



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROSTAT KANSERİNDE İDRAR PROTEOM PROFİLİ

FEYZA BAYRAMOĞLU

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. NESRİN EMEKLI

İKİNCİ DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. CÜNEYD PARLAYAN

İSTANBUL-2017

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında bana yol gösteren, destek ve yardımlarını esirgmeden her zaman yanımda olan saygıdeğer Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan, koşulsuz desteğini ve anlayışını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Türkan Yiğitbaşı'na,

Çalışma süresince ve sonuçların değerlendirilmesindeki destek ve yardımları için sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Cüneyd Parlayan'a

Laboratuvar sürecindeki destek ve yardımları için sayın hocam Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a

Laboratuvar çalışmalarım ve tüm tez sürecinde destekleriyle yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Serra Vildan Akgül Obeidan'a, Şeyma Türkseven ve Çağrı Çakıcı'ya

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu çalışma süresince de beni yüreklendiren, sevgi ve desteklerini hiç eksik etmeyerek her zaman yanımda olan, kendimi güvende ve huzurlu hissettiren çok sevgili annem, babam ve kardeşlerime, tecrübeleriyle hayatımın her anında yol gösteren sevgili dedeme ve ailemin diğer tüm bireyelerine,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

KISALTMALAR

2-D PAGE:	2 Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi
ACN/TCA:	Asetonitril/Trikloroasetik Asit
AmBIC:	Amonyum Bikarbonat
ANXA2:	Anneksin A2
ANXA3:	Anneksin A3
BPH:	Benign Prostat Hiperplazisi
CE-MS:	Kapiller Elektroforez Ve Kütle Spektrometresi
DRE:	Parmakla prostat muayenesi (Dijital Rektal Muayene)
ESI:	Elektrosprey İyonizasyonu
EuroKUP:	Avrupa İdrar Ve Böbrek Proteomiks Girişimi
FTICR:	Fourier Transform İyon Siklotron Rezonans
FASP:	Filter-Aided Sample Preparation
HG-PIN:	Yüksek Dereceli PIN
HKUPP:	İnsan İdrar Ve Böbrek Proteom Projesi
HPLC:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IEF:	İzoelektrik Odaklama
In-Sol:	In-Solution Digestion
IT:	İyon-Trap
LC:	Sıvı Kromatografisi
m/z:	Kütle/yük (mass to charge)

MALDI:	Matriks-Destekli Lazer Dezorbsiyon/İyonizasyonu
MMP-2:	Matriks Metalloproteinaz 2
MMP-9:	Matriks Metalloproteinaz 9
MS:	Kütle Spektrometrisi
MS/MS:	Tandem Kütle Spektrometrisi
PCa:	Prostat Kanseri
PIA:	Proliferatif İnflamatuar Atrofi
PIN:	Prostatik İnter-Epityal Neoplazinin
PİK:	Proteaz İnhibitör Kokteyli
PSA:	Prostat Spesifik Antijen
PTM:	Post-Translasyonel Modifikasyonlar
Q:	Quadrupol
SCC:	Skvamöz Hücreli Karsinomu
SDS PAGE:	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SELDI:	Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization
TCC:	Transisyonel Hücreli Karsinomu
TERT:	Telomeraz Reverse Transkriptaz
TOF:	Uçuş Zamanı (Time-Of-Flight)
Tβ15:	Timozin Beta 15
uTF:	Uriner Doku Faktörü

TABLolar LİSTESİ

Tablo 6.1. Olgulara ait değerler	44
Tablo 6.2 PCa ve kontrol grubu örneklerinin sonuç tablosu ve istatistikleri.....	45
Tablo 6.3 Diyaliz ve aseton presipitasyonu örneklerinin sonuç tablosu ve istatistikleri.....	46
Tablo 6.4 Kontrol ve PCa hasta grubunun idrarlarında bulunan proteinler.....	48
Tablo 6.5 Diyaliz ve aseton presipitasyonu grubunda bulunan ve her ikisinde de ortak olarak bulunan proteinler.....	50
Tablo 6.6 FASP örneklerinde bulunan proteinler	53
Tablo 6.7 In-Sol örneklerinde bulunan proteinler.....	67
Tablo 7. İdrar proteom profili çalışmaları.....	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.3. Bir kütle spektrometresinin temel bileşenlerinin şematik gösterimi.	10
Şekil 4.2.4.1. Numunenin ESI sistemine girişi ve iyonizasyon süreci	11
Şekil 4.2.4.2. Numunenin MALDI sistemine girişi ve iyonizasyon süreci	12
Şekil 4.2.4.3 MALDI-TOF-TOF cihazının gösterimi.....	12
Şekil 4.2.4.4 reflektör-TOF ve Lineer iyon-trap konfigürasyonlarının kendi tipik iyon kaynakları ile gösterimi	13
Şekil 4.2.4.5 Q-TOF, İyon-trap ve FT-MS konfigürasyonlarının kendi tipik iyon kaynakları olan ESI ile gösterimi	14
Şekil 4.5. Plazma, glomerül, tübül ve idrar proteomları arasındaki ilişki	23
Şekil 4.6.3. Prostat kanseri için örnek tarama ve tanı akış tablosu.....	28
Şekil 6.1 Kontrol ve prostat kanserli olguların ortak idrar proteinleri.....	47
Şekil 6.2 Sağlıklı idrarlarda diyaliz ve aseton presipitasyonu ile tanımlanan proteinler	49

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Proteomiks	6
4.2. Proteomiks Çalışmalarında Kullanılan Metodlar.....	7
4.2.1. Pre-fraksiyonlama	7
4.2.2. Protein Ayrıştırma	8
4.2.3. Kütle Spektrometresi.....	9
4.3. İdrar ve Özellikleri.....	17
4.3.1. İdrar Numunesinin Tipleri.....	17
4.3.2. İdrar Numunesinin Toplanması.....	18
4.3.3. İdrarın Fiziksel Özellikleri ve Analizi.....	18
4.3.4. İdrarın Kimyasal Analizi.....	19
4.3.5. İdrarda Protein Tayini	20
4.3.5.1. İdrarda Protein Elektroforezi	20

4.3.5.2.	24 Saatlik Protein Atılımı	21
4.3.5.3.	Spot İdrar Numunelerinde Albumin-Kreatinin Oranı	21
4.4.	İdrarda Proteomiks	22
4.4.1.	Kullanılabilecek Yöntemler	24
4.5.	Prostat Kanseri	25
4.5.1.	Prostat Kanseri Epidemiyolojisi	26
4.5.2.	Prostat Kanseri Gelişimi	26
4.5.3.	Prostat Kanseri Taraması ve Tanı	27
4.5.4.	Proteomik Teknolojileri ve Prostat Kanserinde Uygulamaları	29
4.6.	Prostat Kanserinde İdrarda Bakılan Belirteçler:	29
5.	MATERYAL VE METOD	32
5.1.	Deneyde Kullanılan Malzemeler	32
5.2.	Hasta ve Kontrol Gruplarının Özellikleri	34
5.3.	İdrar Örneklerinin Alınması, Saklanması	34
5.4.	İdrar Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması	34
5.4.1.1.	İdrar Numunesindeki Proteinleri Peptidlerine Ayırmak için Kullanılan Metodlar	35
5.4.1.2.	İdrar Numunesindeki Tuzları Uzaklaştırmak için Kullanılan Metodlar ..	37
5.4.2.	Qubit ile Protein Konsantrasyonun Ölçülmesi	40
5.4.3.	FASP (Filter-Aided Sample Preparation) Protokolü	41
5.4.4.	In-Solution Digestion Protokol	42
5.4.5.	LC-MS ile İdrarda Proteom Analizi	42
5.4.6.	LC-MS Sonuçlarının Biyoinformatik Olarak Değerlendirilmesi- İstatistiksel Analiz	43
6.	BULGULAR	44

6.1. Hasta Özellikleri ve Laboratuvar Verileri.....	44
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
7.1. Numune Hazırlama Aşaması ile İlgili Tartışma	72
7.2. İdrarın Toplanması ve Saklanması ile İlgili Tartışma.....	73
7.3. Kanserde İdrar Proteomiksi ile İlgili Tartışma	74
8. KAYNAKLAR.....	76
9. ETİK KURUL ONAYI	87
10. ÖZGEÇMİŞ.....	90



1. ÖZET

PROSTAT KANSERİNDE İDRAR PROTEOM PROFİLİ

Kompleks analiz sistemlerinin yer aldığı proteom çalışmalarında idrar analizi ile ilgili olası sınırlılıklar, olumsuzluklar ve sonuçlar günümüzün önemli teknik konuları arasında yer alır. Bazı klinik olgular ve sağlıklı kişilere ait biyolojik sıvılardaki mikro düzeyde ve çok sayıda proteinin aynı anda karşılaştırıldığı proteomik analizler günümüzde hastalığa spesifik biyobelirteç bulunmasında etkin bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmanın amacı prostat kanserli (PCa) hastaların idrarlarında kontrol grubu ile birlikte proteom analizi yapmak, farklı teknikleri denemek, olası protein farklılıklarını tespit etmek ve daha ileride yapacağımız biyobelirteç çalışmalarına temel oluşturmaktır.

Numune hazırlama aşaması idrar proteomikisi çalışmalarında çok önemli bir basamaktır. Bu sebeple çalışmamızda kullanabileceğimiz en iyi metoda karar verebilmek için sağlıklı insan idrarında 2 farklı peptidlerine ayırma metodu kullanıldı. FASP kiti ile peptidlerine ayrılan numunede 372, In-sol protokolüne göre çalışılan numunede ise 26 protein tanımlandı. Normal bir insan idrarının protein konsantrasyonu oldukça düşüktür ve proteomik analizleri engelleyen tuz konsantrasyonu ise oldukça yüksektir. Bu sebeple en efektif tuzları uzaklaştırma metodunu bulmak amacıyla idrar örneklerine, numune hazırlama aşamasında aseton presipitasyonu ve diyaliz uygulanarak sırasıyla 52 ve 10 protein tanımlandı. Ön çalışmalarımızdan elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda asıl deney setimizi oluşturan prostat kanserli hasta ve kontrol idrarlarına aseton presipitasyonu ve FASP uygulandı. PCa grubunda 10 ve kontrol grubunda ise 5 protein tanımlandı.

Her bir metodun birbirleriyle kıyaslandığında avantajları ve dezavantajları vardır. Tüm idrar proteomunun incelenmesini sağlayacak tek bir mükemmel protokolün olmadığı bilinmektedir. Bu çalışma sonucunda en büyük miktarda ve kalitede veri elde edebilmek için birkaç numune hazırlama metodunun birlikte kullanılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aseton presipitasyonu, Diyaliz, FASP, İn-solution, Proteomiks, Prostat Kanseri

2. ABSTRACT

URINE PROTEOM PROFILE IN PROSTATE CANCER

Possible limitations, disadvantages and consequences of the urine analysis in proteomics studies which include complex analysis systems are among the most important technical issues of today. Proteomic analyzes at the micro level of the biological fluids of the healthy persons with respect to the some clinical cases in which a large number of proteins are compared at the same time are now considered to be an effective method for the detection of disease-specific biomarkers. The aim of this study is to perform proteomic analysis in the urine of patients with prostate cancer (PCa) with our control group, to try different techniques, to detect possible protein differences, and to provide a basis for our biomarker studies to be exercised.

The sample preparation stage is a very important step in the study of urine proteomics. Therefore, two different peptide separation methods have been used in a healthy person urine in order to determine the best method for our study. While 372 proteins have been identified with the FASP kit, 26 proteins have been identified in the sampling study according to the sol protocol. The protein concentration of a normal person urine is very low and the salt concentration blocking the proteomic analysis is quite high. For this reason, urine specimens were subjected to the acetone precipitation and dialysis during the sample preparation phase for the purposes of finding the most efficient method of removing the salts. 52 and 10 proteins were identified, respectively. Acetone precipitation and FASP were applied in accordance with these results obtained from our preliminary studies to the patients with prostate cancer and urine samples of our control group, which form our main experiment set. 10 proteins are identified in the PCa group and 5 proteins in the control group.

The relative efficacy of these different methods in terms of quality and recovery yield is still not sufficient. Each method has both its advantages and disadvantages when compared to each other. We know there is not a single perfect protocol to analyse all urine proteomics. As a result of this study, we have reached the conclusion that several sample preparation methods must be used together to obtain the largest amount and quality of data.

Keywords: Proteomics, acetone precipitation, dialysis, FASP, in-solution, prostate cancer.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri (PCa) erkeklerde en sık görülen kanserler arasındadır. İdrar diğer vücut sıvıları ile kıyaslandığında, büyük miktarlarda ve non-invasiv olarak elde edilebilmesi ve stabil olması sebebiyle, biyobelirteç çalışmalarında kullanılan en cazip vücut sıvılarından biri haline gelmiştir (1). Son zamanlarda idrar proteinlerinin, diğer organların inflamasyon durumunu yansıtan yararlı belirteçler olduğu bulunmuştur. Prostat kanserinde biyobelirteç olarak kullanılması amacıyla serumda Prostat Spesifik Antijen (PSA) tanımlama ile ilgili gerçekleştirilen büyük ölçekli klinik çalışmalar 1990'lı yıllardan beri devam etmektedir. PSA yüksekliği prostat kanseri tanısında her zaman yeterli değildir. Çünkü ciddi ölçüde yanlış pozitif sonuçlar vermektedir (2). PSA yüksekliği Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 700.000'den fazla gereksiz prostat biyopsisi yapılmasına sebep olmaktadır (3). Bu sebeple PCa için daha efektif ve non-invazif bir biyobelirteçe ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (4).

Biyobelirteçler çeşitli biyolojik numunelerden bulunabilirler. Kan, vücuttaki tüm hücrelerle temas halinde olduğu için bugüne kadar en çok çalışılan biyolojik kaynak olmuştur. Ancak kan örneklerinin proteomik analizinin bazı dezavantajları vardır. Numune toplama sırasında kandaki proteazlar genellikle aktive olur ve bir dizi proteolitik ürün meydana getirirler. Kan proteinlerinin %99'unu kanda yüksek miktarda bulunan yaklaşık 20 protein oluşturur. Bu proteinler, miktarı %1'i oluşturan fakat ihmal edilemeyecek kadar önemli olan diğer proteinleri maskeler (5). İdrar örnekleri bu sebeple biyobelirteç keşfi için avantaj sağlar. Ayrıca idrar, vücuttaki kanın ultra-filtre edilmiş halidir ve kana kıyasla daha stabildir. Bu sebeple son yıllarda idrar proteinlerine ilgi duyulmaya başlanmıştır (4).

Proteomiks, bir hücre, doku, vücut sıvısı veya organizmada protein ekspresyonu, protein-protein etkileşimleri, protein modifikasyonları, protein fonksiyonu ve lokalizasyonunu inceleyerek normal ve hastalık durumlarının biyolojisini daha iyi anlamamızı hedefleyen bir kavramdır (6).

Yeni bir yaklaşım olarak önemi giderek artan "proteomiks" çalışmaları, özellikle insan genom projesinin tamamlanmasının ardından hız kazanmış ve yaygın bir uygulama alanı bulmuştur. Genom araştırmaları, özellikle insan genom projesi,

genlerin yapı, fonksiyon ve ekspresyonlarına ait ayrıntılı bilgileri gün ışığına çıkarmıştır. Bunun yanında genom projesi genetik bilginin organizma tarafından nasıl kullanıldığını açıklamakta yetersiz kalmıştır. Bu noktadan sonra genetik bilginin son ürünü olan proteinlerin işlev, yapı ve yerlerini belirlemek amaçlı yeni bir yaklaşım olan ve “genom sonrası çağ” olarak belirlenen proteomiks uygulamaları her geçen gün önemini artırmıştır (7).

Proteom çalışmalarına duyulan ihtiyaç iki nedenden dolayıdır. RNA seviyesindeki regülasyonlar proteine yansımayaabilir. Örneğin 23 farklı insan hücre hattında yapılan bir çalışmada 1066 gen ürününe ait RNA ve protein profilleri karşılaştırılmış ve aradaki ilişkinin tüm iyimserliğe rağmen %33’ü geçmediği görülmüştür. Genomiks, hastalıklar ve ilgili genler arasındaki ilişkinin bir kısmını ortaya koymasına rağmen son ürün olan proteinlerin çoğunun maruz kaldığı Post-Translasyonel Modifikasyonları (PTM) öngöremez ve bunlarla hastalıklar arasındaki ilişkiyi kuramaz. Başka bir ifadeyle DNA/RNA elde edilmesi ve çalışılması kolay örnekler olmasına rağmen, bunlardan elde edilen bilgide sınırlamalar mevcuttur. Ribozomlarda sentezleri sonrası proteinler basit kimyasal grupların veya kompleks moleküllerin eklenmesi ile 300’den fazla çeşit PTM’a uğrarlar (8).

Proteinler organizmada, biyolojik sistemlerin işlevleri ve hücre fenotiplerinden sorumludurlar. Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran salgıladıkları proteinlerdir. Kanserli hücre proliferasyonu ve aşırı protein sekresyonu sıklıkla birbirleriyle ilişkilidir ve diğer yöntemlerin yeterli olmadığı erken dönemde kanda saptanabilirler. Proteomik yaklaşım proteinlerin hücreden nasıl salgılandığı, hücrede hangi işlevi yerine getirdiği ve karşılıklı iletişimleri, hücre zedelenmesinden sonra nasıl değişim gösterdiği ve hastalıkların spesifik belirteçleri olarak oynayabilecekleri rolü araştırır (9).

Hastalık tanı ve prognozu için klinik açıdan yararlı biyobelirteçlerin tanımlandığı çalışmalarda, çeşitli doku ve vücut sıvılarının protein ekspresyonundaki dinamik değişimlerin incelenmesi amacıyla proteomik teknikler başarıyla kullanılmaktadır. Bazı klinik olgular ve sağlıklı kişilere ait biyolojik sıvılardaki mikro düzeyde ve çok sayıda proteinin aynı anda karşılaştırıldığı proteomik analizler

günümüzde hastalığa spesifik biyobelirteç bulunmasında etkin bir yöntem olarak kabul edilmektedir (1).

Normal idrarda ilk proteomiks çalışmaları 1979 yılında, daha proteomiks kavramı bile icat edilmemişken yapılmıştır. İdrar proteinlerinin 2 Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi (2-D PAGE) yöntemi ile ayrımı o yıl sunulmuştur (10). Üç yıl sonra yine aynı laboratuvar tarafından yapılan başka bir çalışmada bazı major idrar proteinlerinin pozisyonlarını gösteren iki boyutlu elektroforetik harita gösterilmiştir (11). O sıralar temel problem pH gradiyentlerindeki istikrarsızlığa bağlı olarak kullanılan 2-D PAGE'in tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıydı. 2-D PAGE ile idrar proteinleri için bir referans haritası 1995 yılında 10 sağlıklı kişinin idrarının analizi ile oluşturuldu. Proteinlerin tek tek tanımlanması için uyumlu antikolar ile koelektroforez, immünblotlama ve afinite kromatografisi kullanılmıştır (12). Bir sonraki sene normal idrar proteinleri boya presipitasyonu yöntemi kullanılarak izole edilmiş ve 2-D jel ile görüntülenmiş fakat bu proteinlerin hiçbiri tanımlanmamıştır (13). HPLC-ESI-MS (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyonlu-kütle spektrometresi) ile Heine ve ark, 34 peptid ve protein fragmanı tanımlamışlardır (14). 2001 yılında LC-MS/MS kullanılarak yapılmış bir çalışmada ise fraksiyone olmamış normal idrardan gelen toplam 124 tane protein bileşeni tanımlanmıştır (15). Thongboonkerd ve ark. yaptıkları çalışmada asidik ve hidrofobik proteinler için aseton presipitasyonu, bazik, hidrofobik proteinler ve membran proteinleri için ise ultrasantrifüj yöntemi uygulanmış ve elde edilen proteinler 2-D PAGE ile ayrıştırılarak MS'de analiz edilmiştir. Toplam 47 protein tanımlanmıştır (16).

Özet olarak farklı proteom analizleri ile idrarda çeşitli araştırmacılar farklı proteinler tespit edilmiştir. Bu çalışmada amaçladığımız noktalar prostat kanserli hastaların idrarlarında kontrol grubu ile birlikte proteom analizi yapmak, farklı teknikleri denemek, olası protein farklılıklarını tespit etmek ve daha ileride yapacağımız biyobelirteç çalışmalarına temel oluşturmaktır. Kompleks analiz sistemlerinin yer aldığı proteom çalışmalarında idrar analizi ile ilgili olası sınırlılıklar, olumsuzluklar ve sonuçlar bu çalışmada incelemek istediğimiz konular arasında yer almıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Proteomiks

“Proteom” terimi ilk defa 1994 yılında bir sempozyumda Marc Wilkins ve ark. tarafından bir genomun ifade ettiği tüm proteinleri tanımlamak için önerilmiş (PROTein-GenOME) ve 1995 yılında doktora tezinin parçası olarak bilim literatürüne kazandırılmıştır. Daha genel bir tanımlama ile “proteom” terimi, belirli bir anda ve şartlar altında hücrenin veya organizmanın sahip olduğu proteinlerin tümünü tanımlamak için kullanılmaktadır. Bir organizmada genomun değişmeyen doğasının tam tersi şekilde proteomun içeriği dokudan dokuya hatta bir hücreden diğer bir hücreye farklılaşabilmekte, çevresel faktörler, yaş, cinsiyet, hastalıklar ve fizyolojik durumlar (hücre siklusu, apoptoz gibi) gibi iç ve dış faktörlere etkileşerek değişim gösterebilmektedir (7,17).

Genom projesinin tamamlanmasının ardından insanda yaklaşık 20.000 ile 25.000 arasında protein kodlayan genin var olduğu tahmin edilmektedir. Alternatif splicing ve PTM’ler gözönüne alındığında bu sayı 2 milyon proteine ulaşabilmektedir (8).

İnsanlardaki gen sayısı konusunda henüz net bir bilgi oluşmadığı için proteom çalışmalarında proteinlerin sayıları da değişik araştırmacılar tarafından farklı protein sayısının görülmesine neden olmaktadır. Çünkü gen sayısı ile protein sayısı arasındaki sayısal ilişki henüz çok net değildir. İnsan genom projesinin tamamlanması ile organizmanın karmaşıklığının kompleks bir genomdan ziyade kompleks bir proteom ile daha kolay açıklanabileceği açıklık kazandı (18, 19).

Bu evrende yaşayan herkes ya ailesi, ya yakın çevresi ya da kendisi nedeniyle kanserle karşılaşmaktadır. Günümüzde kanser ABD’de kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenlerinin ikinci sırasında yer almıştır, dünyada birçok ülkede de durum daha farklı değildir. Kanserinin erken teşhis ve tedavisi için yapılan araştırmalara yılda milyon dolarlar harcanmakta fakat istatistiksel değerlendirmeler

bu hastalık nedeniyle ölümlerin hala çok fazla olduğunu göstermektedir. Çünkü kanser çok kompleks ve çeşitli tipleri ve alt tipleri olan bir hastalıktır. Kanser ayrıca kişiye özgü olarak gelişim ve prognoz gösteren bir hastalıktır. Aynı tipteki bir kanser türü, aynı tedaviye rağmen farklı kişilerde farklı prognozla sonuçlanmakta kişiye özgü bir hastalık gibi davranabilmektedir. Bu durum kanserde kişiye özgün moleküler değişimlerin olduğunu düşündürdüğü için, günümüzde bu alana çözüm üretebilecek ileri teknolojiler geliştirilmiştir (20).

4.2. Proteomiks Çalışmalarında Kullanılan Metodlar

Klinik proteomiksin bir amacı da hastalığa özgü belirteç (biyobelirteç) tanımlamaktır. Bu amaçla normal doku ve biyolojik sıvılardaki protein ekspresyonu ile hasta doku ve sıvıdaki protein ekspresyonu karşılaştırılır.

Klinik proteomiks çalışmalarında iki ana teknolojik yaklaşım kullanılır. biri hastalığa özgü biyo-belirteç keşfetmek amacıyla protein ayırma tekniklerinin ve kütle spektrometrisinin (MS) kombinasyonu iken diğeri tanı veya tedavi amacıyla keşfedilen biyo-belirteçlerin kullanıldığı protein microçip teknolojisidir.

Biyobelirteç keşfi çalışmalarında izlenen stratejiler "top-down" ve "bottom-up" olarak isimlendirilmiştir. "Top-down" stratejisinde, izole edilen proteinlerin triptik sindirimi ve bu triptik peptidlerin MS ile analizinin ardından 2 boyutlu elektroforez ya da çok boyutlu kromatografi ve kapiller elektroforez kullanılır. Bir diğeri ismi de çok boyutlu protein tanımlama teknolojisi ya da MudPIT/shotgun yaklaşımı olan "Bottom-up" stratejisinde ise proteinler tripsin ile önce küçük peptidlere parçalanır ve daha sonra elde edilen bu peptidler ters faz kromatografi ile birleştirilmiş güçlü katyon değişim kromatografisi ile ayrıştırılarak MS ile analiz edilirler (21).

4.2.1. Pre-fraksiyonlama

Kompleks proteomda bulunabilecek protein bileşenlerinin sayısını arttırmak amacıyla 2D elektroforez veya kütle spektrometresinden önce numunelerin pre-

fraksiyonunun yapılması temel bir yaklaşımdır. Pre-fraksiyonlamak için kromatografik ve elektroforetik yöntemler kullanılmaktadır (21).

4.2.2. Protein Ayırıştırma

İdrarın karmaşık yapısı nedeniyle Western Blot ve diğer immünojenik metodlarla protein ve peptid karakterizasyonu kapsamlı olmamaktadır (22) İdrar proteomiksinde protein ayırıştırma için en çok kullanılan metod, yüksek çözünürlük gücüne sahip bir analitik teknik olan 2-D PAGE'dir. Burada proteinler önce izoelektrik noktalarına göre ayrılmasını sağlayan izoelektrik odaklama (IEF) ile ayırıştırılır, ikinci boyutta ise SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ile proteinler molekül ağırlıklarına göre ayırıştırılır. Ayırıştırıldıktan sonra proteinler boyanır ve protein spotları analiz edilir. Tüm yazılım paketleri, kontrol ve deney jellerini eşleştirerek aralarındaki yoğunluk farkını belirler ve bu şekilde protein noktalarını ölçerler. Bu yazılımlar ekspresyonu değişen protein noktalarını listeledikleri bir rapor da hazırlarlar. İlgilenilen protein noktaları tek tek jelden kesilerek tripsin gibi bir proteaz ile enzimatik olarak sindirildikten sonra MS ile analiz edilebilir ve protein tanımlamak için dizileme veri tabanından araştırılabilir (21).

Yüzlerce protein noktası 2-D PAGE ile ayırılabilir. Ancak her bir noktanın protein kimlik tespiti için MS/MS ile ayrı ayrı analiz edilmesi gerektiği için bu teknikler kullanışlı değildir (22). 2-D-PAGE her ne kadar proteomiks için standart bir yöntem olarak kullanılsa da MS ile çevrimiçi integrasyonunun olmaması ile birlikte sınırlı bir dinamik aralığının ve moleküler kütle aralığının olması gibi dezavantajları, çeşitli likit faz-bazlı çok-boyutlu ayırıştırma tekniklerinin geliştirilmesine sebep olmuştur. Çevrimdışı çok-boyutlu sıvı kromatografi (LC) sistemleri proteomiks çalışmalarında profillemeye amacıyla kullanılmıştır. Ancak çevrimiçi bağlantılı kromatografik ve elektroforetik teknikler tercih edilmektedir. Çünkü en önemlisi MS ile kendi çevrimiçi bağlantısının olması gibi ilave bazı avantajları vardır (21).

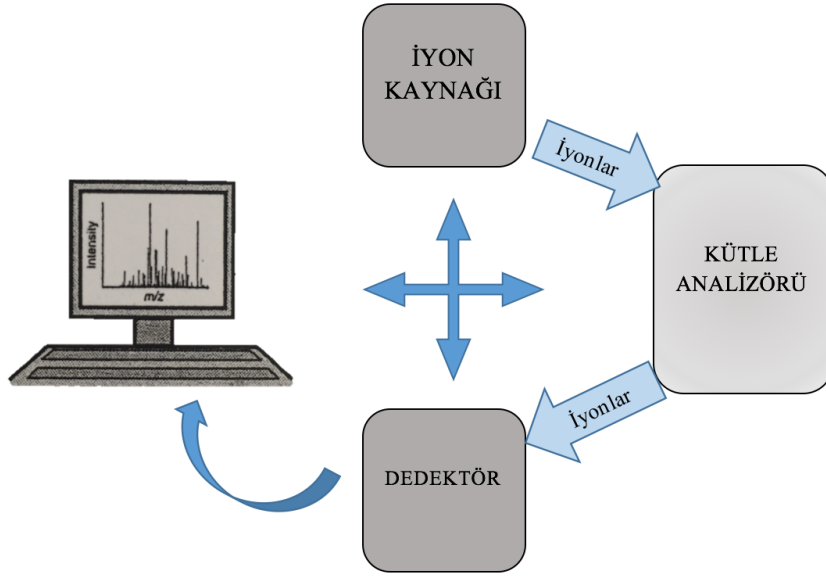
Protein tanımlama yöntemi olarak kütle spektrometresi (MS) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir kütle spektrometresinin iki ana bileşeni vardır; İyonizasyon

tekniki ve kütle analizörü. Yüksek duyarlılık ve doğrulukta kütle analizi için proteinleri ve peptidleri uçurmak ve iyonize etmek için en sık kullanılan iyonizasyon yöntemi matriks-destekli lazer dezorbsiyon/iyonizasyonu (MALDI) ve elektrosprey iyonizasyonudur (ESI). Dört farklı tipte kütle analizörü vardır: Uçuş zamanı (Time-of-Flight, TOF), Quadrupol (Q), iyon-yakalayıcı (Ion-Trap, IT), Fourier transform iyon siklotron rezonans (FTICR) (23).

4.2.3. Kütle Spektrometresi

Bir elektrik veya manyetik alanda, parçacıkların hareketi temeline dayanarak yüklü partiküllerin molekül ağırlıklarını analize imkân sağlayan kütle spektrometresi (MS) tekniği geliştirilmesi proteomiks çalışmalarındaki anahtar gelişmedir. 1990'ların başında peptitleri iyonize hale getirmeyi ve bu peptid iyonlarını kütle spektrometresine göndermeyi başararak bu alanda büyük bir atılım gerçekleştiren çalışmaları ile Fenn ve Tanaka 2002 yılında Kimya alanında Nobel ödülü kazanmışlardır (24-26).

İyon kaynağı, kütle analizörü ve detektör olmak üzere üç bileşenden oluşan kütle spektrometresi, analiz edilecek maddelerin kütleyük ("mass to charge" [m/z]) oranlarını kantite etmek için kullanılır. Bu kantitasyondan kütle belirlenir ve bu kütleye sahip protein tanımlanır. Bir kütle spektrometresinin temel bileşenleri: Moleküllerin iyonize olduğu ve gaz fazına geçtiği iyon kaynağı, iyonların işlendiği kütle analizörü ve bir dedektördür. Tüm bu sistemler bilgisayar iş-istasyonuna yüklü bir yazılım aracılığıyla kontrol ve senkronize edilmektedir (Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.3. Bir kütle spektrometresinin temel bileşenlerinin şematik gösterimi.

Bir kütle spektrometresinin en önemli bileşenleri iyonizasyon kaynağı ve kütle analizörüdür. Proteinleri veya peptidleri MS analizleri için gaz fazına geçirmek ve iyonlaştırmak için en çok kullanılan iki teknik MALDI ve ESI'dir. ESI ile solüsyondaki peptidler ve proteinler uçucu hale getirilir ve iyonize edilir. MALDI ile lazer ışınları katı matriksi uyarır ve analiti iyonize eder. İyonlar daha sonra kütle analizörüne yollanır (27).

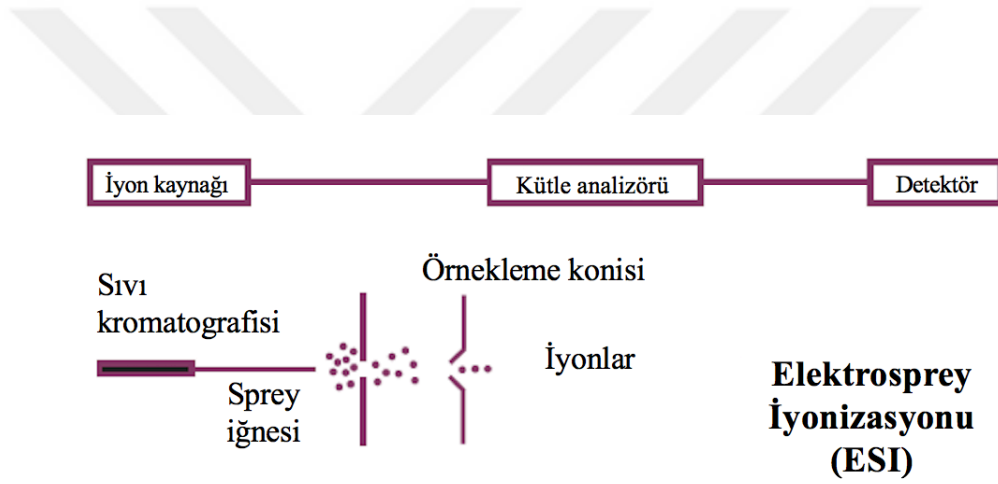
Güncel proteomiks araştırmalarında kullanılan 4 temel kütle analizörü tipi vardır. Bunlar: iyon yakalayıcı, uçuş zamanı (TOF); Quadrupol ve Fourier transform ion cyclotron (FTMS) analizörleridir (23).

Proteomiks çalışmalarında sıklıkla kullanılan peptid ve protein iyonizasyon metodları. A, Elektrosprey İyonizasyon (ESI) ile solüsyondaki peptidler ve proteinler uçucu hale getirilir ve iyonize edilir. B, matriks-destekli lazer dezorbsiyon/iyonizasyonu (MALDI) ile lazer ışınları katı matriksi uyarır ve analiti iyonize eder. İyonlar daha sonra kütle analizörüne yollanır (27).

4.2.4. Kütle Spektrometresi Çeşitleri

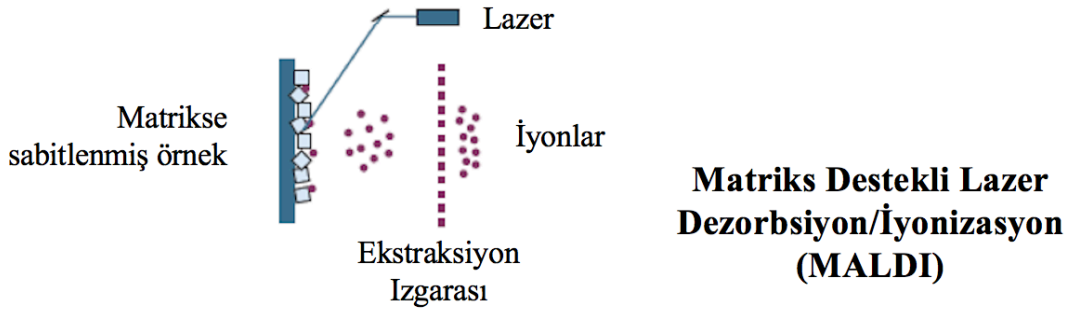
Proteinleri veya peptidleri MS analizleri için gaz fazına geçirmek ve iyonlaştırmak için en çok kullanılan iki teknik matriks-destekli lazer dezorbsiyon/iyonizasyonu (MALDI) ve elektrosprey iyonizasyonu (ESI).

ESI tekniği analit ve çözücü molekülleri içeren akışkanın ince kapillerde yüksek voltaj ve atmosferik basınçta dağılması temeline dayanmaktadır. Bu sistemde yüklü peptidler, vakum koşulu altında geçer ve m/z oranlarına göre elektrik alanda ayrılırlar. Bu teknolojilerin sağladığı en önemli avantaj ardı ardına kütle spektrometrisi uygulanabilmesidir (MS/MS) (28-29).



Şekil 4.2.4.1. Numunenin ESI sistemine girişi ve iyonizasyon süreci

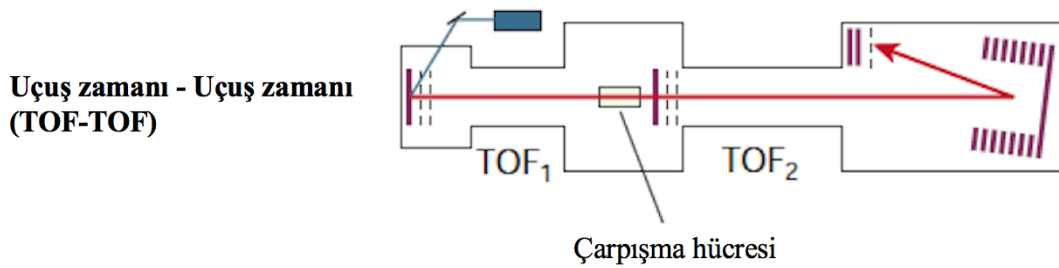
MALDI, 1988 yılında Karas ve Hillenkamp tarafından sunulan ve ışığı absorbe eden bir matriks varlığında analizi yapılan molekülün yüzeyden kopma ve iyonizasyonu için gerekli enerjiyi lazerden kullanan bir çarpma iyonizasyon tekniğidir (30).



Şekil 4.2.4.2. Numunenin MALDI sistemine girişi ve iyonizasyon süreci

Parçalanmamış peptidlerin kütlelerinin ölçümünde MALDI ile birlikte genellikle TOF analizörleri kullanılırken, ESI çoğunlukla iyon traps ve üçlü quadropol ile birlikte ve seçili prekürsör iyonların parça iyon spektrumlarını üretmek için kullanılmaktadır (23).

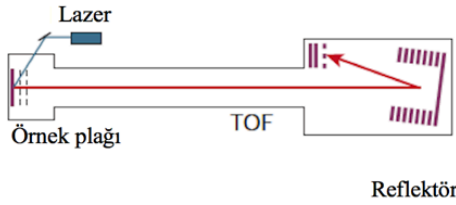
Proteom araştırmalarında kütle spektrometresi ve farklı enstrümantal konfigürasyonlar kullanılır. TOF- TOF cihazı iki TOF bölümü arasında bir çarpışma hücresi içerir. İlk TOF bölümünde belli bir m/z oranına sahip iyonlar seçilir, çarpışma hücresinde fragmanlarına ayrılır ve ikinci TOF bölümünde ise fragmanların kütlelerine göre ayrıştırılır (Şekil 4.2.4.3).



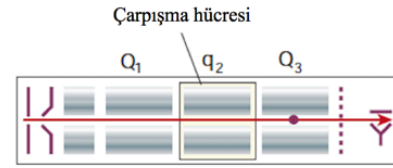
Şekil 4.2.4.3 MALDI-TOF-TOF cihazının gösterimi

Şekil 4.2.4.4'te gösterilen reflektör TOF cihazında, iyonlar yüksek kinetik enerjiye doğru hızlandırılmış ve hız farklarına bağlı olarak bir uçuş tüpü boyunca ayrıştırılmıştır. İyonlar kinetik enerjideki küçük değişiklikleri kompanse eden reflektörde çevrilir ve daha sonra gelen iyonları güçlendiren ve sayan bir dedektöre çarpar. Quadrupol kütle spektrometreleri dört çubuk arasında zamanla değişen elektrik alanlarına göre sadece istenen belirli bir m/z oranına sahip iyonların stabil bir yörüngede kalmasını sağlayarak seçim yapar. Yine belirli bir m/z oranına sahip iyonlar ilk bölümde seçilir (Q1), çarpışma hücrelerinde fragmanlarına ayrılır (q2) ve Q3'te de fragmanlar ayrıştırılır. Lineer İyon-Trap'de, iyonlar Q3'te kırmızı nokta ile gösterilen quadrupol bölümünde yakalanır. Daha sonra rezonant elektrik alanı ile uyarılır ve fragmanlar taranarak tandem kütle spektrumu oluşturulur.

Reflektör uçuş zamanı (TOF)

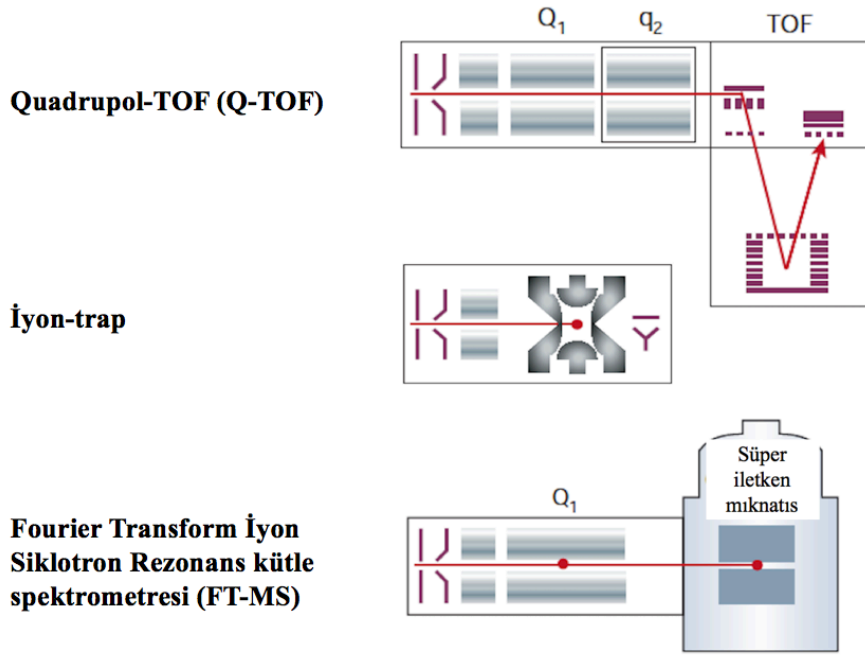


Triple quadrupol veya lineer iyon-trap



Şekil 4.2.4.4 reflektör-TOF ve Lineer iyon-trap konfigürasyonlarının kendi tipik iyon kaynakları ile gösterimi

Proteom araştırmalarında kullanılan 3 farklı enstrümantal konfigürasyon kendi tipik iyon kaynakları ile birlikte Şekil 4.2.4.5'te gösterilmiştir. Quadrupol-TOF (Q-TOF) cihazında triple quadrupol'ün ön kısmı ile reflektör bölümü iyonların kütlelerini ölçmek için birleştirir. İyon-Trap (üç boyutlu), iyonları lineer iyon-trap'de olduğu gibi yakalar, belirli m/z oranına sahip iyonları fragmanlarına ayırır ve daha sonra tandem kütle spektrumunu oluşturmak için fragmanları tarar. FT-MS cihazı da iyonları yakalar fakat güçlü bir manyetik alan yardımıyla yapar bunu. Şekilde FT-MS bölümünde, etkili izolasyon, fragmentasyon ve fragman tesbiti için FT-MS ile lineer iyon-trap birleşimi gösterilmektedir (31).



Şekil 4.2.4.5 Q-TOF, İyon-trap ve FT-MS konfigürasyonlarının kendi tipik iyon kaynakları olan ESI ile gösterimi

Kütle spektrometresinin gücü, tandem kütle spektrometrelerinin (MS/MS) de eklenmesi ile daha da büyük hale gelmiş ve triptik peptidlerin birincil ayrıştırılmasını gerçekleştirmek amacıyla da tandem MS, LC ile birleştirilmiştir. Böyle bir sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak, kompleks bir karışımdaki spesifik proteinler, tek tek her proteinin ön fraksiyonlanmasına gerek kalmadan tanımlanabilir. quadrupol/TOF, quadrupol/linear iyon trap gibi hibrit sistemler ve triple quadrupol, TOF/TOF gibi proteomiks çalışmalarında kullanılan analizörler için tandem kütle spektrometreleri kullanılabilir (21).

Tripsinizasyon yöntemi ile MS'de protein tanımlamak için kullanılan iki temel yaklaşım vardır. İlki peptid kütle parmak izi kullanılarak MALDI-TOF MS yöntemiyle ve ikincisi tandem MS ile peptidleri diziler. Tripsin ile parçalanmış protein ürünlerinin hepsinin molekül ağırlıklarının kendi kütle parmak izleri vardır. tripsin ürünlerinin teorik büyüklükleri ile molekül ağırlıkları bilinen protein sekanslarından (protein veri bankalarından) eşleştirilir. Çünkü tripsin lizin ve arjininden sonra bölmektedir ve bir bilgisayar analizi ile kolaylıkla kendine özgü peptid dizisi külesine

dönüştürülebilmektedir. Ancak protein kütle parmakizi analizleri çoğu durumda örneğin insan çalışmaları gibi büyük veri bankaları taranırken yeterince spesifik değildir.

Peptid dizi analizi için seri olarak bağlanmış iki kütle spektrometresi kullanılır. İyonizasyondan sonra yüklü peptidlerden oluşan karışım ilk kütle spektrometresine (quadrupol ya da iyon-trap analizörü) girer ve burada en yoğun peptid piklerinin listesinin oluşturulması için m/z oranlarına göre ayrılırlar. Cihaz, sadece belirli bir m/z oranına sahip olan peptidlerin inert gaz molekülleriyle çarpıştırıldığı kolizyon hücrelerine yönlendirileceği şekilde ayarlanır. Bu çarpışmalar sonucunda peptid, peptid iyonunun ucunda bulunan bireysel aminoasitlerin ardışık olarak çıkarılmasından kaynaklanan bir dizi fragmanlara ayrılır. Bu fragmanlar ikinci kütle spektrofotometresinde (çoğunlukla TOF cihazı) m/z oranlarına göre ayrıştırılır. Amino asidin kütlesine bağlı olarak değişen ardışık fragmanlar arasındaki molekül ağırlıklarının farkına göre peptid sekansı tanımlanır (21).

Proteomik alanında son teknolojinin gelişmesini sağlayan ve ProteinÇip biyolojik belirteç sisteminin temelini oluşturan SELDI'nin geliştirilmiş versiyonu olan SELDI ProteinÇip Sistemi, ProteinÇip okuyucusu, ProteinÇip dizinleri ve bilgisayar yazılımı olmak üzere toplam 3 bileşenden oluşur. ProteinÇip teknolojisinde uygulanan ayrıştırma tekniği 2D jel elektroforezi teknolojisinde uygulanan birinci boyut ayırma olarak bilinen izoelektrik odaklamadır. Bu aşamada analiz edilecek örnekler, iyon değişimi ile ayrıştırmaya tabii tutularak farklı pH'larda elde edilirler. Farklı pH'larda elde edilen proteinlerin değişik kimyasal yüzeye sahip ProteinÇip "array"lere bağlanma eğilimi proteinlerin izoelektrik noktalarına bağlı olarak değişir.

SELDI-TOF MS sistemi de MALDI-TOF MS teknolojisi gibi uçuş süresi (TOF) tekniği ile peptit ve proteinlerin kütle/yük oranlarının kesin ölçümüne dayanan bir tekniktir. SELDI teknolojisi ayrıca MALDI-TOF MS'den farklı olarak proteinlerin ayrıştırılması ve seçilmesi için 2D jel elektroforezi uygulamasını gerektirmeyen ve biyolojik belirteç bulma çalışmalarında küçük molekül ağırlığındaki proteinlerin ayırımında daha etkin kullanılan bir teknolojidir (32).

Mikroçip teknolojisi (Mikroarray) belirli katı bir yüzeye gönderilen çoklu biyomoleküllerin immobilizasyonu ile üretilmektedir. Proteinlerin küçük bir alanda yakalanarak sabitlenmesi ve sonra bu proteinlerin analiz edilmesi prensibine dayanmaktadır. Protein mikroçipleri genellikle 3 kategoride incelenir: fonksiyonel mikroçipler, analitik mikroçipler ve ters-faz mikroçipler (21).

Fonksiyonel mikroçipler, enzim-substrat etkileşimleri veya protein-protein etkileşimleri gibi biyokimyasal özellikleri analiz etmek için kullanılır. Protein çip üzerindeki reaktif proteinler floresan, fotokimyasal veya radyoizotop yöntemlerle işaretlendikten sonra belirlenirler. En çok floresan işaretleme kullanılmaktadır. Protein mikroçip teknolojisi ile MS'in birlikte çalıştığı sistemlerde çiplere bağlı proteinler MS ile belirlenmektedir. SELDI-TOF MS dayalı protein mikroçipler MALDI-TOF MS'in varyantı olmakla birlikte aynı anda fazla sayıda örneğin ve özellikle küçük molekül ağırlıklı proteinlerin analizini sağlamaları açısından avantajlıdır. Analitik mikroçiplerde proteinler (antijen veya antikolar) bir destek üzerinde sabitlenmiştir. Mikroçip, numune (idrar) ile problanır ve protein bağlanması doğrudan etiketleme veya dolaylı tespit ile değerlendirilir. Analitik mikroçiplerin bir diğer kullanım alanı da sağlıklı ve hasta kişilerin vücut sıvılarındaki protein profilinin değişimini incelemektir. En son olarak da ters-faz mikroçiplerde hücre lizatları, serum veya idrar örnekleri yüzeye sabitlenir ve spesifik tespit reaktifleriyle problanır (33).

Literatürde SELDI-TOF-MS analizleri ile ilgili iki önemli konuya dikkat çekilmektedir. Bunlardan birincisi kalitesiz ve analitik validasyonu yetersiz olan spektrumların analizi öncesinde bir seçim süreci sağlamasıdır. Bu prosedür proteomik verideki kirliliği azaltacak ve tanısal geçerliliğindeki varyasyonu düşürecektir. Tartışılan bir diğer sorun ise tanısal geçerlilik hakkındadır. SELDI-TOF MS ile protein örüntüsü verileri az numune sayısı ile büyük miktarda veri elde edilmiştir. Ancak hedefin seçilmesinde, çalışılacak olan küçük grubun çok kesin kriterler ve mümkün olduğunca az sayıda değişkene sahip olması gerekmektedir.

Belirlenen hedef gruba göre bunlar daha geniş bir vaka grubuyla doğrulanmalı ve biyoinformatik araçlar etkili bir biçimde kullanılmalıdır. Aday proteinlerin çoğu akut faz yanıt proteinlerinden oluşur ve kansere spesifik proteinler henüz klinik bir geçerlilik kazanmamıştır (34).

4.3. İdrar ve Özellikleri

İdrar analizi böbrek ve idrar yolu hastalıklarının varlığını ve şiddetini değerlendiren en eski ve temel testlerden birisidir. Aynı zamanda ucuz, zaman almayan, kolay uygulanabilen bir testtir. Non-invaziv bir test olması nedeniyle, sağlık kuruluşlarında her gün çok sayıda hastanın idrar analizi yapılmaktadır. Nefrolojik şikayetleri olan bir hastanın doğru değerlendirilmesinde, iyi yapılmış bir idrar analizinin sadece pozitif bulguları değil, negatif bulguları da tanısal önem taşımaktadır.

Kan plazması nefronların glomerulus kısmından Bowman kapsülüne süzülür ve buradan tubulus içinde akarak devam eder. Plazma glomeruluslardan süzüldükten sonra tubulusta ilerlerken bileşiminde değişiklikler oluşur ve son olarak böbreği idrar olarak terk eder. İdrar; nefronda glomerüler filtrasyon, tubuler geri emilim ve tübüler sekresyon olayları sonucunda oluşan ve idrar yollarından dışarı atılan sıvıdır. Günde yaklaşık 170 litre ultrafiltratın glomerüller tarafından işlenmesi ile 1200 mL kadar idrar oluşur. İdrarda %95-96 oranında su bulunur. İdrarın geri kalanını suda çözünmüş olarak bulunan inorganik katyonlar, anyonlar ve organik maddeler oluşturur. İdrardaki tüm organik maddelerin yarısını üre, geri kalanın büyük kısmını kreatinin ve ürik asit oluşturur. İdrarda erimiş başlıca anorganik madde klordur, bunu sodyum ve potasyum izler. Bunların dışında eser miktarda bir çok anorganik madde hormonlar, vitaminler ve ilaçlar bulunur. Plazma filtratının bir parçası olmamalarına rağmen; idrarda hücreler, silendirler, kristaller ve bakteriler de gözlenmektedir (32).

4.3.1. İdrar Numunesinin Tipleri

Sabah idrarı: Sabah ilk idrarı rutin idrar analizi için tercih edilen en konsantre ve asidik idrardır. Mesanede idrarın uzun süre kalmasının üriner partiküllerin yıkılmasına sebep olduğu düşüncesi ile sabahın ikinci idrarını tavsiye eden literatürler de vardır. Sabah idrarı özellikle hücrelerin değerlendirilmesi, nitrit, protein ve bilirubin tayini için uygundur.

Spot (rastgele idrar numunesi): Günün herhangi bir zamanında alınan idrar numunesidir.

24 saatlik idrar numunesi: Hasta uykudan kalktıktan sonraki ilk idrarını tuvalete boşaltır ve ertesi gün aynı saate kadar tüm gün ve gece boyunca çıkan idrarı aynı kap içinde toplar. Böylece 24 saatlik idrar toplanmış olur.

İdrar numunelerinin korunması: Eğer idrar hemen analiz edilemiyorsa %10'luk asetik asit ile asidifiye edilmelidir.

4.3.2. İdrar Numunesinin Toplanması

İdrar analizi için idrar 100 mL'lik, temiz, kuru, tek kullanımlık ve kapaklı bir kaba alınmalı ve ideal olarak yarım saat içinde bakılmalıdır. İdrar içindeki partiküller bekleme ile özellikle idrar alkali ise veya osmolalite ve dansitesi düşük ise kolayca parçalanır. Bu nedenle idrar numunesinin analizinin en fazla 2-4 saat içinde tamamlanması önerilmektedir. Hemen analiz edilemeyen numuneler 2-8°C'de saklanmalıdır. Numunenin bekletilmesi fosfat ve ürat kristallerinin çökmesine neden olur. Bu da testin doğru değerlendirilmesini etkiler.

Yapılacak analizin özelliğine göre idrar toplanır. 2, 4, 24 saatlik idrar numuneleri kantitatif analizler için kullanılabilir. İdrarda nadiren çıkan maddeler için daha konsantr olmaları nedeniyle sabah idrarı tercih edilebilir. Hastaya idrar toplama şekli tarif edilmeli ayrıca uyması gereken kurallar ve varsa uyması gereken diyet yazılı olarak verilmelidir.

4.3.3. İdrarın Fiziksel Özellikleri ve Analizi

Normal idrar berraktır. Ancak üratlar, fosfatlar, karbonatlar, oksalatlar, radyografik maddeler, mukus, squamöz epitel hücreleri, eritrosit, lökosit, epitel hücresi, silendir, bakteri veya mukus bulunması idrarın görünümünü değiştirir. İdrardaki partiküller özellikle eritrosit, lökositler, bakteri, skuamöz epitel hücreleri ve

kristallerin artışı idrarı bulanık hale getirir. Üriner enfeksiyon ve genital sekresyonlardan kaynaklanan kontaminasyon idrarın bulanık olmasının en sık sebepleridir.

Normal idrar rengi, açık sarı-koyu sarı arasında değişir. Beklemekle, idrardaki renksiz ürobilinojenin renkli ürobiline oksidasyonu ile idrar rengi koyulaşır. Patolojik durumlar, ilaçlar ve gıdalar idrarda renk değişikliklerine neden olabilir.

İdrarın kendine özgü bir kokusu vardır. Beklemiş idrar amonyak kokar. Ketonüride aseton kokusu bulunur. Anormal keskin idrar konusunun en sık nedeni enfeksiyon durumunda, bakteriler tarafından üretilen amonyaktır. Akçaağaç şurubu hastalığı (akçaağaç şurubu kokusu), fenilketonüri (küp kokusu, fare idrarı kokusu), izovalerik asidemi (terli ayak koku) ve hipermetionemi (ekşimiş tereyağı veya balık kokusu)

Yenidoğan; 30-60 mL/24 saat, erişkin; 600-1800 mL/24 saat idrar çıkarır. İdrar miktarı 24 saatte 2500 mL'den fazla ise poliüri; 50 ile 400 mL arasında ise oligüri ve 50 mL'den az ise anüri olarak adlandırılır. Diüretik ilaçlar, kafein, alkol, intravenöz sıvı verilmesi, fazla protein ve tuz alımı poliüri nedenleri arasındadır. Dehidratasyon, renal iskemi, toksik ajanlar, civa biklorid, bilateral hidronefroz ve prostatik hiperplazi oligüriye neden olur (32).

4.3.4. İdrarın Kimyasal Analizi

İdrarın kimyasal analizi rutin laboratuvarlarda genellikle reaktif emdirilmiş pedler içeren idrar stripleri ile yapılmaktadır. Bu stripler dansite, pH, protein, nitrit, glukoz, bilirubin, ürobilinojen, keton, kan ve lökosit esteraz için reaktif pedlerini içerir (32).

4.3.5. İdrarda Protein Tayini

İdrar glukozu gibi normalde basit yöntemler ile tespit edilemeyecek düzeydedir (150 mg/gün). İdrar proteinlerini özellikle glomeruluslardan filtre olabilen düşük molekül ağırlıklı serum proteinleri ile genitoüriner sistemde üretilen proteinler oluşturur. İdrar proteinlerinin yaklaşık üçte birini albumin oluşturur. Geri kalan idrar proteinleri de plazmadan filtre olabilen α , β ve gama globülinlerdir (32).

4.3.5.1. İdrarda Protein Elektrofrez

Proteinürisi olan hastalarda idrarda atılan protein protein fraksiyonlarının dağılımını değerlendirmek amacı ile kullanılır. Normalde idrarla atılan protein çok düşüktür. İdrar konsantre edilmeden yapılan elektroforez ile bir elektroforegram görmek mümkün değildir. İdrarla atılan proteinlerin bir kısmı glomerüler filtrata geçtikten sonra geri emilemeyen proteinlerden oluşur. Küçük bir kısmı ise böbrek tubuluslarından salgılanan proteinlerden (Tamm Horsfall) oluşur. Küçük molekül ağırlıklı proteinlerin plazmada artışı diğer bir proteinüri nedenidir (taşma proteinürisi).

Glomerüler proteinüriler (örn: glomerülonefrit, nefrotik sendrom) glomerüler membranın seçici geçirgenliğinin bozulması sonucu ortaya çıkarlar. Tübüler proteinüri tübüllerin fonksiyonunu bozan durumlarda ve interstisyel nefritte görülür. Taşma proteinürisinin en önemli nedeni para-proteinemilerdir. Hemoglobinüri ve myoglobinüri bu grupta sayılabilir.

Nefrotik sendromda en çok atılan protein albumindir. Glomerülonefritlerde daha büyük moleküllü proteinlerin atıldığı görülür. Tübüler proteinürilerde daha çok α -2-mikroglobulin, lizozimler, retinol binding protein, α -1-mikroglobulin gibi düşük ağırlıklı proteinler atılır. Taşma proteinürisinin en sık sebebi olan para-proteinemilerde kappa ve lamda hafif zincirleri atılır. Bence Jones proteini olarak da adlandırılan hafif zincir proteinleri, elektroforegramda beta ve gama fraksiyonlarında lokalize olur. Bence Jones protein tayini için en güvenilir yöntem elektroforez yöntemidir.

Multipl myelom hastalarında karakteristik olarak monoklonal bir bant görülür. Ancak bu bandın gerçekten immunoglobulinlerle ilişkili olduğunun immünofiksasyon elektroforezi ile teyit edilmesi gerekir. İdrarda büyük kısmı albumin olmak üzere fazla miktarda protein, az miktarda monoklonal hafif zincir görülmesi amiloidozu akla getirir (32).

4.3.5.2. 24 Saatlik Protein Atılımı

Bu yaklaşım referans metod (gold standart) olarak kabul edilir. Sirkadiyen ritmin sebep olduğu proteinüri değişimlerinden etkilenmez. Tedavi sürecinde proteinürünün izlenmesinde kullanılan en doğru metottur. Ancak diürez oranı tarafından etkilenir. İdrar toplama talimatının detaylandırılmasını gerektirir. Ayaktan takip edilen ve yaşlı hastalar için pratik bir metod olmayabilir. Dahası toplama sırasında idrar kontamine olabilir. İdrarın talimatlara uygun olmayan şekilde toplanması ve idrar hacminin yanlış ölçülmesi hatalı sonuçlara neden olabilir (32).

4.3.5.3. Spot İdrar Numunelerinde Albumin-Kreatinin Oranı

24 saatlik idrar toplama yöntemine alternatif olarak sunulur. Elde etmesi kolaydır. Su alımındaki varyasyon ve diürez oranından etkilenmez. İdrarın toplanması gerekmediği için, preanalitik hatayı önemli ölçüde düşürür ve aynı numune mikroskopik analiz için de kullanılabilir. Literatürdeki derlemeler, 24 saatlik idrar ile albümin/kreatinin oranı arasında güçlü korelasyon olduğunu göstermektedir. Normal albümin/kreatinin oranının saptanması, patolojik proteinüri varlığını ekarte eder ancak albümin/kreatinin oranı sınır (cut- off) değerinin üzerinde ise 24 saatlik idrarda protein ölçümünü gerektirir. Tedavi sürecinde proteinüri'nin izlenmesinde uygun bir yöntem değildir. Proteinürünün saptanması için farklı yaklaşımlar kullanılabilir (32).

4.4. İdrarda Proteomiks

Hastalık tanı ve prognozu için klinik açıdan yararlı biyobelirteçlerin tanımlandığı çalışmalarda, çeşitli doku ve vücut sıvılarının protein ekspresyonundaki dinamik değişimlerin incelenmesi amacıyla proteomik teknikler başarıyla kullanılmaktadır. Bazı klinik olgular ve sağlıklı kişilere ait biyolojik sıvılardaki mikro düzeyde ve çok sayıda proteinin aynı anda karşılaştırıldığı proteomik analizler günümüzde hastalığa spesifik biyobelirteç bulunmasında etkin bir yöntem olarak kabul edilmektedir (1).

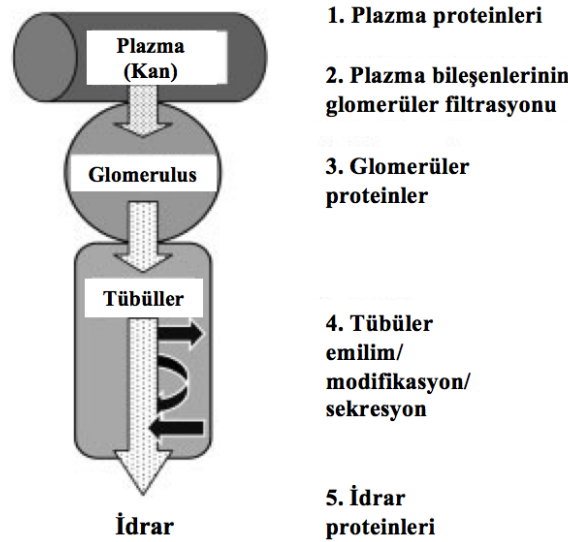
İnsan idrarı klinik tanıda önemli bir rol oynamaktadır. Doktorlar yüzyıllar boyu çeşitli hastalıkların teşhisinde hastalardan alınan idrar örneklerini incelemiştir. Filozof Hermogenes (Milattan önce 5. yüzyıl) bazı hastalıkların göstergesi olarak idrarın rengini ve diğer özelliklerini tanımlamıştı (35).

İdrar, insan vücudunun atık ürünlerinin kandan uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla böbrekler tarafından üretilir. İnsan böbreği nefron adı verilen 1 milyon fonksiyonel birimden oluşur ve bunlar iki işlevsel birime ayrılabilir: Plazmayı filtreleyen ve "primitif" idrarı oluşturan glomerulus ve primitif idrarın çoğunu reabsorbe eden renal tübül. 24 saat içinde yaklaşık 900 litre plazma böbreklerden geçer ve bunun 150-180 litresi filtrelenir. Ancak bu primitif idrarın %99'undan fazlası geri emilir. Geri kalan kısım ("son" idrar) böbrekten üreter yoluyla mesaneye çıkar. Dolayısıyla idrar, sadece böbrek ve idrar yolundan değil aynı zamanda plazmanın glomerüler filtrasyonu ile daha uzak organlar hakkında da bilgi sağlamaktadır. Sağlıklı bireylerde idrar proteomunun %70'i böbrek ve idrar yolu kaynaklı iken geriye kalan %30'u glomeruluslardan filtrelenen proteinlerden oluşmaktadır. Dolayısıyla idrar proteom analizi, hem ürogenital hem de sistemik hastalıkların biyolojik belirteçlerinin tanımlanmasına izin verebilir (36-37).

İdrar diğer vücut sıvıları ile kıyaslandığında, büyük miktarlarda ve non-invasiv olarak elde edilebilmesi ve stabil olması sebebiyle, biyobelirteç çalışmalarında tercih edilen bir vücut sıvısıdır. Normal bir insanın 24 saatlik idrarında 150 mg'dan fazla protein bulunur. Bu proteinler, kanın ultrafiltrasyonu sebebiyle görülebildiği gibi, üriner sistem kaynaklı da olabilirler (21, 38). İdrarın toplam protein konsantrasyonu

plazmaya kıyasla yaklaşık 1000 kat daha düşüktür (39). Tamm-Horsfall proteini (üromodulin) Henle kulbundan salgılanan ve idrarda en yüksek miktarda bulunan çözünebilir proteindir. Uzaklaştırılmadığı takdirde diğer proteinlerin saptanmasına engel olmaktadır (40).

Plazma proteinlerinin bir kısmı ve bunların atık ürünleri glomerüllerden geçerek filtrelenir. Bu sırada glomeriler proteinler de filtrata eklenir. Bu proteinler tübüllere girdiğinde bir kısmı geri emilirken bu sırada tübüllerden de bazı tübüler proteinler filtrata salgılanır. Geri kalan proteinler de idrarla atılırlar. İdrar proteinlerinin üretimi ve atılımının plazma proteinlerinin filtrasyonu, glomerüler fonksiyonu ve tübüler reabsorbsiyon ve sekresyonla nasıl bağlantılı olduğu Şekil 1'de açıkça gösterilmiştir (41).



Şekil 4.5. Plazma, glomerül, tübül ve idrar proteomları arasındaki ilişki (21)

Kan ve idrarda proteom analizi kıyaslandığında kan örneklerinin kullanılmasının bazı dezavantajları vardır. Numune toplama sırasında proteazlar genellikle aktive olur ve bir dizi proteolitik ürün meydana getirirler. Ayrıca kan proteomiks analizinde saptanması beklenen tanısal açıdan önemli ancak konsantrasyonu az olan proteinleri maskeleyen yüksek konsantrasyonda 20 farklı

protein içerir ki, bu proteinler ancak proteomiks analizi ile görülmesi mümkün olan %1'lik diğer proteinleri maskeleyenlerdir (4).

4.4.1. Kullanılabilecek Yöntemler

Normal bir insan idrarının protein konsantrasyonu oldukça seyrek ve yüksek oranda tuz içerir, ki bu da proteomik analizlerine engeldir. Bu sebeple numune hazırlama aşaması idrar proteomiksi çalışmalarında çok önemli bir basamaktır. Özellikle 2-D-PAGE kullanılan tipinde, üriner proteinleri izole/konsantre etmek ve analize engel olan tuzları uzaklaştırmak için numune hazırlama aşaması önemlidir,

İdrar proteinlerini izole/konsantre etmek için kullanılabilecek bir kaç protokol vardır. Bunların en sık kullanılanları ise presipitasyon, liyofilizasyon, ultrasantrifügasyon ve santrifügal filtrasyondur. Ancak bu farklı metodların kalite ve geri kazanım açısından verimliliğine ilişkin veriler hala yeterli değildir (42). İdrar proteinlerinin diyalizi ve fraksiyonlarına ayırmadan liyofilizasyon ile konsantrasyonu, tekrarlanabilirliği ve çözünürlüğü arttırmaktadır ve muhtemelen total üriner proteinlerin 2 boyutlu jellerde görünürlüğünü sağlamaktadır. Ayrıca albümin'in uzaklaştırılması daha az baskın olan diğer idrar proteinlerini de tanımlanabilir kılmaktadır (43).

2006 yılında yayınlanan, jel bazlı insan idrar proteomiksi için numune hazırlama metodları ile ilgili sistematik bir değerlendirmeye göre; idrar hazırlama metodlarında iki ana değişken analiz edilmektedir: miktarı (protein geri kazanım verimi) ve kalitesi (2-D spot örüntüleri veya proteomik profilleri). Değerlendirmede her bir metodun birbirleriyle kıyaslandığında avantajı ve dezavantajlarının olduğu ve tüm idrar proteomunun incelenmesini sağlayacak tek bir mükemmel protokolün olmadığı sonucuna ulaşmışlardır. En büyük miktarda ve kalitede veri elde edebilmek için birkaç numune hazırlama metodu birlikte kullanılmalıdır (42).

İdrar proteomiksi çalışmalarında ele alınması gereken bir diğer konu da numunenin alınma zamanıdır. Klinik laboratuvarlarda kullanılan idrar örnekleri temelde 3'e ayrılır: sabah ilk idrarı, spot idrar ve belli bir zamanda istenen idrar örneği.

Protein ekskresyonunun (atılımı) incelenmesi için kullanılabilir en uygun idrarın hangisi olduğu ile ilgili büyük bir tartışma vardır. Çoğu idrar proteomiksi derleme çalışmalarında sabah ilk idrarı ve spot idrar kullanılmıştır (21).

4.5. Prostat Kanseri

Prostat Kanseri dünya çapında erkeklerde en sık görülen kanserler arasında üçüncü sırada yer alır. Amerika ve Avrupa'da ise erkeklerde, tanı koyulan kanserler arasında birinci ve kansere bağımlı ölüm sebeplerinde ise ikinci sırada gelmektedir. Ayrıca etiyojisi hala bilinmemekle birlikte insidansı giderek artmaktadır (44).

PCa'nın erken evrelerinde klinik semptomlar genellikle görülmez. Ancak iyileştirici bir tedavi için erken tanı konması gereklidir. Kanser prostat dışına yayıldıktan sonra tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır ve sağkalım oranı düşmektedir (45).

Şu anda PCa tanı ve tedavi takibinde kullanılan tek serum biyobelirteci PSA'dır. Prostatik epitelden salınan bir serin proteaz olan PSA'nın (Kallikrein 3) normalde serum düzeyi 4 ng/mL'dir ama kanser gelişimi sırasında düzeyi bu eşiğin üstüne çıkabilir. Fakat PSA'nın bazı sınırlamaları vardır. Kanser tespiti için duyarlılığı ve özgüllüğü düşük olduğu için yanlış pozitif sonuç vermekte ve vakaların %60-80'inde gereksiz biyopsi yapılmasına neden olmaktadır. PSA kullanımının klinik olarak önemsiz tümörlerin tespiti (over-diagnoz), gereksiz tedavi ve hastaların uzun süre boyunca takibinin yapılması gibi riskleri vardır. Ayrıca PSA, indolent (ağrısız) tümörleri agresif tümörlerden ayırmada ya da erken dönemde anti-androjen terapisine hangi tümörlerin cevapsız kalacağını tespit etmede yeterli değildir. PSA'nın heterojenitesi nedeniyle hastalık teşhisi ve takibinde kullanılmak üzere yeni bir biyobelirteç panelinin geliştirilmesi gereklidir (46-48).

Uzun yıllardır PCa için güvenilir bir biyobelirteç tanımlamak amacıyla proteomik, transkriptomik, genomik ve metabolomik stratejilerini toplu olarak kapsayan yoğun bir çaba gösterilmiştir. Bir dizi aday biyobelirteç tanımlanmış olmasına rağmen bunlar henüz rutin kullanımda uygulama öncesinde klinik olarak

valide edilmemiştir. Bu da PCa için biyobelirteç bulma çalışmalarındaki en temel engel olarak görülmektedir.

Son 50 yılda protein ekstraksiyonu, çözünebilirliği, ayrıştırılması, analizi ve biyoinformatik gibi protein tabanlı teknolojilerdeki gelişmeler, PCa biyolojisini anlamamıza ve dolayısıyla aday biyobelirteç tanımlanmasına olanak sağlamıştır (21).

4.5.1. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi

Prostat Kanseri, ABD ve Avrupa'daki erkekler arasında rastlanan en yaygın kanser çeşididir. Avrupa'da her yıl 190 000 civarında yeni vaka teşhis edilmekte ve bunların yaklaşık 80 000 tanesi ölümle sonuçlanmaktadır. İngiltere'de her yıl 32 000 civarında erkeğe hastalık tanısı konulmakta ve bunların yaklaşık 10 000 tanesi ölümle sonuçlanmaktadır. PCa çoğunlukla yaşlı erkeklerde görülür, teşhis edilen vakaların yaklaşık %85'i 65 yaşın üzerindedir. Prostat Kanserinin nedeni bilinmemekle birlikte, hastalığın görülme sıklığı yıllar içinde giderek artmaktadır. PCa görülme sıklığı açısından ülkeler arasında büyük farklılıklar vardır ve bu oranlar 90 kata kadar farklılık göstermektedir. En düşük Asya, en yüksek oranda ise Kuzey Amerika ve İskandinavya'da görülmektedir. İnsidansta gözlenen farklılıklar; ırk, yaş, etnik köken, diyet ve aile öyküsü gibi genetik ve çevresel faktörler ile ilişkilendirilmiştir (21, 44)

4.5.2. Prostat Kanseri Gelişimi

Prostat, erkeklerde idrar kesesinin altında yer alan ceviz büyüklüğünde bir organdır ve üç bölgeye ayrılır: Periferal, transisyonel, ve merkez bölgeleri. Çoğu kanser tipi adenokarsinomadır ve bunların %70'i periferal bölgede, %20'si ise transizyonel bölgede ortaya çıkar. Histolojik olarak, normal prostat bezleri, luminal hücreler(salgı), bazal hücreler ve nöroendokrin hücreler olmak üzere üç farklı hücre tiplerinden oluşur. Luminal hücreler bazal hücrelere dayalı olarak görülmektedir. Nöroendokrin hücreler ise az sıklıkta ve luminal hücreler arasında dağınık olarak görülür.

PCa gelişimi hakkındaki güncel teori, histoloji tarafından erken saptanabilen lezyonların, proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA) ve prostatik intra-epitelyal neoplazinin (PIN) prekürsör lezyonları olabileceğini düşündürmektedir. Günümüzde yüksek dereceli PIN'in (HG-PIN) büyük olasılıkla PCa'nın preinvaziv lezyonu olabileceği kabul edilmiştir. Kansere vakalarının büyük çoğunda HG-PIN ve kanserin birlikte görülmesi bu durum için bir kanıttır.

Kansere ek olarak prostatın, prostatitis veya iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) gibi non-malign hastalıkları da gelişebilir. BPH, çoğunlukla prostatik epiteli çevreleyen stromal bölmesinin aşırı büyümesi ve prostat hacminin artması ile sonuçlanan prostatın büyümesidir (21). BPH tüm dünyada erkeklerde en sık görülen benign hastalıktır ve insidansı yaşla birlikte artmaktadır (49).

4.5.3. Prostat Kanseri Taraması ve Tanı

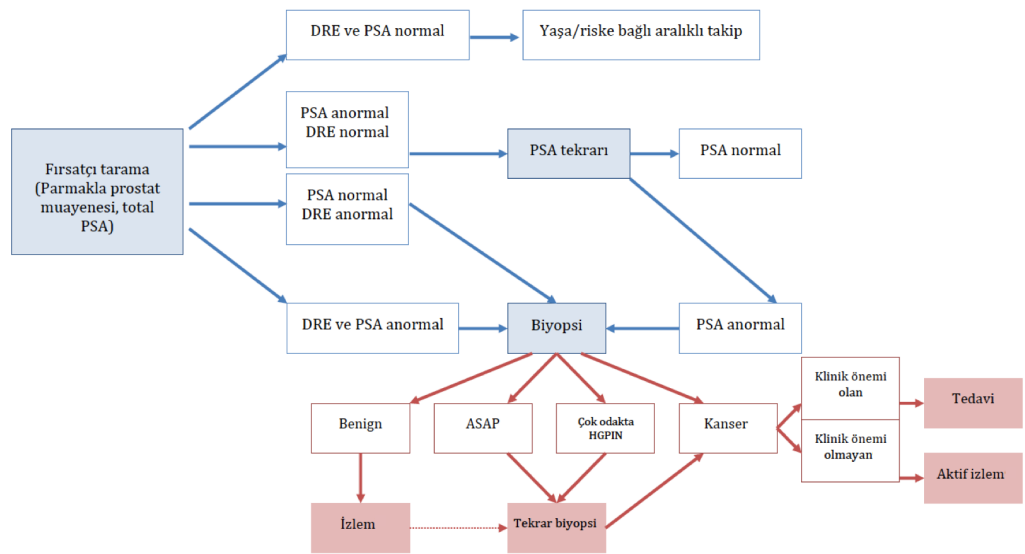
PCa taraması parmakla prostat muayenesi (DRE), serum PSA düzeyi ve trans- ultrason eşliğinde prostat biyopsisi üçlüsüne dayanmaktadır. Anormal DRE ve/veya PSA düzeyi saptanması durumunda prostat biyopsisi yapılması genellikle önerilir. Ancak kanserin kesin tanısı iğne biyopsisi ile alınan doku kesitinin histolojik değerlendirmesi ile koyulur. DRE klinisyene prostatı hissetme şansı verse de sensitivitesi düşüktür ve sadece lokal olarak ilerlemiş görece olarak büyük tümörlerin saptanmasında etkilidir (21).

PSA her zaman kanser varlığını göstermez aksine BPH, prostatitis ve üretral manipülasyonlardan sonra da yükselir (50). Prostat kanseri (PCa) ve Benign Prostatik Hiperplazi (BPH) benzer semptomlar gösterirler ve serum PSA düzeyleri her iki durumda da yükselir (51). Yani PSA prostata spesifik çok iyi bir belirteç olduğu halde kansere spesifik değildir. Prostat kanserinde biyobelirteç olarak kullanılması amacıyla serumda PSA tanılama ile ilgili büyük ölçekli klinik çalışmalar 1990'lı yıllardan beri devam etmektedir. PSA, kanser tanısı konmuş olgularda anlamlı bir artış göstermiştir. Ancak yanlış pozitif sonuçlar verdiği de görülmüştür. Bundan dolayı Amerika Birleşik

Devletleri'nde yılda yaklaşık 700.000'den fazla gereksiz prostat biyopsisi yapılmaktadır (3, 52).

PCa evrelemesi ile hastalığın derecesinin mümkün olduğu kadar doğru bir şekilde saptanması amaçlanmaktadır. Bu şekilde prognoza yardımcı ve çeşitli tedavi seçeneklerinden birine karar vermek için rehber işlevi görmektedir. Evrelemenin tamamlayıcı iki unsuru vardır: klinik ve patolojik. Klinik evre hastalığın derecesinin DRE, serum tümör belirteçleri (PSA), tümör evresi ve görüntüleme teknikleri ile değerlendirilmesi sürecini içerir. Hastalığın derecesinin prostat bezi ve lokal çevresinde değerlendirilmesi patolojik evredir. Prostatın (ve lenf nodlarının) veya prostat biyopsi çekirdeklerinin alınmasından sonra histolojik inceleme ile değerlendirilmesidir. PCa için örnek tarama ve tanı akış tablosu aşağıda Şekil 4.6.3'de gösterilmiştir (53).

Gleason skoru patolojik evrelemenin önemli bir parçasıdır ve kanserli dokunun yapısının histolojik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır. Gleason skoru, 1 ile 5 aralığında iki ana Gleason seviyesinin toplamıdır. Sonuçta toplam Gleason skoru 2 ile 10 arasında olur. Kanser gelişiminin erken evrelerinde kanser hücreleri iyi diferansiye olmuşlardır (Seviye 3); ancak kanser ilerledikçe hücreler az diferansiye olur (Seviye 5) bu da kötü prognoz ile ilişkilidir (21).



Şekil 4.6.3. Prostat kanseri için örnek tarama ve tanı akış tablosu

4.5.4. Proteomik Teknolojileri ve Prostat Kanserinde Uygulamaları

Proteomiks, bir hücre, doku, vucut sıvısı veya organizmada protein ekspresyonu, protein-protein etkileşimleri, protein modifikasyonları, protein fonksiyonu ve lokalizasyonunu inceleyerek normal ve hastalık durumlarının biyolojisini daha iyi anlamamızı hedefleyen görece olarak yeni bir kavramdır.

Proteomiks, sadece genomiks tabanlı yöntemlerle anlaşılamayan Post-Translasyonel Modifikasyonların (fosforilasyon, asetilasyon, glikozilasyon gibi) derecelendirilmesi gibi hastalığın patolojisini açıklamaya yönelik çalışmalarda kullanılabilir. Genomik tabanlı çalışmalar hastalığın mekanizmasını anlamada üstünlüğe sahip olsalar da proteomik teknolojilerinin de bazı avantajları vardır. Örneğin hastalığın temel nedeni genetik seviyede yatıyor olabilse de çoğunlukla kendini protein seviyesinde ortaya çıkarmaktadır.

Ayrıca mRNA ekspresyonu ve protein sentezi arasında zayıf bir korelasyon olduğu belgelenmiştir. Buna ek olarak idrar, serum, plazma, ve prostat kaynaklı sıvılar gibi bazı vücut sıvıları, DNA/RNA baskınlığının düşük olması sebebiyle genomik tabanlı uygulamalar için daha az uygundur. Ancak serumda veya plazmada proteomik tabanlı PCa biyobelirteç keşfi çalışmalarının en önemli sorunlarından biri klinik olarak faydalı belirteçlerin (PSA gibi) nanomolar düzeyde bulunmasıdır. Bu kadar düşük düzeyde bulunan belirteçler de daha baskın proteinler tarafından maskelenebilir (10).

4.6. Prostat Kanserinde İdrarda Bakılan Belirteçler:

Normal idrarda günümüzde proteomik analizi ile 2500 protein tespit edilmiştir. Bu proteinlerden üriner PSA, Timozin β 15, Üriner Transferrin, S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein, Matrix Metalloproteinaz (MMP9), Üriner Doku Faktörü, Anneksin A3, Anneksin A2 ve Telomeraz aktivitesi prostat kanseri ile ilişkili proteinlerdir (2, 52, 54-63)

İdrarda PSA: Prostat kanseri tanısının konmasında serum PSA'nın spesifitesini desteklemek amacıyla idrar/serum PSA oranının klinik önemini araştırıldığı çok

merkezli prospektif bir çalışmaya göre PK ve BPH arasında idrar PSA'da anlamlı bir değişiklik görülmezken, idrar/serum PSA oranı anlamlı bulunmuştur. idrar/serum PSA oranındaki anlamlılık düzeyi, total PSA'ya veya serbest/total PSA oranına göre daha anlamlı bulunmuştur (55).

Matrix Metalloproteinazlar: Roy ve ark. 103 PCa'li hastada yaptıkları çalışmada, MMP'lerin idrar konsantrasyonunun arttığını tespit etmişlerdir (64). Başka bir çalışmada MMP9'un (%64) MMP2'ye (%39) göre PCa için hassaslığının daha yüksek olduğu bulunmuştur (65). Herhangi bir MMP'nin varlığı PCa'ya %82 duyarlılık ve %74 özgüllük gösterirken, MMP9'un görülmesinin PCa için bağımsız bir belirleyici olduğu bulunmuştur (55)

Timozin β 15: Timozin beta 15 (T β 15) ekspresyon seviyesi, PCa hücre hatlarında motilite ve metastaz potansiyelinin artması ile pozitif ilişkilidir (58). Sağlıklı insan dokularında neredeyse hiç bulunmayan ve malign tümörlerde idrar konsantrasyonu artan T β 15'in, PCa için tümör belirteci olabileceği ile ilgili çalışan bir araştırma grubunun sonuçlarına göre, PCa tespitinde PSA'nın tek başına kullanılmasına kıyasla serum PSA ve T β 15 'in birlikte kullanılması hassasiyet ve özgüllüğü %15 oranında arttırmaktadır (55).

Üriner Doku Faktörü: Üriner Doku Faktörü (uTF) molekül ağırlığı 34 kDa olan ve aktivitesi insan doku faktörü (TF) antikoru tarafından inhibe edilen bir proteindir. Sağlıklı kontroller ve BPH'li hastalar arasında anlamlı bir değişiklik yok iken Prostatitis ve PCa'lı hastalarda üriner doku faktörü konsantrasyonlarında anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (60).

Annksin A2: Annksin A2'nin (ANXA2) kanser oluşumu, invazyonu ve metaztazi ile ilişkili olduğu ve down-regülasyonunun PCa ile ilişkili olduğu bulunmuştur (57). ANXA2 disregülasyonunun ise PCa gelişimiyle ilişkili erken bir uyarıcı olduğu düşünülmektedir. ANXA2, benign prostatik epitelyumda, prostatik atrofide ve bazal hücre hiperplazisinde sürekli olarak eksprese edilmektedir ve bu yönüyle PCa'yı benign prostat bezlerinden ayırmada klinik olarak faydalı bir biyobelirteç olabilir. ANXA2 ekspresyonu yüksek dereceli prostat kanserlerinin alt tiplerinde restore

edildiği için PCa'da ANXA2 ekspresyonunu ölçmek klinik olarak faydalı olabilecek prognostik bilgi sağlayabilir (66-69).

Anneksin A3: Anneksin A3 (ANXA3) en güncel PCa belirteçlerinden birisidir. ANXA3, PCa metaztazı sırasında hücre farklılaşması, migrasyonu, immünmodülasyonu, kemik oluşumu ve mineralizasyonu gibi kalsiyuma bağımlı süreçlerde etkilidir (2, 57, 70). PCa ile ters ilişkilidir ve spesifitesi PSA'dan daha iyidir. İdrar örneklerinde ANXA3 değerleri PCa'lı hastalarda BPH'li hastalara kıyasla anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (71).

TERT (Telomeraz Reverse Transkriptaz): Prostat kanserlerinin %90'ında TERT aşırı aktivitesi bildirilmiştir (72-73). Başka bir çalışmada protein ekstraksiyonundan sonra 36 hastanın idrarı incelenmiş ve telomeraz aktivitesinin PCa için %58 duyarlılık ve %100 özgüllükte olduğu görülmüştür (55).

S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein: Her kanser tipi kendine özgü bir S100 profili gösterdiği için bu protein ailesinin birden fazla üyesinin ekspresyonunun bozulması insan kanserlerinde ortak olarak görülmektedir. İlaç keşif çalışmaları bazı S100 proteinlerinin inhibe edilmesi yönünde şekillenmektedir. Bu doğrultuda PCa için S100A9 proteinleri için tanımlanmış bir inhibitör, kanser hastalarında klinik deneme aşamasına geçmiştir (74-75). S100A16'nın PCa tanı ve prognozunda önemli olabileceğini belirtmiştir. Köpeklerde yapılan bir çalışmada ise prostat kanserinde idrar S100A8/A9 ve S100A12 proteinlerinin over eksprese olduğu görülmüştür (76).

5. MATERYAL VE METOD

5.1. Deneyde Kullanılan Malzemeler

Tablo 5.1.1. Deneyde kullanılan cihazlar

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodu- Katalog Numarası
Liyofilizatör	Labconco	7948030
Santrifüj	Orto Alresa	
Multi-Therm shaker	Benchmark Scientific	H500-HC
Vortex	Benchmark Scientific	BV100
Spin-Down Mini santrifüj	Sprout	
Qubit 2.0 Fluorometer	ThermoFisher	
Yarı otomatik pipet seti	Eppendorf	
Kimyasal Dolabı	Asecos	
SYNAPT G2-Si High Definition Mass Spectrometry	Waters	
nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column	ACQUITY UPLC, Waters	
nanoACQUITY UPLC BEH C18 Column	ACQUITY UPLC, Waters	
Eppendorf® LoBind microcentrifuge tubes	Sigma-Aldrich	Z666505-100EA
Ultrasonikatör	Bandelin Sonarex	RK 510
Concentrator Plus	Eppendorf	
pH metre	Isolab	pH7110
Distile Su Cihazı	Millipore	
LC-Vial	Sigma-Aldrich	29413-U
+4 Dolabı	Uğur	
-20 Dolabı	Thermo Scientific	
-80 Dolabı	Arctiko	

Hassas Tartı	Ohaus Explorer	
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Scientific	
Laminar Flow	ESCO	

Tablo 5.1.2. Konsantrasyon tayininde kullanılan malzemeler

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodu- Katalog Numarası
Qubit® Protein Assay Kit	ThermoFisher	Q33211
Qubit® Assay Tubes	ThermoFisher	Q32856
Qubit 2.0 Fluorometer	ThermoFisher	

Tablo 5.1.3. Ekspresyon analizi için kullanılan malzemeler

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodu- Katalog Numarası
PD-10 desalting column	Amersham Bioscience	17-0851-01
Pur-A-Lyzer MINI Dialysis Devices	Sigma	
FASP Protein Digestion Kit	Expedeon	44250
UPX Universal Protein Extraction	Expedion	44101
Trypsin	Thermo Scientific	90055
Formik Asit	Fluka	94318-50mL-F
Acetonitrile Hypergrade for LC-MS LiChromosolv	Merck	100029.2500
Water for Chromotography LC-MS Grade LiChromosolv	Merck Millipore	15333
[Glu 1]-Fibrinopeptide B Standart	Waters	700004729

5.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Özellikleri

Bu çalışmada Medipol Üniversitesi Mega Medipol Hastanesi Üroloji Polikliniğine başvuran Prostat Kanserli hastaların bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alındıktan sonra, sabah, orta idrarları alındı ve analiz edilinceye kadar -80°C 'de saklandı (77-80). Tüm analizler Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından REMER sistemler biyolojisi laboratuvarında aşağıda belirtildiği şekilde incelendi.

Çalışmada dışlama kriterleri; 18 yaşından küçük, 75 yaşından büyük olmak, sigara kullanıyor olmak, böbrek fonksiyon bozuklukları, hipertansiyon, kalp hastalığı, enflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıkların varlığı olarak belirlendi.

5.3. İdrar Örneklerinin Alınması, Saklanması

İnsan İdrar ve Böbrek Proteom Projesi (HKUPP) ve Avrupa İdrar ve Böbrek Proteomiks (EuroKUP) girişimi tarafından hazırlanan idrar toplama standart protokolüne göre, Hastaların sabah, orta idrarları alındı ve analiz edilinceye kadar -80°C 'de saklandı (77-80). Dondurulmadan önce idrar örneklerine Proteaz İnhibitör Kokteyli (PİK) eklenmedi (81-82). Çözülmesi için $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen örneklere PİK eklendi ve 1200 rpm, 60°C 'de 15 dk inkübasyona bırakıldı (83). Daha sonra 14000 x g'de 15 dk santrifüj edilen idrar örnekleri diyaliz tüplerine (Pur-A-Lyzer, Sigma) alınarak tüm gece AmBIC'a karşı diyalize bırakılarak ve daha sonra da aseton presipitasyonu yapılarak içindeki tuzlar uzaklaştırıldı.

5.4. İdrar Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması

İdrar numunesindeki tuzları uzaklaştırmak (Desalting) için 2 farklı metod kullanıldı. Asıl deney setinde çalışmadan önce, kullanılabilecek en iyi metoda karar verebilmek için sağlıklı insan idrarında 2 farklı peptidlerine parçalama (FASP ve In-Solution) ve daha sonra 2 farklı tuzları uzaklaştırma (desalting) metodu (Diyaliz ve aseton presipitasyonu) denendi.

5.4.1. Numune Hazırlama Metodları

5.4.1.1. İdrar Numunesindeki Proteinleri Peptidlerine Ayırmak için Kullanılan Metodlar

FASP uygulanacak numuneler, Expedion FASP protein digestion kiti ile protokole uygun olarak çalışıldı. In-Solution (In-Sol) numunesi aşağıda verilen protokole uygun olarak çalışıldı

METOD 1 (Diyaliz + Aseton presipitasyonu + FASP)

1. 1000 µL idrarın üzerine 2 µL PİK ilave edilir. Önce pipetaj yapılır daha sonra vortekslenir.
2. 50°C, 1200 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
3. 14000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
4. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır.
5. Son hacmin 1:1 oranında UPX eklenir.
6. 8 µL PİK ilave edilip vortekslenir.
7. 100°C, 600 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
8. +4°C'de 1 saat bekletilir.
9. 15000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
10. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır.
11. Diyaliz membranının (*Pur-A-Lyzer MINI Dialysis Devices, Sigma*) üstüne AmBİC eklenerek membranın ıslanması sağlanır.
12. Daha sonra pipet yardımıyla dikkatli bir biçimde, membrana zarar vermeden üstüne eklenen AmBIC tamponu çekilir ve yerine LoBind tüpe alınan örnek ilave edilir.
13. Tüm gece boyunca diyalize bırakılır.
14. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır.
15. Aseton presipitasyonu yapılır.
 - a. 1:6 oranında idrar örneği ve -20°C'de 2 saat daha sonra da 1 dakika sıvı azotta bekletilmiş LC-Grade aseton karıştırılır.

- b. -80°C'de 1 saat bekletilir. Proteinlerin aralarında kalan SDS'lerin çıkması için her 15 dakikada bir çıkarıp 30 saniye vortekslenir.
- c. 4°C'de 15000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
- d. Pellete zarar vermeden pipetle aseton çekilir.
- e. Üzerine 50 µL AmBİC eklenir.
- f. Concentrator Plus'ta kalan asetonun da uçurulması için 10-15 dakika bekletilir.
- g. 50°C, 600 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.

16. Qubit ölçümü yapılır.

17. Son konsantrasyon 50 µg/30 µL olacak şekilde AmBIC ile seyreltilir.

Üre çözeltisi ile 230 µL'ye tamamlanarak FASP'a başlanır.

METOD 2 (Diyaliz + Aseton presipitasyonu + In-Sol)

1. 1000 µL idrarın üzerine 2 µL PİK ilave edilir. Önce pipetaj yapılır daha sonra vortekslenir.
2. 50°C, 1200 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
3. 14000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
4. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır.
5. Son hacmin 1:1 oranında UPX eklenir.
6. 8 µL PİK ilave edilip vortekslenir.
7. 100°C, 600 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
8. +4°C'de 1 saat bekletilir.
9. 15000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
10. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır.
11. Diyaliz membranının (*Pur-A-Lyzer MINI Dialysis Devices, Sigma*) üstüne AmBİC eklenerek membranın ıslanması sağlanır.
12. Daha sonra pipet yardımıyla dikkatli bir biçimde, membrana zarar vermeden üstüne eklenen AmBIC tamponu çekilir ve yerine LoBind tüpe alınan örnek ilave edilir.

13. Tüm gece boyunca diyalize bırakılır.
14. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır.
15. Aseton presipitasyonu yapılır.
 - a. 1:6 oranında idrar örneği ve -20°C 'de 2 saat daha sonra da 1 dakika sıvı azotta bekletilmiş LC-Grade asetona karıştırılır.
 - b. -80°C 'de 1 saat bekletilir. Proteinlerin aralarında kalan SDS'lerin çıkması için her 15 dakikada bir çıkarıp 30 saniye vortekslenir.
 - c. 4°C 'de 15000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
 - d. Pellete zarar vermeden pipetle asetona çekilir.
 - e. Üzerine 50 μL AmBIC eklenir.
 - f. Concentrator Plus'ta kalan asetona da uçurulması için 10-15 dakika bekletilir.
 - g. 50°C , 600 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
16. Qubit ölçümü yapılır.
17. Son konsantrasyon 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ olacak şekilde AmBIC ile seyreltilir ve protokole göre In-Sol digestion'a başlanır.

5.4.1.2. İdrar Numunesindeki Tuzları Uzaklaştırmak için Kullanılan Metodlar

Diyaliz membranı olarak Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices, Thermo Scientific kullanılmış ve etkinliği hem Pur-A-Lyzer MINI Dialysis Devices, Sigma ile hem de sadece asetona presipitasyonu ile karşılaştırılmıştır

METOD 3 (Aseton Presipitasyonu + FASP)

1. 3000 μL idrarın üzerine 6 μL PİK ilave edilir. Önce pipetaj yapılır daha sonra vortekslenir.
2. 50°C , 1200 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
3. 14000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.

4. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır.
 5. Son hacmin 1:1 oranında UPX eklenir.
 6. 8 µL PİK ilave edilip vortekslenir.
 7. 100°C, 600 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
 8. +4°C'de 1 saat bekletilir.
 9. 15000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
 10. Aseton presipitasyonu yapılır.
 - a. 1:6 oranında idrar örneği ve -20°C'de 2 saat daha sonra da 1 dakika sıvı azotta bekletilmiş LC-Grade aseton karıştırılır.
 - b. -80°C'de 1 saat bekletilir. Proteinlerin aralarında kalan SDS'lerin çıkması için her 15 dakikada bir çıkarıp 30 saniye vortekslenir.
 - c. 4°C'de 15000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
 - d. Pellete zarar vermeden pipetle aseton çekilir.
 - e. Üzerine 50 µL AmBİC eklenir.
 - f. Concentrator Plus'ta kalan asetonun da uçurulması için 10-15 dakika bekletilir.
 - g. 50°C, 600 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
 11. Qubit ölçümü yapılır.
 12. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır. Üzeri delinir ve liyofilizatörde kurutulur.
 13. Qubit ölçümü yapılır.
 14. Son konsantrasyon 50 µg/30 µL olacak şekilde AmBIC ile seyreltilir.
- Üre çözeltisi ile 230 µL'ye tamamlanarak FASP'a başlanır.

METOD 4 (Diyaliz + Aseton presipitasyonu + FASP)

1. 3000 µL idrarın üzerine 6 µL PİK ilave edilir. Önce pipetaj yapılır daha sonra vortekslenir.
2. 50°C, 1200 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
3. 14000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
4. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır. Üzeri delinir ve liyofilizatörde kurutulur.

5. Tamamen kuruduktan sonra Amonyum Bikarbonat (AmBic) ile çözdürülür.
 6. Son hacmin 1:1 oranında UPX eklenir.
 7. 8 µL PİK ilave edilip vortekslenir.
 8. 100°C, 600 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
 9. +4°C'de 1 saat bekletilir.
 10. 15000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
 11. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır.
 12. Diyaliz membranının (*Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices, Thermo-Scientific*) üstüne AmbİC eklenerek membranın ıslanması sağlanır.
 13. Daha sonra pipet yardımıyla dikkatli bir biçimde, membrana zarar vermeden üstüne eklenen AmbIC tamponu çekilir ve yerine LoBind tüpe alınan örnek ilave edilir.
 14. Tüm gece boyunca diyalize bırakılır.
 15. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır.
 16. Aseton presipitasyonu yapılır.
 - a. 1:6 oranında idrar örneği ve -20°C'de 2 saat daha sonra da 1 dakika sıvı azotta bekletilmiş LC-Grade aseton karıştırılır.
 - b. -80°C'de 1 saat bekletilir. Proteinlerin aralarında kalan SDS'lerin çıkması için her 15 dakikada bir çıkarıp 30 saniye vortekslenir.
 - c. 4°C'de 15000 xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.
 - d. Pellete zarar vermeden pipetle aseton çekilir.
 - e. Üzerine 50 µL AmbİC eklenir.
 - f. Concentrator Plus'ta kalan asetonun da uçurulması için 10-15 dakika bekletilir.
 - g. 50°C, 600 rpm'de 15 dakika thermocycler'da karıştırılır.
 17. Qubit ölçümü yapılır.
 18. Supernatant yeni bir LoBind eppendorfa alınır. Üzeri delinir ve liyofilizatörde kurutulur.
 19. Qubit ölçümü yapılır.
 20. Son konsantrasyon 50 µg/30 µL olacak şekilde AmbIC ile seyreltilir.
- Üre çözeltisi ile 230 µL'ye tamamlanarak FASP'a başlanır.

5.4.2. Qubit ile Protein Konsantrasyonun Ölçülmesi

Qubit Çözeltilerinin Hazırlanması:

1. Hepsi kit ile birlikte gelen ve konsantrasyonları; 0 ng/μL, 200ng/μL, 400ng/μL olan üç tane standartı var.
2. Ölçümün yapılabilmesi için mix çözeltisinin hazırlanması gerekiyor.
 - a. Bunun için; Buffer solüsyonundan 199μL ve floresan boyasından 1μL karıştırılır ve toplamda 200μL'lik bir çalışma solüsyonu hazırlanır.
 - b. Daha sonra standart ve örneklerin Qubit için çözeltilerinin hazırlanması gerekir.
 - c. Standart için; çalışma solüsyonundan 190μL Standart çözeltisinden 10μL eklenir ve toplam 200μL çözelti elde edilir.
 - d. Örnekler için; çalışma solüsyonundan 198μL örneklerden 2μL eklenir ve toplam 200μL çözelti elde edilir.
 - e. Hazırlanan bu çözeltiler 15 dk karanlık ortamda bekletilir ve 15 dk sonunda Qubit cihazı ile ölçüm yapılır.
 - f. Qubitte okunan değerlere bir örnek:
 - i. Örnek konsantrasyonu 23,8 μg/mL (1:100 seyreltilmiş hali).
 - ii. Bu yüzden normal hali için: $23,8 \times 100 = 2380 \mu\text{g/mL}$
 - iii. Daha öncede belirtildiği gibi 50 μg örnek üzerinden devam edilecek bu yüzde;
 - iv. $(50 \div 2380) \times 1000 = 21 \mu\text{L}$. (1000'le çarpılmasının nedeni birim değişimi içindir. 1 mL=1000 μL).
3. Son konsantrasyonun 30 μL olması istendiği için Qubit ölçümünden elde edilen sonuçlara göre gerekli miktarda örnek alınarak, üzerine UPX çözeltisi ya da LC-su eklenir ve son hacmin 30 μL olması sağlanır. Yukarıdaki sonuçlardan bu aşama açıklanmak istenirse;
 - a. Örnekten 21 μL
 - b. UPX çözeltisinden 9 μL eklenir ve 30 μL hacminde bir çözelti hazırlanır.

5.4.3. FASP (Filter-Aided Sample Preparation) Protokolü

Proteomiks için FASP (Filter-aided sample preparation) Yöntemiyle Numune Hazırlama (83).

1. Hazırlanan 30 µL hacmindeki çözelti üzerine 200 µL üre ilave edilir. Burada kitlerle beraber gelen özel filtreli FASP tüpleri kullanılıyor.
2. 14.000xg'de 15dk santrifüj yapılır.
3. Filtrenin üzerine tekrar 200 µL üre ilave edilir ve 14.000g×15 dk santrifüjlenir.
 - a. Üre çözeltisi yıkama amacıyla kullanılır. UPX içindeki SDS'den kurtulmak için.
 - b. Üre Çözeltisinin Hazırlanması; 1 mL tris HCl, liyofilize halde kit ile birlikte gelen ürenin üstüne eklenir.
4. Bu aşamadan sonra toplama tüpündeki sıvı kısım atılır.
5. Filtrenin üzerine 10 µL iyodoasetamid çözeltisi ve 90 µL üre eklenir ve 250 rpm'de 1 dakika karıştırılır. İnkübasyon için 20 dk karanlık ortamda bekletilir.
6. 14.000xg'de 10 dk santrifüj yapılır.
7. Filtrenin üzerine 100µL üre eklenir ve 14.000xg'de 10dk santrifüj yapılır. Bu işlem 2 kez daha tekrar edilir.
8. Toplama tüpü dikkatlice boşaltılır.
9. Filtrenin üzerine 100µL 50mM amonyum bikarbonat eklenir. 14.000xg'de 10 dk santrifüj yapılır. Bu işlem 2 kez daha tekrar edilir.
10. 75 µL digestion solution eklenir.
11. Tüpün her tarafı hava almayacak şekilde parafilmle sarılır ve etüvde 37°C'de 4-18 saat bekletilir.
12. Tripsinizasyon aşamasından sonra filtre yeni bir toplama tüpüne takılır ve üzerine 40 µL AmBIC ilave edilerek 14.000xg'de 10 dk santrifüj yapılır. Bu işlem 1 kez daha tekrar edilir.
13. En son olarak tüpe 50 µL sodyum klorür eklenir ve 14.000xg'de 10dk santrifüj yapılır.
14. Bu adımdan sonra filtre atılır ve sıvı faz kullanılmaya devam edilir.

15. En son aşamada peptidler fazla dilue oldukları için konsantre edilmeleri gerekir. Bunu için de liyofilizasyon yapılır ve toz halinde bir madde elde edilir.

5.4.4. In-Solution Digestion Protokol

1. Son konsantrasyon 50 µg/50 µL olacak şekilde AmbIC ile seyreltilir.
2. 80 °C de 15' inkübe edilir.
3. Son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde 100 mM DTT eklenir.
4. 80 °C de 15' inkübe edilir.
5. Son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde 200 mM iyodoasetamid eklenir.
6. Karanlıkta 20 dk bekletilir.
7. 50 µL ye 1 µL olacak şekilde tripsin eklenir.
8. Tüpün her tarafı hava almayacak şekilde parafilmle sarılır ve etüvde 37°C'de 4-18 saat bekletilir.
9. En son aşamada peptidler fazla dilue oldukları için konsantre edilmeleri gerekir. Bunu için de liyofilizasyon yapılır ve toz halinde bir madde elde edilir.

5.4.5. LC-MS ile İdrarda Proteom Analizi

Peptitleri bulunduran çözeltiye, 20 µL 0,1% Formik asit eklenir. Qubit'te konsantrasyon tayini yapılır ve son konsantrasyon 100 ng/µL olacak şekilde formik asitle tamamlanır. Bu karışımdan 2 µL yüksek basınçlı sıvı kromatografisine bağlı, elektrosprey iyonlaştırma ve dört kutup zaman bazlı ölçüm kaynağı içeren kütle spektrometresi sistemine [nanoUPLC (*nano ultra performance liquid chromatography*)-ESI (*electrospray ionization*)-QTOF (*quadrupole time of flight*)-MS (*mass spectrometry*), Waters, Amerika Birleşik Devletleri] gönderilir. Toplam 3 enjeksiyon yapılır. Veri bağımsız edinim yöntemi (*data independent acquisition mode*; MS^E), pozitif iyon V modu, MS ve MS/MS fonksiyonları (1,5 saniye aralıklarla 6V

düşük enerji ve 15-40V yüksek enerji) kullanılarak peptit m/z değerleri ve ürün iyon bilgisi elde edilir (84).

5.4.6. LC-MS Sonuçlarının Biyoinformatik Olarak Değerlendirilmesi- İstatistiksel Analiz

Çalışmanın biyoinformatik kısmı öncelikli olarak ProteinLynx Global Server v. 2.4 (Waters Corp.) programında IDENTITY algoritmasıyla bakılacaktır. Ardından gruplar arasındaki istatistiksel çözümlene de Progenesis (Non linear Corp.) programıyla tanımlanan proteinler belirlenen eşik değerlerine göre ANOVA testi ile anlamlı farklılıklar tesbit edilecektir.

6. BULGULAR

6.1. Hasta Özellikleri ve Laboratuvar Verileri

Çalışmaya 3 prostat kanserli hasta ve 3 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 6 idrar örneği dahil edildi. Çalışmaya katılan prostat kanserli hastaların yaş ortalaması 59, sağlıklı kontrollerin yaş ortalaması ise 32'ydi. Hasta ve kontrol grubunun tamamının cinsiyeti erkekti. Prostat kanserli hasta grubunun PSA, kreatinin ve Hgb düzeyi ölçülmüş ve sonuçlar PSA için ng/mL, kreatinin için mg/dL ve Hgb için g/dL cinsinden tabloda verilmiştir. Hasta ve kontrol grubu numunelerinin karakteristik özellikleri ve laboratuvar bulguları Tablo 6.1'de gösterilmiştir.

Tablo 6.1. Olgulara ait değerler

Tanı	İsim	Cinsiyet	Yaş	PSA (ng/mL)	Kreatinin (mg/dL)	Hb (g/dL)	Boy (cm)	Kilo (kg)	BKİ
PCA	N.P	E	68	26	1,12	14,9	177	82	26,1
	K.T	E	57	41	0,76	12,9	173	85	28,4
	Y.Ö	E	52	6	0,9	13,1	175	73	23,8
KONTROL	Ç.Ç	E	28				185	78	22,8
	İ.Y	E	36				175	75	24,5
	H.K	E	32				185	95	27,7

PCa: Prostat Kanseri, PSA: Prostat Spesifik Antijen (referans aralığı: 0-4 ng/mL), Kreatinin (referans aralığı: 0,50-1,40 mg/dL), Hb: Hemoglobin (referans aralığı: 16-50 yaş için 13,50-17,50 g/dL, 50 yaş üstü için 14,00-18,00 g/dL), BKİ: Beden Kitle İndeksi, E: Erkek

Tablo 6.2 Prostat kanseri ve kontrol grubu örneklerinin sonuç tablosu ve istatistikleri

Numune Açıklamaları	Tarih	1.enj	2.enj	3.enj	Ort	Standart Sapma	Relatif Standart Sapma (%RSD)	Varyans
Y.Ö, PCa	23.07.2016	2	0	2	1	1,15	86,25	1,32
N.P, PCa	23.07.2016	4	4	5	4	0,58	13,38	0,34
K.T, PCa	23.07.2016	0	0	0	0	0,00	0	0,00
H.K, Kontrol	23.07.2016	1	3	2	2	1,00	50,00	1,00
İ.Y, Kontrol	23.07.2016	3	4	3	3	0,58	17,40	0,34
Ç.Ç, Kontrol	23.07.2016	0	1	1	1	0,58	87,00	0,34

PCa: Prostat Kanseri

3 Kontrol ve 3 prostat kanserli hastanın dahil edildiği bu çalışmada her bir örnek 3 enjeksiyon çalışıldı ve PCa grubu için tanımlanan en yüksek protein sayıları Y.Ö, N.P ve K.T için sırasıyla 2, 5, 0 olarak bulundu. Kontrol grubunda ise H.K, İ.Y ve Ç.Ç numunelerinde sırasıyla 3, 4, 1 protein tanımlandı. PCa ve Kontrol grubu örneklerinde 3 enjeksiyonda tanımlanan ortalama protein sayıları ve standart sapmaları Y.Ö (1; 1,15), N.P (4; 0,58), K.T (0; 0), H.K (2;1), İ.Y (3; 0,58), Ç.Ç (1; 0,58) olarak bulundu. Prostat kanseri ve kontrol grubu örneklerinin sonuç tablosu ve istatistikleri Tablo 6.2’de gösterilmiştir.

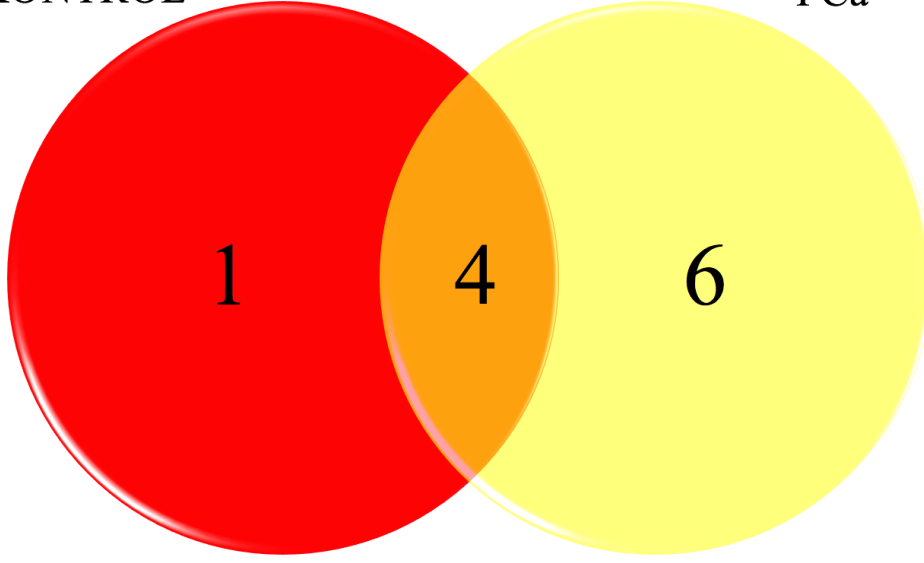
Tablo 6.3 Diyaliz ve aseton presipitasyonu örneklerinin sonuç tablosu ve istatistikleri

Numune Açıklamaları	Tarih	1.enj	2.enj	3.enj	Ort	Standart Sapma	Relatif Standart Sapma (%RSD)	Varyans
Diyaliz (Sağlıklı Kontrol)	16.08.2016	5	7	7	6	1,15	18,16	1,32
Aseton Presipitasyonu (Sağlıklı Kontrol)	16.08.2016	40	33	36	36	3,51	9,66	12,32

Yaptığımız ön çalışmadaki Diyaliz ve aseton presipitasyonu numunelerinin her biri 3 enjeksiyon çalışıldı ve tanımlanan en yüksek protein sayıları sırasıyla 7 ve 40 olarak bulundu. Diyaliz ve aseton presipitasyonu örneklerinin sonuç tablosu ve istatistikleri Tablo 6.3’de gösterilmiştir.

KONTROL

PCa



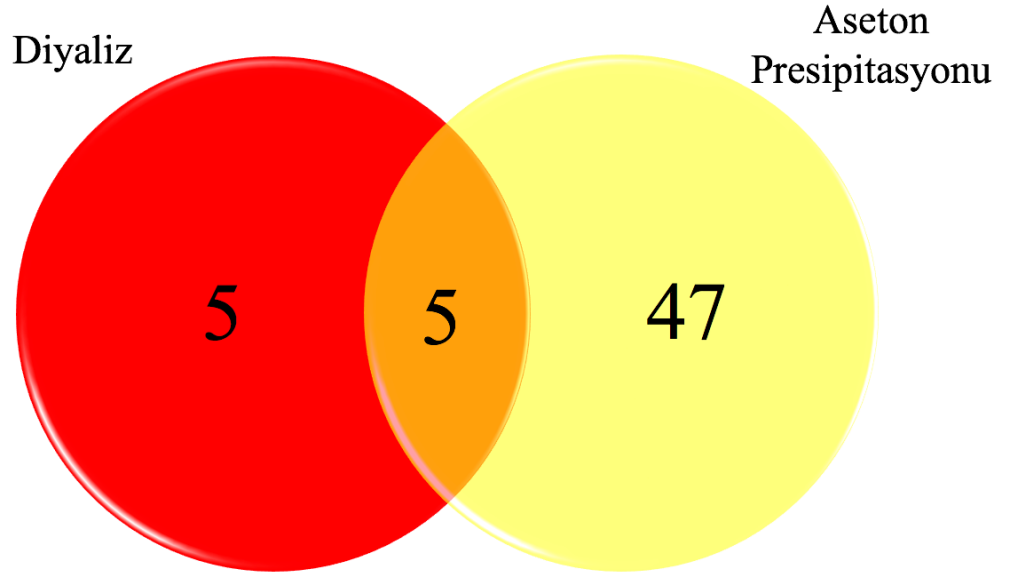
Şekil 6.1 Kontrol ve prostat kanserli olguların ortak idrar proteinleri

Kontrol ve prostat kanserli hasta grubunun idrarlarında bulunan protein sayılarının venn diyagramında gösterimi Şekil 6.1'dedir. Şekilde kırmızı ile gösterilen alan kontrol grubu örneklerinde ve sarı ile gösterilen alan da PCa örneklerinde 3 enjeksiyon sonunda en yüksek tanımlanan protein sayısını göstermektedir. Turuncu ile işaretli alanda ise her iki grupta da ortak olarak bulunan proteinlerin sayısı yer almaktadır. Buna göre PCa grubunda toplamda 10 protein tanımlanmıştır fakat bunların 4 tanesi ortak proteinlerdir dolayısıyla Kontrol grubundan farklı olarak 6 protein tanımlanmıştır.

Tablo 6.4 Kontrol ve prostat kanserli hasta grubunun idrarlarında bulunan proteinler

		Tanım	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Skoru	Peptidler
KONTROL	1	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	25834	6,1392	94,9036	4
ORTAK	1	Osteopontin	35401	4,1777	258,5635	8
	2	Uromodulin	69714	4,8823	57,2404	3
	3	Prostaglandin-H2 D-isomerase (Fragment)	13716	8,1943	579,994	1
	4	Alpha-2-HS-glycoprotein	39386	5,332	569,414	20
PCa	1	Ig kappa chain V-III region SIE	11767	8,7891	444.468	2
	2	Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor	30831	6,0894	213,9053	1
	3	Protein FAM200A (Fragment)	61838	5,3115	36,8437	3
	4	Cohesin subunit SA-2	141235	5,1094	17,4747	3
	5	Atherin	46238	5,5869	33,7012	2
	6	Nucleoporin NUP188 homolog	195916	6,2607	9,371	4

Kontrol ve prostat kanserli hasta grubunun idrarlarında bulunan proteinler ve her ikisinde de ortak olarak bulunan proteinlerin isimleri, molekül ağırlıkları, pI değerleri, PLGS skorları ve peptid sayıları Tablo 6.4’de verilmiştir. Tabloda kırmızı ile gösterilen alan kontrol grubu örneklerinde ve sarı ile gösterilen alan da PCa örneklerinde bulunan proteinleri göstermektedir. Turuncu ile işaretli alanda ise her iki grupta da ortak olarak bulunan proteinler görülmektedir.



Şekil 6.2 Sağlıklı idrarlarda diyaliz ve aseton presipitasyonu ile tanımlanan proteinler

Diyaliz ve Aseton presipitasyonu örneklerinde bulunan protein sayılarının venn diyagramında gösterimi Şekil 6.2'dedir. Şekilde kırmızı ile gösterilen alan diyaliz örneğinde ve sarı ile gösterilen alan da aseton presipitasyonu örneğinde 3 enjeksiyon sonunda en yüksek tanımlanan protein sayısını göstermektedir. Turuncu ile işaretli alanda ise her iki grupta da ortak olarak bulunan proteinlerin sayısı yer almaktadır. Buna göre Aseton presipitasyonu örneğinde 5 tanesi iki örnekte de ortak olmak üzere toplamda 52 protein tanımlanmıştır fakat bunların 4 tanesi ortak proteinlerdir dolayısıyla Kontrol grubundan farklı olarak 6 protein tanımlanmıştır.

Tablo 6.5 Diyaliz ve aseton presipitasyonu grubunda bulunan ve her ikisinde de ortak olarak bulunan proteinler

		Tanım	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Skoru	Peptidler
DİYALİZ	1	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	102336	8,042	13,5477	5
	2	Histone H2A	18470	11,9297	265,2033	1
	3	Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor	30831	6,0894	219,5604	1
	4	Secreted and transmembrane protein 1 (Fragment)	15947	6,6812	303,7497	2
	5	Serum albumin	69181	5,9385	138,5949	9
ORTAK	1	Uromodulin	69714	4,8823	717,179	27
	2	Tyrosine-protein kinase receptor UFO	98273	5,1182	241,7074	4
	3	Osteopontin	35401	4,1777	1599,062	18
	4	Plasma serine protease inhibitor	45645	9,6094	2150,594	11
	5	Pro-epidermal growth factor	45645	5,4419	357,3834	30
ASETON PRESİPİTASYONU	1	Alpha-1-antitrypsin	46679	5,2412	91,4708	9
	2	Alpha-amylase 1	57730	6,4819	116,0675	7
	3	Annexin (Fragment)	12056	7,3916	655,7067	1
	4	Annexin (Fragment)	19518	5,5869	1614,908	3
	5	Apolipoprotein D (Fragment)	24142	5,3027	196,5524	5
	6	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	44969	6,6123	38,9999	3
	7	Butyrophilin subfamily 2 member A1 (Fragment)	9906	7,3081	423,884	3
	8	CD44 antigen (Fragment)	32034	4,8428	395,7426	7
	9	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	250379	5,127	22,7666	3
	10	Clusterin	52461	5,8389	1716,994	14
	11	Collagen alpha-1(VI) chain	108271	5,0903	91,8564	12
	12	Collagen alpha-1(XV) chain	139972	4,7051	21,7332	3
	13	Deoxyribonuclease-1	31413	4,5205	323,9504	4
	14	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	25834	6,1392	63,9754	5
	15	Galectin-3-binding protein	65289	4,9438	301,1547	15

ASETON PRESIPITASYONU	16	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	40850	6,1304	202,5527	5
	17	Heat shock protein beta-1	22768	5,959	292,381	6
	18	ICOS ligand	51892	7,9365	460,3704	5
	19	Ig alpha-1 chain C region	37630	6,0571	316,7343	7
	20	Ig gamma-1 chain C region	51121	7,3813	296,0397	7
	21	Ig kappa chain C region (Fragment)	11712	5,5005	716,5988	2
	22	Ig kappa chain V-III region SIE	11767	8,7891	366,2435	2
	23	ITIH4 protein	103816	6,4365	170,1722	7
	24	Kallikrein-1	28870	4,4985	1250,738	17
	25	Keratin, type II cytoskeletal 5 (Fragment)	20643	6,9111	366,9395	5
	26	Keratin, type II cytoskeletal 6A	60008	8,0537	190,1566	5
	27	Kininogen-1	71912	6,3398	286,0811	21
	28	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	136145	4,563	20,064	4
	29	Lysosomal alpha-glucosidase	105256	5,5649	278,0461	9
	30	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	55763	6,7998	127,4271	3
	31	Maltase-glucoamylase, intestinal (Fragment)	228925	4,9204	37,1941	5
	32	Matrix-remodeling-associated protein 8	49101	6,7866	87,3438	7
	33	Myeloperoxidase	83814	9,0366	33,3313	2
	34	Neural cell adhesion molecule L1-like protein	130712	5,4316	24,1268	4
	35	Pancreatic alpha-amylase	57670	6,6255	80,4831	5
	36	Pepsin A-4	41950	3,9595	334,7479	4
	37	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1	28229	4,7271	1674,115	3
	38	Plasma protease C1 inhibitor	59454	6,293	109,2789	5
39	Prostaglandin-H2 D-isomerase (Fragment)	13716	8,1943	3130,571	5	
40	Protein AMBP	38973	5,874	1577,851	11	
41	Protein LOC102723996	20982	4,897	273,3701	2	
42	Protein S100-A9	13233	5,6807	723,14	5	
43	Roundabout homolog 4	107390	6,1685	161,7696	4	

ASETON PRESİPİTASYONU	41	Protein LOC102723996	20982	4,897	273,3701	2
	42	Protein S100-A9	13233	5,6807	723,14	5
	43	Roundabout homolog 4	107390	6,1685	161,7696	4
	44	Secreted and transmembrane protein 1 (Fragment)	15947	6,6812	1747,795	9
	45	Serpin B3	44536	6,3662	106,8488	6
	46	Serum albumin	69321	5,8608	1209,036	42
	47	Vasorin	71667	7,0884	416,1889	5

Diyaliz ve Aseton presipitasyonu örneklerinde bulunan proteinler ve her ikisinde de ortak olarak bulunan proteinlerin isimleri, molekül ağırlıkları, pI değerleri, PLGS skorları ve peptid sayıları Tablo 6.5’de verilmiştir. Tabloda kırmızı ile gösterilen alan diyaliz örneklerinde ve sarı ile gösterilen alan da Aseton presipitasyonu örneklerinde bulunan proteinleri göstermektedir. Turuncu ile işaretli alanda ise her iki grupta da ortak olarak bulunan proteinler görülmektedir.

Tablo 6.6 FASP örneklerinde bulunan proteinler

	Tanım	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Skoru	Peptidler
1	Serum albumin	69321	58.608	33750.61	182
2	Plasma serine protease inhibitor	45645	96.094	29999.25	35
3	Polyubiquitin-B	17204	73.169	28226.81	13
4	Ig kappa chain C region (Fragment)	11712	55.005	27113.87	12
5	Deoxyribonuclease-1	31413	45.205	25620.4	17
6	WAP four-disulfide core domain protein 2	12983	44.839	24527.67	20
7	CD59 glycoprotein	11976	53.672	23061.21	27
8	Serotransferrin	77013	67.515	22308.25	53
9	Ig gamma-1 chain C region	51121	73.813	18881.83	25
10	Protein AMBP	38973	5.874	17490.88	36
11	Clusterin	52461	58.389	16226.99	16
12	Pancreatic alpha-amylase	57670	66.255	14735.14	29
13	Fatty acid-binding protein, epidermal	15154	68.042	12908.18	10
14	Alpha-amylase 1	57730	64.819	12524.0	23
15	Alpha-amylase 2B	57673	6.668	12289.58	24
16	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	54604	47.681	11841.32	16
17	Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	31451	54.097	11840.33	8
18	Ig heavy chain V-III region 23	12574	84.639	11780.91	4
19	Ig alpha-1 chain C region	37630	60.571	11390.33	26
20	Glutaminy-peptide cyclotransferase	40850	61.304	11061.43	17
21	Protein S100-A9	13233	56.807	10714.02	23
22	Transthyretin	20132	50.376	10705.54	7
23	Galectin-3-binding protein	65289	49.438	9.260.525	32
24	Protein IGKV1-33	11834	49.263	9.258.223	2
25	Ig alpha-2 chain C region	36503	56.616	9.196.486	25
26	CD44 antigen (Fragment)	32034	48.428	9.091.987	13

27	Kininogen-1	71912	63.398	9.077.681	47
28	Protein IGKV1-8	19954	86.602	9.054.699	4
29	Immunoglobulin J chain	18086	49.102	9.014.247	11
30	Kallikrein-1	28870	44.985	8.924.551	13
31	Serine protease inhibitor Kazal-type 1	8501	76.187	8.880.261	4
32	Ig gamma-2 chain C region	35877	7.437	8.805.389	21
33	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34237	56.367	8.658.693	17
34	Ig kappa chain V-III region SIE	11767	87.891	8535.41	6
35	Protein IGKV2-28 (Fragment)	12948	55.298	8.208.182	2
36	Uromodulin	69714	48.823	8.123.385	76
37	Ig lambda-2 chain C regions (Fragment)	11340	70.737	8.042.757	8
38	Ribonuclease pancreatic	17632	88.945	7.916.083	9
39	Apolipoprotein D (Fragment)	24142	53.027	7.840.243	16
40	Ig kappa chain V-III region GOL	11822	95.024	7.766.688	4
41	Secreted and transmembrane protein 1 (Fragment)	15947	66.812	7.686.074	4
42	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	25834	61.392	7290.36	12
43	Haptoglobin	45176	61.201	7.280.239	20
44	Trefoil factor 2	14274	54.155	7.184.559	7
45	Pro-epidermal growth factor	133906	54.419	7.184.319	61
46	Ig gamma-4 chain C region	35917	71.104	7.084.017	15
47	Ig kappa chain V-I region AU	11931	49.263	6.820.497	2
48	Non-secretory ribonuclease	18342	87.671	6.774.067	8
49	Small proline-rich protein 3	18142	86.616	6.448.407	16
50	Cystatin-C	15789	89.854	6.302.104	14
51	Hemopexin	51643	65.654	6.284.687	28
52	Polymeric immunoglobulin receptor	83231	54.346	6.269.589	34
53	Insulin-like growth factor-binding protein 7	29111	77.856	6.240.645	16
54	Alpha-1-antichymotrypsin	47620	51.812	5.680.871	14

55	Vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	21520	47.153	5.471.372	5
56	Protein S100-A8	10827	66.167	5350.14	14
57	Peptidoglycan recognition protein 1	21716	86.104	5.210.326	9
58	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	23048	90.234	5.148.967	8
59	Collagen alpha-1(VI) chain	108271	50.903	5.070.937	35
60	Plasma protease C1 inhibitor	55119	6.082	4.993.484	23
61	Hemoglobin subunit beta	15988	68.804	4.955.997	6
62	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	21043	73.901	4.793.021	9
63	Vesicular integral-membrane protein VIP36	36520	61.846	4.752.863	14
64	Alpha-1-antitrypsin	46707	52.412	4.723.423	28
65	Prothrombin	65366	5.376	4.508.197	12
66	Annexin A1	38689	66.372	4.499.166	12
67	Syndecan-1	32441	43.389	4.461.867	2
68	Pepsin A-4	41950	39.595	4.372.411	14
69	Lysosomal alpha-glucosidase	105256	55.649	4.349.823	32
70	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23496	47.417	4220.03	9
71	Keratin, type I cytoskeletal 13	45232	45.615	4.132.104	21
72	Prosaposin	58073	48.853	4.085.893	25
73	Serpin B3	44536	63.662	3.978.948	22
74	Vasorin	71667	70.884	3.924.041	13
75	CD320 antigen	28972	44.106	3.750.538	5
76	Protein S100-A11	11732	7.021	3683.7	2
77	Keratin, type II cytoskeletal 4	57249	62.153	3.657.774	12
78	IST1 homolog (Fragment)	27892	70.957	3.623.433	9
79	Osteopontin	35401	41.777	3.622.878	23
80	Beta-2-microglobulin	13705	60.718	3614.58	6
81	Ig heavy chain V-III region TIL	12348	94.102	3.598.767	3
82	Annexin A2	38579	77.842	3501.69	16
83	Cathepsin D	44523	60.908	3.450.004	15

84	Epididymal secretory protein E1	22426	85.576	3.407.861	6
85	Tetranectin	17782	47.725	3.392.404	13
86	Vitamin D-binding protein	52929	52.383	3318.79	20
87	Actin, cytoplasmic 1	41709	51.431	3.275.238	14
88	Ig kappa chain V-I region Ni	12238	50.449	3.216.777	2
89	Hepatitis A virus cellular receptor 2	30311	47.241	3.038.831	8
90	Beta-2-glycoprotein 1	38272	78.691	2.953.178	12
91	Folate receptor alpha	29799	78.574	2.934.553	11
92	ITIH4 protein	103816	64.365	2.897.386	33
93	Cystatin-B	11132	75.073	2.783.621	5
94	Ig kappa chain V-IV region Len	12632	81.665	2.722.615	3
95	Prostaglandin-H2 D-isomerase	21015	78.325	2.710.094	12
96	Mucin-1 (Fragment)	25549	6.249	2.670.956	5
97	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1	28229	47.271	2.582.127	9
98	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B	24406	62.461	2564.83	4
99	Retinol-binding protein 4	22853	53.306	2.465.542	10
100	Cornulin	53501	56.792	2.457.604	12
101	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1	11178	50.332	2.445.941	7
102	Haptoglobin-related protein	39004	66.724	2.442.159	10
103	Prostasin	36408	54.434	2.426.827	2
104	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14	20739	57.349	2400.78	4
105	Calmodulin	21675	42.524	2.327.326	7
106	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	37504	77.285	2.310.172	6
107	Ester hydrolase C11orf54	28664	66.006	2.268.607	4
108	Ig gamma-3 chain C region	41260	77.886	2.259.807	17
109	Prolactin-inducible protein	16561	81.035	2.230.011	5
110	Ig mu chain C region	64065	6.772	2.208.543	12
111	Apolipoprotein(a)	62513	53.745	2132.83	6

112	ICOS ligand	51892	79.365	2.091.582	8
113	Neutrophil defensin 1	10194	67.749	2.080.114	3
114	Alpha-1-acid glycoprotein 2	23587	48.457	2.073.308	6
115	Cornifin-A	9870	85.137	2.042.731	3
116	Beta-defensin 1	7414	86.411	2.031.956	1
117	Nuclear transport factor 2	14469	49.526	2.031.814	4
118	Prostate stem cell antigen	12903	48.896	2.031.056	7
119	Keratin, type II cytoskeletal 6A	60008	80.537	2.029.124	14
120	Macrophage colony-stimulating factor 1	60141	49.922	1.973.874	9
121	Monocyte differentiation antigen CD14	40050	57.993	1.973.779	7
122	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	22573	91.963	1.954.026	8
123	Activin receptor type-1B (Fragment)	8169	61.904	1.927.845	2
124	6-phosphogluconolactonase	27529	56.396	1.832.984	7
125	Keratin, type II cytoskeletal 5	62339	7.793	1.827.685	11
126	Keratin, type II cytoskeletal 6C	59988	80.537	1.808.909	12
127	Interleukin-1 receptor antagonist protein	20041	57.686	1.788.693	4
128	Cadherin-2	99747	44.429	1.783.241	10
129	Prostatic acid phosphatase	44537	57.964	1.727.425	10
130	Keratin, type I cytoskeletal 19	44079	48.604	1.720.327	12
131	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	8182	98.525	1682.75	2
132	Protein S100-A7	11463	63.413	1.682.509	7
133	Amyloid beta A4 protein	80782	45.454	1.673.029	9
134	Butyrophilin subfamily 2 member A1	59594	60.469	1.624.738	8
135	Small proline-rich protein 2A	7959	83.818	1.618.892	3
136	Keratin, type II cytoskeletal 6B	60030	80.537	1616.57	12
137	Keratin, type II cytoskeletal 1	65998	82.661	1.598.249	15
138	Alpha-N-acetylglucosaminidase	82213	61.919	1.596.132	20
139	Cell adhesion molecule 4	42758	58.755	1.593.172	10
140	L-lactate dehydrogenase B chain	36615	56.396	1.588.207	5

141	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	65667	78.735	1.564.213	10
142	Endothelial protein C receptor	26654	67.852	1.557.147	8
143	Cornifin-B	9880	85.151	1.549.729	3
144	Heat shock protein beta-1	22768	5.959	1511.95	6
145	Protein shisa-5 (Fragment)	12217	5.105	1.511.896	6
146	Tyrosine-protein kinase receptor UFO	98273	51.182	1.460.886	6
147	Insulin-like growth factor-binding protein 2	34791	72.803	1.444.709	9
148	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	45154	4.396	1.391.678	4
149	CMRF35-like molecule 9	36037	55.825	1.366.866	10
150	Glutathione S-transferase P	23341	52.822	1.366.437	5
151	Protein CutA	14391	51.709	1.365.791	3
152	Golgi membrane protein 1	45305	47.183	1.364.932	12
153	Keratin, type I cytoskeletal 10	58791	49.556	1.349.066	22
154	POTE ankyrin domain family member E	121285	57.715	1347.92	10
155	Peroxiredoxin-1	22096	82.427	1.338.965	7
156	Actin, gamma-enteric smooth muscle	41849	51.606	1.337.764	13
157	Major prion protein (Fragment)	27260	91.963	1.237.979	2
158	Ly-6/neurotoxin-like protein 1	14016	62.725	1.237.413	2
159	Vitronectin	54271	54.331	1.229.317	6
160	Hemicentin-1 (Fragment)	26903	59.399	1.198.708	8
161	Zymogen granule protein 16 homolog B	19588	5.584	1.198.232	2
162	Leukocyte elastase inhibitor	42714	58.521	1177.71	12
163	Protein YIPF3	38863	52.515	1.177.336	8
164	Keratin, type I cytoskeletal 15	49181	45.132	1.160.991	15
165	Fibronectin	262457	53.438	1.151.645	33
166	Tetraspanin-1	26283	49.365	1150.32	1
167	Acyl-CoA-binding protein	15948	47.886	1.149.451	2
168	Collagen alpha-1(XV) chain	139972	47.051	1.144.316	16
169	Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor	30831	60.894	1.121.396	7

170	Lysozyme C	16526	93.252	1.111.477	6
171	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	136145	4.563	1.057.861	30
172	Glutathione peroxidase	25385	82.222	1.055.016	9
173	V-type proton ATPase subunit S1	51992	56.851	1.048.892	4
174	Matrix-remodeling-associated protein 8	49101	67.866	1.044.202	8
175	Neuronal growth regulator 1	32829	64.731	1.043.543	3
176	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65393	80.537	1.019.813	14
177	Urokinase-type plasminogen activator	48475	83.291	9.674.343	12
178	Keratin, type I cytoskeletal 14	51529	48.984	950.563	16
179	Migration and invasion enhancer 1	12392	42.261	9.460.244	2
180	CD27 antigen	29117	74.487	9.457.551	5
181	Immunoglobulin superfamily-containing leucine-rich repeat protein (Fragment)	20320	54.624	9.363.823	3
182	Alpha-enolase	47139	71.719	9.110.828	9
183	Thioredoxin	11729	46.201	9.103.105	3
184	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (Fragment)	24452	62.329	906.78	3
185	Biotinidase	61093	57.891	9.045.667	7
186	Probable serine carboxypeptidase CPVL	54129	52.559	901.942	11
187	Elafin	12261	89.751	8.950.088	4
188	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=LAMP2 PE=1 SV=2	44932	5.231	8.891.702	5
189	Complement factor I	66581	74.092	8.627.368	10
190	Guanylin	12380	43.579	8.365.266	4
191	Cadherin-1	99965	44.458	8.128.582	6
192	Resistin	11411	66.138	8.101.341	3
193	Sulfhydryl oxidase 1	82525	90.688	7.965.279	12
194	Acid ceramidase	41769	81.343	7.961.227	9
195	Attractin	158431	6.999	7.878.733	30
196	T-cell antigen CD7	23026	61.948	7.816.116	2

197	Hemoglobin subunit alpha	15247	91.787	7.687.019	3
198	Carboxypeptidase Q	51854	57.407	7.496.833	5
199	Beta-galactosidase	60444	63.765	7.318.783	5
200	Ig lambda chain V-I region HA	11888	92.095	7.236.491	2
201	Antithrombin-III	52568	63.047	7.164.363	7
202	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (Fragment)	20464	53.789	7.128.874	4
203	Thy-1 membrane glycoprotein (Fragment)	17029	92.461	6.961.796	3
204	WNT1-inducible-signaling pathway protein 2	26806	7.752	6.819.125	3
205	Interleukin 18 binding protein, isoform CRA_a	21916	75.073	6.791.926	6
206	Gamma-glutamyltranspeptidase 1	61371	66.987	6.770.626	7
207	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	23771	93.442	6.728.019	3
208	Alpha-1B-glycoprotein	54219	54.756	6.720.552	5
209	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 3	49046	48.135	6.710.496	2
210	Plakophilin-4	133886	92.563	6.707.807	9
211	Alpha-2-HS-glycoprotein	39386	5.332	6.670.539	7
212	Carboxypeptidase M	50481	70.063	663.78	7
213	Roundabout homolog 4	107390	61.685	6.508.233	16
214	Fructose-bisphosphate aldolase	39792	80.654	649.424	9
215	Melanotransferrin	80163	55.269	6.472.218	7
216	CMRF35-like molecule 2	22903	80.024	643.856	3
217	Mucosal addressin cell adhesion molecule 1	40865	47.695	6.313.347	4
218	IGF-like family receptor 1	37870	67.119	6.225.193	5
219	Intercellular adhesion molecule 2 (Fragment)	18481	59.194	6.146.066	2
220	Apolipoprotein E (Fragment)	24888	55.986	6.044.556	7
221	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36030	86.968	6.010.394	4
222	Platelet glycoprotein VI	36842	93.823	5.923.836	5
223	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	27945	45.996	5.809.846	2

224	Cystatin-M	16500	81.255	5.774.627	5
225	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	22948	104.136	576.962	1
226	Cell adhesion molecule 1	47546	4.481	5.748.768	5
227	Frizzled-4	59841	Haz.98	5.653.009	2
228	Triosephosphate isomerase	30771	55.474	5.574.371	5
229	Cadherin-11	87910	45.586	5.552.178	8
230	Nidogen-1	136290	49.541	5.530.337	14
231	ATP-dependent RNA helicase DDX19A	50488	59.648	5.398.732	3
232	Fibrinogen alpha chain	94914	56.118	5.348.106	5
233	Protein NOV homolog	39135	75.732	5.343.375	3
234	Uncharacterized protein (Fragment)	38406	45.645	5.308.365	5
235	Ceruloplasmin	122127	53.364	5.153.294	16
236	Peroxiredoxin-2	21878	55.679	5.022.973	4
237	Tenascin-X	212944	48.032	5.016.098	8
238	Keratin, type I cytoskeletal 17	40262	47.036	5.015.066	8
239	Bile salt-activated lipase	79271	4.957	4.994.175	10
240	Complement component C7	93457	60.498	4.984.826	17
241	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	65800	80.991	4.935.161	8
242	Immunoglobulin superfamily member 8 (Fragment)	32264	63.442	4.921.114	4
243	Corticosteroid-binding globulin	45111	55.884	4.838.474	3
244	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	161003	53.745	4.787.602	16
245	Endosialin	80807	50.288	4.779.742	13
246	Lysosomal protective protein	54431	61.567	4.750.767	6
247	Cyclin-dependent kinase 2-associated protein 1	12357	9.668	4.650.764	1
248	Poliovirus receptor	42854	63.809	4.644.588	6
249	G-protein-coupled receptor family C group 5 member C	52900	90.601	4.617.802	5
250	Fibrillin-1	312021	46.187	4.532.834	38
251	Pro-cathepsin H	36245	80.508	4.513.721	4

252	Involucrin	68437	44.326	4.474.506	12
253	Filamin-A	280561	56.367	4.414.396	11
254	Keratin, type II cytoskeletal 1b	61863	56.206	4.396.283	6
255	Sialate O-acetyltransferase	58277	69.668	439.526	7
256	Heat shock cognate 71 kDa protein	68763	51.973	4.387.822	8
257	Beta-actin-like protein 2	41975	52.515	4.344.123	8
258	Insulin-like growth factor binding protein 3	29727	84.785	4.319.438	4
259	Heat shock-related 70 kDa protein 2	69977	54.082	4.306.294	7
260	Nectin-4	55419	50.786	4.305.109	8
261	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	145981	52.397	4.155.179	9
262	Collagen alpha-1(XII) chain	332994	52.134	4.057.914	24
263	Pyruvate kinase PKM	57900	77.534	3.982.202	8
264	Heat shock 70 kDa protein 1A	70009	53.188	397.785	7
265	SLAM family member 5	38757	66.768	3.959.665	3
266	Cartilage oligomeric matrix protein	79646	41.836	3.906.679	7
267	Apolipoprotein A-I	30758	54.316	3.862.774	7
268	Complement decay-accelerating factor	49306	88.184	3.849.826	4
269	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	47942	72.686	383.249	6
270	Lysosomal acid phosphatase	44482	62.212	3.758.467	4
271	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	54932	65.361	3.735.534	7
272	Carboxypeptidase E	53117	48.472	370.04	6
273	Ig kappa chain V-I region CAR	11696	97.163	3.683.212	1
274	Protein FAM3C	24664	8.395	3.646.154	5
275	Uncharacterized protein	108612	67.559	3.562.431	4
276	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule	37983	64.805	3.490.927	3
277	Fructose-bisphosphate aldolase B	39448	7.793	3.443.256	6
278	E2F-associated phosphoprotein (Fragment)	23453	49.863	3.390.288	5
279	Keratin, type I cytoskeletal 24	55053	46.948	3.358.482	8
280	Multimerin-2	104344	54.697	3.253.368	6

281	Dermatopontin	23988	45.029	3.236.412	4
282	Granulins (Fragment)	41321	60.615	3.231.427	5
283	Di-N-acetylchitobiase	43731	61.831	3.203.773	4
284	TOM1-like protein 1	36192	47.388	3.174.088	4
285	Growth/differentiation factor 15	34118	9.936	3.172.113	4
286	Cadherin-13	76921	4.585	3.157.309	12
287	Tenascin	210717	46.567	3.119.397	12
288	Complement C1r subcomponent-like protein	53464	67.808	3.083.701	6
289	Arylsulfatase A	53771	56.118	3.032.628	6
290	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	216903	60.176	3.015.685	16
291	Gelsolin	82474	52.896	291.227	10
292	Thrombomodulin	60289	45.923	2.701.782	4
293	Cdc42 effector protein 4	37956	4.875	2.665.371	6
294	Maltase-glucoamylase, intestinal	311823	50.522	2.602.722	24
295	Elongation factor 1-alpha 1	47852	93.691	2.535.825	4
296	Leukocyte receptor cluster member 8	86258	95.874	2.497.415	3
297	Nuclear receptor corepressor 2	272652	73.008	2.495.732	4
298	Contactin-1	113249	55.137	2.490.925	12
299	Homeobox protein TGIF1 (Fragment)	24088	92.681	2.454.787	4
300	Carboxypeptidase N subunit 2	60518	55.679	2.438.337	5
301	Mannan-binding lectin serine protease 2	75653	5.269	2.434.934	9
302	Ataxin-2	116441	86.836	2.430.882	2
303	Protein TSSC1	34831	52.617	2.429.637	2
304	Alpha-2-antiplasmin (Fragment)	27805	63.252	2.375.401	7
305	14-3-3 protein beta/alpha	28064	45.674	2.359.301	2
306	Protein IGKV1-27 (Fragment)	12703	84.683	2.330.292	3
307	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	72922	60.132	2.329.193	6
308	Macrophage migration inhibitory factor	12468	79.922	231.014	4
309	14-3-3 protein zeta/delta	19060	42.773	229.189	4

310	Kallistatin	48511	75.601	2.284.633	6
311	Uncharacterized protein	140852	67.793	2.231.845	9
312	Peroxiredoxin-6	25019	59.575	2.136.549	4
313	Gamma-glutamylcyclotransferase	20994	48.779	2.095.645	5
314	Napsin-A	45357	61.523	2.093.628	7
315	Transcription elongation factor A N-terminal and central domain-containing protein	40219	86.382	2.085.668	5
316	Dynactin subunit 1	139007	53.672	2.058.382	8
317	Ephrin-B1 OS=Homo sapiens GN=EFNB1 PE=1 SV=1	37982	91.479	2.028.946	3
318	Zinc finger protein 578 (Fragment)	29285	64.937	1.943.019	3
319	Desmoglein-2	122217	49.541	1.938.209	7
320	78 kDa glucose-regulated protein	72288	4.875	1.937.043	9
321	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	44969	66.123	1.909.923	5
322	Calbindin	30006	45.088	1.905.481	5
323	Ankyrin-2 (Fragment)	188988	68.613	190.433	13
324	Angiopoietin-related protein 2	57068	72.773	1.891.952	9
325	Cartilage intermediate layer protein 2	126776	81.401	1.888.601	12
326	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	55763	67.998	186.658	6
327	Sushi domain-containing protein 2	90149	58.154	1.861.875	11
328	14-3-3 protein epsilon	29155	44.355	1.834.724	3
329	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	120636	7.938	1.801.819	9
330	Junctional adhesion molecule A	30178	79.849	1.787.348	5
331	Ciliary neurotrophic factor receptor subunit alpha	40607	62.783	1.767.241	2
332	Regulator of G-protein signaling 3	132252	58.491	1.763.589	9
333	Fibulin-5	50846	44.209	1.738.144	5
334	ATP-dependent RNA helicase DDX55	65149	98.071	1.732.978	4
335	72 kDa type IV collagenase	73834	50.947	1.681.941	6
336	Basal cell adhesion molecule	63654	56.763	167.025	5
337	Complement C3	187029	59.648	1.660.271	18

338	Sorting nexin-4	51876	5.606	1.641.741	4
339	Transcription elongation factor A protein 2	33579	94.468	163.882	7
340	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	250379	5.127	162.68	15
341	Fatty acid-binding protein, liver	13799	50.508	1.625.324	2
342	PITH domain-containing protein 1	24162	5.376	1.617.165	2
343	Keratin, type I cytoskeletal 9	62026	49.585	1.601.223	7
344	Protein Daple	228088	58.081	1.596.861	6
345	MTSS1-like protein (Fragment)	14744	58.535	159.081	1
346	UPF0764 protein C16orf89	48787	55.854	1.588.499	6
347	Protein delta homolog 1	41272	53.071	1.583.108	4
348	Thrombospondin-1	129299	45.278	1.575.103	12
349	Lysyl oxidase homolog 1	63070	72.363	1.571.066	7
350	Nucleolar protein 3 (Fragment)	15012	47.241	1.562.827	1
351	Myosin light chain kinase, smooth muscle	210581	57.671	1.537.992	7
352	Plasminogen	90510	69.097	1.506.552	5
353	Dipeptidyl peptidase 1	51820	65.508	1.505.356	6
354	Protein HEG homolog 1	147368	57.495	1.502.342	9
355	Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2	144270	78.706	1.496.796	12
356	C-type lectin domain family 14 member A	51602	59.326	146.664	4
357	Sialic acid-binding Ig-like lectin 7	51110	69.287	1.453.101	3
358	Serine/threonine-protein kinase Sgk1 (Fragment)	16098	53.701	1.440.428	3
359	Myotilin	55360	92.417	1.435.882	7
360	Cadherin-related family member 5	88073	45.967	142.705	3
361	T-complex protein 1 subunit gamma (Fragment)	30741	65.229	1.411.253	4
362	Serpin B13	45258	54.653	1.401.173	5
363	SPARC-like protein 1	75161	45.264	137.389	7
364	Uncharacterized protein C16orf46	43390	85.298	1.371.633	2
365	Galectin-3	26136	88.755	1.371.028	2

366	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase 2 (Fragment)	13400	9.605	1.367.861	3
367	Collagen alpha-1(XVIII) chain	178076	55.957	1.030.888	7
368	Chromogranin-A	50657	43.857	1.014.203	5
369	Zinc finger protein 227	91973	88.521	98.41	9
370	Fibulin-1	78276	50.698	92.16	8
371	Tumor suppressor p53-binding protein 1	213440	44.297	710.355	18
372	Son of sevenless homolog 2	152881	63.853	687.739	10



Tablo 6.7 In-Sol örneklerinde bulunan proteinler

	Tanım	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Skoru	Peptid r
1	Period circadian protein homolog 2	136493	60.146	9.432.396	17
2	Eukaryotic initiation factor 4A-II	10798	5.395	6.302.249	3
3	Uromodulin	69714	48.823	6.108.812	27
4	Microtubule-associated protein 2	199402	46.318	5.516.055	26
5	Serum albumin	69321	58.608	5.372.054	14
6	Kinesin-like protein KIF20A	100215	64.805	441.46	15
7	Cohesin subunit SA-3	138945	50.728	3.673.479	10
8	Alkaline ceramidase 3	5871	39.316	3.537.513	2
9	Integrin beta-1	88356	50.977	3.336.072	17
10	Protein FAM9A	37316	46.274	3.307.426	6
11	Zinc finger protein 532	141606	86.528	3.282.615	21
12	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5	31505	43.037	3.172.533	16
13	Tetraspanin-5	30317	4.396	3.125.841	6
14	Putative uncharacterized protein encoded by LINC00696	16888	46.919	277.316	7
15	Translocon-associated protein subunit alpha	33866	43.828	2.492.372	4
16	TM2 domain-containing protein 3	27100	79.395	2.452.299	7
17	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	15022	76.245	2.329.474	7
18	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4	173319	51.138	1.359.605	36
19	Laminin subunit beta-1	197907	4.645	1.274.347	37
20	Palladin	150470	66.636	1.147.256	13
21	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	53131	57.803	996.259	9
22	Laminin subunit alpha-4	202439	5.814	779.301	23
23	Ubiquitin-associated protein 2-like	113558	62.051	764.272	14
24	Pecanex-like protein 2	237124	62.842	721.299	26
25	Dedicator of cytokinesis protein 9	237603	75.498	442.463	23
26	Calpain-15	117239	62.549	391.993	15

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genomiklerdeki ileri teknoloji insan hücrelerini ve kanserdeki değişimi anlamaya fırsat sağlamış ancak bir tanıya götürememiştir. Günümüzde genomiklerdeki ileri teknoloji proteomiklerde de yakalanmıştır ve bu alanda çalışmalar hızla ilerlemektedir.

Kütle spektrometresi gibi yüksek hacimli proteomik teknolojilerindeki gelişmeler hücredeki protein seviyelerindeki değişiklikleri topluca göstermektedir. Proteinler genlerin fonksiyonel birimleri olduğu için bu analizler ile ortaya konulan farklılıkların hastalıkla doğrudan ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Çünkü DNA transkripsiyonu ve ardından gelen mRNA translasyonu ile sentez edilen protein, translasyon sonrasında da çeşitli değişikliklere uğrayabilmektedir.

Bu nedenle kanser çalışmalarında proteomik analizleri ile elde edilen yeni biyobelirteçlerin hastalığa daha özgül olabileceği çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir. Ancak bu teknoloji ile dokuda görülebilen binlerce protein arasında normal ve kanserli protein farkını tespit etmek, karakterize etmek proteomik bilimcilerini bir hayli meşgul etmektedir. Günümüzde bu durumu daha iyi kavrayabilmek için sistem biyolojisi gibi yeni alanlar gelişmeye başlamıştır. Teknoloji odaklı olarak çalışan proteomiksin halkın sağlığına katkıda bulunacak duruma gelmesi için çok kapsamlı ve planlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Günümüzde proteomik teknolojisi kanser hastalarının teşhisi ve tedavisi için ümit verici bir alan gibi görünmektedir (20).

Proteomik olarak isimlendirilebilecek ilk protein çalışmaları 1975 yılında 2-D jelin tanıtılması ile birlikte O'Farrel, Klose ve Scheele tarafından yapılmıştır (16).

Oh ve ark, insan üriner protein preparatlarıyla ilgili zorlukların, idrarın protein konsantrasyonunun düşük olması ve proteinlere veya glikozaminoglikan gibi diğer interfere edici moleküllere sıkıca bağlı olan tuzların varlığından ileri geldiğini belirtmişlerdir (43).

İnterfere edici molekülleri uzaklaştırmak amacıyla idrar örneklerinin diyaliz edildiği daha yakın tarihli bir çalışmada, cinsiyete bağlı olarak görülebilecek protein spotlarını engellemek amacıyla 20 farklı erkek ve 20 farklı kadından alınan idrar örnekleri karıştırılarak havuz oluşturulmuş ve toplamda 113 protein tanımlanmıştır (43).

Molekül ağırlığı 30 kDa'dan düşük olan proteinleri büyük proteinlerden ayırarak zenginleştirmek (enrichment) amacıyla protein fraksinasyon stratejisi tasarlanmıştır. Albümin ve İmmünglobulin G (IgG) gibi yüksek miktarlarda bulunan büyük proteinleri uzaklaştırmak için immunoafinite subtraksiyon kromatografisinin kullanıldığı ve daha sonra 2-D PAGE ile ayrıştırılıp MS ile analiz edildiği çalışmada yaklaşık 150 protein tanımlanmıştır (85).

Başka bir çalışmada sağlıklı kişilerin idrarındaki protein ve peptidleri tanımlayabilmek amacıyla kapiller elektroforez ve ESI-TOF MS birleştirilmiş ve 247 polipeptitten oluşan "normal idrar polipeptid yapısı" diye isimlendirdikleri yapı bulunmuştur (86). Aynı şekilde Schaub ve ark. insan idrar profilini elde etmek için SELDI-TOF MS kullanmışlardır. Her iki çalışmada da protein tanımlaması yapılmamıştır (87).

Daha yakın zamanlarda 3 farklı ayırma yaklaşımı ile insan idrar proteomu analiz edilmiştir. İdrar proteinleri aseton ile presipite edilmiş, ayrıştırılmış ve 3 farklı yaklaşımla analiz edilmiştir, 1-DE+1-D LC/MS/MS, direkt 1-D LC/MS/MS, and 2-D LC/MS/MS. Toplamda 226 idrar proteini tanımlanmıştır. Bunların 171 tanesi proteomik yaklaşımla ilk kez tanımlanmıştır içlerinde 4 tanesi de sadece erkeklere spesifiktir (88).

Konsantrasyon/eşitleme tekniği ile yapılan bir çalışmada heksamerik peptid ligandı kütüphaneleri ile kaplı boncuklar (beads coated with hexameric peptide ligand libraries) kullanılmış ve insan idrarında 383 protein bileşeni tanımlanmıştır. Bu boncuklar numunede bulunan tüm protein spektrumlarını yakalayarak, en baskın proteinlerin seviyesini büyük oranda azaltırken seyrek ve nadir bulunan proteinlerin konsantrasyonunu artırır (89).

Adachi ve ark. yaptıkları çalışmada, protein ayrıştırması ve fraksiyonlaması için tek boyutlu Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid (SDS-PAGE) Jel Elektrofrezisi ve Ters-Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) kullanmışlar ve fraksiyonlanan proteinleri İn-Gel veya İn-Sol metodu ile peptidlerine parçalayarak Lineer İyon-Trap-Fourier Transform (LTQ-FT) ve Lineer İyon-Trap Orbitrap (LTQ-Orbitrap) Kütle Spektrometreleri ile analiz etmişlerdir. Bu yöntem ile insan idrarında 1453 protein tespit etmişlerdir (38).

Jedinak ve Ark. PCa ve BPH hastalarının idrarında farklı olarak eksperese edilen proteinleri tanımlamak amacıyla iTRAQ LC/LC/MS/MS ile kantitatif analiz yapmışlardır. 83 BPH ve 90 PCa hastasının dahil edildiği çalışmada iTRAQ ile üç protein (β 2M, PGA3 ve MUC3) tanımlanmış ve immunoblot analizlerle valide edilmiştir. PCa hastalarının idrarlarında bu proteinlerin konsantrasyonlarının anlamlı olarak arttığı belirtilmiştir (49).

Theodorescu ve ark, tarafından yapılan bir çalışmada PSA'sı referans aralığın üstünde çıkıp PCa şüphesiyle biyopsi yapılan fakat sonuçları negatif çıkan 35 hasta ve PCa'lı 51 hastanın idrarı CE/MS ile incelenmiş ve 12 yeni biyobelirteç tanımlanarak valide edilmiştir. Alikodlanmış ve analiz edilinceye kadar -20°C 'de muhafaza edilmiş idrar örneklerinden 0,7 mL'si çözdürülmüş ve yüksek molekül ağırlıklı proteinleri uzaklaştırmak için Centrisart ultracentrifugation filter devices kullanılarak 3000 rcf'de santrifüj edilmiştir (90).

Tablo 7. İdrar proteom profili çalışmaları

Literatür	Araştırmacı	Metod	İdrar Protein Profili
9	1979, Anderson ve ark.	2-D	Protein spotları görülmüş
10	1982, Edwards ve ark.	2-D	Bazı major idrar proteinleri görüntülenmiş
11	1995, Bueler ve ark.	2-D PAGE	Uyumlu antikoru bulunan proteinler tanımlanmış
12	1996, Marshall ve Williams	2-D	Protein spotlar görüntülenmiş fakat tanımlanmamış
13	1997, Heine ve ark.	HPLC-ESI-MS	34 peptid ve protein fragmentı tanımlanmış
14	2001, Spahr ve ark.	LC-MS/MS	124 protein fragmentı tanımlanmış
15	2002, Thongboonkerd ve ark.	2-D PAGE	47 protein tanımlanmış
63	2003, Wittke ve ark.	CE-ESI-TOF-MS	247 protein fragmentı tanımlanmış
43	2004, Oh ve ark.	2-D LC-MS/MS	113 protein tanımlanmış
62	2004, Pieper ve ark.	2-D MS	150 protein tanımlanmış
64	2004, Schaub ve ark.	SELDI-TOF	Protein tanımlanamamış
65	2005, Sun ve ark.	1-D LC-MS/MS	Toplam 226 protein tanımlanmış
		1-D+1-D LC-MS/MS	
		2-D LC-MS/MS	
66	2005, Castagna ve ark.	2-D PAGE, SELDI, FT-ICR-MS	383 protein bileşeni tanımlanmış
38	2006, Adachi ve ark.	LTQ-FT, LTQ-Orbitrap MS	1453 protein tanımlanmış
67	2008, Theodorescu ve ark.	CE/MS	Toplam 1459 polipeptid tanımlanmış
49	2015, Jedinak ve ark.	iTRAQ LC/LC/MS/MS	PCa'da konsantrasyonu artan 3 protein tanımlanmış ve valide etmişler

Normal insan idrar proteomunu açıklayabilmek için kullanılan 2-D PAGE, LC-MS/MS ve diğer çeşitli cihaz konfigürasyonları ile yapılan çalışmalar bu bölümde

kronolojik olarak kısaca özetlenmiştir. Metodun numune hazırlama aşamasına bağlı olarak tartışılacağı kısım ise aşağıdadır.

7.1. Numune Hazırlama Aşaması ile İlgili Tartışma

Protein presipitasyonu makromoleküllerin izolasyonu için sıklıkla kullanılan bir saflaştırma prosedürüdür. Proteinlerin denatürasyonu ve presipitasyonu aşırı iyonik kuvvet, çok düşük pH ya da yüksek konsantrasyonda organik çözücü içeren solüsyonlarda gerçekleşir. kullanılan ayıraçlar genellikle amonyum sülfat (3M konsantrasyonda tuzları uzaklaştırmak için kullanılır), trikloroasetik asit (TCA, %5'den (w/v) yüksek konsantrasyonlarda kullanılır) ve çeşitli organik çözücülerdir (son konsantrasyonları%50'den (v/v) yüksek olacak şekilde etanol, aseton, asetonitril, kloroform, metanol ve izopropanol). Presipitasyon metodunun seçimi öncelikli olarak kullanılacak analitik prosedüre bağlıdır. Organik çözücüler çok yüksek verim sağlar ancak bazıları (metanol, asetonitril) toksiktir, kloroform (bu da toksiktir) gibi bazıları ise karışık bir presipitasyon metoduna sahiptir (91).

Lee ve ark, 4 temel protein ekstraksiyonu metodunu Bradford testi ile incelemişlerdir. Bunlar etanol presipitasyonu, vakum santrifügasyonu, mikrosantrifügasyon ve ters faz trap kolonudur. Tanımlanan protein ve peptid sayıları ile LC-MS'den gelen kümülatif spektral sayımları kıyaslandığında ise bu dört metod arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür (92). Bu nedenle protein ekstraksiyonu için uygun bir yaklaşım seçerken metod dışında göz önünde bulundurulması gereken teknik maliyet, hız ve downstream protokollerine uyumluluk gibi başka faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır (93).

Tantipaiboonwong ve ark'larının yaptığı bir çalışmada ultrafiltrasyon ve dört farklı presipitasyon yöntemi, idrar proteomiksi için en iyi numune hazırlama metodunun bulunması amacıyla kıyaslanmış ve şu sonuca ulaşılmıştır. Ultrafiltrasyon, aseton presipitasyonu ve ACN/TCA (Asetonitril/Trikloroasetik asit) presipitasyonu arasında sonuç profili açısından çok bir fark görülmemiş, benzer oldukları görülmüştür. Fakat tersine metanol/kloroform/su presipitasyonu ve TCA/aseton

presipitasyonu sonucunda daha az protein görülmüş ve hatta bazı piklerin de kaybolduğu görülmüştür (94).

Bu sebeple biz maliyet açısından da uygun bir yöntem olan aseton presipitasyonu yapmayı seçtik. Diyalize idrardaki proteinler aseton ile presipite edilerek interfere edici ajanlar uzaklaştırıldı. AmBIC ile yıkanıp, vacuufuge ile kurutuldu ve çözdürme işlemi yine AmBIC ile yapıldı (The UCLA Molecular Instrumentation Center., 2016) (95).

Biyolojik materyallerden ekstrakte edilen proteinleri MS tabanlı proteom analizlerine uygun peptidler haline getirmek için iki temel metod vardır. Birincisi proteinlerin deterjanlarla çözdürülmesi, SDS-PAGE ile ayrıştırılması ve jelde tutulmuş proteinlerin sindirilmesi esasına dayanır ('in-gel' digestion). İkinci metotta ise deterjan maddeler kullanılmaz. üre ve tioüre gibi güçlü kaotropik ayıraçlar, protein presipitasyonu ve denatüre edici koşullar altında proteinlerin sindirilmesi esasına dayanır ('in-solution' digestion). Bu nedenle SDS'in uzaklaştırılması proteomiks analizlerde kütle spektrometresinin etkinliği için önemlidir. Wis'niewski ve arkadaşlarının 2009 yılında bulduğu bir yönteme göre membran proteinleri 8 M üre içinde jel filtrasyonu ile deterjanlardan tamamıyla uzaklaştırılabilir ve bu sayede çözünebilir proteinler olarak etkin bir şekilde analiz edilebilirler. Bu temel prensibe göre hazırlanan FASP kiti ile protokole göre çalışıldı (83).

7.2. İdrarın Toplanması ve Saklanması ile İlgili Tartışma

Orta idrarın toplanması neredeyse tüm idrar analizleri için standart kabul edilmektedir. Erkeklerde ilk ve orta idrar arasında belirgin bir farklılık gözlenmezken muhtemelen bakteriyel kontaminasyona bağlı olarak kadınlarda ilk ve orta idrar arasında önemli farklılıklar (varyasyonlar) vardır (87). Yapılan çalışmalarda da kadınlardan alınan idrar örneklerinde cilt kaynaklı yaklaşık %40 oranında bakteriyel kontaminasyon olduğu bulunmuştur (96-97).

Zerefos ve Vlahou, 4°C'de 24 saatlik depolamanın protein profilinde bazı değişikliklere sebep olduğunu bu nedenle en fazla 6 saate kadar bekletmenin daha iyi olabileceğini bildirmişlerdir (91, 93).

İdrar örneklerindeki çoklu dondurup-çözdürme sikluslarının idrar proteomu üzerindeki etkileri başka bir endişe kaynağıdır. Schaub ve ark, SELDI-TOF-MS kullanarak yaptıkları çalışmada 1-4 kez dondurup-çözdürmenin idrar proteom profilinde belirgin bir farklılığa sebep olmadığını fakat beşinci dondurup-çözdürme siklusundan sonra bazı zayıf piklerin yoğunluğunu kaybaldığını göstermişlerdir (87). Fiedler ve ark, SELDI-TOF-MS kullanarak yaptıkları çalışmada kütle sinyallerinin bazı göreceli yoğunluklarının değiştiğini buna karşın tekrarlayan dondurup-çözdürme sikluslarında başka önemli bir varyasyon saptanmadığını göstermişlerdir (98). Buna ek olarak 4-7 dondurup-çözdürmede bazı ürünler protein düzeylerinin değiştiği Thongboonkerd tarafından bildirilmiştir (81). Bu bulguların tutarsızlığı çalışmaların teknik ve biyolojik tekrarlarının yetersizliğiyle açıklanabilir. Sonuç olarak deney sürecindeki hataları en aza indirmek için klinik idrar örneklerinde çoklu dondurup-çözdürme sikluslarından önlemek daha güvenilirdir (93).

7.3. Kanserde İdrar Proteomiksi ile İlgili Tartışma

Ürolojik kanserlerde tümörden direkt salınan ürünlerin doğrudan idrara geçmesi ve dolayısıyla bunları yüksek konsantrasyonlarda içermesi sebebiyle idrar, çok kullanışlı bir biyosıvıdır. İdrar proteomiksi kullanılarak ürolojik mesane kanseri, renal hücreli karsinom, transisyonel hücreli karsinom, prostat kanseri gibi maliniteler incelenmiştir.

Erken proteomik çalışmalarda, Rasmussen ve ark, mesanenin skuamöz hücreli karsinomu (SCC) hastalarının idrarında 2-D PAGE ile ayırttıkları proteinleri MS ile analiz etmişler ve 124 polipeptid tanımlamışlardır (tekrarlanan birkaç varyantla) (n=50). Tanımlanan proteinlerin çoğunluğu baskın proteinler olsa da sadece 1 tanesi, psoriasin SCC hastalarının idrarında farklı olarak görülmüştür (99).

Sağlıklı kontrol (n=34) ile mesanenin transisyonel hücreli karsinomu (TCC)

hastalarının (n=30) idrarları SELDI-TOF MS ile kıyaslanmış ve çoklu protein değişiklikleri saptanmıştır. Potansiyel TCC biyobelirteci olabilecek 5 protein ve 7 protein kümesi tespit edilmiştir. Bunların kombinasyonunun TCC tanısı için hassasiyeti %87 ve özgülüğü ise %66 olarak bulunmuştur (100). Bu TCC biyobelirteçlerinden biri olan defensin (2,4 kDa) ayrıca mesane kanserinde de tanımlanmıştır. Mesane kanserli (n=40) ve gönüllü sağlıklı kontrollerin (n=32) idrarlarında 2-D PAGE ile yapılan çalışmada ekstraselüler matriks ve matriks metalloproteinazlara odaklanılmıştır. Mesane kanserli hastaların idrarında kontrol grubundan farklı olarak matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), fibronektin ve bunların fragmanları tanımlanmıştır. Bu proteinlerin sadece toplam miktarı değil ayrıca jel üzerindeki dağılım modeli de histopatolojik değerlendirme ile teşhis edilen invazyonun derecesi ile eşleşmiştir (101).

Üretelyal karsinomalı hastaların (n=31), sağlıklı kontrol grubunun (n=11) ve non malign genitoüriner hastaların (n=138) idrarları kapiller elektroforez ve kütle spektrometresi (CE-MS) ile analiz edilmiştir. 22 polipeptid kütesinden oluşan tanısal üretelyal karsinoma paterni tespit ettiler. Maskelenmiş değerlendirmede, bu polipeptitlere dayanan tahmin modelleri, üretelyal karsinomanın tüm örneklerini (%100 duyarlılıkta) ve sağlıklı örneklerin tümünü (%100 özgülükte) doğru olarak sınıflandırmıştır. Üretelyal karsinom için tanısal paternden belirgin bir polipeptid olan fibrinopeptid A tanımlanmıştır. Fibrinopeptid A yumurtalık ve mide kanserinde kullanılan bilinen bir biyo belirteçtir (102).

Prostat kanserinde öncü üriner proteom çalışmalarından biri 2-D PAGE ile yapılmıştır. Prostat kanseri için aday bir biyobelirteç olan Prostat Kanseri Antijeni (PCA-1) tanımlanmıştır. Bu protein hakkında daha sonra yapılan doğrulayıcı bir çalışma bulunmamaktadır (11). Rehman ve ark., prostat kanserli (n=6) ve benign prostatik hiperplazili (n=6) hastaların prostat masajından sonra alınan idrarlarını 2-D PAGE ve MALDI-TOF MS ile analiz etmişlerdir. Prostat kanserli bazı hastaların idrarında kontrol grubundan farklı olarak Kalgranulin B/MRP-14 tanımlanmıştır. Fakat bu proteini, prostat kanseri için olası bir biyo belirteç olarak ele almak için ek araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (103).

8. KAYNAKLAR

- 1) Lee, M.Y., Huang, C.H., Kuo, C.J., Lin, C.L.S., Lai, W.T., Chiou, S.H. “Clinical Proteomics Identifies Urinary CD14 as a Potential Biomarker for Diagnosis of Stable Coronary Artery Disease”, PLoS ONE 10(2), 1-18, 2015.
- 2) Jamaspishvili, J., Kral, M., Khomeriki, I., Student, V., Kolar, Z., Bouchal, J. “Urine markers in monitoring for prostate cancer”, Nature Publishing Group Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 13, 12–19, 2010.
- 3) Presti, J.C., Jr. “Prostate cancer: Assessment of risk using digital rectal examination, tumor grade, prostate-specific antigen, and systematic biopsy”, Radiol. Clin. North Am, 38, 49–58, 2000.
- 4) Pedroza-Díaz, J., Röthlisberger, S. “Advances in urinary protein biomarkers for urogenital and non-urogenital pathologies”, Biochemia Medica, 25(1), 22–35, 2015.
- 5) Caubet C, Lacroix C, Decramer S, Drube J, Ehrich JH, Mischak H, “Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery in pediatric renal disease”, Pediatr Nephrol, 25, 27–35, 2010.
- 6) Evans, C. A., Glen, A., Eaton, C. L., Larré, S., Catto, J. W., Hamdy, F. C., Rehman, I. “Prostate cancer proteomics: the urgent need for clinically validated biomarkers”, Proteomics-Clinical Applications, 3(2), 197-212, 2009.
- 7) Akpınar, G., Kasap, M., Cantürk, Z., Cantürk, N.Z. “Proteomiks nedir? Tiroid hastalıklarıyla ilgili araştırmalarda proteomiks”, Endokrinolojide Diyalog, 8(4), 166-176, 2011.
- 8) Kasap, M., Akpınar, G. “Parkinson Hastalığı Tanısında Proteomiks Yaklaşımlarının Yeri ve Biyobelirteç Arayışları”, Türkiye Klinikleri J Med Sci, 31(3), 691-701, 2011.
- 9) Ece, F., Kömürcüoğlu, B. “Akciğer Kanserinde Proteomik ve Genomik Yaklaşım”, Solunum, 12(2): 59–65, 2010.
- 10) Anderson NG, Anderson NL, Tollaksen SL. “Proteins of human urine: I. Concentration and analysis by two-dimensional electrophoresis”, Clin Chem, 25, 1199–1210, 1979.

- 11) Edwards, J. J., Anderson, N. G., Tollaksen, S. L., Von Eschenbach, A. C., Guevara, J. “Proteins of human urine. II. Identification by two-dimensional electrophoresis of a new candidate marker for prostatic cancer”, *Clinical chemistry*, 28(1), 160-163, 1982.
- 12) Büeler, M. R., Wiederkehr, F., & Vonderschmitt, D. J. “Electrophoretic, chromatographic and immunological studies of human urinary proteins”, *Electrophoresis*, 16(1), 124-134, 1995.
- 13) Marshall T, Williams K. “Two-dimensional electrophoresis of human urinary proteins following concentration by dye precipitation”, *Electrophoresis*, 17, 1265–1272, 1996.
- 14) Heine G, Raida M, Forssmann WG. “Mapping of peptides and protein fragments in human urine using liquid chromatography-mass spectrometry”, *J Chromatogr A*, 776, 117–124, 1997.
- 15) Spahr CS, Davis MT, McGinley MD, “Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: I. Profiling an unfractionated tryptic digest”, *Proteomics*, 1, 93–107, 2001.
- 16) Thongboonkerd, V., Mcleish, K.R., Arthur, J.M., Klein, J.B. “Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation”, *Kidney International*, Vol. 62, 1461–1469, 2002.
- 17) O’Farrell, P.H. “High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins”, *The Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007-4021, 1975.
- 18) Pennisi, E. “A Low Number Wins the GeneSweep Pool”, *Science*, 300, 1484. Theodorescu, D., Schiffer, E., Bauer, H.W., Douwes, F., Eichhorn, F., Polley, R., Schmidt, T., Schöfer, W., Züribig, P., Good, D.M., Coon, J.J., Mischak H. 2008. “Discovery and validation of urinary biomarkers for prostate cancer”, *Proteomics Clin. Appl.*, 2, 556–570, 2003.
- 19) Rappsilber, J., Mann, M. “What does it mean to identify a protein in proteomics?”, *Trends in biochemical sciences*, 27(2), 74-78, 2002.
- 20) Veenstra, T.D. *Proteomic Applications in Cancer Detection and Discovery*. John Wiley & Sons, Inc. 2013.
- 21) González-Buitrago, JM., Ferreira, L., Lorenzo, I. “Urinary proteomics”, *Clinica Chimica Acta*, 375, 49–56, 2007.

- 22) Theodorescu, D., Fliser, D., Wittke, S., Mischak, H., Krebs, R., Walden, M., Ross, M., Eltze, E., Bettendorf, O., Wulfing, C., Semjonow, A. "Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in urine", *Electrophoresis*, 26, 2797–2808, 2005
- 23) Mischak, H., Julian, B.A., Novak, J. "High-resolution proteome/peptidome analysis of peptides and low-molecular-weight proteins in urine", *Proteomics-Clinical applications*, 1(8), 792-804, 2007.
- 24) Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B. "Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules", *Science*, 246(4926), 64-71, 1989
- 25) 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*, 2(8), 151-153, 1988.
- 26) Hoorn, E.J., Pisitkun, T., Zietse, R., Gross, P., Frokiaer, J., Wang, N.S., Gonzales, P.A., Star, R.A., Knepper, M.A. "Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary biomarkers", *Nephrology*, 10, 283–290, 2005.
- 27) Wisniewski, J. R. "Mass spectrometry-based proteomics: principles, perspectives, and challenges", *Archives of pathology & laboratory medicine*, 132(10), 1566-1569, 2008.
- 28) Yamashita, M., Fenn, J. B. "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme", *The Journal of Physical Chemistry*, 88(20), 4451-4459, 1984.
- 29) Di Marco, V. B., Bombi, G. G. "Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the study of metal–ligand solution equilibria", *Mass Spectrometry Reviews*, 25(3), 347-379, 2006.
- 30) Karas, M., Hillenkamp, F. "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons", *Analytical chemistry*, 60(20), 2299-2301, 1988.
- 31) Aebersold, R., Mann, M. "Mass spectrometry-based proteomics", *Nature*, 422(6928), 198-207, 2003.
- 32) Emekli N, Yiğitbaşı T. *Klinik Biyokimya*. P.64. Nobel Tıp Kitabevleri, 2015.
- 33) Kurban, S. ve Mehmetoğlu İ. "Proteomik", *Yeni Tıp Dergisi*, 27(2), 70, 2010.

- 34) Baskin, Y., Yigitbasi, T. “Clinical proteomics of breast cancer”, *Current genomics*, 11(7), 528-536, 2010.
- 35) Iorio, L., Avagliano, F. “Observations on the Liber medicine orinalibus by Hermogenes”, *American journal of nephrology*, 19(2), 185-188, 1999.
- 36) Decramer, S., Gonzalez De Peredo, A., Breuil, B., Mischak, H., Monsarrat, B., Bascands, J.L., Schanstra, J.P. “Urine in clinical proteomics”, *Molecular & Cellular Proteomics*, 7, 1850–1862, 2008.
- 37) Thongboonkerd, V., Malasit, P. “Renal and urinary proteomics: current applications and challenges”, *Proteomics*, 5(4), 1033-1042, 2005.
- 38) Adachi, J., Kumar, C. Zhang, Y., Olsen, J.V., Mann M. “The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins”, *Genome Biology*, 7:R80, 2006.
- 39) Hortin, G.L., Sviridov, D. “Diagnostic potential for urinary proteomics”, *Pharmacogenomics*, 8(3), 237–255, 2007.
- 40) Pisitkun, T., Johnstone, R., Knepper, M.A. “Discovery of Urinary Biomarkers”, *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 1760–1771, 2006.
- 41) Yamamoto, T., Langham, R.G., Ronco, P., Knepper, M.A., Thongboonkerd, V.A. “Towards standard protocols and guidelines for urine proteomics: a report on the Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP) Symposium and Workshop, 6 October 2007, Seoul, Korea and 1 November 2007, San Francisco, CA, USA”, *Proteomics*, 8, 2156–2159, 2008.
- 42) Thongboonkerd, V., Chutipongtanate, S., Kanlaya, R. “Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability”, *Journal of proteome research*, 5(1), 183-191, 2006.
- 43) Oh, J., Pyo, J.H., Jo, E.H., Hwang, S.I., Kang, S.C. “Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map”, *Proteomics*, 4, 3485–3497, 2004.
- 44) Grönberg, H. “Prostate cancer epidemiology”, *The Lancet*, 361(9360), 859-864, 2003.
- 45) Heidenreich, A., Aus, G., Bolla, M., Joniau, S., Matveev, V. B., Schmid, H. P., Zattoni, F. “EAU guidelines on prostate cancer”, *European urology*, 53(1), 68-80, 2008.

- 46) M'Koma, A.E., Blum, D.L., Norris, J.L., Koyama, T., Billheimer, D., Motley, S., Ghiassi, M., Ferdowsi, N., Bhowmick, I., Chang, S.S., Fowke, J.H., Caprioli, R.M., Bhowmick, N.A. "Detection of pre-neoplastic and neoplastic prostate disease by MADI profiling of urine", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353, 829–834, 2007.
- 47) Barratt, J., Topham, P. "Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease", *Canadian Medical Association Journal*, 177(4), 361-368, 2007.
- 48) Loeb, S., Catalona, W. J. "Prostate-specific antigen in clinical practice", *Cancer letters*, 249(1), 30-39, 2007.
- 49) Jedinak, A., Curatolo, A., Zurakowski, D., Dillon, S., Bhasin, M.K., Libermann, T.A., Roy, R., Sachdev, M., Loughlin, K.R., Moses, M.A. "Novel non-invasive biomarkers that distinguish between benign prostate hyperplasia and prostate cancer", *BMC Cancer*, 15, 259, 2015.
- 50) Downes, M.R., Byrne, J.C., Pennington, S.R., Dunn, M.J., Fitzpatrick, J.M., Watson, R.W.G. "Urinary Markers For Prostate Cancer", *Bju international*, 99, 263-268, 2006.
- 51) Haj-Ahmad, T.A., Abdalla, M.A.K., Haj-Ahmad, Y. "Potential Urinary Protein Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients", *Journal of Cancer*, 5(2), 103-114, 2014.
- 52) Drake, R.R., White, K.Y., Fuller, T.W., Igwe, E., Clements, M.A., Nyalwidhe, J.O., Given, R.W., Lance, R.S., Semmes, O.J. "Clinical collection and protein properties of expressed prostatic secretions as a source for biomarkers of prostatic disease", *Journal Of Proteomics*, 72, 907–917, 2009.
- 53) K. Y., Başaran, M., Bavbek, S., Çal, Ç., İğdem, Ş., Özen, H., Türkeri, L. "Prostat Kanseri Yol Haritası: Uluslararası Kılavuzlar ve Klinik Deneyimler Işığında Prostat Kanserine Yaklaşım Önerileri", 2015.ŞEKİL
- 54) Ikeda, N., Uemura, H., Ishiguro, H., Hori, M., Hosaka, M., Kyo, S., Miyamoto, K., Takeda, E., Kubota, Y. "Combination Treatment with 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 9-cis-Retinoic Acid Directly Inhibits Human Telomerase Reverse Transcriptase Transcription in Prostate Cancer Cells", *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol 2, 739–746, 2003.

- 55) Ploussard, G., de la Taille, A. “Urine biomarkers in prostate cancer”, *Nat. Rev. Urol*, 7, 101–109, 2010.
- 56) Yun, S. J., Yan, C., Jeong, P., Kang, H. W., Kim, Y. H., Kim, E. A., Choi, Y. H. “Comparison of mRNA, protein, and urinary nucleic acid levels of S100A8 and S100A9 between prostate cancer and BPH”, *Annals of surgical oncology*, 22(7), 2439-2445, 2015.
- 57) Zhang, X., Liu, S., Guo, C., Zong, J., Sun, M.Z. “The association of annexin A2 and cancers”, *Clin Transl Oncol*, 14, 634–640, 2012.
- 58) Hutchinson, L.M., Chang, E.L., Becker, C.M., Shih, M.C., Brice, M., DeWolf, W.C. et al. “Use of thymosin beta15 as a urinary biomarker in human prostate cancer”, *Prostate*, 64, 116–127, 2005.
- 59) Van Dieijen-Visser, M.P., Hendriks, M.W., Delaere, K.P., Gijzen, A.H., Brombacher, P.J. “The diagnostic value of urinary transferrin compared to serum prostatic specific antigen (PSA) and prostatic acid phosphatase (PAP) in patients with prostatic cancer”, *Clin Chim Acta*, 177, 77–80, 1988.
- 60) Lwaleed, B.A., Francis, J.L., Chisholm, M. “Urinary tissue factor levels in patients with bladder and prostate cancer”, *Eur J Surg Oncol*, 26, 44–49, 2000.
- 61) Müller, H., Brenner, H. “Urine markers as possible tools for prostate cancer screening: review of performance characteristics and practicality”, *Clinical chemistry*, 52(4), 562-573, 2006.
- 62) Casado-Vela, J., Gómez del Pulgar, T., Cebrián, A., Álvarez-Ayerza, N., Lacal, J.C. “Human urine proteomics: building a list of human urine cancer biomarkers”, *Expert Rev. Proteomics*, 8(3), 347–360, 2011.
- 63) Frantzi, M., Latosinska, A., Merseburger, A. S., Mischak, H. “Recent progress in urinary proteome analysis for prostate cancer diagnosis and management”, *Expert review of molecular diagnostics*, 15(12), 1539-1554, 2015.
- 64) Roy, R. *et al.* “Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species”, *Clin. Cancer Res*, 14, 6610–6617, 2008.
- 65) Moses, M.A., Wiederschain, D., Loughlin, K.R., Zurakowski, D., Lamb, C.C., Freeman, M.R. “Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients”, *Cancer Res*, 58, 1395–1399, 1998.

- 66) Inokuchi, J., Narula, N., Yee, D. S., Skarecky, D. W., Lau, A., Ornstein, D. K., Tyson, D. R. "Annexin A2 positively contributes to the malignant phenotype and secretion of IL-6 in DU145 prostate cancer cells", *International journal of cancer*, 124(1), 68-74, 2009.
- 67) Baran, D.T., Quail, J.M., Ray, R., Leszyk, J., Honeyman, T. "Annexin II is the membrane receptor that mediates the rapid actions of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃", *J Cell Biochem*, 78, 34-46, 2000.
- 68) Maier, S.M., Scherer, S.J., Seifert, M., Hanselmann, R.G., Schleehuber, Y., Edelmann, L., Reichrath, J., Krohne, G., Rescher, U., Seidl, W., Mutschler, W., Claes, L., Welter, C., Scharl, L. "1[alpha],25-dihydroxyvitamin D₃ Enhances Annexin II Dependent Proliferation of Osteoblasts", *Journal of Cellular Biochemistry*, 100, 679-692, 2007.
- 69) Yee, D. S., Narula, N., Ramzy, I., Boker, J., Ahlering, T. E., Skarecky, D. W., Ornstein, D. K. "Reduced annexin II protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer", *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(6), 902-908, 2007.
- 70) Schostak, M., Schwall, G.P., Poznanovic', S., Groebe, K., Müller, M., Messinger, D., Miller, K., Krause, H., Pelzer, A., Horninger, W., Klocker, H., Hennenlotter, J., Feyerabend, S., Stenzl, A., Schratzenholz, A. "Annexin A3 in Urine: A Highly Specific Noninvasive Marker for Prostate Cancer Early Detection", *The Journal Of Urology*, Vol. 181, 343-353, 2009.
- 71) Roobol, M.J., Haese, A., Bjartell, A. "Tumour markers in prostate cancer III: Biomarkers in urine" *Acta Oncologica*, 50(Suppl 1), 85-89, 2011.
- 72) Botchkina, G.I., Kim, R.H., Botchkina, I.L., Kirshenbaum, A., Frischer, Z., Adler H.L. "Noninvasive Detection of Prostate Cancer by Quantitative Analysis of Telomerase Activity", *Clin Cancer Res.*, 11, 9, 3243-3249, 2005.
- 73) Güzelgül, F., Aksoy, K. "Telomeraz Enziminin Tanı ve Tedavide Kullanım Alanı", *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(2), 2011.
- 74) Bresnick. A.R., Weber, D.J., Zimmer, D.B. "S100 proteins in cancer", *Nat Rev Cancer*, 15(2), 96-109, 2015.
- 75) Zhu, W., Xue, Y., Liang, C., Zhang, R., Zhang, Z., Li, H., Su, D., Liang, X., Zhang, Y., Huang, Q., Liu, M., Li, L., Li, D., Zhao, A.Z., Liu, Y. "S100A16 promotes cell

- proliferation and metastasis via AKT and ERK cell signaling pathways in human prostate cancer”, *Tumour Biol*, DOI 10.1007/s13277-016-5096-9, 2016.
- 76) Heilmann, R.M., Wright, Z.M., Lanerie, D.J., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M. “Measurement of urinary canine S100A8/A9 and S100A12 concentrations as candidate biomarkers of lower urinary tract neoplasia in dogs”, *J Vet Diagn Invest.*, Jan;26(1), 104-12, 2014.
- 77) Zimmerli, L.U., Schiffer, E., Zürlbig, P., Good, D.M., Kellmann, M., Mouls, L., Pitt, A.R., Coon, J.J., Schmieder, R.E., Peter, K.H., Mischak, H., Kolch, W., Delles, C., Dominiczak A.F. “Urinary Proteomic Biomarkers in Coronary Artery Disease”, *Molecular & Cellular Proteomics*, 7, 290–298, 2008.
- 78) Kentsis, A., Monigatti, F., Dorff, K., Campagne, F., Bachur, R., Steen, H. “Urine proteomics for profiling of human disease using high accuracy mass spectrometry”, *Proteomics Clin. Appl*, 3, 1052–1061, 2009.
- 79) Jonscher, K.R., Osypuk, A.A., Bokhoven, A.V., Lucia, M.S. “Evaluation of Urinary Protein Precipitation Protocols for the Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain Research Network”, *Journal of Biomolecular Techniques*, 25, 118–126, 2014.
- 80) Afkarian, M., Bhasin, M., Dillon, S.T., Guerrero, M.C., Nelson, R.G., Knowler, W.C., Thadhani, R., Libermann, T.A. “Optimizing a Proteomics Platform for Urine Biomarker Discovery”, *Molecular & Cellular Proteomics*, 9, 2195–2204, 2010.
- 81) Thongboonkerd, V. “Practical Points in Urinary Proteomics”, *Journal of Proteome Research*, 6, 3881-3890, 2007.
- 82) Mischak, H., Kolch, W., Aivaliotis, M., Bouyssié, D., Court, M., Dihazi, H., Dihazi, G.H., Franke, J., Garin, J., Peredo, A.G., Iphöfer, A., Jänsch, L., Lacroix, C., Makridakis, M., Masselon, C., Metzger, J., Monsarrat, B., Mrug, M., Norling, M., Novak, J., Pich, A., Pitt, A., Bongcam-Rudloff, E., Siwy, J., Suzuki, H., Thongboonkerd, V., Wang, L.S., Zoidakis, J., Zürlbig, P., Schanstra, J.P., Vlahou, A. “Comprehensive human urine standards for comparability and standardization in clinical proteome analysis”, *Proteomics Clin Appl*, 4(4), 464–478, 2010.
- 83) Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M. “Universal sample preparation method for proteome analysis”, *Nature Methods*, Vol.6 No.5, 359-363,

2009.

- 84) Haçarız, O., Baykal, A. T. “Deneyisel Çalışmalarda Çevresel Değişikliğe Maruz Kalan *Fasciola hepatica*’nın Salgıladığı Protein Miktarlarının Bir İleri Proteomik Yaklaşımla İncelenmesi”, *Parasite*, 38, 106-10, 2014.
- 85) Pieper, R., Gatlin, C.L., McGrath, A.M., Makusky, A.J., Mondal, M., Seonarain, M., Field, E., Schatz, C.R., Estock, M.A., Ahmed, N., Anderson, N.G., Steiner, S. “Characterization of the human urinary proteome: A method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots”, *Proteomics*, 4, 1159–1174, 2004.
- 86) Wittke S, Fliser D, Haubitz M. “Determination of peptides and proteins in human urine with capillary electrophoresis-mass spectrometry, a suitable tool for the establishment of new diagnostic markers”, *J Chromatogr A*, 1013, 173–181, 2003.
- 87) Schaub, S., Wilkins, J., Weiler, T., Sangster, K., Rush, D., Nickerson, P. “Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”. *Kidney international*, 65(1), 323-332, 2004.
- 88) Sun, W., Li, F., Wu, S., Wang, X., Zheng, D., Wang, J., Gao, Y. “Human urine proteome analysis by three separation approaches”, *Proteomics*, 5, 4994–5001, 2005.
- 89) Castagna, A., Cecconi, D., Sennels, L., Rappsilber, J., Guerrier, L., Fortis, F., Boschetti, E., Lomas, L., Righetti, P.G. “Exploring the Hidden Human Urinary Proteome via Ligand Library Beads”, *Journal of Proteome Research*, 4, 1917-1930, 2005.
- 90) Theodorescu, D., Schiffer, E., Bauer, H.W., Douwes, F., Eichhorn, F., Polley, R., Schmidt, T., Schöfer, W., Zürbig, P., Good, D.M., Coon, J.J., Mischak H. “Discovery and validation of urinary biomarkers for prostate cancer”, *Proteomics Clin. Appl.*, 2, 556–570, 2008.
- 91) Zerefos, P. G., Vlahou, A. “Urine sample preparation and protein profiling by two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy”, *Clinical Proteomics: Methods and Protocols*, 141-157, 2008.

- 92) Lee, R.S., Monigatti, F., Briscoe, A.C., Waldon, Z., Freeman, M.R., Steen, H. “Optimizing Sample Handling for Urinary Proteomics”, *Journal of Proteome Research*, 7, 4022–4030, 2008.
- 93) Wu, J., Chen, Y.D., Gu, W.N. “Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases”, *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, 11(4):227-237, 2010.
- 94) Tantipaiboonwong, P., Sinchaikul, S., Sriyam, S., Phutrakul, S., Chen, S.T. “Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients”, *Proteomics*, 5, 1140–1149, 2005.
- 95) The UCLA Molecular Instrumentation Center. “Protein Precipitation Protocols” http://www.mic.ucla.edu/ms_pr/handouts/proteomics/protein_precipitation_protocols.pdf Son erişim tarihi: 22 Haziran 2016
- 96) Finkel, E. “Cloudy or clear? Best forecast for urine cultures”. *CAP Today*, 20(11), 86-90, 2006
- 97) Lifshitz, E., Kramer, L. “Outpatient urine culture: does collection technique matter?” *Archives of internal medicine*, 160(16), 2537-2540, 2000
- 98) Fiedler, G. M., Baumann, S., Leichtle, A., Oltmann, A., Kase, J., Thiery, J., & Ceglarek, U. “Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 53(3), 421-428, 2007.
- 99) Rasmussen HH, Orntoff TF, Wolf H, Celis JE. “Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer”, *J Urol*, 155, 2113–2119, 1996.
- 100) Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S. “Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine”, *Am J Pathol*, 158, 1491–1502, 2001.
- 101) Saito M, Kimoto M, Araki T. “Proteome analysis of gelatin-bound urinary proteins from patients with bladder cancers”, *Eur Urol*, 48, 865–871, 2005.
- 102) Theodorescu, D., Wittke, S., Ross, M.M., Walden, M., Conaway, M., Just, I., Mischak, H., Frierson, H.F. “Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis”, *Lancet Oncol*, 7, 230-240, 2006.

- 103) Rehman I, Azzouzi AR, Catto JW,. “Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: a pilot study”, *Urology*, 64, 1238–1243, 2004. Ikeda, N., Uemura, H., Ishiguro, H., Hori, M., Hosaka, M., Kyo, S., Miyamoto, K., Takeda, E., Kubota, Y. “Combination Treatment with 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 9-cis-Retinoic Acid Directly Inhibits Human Telomerase Reverse Transcriptase Transcription in Prostate Cancer Cells”, *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol 2, 739–746, 2003.



9. ETİK KURUL ONAYI

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prostat Kanserinde İdrar Proteom Profili			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Arş. Gör. Feyza Bayramoğlu			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>





İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prostat Kanserinde İdrar Proteom Profili			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Arş. Gör. Feyza Bayramoğlu			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	12.10.2016		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	12.10.2016		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>			
Karar Bilgileri	Karar No: 491	Tarih: 19/10/2016				
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İlkur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Öğr. Gör. Dr. Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Feyza	Soyadı	Bayramoğlu
E-mail	fbayramoglu@medipol.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İstanbul Medipol Unv. / Sağlık Bilimleri Fakültesi <i>Beslenme ve Diyetetik Bölümü</i>	2014
Lise	Özel Arda Asalet Lisesi	2009

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Stajyer diyetisyen	Medipol Mega Hastaneler Komp.	12.2013-02.2014
Stajyer diyetisyen	Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hast.	02.2014-05.2014
Biyokimya Laboratuvarı / Asistan	İstanbul Medipol Üniversitesi/Biyokimya ABD	02.2015-09.2015
Biyokimya Laboratuvarı / Araştırma Görevlisi	İstanbul Medipol Üniversitesi/ Biyokimya ABD	09.2015-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	78	74	59

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

Sertifikalar

İstanbul Medipol Üniversitesi	İş Sağlığı ve Güvenliği	2016
İstanbul Medipol Üniversitesi	Pratik İstatistik Kursu SPSS	2016
Sem Bio Technologies	Kök Hücre Çalışmalarında Kullanılan Teknikler	2016
Marmara Üniversitesi	5.Kök Hücre Sempozyumu	2016
İstanbul Medipol Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2015
Ankara Üniversitesi	3.Ulusal Sağlıklı Yaşam Sempozyumu Kardiyoloji Diyetisyenliği Kursu	2013
İstanbul Medipol Üniversitesi	Çocukluk ve Ergenlik Döneminde Beslenme Kursu	2013