T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER ALT TİPLERİNDE HEDEFLEYİCİ PEPTİTİN ORTAK RESEPTÖRÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Zeynep KILINÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

Danışman
Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Eş Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Gamze YEŞİLAY

Temmuz, 2024

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER ALT TİPLERİNDE HEDEFLEYİCİ PEPTİTİN ORTAK RESEPTÖRÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Zeynep KILINÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 29.07.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU	Dr. Öğr. Üyesi Gamze YEŞİLAY
Yıldız Teknik Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Danışman	Eş Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Büşra BOLAT, Üye

Sağlık Bilimleri Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplerinde Hedefleyici Peptitin Ortak Reseptörünün Araştırılması" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Zeynep KILINÇ

İmza

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 122Z231" numaralı projesi ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

Eşime

ve

İnsanlığa

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca her zor anımda yanımda olan, engin tecrübesi ile yolumu aydınlatan, bilge ve hoşgörülü tavrıyla beni destekleyen ve cesaretlendirilen sayın hocam Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na minneti borç bilir; sonsuz teşekkür ve saygılarımı arz ederim.

Tez sürecim boyunca yaptığım her yanlışı hoşgörü ile karşılayıp arkamda durarak beni destekleyen, her ihtiyacım olduğunda bir telefon uzağımda olan, çalışmalarımı planlama ve yürütülmesinde bana önderlik eden ve her öğrenciye nasip olmayacak bir yüksek lisans deneyimini bana yaşatan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Gamze YEŞİLAY'a, çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen, bana projesini emanet eden ve kendisi ile vakit geçirmekten zevk aldığım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Büşra BOLAT'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı arz ederim.

Bu tez çalışmasının gizli ve gönüllü, hayatımın baş kahramanı olan, beni bir an olsun yalnız bırakmayıp her anımda destek olan ve beni cesaretlendiren, elindeki bütün imkanları ayaklarımın altına sererek benim bu süreci rahat atlatmamı sağlayan sevgili eşim Cihan KILINÇ'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans süreci boyunca zaman ve mekân algımızı derinden sarsan, temiz ve saf ahlakı ile bana örnek olan, desteğini bir gün olsun eksik etmeyen sıra arkadaşım Züleyha DEMİRCİ'ye, prensesliğin kitabını yazsa da bütün sorunlarımızı sırtlayan, ne zaman ihtiyacım olsa yardımıma koşan ve evi okula sadece bir saat uzaklıkta olan küçük dev kader ortağım Ebral AKGÜN'e, sürekli proje fikirleri üretmesini hayranlık ile takip ettiğim, hayata karşı dik duruşlu tavrı ile bana ders veren ve sadece tez çalışmamda değil hayata dair verdiği tavsiye ve desteği ile içimi rahatlatan sırdaşım Şuranur AYVAZ'a teşekkür eder; ömürleri boyunca ayaklarına taş değmemesini temenni ederim.

Hayatım boyunca 'benim çocuğum yapar' diyerek benden umudunu hiç yitirmeyen, destekleyen ve bugünlere getiren annem Güzide ÇALIŞ'a, lisans ve yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bana sponsor olan eniştem Yılmaz GÜLTEKİN'e, hayat ve tez sürecimde benden manevi desteğini esirgemeyen rol modelim kuzenim Esra GÜLTEKİN'e teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 122Z231" numaralı projesi ile desteklenmiştir. Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında sağladığı maddi destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep KILINÇ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ ix

KISALTMA LİSTESİ x

ŞEKİL LİSTESİ xv

TABLO LİSTESİ xvi

ÖZET xvii

ABSTRACT xix

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 2

1.3 Hipotez 2

2 MEME KANSERİ 4

2.1 Meme Kanseri 4

2.1.1 Meme Kanserinde Alt Tipler 5

2.1.2 Meme Kanseri Hücre Hatları 15

2.2 Meme Kanseri Biyobelirteçleri 18

2.3 Tümör ile İlişkili Peptitler 23

2.3.1 RGD Peptitleri 24

2.3.2 NGR Peptitleri 26

2.3.3 LyP-1 Peptitleri 27

2.3.4 CLT Peptitleri 27

2.3.5 Diğer Peptitler 28

2.4 Meme Kanserinde Tümörle İlişkili Peptitler 30

2.4.1 p18-4 Peptit ve Meme Kanseri ile İlişkisi 36

2.5 Reseptör ve Biyobelirteç Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler 44

2.5.1 Proteinleri Çözünürleştirme Yöntemleri 44

2.5.2 İzolasyon Yöntemleri 49

2.5.3 Karakterizasyon Yöntemleri 53

3 DENEYSEL ÇALIŞMA **56**

3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hücreler 56

3.2 Yöntem 59

3.2.1 Hücre Kültürü 59

3.2.2 Protein İzolasyonu 60

3.2.3 DC Protein Tayini ve SDS Jel Görüntüleme 63

3.2.4 Afinite Kromatografisi 65

3.2.5 LC-MS 65

4 SONUÇ **68**

4.1 Protein İzolasyonu 68

4.1.1 Tuz ile Protein İzolasyonu 68

4.1.2 Ultrasantrifüj ile Protein İzolasyonu 69

4.1.3 Deterjan ile Protein İzolasyonu 70

4.1.4 SMALP ile Protein İzolasyonu 71

4.2 Afinite Kromatografisi 74

4.2.1 p18-4 ile Afinite Kromatografisi 74

4.2.2 Rastgele Peptit Dizisi ile Afinite Kromatografisi 79

4.3 LC-MS 85

4.3.1 Protein Sindirimi 85

4.3.2 LC-MS 87

4.4 Öneriler 89

KAYNAKÇA **91**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **115**

SİMGE LİSTESİ

℃	Derece
µg	Mikro Gram
µL	Mikro Litre
mL	Mili Litre
mM	Mili Molar
M	Molar

KISALTMA LİSTESİ

1D	Tek Boyutlu
2D	İki Boyutlu
AFM	Aatomik Kuvvet Mikroskobu
AGR2	Anterior Gradient 2
APA	Aminopeptidaz A
AR	Androjen Reseptör
BL	Bazal Benzeri
BRCA1	Meme Kanseri A1 Geni
BRCA2	Meme Kanseri A2 Geni
BRIP1	BRCA1 ile Etkileşime Giren Protein 1
CA15-3	Karbonhidrat Antijen 15-3
CCNE1	Siklin E1
CDH1	Kaderin-1
Ce6	Klorin e6
CF	Karboksi Florisin
CHEK2	Kontrol Noktası Kinaz 2
CMC	Kritik Misel Derişimi
COX-2	Siklooksijenaz-2
CR-1	Kripto-1
DC	Deterjan Uyumlu
DDM	n-Dodesil-β-D-Maltopiranozid
DIBMA	Di-izobütilen Maleik Asit
DKIS	Duktal Karsinoma *in situ*
DM	n-Dekil-β-D-Maltopiranozid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DOX	Doksorubisin
DTT	Ditiyotreitol
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü

EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Östrojen Reseptörü
ERBB2	Erb-B2 Receptor Tirozin Kinaz 2
FA	Formik Asit
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
FGF2	Fibroblast Büyüme Faktörü 2
FGFR	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
FOXA1	Forkhead Box A1
GAS1	Büyüme Baskılayıcı Spesifik 1
GATA3	GATA Bağlayıcı Proteini 3
GCDFP-15	Gross Kistik Hastalık Sıvı Protein-15
GRB7	Büyüme Faktörü Bağımlı Birincil Adaptör Protein 7
HA	Hiyalüronik Asit
HB	Homojenizasyon Tampon
HBA	Homojenizasyon Tampon A
HBB	Homojenizasyon Tampon B
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
HIC	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi
HR	Hormon Reseptörü
HSP	Isı Şok Protein
IDK	İnvaziv Duktal Karsinom
IEC	İyon Değişimi Kromatografisinde
IFN	İnterferon
IL4R	İnterleukin-4 Reseptörünü
ILK	İnvaziv Lobüler Karsinomdur
IM	İmmünomodülatör
IMAC	İmmobilize Metal İyonu Afiniteli Kromatografi
IMP	İntegral Membran Proteinleri
Ki-67	Antijen Tanımlayan 67
KLK14	Mammaglobin, Kallikrein 14
KSA	Kopya Sayısı Anomalileri

LAR	Luminal Androjen
LC	Sıvı Kromatografi
LKIS	Lobüler Karsinoma *in situ*
LMNG	Lauril Maltoz Neopentil Glikol
LNP	Lignin Nanoparçacıklar
M	Mezenkimal
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma
MAMK	Moleküler Apokrin Alt Tipi
MAP3K1	Mitogen Aktive Edici Protein Kinaz Kinaz 1
MGBA	Mammaglobin A
MKI67	Antijen Tanımlayan 67, KI-67
MMP	Matris Metalloproteinaz
MS	Kütle Spektrometresi
MSL	Mezenkimal Kök Hücre Benzeri
MUC1	Mucin 1
NSEP1	Nükleer Sentez Edici Faktör 1
NST	Özel Tip Olmayan
OG/NG	n-Oktil-β-D-Glukopiranozid / n-Nonil-β-D-Glukopiranozid
OPN	Osteopontin
p18-4	Peptit 18-4
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1
PALB2	Partner ve Lokalizatör BRCA2
PAM50	Perfüzyon Ayarlı Moleküler Subtip Anlama Paneli
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
PD1	Programlanmış Ölüm 1
PDC	Peptit İlaç Konjugatları
PD-L1	PD Ligandı 1
PEG	Polietilen Glikol
PI3K	Fosfatidil İnositol 3-kinaz
PIK3CA	Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz Katalitik Alfa Polipeptit
PMSF	Fenilmetil Sülfonil Florid
PR	Progesteron Reseptörü

PS	Penisilin Streptomisin
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homolog
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RP-HPLC	Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEC	Boyut Dışlama Kromatografisi
SERDS	Saf Selektif ER Aşağı Düzenleyicileri
SFRP1	Salgılanmış Frizzled İlgili Protein 1
SK	Sitokeratin
SMA	Stiren Maleik Asit
SMA-EA	SMA Etanolamin
SMA-ED	SMA-Etilendiamin
SMA-EtA	SMA-Etilamin
SMA-MA	SMA- Metilamin
SMA-PA	SMA- Propilamin
SMA-QA	Stiren Maleimid Kuaterner Amonyum
SMFS	Tek molekül kuvvet spektroskopisi
SMI	Stiren-Maleik İmid
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
TAM	Tümörle İlişkili Makrofaj
TBX3	T-box Transkripsiyon Faktörü 3
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethyl-ethylenediamine
TF	Organ Faktörü
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TOF	Uçuş Süresi
TP53	Tümör Protein p53
TX-100	Triton X-100
UDM	n-Undesil-β-D-maltopiranozid
UPLC	Ultra-HPLC

ÜNMK	Üçlü Negatif Meme Kanseri
VEGF	Vasküler Endotel Byüme Faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
zSMA:	Zwitteriyonik SMA

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 GLOBOCAN**,** 2020 verileri kullanılarak dünya genelinde tüm yaş grupları arası kadın meme kanseri için yaşa standartlaştırılmış (ASR) görülme sıklığı oranları**.....4**
Şekil 2.2 Meme kanseri alt tiplerinin sınıflandırılması**. 8**
Şekil 2. 3 İçsel alt tipler**. 10**
Şekil 2.4 Nanodisk ve SMALP**.....48**
Şekil 2.5 SMA türleri**.....49**
Şekil 4.1 Tuz ile çöktürme yöntemiyle elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonucu**. 69**
Şekil 4.2 Ultrasantrifüj yöntemi ile elde edilen zar proteinlerin SDS-PAGE sonucu. **.....70**
Şekil 4.3 Deterjan ile protein izolasyonu yöntemi ile elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonucu**.....71**
Şekil 4.4 SMALP ile elde edilen MDA-MB-231 hücre hattının proteinlerinin SDS-PAGE görüntüleri**.....73**
Şekil 4.5 SMALP ile elde edilen MDA-MB-231, MCF-7, T-47D ve AU-565, BT-474, MCF-10A hücre hatlarına ait proteinler**.. .....73**
Şekil 4.6 Afinite kromatografisinden elde edilen MDA-MB-231 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü**.....77**
Şekil 4.7 Afinite kromatografisinden elde edilen AU-565 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü**.....77**
Şekil 4.8 Afinite kromatografisinden elde edilen T-47D hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. **.....78**
Şekil 4.9 Afinite kromatografisinden elde edilen BT-474 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü**.. .....78**
Şekil 4.10 Afinite kromatografisinden elde edilen MCF-10A hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü**.....79**
Şekil 4.11 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş afinite kromatografisinden elde edilen MDA-MB-231 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü**.. .....83**
Şekil 4.12 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş afinite kromatografisinden elde edilen AU-565 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü**.. .....83**
Şekil 4.13 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş afinite kromatografisinden elde edilen T-47D hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü**.. .84**
Şekil 4.14 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş afinite kromatografisinden elde edilen BT-474 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü**..84**
Şekil 4.15 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş afinite kromatografisinden elde edilen MCF-10A hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü**.. .....85**
Şekil 4.16 Tripsin ile sindirilmiş p18-4 resinden elde edilen meme kanseri hücre hatlarına ait proteinler**.. .....86**
Şekil 4.17 Tripsin ile sindirilmiş rastgele peptit dizisiyle konjuge edilmiş resinden elde edilen meme kanseri hücre hatlarına ait proteinler **.....86**

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Moleküler alt tiplerin özellikleri **13**
Tablo 2.2 Meme kanseri hücre hatları. **17**
Tablo 2.3 Meme kanserinde tümörle ilişkili peptitler **38**
Tablo 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, markası ve katalog numarası **56**
Tablo 3.2 Kullanılan hücreler ve ATTC kodları **57**
Tablo 3.3 SMALP hazırlama koşulları. **63**
Tablo 3.4 SDS-PAGE jel hazırlama çözeltileri **64**
Tablo 4.1 Tuz ile çöktürme yöntemiyle elde edilen proteinlerin derişimleri **68**
Tablo 4.2 Ultrasantrifüj yöntemiyle elde edilen proteinlerin derişimleri. **69**
Tablo 4.3 Deterjan ile protein izolasyonu yöntemiyle elde edilen proteinlerin derişimleri. **71**
Tablo 4.4 SMALP ile protein izolasyonu yöntemiyle elde edilen MDA-MB-231 hücre hattının proteinlerinin derişimleri. **72**
Tablo 4.5 %1 SMALP ile protein izolasyonu yöntemiyle elde edilen proteinlerin derişimleri **72**
Tablo 4.6 Afinite kromatografisinden elde edilen proteinlerin elüsyonlarının derişimleri. **75**
Tablo 4.7 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş resinle gerçekleştirilen afinite kromatografisinden elde edilen proteinlerin elüsyonlarının derişimleri **80**
Tablo 4.8 LC-MS protein analizi sonucu **87**

ÖZET

Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplerinde Hedefleyici Peptitin Ortak Reseptörünün Araştırılması

Zeynep KILINÇ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Eş-Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gamze YEŞİLAY

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda kanser ölümlerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Meme kanseri heterojen bir hastalık olup östrojen, progesteron ve HER2 gibi reseptörlerin varlığına bağlı olarak Luminal A, Luminal B, $HER2^+$ ve üçlü negatif olmak üzere moleküler alt tiplere ayrılmaktadır. Bu sebeple, her alt tip için uygun tedavi yöntemlerine ihtiyaç bulunmaktadır. Tümör ile ilişkili peptitler, tümör yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak hedefe yönelik tedavi veya görüntüleme amaçlı kullanılabilmektedir. Stabil bir tümör hedefleyici peptit olan peptit 18-4'ün (p18-4) Luminal A alt tipi hücre hattında (MCF-7) Keratin-1'e (SK1) bağlandığı literatürde belirtilmiştir (Soudy vd., 2011, 2017). Meme kanserinin birden fazla alt çeşidinde yapılan çalışmalarda p18-4'ün meme kanseri hücre hatlarına yüksek oranda bağlanabildiği ve hücre içine alımı olduğu görülmüştür. Bu sebeple, ortak bir reseptörün varlığının bu tez kapsamında ayrıntılı bir şekilde araştırılması hedeflenmiştir. Meme kanseri hücre hatlarından membran

proteinlerini yüksek verimlilikle izole etmek amacıyla farklı yöntemler denenip optimize edilmiştir. Stiren-maleik asit lipid partiküllerinin (SMALP), membran proteinlerini yüksek verimlilikle izole ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıştırılan proteinler afinite kromatografisinde p18-4 ile konjuge olmuş resin yardımıyla izole edilmiştir ve negatif kontrol olarak rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş resinden elüsyon edilen proteinler kullanılmıştır. Elde edilen proteinler tripsin ile sindirilmiştir ve protein fraksiyonları LC-MS ile incelenerek p18-4'e özgüllük gösteren reseptörlerin analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda MDA-MB-231 ve AU-565 hücre hatlarında kalmodulin-3, kalretikulin ve laktoilglutatyon liyaz olmak üzere ortak 3 aday belirlenmiştir. BT-474 hücre hattında kreatin kinaz ve T-47D hücre hattında ise protein pikolo proteinleri p18-4'e özgüllük göstermiştir. Bu bulgular, p18-4'ün meme kanserinin farklı moleküler alt tiplerinde değişen özgüllükte farklı proteinlerle etkileşime girdiğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında, meme kanserinin heterojen doğası sebebiyle tek bir biyobelirteç üzerinden hedefleme yapılmasının zorluğu ve biyobelirteç keşfinde hücre tipine özgün hedeflerin önemini vurgulamaktadır. İlerleyen çalışmalarda, bu farklılıkların derinlemesine araştırılması ve ortak bir biyobelirtecin belirlenmesi, hedeflemeye yönelik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Afinite kromatografi, biyobelirteç keşfi, protein saflaştırma

ABSTRACT

Investigation of the Common Receptor of a Targeting Peptide in Molecular Subtypes of Breast Cancer

Zeynep KILINÇ

Department of Chemistry

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Co-supervisor: Assist. Prof. Dr. Gamze YEŞİLAY

Breast cancer constitutes a significant portion of cancer-related deaths among women worldwide. As a heterogeneous disease, breast cancer is classified into molecular subtypes based on the presence of receptors such as estrogen, progesterone, and HER2, resulting in categories like Luminal A, Luminal B, HER2+, and triple negative. Consequently, appropriate treatment strategies are required for each subtype. Tumor-associated peptides can be used for targeted therapy or imaging by binding to specific receptors on the tumor surface. The stable tumor-targeting peptide 18-4 (p18-4) has been reported to bind to Keratin-1 (CK1) in the Luminal A subtype cell line (MCF-7) (Soudy et al., 2011, 2017). p18-4 has been shown to bind and being internalized into multiple breast cancer cell lines. Therefore, this thesis aims to investigate the presence of a common receptor in detail. Various methods were tested and optimized to isolate membrane proteins with high efficiency from different breast cancer cell lines. Styrene-maleic acid lipid particles (SMALP) were observed to isolate membrane proteins with high efficiency. The isolated proteins were eluted using resin conjugated with p18-4 in

affinity chromatography, and proteins obtained with resin conjugated with a randomly selected peptide sequence were used as negative control. The proteins were digested with trypsin and the protein fractions were analyzed using LC-MS to identify receptors specific to p18-4. Results showed that calmodulin-3, calreticulin, and lactoylglutathione lyase were identified as three common candidate proteins in the MDA-MB-231 and AU-565 cell lines. In contrast, creatine kinase was specific to the BT-474 cell line, and the piccolo protein was specific to the T-47D cell line. These findings suggest that p18-4 interacts with different proteins exhibiting varying specificity across different molecular subtypes of breast cancer. This thesis emphasis the challenge of targeting a single biomarker due to the heterogeneous nature of breast cancer and highlights the importance of cell type-specific targets in biomarker discovery. Future studies should investigate deeper into these differences and aim to identify a common biomarker, which could contribute to the development of more effective targeting strategies.

Keywords: Affinity chromatography, biomarker discovery, protein purification

1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türlerinden biridir (Eliyatkın vd., 2015). Günümüzde erken teşhisin ve kişiye özel tedavi yöntemlerinin gelişmesiyle meme kanseri sebepli ölümlerin oranı %23'ten %15,5'e düşmüştür (*Cancer Today*, t.y.). Meme kanseri insidansı bölgesel farklılıklar göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde meme kanseri, kansere bağlı ölümler arasında önde gelen türdür. Gelişmiş ülkelerde ise ikinci sırada yer almaktadır (Seely & Alhassan, 2018).

Meme kanseri risk faktörleri arasında ilerleyen yaş, cinsiyet, genetik mutasyonlar, etnik köken, yüksek vücut kitle indeksi, doğum yapmamış olmak, aile öyküsü, menopoz, hormon dengesi, yaşam kalitesi, obezite ve diyabet bulunmaktadır (Momenimovahed & Salehiniya, 2019; Watkins, 2019).

Meme kanseri, histolojik ve moleküler sınıflandırmalar olmak üzere iki farklı kategoride incelenir. Geleneksel histolojik sınıflandırmada, tümörün bulunduğu doku, boyutu, derecesi ve yayılma durumu gibi faktörler değerlendirilir (Perou vd., 2000). Moleküler sınıflandırma ise hormon reseptörü (HR) ve HER2 reseptörlerinin varlığına dayanır. Meme kanseri sadece birkaç reseptörle sınırlı kalmayıp çeşitli moleküler alt tiplere ayrılabileceği mikrodizi tabanlı gen ifade analizi ile gösterilmiştir (Sørlie vd., 2001a). Bu moleküler alt tipler, Luminal benzeri, HER2 zenginleşmiş, normal benzeri ve bazal benzeri olarak adlandırılır. Bu sınıflandırmalar, tedavi, teşhis ve görüntüleme stratejilerinin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (Turner vd., 2021).

Tümör ile ilişkili peptitler, hedefe yönelik tedavilerde ve görüntüleme amaçlı olarak kullanılabilen küçük moleküllerdir. Bu peptitler, tümör hücreleri üzerinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak hücrelere yönlendirilebilirler (Enbäck &

Laakkonen, 2007). Bazı peptitler sadece hücre içine alınırken, bazıları hedef hücrelerde antitümör etkiler gösterir. Peptitlerin küçük boyutları, yüksek zar geçirgenliği ve hedefe yönelik özgüllükleri, onları antikorlara kıyasla daha avantajlı kılar (Craik vd., 2013). Bu peptitler, doğrudan ilaç taşıma sistemi, görüntüleme ajanı veya sitotoksik bileşikleri taşıma aracı olarak kullanılabilirler.

Biyobelirteçler, kanser teşhisi, tedavisi ve prognozunda önemli rol oynayan biyolojik moleküllerdir. Kan, serum, plazma, doku ve diğer vücut sıvılarından elde edilen biyobelirteçler, normal veya anormal bir sürecin göstergesi olabilir (Henry & Hayes, 2012). Proteinler, nükleik asitler, antikorlar ve peptitler biyobelirteçler arasında yer alır. Meme kanseri teşhisinde kullanılan biyobelirteçler arasında RS/DJ-1, p53, HSP60, HSP90, MUC1, ER, PR, HER2, mammaglobin, KLK14, OPN ve CR-1 gibi proteinler bulunur (Luca vd., 2020a). Peptitler hedef hücrelerde bulunan biyobelirteçlere yönlendirilip tedavi veya görüntüleme amacıyla kullanılabilir (Kondo vd., 2021). Bu sebeple, biyobelirteçlerin karakterizasyonu ile tümörle ilişkili peptitlerin hedeflerinin belirlenmesi kritik öneme sahiptir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı, meme kanserinin moleküler alt tiplerinde p18-4 peptitinin hedeflediği ortak reseptörleri araştırmaktır. Bu doğrultuda, meme kanseri alt tiplerine ait hücre hatlarından membran proteinleri izole edilerek p18-4'ün spesifik olarak hedeflediği reseptörlerin tanımlanması ve bu reseptörlerin biyobelirteç olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin, meme kanseri tedavisinde p18-4 peptitinin potansiyel kullanım alanlarını ve etkinliğini ortaya koyarak, hedefe yönelik ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

1.3 Hipotez

Meme kanserinin çeşitli moleküler alt tiplerinde p18-4'ün yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, p18-4'ün Luminal A alt tipi hücre hattında (MCF-7) SK1 reseptörüne spesifik olarak bağlandığı belirtilmiştir (Soudy vd., 2011, 2017). p18-4 ve SK1 ligand-reseptör ilişkisine dayanarak üretilen Klorin e6 (Ce6) ve p18-4 modifiyeli polihedral oligomerik silseskioksan (POSS)

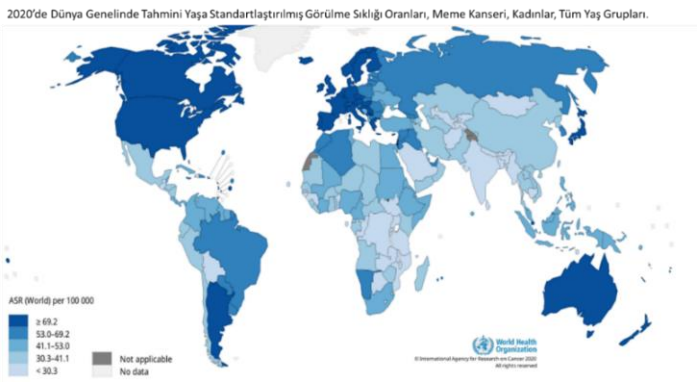
nanoparçacıklar ÜNMK alt tipi hücre hattında (MDA-MB-231) *in vitro* hücresel alımı tespit edilmiştir (Y.-J. Kim vd., 2020). Fakat literatürde SK1'e hedeflenen p18-4 sadece ÜNMK ve Luminal A alt tiplerinde gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, hipotezimiz, p18-4'ün meme kanserinin tüm moleküler alt tiplerinde ortak olarak bağlanabileceği bir veya birden fazla biyobelirteç adaylarının varlığıdır. Bu hipotezi test etmek için, p18-4'ün tüm meme kanseri moleküler alt tiplerinde bağlandığı hedef reseptörleri tespit etmek ve p18-4'e özgül ortak bir biyobelirteç belirlemek amacıyla LC-MS ile karakterizasyon yapılacaktır.

2

MEME KANSERİ

2.1 Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda dünya genelinde yeni kanser vakalarının %24,5'ini oluştururken, 2015 yılında dünya genelinde kadınlarda kanser ölümünün %23'ünü oluşturmaktaydı (Eliyatkın vd., 2015). 2020 yılı güncel verilerine göre ise kadınlarda kanser ölümünün %15,5'ini oluşturmaktadır (*Cancer Today,* t.y.). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından incelenen mevcut verilere göre, kadınlarda meme kanserinin görülme sıklığı en yüksek Belçika, Hollanda, Lüksemburg, Kanada ve Fransa gibi büyük bir kısmı Avrupa ve Kuzey Amerika'da, Güney Amerika ve Doğu Avrupa'da orta seviyede, Asya ve Afrika'nın büyük bir kısmında ise en düşük seviyedir. (Şekil 2.1). Gelişmekte olan ülkelerde kansere bağlı ölümler arasında önde gelen tür iken, gelişmiş ülkelerde ikinci önde gelen kanser türü kabul edilmektedir (Seely & Alhassan, 2018). Meme kanserinin büyük çoğunlukla kadınlarda görülmesine rağmen tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %1'ini erkekler oluşturur ve meme kanseri aile öyküsüne sahip erkeklerde ise kanser riski 2 katına kadar çıkmaktadır (Giordano, 2018).



Şekil 2.1 GLOBOCAN, 2020 verileri kullanılarak dünya genelinde tüm yaş grupları arası kadın meme kanseri için yaşa standartlaştırılmış (ASR) görülme sıklığı oranları. Veri kaynağı: GLOBOCAN, 2020; Grafik üretim: IARC (http://gco.iarc.fr/today), WHO.

Meme kanserindeki risk faktörleri arasında ilerleyen yaş, cinsiyet, genetik faktörler, etnik köken, yüksek vücut kitle indeksi, doğum yapmamış kadınlar, aile öyküsü, menopoz, hormon dengesi, yaşam kalitesi, obezite ve diyabet gibi faktörler yer almaktadır (Momenimovahed & Salehiniya, 2019; Watkins, 2019). Meme kanserine yol açan birkaç önemli genetik mutasyon bulunmaktadır (Joshi & Press, 2018). Bunlardan en iyi bilineni BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlardır ve meme kanserlerinin sadece %10'unu oluşturmaktadır (Watkins, 2019). Öte yandan aile öyküsü ile kalıtsal mutasyonun sebep olduğu meme kanserinin ilerleyen yaşlarda %70 gibi ciddi bir risk ile ilişkilendirilmiş olması hem aile öyküsündeki mutasyonun bireysel taşıyıcıya göre önemini hem de genetik olmayan faktörler ile aşağı veya yukarı yönlü kanser seyrinin değişebileceğini vurgulamıştır (Britt vd., 2020). Ayrıca, TP53, CDH1, STK11, PTEN gibi DNA onarımını ve hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki mutasyonların meme kanseri oluşumuna katkısı yüksek iken CHEK2, PALB2, BRIP1, ve XRCC2 genlerindeki mutasyonların meme kanseri oluşumuna katkısı bulunmadığı rapor edilmiştir (Łukasiewicz vd., 2021).

2.1.1 Meme Kanserinde Alt Tipler

Meme kanserinin sınıflandırılmasına tarihsel bir perspektiften bakıldığında, ilk olarak 1968'de WHO tarafından yayınlanan "Meme Tümörlerinde Histolojik Sınıflandırma" adlı kitapta, sınıflandırma yalnızca morfolojik özelliklere dayanmaktaydı (Cserni, 2020). Ancak, geçen zaman içinde yapılan çalışmaların katkısıyla, 1982'de yayımlanan ikinci baskı olan "Meme Tümörlerinde Histolojik Sınıflandırma" kitabında alt tipler, morfolojik özelliklere göre daha ayrıntılı bir şekilde tanımlamaya devam etmiştir (Weigelt & Reis-Filho, 2009). 1987 ve 1993 yıllarında, meme kanseri alt tipleri hem tümör içi çeşitliliği hem de klinikte fark edilen patolojik özellikleri dikkate alarak şekillenmeye devam etmiştir. 2003 yılında WHO tarafından yayımlanan sınıflandırmada duktal karsinoma, özel tip olmayan (IDK-NST) ve özel alt tipler olmak üzre 3 farklı alt tip isimlendirilmiştir (Cummings vd., 2011). Yayımlanmış olan sınıflandırmaya göre meme kanserlerinin %60-75'i özel tip olmayan iken %20-25'i özel alt tiplerdir. Devam eden tümör içi ve tümörler arası heterojenliğin tanımlanması ile meme kanserinde alt tipler WHO tarafından 2012'de yayımlanan dördüncü baskısı olan "Meme Kanserlerinin Sınıflandırılması" kitabında güncellenmiştir, invaziv meme

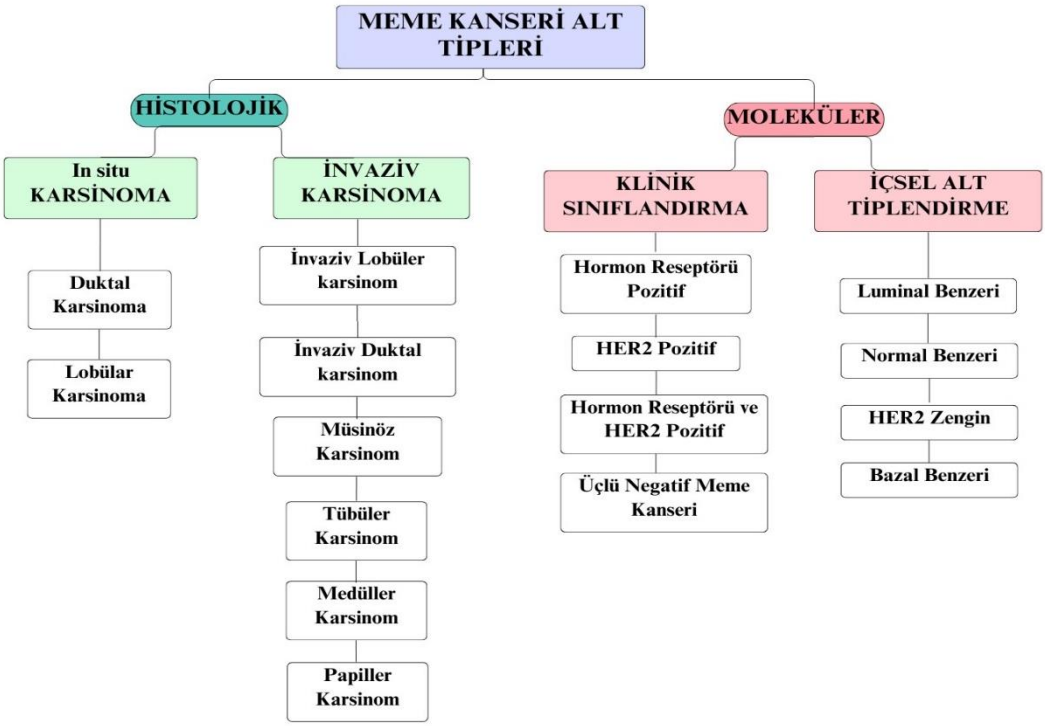
kanserinin en az 22 farklı histolojik tipin varlığından söz etmektedir (Sinn & Kreipe, 2013). Dahası 2019'da WHO tarafından yayınlanan kitabın güncel halinde ise 34 farklı meme kanseri alt türünden bahsedilmiş, ayrıca erkeklerde bulunan meme kanseri türlerine de değinilmiştir (Cserni, 2020).

Meme kanseri alt tipleri histolojik ve moleküler sınıflandırmalar olmak üzere iki farklı kategoride incelenmiştir (Şekil 2.2) (Szymiczek vd., 2021; Weigelt & Reis-Filho, 2009). Geleneksel histolojik sınıflandırmada, tümörün bulunduğu meme dokusu, boyutu, tümör derecesi ve yayılma durumu gibi faktörler önemli kriterler olarak kabul edilir. Bu sınıflandırmalar, meme kanserinin hem görüntüleme hem de moleküler düzeyde geniş bir çeşitliliğe sahip olduğunu vurgular ve bu bilgilerin tedavi stratejilerini belirlemede önemli olduğunu gösterir.

Kanserin yayılım durumuna göre ise genel olarak *in situ* ve invaziv olmak üzere 2 farklı histolojik alt gruba ayrılmaktadır. *In situ* meme kanseri başladığı bölge ile sınırlı kalan yayılım göstermeyen duktal (süt kanalı) veya lobüler (süt bezler) bölgelerde yer almaktadır. Duktal Karsinoma *in situ* (DKIS), Duktal epitel hücrelerinin malign bir proliferasyonu olarak da tanımlanmaktadır ve invaziv duktal karsinom ile benzer risk faktörlerine sahip olduğu için invaziv karsinomun gelişimine öncülük edebilecek bir potansiyel taşımaktadır (Salvatorelli vd., 2020). Lobüler karsinoma *in situ* (LKIS), pre-menopozal dönemde kadınlarda yaygın olarak görülen süt bezlerindeki hücrelerin anormal büyümesi olarak tanımlanan ancak kanser olarak kabul edilmeyen, sadece risk faktörü sayılan bir meme kanseri alt türüdür (Harbeck vd., 2019). LKIS mikroskobik bulgu ile teşhis edilmektedir çünkü hücrelerin polaritesini kaybederken düzenli boyutunu korumak gibi ayırt edici morfolojik özellikleri vardır (Wen & Brogi, 2018).

İnvaziv meme kanserlerinin %70 oranla en yaygın türü özel olmayan tip (NST) olarak sınıflandırılan invaziv duktal karsinom (IDK-NST) iken ikinci en yaygın türü %10 oran ile NST olarak sınıflandırılan invaziv lobüler karsinomdur (ILK) (Şekil 2.2) (Waks & Winer, 2019; Watkins, 2019). Diğer alt tiplerin görülme sıklığı medüller ve müsinöz karsinom için %5 iken tübüler karsinom için %1-5 arasında değişmektedir (Girgin & Eğin, t.y.). DKIS'ye sahip olmak, tümörün IDK olarak bilinen invaziv bir forma ilerleme riskini artırabilmektedir (Sadeghalvad vd., 2021). DKIS'nin invaziv hale gelmesini sağlayan potansiyel biyobelirteçler arasında

FGF2, GAS1 ve SFRP1 genleri öne çıkmaktadır (Dettogni vd., 2020). Hücrelerin birbirine tutunmasını sağlayan E-kaderin proteinini anlatan gende (CDH1) meydana gelen kalıtsal mutasyonlar, meme kanserinin bir alt türü olan ILK'de E-kaderin proteininin eksikliğine sebep olur (Mukhtar & Chien, 2021). Bu durum, α-, β-, γ-kateninlerin kaybına, p120 kateninin artarak sitoplazmaya lokalize olmasına neden olmaktadır ve meme bezinin epitelyal hücrelerinde "tek sıra halinde" adı verilen invazyon desenine yol açarak tümör oluşumunu desteklemektedir (M. Thomas vd., 2019). E-kaderin eksikliği ve p120 kateninin sitoplazmaya lokalize olması, ILK alt türünün belirleyici özelliği olmasının yanı sıra, PTEN, TBX3 ve FOXA1'i hedefleyen özel mutasyonların da bulunduğu belirtilmiştir (Luveta vd., 2020; Rakha & Green, 2017). ILK, östrojen/progesteron reseptörü (ER/PR) pozitif ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) negatif bir alt türdür. Ayrıca, ILK, IDK ile karşılaştırıldığında daha sık olarak bilateral meme tutulumuna sahiptir. Müsinöz karsinom, malign hücrelerin hücre-dışı mukus içinde hareket ettiği ve fibröz septalarla ayrılmış küme ve tabakalardan oluşan karakteristik bir özellik sergilemektedir (Jenkins vd., 2021). Tübüler karsinom ise genellikle bol stromayla çevrili, tipik olarak bir katman kalınlığında açık lümene sahip iyi ayrışmış tübüler yapıları içerirken, invaziv papiller karsinomlar, miyoepitelyal hücreler içermeyen fibrovasküler çekirdekli papiller yapıları içeren kistlerden oluşmaktadır. Bu üç nadir rastlanan alt tür, IDK ile karşılaştırıldığında daha küçük boyutlu ve düşük lenf nodu tutulumuna sahiptir, bu da olumlu prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Bu karsinomların genellikle postmenapozal dönemde ortaya çıkmaktadır ve yüksek oranda ER ve PR ifadesine sahiptir ancak HER2 eksikliğini göstermektedir (Di Saverio vd., 2008; Zheng vd., 2016). Tüm bu özellikler, bu üç karsinomun diğer meme kanseri alt tiplerinden ayırt edici olduğunu ve genellikle daha olumlu bir klinik seyirle ilişkilendiğini göstermektedir.

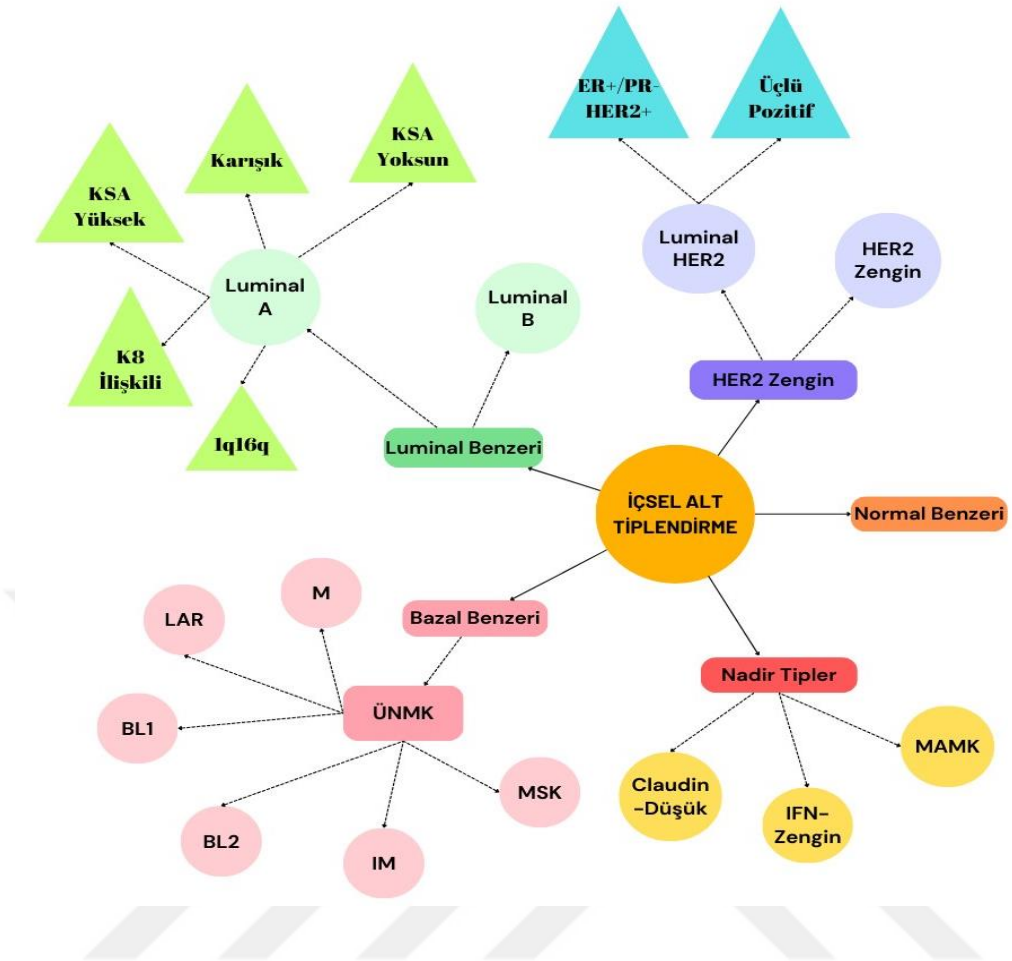


Şekil 2.2 Meme kanseri alt tiplerinin sınıflandırılması.

Meme kanserinde hormon reseptörlerinin (HR) rolü, 1960'ların sonlarına kadar tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Histolojik sınıflandırma şeması yalnızca histolojiye dayandığı ve kanıtlanmış prognostik öneme sahip yeni moleküler belirteçleri kullanmadığı için 1970'lerin sonlarına gelindiğinde, Elwood Jensen liderliğinde gerçekleştirilen çalışmalar, özellikle ER'nin meme tümörlerindeki ifadesinin ve tedavi için potansiyel bir hedef reseptör olmasının keşfi, bu biyobelirteçlerin meme kanserini sınıflandırmak amacıyla kullanılabileceği yönelimini başlatmıştır (X. Dai vd., 2016; Greene, 2013; Szymiczek vd., 2021). ER ifadesi yüksek olan meme kanseri dünya genelinde %75 gibi yüksek bir orana sahip olup bu oranın yaşa bağlı olarak değişebileceği yayınlanan klinik bir çalışmada vurgulanmaktadır (Anderson vd., 2002). Süregelen çalışmalarda, meme kanserinde ER'ye bağlı indüklenen PR keşfi gerçekleşmiştir (Walker, 2008). PR ifadesi yüksek olan tümörlerde %0,2 ila %10 arasında değişen ER negatif ifadesi gibi çok düşük bir orana sahiptir. PR ile ER ifadelerinin hastalarda beraber incelenmesiyle endokrin terapiden daha yüksek verim elde edilebileceği ifade edilmiştir (Dowsett vd., 2006; Rakha vd., 2010). Bu tümör sınıfı genellikle heterojen olduğundan HER2 gibi diğer belirteçlere bağlı olarak çeşitli karakteristik özelliklere sahip alt gruplara ayrılabilmektedir (X. Dai vd., 2016; Sørlie vd., 2001b). HER2'nin meme kanserinin

sağkalımını, invazyonunu ve farklılaşmasını etkilediğinin keşfi ile HER2 içeren kanser hücrelerine ayrı bir sınıf açılmıştır (Slamon vd., 1987). Süregelen çalışmalarda ise HR ifadesinin yüksek olduğu tümörlerde olumlu sonuçlanan hormon tedavilerin aksine HER2 yüksek ifadeli tümörlerde endokrin tedavilerine dirençli yanıt alınması bu iki grubun arasında zıt bir ilişki olduğunu göstermiştir (Tsutsui vd., 2002). Dahası, HER2 ifadesinin fazla olduğu tümörler IDK'nin %13-20'sinde görülmektedir ve bu grubun %55'inde HR ifadesinin olmadığı gözlemlenmiştir (X. Dai vd., 2016). Her ne kadar HR ve HER2 ifadeleri ters orantılı olsa da meme kanserinin heterojen doğası nedeniyle her iki proteinin de ifade edildiği meme kanseri vakaları bulunmaktadır. Bütün bu keşifler sayesinde meme kanserinin klinik sınıflandırılması 4 ana başlık altında toplanmıştır. Bu başlıklar şu şekilde isimlendirilmiştir; hormon reseptör pozitif, HER2 pozitif, üçlü negatif (ÜNMK) ve HR^{+}HER2 pozitif meme kanseri. Ancak bu dört ana başlığın meme kanserinin sahip olduğu farklı genetik özelliklere kısıtlayıcı bir yaklaşım olması sebebiyle, klinik alt türlerin genetik özellikleri incelenerek moleküler alt tipler sınıflandırılmıştır.

Klinik sınıflandırmada HR ve HER2 reseptörleri her ne kadar meme kanseri belirteçleri olarak kullanılsa da yapılan bir çalışmada klinik alt tiplerin (IDK, ILK, DKIS) gen anlatımları mikrodizi tabanlı gen ifade analizi (PAM50) kullanılarak incelendiğinde meme kanserinin sadece birkaç reseptör ile sınırlı kalmadığı, moleküler alt tiplere sınıflandırılabileceği vurgulanmıştır (Perou vd., 2000; Sørlie vd., 2001b; Turner vd., 2021). Bu sistem sayesinde Luminal benzeri, HER2 zenginleşmiş, normal benzeri ve bazal benzeri olarak moleküler dört ayrı tip isimlendirilmiştir (Şekil 2.3, Tablo 2.1).



Şekil 2.3 İçsel alt tipler.

En yaygın moleküler alt tip olan luminal-benzeri tümörlerin ER ifadesinin yüksek olması ve HER2 ifadesinin yoksunluğu yapılan ilk çalışmalarda ortaya çıksa da luminal-benzeri tümörlerinde kendi içinde heterojenliğe sahip oldukları ilerleyen çalışmalarda belirtilmiştir (Johnson vd., 2021; Turner vd., 2021). Luminal-benzeri alt tipin belirleyici özelliğinin ER ifadesinin yüksek olması yanı sıra PR ifadesinin aşırı anlatımı luminal-benzeri tümörleri 3 alt başlığa ayırmıştır. İnvaziv meme kanserinin %40-50'sini kapsayan en yaygın olan alt tip Luminal A iken diğerleri Luminal B ve Luminal C olarak isimlendirilmiştir (Peppercorn vd., 2008). Fakat Luminal B ve Luminal C'nin ayrı sınıflandırılacak kadar farklı gen ifadesine sahip olmadığı analizler sonucu tespit edilmiştir. Luminal tümörler arasında %54,3 gibi ciddi bir orana sahip olan Luminal A alt tipi ER, PR, Bcl-2, GATA3 ve sitokeratin 8/18 (SK8/18)'in yüksek ifadesi, HER2 ifadesinin yoksunluğu ve düşük proliferasyon ile karakterize edilmektedir (X. Dai vd., 2015; Eroles vd., 2012).

Luminal A, genetik mutasyonlar ele alınarak yapılan sınıflandırmada 5 farklı alt tipe ayrılmaktadır. Bunlar kopya sayısı anomalilerinden (KSA) yoksun, 1q/16q, kromozom 8 ilişkili, KSA-yüksek ve karışık tipler (Ciriello vd., 2013). 1q/16q alt tipinde PIK3CA mutasyonu, kromozom 8 ilişkili alt tipte MAP3K1 mutasyonu, KSA-yüksek alt tipinde TP53 mutasyonu ile karakterize edilmektedir. Luminal B tümörlerinde PR ve SK ifadesi düşük iken Ki-67, hücre döngüsü genleri (MKI67 ve siklin B1 genleri) ve hücre proliferasyonu genlerinin (NSEP1 ve CCNE1) yüksek ifadesi sebebiyle Luminal A alt tipinden ayrışmaktadır (Eroles vd., 2012; Tsang & Tse, 2020). Dahası, büyüme faktörlerinin bazı alternatif yolaklarının (fosfatidil inositol 3-kinaz (PI3K) ve Src) aktive edilebilmesi iki luminal alt grup arasındaki moleküler farklar sonucudur (Nascimento & Otoni, 2020). Luminal A alt tipine kıyasla daha kötü prognoza ve istikrarsız HER2 ifadesine sahiptir (Makki, 2015).

HER2 ifadesi yüksek tümörlerde aşırı HER2 ifadesi ve düşük HR ifadesi gözlemlenmektedir (Johnson vd., 2021; Perou vd., 2000). HER2 tirozin kiraz reseptörüdür ve hücredışı sinyallere bağlanarak hücre çoğalması, farklılaşması, apoptoz süreçlerini başlatmakla görevlidir (Orrantia-Borunda vd., 2022). Bu sebeple HER2 ifadesinin aşırı anlatımına sahip olan hücrelerde agresif tümör büyümesi gözlemlenmektedir (Tang & Tse, 2016). Öte yandan, hücre çoğalması yolaklarını tetikleyen HER2 reseptörünün aşırı anlatımı ile beraber, Ki67 yüksek ifadesi ve %80 oranında TP53 mutasyonu gözlemlenmektedir (Makki, 2015). Dahası, HER2 ifadesi yüksek tümörler, heterojen doğası gereği 2 farklı alt gruba ayrılmaktadır (Fountzilas vd., 2012; Tang & Tse, 2016). Bunlar şu şekilde isimlendirilmişlerdir; Luminal HER2 (ER veya PR pozitif/HER2 pozitif) ve HER2-zengin (ER veya PR negatif/ HER2 pozitif). Luminal HER2 alt tipinde GATA3, BCL2 ve ESR1 gibi genlerin ve ER'nin ifadesi yüksektir (Y.-Z. Jiang vd., 2014). Bu alt tip, PR ifadesine göre iki farklı fenotipe ayrılmaktadır, üçlü pozitif ve $ER^+/PR^-/HER2^+$ olarak isimlendirilmektedir (Parise & Caggiano, 2014). Luminal HER2 alt tiplerinde yapılan çalışmada PR ifadesinin yüksek HER2 ifadesi ile ters ilişkili olduğu, $ER^+/PR^-/HER2^+$ alt tipine sahip hastaların sağkalımı üçlü pozitif hastalara kıyasla daha az olduğu ve daha agresif bir fenotipe sahip olma eğiliminde olduğu ortaya çıkarılmıştır (Arpino vd., 2005). HER2-zengin alt tipinin karakteristik özellikleri arasında p53 ve PIK3CA mutasyonu, FGFR4, EGFR ve

HER2 gibi reseptör tirozin kinaz yollarının aktivasyonu bulunur (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Ayrıca, ERBB2 ve GRB7 dahil olmak üzere birçok gen yüksek anlatıma sahiptir.

Normal benzeri alt tip HR ve HER2 ifadesinden yoksun olduğu için ÜNMK olarak tanımlanmış olsa da SK5 ve EGFR için negatif oldukları için bazal benzeri olarak kabul edilmezler (Eroles vd., 2012). Fakat bu alt türün varlığı yapılan çalışmalar ile hala bir tartışma konusu olmaya devam etmektedir.

Bazal benzeri moleküler alt tip meme kanserinde HR, HER2 ifadesinin ve bir çok genin eksik ifadesi mevcutken SK5, SK6, SK14, SK17, integrin-B4, P-kaderin ve hücre çoğalması ile ilişkilendirilen genler yüksek ifade edilmektedir (Johnson vd., 2021). Bazal benzeri alt tip, yüksek proliferasyona sahiptir ve %70-80 oranında ÜNMK alt türünü içermektedir (N. Cho, 2016).

ÜNMK heterojen bir alt grup olup farklı alt tiplere ayrılmaktadır. Bunlar bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), immünomodülatör (IM), luminal androjen (LAR), mezenkimal (M) ve mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) alt tipler şeklinde isimlendirilmiştir (Lehmann vd., 2011). Bahsi geçen her alt tip kendine özgü karakteristik yolakları içermektedir.

BL1 alt tipi, hücre döngüsü, hücre bölünme genleri (AURKA, AURKB, CENPA, CENPF, BUB1, TTK, CCNA2, PRC1, MYC, NRAS, PLK1 ve BIRC5) bakımından zengin ifadeye ve yüksek DNA hasar yanıtı (ATR/BRCA, CHEK1, FANCA, FANCG, RAD54BP, RAD51, NBN, EXO1, MSH2, MCM10, RAD21 ve MDC1) yolaklarına sahiptir (Lehmann vd., 2011).

BL2 alt tipi, büyüme faktörü sinyalinden faydalanan yolaklarca ve aynı zamanda glikoliz ve glukoneogenez bakımından zenginlik göstermektedir. IM alt tipi, bağışıklık hücresi sinyalleşme genleri açısından desteklenmesine rağmen olumlu prognoz ile ilişkilendirilmektedir (X. Dai vd., 2015).

M ve MSL alt tipleri hücre hareketliliği, hücredışı matris reseptör etkileşimi ve hücre farklılaşma yolakları bakımından gen çeşitliliği gösterirken; inositol fosfat metabolizması, EGFR, PDGF, kalsiyum sinyalleşmesi, G-protein bağlı reseptör ve ERK1/2 sinyalleşmesi, ABC taşıyıcı ve adipokin sinyalleşme yolakları bakımından MSL alt tipi M alt tipinden ayrışmaktadır (Y.-M. Lee vd., 2020).

Tablo 2.1 Moleküler alt tiplerin özellikleri

Moleküler Alt Tipler	ER	PR	HER2	Karakteristik Genler	Prognoz	Histolojik Alt Tip
Luminal A	+	+	-	ESR1, Bcl2, GATA3, SK8/18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1	İyi	Tübüler Karsinoma, IDK- NST, ILK
Luminal B	+	- / az	-	ESR1, GATA3, SK8/18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAMPTM4B, MKI67, siklin B1, NSEP1 ve CCNE1	Orta kötü	IDK- NST, Mikropapiller Karsinoma, ILK
	+	+	+			
HER2 Aşırı İfadesi	-	-	+	GATA3, BCL2, ESR1, ERBB2, GRB7	Kötü	IDK- NST, ILK
Bazal Benzeri	-	-	-	SK5, SK17, CDH3, ID4, FABP7, TRIM29, LAMC2	Kötü	IDK-NST, Medüller Karsinoma, Adenoid Sistik Karsinoma
Normal Benzeri	+/-	-	-	PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7	Orta	Fibroadenom

LAR alt tipi, ER negatif olmasına rağmen androjen/östrojen, steroid, porfirin metabolizması gibi yolaklar ile karakterize edilmektedir ve PI3K mutasyonları ile ilişkili olup androjen reseptör ifadesi yüksektir. (Farmer vd., 2005). Yapılan prognostik analiz çalışmalarında BL1 alt tipine sahip hastaların BL2 ve LAR alt tiplerine kıyasla kemoterapiye daha az duyarlı olduklarını ve daha fazla patolojik tam yanıt elde edildiği gözlemlenmiştir (Bareche vd., 2018).

ÜNMK için potansiyel terapötik hedeflere özgü yapılan sınıflandırma da ise ÜNMK dört alt başlığa ayrılmaktadır (Burstein vd., 2015; Y.-R. Liu vd., 2016). Bunlar luminal androjen reseptörü ve hücre yüzeyi protein Mucin 1 (MUC1) ile belirlenen, mezenkimal büyüme faktörleri (CD117, PDGF reseptör A) tarafından belirlenen, bazal benzeri immün baskılı VTCN1 ile belirlenen immün baskılayıcı molekül tarafından işaretlenen, bazal benzeri immün aktivasyonu işaretli Stat sinyal molekülleri ve sitokinler-tarafından-belirlenen olarak tanımlanmıştır.

Yapılan son çalışmalar, meme kanserinin birkaç içsel moleküler alt tipini tanımlamış ve bunları şu şekilde sınıflandırmıştır: bazal-benzeri, normal-benzeri $HER2^{+,}$ luminal alt tip A ve luminal alt tip B. Süregelen çalışmalarda ise meme kanserinin moleküler heterojenliği sebebiyle yeni alt tipler önerilmektedir, claudin-düşük, moleküler apokrin, ve interferon-zengin gibi nadir alt tipler tanımlanmıştır (Johnson vd., 2021; Tsang & Tse, 2020).

Kötü prognoza sahip olan Interferon-(IFN) zengin adı verilen yeni bir tümör grubu karakterize edilmiştir (Z. Hu vd., 2006). Bu tümör grubu IFN-düzenleyen genlerin yüksek ifadesi ile tanımlanmıştır.

MK alt türü olan Claudin-düşük meme kanseri (Herschkowitz vd., 2007), claudin 1, 3, 4, 7 ve 8, okludin, E-kaderin, HR ifadesinin düşüklüğü ile (Johnson vd., 2021; Prat vd., 2010) ve ayrıca Vimentin, Snai 1/2, Twist 1/2, Zeb 1/2 ve ALDH1'in yüksek ifadesi ile kök hücre özellikleri ile karakterize edilmiştir ve genellikle kötü prognozlu ÜNMK'dir (Pan vd., 2023). Ancak Claudin-düşük meme kanserinin %20'sinde HR ifadesi gözlenmektedir (Eroles vd., 2012). Ayrıca, EGFR, SRC ve TGFβ yolaklarının yüksek aktivitesine; MYC ve PI3K yolaklarının daha düşük aktivitesine sahiptirler (Sabatier vd., 2014).

Moleküler apokrin alt tipi (MAMK), ÜNMK veya HER2 ifadesince yüksek meme kanseri olarak sınıflandırılabilir. Karakteristik özelliklerinde yüksek androjen reseptör (AR) ifadesi ve düşük ER ifadesi gözlemlenmektedir (Tang & Tse, 2016). Androjen reseptörünün önemi yapılan çalışmalar ile desteklenmiş ve meme kanserinde prognostik belirteç olabileceği vurgulanmıştır (Lakis vd., 2014).

2.1.2 Meme Kanseri Hücre Hatları

Meme kanserini modellemek için *in vitro* hücre hatları elde edilmiştir ve ticarî olarak satılmaktadır (Tablo 2.2). İlk meme kanseri hücre hattı, 1958'de çevresel stromadan elde edilen BT-20'dir (Lasfargues & Ozzello, 1958). Teknik zorluklara rağmen 1970'lerin sonundan itibaren meme kanseri hücre hatlarının izolasyonu ve kullanımı başlamıştır (X. Dai vd., 2017).

Elde edilen hücreler fenotiplerine dayanarak değil izole edilen kuruluş, bilim insanının adı, hasta veya izole edilen subkültür popülasyonuna dayanarak isimlendirilmiştir. Örneğin, primer tümörlerden elde edilen kötü huylu olmayan hücre hatları veya suşlarını Hormon Kanser Merkezi'nde izole edip 'HCC serisi' (Gazdar vd., 1998), Streamlined Michigan Üniversitesi'nde izole edilen 'SUM serisi', ZR-75-1 için Zeida Rae veya T-47D için Tel Aviv Üniversitesi'nde 47. petri kabında elde edilmiş hücreler, Arizona Kanser Araştırma Üniversitesinde izole edilen hücreler 'UACC serisi ', M. D. Anderson hastanesi ve tümör enstitüsünde izole edilen hücreler 'MDA serisi' (Cailleau vd., 1978), infiltratif ve kanal içi meme karsinomu teşhisi konmuş aynı hastadan izole edilen farklı fenotiplere ve genotiplere sahip primer ve metastatik hücreler '21 serisi' olarak isimlendirilmiştir (Band vd., 1990; Witt & Tollefsbol, 2023). AU-565 adı, Adenokarsinoma Bilinmeyen 565'ten, SK-BR-3 adı Memorial-Sloan Kettering Kanser Merkezi'nden gelmektedir. CAL148 meme kanseri hücre hattı Centre Antoine Lacassagne'de izole edildiği için bu şekilde isimlendirilmiştir ve Hs578T meme kanseri hücre hattının adı, Homo sapiens veya Human sarcoma'dan türetilmiştir (Witt & Tollefsbol, 2023).

Ek olarak, SUM ve HMT serisi gibi farklı meme tümörleriden izole edilip aynı seçici ortamlarda kültürlenmesi gibi farklı hücre hatları da bulunmaktadır (Ethier vd., 1993). HMT serisi farklı alt kültür koşulları ile p53 mutasyonu, MYC çoğaltımı, EGFR, TGF-alfa ve c-erbB-2 aşırı anlatımı gibi farklı özellikler

geliştirilmiştir (Briand & Lykkesfeldt, 2001). Ayrıca bu seriye ait hücre hatlarında genetik mühendisliği sayesinde oluşturulan EGF ve 17-beta östradiol (E2) etkileşimleri incelenmiştir. MCF-7 ve T47D gibi ER^+ luminal A hücre hatları, sadece östrojenin varlığında tümör oluşturur ve anti-östrojen tedavisi ile tümör büyümesine müdahale edilebilen hücre hatlarıdır (Holliday & Speirs, 2011). Ancak, HER2 alt tipini temsil eden hücreler arasında, SK-BR-3 ve MDA-MB-453 hücreleri düşük tümör oluşturma potansiyeline sahiptir (Witt & Tollefsbol, 2023).

DU4475 hücre hattı, meme kanserinde nadir gözlemlenen bir özellik olarak *in vitro* süspansiyon içinde büyüyebilmektedir (Langlois vd., 1979). MFM-223 hücreleri fazla miktarda androjen reseptör ve düşük ER/PR anlatımına sahiptir (Hackenberg vd., 1991; Yin vd., 2020).

SUM-102, SUM-149 ve SUM-229 hücreleri EGFR geninin aşırı anlatımına sahipken, BT-20 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında EGFR geninin aşırı anlatımı çoğaltımı gerçekleştirilerek elde edilmiştir (Lacroix & Leclercq, 2004). SUM-44, SUM-52 ve MDA-MB-134 hücre hatlarında fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 geninin (FGFR1) yüksek düzeyde çoğaltımı gerçekleştirilmiştir (Burdall vd., 2003; McLeskey vd., 1994). FGFR2 geninin SUM-52 hücre hattında çoğaltımı gerçekleştirilmiştir (Tannheimer vd., 2000). BT-474, SK-BR-3, MDA-MB-361, MDA-MB-453, ZR-75-30, UACC-812, UACC-893, BSMZ, HCC1419, HCC1954, SUM-190 ve SUM-225 hücre hatlarında HER2 geninin 17q11.2-q12'de çoğaltımı gerçekleştirilmiştir (Lacroix & Leclercq, 2004).

Hücrelerin elde edilen kökenleri her zaman meme kanseri dokusu olmayabilir örneğin MDA-MB-361, bir beyin metastazından, LCC15-MB hücreleri bir femoral (üst bacak kemiği) metastazdan veya HH315 ve HH375 hücre hatları ise sırasıyla abdominal ve supraklavikular lenf nodu metastazlarından elde edilmişlerdir (Cailleau vd., 1978; Nayak vd., 2000; Thompson vd., 1999). Bu tez çalışması kapsamında moleküler alt tipleri temsil etmesi için T-47D, BT-475, MDA-MB-231 ve AU-565 hücre hatları kullanılmıştır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2 Meme kanseri hücre hatları

Hücre Hattı	Hücre Hattı Serisi	Moleküler Alt Tip	ER	PR	HER2	Histolojik Alt Tip
MCF-7	HMT	Luminal A	+	+	-	IDK
T-47D	SUM		+	+	-	IDK
BT-474	21	Luminal B	+	+	+	IDK
ZR-75	SUM		+	+		IDK
BT-549	21	Claudin-düşük	-	-	-	IDK
MDA-MB-231	MDA		-	-	-	AK
AU-565	21	HER2	-	-	+	AK
SKBR5	SKBR		-	-	+	AK

Kısaltmalar: AK adenokarsinoma, IDK invaziv duktal karsinoma.

2.2 Meme Kanseri Biyobelirteçleri

Meme kanseri biyobelirteçleri tanı, tedavi ve prognozda kullanılmaktadır. Biyobelirteçler kan, serum, plazma, doku, vücut sıvısı veya salgısından elde edilen mutasyonlar, transkripsiyonel değişiklikler ve post-translasyonel modifikasyonlar gibi faktörlere bağlı olabilen normal veya anormal bir sürecin, bir durumun veya hastalığın belirtisi olan biyolojik bir molekül olarak A.B.D.'deki Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından tanımlanmıştır (Henry & Hayes, 2012). Biyobelirteçler proteinler (enzim veya reseptör), nükleik asitler (mikroRNA, mRNA, dolaşan tümör DNA), antikorlar ve peptitler gibi farklı moleküller olabilirler.

Klinik çalışmalarda meme kanseri teşhisinde incelenen birçok protein arasında RS/DJ-1, p53, ısı şok protein 60 (HSP60), HSP90, MUC1, ER, PR, HER2, mammaglobin, kallikrein 14 (KLK14), osteopontin (OPN), ve kripto-1 (CR-1) gibi proteinler mevcuttur. Fakat RS/DJ-1 ve p53 proteinleri kötü sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (Kulić vd., 2010). Her ne kadar bu proteinlerin meme kanserinde anlatımı yüksek olsa da proteinlerin meme kanserine özgü olmadığı tespit edilmiştir (Le Naour vd., 2001; Metcalfe vd., 2000). Meme kanseri teşhisinde kullanılan ve kötü prognoz ile ilişkilendirilen bir diğer biyobelirteç ise HSP60 ve HSP90 proteinleridir. MUC1 glikoproteininin meme kanseri gibi birçok kanser türünde arttığı gözlenmiştir (L. Wang, 2017). Bu sebeple, kanser teşhisi ve prognozunun değerlendirilmesinde bir biyobelirteç olarak kullanılabilir (Seale & Tkaczuk, 2022). Özellikle, MUC1'in salınması sonucu ortaya çıkan karbonhidrat antijen 15-3 (CA15-3) anlatımı, meme kanserinin prognozu ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Duffy, 1999; J. S. Lee vd., 2013). Ki67, hücre döngüsü ve çoğalmasında rol alan bir nükleer proteindir (Patani vd., 2013). Ki67, kanserin türü, agresifliği, prognozu, kemoterapi ve radyoterapiye olan duyarlılığı ve tedaviye verilen yanıtı değerlendirmede kullanılmaktadır.

HER2 anlatımı yüksek olan meme kanseri hastalarının serumunda tespit edilen aşırı anlatıma sahip CA15-3'ün tanıda olumsuz bir prognoz belirtisi olduğu, meme kanseri evresi, tümör boyutu, pozitif aksiller lenf nodları ile ilişkilendirilmiştir (Di Gioia vd., 2015). Dolaşımda tespit edilen HER2 seviyeleri prognoz, kanser ilerlemesini izlemek, uygun tedaviyi seçmek ve kanser teşhisi için belirteç olarak

kullanılmaktadır (Molina vd., 2012). Sağlıklı bireylerde HER2 seviyeleri normalde 2-15 ng/mL arası, meme kanserli hastalarda 15-75 ng/mL arasında bulunmaktadır (Sørensen vd., 2013).

ER, PR, HER2 ve Ki67 gibi proteinlerin meme kanserindeki rolü ve bu proteinlerin kullanımının luminal A ve luminal B meme kanseri alt tiplerini ayırt etmede kullanılabileceği yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (Cheang vd., 2009). Araştırmacılar, ER, PR, HER2 ve Ki67'nin bir immüno-panelini kullanarak, bu proteinlerin belirli kombinasyonlarının luminal A ve luminal B alt tiplerini ayırmada kullanılabileceğini ve özellikle, luminal A ve luminal B tümörlerini ayırt etmek Ki67 pozitif boyama yüzdesinin ayırıcı değerinin %13,25 olabileceği belirlenmiştir. Daha yüksek bir Ki67 puanı luminal B tümörlerini ve daha kötü bir prognozu tanımlamaktadır.

Serin proteazı uPA ve PAI-1 anlatımı tümör prognozunda bağımsız belirteçler olsalar da, uPA, PAI-1 ve TF'nin meme ucu aspirasyon sıvısındaki kombinasyonu ile erken meme kanseri tespitinde kullanılabileceği yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (W. Qin vd., 2012). Mammaglobin A (MGBA) 1996 yılında tanımlanan sadece normal meme bez epitelinde ve meme kanserinde anlatımı olan bir proteindir (Watson & Fleming, 1996). Yapılan bir çalışmada MGBA'nın meme kanseri tanısında kullanılabilecek bir belirteç adayı olabileceği çünkü meme kanseri hastalarının serumunda normal kontrollere kıyasla daha yüksek anlatıma sahip olduğunu göstermiştir (Galvis-Jiménez vd., 2013; Huang vd., 2011). Fakat, ÜNMK teşhisi için kullanışlı bir biyobelirteç olmadığı çünkü düşük dereceli ER pozitif tümörlerde MGBA'nın aşırı anlatımı mevcutken, ER negatif ve yüksek dereceli tümörlerde MGBA'nın daha az anlatıma sahip olduğu gözlemlenmiştir (dos Anjos Pultz vd., 2014). Gross kistik hastalık sıvı protein-15 (GCDFP-15) ve MGB biyobelirteçleri beraber kullanıldığında meme kökenli lenf nodu metastazların veya bölgesel nükslerin teşhis oranı kendi başına kullanılana kıyasla 1,5 kat daha fazla tespit edilmiştir (Luo vd., 2013).

OPN, integrinlere bağlanan fosforillenmiş bir glikoproteindir ve metastaz varlığını izlemek için potansiyel bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Fakat, meme kanseri ile beraber 34 farklı kanser ile ilişkilendirilmiştir (Weber vd., 2011). Bu durum, OPN'nin tek başına değil beraberinde bağımlı olduğu bir belirteç ile

kullanılabileceğini akıllara getirmiştir. Yapılan bir çalışmada, OPN anlatımı invaziv meme kanserinde aşırı anlatıma sahip oldukları bilinen siklooksijenaz-2 (COX-2) anlatımı ile beraber incelenmiştir. HER2 aşırı ifade eden meme kanseri alt tipinde OPN ve COX-2'nin aşırı anlatımının diğer meme kanseri alt türlerine kıyasla anlamlı derecede farklı olması sebebiyle meme kanserinde tanısal ve prognostik belirteçler olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (THORAT vd., 2013).

Öte yandan, OPN'nin OPN-a, OPN-b ve OPN-c olmak üzere 3 farklı izotopu vardır. Bu varyantlar arasında OPN-c meme kanserinde aşırı anlatıma sahipken diğer iki varyant normal meme dokusunda da anlatıma sahip olabilmektedir. Bu sebeple OPN-c'nin biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ispatlamak amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, OPN-c, E-kaderin ve β-katenin proteinleri hedeflenerek anlatım seviyelerinin klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi incelenmiştir (Pang vd., 2013). OPN-c düzeyinin, diğer iki protein düzeylerine kıyasla meme kanserinde daha yüksek olduğu, hatta tümör nüksü ve lenf nodu metastazı ile birlikte ÜNMK alt tipleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Diğer ÜNMK belirteci olan biyobelirteçler arasında vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), C-kit ve bazal SK8, -18, -19, Ki67, PARP, HSP90 ve COX2 proteinleri yer almaktadır (Brooks, 2009; Yadav vd., 2015). Bu biyobelirteçler, mevcut hedefe yönelik tedavilere dirençli ve iyi sonuç vermeyen ÜNMK'lerde prognostik, tedavi için hedefleme ve tedavinin vereceği cevabı tahmin etmekte yardımcı olmaktadır.

Meme kanserinde serum biyobelirteçleri olan Bc1, Bc2 ve Bc3'ün meme kanserinin erken tespitinde kullanılabileceğini hipotez eden bir çalışmanın sonucunda Bc2 profillerinin, meme kanseri tanısını iyileştirmek için potansiyel yardımcı olabileceğini fakat Bc1, -2, -3'ün tek başına meme kanserinin erken tanısında kullanılamayacağı vurgulanmıştır (Atahan vd., 2011).

Fibronektin 1 ve CXCL9 proteinlerinin serumda anlatım seviyelerine bağımlı olarak meme kanseri teşhisinde rutin tarama testlerine katılabileceği öne sürülmüştür çünkü gerçekleştirilen çalışmada, bu iki proteinin derişimleri meme kanseri hastalarının serumunda (190 µg /ml- 851 pg/ml) normal bireylere (125 µg/

mL- 635 pg/ml) kıyasla anlamlı bir aşırı anlatıma sahip olduğu gözlemlenmiştir (Ruiz-Garcia vd., 2010).

Tanısı konmuş meme kanseri hastalarının lenf nodu metastaz sayısı, tümör boyutu ve tümör derecesi ile prognostik bilgileri elde edilse de kişiselleştirilmiş terapi için yetersiz veri sunmaktadır. Bu sebeple, gerçekleştirilen çalışmaların sonucu dahilinde son yıllarda hastalığın nüks riskini tahmin eden moleküler biyobelirteçler keşfi sayesinde meme kanseri prognozuna dair öngörü sağlamaktadır. Ayrıca, prognostik belirteçler bir hastanın tedaviye ihtiyaç duyup duymadığını belirlemeye yardımcı olmaktadır. Bunlar arasında miRNA ve mRNA'ların anlatımı, dolaşan tümör ve DNA'ların vücut sıvısında belirlenmesi veya teşhisi konmuş hastada belirteç olan proteinlerin aşırı ifadesi söz konusudur (Nicolini vd., 2018). Prognostik çoklu gen testleri arasında klinikte sıkça kullanılanlar ise Oncotype DX, MammaPrint ve uPA/PAI-1, Ki67'dir.

Urokinaz plazminojen aktivatörü uPA hücredışı matrisi parçalayan bir proteazdır ve kanser invazyonu ve metastazında rol oynamaktadır (Duffy vd., 2014). uPA, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ile etkileşerek baskılanır. uPA/PAI-1 anjiyogenez, invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilen proteaz sistemini oluşturur ve bu iki proteinin anlatım seviyelerine bağımlı olarak HER2 negatif tümöre sahip hastalarda prognozun daha kötü olduğu kanısına varılmaktadır (Nicolini vd., 2018). Tümör dokusunda bu belirteçlerin yüksek düzeyde ifade edilmesi, hastalığın tekrar etme riskinin artması ve hastaların sağkalım sürelerinin kısalmasıyla ilişkilendirilmiştir (dos Anjos Pultz vd., 2014).

Meme kanserinde proliferasyon belirleyicisi Ki67'nin olası prognostik rolü tek bir değişken olarak düşük lenf nodu içermeyen meme kanseri hastalarının iyi veya kötü prognozunu belirlemede önemli bir belirteç olabileceği yapılan bir çalışma ile ileri sürülmüştür (Urruticoechea vd., 2005). Ki67'nin prognostik önemini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, neoadjuvan kemoterapi sonrası Ki67 ölçümünün nüksü önleme ve genel sağkalım arasındaki ilişki immünhistokimyasal olarak incelenmiştir ve K67'nin güçlü bir belirteç olduğunu göstermişlerdir (Jones vd., 2009).

Meme kanseri siklik D1 mRNA ve proteinin aşırı anlatımına sahiptir ve östrojen duyarlı hücrelerin proliferasyonunu düzenleme yeteneğine sahiptir. Özellikle düşük

siklik D1, ER pozitif meme kanseri hastalarında nüks ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmekle beraber anti-östrojen tedavilere kötü yanıt verme öngörücüsü olarak potansiyel bir belirteçtir (Bilalović vd., 2005; S. Y. Zhang vd., 1994). Siklin E proteinin izoformları meme kanseri tümör hücrelerinde post-translasyonel olarak üretildiği tespit edilmiştir. Tümör oluşumu, derecesi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Weigel & Dowsett, 2010). Siklik E izoformlarının meme kanseri tümör hücrelerindeki dağılımı incelendiğinde, farklı izoformların tümöre özgü olduğu ve tümör prognozu hakkında bilgi edinilebilecek bir belirteç olabileceğini vurgulamışlardır (Wingate vd., 2009). Siklin E'nin aşırı ifadesinin ERα ile ters ilişkili olduğu düşünülmektedir, bu da kötü bir prognoza, daha kötü bir endokrin yanıtına sebep olmaktadır (Akli & Keyomarsi, 2004). Anterior gradient 2 (AGR2) proteinin ER pozitif tümörlerde aşırı ifadesi, kötü prognoz, meme kanserinin ilerlemesi ve metastazı üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir (Salmans vd., 2013). Bu sebeple, meme kanserinde hem terapötik hedef hem de prognostik bir gösterge için hedef belirteç olma potansiyeline sahiptir.

Meme kanseri tedavisinde biyobelirteçlerin kullanımı kanserin tedaviye nasıl bir yanıt vereceğini ve hangi tedavinin en iyi olacağını tahmin etmede yardımcı olmaktadır. Klinikte kullanılmakta olan biyobelirteçler arasında ER, PR ve HER2 anlatımının ölçümü rutin testler hale gelmiştir (Nicolini vd., 2018). ER endokrin terapinin doğrudan hedefi olduğundan, ER ölçümü meme kanseri teşhisi konmuş bütün hastalarda uygulanmak zorunda olup hem prognoza dair hem de tedaviye dair ip uçları sunmaktadır çünkü östrojen ER'ye bağlanarak aktive etmekte ve MYC ve siklin D (CCND1) gibi genlerin ifadesini artırarak meme kanseri hücre büyümesini teşvik etmektedir.

ER, erken meme kanserli hastalarda adjuvan tedavi için ilaçların belirlenmesinde kullanılmaktadır (Carroll, 2016). Bu ilaçlar arasında selektif ER modülatörleri tamoksifen (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005), aromataz inhibitörleri (anastrozol, letrozol veya exemestan), LH-RH agonistleri (leuprolid, goserelin), saf selektif ER aşağı düzenleyicileri (SERDS) (fulvestrant) ve ovaryektomi gibi tedaviler bulunmaktadır. Örneğin tamoksifen ER'ye bağlanır fakat aktive etmez bu sayede vücutta üretilen östrojenin etkisini kısmen engellemektedir (Criscitiello vd., 2010).

PR varlığının ER'ye bağımlı olduğu düşünüldüğü için ER testi ile birlikte PR testi de yapılmaktadır (Weigel & Dowsett, 2010). SRC-3 proteini ER koaktivatörü olarak hareket eder ve östrojen sinyal yolunun aktivasyonunu artırarak hücresel yanıtları etkiler (Cole vd., 2013). Gerçekleştirilen bir çalışmada, Tamoksifen ile tedavi edilen meme kanseri hastalarında ölçülen yüksek SRC-3 anlatımı tamoksifen direncine sebep olduğunu göstermektedir (Osborne vd., 2003).

HER2 mevcut kullanımı neoadjuvan, adjuvan ve ileri derece meme kanseri tedavisinde anti-HER2 ile gerçekleştirilen tedaviye yanıtı tahmin etmek içindir (Martin & López-Tarruella, 2016). Klinikte onaylanmış ve kullanılan trastuzumab (Herceptin), lapatinib, pertuzumab ve trastuzumab emtansin (TDM-1) olmak üzere 4 anti-HER2 tedavi formu bulunmaktadır.

Programlanmış ölüm 1 (PD1) reseptörü, PD ligandı 1 (PD-L1) ile bağlandığında kansere karşı bağışıklık sisteminin yanıtını baskılamak için aktif bir biyobelirteç olarak kullanılabilmektedir. PD1 reseptörünün aktivasyonu sonucunda T hücreleri düzenlenir bu sebeple kanseri tedavi etmek için önemli terapötik hedef haline gelmektedir (Schick vd., 2021). Klinikte kullanılan FDA tarafından onaylanmış iki adet PD-1 hedefli monoklonal antikor (nivolumab, pembrolizumab) ve 3 adet PD-L1 hedefli monoklonal antikor (atezolizumab, avelumab ve durvalumab) bulunmaktadır.

Fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR) meme kanserinde ilaç hedefleme sistemlerinde kullanılabilecek potansiyel bir belirteçtir (Tenhagen vd., 2012). Yapılan bir çalışmada, FGFR2 kinaz aktivitesinin farmakolojik olarak baskılanması sonucu, meme kanserinde kök hücre benzeri tümör başlatıcı hücrelerin popülasyonunda bir azalmaya sebep olarak meme tümör büyümesinin bastırılmasına neden olmuştur (S. Kim vd., 2013). Bu sayede antikanser meme kanseri tedavileri için FGFR2'nin farmakolojik olarak hedef bir belirteç olabileceği görülmüştür.

2.3 Tümör ile İlişkili Peptitler

Tümör ile ilişkili peptitler, 30 veya daha az aminoasit dizisinden oluşmuş oligopeptitlerdir (Kondo vd., 2021). Bu peptitler, tümör yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlere veya moleküllere bağlanarak hedeflenmiş bir bölgeye

yönlendirilebilirler. Birçok tümör ile ilişkili peptitin hücre fonksiyonlarını etkilemeden hücrelere alımı gerçekleşse de bazıları hedef tümör hücrelerine karşı hem içselleştirilme hem de antitümör etkilerini gösterebilmektedir. Böylelikle, hedefe yönelik tedaviler veya apoptoza yönlendirme gibi özelliklere sahip olabilirler (Enbäck & Laakkonen, 2007). Tümörle ilişkili peptitlerin sadece tedaviye yönelik olmadığını aynı zamanda görüntüleme amaçlı da kullanılabileceğine örnek olan bir çalışmada, ayak ve ağız hastalığı virüsünden üretilen 20 aminoasit uzunluğunda olan ve αvß6 integrine bağlanma özelliği gösteren radyoaktif işaretli A20FMDV2 peptiti kullanılmıştır. Bu sayede klinik PET uygulamalarında αvß6 ifadesinin ölçülebileceği gösterilmiştir (Keat vd., 2018).

Tümör ile ilişkili peptitler mühendisliğe açık bir alandır. Farklı moleküller ile konjuge edilebilmeleri, hedeflemede kullanılan antikorlara oranla daha küçük boyutlara sahip olmaları ve yüksek afinite gibi özellikler ile modifiye edilebilmeleri sebebiyle hızla kullanımı artmakta ve sentetik analogları geliştirilmektedir (Kondo vd., 2021). Tümör ile ilişkili peptitler farklı alt başlıklarda toplanmıştır. Örneğin, İntegrin hedefli (RGD ile ilişkili peptitler), Aminopeptidaz N hedefli (NGR ile ilişkili peptitler), P32/qC1qR hedefli (Lyp-1 ile ilişkili peptiler), fibrin-fibronektin komplekslere hedefli (CLT1), tümör gelişiminin farklı aşamalarına özgü (KAA, RSR, EYQ, VGVA, RGR), malign hücredışı matrise hedeflenen (PL1), hiyalüronan hedefleme (BH-P, IP3), tümörle ilişkili makrofaj (TAM) hedefleme peptitleri, nükleolin hedefleme ve EGFR hedeflenen (F3, EBP, D4, Gel1) peptitler bulunmaktadır (Lingasamy & Teesalu, 2021).

2.3.1 RGD Peptitleri

Hücre yüzeyinde aşırı anlatıma sahip reseptörler veya proteinler sayesinde endositoz veya fagositoz benzeri bir süreç tarafından içselleştirme özelliğine sahip keşfedilen ilk tümör ile ilişkili peptit RGD ile ilişkili peptitlerdir (CRGDC ve CDCRGDCFC) (Enbäck & Laakkonen, 2007). Bu peptitler, hücre yüzeyindeki adezyon reseptörü integrin reseptör ailesini tanımakla beraber hücredışı matriste bulunan fibronektin, laminin, vitronektin, fibrinojen ve SK1/5 arasındaki etkileşimleri integrin reseptörleri aracılığıyla düzenleyerek tümör hücrelerinin göç ve invazyonuna müdahale etmektedir (Ayo & Laakkonen, 2021).

RGD ile ilişkili peptitler terapötik ajanları tümör hücreleri ve tümörle ilişkili damar yapısında aşırı anlatımı olan αv-integrinlerine seçici olarak taşımaya uygun bir aday olduğu için sıkça tercih edilmektedir. Örneğin yapılan bir çalışmada, tümör nekroz faktör-α (TNF) RGD peptiti ile rekombinant DNA teknolojisinden faydalanılarak konjuge edilmiştir ve TNF'nin antineoplastik aktivitesinin artmasına ve vasküler hedefleme için artık sadece aminopeptidaz N'nin (CD13) değil αv-integrinlerin potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabileceği yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir (Curnis vd., 2004; Zarovni vd., 2004). RGD ile ilişkili peptitin tümörle ilişkili damar yapısına yönlendirilme özelliğinden faydalanarak doksorubisin (Dox) -RGD konjugatının ortotopik bir fare hepatom modelinde antitümör etkisi incelenmiştir (J.-W. Kim & Lee, 2004). Bu konjugatların serbest Dox'a kıyasla daha düşük sitotoksisiteye, daha etkili bir şekilde hepatoma büyümesinin baskılanmasına, tümör hücre ölümüne sahip olduğu gösterilmiştir.

RGD ile ilişkili peptitler hedefe yönelik yapılan tedavilerde sadece terapötik ajanlar ile değil ayrıca sentezlenen pro-apoptotik peptit ile de konjuge edilerek hem tümör kan damarına hedefleyip hem de içselleştirildiğinde pro-apoptotik peptit sayesinde programlanmış hücre ölümü indükleyerek anti kanser aktivite göstermektedir (Ellerby vd., 1999). Diğer bir çalışmada, hasarlı dokularda rastlanan kan pıhtılaşma sürecini başlatan hücre zarı reseptör proteini Organ Faktörünün (TF) bağlanma bölgesini tümör ajanı ile değiştirerek (tTF) tümöre hedefleme ve tümör yıkımına sebep olabileceği ön görülmüştür. RGD/tTF füzyon proteinleri, MAD109 akciğer ve Colon 26 karsinomları taşıyan farelerde yapılan *in vivo* çalışmalar sonucunda küçük ve orta büyüklükteki tümör damarlarında tromboz indüklemiştir ve masif hücre nekrozuna sebep olarak terapötik vasküler pıhtılaşmayı indüklemede kullanılabileceği vurgulanmıştır (P. Hu vd., 2003).

RGD-integrin ilişkisinden sadece terapötik olarak değil aynı zamanda görüntüleme amaçlı faydalanılmaktadır. İntegrin reseptörünün glioma ve aktive edilmiş endotelyal hücrelerde aşırı miktarda bulunması sebebiyle [^{18}F]florobenzoil-RGD veya ^{68}Ga ile işaretli peptit, beyin ve diğer anatomik bölgelerde αvβ3-integrin pozitif tümörlerin görüntülenmesi için potansiyel bir PET izleyici olarak kullanılabileceği gözlemlenmiştir (X. Chen vd., 2004; Zhao vd., 2019). RGD peptit dizisinin ^{111}In/^{90}Y ve ^{99m}Tc ile radyoaktif işaretleme yapılarak gerçekleştirilen

NIH:OVCAR-3 over kanseri ksenograft modelinde *in vivo* davranışı incelediğinde işaretli peptitin yüksek ve özgül tümöre alımını ve aynı zamanda tümör büyümesinde anlamlı bir gecikmeye neden olduğu belirtilmiştir (Janssen vd., 2002). RGD peptitinin PET izleyicisi olarak kullanıldığı çalışmalarda, A549 tümör taşıyan farelerde DOTA şelatı ile ^{177}Lu etiketine bağlanan RGD'nin *in vivo* dağılımı incelenmiştir (Pirooznia vd., 2020). Bu radyopeptitin farelere uygulanması, sadece tümör büyümesini baskılamakla kalmamış, aynı zamanda önemli oranda tümör küçülmesine de neden olmuştur.

2.3.2 NGR Peptitleri

NGR dizisi içeren peptit (CNGRC), CD13'e bağlanarak tümörle ilişkili kan damarlarına seçici bir şekilde yönlendirilir (Curnis, Arrigoni, vd., 2002). Hem lineer hem de siklik NGR peptitleri, RGD ile ilişkili peptit gibi, sitokinler, kemoterapi ajanları, radyofarmasötikler ve pro-apoptotik peptitlerin hedefe yönlendirilmiş teslimatı için kullanılmaktadır (Ayo & Laakkonen, 2021; Ma vd., 2016; Pastorino vd., 2006). Karbon nanoküreler, G3-cNGR peptiti ile işlevselleştirilmiştir ve potansiyel olarak moleküler görüntüleme ve tedavi amaçlarıyla radyoizotop ^{177}Lu ile etiketlenmiştir. Bu çalışmada, NGR peptitin potansiyel hedefleme ajanı olabileceği ifade edilmiştir (Vats vd., 2018).

Anti- tümör nekroz faktörü (TNF) ajanlarının kanser tedavisinde klinik kullanımı mevcuttur. Pikogram dozlarda NGR peptiti ile konjuge edilmiş TNF ile vasküler hedeflemeyi sağlayarak Dox'un tümör içine alımını ve terapötik etkinliğini fare lenfoması modellerinde büyük ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir. Bu yaklaşım, kemoterapötik ilaçların terapötik indeksini artırmak için bir strateji olarak önerilmektedir (Curnis, Sacchi, vd., 2002). Dox, paklitaksel, gemsitabin, sisplatin ve melfalan da dâhil olmak üzere birçok kemoterapötik ilaç, NGR–TNF ile kombinasyon hâlinde murin lenfoma, fibrosarkom ve meme adenokarsinoma modellerinde ayrıca RMA lenfoması ve WEHI-164 murin fibrosarkom tümörü taşıyan farelerde test edilmiştir. Hem *in vivo* hem de *in vitro* veriler, tümör damarlarına düşük dozda NGR-TNF'nin hedefli teslimatı ile, farklı mekanizmalar üzerinden etki eden çeşitli ilaçların etkililiğini artırabileceğini ve NGR-TNF'nin kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonlu klinik çalışmaların tasarlamasında bir adım olabileceği vurgulanmıştır (Sacchi vd., 2006).

Gerçekleştirilen bir çalışmada, farklı konformasyondaki (siklik ve lineer NGR) NGR peptitinin TNF ile konjugasyonu sonucu antitümör aktivitesi ve hedeflenmesi karşılaştırılmıştır (Colombo vd., 2002). TNF'ye konjuge edilmiş siklik CNGRC (NGR) peptitin disülfit köprüsü aracılığıyla siklize edilmesi, CNGRC–TNF'nin stabilitesini ve hedefleme verimliliğini artırması sebebiyle lineer GNGRG–TNF bileşiğinden 10 kat daha yüksek antitümör aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur.

2.3.3 LyP-1 Peptitleri

LyP-1 (CGNKRTRGC), vasküler endotelyal büyüme faktörü C'nin (VEGF-C) aşırı anlatımına sahip MDA-MB-435 meme kanseri ksenograftları kullanılarak yapılan bir taramada izole edilen dokuz aminoasitli, halkasal bir peptittir (Adeyemi & Choonara, 2022). LyP-1 peptiti, lenfatik endotel hücreleri ve tümör hücreleri tarafından içselleştirilmektedir ve hipoksik tümör lezyonlarını tanımasının yanı sıra bağlandığı hücrelerin apoptozuna neden olmaktadır.

LyP-1 peptitinin meme kanseri tümörlerine olan anti-tümör etkisi, peptitin sitotoksik aktivitesine bağlı olduğu düşünülmektedir (Laakkonen vd., 2004). p32/gC1qR, tümör hücreleri ve tümörle ilişkilendirilmiş makrofajlar tarafından ifade edilir, tümör lenfatik damarlarının duvarlarında hücre yüzeyine bağlı mitokondriyal protein, LyP-1'in bağlandığı reseptördür (Fogal vd., 2008). Devam eden çalışmalarda ise siklik LyP-1'in ve reseptörü p32'nin olası etkileşimleri moleküler dinamik ve bağlanma çalışmaları ile değerlendirilerek, LyP-1 ve p32 arasındaki etkileşim açıklığa kavuşturulmuştur. Çalışmanın sonucunda p32 bağlanması için sorumlu olan en temel amino asitlerin 3Asn, 4Lys, 5Arg ve 7Arg olduğunu açığa çıkarmıştır. Böylelikle p32'ye bağlanabilen ve gelişmiş antitümör etki gösterebilen yeni LyP-1 türevlerinin tasarlanmasına öncülük edilebileceği vurgulanmıştır (Timur vd., 2018).

Yapılan bir diğer çalışmada ise, LyP-1, floresan etiketi ile konjuge edilerek sistemik olarak meme tümörü taşıyan farelere uygulandığında primer tümörlerin çekirdeğinde güçlü bir şekilde birikmiştir ve başarılı bir şekilde tümör görüntüleme amacıyla kullanılmıştır (Laakkonen vd., 2004).

2.3.4 CLT Peptitleri

Siklik dekapeptit olan CGLIIQKNEC (CLT1) ve CNAGESSKNC (CLT2) peptitlerin yapılan çalışmalarda floresan ile konjuge edildiklerinde, çeşitli tiplerde

tümör taşıyan farelerin hücredışı boşluğundaki fibriller ağda biriktiği gözlemlenmiştir, ancak tümör taşıyan farelerin diğer dokularında tespit edilememiştir (Pilch vd., 2006). Çalışmanın sonucunda, CLT peptitlerinin, tümörlerde ve diğer lezyonlarda ekstravasküler boşluğa sızmış plazma proteinlerinin pıhtılaşması ile oluşan fibrin-fibronektin komplekslerini tanıdığı ve bu peptitlerin, tümör ve yaralanmış dokulara tanısal ve terapötik materyalleri hedefleme açısından kullanışlı olabileceği ön görülmüştür.

Terapötik amaçlı yapılan bir çalışmada, glioma dokularındaki hücredışı matrisinde yaygın olarak bulunan fibronektinlere yönelik bir ilaç teslim sistemi oluşturmak için fibronektin hedefli CLT1 peptiti ile konjuge edilmiş paklitaksel yüklü nanoparçacık kullanılmıştır (B. Zhang vd., 2014). Tedavi edilen glioma taşıyan fare modellerinde daha geniş çaplı hücre apoptozunun indüklendiği ve CLT1 modifikasyonunun, nanoparçacıkların glioma sferoidlerinin çekirdeğine nüfuz etmesini kolaylaştırdığı sonucu elde edilmiştir. ^{153}Gd-DTPA ile konjuge edilen CLT-1 peptiti tümör dokusundaki fibronektin-fibrin komplekslerinin HT-29 insan kolon karsinom ksenograft taşıyan farelerde en az 60 dakika boyunca önemli ölçüde tümör kontrast artışı göstermiştir (Ye vd., 2008). CLT1 peptitinin, manyetik rezonans (MR) görüntüleme ile kanser moleküler görüntüleme için potansiyel bir aday olabileceği yapılan bu çalışma ile gösterilmiştir.

2.3.5 Diğer Peptitler

Tümör gelişiminin farklı aşamalarında neoplastik vasküler imzaları tanıyan peptitler *in vivo* faj görüntüleme kullanılarak pankreatik endokrin karsinomu, skuamöz hücre karsinomları, pankreatik nöroendokrin tümör ve insan MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattı üzerine RIP1-Tag2 transgenik modelinde tanımlanmıştır (Fontana & Santos, 2021).

Pankreatik adacık karsinogenezi bir fare modelindeki anjiyogenik aşamalardaki damarlanma peptit kütüphaneleri ile profillenmiştir (Joyce vd., 2003). Çalışmanın sonucunda elde edilen peptitler angiyojenik progenitörlere, katı tümörlere veya her ikisine olan ilgisi sebebiyle KAA (CKAAKNK), KAR (CKGAKAR), RSR (CRSRKG), EYQ (CEYQLDVE), VGVA (FRVGVADV) ve RGR (CRGRRST) peptitleri karakterize edilmiştir. KAA peptitinin pankreatik patolojik mikro çevreye olan ilgisinden yararlanarak tasarlanan nanoparçacık, gemsitabin ile yüklenip Wnt-

2 ile etkileşime geçerek hem tümör hücreleriyle hem de anjiyojenik damarlarla özgül etkileşimde bulunmuştur (Valetti vd., 2014). Ayrıca perisit kaplaması sağlayarak vasküler normalleşmeye yol açıp tümörün tedaviye erişilebilirliğini artırmıştır.

Fibronektin Ekstra Alan-B (FN-EDB) ve Tenascin-C (TNC), birçok katı tümörde aşırı ifade edilir ve kötü huylu olmayan tümörlü dokularda neredeyse bulunmamaktadır (Fontana & Santos, 2021; Park vd., 2012). PL1 peptiti (PPRRGLIKLKTS) 12 amino asitlik bir peptit olarak tanımlanmıştır ve iki farklı hücredışı matris molekülü olan FN-EDB ve TNC-C'ye çoklu özgünlük göstermektedir (Lingasamy vd., 2019). Çalışmada intravenöz enjekte edilen PL1 ile konjuge edilmiş demir oksit nanoparçacıklar ve gümüş nanoparçacıklar, farelerde model yapılmış bir dizi glioblastoma ve prostat karsinom ksenograftına ayrıca VEGF aşırı ifadesi ile indüklenmiş kötü huylu olmayan anjiyojenik neovasküler yapılara güçlü bir birikim göstermiştir. Glioblastoma ksenograftları incelendiğinde ise bu çift hedefli peptitin, görüntüleme ajanların ve terapötik yüklerin katı tümörlere güçlü ve özgül bir şekilde teslimatı için kullanılabileceği gösterilmiştir.

Hiyalüronik asit (HA), hücredışı matriste bulunan negatif yüklü bir glikozaminoglikan bileşenidir ve epitel, bağ dokusu ve sinir dokusunda bulunur (Simón-Gracia vd., 2018). Doku mühendisliği için çekici bir taşıyıcı olarak da görülmektedir çünkü HA matris organizasyonundan hücre adezyonu, migrasyon, anjiyogenez, morfogenez, yara iyileşmesi ve enflamatuar tepkilere kadar geniş biyolojik fonksiyonlara sahiptir (Y. Zhang vd., 2018). Peritonal karsinomatozlu farelerde yapılan *in vivo* peptit faj çalışmasında 9 amino asitlik siklik peptit IP3 (CKRDLSRRC) peritoneal tümörleri (mide zarı) hedefleyen bir hiyalüronan bağlayan peptit olarak tanımlanmıştır (Ikemoto vd., 2017).

Nükleolin hedefleyen F3 peptiti (KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAK K) endotel hücrelerin yüzeyinde bulunan nükleolinlere olan ilgisi sayesinde farklı kökenli tümör hücrelerin çekirdeğine translokasyon yapabilir (Araste vd., 2018). F3 peptitin tümör hücrelerinin çekirdeklerine içselleştirildiği ve translokasyon yapabildiğini ispatlamak amaçlı yapılan çalışmada etiketli F3 peptitinin, insan miyeloid lösemi hücrelerinde ve insan meme kanseri hücrelerinde hücresel alım

üzerine spesifik bir etkisi olduğu belirtilmiştir (Drecoll vd., 2009; Karamchand vd., 2013). Bu sebepledir ki, F3 peptiti, nanoparçacıklar, kemoterapötikler ve radyoterapötik ajanlar için bir tümör hedefleme ligandı olarak kullanılmaya adaydır. EGFR'ye hedeflenen peptitler ile yapılan bir çalışmada, Gel1 peptitinden yararlanarak 30 farklı peptit analoğu oluşturulmuş ve aralarından peptit 22, ÜNMK hücreleri tarafından Gel1 peptite kıyasla bir kaç kat daha fazla doğrudan alınarak en iyi aday seçilmiştir (Hossein-Nejad-Ariani vd., 2019).

2.4 Meme Kanserinde Tümörle İlişkili Peptitler

Meme kanseri tedavi ve teşhisinde hücre yüzeyindeki biyobelirteçler hedeflenerek nanoparçacıklar, antikorlar, küçük moleküller, antikor-ilaç konjugatları veya peptitler ile amaca yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Cavallaro vd., 2023). Yapılan son çalışmalarda, antikorlar yerine peptitlerin tercih edilme sebebinin antikorların büyük boyutları, sterik engelleme nedeniyle doku içine daha az nüfuz etmeleri ve belirli hedef bölgelere ulaşabilirliğini azaltması nedeniyle antikorların etkinliğini ve uygulanabilirliğini sınırlaması olduğu belirtilmiştir (Luca vd., 2020b). Peptitler ise küçük boyutları, yüksek zar geçirgenliği, hedefe yönelik özgüllükleri, düşük immün yanıtı, kolay modifikasyonları ve yüksek etki gücü gibi avantajları nedeniyle antikorlara karşı güçlü bir alternatif sunmaktadırlar (Craik vd., 2013). Bu sebeple tümörle ilişkili peptitler doğrudan ilaç taşıma sistemi, görüntüleme ajanı veya sitotoksik bileşikleri taşıma aracı olarak kullanılabilmektedirler (Tablo 2.3).

Meme kanseri reseptörü olan HER2'ye karşı yüksek bağlanma afinitesi ve özgüllük gösteren 27 amino asit içeren pep27 (NKFNKGMRGYWGALGGGNGKRGIRGY D) ve pep27-24M (NKFNKGMRGYWGALGGGNGKRGIMGYD) peptitleri bir affibody olan Z(HER2:342) temel alınarak elde edilmiştir (Geng vd., 2015). Bu çalışmada, SK-BR-3 hücreleri ile ksenograft oluşturulmuş çıplak farelere karşı peptitlerin floresan görüntülemesi ile yeni peptitlerin tanımlanması ve bunların HER2'ye yüksek özgüllükte ve etkin bir şekilde bağlanması üzerine odaklanılmıştır.

Benzer bir çalışmada ise, 72 peptit tanımlanıp analiz edilerek aralarından P51 (CDTFPYLGWWNPNEYRY) ve P25 (CKTIYYLGYYNPNEYRY) peptitlerinin HER2 proteinine yüksek afinite gösterdiğini ve bu nedenle HER2-pozitif meme

kanseri görüntüleme ve hedefli ilaç teslimi uygulamalarında kullanılacak araçlar olabileceğini belirtmişlerdir (Geng vd., 2016). Çalışmanın devamında ise, belirlenen bu peptitler Dox yüklü lipozom nanoparçacıkları işlevselleştirmek amacıyla konjuge edilerek kanser tedavisi için hedeflenmiş ilaç teslim sistemi geliştirmişlerdir ve HER2-pozitif hücrelere karşı artan sitotoksisite gözlemlemişlerdir.

HER2'ye karşı yüksek bağlanma afinitesi gösteren peptit sentezi için gerçekleştirilen güncel bir çalışmada ise *in silico* olarak Trastuzumab monoklonal antikoru ile HER2 proteini arasındaki bağlanma kinetiği temel alınarak halkasal peptit Siklo-GCGPep1 (RIKPRKGYTR-GCG) tasarlanmıştır (J. Zhou vd., 2021). Bu elde edilen peptitin HER2'ye özgül olmasının yanı sıra Kamptotesin ile peptit-ilaç konjugatları oluşturarak SK-BR-3 ve NCI-N87 hücre hatlarına karşı etkili antiproliferatif ve daha iyi penetrasyon yeteneğini de göstermiştir.

Yapılan başka bir çalışmada ise, elde edilen A9 (Ac-Q27-D28-V29-N30-T31-A32-V33-A34-W35-NH2) peptitinin yüksek afinite ile HER2 reseptörünü hedefleyebildiğini ve bu peptitin moleküler görüntüleme aracı ve aktif kanser ilaçlarının hedeflenmesi için umut vaat eden bir prob olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Luca vd., 2020b). Diğer çalışma ile benzer bir şekilde A9 peptitini sentezlemek için monoklonal antikor Trastuzumab kullanılmış ve ^{111}In ile radyo-etiketleme yaparak BT-474 hücre hattı ile etkileşimi gözlemlenmiştir (De Luca vd., 2020).

HER2-pozitif tümörlerin görüntülenmesi için PET radyoaktif işaretleyici ile modifiye edilmiş peptit geliştirilmiştir (Biabani Ardakani vd., 2021). Peptit tabanlı ^{68}Ga-PET radyoaktif işaretleyici (^{68}Ga-DOTA-(Ser)$_3$-LTVSPWY), daha yüksek doku penetrasyonu ve daha hızlı görüntüleme süresi sayesinde HER2 aşırı anlatımına sahip tümörlerde teşhis aracı olarak kullanmayı vaat etmektedir.

Bazı çalışmalarda sentezlenen peptitlerin HER2'ye olan özgüllüğünü daha da artırmak için modifiye edilerek yeni konjuge peptitler elde edilmektedir. Bu duruma örnek olarak daha önceden sentezlenmiş olan KCCYSL peptiti (Karasseva vd., 2002) GYYNPN peptiti ile konjuge edilerek HER2'nin hücredışı bölgesini hedefleyen peptit analogları üretilmiştir (Biri-Kovács vd., 2020). Bu yeni modifiye edilmiş peptit, floresan boya 5(6)-karboksi florisin (CF) ile işaretlenerek hücredışı

lokalizasyonları ve özgüllükleri, MDA-MB-453 hücre hattı ile akış sitometrisi ve konfokal mikroskopisinden yararlanılarak doğrulanmıştır.

Meme kanseri hücrelerinde α6β4 ve αvβ3 integrinlerin anlatımı mevcuttur (Sorolla vd., 2020). RGD ile ilişkili peptitler, integrinler tarafından yüksek afinite ile tanınan ve bağlanan genel bir tümör ile ilişkili peptit dizisi olduğundan meme kanseri tedavi ve görüntüleme amacıyla hedeflemek için sıkça kullanılmaktadır. Örneğin, integrin α3'ü hedefleyen mTOR inhibitörü rapamisin ve Dox yüklü LXY peptiti (Cys-Asp-Gly-Phe (3,5-DiF)-Gly-Hyp-Asn-Cys-NH_2) ile modifiye edilmiş lipozomlar kullanarak ÜNMK'ye karşı yeni bir terapötik strateji geliştirilmiştir (W. Dai vd., 2014). RGD içeren peptite yapılan LXY modifikasyonunun, integrin α3 aşırı anlatımına sahip MDA-MB-231 hücre hattında lipozomal Dox'un hücresel alımını önemli ölçüde artırdığını ve buna bağlı olarak lipozomların tümör birikimini *in vivo* iyileştirdiğini göstermiştir.

Benzer bir çalışmada ise polietilen glikol (PEG) ile kaplanmış altın nanoparçacıklar (P-AuNP), α5-integrinlerinin anlatımına sahip MDA-MB-231 hücre hattına RGD peptiti (RGDRGDRGDRGDPGC) ile hedeflenerek radyasyona maruz bırakılmıştır (P.-H. Wu vd., 2017). MDA-MB-231 hücre hattında, RGD/P-AuNP ve radyasyon muamelesi kanser hücresinin canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır ve DNA hasarını artırarak invaziv aktiviteyi önemli ölçüde baskılamıştır. Bu veriler ışığında, RGD/P-AuNP sayesinde hem radyoterapiyi iyileştirmenin hem de integrin aşırı ifade eden kanser hücrelerini hedeflemenin ayrıca radyoterapi sonrası invaziv meme kanseri tedavisinde AuNP kullanımının olası bir klinik strateji olabileceğini rapor edilmiştir.

Wnt/β-Katenin (Kanonik/Klasik) yolağı kanser gelişimini teşvik eder ve belirteç olarak β-Katenin kullanılmaktadır çünkü sitoplazmada bulunarak WNT sinyal yolağı ile çekirdeğe taşınır, bu sayede hücre büyümesi, farklılaşması, programlı hücre ölümü, hücre yapışması ve hücre hareketliliği gibi kritik düzenlemelerde bulunmaktadır. Bu sebeple yapılan çalışmada, β-katenin anlatımını baskılamak için, α5-integrin anlatımına sahip ÜNMK'ye karşı (ITGA5)-hedefli bir nanoparçacık sistemi geliştirilmiştir (Y. Li vd., 2019). Bu sistemde, RGD dizisi içeren ITGA5 peptiti (c(RGDfC) ile hedeflenmiş lipid-polimer nanoparçacıkların anti-kanser ilaç diasidik norkantaridin ile yüklenerek çıplak fare ortotopik meme

ÜNMK tümörü ve akciğer metastatik tümörlerine verildiğinde tümörde daha etkin bir şekilde biriktiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, β-katenin anlatımı baskılanarak tümör büyümesi ve metastazı azalmıştır. Bir çalışmada ise, tümör invazyonu ve metastazının baskılanması için tümör etrafında nanofiberler oluşturabilen ve RGD motifini içeren peptit-1 (BP-KLVFFK-GGDGR-YIGSR) adı verilen nanomalzeme üretilmiştir (X.-X. Hu vd., 2017). Üretilen bu peptit-1 nanomalzeme, içerdiği RGD dizisi sayesinde ortotopik MDA-MB 231 tümör çevresine birikerek tümörün etrafında nanoliflere dönüşmüştür ve tümör hücre yüzeylerindeki reseptörlere bağlanarak yapay hücredışı matrisi oluşturarak 72 saat boyunca stabilitesini sürdürmüştür. *In vivo* kendi kendine birleşme sistemi sayesinde, tümörün büyümesini ve metastatik potansiyelini hedefleyip bastırarak etkili ilaçsız biyomalzeme geliştirilmiştir.

İntegrinler hedefleme aracı olarak sadece ilaç taşıma sistemlerinde değil aynı zamanda RGD dizisi ile hedeflenerek meme kanseri görüntüleme çalışmalarında da kullanılmaktadır. Örneğin, sentezlenen paladyum nanoparçacıkların biyouyumluluğunu artırmak için kitosan oligosakkarit ile kaplayıp RGD peptiti ile işlevselleştirilmiştir (Bharathiraja vd., 2018). Sentezlenen bu nanoparçacığın 808 nm lazer altında fototermal terapötik etkilere yol açtığı gözlemlenmiştir ve dahası iyi bir fotoakustik sinyal genliği özelliği sayesinde α3-integrin anlatımına sahip MDA-MB-231 hücre hattında kızılötesi ışık altında etkili görüntüleme sağlamıştır.

Tedavi amaçlı yapılan çalışmalarda sadece tümöre karşı hedeflenen ilaçlar değil aynı zamanda da uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA'lar) ÜNMK gibi heterojen ve karmaşık kanserlerin tedavisi için çekici farmakolojik hedef olmuşlardır. lncRNA ile yapılan bir çalışmada, tümörü hedeflemek için RGD dizisinden yararlanarak nanaoparçacık (RGD-PEG-ECO/siDANCR NP) geliştirilmiştir (Vaidya vd., 2019). Muamele edilen MDA-MB-231 ve BT-549 hücre hatlarında invazyon, göç, hayatta kalma, tümör sferoid formasyonu ve proliferasyonunda önemli bir azalma elde edilmiş ve *in vitro* terapötik etkinlik sağlanmıştır.

Sonic hedgehog (SHH) sinyal yolu, metastatik ÜNMK tedavisi için hedeflenen bir yolaktır. Bu amaçla, paklitaksel ve SHH inhibitörü GANT61'in yüklü olduğu apolipoprotein A-1 ve tLyP-1 (CGNKRTR) peptit ile fonksiyonelleştirilmiş nanoparçacık (tLyP-1-rHDL-PTX/GANT61 NP) içeren çift hedefli bir ilaç iletim

sistemi tasarlanmıştır (C. Jiang vd., 2021). Nanoparçacıkların yüzeyindeki motifler sayesinde tümör hücrelerindeki çöpçü reseptör B tip I ve nöropilin-1 reseptörü hedeflenmektedir. Bu sayede, tLyP-1 peptiti, nanoparçacıkların MDA-MB-231, BT-549 tümör hücrelerinde ve 3D tümör sferoidlerinde derin tümör penetrasyonunu sağlayarak paklitaksel ve GANT61 teslimatını artırarak daha etkili metastaz baskılama etkinliğini göstermiştir. Paklitaksel ve GANT61'in tLyP-1 nanoparçacıklarla çift hedefli iletimi, tümör hücrelerindeki proliferasyonu bozarak ve programlanmış hücre ölümünü tetikleyerek ilaç çözeltilerinden daha üstün etkinlik göstermiştir.

Tümör büyümesi, anjiyogenez ve metastazının matris metalloproteinaz (MMP) ile ilişkili olduğunu ve tip IV kollajenaz/jelatinaz ailesi MMP'ler için özgü inhibitörlerin olmaması sebebiyle MMP-2 ve MMP-9 enzimleri için hedefe yönelik teslimat gerçekleştirilemediği belirtilmiştir (Koivunen vd., 1999). Fakat MMP-2 ve MMP-9 enzimlerini hedefleyen sentetik bir peptit olan seçici jelatinaz inhibitörü (CTTHWGFTLC) sentezlendiği ve bu peptitin MDA-MB-435 kökenli meme karsinomlarında hücre göçünü engellediği, tümör büyümesini ve invazyonunu hayvan modellerinde önlediğini ve hayatta kalımını artırdığını gözlemlemişlerdir. Hücre zarı proteazı olan aminopeptidaz A (APA)'nın insan meme kanseri tümörlerinde damarlaşmayı engelleyen bir hedef olduğu CPRECESIC motifine sahip sentezlenen peptit ile yapılan çalışmada belirlenmiştir (Marchiò vd., 2004). Sentezlenen peptit ile tedavi edilen insan meme karsinomu MDA-MB-435 hücre hattından türeyen ksenograft taşıyan çıplak farelerde peptitin APA'ya özgül olarak bağlandığını ve tümör damarlarına olan yönelimini, ayrıca damarlaşmayı önlediğini belirterek APA'nın işlevsel bir hedef olabileceğini vurgulamışlardır.

Paklitakselin antiangiyojenik etkinliğini güçlendirmeyi, dozla ilişkili yan etkileri azaltmayı ve antitümör etkinliğini artırma amacıyla yapılan bir çalışmada, tümör neovaskülatür hedefli ilaç iletimi için K237-(HTMYYHHYQHHL) peptitleri ile işlevselleştirilmiş PEG-poli(laktid) (aldehit-PEG-PLA) blok kopolimeri paklitaksel ile yüklenerek dişi BLAB/c çıplak farelerde implant edilmiş MDA-MB-231 meme tümörü tedavisi gerçekleştirilmiştir (Yu vd., 2010). K237 peptiti tümör neovaskülatür endotel hücrelerinin yüzeyinde aşırı anlatıma sahip KDR reseptörlerine özgüllük göstererek VEGF-KDR anjiyojenik sinyal yolunu

baskılamıştır ve bu sayede tümörlü hücrelerin apoptoza ve tümör dokusunun nekroza uğramasına sebep olmuştur.

M2-benzeri tümör ilişkili makrofajları hedefleyen mUNO olarak isimlendirilen peptit (CSPGAK) ile konjuge edilmiş ve toll benzeri reseptör TLR7/8'in agonisti resikvimod (R848) yüklenmiş lignin nanoparçacıklar (LNP) agresif bir ÜNMK *in vivo* modelinin tümör mikro çevresinde pro-tümör fenotiplerini (CD206) anti-tümör M1-benzeri makrofajlara dönüştürmek amacıyla bir sistem geliştirilmiştir (Figueiredo vd., 2021). Elde edilen bulgulara göre, mUNO peptiti ile hedeflenen LNP sayesinde R848'in etkinliği artırılarak tümör destekleyici M2-benzeri makrofajların anti-tümör (M1-benzeri) fenotipe yeniden programlanması gerçekleştirilmiştir.

Hedefli ilaç taşma sistemlerinde sadece lipozomlar veya nanoparçacıklar değil, aynı zamanda eksozomların da kullanılabileceği ve bu eksozomların hem mikroRNA ile yüklenebileceği hem de GE11 peptiti (YHWYGYTPQNVI) ile fonksiyonelleştirilerek EGFR'ye yönlendirilebileceği yapılan çalışmada gösterilmiştir (Ohno vd., 2013). Elde edilen sonuçlarda, intravenöz olarak RAG2(-/-) farelerinde EGFR ifade eden ksenograft meme kanseri dokusuna enjekte edilen eksozomların let-7a miRNA teslimatı sonrasında tümör büyümesinin baskılandığı belirtilmiştir.

Eksozom ile hedefe yönelik ilaç taşıma sisteminden faydalanarak gerçekleştirilen güncel bir çalışmada ise, anti-tümör M1-benzeri makrofaj hücrelerin aktivasyonunu desteklemek amacıyla interleukin-4 reseptörünü (IL4R) hedef alarak M1 makrofaj kaynaklı eksozomları IL4RPep-1 (CRKRLDRNC) ile işlevselleştirilerek tümör büyümesini baskılamayı hedeflemişlerdir (Gunassekaran vd., 2021). miR-511–3p ve NF-κB p50 siRNA taşıyan hedeflenmiş eksozomlar, tümör büyümesi baskılamış, aynı zamanda hedef genleri indirgeyerek M2 sitokinlerinin seviyelerini azaltırken immün baskılayıcı hücrelerin seviyelerini azaltmıştır. M1 sitokinlerinin seviyelerini ve immün uyarıcı hücrelerin seviyelerini artırmıştır. Bu sayede M1-benzeri makrofajlar yeniden programlanarak yeni bir kanser immün terapi sistemi yaklaşımı geliştirilmiştir.

Bir başka çalışmada, eksozom yüzeyine konjuge edilen peptiti L17E (IWLTALKFLGKHAAKHEAKQQLSKL) hedefleme amaçlı değil eksozoma

yüklenmiş olan Dox ve kolesterol-modifiye tek sarmallı miRNA21 inhibitörünün (chol-miR21i) sitozolik salımını teşvik etmektedir; yani teslim edilen kapsüllenmiş yüklerin endozoma hapsedilmeden önce serbest bırakılmasını sağlamaktadır (Zhan vd., 2020). Sonuç olarak, manyetik moleküller ile hedeflenmiş eksozomların nükleik asit ve kemoterapötik ilaç kombinasyonu ile MDA-MB-231 meme kanseri ksenograftlarında onkogenlerin anlatımını azaltarak tümörlerin büyümesini dikkate değer derecede inhibe edebileceği vurgulanmıştır.

Karbon nanotüpler ile yapılan bir çalışmada, katı tümörlerin damarlarında endotelyal hücrelerin yüzeyinde bulunan nükleolin proteinini hedeflemek için nanotüpler F3 peptiti (KDE-PQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK) ile işlevselleştirilmiştir (Prickett vd., 2011). Elde edilen bulgulara göre, fotodinamik terapi ile MCF-7 meme kanseri hücre hattında belirgin hücre ölümü olmuştur. Bazı Peptid İlaç Konjugatları (PDC'ler), ticari kullanım için A.B.D.'deki Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış ve klinik olarak meme kanseri tümörüne hedefli kullanılmaktadır (Vadevoo vd., 2023). FDA onaylı ilaçlara örnek olarak ANG1005 (AngioChem) ve TH1902 (Theratechnologies) verilebilmektedir.

2.4.1 p18-4 Peptit ve Meme Kanseri ile İlişkisi

Peptit 18-4 (p18-4), peptit 160'ın (p160) sentezlenen türevidir. p160 (VPWMEPAYQRFL), Zhang ve arkadaşları tarafından rastgele peptit faj görüntüleme yöntemiyle izole edilen bir dodekapeptittir. Yapılan çalışmada p147 ve p160 peptitlerini içeren iki farklı bakteriyofajın (t147 ve t160) nöroblastoma hücre hattı olan WAC2'ye bağlandığı gözlemlenmiştir (J. Zhang vd., 2001). Ancak t147'nin hücre yüzeyinde kaldığı, aynı zamanda t160'ın ise reseptör aracılı endositoz ile potasyum derişimine bağımlı olarak hücre içine alınımının gerçekleştiği belirtilmiştir. p160'ın nöroblastoma WAC2 hücre hattına olan afinitesi, bağlanma kinetiği ve serum stabilitesini gözlemlemek amacıyla p160 ile p160'ın sentezlenen türevleri ^{125}I veya ^{131}I ile radyo-etiketlenmiştir (Askoxylakis vd., 2006). Çalışmanın sonuçlarına göre, p160 dizisi içerisinde yer alan EPAYQR dizisinin bağlanma için önemli olabileceği ve p160'ın hedeflemede kullanılabileceği vurgulanmış olmasına rağmen, stabilite sorunu olduğu vurgulanmıştır.

p160'ın nöroblastoma hücre hattı dışındaki farklı tümör hücre hatlarında hedefe yönelik ilaç teslimatında kullanılabilirliği de araştırılmıştır. Meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-435'in p160'a bağlanma afinitesi olduğu gösterilmiştir (Askoxylakis vd., 2005). Dahası, meme kanseri hücre hattında p160'ın reseptör aracılığı ile içeri alınımı destekleyen bulgular elde edilmiştir. İlk olarak, ^{125}I ile radyo-etiketli p160'ın, artan derişim ile etiketsiz p160'la rekabet ettiğinde hücre içine alınımının azalması aynı zamanda özgün olmayan rekabetçileri ile yarıştırıldığında hiçbir etkinin gözlemlenmemiş olması p160'ın hücre içine reseptör aracılığı ile girdiğinin ispatı olmuştur.

Tablo 2.3 Meme kanserinde tümörle ilişkili peptitler

Tümör ile İlişkili Peptit Adı	Peptit Dizisi	Hedef	Referans
K237	HTMYYHHYQHHL	VEGFR-2	(Yu vd., 2010)
IL4RPep-1	CRKRLDRNC	IL4R	(Gunassekaran vd., 2021)
mUNO	CSPGAK	CD206	(Figueiredo vd., 2021)
GE11	YHWYGYTPQNVI	EGFR	(Ohno vd., 2013)
L17E	IWLTALKFLGKHAAKHEAKQQLSKL	Endozomal zar	(Zhan vd., 2020)
Akromegali	FCFWKTCT	SSTR2/5	(Lelle vd., 2015)
Angiopep-2	TFFYGGSRGKRNNFKTEEY	LRP-1	(Régina vd., 2008)

Tablo 2.3 Meme kanserinde tümörle ilişkili peptitler (devamı)

F3	KDE-PQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK	Nükleolin	(Prickett vd., 2011) (M. Qin vd., 2014) (Y. Zhang vd., 2009)
pep27 pep27-24M	NKFNKGMRGYWGALGGGNGKRGIRGYD NKFNKGMRGYWGALGGGNGKRGIMGYD	HER2	(Geng vd., 2015)
P51 P25	CDTFPYLGWWNPNEYRY CKTIYYLGYYNPNEYRY	HER2	(Geng vd., 2016)
Siklo-GCGPep1	RIKPRKGYTR-GCG	HER2	(J. Zhou vd., 2021)
A9	Ac-QDVNTAVAW-NH2	HER2	(De Luca vd., 2020; Luca vd., 2020b)
^{68}Ga-DOTA-(Ser)3-LTVSPWY	LTVSPWY	HER2	(Biabani Ardakani vd., 2021)

Tablo 2.3 Meme kanserinde tümörle ilişkili peptitler (devamı)

KCCYSL- GYYNPN	KCCYSL- GYYNPN	HER2	(Biri-Kovács vd., 2020)
LXY peptide	Cys-Asp-Gly-Phe (3,5-DiF)-Gly-Hyp-Asn-Cys-NH2	αvβ3 integrin	(W. Dai vd., 2014)
RGD peptiti	RGDRGDRGDRGDPGC	α5-integrin	(P.-H. Wu vd., 2017)
ITGA5	c(RGDfC)	α5-integrin	(Y. Li vd., 2019)
peptit-1	BP-KLVFFK-GGDGR-YIGSR	Laminin İntegrin	(X.-X. Hu vd., 2017)
Pd@COS-RGD	c-(RGDfK)-SH	α3-integrin	(Bharathiraja vd., 2018)
tLyP-1	CGNKRTR	Çöpçü reseptör B tip I ve nöropilin-1	(C. Jiang vd., 2021)
Jelatinaz inhibitörü	CTTHWGFTLC	Matris metalloproteinaz	(Koivunen vd., 1999)

Tablo 2.3 Meme kanserinde tümörle ilişkili peptitler (devamı)

APA'ya Bağlanan Peptit	CPRECESIC	Aminopeptidaz A	(Marchiò vd., 2004)
TMTP1	NVVRQ	Aminopeptidase P2 (XPNPEP2)	(W. Yang vd., 2008)
4T1pep1	CPTASNTSC	FGFR1	(Silva vd., 2016)
SP90	SMDPFLFQLLQL	Putative zar reseptörü	(R.-M. Lu vd., 2013)
CREKA	Cys-Arg-Glu-Lys-Ala	Pıhtılaşmış plazma proteinleri	(C. Wang vd., 2015)

p160'ın farklı kanser hücrelerinde hedefe yönelik ilaç iletiminde kullanılabilecek çekici bir peptit adayı olmasına rağmen serum proteazları tarafından hızlı yıkımı sebebiyle p160'ın stabilizasyon sorunun önüne geçmek için farklı yöntemler önerilmiştir (Schmidt & Debant, 2013). Siklizasyon veya kimyasal modifikasyonlar gibi yöntemler ile örneğin serum proteazları tarafından tanınamayan D-amino asitlerin peptit dizisinde kullanımı veya peptitin PEGleme ile yarı ömrünü uzatma gibi modifikasyonlar kullanılmaktadır. Örneğin, p160'ın dizisinden yararlanarak 70 farklı 9-mer ile 12-mer arasında değişen uzunluktaki peptit dizileri tasarlanıp selüloz membran üzerinde sentezlenmiştir. Sentezlenen bu peptitlerin stabilitesi C-terminal uca β-alanin bağı ile PEG bağlanarak sağlanmıştır (Ahmed vd., 2010). Sentezlenen peptitler arasından 3 tane peptit (p11, p18 ve p40) MDA-MB-435 ve MCF-7 meme kanser hücre hattına p160'a göre daha yüksek afinite göstermiştir. Ancak 11-mer olan p11 (RGDPAYQGRFL), çeşitli tanıma motifleri içerdiğinden hedef kanser hücrelerinde farklı reseptörlere bağlanmıştır Bir 10-mer olan p18'in (WXEAAYQRFL) ise p160'ın hedef reseptörüne bağlandığı işaretsiz peptitler ile yarıştırma deneyleriyle ortaya koyulmuştur.

Meme kanseri hücre hatları için p18'in p160'a kıyasla 3 kata kadar daha yüksek bağlanma afinitesi göstermesi ile tümör ile ilişkili peptit olarak kullanıma aday gösterilebileceği fakat serumda bulunan proteazlara karşı karasızlığı sebebiyle daha önce de bahsedilmiş olan siklizasyon, kimyasal modifikasyonlar veya D-aminoasitlerin peptit dizisine eklenmesi gibi yöntemler ile bu engelin üstesinden gelinmesi hedeflenmiştir (Soudy vd., 2011). Bu amaç doğrultusunda, p18'in 10 farklı analoğu sentezlenmiştir. İkinci aminoasit norlösinin ve sekizinci aminoasit arjininin D-formundan oluşan p18-4'ün (W**x**EAAYQ**r**FL) stabil olduğu bulunmuştur. Meme kanseri hücre hatları MDA-MB-435, MDA-MB-231 ve MCF-7 ile yapılan çalışmada peptit 18'e kıyasla p18-4'ün 3,5 kat daha yüksek alım göstermesi, kontrol hücre hatları olan MCF-10A ve HUVEC hücre hatlarına düşük afinite göstermesi p18-4'ün tümör hedefleyici peptit olarak *in vivo* ve *in vitro* koşullarda hedefleyici peptit olarak kullanılabileceğini işaret etmiştir.

Bir devam çalışmasında p18-4 ile konjuge edilen Dox ile hedefe yönelik ilaç taşıma sistemi geliştirilmiştir (Soudy vd., 2013). Hücre alımı çalışmaları sonucunda, sentezlenen bu konjugatın meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve MDA-MB-435'e

karşı kanserli olmayan hücre hattı MCF-10A ve HUVEC'e kıyasla 6 kat daha seçici olduğu gösterilmiştir. Benzer bir çalışmada ise p18-4'e konjuge edilen Dox'un ÜNMK hücreleri için tedavi amaçlı kullanılabileceği çünkü kanser olmayan hücrelere kıyasla 13 ila 30 kat daha toksik olduğu vurgulanmış ve yapılan diğer çalışmalar ile bulgu desteklenmiştir (Ziaei vd., 2019).

İlave olarak, *in vivo* koşullarda p18-4 ile konjuge edilmiş Dox aktivitesini gözlemlemek amacıyla gerçekleştirilmiş olan hedefe yönelik tedavide ÜNMK'ye sahip fare modellerinde tümör hacminde 1,5 kat azalma gözlemlenmiştir (Saghaeidehkordi vd., 2021). Ayrıca, sadece hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerinde değil aynı zamanda p18-4'ün meme kanseri hücrelerini seçici olarak teşhis etmede de kullanılabileceği yapılan bir çalışmada ortaya koyulmuştur (Etayash vd., 2015).

Literatürde p160'ın meme kanseri için ilaç taşıma sistemlerine hedef olabilecek bir belirteç olabileceğini ve hatta sentetik analoğu olan p18-4'ün ise hem enzimatik olarak daha stabil hem de p160 ile aynı reseptörü kullanma potansiyeli olduğu daha önce de belirtilmiştir (Soudy vd., 2011). Bu hipotezin üzerine, p160 ve p18-4'ün MCF-7 meme kanseri hücre hattına bağlanmasının SK1'in ifadesine bağımlı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Y.-J. Kim vd., 2020; Soudy vd., 2017). Bahsedilen çalışmada, p18-4 ile SK1 reseptör-ligand ilişkisinin bağlanma özgünlüğünün K_d~0,98 μM olduğu, afinite kromatografiden elde edilen proteinlerin MS analizinde %17 oranında SK1 reseptörü ile ve %28 Kalmodulin proteinleri ile eşleştiği deneysel olarak gösterilmiştir (Soudy vd., 2017). p18-4 ile SK1 reseptör-ligand ilişkisinden yararlanarak gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise polihedral oligomerik silseskioksan (POSS) nanoparçacıklar üretilerek Klorin e6 (Ce6) ve p18-4 ile konjuge edilmiştir (Y.-J. Kim vd., 2020). Sentezlenen bu nanoparçacık p18-4 sayesinde meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231'deki *in vitro* hücresel alımını ve hücreye hedefleme yeteneğini artırıp tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Yapılan son çalışmada ise p18-4 ile SK1 reseptör-ligand ilişkisi *in vivo* ortamda incelenerek elde edilen sonuçlar ile öneminin altı tekrar çizilmiştir (Ziaei vd., 2023). Elde edilen sonuçlara göre, ÜNMK'ye sahip fare modellerinde serbest Dox ile tedaviye kıyasla p18-4 ile konjuge edilen Dox uygulanan grupta daha düşük

hacimli tümörlerin gözlemlendiği ve düşük dozlarda dahi hücre proliferasyonunu azaltıp apoptoza sürüklediğini göstermişlerdir.

2.5 Reseptör ve Biyobelirteç Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Tümörle ilişkili peptitler elde edildiklerinde hedef reseptörleri bilinmeyebilir ya da *in silico* çalışmalar sonrası elde edilen hedefin doğrulanması gerekebilir. Bu amaçla reseptör proteinlerin olduğu protein izolatları tümör ilişkili peptitlerle etkileşime sokulabilir. Bunu gerçekleştirmek için ilk adım ise protein izolasyonudur. Proteinlerin fizikokimyasal özelliklerine göre farklı izolasyon yöntemleri geliştirilmiştir çünkü her proteinin kendine özgü aminoasit dizisi, boyutu, ikincil yapısı, net yükü, izoelektrik noktası, çözünürlüğü, ısı kararlılığı, ve hidrofobik özellikleri vardır (Nehete vd., 2013). Bu sebeple alkol, deterjan veya nanodisklerin kullanımı gibi farklı çözünürleştirme yöntemleri (Inagaki vd., 2013), kromatografik yöntemler veya SDS jel elektroforezi gibi saflaştırma yöntemleri ve kütle spektrometresi (MS), sıvı kromatografi (LC) veya dairesel dikroizm spektoskopisi gibi farklı karakterizasyon yöntemleri vardır.

2.5.1 Proteinleri Çözünürleştirme Yöntemleri

2.5.1.1 Deterjan Aracılığıyla

Proteinleri çözünür hâle getirme yöntemlerinde deterjan kullanımı yaygın bir tekniktir çünkü deterjanlar sulu çözeltilerde polar veya yüklü bir baş grubu ve uzun hidrofobik hidrokarbon zincirinden oluşan amfipatik doğal çift katmanlı misel yapıları sebebiyle amfipatik hücre zarını taklit ederek proteinlerin çözünürlüklerini artırabilirler (Errasti-Murugarren vd., 2021). Fakat zar proteinlerinin işlevlerini ve yapısal özelliklerini korumak için proteinin barındırdığı özelliklerine özgü deterjan seçimi oldukça önemlidir. Kritik misel derişimi (CMC), deterjan moleküllerinin miseller oluşturmak için bir araya geldiği derişimdir. Daha düşük CMC değerlerine sahip deterjanlar, protein etkileşimleriyle müdahaleyi azaltmak için daha düşük konsantrasyonlarda misel oluşturduğu için yapısal analizlerde tercih edilir (Stetsenko & Guskov, 2017). Daha düşük CMC değerleri aynı zamanda çözünme verimliliğinin daha iyi olduğunu gösterir, bu da membran proteinlerinin stabilitesini ve doğal halini analiz sırasında korumak için önemlidir. CMC ve misel boyutu,

deterjan çözeltisinin iyonik direncine, sıcaklığına, basınç, pH ve kirliliğe bağlıdır (Arnold & Linke, 2007). İyonik deterjanların CMC'si tuz konsantrasyonunun artmasıyla azalırken, sıcaklık tarafından pek etkilenmez, noniyonik deterjanların CMC'si ise tuzların varlığından az etkilenirken, sıcaklık arttıkça artar. Protein saflaştırma amacıyla deterjan kullanımında, deterjanın çözeltideki davranışını anlamak ve deterjanın çözelti içindeki durumunu kontrol etmek için bulanıklık noktasının tespiti önem arz etmektedir çünkü bulanıklık noktasında miseller çözelti bulanık hale gelir ve miseller su ile karışmaz, büyük agregatlar oluşturarak sudan ayrılır. Bu sayede, deterjanın optimal konsantrasyonunu belirlemek ve gerektiğinde faz ayrılmasını kullanarak istenmeyen maddeleri uzaklaştırmak için bu bilgi önemlidir. (Linke, 2009).

Deterjanlar, yapı ve iyonik özellikleri itibariyle iyonik, iyonik olmayan ve zwitteriyonik olmak üzere 3 ana sınıfa ayrılmışlardır (Linke, 2009). İyonik olmayan deterjanlar, hafif deterjan grubu altında da incelenebilirler çünkü bunlar yüksüz hidrofilik glukoz kökenli veya polioksietilen baş grupları içerir (Seddon vd., 2004). Bu tür deterjanlar lipid-lipid ve lipid-protein etkileşimlerini kırarlar. İyonik deterjanlar katyonik veya anyonik baş grup ve hidrofobik bir hidrokarbon zinciri veya steroidal bir yapıya sahiptir. İyonik deterjanlar sert deterjan grubu altında da incelenebilirler çünkü protein-protein etkileşimlerini ve protein içi etkileşimleri doğrudan bozarlar (Anandan & Vrielink, 2016). Zwitteriyonik deterjanlar diğer iki deterjanın da özelliklerini taşıyan ara form bir deterjandır. Bu sebeple, zar proteinlerinin çözünürleştirmesinde kullanılmaya aday gösterilirler (Seddon vd., 2004). Fakat, baş grup yükleri pH'a duyarlı olduğundan çözünebilirlik ve saflaştırma koşulları deterjan özelliklerini değiştirebilir.

n-Dodesil-β-D-Maltopiranozid (DDM), n-Dekil-β-D-Maltopiranozid (DM), n-Oktil-β-D-Glukopiranozid / n-Nonil-β-D-Glukopiranozid (OG/NG), LDAO, C12E8, n-Undesil-β-D-maltopiranozid (UDM), Lauril maltoz neopentil glikol (LMNG), Triton X-100, Thesit ve Digitonin gibi deterjanlar, membran proteinlerinin saflaştırılması ve kristalleştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Stetsenko & Guskov, 2017).

Deterjan ile çözünürleştirme yöntemine alternatif olarak kullanılan organik çözücüler, lipidlerin ve zar proteinlerinin çözünmesini sağlayarak proteinleri

hücreden izole etme özelliklerine sahiplerdir (Vit & Petrak, 2017). Sıkça kullanılan organik çözücülere örnek olarak formik asit (FA), metanol ve trifloroetanol verilebilir.

2.5.1.2 Lipid Tabanlı Stratejiler

Polimer tabanlı nanodiskler son zamanlarda tercih edilen membran proteinlerinin çözünürleştirmesinde ve izolasyonunda kullanılan lipid membran taklitçisi polimerlerdir (Bada Juarez vd., 2019). Nanodiskler sayesinde membran proteinlerini yapısal ve fonksiyonel özelliklerini kaybetmeden çözünür hâle getirerek izole etmek mümkündür. Bu sayede jel parçalama veya deterjandan proteinleri arındırma gibi basamakları atlayarak izolasyon yöntemi ile elde edilen proteinler direkt olarak MS yöntemleri ile tayin edilebilir (C. C. Wu & Yates, 2003). Amfipol ve stiren maleik asit (SMA) olmak üzre iki çeşit polimer tabanlı Nanodisk bulunmaktadır (Şekil 2. 4).

Amfipol, büyük bir hidrofilik kısım ve sık aralıklı hidrofobik gruplar içeren kısa amfifilik polimerlerdir (Parmar vd., 2016). Proteinin deterjan ile çözünmesinden sonra, polimer, membran proteinlerinin hidrofobik bölgeleri ile etkileşime girerek proteini ince bir tabaka halinde sarmalar, ancak kompleksi hidrofilik bölgeler sayesinde sulu çözeltide tutar. Dezavantajı ise, proteini elde etmek için önce proteinin deterjan ile çözünmesidir (Popot, 2010). Bu sebeple, kullanılan deterjanların doğasını ve konsantrasyonunu optimize etmek zorunludur, bu da proteinin aktivitesinin kaybı gibi potansiyel zorluklar yaratabilmektedir.

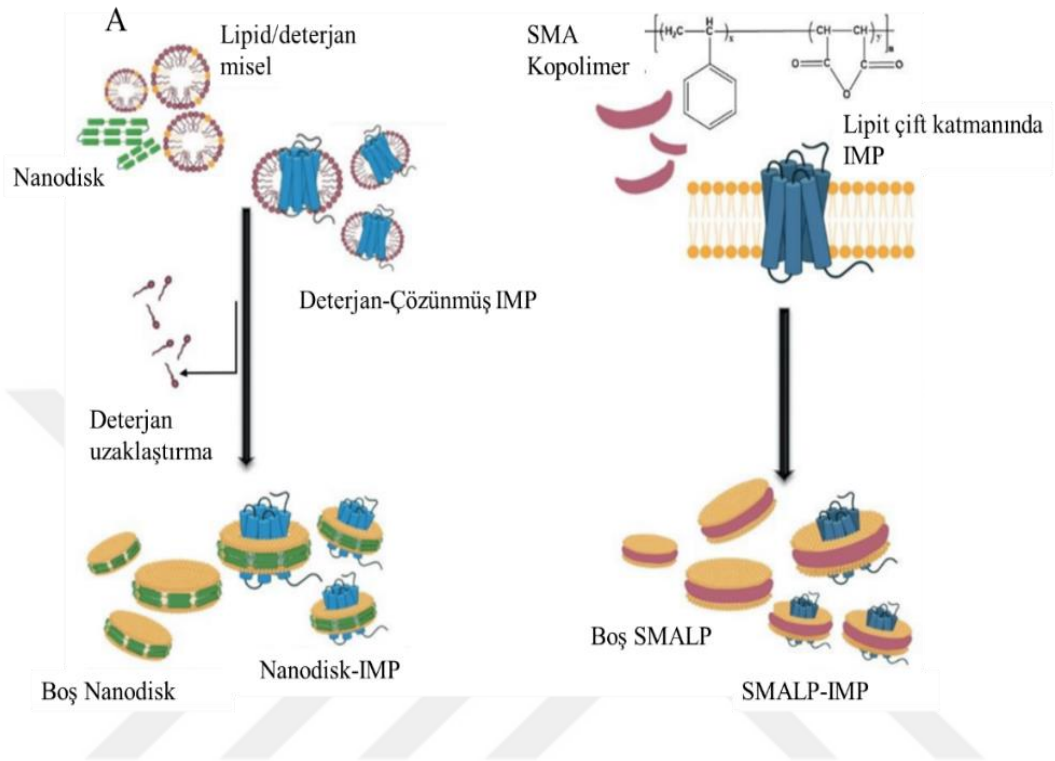
SMA kopolimerleri, stiren ve maleik anhidritin serbest radikal polimerizasyonu ve ardından asit hidroliziyle stiren maleik asit formuna dönüştürülmesiyle elde edilir (S. C. Lee & Pollock, 2016). SMA, polistiren-maleik asit kopolimerleri ile bir araya getirilen farklı uzunluk ve kompozisyonlardan oluşan polimerlerdir ve SMALP veya lipodisk nanoparçacıkları olarak isimlendirilmektedirler (Parmar vd., 2016) (Şekil 2.5). SMA, yapısında hidrofobik stiren ve yüklü hidrofilik maleik asit bileşenlerinden oluştuğu için amfipatiktir. SMA polimerlerinin amfipatik doğası sayesinde membran proteininin etrafında toplanır ve proteinin stabilizasyonunu ve hidrofobik ortamın taklit edilmesini sağlar. En büyük avantajından biri ise önceden deterjan kullanmadan doğrudan zarlar üzerinde kullanılabilir yani membran proteinlerini doğal lipid ortamlarından doğrudan saflaştırılabilir (Pollock vd.,

2018). SMALP'ler membran proteinlerinin saflaştırılması, stabilizasyonu ve yapısal ya da fonksiyonel analizleri için güçlü bir araçtır. Bu yöntem, geleneksel deterjanların bazı dezavantajlarını aşarak, membran proteinlerinin daha doğal bir ortamda incelenmesini sağlar. Fakat iyon, düşük pH duyarlılığı ve küçük boyutları (10-12 nm) sebebiyle SMA kullanımı sınırlanmaktadır (Oluwole vd., 2017).

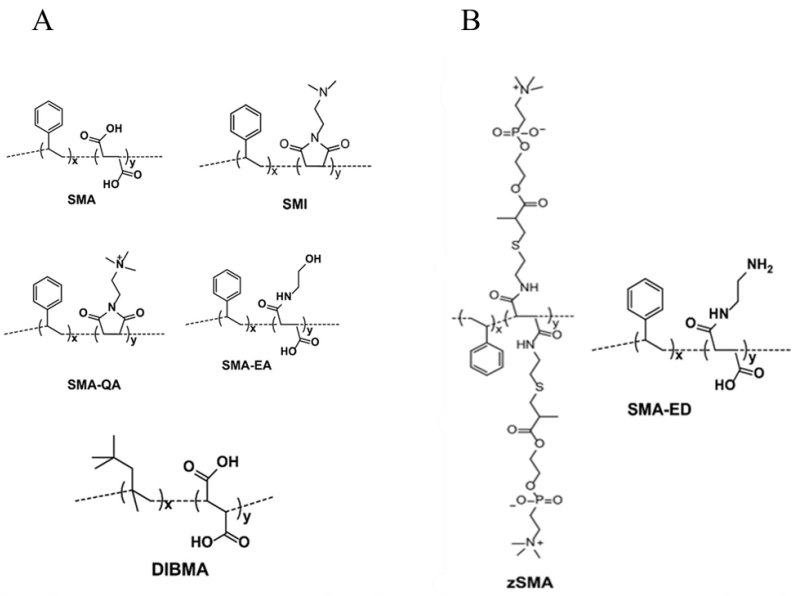
SMALP nano yapılarının, magnezyum ve kalsiyum gibi divalen iyonlara karşı duyarlılığı sebebiyle SMA'nın proteinin etrafındaki diski saran yapıyı çözerek proteinin çökelmesine sebep olması söz konusudur. Bu sınırlamaları aşmak için tuza daha dirençli polimerler geliştirilmiştir (Bada Juarez vd., 2019). Örneğin, magnezyum duyarlılığını azaltmak amacıyla bir maleik asit karboksil grubunun bir amid ile değiştirilmesi ve polar yan zincirlerde tiyol grupları bulunduran SMA-SH önerilmektedir veya halkasal stiren grubu yerine lineer bir karbon zinciri içeren di-izobütilen maleik asit (DIBMA) kopolimeri, daha yüksek kalsiyum veya magnezyum konsantrasyonlarına dayanıklı diskler oluşturmaktadır (Lindhoud vd., 2016; Samyn, 2017). Ayrıca, SMA etanolamin (SMA-EA), etanolamin grupları ile modifiye edilmiş bir SMA türevidir ve yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklıdır. Aynı şekilde, SMA-etilendiamin (SMA-ED) ise SMA-EA'nın zwitteriyonik formudur ve SMA-ED'nin dehidratasyonu ile oluşturulan SMAd-A formu da stabil asidik pH'lı kopolimerler arasında yer almaktadır (A. Chen vd., 2020). Böylece, pH 6'dan düşük değerlerde lipid keseciklerinin çözünmesini kolaylaştırır (Brown vd., 2021).

SMALP'ların düşük pH'a duyarlılığının üstesinden gelmek için SMA'ya alternatif bir diğer türev stiren-maleik imid (SMI) üretilmiştir ve bu sayede pH 6 ve altında lipidleri çözebilmektedir (Samyn, 2017). Stiren maleimid kuaterner amonyum (SMA-QA) pozitif yüklü bir SMA türevidir ve geniş bir pH aralığında çözünürlüğe sahiptir ve divalent iyonlara toleranslıdır. Benzer şekilde, geniş pH aralığında aktivite göstererek protein multimerlerini çözen türevler ise metilamin (SMA-MA), etilamin (SMA-EtA) ve propilamin (SMA-PA) türevleridir (Brown vd., 2021). SMA'da bulunan anyonik karboksil asitler zwitteriyonik fosfatidilkolin gruplarıyla değiştirilerek üretilen Zwitteriyonik SMA'lar (zSMAlar) tampon çözelti uyumsuzluklarını ve SMALP'lerin boyut kısıtlamalarına çözüm sunmak amacıyla

geliştirilmiştir (A. Chen vd., 2020). SMA'ların aksine, zSMAlar düşük pH veya polikatyonların varlığında çözeltiden çökmezler (Şekil 2.5).



Şekil 2.4 Nanodisk ve SMALP. (A) Deterjanda çözündürülmüş integral membran proteinleri (IMP), çoğu durumda BioBeads kullanılarak deterjanlar ortamdan uzaklaştırılarak deterjanda çözündürülmüş lipidler Nanodisk ile sarmalanırlar. (B) IMP–SMALP kompleksleri, IMP'nin önce lipit çift katmanının deterjanla çözündürülmesini gerektirmeksizin doğal membranlarından izole edilebilmektedir (Majeed vd., 2021)



Şekil 2.5 SMA türleri. (A) İyonik Polimerler. (B) Zwitteriyonik polimerler (Krishnarjuna & Ramamoorthy, 2022).

2.5.2 İzolasyon Yöntemleri

2.5.2.1 Elektroforetik Yöntemler

Elektroforetik yaklaşımlar, proteomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan ve proteinlerin ayrılmasını sağlayan yöntemlerdir. Elektroforetik yaklaşımların farklı türleri arasında sıvı faz izoelektrik odaklama, serbest akış elektroforezi, kapiller elektroforez ve membran elektroforezi bulunmaktadır (Ly & Wasinger, 2011). Bu yöntemler, genellikle MS çeşitleri ile kullanılabilmekte ancak bazı durumlarda bu kombinasyon mümkün olmayabilmektedir.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) jel elektroforezi, yüklü proteinlerin elektrik akımı ile jel üzerinde boyutsal olarak ayrıştığı bir yöntemdir (Nehete vd., 2013). Sistemde kullanılan SDS sayesinde proteinlerin 3 boyutlu yapıları bozunur ve negatif yüklenerek kütle oranlarına göre jelde ilerlerler. Jel görüntüleme yapıldığında, boyutlarına bağlı olarak farklı konumlarda protein bantları meydana gelir.

İki çeşit SDS jel elektroforezi vardır bunlar tek boyutlu (1D) ve iki boyutlu (2D) jel elektroforezi olarak adlandırılmışlardır. Tek boyutlu jel elektroforezinde, proteinlerin moleküler boyutu ve saflığı hakkında bilgi edinilir (C. C. Wu & Yates,

2003). Poliakrilamid jele yüklenen proteinlerin jel matrisindeki gözenek boyutuna ve proteinin yük, şekil ve büyüklüğüne bağımlı olarak elektrik akımı altında göç hızları değişir. Proteinler, iki boyutlu jel elektroforezin ilk boyutunda izoelektrik özelliklere göre, ikinci boyutunda ise SDS sebebiyle yapısı bozunmuş proteinlerin elektrik akım altında kat ettiği yola göre yani boyutuna göre ayrılır (Ward vd., 2015). İzoelektrik odaklamada, proteinler, nötr yükte oldukları pH'ye doğru bir pH gradyanında göç ederler. Bu sayede proteinin hem boyutu hem de yükü hakkında bilgi elde edilir. Fakat, 2-D jel elektroforezi zaman alıcı ve işgücü yoğun bir süreçtir ve özellikle hidrofobik ve alkalin proteinlerin yetersiz temsilini sağlar (W. C. S. Cho, 2007). Bu yöntem ayrıca düşük dinamik aralığa sahiptir ve jelden jele kararlı olmayan sonuçlar elde edilmesine sebep olabilmektedir.

2.5.2.2 Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, çözeltideki moleküllerin sabit ve hareketli matrisler ile etkileşimine dayanır. Bu moleküller biyokimyasal olarak farklı özelliklere sahip olduklarından farklı göç hızları gösterirler (Ly & Wasinger, 2011). Sabit fazda bulunan malzeme hedef moleküllerin bağlanmasına, hareketli faz koşulları ise moleküllerin çözünürlüğüne etki ettiğinden bu etkileşimler göç hızlarını belirler. Bu şekilde, proteinler veya peptitler belirli fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılabilirler.

Ters Fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile peptitlerin ve proteinlerin hem izolasyonu MS ile birleştirildiğinde hem karakterizasyonu hem de analitik ölçümlerini yapılabilir (Tartaglia vd., 2020). Proteinin hidrofobik özelliklerine göre, seçilen kolon ve mobil faz ile zamana bağlı olarak artan bir organik çözücü gradyanıyla hedeflenen protein izole edilebilir veya analiz edilebilir. Gradyan süresi, sabit faz sıcaklığı, uzunluğu ve hareketli fazın akış hızları gibi parametreler ile izolasyon kapasitesini arttırmak mümkündür (Ly & Wasinger, 2011). Özetle, HPLC, sıvı mobil fazın, uygun matrisle doldurulmuş kolondan geçtiği, farklı moleküllerin kolon matrisi ile olan etkileşimlerinin farklılığına bağlı olarak çalışır. RP-HPLC ile proteinlerin analitik ölçümlerinin yanı sıra proteinin parçalanmış peptit fraksiyonlarının MS analizinden önce tuzdan arındırma amacıyla kullanılmaktadır. Fakat dezavantajı, büyük ölçekli protein analizinde veya izolasyonunda kullanımının sınırlı olmasıdır (Nehete vd., 2013). Ultra-HPLC (UPLC) ile HPLC'nin çalışma prensipleri aynıdır fakat UPLC ile yapılan

kromatografik izolasyonlarda hem çözünme gücü hem de ayrışma hızı daha fazladır (Feist & Hummon, 2015).

İyon değişimi kromatografisinde (IEC), mobil fazın içeriğindeki tuz veya pH değerine bağımlı olarak proteinlerin elektriksel yüklerine göre ayrıştırılması söz konusudur (Ly & Wasinger, 2011). Ek olarak, mobil fazdaki pH'ın gradyan kullanımı sayesinde proteinlerin pI değerlerine göre yüksek çözünürlükle proteinlerin izolasyonu yapılabilir. Fakat proteinleri elde etmek için kullanılan hareketli fazdaki yüksek tuz oranı sebebiyle MS gibi teknikler ile doğrudan birleştirilemez.

Boyut dışlama kromatografisi (SEC), moleküler ağırlıklarından faydalanarak protein karışımlarının daha az karmaşık kümelere ayrılması için kullanılan bir yöntemdir (Gaborieau & Castignolles, 2011). Kullanılan kolonun kaplamasındaki por çapına bağlı olarak, protein veya peptitlerin porların içerisine girmesi veya dışlanmasına göre büyük proteinlerin öncelikli, porlara giren küçük proteinlerin ise daha yavaş ayrışması prensibine dayanmaktadır. Kullanılan iki tür kolon bulunmaktadır, bunlar hidrofobik sütun (jel geçirgenliği) ve hidrofilik sütun (jel filtrasyonu) olarak bilinir (Boxi vd., 2020).

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (HIC), proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik bakiyelerden faydalanarak, proteinleri veya molekülleri hidrofobiklik farkına dayanarak ayırma yöntemidir (S. Liu vd., 2020). HIC yönteminin koşulları, proteinlerin yapısını bozmaz ve bu sayede biyolojik olarak aktif bir protein eldesi gerçekleşebilir.

Afinite kromatografisi, diğer kromatografik yöntemlerde kullanılan boyut, yük veya hidrofobik özellikleri yerine biyokimyasal özellikleri kullanmaktadır (Wingfield, 2015). Biyoözgül bağlanmadan faydalanarak, doğal ligandların immobilizasyonu sonucu belirli protein sınıflarının seçilimi gerçekleştirilir. Bu sayede proteomik analizlerde yüksek özgüllük ve seçicilik sağlar. Antikorlar ve antijenler, bakteriler, virüsler ve fajlar, rekombinant proteinler, lektinler ve glikoproteinler, düzenleyici enzimler ve reseptörler gibi bazı biyomoleküller uygun afinite kromatografisi metodu ile saflaştırılabilir (Boxi vd., 2020). Afinite kromatografisi, matris aktivasyonu, ligandların bağlanması, protein adsorpsiyonu, elüsyon ve matris yenilenmesi olmak üzere 5 adımdan oluşan bir süreçtir.

Afinite kromatografisinde, zenginleştirme ve tüketme olmak üzere iki yaygın strateji vardır (Ly & Wasinger, 2011). Zenginleştirme stratejisinde, genellikle düşük bollukta bulunan belirli bir protein veya peptit sınıfının konsantrasyonunu artırmayı amaçlarken tüketme stratejisinde ise genellikle yüksek bollukta bulunan belirli bir protein veya peptit grubunu hedefler ve düşük bolluklu türlerden 'soyarak' uzaklaştırır. Örneğin, immünoafinite kromatografisi, yüksek özgüllüğe sahip antikorlar kullanılarak yüksek bolluklu proteinlerin plazma veya serum gibi biyolojik sıvılardan uzaklaştırılmasında etkilidir. Biyoafinite kromatografisi, immünoafinite kromatografisi, boyalı-ligand veya biyomimetik afiniteli kromatografi, immobilize metal iyonu afiniteli kromatografi (IMAC) ve analitik afiniteli kromatografi gibi farklı afinite kromatografi yöntemleri bulunmaktadır (Hage vd., 2023).

Afinite kromatografisinde, elde edilmek istenen proteinler bazen spesifik bir işaretleyici ile işaretlenebilir (Urh vd., 2009). Afinite kromatografisinden elde edilen biyomoleküllerin karakterizasyonunun farklı MS yöntemleri ile gerçekleştirilmesi gerekmektedir fakat ilerleyen teknoloji ile ligand ve makromolekülün doğrudan etkileşimin analizi için Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR) biyosensörleri de kullanılabilmektedir. Geliştirilen bir SPR biyosensörde altın bir sensör yongası dekstran ile kaplanmış ve ligand yüzeye immobilize edilmiştir (Boxi vd., 2020). Ligand ve makromolekül etkileşime girdiğinde yüzey plazmonları üzerinde bir değişiklik meydana gelmiş ve bir dedektör tarafından tespit edilip sinyal olarak kaydedilmiştir. Bu sayede, immobilize edilmiş ligandla hedef analit arasındaki etkileşimlerin varlığı ve niteliği hakkında bilgi elde edilmiştir. Bu metot sayesinde, moleküler bağlanma kinetiği, afiniteler ve inhibisyon türleri gibi birçok biyolojik etkileşim özelliği karakterize edilebilmektedir.

2.5.2.3 Ultrasantrifüj

Plazma proteinlerinin saflaştırılmasında kullanılan yöntemlerden olan ultrasantrifüj deneylerinin verimi azdır çünkü sitoplazmik proteinlerin ortama kaçması ve işlemler sırasında hedef proteinlerin kaybı söz konusudur (Lehner vd., 2003). Bu sebeple, ultrasantrifüj yöntemi zaman içerisinde optimize edilerek güçlendirilmiştir. Örneğin gradyan ultrasantrifüjünde, çöktürülmüş proteinlerin

yoğunluklarından faydalanarak, proteinler sulu iki fazda saflaştırılmaktadır (Cordwell & Thingholm, 2010). Ayrıca, farklı yoğunluk santrifügasyonu veya yoğunluk sedimentasyonu yöntemleri ile diğer hücresel organellerin de yoğunluk farkıyla ayrıştırılması mümkündür.

2.5.3 Karakterizasyon Yöntemleri

İzole edilen zar proteinlerinin karakterizasyonu farklı yöntemler ile gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile doğrudan zar proteinlerinin yapıları değerlendirilebilir. Aynı zamanda oligomerik yapı ve süper-moleküler bileşim tayini de mümkündür (Muller & Engel, 2008). Tek molekül kuvvet spektroskopisi (SMFS) yöntemi ise p160 peptitin bağlandığı reseptörün karakterizasyonunda da karşımıza çıkan yaygın yöntemlerden olup, zar proteinlerinin katlanmasını stabilize eden etkileşimleri belirler ve işlevsel durumları arasındaki geçişi karakterize eder. Kızılötesi spektroskopisi yönteminde, proteinin yapısında veya dinamiğindeki bozulmalardan yararlanarak titreşim değişikliklerini inceler ve bu sayede proteinlerin protonlanma durumu, farklı bakiyelerin konformasyonları, amino asit yan zincirleri ve su veya kofaktörlere olan duyarlılığını ölçer (Lorenz-Fonfria, 2020).

Membran proteinlerinin atom seviyesinde yüksek çözünürlüklü yapılarının değerlendirilmesinde NMR spektroskopisi ve X-ışını kristalografisi yöntemleri kullanılabilir (Xie vd., 2009). Geleneksel NMR spektroskopisinin dezavantajı 40 kDa ve altı küçük zar proteinlerinin analizi ile sınırlı olmasıdır. Katı hal NMR spektroskopisi ise 100 kDa ve daha büyük lipid protein kompleks yapılarının analizinde kullanılabilmektedir (Bolla vd., 2019). XRD kullanarak atomik düzeyde büyük proteinlerin yüksek çözünürlüklü 3D yapılarının, protein yapılarının hareketliliği (dinamikleri) ve heterojenliği hakkında bilgi edinmek için proteinlerin kristal formunu alması gerekmektedir (Acharya & Lloyd, 2005; Pandey vd., 2016). Bu sayede X-ışınları kristal yapı üzerine düşürüldüğünde, atomlardan X-ışınlarının saçılmasıyla protein kristalindeki atom düzeni hakkında bilgi içeren bir kırınım deseni elde edilerek 3D yapılar çıkarılabilmektedir.

MS ile membran proteinlerinin karakterizasyonu, topolojik yapı, üç boyutlu yapı tayini ve protein komplekslerindeki protein-protein etkileşimleri tayin edilmektedir (Xie vd., 2009). MS'de, tek boyutlu veya iki boyutlu jel elektroforezi ile izole edilen

proteinler jelin kimyasal olarak parçalanmasından sonra proteinlerin teşhisi gerçekleşebilmektedir (C. C. Wu & Yates, 2003). Örneğin, matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu-uçuş zamanı MS (MALDI-TOF MS), iyonizasyondan yararlanarak izole edilen proteinlerin karakterizasyonunda, veya modifiye edilmiş proteinlerin molekül ağırlığının tespitinde kullanılabilir (Nehete vd., 2013). MALDI-TOF analizi için analiz edilmesi istenilen örneğin uygun matris ile kristalleştirildikten sonra lazer ışıması ile örnek iyonlaştırılır ve desorpsiyon süreci gerçekleştirilir (Jang & Kim, 2018). TOF kütle dedektörü, iyonların kütlelerine bağımlı olarak iyon kaynağı ile dedektör arasındaki mesafeyi katetmek için harcadıkları süreyi belirler (D. Li vd., 2022). Karmaşık bir örnekte hedef analitleri analiz etmek için bir adet TOF kütle analizörü yeterli olmadığında, ikinci bir TOF (MALDI-TOF/TOF) kütle analizörünün bağlanması ile uçuş süresini artırarak ikinci TOF tarafından iyonlar analiz edilir ve ardışık kütle spektrumu elde edilir. Bu sayede peptitlerin dizileri analiz edilebilir (Fagerquist, 2013).

Proteomik araştırmalar, hücresel sistemlerdeki gen ifadesi ürünlerinin tanımlanması, nicelendirilmesi ve karakterize ederek kapsamlı analizini sağlar. Fakat bu süreç proteinlerin kimyasal ve yapısal özelliklerini etkileyebilir ve hatta işlevini bozabilmektedir. Farklı yöntemler ile izole edilen proteinlerin proteaz enzimleri ile sindirilip direkt olarak analizi LC-MS ile gerçekleştirilebilir (Dupree vd., 2020). LC-MS, hassasiyeti, seçiciliği, doğruluğu, hızı ve verimliliği sebebiyle, proteinlerin tanımlanması ve modifikasyonlarının belirlenmesi gibi karmaşık protein analizlerinde önemli bir rol oynamaktadır (G. Chen & Pramanik, 2009). LC-MS/MS, proteinlerin önce uygun bir kolon ile LC kısmında yüksek basınç altında analitlerin fiziksel ve/veya kimyasal özelliklerine dayalı olarak ayrıştırıldığı ve ayrıştırılan proteinlerin bir MS'ye aktarıldığı birleştirilmiş bir tekniktir. Analitler, MS iyon kaynağına ulaştığında, iyonlaşma gerçekleşir yüklü parçacıklar oluşturulur ve dedektör tarafından analit miktarına bağımlı olarak sinyal üretilir (Leung & Fong, 2014). MS kısmında, kuadrupoller, yüksek vakum altında parçacıkların kütle analizörlerinden geçmesini sağlar (S. N. Thomas vd., 2022). İlk kuadrupol belirli bir ana iyonu hedeflerken diğerleri dışlanır. Çarpışma hücresinde, seçilen iyonlar inert bir gazla çarpışarak parçalanır ve ürün iyonlarına dönüşür. Üçüncü kuadrupol, belirli ürün iyonlarını hedeflemek için kullanılır ve son olarak izole edilen iyonlar nicelendirilir (Grebe & Singh, 2011). LC-MS/MS analizinde,

her bir bileşenin kütle/yük oranı belirlenerek, hangi bileşenin hangi analite ait olduğu anlaşılır. Bu bilgiler, bileşenlerin kimliklerini belirlemeye yardımcı olur. Aşağıdan-yukarı (Bottom-up) LC-MS yaklaşımında proteinlerin proteaz sindirimi ile başlanmakta ve ardından peptit kütlesinin parmak izi veya LC-MS/MS ile bireysel peptitlerin dizisinin analizi gerçekleştirilmektedir (W. C. S. Cho, 2007).

Meme kanseri çalışmalarında metabolit ve protein analizlerinde LC-MS/MS sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin, son zamanlarda gerçekleştirilen bir çalışmada, meme kanserinde proteoglikan biyobelirteçlerin karakterizasyonunda LC-MS/MS tabanlı proteomik yaklaşım kullanılmıştır (Kizhakkeppurath Kumaran vd., 2023). Bir diğer çalışmada ise, LC-MS/MS'nin kullanım amacı, trastuzumab tabanlı tedaviye dirençli $HER2^{+}$ meme kanseri hastalarının serumunda bulunan belirli proteinlerin keşfedilmesi ve bunların tedavi direnci ile ilişkilendirilmesidir (T. Yang vd., 2020). LC-MS/MS, bu proteinlerin doğrulanması ve sonrasında $HER2^{+}$ meme kanseri hastaları için trastuzumab tabanlı tedavinin terapötik etkilerini öngören bir serum tabanlı protein imzası geliştirilmek için kullanılmıştır. Biyobelirteç tayin etmek için LC-MS/MS kullanan bir çalışmada ise meme kanseri tespiti ve ilerlemesini izlemek için idrardaki protein biyobelirteçlerinin tespiti hedeflenmiştir (Beretov vd., 2015). Meme kanserli ve sağlıklı kontrol grubu kadınların idrarlarını karşılaştıran proteomik analiz ile meme kanserli hastalardaki idrar proteomunda 59 önemli farklı protein tespit etmiştir. Bu proteinler arasında meme kanserini belirlemede kullanılabilecek 13 yeni potansiyel belirteç bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma ile elde edilen bulgular, idrarın bir biyobelirteç havuzu olabileceği ve meme kanserinin tespitinde klinik kullanım potansiyeline sahip olduğu vurgulanmıştır.

3

DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hücreler

Tablo 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, markası ve katalog numarası

Kimyasal adı	Marka	Katalog Numarası
RIPA tamponu	Clear Bons	R101122
Tris-HCl	Sigma- Aldrich	T1503-1KG
Magnezyum klorür	BIOBASIC	7791-18-6
İnsülin	Gibco	2517759
Sükroz	BIO BASIC	57-50-1
Proteaz inhibitör	Goldbio	GB-108-2
Fenilmetil sülfonil florid (PMSF)	Goldbio	P-470-10
n-oktil-β-D-glukopiranozid	BIO BASIC	KC58961ZA
İmidazol,	BIO BASIC	288-32-4
EDTA	Sigma- Aldrich	E5134-500G
Sodyum karbonat	BIOBASIC	497-19-8
Coomassie mavi	BIOBASIC	6104-59-2

Tablo 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, markası ve katalog numarası (devamı)

Magnezyum asetat	BIOBASIC	16674-78-5
EGTA	BIO BASIC	67-42-5
Akrilamid	Bioshop	2J79095
SDS	MULRICELL	800-100-EG
APS	Sigma- Aldrich	7727-54-0
N,N,N',N'- tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)	Sigma- Aldrich	T9281-25ML
Etilen glikol	EMPLURA	1002642500
Glisin	BIOBASIC	56-40-6
Sodyum klorür	ISOLAB- 1KG	7647-14-5
Ditiyotreitol (DTT)	GOLDBIO	27565-41-9, 3483-12-3
İyodoasetamid	BIOBASIC	144-48-9
Amonyum bikarbonat	BIOBASIC	1066-33-7
Formik asit	Merck EMSURE	
Trypsin-ultra™, mass spectrometry grade	NEB-UK	P8101S
Dulbecco’s PBS (1X)	Capricorn	PBS-1A
FBS	Diagnovum	D154-100ml
Penisilin-streptomisin	Sigma Aldrich	P4333-100ml

Tablo 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, markası ve katalog numarası (devamı)

Dimetil sülfoksit	Honeywell	41640-1l
Triton- X100	Biobasic	9002-93-1
NP-40	BIO BASIC	9016-45-9
Etanol absolute	Isolab	920.026.2500-2.5
Metanol	Honeywell	24229-2.5L
İzopropil alkol	Zag Kimya	Zs.100280.1000
DC protein analiz kiti 1	Bio-Rad	500-0005
Nuclease-Free water	Synthego	19DC0911
RPMI medium 1640	Gibco™	21875-091
MEBM	Lonza	Cc-3151
Hybri-Care, L-Glutamin ve HEPES	Hybri-Care	80923211
SMALP	Cube Biotech	18280
Trypsin- edta solution	Sigma Aldrich	T4049-100ml

Tablo 3.2 Kullanılan hücreler ve ATTC kodları

Hücre Hattı	**ATCC kodu**
MDA-MB-231	HTB-26™

Tablo 3.2 Kullanılan hücreler ve ATTC kodları (devamı)

BT-474	HTB-20 ™
AU-565	CRL-2351 ™
T-47D	HTB-133 ™
MCF-10A	CRL-10317 ™

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre Kültürü

Proje kapsamında kullanılan meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231, AU-565, BT-474, T-47D ve sağlıklı meme hücre hattı MCF-10A'dır (Tablo 3.2). Deneylerde kullanmak üzere %10 Fetal Sığır Serumu (FBS) ve %1 Penisilin Streptomisin (PS) içeren "Roswell Park Memorial Institute-1640" (RPMI-1640) besiyeri MDA-MB-231 ve AU-565 hücre hatları için kullanılmıştır. RPMI-1640 besiyerini %10 FBS, %1 PS ve 1mg/mL insülin içeriği ile T-47D hücre hattı için kullanılmıştır. Sağlıklı meme ühcre hattı olan MCF-10A'yı kültürleme için "Mammary Epithelial Basal Medium" (MEBM) besiyeri, %2 FBS, 5 ng/mL Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), 0,5 µg/mL hidrokortizon, insülin ve 50 µg/mL sığır hipofiz özü ile zenginleştirilerek kullanılmıştır. Hybri-Care besiyeri BT-474 hücre hattı için kullanılmıştır.

Her hücre hattı için hazırlanmış olan besiyerlerinden 3 mL 25 cm^2 (T25) flaska eklenerek 37°C'de %5 CO_2'li inkübatör ortamında besiyerinin sıcaklığa dayalı pH dengesi sağlanmıştır. Donmuş hücreleri T25 flaska ekmek için öncellikle oda sıcaklığında %80'lik hacmi çözülene kadar tutulmuştur. Çözülen hücrelerin iki katı hacmi kadar besiyeri eklenerek hücreleri dimetil sülfoksit (DMSO) toksisitesinden uzaklaştırmak için 1500 rpm hızda 5 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatan kısmı atılmıştır. Elde edilen hücre pelleti 1 mL besiyeri ile yeniden çözdürülerek T25

flaska pipetaj yapılarak ekilmiştir. Tutunma özelliğine sahip olan meme kanseri hücre hatları 37°C'de %5 CO_2'li ortamda bir gün boyunca kültür edilmiştir.

Hücre hatları %80-90 yoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır. İlk olarak, ortamdaki besiyeri uzaklaştırılıp ölü hücre ve kalıntılarından kurtulmak için PBS ile T25 flask yıkanmıştır. Tutunan hücreleri yüzeyden kaldırmak için 500 µL tripsin eklenmiştir ve 3 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Tripsin aktivitesini durdurmak için 3 mL besiyeri eklenerek yüzen hücreler toplanmış ve 15 mL'lik steril falkona aktarılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatan ortamdan uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1:4 oranında seyreltilerek 10 mL yeni besiyeri ile T75 flaska homojen şekilde ekilmiştir. Ekilen hücre hatları 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde %80-90 yoğunluğa ulaşıncaya dek kültür edilmiştir. Meme kanseri hücre hatlarının normal metabolik faaliyetlerine ulaşabilmesi için en az 1 hafta kültür edildikten sonra hücre hatları 10 cm^2 petri kabına ekilmiştir.

3.2.2 Protein İzolasyonu

3.2.2.1 Tuz ile Protein İzolasyonu

Petri kabında %85-90 alansal yoğunluğa ulaşan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231, RIPA tamponu kullanılarak homojenleştirilmiştir ve hücreler petri kabından hücre sıyırıcı ile kazınmıştır. MDA-MB-231 hücre hattı kazındıktan sonra sonikasyon ile parçalanmıştır. Sonikasyon sonrasında hücreler 5 dakika boyunca 13.000×g hızında santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatana lizis tamponu (50 mM tris-HCl (pH: 7,4), 5mM $MgCl_2$, 250 mM sükroz, proteaz inhibitör ve PMSF) eklenmiştir. Her adımda 15 dakika 800×g ve 6.000×g'de santrifüjle devam edilmiştir ve süpernatanlar kullanılmıştır. Ultrasantrifüj ile sabit açılı rotor kullanılarak 100.000×g'de süpernatan santrifüj edilmiştir. Çözünen ve çözünmeyen proteinler ayrıştırılmıştır. Ultrasantrifüj sonrası pellete, hazırlanan süspansiyon tamponu (Fosfat tampon salin solüsyon çözeltisi (PBS), n-oktil-β-D-glukopiranozid ve proteaz inhibitörü) eklenmiştir. Yeniden süspansiyon sonrasında, çözelti 22.000×g'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanda proteinlerin derişimleri DC protein analizi ile hesaplanıp %12 SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Yürütülen jel, Coomassie mavisi ile boyanıp ChemiDoc ile görüntülenmiştir.

3.2.2.2 Ultrasantrifüj ile Protein İzolasyonu

Petri kabında %85-90 alansal yoğunluğa ulaşan MDA-MB-231 hücre hattı önce 1 mL PBS ile yıkanıp kazınmıştır. Hücreler toplandıktan sonra 4°C, 400×g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatan ortamdan uzaklaştırılmış ve pellet Homojenizasyon tampon A (HBA) çözeltisi (3 mM imidazol, 1 mM EDTA, proteaz inhibitörü, pH 7,4) ile tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Ardından, 4°C'de 10 dakika 200×g'de bir kez daha santrifüj edilmiştir. Pellet HBA ile yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon haline getirilen pellet, 20 dakika buz ile muamele edilmiştir ve Homojenizasyon tampon B (HBB) çözeltisi (500 mM sükroz, 3 mM imidazol, 1 mM EDTA, proteaz inhibitörü, pH 7,4) eklenmiştir. Hücrelerin homojenizasyonu, hücrelerin 21G iğne uçlu bir şırıngadan sertçe geçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Homojenizasyon tampon (HB) (250 mM sükroz, 3 mM imidazol, 1 mM EDTA, proteaz inhibitörü, pH 7,4) eklenerek 4°C'de 10 dakika 1600×g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatan'dan (PNS) integral ve periferik membran proteinlerini ayırmak için ultrasantrifüj gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, HBA-HBB-HB çözeltisi karışımındaki PNS, 25°C'de bir saat sabit açılı rotor ile 100.000×g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pellet HBA-HBB-HB çözeltisi ile yeniden süspansiyon haline getirilmiştir ve 15 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Ardından, tekrar 25°C'de bir saat sabit açılı rotor ile 100.000×g'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, 1:3 oranında 1 M Na_2CO_3:2 M Na_2CO_3 çözeltileri ile yeniden süspansiyon haline getirilmiştir ve 25°C'de 10 dakika 230.000×g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pellet HBA-HBB-HB çözeltisi ile yeniden süspansiyon haline getirilmiştir ve 15 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra protein karışımı, TX-100 içeren HB çözeltisi ile 25°C'de 10 dakika 230.000×g'de bir kez daha santrifüj edilmiştir. Elde edilen proteinlerin derişimleri DC protein analizi ile hesaplanıp %12 SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Yürütülen jel, Coomassie mavisi ile boyanıp ChemiDoc ile görüntülenmiştir.

3.2.2.3 Deterjan ile Protein İzolasyonu

Deterjan ile protein ekstraksiyonu gerçekleştirmek için TX-100 ve NP-40 kullanılmıştır. İlk olarak MDA-MB-231 hücre hattı NP-40 ve TX-100 deterjanları ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon şu şekilde gerçekleştirilmiştir; %0,1 NP-40 veya TX-100 içeren Tampon A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 ve proteaz

inhibitörü) çözeltisi ile hücreler kazındıktan sonra 21G iğne uçlu bir şırıngayla ve yoğun titreşimle homojenize edilmiştir. Hücreler 1 dakika 200×g'de 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatan bir sonraki adım için saklanmıştır. Pellet, %0,1 NP-40 veya Tx-100 içeren Tampon A ile yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon titreşimle homojenize edilmiştir ve 1 dakika 200×g'de 4°C'de santrifüj edilmiştir. Saklanan süpernatan, yeni süpernatan ile karıştırılmıştır ve 10 dakika 750×g'de 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatan (S1) saklanmıştır ve pellet, %0,1 NP-40 veya TX-100 içeren Tampon A ile yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon tekrar titreşimle homojenize edilmiştir ve 10 dakika 750×g'de 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatan (S2) daha sonraki analizler için saklanmıştır ve pellet, %1 NP-40 veya TX-100 içeren Tampon A ile yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon, karıştırılarak buz üzerinde 1 saat muamele edilmiştir ve ardından 4°C'de 20 dakika 12.000×g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatan (S3), çözünür proteinleri içermektedir ve pellet, çözünmeyen proteinleri içermektedir. Elde edilen proteinlerin miktar tayini yapılıp %12 SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Yürütülen jel Coomassie mavisi ile boyanıp ChemiDoc ile görüntülenmiştir.

3.2.2.4 SMALP ile Protein İzolasyonu

MDA-MB-231 hücre hattı proteinlerinin ekstraksiyonu için %1 ve %1,5'lik SMALP çözeltileri hazırlanmıştır. 25 mg SMA-140, 4 mM EGTA (pH: 7,4) ve 4 mM magnezyum asetat (pH: 7,4) çözeltileri ile süspanse edilmiştir. SMALP çözeltisi, Tablo 3.3'te gösterildiği gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan 1 mL SMALP çözeltisi ile hücreler hücre sıyırıcı ile kazınmıştır. Kazınmış hücreler, santrifüj tüpüne toplanarak 4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında proteinler parafin yağı ile 13 mL'e tamamlanarak 4°C'de 1 saat sabit açılı rotorla 100.000×g'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı, çözünür proteinleri, pellet ise çözünmeyen proteinleri içermektedir. Pellet, 1 mL PBS içinde çözülüp -80°C'de saklanmıştır. %1 ve %1,5'lik SMALP çözeltileri ile elde edilen proteinlerin miktar tayinleri yapılmıştır ve %1 SMALP çözeltisi protein izolasyonu için optimize yöntem olarak belirlenmiştir.

Bu yöntem, diğer meme kanseri hücre hatları ve sağlıklı meme hücre hattı olan MCF-10A için kullanılmıştır. Tezin devam eden aşamalarında hücre hatlarının zar proteinleri %1 SMALP ile homojenize edilip ultrasantrifüj ile ayrıştırılmıştır. Elde

edilen proteinlerin derişimleri DC protein analizi ile hesaplanıp %12 SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Yürütülen jel Coomassie mavisi ile boyanıp ChemiDoc ile görüntülenmiştir.

Tablo 3.3 SMALP hazırlama koşulları.

İçerik	**%1 SMALP**	**%1,5 SMALP**
10% SMALP-140	100 µL	150 µL
Ultra Saf Su	390 µL	340 µL
Proteaz inhibitör	10 µL	10 µL
4 mM Magnezyum Asetat (pH 7,4)	250 µL	250 µL
4 mM EGTA (pH 7,4)	250 µL	250 µL
Toplam	1 mL	1 mL

3.2.3 DC Protein Tayini ve SDS Jel Görüntüleme

Elde edilen bütün proteinlerin derişimleri Bio-Rad deterjan uyumlu (DC) protein tayini kiti ile hesaplanmıştır. İlk olarak kit içerisinde yer alan 1,37 mg/mL γ-globulin protein standartı kullanılarak 1, 0,75, 0,5, 0,25 ve 0 mg/mL olmak üzre nükleaz içermeyen su ile protein standartları hazırlanmıştır. Her protein örneğinden ve protein standartlarından 5 µL 96 kuyucuklu plakaya 3 tekrarlı yüklenmiştir. Yüklenen proteinlerin üzerine sırasıyla 25 µL kit içerisinde yer alan Reaktif A ve 200 µL Reaktif B eklenmiştir. Protein tayini için hazırlanmış olan 96 kuyucuklu plaka karanlıkta oda ısısında 15 dakika muamele edildikten sonra Multimod Mikroplaka Okuyucu ile 750 nm dalga boyunda okunmuştur. Hazırlanan standartlarla standart eğrisi denklemi oluşturulmuş ve denklem referans alınarak elde edilen proteinlerin derişim tayini gerçekleştirilmiştir.

Protein izolasyonu için kullanılan bütün yöntemlerden sonra derişimleri tayin edilen proteinler %12 SDS-PAGE jele yüklenmiştir. Bu sebeple, %12 SDS-PAGE jel hazırlamak için %12 ayırma jeli ve %5 istifleme jeli hazırlanmıştır (Tablo 3.4). Hazırlanan jeller polimerleştikten sonra 95°C'de 5 dk muamele edilen 15 µL protein ve 5 µL (4X) Laemmlie Tampon çözeltisi her bir kuyuya pipetaj yapılarak yüklenmiştir. Her jel için referans olarak abm Opti-Protein Ultra Marker protein işaretçisi kullanılmıştır. Yüklenen SDS-PAGE jel 1X yürütme tampon çözeltisi (0,25 M Tris-Base, 144 gram glisin, 10 gram SDS, pH 8,5, 1L) 1 saat 100 Volt ile muamele edildikten sonra 120 Volt ile 2 saat proteinler yürütülmüştür.

Protein bantlarını görüntülemek için jeller Coomassie mavisi ile boyanmıştır. Coomassie mavisi hazırlamak için 3,5 mg Coomassie mavisi tartılıp 4 saat manyetik karıştırıcıda 50 mL su ile karıştırılmıştır. Ardından 150 µL saf HCl eklenerek 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Boyama protokolü ise şu şekildedir, iki cam arasından sıyrılan protein yürütülmüş SDS-PAGE jel 3 kere 5'er dakika çalkalayıcıda muamele edilmiş aynı zamanda 100 mL saf suda 10'ar saniye 450 Watt mikrodalgada ısıtılmıştır. Jel yüzeyini kaplayacak kadar hazırlanan Coomassie mavisi ile 30 saniye 450 Watt mikrodalgada ısıtılmıştır ve protein bantları gözlemlenene kadar çalkalayıcıda Coomassie mavisi ile muamele edilmiştir. Protein bantları gözlemlendiğinde jel bol su ile yıkanarak boyasından arındırılmıştır ve jel görüntülemesi yapılmıştır.

Tablo 3.4 SDS-PAGE jel hazırlama çözeltileri

Çözeltiler	**%12 Yürütme Jeli**	**%5 Ayırma Jeli**
%30 akrilamid	2 mL	330 µL
4X Tris-HCl	1.25 mL (pH 8.8)	250 µL (pH 6.8)
%10 SDS	50 µL	20 µL
%10 APS	50 µL	20 µL

Tablo 3.4 SDS-PAGE jel hazırlama çözeltileri (devamı)

TEMED	2 µL	2 µL
dH_2O	1.648 mL	2 mL

3.2.4 Afinite Kromatografisi

Meme kanseri hücre hatlarından ve sağlıklı meme hücre hattından %1 SMALP ile elde edilen proteinler p18-4 ve rastgele peptiti dizisi (AEXWVPY) ile konjuge edilmiş resinler aracılığıyla afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. p18-4 veya rastgele peptiti dizisi ile konjuge edilmiş resin ve %1 SMALP ile elde edilmiş proteinlerle karıştırılıp 4°C'de gece boyu çalkalanarak muamele edilmiştir. Afinite kromatografisi kolonu, yer çekiminden yararlanarak resin ile paketlenmiştir. Paketlenen kolondan hedef proteinlerin eldesi için öncelikle kolon 4 mM EGTA (pH: 7,4) ve 4 mM magnezyum asetat (pH: 7,4) içeren tampon çözeltisi ile yoğun miktarda yıkama yapıldıktan sonra yarışımlı ayrıştırma için hazırlanan 1 mM p18-4 (%20 etilen glikol ve PBS içerir) ile protein saflaştırması gerçekleştirilmiştir.

Kolon içerisinde arta kalan ve resinden kopamamış proteinleri yıkayıp kolonu tekrar kullanılabilir hâle getirebilmek için asidik (0,1 M glisin, pH 3,5) ve bazik (150 mM NaCl ve 0.5 N Na_2CO_3, pH: 11) tampon çözeltileri ile yıkama yapılmıştır. İlk olarak 5 mL asidik tampon çözeltisi kolondan geçirildikten sonra 5 mL bazik tampon çözeltisi kolondan geçirilmiştir. Elde edilen bütün proteinlerin miktar tayinleri yapılmış, %12 SDS-PAGE'de yürütülmüş ve jel Coomassie mavisi ile boyanarak ChemiDoc ile görüntülenmiştir.

3.2.5 LC-MS

3.2.5.1 Protein Sindirimi

Afinite kromatografi sonrası elde edilen proteinlerin bulunduğu tampon çözelti içeriğindeki kimyasal malzemeler protein sindirim aşamasında sorun oluşturacağından öncelikle proteinlerin bulunduğu tampon çözelti değiştirilmiştir. Bunun için, protein içeren çözelti hacminin 10 katı kadar aseton ve dietil eter ile 1 saat -20°C'de muamele edilemiş, 10 dakika 10.000×g'de santrifüj edilip

çöktürülmüştür. Süpernatan ortamdan uzaklaştırılıp elde edilen protein pelletinde arta kalan aseton ve dietil eter 20 dakika 30°C'de vakumlu santrifüjde ağzı açık şekilde uçurulmuştur. Elde edilen pellet, 100 mM amonyum bikarbonat (pH 8-8,5) ile yeniden çözülmüştür.

Proteinleri sindirmeden önce indirgemek için 10 mM ditiyotreitol (DTT) ile 60°C'de 1 saat muamele edilmiştir. Ardından, son derişimi 50 mM olacak şekilde iyodoasetamid ile 30 dakika karanlıkta oda ısısında muamele edilmiştir. Protein sindirimi için 1:40 oranında tripsin (1 µg/µL, 100 mM amonyum bikarbonat içerisinde) eklenerek gece boyu 37°C'de muamele edilmiştir. Protein sindirimini durdurmak için %1 formik asit eklenerek LC-MS analizi için numuneler hazır hâle getirilmiştir. Elde edilen peptitler, %12 SDS-PAGE'de yürütülmüş, jel Coomassie mavisi ile boyanıp ChemiDoc ile görüntülenmiştir.

3.2.5.2 LC-MS

Kocaeli Üniversitesi bünyesinde bulunan Proteomik Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılmıştır. Triptik kesim sonrası elde edilen peptit örneklerinin konsantrasyonları Qubit assay yardımıyla belirlenmiştir. Peptit örnekleri 250 ng/µL olacak şekilde seyreltilip her bir okuma için sisteme 500 ng örnek yüklenmiştir. Peptit örneklerinin ayrımı Ultimate 3000 RSLC nano sistemi (Dionex, Thermo Scientific, CA, ABD) kullanılarak C18 tabanlı trap ve analitik kolonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler sırasında tüm cihaz ve sistemler Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) kullanılarak kontrol edilmiştir. Peptitlerin kromatografik iki farklı mobil faz yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Mobil faz A (%0.1 Formik asit) ve mobil faz B (%80 Asetonitril + %0.1 Formik Asit). Peptitlerin ayrım işleminde örnekler C18 tabanlı tuzak kolonu yardımıyla konsantre edilip ve kirlilikler uzaklaştırılmıştır. İleri kromatografik ayrılma işlemi için örnekler Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolona (75 um x 25 cm x 2 um, 100 Â çap, Thermo Scientific, CA, ABD) aktarılmıştır. Bu ayrım için kullanılan mobil faz gradyanı; ilk 3 dakika için %5 B, 37 dakika için %5-42 B, 3 dakika için %42-95 B, 5 dakika için %95 B, 3 dakika için %95-5, 5 dakika için %5 B olacak şekilde 60 dakikalık toplam çalışma süresinde 300 nL/dakika akış hızıyla gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kütle spektrumları eldesinde aşağıdaki parametrelerle kullanılmıştır: çözünürlük 70.000, tarama aralığı 250-2000 m/z,

otomatik kazanç kontrolü (AGC) 3×E6, MS için belirlenen maksimum enjeksiyon aralığı 60 ms. MS/MS analizleri için ise en yüksek on iyonunun analizi gerçekleştirilmiştir. Çarpışma sonrası oluşan (yüksek enerjili çarpışmalı ayrışma (higher-energy collisional dissociation- HCD)) MS/MS kütlerinin analizde ise; çözünürlük 17.500, AGC 1E6; sistem maksimum enjeksiyon süresi 100 ms, izolasyon penceresi 2.0 m/z ve çarpışma enerjisi (NCE) 27 olacak şekilde parametreler belirlenmiştir. Her analizden önce standart bir pozitif kalibratör ile (LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution, Pierce, ABD) cihazın kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.3 Veri Analizi

Yapılan nLC-MS/MS çalışması sonucu elde edilen verilerin analizi için ham spektrum dataları Proteom Discoverer 2.2 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Analizlerde insan proteom databankası kullanılmıştır (UP000005640). Bu işlem sırasında peptitlerin belirlenmesi için kullanılan kütle toleransı 4 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.3 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sabit peptit modifikasyonu olarak sistein karbamidometilasyonu, değişken modifikasyon için ise metionin oksidasyonu ve asparajin deaminasyonu kullanılmıştır. Belirlenen proteinlerin seçimi için tanımlanan özgün peptit sayısı minimum 1 olarak alınmıştır.

4

SONUÇ

4.1 Protein İzolasyonu

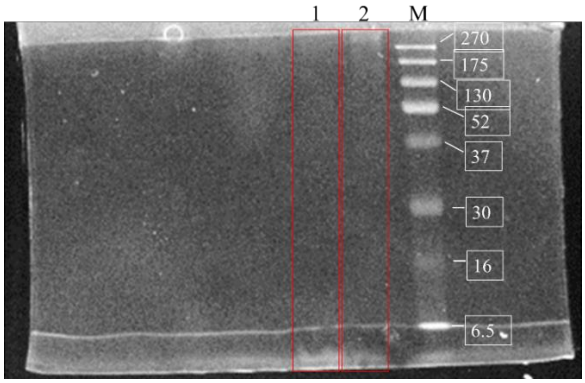
Meme kanseri hücre hatlarından zar proteinlerini izole etmek için farklı yöntemler denemiştir. Elde edilen proteinin verimini değerlendirmek amacıyla denenmiş olan bütün yöntemler sadece MDA-MB-231 ÜNMK hücre hattı ile gerçekleştirilmiştir. Bu sayede en verimli yöntem tayin edilmiştir.

4.1.1 Tuz ile Protein İzolasyonu

Denenmiş olan ilk yöntem tuz ile protein izolasyonudur. Santrifüjleme için artan hızlar uygulanarak farklı boyutlardaki proteinler ayrıştırılmıştır. Sonuç olarak, çözünen ve çözünmeyen proteinlerin ayrılması hedeflenmiştir. Elde edilen proteinlerin derişimlerinin tayini sonucunda 168,98 µg/mL çözünen protein elde edilmiştir fakat çözünmeyen proteinlerin derişimleri tayin edilememiştir (Tablo 4.1). Elde edilen proteinler verim düşüklüğü sebebiyle %12 SDS-PAGE jelde görüntülenememiştir (Şekil 4.1).

Tablo 4.1 Tuz ile çöktürme yöntemiyle elde edilen proteinlerin derişimleri.

Örnek Adı	Derişim (µg/mL)
Çözünen proteinler	168,98 ± 10,71
Çözünmeyen proteinler	Belirlenememiştir



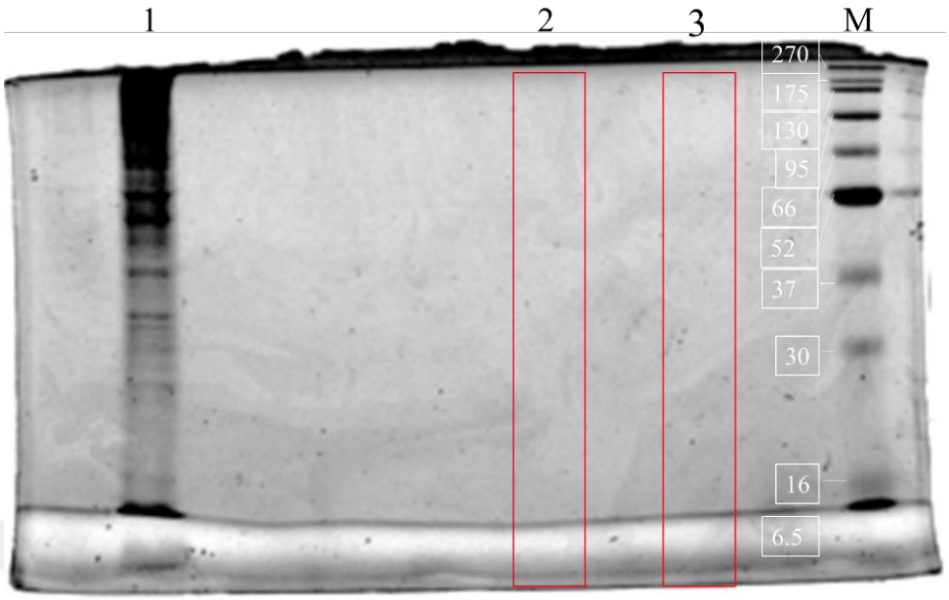
Şekil 4.1 Tuz ile çöktürme yöntemiyle elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonucu. (1) Çözünemeyen proteinler, (2) Çözünen proteinler, (M) Marker.

4.1.2 Ultrasantrifüj ile Protein İzolasyonu

Tuz ile çöktürerek elde edilen MDA-MB-231 hücre hattı proteinlerinin derişimleri çok düşük olduğu için ultrasantrifüj ile protein ekstraksiyonu denenmiştir. Ayrıca, tuz ile elde edilen proteinler hem sitoplazmik hem de zar proteinlerini içermektedir. Özellikle zar proteinlerini izole etmek için ultrasantrifüj yöntemi denenmiştir. Bu yöntem sayesinde hedef proteinler olan zar proteinlerinin daha yüksek derişimlerde izole edilmesi beklenmektedir. Fakat elde edilen integral ve periferal proteinlerin derişimleri tayin edilememiştir. SDS-PAGE jele yüklenen proteinlerde ise bant gözlemlenmemiştir (Şekil 4.2). Sadece pellet içerisindeki proteinler SDS-PAGE jel üzerinde gözlemlenmiştir.

Tablo 4.2 Ultrasantrifüj yöntemiyle elde edilen proteinlerin derişimleri.

Örnek Adı	**Derişim (µg/mL)**
İntegral protein	Belirlenememiştir
Periferal protein	Belirlenememiştir
Pellet	42,65 ± 616,68



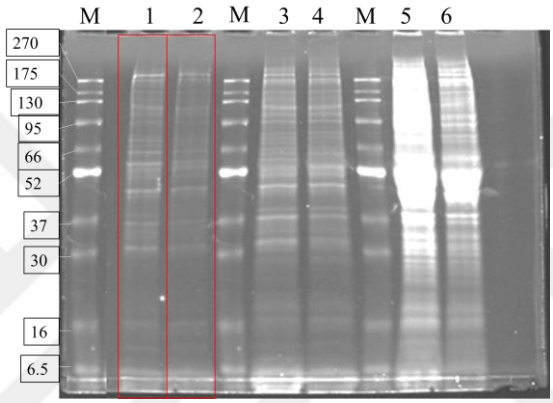
Şekil 4.2 Ultrasantrifüj yöntemi ile elde edilen zar proteinlerin SDS-PAGE sonucu. (1) Pellet, (2) Periferal proteinler, (3) İntegral proteinler, (M) Marker.

4.1.3 Deterjan ile Protein İzolasyonu

Denenmiş olan her iki protokolde de elde edilen proteinlerin derişimlerinin cihazlarda tanımlanamayacak derecede düşük olması sebebiyle membran proteinlerinin çözünürlüğünü ve saflığını arttırmak için deterjan ile protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Membran proteinlerine uygun deterjanı bulmak için NP-40 ve TX-100 olmak üzre 2 farklı deterjan ile aynı protokol tekrar edilmiştir. İzole edilen proteinlerin derişimleri protein tayini ile belirlenmiştir (Tablo 4.3). NP-40 deterjanı ile elde edilen proteinlerin derişimi 429,70 µg/mL, TX-100 deterjanı ile elde edilen proteinlerin derişimi 164,84 µg/mL bulunmuştur. Protein tayini ile belirlenen derişim farkı SDS-PAGE jelde de gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). NP-40 ile izole edilen proteinlerin bant sayısı ve bantların yoğunluğunun TX-100 ile elde edilen proteinlerden daha fazla olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.3 Deterjan ile protein izolasyonu yöntemiyle elde edilen proteinlerin derişimleri.

Örnek Adı	Derişim (µg/mL)
NP-40 ile izole edilen membran proteinleri (S3)	429,70 ± 29,69
TX-100 ile izole edilen membran proteinleri (S3)	164,84 ± 9,76



Şekil 4.3 Deterjan ile protein izolasyonu yöntemi ile elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonucu. (1) NP-40 ile elde edilen zar proteinleri (S3), (2) TX-100 ile elde edilen zar proteinleri (S3), (3) NP-40 ile elde edilen proteinler (S2), (4) TX-100 ile elde edilen proteinler (S2), (5) NP-40 ile elde edilen proteinler (S1), (6) TX-100 ile elde edilen proteinler (S1), (M) Marker.

4.1.4 SMALP ile Protein İzolasyonu

Deterjan ve diğer yöntemler ile elde edilen protein derişimlerinin afinite kromatografisi için yeterli olmayacağı düşünülmüştür ve SMALP ile protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda kullanılan SMALP ile elde edilen MDA-MB-231 hücre hattının proteinlerinin derişimi 861,73 ve 859,67 µg/mL'dir (Tablo 4.4). Devam eden deneylerde %1 SMA kullanılmıştır.

Tablo 4.4 SMALP ile protein izolasyonu yöntemiyle elde edilen MDA-MB-231 hücre hattının proteinlerinin derişimleri.

Örnek Adı	**Derişim (µg/mL)**
%1 SMA ile izole edilen zar proteinleri	861,73 ± 3,56
%1,5 SMA ile izole edilen zar proteinleri	859,67 ± 70,20

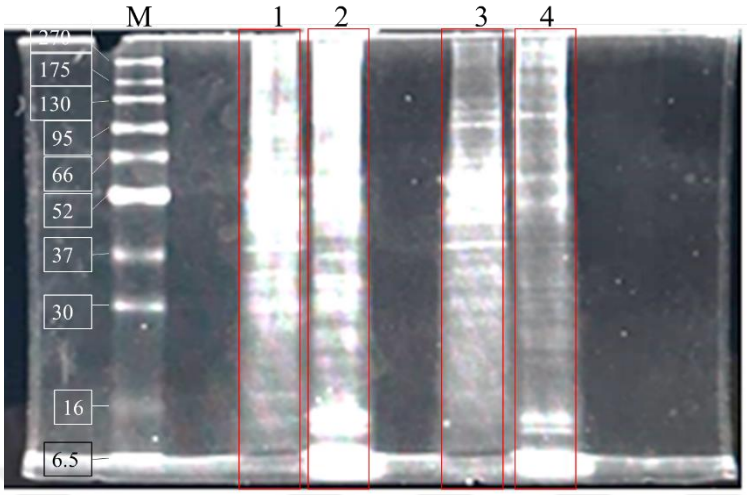
%1 SMALP çözeltisi ile BT-474, AU-565, T-47D, MDA-MB-231, ve MCF-10A hücre hatlarından elde edilen proteinlerin miktar tayinleri yapılmıştır (Tablo 4.5). Elde edilen proteinleri derişimleri sırasıyla 746,39, 762,95, 851,4, 861,73, 194,19 µg/mL'dir.

Tablo 4.5 %1 SMALP ile protein izolasyonu yöntemiyle elde edilen proteinlerin derişimleri

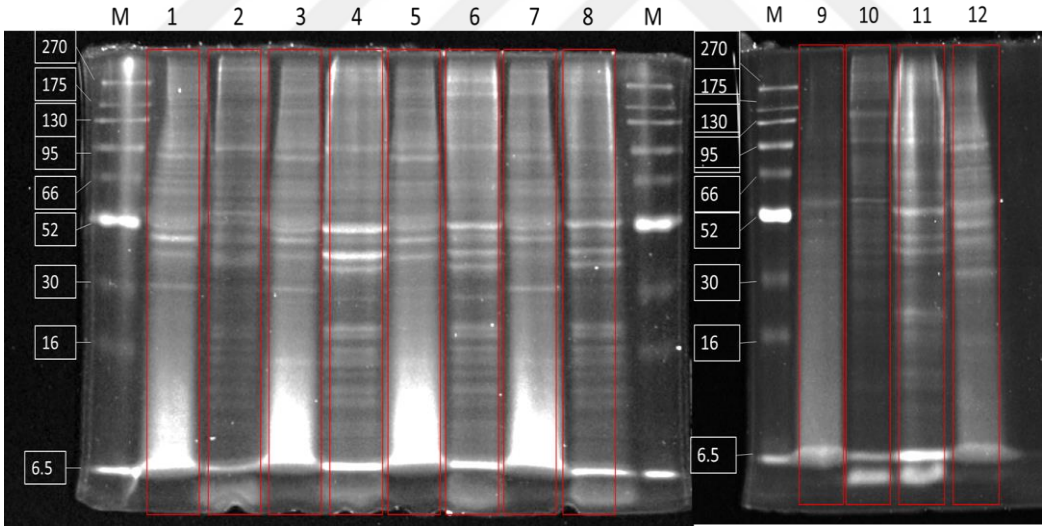
Örnek	**MDA-MB-231**	**AU-565**	**T-47D**	**BT-474**	**MCF-10A**
%1 SMA zar proteinleri	861,73 ± 3,56	762,95 ± 50,48	851,40 ± 77,44	746,39 ± 3,17	194,19 ± 5,49
%1 SMA pellet	789,71 ± 40,48	1053,58 ± 539,35	1447,81 ± 393,36	2468,82 ± 1168,45	254,53± 280,30

Kullanılan SMALP derişimi, protein tayini ve SDS-PAGE ile optimize edilmiştir. %1 SMALP ile protein izolasyonunun daha verimli olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar SDS-PAGE jelde gözlemlenen protein bantlarının yoğunluğu ile desteklenmiştir (Şekil 4.4). Tüm meme kanseri moleküler alt tiplerine ait hücre

hatlarından elde edilen proteinler %12 SDS-PAGE'de yürütülmüştür ve izole edilen zar proteinlerinin bantları gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4 SMALP ile elde edilen MDA-MB-231 hücre hattının proteinlerinin SDS-PAGE görüntüleri. (1) %1 SMALP süpernatan, (2) %1 SMALP pellet, (3) %1,5 SMALP süpernatan, (4) %1,5 SMALP pellet, (M) Marker.



Şekil 4.5 SMALP ile elde edilen MDA-MB-231, MCF-7, T-47D ve AU-565, BT-474, MCF-10A hücre hatlarına ait proteinler. (1) MDA-MB-231 süpernatan, (2) MDA-MB-231 pellet, (3) MCF-7 süpernatan, (4) MCF-7 pellet, (5) T-47D süpernatan, (6) T-47D pellet, (7) AU-565 süpernatan, (8) AU-565 pellet, (9) MCF-10A süpernatan, (10) MCF-10A pellet, (11) BT-474 pellet, (12) BT-474 süpernatan, (M) Marker.

4.2 Afinite Kromatografisi

4.2.1 p18-4 ile Afinite Kromatografisi

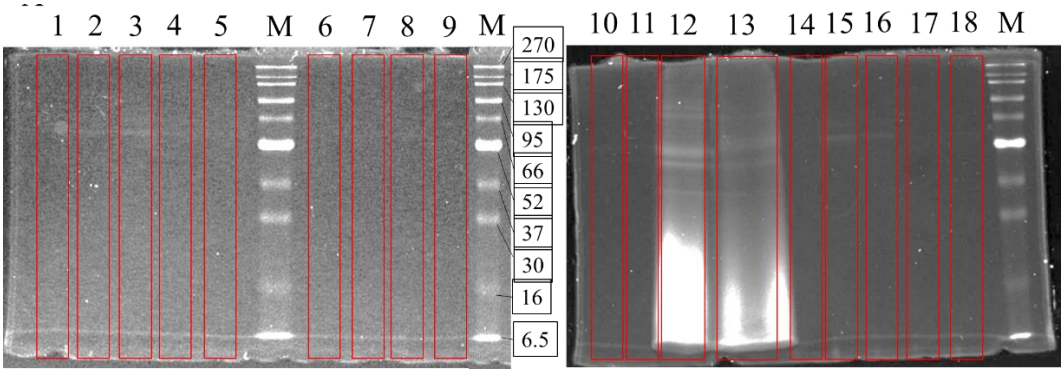
SMALP ile hücre hatlarından elde edilen proteinler ile p18-4 varlığında yarışımlı bir şekilde afinite kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Böylelikle, p18-4'e bağlanan proteinler saflaştırılmıştır. Kromatografiden elde edilen proteinlerin derişimleri Tablo 4.6'da verilmiştir. p18-4'e bağlanan proteinler ile bazik ve asidik elüsyonlardan elde edilen proteinler %12 SDS-PAGE jelde yürütülmüştür. MDA-MB-231, AU-565 ve T-47D hücre hatlarında 52-66 kDa arasında bant gözlemlenmiştir (Şekil 4.6, 4.7, 4.8). Asidik ve bazik yıkamalar ise özgül olmayan bağlantıları içerdiğinden jelde sürüntü bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10). BT-474 ve MCF-10A hücre hatlarında afinite kromatografisi sonucu elde edilen proteinlerde 52-66 kDa arasında herhangi bir bant gözlenmemiştir (Şekil 4.9, 4.10). Fakat asidik ve bazik yıkamalar ile elde edilen proteinlerde jel üzerinde sürüntü bantlar olarak gözlemlenmiştir.

Tablo 4.6 Afinite kromatografisinden elde edilen proteinlerin elüsyonlarının derişimleri

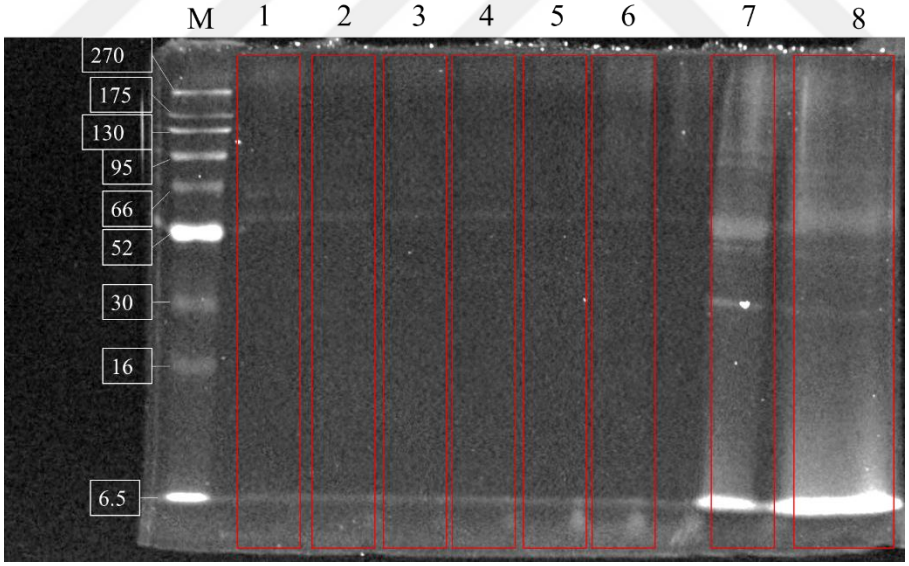
	Derişim (µg/mL)				
	MDA-MB-231	**AU-565**	**T-47D**	**BT-474**	**MCF-10A**
Yıkama	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	6,82 ± 6,40
p18-4 Elüsyon 1	**2,06 ± 10,70**	Belirlenememiştir	**77,52 ± 15,82**	**109,54 ± 15,52**	**53,74 ± 10**
p18-4 Elüsyon 2	**706,20 ± 65,37**	**602,36 ± 33,00**	**722,82 ± 38,23**	**1003,36 ± 45,75**	**908,94 ± 38**
p18-4 Elüsyon 3	**545,60 ± 86,47**	**828,04 ± 31,70**	**274,46 ± 23,80**	**1131,05 ± 67,32**	**1062,49 ± 99**
p18-4 Elüsyon 4	Belirlenememiştir	**67,11 ± 11,98**	**12,57 ± 6,29**	**161,07 ± 30,30**	**100,66 ± 4**
p18-4 Elüsyon 5	Belirlenememiştir	**7,19 ± 5,99**	Belirlenememiştir	**26,66 ± 13,99**	**47,34 ± 7**
p18-4 Elüsyon 6	Belirlenememiştir	**17,18 ± 43,34**	Belirlenememiştir	**6,50 ± 3,88**	**43,08 ± 7**
p18-4 Elüsyon 7	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	**8,74 ± 10,27**	**32,42 ± 13**

Tablo 4.6 Afinite kromatografisinden elde edilen proteinlerin elüsyonlarının derişimleri (devamı)

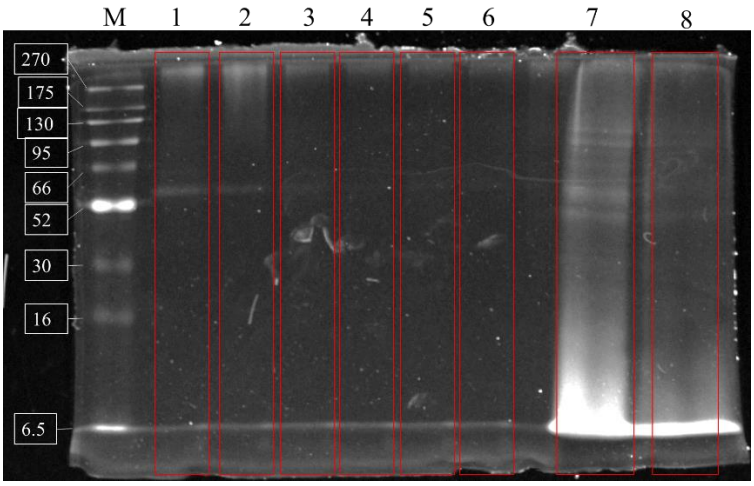
p18-4 Elüsyon 8	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	**4,26 ± 6,72**	**21,75 ± 10**
p18-4 Elüsyon 9	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	**4,26 ± 6,72**	**19,62 ± 6**
p18-4 Elüsyon 10	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	**4,26 ± 6,72**	**21,75 ± 13**
Asidik Yıkama 1	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	**4,26 ± 13,44**	**30,28 ± 10**
Asidik Yıkama 2	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	**11,09 ± 4**
Asidik Yıkama 3	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir		**17,49 ± 7**
Bazik Yıkama 1	**166,77 ± 45,53**	**248,85 ± 79,11**	**94,28 ± 6,29**	**149,87 ± 21,60**	**49,48 ± 10**
Bazik Yıkama 2	**8,24 ± 10,70**	**428,60 ± 224,93**	Belirlenememiştir	**93,86 ± 27,16**	**36,68 ± 30**
Bazik Yıkama 3		Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Bazik Yıkama 4		Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir



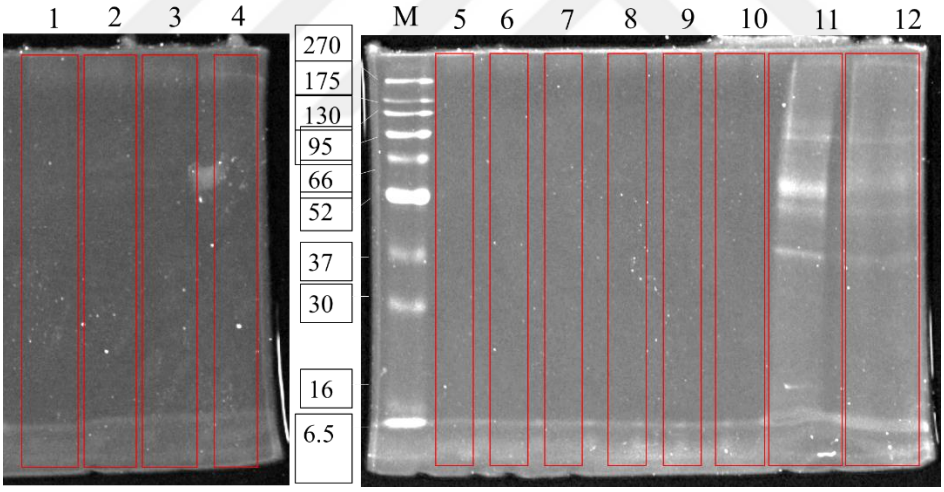
Şekil 4.6 Afinite kromatografisinden elde edilen MDA-MB-231 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. (A), (1) Yıkama, (2) p18-4 elüsyon1, (3) p18-4 elüsyon2, (4) p18-4 elüsyon3, (5) p18-4 elüsyon4, (6) p18-4 elüsyon5, (7) p18-4 elüsyon6, (8) p18-4 elüsyon7, (9) p18-4 elüsyon8. (B), (10) p18-4 elüsyon9, (11) p18-4 elüsyon10, (12) Bazik elüsyon1, (13) Bazik elüsyon2, (14) Asidik elüsyon3, (15) p18-4 elüsyon2, (16) p18-4 elüsyon3, (17) Asidik elüsyon2, (18) Asidik elüsyon1, (M) Marker.



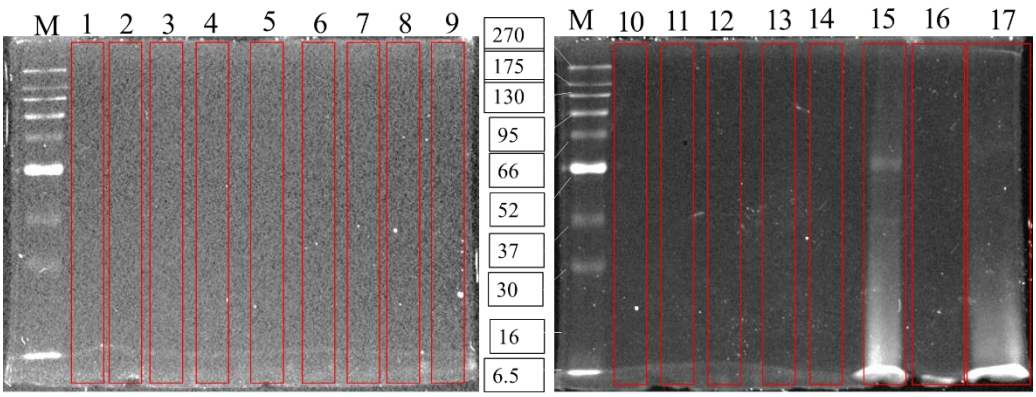
Şekil 4.7 Afinite kromatografisinden elde edilen AU-565 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. (1) p18-4 elüsyon2, (2) p18-4 elüsyon3, (3) p18-4 elüsyon4, (4) p18-4 elüsyon5, (5) p18-4 elüsyon6, (6) p18-4 elüsyon7, (7) Bazik elüsyon1, (8) Bazik elüsyon2, (M) Marker.



Şekil 4.8 Afinite kromatografisinden elde edilen T-47D hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. (1) p18-4 elüsyon1, (2) p18-4 elüsyon2, (3) p18-4 elüsyon3, (4) p18-4 elüsyon4, (5) p18-4 elüsyon5, (6) p18-4 elüsyon6, (7) Bazik elüsyon1, (8) Bazik elüsyon2, (M) Marker.



Şekil 4.9 Afinite kromatografisinden elde edilen BT-474 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. (1) p18-4 elüsyon1, (2) p18-4 elüsyon2, (3) p18-4 elüsyon3, (4) p18-4 elüsyon4, (5) p18-4 elüsyon5, (6) p18-4 elüsyon6, (7) p18-4 elüsyon7, (8) p18-4 elüsyon8, (9) p18-4 elüsyon9, (10) p18-4 elüsyon10, (11) Bazik elüsyon1, (12) Bazik elüsyon2, (M) Marker.



Şekil 4.10 Afinite kromatografisinden elde edilen MCF-10A hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. (1) yıkama, (2) p18-4 elüsyon1, (3) p18-4 elüsyon2, (4) p18-4 elüsyon3, (5) p18-4 elüsyon4, (6) p18-4 elüsyon5, (7) p18-4 elüsyon6, (8) p18-4 elüsyon7, (9) p18-4 elüsyon8, (10) p18-4 elüsyon9, (11) p18-4 elüsyon10, (12) Asidik elüsyon1, (13) Asidik elüsyon2, (14) Bazik elüsyon4, (15) Bazik elüsyon1, (16) Bazik elüsyon3, (17) Bazik elüsyon2, (M) Marker.

4.2.2 Rastgele Peptit Dizisi ile Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisinde p18-4 hedefine özgü bağlanmaların ayırt edilmesi amacıyla kontrol grubu olarak rastgele peptit dizisi (AEXWVPY) ile konjuge edilmiş resin kullanılarak afinite kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen proteinlerin derişimleri Tablo 4.7'de verilmiştir. Buna göre, MDA-MB-231 hücre hattında 30-95 kDa arasında 7 bant (Şekil 4.11), AU-565 hücre hattında 30-95 kDa arasında 4 bant (Şekil 4.12), T-47D hücre hattında 52-95 kDa arasında 4 bant (Şekil 4.13), BT-474 hücre hattında 52-95 kDa arasında 3 bant (Şekil 4.14), MCF-10A hücre hattında ise 52-66 kDa arasında tek bant gözlemlenmektedir (Şekil 4.15). Kromatografiden asidik ve bazik yıkamalar ile elde edilen proteinler SDS-PAGE jel üzerinde sürüntü bantlar olarak gözlemlenmiştir.

Tablo 4.7 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş resinle gerçekleştirilen afinite kromatografisinden elde edilen proteinlerin elüsyonlarının derişimleri

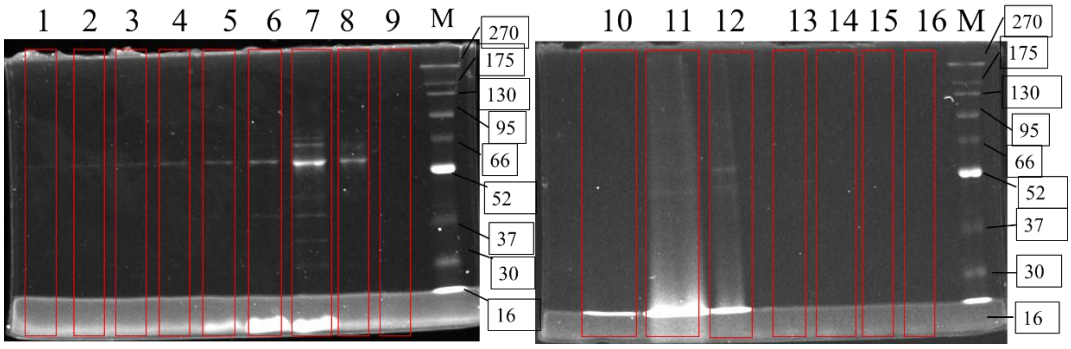
	Derişim (µg/mL)				
	MDA-MB-231	**AU-565**	**T-47D**	**BT-474**	**MCF-10A**
Yıkama 1	15,75 ± 8,62	Belirlenememiştir	0,4 ± 3,44	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Yıkama 2	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Yıkama 3	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Yıkama 4	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Yıkama 5	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
p18-4 Elüsyon 1	30,68 ± 4,98	**48,42 ± 4,94**	**42,09 ± 3,44**	Belirlenememiştir	**45,25 ± 22,39**
p18-4 Elüsyon 2	715,59 ± 28,29	**722,00 ± 32,90**	**752,83 ± 39,06**	**908,42 ± 52,21**	**913,60 ± 71,20**
p18-4 Elüsyon 3	753,73± 70,59	**698,95 ± 37,41**	**925,55 ± 54,59**	**930,70 ± 114,29**	**950,23 ± 0,00**

Tablo 4.7 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş resinle gerçekleştirilen afinite kromatografisinden elde edilen proteinlerin elüsyonlarının derişimleri (devamı)

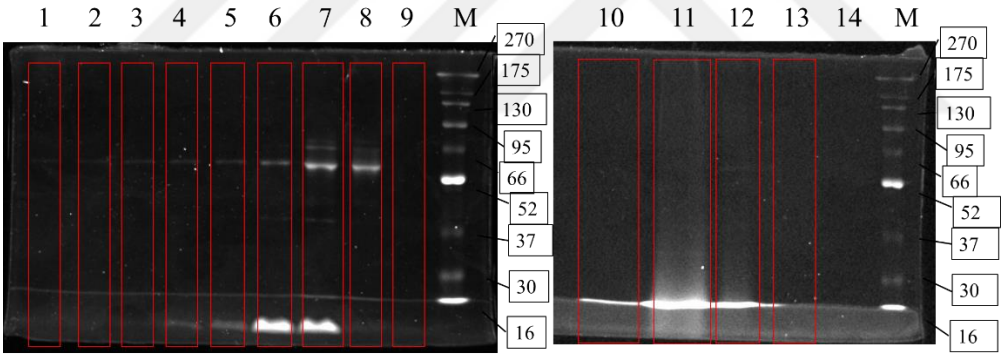
p18-4 Elüsyon 4	160,03 ± 13,16	**142,29 ± 22,64**	**190,99 ± 14,99**	**211,01 ± 27,02**	**148,67 ± 35,99**
p18-4 Elüsyon 5	48,92 ± 5,74	**63,24 ± 13,07**	**145,32 ± 92,84**	**86,23 ± 30,63**	**49,56 ± 26,12**
p18-4 Elüsyon 6	19,07 ± 7,60	**12,19 ± 7,55**	**75,84 ± 29,38**	**30,53 ± 10,21**	**8,62 ± 14,93**
p18-4 Elüsyon 7	10,78 ± 8,62	**3,95 ± 4,94**	**18,26 ± 6,88**	**8,24 ± 3,86**	Belirlenememiştir
p18-4 Elüsyon 8	7,46 ± 5,74	Belirlenememiştir	**6,35 ± 9,10**	**3,79 ± 10,21**	Belirlenememiştir
p18-4 Elüsyon 9	2,49 ± 10,36	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
p18-4 Elüsyon 10	2,49 ± 10,36	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Asidik yıkama 1	0,83 ± 9,95	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Asidik yıkama 2	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Asidik yıkama 3	Belirlenememiştir	**3,95 ± 8,56**	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir

Tablo 4.7 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş resinle gerçekleştirilen afinite kromatografisinden elde edilen proteinlerin elüsyonlarının derişimleri (devamı)

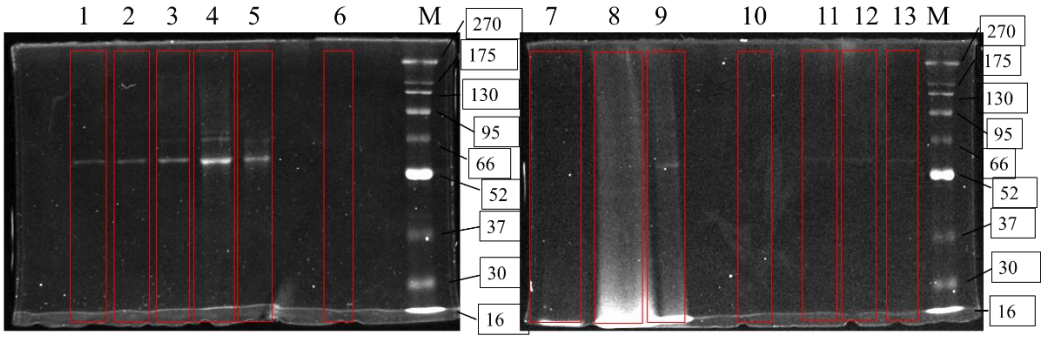
Asidik yıkama 4	20,73 ± 0,00	Belirlenememiştir	**6,35 ± 14,99**	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Asidik yıkama 5	7,46 ± 2,87	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Bazik yıkama 1	75,46 ± 4,98	**22,07 ± 7,55**	**91,72 ± 10,32**	-2,90 ± 7,72	**38,78 ± 6,46**
Bazik yıkama 2	296,02 ± 48,32	**153,82 ± 22,28**	**383,56 ± 21,47**	**338,01 ± 25,31**	**148,67 ± 12,93**
Bazik yıkama 3	12,44 ± 5,74	Belirlenememiştir	**4,37 ± 3,44**	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Bazik yıkama 4	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir
Bazik yıkama 5	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir	Belirlenememiştir



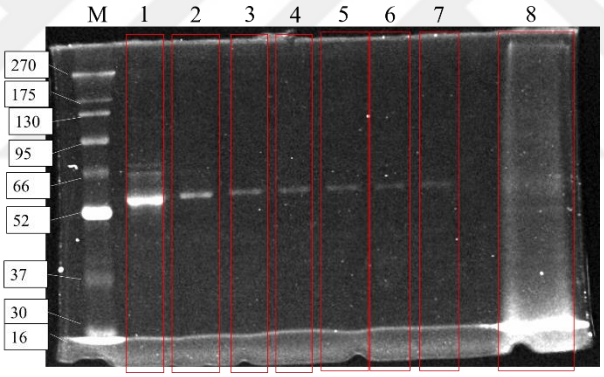
Şekil 4.11 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş afinite kromatografisinden elde edilen MDA-MB-231 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. (1) p18-4 elüsyon8, (2) p18-4 elüsyon7, (3) p18-4 elüsyon6, (4) p18-4 elüsyon5, (5) p18-4 elüsyon4, (6) p18-4 elüsyon3, (7) p18-4 elüsyon2, (8) p18-4 elüsyon1, (9) Yıkama1, (10) Bazik elüsyon3, (11) Bazik elüsyon2, (12) Bazik elüsyon1, (13) Asidik elüsyon4, (14) Asidik elüsyon1, (15) p18-4 elüsyon10, (16) p18-4 elüsyon9, (M) Marker.



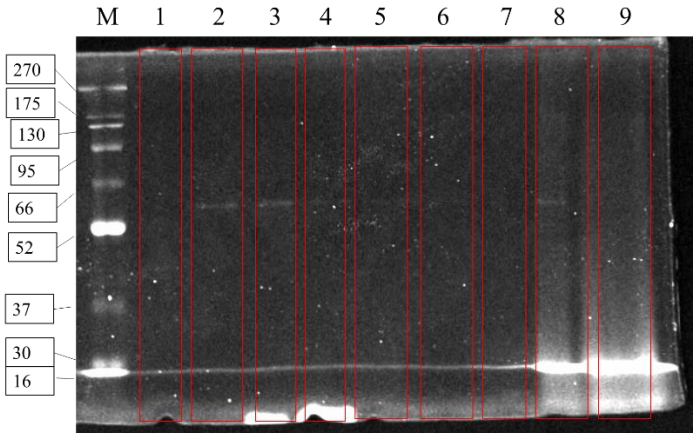
Şekil 4.12 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş afinite kromatografisinden elde edilen AU-565 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. (1) p18-4 elüsyon8, (2) p18-4 elüsyon7, (3) p18-4 elüsyon6, (4) p18-4 elüsyon5, (5) p18-4 elüsyon4, (6) p18-4 elüsyon3, (7) p18-4 elüsyon2, (8) p18-4 elüsyon1, (9) Yıkama1, (10) Bazik elüsyon3, (11) Bazik elüsyon2, (12) Bazik elüsyon1, (13) Asidik elüsyon4, (14) Asidik elüsyon1, (M) Marker.



Şekil 4.13 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş afinite kromatografisinden elde edilen T-47D hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. (1) p18-4 elüsyon5, (2) p18-4 elüsyon4, (3) p18-4 elüsyon3, (4) p18-4 elüsyon2, (5) p18-4 elüsyon1, (6) Yıkama1, (7) Bazik elüsyon3, (8) Bazik elüsyon2, (9) Bazik elüsyon1, (10) Asidik elüsyon1, (11) p18-4 elüsyon8, (12) p18-4 elüsyon7, (13) p18-4 elüsyon6, (M) Marker.



Şekil 4.14 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş afinite kromatografisinden elde edilen BT-474 hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. (1) p18-4 elüsyon2, (2) p18-4 elüsyon3, (3) p18-4 elüsyon4, (4) p18-4 elüsyon5, (5) p18-4 elüsyon6, (6) p18-4 elüsyon7, (7) p18-4 elüsyon8, (8) Bazik elüsyon2, (M) Marker.

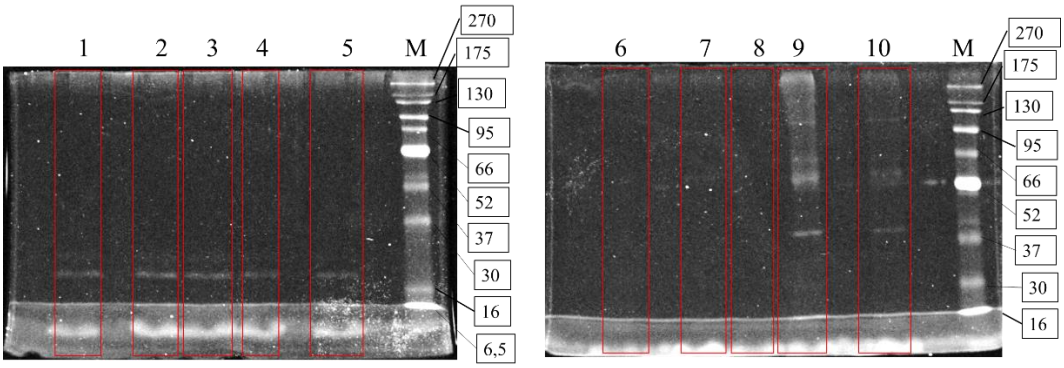


Şekil 4.15 Rastgele peptit dizisi ile konjuge edilmiş afinite kromatografisinden elde edilen MCF-10A hücre hattı proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. (1) yıkama1, (2) p18-4 elüsyon1, (3) p18-4 elüsyon2, (4) p18-4 elüsyon3, (5) p18-4 elüsyon4, (6) p18-4 elüsyon5, (7) p18-4 elüsyon6, (8) Bazik elüsyon1, (9) Bazik elüsyon2, (M) Marker.

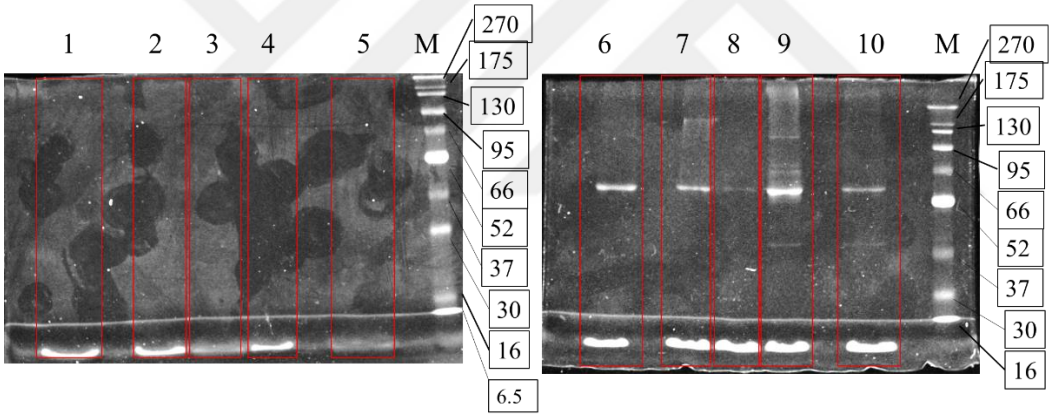
4.3 LC-MS

4.3.1 Protein Sindirimi

Afinite kromatografi sonrası elde edilen proteinleri LC-MS analizine uygun hâle getirmek için ilk olarak proteinlerin bulunduğu tampon çözelti değiştirilmiştir. Şekil 4.16'da tripsin ile sindirilen ve sindirilmemiş p18-4 resinden elde edilen meme kanseri hücre hatlarına ait proteinler karşılaştırılmıştır. Sindirilmemiş proteinlerin boyutları 37-66 kDa arasında 2 bant olarak gözlemlenirken sindirilen proteinlerin boyutları 16-30 kDa arasında gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, protein sindirimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17'de tripsin ile sindirilen ve sindirilmemiş, rastgele peptit dizisi içeren resinden elde edilen meme kanseri hücre hatlarına ait proteinler karşılaştırılmıştır. Sindirilmemiş proteinlerin boyutları 37-130 kDa arasında farklı bantlar olarak gözlemlenirken sindirilen proteinlerin boyutları SDS-PAGE jel üzerinde gözlemlenmemiştir. Sindirilen proteinlerin jel üzerinde gözlemlenmeme sebebi derişimlerinin yetersiz olması veya saklama koşulu kaynaklı peptit fraksiyonlarının yapı taşlarına ayrıştırılması olabilir.



Şekil 4.16 Tripsin ile sindirilmiş p18-4 resinden elde edilen meme kanseri hücre hatlarına ait proteinler. (1) Sindirilmiş BT-474, (2) Sindirilmiş T-47D, (3) Sindirilmiş MCF-10A, (4) Sindirilmiş AU-565, (5) Sindirilmiş MDA-MB-231, (6) Sindirilmemiş BT-474, (7) Sindirilmemiş T-47D, (8) Sindirilmemiş MCF-10A, (9) Sindirilmemiş AU-565, (10) Sindirilmemiş MDA-MB-231, (M) Marker.



Şekil 4.17 Tripsin ile sindirilmiş rastgele peptit dizisiyle konjuge edilmiş resinden elde edilen meme kanseri hücre hatlarına ait proteinler. (1) Sindirilmiş BT-474, (2) Sindirilmiş T-47D, (3) Sindirilmiş MCF-10A, (4) Sindirilmiş AU-565, (5) Sindirilmiş MDA-MB-231, (6) Sindirilmemiş BT-474, (7) Sindirilmemiş T-47D, (8) Sindirilmemiş MCF-10A, (9) Sindirilmemiş AU-565, (10) Sindirilmemiş MDA-MB-231, (M) Marker.

4.3.2 LC-MS

Bu çalışmada, meme kanserinin tüm moleküler alt tiplerinde p18-4'e özgül proteinleri belirlemek amacıyla LC-MS analizi gerçekleştirilmiştir. Her bir hücre hattı için tespit edilen proteinlerin % dizi kapsamı, skor ve özgün peptit sayıları Tablo 4.8'de gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında, kalmodulin-3 (%6 dizi kapsamı, 4,35 skor, 1 özgün peptit), kalretikülin (%2 dizi kapsamı, 1,71 skor, 1 özgün peptit) ve laktoilglutatyon liyaz (%8 dizi kapsamı, 1,68 skor, 2 özgün peptit) p18-4'e özgüllük gösteren proteinler olarak tespit edilmiştir.

AU-565 hücre hattında kalmodulin-3 (%28 dizi kapsamı, 18,06 skor, 4 özgün peptit), kalretikülin (%17 dizi kapsamı, 12,62 skor, 3 özgün peptit) ve laktoilglutatyon liyaz (%5 dizi kapsamı, 0 skor, 2 özgün peptit) ortak aday proteinler olarak belirlenmiştir. Kalmodulin-3'ün %28 dizi kapsamı ve 18,06'lık skoru, bu proteinin belirgin bir şekilde varlığını gösterirken, özgün peptit sayısı bu proteinin p18-4 ile olası bir spesifik etkileşimini göstermektedir.

T-47D hücre hattında pikolo protein (%0 dizi kapsamı, 3,73 skor, 1 özgün peptit) belirlenmiştir. Pikolo proteinin %0 dizi kapsamına rağmen 3,73'lük bir skor elde etmesi, bu proteinin düşük miktarda fakat p18-4 ile spesifik bir etkileşime sahiptir.

BT-474 hücre hattında ise kreatin kinaz (%5 dizi kapsamı, 1 skor, 0 özgün peptit) belirlenmiştir. Kreatin kinazın %5 dizi kapsamı ve 1'lik skoru, bu proteinin BT-474 hücre hattında p18-4 ile spesifik bir etkileşim gösterebileceğini öne sürmektedir.

Bu bulgular, p18-4'ün meme kanserinin farklı moleküler alt tiplerinde, farklı proteinlerle etkileşime girdiğini ve bu proteinlerin hücre tipine bağlı olarak çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.8 LC-MS protein analizi sonucu

Hücre Hattı	Hedef Protein Adı	% Dizi Kapsamı	Skor	Özgün peptit
MDA-MB-231	Kalmodulin-3	6	4,35	1

Tablo 4.8 LC-MS protein analizi sonucu (devamı)

MDA-MB-231	Kalretikülin	2	1,71	1
	Laktoilglutatyon Liyaz	8	1,68	2
AU-565	Kalmodulin-3	28	18,06	4
	Kalretikülin	17	12,62	3
	Laktoilglutatyon Liyaz	5	0	2
T-47D	Pikolo Protein	0	3,73	1
BT-474	Kreatin Kinaz	5	1	0

Literatürde, p18-4'ün MCF-7 hücre hattında SK1 reseptörüne ve kalmodulin proteinine bağlandığı belirtilmiştir (Soudy vd., 2017). Ayrıca, p18-4'ün SK1 ile olan etkileşiminin meme kanseri hücre hatlarında belirgin bir rol oynadığı ve bu etkileşimin nanoparçacık bazlı tedavi stratejilerinde tümör büyümesini inhibe etme potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (Y.-J. Kim vd., 2020).

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular, p18-4'ün farklı meme kanseri moleküler alt tiplerinde ortak bir reseptör yerine, çeşitli hücre içi ve hücre dışı proteinlerle etkileşime girdiğini göstermektedir. Literatürde p18-4'ün SK1 reseptörü ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir, ancak bu çalışmada MDA-MB-231 ve AU-565 hücre hatlarında kalmodulin-3 ve kalretikülinin p18-4'e özgül hedef proteinler olduğu bulunmuştur. Bu bulgu, p18-4'ün yalnızca SK1 ile değil, farklı hücre tiplerine özgü diğer proteinlerle de etkileşime girdiğini ve bu etkileşimlerin hücre tipine özgü olabileceğini göstermektedir.

Kalmodulin ve kalretikülin, hücre içi kalsiyum homeostazını düzenleyen proteinlerdir (Azeez vd., 2018). Kalmodulin, kalsiyum bağımlı bir sinyal transdüksiyon molekülü olarak işlev görür ve kalsiyum iyonlarına bağlanarak çeşitli enzimlerin, iyon kanallarının ve diğer proteinlerin aktivitesini düzenler (Grzybowska, 2018; Pratt vd., 2020).. Kalretikülin endoplazmik retikulumda

bulunan bir şaperon proteindir ve glikozile proteinlerin doğru katlanmasında rol oynar, bu süreç hücre içi kalsiyum düzenlemesi açısından kritiktir (Venkateswaran vd., 2018).

Kalretikülin hücre yüzeyine translokasyon yaparak immunojenik hücre ölümünü tetikleyebilir ve bu yolla kanser hücrelerinin bağışıklık sistemine tanıtılmasını sağlayabilir (Y.-C. Lu vd., 2015). Ayrıca, hücre yapışmasını ve metastazı etkileyen integrinlerle etkileşime girerek kanser hücrelerinin yayılmasını etkiler. Literatürde, kalretikülinin meme kanseri invazyonu için potansiyel bir biyobelirteç olabileceği yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (Zamanian vd., 2016).

Kalmodulin, meme kanseri hücrelerinde aşırı ifade edilen ve hücrelerin büyümesini, çoğalmasını düzenleyen bir proteindir. Özellikle hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalma yeteneğini etkileyebilir. Kalmodulin, Ölüm reseptörü 5 (DR5) ile kalsiyum bağımlı olarak bağlanarak apoptotik sinyalin başlatılmasında rol oynar (Fancy, 2017).

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, p18-4'ün kalmodulin ve kalretikülin gibi proteinlerle etkileşimi, meme kanseri hücrelerindeki kalsiyum bağımlı hücresel işlevlerin düzenlenmesinde ve kanserin ilerlemesi üzerinde potansiyel bir etkiye sahip olabilir. Bu bağlamda, p18-4'ün bu proteinlerle etkileşimi, kalsiyum homeostazını bozarak kanser hücrelerinin apoptoza sürüklenmesine veya proliferasyonunun inhibe edilmesine neden olabilir (W. J. Lee vd., 2006). Bu nedenle, p18-4'ün kalmodulin ve kalretikülin ile olan etkileşimlerinin hücre içi kalsiyum sinyal yollarını nasıl etkilediğini ve bu etkinin kanser hücrelerinin yaşam döngüsü üzerindeki sonuçlarının derinlemesine incelenmesi gerekmektedir.

4.4 Öneriler

- LC-MS analizinden elde edilen sonuçlar, p18-4'ün ortak bir hücre yüzey reseptörü yerine hücre içi veya hücre dışı proteinlerle etkileşime girebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, p18-4'ün etkileşimde bulunduğu proteinlerin işlevsel analizlerinin yapılması ve bu proteinlerin hücre yüzey reseptörleri ile etkileşimde olduğu yolakların olası bağlantılarının araştırılması gerekmektedir. Özellikle, elde edilen bu proteinlerin meme kanserinin ilerlemesi ve metastazındaki rolleri üzerinde durulmalıdır.

Ayrıca, p18-4'ün hangi koşullarda ve hangi proteinlerle daha güçlü etkileşime geçtiğini anlamak için, işaretli p18-4 kullanılarak farklı hücre hatlarında bağlanma afinitesinin araştırılması ve belirlenmesi gerekmektedir.

- İlerleyen çalışmalarda, meme kanseri alt tiplerine özgü biyobelirteçlerin belirlenmesi ve bu biyobelirteçlerin p18-4 ile olan etkileşimlerinin aydınlatılması, hedefe yönelik tedavi ve tanı yöntemlerinin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayabilir. Ayrıca, p18-4'ün hangi koşullarda ve hangi proteinlerle daha güçlü etkileşime girdiğinin anlaşılması, tümör mikroçevresi dinamiklerinin çözülmesine ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanıyabilir. Bu doğrultuda, p18-4'ün farklı kanser türleri ve diğer hastalık modellerinde de potansiyel biyobelirteç ve tedavi hedefi olarak incelenmesi, kanser tedavisinde yenilikçi yaklaşımların önünü açabilir.

KAYNAKÇA

Acharya, K. R., & Lloyd, M. D. (2005). The advantages and limitations of protein crystal structures. *Trends in Pharmacological Sciences*, *26*(1), 10-14. https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.10.011

Adeyemi, S. A., & Choonara, Y. E. (2022). In Vitro and In Vivo Evaluation of a Cyclic LyP-1-Modified Nanosystem for Targeted Endostatin Delivery in a KYSE-30 Cell Xenograft Athymic Nude Mice Model. *Pharmaceuticals*, *15*(3), 353. https://doi.org/10.3390/ph15030353

Ahmed, S., Mathews, A. S., Byeon, N., Lavasanifar, A., & Kaur, K. (2010). Peptide arrays for screening cancer specific peptides. *Analytical chemistry*, *82*(18), 7533-7541.

Akli, S., & Keyomarsi, K. (2004). Low-molecular-weight cyclin E: The missing link between biology and clinical outcome. *Breast Cancer Research: BCR*, *6*(5), 188-191. https://doi.org/10.1186/bcr905

Anandan, A., & Vrielink, A. (2016). Detergents in membrane protein purification and crystallisation. *The next generation in membrane protein structure determination*, 13-28.

Anderson, W. F., Chatterjee, N., Ershler, W. B., & Brawley, O. W. (2002). Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Research and Treatment*, *76*(1), 27-36. https://doi.org/10.1023/a:1020299707510

Araste, F., Abnous, K., Hashemi, M., Taghdisi, S. M., Ramezani, M., & Alibolandi, M. (2018). Peptide-based targeted therapeutics: Focus on cancer treatment. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *292*, 141-162. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.11.004

Arnold, T., & Linke, D. (2007). Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. *BioTechniques*, *43*(4), 427-430, 432, 434 passim. https://doi.org/10.2144/000112566

Arpino, G., Weiss, H., Lee, A. V., Schiff, R., De Placido, S., Osborne, C. K., & Elledge, R. M. (2005). Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: Association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *Journal of the National Cancer Institute*, *97*(17), 1254-1261. https://doi.org/10.1093/jnci/dji249

Askoxylakis, V., Mier, W., Zitzmann, S., Ehemann, V., Zhang, J., Krämer, S., Beck, C., Schwab, M., Eisenhut, M., & Haberkorn, U. (2006). Characterization and development of a peptide (p160) with affinity for neuroblastoma cells. *Journal of Nuclear Medicine*, *47*(6), 981-988.

Askoxylakis, V., Zitzmann, S., Mier, W., Graham, K., Krämer, S., Von Wegner, F., Fink, R. H., Schwab, M., Eisenhut, M., & Haberkorn, U. (2005). Preclinical evaluation of the breast cancer cell-binding peptide, p160. *Clinical cancer research*, *11*(18), 6705-6712.

Atahan, K., Küpeli, H., Gür, S., Yiğitbaşı, T., Baskın, Y., Yiğit, S., Deniz, M., Çökmez, A., & Tarcan, E. (2011). The Value of Serum Biomarkers (Bc1, Bc2, Bc3) in the Diagnosis of Early Breast Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, *8*(2), 148-155.

Ayo, A., & Laakkonen, P. (2021). Peptide-Based Strategies for Targeted Tumor Treatment and Imaging. *Pharmaceutics*, *13*(4), 481. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040481

Azeez, J. M., Vini, R., Remadevi, V., Surendran, A., Jaleel, A., Santhosh Kumar, T. R., & Sreeja, S. (2018). VDAC1 and SERCA3 Mediate Progesterone-Triggered Ca2+ Signaling in Breast Cancer Cells. *Journal of Proteome Research*, *17*(1), 698-709. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00754

Bada Juarez, J. F., Harper, A. J., Judge, P. J., Tonge, S. R., & Watts, A. (2019). From polymer chemistry to structural biology: The development of SMA and related amphipathic polymers for membrane protein extraction and solubilisation. *Chemistry and Physics of Lipids*, *221*, 167-175. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.03.008

Band, V., Zajchowski, D., Swisshelm, K., Trask, D., Kulesa, V., Cohen, C., Connolly, J., & Sager, R. (1990). Tumor progression in four mammary epithelial cell lines derived from the same patient. *Cancer Research*, *50*(22), 7351-7357.

Bareche, Y., Venet, D., Ignatiadis, M., Aftimos, P., Piccart, M., Rothe, F., & Sotiriou, C. (2018). Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *29*(4), 895-902. https://doi.org/10.1093/annonc/mdy024

Beretov, J., Wasinger, V. C., Millar, E. K. A., Schwartz, P., Graham, P. H., & Li, Y. (2015). Proteomic Analysis of Urine to Identify Breast Cancer Biomarker Candidates Using a Label-Free LC-MS/MS Approach. *PLoS ONE*, *10*(11), e0141876. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141876

Bharathiraja, S., Bui, N. Q., Manivasagan, P., Moorthy, M. S., Mondal, S., Seo, H., Phuoc, N. T., Vy Phan, T. T., Kim, H., Lee, K. D., & Oh, J. (2018). Multimodal tumor-homing chitosan oligosaccharide-coated biocompatible palladium nanoparticles for photo-based imaging and therapy. *Scientific Reports*, *8*(1), 500. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18966-8

Biabani Ardakani, J., Akhlaghi, M., Nikkholgh, B., & Hosseinimehr, S. J. (2021). Targeting and imaging of HER2 overexpression tumor with a new peptide-based 68Ga-PET radiotracer. *Bioorganic Chemistry*, *106*, 104474. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104474

Bilalović, N., Vranić, S., Basić, H., Tatarević, A., & Selak, I. (2005). Immunohistochemical evaluation of cyclin D1 in breast cancer. *Croatian Medical Journal*, *46*(3), 382-388.

Biri-Kovács, B., Adorján, A., Szabó, I., Szeder, B., Bősze, S., & Mező, G. (2020). Structure-Activity Relationship of HER2 Receptor Targeting Peptide and Its Derivatives in Targeted Tumor Therapy. *Biomolecules*, *10*(2), 183. https://doi.org/10.3390/biom10020183

Bolla, J. R., Agasid, M. T., Mehmood, S., & Robinson, C. V. (2019). Membrane Protein–Lipid Interactions Probed Using Mass Spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, *88*(1), 85-111. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111508

Boxi, A., Parikh, I., B S, R., & K S, S. (2020). Current Trends in Protein Purification: A Review. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, 279-310. https://doi.org/10.32628/IJSRST207645

Briand, P., & Lykkesfeldt, A. E. (2001). An in vitro model of human breast carcinogenesis: Epigenetic aspects. *Breast Cancer Research and Treatment*, *65*(2), 179-187. https://doi.org/10.1023/a:1006434503061

Britt, K. L., Cuzick, J., & Phillips, K.-A. (2020). Key steps for effective breast cancer prevention. *Nature Reviews Cancer*, *20*(8), 417-436. https://doi.org/10.1038/s41568-020-0266-x

Brooks, M. (2009). Breast Cancer Screening and Biomarkers. Içinde M. Verma (Ed.), *Cancer Epidemiology: Modifiable Factors* (ss. 307-321). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0_13

Brown, C. J., Trieber, C., & Overduin, M. (2021). Structural biology of endogenous membrane protein assemblies in native nanodiscs. *Current Opinion in Structural Biology*, *69*, 70-77. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.03.008

Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R., & Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: Friend or foe? *Breast Cancer Research*, *5*(2), 89. https://doi.org/10.1186/bcr577

Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A. W., Savage, M. I., Osborne, C. K., Hilsenbeck, S. G., Chang, J. C., Mills, G. B., Lau, C. C., & Brown, P. H. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(7), 1688-1698. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432

Cailleau, R., Olivé, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In Vitro*, *14*(11), 911-915. https://doi.org/10.1007/BF02616120

Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *490*(7418), 61-70. https://doi.org/10.1038/nature11412

Cancer today. (t.y.). Geliş tarihi 16 Aralık 2023, gönderen http://gco.iarc.fr/today/home

Carroll, J. S. (2016). Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. *European Journal of Endocrinology*, *175*(1), R41-49. https://doi.org/10.1530/EJE-16-0124

Cavallaro, P. A., De Santo, M., Belsito, E. L., Longobucco, C., Curcio, M., Morelli, C., Pasqua, L., & Leggio, A. (2023). Peptides Targeting HER2-Positive Breast Cancer Cells and Applications in Tumor Imaging and Delivery of Chemotherapeutics. *Nanomaterials*, *13*(17), Article 17. https://doi.org/10.3390/nano13172476

Cheang, M. C. U., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., & Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *101*(10), 736-750. https://doi.org/10.1093/jnci/djp082

Chen, A., Majdinasab, E. J., Fiori, M. C., Liang, H., & Altenberg, G. A. (2020). Polymer-Encased Nanodiscs and Polymer Nanodiscs: New Platforms for Membrane Protein Research and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.598450

Chen, G., & Pramanik, B. N. (2009). Application of LC/MS to proteomics studies: Current status and future prospects. *Drug Discovery Today*, *14*(9-10), 465-471. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.02.007

Chen, X., Park, R., Shahinian, A. H., Tohme, M., Khankaldyyan, V., Bozorgzadeh, M. H., Bading, J. R., Moats, R., Laug, W. E., & Conti, P. S. (2004). 18F-

labeled RGD peptide: Initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis. *Nuclear Medicine and Biology*, *31*(2), 179-189. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2003.10.002

Cho, N. (2016). Molecular subtypes and imaging phenotypes of breast cancer. *Ultrasonography (Seoul, Korea)*, *35*(4), 281-288. https://doi.org/10.14366/usg.16030

Cho, W. C. S. (2007). Proteomics Technologies and Challenges. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *5*(2), 77-85. https://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60018-7

Ciriello, G., Sinha, R., Hoadley, K. A., Jacobsen, A. S., Reva, B., Perou, C. M., Sander, C., & Schultz, N. (2013). The molecular diversity of Luminal A breast tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*, *141*(3), 409-420. https://doi.org/10.1007/s10549-013-2699-3

Cole, K. D., He, H., & Wang, L. (2013). Breast cancer biomarker measurements and standards. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, *7*(1-2), 17-29. https://doi.org/10.1002/prca.201200075

Colombo, G., Curnis, F., Mori, G. M. S. D., Gasparri, A., Longoni, C., Sacchi, A., Longhi, R., & Corti, A. (2002). Structure-Activity Relationships of Linear and Cyclic Peptides Containing the NGR Tumor-homing Motif *. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(49), 47891-47897. https://doi.org/10.1074/jbc.M207500200

Cordwell, S. J., & Thingholm, T. E. (2010). Technologies for plasma membrane proteomics. *PROTEOMICS*, *10*(4), 611-627. https://doi.org/10.1002/pmic.200900521

Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S., & Price, D. (2013). The future of peptide-based drugs. *Chemical Biology & Drug Design*, *81*(1), 136-147. https://doi.org/10.1111/cbdd.12055

Criscitiello, C., Fumagalli, D., Saini, K. S., & Loi, S. (2010). Tamoxifen in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer: Overview of clinical use and molecular biomarkers for patient selection. *OncoTargets and Therapy*, *4*, 1-11. https://doi.org/10.2147/OTT.S10155

Cserni, G. (2020). Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica*, *112*(1), 25-41. https://doi.org/10.32074/1591-951X-1-20

Cummings, M. C., Chambers, R., Simpson, P. T., & Lakhani, S. R. (2011). Molecular classification of breast cancer: İs it time to pack up our microscopes? *Pathology*, *43*(1), 1-8. https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e328341e0b5

Curnis, F., Arrigoni, G., Sacchi, A., Fischetti, L., Arap, W., Pasqualini, R., & Corti, A. (2002). Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Research*, *62*(3), 867-874.

Curnis, F., Gasparri, A., Sacchi, A., Longhi, R., & Corti, A. (2004). Coupling tumor necrosis factor-alpha with alphaV integrin ligands improves its antineoplastic activity. *Cancer Research*, *64*(2), 565-571. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-1753

Curnis, F., Sacchi, A., & Corti, A. (2002). Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *The*

Journal of Clinical Investigation, *110*(4), 475-482. https://doi.org/10.1172/JCI15223

Dai, W., Yang, F., Ma, L., Fan, Y., He, B., He, Q., Wang, X., Zhang, H., & Zhang, Q. (2014). Combined mTOR inhibitor rapamycin and doxorubicin-loaded cyclic octapeptide modified liposomes for targeting integrin α3 in triple-negative breast cancer. *Biomaterials*, *35*(20), 5347-5358. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.036

Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, *8*(16), 3131-3141. https://doi.org/10.7150/jca.18457

Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*, *5*(10), 2929-2943.

Dai, X., Xiang, L., Li, T., & Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer*, *7*(10), 1281-1294. https://doi.org/10.7150/jca.13141

De Luca, S., Verdoliva, V., Saviano, M., Fattorusso, R., & Diana, D. (2020). SPR and NMR characterization of the molecular interaction between A9 peptide and a model system of HER2 receptor: A fragment approach for selecting peptide structures specific for their target. *Journal of Peptide Science*, *26*(2), e3231. https://doi.org/10.1002/psc.3231

Dettogni, R. S., Stur, E., Laus, A. C., da Costa Vieira, R. A., Marques, M. M. C., Santana, I. V. V., Pulido, J. Z., Ribeiro, L. F., de Jesus Parmanhani, N., Agostini, L. P., Dos Reis, R. S., de Vargas Wolfgramm Dos Santos, E., Alves, L. N. R., Garcia, F. M., Santos, J. A., do Prado Ventorim, D., Reis, R. M., & Louro, I. D. (2020). Potential biomarkers of ductal carcinoma in situ progression. *BMC Cancer*, *20*(1), 119. https://doi.org/10.1186/s12885-020-6608-y

Devrim, B., Bolat, Z. B., Telci, D., Şahin, F., Gulyuz, S., Ozkose, U. U., Yilmaz, O., & Bozkır, A. (2021). Design and evaluation of peptide-18-targeted nanoliposomes constructed by poly(2-oxazoline)-DOPE for doxorubicin delivery. *Journal of Microencapsulation*, *38*(5), 285-297. https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1905094

Di Gioia, D., Dresse, M., Mayr, D., Nagel, D., Heinemann, V., & Stieber, P. (2015). Serum HER2 in combination with CA 15-3 as a parameter for prognosis in patients with early breast cancer. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *440*, 16-22. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.11.001

Di Saverio, S., Gutierrez, J., & Avisar, E. (2008). A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, *111*(3), 541-547. https://doi.org/10.1007/s10549-007-9809-z

dos Anjos Pultz, B., da Luz, F. A. C., de Faria, P. R., Oliveira, A. P. L., de Araújo, R. A., & Silva, M. J. B. (2014). Far Beyond the Usual Biomarkers in Breast Cancer: A Review. *Journal of Cancer*, *5*(7), 559-571. https://doi.org/10.7150/jca.8925

Dowsett, M., Houghton, J., Iden, C., Salter, J., Farndon, J., A'Hern, R., Sainsbury, R., & Baum, M. (2006). Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor,

EGF receptor and HER2 status. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *17*(5), 818-826. https://doi.org/10.1093/annonc/mdl016

Drecoll, E., Gaertner, F. C., Miederer, M., Blechert, B., Vallon, M., Müller, J. M., Alke, A., Seidl, C., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Senekowitsch-Schmidtke, R., & Essler, M. (2009). Treatment of peritoneal carcinomatosis by targeted delivery of the radio-labeled tumor homing peptide bi-DTPA-[F3]2 into the nucleus of tumor cells. *PloS One*, *4*(5), e5715. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005715

Duffy, M. J. (1999). CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer. *Annals of Clinical Biochemistry*, *36 (Pt 5)*, 579-586. https://doi.org/10.1177/000456329903600503

Duffy, M. J., McGowan, P. M., Harbeck, N., Thomssen, C., & Schmitt, M. (2014). uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: Validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Research*, *16*(4), 428. https://doi.org/10.1186/s13058-014-0428-4

Dupree, E. J., Jayathirtha, M., Yorkey, H., Mihasan, M., Petre, B. A., & Darie, C. C. (2020). A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. *Proteomes*, *8*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/proteomes8030014

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)*, *365*(9472), 1687-1717. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0

Eliyatkın, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., & Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *The Journal of Breast Health*, *11*(2), 59-66. https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669

Ellerby, H. M., Arap, W., Ellerby, L. M., Kain, R., Andrusiak, R., Rio, G. D., Krajewski, S., Lombardo, C. R., Rao, R., Ruoslahti, E., Bredesen, D. E., & Pasqualini, R. (1999). Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nature Medicine*, *5*(9), 1032-1038. https://doi.org/10.1038/12469

Enbäck, J., & Laakkonen, P. (2007). Tumour-homing peptides: Tools for targeting, imaging and destruction. *Biochemical Society Transactions*, *35*(4), 780-783.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, *38*(6), 698-707. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005

Errasti-Murugarren, E., Bartoccioni, P., & Palacín, M. (2021). Membrane Protein Stabilization Strategies for Structural and Functional Studies. *Membranes*, *11*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/membranes11020155

Etayash, H., Jiang, K., Azmi, S., Thundat, T., & Kaur, K. (2015). Real-time Detection of Breast Cancer Cells Using Peptide-functionalized Microcantilever Arrays. *Scientific Reports*, *5*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/srep13967

Ethier, S. P., Mahacek, M. L., Gullick, W. J., Frank, T. S., & Weber, B. L. (1993). Differential isolation of normal luminal mammary epithelial cells and breast

cancer cells from primary and metastatic sites using selective media. *Cancer Research*, *53*(3), 627-635.

Fagerquist, C. K. (2013). Top-down proteomic identification of bacterial protein biomarkers and toxins using MALDI-TOF-TOF-MS/MS and post-source decay. *Reviews in Analytical Chemistry*, *32*(2), 127-133. https://doi.org/10.1515/revac-2012-0035

Fancy, R. (2017). Role Of Calmodulin In Death Receptor 5-Mediated Apoptosis In Breast Cancer. *All ETDs from UAB*. https://digitalcommons.library.uab.edu/etd-collection/1625

Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Macgrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., Duss, S., Nicoulaz, A.-L., Brisken, C., Fiche, M., Delorenzi, M., & Iggo, R. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*, *24*(29), 4660-4671. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208561

Feist, P., & Hummon, A. B. (2015). Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/ijms16023537

Figueiredo, P., Lepland, A., Scodeller, P., Fontana, F., Torrieri, G., Tiboni, M., Shahbazi, M.-A., Casettari, L., Kostiainen, M. A., Hirvonen, J., Teesalu, T., & Santos, H. A. (2021). Peptide-guided resiquimod-loaded lignin nanoparticles convert tumor-associated macrophages from M2 to M1 phenotype for enhanced chemotherapy. *Acta Biomaterialia*, *133*, 231-243. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.038

Fogal, V., Zhang, L., Krajewski, S., & Ruoslahti, E. (2008). Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *Cancer Research*, *68*(17), 7210-7218. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6752

Fontana, F., & Santos, H. A. (Ed.). (2021). *Bio-Nanomedicine for Cancer Therapy* (C. 1295). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58174-9

Fountzilas, G., Dafni, U., Bobos, M., Batistatou, A., Kotoula, V., Trihia, H., Malamou-Mitsi, V., Miliaras, S., Chrisafi, S., Papadopoulos, S., Sotiropoulou, M., Filippidis, T., Gogas, H., Koletsa, T., Bafaloukos, D., Televantou, D., Kalogeras, K. T., Pectasides, D., Skarlos, D. V., … Dimopoulos, M. A. (2012). Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without paclitaxel. *PloS One*, *7*(6), e37946. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037946

Gaborieau, M., & Castignolles, P. (2011). Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *399*(4), 1413-1423. https://doi.org/10.1007/s00216-010-4221-7

Galvis-Jiménez, J. M., Curtidor, H., Patarroyo, M. A., Monterrey, P., & Ramírez-Clavijo, S. R. (2013). Mammaglobin peptide as a novel biomarker for breast cancer detection. *Cancer Biology & Therapy*, *14*(4), 327-332. https://doi.org/10.4161/cbt.23614

Gazdar, A. F., Kurvari, V., Virmani, A., Gollahon, L., Sakaguchi, M., Westerfield, M., Kodagoda, D., Stasny, V., Cunningham, H. T., Wistuba, I. I., Tomlinson, G., Tonk, V., Ashfaq, R., Leitch, A. M., Minna, J. D., & Shay,

J. W. (1998). Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *International Journal of Cancer*, *78*(6), 766-774. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19981209)78:6<766::aid-ijc15>3.0.co;2-l

Geng, L., Wang, Z., Jia, X., Han, Q., Xiang, Z., Li, D., Yang, X., Zhang, D., Bu, X., Wang, W., Hu, Z., & Fang, Q. (2016). HER2 Targeting Peptides Screening and Applications in Tumor Imaging and Drug Delivery. *Theranostics*, *6*(8), 1261-1273. https://doi.org/10.7150/thno.14302

Geng, L., Wang, Z., Yang, X., Li, D., Lian, W., Xiang, Z., Wang, W., Bu, X., Lai, W., Hu, Z., & Fang, Q. (2015). Structure-based Design of Peptides with High Affinity and Specificity to HER2 Positive Tumors. *Theranostics*, *5*(10), 1154-1165. https://doi.org/10.7150/thno.12398

Giordano, S. H. (2018). Breast Cancer in Men. *New England Journal of Medicine*, *378*(24), 2311-2320. https://doi.org/10.1056/NEJMra1707939

Girgin, M., & Eğin, M. (t.y.). *Meme Kanserinin Histolojik ve Moleküler Sınıflandırılması*.

Grebe, S. K., & Singh, R. J. (2011). LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here? *The Clinical Biochemist Reviews*, *32*(1), 5-31.

Greene, G. L. (2013). In Memoriam: Elwood Jensen (1920–2012). *Endocrinology*, *154*(10), 3489-3491. https://doi.org/10.1210/en.2013-1009

Grzybowska, E. A. (2018). Calcium-Binding Proteins with Disordered Structure and Their Role in Secretion, Storage, and Cellular Signaling. *Biomolecules*, *8*(2), 42. https://doi.org/10.3390/biom8020042

Gunassekaran, G. R., Poongkavithai Vadevoo, S. M., Baek, M.-C., & Lee, B. (2021). M1 macrophage exosomes engineered to foster M1 polarization and target the IL-4 receptor inhibit tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages into M1-like macrophages. *Biomaterials*, *278*, 121137. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121137

Hackenberg, R., Lüttchens, S., Hofmann, J., Kunzmann, R., Hölzel, F., & Schulz, K. D. (1991). Androgen sensitivity of the new human breast cancer cell line MFM-223. *Cancer Research*, *51*(20), 5722-5727.

Hage, D. S., Anguizola, J. A., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Sobansky, M., & Zheng, X. (2023). Chapter 20—Affinity chromatography. Içinde S. Fanali, B. Chankvetadze, P. R. Haddad, C. F. Poole, & M.-L. Riekkola (Ed.), *Liquid Chromatography (Third Edition)* (C. 1, ss. 539-561). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99968-7.00034-5

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, *5*(1), 66. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2

Henry, N. L., & Hayes, D. F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular Oncology*, *6*(2), 140-146. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010

Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M. G., Yin, Y., Khramtsov, A. I., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R. I., Brown, P. H., Green, J. E., Kopelovich, L., … Perou, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*, *8*(5), R76. https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r76

Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, *13*(4), 215. https://doi.org/10.1186/bcr2889

Hossein-Nejad-Ariani, H., Althagafi, E., & Kaur, K. (2019). Small peptide ligands for targeting EGFR in triple negative breast cancer cells. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-10.

Hu, P., Yan, J., Sharifi, J., Bai, T., Khawli, L. A., & Epstein, A. L. (2003). Comparison of three different targeted tissue factor fusion proteins for inducing tumor vessel thrombosis. *Cancer Research*, *63*(16), 5046-5053.

Hu, X.-X., He, P.-P., Qi, G.-B., Gao, Y.-J., Lin, Y.-X., Yang, C., Yang, P.-P., Hao, H., Wang, L., & Wang, H. (2017). Transformable Nanomaterials as an Artificial Extracellular Matrix for Inhibiting Tumor Invasion and Metastasis. *ACS Nano*, *11*(4), 4086-4096. https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00781

Hu, Z., Fan, C., Oh, D. S., Marron, J. S., He, X., Qaqish, B. F., Livasy, C., Carey, L. A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M. G., Sawyer, L. R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Ruiz Orrico, A., … Perou, C. M. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, *7*, 96. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-96

Huang, Y., Zhang, H. Q., Wang, J., Song, X. G., Wang, G. H., Guan, Q., Zho, W., Huo, F., Yu, C. Z., & Zeng, Y. J. (2011). Cloning expression, monoclonal antibody preparation and serologic study of mammaglobin in breast cancer. *Neoplasma*, *58*(5), 436-440. https://doi.org/10.4149/neo_2011_05_436

Ikemoto, H., Lingasamy, P., Anton Willmore, A.-M., Hunt, H., Kurm, K., Tammik, O., Scodeller, P., Simón-Gracia, L., Kotamraju, V. R., Lowy, A. M., Sugahara, K. N., & Teesalu, T. (2017). Hyaluronan-binding peptide for targeting peritoneal carcinomatosis. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *39*(5), 1010428317701628. https://doi.org/10.1177/1010428317701628

Inagaki, S., Ghirlando, R., & Grisshammer, R. (2013). Biophysical characterization of membrane proteins in nanodiscs. *Methods*, *59*(3), 287-300. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.11.006

Jang, K.-S., & Kim, Y. H. (2018). Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: A brief overview of their diverse applications. *Journal of Microbiology*, *56*(4), 209-216. https://doi.org/10.1007/s12275-018-7457-0

Janssen, M. L., Oyen, W. J., Dijkgraaf, I., Massuger, L. F., Frielink, C., Edwards, D. S., Rajopadhye, M., Boonstra, H., Corstens, F. H., & Boerman, O. C. (2002). Tumor targeting with radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model. *Cancer Research*, *62*(21), 6146-6151.

Jenkins, S., Kachur, M. E., Rechache, K., Wells, J. M., & Lipkowitz, S. (2021). Rare Breast Cancer Subtypes. *Current Oncology Reports*, *23*(5), 54. https://doi.org/10.1007/s11912-021-01048-4

Jiang, C., Wang, X., Teng, B., Wang, Z., Li, F., Zhao, Y., Guo, Y., & Zeng, Q. (2021). Peptide-Targeted High-Density Lipoprotein Nanoparticles for Combinatorial Treatment against Metastatic Breast Cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *13*(30), 35248-35265. https://doi.org/10.1021/acsami.1c02074

Jiang, Y.-Z., Yu, K.-D., Zuo, W.-J., Peng, W.-T., & Shao, Z.-M. (2014). GATA3 mutations define a unique subtype of luminal-like breast cancer with improved survival. *Cancer*, *120*(9), 1329-1337. https://doi.org/10.1002/cncr.28566

Johnson, K. S., Conant, E. F., & Soo, M. S. (2021). Molecular subtypes of breast cancer: A review for breast radiologists. *Journal of Breast Imaging*, *3*(1), 12-24.

Jones, R. L., Salter, J., A'Hern, R., Nerurkar, A., Parton, M., Reis-Filho, J. S., Smith, I. E., & Dowsett, M. (2009). The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *116*(1), 53-68. https://doi.org/10.1007/s10549-008-0081-7

Joshi, H., & Press, M. F. (2018). 22—Molecular Oncology of Breast Cancer. Içinde K. I. Bland, E. M. Copeland, V. S. Klimberg, & W. J. Gradishar (Ed.), *The Breast (Fifth Edition)* (ss. 282-307.e5). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2

Joyce, J. A., Laakkonen, P., Bernasconi, M., Bergers, G., Ruoslahti, E., & Hanahan, D. (2003). Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell*, *4*(5), 393-403. https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00271-x

Karamchand, L., Kim, G., Wang, S., Hah, H. J., Ray, A., Jiddou, R., Koo Lee, Y.-E., Philbert, M. A., & Kopelman, R. (2013). Modulation of hydrogel nanoparticle intracellular trafficking by multivalent surface engineering with tumor targeting peptide. *Nanoscale*, *5*(21), 10327-10344. https://doi.org/10.1039/c3nr00908d

Karasseva, N. G., Glinsky, V. V., Chen, N. X., Komatireddy, R., & Quinn, T. P. (2002). Identification and characterization of peptides that bind human ErbB-2 selected from a bacteriophage display library. *Journal of Protein Chemistry*, *21*(4), 287-296. https://doi.org/10.1023/a:1019749504418

Keat, N., Kenny, J., Chen, K., Onega, M., Garman, N., Slack, R. J., Parker, C. A., Lumbers, R. T., Hallett, W., & Saleem, A. (2018). A microdose PET study of the safety, immunogenicity, biodistribution, and radiation dosimetry of 18F-FB-A20FMDV2 for imaging the integrin αvβ6. *Journal of nuclear medicine technology*, *46*(2), 136-143.

Kim, J.-W., & Lee, H.-S. (2004). Tumor targeting by doxorubicin-RGD-4C peptide conjugate in an orthotopic mouse hepatoma model. *International Journal of Molecular Medicine*, *14*(4), 529-535.

Kim, S., Dubrovska, A., Salamone, R. J., Walker, J. R., Grandinetti, K. B., Bonamy, G. M. C., Orth, A. P., Elliott, J., Porta, D. G., Garcia-Echeverria, C., & Reddy, V. A. (2013). FGFR2 promotes breast tumorigenicity through maintenance of breast tumor-initiating cells. *PloS One*, *8*(1), e51671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051671

Kim, Y.-J., Lee, H.-I., Kim, J.-K., Kim, C.-H., & Kim, Y.-J. (2020). Peptide 18-4/chlorin e6-conjugated polyhedral oligomeric silsesquioxane nanoparticles for targeted photodynamic therapy of breast cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *189*, 110829. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110829

Kizhakkeppurath Kumaran, A., Sahu, A., Singh, A., Aynikkattil Ravindran, N., Sekhar Chatterjee, N., Mathew, S., & Verma, S. (2023). Proteoglycans in

breast cancer, identification and characterization by LC-MS/MS assisted proteomics approach: A review. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, *17*(4), 2200046. https://doi.org/10.1002/prca.202200046

Koivunen, E., Arap, W., Valtanen, H., Rainisalo, A., Medina, O. P., Heikkilä, P., Kantor, C., Gahmberg, C. G., Salo, T., Konttinen, Y. T., Sorsa, T., Ruoslahti, E., & Pasqualini, R. (1999). Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nature Biotechnology*, *17*(8), 768-774. https://doi.org/10.1038/11703

Kondo, E., Iioka, H., & Saito, K. (2021). Tumor-homing peptide and its utility for advanced cancer medicine. *Cancer Science*, *112*(6), 2118-2125. https://doi.org/10.1111/cas.14909

Krishnarjuna, B., & Ramamoorthy, A. (2022). Detergent-Free Isolation of Membrane Proteins and Strategies to Study Them in a Near-Native Membrane Environment. *Biomolecules*, *12*(8), 1076. https://doi.org/10.3390/biom12081076

Kulić, A., Sirotković-Skerlev, M., Jelisavac-Cosić, S., Herceg, D., Kovac, Z., & Vrbanec, D. (2010). Anti-p53 antibodies in serum: Relationship to tumor biology and prognosis of breast cancer patients. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, *27*(3), 887-893. https://doi.org/10.1007/s12032-009-9301-1

Laakkonen, P., Åkerman, M. E., Biliran, H., Yang, M., Ferrer, F., Karpanen, T., Hoffman, R. M., & Ruoslahti, E. (2004). Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(25), 9381-9386. https://doi.org/10.1073/pnas.0403317101

Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). Relevance of Breast Cancer Cell Lines as Models for Breast Tumours: An Update. *Breast Cancer Research and Treatment*, *83*(3), 249-289. https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc

Lakis, S., Kotoula, V., Eleftheraki, A. G., Batistatou, A., Bobos, M., Koletsa, T., Timotheadou, E., Chrisafi, S., Pentheroudakis, G., Koutras, A., Zagouri, F., Linardou, H., & Fountzilas, G. (2014). The androgen receptor as a surrogate marker for molecular apocrine breast cancer subtyping. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, *23*(3), 234-243. https://doi.org/10.1016/j.breast.2014.02.013

Langlois, A. J., Holder, W. D., Iglehart, J. D., Nelson-Rees, W. A., Wells, S. A., & Bolognesi, D. P. (1979). Morphological and biochemical properties of a new human breast cancer cell line. *Cancer Research*, *39*(7 Pt 1), 2604-2613.

Lasfargues, E. Y., & Ozzello, L. (1958). Cultivation of Human Breast Carcinomas2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *21*(6), 1131-1147. https://doi.org/10.1093/jnci/21.6.1131

Le Naour, F., Misek, D. E., Krause, M. C., Deneux, L., Giordano, T. J., Scholl, S., & Hanash, S. M. (2001). Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *7*(11), 3328-3335.

Lee, J. S., Park, S., Park, J. M., Cho, J. H., Kim, S. I., & Park, B.-W. (2013). Elevated levels of serum tumor markers CA 15-3 and CEA are prognostic factors for diagnosis of metastatic breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, *141*(3), 477-484. https://doi.org/10.1007/s10549-013-2695-7

Lee, S. C., & Pollock, N. L. (2016). Membrane proteins: İs the future disc shaped? *Biochemical Society Transactions*, *44*(4), 1011-1018.

Lee, W. J., Monteith, G. R., & Roberts-Thomson, S. J. (2006). Calcium transport and signaling in the mammary gland: Targets for breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1765*(2), 235-255. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.12.001

Lee, Y.-M., Oh, M. H., Go, J.-H., Han, K., & Choi, S.-Y. (2020). Molecular subtypes of triple-negative breast cancer: Understanding of subtype categories and clinical implication. *Genes & Genomics*, *42*(12), 1381-1387. https://doi.org/10.1007/s13258-020-01014-7

Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(7), 2750-2767. https://doi.org/10.1172/JCI45014

Lehner, I., Niehof, M., & Borlak, J. (2003). An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. *Electrophoresis*, *24*(11), 1795-1808. https://doi.org/10.1002/elps.200305387

Lelle, M., Kaloyanova, S., Freidel, C., Theodoropoulou, M., Musheev, M., Niehrs, C., Stalla, G., & Peneva, K. (2015). Octreotide-Mediated Tumor-Targeted Drug Delivery via a Cleavable Doxorubicin–Peptide Conjugate. *Molecular Pharmaceutics*, *12*(12), 4290-4300. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00487

Leung, K. S.-Y., & Fong, B. M.-W. (2014). LC–MS/MS in the routine clinical laboratory: Has its time come? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(9-10), 2289-2301. https://doi.org/10.1007/s00216-013-7542-5

Li, D., Yi, J., Han, G., & Qiao, L. (2022). MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Measurement Science Au*, *2*(5), 385-404. https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00019

Li, Y., Xiao, Y., Lin, H.-P., Reichel, D., Bae, Y., Lee, E. Y., Jiang, Y., Huang, X., Yang, C., & Wang, Z. (2019). In vivo β-catenin attenuation by the integrin α5-targeting nano-delivery strategy suppresses triple negative breast cancer stemness and metastasis. *Biomaterials*, *188*, 160-172. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.019

Lindhoud, S., Carvalho, V., Pronk, J. W., & Aubin-Tam, M.-E. (2016). SMA-SH: Modified Styrene-Maleic Acid Copolymer for Functionalization of Lipid Nanodiscs. *Biomacromolecules*, *17*(4), 1516-1522. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00140

Lingasamy, P., & Teesalu, T. (2021). Homing Peptides for Cancer Therapy. Içinde F. Fontana & H. A. Santos (Ed.), *Bio-Nanomedicine for Cancer Therapy* (ss. 29-48). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58174-9_2

Lingasamy, P., Tobi, A., Haugas, M., Hunt, H., Paiste, P., Asser, T., Rätsep, T., Kotamraju, V. R., Bjerkvig, R., & Teesalu, T. (2019). Bi-specific tenascin-C and fibronectin targeted peptide for solid tumor delivery. *Biomaterials*, *219*, 119373. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119373

Linke, D. (2009). Detergents: An overview. *Methods in Enzymology*, *463*, 603-617. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63034-2

Liu, S., Li, Z., Yu, B., Wang, S., Shen, Y., & Cong, H. (2020). Recent advances on protein separation and purification methods. *Advances in Colloid and Interface Science*, *284*, 102254. https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102254

Liu, Y.-R., Jiang, Y.-Z., Xu, X.-E., Yu, K.-D., Jin, X., Hu, X., Zuo, W.-J., Hao, S., Wu, J., Liu, G.-Y., Di, G.-H., Li, D.-Q., He, X.-H., Hu, W.-G., & Shao, Z.-M. (2016). Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, *18*(1), 33. https://doi.org/10.1186/s13058-016-0690-8

Lorenz-Fonfria, V. A. (2020). Infrared Difference Spectroscopy of Proteins: From Bands to Bonds. *Chemical Reviews*, *120*(7), 3466-3576. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00449

Lu, R.-M., Chen, M.-S., Chang, D.-K., Chiu, C.-Y., Lin, W.-C., Yan, S.-L., Wang, Y.-P., Kuo, Y.-S., Yeh, C.-Y., Lo, A., & Wu, H.-C. (2013). Targeted Drug Delivery Systems Mediated by a Novel Peptide in Breast Cancer Therapy and Imaging. *PLoS ONE*, *8*(6), e66128. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066128

Lu, Y.-C., Weng, W.-C., & Lee, H. (2015). Functional Roles of Calreticulin in Cancer Biology. *BioMed Research International*, *2015*(1), 526524. https://doi.org/10.1155/2015/526524

Luca, S. D., Verdoliva, V., & Saviano, M. (2020a). Peptide Ligands Specifically Targeting HER2 Receptor and the Role Played by a Synthetic Model System of the Receptor Extracellular Domain: Hypothesized Future Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(24), 15333-15343. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01340

Luca, S. D., Verdoliva, V., & Saviano, M. (2020b). Peptide Ligands Specifically Targeting HER2 Receptor and the Role Played by a Synthetic Model System of the Receptor Extracellular Domain: Hypothesized Future Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(24), 15333-15343. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01340

Łukasiewicz, S., Czeczelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, *13*(17), Article 17. https://doi.org/10.3390/cancers13174287

Luo, M.-H., Huang, Y.-H., Ni, Y.-B., Tsang, J. Y. S., Chan, S.-K., Shao, M.-M., & Tse, G. M. (2013). Expression of mammaglobin and gross cystic disease fluid protein-15 in breast carcinomas. *Human Pathology*, *44*(7), 1241-1250. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.10.009

Luveta, J., Parks, R. M., Heery, D. M., Cheung, K.-L., & Johnston, S. J. (2020). Invasive Lobular Breast Cancer as a Distinct Disease: Implications for Therapeutic Strategy. *Oncology and Therapy*, *8*(1), 1-11. https://doi.org/10.1007/s40487-019-00105-0

Ly, L., & Wasinger, V. C. (2011). Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: Tools for the complex proteome. *PROTEOMICS*, *11*(4), 513-534. https://doi.org/10.1002/pmic.201000394

Ma, W., Shao, Y., Yang, W., Li, G., Zhang, Y., Zhang, M., Zuo, C., Chen, K., & Wang, J. (2016). Evaluation of (188)Re-labeled NGR-VEGI protein for radioimaging and radiotherapy in mice bearing human fibrosarcoma HT-

1080 xenografts. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *37*(7), 9121-9129. https://doi.org/10.1007/s13277-016-4810-y

Majeed, S., Ahmad, A. B., Sehar, U., & Georgieva, E. R. (2021). Lipid Membrane Mimetics in Functional and Structural Studies of Integral Membrane Proteins. *Membranes*, *11*(9), 685. https://doi.org/10.3390/membranes11090685

Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights. Pathology*, *8*, 23-31. https://doi.org/10.4137/CPath.S31563

Marchiò, S., Lahdenranta, J., Schlingemann, R. O., Valdembri, D., Wesseling, P., Arap, M. A., Hajitou, A., Ozawa, M. G., Trepel, M., Giordano, R. J., Nanus, D. M., Dijkman, H. B. P. M., Oosterwijk, E., Sidman, R. L., Cooper, M. D., Bussolino, F., Pasqualini, R., & Arap, W. (2004). Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. *Cancer Cell*, *5*(2), 151-162. https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00025-x

Martin, M., & López-Tarruella, S. (2016). Emerging Therapeutic Options for HER2-Positive Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, *35*, e64-70. https://doi.org/10.1200/EDBK_159167

McLeskey, S. W., Ding, I. Y., Lippman, M. E., & Kern, F. G. (1994). MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Research*, *54*(2), 523-530.

Metcalfe, S., Wheeler, T. K., Picken, S., Negus, S., & Jo Milner A, null. (2000). P53 autoantibodies in 1006 patients followed up for breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, *2*(6), 438-443. https://doi.org/10.1186/bcr91

Molina, R., Escudero, J. M., Muñoz, M., Augé, J. M., & Filella, X. (2012). Circulating levels of HER-2/neu oncoprotein in breast cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *50*(1), 5-21. https://doi.org/10.1515/cclm.2011.822

Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer : Targets and Therapy*, *11*, 151-164. https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070

Mukhtar, R. A., & Chien, A. J. (2021). Invasive Lobular Carcinoma of the Breast: Ongoing Trials, Challenges, and Future Directions. *Current Breast Cancer Reports*, *13*(3), 164-170. https://doi.org/10.1007/s12609-021-00412-4

Muller, D. J., & Engel, A. (2008). Strategies to prepare and characterize native membrane proteins and protein membranes by AFM. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *13*(5), 338-350. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.09.002

Nascimento, R. G. D., & Otoni, K. M. (2020). Histological and molecular classification of breast cancer: What do we know? *Mastology*, *30*, e20200024. https://doi.org/10.29289/25945394202020200024

Nayak, S. K., Kakati, S., Harvey, S. R., Malone, C. C., Cornforth, A. N., & Dillman, R. O. (2000). Characterization of cancer cell lines established from two human metastatic breast cancers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, *36*(3), 188-193. https://doi.org/10.1290/1071-2690(2000)036<0188:COCCLE>2.0.CO;2

Nehete, J. Y., Bhambar, R. S., Narkhede, M. R., & Gawali, S. R. (2013). Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacognosy Reviews*, *7*(14), 107-116. https://doi.org/10.4103/0973-7847.120508

Nicolini, A., Ferrari, P., & Duffy, M. J. (2018). Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Seminars in Cancer Biology*, *52*, 56-73. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.010

Ohno, S., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., Gotoh, N., & Kuroda, M. (2013). Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *21*(1), 185-191. https://doi.org/10.1038/mt.2012.180

Oluwole, A. O., Danielczak, B., Meister, A., Babalola, J. O., Vargas, C., & Keller, S. (2017). Solubilization of Membrane Proteins into Functional Lipid-Bilayer Nanodiscs Using a Diisobutylene/Maleic Acid Copolymer. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *56*(7), 1919-1924. https://doi.org/10.1002/anie.201610778

Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of Breast Cancer. Içinde H. N. Mayrovitz (Ed.), *Breast Cancer*. Exon Publications. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583808/

Osborne, C. K., Bardou, V., Hopp, T. A., Chamness, G. C., Hilsenbeck, S. G., Fuqua, S. A. W., Wong, J., Allred, D. C., Clark, G. M., & Schiff, R. (2003). Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *95*(5), 353-361. https://doi.org/10.1093/jnci/95.5.353

Pan, C., Xu, A., Ma, X., Yao, Y., Zhao, Y., Wang, C., & Chen, C. (2023). Research progress of Claudin-low breast cancer. *Frontiers in Oncology*, *13*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2023.1226118

Pandey, A., Shin, K., Patterson, R. E., Liu, X.-Q., & Rainey, J. K. (2016). Current strategies for protein production and purification enabling membrane protein structural biology. *Biochemistry and Cell Biology*, *94*(6), 507-527. https://doi.org/10.1139/bcb-2015-0143

Pang, H., Lu, H., Song, H., Meng, Q., Zhao, Y., Liu, N., Lan, F., Liu, Y., Yan, S., Dong, X., & Cai, L. (2013). Prognostic values of osteopontin-c, E-cadherin and β-catenin in breast cancer. *Cancer Epidemiology*, *37*(6), 985-992. https://doi.org/10.1016/j.canep.2013.08.005

Parise, C. A., & Caggiano, V. (2014). Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. *Journal of Cancer Epidemiology*, *2014*, 469251. https://doi.org/10.1155/2014/469251

Park, J., Kim, S., Saw, P. E., Lee, I.-H., Yu, M. K., Kim, M., Lee, K., Kim, Y.-C., Jeong, Y. Y., & Jon, S. (2012). Fibronectin extra domain B-specific aptide conjugated nanoparticles for targeted cancer imaging. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *163*(2), 111-118. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.08.029

Parmar, M. J., Lousa, C. D. M., Muench, S. P., Goldman, A., & Postis, V. L. G. (2016). Artificial membranes for membrane protein purification,

functionality and structure studies. *Biochemical Society Transactions*, *44*(3), 877-882. https://doi.org/10.1042/BST20160054

Pastorino, F., Brignole, C., Di Paolo, D., Nico, B., Pezzolo, A., Marimpietri, D., Pagnan, G., Piccardi, F., Cilli, M., Longhi, R., Ribatti, D., Corti, A., Allen, T. M., & Ponzoni, M. (2006). Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy. *Cancer Research*, *66*(20), 10073-10082. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2117

Patani, N., Martin, L.-A., & Dowsett, M. (2013). Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *International Journal of Cancer*, *133*(1), 1-13. https://doi.org/10.1002/ijc.27997

Peppercorn, J., Perou, C. M., & Carey, L. A. (2008). Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: Divide and conquer. *Cancer Investigation*, *26*(1), 1-10. https://doi.org/10.1080/07357900701784238

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747-752. https://doi.org/10.1038/35021093

Pilch, J., Brown, D. M., Komatsu, M., Järvinen, T. A. H., Yang, M., Peters, D., Hoffman, R. M., & Ruoslahti, E. (2006). Peptides selected for binding to clotted plasma accumulate in tumor stroma and wounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(8), 2800-2804. https://doi.org/10.1073/pnas.0511219103

Pirooznia, N., Abdi, K., Beiki, D., Emami, F., Arab, S. S., Sabzevari, O., & Soltani-Gooshkhaneh, S. (2020). 177Lu-labeled cyclic RGD peptide as an imaging and targeted radionuclide therapeutic agent in non-small cell lung cancer: Biological evaluation and preclinical study. *Bioorganic Chemistry*, *102*, 104100. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104100

Pollock, N. L., Lee, S. C., Patel, J. H., Gulamhussein, A. A., & Rothnie, A. J. (2018). Structure and function of membrane proteins encapsulated in a polymer-bound lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1860*(4), 809-817. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.08.012

Popot, J.-L. (2010). Amphipols, Nanodiscs, and Fluorinated Surfactants: Three Nonconventional Approaches to Studying Membrane Proteins in Aqueous Solutions. *Annual Review of Biochemistry*, *79*(1), 737-775. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052208.114057

Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X., & Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, *12*(5), R68. https://doi.org/10.1186/bcr2635

Pratt, S. J., Hernández-Ochoa, E., & Martin, S. S. (2020). Calcium signaling: Breast cancer's approach to manipulation of cellular circuitry. *Biophysical Reviews*, *12*(6), 1343-1359. https://doi.org/10.1007/s12551-020-00771-9

Prickett, W. M., Van Rite, B. D., Resasco, D. E., & Harrison, R. G. (2011). Vascular targeted single-walled carbon nanotubes for near-infrared light therapy of

cancer. *Nanotechnology*, *22*(45), 455101. https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/45/455101

Qin, M., Zong, H., & Kopelman, R. (2014). Click conjugation of peptide to hydrogel nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Biomacromolecules*, *15*(10), 3728-3734. https://doi.org/10.1021/bm501028c

Qin, W., Gui, G., Zhang, K., Twelves, D., Kliethermes, B., & Sauter, E. R. (2012). Proteins and carbohydrates in nipple aspirate fluid predict the presence of atypia and cancer in women requiring diagnostic breast biopsy. *BMC Cancer*, *12*, 52. https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-52

Rakha, E. A., & Green, A. R. (2017). Molecular classification of breast cancer: What the pathologist needs to know. *Pathology*, *49*(2), 111-119. https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.10.012

Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2010). Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *120*(2), 293-308. https://doi.org/10.1007/s10549-010-0746-x

Régina, A., Demeule, M., Ché, C., Lavallée, I., Poirier, J., Gabathuler, R., Béliveau, R., & Castaigne, J. (2008). Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *British Journal of Pharmacology*, *155*(2), 185-197. https://doi.org/10.1038/bjp.2008.260

Ruiz-Garcia, E., Scott, V., Machavoine, C., Bidart, J. M., Lacroix, L., Delaloge, S., & Andre, F. (2010). Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening. *British Journal of Cancer*, *102*(3), 462-468. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605511

Sabatier, R., Finetti, P., Guille, A., Adelaide, J., Chaffanet, M., Viens, P., Birnbaum, D., & Bertucci, F. (2014). Claudin-low breast cancers: Clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Molecular Cancer*, *13*, 228. https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-228

Sacchi, A., Gasparri, A., Gallo-Stampino, C., Toma, S., Curnis, F., & Corti, A. (2006). Synergistic antitumor activity of cisplatin, paclitaxel, and gemcitabine with tumor vasculature-targeted tumor necrosis factor-alpha. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(1), 175-182. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1147

Sadeghalvad, M., Mohammadi-Motlagh, H.-R., & Rezaei, N. (2021). Immune microenvironment in different molecular subtypes of ductal breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, *185*(2), 261-279. https://doi.org/10.1007/s10549-020-05954-2

Saghaeidehkordi, A., Chen, S., Yang, S., & Kaur, K. (2021). Evaluation of a Keratin 1 Targeting Peptide-Doxorubicin Conjugate in a Mouse Model of Triple-Negative Breast Cancer. *Pharmaceutics*, *13*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050661

Salmans, M. L., Zhao, F., & Andersen, B. (2013). The estrogen-regulated anterior gradient 2 (AGR2) protein in breast cancer: A potential drug target and biomarker. *Breast Cancer Research*, *15*(2), 204. https://doi.org/10.1186/bcr3408

Salvatorelli, L., Puzzo, L., Vecchio, G. M., Caltabiano, R., Virzì, V., & Magro, G. (2020). Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: An Update with Emphasis

on Radiological and Morphological Features as Predictive Prognostic Factors. *Cancers*, *12*(3), 609. https://doi.org/10.3390/cancers12030609

Samyn, P. (2017). Lateral mapping of poly(styrene-co-maleimide) nanoparticle coatings on paper by confocal Raman microscopy. *Vibrational Spectroscopy*, *88*, 27-39. https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.09.025

Schick, J., Ritchie, R. P., & Restini, C. (2021). Breast Cancer Therapeutics and Biomarkers: Past, Present, and Future Approaches. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, *15*, 1178223421995854. https://doi.org/10.1177/1178223421995854

Schmidt, S., & Debant, A. (2013). Chapter Seven—Aptamer-Derived Peptide Inhibitors of Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors. İçinde F. Tamanoi (Ed.), *The Enzymes* (C. 33, ss. 147-168). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416749-0.00007-5

Seale, K. N., & Tkaczuk, K. H. R. (2022). Circulating Biomarkers in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, *22*(3), e319-e331. https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.09.006

Seddon, A. M., Curnow, P., & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1666*(1-2), 105-117.

Seely, J. M., & Alhassan, T. (2018). Screening for breast cancer in 2018—What should we be doing today? *Current Oncology*, *25*(Suppl 1), S115-S124. https://doi.org/10.3747/co.25.3770

Silva, V. L., Ferreira, D., Nobrega, F. L., Martins, I. M., Kluskens, L. D., & Rodrigues, L. R. (2016). Selection of Novel Peptides Homing the 4T1 CELL Line: Exploring Alternative Targets for Triple Negative Breast Cancer. *PLOS ONE*, *11*(8), e0161290. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161290

Simón-Gracia, L., Hunt, H., & Teesalu, T. (2018). Peritoneal Carcinomatosis Targeting with Tumor Homing Peptides. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, *23*(5), 1190. https://doi.org/10.3390/molecules23051190

Sinn, H.-P., & Kreipe, H. (2013). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care*, *8*(2), 149-154. https://doi.org/10.1159/000350774

Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., & McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, N.Y.)*, *235*(4785), 177-182. https://doi.org/10.1126/science.3798106

Sørensen, P. D., Jakobsen, E. H., Madsen, J. S., Petersen, E. B., Andersen, R. F., Østergaard, B., & Brandslund, I. (2013). Serum HER-2: Sensitivity, specificity, and predictive values for detecting metastatic recurrence in breast cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *139*(6), 1005-1013. https://doi.org/10.1007/s00432-013-1411-7

Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001a). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America, *98*(19), 10869-10874. https://doi.org/10.1073/pnas.191367098

Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A.-L. (2001b). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(19), 10869-10874. https://doi.org/10.1073/pnas.191367098

Sorolla, A., Sorolla, M. A., Wang, E., & Ceña, V. (2020). Peptides, proteins and nanotechnology: A promising synergy for breast cancer targeting and treatment. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *17*(11), 1597-1613. https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1814733

Soudy, R., Chen, C., & Kaur, K. (2013). Novel peptide–doxorubucin conjugates for targeting breast cancer cells including the multidrug resistant cells. *Journal of medicinal chemistry*, *56*(19), 7564-7573.

Soudy, R., Etayash, H., Bahadorani, K., Lavasanifar, A., & Kaur, K. (2017). Breast cancer targeting peptide binds keratin 1: A new molecular marker for targeted drug delivery to breast cancer. *Molecular pharmaceutics*, *14*(3), 593-604.

Soudy, R., Gill, A., Sprules, T., Lavasanifar, A., & Kaur, K. (2011). Proteolytically stable cancer targeting peptides with high affinity for breast cancer cells. *Journal of medicinal chemistry*, *54*(21), 7523-7534.

Stetsenko, A., & Guskov, A. (2017). An overview of the top ten detergents used for membrane protein crystallization. *Crystals*, *7*(7), 197.

Szymiczek, A., Lone, A., & Akbari, M. R. (2021). Molecular intrinsic versus clinical subtyping in breast cancer: A comprehensive review. *Clinical Genetics*, *99*(5), 613-637. https://doi.org/10.1111/cge.13900

Tang, P., & Tse, G. M. (2016). Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *140*(8), 806-814. https://doi.org/10.5858/arpa.2015-0133-RA

Tannheimer, S. L., Rehemtulla, A., & Ethier, S. P. (2000). Characterization of fibroblast growth factor receptor 2 overexpression in the human breast cancer cell line SUM-52PE. *Breast Cancer Research: BCR*, *2*(4), 311-320. https://doi.org/10.1186/bcr73

Tartaglia, A., Locatelli, M., & Samanidou, V. (2020). Trends in the Analysis of Biopharmaceuticals by HPLC. *Current Analytical Chemistry*, *16*(1), 52-58. https://doi.org/10.2174/1573411015666181205114810

Tenhagen, M., van Diest, P. J., Ivanova, I. A., van der Wall, E., & van der Groep, P. (2012). Fibroblast growth factor receptors in breast cancer: Expression, downstream effects, and possible drug targets. *Endocrine-Related Cancer*, *19*(4), R115-129. https://doi.org/10.1530/ERC-12-0060

Thomas, M., Kelly, E. D., Abraham, J., & Kruse, M. (2019). Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. *Seminars in Oncology*, *46*(2), 121-132. https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.03.002

Thomas, S. N., French, D., Jannetto, P. J., Rappold, B. A., & Clarke, W. A. (2022). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical diagnostics.

Nature Reviews Methods Primers, *2*(1), 1-14. https://doi.org/10.1038/s43586-022-00175-x

Thompson, E. W., Sung, V., Lavigne, M., Baumann, K., Azumi, N., Aaron, A. D., & Clarke, R. (1999). LCC15-MB: A vimentin-positive human breast cancer cell line from a femoral bone metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, *17*(3), 193-204. https://doi.org/10.1023/a:1006598422203

THORAT, D., SAHU, A., BEHERA, R., LOHITE, K., DESHMUKH, S., MANE, A., KARNIK, S., DOKE, S., & KUNDU, G. C. (2013). Association of osteopontin and cyclooxygenase-2 expression with breast cancer subtypes and their use as potential biomarkers. *Oncology Letters*, *6*(6), 1559-1564. https://doi.org/10.3892/ol.2013.1600

Timur, S. S., Yalçın, G., Çevik, Ö., Andaç, C., & Gürsoy, R. N. (2018). Molecular dynamics, thermodynamic, and mutational binding studies for tumor-specific LyP-1 in complex with p32. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, *36*(5), 1134-1144. https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1313779

Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, *27*(1), 27-35. https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232

Tsutsui, S., Ohno, S., Murakami, S., Hachitanda, Y., & Oda, S. (2002). Prognostic value of c-erbB2 expression in breast cancer. *Journal of Surgical Oncology*, *79*(4), 216-223. https://doi.org/10.1002/jso.10079

Turner, K. M., Yeo, S. K., Holm, T. M., Shaughnessy, E., & Guan, J.-L. (2021). Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *321*(2), C343-C354. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00109.2021

Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). Chapter 26 Affinity Chromatography: General Methods. Içinde R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Ed.), *Methods in Enzymology* (C. 463, ss. 417-438). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-3

Urruticoechea, A., Smith, I. E., & Dowsett, M. (2005). Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *23*(28), 7212-7220. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.501

Vadevoo, S. M. P., Gurung, S., Lee, H.-S., Gunassekaran, G. R., Lee, S.-M., Yoon, J.-W., Lee, Y.-K., & Lee, B. (2023). Peptides as multifunctional players in cancer therapy. *Experimental & Molecular Medicine*, *55*(6), 1099-1109. https://doi.org/10.1038/s12276-023-01016-x

Vaidya, A. M., Sun, Z., Ayat, N., Schilb, A., Liu, X., Jiang, H., Sun, D., Scheidt, J., Qian, V., He, S., Gilmore, H., Schiemann, W. P., & Lu, Z.-R. (2019). Systemic Delivery of Tumor-Targeting siRNA Nanoparticles against an Oncogenic LncRNA Facilitates Effective Triple-Negative Breast Cancer Therapy. *Bioconjugate Chemistry*, *30*(3), 907-919. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00028

Valetti, S., Maione, F., Mura, S., Stella, B., Desmaële, D., Noiray, M., Vergnaud, J., Vauthier, C., Cattel, L., Giraudo, E., & Couvreur, P. (2014). Peptide-functionalized nanoparticles for selective targeting of pancreatic tumor. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *192*, 29-39. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.039

Vats, K., Satpati, A. K., Sharma, R., Sarma, H. D., Satpati, D., & Dash, A. (2018). 177Lu-labeled cyclic Asn-Gly-Arg peptide tagged carbon nanospheres as tumor targeting radio-nanoprobes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *152*, 173-178. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.052

Venkateswaran, K., Verma, A., Bhatt, A. N., Shrivastava, A., Manda, K., Raj, H. G., Prasad, A., Len, C., Parmar, V. S., & Dwarakanath, B. S. (2018). Emerging Roles of Calreticulin in Cancer: Implications for Therapy. *Current Protein and Peptide Science*, *19*(4), 344-357. https://doi.org/10.2174/1389203718666170111123253

Vit, O., & Petrak, J. (2017). Integral membrane proteins in proteomics. How to break open the black box? *Journal of Proteomics*, *153*, 8-20. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.006

Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, *321*(3), 288-300. https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323

Walker, R. A. (2008). Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, *61*(6), 689-696. https://doi.org/10.1136/jcp.2006.041830

Wang, C., Wang, X., Zhong, T., Zhao, Y., Zhang, W.-Q., Ren, W., Huang, D., Zhang, S., Guo, Y., Yao, X., Tang, Y.-Q., Zhang, X., & Zhang, Q. (2015). The antitumor activity of tumor-homing peptide-modified thermosensitive liposomes containing doxorubicin on MCF-7/ADR: İn vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, *10*, 2229-2248. https://doi.org/10.2147/IJN.S79840

Wang, L. (2017). Early Diagnosis of Breast Cancer. *Sensors*, *17*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/s17071572

Ward, M. E., Brown, L. S., & Ladizhansky, V. (2015). Advanced solid-state NMR techniques for characterization of membrane protein structure and dynamics: Application to Anabaena Sensory Rhodopsin. *Journal of Magnetic Resonance*, *253*, 119-128. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2014.11.017

Watkins, E. J. (2019). Overview of breast cancer. *JAAPA*, *32*(10), 13. https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000580524.95733.3d

Watson, M. A., & Fleming, T. P. (1996). Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Research*, *56*(4), 860-865.

Weber, G. F., Lett, G. S., & Haubein, N. C. (2011). Categorical meta-analysis of Osteopontin as a clinical cancer marker. *Oncology Reports*, *25*(2), 433-441. https://doi.org/10.3892/or.2010.1106

Weigel, M. T., & Dowsett, M. (2010). Current and emerging biomarkers in breast cancer: Prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer*, *17*(4), R245-R262. https://doi.org/10.1677/ERC-10-0136

Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: Is there a unifying taxonomy? *Nature Reviews Clinical Oncology*, *6*(12), Article 12. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.166

Wen, H. Y., & Brogi, E. (2018). Lobular Carcinoma In Situ. *Surgical Pathology Clinics*, *11*(1), 123-145. https://doi.org/10.1016/j.path.2017.09.009

Wingate, H., Puskas, A., Duong, M., Bui, T., Richardson, D., Liu, Y., Tucker, S. L., Van Pelt, C., Meijer, L., Hunt, K., & Keyomarsi, K. (2009). Low

molecular weight cyclin E is specific in breast cancer and is associated with mechanisms of tumor progression. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *8*(7), 1062-1068.

Wingfield, P. T. (2015). Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, *80*(1), 6.1.1-6.1.35. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80

Witt, B. L., & Tollefsbol, T. O. (2023). Molecular, Cellular, and Technical Aspects of Breast Cancer Cell Lines as a Foundational Tool in Cancer Research. *Life*, *13*(12), 2311. https://doi.org/10.3390/life13122311

Wu, C. C., & Yates, J. R. (2003). The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nature Biotechnology*, *21*(3), Article 3. https://doi.org/10.1038/nbt0303-262

Wu, P.-H., Onodera, Y., Ichikawa, Y., Rankin, E. B., Giaccia, A. J., Watanabe, Y., Qian, W., Hashimoto, T., Shirato, H., & Nam, J.-M. (2017). Targeting integrins with RGD-conjugated gold nanoparticles in radiotherapy decreases the invasive activity of breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 5069-5085. https://doi.org/10.2147/IJN.S137833

Xie, H., Guo, X.-M., & Chen, H. (2009). Making the Most of Fusion Tags Technology in Structural Characterization of Membrane Proteins. *Molecular Biotechnology*, *42*(2), 135-145. https://doi.org/10.1007/s12033-009-9148-x

Yadav, B. S., Chanana, P., & Jhamb, S. (2015). Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World Journal of Clinical Oncology*, *6*(6), 252-263. https://doi.org/10.5306/wjco.v6.i6.252

Yang, T., Fu, Z., Zhang, Y., Wang, M., Mao, C., & Ge, W. (2020). Serum proteomics analysis of candidate predictive biomarker panel for the diagnosis of trastuzumab-based therapy resistant breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *129*, 110465. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110465

Yang, W., Luo, D., Wang, S., Wang, R., Chen, R., Liu, Y., Zhu, T., Ma, X., Liu, R., Xu, G., Meng, L., Lu, Y., Zhou, J., & Ma, D. (2008). TMTP1, a Novel Tumor-Homing Peptide Specifically Targeting Metastasis. *Clinical Cancer Research*, *14*(17), 5494-5502. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0233

Ye, F., Jeong, E.-K., Jia, Z., Yang, T., Parker, D., & Lu, Z.-R. (2008). A Peptide Targeted Contrast Agent Specific to Fibrin-Fibronectin Complexes for Cancer Molecular Imaging with MRI. *Bioconjugate Chemistry*, *19*(12), 2300-2303. https://doi.org/10.1021/bc800211r

Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W., & Yu, S. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, *22*(1), 61. https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5

Yu, D.-H., Lu, Q., Xie, J., Fang, C., & Chen, H.-Z. (2010). Peptide-conjugated biodegradable nanoparticles as a carrier to target paclitaxel to tumor neovasculature. *Biomaterials*, *31*(8), 2278-2292. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.047

Zamanian, M., Qader Hamadneh, L. A., Veerakumarasivam, A., Abdul Rahman, S., Shohaimi, S., & Rosli, R. (2016). Calreticulin mediates an invasive breast cancer phenotype through the transcriptional dysregulation of p53

and MAPK pathways. *Cancer Cell International*, *16*(1), 56. https://doi.org/10.1186/s12935-016-0329-y

Zarovni, N., Monaco, L., & Corti, A. (2004). Inhibition of tumor growth by intramuscular injection of cDNA encoding tumor necrosis factor alpha coupled to NGR and RGD tumor-homing peptides. *Human Gene Therapy*, *15*(4), 373-382. https://doi.org/10.1089/104303404322959524

Zhan, Q., Yi, K., Qi, H., Li, S., Li, X., Wang, Q., Wang, Y., Liu, C., Qiu, M., Yuan, X., Zhao, J., Hou, X., & Kang, C. (2020). Engineering blood exosomes for tumor-targeting efficient gene/chemo combination therapy. *Theranostics*, *10*(17), 7889-7905. https://doi.org/10.7150/thno.45028

Zhang, B., Shen, S., Liao, Z., Shi, W., Wang, Y., Zhao, J., Hu, Y., Yang, J., Chen, J., Mei, H., Hu, Y., Pang, Z., & Jiang, X. (2014). Targeting fibronectins of glioma extracellular matrix by CLT1 peptide-conjugated nanoparticles. *Biomaterials*, *35*(13), 4088-4098. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.046

Zhang, J., Spring, H., & Schwab, M. (2001). Neuroblastoma tumor cell-binding peptides identified through random peptide phage display. *Cancer letters*, *171*(2), 153-164.

Zhang, S. Y., Caamano, J., Cooper, F., Guo, X., & Klein-Szanto, A. J. (1994). Immunohistochemistry of cyclin D1 in human breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, *102*(5), 695-698. https://doi.org/10.1093/ajcp/102.5.695

Zhang, Y., Sun, T., & Jiang, C. (2018). Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, *8*(1), 34-50. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.11.005

Zhang, Y., Yang, M., Park, J.-H., Singelyn, J., Ma, H., Sailor, M. J., Ruoslahti, E., Ozkan, M., & Ozkan, C. (2009). A Surface-Charge Study on Cellular-Uptake Behavior of F3-Peptide-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, *5*(17), 1990-1996. https://doi.org/10.1002/smll.200900520

Zhao, Z.-Q., Ji, S., Li, X.-Y., Fang, W., & Liu, S. (2019). 68Ga-labeled dimeric and trimeric cyclic RGD peptides as potential PET radiotracers for imaging gliomas. *Applied Radiation and Isotopes: Including Data, Instrumentation and Methods for Use in Agriculture, Industry and Medicine*, *148*, 168-177. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.03.033

Zheng, Y.-Z., Hu, X., & Shao, Z.-M. (2016). Clinicopathological Characteristics and Survival Outcomes in Invasive Papillary Carcinoma of the Breast: A SEER Population-Based Study. *Scientific Reports*, *6*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/srep24037

Zhou, H., Li, S., Zeng, X., Zhang, M., Tang, L., Li, Q., Chen, D., Meng, X., & Hong, X. (2020). Tumor-homing peptide-based NIR-II probes for targeted spontaneous breast tumor imaging. *Chinese Chemical Letters*, *31*(6), 1382-1386. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2020.04.030

Zhou, J., Zou, Y., Cai, Y., Chi, F., Huang, W., Shi, W., & Qian, H. (2021). A designed cyclic peptide based on Trastuzumab used to construct peptide-drug conjugates for its HER2-targeting ability. *Bioorganic Chemistry*, *117*, 105453. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105453

Ziaei, E., Paiva, I. M. de, Yao, S.-J., Sarrami, N., Mehinrad, P., Lai, J., Lavasanifar, A., & Kaur, K. (2023). Peptide–Drug Conjugate Targeting Keratin 1

Inhibits Triple-Negative Breast Cancer in Mice. *Molecular Pharmaceutics*, *20*(7), 3570-3577. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00189

Ziaei, E., Saghaeidehkordi, A., Dill, C., Maslennikov, I., Chen, S., & Kaur, K. (2019). Targeting Triple Negative Breast Cancer Cells with Novel Cytotoxic Peptide–Doxorubicin Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, *30*(12), 3098-3106. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00755

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Z. Kılınç, G. Yeşilay, Z. B. Bolat, B. Nalbantoğlu (2024, Mayıs). Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplerinde Hedefleyici Peptitin Ortak Reseptörünün Araştırılması. Bursa Uludağ Üniversitesi, 9. Ulusal Kimya Kongresi (88 ss.).