



## Proteomics techniques and their applications in cancer research

Sevgi Gezici\*

\* 7 Aralık Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kilis, Turkey

\*Sorumlu Yazar  
E-posta: sevgigezici.00@gmail.com

Geliş Tarihi: 15 Ağustos 2017  
Kabul Tarihi: 25 Ekim 2017

### Abstract

Proteomics techniques have become extremely useful and popular in cancer research field providing comprehensive information about carcinogenesis, and providing insight into identification of cancer related protein patterns nowadays, despite the fact that progresses in genomics and transcriptomic techniques allow for advances in cancer researches. Proteomics, a set of technologies focusing on all protein forms expressed in a cell, organ or organism depending on a function of time, age, condition and external factors, plays crucial roles as a bridge between genomics and biology, and also provides information about what actually happens. Therefore, there is an increasing interest in using of proteomics techniques for cancer research. Current proteomics technologies including one dimensional (1D) and two dimensional (2D) polyacrylamide gel electrophoresis, differential gel electrophoresis (DIGE), fluorescence 2D difference gel electrophoresis (2D-DIGE), mass spectrometry-based methods (MALDI-TOF-matrix assisted laser desorption/ionization time of flight, SELDI-TOF-surface enhanced laser desorption/ionization time of flight, ESI-TOF-electrospray ionization time of flight, tandem mass spectroscopy etc.), protein microarray, tissue microarray, stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC), isotope-coded affinity tag (ICAT), isobaric tagging for relative and absolute quantitation (iTRAQ) etc. offer the opportunity of performing the detailed proteome analysis, and provide potential solutions for early detection of cancer by providing powerful biological information to detect candidate tumor biomarkers. Proteomics technologies and their applications that currently used in cancer research are summarized in this review.

**Keywords:** Cancer; proteomics; proteomics technology; proteome analysis.

## Kanser Araştırmalarında Proteomiks Teknikler ve Uygulamaları

### Özet

Genomik ve transkriptomik tekniklerdeki ilerlemeler, kanser araştırmalarındaki gelişmelere olanak sağlamasına rağmen; günümüzde proteomiks teknikler, karsinogenezis ve kanserle ilişkili protein paternlerinin tanımlanması hakkında daha kapsamlı bilgi sağlaması bakımından, kanser araştırmalarında son derece kullanışlı ve popüler hale gelmiştir. Proteomiks; zaman, yaş, durum ve dış etkenlere bağlı olarak hücre, organ veya organizmada ifade edilen tüm protein formlarına odaklanmış, genomik ile biyoloji arasında bir köprü olarak önemli rol oynayan ve gerçekte ne olduğu hakkında bilgi sağlayan teknolojiler topluluğudur. Bu nedenle günümüzde, kanser araştırmalarında proteomiks tekniklerin kullanımı yönünde artan bir ilgi söz konusudur. Tek boyutlu (1D) ve iki boyutlu (2D) poliakrilamid jel elektroforezi, ayırıcı jel elektroforezi (DIGE), floresan ayırıcı 2D jel elektroforezi (2D-DIGE), kütle spektrometresine dayalı yöntemler (MALDI-TOF-matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı, SELDI-TOF-yüzey geliştirilmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı, ESI-TOF-elektrosprey iyonizasyon uçuş zamanı, tandem kütle spektroskopisi vs.), protein mikroarray, doku mikroarray, hücre kültüründe amino asitler ile izotopik işaretleme (SILAC), izotopla kodlanmış afinite işaretleme (ICAT), göreceli ve mutlak kantitatif izobarik işaretleme (iTRAQ) vs. teknikleri içeren günümüz proteomiks teknolojisi; detaylı proteom analizlerinin yapılmasına imkan sunmakta ve aday tümör biyobelirteçlerinin saptanmasında güçlü biyolojik bilgi sağlayarak, kanserin erken teşhisi için olası çözümler sunmaktadır. Bu derlemede, günümüz kanser araştırmalarında kullanılan proteomiks teknolojileri ve uygulamaları özetlenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser; proteomiks; proteomiks teknolojisi; proteom analizi.

### GİRİŞ

Son yüzyılda tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de ölümlerin en sık nedenleri arasında yer alan ve kontrolsüz hücre bölünmesi ve çoğalması ile karakterize edilen kanser; temelde DNA’da meydana gelen değişiklikler sonucunda oluşan genom hastalığı olup, sonrasında genom yapısındaki değişikliklerin yanı sıra, proteomiks ve metabolik değişikliklerle de kendini göstermektedir.<sup>1</sup> Genetik olarak yatkınlık, mutasyonlar, hormonlardaki değişiklikler ve

bağımsızlık sistemindeki değişimler kansere yol açan temel faktörler olmakla birlikte, sigara ve alkol kullanımı, dengesiz beslenme, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, kimyasallar, radyasyon ve hava kirliliği olmak üzere bazı dış faktörler de kanser gelişiminde etkili rol oynayabilmektedir.<sup>2</sup>

Global kanser istatistiklere göre, dünya genelinde kanser kaynaklı ölümler %23 ölüm oranı ile kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada gelmektedir, sonrasında kanser kaynaklı ölümleri sırası ile kronik solunum yetmezliği, diyabet

ve Alzheimer takip etmektedir.<sup>3,4</sup> Global olarak kansere yakalanma riski ve kanser kaynaklı ölüm oranı her geçen gün artarak devam etmektedir. 2017 yılı dünya geneli kanser istatistiklerine göre, yaklaşık 1,688,780 yeni kanser vakası tahmin edilmekte olup, bunlardan yaklaşık 600,920 kişinin kanser kaynaklı ölümü de tahmin edilen veriler arasındadır. Bu veriler, her gün ölen her dört kişiden birinin kanser nedeni ile öldüğünü ortaya koymakta ve kanserin çağımızın en ciddi sağlık problemlerinden biri olarak nitelendirilmesini rakamlarla desteklemektedir.<sup>3,5</sup>

Kanser nedeni ile meydana gelen ölüm oranlarının azaltılarak, hastaların sağ kalım sürelerinin ise artırılarak kanserin kontrol altına alınmasında, kanserin erken evrelerde tanı ve teşhisinin konulması önemlilik arz etmektedir.<sup>6</sup>Hedef kanser hücrelerine yönelik etkili kanser tedavi stratejilerinin belirlenerek, erken evrelerde kanserin teşhis edilebilmesi amacıyla, ilgili kanserin metastazı sonucunda protein mekanizmasında meydana gelen değişikliklerin tam olarak belirlenmesi ve protein biyo-belirteçlerinin tespit edilmesi gerekmektedir.<sup>7</sup>

Kanserlerdeki patofizyolojinin protein düzeyinde anlaşılması; (1) hastalığın erken tanı ve teşhisinin konulması, (2) hastalarda prognoz takibinin yapılması, (3) uygun ve etkili bir tedavi uygulanması, (4) tedavi sonrasında hastaların sağ kalım oranlarının artırılması bakımından gereklilik arz etmektedir. Bu doğrultuda, günümüzde moleküler yöntemler kullanılarak biyolojik örneklerde bulunan bir takım belirteçler yardımı ile kansere yönelik tanı konulması olağan bir uygulama olmakla birlikte; bu belirteçlerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin tespit edilmesi kanser gelişimine karşı yatkinlığı olan yüksek riskli bireylerin taranması, erken tanı konulması, prognoz tahmini ve tedavi yanıtının izlenmesi de yapılabilmektedir.<sup>6,7</sup>

Organizmada protein seviyesinde meydana gelen değişiklikleri, organizmanın içinde bulunduğu fizyolojik duruma bağlı olarak yansıtan ve böylece proteom seviyesinde meydana gelen değişiklikleri inceleme olanağı sunan proteomiks; kanserin erken tanı ve teşhisinin konulmasına yönelik yeni biyolojik belirteçlerin belirlenerek, bunların klinikte rutinde kullanılabilir hale getirilmesinde ve kanser kaynaklı ölüm oranlarının azaltılmasında da umut vaat eden teknikler topluluğudur.<sup>8,9</sup>

Proteomiks; kanser hücrelerinin moleküler profillerine uygun olarak, hedefe yönelik yeni ilaçların belirlenmesinde ve potansiyel kanser tedavilerinin geliştirilmesinde önem arz etmesine rağmen, sonuçların tekrar edilebilirliği ve güvenilirliği açısından rutin olarak klinikte kanser araştırmalarında kullanımı bakımından bir takım sınırlılıklara sahiptir. Ancak ilerleyen yıllarda, teknolojik ilerleme ve gelişmelerle birlikte, proteomiks ve kanser araştırmaları hız kazanacak ve protein biyolojik belirteçler klinik uygulamalarda etkin bir kullanıma sahip olacaktır.

## PROTEOM VE PROTEOMIKS

Proteom, bir organizma, doku veya hücrede herhangi bir anda bulunan proteinlerin tümünü ifade eder. "Proteom" terimi ilk kez 1994 yılında genom tarafından ifade edilen tüm proteinleri tanımlamak için kullanılmıştır (PROTein-genOME).<sup>9</sup> Proteomiksin dinamik doğasını vurgulamak için daha açık bir ifade ile proteom, yer ve zaman dikkate alındığında, bileşimi dokudan dokuya veya hücreden hücreye değişen proteinlerin tümüdür. Proteomun yapısı; çevresel faktörler, yaş, cinsiyet ve hastalıklar, fizyolojik durumlar (hücre siklusu, apoptoz gibi) gibi iç ve dış faktörlere bağlı olarak değişim gösterir. Bu durum genom

doğasının tam tersi bir durumu yansıtmaktadır. Bu nedenle aynı genomu sahip olan iki canlı, farklı proteom yapısına sahiptir.<sup>10,11</sup>Proteomun temel birimi olan bir protein aminoasitlerden oluşur ve hücrede bulunan aktif formu üç boyutlu haldedir. Proteinlerin aminoasit dizeleri uygun genler tarafından belirlenmesine rağmen genetik bilgi bir protein hakkında bütün bilgileri sağlamaz. Bir gen-bir protein korelasyonu günümüzde anlamını yitirmiş bir kavramdır. Çünkü dört nükleotidin kombinasyonu ile belirlenen tek boyutlu genomik bilginin aksine proteinlerde kodlanan bilgi sadece aminoasit dizeleriyle sınırlı değildir. Proteinler, hücreler tarafından birçok düzenlemeye tabi tutulmaktadır.<sup>12</sup>mRNA'nın alternatif şekillerinin oluşması (splicing), füzyonlar ve post-translasyonel modifikasyonlar gibi düzenlemeler proteomiksin sıkı bir şekilde kontrol edilen dinamik yapısına, çok boyutluluğuna, değişkenliğine katkıda bulunmaktadır. Bu durum çok sayıda özgün protein molekülünün nasıl oluştuğunu da açıklamaktadır.<sup>13</sup> Vücutta patolojik bir durumun meydana gelmesi proteomda meydana gelen değişimlerle doğrudan ilişkilidir ve bu değişimlerin ve nedenlerinin anlaşılmasında proteomiks teknikleri kullanılmaktadır.<sup>14</sup>

Genel olarak proteomiks yaklaşımlar; ekspresyon proteomiks, yapısal proteomiks ve fonksiyonel proteomiks gibi çeşitli gruplara ayrılarak incelenmektedir. Bu yaklaşımlardan ekspresyon proteomiks; hücre ya da dokuda ifade edilen proteinleri belirleyerek hastalığın erken tanı ve etkin tedavisinde kullanılabilir hastalık biyobelirteçlerinin belirlenmesine sağlar. Yapısal proteomiks; protein komplekslerinin üç boyutlu yapılarını analiz ederek, bu proteinlerin hücre içerisinde nerelerde lokalize olduklarını belirler. Fonksiyonel ya da işlevsel proteomiks; protein-protein veya protein-DNA/RNA etkileşimlerini inceleyerek, proteinlerin fonksiyonlarını analiz eder.<sup>15</sup>

Proteomiks, hücre, doku veya biyolojik sıvıların protein profillerinin araştırılmasında kullanılan, genomik ile biyoloji arasında köprü kuran ve son yıllarda hızla gelişen yeni bir analitik disiplindir. Proteinlerin spesifik özellikleri nedeniyle proteomiks, yeni proteinlerin tespit edilmesi, miktarlarının belirlenmesi, post translasyonel modifikasyonların, protein yapısının ve fonksiyonlarının ortaya çıkarılması ve olası etkileşimlerin tespit edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Hızla gelişen teknolojik araçlar, kompleks karışımlardaki (dokular veya biyolojik sıvılar) birçok proteinin tespit edilmesi, hücre ve hücre düzeyinin altında meydana gelen etkileşimlerin haritalanması ve biyolojik etkilerinin araştırılması olanağını sağlamıştır.<sup>16,17</sup>

Proteomiks araştırmaları, vücut sıvılarında, hücrelerde ve doku biyopsilerinde protein kökenli tanısal ve prognostik hastalık belirteçlerinin tanımlanmasına ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Herbir bireyin proteom yapısı kendine özgü olduğu için, herhangi bir patolojik durum sonucunda bireyin proteomunda meydana gelen değişimlerin analiz edilmesi, kişiye özgü tedavilerin geliştirilmesinde anahtar rol oynamaktadır.<sup>18</sup>

Proteomiks öncesinde yapılan çalışmalar transkriptomiks adı altında RNA seviyesindeki değişikliklere ışık tutmakta idi. Ancak, mRNA ekspresyon seviyesindeki değişiklikler birebir olarak protein seviyesinde görülememektedir, mRNA ekspresyon düzeyleri proteinin aktivitesine yönelik bilgi sağlamamaktadır ve posttranslasyonel modifikasyonlar sonucu proteinde meydana gelen değişimler hakkında veri sağlamamaktadır. Bu nedenle genom ve proteomun birlikte analiz edilerek, komplementer veri elde edilmesi özellikle

klinik araştırmaları için son derece önemlidir. Yapılan bir çalışmada, 23 farklı insan hücre çizgisinde hem RNA hem de protein ekspresyon düzeylerine bakılmış ve protein ekspresyon seviyelerinin sadece %33 düzeyinde RNA ekspresyon seviyeleri ile uyduğu görülmüştür. Dolayısı ile RNA ekspresyon seviyelerindeki değişiklikleri belirlemek yerine, protein ekspresyonlarındaki değişiklikleri takip etmek daha doğru bir yaklaşımdır.<sup>19,20</sup>

## PROTEOMIKS TEKNİKLER

Proteomiks teknolojisinde temel olarak “jel temelli” ve “jel temelli olmayan” olmak üzere iki yaklaşım söz konusudur. Bu yaklaşımları kısaca özetlemek gerekirse; jel temelli yaklaşımda, materyalde var olan proteinler izole edilerek protein karışımları oluşturulur, jel sistemleri ile protein karışımları ayırma tabi tutulur ve protein spotları elde edilir. Elde edilen protein spotlarındaki proteinler, enzim ile muamele edilerek peptitlere ayrıştırılır ve çeşitli kütle spektrofotometreleri kullanılarak ilgili veritabanları yardımı ile proteinler tanımlanır.<sup>21</sup>Jel temelli olmayan yaklaşımda ise; protein karışımları elde edildikten sonra ya bu protein karışımı kromatografik yöntemler ile fraksiyonlarına ayrılarak analizler yapılır, ya da protein karışımı enzimatik olarak kesime tabi tutulur ve affinite kromatografisi ile peptitlerine ayrıştırılır, spektrofotometrik analizler (MS-MS) ile uygun veritabanlarının yardımı ile proteinler tanımlanır.<sup>9</sup>

Proteomiks teknolojisi genel olarak, önce örnekteki proteinlerin ayırımı ve sonra bu proteinlerin tanımlanması prensibine dayanmaktadır. Proteomiks yaklaşımlarda başlıca birbirini izleyen üç basamak mevcuttur, bunlar; örnek hazırlanması, proteinlerin ayırımı ve proteinlerin tanımlanması şeklindedir. Biyoinformatik ise, proteomiks teknikler ile elde edilen verilerin toplanması, depolanması, işlenmesi ve görünür hale getirilmesinde proteomiks teknolojilerinin olmazsa olmazıdır.<sup>22</sup>

### Protein Örneklerinin Hazırlanması

Doku, kan, tükürük, herhangi bir vücut sıvısı, kültüre edilmiş hücre, bakteri vs. olmak üzere her türlü biyolojik materyal örnek hazırlamak için kullanılabilir. Proteinler buldukları ortamlarda homojen olmayıp; moleküler ağırlık, izoelektrik nokta, çözünürlük gibi farklı biyofiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduklarından dolayı, protein örneklerinin hazırlanması aşaması; proteomiks çalışmalarının en temel ve en hassas aşamasıdır. Tüm protein sınıfları için tek bir protein hazırlık protokolü yoktur ve mümkün olan en az kontaminasyon ile en fazla protein eldesi protein hazırlığında temel amaçtır.<sup>23</sup>Protein ekstrakt hazırlığı; protein/protein, protein/lipid ve protein/nükleotid arasındaki karşılıklı etkileşimlerin kesilmesi amacı ile çözünürlüştürme, denatürasyon ve indirgeme aşamalarını gerektirir. Bu aşamalarda kullanılan kimyasal ve solüsyonlar kullanılan örneğe bağlı olarak çeşitlilik göstermekle birlikte;membran proteinlerini lipitlerden ayırarak çözünür hale getirebilmek için SDS, CHAPS, Tween gibi deterjanlar; proteinlerdeki disülfid bağlarını kırarak proteinlerin indirgenmesini sağlamak için DTT, merkaptetanol gibi indirgeyiciler; protein-protein etkileşimlerini denatüre ederek proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarını bozmak için denatüre edici ajan olan üre ve ürik asit; DNA ve RNA kontaminasyonlarını engellemek için enzimler kullanılmaktadır.<sup>24</sup>

### Proteinlerin ayırımı

Proteinlerin ayırımı, proteomiks çalışmalarının ikinci

adımını oluşturmaktadır. Kompleks protein karışımları içerisindeki proteinler, çeşitli teknikler kullanılarak belli proteinlere veya protein alt gruplarına ayrıştırılır ve böylece protein düzeylerindeki farklılıklar analiz edilebilir. Jel temelli olmayan proteomiks teknolojisinde proteinlerin ayırımı için; ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi (iyon değişim kromatografisi, affinite kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi), bir ve iki boyutlu sıvı kromatografisi (1D ve 2D LC-Liquid Chromatography) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-High Performance Liquid Chromatography), ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC-ultra-performance liquid chromatography) ve elektrostatik geri itmeli hidrofilitik interaksyon kromatografisi (ERLIC-electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography) gibi kromatografik yöntemler kullanılmaktadır.<sup>25,26</sup>

Jel temelli protein ayırımı ise; birboyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (1D-PAGE), iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi(2D-PAGE) vediferansiyel jel elektroforezi (DIGE) gibi çeşitli jel sistemlerinden yararlanılmaktadır.<sup>27,28</sup>

### Proteomiksde Kromatografik Analiz Yöntemleri

Herhangi bir karışımdaki maddelerin biri hareketli ve diğeri sabit olmak üzere iki faz yardımıyla birbirinden ayrılması işlemi “kromatografi” olarak adlandırılır. Fraksiyonlarına ayrılmak istenen karışım, sabit fazın başlangıç kısmına konur ve hareketli faz ilerleye doğru ilerletilir, bu ilerleme esnasında karışımdaki bileşenler, fizikokimyasal özelliklerine göre sabit fazın farklı bölgelerinde tutularak değişik hızlarda hareket ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Temel analiz prensibi aynı olmakla birlikte çok çeşitli kromatografik yöntemler mevcuttur. İnce tabaka kromatografisinde, örnek katı bir yüzeye emdirilir ve çözücü bir solüsyon içine yerleştirilerek örnekteki proteinlerin çözünme yeteneklerine göre ayırım yapılır. Kolon kromatografisinde, proteinler porlu katı bir yüzeyden geçirilerek; iyonik yüklerine, kimyasal gruplara bağlanma özelliklerine ve büyüklüklerine göre yüzey ile göstermiş oldukları farklı etkileşimler doğrultusunda ayırma tabi tutulurlar. Bir boyutlu sıvı kromatografisinde, proteinler izoelektrik noktaları, kütleleri veya hidrofobikliklerinden sadece birine göre ayrılabilir iken; iki boyutlu sıvı kromatografisinde proteinler önce izoelektrik noktalarına göre ve ikinci olarak da hidrofobikliklerine göre ayrılır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde, proteinlere yüksek basınç uygulanarak kolondan hızlıca geçirilir ve ayırım sağlanır. Bu kromatografi yöntemi, diğerkromatografik yöntemlere göre daha yüksek ayırma gücüne ve daha fazla duyarlılığa sahip bir yöntemdir. Proteomiks analizlerinde sıvı kromatografisi yöntemleri; jel elektroforez sistemleri ve kütle spektrofotometreleri ile kombineli olarak kullanılmakta ve proteinlerde meydana gelen modifikasyonların anlaşılmasına yardımcı olmaktadır.<sup>25,29</sup>

### Proteomiksde Elektroforetik Analiz Yöntemleri

Elektroforetik analiz yöntemlerindeki temel amaç; protein karışımları içerisindeki karışıklığı ve kompleksliği azaltarak proteinlerin ayırımına olanak sağlamaktır. Bu amaçla çeşitli jel elektroforez sistemleri kullanılmaktadır;bir boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (1D-PAGE), iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) ve diferansiyel jel elektroforezi (DIGE). Bir boyutlu poliakrilamid jel elektroforezinde, proteinler sadece moleküler ağırlıklarına göre ayırımı tabi tutulur ve bu

nedenle kompleksliği azaltamaz; iki boyutta yapılan jel elektroforezinde ise proteinler hem moleküler ağırlıklarına (Mw) göre hem de sahip oldukları farklı izoelektronik noktalarına (pI) göre ayırma tabi tutulurlar ve bu nedenle 2D SDS-PAGE kompleks protein karışımlarının ayırma olarak sağlar. Birinci boyutta yüke bağımlı bir ayırma yöntemi olan izoelektronik odaklama (IEF) ile ikinci yönde SDS varlığında moleküler kütleyle göre ayırma yapan Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezinin (SDS-PAGE); kompleks protein karışımlarının ayrılması ve tanımlanması, hücre tipi ve suşların belirlenmesi ve karakterizasyonu, fonksiyonel protein bazında genetik farklılıkların analiz edilmesi, hücre içeriğindeki protein farklılıklarının belirlenmesi, hastalık teşhisi, post-translasyonel modifikasyonların belirlenmesi, kalite kontrolünde protein saflığının analizi, hücre proliferasyonu, farklanma ve transformasyonun incelenmesi gibi birçok uygulama alanına sahiptir.<sup>27,30,31</sup>

Jellerin hazırlanmasında kullanılan sodyum dodesil sülfat (SDS) anyonik bir deterjandır ve proteinin moleküler ağırlığına kabaca sabit bir oranla negatif yük SDS'in sülfat gruplarından verilip birçok polipeptit SDS'i belirli bir oranda bağlar. Bu şekilde, etkin olarak polipeptit zincirlerinin net yükü maskelenir ve negatif yüklü SDS molekülleri içeren protein-SDS kompleksleri meydana gelir. Jele yüksek voltajda elektrik akımı uygulandığı zaman, protein-SDS kompleksleri çapraz bağlı poliakrilamid jeldeki porlar boyunca moleküler ağırlıklarına bağlı olarak hareket eder ve bant profilleri meydana getirir. Jelde oluşacak çapraz bağların derecesi; jellerin yoğunluğuna (yüzdesine) ve proteinlerin moleküler ağırlıklarına bağlıdır. Moleküler ağırlığı fazla olan protein karışımlarının ayırma yapabilmek için, düşük dereceli çapraz bağların oluşması proteinlerin jelde hareketini kolaylaştırarak daha iyi bir ayırma imkânı sağlar. Bunun yanı sıra; aynı jelin farklı kısımlarının farklı yoğunluklara sahip olduğu gradiyent jel olarak tanımlanan jeller de tercih edilebilir. Bu tip jellerde, jelin üstünden altına doğru çapraz bağların miktarı artar ve böylece moleküler ağırlıkları geniş olan bir dizi proteinin daha iyi ayırma sağlanır.<sup>32</sup>

Jel elektroforezi sonucunda elde edilen protein bantlarının ve protein spotlarının, protein boyama yöntemleri ile boyanarak görünür hale getirilmesi gerekmektedir. Jellerin boyanmasında Coomassie Brilliant Blue R250 veya G250 boyama, gümüş boyama, organik floresan boyama ve SYPRO Ruby boyama gibi boyalar kullanılmaktadır. Jellerin boyanmasının ardından jeller, görsel olarak ve PDQUEST gibi uygun yazılımlar yardımı ile bilgisayar ortamında değerlendirilir.<sup>33,34</sup>

Diferansiyel jel elektroforezi (DIGE), 2D SDS-PAGE yöntemine pek çok yönden benzerlik göstermesine rağmen, bu yöntemde izoelektronik noktasına göre odaklama yapılmadan önce proteinlerin amino uçlarındaki lizin grupları floresan boyalar (CyDye-Cyanin boya) ile işaretlenir. Bu metotta, fizyolojik ve patolojik olarak iki farklı kaynaktan gelen örnekler, farklı floresan işaretlemeye tabi tutularak aynı jel üzerinde yürütülüp, jeller arası farklılaşmalar ortadan kaldırılarak daha güvenilir sonuçlar elde edilir. Farklı floresan boyalarla (internal standart için Cy2, kontrol ve hasta/deney grubunu ise Cy3 veya Cy5 floresan boyalar ile işaretleme) işaretleme imkânı sağladığı için, bu yöntem karşılaştırmalı proteom analizlerinde avantajlar sunmaktadır.<sup>35</sup>

### Proteinlerin Tanımlanması

Proteomiks yaklaşımda ayırma yapılan proteinlerin tanımlanması işlemi kütle spektrometresi (MS) aracılığı ile yapılmaktadır. MS teknolojisi 20. Yüzyılın başında ortaya çıkmış bir teknoloji olmasına rağmen, proteomiks çalışmalarında kullanıma son yıllarda adapte edilebilmiş bir teknoloji olup, proteomiks çalışmalarına muazzam katkılar sağlamıştır.<sup>36</sup>

Kütle spektroskopisi; iki boyutlu jel elektroforezinde ayırma yapılmış olan proteinlerin "kütle parmak izi" (peptid mass fingerprints) analizlerinin yapılması için mükemmel bir analiz yöntemidir. MS ile analizi yapılacak olan peptit ya da protein öncesinde genel olarak enzimatik kesime tabi tutularak proteolitik peptitler elde edilir ve daha sonra bütünlüğü bozulmadan iyonlaştırılarak gaz fazına geçirilir.<sup>37</sup>

Kütle spektrometresi genel olarak üç temel bölümden oluşur:

1. İyon kaynağı: protein ya da peptitleri doğrudan veya dolaylı olarak iyonlaştırarak, hem pozitif hem de negatif iyonları oluşturur. İyonlaşma yapısına göre; elektrosprey iyonizasyon, UV lazer iyonizasyon, kimyasal iyonizasyon, atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon ve hızlı atomik bombardıman iyonizasyonu gibi çeşitli iyonizasyon sistemleri bulunmaktadır.<sup>38</sup>

2. Kütle analizatörü: basınç altında iyonların magnetik alanın kuvvetine ve iyonların hızına ve kütlelerine göre çözer. Çeşitli kütle analizör tipleri vardır; tek odaklamalı veya çift odaklamalı magnetiksektör analizörü (MSA), kuadropol analizör (Q), zaman-yol bağımlı analizör (TOF), iyon kapanı kütle analizörü (QSTAR), FT-iyon siklotron rezonans MS (FT-ICR MS).<sup>39</sup>

3. Dedektör: kütle analizörü tarafından çözülen iyonları algılar ve iyon akımı oluşur.<sup>39</sup>

Proteomiks teknolojisinde, önemli bir kullanıma sahip olan MS, protein ya da peptitleri önce iyonlarına ayırır, sonra sahip oldukları kütle/yük oranına (m/z) göre sınıflandırır ve elde edilen kütle spektrumuna göre veri bankaları ile karşılaştırmalı analizler yaparak, proteinlerin amino asit dizilerinden protein tanımlaması yapar. Hassas ve rezolüsyon gücü yüksek kütle spektrofotometreleri proteomiks çalışmalarında önem arz etmekte olup, hangi MS çeşidi ile çalışılacağı çalışılması planlanan proteomiks stratejisine bağlı olarak değişkenlik gösterir.<sup>40</sup>

Çeşitli kütle spektrometreleri bulunmakla birlikte; en sık kullanıma sahip olan kütle spektrometreleri MALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry), SELDI-TOF/MS (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry) ve ESI-TOF/MS (Electrospray Ionization tandem mass spectrometry-Time of Flight/Mass Spectrometry)'dir.<sup>9</sup>

### MALDI-TOF/MS

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF/MS-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry) ile biyolojik orijinli pek çok biyomolekülün (protein, peptit, şeker, polimer, dendrimer gibi) çok yönlü analizi yapılabilmektedir.<sup>41</sup> 1980'lerde çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan biyokimyasal araştırmalarda MALDI-TOF kütle spektrometresinin analizlerdeki başarısı kanıtlanmış ve 1991'den sonra ticari olarak geliştirilmeye başlanmıştır.<sup>42,43</sup>

Günümüzde ise, disiplin olarak proteomiksin büyümesi

ile birlikte, analitik platformda MALDI metodu ve uygulamaları, total bir peptit karışımından peptit kütlelerinin tayininde ve proteinin tanımlanmasında umut verici potansiyele sahip bir teknik haline gelmiştir.<sup>41,44,45</sup>

MALDI-TOF/MS'in çalışma mekanizması üç temel basamaktan meydana gelir: ilk olarak, matriksin birbirinden tümüyle ayrılmış analit moleküllerine erişebilmesi için uygun bir solüsyon oluşturulur. İkinci adımda, lazer ışını matriks-analit solüsyonu üzerine odaklanarak, hızlı titreşimler ile katı solüsyonun parçalanması sağlanır ve matriks uyarımı gerçekleştirilir. Uyarılan matriks molekülleri yüzeyden fıskıran demetler içerisinden uçarak analiti gaz fazında serbest bırakır. Son olarak ise; uyarılmış matriks analite doğru stabilize olarak analitin iyonize olması sağlanır ve oluşan iyonlar kütle spektrometresinde incelenir. İyonlaşma için analit ve matriks aynı enerji ile uyarılmasında rağmen, iyonlar farklı kinetik enerji, yük ve kütlelere sahip olduklarından dolayı detektöre değişik zamanlarda ulaşırlar, analizatörün TOF (Time of Flight-uçuş zamanı) olarak adlandırılmasının nedeni bu farklı varış zamanından kaynaklanmaktadır.<sup>46-48</sup>

Proteomiks çalışmalarda; MALDI-TOF/MS ile elde edilen veriler "kütle parmak izi" olarak ifade edilmektedir. Jel spotları, triptik veya diğer proteolitik enzimlerle parçalandıktan sonra elde edilen kütleler, protein veri tabanlarında listelenen tüm proteinlerin teorik parçalarının kütleleri ile karşılaştırılır ve enzim için triptik parçalama bölgeleri kullanılarak her bir protein için değerler hesaplanır. Triptik parçalama söz konusu olduğunda, bilgisayar programı; tüm proteinlerin her bir lizin ve arjininden sonra gelen peptit bağımlı parçalara ayırarak, teorik kütlelerini hesaplayabilmektedir. Bu kütlelerle uyum sağlayan ana proteinin doğru bir şekilde belirlenmesi, gerçek kütlelerle kıyaslama yolu ile mümkün olmaktadır. Ayrıca, fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon gibi modifikasyonlar da bilgisayar arama programlarının içeriğine eklenebilmektedir.<sup>49,50</sup>

### SELDI-TOF/MS

Protein çip biyolojik belirteç sisteminin temelini oluşturan, yüzeyi geliştirilmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (SELDI-TOF/MS-Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry) pek çok yönden MALDI-TOF/MS ile benzerlik göstermektedir.<sup>51</sup>

SELDI-TOF/MS teknolojisi, ProteinChip Array, kütle analizörü, ve veri analizi yazılım (software) programı olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır. Proteinlerin kimyasal ya da biyokimyasal yollarla modifiye edilmiş bir yüzeye tutulumunu hedefleyen bu teknolojide; proteinler seçici olarak yüzeye tutunurlar ve tutunmayan artıklar interferans verebilecek maddeler, deterjanlar, tuzlar ve lipidler uygun çözücü ya da tamponlarla yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Özel maddelerle muamele edilerek aktive edilen iyonlar, lazerle uyarılır ve incelenen örnekteki proteinlerin özel bir kolon boyunca kütlelerinin yüklerine oranına (m/z) göre ilerleyerek ayrılması sağlanır. İyonlar uçuş zamanına bağlı olarak kolon sonunda detektöre ulaşırlar ve dedektör tarafından algılanan verilerden kütle spektrumları elde edilir.<sup>52,53</sup>

Proteomiks çalışmalarında SELDI-TOF/MS teknolojisi diğer MS çeşitlerine kıyasla bir takım avantajlara sahiptir. Bu yöntemde; serum, idrar, plazma, kan, barsak sıvısı ya da hücre salıverisi gibi binlerce farklı protein içeren biyolojik örnekler herhangi bir ön işleme gerek

olmadan direk olarak kromatografik chip yüzeyine uygulanıp, analiz edilebilmektedir. Buna ek olarak; protein biyobelirteç taraması için, az miktardaki örneklerden yeterli olmaktadır.<sup>54,55</sup>

### ESI-MS

Elektrosprey iyonizasyon (ESI-MS-Electrospray Ionization tandem mass spectrometry-Mass Spectrometry) yöntemi en yumuşak iyonizasyon tekniğidir. Polar ve uçucu olmayan bileşikler ile buharlaştırılması ve iyonlaştırılması zor olan büyük biyolojik moleküller (proteinler, peptitler, nükleik asitler, farmasetikler ve doğal ürünler) için ideal bir iyonizasyon yöntemidir. Bu analiz yönteminde; örnek MS içerisine bir şırınga pompası ile püskürtülerek, oluşan damlacıklar buharlaşır ve bu buharlaşma esnasında yükler damlacıkların içinde bulunan moleküllere transfer olur, iyonlar oluşur. Diğer MS analizlerinde olduğu gibi ESI kütle analizinde de, ayırım genellikle kütle-yük oranı ile yapılır ve spektrum elde edilir.<sup>56,57</sup>

### Protein Mikroarray Teknolojisi

Protein mikroarray veya "protein mikroçip teknolojisi" olarak nitelendirilen bu teknolojide proteinler yakalanarak, çipler üzerinde sabitlenir ve MS (kütle spektrometresi) teknolojisi ile analiz edilir. Proteinlerle olan etkileşim mekanizmasındaki farklılıklara göre temelde iki tüp protein mikroçip teknolojilerinden bahsedilir: "analitik mikroarray" veya "antikör mikroarray" ve "fonksiyonel protein mikroarray".<sup>58</sup> Proteine bağlanabilme özelliğine sahip özel moleküller ihtiva eden cam yüzeyler sayesinde solüsyonda var olan proteinlerin spesifik olarak bu cam yüzeye bağlanması ve böylece proteinlerin analiz edilmesi prensibine dayanan protein mikroarray teknolojisi "analitik mikroarray" veya "antikör mikroarray" olarak tanımlanır iken; fonksiyonel olan tüm proteinlerin cam yüzey üzerindeki çiplere bağlanması ve çip üzerindeki reaktif proteinlerin floresan, fotokimyasal veya radyoizotop yöntemlerle işaretlenmesi ve analiz edilmesi temeline dayanan protein mikroarray teknolojisi ise "fonksiyonel protein mikroarray" olarak tanımlanır.<sup>59</sup> Klinik olarak sağlıklı ve hastalıklı dokudaki protein farklılıklarının ortaya konulmasında ve hastalık durumunda meydana gelen protein farklılıklarının belirlenmesinde antikör mikroarray teknolojisi diğer mikroarray teknolojilerine göre daha sık bir kullanıma sahiptir. Ancak protein birbirleri ile ve küçük moleküller ile interaksyonlarının analiz edilmesinin hedeflendiği çalışmalarda ise, fonksiyonel mikroarray teknolojisi ki, özellikle floresan ile işaretlenmiş mikroarray analizleri avantajlar sunmaktadır.<sup>60</sup>

### Doku Mikroarray Teknolojisi

Doku mikroarray veya "doku mikrodizin teknolojisi" olarak nitelendirilen bu teknoloji dokudaki onbinlerce proteini hızlıca tanımlamaya olanak sağlayan bir proteomik yaklaşımdır. Doku mikrodizinleri içerisindeki "alıcı" blok içine bir "verici" doku çekirdeklerinin transferi ile elde edilmiş olan mikrodizinler, özellikle kanser araştırmalarında kansere spesifik protein prognostik veya prediktif biyolojik belirteçlerinin belirlenmesine yönelik araştırmalarda kullanılmaktadır. Ancak, çeşitli tümör dokularından alınan örneklerde, aday protein biyomarkırlar içerisinden hedefe yönelik olarak en doğru proteinin seçilmesi ve bunun doğrulanması açısından bu teknolojinin bir takım sınırlılıkları mevcuttur.<sup>61</sup> Günümüzde gelişen teknoloji sayesinde, sadece kanser gruplarına spesifik biyomarkırların

belirlenmesine yönelik değil; aynı zamanda bireylerde olası kanser vakalarının belirlenmesi, preneoplastik lezyonlar ve metastatik lezyonların belirlenmesi, senkronize veya farklı zamanlı kanser vakalarının belirlenmesi ve kanser vakalarında ailesel faktörlerin belirlenmesi gibi farklı olgularda da farklı farklı kanserlere spesifik doku array blokları oluşturulabilmektedir.<sup>62</sup>

### İzotopik İşaretleme Yöntemleri

Farklı izotoplarla işaretlenmiş amino asitlerin in vivo veya in vitro ortamlarda protein veya peptitlerin yapısına katılması prensibine dayanan kütle spektrofotometrisi temelli teknikler topluluğudur. İzotopik olarak hafif prob ve ağır prob ile işaretlenmiş iki proteoma ait peptitler kütle spektrofotometreleri yardımı ile kantitatif olarak karşılaştırmalı analiz edilir.<sup>63</sup> İzotopik olarak işaretleme çeşitli şekillerde yapılabilmektedir: Bunlar stabil izotoplarla hücre kültüründeki örneklerin in vivo olarak işaretleme (stable isotope labeling with amino acids in cell culture-SILAC), izotoplarla proteinlerin affinite izolasyonuna imkan sağlayan kuyruk kısımlarının in vivo olarak işaretleme (isotope-coded affinity tag-ICAT), göreceli ve mutlak miktar tayini için izobarik olarak etiketleme yapılması (isobaric tagging for relative and absolute quantitation-iTRAQ) ve apteolitik olarak <sup>18</sup>O ile in vitro işaretleme şeklinde gruplandırılabilir.<sup>64</sup>

### Proteomiks Uygulama Alanları

Proteomiks teknikleri kullanılarak onkoloji, immünoloji, mikrobiyoloji, biyokimya, farmakoloji, genetik, biyoloji gibi tıp ve tıp alanı dışındaki pek çok disiplinde çok çeşitli araştırmalar yapılmış olup, bunlardan bazıları; hastalıkların tanı ve teşhisine yönelik protein temelli biyobelirteçlerin belirlenmesi, karşılaştırmalı proteom analizleri ile farklı koşullara karşı organizmanın proteomundaki değişikliklerin analiz edilmesi, anneye bebekten geçen proteinlerin belirlenmesi ile nöral tüp defekti gibi fetal bozuklukların araştırılması, konak ve virüs karşılıklı etkileşimindeki proteomların analiz edilmesi, mikroorganizmaların proteom yapılarının analiz edilerek identifikasyonlarının yapılması, farklı toplumlardaki proteom farklılıklarından yola çıkarak hastalıklara spesifik proteinlerin belirlenmesi, parkinson, alzheimer, huntington, down sendromu, kanser gibi pek çok hastalık için hastalık modellerinin belirlenmesi şeklindedir.<sup>65-68</sup>

Günümüzde proteomiks uygulamaları temel olarak 4 grupta toplanmaktadır.<sup>69</sup> Bunlar:

### Proteomun Tamamının İncelenmesi (Protein mining analizi)

Protein mining analizi, bir örnekte var olan tüm proteinlerin tanımlanması analizidir, diğer bir ifade ile proteomu meydana getiren tüm bileşenlerin gen ekspresyonundaki etkilerine bakılmaksızın analiz edilmesidir.<sup>70</sup>

### Protein Ekspresyon Profil Analizi

Protein ekspresyon profil analizi, protein mining analizinin özelleşmiş bir formu olup, bir organizmanın veya bir hücrenin hastalık, stres, ilaç veya kimyasal uygulaması veya fiziksel uyarıcı gibi belirli durumlar/koşullara maruz kalması sonucunda organizmada meydana gelen protein

ekspresyonu profillerindeki farklılıkların karşılaştırılması olarak analizidir.<sup>71</sup>

### Protein Network Haritalaması

Protein network haritalaması, "Protein-Protein İnteraksiyonu" olarak da tanımlanabilen bir proteomiks yaklaşım olup, organizmalarda birbiri ile interaksiyon içerisinde olan proteinlerin analiz edilerek proteinlerin yollarının belirlenmesine olanak sağlar.<sup>72</sup>

### Protein Posttranslasyonel Modifikasyonlarının Haritalanması

Yaşayan sistemlerin pek çoğunda, proteinler sentez edildikten sonra fonksiyonel duruma gelmeden önce bir takım modifikasyonlara uğrayarak kimlik kazanmaktadır. Proteinin nereye hedefleneceği, hedeflendiği yerde nasıl bir fonksiyona sahip olacağı posttranslasyonel modifikasyonlar sayesinde belirlenir. Modifikasyonlar, proteinin yapı ve işlevinde değişiklikler meydana getirerek, aynı proteinin, aynı canlının farklı kısımlarında farklı fonksiyonla sahip olmasına imkân sunar. Protein modifikasyon haritalanması, proteinlerin nerede ve nasıl bir modifikasyona uğradığını ve bu modifikasyonların yaşayan sistemlerdeki proteom yapısını nasıl etkilediği belirlemek için kullanılan bir proteom analizidir.<sup>73</sup>

### Kanser Araştırmalarında Proteomiks

Proteomiks teknikler bugüne kadar parkinson, alzheimer, huntington, down sendromu, kardiyovasküler hastalıklar, infertilite, obezite ve kanser olmak üzere pek çok hastalıkta ve hastalık modelinde uygulanmıştır. Kanser araştırmalarındaki proteomiks çalışmalar, karsinogenezis durumunda proteinlerde bir takım değişimlerin var olduğunu göstermiş olmasına rağmen, hangi proteinlerin hangi kanser türlerinde ne tür farklılıklar gösterdiğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır.<sup>74</sup>

Kanserin moleküler temelini anlamamızdaki büyük ilerlemelere rağmen, hem hastalık mekanizmalarını anlamada hem de erken teşhis ve tedavi için etkin stratejiler geliştirmede eksiklikler mevcuttur. Hastalığın patofizyolojisinin hastalığın ilerleyen evrelerinde anlaşılması hastaların başarıyla tedavi edilebilmesini etkileyen en temel faktördür.<sup>75</sup> Günümüzde biyolojik örneklerde moleküler yöntemler kullanılarak bir takım belirteçler yardımı ile tanı konulması olağan bir uygulamadır. Bu belirteçlerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin tespit edilmesi hastalıklar için yüksek riskli bireylerin taranmasını, erken tanı konulmasını, prognoz tahminini ve tedavi yanıtının izlenmesini sağlamaktadır. Klinik uygulamada kullanılan bu belirteçlerin esas amacı mortalite ve morbiditeyi azaltmaktır.<sup>76</sup> Biyo-belirteçler genellikle monoklonal antikor tabanlı metotlarla tespit edilen veya miktarı ölçülen protein molekülleridir. Ancak günümüzde biyo-belirteç olarak kullanılan veya belirteç potansiyeli olan birçok molekül tek başına ideal bir molekülün özelliklerini taşımamaktadır. Teorik olarak her hastalık özgün bir biyo-belirteçle ortaya çıkarılabilir ve karakterize edilebilir ve bu belirteçler tek bir molekül olabilir. Başka bir alternatif ise hastalığa özgü bir protein olmak yerine hastalık durumunda posttranslasyonel modifikasyonlarla değişmiş olan bir protein veya proteinler paneli olabilir. Proteinlerin tanısal araç olarak potansiyelinin bilinmesi ve proteomiks teknolojilerdeki ilerlemeler biyo-belirteç araştırmalarına ilginin artmasına neden olmuştur.<sup>77</sup> Proteomiks kanser araştırmalarında, özellikle tümörün gelişmesi ve ilerlemesi ile ilgili çalışmalarda

da kullanılmaktadır. En önemli alanlardan biri de, tümör büyüme ve gelişmesi ile ilgili ana faktörlerden biri olarak apoptotik mekanizmaların bozulması ileri sürüldüğü için, apoptozis çalışmalarıdır.<sup>78</sup>

## KAYNAKLAR

1. Gelband H, Sankaranarayanan R, Gauvreau CL, Horton S, Anderson BO, Bray F, Gupta S. Costs, affordability, and feasibility of an essential package of cancer control interventions in low-income and middle-income countries: key messages from Disease Control Priorities. *The Lancet*, 2016; 387(10033), 2133-2144.
2. Cairns RA, Mak TW. The current state of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 2016; 16(10), 613-614.
3. Smith RA, Andrews K, Brooks D, DeSantis CE, Fedewa SA, Lortet-Tieulent J, Wender RC. Cancer screening in the United States, 2016: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA: a cancer journal for clinicians*.
4. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2016; 25(1), 16-27.
5. WHO. World Health Organization. 2016. Cancer country profiles.
6. Levitsky DO, Dembitsky VM. Anti-breast Cancer Agents Derived from Plants. *Natural Products & Bioprospecting*, 2015; 5, 1–16.
7. Tagne RS, Telefo BP, Nyemb JN, Yemele DM, Njina SN, Goka SMC, Farooq AD. Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2014; 7(1), 442-447.
8. Nicolini A, Ferrari P, Masoni MC, Fini M, Pagani S, Giampietro O, Carpi A. Malnutrition, anorexia and cachexia in cancer patients: a mini-review on pathogenesis and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2013; 67(8), 807-817.
9. Deracinois B, Flahau, C, Duban-Deweere S, & Karamanos Y. Comparative and quantitative global proteomics approaches: an overview. *Proteomes*, 2013; 1(3), 180-218.
10. Löhr M, & Faissner R. Proteomics in pancreatic disease. *Pancreatology*, 2004; 4(2), 67-75.
11. Maron JL, Alterovitz G, Ramoni M, Johnson KL, & Bianchi DW. High-throughput discovery and characterization of fetal protein trafficking in the blood of pregnant women. *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 2009; 3(12), 1389-1396.
12. Reynolds T. Updates to staging system reflect advances in imaging, understanding. *Journal of the National Cancer Institute*, 2002; 94(22), 1664-1666.
13. Seo J, & Lee KJ. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 2004; 37(1), 35-44.
14. Espina V, Geho D, Mehta AI, Petricoin III EF, Liotta LA, & Rosenblatt KP. Pathology of the future: molecular profiling for targeted therapy. *Cancer investigation*, 2005; 23(1), 36-46.
15. Lau ATY, He QY, & Chiu JF. Proteomic technology and its biomedical applications. *Acta Biochimica*

*Et Biophysica Sinica-Chinese Edition*, 2003; 35(11), 965-975.

16. Wilson R. Sensitivity and specificity: twin goals of proteomics assays. Can they be combined? *Expert review of proteomics*, 2013; 10(2), 135-149.
17. Pearson H. Genetics: what is a gene? *Nature*, 2006; 441(7092), 398-401.
18. Pandey A, & Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000; 405(6788), 837-846.
19. Tyers M, & Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*, 2003; 422(6928), 193-197.
20. Massion PP, & Caprioli RM. Proteomic strategies for the characterization and the early detection of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 2006; 1(9), 1027-1039.
21. Aebersold R, & Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003; 422(6928), 198-207.
22. Colantonio DA, & Chan DW. The clinical application of proteomics. *Clinica chimica acta*, 2005; 357(2), 151-158.
23. Raynie DE. Modern extraction techniques. *Analytical chemistry*, 2010; 82(12), 4911-4916.
24. Bodzon-Kulakowska A, Bierzynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, et al. Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of Chromatography B*, 2007; 849(1), 1-31.
25. Xie F, Liu T, Qian WJ, Petyuk VA, & Smith RD. Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Journal of Biological Chemistry*, 2011; 286(29), 25443-25449.
26. Hao P, Guo T, Li X, Adav SS, Yang J, Wei M, & Sze SK. Novel application of electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography (ERLIC) in shotgun proteomics: comprehensive profiling of rat kidney proteome. *Journal of proteome research*, 2010; 9(7), 3520-3526.
27. Rabilloud T, & Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of proteomics*, 2011; 74(10), 1829-1841.
28. Craven R. A, Totty N, Harnden P, Selby PJ, & Banks RE. Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations. *The American journal of pathology*, 2002; 160(3), 815-822.
29. Peng J, Elias JE, Thoreen CC, Licklider LJ, & Gygi SP. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *Journal of proteome research*, 2003; 2(1), 43-50.
30. Riederer BM. Non-covalent and covalent protein labeling in two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of proteomics*, 2008; 71(2), 231-244.
31. Zhou S, Bailey MJ, Dunn MJ, Preedy VR, & Emery PW. A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure. *Proteomics*, 2005; 5(11), 2739-2747.
32. Anderson NL, & Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 1998; 19(11), 1853-1861.
33. Groth SFDS, Webster RG, & Datyner A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et biophysica acta*,

1963; 71, 377-391.

34. Merrill CR, Switzer RC, & Van Keuren ML. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979; 76(9), 4335-4339.

35. Minden JS, Dowd SR, Meyer HE, & Stühler K. Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 2009; 30(S1), S156-S161.

36. Angel TE, Aryal UK, Hengel SM, Baker ES, Kelly RT, Robinson EW, & Smith RD. Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chemical Society Reviews*, 2012; 41(10), 3912-3928.

37. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, & Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989; 246(4926), 64-71.

38. Yamashita M, & Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, 1984; 88(20), 4451-4459.

39. Walther TC, & Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *The Journal of cell biology*, 2010; 190(4), 491-500.

40. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL. et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 2002; 415(6868), 180-183.

41. Bonk T, & Humeny A. MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA. *The Neuroscientist*, 2001; 7(1), 6-12.

42. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, & Matsuo T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 1988; 2(8), 151-153.

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

44. Harvey DJ. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of oligosaccharides and glycoconjugates. *Journal of chromatography A*, 1996; 720(1), 429-446.

45. Zaluzec EJ, Gage DA, & Watson JT. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. *Protein expression and purification*, 1995; 6(2), 109-123.

46. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, & Chait BT. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical chemistry*, 1991; 63(24), 1193A-1203A.

47. Lewis JK, Wei J, & Siuzdak G. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; 2000.

48. Marvin LF, Roberts MA, & Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica chimica acta*, 2003; 337(1), 11-21.

49. Blueggel M, Chamrad D, & Meyer HE. Bioinformatics in proteomics. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2004; 5(1), 79-88.

50. Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D. et al. Approaching clinical

proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. *Cytometry Part A*, 2009; 75(10), 816-832.

51. Hutchens TW, & Yip TT. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1993; 7(7), 576-580.

52. Cazares LH, Leung SM, Nasim S, Adam BL, Yip TT, Schellhammer PF. et al. Proteinchip (R) surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 1999; 2(5/6), 264-276.

53. Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, & Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002; 292(3), 587-592.

54. Ahram M, & Petricoin EF. Proteomics discovery of disease biomarkers. *Biomarker insights*, 2008; 3, 325.

55. Tang N, Tornatore P, & Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass spectrometry reviews*, 2004; 23(1), 34-44.

56. Banerjee S, & Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International journal of analytical chemistry*, 2012.

57. Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW. et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clinical Biochemist Reviews*, 2003; 24(1), 3-12.

58. Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, Voloshchuk S, Chupeeva V, & Mirzabekov A. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Analytical Biochemistry*, 2000; 278(2), 123-131.

59. Haab BB, Dunham MJ, & Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol*, 2001; 2(2), 1-13.

60. Pawletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW. et al. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene*, 2001; 20(16), 1981-1989.

61. Wu W, Hu W, & Kavanagh JJ. Proteomics in cancer research. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2002; 12(5), 409-423.

62. Kim WH. Tissue array technology for translational research. From gene discovery to application]. *Experimental & molecular medicine*, 2001; 33(1 Suppl), 135-148.

63. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, & Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2007; 389(4), 1017-1031.

64. Akpınar G, Kasap M, Cantürk Z, & Cantürk NZ. Proteomiks nedir? Tiroid hastalıklarıyla ilgili araştırmalarda proteomiks. *Journal of Dialog in Endocrinology/Endokrinoloji Dergisi*, 2011; 8(4).

65. Munday DC, Surtees R, Emmott E, Dove BK, Digard P, Barr JN. et al. Using SILAC and quantitative proteomics to investigate the interactions between viral and host proteomes. *Proteomics*, 2012; 12(4), 666-672.

66. Yohannes E, Ghosh SK, Jiang B, McCormick TS,



Weinberg A, Hill E. et al. Proteomic signatures of human oral epithelial cells in HIV-infected subjects. *PloS one*, 2011; 6(11), e27816.

67. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E. Et al. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood*, 2007; 110(5), 1550-1558.

68. Nedelkov D, Kiernan UA, Niederkofler EE, Tubbs KA, & Nelson RW. Population Proteomics The Concept, Attributes, and Potential for Cancer Biomarker Research. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006; 5(10), 1811-1818.

69. Plebani M. Proteomics: the next revolution in laboratory medicine? *Clinica chimica acta*, 2005; 357(2), 113-122.

70. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, & Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000; 97(17), 9390-9395.

71. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud SE, Wilkins MR, Appel RD, & Bairoch A. *Protein identification and analysis tools on the ExpASY server*; 2005. (pp. 571-607). Humana Press.

72. Roy P, & Shukla Y. Applications of proteomic techniques in cancer research. *Cancer Therapy*, 2008; 6(2).

73. Yates JR. Mass spectrometry: from genomics to proteomics. *Trends in Genetics*, 2000; 16(1), 5-8.

74. Hanash S, & Taguchi A. The grand challenge to decipher the cancer proteome. *Nature reviews cancer*, 2010; 10(9), 652-660.

75. Petricoin EF, & Liotta LA. Proteomic approaches in cancer risk and response assessment. *Trends in molecular medicine*, 2004; 10(2), 59-64.

76. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, et al. The case for early detection. *Nature Reviews Cancer*, 2003; 3(4), 243-252.

77. Mayr M, Zhang J, Greene AS, Gutterman D, Perloff J, & Ping P. Proteomics-based Development of Biomarkers in Cardiovascular Disease Mechanistic, Clinical, and Therapeutic Insights. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006; 5(10), 1853-1864.

78. Robaye B, Døskeland AP, Suarez-Huerta N, Døskeland SO, & Dumont JE. Apoptotic cell death analyzed at the molecular level by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 1994; 15(1), 503-510.