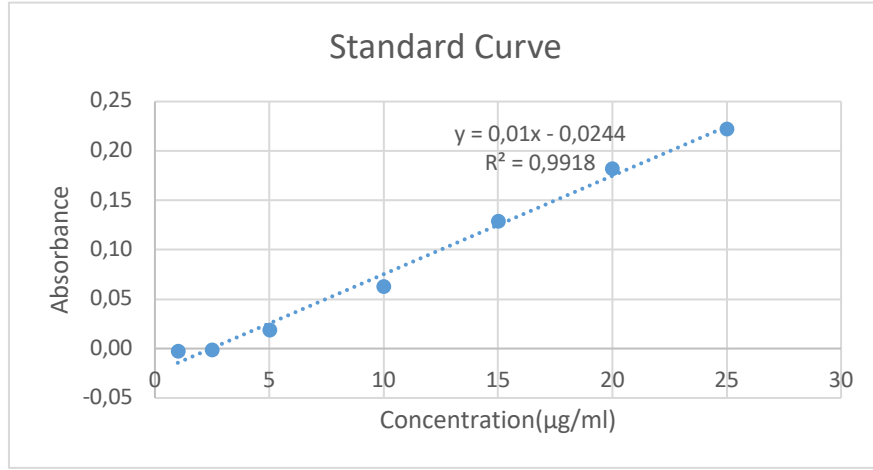
4.1 Antijen Geri Kazanımı Optimizasyonu

4.1.1 Örneklere ait uygun antijen geri kazanımı tamponlarının belirlenmesi

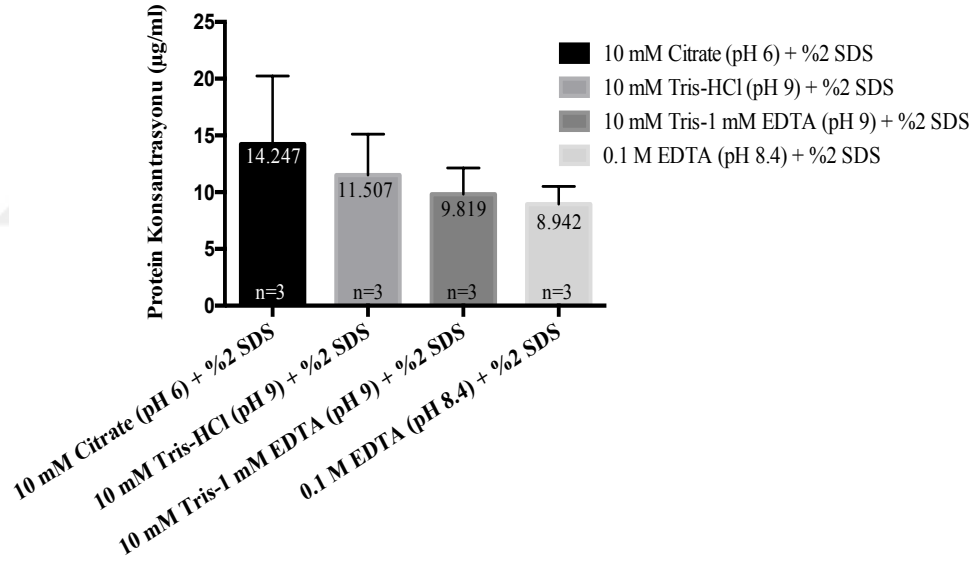
Optimizasyon çalışmalarının ilk basamağında antijen geri kazanımı için, MALDI-Görüntüleme yönteminde tüp içerisinde en iyi antijen geri kazanımı tamponunu mide biyopsi örnekleri için tespit etmek hedefi ile 42 mikron doku kesit kalınlığı kullanılarak farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltileri denenmiş olup protein konsantrasyonuna etkisi değerlendirilmiştir.

İlk protokolde 10 mM Sitrat (pH 6) + %2 SDS, ikinci protokolde 10 mM Tris-HCl (pH 9) + %2 SDS, üçüncü protokolde 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 9) + %2 SDS ve dördüncü protokolde 0.1 M EDTA (pH 8.4) + %2 SDS tampon çözeltileri ile farklı antijen geri kazanımı prosedürleri uygulanmıştır. Dört farklı protokolün uygulanmasının ardından proteinler metanol/kloroform presipitasyonu yöntemi ile temizlenmiş olup protein konsantrasyonları ölçülmüştür.

Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonu tayini sonucunda üç tekrarlı olarak hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki BSA standartları ve blank olarak kullanılan boş Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonu tayini sonucunda üç tekrarlı olarak hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki BSA standartları ve blank olarak kullanılan boş boya solüsyonuna ait spektrofotometrik absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür. BSA standartlarının konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak çizilen grafikte eğri denklemi ve R^2 değeri Şekil 3'te gösterildiği gibi hesaplanmıştır. Elde edilen eğri denkleminde, örneklerin absorbans değerleri kullanılarak bilinmeyen protein konsantrasyonları Şekil 4'deki gibi bulunmuştur.



Şekil 3 BSA standartlarının konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak çizilen grafik ile hesaplanan eğri denklemleri ve R² değeri



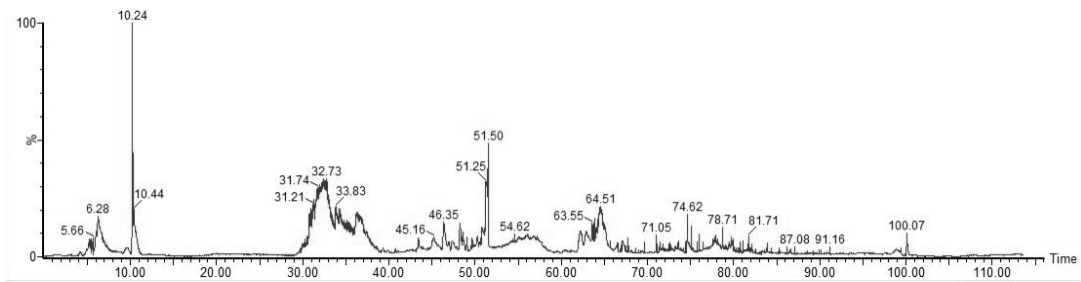
Şekil 4 Dört farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltisi sonucunda elde edilen protein konsantrasyonlarının karşılaştırılması

Bu çalışmanın sonucunda, 10 mM Sitrat (pH 6) + %2 SDS tampon çözeltisi ile elde edilen protein konsantrasyonunun en yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçtan dolayı, bundan sonra yapılan tüm optimizasyon basamaklarında sitrat tampon çözeltisi ile antijen geri kazanımı basamağı yapılmıştır.

4.1.2 Antijen geri kazanımı tamponuna geçen proteinlerin tespiti

MALDI-Görüntüleme çalışmalarında antijen geri kazanımı tampon çözeltisine proteinlerin geçtiği bilinmemektedir. Bu sebep ile antijen geri kazanımı solüsyonuna protein geçip geçmediği kontrol edilmek üzere SDS içermeyen yalnızca 10 mM Sitrata (pH 6) antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile muamele edilmiş örnekler Yöntem kısmında belirtildiği şekilde “In-Solution Tryptic Digestion” yöntemi ile hazırlanarak LC-MS/MS analizi sonucu bu tampon çözeltiye geçen proteinler incelenmiştir.

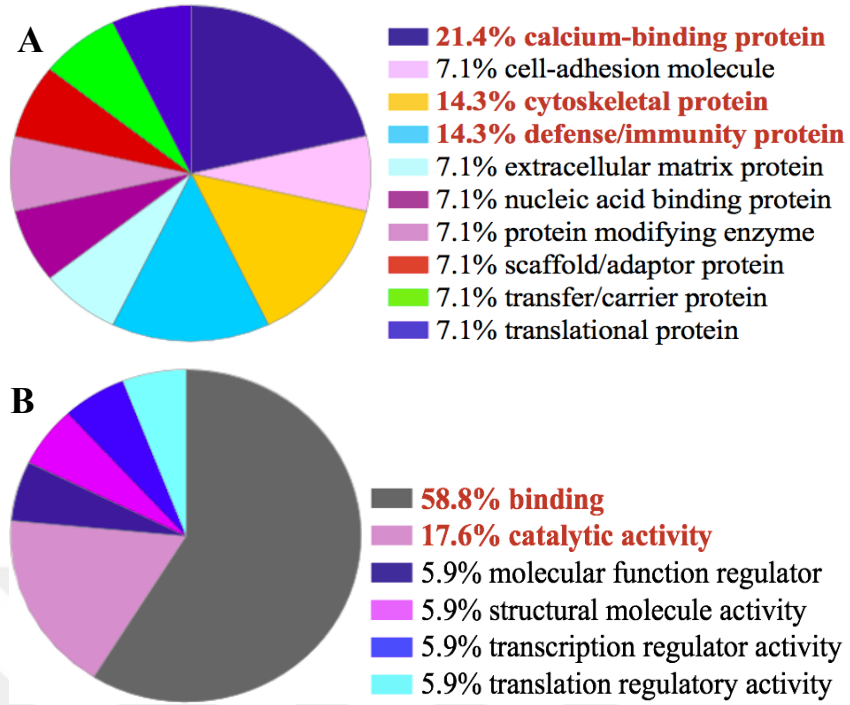
LC-MS/MS analizi sonucunda, 10 mM Sitrata (pH 6) antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile muamele edilmiş örneklerden herhangi bir filtreleme ve istatistiksel test olmaksızın toplamda 37 protein tanımlaması yapılmıştır. Analiz edilen örnekler için Progenesis QI sisteminde total iyon kromatogramları incelenmiştir. Örnek bir kromatogram Şekil 5’de verilmiştir. Elde edilen pik listeleri, Progenesis yazılımlarındaki standart iş akışı ile ham veri dosyalarından üretilmiştir. Protein tanımlaması ise; Uniprot insan referans protein veri tabanı ile karşılaştırılarak yapılmış olup analiz sonucunda keratin başta olmak üzere tampon çözeltiye geçen proteinler tespit edilerek Tablo 3’te verilmiştir. Tanımlanan proteinlerin çeşitli fonksiyonlarını analiz etmek için PANTHER programı kullanılmıştır. Antijen geri kazanımı tamponunda tespit edilen proteinlerin protein sınıflandırması ve moleküler fonksiyonları gösteren pasta grafik dağılımı Şekil 6’da verilmiştir.



Şekil 5 10 mM Sitrata (pH 6) antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile muamele edilmiş örneklerin LC-MS/MS analizi ile belirlenen farklı m/z değerlerine sahip çeşitli peptitlerin kromatogram görüntüsü

Tablo 3 10 mM Sitrat (pH 6) antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile muamele edilmiş örneklerin LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinler

Accession	Protein Name	Peptide count	Unique peptides
P0CG47	Polyubiquitin-B	1	1
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	13	3
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	12	2
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B	11	0
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	29	22
P05109	Protein S100-A8	1	1
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16	15	7
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	38	30
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	9	1
P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5	13	9
P14923	Junction plakoglobin	2	2
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4	4	0
P31151	Protein S100-A7	1	1
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	15	14
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	25	17
P47929	Galectin-7	1	1
P60709	Actin, cytoplasmic 1	1	1
Q72794	Keratin, type II cytoskeletal 1b	4	0
Q9NZT1	Calmodulin-like protein 5	2	2
Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17	10	3
P31944	Caspase-14	1	1
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	1	1
P01834	Immunoglobulin kappa constant	1	1
P02768	Albumin	1	1
Q9UHR6	Zinc finger HIT domain-containing protein 2	1	1
P07355	Annexin A2	1	1
P62805	Histone H4	1	1
Q08554	Desmocollin-1	1	1
P31947	14-3-3 protein sigma	1	1
Q9NR56	Muscleblind-like protein 1	2	2
Q9NVN3	Synembryn-B	2	2
P29508	Serpin B3	2	2
P0CG47	Polyubiquitin-B O	2	2
O95876	ND repeat-containing and planar cell polarity effector protein	2	2
Q8N1N4	Keratin, type II cytoskeletal 78	2	2
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	3	3
P15924	Desmoplakin	15	15



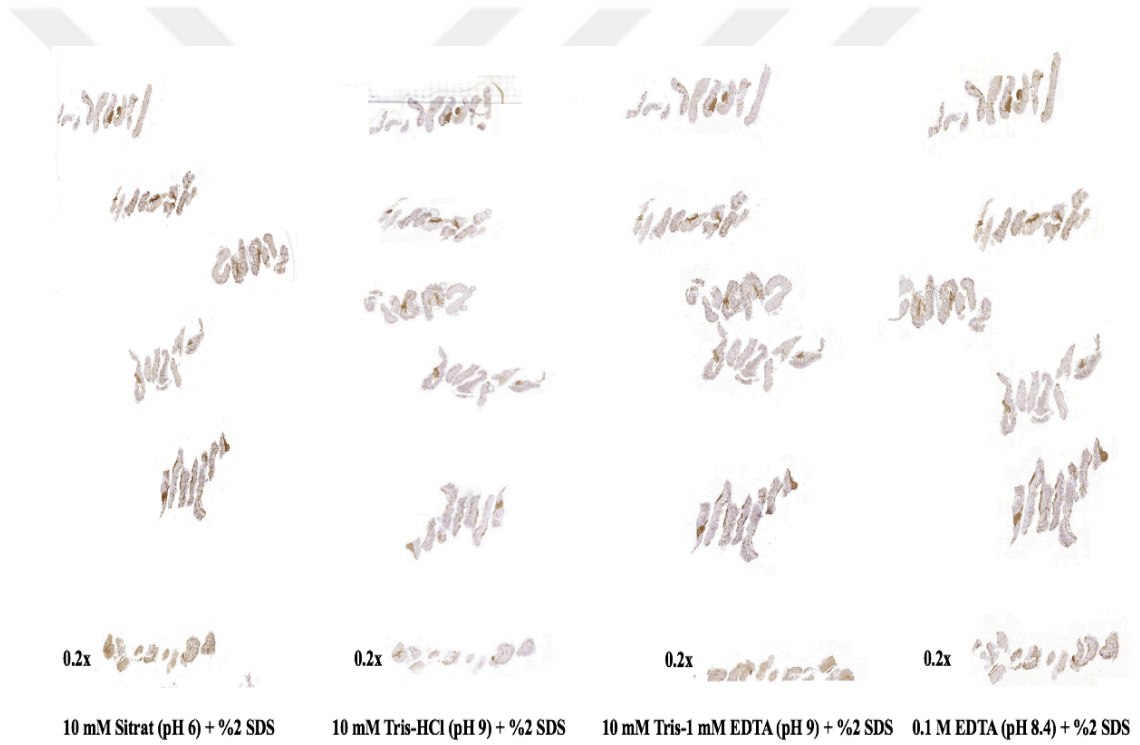
Şekil 6 Antijen geri kazanımı tamponunda tespit edilen proteinlerin; protein sınıflandırması(A) ve moleküler fonksiyonları(B) gösteren pasta grafik dağılımı

LC-MS/MS analizi sonucunda tanımlanan proteinlerde keratin başta olmak üzere tampon çözeltiliye geçen 37 protein gözlemlenmiştir (Tablo 3). Tanımlanan 37 protein ile PANTHER yazılımı kullanılarak protein sınıflandırması ve moleküler fonksiyon analizi yapılmıştır. Tanımlanan proteinler ile yapılan protein sınıflandırması Şekil 6(A)'da, moleküler fonksiyon analizi Şekil 6(B)'de ifade edilmiştir. Proteinlerin, sınıflarına göre dağılım gösterdiği grafikte en yüksek yüzdeler dağılıma sahip üç grup, moleküler fonksiyonlarına göre dağılım gösterdiği grafikte ise en yüksek yüzdeler dağılıma sahip iki grup kırmızı ile gösterilmiştir. Tanımlanan 37 protein ile yapılan protein sınıflandırılmasında, proteinler sınıflarına göre 10 gruba ayrılmıştır. Proteinlerin yaklaşık %21.5'u kalsiyum bağlayan proteinlerden ve bağışıklık sistemiyle ilgili proteinlerden oluştuğu görülmektedir (Şekil 6A). Tanımlanan 37 protein ile yapılan moleküler fonksiyon analizinde, proteinler moleküler fonksiyonlarına göre 6 gruba ayrılmıştır. Proteinlerin yaklaşık %70inde yine bağlama ve katalitik aktivitelerinin olduğu görülmektedir (Şekil 6B).

4.1.3 İmmünohistokimya analizi

Tampon çözeltilerden 10 mM Sitrat (pH 6) + %2 SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 9) + %2 SDS, 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 9) + %2 SDS, 0.1 M EDTA (pH 8.4) + %2 SDS çözeltiler ile muamele edilmiş örnekler immünohistokimya analizi yapılarak biyopsi örneklerinin boyama durumları incelenmiştir (Şekil 7).

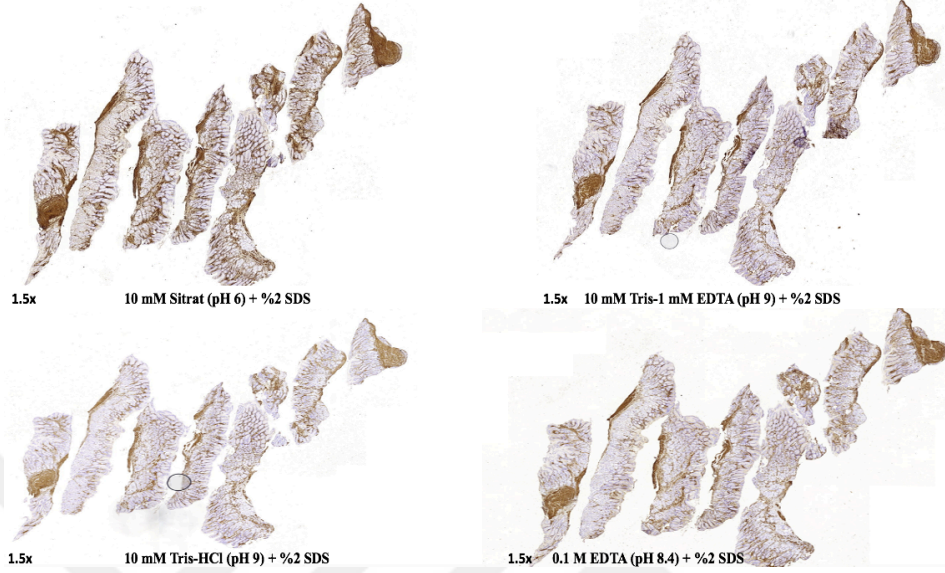
Aktine spesifik “Actin, Alpha-Smooth Muscle, α -SMA” monoklonal antikor ile mideye ait doku kesitlerinde miyofibroblastları ve miyoepitelyal hücreleri boyayan immünohistokimyasal boyama yapılmıştır.



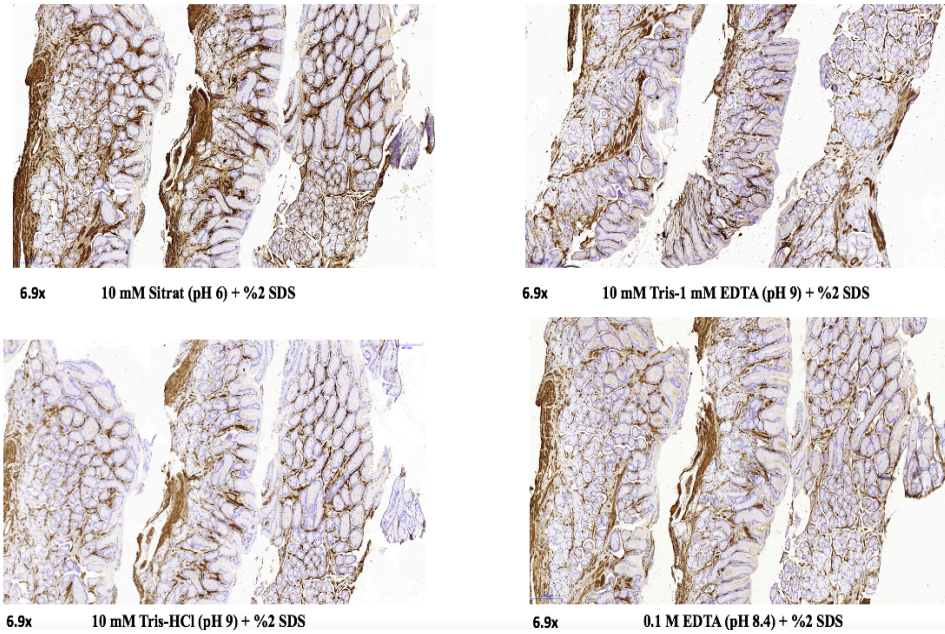
Şekil 7 Dört farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltisinin α -SMA antikor ile immünohistokimya analiz görüntüleri (0.2x objektif büyütme ile)

Midenin antrum bölgesine uygulanan α -SMA immün boya ile boyama sonucunda mide dokusunda 10 mM Sitrat (pH 6) tampon çözeltisi kuvvetli boyanma gösterirken 10 mM Tris-HCl (pH 9) + %2 SDS, 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 9) + %2 SDS, 0.1 M EDTA (pH 8.4) + %2 SDS tampon çözeltileri zayıf boyama göstermiştir (Şekil 7).

Lam üzerinde yer alan 6 dokudan bir tanesi seçilerek daha yüksek oranda büyütme ile immün boyamanın etkisi Şekil 8 ve Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 8 Dört farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltisinin α -SMA antikor ile immünohistokimya analizi görüntüleri (1.5x objektif büyütme ile 5.dokuya aittir)



Şekil 9 Dört farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltisinin α -SMA antikor ile immünohistokimya analizi görüntüleri (6.9x objektif büyütme ile 5.dokuya aittir)

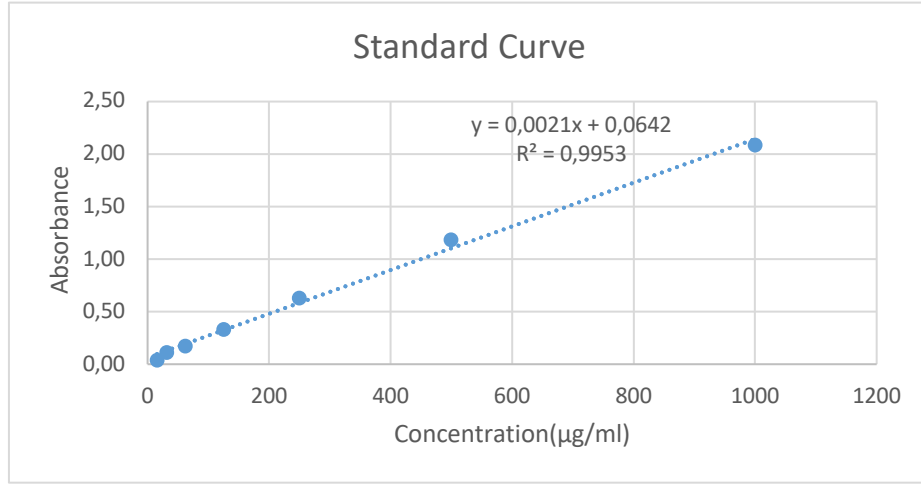
Dokulara uygulanan 10 mM Sitrata (pH 6) + %2 SDS tampon çözeltisi ile antijen geri kazanım sonrasında diğer üç farklı tampon çözeltiye göre daha yoğun boyama gözlemlenmiştir. Sitrata tamponu ile birlikte diğer üç tampon çözeltinin etkinliğinin immünohistokimya yöntemi ile analiz edilmesi sonucu, önceki antijen geri kazanımı optimizasyon çalışmalarını doğrular niteliktedir.

4.2 Tripsin Miktarı Optimizasyonu

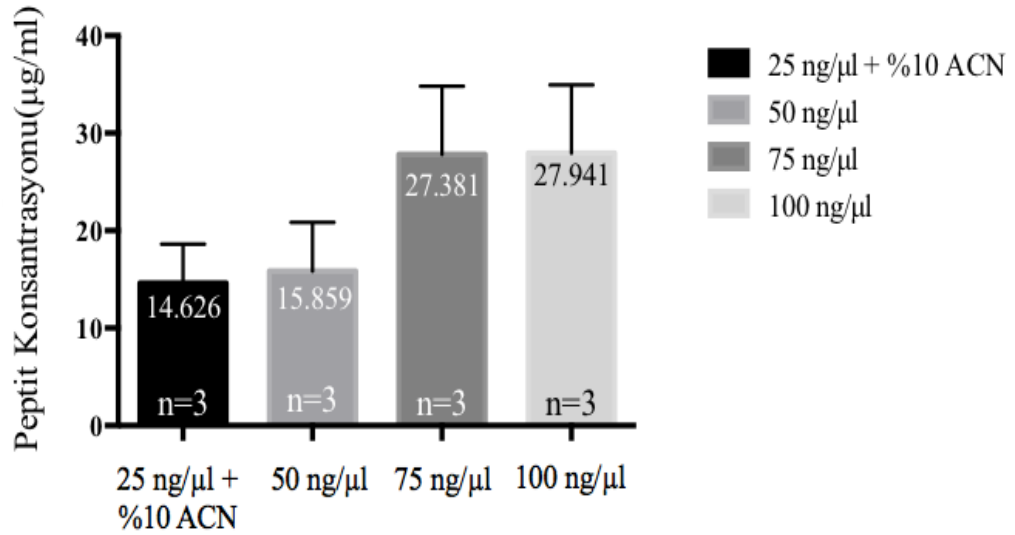
4.2.1 Peptit konsantrasyonlarının belirlenmesi

Yapılan ön optimizasyon çalışması ile tripsin uygulama parametreleri belirlenmiştir. Doku üzerine tripsin uygulaması, antijen geri kazanımının ardından uygulanmıştır. Bu amaçla, uygun konsantrasyonda tripsin çözeltisinin belirlenebilmesi için 25 ng/μl, 50 ng/μl, 75 ng/μl ve 100 ng/μl olmak üzere dört farklı tripsin konsantrasyonu Yöntem kısmında belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Tripsin proteazı ile doku proteinlerinin peptitlere parçalanmasının ardından Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay kit ile üreticinin talimatlarına göre peptit konsantrasyonu tayin edilmiştir. Dört farklı tripsin konsantrasyonu uygulanmasının ardından, kolorimetrik tayin yöntemi ile peptit konsantrasyonu tayini sonucunda üç tekrarlı olarak hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki BSA standartlarına ait spektrofotometrik absorbans değerleri 480 nm dalga boyunda ölçülmüştür. BSA standartlarının konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak çizilen grafikte eğri denklemi ve R^2 değeri Şekil 10'da gösterildiği gibi hesaplanmıştır. Elde edilen eğri denkleminde, örneklerin absorbans değerleri kullanılarak bilinmeyen peptit konsantrasyonları Şekil 11'deki gibi bulunmuştur.



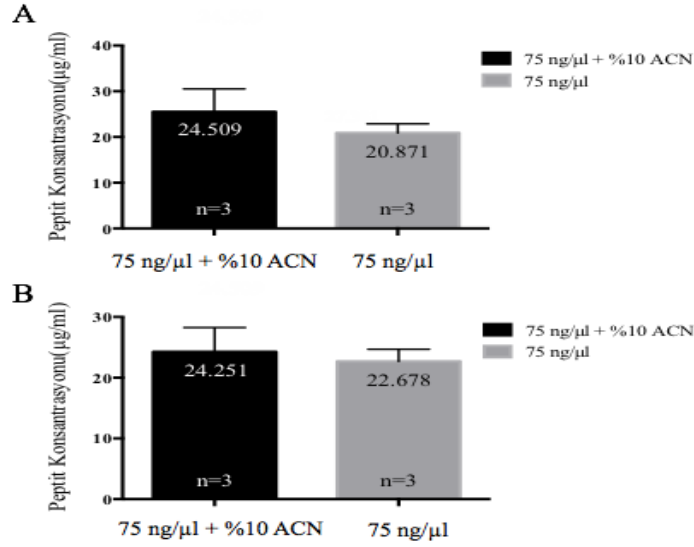
Şekil 10 BSA standartlarının konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak çizilen grafik ile hesaplanan eğri denklemini ve R^2 değeri



Şekil 11 Dört farklı enzim konsantrasyonu sonucunda elde edilen peptit konsantrasyonlarının karşılaştırılması

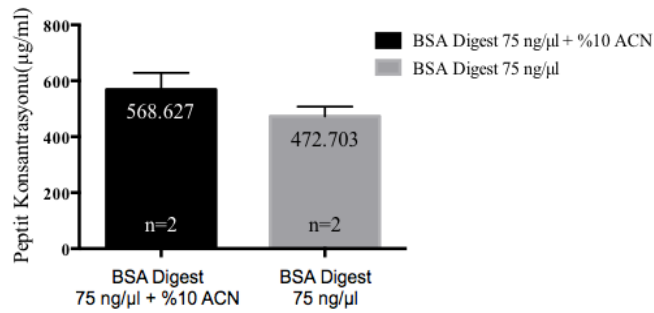
Dört farklı konsantrasyonda (25 ng/µl, 50 ng/µl, 75 ng/µl ve 100 ng/µl) tripsin enzimi ile doku proteinlerinin peptitlere parçalanması sonucunda elde edilen peptit konsantrasyonları Şekil 11’de karşılaştırılmıştır ve peptit konsantrasyonu en yüksek çıkan 75 ng/µl ve 100 ng/µl arasında önemli bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$).

Tripsin solüsyonu içine ACN eklemek konsantrasyonu arttırmakta olup, 75 ng/μl tripsin konsantrasyonu ile farklı günlerde 3 replika yapılan iki deney tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir (Şekil 12).



Şekil 12 75 ng/μl + %10 ACN ve 75 ng/μl enzim konsantrasyonu sonucunda elde edilen peptit konsantrasyonlarının karşılaştırılması (A, 1.gün ve B, 2.gün yapılan deney sonucunu göstermektedir)

ACN eklenen tripsinli dokularda peptit konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç pozitif kontrol olarak kullanılan BSA üzerinde de gözlemlenmiştir(Şekil 13).

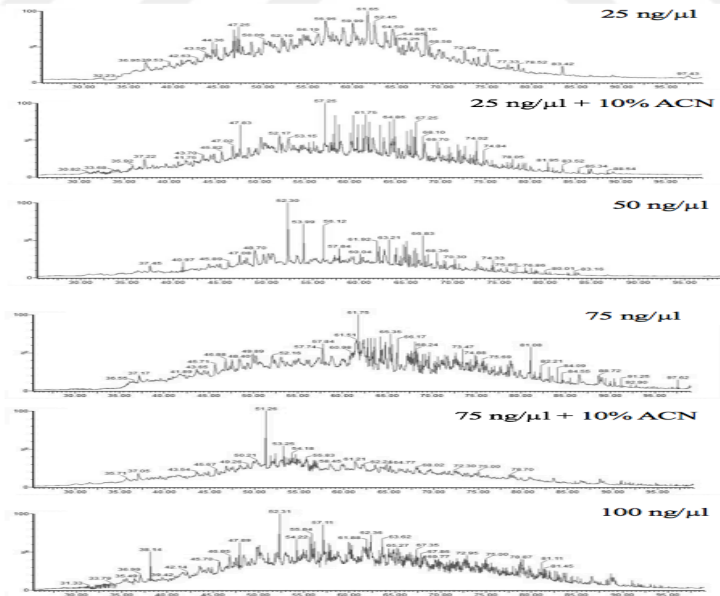


Şekil 13 75 ng/μl + %10 ACN ve 75 ng/μl enzim konsantrasyonu sonucunda pozitif kontrol olarak kullanılan BSA proteininden elde edilen peptit konsantrasyonlarının karşılaştırılması

4.2.2 LC-MS/MS yöntemi ile peptit tanımlaması

Farklı konsantrasyonlardaki (25 ng/μl, 25 ng/μl + %10 ACN, 50 ng/μl, 75 ng/μl ve 100 ng/μl) tripsin enzimi ile doku proteinlerinin parçalanmasının ardından, doku yüzeyinden %20 ACN ile toplanan peptitlerin peptit konsantrasyonu tayin edilmiş olup LC-MS/MS analizi sonucu tayin edilen proteinler incelenmiştir.

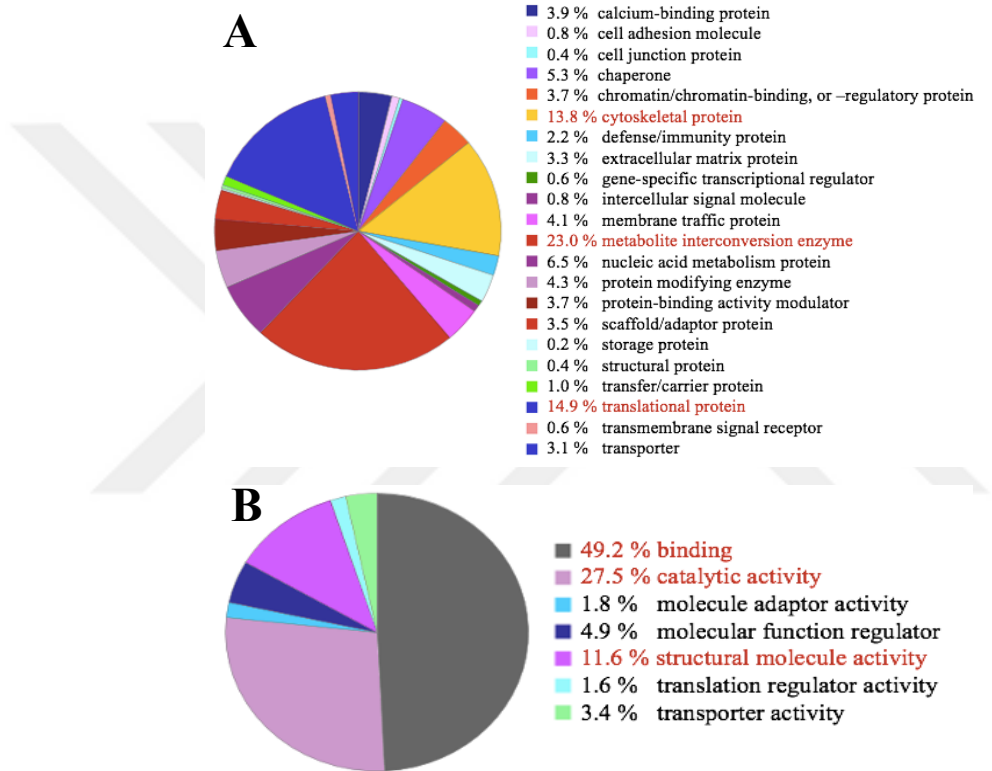
LC-MS/MS analizi sonucunda, örneklerden herhangi bir filtreleme ve istatistiksel test olmaksızın toplamda 25 ng/μl için 199 protein, 25 ng/μl + %10 ACN için 245 protein, 50 ng/μl için 127 protein, 75 ng/μl için 354 protein, 100 ng/μl için 382 protein tanımlaması yapılmıştır. Tripsin optimizasyonu deneyleri esnasında deneyin tekrarlanabilirliğinin gösterilmesi adına 75 ng/μl ve 75 ng/μl + %10 ACN tripsin konsantrasyonları ile yapılan iki örnek de analiz edilmiş olup, 75 ng/μl için 389 protein, 75 ng/μl + %10 ACN için 485 protein tanımlaması yapılmıştır. Analiz edilen örnekler için Progenesis QI sisteminde total iyon kromatogramları incelenmiş olup yedi örneğe ait kromatogramlar Şekil 14’de verilmiştir.



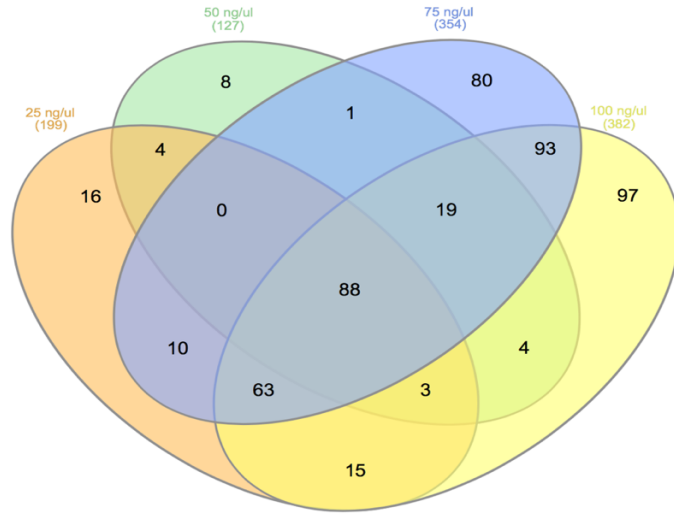
Şekil 14 Farklı konsantrasyonlarda tripsin enzimi uygulanan örneklerin LC-MS/MS analizi ile belirlenen farklı m/z değerlerine sahip çeşitli peptitlerin kromatogram görüntüleri

Elde edilen proteinlerin sınıflandırmaları ve moleküler fonksiyonları Panther-Gene List Analysis ile yapılmış olup pasta grafik dağılımları Şekil 15’de verilmiştir.

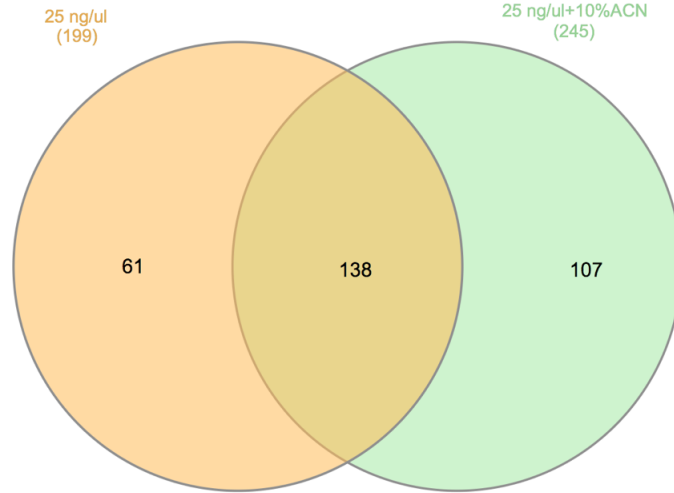
Venn diyagramı ile farklı enzim konsantrasyonlarında tespit edilen ortak ve farklı proteinler karşılaştırılmıştır. Elde edilen proteinlerin gruplandırılarak karşılaştırmaları InteractiVenn (<http://www.interactivenn.net/#>) ile yapılmış olup Şekil 16 – Şekil 18 arasında verilmiştir.



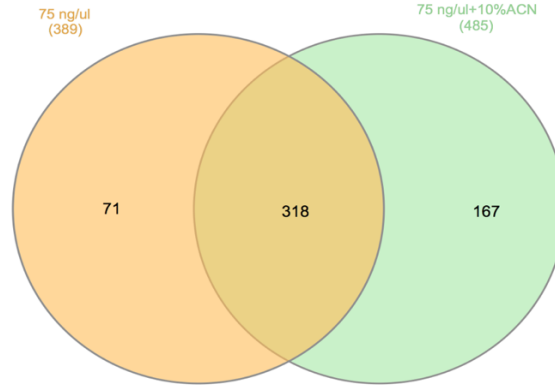
Şekil 15 LC-MS/MS analizi sonucunda tespit edilen tüm proteinlerin; protein sınıflandırması(A) ve moleküler fonksiyonları(B) gösteren pasta grafik dağılımı



Şekil 16 25 ng/μl, 50 ng/μl, 75 ng/μl ve 100 ng/μl olmak üzere dört farklı tripsin konsantrasyonuna ait LC-MS/MS analizi sonucunda tespit edilen proteinlerin venn diyagramı



Şekil 17 25 ng/μl ve 25 ng/μl + %10 ACN tripsin konsantrasyonlarına ait LC-MS/MS analizi sonucunda tespit edilen proteinlerin venn diyagramı



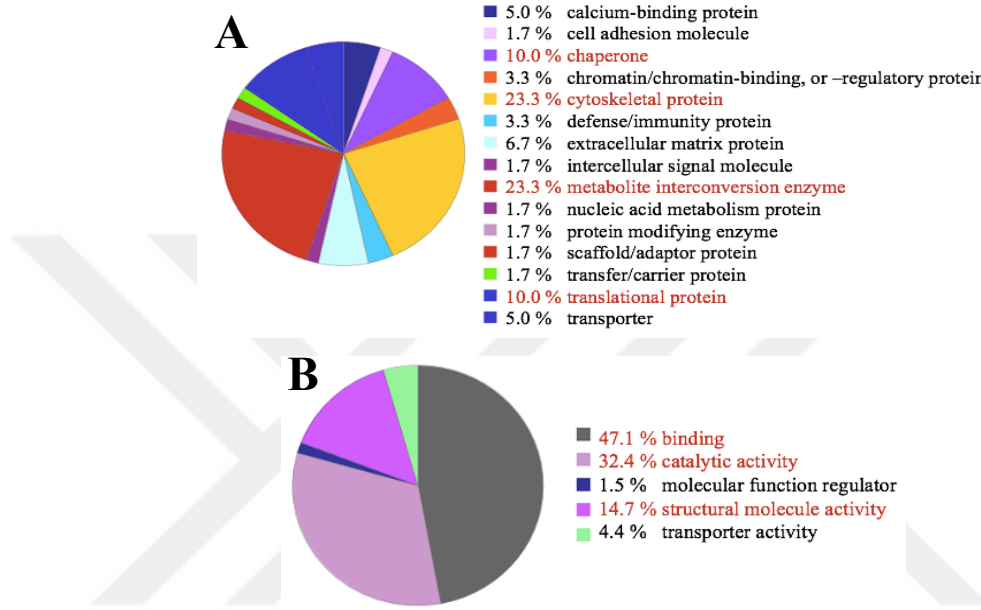
Şekil 18 75 ng/μl ve 75 ng/μl + %10 ACN tripsin konsantrasyonlarına ait LC-MS/MS analizi sonucunda tespit edilen proteinlerin venn diyagramı

LC-MS/MS analizi sonucunda altı grup için toplamda 2181 protein tanımlaması yapılmıştır. Tanımlanan 2181 protein ile PANTHER yazılımı kullanılarak protein sınıflandırması ve moleküler fonksiyon analizi yapılmıştır. Tanımlanan proteinler ile yapılan protein sınıflandırması Şekil 15(A)'da, moleküler fonksiyon analizi Şekil 15(B)'de ifade edilmiştir. Proteinlerin, hem sınıflarına göre hem de moleküler fonksiyonlarına göre dağılım gösterdiği iki grafikte de en yüksek yüzdelik dağılıma sahip üç grup kırmızı ile gösterilmiştir.

Tanımlanan 2181 protein ile yapılan protein sınıflandırılmasında, proteinler sınıflarına göre 22 gruba ayrılmıştır. Proteinlerin %23'ü temel olarak küçük molekülleri dönüştürücü enzimlerden, yaklaşık %14'ü hücre iskeletini oluşturan proteinlerden ve yaklaşık %15'inin translasyonel proteinlerden oluştuğu görülmektedir (Şekil 15A). Tanımlanan 2181 protein ile yapılan moleküler fonksiyon analizinde, proteinler moleküler fonksiyonlarına göre 7 gruba ayrılmıştır. Proteinlerin yaklaşık %50'si bağlama ve %30'unun katatilik aktivitelerinin olduğu görülmektedir (Şekil 15B).

Venn diyagramları sonucunda 25 ng/μl, 50 ng/μl, 75 ng/μl ve 100 ng/μl tripsin konsantrasyonuna ait LC-MS/MS analizi sonucunda dört grup arasında ortak 88 protein tespit edilmiş olup, tanımlanan ortak proteinlerin çeşitli fonksiyonlarını analiz etmek için PANTHER analiz programı kullanılarak sınıflandırma yapılmıştır (63).

Tüm enzim konsantrasyonlarında ortak tespit edilen proteinlerin sınıflandırmaları ve moleküler fonksiyonları Panther-Gene List Analysis ile yapılmış olup pasta grafik dağılımları Şekil 19’da verilmiştir. Proteinlerin, hem sınıflarına göre hem de moleküler fonksiyonlarına göre dağılım gösterdiği iki grafikte de en yüksek yüzdelik dağılıma sahip üç grup kırmızı ile gösterilmiştir.



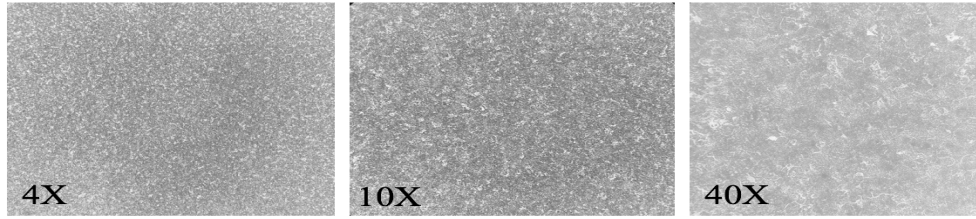
Şekil 19 LC-MS/MS analizi sonucunda dört grup arasında tespit edilen ortak proteinlerin; protein sınıflandırması(A) ve moleküler fonksiyonları(B) gösteren pasta grafik dağılımı

Tespit edilen ortak 88 protein ile yapılan protein sınıflandırılmasında, proteinler sınıflarına göre 15 gruba ayrılmıştır. Proteinlerin yaklaşık %47’si temel olarak küçük molekülleri dönüştürücü enzimlerden ve hücre iskeletini oluşturan proteinlerden ve yaklaşık %20’sinin şaperon ve translasyonel proteinlerden oluştuğu görülmektedir (Şekil 19A). Tespit edilen ortak 88 protein ile yapılan moleküler fonksiyon analizinde, proteinler moleküler fonksiyonlarına göre 5 gruba ayrılmıştır. Proteinlerin yaklaşık %50’si bağlama, %33’ünün katalitik aktivitelerinin, %15’inin de proteinlerin yapısal bütünlüğüne katkıda bulunan proteinler oluştuğu görülmektedir (Şekil 19B). Yapılan tüm tripsin optimizasyonları sonucunda ise, MALDI-Görüntüleme çalışmalarına 75 ng/µl ve 100 ng/µl tripsin konsantrasyonu ile devam edilmesine karar verilmiştir.

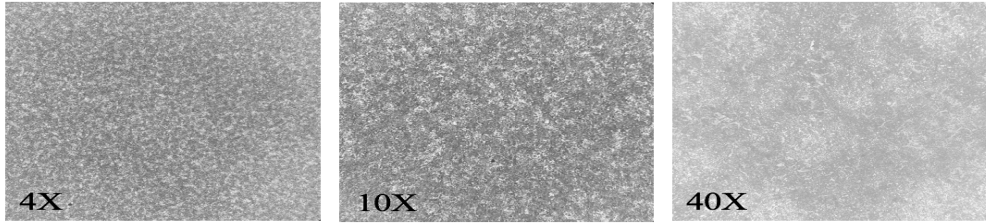
4.3 MALDI-Matriks Konsantrasyonu Optimizasyonu

4.3.1 Kristal yapı ve boyutlarının incelenmesi

Matriks konsantrasyonu optimizasyonu ile birlikte matriks kristallerinin şekilleri ve boyutları ışık mikroskobu altında görüntülenmiş olup farklı objektiflerden elde edilen 5 mg/ml ve 7 mg/ml α -CHCA matriks kristallerine ait görüntüler Şekil 20 ve Şekil 21’de sunulmuştur.



Şekil 20 5 mg/ml α -CHCA matriks konsantrasyonuna ait matriks kristallerinin yapı ve boyutları

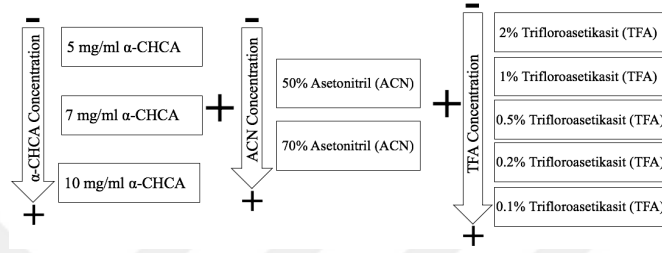


Şekil 21 7 mg/ml α -CHCA matriks konsantrasyonuna ait matriks kristallerinin yapı ve boyutları

Işık mikroskobu altında α -CHCA matriks kristallerinin şekilleri ve boyutları düzgün olup, homojen dağılım gösterdiği Şekil 20 ve Şekil 21’de gösterilmiştir. 5 mg/ml matriks konsantrasyonuna ait kristallere kıyasla, 7 mg/ml matriks konsantrasyonunda 10X büyütme ile incelenmesinde daha sık kristallerin varlığı gözlemlenmiştir (Şekil 21).

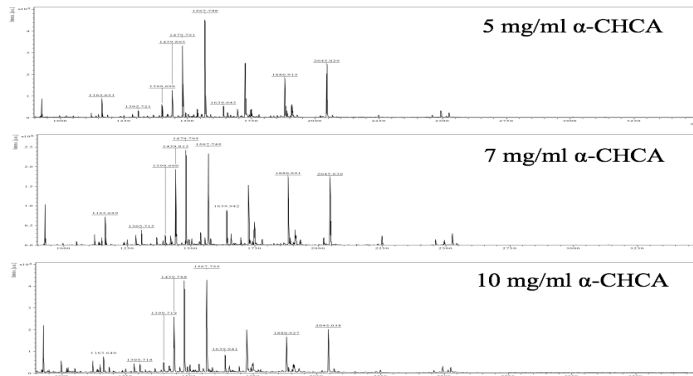
4.3.2 Farklı matriks konsantrasyonlarının peptit profillerine etkisi

Farklı α -CHCA matriks konsantrasyonu ve kompozisyonlarının peptit profillerine etkisi ilk olarak dried-droplet yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu doğrultuda Şekil 22’de gösterildiği gibi 30 farklı α -CHCA matriks konsantrasyonu ve kompozisyonu hazırlanmıştır.

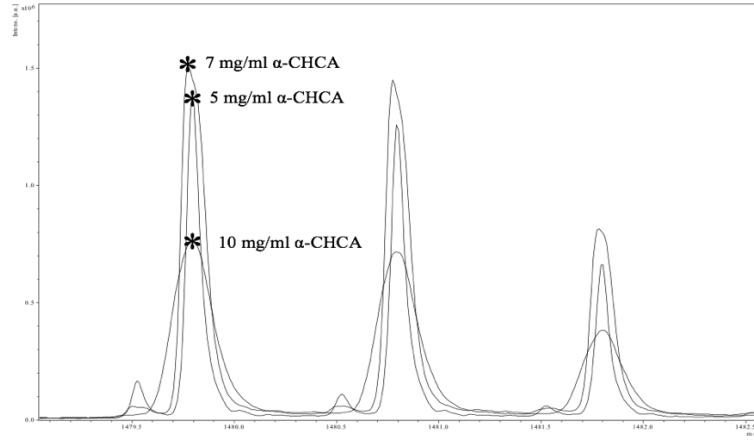


Şekil 22 Hazırlanan 30 farklı α -CHCA matriks konsantrasyonu ve kompozisyonlarının içeriği

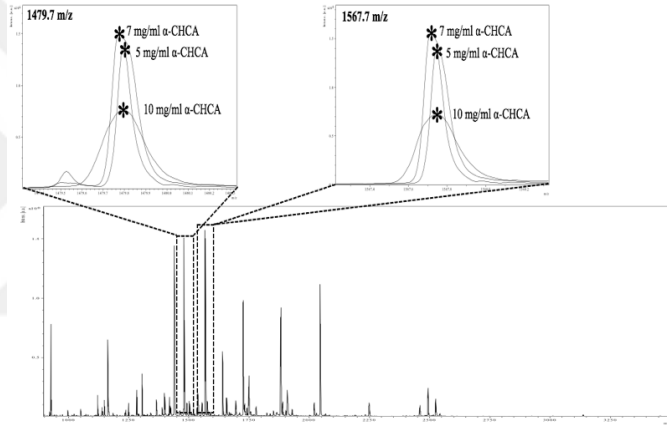
Farklı konsantrasyon ve kompozisyonlarda hazırlanan 30 farklı α -CHCA matriksin analizinden elde edilen spektrumlar Ek 2’de verilmiştir. Farklı matriks konsantrasyonlarından elde edilen spektrumlar histogramlar ile birlikte değerlendirildiğinde, en düşük peptit sinyal yoğunlukları 10 mg/ml matriks konsantrasyonunda gözlemlenmiştir (Şekil 23).



Şekil 23 Farklı matriks konsantrasyonlarından elde edilen spektrumların karşılaştırılması

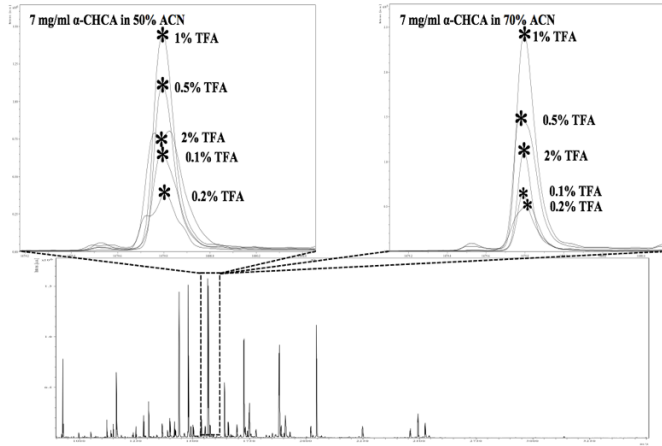


Şekil 24 1479.7 m/z değerinde farklı matriks konsantrasyonlarında sinyal yoğunluğunun değişimi



Şekil 25 1479.7 ve 1567.7 m/z değerlerinde farklı matriks konsantrasyonlarındaki sinyal yoğunluğunun değişimi

Spektruma göre sinyal yoğunluğu en yüksek iki peptit (m/z 1479.7 ve m/z 1567.7) seçilerek farklı konsantrasyonlardaki değişim incelendiğinde her iki peptit piki için 7 mg/ml matriks konsantrasyonunda en yüksek peptit sinyal yoğunlukları elde edilmiştir (Şekil 24 ve Şekil 25). Matriks içeriğindeki ACN konsantrasyonu %50'den 70'e yükseltildiğinde kütle spektrumunda gözlemlenen peptit sinyallerinin yoğunluğu artarken en yüksek sinyal yoğunlukları %1 TFA konsantrasyonunda görülmüştür (Şekil 26).



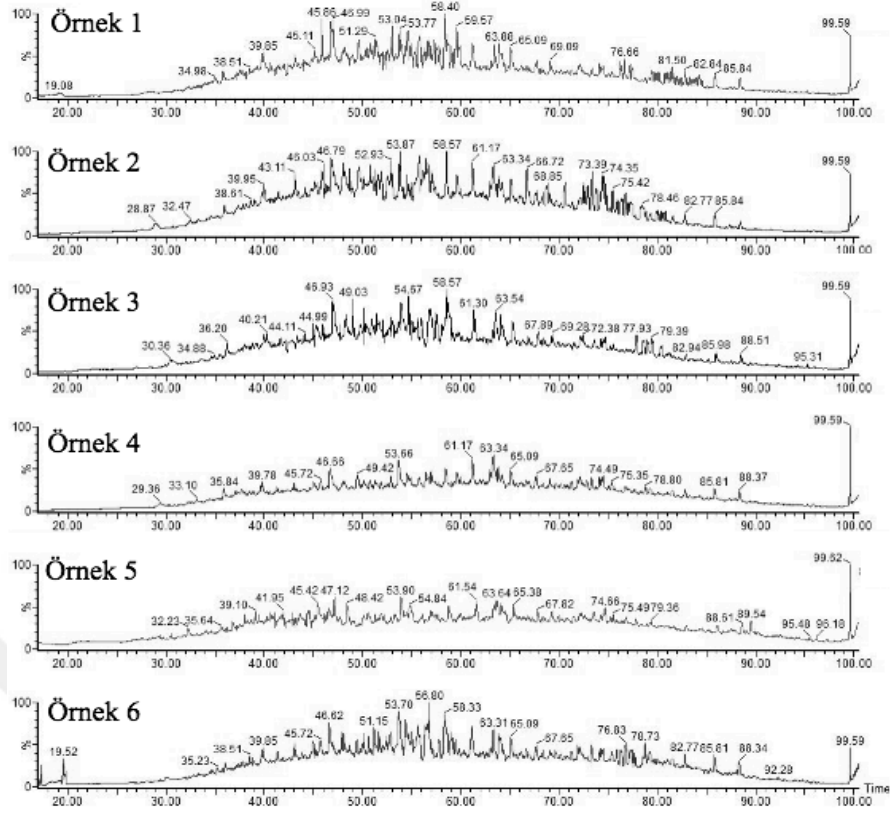
Şekil 26 5 mg/ml ve 7 mg/ml α -CHCA matris konsantrasyonlarında değişen ACN ve TFA konsantrasyonlarındaki sinyal yoğunluğunun değişimi

Farklı matris konsantrasyonlarından elde edilen spektrumların karşılaştırılmasının ardından spektruma göre sinyal yoğunluğu en yüksek iki peptit seçilerek farklı matris konsantrasyonlarındaki sinyal yoğunluğunun değişimi incelendiğinde 5 mg/ml ve 7 mg/ml α -CHCA matris arasında önemli bir fark görülmemekle birlikte seçilen her iki peptit piki için de 7 mg/ml α -CHCA, %70 ACN, %1 TFA matris kompozisyonunun en yüksek peptit sinyal yoğunluğunu verdiği gösterilmiştir.

4.4 FFPE Mide Biyopsi Örneklerinin LC-MS/MS ile Peptit Profillerinin Belirlenmesi

Optimizasyon çalışmalarında kullanılan mide biyopsi örneklerinin LC-MS/MS analizi ile peptit profillerinin belirlenebilmesi için örnekler FASP yöntemi ile hazırlanmıştır. LC-MS/MS sonucunda elde edilen peptit tanımlamaları, MALDI-MSI'den elde edilecek m/z değerleri ile ve bu değerlere karşılık gelen peptit tanımlamalarını eşleştirmek için kullanılmıştır.

LC-MS/MS analizi sonucunda, çeşitli proteinler tespit edilmiş olup analiz edilen 6 adet FFPE dokunun Progenesis QI sisteminde total iyon kromatogramları incelenmiştir ve örneklere ait kromatogram görüntüleri Şekil 27'da verilmiştir.

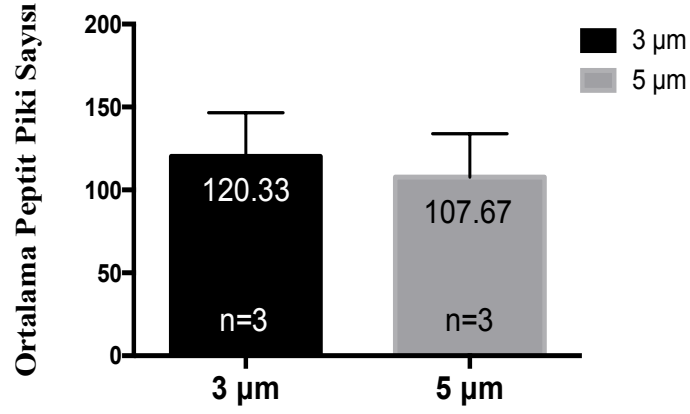


Şekil 27 Mide biyopsi örneklerinin LC-MS/MS analizi ile belirlenen farklı m/z değerlerine sahip çeşitli peptitlerin kromatogram görüntüsü

4.5 FFPE Mide Biyopsi Örneklerinin MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi Yöntemi ile Analizi

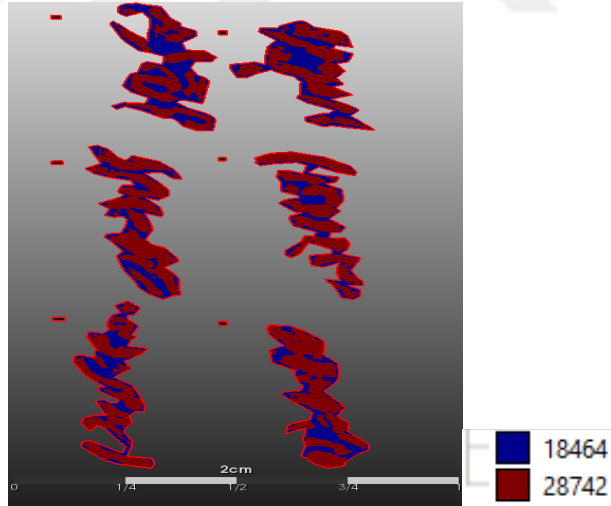
4.5.1 Doku kesit kalınlığı optimizasyonu

Dokulardan 3 μm ve 5 μm 'lik kesitler alınmış ve elde edilen peptit sayıları karşılaştırılmıştır. 3 μm ve 5 μm kesit kalınlıkları kıyaslandığında ise daha ince kesit kalınlığı ile ortalama peptit piki sayısının arttığı Şekil 28'de verilen histogramda gösterilmiştir. Kesit kalınlığının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmanın sonucunda elde edilen ortalama peptit piki sayısı düşünüldüğünde 3 μm 'lik kesitlerde daha optimum sonuçlar alınmıştır.



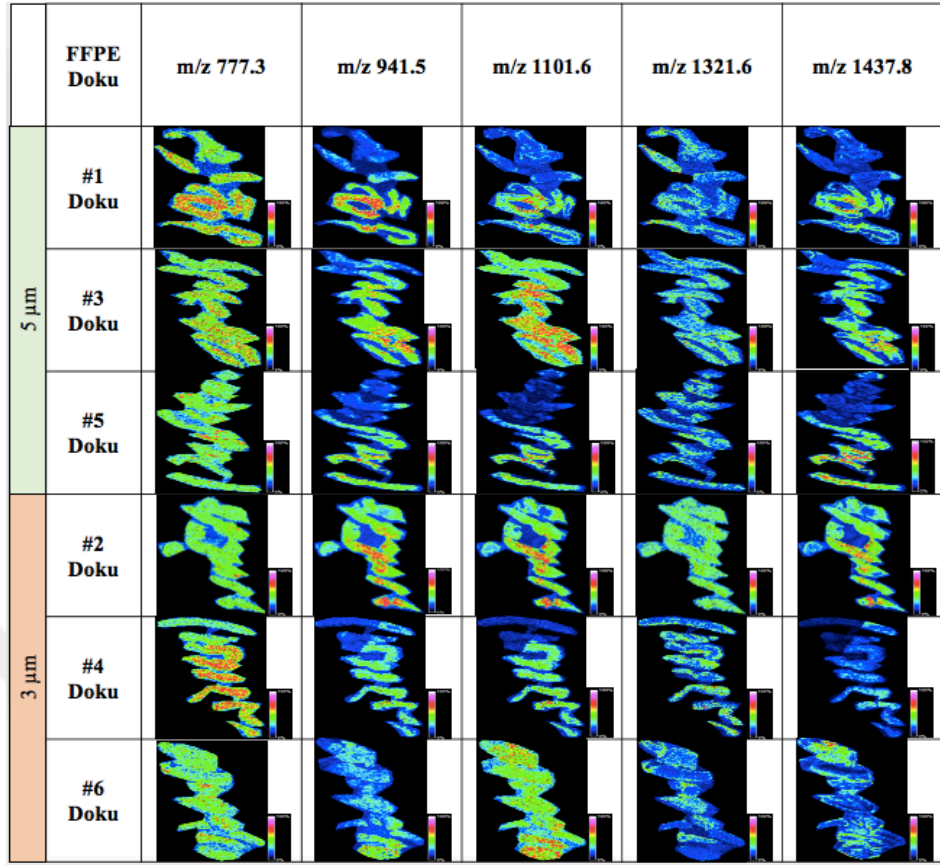
Şekil 28 İki farklı kalınlıktaki kesitlerde olan FFPE dokularının ortalama peptit piklerinin sayısı (standart sapma, sinyal yoğunluklarına göre hesaplanmıştır)

Her iki kesit kalınlığındaki dokular ile yapılan hiyerarşik kümeleme analizine göre, matriks ve dokudan gelen m/z değerleri doku histolojisine göre doğru sınıflandırılmıştır (Şekil 29).



Şekil 29 Matriks ve dokuya ait m/z değerlerinin hiyerarşik kümeleme analizi

Ayrıca, dokularda sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptit seçilmiştir ve bu peptitlere ait görüntüler Şekil 30'da verilmiştir.



Şekil 30 Sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptide ait doku görüntüleri

MALDI-Görüntüleme analizi sonucu sinyal yoğunluğu en yüksek seçilen 5 peptit, LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan peptitler ile karşılaştırılmıştır ve Tablo 4’de verilen proteinler ile eşleştirilmiştir.

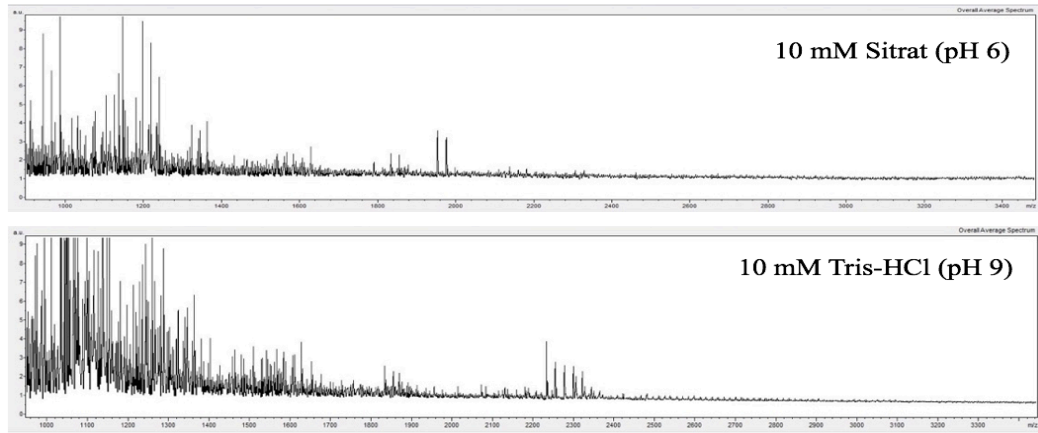
Tablo 4 MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin listesi

MALDI-MSI (m/z)	LC-MS/MS (m/z)	UniProt ID	Protein Name	Peptide Count	Unique Peptides
777.3	777.3	P60709	Actin Cytoplasmic 1	42	13
941.5	941.5	P10809	60 kDa Heat Shock Protein Mitochondrial	20	18
1101.6	1101.6	O60218	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10	24	22
1321.6	1321.6	P62269	40S Ribosomal Protein S18	12	11
1437.8	1437.8	O75874	Isocitrate Dehydrogenase NADP Cytoplasmic	18	14

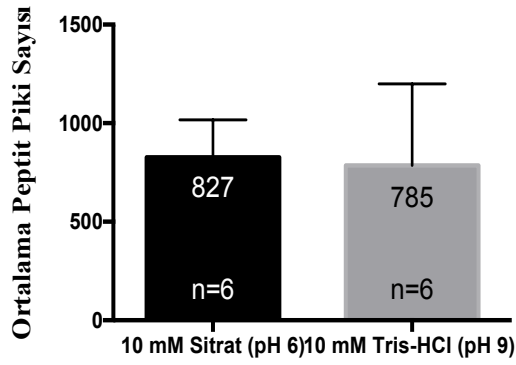
4.5.2 Farklı antijen geri kazanımı tampon çözeltileri ile MALDI-Görüntüleme analizi

Tez çalışması kapsamında antijen geri kazanımına ait optimizasyon basamakları tamamlanmış olup elde edilen protein konsantrasyonları karşılaştırıldığında en yüksek çıkan iki tampon çözeltinin Sitrat ve Tris-HCl olduğu görülmüştür. Bu doğrultuda 10 mM Sitrat (pH 6) ve 10 mM Tris-HCl (pH 9) antijen geri kazanım tampon çözeltileri ile FFPE mide biyopsi örneklerinin MALDI-Görüntüleme analizleri tamamlanmıştır.

10 mM Sitrat (pH 6) ve 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltileri ile yapılan antijen geri kazanımına ait spektrumlar Şekil 31’de verilmiş olup sitrat tampon çözeltisi ile yapılan antijen geri kazanımında göre daha yüksek sinyal yoğunluğunda peptitlerin varlığı görülmüştür. Bununla birlikte elde edilen ortalama peptit pik sayısı incelendiğinde yine sitrat tampon çözeltisi ile daha yüksek peptit piki tespit edilmiştir (Şekil 32).

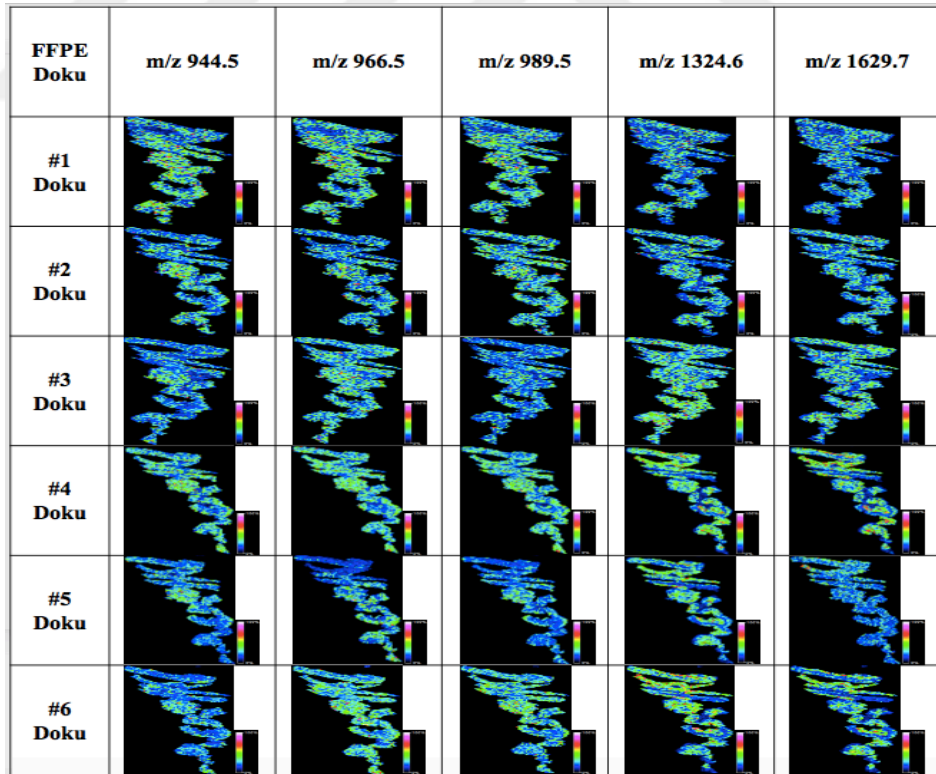


Şekil 31 10 mM Sitrat (pH 6) ve 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltileri ile yapılan antijen geri kazanımlarına ait spektrumlar

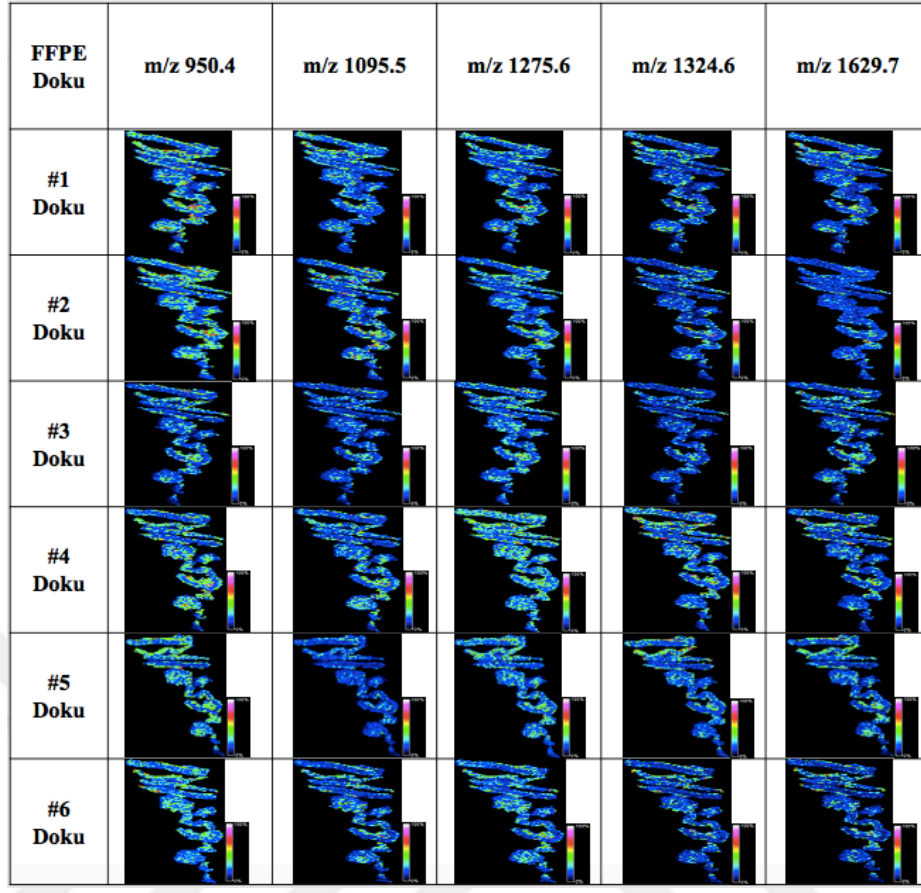


Şekil 32. 10 mM Sitrat (pH 6) ve 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltileri ile yapılan antijen geri kazanımlarına ait ortalama peptit piki sayılarına ait histogramlar

10 mM Sitrat (pH 6) ve 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltileri ile antijen geri kazanımı uygulanan dokularda sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptit seçilmiştir ve bu peptitlere ait görüntüler Şekil 33 ve Şekil 34’te verilmiştir.



Şekil 33 10 mM Sitrat (pH 6) tampon çözeltisine ait sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptide ait doku görüntüleri



Şekil 34 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltisine ait sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptide ait doku görüntüleri

10 mM Sitrata (pH 6) ve 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltileri ile yapılan MALDI-Görüntüleme analizi sonucu sinyal yoğunluğu en yüksek seçilen 5 peptit, LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan peptitler ile karşılaştırılmıştır ve Tablo 5 ve Tablo 6'da verilen proteinler ile eşleştirilmiştir.

Tablo 5 Sitrata antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile yapılan MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin listesi

MALDI-MSI (m/z)	LC-MS/MS (m/z)	UniProt ID	Protein Name	Peptide Count	Unique Peptides
944.5	944.5	P38159	RNA Binding Motif Protein X Chromosome	13	3
966.5	966.5	P83731	60S Ribosomal Protein L24	3	3
989.5	989.5	P11142	Heat Shock Cognate 71 kDa Protein	32	14
1324.6	1324.6	P20648	Potassium Transporting ATPase Alpha Chain 1	38	33
1629.7	1629.7	P55072	Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase	35	31

Tablo 6 Tris-HCl antijen geri kazanımı tampon çözeltisi ile yapılan MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin listesi

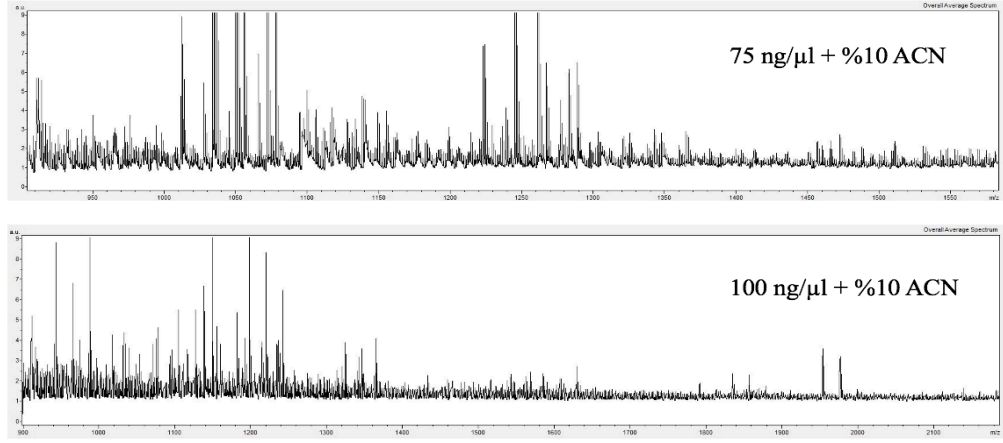
MALDI-MSI (m/z)	LC-MS/MS (m/z)	UniProt ID	Protein Name	Peptide Count	Unique Peptides
950.4	950.4	P26373	60S Ribosomal Protein L13	9	9
1095.5	1095.5	P00352	Retinal Dehydrogenase 1	28	22
1275.6	1275.6	P14625	Endoplasmin	35	29
1324.6	1324.6	P20648	Potassium Transporting ATPase Alpha Chain 1	38	33
1629.7	1629.7	P55072	Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase	35	31

İki farklı tampon çözelti için çeşitli m/z değerlerinde yüksek sinyal yoğunluğunda peptitlerin doku üzerindeki uzamsal dağılımları başarılı bir şekilde gösterilmiştir (Şekil 33 ve Şekil 34). Bununla birlikte MALDI-MSI analizi sonucunda sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptit piki başarılı bir şekilde LC-MS/MS analizi sonuçları ile peptit sayısı (peptide count) ve o peptide özgü tanımlanan peptitler (unique peptides) $3 \geq$ olacak şekilde eşleştirilmiştir (Tablo 5 ve Tablo 6).

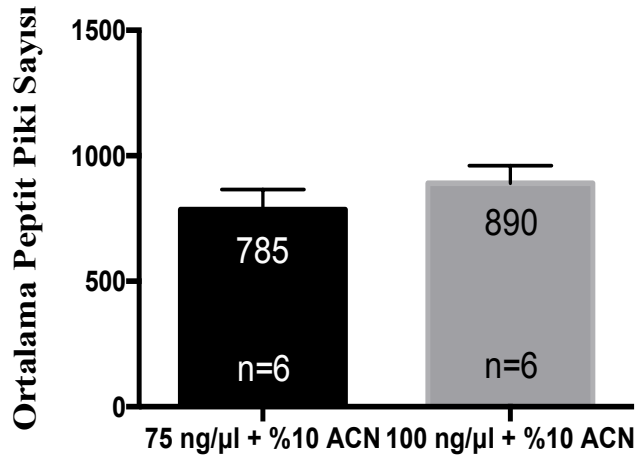
4.5.3 Farklı enzim konsantrasyonları ile MALDI-Görüntüleme analizi

Tez çalışması kapsamında farklı tripsin konsantrasyonlarına ait optimizasyon basamakları tamamlanmış olup peptit konsantrasyonları karşılaştırıldığında en yüksek çıkan iki konsantrasyonun 75 ng/μl + %10 ACN ve 100 ng/μl + %10 ACN olduğu görülmüştür. Bununla birlikte bu konsantrasyonlara ait örneklere yapılan LC-MS/MS analizleri sonucunda da en fazla sayıda protein tanımlamaları bu iki konsantrasyonda yapılmıştır. Bu doğrultuda, 75 ng/μl + %10 ACN ve 100 ng/μl + %10 ACN enzim konsantrasyonları ile FFPE mide biyopsi örneklerinin MALDI-Görüntüleme analizleri tamamlanmıştır.

75 ng/μl + %10 ACN ve 100 ng/μl + %10 ACN enzim konsantrasyonlarına ait spektrumlar Şekil 35'de verilmiş olup 100 ng/μl + %10 ACN enzim konsantrasyonunda daha yüksek sinyal yoğunluğunda peptitlerin varlığı görülmüştür. Bununla birlikte elde edilen ortalama peptit pik sayısı incelendiğinde yine 100 ng/μl + %10 ACN enzim konsantrasyonu ile daha yüksek sayıda peptit piki tespit edilmiştir (Şekil 36).

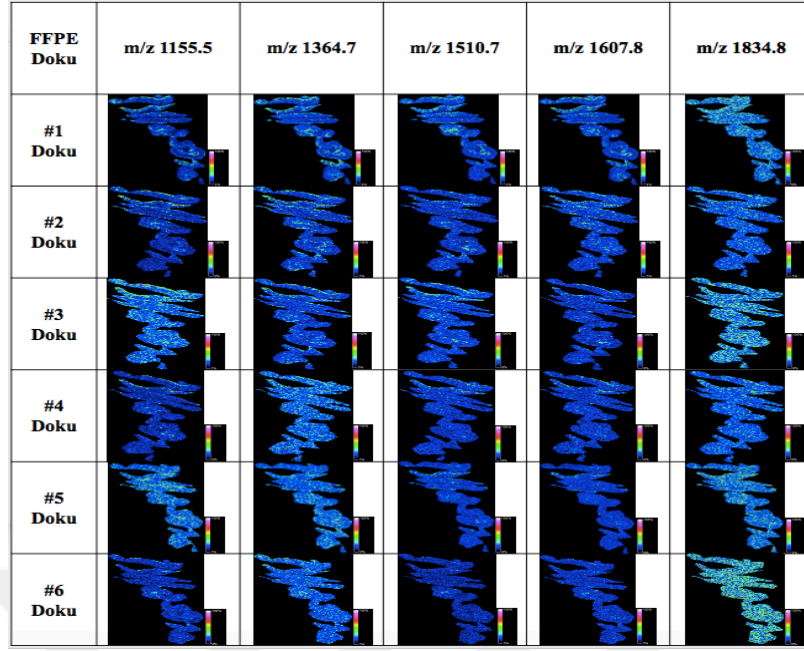


Şekil 35. 75 ng/μl + %10 ACN ve 100 ng/μl + %10 ACN konsantrasyonlarına ait spektrumlar

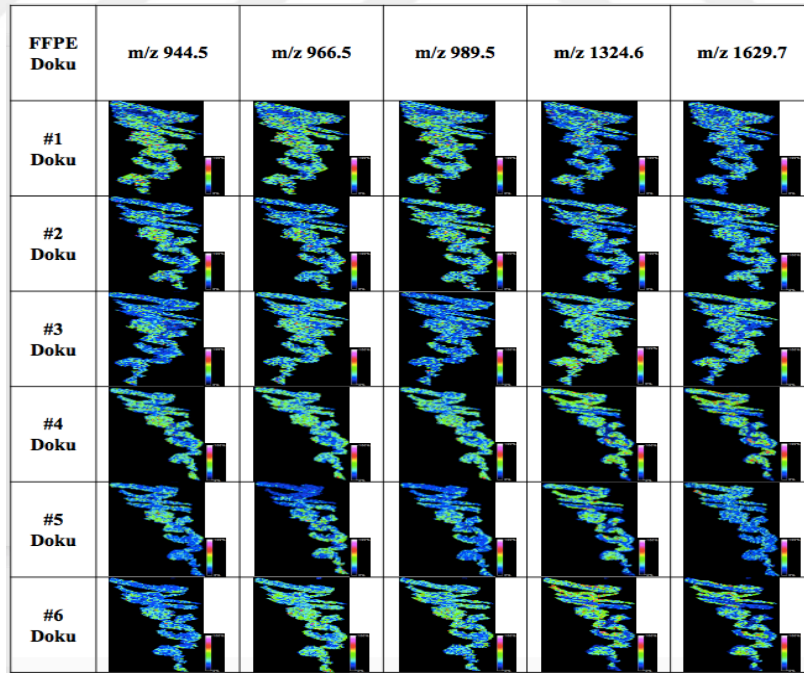


Şekil 36. 75 ng/μl + %10 ACN ve 100 ng/μl + %10 ACN konsantrasyonlarına ait ortalama peptit piki sayılarına ait histogramlar

75 ng/μl + %10 ACN ve 100 ng/μl + %10 ACN olmak üzere iki farklı enzim konsantrasyonunun uygulandığı dokularda sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptit seçilmiştir ve bu peptitlere ait görüntüler Şekil 37 ve Şekil 38’de verilmiştir.



Şekil 37. 75 ng/µl + %10 ACN enzim konsantrasyonuna ait sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptide ait doku görüntüleri



Şekil 38. 100 ng/µl + %10 ACN enzim konsantrasyonuna ait sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptide ait doku görüntüleri

75 ng/μl + %10 ACN ve 100 ng/μl + %10 ACN enzim konsantrasyonları ile yapılan MALDI-Görüntüleme analizi sonucu sinyal yoğunluğu en yüksek seçilen 5 peptit, LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan peptitler ile karşılaştırılmıştır ve Tablo 7 ve Tablo 8’de verilen proteinler ile eşleştirilmiştir.

Tablo 7 75 ng/μl + %10 ACN enzim konsantrasyonu uygulanan MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin listesi

MALDI-MSI (m/z)	LC-MS/MS (m/z)	UniProt ID	Protein Name	Peptide Count	Unique Peptides
1155.5	1155.5	Q15365	Poly(rC) Binding Protein 1	12	7
1364.7	1364.7	P23284	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase B	13	9
1510.7	1510.7	Q13228	Methanethiol Oxidase	18	18
1607.8	1607.8	O75390	Citrate Synthase Mitochondrial	16	15
1834.8	1834.8	P15311	Ezrin	22	12

Tablo 8 100 ng/μl + %10 ACN enzim konsantrasyonu uygulanan MALDI-MSI ve LC-MS/MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin listesi

MALDI-MSI (m/z)	LC-MS/MS (m/z)	UniProt ID	Protein Name	Peptide Count	Unique Peptides
944.5	944.5	P38159	RNA Binding Motif Protein X Chromosome	13	3
966.5	966.5	P83731	60S Ribosomal Protein L24	3	3
989.5	989.5	P11142	Heat Shock Cognate 71 kDa Protein	32	14
1324.6	1324.6	P20648	Potassium Transporting ATPase Alpha Chain 1	38	33
1629.7	1629.7	P55072	Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase	35	31

İki farklı enzim konsantrasyonu için çeşitli m/z değerlerinde yüksek sinyal yoğunluğunda peptitlerin doku üzerindeki uzamsal dağılımları başarılı bir şekilde gösterilmiştir(Şekil 37 ve Şekil 38). Bununla birlikte MALDI-MSI analizi sonucunda sinyal yoğunluğu en yüksek olan 5 peptit piki başarılı bir şekilde LC-MS/MS analizi sonuçları ile peptit sayısı (peptide count) ve o peptide özgü tanımlanan peptitler (unique peptides) 3 ≥ olacak şekilde eşleştirilmiştir (Tablo 7 ve Tablo 8).

5 TARTIŞMA

MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi ile dokular üzerinde protein analizi yapılması için uygulanmaya başlandığından beri son on yılda, MALDI-MSI hızla gelişerek dünya çapında bilim insanları tarafından hem tıbbi hem de temel araştırmalarda başarıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemin klinik adaptasyonunun yüksek olmasına rağmen, MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi uygulamasındaki önemli noktalardan biri de, örnek hazırlığı için genel protokollerin yeterli olmaması ve uygun optimizasyon çalışmaları yapılmadan tekrarlanabilir sonuçların elde edilememesidir (19,20). Bilimsel literatür içerisinde FFPE mide biyopsi dokuları kullanılarak yapılan MALDI-Görüntüleme analizi ile elde edilen peptit profillerinin incelenmesinde optimize edilmiş bir protokol olmaması ve kullanılacak örneklerin biyopsi materyalleri olduğundan çok az miktarda örnek barındırması ve farklı optimizasyon yaklaşımlarının uygulanmasını gerektirmesi nedeni ile bu çalışmada, FFPE mide biyopsi örnekleri ile MALDI-Görüntüleme yöntemi optimizasyon çalışmasının yapılması amaçlanmıştır ve bu çalışmanın özgün yanının literatürde önemli bir eksikliği kapatarak literatüre katkı sağlaması hedeflenmektedir.

MALDI-Görüntüleme yönteminde taze dondurulmuş dokuların yanı sıra, FFPE dokular da kullanılmaktadır. FFPE dokular, hasta verileri ile ilişkili olarak retrospektif araştırmalara olanak sağladığından proteomik çalışmalar için değerlidir (5). Bu dokular kullanılarak yapılan proteomik çalışmalar, proteomik verileri arşivlenmiş hasta bilgileri ile ilişkilendirme potansiyelini arttırmaktadır (64). MALDI-Görüntüleme uygulamalarında başarılı sonuç elde etmek, başta antijen geri kazanımı olmak üzere, büyük ölçüde örnek hazırlama basamaklarında yapılan optimizasyon çalışmalarına bağlıdır (44). Antijen geri kazanımı uygulaması, FFPE dokularda çeşitli proteinlerin saptanmasına izin verir (65). Formaldehit fiksasyonu ortaya çıktığından beri, klinik örneklerden dokuların korunması için standart bir yöntem olmuştur (43). Formalin ile fiksasyon sayesinde, FFPE dokular metilol eklentileri ve metilen köprüleri yoluyla fiksasyona bağlı çapraz bağlanma nedeniyle bozulma endişesi olmadan uzun süre stabil kalabilmektedir (43,44).

Ancak, fiksasyon esnasında kullanılan formalin, peptitler ve proteinler ile reaksiyona girmekte ve lizin, arjinin ve sistein tiyol kalıntıları üzerinde bir metilol oluşumunu indüklemektedir. Gerçekleşen, protein çapraz bağlanma reaksiyonu sonucunda oluşan metilen köprüleri, proteinlerin başlangıç konformasyonlarını önemli ölçüde değiştirir ve bazı epitoplara maskeleyebilir. FFPE dokularda formalin fiksasyonundan kaynaklanan metilen çapraz bağlarının ortadan kaldırılması, antijen geri kazanımı yaklaşımları sayesinde metilen çapraz bağlarının hidrolizi ile gerçekleşmekte ve epitoplara maskesi kaldırılabilir. Isı, formalin fiksasyonundan kaynaklanan bu protein kimyasal modifikasyonlarının tersine çevrilmesine neden olurken tripsin gibi enzimler kullanılarak yapılan proteolitik sindirim de protein çapraz bağlarını kırar (66). Isı gibi kullanılan tampon tipi de antijen geri kazanımının başarısında önemli bir faktördür.

Bu faktörlerin, FFPE örneklerinin MALDI-Görüntüleme yöntemi gibi proteomik analizlerden önce dikkate alınması gerekir. Bu nedenle diğer değişkenler gibi antijen geri kazanımının süresi, uygulandığı pH ve sıcaklığın da optimize edilmesi son derece önemlidir (44,65). Literatürde FFPE doku örneklerine uygulanan antijen geri kazanımı tamponları sıklıkla Sitrat, Tris, Tris-HCl, Tris-EDTA, Tripsin/EDTA, EDTA ve deiyonize sudur (19,20,44,67-71). Antijen geri kazanım tamponlarından en yaygın kullanımı olan tampon Sitrat olması ile birlikte Ronci ve arkadaşları, EDTA tampon çözeltisi ile FFPE doku kesitlerine antijen geri kazanımı uygulanmasında yüksek peptid sinyalleri verdiğini gösterirken Casadonte ve arkadaşları ise Tris tampon çözeltisi ile antijen geri kazanımı uygulaması ile FFPE dokularında formalinden kaynaklanan çapraz bağların etkili bir şekilde ayrıldığını belirtmişlerdir (67,69). Bu tamponların uygulanmış olduğu FFPE doku örnekleri meme, kalp, tiroid, yumurtalık, böbrek, mesane, akciğer, deri ve beyin dokusudur. Antijen geri kazanımı sonuçları alınmış olan bu tampon çözeltilerin FFPE mide biyopsi örneklerine uygulandığı bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında literatürde yaygın olarak kullanılan Sitrat, Tris-HCl, Tris/EDTA ve EDTA tampon çözeltileri ile muamele edilmiş örnekler immünohistokimya analizi yapılarak biyopsi örneklerinin boyama durumları incelenmiş ve diğer üç tampona kıyasla dokularda Sitrat tampon çözeltisi ile en kuvvetli boyanma gösterilmiştir.

FFPE mide biyopsi örnekleri ile yapılan bu çalışmalar kapsamında Guo ve arkadaşlarının 2012 yılında uyguladıkları protokole göre antijen geri kazanımı basamağının optimizasyonu sonucunda uygulanan 4 farklı tampon çözeltiye ait protein konsantrasyonları belirlenmiş ve 10 mM Sitrata + %2 SDS tampon çözeltisine ait protein konsantrasyonları en yüksek bulunmuştur (61). SDS eklendiğinde membran proteinleri de parçalandığından daha fazla proteinin tampon çözeltiye geçmesi sağlanır. Bu nedenle SDS'in eklenmesi beklenildiği gibi protein eldesinde fayda sağlamıştır. Literatürde, Gustafsson ve arkadaşları 2010 yılında 10 mM Sitrata ve 10 mM Tris antijen geri kazanımı çözeltilerini karşılaştırarak FFPE yumurtalık kanseri dokularında peptit analizi yapmışlardır. Bu tez çalışmasının sonuçları ile benzer olarak görüntüleme kütle spektrometresi sonucunda Sitrata tampon çözeltisi ile daha iyi spektrum elde ettiklerini belirtmişlerdir (11). Bununla birlikte literatürde Diehl ve arkadaşları 2014 yılında Sitrata tamponu ile FFPE beyin dokusunda antijen geri kazanımı uygulayarak MALDI-Görüntüleme yöntemi ile peptit analizi yaparak başarılı sonuçlar almıştır ve taze dondurulmuş doku örneklerinin analizi ile de karşılaştırılabilir kütle spektrumu sonuçları veren analiz sonuçlarını sunmuşlardır (70). Vos ve arkadaşları 2018 yılında in situ proteolitik sindirim sonucunda peptit düzeyi hakkında moleküler bilgi elde etmek için FFPE mesane kanseri dokularına sitrata tamponu ile antijen geri kazanımı uygulayarak başarılı sonuçlar almışlardır (72). Hermann ve arkadaşları ise 2019 yılında sitrata tampon kullanılarak antijen geri kazanımı uygulamasının optimal sonuçlar verdiği belirten FFPE dokular ile MALDI-Görüntüleme analizi için örnek hazırlığına yönelik SOP yayınlamışlardır (73). Tez çalışması kapsamında yapılan MALDI-Görüntüleme analizlerinde de 10 mM Sitrata (pH 6) ve 10 mM Tris-HCl (pH 9) tampon çözeltileri karşılaştırıldığında Sitrata tampon çözeltisi ile daha yüksek sinyal yoğunluğunda peptitlerin varlığı görülmüştür.

Tez çalışmasındaki antijen geri kazanımı sonuçlarına göre 10 mM Sitrata + %2 SDS tampon çözeltisine protein geçip geçmediği kontrol edilmek üzere UPX Universal Protein Extraction Kit (Expedeon) ile üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre LC-MS/MS analizi yapılmıştır ve keratin başta olmak üzere yalnızca 37 adet protein antijen geri kazanımı tamponunda tespit edilmiştir.

Tespit edilen keratin proteininin sayıca yüksek olması deneyde potansiyel bir kontaminasyona işaret edebilir. Kütle spektrometresi temelli proteomik çalışmalarda protein örneklerinden olmayan, istenmeyen kontaminantlar çoğunlukla laboratuvar, kişilerin saç ve deri gibi örneklerinden ya da örnek analizi için kullanılan tripsin gibi reaktiflerden kaynaklanmaktadır. Derinin dış tabakasında, saç ve tırnaklarda bol miktarda bulunan keratin, genellikle kütle spektrometrelerinde kontaminasyon kaynağı olarak görülmektedir (74). Doku kesitlerinin hazırlanması aşamasında laboratuvar, kişilerin saç ve deri gibi örneklerinden ya da örnek analizi için kullanılan tripsin gibi reaktiflerden kaynaklanmaktadır. Derinin dış tabakasında, saç ve tırnaklarda bol miktarda bulunan keratin, genellikle kütle spektrometrelerinde kontaminasyon kaynağı olarak görülmektedir (74). Doku kesitlerinin hazırlanması aşamasında laboratuvar, kişilerin saç ve deri gibi örneklerinden ya da örnek analizi için kullanılan tripsin gibi reaktiflerden kaynaklanmaktadır. Derinin dış tabakasında, saç ve tırnaklarda bol miktarda bulunan keratin, genellikle kütle spektrometrelerinde kontaminasyon kaynağı olarak görülmektedir (74). Birçok sebepten kaynaklanabilen kontaminasyonu tamamen ortadan kaldırılamasa da keratin etkileşimlerinden nasıl kaçınılacağına dair bir kılavuz Biringer tarafından geliştirilmiştir (75).

Analiz sonucunda antijen geri kazanımı tamponunda keratin proteini dışında 23 farklı protein tespit edilmiştir. Keratin sayıca yüksek oranda tespit edilen proteinlerden olmasına karşın tanımlanan bütün proteinler keratin ile ilgili değildir. Diğer 23 protein başka proteinlere bağlanan ve bağlanma aktivitelerini modüle eden proteinlerden, katalize edilen reaksiyonlarda görev alan katalitik aktiviteye sahip proteinlerden, transkripsiyon ve translasyon düzenleyici aktiviteye sahip proteinlerden oluştuğu görülmektedir. Bu nedenle genel olarak bütün proteinler keratinli ilişkilidir yorumu yapılamamaktadır. Peptit sayısı açısından tanımlanan proteinler incelendiğinde ise, keratin proteinini desmoplakin proteini takip etmektedir. Desmoplakin, kalp kası ve epidermal hücrelerdeki desmozom yapılarının major yüksek ağırlığa sahip bileşeni olup, insanlarda DSP geni tarafından kodlanan bir protein olup iki baskın izoforma sahiptir (76).

FFPE mide biyopsi örnekleri ile yapılan optimizasyon çalışmaları kapsamında antijen geri kazanımı basamağından sonra, tripsin miktarı optimize edilmek üzere farklı tripsin konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Literatürde bu tez çalışmasına benzer olarak FFPE dokularda farklı tripsin konsantrasyonlarının uygulandığı ve benzer/farklı sonuçlar elde edilen yayınlar mevcuttur (19,20,68–70,72,77–80).

Uygun konsantrasyonda tripsin çözeltisinin belirlenebilmesi için 25 ng/μl, 50 ng/μl, 75 ng/μl ve 100 ng/μl olmak üzere dört farklı tripsin konsantrasyonu uygulanan dokular üzerinden toplanan peptitlerden peptit konsantrasyonu tayin edilmiş olup 75 ng/μl ve 100 ng/μl tripsin konsantrasyonu arasında önemli bir fark görülmemiştir. Bununla birlikte ACN eklemenin peptit konsantrasyonuna etkisini gözlemek üzere 75 ng/μl ve 100 ng/μl tripsin konsantrasyonlarına ACN eklenmiştir ve ACN eklenen tripsinli dokularda peptit konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç pozitif kontrol olarak kullanılan BSA üzerinde de gözlemlenmiştir ancak literatürde tripsin solventinin içine ACN eklenmesinin peptit konsantrasyonuna etkisinin incelendiği FFPE dokular ile yapılan analiz sonuçları bulunmamaktadır.

Hermann ve arkadaşlarının 2019 yılında FFPE doku kesitleri ile MALDI-Görüntüleme analizi için örnek hazırlığına yönelik yayınladıkları çalışmalarında farklı tripsin konsantrasyonu ve kompozisyonlarının elde edilen kütle spektrumları üzerinde etkili olduğu için ilk olarak 50 mM hidrosimetil-aminometan hidroklorür, 20 mM amonyum bikarbonat ve %10 ACN ile 20 mM amonyum bikarbonat tripsin çözücülerini karşılaştırılarak elde edilen veriler incelenmiştir. En yoğun kütle sinyalleri ve S/N oranlarının 20 mM amonyum bikarbonat içinde çözülmüş tripsin kullanılarak elde edildiğini bildirmişlerdir. İkinci olarak 5 nM ile 50 nM tripsin konsantrasyonu sonucu elde edilen veriler karşılaştırılmıştır ve 5 nM tripsin konsantrasyonu düşük S/N oranı ile sonuçlanırken, 50 nM tripsin konsantrasyonu kullanılarak artan S/N oranlarına ulaşılmıştır (73). Bu çalışmaya benzer olarak Judd ve arkadaşlarının, 2019 yılında FFPE dokular ile yaptıkları çalışmada 0.64, 3.2, 24 ng/mm² olmak üzere doku alanı başına düşen 3 farklı tripsin konsantrasyonu sonucunda elde edilen spektrumlar karşılaştırılmıştır. 3.2 ng/mm² tripsin konsantrasyonu ile en yüksek yoğunlukta peptit pikleri elde edilmiş olup, LC-MS/MS analizi sonucunda da daha fazla sayıda protein ve o protein özgü peptitlerin tanımlandığını bildirmişlerdir (80). Bu tez çalışması kapsamında da bu yayındaki sonuçlara benzer olarak doku başına düşen tripsin miktarı hesaplanmıştır ve 75 ng/μl tripsin püskürtüldüğünde doku alanı başına düşen enzim konsantrasyonu 13.86 ng olarak hesaplanmıştır. Bu yayında uygulanan 3.2 ng/mm² tripsin ise tez çalışmasında elde edilen sonuçlarda 25 ng/μl'ye tekabül etmektedir.

Ancak tez çalışmasında tripsin konsantrasyonu 25 ng/μl'den 75 ng/μl'e arttırıldığında daha optimum sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, mesane, mide, yumurtalık, tiroid gibi farklı FFPE dokulara uygulanan farklı enzim konsantrasyonları ile birbirinden farklı sonuçlar edilmiştir. Bütün bu çalışmalara göre, kullanılan doku tipi uygulacak enzim miktarı ile ilişkili olduğundan doku tipine göre tripsin miktarı ile ilgili optimizasyonların yapılması gerekmektedir.

Tripsin miktarı optimizasyonu deneyleri kapsamında doku yüzeyinden toplanan peptitlerin LC-MS/MS analizi sonuçları incelenmiştir ve tripsin konsantrasyonu arttırıkça tanımlanan protein sayısının da arttığı gözlemlenmiştir. Farklı tripsin konsantrasyonları sonucu tespit proteinlerin çeşitli fonksiyonlarını analiz edilmiştir. Yapılan venn diyagramları sonucunda ise 25 ng/μl, 50 ng/μl, 75 ng/μl ve 100 ng/μl konsantrasyonları arasında ortak 88 protein tespit edilmiştir. Protein sınıflandırması açısından bakıldığında temel olarak küçük molekülleri dönüştürücü enzimler ve hücre iskeletini oluşturan proteinler dışında, HSP60, HSP 70, HSP 90 ve HSP100 ailelerine ait şaperon translasyonel proteinlere rastlanmıştır. Buna karşılık her tripsin konsantrasyonuna spesifik tanımlanan proteinler de incelenmiştir.

Yalnızca 25 ng/μl tripsin konsantrasyonuna spesifik 16 protein tanımlanmış olup, protein sınıflandırması baz alındığında diğer konsantrasyonlarda tanımlanmayan ferritin ailesine ait depo proteinler tespit edilmiştir. Yalnızca 50 ng/μl tripsin konsantrasyonuna spesifik 8 protein tanımlanmıştır ancak bu konsantrasyonda tanımlanmamış olan özgün bir protein mevcut değildir. Yalnızca 75 ng/μl tripsin konsantrasyonuna spesifik 80 protein tanımlanmış olup, protein sınıflandırması baz alındığında diğer konsantrasyonlarda tanımlanmayan bir dizi spesifik genin transkripsiyonunu düzenleyen proteinler ve başka proteinlere bağlanıp aktivitesini modüle eden proteinler tespit edilmiştir. Son olarak yalnızca 100 ng/μl tripsin konsantrasyonuna spesifik 97 protein tanımlanmış olup, protein sınıflandırmasına bakıldığında diğer konsantrasyonlarda tanımlanmayan hücre dışında sinyal molekülüne bağlanıp sinyali sitoplazmaya ileten transmembran proteinleri tespit edilmiştir.

FFPE mide biyopsi örnekleri ile yapılan bu çalışmalar kapsamında, tripsin optimizasyonu basamaklarından sonra MALDI-matriks konsantrasyonu optimize edilmek üzere 30 farklı α -CHCA matriks konsantrasyonu ve kompozisyonlarının peptit profillerine etkisi ilk olarak dried-droplet yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Literatürde bu tez çalışmasına benzer olarak FFPE dokularda farklı farklı α -CHCA matriks konsantrasyonları uygulanan başarılı sonuçlar alınan çeşitli çalışmalar mevcuttur (19,20,44,69,70,72,79–82).

Tez çalışmasında farklı matriks konsantrasyonlarından elde edilen spektrumlar histogramlar ile birlikte değerlendirildiğinde, 7 mg/ml matriks konsantrasyonunda en yüksek, 10 mg/ml matriks konsantrasyonunda en düşük peptit sinyal yoğunlukları elde edilmiştir. Ancak literatürde 10 mg/ml α -CHCA matriks konsantrasyonu ile de başarılı sonuçlar alınan çalışmalar mevcuttur (19,69,77,79). Bununla birlikte, spektruma göre sinyal yoğunluğu en yüksek iki peptit piki seçilerek farklı konsantrasyonlardaki değişim incelendiğinde her iki peptit piki için 7 mg/ml matriks konsantrasyonunda en yüksek peptit sinyal yoğunlukları elde edilmiştir. Matriks kompozisyonu içerisindeki ACN konsantrasyonu %50'den %70'e yükseltildiğinde kütle spektrumunda gözlemlenen peptit sinyallerinin yoğunluğu artarken en yüksek sinyal yoğunlukları %1 TFA konsantrasyonunda görülmüştür. Literatürde Judd ve arkadaşları tarafından α -CHCA matriks solventi içerisine farklı konsantrasyonda ACN eklenmesinin sinyal yoğunluğuna etkisinin araştırıldığı MALDI-Görüntüleme çalışmasında, %50, %70 ve %90 ACN konsantrasyonlarına ait spektrumlar ve iyon görüntüleri incelenmiştir. %90 ACN ve %0.1 TFA içerisinde hazırlanan α -CHCA matriks ile daha yoğun iyon sinyalleri elde ettiklerini belirtilmişlerdir. Bu tez çalışmasında da bulunan sonuçlarla paralel olarak artan ACN konsantrasyonu ile MALDI-Görüntüleme analizlerinde daha yüksek sinyal olduğu elde edilebildiği gösterilmiştir (80).

Literatürde Kim ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan, matriks solventi içerisine farklı çözücülerin eklendiği ve farklı matriksler ile birlikte ilgili analitin MALDI target üzerinde analiz edildiği bir çalışmada, %100 metanol, %100 aseton ve 100% asetonitril çözücülerine ait analizin sinyal yoğunlukları karşılaştırılmış ve 5

teknik tekrar ile yapılan 3 bağımsız deneyin ortalamasına göre %100 asetonitril ile en yüksek sinyal yoğunlukları elde edilmiştir (83).

Karşılaştırılan tüm matriks konsantrasyonu ve kompozisyonları incelendiğinde 5 mg/ml ve 7 mg/ml α -CHCA matriks arasında önemli bir fark görülmemekle birlikte seçilen her iki peptit piki için de 7 mg/ml α -CHCA, %70 ACN, %1 TFA matriks kompozisyonunun en yüksek peptit sinyal yoğunluğunu verdiği gösterilmiştir. Dolayısıyla, yalnızca matriks konsantrasyonu değil matriks kompozisyonun da çalışmalar öncesinde optimize edilmesi önem arz etmektedir.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda, FFPE mide biyopsi örneklerinin MALDI-görüntüleme analizi için çeşitli parametreler optimize edilmiştir. Bu parametreler ile yapılan MALDI-Görüntüleme analizleri kapsamında ilk olarak kesit kalınlığı optimize edilmek üzere iki farklı doku kesit kalınlığı (3 μ m ve 5 μ m) karşılaştırılmıştır. Biyomoleküllerin başarılı profilendirilmesinin yapılabilmesi için uygun örnek hazırlığı ile birlikte doku kesitlerinin de uygun kalınlıkta kesitlendirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla literatürde farklı doku kesit kalınlıkları ile başarılı sonuçlar alınan MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi çalışmaları mevcuttur (19,20,68,84). Tez çalışmasında doku kalınlığının kütle spektrumu ve sinyal yoğunlukları üzerindeki etkilerine bakıldığında kütle spektrumu ile görüntüleme sonuçları birlikte değerlendirilmiştir ve 3 μ m'lik kesitler ile daha fazla sayıda peptit piki tespit edilmiştir. 3 μ m ve 5 μ m kesit kalınlığı karşılaştırıldığında, doku kesitleri incelidikçe elde edilen sinyal yoğunlukları, literatürdeki sonuçlarla paralel olarak artmıştır. Sugiura ve arkadaşlarının 2016 yılında 2 μ m ile 40 μ m arasındaki doku kesit kalınlığının kütle spektrumu üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmaları sonucunda kesit kalınlığı incelidikçe (<10 μ m) sinyal sayısı ve sinyal yoğunluklarının arttığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte yüksek moleküler ağırlığa sahip proteinlerin ince kesit kalınlıklarından elde edildiğini de belirtmişlerdir. Böylece diğer basamaklar gibi doku kalınlığının da yüksek kaliteli kütle spektrumları elde etmek için önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kesit kalınlığının artması ile analit iyonizasyonunun yetersiz kalmasının, iletken olmayan özellikler ve kalın kesitlerdeki katışkı olmak üzere iki nedeni olduğu düşünülmektedir (84).

Longuespee ve arkadaşlarının 2019 yılında FFPE TMA dokuları ile yaptıkları MALDI-Görüntüleme analizinde, 1 μm , 3 μm ve 5 μm kalınlığındaki doku kesitlerine ait m/z değerlerinin yoğunlukları karşılaştırılmıştır ve spesifik olarak 5 μm kalınlığa kıyasla 1 μm doku kesitlerindeki piklerde daha yüksek sinyal yoğunlukları gözlemlenmiştir (78). Literatürde FFPE dokular kullanılarak yapılan MALDI-Görüntüleme çalışmalarında sıklıkla 3 μm doku kesitleri kullanılması ile birlikte 5 μm , 6 μm ve 10 μm kesit kalınlığında analiz edilen çalışmalar da mevcuttur (19,20,44,67,68). Dolayısıyla, doku tipine bağlı olarak kesit kalınlığının etkisinin olduğu söylenebilir. Bu nedenle çalışılan doku tipine ait kesit kalınlığının optimizasyon çalışmaları ile belirlenmesi önem arz etmektedir.



6 SONUÇ

Sonuç olarak, klinik değeri yüksek olan doku örneklerinin homojenizasyonuna ihtiyaç duyulmadan yapılan ve histolojik veriler ile yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi verilerini birleştiren MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi ile protein profillerinin incelenmesi uzun vadede çeşitli gastrointestinal hastalıkların tanı, tedavi ya da prognoz süreçlerine bilgilerin edinilmesi için önem arz etmektedir.

MALDI kütle spektrometresine ait temel bileşenlerinin de yıllar içerisinde geliştirilmesindeki ilerleme ile bu alandaki araştırmalar da ilerlemiştir ve bilimsel çalışmalar artan bir etki kazanmıştır (85–87). Bu teknolojideki gelişmeler incelendiğinde, optimizasyon problemleri örnek hazırlama basamaklarından daha fazla ortaya çıkmaktadır. Örnek hazırlama basamaklarına ait literatürde birtakım protokoller mevcuttur ancak bu protokoller sistematik olarak henüz optimize edilmemiştir (70,86,88).

Bilimsel literatürde FFPE mide dokularının MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi analizi ile peptit profilleri incelenmesinde optimize edilmiş bir protokol olmaması nedeni ile optimizasyon çalışmalarının yapılması önem arz etmektedir.

Tez çalışmasına ait optimizasyon adımlarının ayrıntılı sunulması ile birlikte optimize edilen parametreleri içeren deneysel basamaklar da sunulmuştur. Bu tez çalışması sonucunda FFPE mide biyopsi örneklerinin MALDI-MSI analizi için uygun kesit kalınlığı, uygun tripsin konsantrasyonu ve matriks kompozisyonu belirlenmiştir. Optimize edilen mevcut protokol ile diğer FFPE dokuların da MALDI-MSI analizi ile birlikte standardize bir rehber geliştirilmesi için araştırmalara devam edilmesi planlanmaktadır.

7 KAYNAKLAR

1. Zhu Y, Weiss T, Zhang Q, Sun R, Wang B, Yi X, et al. High-throughput proteomic analysis of FFPE tissue samples facilitates tumor stratification. *Mol Oncol*. 2019;13(11):2305–28.
2. Chu TY, Hwang KS, Yu MH, Lee HS, Lai HC, Liu JY. A research-based tumor tissue bank of gynecologic oncology: Characteristics of nucleic acids extracted from normal and tumor tissues from different sites. *Int J Gynecol Cancer*. 2002;12(2):171–6.
3. Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, Mareninov S, Lou JJ, Vinters H V., et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem [Internet]*. 2014;47(4–5):258–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.01.002>
4. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: Past, present, and future. *J Histochem Cytochem*. 1997;45(3):327–43.
5. Gorzolka K, Walch A. MALDI mass spectrometry imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues in clinical research. *Histol Histopathol*. 2014;29(11):1365–76.
6. Cross, Sarah J. Linker, Kay E. Leslie FM. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2016;176(1):100–106.
7. Allen EM Van, Wagle N, Stojanov P, Perrin DL, Marlow S, Jane-valbuena J, et al. Tumor Samples To Guide Precision Cancer Medicine. 2014;20(6):682–8.
8. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One*. 2007;2(12):1–7.
9. Li P, Conley A, Zhang H, Kim HL. Whole-Transcriptome profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded renal cell carcinoma by RNA-seq. *BMC Genomics*. 2014;15(1):1–9.
10. Giusti L, Lucacchini A. Proteomic studies of formalin - fixed paraffin - embedded tissues. 2013;165–77.
11. Gustafsson OJR, Arentz G, Hoffmann P. Proteomic developments in the analysis of formalin-fixed tissue. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics [Internet]*. 2015;1854(6):559–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.10.003>
12. Hood BL, Darfler MM, Guiel TG, Furusato B, Lucas DA, Ringeisen BR, et al. Proteomic analysis of formalin-fixed prostate cancer tissue. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(11):1741–53.
13. Ostasiewicz P, Zielinska DF, Mann M, Wisniewski JR. Proteome, phosphoproteome, and N-glycoproteome are quantitatively preserved in formalin-fixed paraffin-embedded tissue and analyzable by high-resolution mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2010;9(7):3688–700.
14. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) tissue: How well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(11):1520–30.
15. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An

- enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 1991;39(6):741–8.
16. Gaffney EF, Riegman PH, Grizzle WE, Watson PH. Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotech Histochem* [Internet]. 2018;93(5):373–86. Available from: <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1446101>
 17. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Anal Chem*. 1997;69(23):4751–60.
 18. Smith A, Piga I, Galli M, Stella M, Denti V, del Puppo M, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging in the study of gastric cancer: A mini review. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12).
 19. Ucal Y, Ozpinar A. Improved spectra for MALDI MSI of peptides using ammonium phosphate monobasic in MALDI matrix. *J Mass Spectrom*. 2018;53(8):635–48.
 20. Ucal Y, Tokat F, Duren M, Ince U, Ozpinar A. Peptide Profile Differences of Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-Like Nuclear Features, Encapsulated Follicular Variant, and Classical Papillary Thyroid Carcinoma: An Application of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spe. *Thyroid*. 2019;29(8):1125–37.
 21. Soybel DI. Anatomy and physiology of the stomach. *Surg Clin North Am*. 2005;85(5):875–94.
 22. Türk Cerrahi Derneği. Gastrointestinal Sistem Endoskopisi [Internet]. 2016. 303–305 p. Available from: <https://turkcer.org.tr/files/publications/86/fbd58fceed748112cd1a7911d8df70df.pdf>
 23. Daniels IR, Allum WH. The Anatomy and Physiology of the Stomach. *Up Gastrointest Surg*. 2005;17–37.
 24. Xavier RJ, Thomas HJ. *Gastrointestinal Diseases* [Internet]. Tenth Edit. Hunter’s Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease: Ninth Edition. Elsevier Inc.; 2012. 18–27 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00003-X>
 25. Hu Y, He LH, Xiao D, Liu GD, Gu YX, Tao XX, et al. Bacterial flora concurrent with helicobacter pylori in the stomach of patients with upper gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 2012;18(11):1257–61.
 26. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
 27. Gültekin M, Boztaş G. *Katkıda Bulunanlar*. Sağlık Bakanl Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2014;43:12–32.
 28. Lyons K, Le LC, Pham YTH, Borron C, Park JY, Tran CTD, et al. Gastric cancer: Epidemiology, biology, and prevention: A mini review. *Eur J Cancer Prev*. 2019;28(5):397–412.
 29. Eusebi LH, Telese A, Marasco G, Bazzoli F, Zagari RM. Gastric cancer prevention strategies: A global perspective. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020;35(9):1495–502.
 30. Kron J. Peptic ulcer disease. *J Complement Med*. 2008;7(1):12–9.

31. Prasad MA, Friedman LS. Peptic Ulcer Disease - General - Etiology and Pathogenesis. 2018;35–47.
32. Rogers AI. Medical treatment and prevention of peptic ulcer disease. *Postgrad Med.* 1990;88(5):57–60.
33. Sipponen P, Maaros HI. Chronic gastritis. *Scand J Gastroenterol.* 2015;50(6):657–67.
34. Selviana BY. Effect of Coffee and Stress with the Incidence of Gastritis. *J Major.* 2015;4:2–6.
35. Shiota S, Thrift AP, Green L, Shah R, Verstovsek G, Rugge M, et al. Clinical Manifestations of *Helicobacter pylori*-Negative Gastritis. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2017;15(7):1037-1046.e3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2017.01.006>
36. Salimzadeh L, Bagheri N, Zamanzad B, Azadegan-Dehkordi F, Rahimian G, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Frequency of virulence factors in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis. *Microb Pathog.* 2015;80(February):67–72.
37. Varis K. Gastritis - a misused term in clinical gastroenterology. *Scand J Gastroenterol.* 1988;23(S155):53–60.
38. Smith AE, Geigy C. Formaldehyde. 1992;83–8.
39. Shaham J, Bomstein Y, Meltzer A, Kaufman Z, Palma E, Ribak J. DNA - Protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde - in vitro and in vivo studies. *Carcinogenesis.* 1996;17(1):121–5.
40. Usanmaz SE, Akarsu ES, Vural N. Neurotoxic effects of acute and subacute formaldehyde exposures in mice. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2002;11(2):93–100.
41. Bolt HM. Experimental toxicology of formaldehyde. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1987;113(4):305–9.
42. Heck HDA, Casanova M. Pharmacodynamics of formaldehyde: Applications of a model for the arrest of DNA replication by DNA-protein cross-links. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;160(1):86–100.
43. O'Rourke MB, Djordjevic SP, Padula MP. A non-instrument-based method for the analysis of formalin-fixed paraffin-embedded human spinal cord via matrix-assisted laser desorption/ionisation imaging mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2015;29(19):1836–40.
44. Magangane P, Khumalo N, Adeola H. The effect of antigen retrieval buffers on MALDI mass spectrometry imaging of peptide profiles in skin FFPE tissue. *J Interdiscip Histopathol.* 2018;7(1):26.
45. Abdallah C, Dumas-Gaudot E, Renaut J, Sergeant K. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *Int J Plant Genomics.* 2012;2012.
46. Han, X.; Aslanian, A.; Yates JR. Mass Spectrometry for Proteomics. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2008;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
47. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(2):140–50.

48. BİBEROĞLU G. Kütle Spektrometresi Ve Tıp Alanında Kullanımı. Türkiye Klin Tıp Bilim Derg [Internet]. 2003;23(6):491–8. Available from: <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-kutle-spektrometresi-ve-tip-alaninda-kullanimi-4371.html>
49. Savaryn JP, Catherman AD, Thomas PM, Abecassis MM, Kelleher NL. Proteomics in 21st century medicine. *Genome Med* [Internet]. 2013;5(53):1–8. Available from: <http://genomemedicine.com/content/5/6/53>
50. Aebersold R, Mann M. <Aebersold_Mann_Proteomics_nat2003 mass spec.pdf>. *Nature*. 2003;422(March):198–207.
51. Dančik V, Addona TA, Clauser KR, Vath JE, Pevzner PA. De novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry. *J Comput Biol*. 1999;6(3–4):327–42.
52. Weiland F, Zammit CM, Reith F, Hoffmann P. High resolution two-dimensional electrophoresis of native proteins. *Electrophoresis*. 2014;35(12–13):1893–902.
53. Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z, et al. Basics and recent advances of two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics*. 2014;11(1):1–10.
54. Volchenbom SL. Proteomics for Cancer Biomarker Discovery by Masters of Science in Biomedical Informatics. 2007;(1991).
55. Meleady P. Two-dimensional gel electrophoresis and 2D-DIGE. *Methods Mol Biol*. 2018;1664:3–14.
56. Karpievitch Y V., Polpitiya AD, Anderson GA, Smith RD, Dabney AR. Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. *Ann Appl Stat*. 2010;4(4):1797–823.
57. Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) - Technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007;115(9):559–70.
58. Rauh M. LC-MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2012;883–884:59–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.030>
59. Weickhardt C, Moritz F, Grottemeyer J. Time-of-flight mass spectrometry: State-of-the-art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrom Rev*. 1996;15(3):139–62.
60. Ucal Y, Durer ZA, Atak H, Kadioglu E, Sahin B, Coskun A, et al. Clinical applications of MALDI imaging technologies in cancer and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2017;1865(7):795–816. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.01.005>
61. Guo H, Liu W, Ju Z, Tamboli P, Jonasch E, Mills GB, et al. An efficient procedure for protein extraction from formalin-fixed, Paraffin-embedded tissues for reverse phase protein arrays. *Proteome Sci* [Internet]. 2012;10(1):1. Available from: Proteome Science
62. Wessel D, Flügge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*. 1984;138(1):141–3.

63. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* 2003;13(9):2129–41.
64. Peng L, Cantor DI, Huang C, Wang K, Baker MS, Nice EC. Tissue and plasma proteomics for early stage cancer detection. *Mol Omi.* 2018;14(6):405–23.
65. Tacha D, Teixeira M. History and overview of antigen retrieval: Methodologies and critical aspects. *J Histotechnol.* 2002;25(4):237–42.
66. Leong TYM, Leong ASY. How does antigen retrieval work? *Adv Anat Pathol.* 2007;14(2):129–31.
67. Ronci M, Bonanno E, Colantoni A, Pieroni L, Di Ilio C, Spagnoli LG, et al. Protein unlocking procedures of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Application to MALDI-TOF Imaging MS investigations. *Proteomics.* 2008;8(18):3702–14.
68. Gustafsson JOR, Oehler MK, McColl SR, Hoffmann P. Citric acid antigen retrieval (CAAR) for tryptic peptide imaging directly on archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Proteome Res.* 2010;9(9):4315–28.
69. Casadonte R, Caprioli RM. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. *Nat Protoc [Internet].* 2011;6(11):1695–709. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.388>
70. Diehl HC, Beine B, Elm J, Trede D, Ahrens M, Eisenacher M, et al. The challenge of on-tissue digestion for MALDI MSI- a comparison of different protocols to improve imaging experiments. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(8):2223–43.
71. Xu H, Yang L, Wang W, Shi SR, Liu C, Liu Y, et al. Antigen retrieval for proteomic characterization of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Proteome Res.* 2008;7(3):1098–108.
72. Vos DRN, Jansen I, Lucas M, Paine MRL, de Boer OJ, Meijer SL, et al. Strategies for managing multi-patient 3D mass spectrometry imaging data. *J Proteomics.* 2019;193(July):184–91.
73. Hermann J, Noels H, Theelen W, Lellig M, Orth-Alampour S, Boor P, et al. Sample preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections for MALDI-mass spectrometry imaging. *Anal Bioanal Chem.* 2020;412(6):1263–75.
74. Hodge K, Have S Ten, Hutton L, Lamond AI. Cleaning up the masses: Exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS. *J Proteomics [Internet].* 2013;88:92–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.023>
75. Biringier R, Scientist S, Corporation TE, Parkway RO. Protocol for a Keratin-Free Environment. 2002;
76. Rasmussen T, Hansen J, Nissen P, Palmfeldt J, Dalager S, Jensen U, et al. Protein expression studies of desmoplakin mutations in cardiomyopathy patients reveal different molecular disease mechanisms. *Clin Genet.* 2013;84(1):20–30.
77. Ly A, Longuespée R, Casadonte R, Wandernoth P, Schwamborn K, Bollwein C, et al. Site-to-Site Reproducibility and Spatial Resolution in MALDI-MSI of Peptides from Formalin-Fixed

- Paraffin-Embedded Samples. *Proteomics - Clin Appl.* 2019;13(1):1–30.
78. Longuespée R, Kriegsmann K, Cremer M, Zgorzelski C, Casadonte R, Kazdal D, et al. In MALDI–Mass Spectrometry Imaging on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Specimen Section Thickness Significantly Influences m/z Peak Intensity. *Proteomics - Clin Appl.* 2019;13(1):1–7.
 79. Groseclose MR, Massion PP, Chaurand P, Caprioli RM. High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry. *Proteomics.* 2008;8(18):3715–24.
 80. Judd AM, Gutierrez DB, Moore JL, Patterson NH, Yang J, Romer CE, et al. A recommended and verified procedure for in situ tryptic digestion of formalin-fixed paraffin-embedded tissues for analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2019;54(8):716–27.
 81. Casadonte R, Kriegsmann M, Deininger SO, Amann K, Paape R, Belau E, et al. Imaging mass spectrometry analysis of renal amyloidosis biopsies reveals protein co-localization with amyloid deposits. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(18):5323–31.
 82. Longuespée R, Kriegsmann K, Cremer M, Zgorzelski C, Casadonte R, Kazdal D, et al. In MALDI–Mass Spectrometry Imaging on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Specimen Section Thickness Significantly Influences m/z Peak Intensity. *Proteomics - Clin Appl.* 2019;13(1):1–19.
 83. Kim YH, Fujimura Y, Sasaki M, Yang X, Yukihiro D, Miura D, et al. In situ label-free visualization of orally dosed strictinin within mouse kidney by MALDI-MS imaging. *J Agric Food Chem.* 2014;62(38):9279–85.
 84. SUGIURA Y, SHIMMA S, SETOU M. Thin Sectioning Improves the Peak Intensity and Signal-to-Noise Ratio in Direct Tissue Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom Soc Jpn.* 2006;54(2):45–8.
 85. Rocha B, Cillero-Pastor B, Blanco FJ, Ruiz-Romero C. MALDI mass spectrometry imaging in rheumatic diseases. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2017;1865(7):784–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.10.004>
 86. Pietrowska M, Gawin M, Polańska J, Widłak P. Tissue fixed with formalin and processed without paraffin embedding is suitable for imaging of both peptides and lipids by MALDI-IMS. *Proteomics.* 2016;16(11–12):1670–7.
 87. Lee RFS, Theiner S, Meibom A, Koellensperger G, Keppler BK, Dyson PJ. Application of imaging mass spectrometry approaches to facilitate metal-based anticancer drug research. *Metallomics.* 2017;9(4):365–81.
 88. Aoki Y, Toyama A, Shimada T, Sugita T, Aoki C, Umino Y, et al. A novel method for analyzing formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue sections by mass spectrometry imaging. *Proc Japan Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2007;83(7):205–14.

8 EKLER

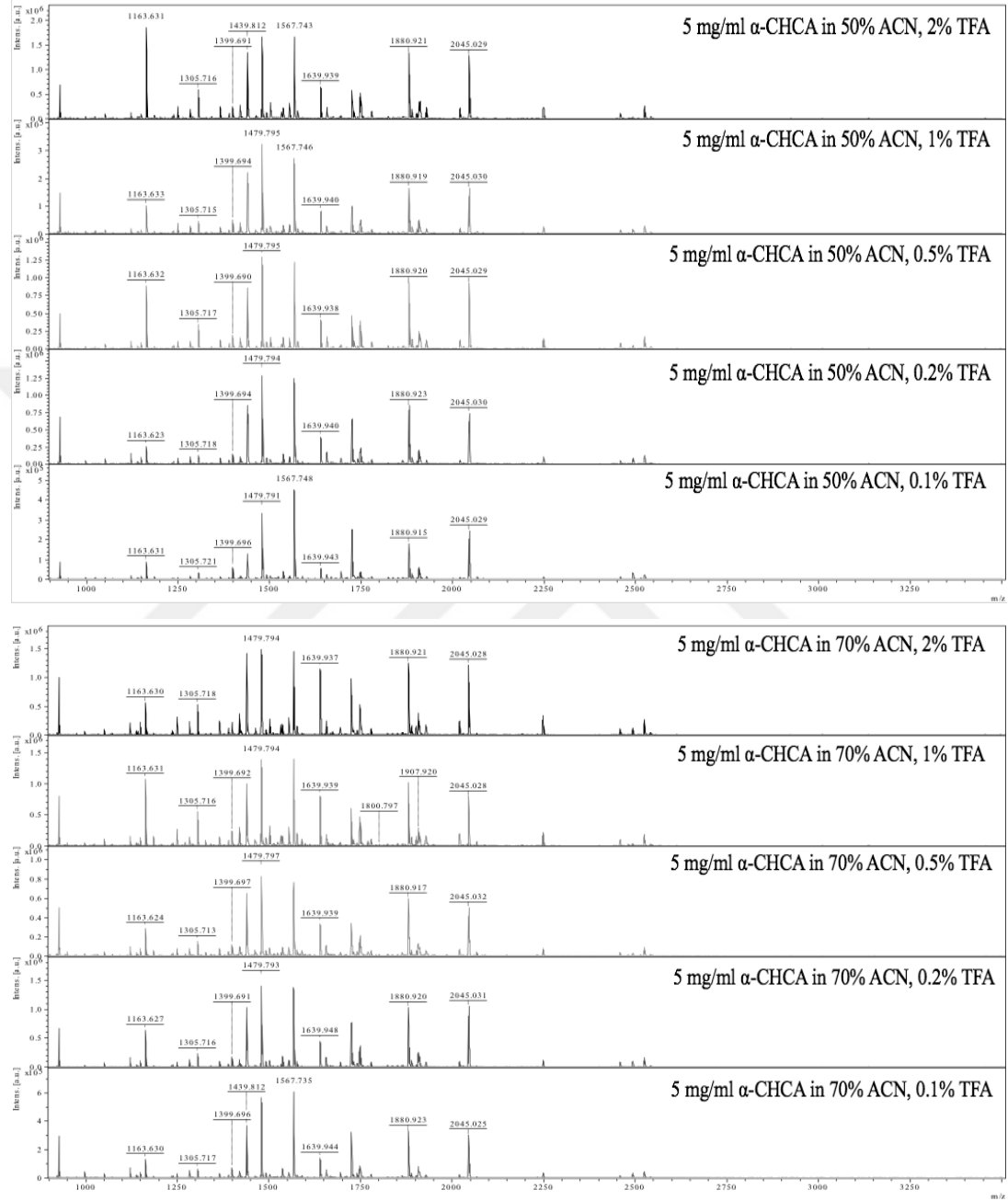
EK 1 Etik Kurul Onayı



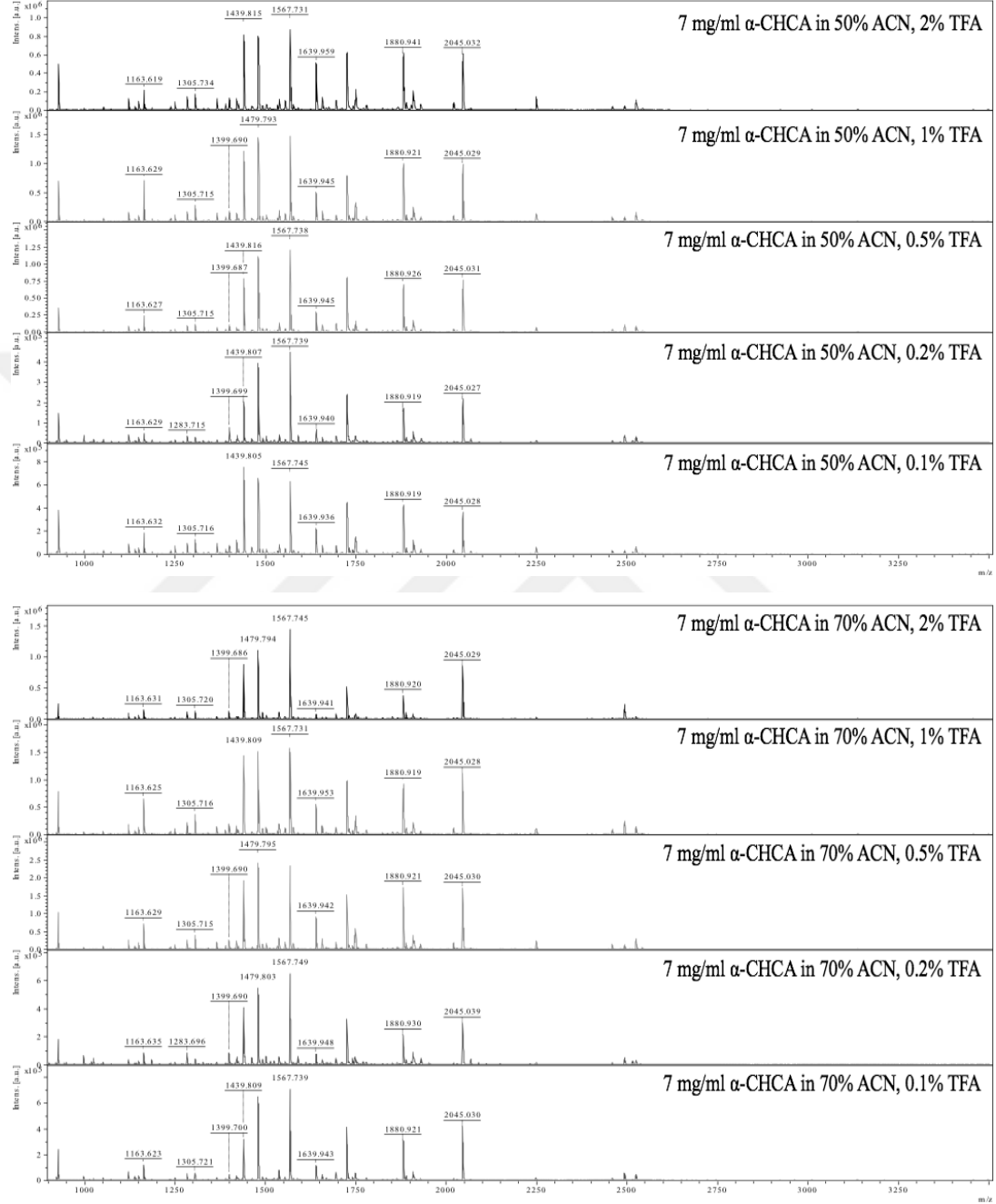
EK 1 Etik Kurul Onayı (Devamı)



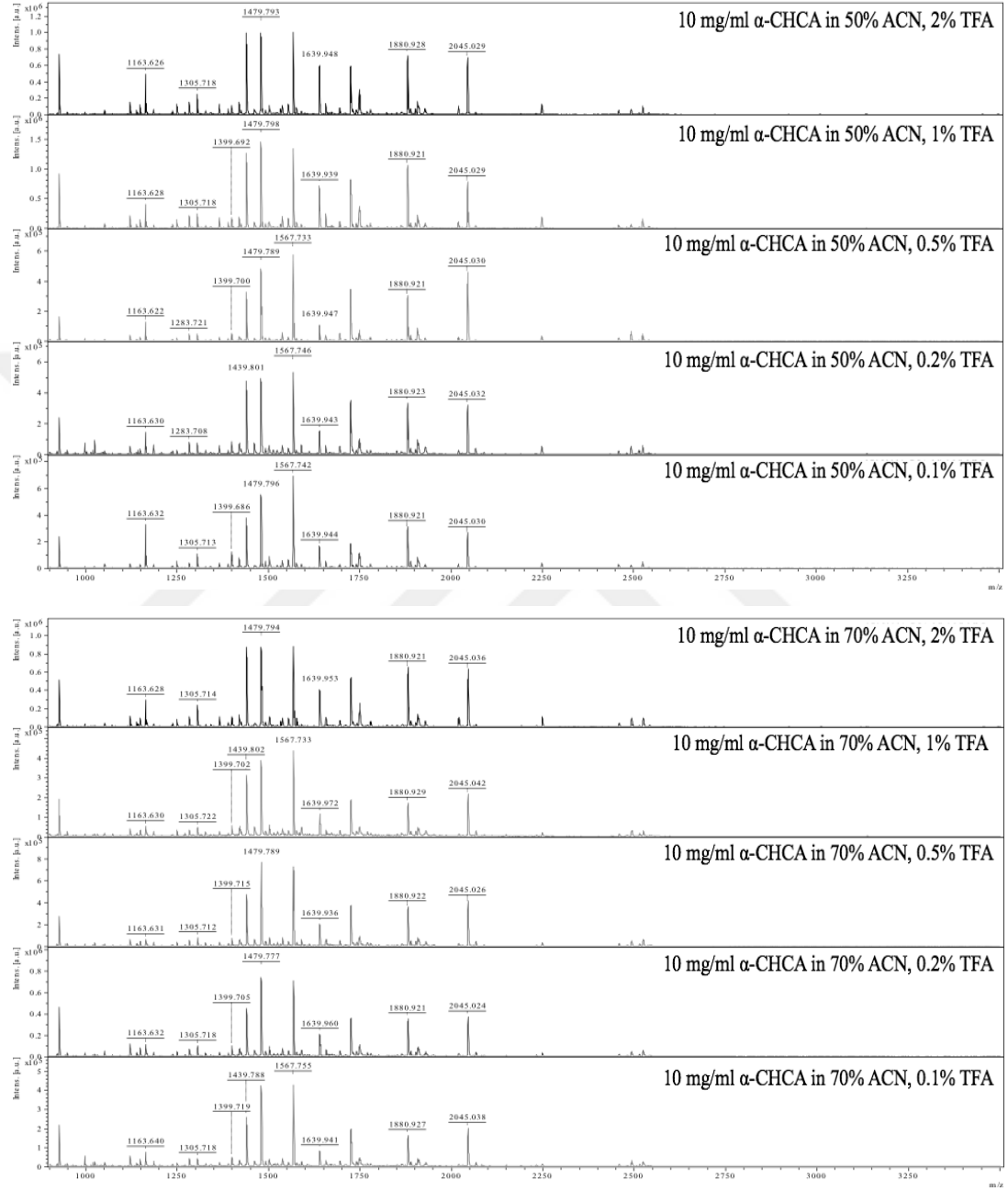
EK 2 Farklı Konsantrasyon ve Kompozisyonlarda Hazırlanan 30 Farklı α -CHCA Matriksin Analizinden Elde Edilen Spektrumlar



EK 2 Farklı Konsantrasyon ve Kompozisyonlarda Hazırlanan 30 Farklı α -CHCA Matriksin Analizinden Elde Edilen Spektrumlar (Devamı)



EK 2 Farklı Konsantrasyon ve Kompozisyonlarda Hazırlanan 30 Farklı α -CHCA Matriksin Analizinden Elde Edilen Spektrumlar (Devamı)



9 ÖZGEÇMİŞ



