

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LC-MS-MS İLE PROSTAT KANSERİNDE PROTEOM
PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İhsan YOZGAT

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mustafa GÜLFEN

Haziran 2018

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

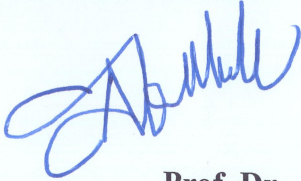
LC-MS-MS İLE PROSTAT KANSERİNDE PROTEOM
PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
İhsan YOZGAT

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA

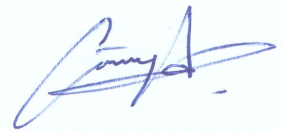
Bu tez 28.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr.
Abdil ÖZDEMİR
Jüri Başkanı



Doç. Dr.
Mustafa GÜLFEN
Üye



Dr. Öğr. Üyesi
Cüneyd PARLAYAN
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

İhsan YOZGAT

28.06.2018

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa Gülfen'e, Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü başkanı Prof. Dr. Abdil Özdemir ve tüm öğretim üyelerine, bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi'nin (REMER) sağladığı üstün teknolojik araç, gereç ve kimyasal malzemelerle yapılmıştır. Laboratuvar olanakları konusunda anlayış ve yardımlarını esirgemeyen Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi (REMER)'nin müdürü ve aynı zamanda Sinirbilim Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e ve REMER'de bulunan Sistemler Biyolojisi (Genomics & Proteomics) Laboratuvar sorumlusu Yrd. Doç. Dr. Cuneyd Parlayan'a, çalışmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen değerli arkadaşım Dr.Seda Keleştemur ve Yrd. Doç. Dr. Emre Karakoç'a, hayatım boyunca, eğitim ve iş hayatımda bana her zaman destek olan, hayatımın her noktasında değerli fikirleriyle yoluma ışık tutan ablam Yasemin Yozgat'a, çalışmalarım süresince manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Prostat Kanseri.....	5
2.1.1. Türkiye’ de üriner sistem kanserlerinin görülme sıklığı.....	6
2.1.2. Prostat kanseri risk faktörleri.....	9
2.1.3. Tanı	10
2.1.3.1. Parmakla rektal muayene (PRM)	10
2.1.3.2. Prostat spesifik antijen	11
2.1.3.3. Yaşa göre değişen PSA referans aralıkları	14
2.1.3.4. Düşük PSA değerlerinin PCa riski ile ilişkisi	14
2.2. Proteinler ve Protein Analitik Teknikleri.....	15
2.2.1. Amino asitler	15
2.2.2. Proteinler	21
2.2.3. Proteinlerin yapısı.....	22
2.2.3.1. Birincil yapısı	22
2.2.3.2. İkincil yapı	22

2.2.3.3. Üçüncül yapı	25
2.2.3.4. Kuarternler yapı.....	26
2.2.4. Proteinlerin karakterizasyonunda kullanılan analitik yöntemler..	26
2.2.4.1. Kromotografi	26
2.2.4.2. Jel-Filtrasyon kromatografisi	27
2.2.4.3. Afinite kromatografisi	28
2.2.4.4. Jel elektroforez	29
2.2.4.5. Kütle spektrometresi	31
2.2.5. LC-MS-MS'in prostat kanseri tanısındaki uygulamaları	33
2.2.6. Prostat kanseri tanısı için belirlenmiş olan biyobelirteçler.....	37
2.2.7. İdrarda tespit edilen prostat kanseri biyobelirteç adayları.....	38
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	40
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	41
3.3. Protein Analizleri	41
3.3.1. Örnek toplama	41
3.3.2. Örnek saklama	42
3.3.3. Örnek hazırlama	43
3.3.4. İdrardan protein eldesi	43
3.3.4.1. Aseton presipitasyonu	43
3.3.5. Protein konsantrasyon tayini	44
3.3.6. Sıvı kromatografisi – kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizleri.....	45
3.3.7. Biyoinformatik analiz.....	46
3.3.7.1. Progenesis QI	46
3.3.7.2. STRING	46
3.3.7.3. Ingenuity Pathway Analysis (IPA)	47
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR	48

4.1. LC-MS-MS ile Göreceli Protein Analizleri.....	48
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ	64
KAYNAKLAR.....	66
EKLER.....	73
ÖZGEÇMİŞ	76

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ACN	: Asetonitril
AmBic	: Amonyum Bikarbonat
FASP	: Filtre Yardımı İle Örnek Hazırlama Kiti
GluFib	: Glu1-Fibrinopeptid B Standart
IAA	: İyodoasetamid
LC	: Sıvı Kromatografisi
MS	: Kütle Spektrometresi
PIC	: Proteaz İnhibitör Kokteyl
UPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UPX	: Universal Protein Ekspresyon Kiti
PSA	: Prostat spesifik antijen
PRM	: Parmakla rektal muayeneye
IPA	: Ingenuity Pathways Analysis
PLGS	: ProteinLynx Global Server
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
MR	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
PKM	: Pyruvate kinase PKM
KLK-11	: Kallikrein-11
PHI	: Prostat Sağlık İndeksi
tPSA	: Toplam PSA
sPSA	: Serbest PSA
BPSA	: Benign PSA
iPSA	: İntakt PSA
SDS	: Sodyum Dodesil sülfat
LC-MS / MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi-Kütle Spektroskopisi

MALDI-TOF-TOF	: Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu – Uçuş Süresi-Uçuş Süresi
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
PCa	: Prostat Kanseri
Gerçek-Zaman-PCR	: Gerçek-zaman Polimeraz zincir reaksiyonu
GS	: Gleason Skor
HDMSE	: Veri Bağımsız Edinim Yöntemi (Data independent acquisition mode)
STRING	: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Dünya çapında prostat kanser vakaları (Ferlay ve ark., 2004)	5
Şekil 2.2. Prostat kanser, yaşın standarilize edildiği vaka ve her 100.000 de ölüm oranları	6
Şekil 2.3. 2000-2003 yılları arası ulusal kanser görülme sıklığı.....	7
Şekil 2.4. Ulusal Kanser Görülme Sıklığının Cinsiyete Göre Dağılımı	7
Şekil 2.5. Amino asit yapısı	15
Şekil 2.6. Hidrofobik aminlerin yapısı	16
Şekil 2.7. Polar aminlerin yapısı	18
Şekil 2.8. Pozitif yüklü polar aminler lysine arginine, histidine.....	19
Şekil 2.9. Negatif yüklü amino asitler.....	20
Şekil 2.10. Peptit bağının oluşumu	21
Şekil 2.11. α heliks yapısı	23
Şekil 2.12. Beta kırmalı yapının iki formu ; paralel ve antiparalel	24
Şekil 2.13. Beta kırmalı yapının daha detaylı görünümü.....	24
Şekil 2.14. Beta kırmalı yapının detaylı görünümü	25
Şekil 2.15. Jel-Filtrasyon Kromatografisi	27
Şekil 2.16. Afinite kromatografisi.....	28
Şekil 2.17. SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	29
Şekil 2.18. Izoelektrik odaklama.....	30
Şekil 2.19. MALDI Kütle spektroskopisi	32
Şekil 2.20. WATERS SYNAPT G2 Si HDMS kütle spektrofotometrenin şeması ...	33
Şekil 4.1. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein ($p < 005$) biyolojik prosesi.....	56
Şekil 4.2. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein ($p < 005$) hücresel prosesi.....	57

Şekil 4.3. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein (p < 005) moleküler fonksiyonu.....	57
Şekil 4.4. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein (p < 005) stringe göre pathway analizi.....	58
Şekil 4.5. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı up-regüle olmuş proteinlerin (p < 005) stringe göre pathway analizi	59
Şekil 4.6. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı down-regüle olmuş proteinlerin (p < 005) stringe göre pathway analizi.....	59
Şekil 4.7. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı down-regüle olmuş proteinlerin (p < 005) biyolojik fonksiyonlarının sınıflandırılması.....	60
Şekil 4.8. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı up-regüle olmuş proteinlerin (p < 005) biyolojik fonksiyonlarının sınıflandırılması	60
Şekil 4.9. Sağlıklı idrar örneğinden elde edilen triptik peptit karışımların pozitif iyonlaşmada, 0-400 m/z arası LC-MS-MS spektrumu	61
Şekil 4.10. Sağlıklı idrar örneğinden elde edilen triptik peptit karışımların pozitif iyonlaşmada, 400-800 m/z arası LC-MS-MS spektrumu.....	61
Şekil 4.11. Sağlıklı idrar örneğinden elde edilen triptik peptit karışımların pozitif iyonlaşmada, 800-1200 m/z arası LC-MS-MS spektrumu.....	62
Şekil 4.12. Prostat kanserlinin idrar örneğinden elde edilen triptik peptit karışımların pozitif iyonlaşmada, 0-400m/z arası LC-MS-MS spektrumu.....	62
Şekil 4.13. Prostat kanserlinin idrar örneğinden elde edilen triptik peptit karışımların pozitif iyonlaşmada, 400-800 m/z arası LC-MS-MS spektrumu.....	63
Şekil 4.14. Prostat kanserlinin idrar örneğinden elde edilen triptik peptit karışımların pozitif iyonlaşmada, 800-1200 m/z arası LC-MS-MS spektrumu.....	63

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Türkiye’de erkeklerde en sık görülen on kanser türü (2003).....	8
Tablo 2.2. Türkiye’de en sık görülen on kanser türü (2003)	8
Tablo 2.3. Ürogenital sistem kanserlerinin dağılımı (2003)	9
Tablo 2.4. Yaş aralığına göre normal PSA aralıkları	14
Tablo 3.1. Deneyde kullanılan araç ve gereçler	40
Tablo 3.2. Deneyde kullanılan kimyasal ve materyal listesi.....	41
Tablo 4.1. LC-MS-MS analiz sonucunda elde edilen proteinler	48
Tablo 4.2. LC-MS-MS analiz sonucunda elde edilen proteinler	49

ÖZET

Anahtar kelimeler: Prostat kanser, LC-MS-MS, proteomiks.

Prostat kanseri (PCa) tüm dünyada erkeklerde en çok görülen kanser türlerinden biri olup büyük oranda ölümlü sonuçlanmaktadır. Prostat kanserinin tanısı, genel olarak parmakla rektal muayeneye (PRM), serum PSA (Prostat spesifik antijen) ölçümüne ve biyopsiye dayanmaktadır. PSA'nın en büyük dezavantajı, yanlış negatif veya yanlış pozitif test sonuçlarına yol açmasıdır. Biyopsi, hastalar tarafından organ ve dokularının hasar görmesine sebep olabilir endişesi ile tercih edilmek istenmemektedir. Bu çalışmada ise LC-MS-MS tekniği kullanılarak invaziv tekniklere alternatif olacak şekilde prostat kanseri tanısında kullanılacak biyobelirteçler belirlenmiştir.

Steril tüplerde uygun şartlarda muhafaza edilen sağlıklı ve prostat kanserli idrar örneklerine aseton çöktürme tekniği uygulanarak proteinlerin saflaştırılma işlemi yapılmıştır. Bu aşamadan sonra filtre yardımcı örnek hazırlama tekniği kullanılarak proteinlerin enzimatik parçalanması gerçekleştirildi. Elde edilen peptitler LC-MS-MS cihazı ile analiz edilerek protein profilleri karşılıklı olarak incelendi. Hastalık ile ilişkili olabilecek up-regüle ve down-regüle olmuş proteinler saptandı. Bulunan anlamlı proteinler için string yolak analizi yapılarak bu proteinlerin birbirleri ile olan ilişkilerinin yanısıra, moleküler fonksiyonları, hücresel, biyolojik ve reaksiyon prosesleri incelendi. Ingenuity Pathways Analysis (IPA) programı ile iki grup arasında anlamlı olarak belirlenen proteinler incelendi ve prostat kanserle ilişkili olan Pyruvate kinase PKM ve Kallikrein-11 proteinleri biyobelireç adayları olarak tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar umut vadeci bir ön çalışma olup, belirlenmiş olan biyobelirteçlerin doğrulanması aşamasından sonra LC-MS-MS tekniğinin klinikte uygulanabilir olabilmesi için çok önemlidir. Bu teknik ile idrardan prostat kanseri teşhisinin kısa sürede ve yüksek doğrulukla yapılabilir duruma gelmesi kanserlerin hızlı bir şekilde teşhis edilerek, başarılı tedavi programlarının oluşturulması açısından önem arz etmektedir.

INVESTIGATION OF PROTEOM PROFILES IN PROSTATE CANCER WITH LC-MS-MS

SUMMARY

Keywords: Prostate cancer, LC-MS-MS, proteomics.

Prostate cancer (PCa) is one of the most common cancer types observed in males around the worldwide and resulted in death in large proportions. The diagnosis of prostate cancer is based mainly on digital rectal examination, serum PSA (prostate specific antigen) measurement and biopsy. The biggest disadvantage of PSA is that it leads to false negative or false positive test results. Biopsy is not intended to be preferred with concerns that it may cause damage to organs and tissues by patients. In this study, biomarkers were determined to diagnose prostate cancer as an alternative to invasive techniques using LC-MS-MS.

The proteins obtained from the urines of healthy and prostate cancer specimens were purified by applying acetone precipitation technique which had been kept in sterile tubes. After this step, by using the filter assisted sample preparation technique, the proteins were firstly broken up into the peptides by enzymatic digestion prior to MS analysis. The obtained peptides were analyzed by using LC-MS-MS and the protein profiles were examined mutually. The up-regulated and down-regulated proteins which may be associated with the cancer disease were detected. For the detected significant proteins, in addition to the relationship of these proteins to each other, the molecular functions, cellular, biological and reaction processes were investigated by string pathway analysis. Significant proteins between the two groups by Ingenuity Pathways Analysis (IPA) program were examined. Pyruvate kinase PKM and Kallikrein-11 proteins associated with prostate cancer were detected as biomolecular candidates. These results are very promising as a preliminary study, and LC-MS-MS technique is crucial to be clinically feasible after the validation phase of identified biomarkers. With this technique, the diagnosis of prostate cancer from urine in a short time and with high accuracy is very important in terms of establishing successful treatment programs by rapidly diagnosing cancers.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Erkek üreme sisteminde, prostat, rektumun önündeki mesanenin altında yer alan, idrar akımını sağlayan üretra (idrar yolu) tarafından çevrilmiş şekil ve boyut olarak ceviz benzeyen küçük bir salgı bezidir. Başlıca işlevleri seminal sıvının üretilmesine ve depolanmasına yardımcı olmaktır. Spermayı içeren sıvıların yaklaşık % 20'si prostat içindeki küçük bezlerden oluşur (Ünal ve ark., 2017).

Prostat bezlerinde hücre mutasyonu süreci prostat kanserine neden olmaktadır. Prostat kanseri (PCa) dünya çapında en yaygın görülen ikinci kanserdir ve Türkiye'de mide kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Aydın, 2007; Frantzi ve ark., 2015).

Prostat kanserinin tanısı, parmakla rektal muayeneye (PRM), tarama yöntemi olarak kullanılan serum PSA (Prostat spesifik antijen) ölçümüne ve biopsiye dayanmaktadır.

PRM, hızlı, düşük maliyet ve risk ve normal veya minimal düzeyde yüksek PSA seviyesine sahip erkeklerde kanser tespitine katkıda bulunduğu için prostat kanseri tanısında halen temel teşkil eder. PRM'nin tek başına düşük duyarlılığı vardır, bu nedenle tarama için önerilmez, ancak (PSA) testiyle birlikte kanser tespit etme oranını artırır (Tenke ve ark., 2007).

PSA'nın en büyük dezavantajı, yanlış negatif veya yanlış pozitif test sonuçlarına yol açmasıdır. Doktorlar 4.0 ng / mL'nin altında tespit edilen PSA değerini normal olarak tanımlarken, PSA seviyesi ≤ 4.0 ng / mL olan erkeklerin % 15,2'sinde prostat kanseri teşhis edilmiştir. Yanlış pozitiflikler sağlıklı kişilere postat kanseri teşhisi konmasına

neden olmasına neden olur ve ardından uzun süre hastaların gereksiz yere tedavisi ve izlenmesi yapılır.

Prostat kanseri tanısını tam olarak doğrulayan tek test biyopsidir. Bununla birlikte, bir biyopsi yapılmadan önce, prostat ve üriner sistem hakkında daha fazla bilgi toplamak için birkaç başka araç kullanılabilir. Parmakla rektal muayene bir doktorun prostat anormalliklerini tespit etmesine izin verebilir. Transrektal ultrason prostat görüntüsünü oluşturmak için rektuma yerleştirilen bir prob tarafından üretilen duyulamaz ses dalgalarını kullanır. Biyopsi kanseri gösteriyorsa, doktor kanserin yayılıp yayılmadığını veya ne kadar yayıldığını belirlemek için kemik taramaları, x-ışınları, bilgisayarlı tomografi (BT) taraması veya manyetik rezonans görüntüleme (MR) gibi diğer testleri isteyecektir.

Tüm bunlara rağmen biyopsi, hastalar tarafından organ ve dokularının hasar görmesine sebep olabilir endişesi ile tercih edilmek istenmemektedir. Ayrıca, bazı hastalar tanı testlerinin yapılması için kan vermeyi tercih etmemektedirler.

İdrar örneği, tükürük örneği gibi invaziv olmayan yani cerrahi müdahale gerektirmeyen teşhis prosedürleri vücuda mekanik olarak nüfuz etmez, cilde zarar vermez ve vücut boşluğuna girmez ve biyolojik dokunun çıkarılmasına ihtiyaç duymazlar. Bu sayede tekniğin geliştirilmesi ile birlikte kanser teşhisinde invaziv müdahalelere gerek duyulmaması hedeflenmektedir. Biyolojik belirteçler, kütle spektroskopisi ile yapılan invaziv olmayan tanıda kullanılacak umut vadeci adaylardır (Nelen, 2007; Gamagedara ve Ma, 2011).

Çok aşamalı prostat kanseri ile ilişkili belirteçlerin tanımlanması olası nedenler ve altta yatan mekanizmalar hakkında daha bilimsel bir anlayış sağlayacak ve tedaviyi iyileştirmek için gereken önemli bilgileri sağlayacaktır.

"Proteomik" terimi ilk olarak 1990'lı yılların sonlarında ortaya çıkmış ve kütle spektrometresi (MS) temelli proteomik analizler, klinik biyoloji ve karmaşık insan hastalıklarını daha iyi anlayabilmek için sistem biyolojisi alanlarında ortaya çıkan

önemli bir araç olmuştur. Proteomik tekniği yenilikçi deneysel yaklaşımlar, hassasiyetteki gelişmeler, çözünürlük ve kütle analizörlerinin doğruluğunun geliştirilmesiyle hızla büyümeye devam etmektedir (Goo ve Goodlett, 2010).

1990'ların başlarında ilk defa idrarda protein tespiti çalışmaları yapılmıştır. 2004'te Pieper ve ark. (Pieper ve ark., 2004) iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) kullanarak idrarda yaklaşık 1400 farklı nokta tespit etmiştir. 1400 farklı nokta kütle spektrometresi ile analiz edilerek içerdiği 420 protein tespit edilmiştir.

Sun ve ark. (2005) sağlıklı insan üriner proteom profilini oluşturmak için tandem kütle spektrometresi (LC-MS-MS) ile birleştirilmiş sıvı kromatografi kullanarak 226 proteini üç farklı ayırma yöntemiyle (1D jel, bunu takiben 1DLC ve 2DLC) tespit etmişlerdir. Yüksek çözünürlüklü LTQ-FT ve LTQ-Orbitrap kütle spektrometrelerini kullanarak, Adachi ve ark. (2006) tarafından sağlıklı insan idrarında 1534 protein tespit edilmiştir.

Li ve ark. (2010) 1310 protein teşhis etmeyi başardıkları iki farklı yaklaşım geliştirdi. Bunlardan birincisi entegre çok boyutlu sıvı kromatografisi (IMD-LC) ve ikincisi ise Yin-yang çok boyutlu sıvı kromatografisi (Yin-yang MDLC) tandem kütle spektrometrisidir. Bugüne kadar yapılan tüm çalışmalarda, sağlıklı insan idrarında 2000'den fazla protein tespit edilmiştir (Shao ve ark., 2011).

Prostat kanseri için idrara dayalı tarama testlerinin başlıca zorluğu, iyi performans özelliklerine sahip ve aynı zamanda idrar toplama ve işleme kolaylığı sağlayan bir biyobelirteç bulmaktır. Serum prostat spesifik antijen ölçümleri, prostat kanserinin erken saptanması için yaygın olarak kullanılır, ancak özgüllüğü yoktur. Bu nedenle ek biyobelirteç arayışı hastalığın teşhisi için şarttır.

Bu çalışmanın amacı LC-MS-MS tekniği kullanılarak invaziv tekniklere alternatif olacak şekilde prostat kanseri tanısında kullanılacak biyobelirteçlerin saptanmasıdır. Prostat kanseri tanısında kullanılacak biyobelirteçlerin saptanması ve doğrulanması ile birlikte bu tekniğin klinikte uygulanabilirliğinin gösterilmesi

çalışmanın en temel amaçlarından biridir. Kütle spektroskopisi kullanılarak idrardan prostat kanseri tanısı yapılabilmesi teşhis süresi ve kolaylığı açısından birçok avantaj sağlayacaktır. Bu doğrultuda sağlıklı ve prostat kanserli hastalardan alınan idrar numuneleri LC-MS-MS cihazı ile analiz edilerek protein profilleri karşılıklı olarak incelenmiştir. Hastalık ile ilişkili olabilecek up-regüle ve down-regüle olmuş proteinler saptanmıştır. Bulunan anlamlı proteinler için string pathway analizi yapılarak bu proteinlerin birbirleri ile olan ilişkilerinin yanısıra, moleküler fonksiyonları, hücresel, biyolojik ve reaksiyon prosesleri incelenmiştir. Ingenuity Pathways Analysis (IPA) programı ile iki grup arasında anlamlı olarak belirlenen proteinler incelenmiş ve prostat kanserle ilişkili olan Pyruvate kinase PKM ve Kallikrein-11 proteinleri biyobelirteç adayları olarak tespit edilmiştir.

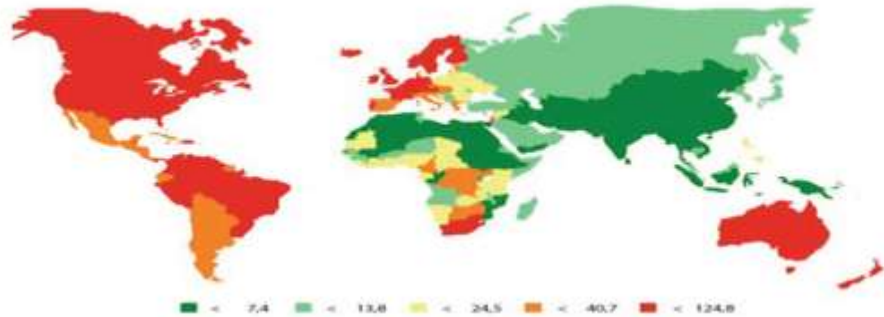
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Prostat Kanseri

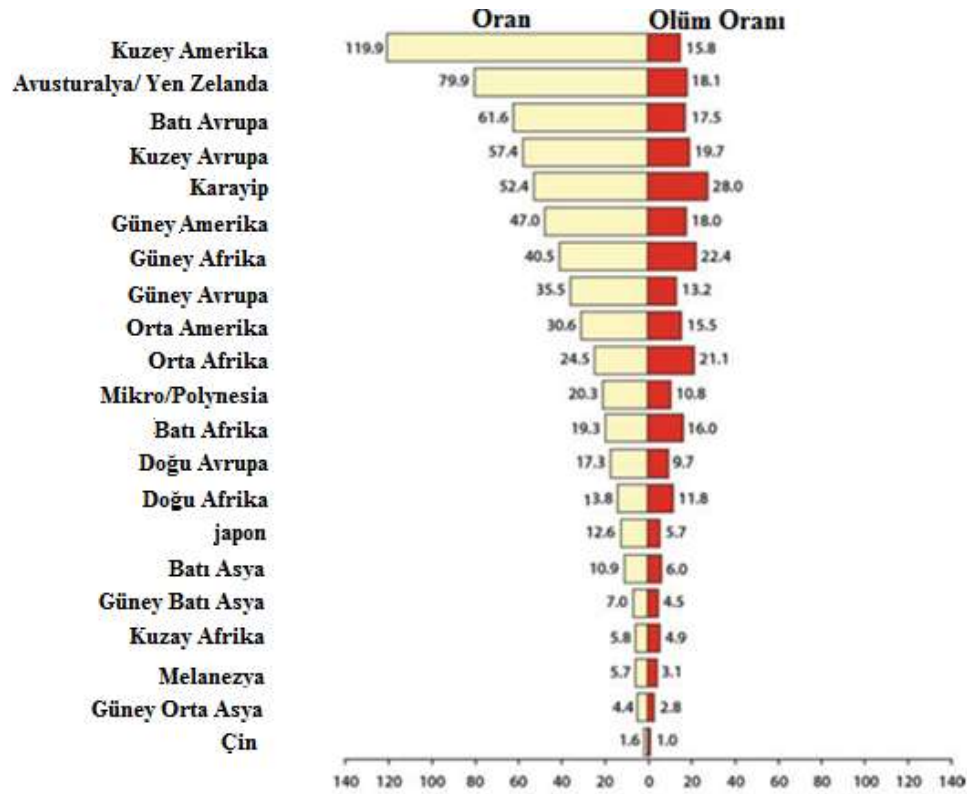
Prostat kanseri tüm dünyada en çok görülen kanser türlerinden biridir (Tefekli, 2012). Dünya genelinde her 100.000 kişide 25,3 kişide görülen, ülkeler arasında büyük farklılık göstermekle birlikte erkeklerde ikinci en çok görülen kanser türüdür.

Kanser üç ölçümle ifade edilebilir; insidans, ölüm oranı ve yaygınlık. İnsidans, bir toplumda yılda bir kez meydana gelen yeni vakaların sayısıdır ve mutlak sayı veya 100.000 kişi başına bir oran olarak ifade edilebilir. Ölüm oranı, meydana gelen ölümlerin sayısıdır ve ayrıca her yıl her 100.000 kişide bir oran olarak ifade edilebilir. Yaygınlık ise belirli bir zaman zarfında hastalığı olan canlı sayısıdır. 2002 yılında dünya çapında 10,9 milyon yeni kanser vakası tespit edildi, 6,7 milyon kişi kanserden öldü ve 24,6 milyon kişi ise kanserle yaşamaktadır (Parkin ve ark., 2005).

Prostat kanseri insidansı kıtalar arasında (Şekil 2.1.) ve ülkeden ülkeye değişmektedir (Şekil 2.2.). İnsidans Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avustralya, Yeni Zelanda Kuzey ve Doğu Avrupada yüksektir. En düşük oran ise Çin ve Asya'da görülmektedir (Parkin ve ark., 2005).



Şekil 2.1. Dünya çapında prostat kanser vakaları (Ferlay ve ark., 2004)



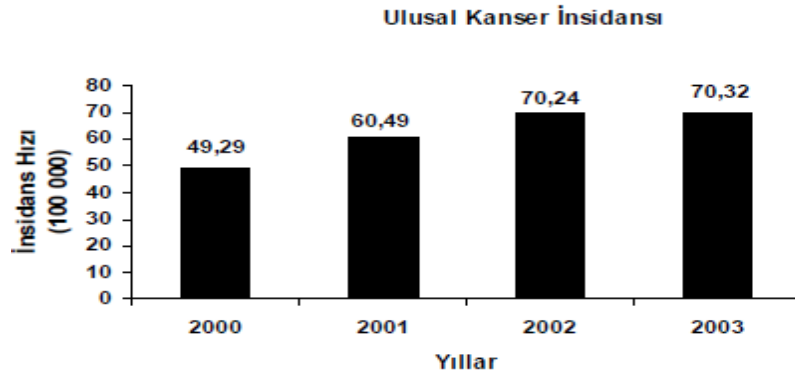
Şekil 2.2. Prostat kanser, yaşın standarlize edildiği vaka ve her 100.000 de ölüm oranları (Parkin ve ark., 2005)

Prostat kanseri tüm kanser ölümlerinin % 3,3'ünden sorumludur. 2004 yılında Avrupa'da yaklaşık 85.000 erkek prostat kanserinden ölmüştür ve bu sayı kanser ölümlerinin % 5,8'ini ifade etmektedir. Avrupa Birliği'nde prostat kanserinden ölenlerin yaşam boyu (0-74 yaş) riski 2004'te % 1,1 olarak belirlenmiştir (Boyle ve Ferlay, 2005). Kanser ölüm oranları, gelişmekte olan ülkeler ile gelişmiş ülkeler arasında insidans hızlarına göre daha az farklılık göstermektedir. Erkekler için toplam kümülatif ölüm oranı 65 yaşından önce tüm kanserler için % 18'dir (Ferlay ve ark., 2004). Bu oran gelişmiş ülkelerde daha yüksektir. Prostat kanserindeki farklılığın bir kısmı toplumdaki farklı yaş gruplarından kaynaklanmaktadır.

2.1.1. Türkiye'de üriner sistem kanserlerinin görülme sıklığı

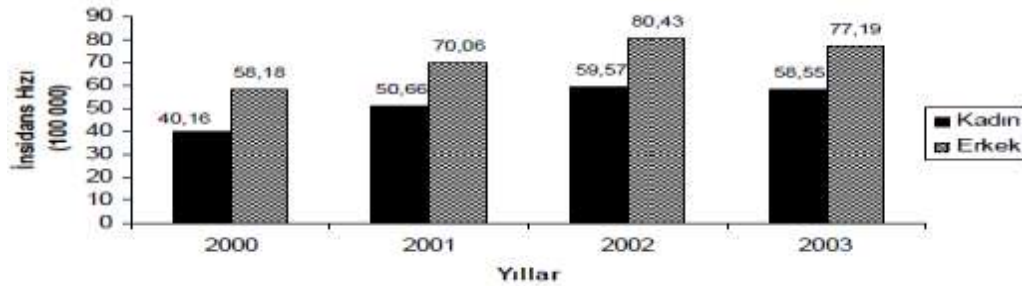
Ülkemizde kanser konusunda ilk düzenleme 1947 yılında Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu'nun kurulmasıyla başlayan çalışmalarda toplanan verilere dayanmaktadır ve elde edilen veriler ülkemizde kanser vakalarının görülme sıklığının her yıl artmakta olduğunu göstermektedir. Şekil 2.3.'de 2000-2003 yılları arası ulusal

kanser görülme sıklığı görülmektedir. 2000 yılında ülkemizde kanser görülme sıklığı yüz binde 49,29; 2001'de 60,49; 2002'de 70,24 ve 2003'de 70,32 olarak tespit edilmiştir. Erkeklerde görülen kanserler içerisinde prostat kanseri görülme sıklığı yüz binde 14,01 dir. Akciğer ve mide kanserinden sonra en sık görülen kanser türü olarak literatüre girmiştir (Aydın, 2007).



Şekil 2.3. 2000-2003 yılları arası ulusal kanser görülme sıklığı (Aydın, 2007)

Şekil 2.4.'de aynı yıllarda cinsiyete göre kanser görülme sıklıkları görülmektedir. 2000 yılında kadınlarda yüz binde 40,16, erkeklerde yüz binde 58,18 olan kanser görülme sıklığı, 2003 yılında kadınlarda yüz binde 58,55'e, erkeklerde ise yüz binde 77,19'a yükselmiştir.



Şekil 2.4. Ulusal Kanser Görülme Sıklığının Cinsiyete Göre Dağılımı (Aydın, 2007)

Tablo 2.1.'de erkeklerde en sık görülen 10 kanser türü sırasıyla görülmektedir. Akciğer kanseri yüz binde 19,20 görülme sıklığı oranıyla birinci sırada yer alırken, prostat kanseri mide kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır.

Tablo 2.1. Türkiye’de erkeklerde en sık görülen on kanser türü (2003) (Aydın, 2007)

Kanser Tipi	Olgu Sayısı	%	İnsidens
Akciğer	6828	24,22	19,20
Mide	2275	8,07	6,40
Prostat	2122	7,53	5,97
Mesane	2109	7,48	5,93
Deri	2006	7,12	5,64
Larinks	1324	4,70	3,72
Kolon	1240	4,40	3,49
Kemik iliği	1090	3,87	3,06
Beyin	923	3,27	2,60
Rektum	906	3,21	2,55
Diğer	7366	26,13	20,71
Toplam	28189	100	79,26

Cinsiyet ayrımı olmaksızın yapılan sıralama ise Tablo 2.2.’de verilmiştir. Burada prostat kanserinin görülme sıklığı yüz binde 4,30 ile üçüncü sırayı almıştır.

Tablo 2.2. Türkiye’de en sık görülen on kanser türü (2003) (Aydın, 2007)

Kanser Tipi	Olgu Sayısı	%	İnsidens
Akciğer	7754	15,70	11,04
Meme	5828	11,80	8,30
Prostat	2122	4,30	5,97
Deri	3703	7,50	5,27
Mide	3448	6,98	4,91
Mesane	2400	4,86	3,42
Kolon	2247	4,55	3,20
Kemik iliği	1833	3,71	2,61
Beyin	1643	3,33	2,34
Rektum	1555	3,15	2,21
Diğer	16854	34,13	24,00
Toplam	49387	100,00	70,32

Tablo 2.3.’de ürolojinin konusu olan kanserlerde olgularının dağılımları ve oranları görülmektedir. Bu sıralamada prostat kanseri ilk sırayı almaktadır.

Tablo 2.3. Ürogenital sistem kanserlerinin dağılımı (2003) (Aydın, 2007)

Kanser Tipi	Kod	Erkek		Kadın		Toplam	
		Sayı	İnsidens	Sayı	İnsidens	Sayı	İnsidens
Prostat	61,9	2122	5,97	-	-	-	-
Testis	62,0-62,9	475	1,34	-	-	-	-
Böbrek	64,9	531	1,49	337	0,97	868	1,24
Böbrek Pelvisi	65,9	11	0,03	7	0,02	18	0,03
Üreter	66,9	14	0,04	4	0,01	18	0,03
Mesane	67-67,9	2109	5,93	291	0,84	2400	3,42

2.1.2. Prostat kanseri risk faktörleri

Prostat kanserine sebep olan faktörler henüz kesin olarak tespit edilememiştir. Prostat kanseri muhtemel risk faktörlerinin bir kombinasyonunun sonucudur. Bu faktörler yaş, kalımsal faktörler ve çevresel risk faktörleri olarak sınıflandırılabilir.

Prostat kanser oranının diğer birçok kanser türlerine göre yaşa bağlı olarak belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Otopsi çalışmaları, histolojik kanserin yaşla birlikte arttığını, 50 yaş üzerindeki erkeklerde %15-30 ve 80 yaşın üzerindeki erkeklerde %60-70 arasında değiştiğini göstermektedir (Pienta ve Esper, 1993).

50 yaşın altındaki erkeklerde prostat kanseri vakası az sayıda görülmektedir. Tüm prostat kanseri vakalarının dörtte üçü 65 yaş ve üstü erkeklerde görülmektedir. Oranlar yaşa bağlı olarak orantısız bir şekilde artmaktadır. Bu nedenle, daha yaşlı erkek nüfusuna sahip ülkelerde görülme oranı daha yüksektir. Prostat kanseri oranı, gelişmiş ülkelerde yeni vakaların %19'una, gelişmekte olan ülkelerde ise sadece %5,3'üne denk gelmektedir (Quinn ve Babb 2002).

Prostat kanseri risk faktörlerinden diğer bir etmen olan kalıtım, önemli bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Birinci derece akrabada (baba, erkek kardeş, ağabey) hastalık varsa hastalık riskinin en az iki kat arttığı, iki veya daha fazla akrabada bu hastalığın görülmesi ile hastalık riskinin 5 ila 11 kat arttığı belirlenmiştir (Steinberg ve ark., 1990; Gronberg ve ark., 1996).

Prostat kanser insidansında yüksek farklılıklar farklı etnik gruplarda da farkedilmiştir. Afrikan Amerikalılar benzer eğitimi ve sosyo ekonomik geçmişe sahip olan beyaz Amerikalılara göre daha yüksek insidans oranına sahiptir (Baquet ve ark., 1991). Sigara içimi, alkol tüketimi, kadmiyum maruziyeti, meslek tipi, enfeksiyöz ajanlar, iyonlaştırıcı radyasyon, morötesi ışık, fiziksel aktivite, vücut kütle indeksi ve beslenme faktörleri geniş anlamda çevresel risk faktörleri olarak ileri sürülmektedir (Nelen, 2007).

Kanser ile beslenme arasındaki ilişki birçok farklı çalışma ile ortaya konmuştur. Diyetinde yüksek miktarda hayvansal yağların bulunması prostat kanser riskinin artmasında önemli olabilir (Meyer ve ark., 1999). Düşük E vitamini, selenyum, lignanlar ve izoflavonoidlerin alınması da diğer etkileyici risk faktörleri içerisinde (Denis ve ark., 1999). Güneş ışınlarına maruz kalma süresinin prostat kanserinin ilerleme riski ile ters ilişkili olduğu belirtilmektedir. Güneş ışınının D vitamini üretimini artırmasının prostat kanserinde koruyucu etkisi olduğunu gösterilmiştir (Hanchette ve Schwartz, 1992).

2.1.3. Tanı

Prostat kanseri tanısında parmakla rektal muayene (PRM), Prostat spesifik antijen (PSA) ve Transrektal ultrasonografi en çok kullanılan tarama teknikleridir (Imai ve ark., 1995).

2.1.3.1. Parmakla rektal muayene (PRM)

Parmakla rektal muayene (PRM) basit ve ucuz bir tarama testidir fakat hassasiyeti transrektal ultrasonografiye göre daha düşüktür (Oesterling ve ark., 1995). Çoğu prostat kanseri periferik bölgede bulunur ve ancak hacmi 0.2 mL'den büyük olduğunda PRM tarafından tespit edilebilir (Richie ve ark., 1993).

PSA seviyesi 2 ng / mL den küçük hastalarda PRM'nin pozitif prediktif değeri % 5 ile %30 arasındadır. Anormal PRM yüksek Gleason skoru riski ile ilişkilidir ve

biyopsinin gerekliliğinin bir göstergesidir (Okotie ve ark., 2007; Gosselaar ve ark., 2008).

2.1.3.2. Prostat spesifik antijen

Prostat spesifik antijen (PSA) , yaklaşık olarak 237 tane amino asit residüsünden oluşan, yaklaşık 26 kDa molekül ağırlığına sahip ve tek polipeptit zincirinden meydana gelen ve insan sperm sıvısında 0.5-2 mg / mL seviyelerinde bulunan proteolitik bir enzimdir (Lundwall ve Lilja, 1987; Schaller ve ark., 1987; Lundwall, 1989; Lilja, 1993; Clements ve Mukhtar, 1994).

PSA'nın serumdaki düzeyi FDA onaylı bir prostat kanseri belirteci olmakla beraber bir serum belirteci olarak kullanılması prostat kanseri tanısında devrim yaratmıştır (Gittes, 1987; Stamey ve ark., 1987; Wolf ve ark., 2010).

PSA ilk olarak prostat dokusunda veseminal sıvıda izole edildikten sonra yapılan çalışmalar sonucunda tükürük salgısında, pankreas ve meme dokularında da tespit edilmiştir (Acar ve Şanlı, 2012).

Kanserin erken teşhisi, nihai kontrolü ve önlenmesi için çok önemlidir. PSA organlara özgü olmakla beraber benign prostat hipertrofinde (BPH), prostatitte ve diğer kötü huylu olmayan durumlarda da miktarı yükselebildiğinden dolayı kanser spesifik değildir Prostat kanseri ve BPH olan hastaların tanı, tedavi ve takip süreçlerinde sıklıkla kullanılmaktadır.

PSA gibi konvansiyonel tanı stratejilerindeki ilerlemeler hastalığın tespitinde ilerleme sağlamış olsa da serum PSA konsantrasyonu prostat kanseri için düşük bir tanısal özgüllüğe sahiptir ve bu da birçok gereksiz hasta biyopsisine neden olmaktadır (Catalona ve ark., 1994; Acar ve Şanlı, 2012; Wilt ve ark., 2014; Wulfkühle ve ark., 2003).

PSA, prostat kanseri tanısında kullanılan PRM ve Transrektal ultrasonografi gibi tarama tekniklerine kıyasla daha iyi bir kanser belirleyicisidir (Catalona ve ark., 1994). PSA prostat kanseri tanısında tek başına yeterli olmadığından dolayı kesin tanıyı oluşturabilmek için çeşitli stratejiler araştırılmıştır. Bunları PSA yoğunluğu, PSA velositesi, yaşa göre değişen PSA referans aralıkları, serbest / toplam PSA yüzdesi, PSA formları ve Prostat Sağlık İndeksi (PHI) testi olarak sıralayabiliriz. Bunların ortak amaçları yanlış-pozitif test sonuçlarını azaltmaktır. Bu spesifisiteyi ve pozitif prediktif değeri artırır ve gereksiz biyopsileri azaltarak maliyeti düşürür (McLaughlin ve Dryer, 2000).

PSA yoğunluğu, serum PSA düzeyinin (tPSA) trans rektal ultrasonografi (TRUS) ile belirlenmiş prostat hacmine bölünmesidir. PSA yoğunluğu ne kadar yüksek olursa, PCA'nın klinik açıdan anlamlılığı da o kadar yüksektir. Bu strateji ile biyopsi oranının azaltılmasına rağmen değerleri ile de PSA yoğunluğu ile elde edilen performansa ulaşabilmektedir. Bu nedenle pratikte kullanılmamakla beraber akademik araştırmalarda kullanılmaktadır.

PSA velositesi, toplam PSA (tPSA) hızı (ng/mL/yıl), tPSA'nın yıllık mutlak artışı olarak tanımlanmış. Serum PSA seviyesi 4-10 ng/mL arasında olanlarda başlangıçta kanser tanısına yönelik 0,75 ng/mL/yıl artış olarak tanımlandı. Prostat kanserli erkeklerin, prostat kanseri olmayan erkeklere göre prostat kanseri tanısı konmadan önceki yıllarda daha hızlı yükselen serum PSA değerlerine sahip oldukları gösterilmiştir. Serum PSA değerleri yılda 0,75 ng/mL'den daha hızlı yükselen erkeklerin prostat kanserine yakalanma risklerinin arttığı düşünülmektedir. Yüksek PSA velositesi, ancak birkaç serum PSA analizinin 20 aynı laboratuvarında ve en az 18 aydan fazla süreli birperiyot içinde yapıldığı zaman anlamlı sayılmalıdır (Ayyıldız ve Ayyıldız, 2014; McLaughlin ve Dryer, 2000).

Toplam PSA (tPSA), serumda bulunan serbest PSA ve plazma proteinlere bağlı PSA'dan oluşmaktadır. En önemli bağlanan proteinler alfa-1-antikimotripsin (ACT), alfa-2-makroglobülin (A2M) ve alfa-1-tripsin (veya protein) inhibitörüdür (API). tPSA değeri 4,0 ng/mL olarak alındığında prostat kanser için hassasiyet %20, özgüllük ise

%60-70 arasında değişmektedir. Bu nedenle başka stratejiler geliştirmeye çalışmışlar (Jain ve ark., 2002).

Serbest PSA (sPSA) ve Serbest / toplam (f / t) PSA oranı, serbest PSA, serum proteinlere bağlı olmayan kısmıdır. Serbest PSA , proPSA , benign PSA (BPSA) ve intakt PSA (iPSA) olarak üç farklı formu bulunmaktadır.

proPSA 244 amino asite sahiptir. Hem dokuda hem de serumda bulunmaktadır. Diğer önemli formu [-2]pPSA (p2PSA)'dır ve 239 amino aside sahiptir. Mikolajczyk ve ark. tarafından tanımlanmıştır, bu form PCa'lı dokuda ve sonradan da serumda saptanmıştır (Ayyıldız ve Ayyıldız, 2014).

Benign PSA, PSA'nın prostat dokusu içinde uğradığı proteolitik değişimin sonucunda oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda, BPSA'nın prostat hacmi (özellikle transition zone) ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Prostat kanseri olan ve olmayan hastaların ayırımında ise çok kısıtlı bilgiler sağlamaktadır (Acar ve Şanlı, 2012).

İntakt PSA, PSA'nın başka bir alt bölümüdür. İnsan Prostat; sol supraklaviküler lenf nodu metatazından elde edilmiş LNCaP hücrelerinden izole olduğu için, klinik uygulamadaki yeri hala tartışmalıdır.

sPSA, tek başına bir anlam içermemektedir. Bu nedenden dolayı sPSA yüzdesi olarak kullanılmaktadır. Matematiksel olarak $\%sPSA = 100 * sPSA / tPSA$ şeklindedir. Prostat kanserin ayırt edilmesinde toplam PSA ya göre daha duyarlıdır. PCa, f / t PSA oranı $< 0,10$ olan erkeklerin % 56'sında biyopsi ile tespit edildi, ancak f / t PSA oranı $> 0,25$ olanlarda ise tespit edilen PSA miktarı yalnızca % 8 idi. Toplam serum PSA değeri > 10 ng / mL veya bilinen PCa takibi sırasında f / t PSA oranı klinik olarak kullanılamaz (Ayyıldız ve Ayyıldız, 2014; Stephan ve ark., 1997).

2.1.3.3. Yaşa göre değişen PSA referans aralıkları

Prostat kanseri olmayan erkekler için olan yaşa-bağlı PSA değerleri Tablo 2.4.'de gösterilmiştir. Oesterling ve arkadaşları tPSA değeri ve prostat hacmi arasında yaşa bağlı olarak logaritmik bir korelasyon olduğunu gözlemlemişler ve Tablo 2.4.'de gösterilen yaşa bağlı referans aralıklarının %95 oranında yararlı olduğunu ileri sürmüşler. Yaşa özgü PSA değerlerinin kullanılmasında fikir ayrılıkları bulunmaktadır. Catolona ve arkadaşları genç yaştaki erkeklerde düşük PSA aralıkları ile gereksiz biyopsi yapılmasına ve maliyet artışına neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenden dolayı tek başına anlamlı bir parametre değildir (Ayyıldız ve Ayyıldız, 2014; Kutlu ve Köksal, 2012).

Tablo 2.4. Yaş aralığına göre normal PSA aralıkları (McLaughlin, 2000)

Yaş Aralığı	Normal PSA Aralığı
40-49	0-2,5
50-59	0-3,5
60-69	0-4,5
70-79	0-6,5

PHI testi, Phi indeks: $[-2] \log(\text{proPSA}/\text{fPSA}) \times \text{PSA}^{1/2}$ formülü kullanarak PSA testi olan erkeklerdeki gereksiz prostat biyopsilerinin sayısını azaltılması hedeflenen bir testtir (Ayyıldız ve Ayyıldız, 2014). Klinik etkileri, henüz kanıtlanmamış olmakla beraber, klinik karar verme için az da olsa bir ışık sağlayabilir (Fossati ve ark., 2015).

2.1.3.4. Düşük PSA değerlerinin PCa riski ile ilişkisi

Tablo 2.5. düşük PSA düzeylerinde Gleason > 7 olma riskini ve prostat kanser olma riskini göstermektedir. Bu tablo klinik açıdan anlamlı PCa'nın saptanması için optimal bir PSA eşiğinin olmadığını göstermektedir.

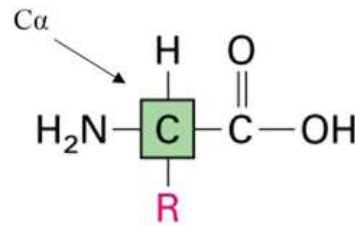
Tablo 2.5. Düşük PSA değerlerinin PCa riski ile ilişkisi (Aus ve ark., 2005)

PSA seviyesi (ng/mL)	Pca Riski (%)	Gleason Riski > 7 PCa (%)
0.0-0.5	6,6	0,8
0.6-1.0	10,1	1,0
1.1-2.0	17,0	2,0
2.1-3.0	23,9	4,6
3.1-4.0	26,9	6,7

2.2. Proteinler ve Protein Analitik Teknikleri

2.2.1. Amino asitler

İnsan vücudunda 20 amino asit bulunur. 20 amino asitten pirolin hariç geri kalan tüm amino asitler α -amino asitlerdir. Bunlar aynı karbon atomuna bağlı bir karboksil grubu ve bir amino grubuna sahiptir. Onlar birbirleriyle R guruplarına göre farklılaşırlar. Bu durum yapı, boyut ve elektrik yükünde değişiklik gösterir ve amino asitlerin sudaki çözünürlüğünü etkiler (Nelson ve Cox, 2012).



Amino asit

Şekil 2.5. Amino asit yapısı (Harvey ve Ferrier, 2011)

Amino asitler, R guruplarının genel kimyasal özelliklerine dayanarak dört gruba ayrılmaktadır:

1. Polar olmayan R guruplu hidrofobik amino asitler
2. Nötr R guruplarına sahip polar amino asitler

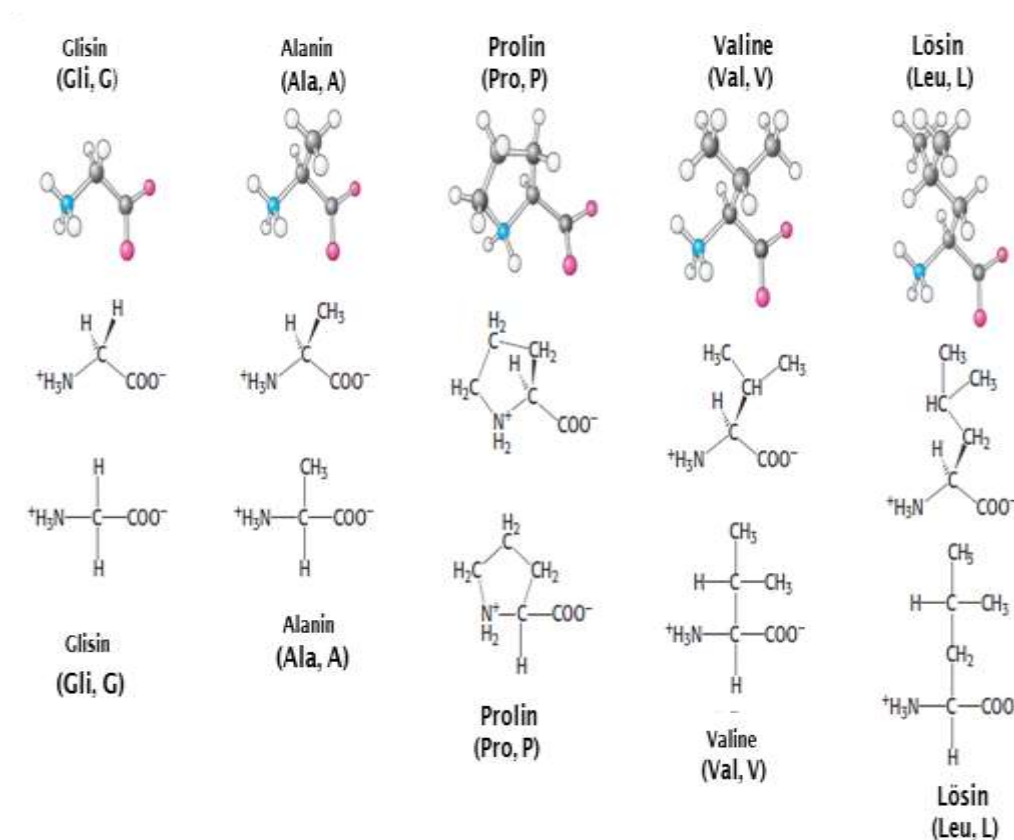
3. Fizyolojik pH değerinde pozitif yüke sahip R grupları ile pozitif yüklü amino asitler,

4. Fizyolojik pH'da negatif yüke sahip negatif yüklü R gruplu amino asitler (Berg ve ark., 2012).

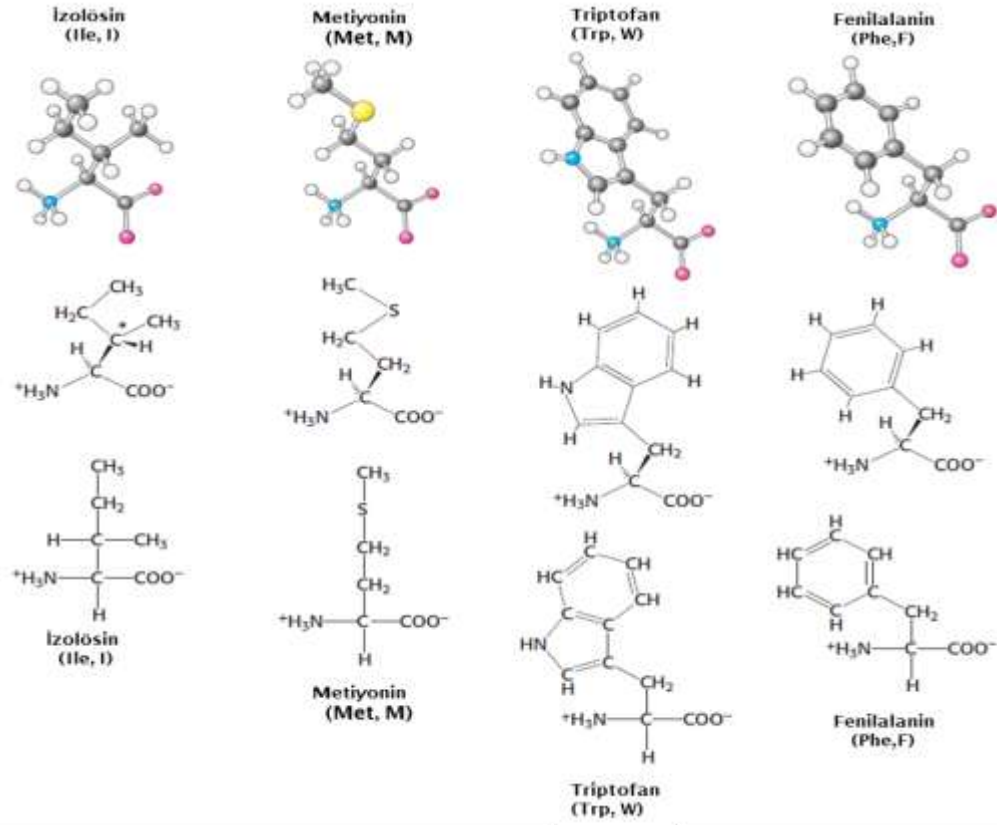
Hidrofobik amino asitler içerisinde en basit amino asit, glisin olup yan zincir olarak tek bir hidrojen atomuna sahiptir. α -karbon atomuna bağlı iki hidrojen atomuyla, glisin akiral molekül olarak benzersizdir (Şekil 2.6.).

Bir sonraki en basit amino asit olan alanin, yan zinciri olarak bir metil grubuna (OCH₃) sahiptir (Şekil 2.6.).

Daha büyük hidrokarbon yan zincirleri valine, lösin ve izolösin bulunur. Metiyonin, tioeter (-S-) grubu içeren büyük ölçüde alifatik bir yan zincir içerir.



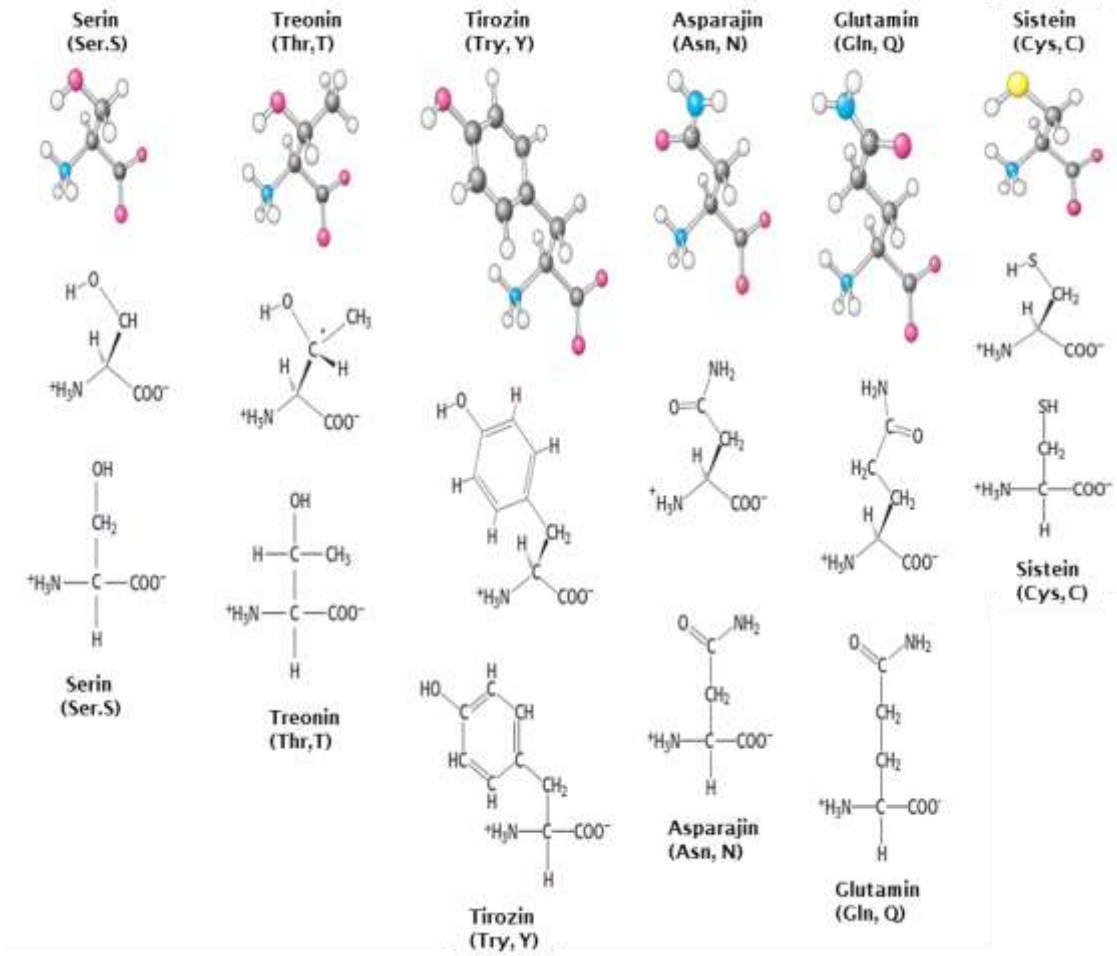
Şekil 2.6. Hidrofobik aminlerin yapısı (Berg ve ark., 2012)



Şekil 2.6. (Devamı)

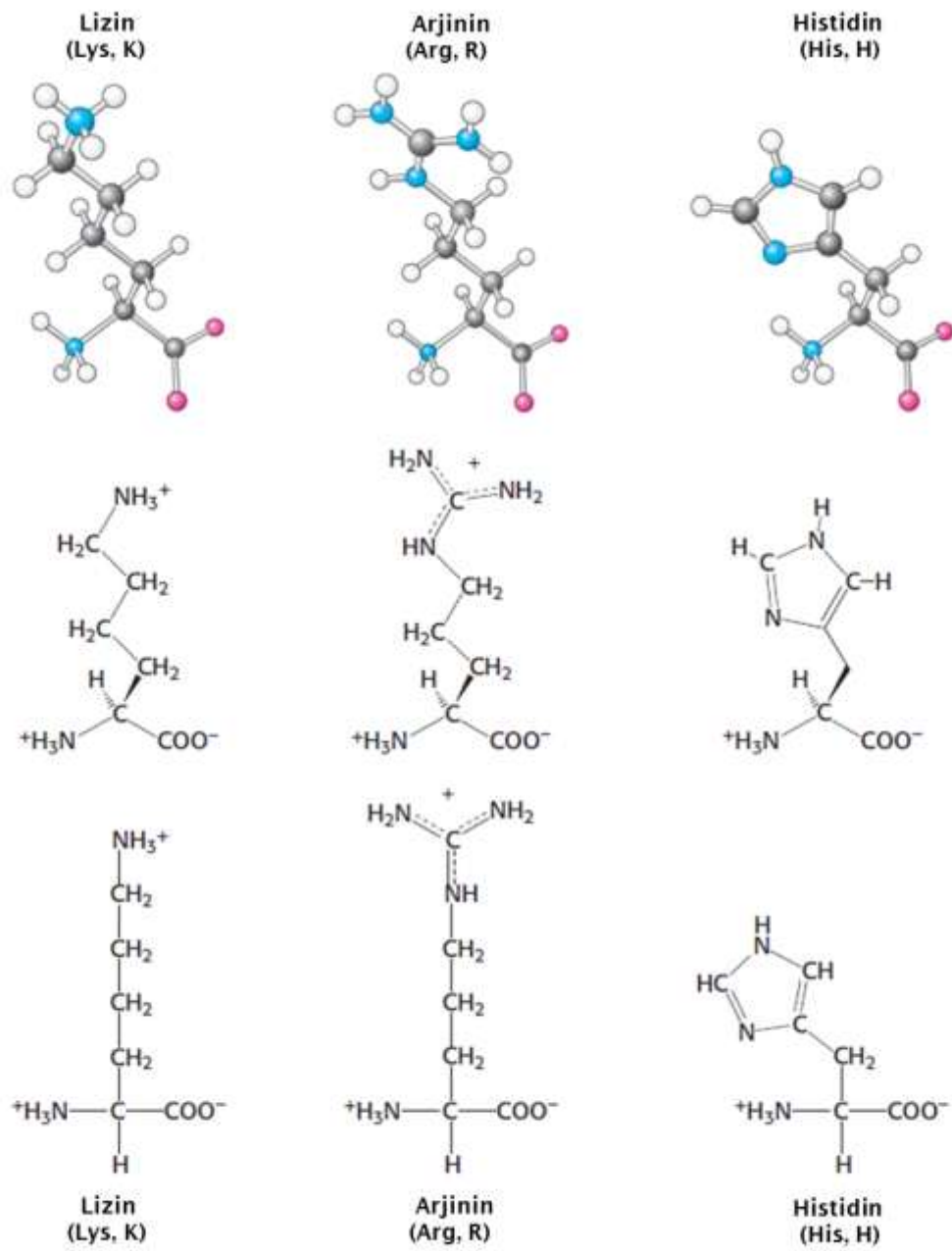
Altı amino asit polar moleküllerdir. Fakat yüksüzdür. Üç amino asit, serin, treonin ve tirozin, bir hidrofobik yan zincire bağlı hidroksil grupları (-OH) içerir (Şekil 2.7.). Serin, bir hidroksil grubu bağlı bir alaninin bir versiyonu olarak düşünülebilir; treonin, valine metil gruplarından birinin yerine bir hidroksil grubu olan valine benzemektedir ve tirozin, fenilalaninin, hidroksil grubunun, aromatikte bir hidrojen atomu yerine geçtiği bir versiyonudur yüzük.

Hidroksil grubu, bu amino asitleri hidrofobik analoglarına kıyasla çok daha hidrofilik (su seven) ve reaktif hale getirir.

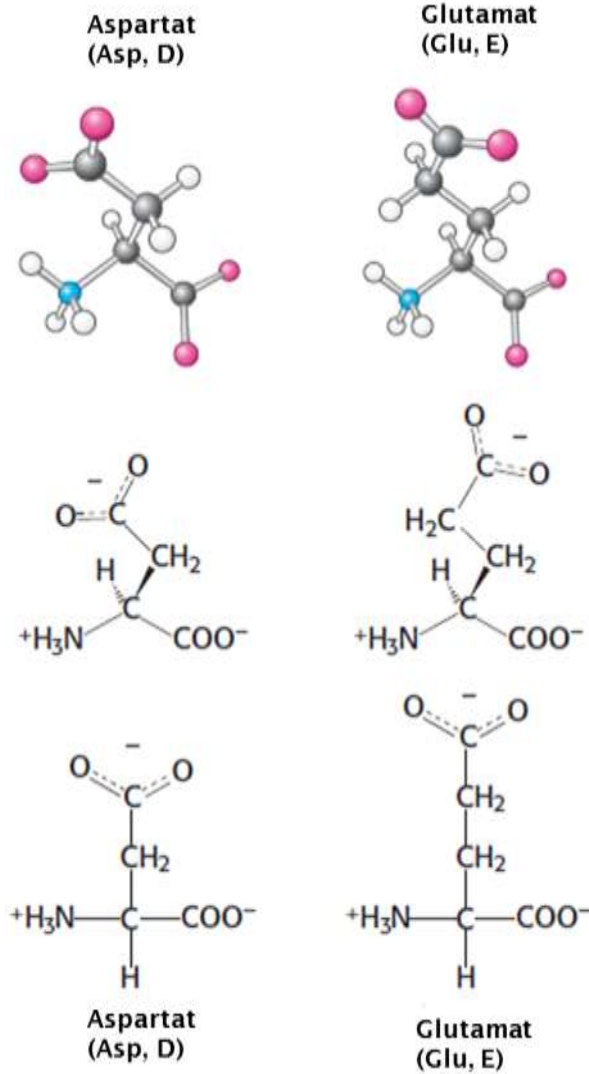


Şekil 2.7. Polar aminlerin yapısı (Berg ve ark., 2012)

Lizin ve arjinin, nötr pH değerinde pozitif yüklü gruplarla son bulan uzun yan zincirlere sahiptir. Lizin, primer bir amino grubu, arjinin guanidinyum grubu ve histidin, pozitif yüklü olabilen bir aromatik halka olan bir imidazol grubu içerir (Şekil 2.8.).



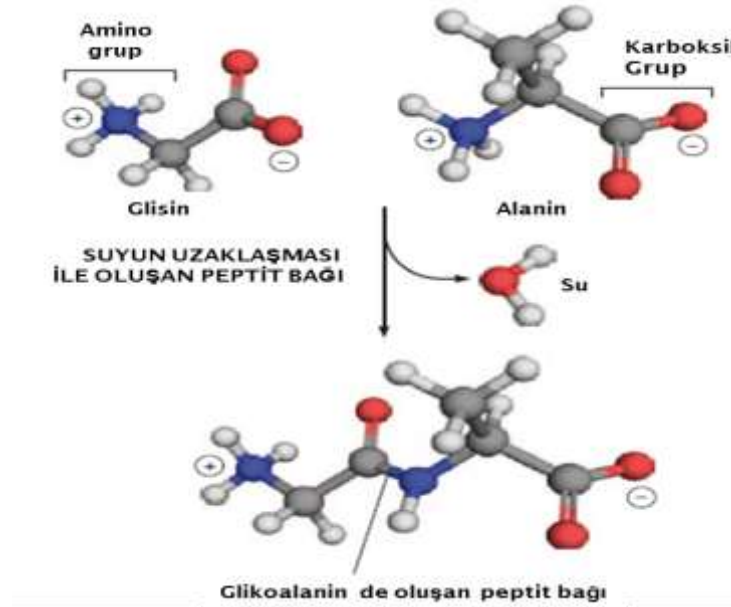
Şekil 2.8. Pozitif yüklü polar aminler lysine arginine, histidine (Berg ve ark., 2012)



Şekil 2.9. Negatif yüklü amino asitler (Berg ve ark., 2012)

Proteinler peptit bağları ile birbirine bağlanan amino asitlerden oluşmaktadır (Şekil 2.10.). İki amino asit bir dipeptit oluşturmak üzere birleşir; üç amino asit bir tripeptit oluşturur; dört aminoasit ise bir tetrapeptit oluşturur. Birkaç amino asit ise birlikte bir oligopeptit oluşturur ve 10 ila 50 amino asit kombinasyonu bir polipeptit olarak adlandırılır. Konvansiyonel olarak, 50'den fazla amino asit içeren büyük polipeptit zincirlerine protein denir. Bir proteinin yapısında 20 farklı amino asit bulunabilir. Bir tripeptitte 3 amino asit bulunur ve bu 3 amino asit 20 amino asitten herhangi biri olabilir. Böylece tripeptitte $20^3 = 8000$ farklı permütasyon ve kombinasyonları mümkündür. Yaklaşık 100 amino asit içeren sıradan bir proteinin 20^{100} farklı olasılığı vardır. Bu sayı, tüm evrende bulunan toplam atom sayısından daha fazladır.

Böylece, sadece 20 amino asit olsa bile, bu amino asitlerin kombinasyon dizisini değiştirerek, belirgin şekilde farklı proteinler oluşabilmektedir (Vasudevan ve ark., 2011).



Şekil 2.10. Peptit bağının oluşumu (Alberts ve ark., 2014)

2.2.2. Proteinler

Protein kelimesi, birincil anlamı taşıyan "proteios" sözcüğünden türemiştir. Adından da anlaşılacağı üzere, proteinler biyolojik sistemler için büyük önem taşır. Toplam kuru vücut ağırlığının 3 / 4'ü proteinlerden oluşur. Proteinler vücut geliştirme için kullanılır. Vücudun tüm önemli yapısal ve işlevsel yönleri protein molekülleri tarafından gerçekleştirilir. Protein yapısındaki anormallik, metabolik işlevlerde derin değişikliklerle birlikte moleküler hastalıklara yol açabilmektedir. Proteinler ana bileşenler olarak karbon, hidrojen, oksijen ve azot içerirken, aynı zamanda kükürt ve fosfor da içermektedir. Ortalama olarak, sıradan proteinlerin azot içeriği ağırlıkça % 16'dır (Vasudevan ve ark., 2011).

Proteinler, canlı sistemlerdeki çok yönlü makromoleküllerdir ve temel olarak tüm biyolojik süreçlerde önemli işlevlere hizmet ederler. Onlar katalizör, oksijen gibi diğer moleküllerin taşınması ve depolanması, mekanik destek ve bağışıklık koruması

sağlamak, hareket oluşturmak, sinir uyarılarını iletmek ve büyümeyi ve farklılaşmayı kontrol etmek gibi fonksiyonlara sahiptir (Berg ve ark., 2012).

2.2.3. Proteinlerin yapısı

Proteinler farklı yapısal örgütlenme düzeylerine sahiptir; Birincil, ikincil, üçüncül ve kuaterner (Vasudevan ve ark., 2011).

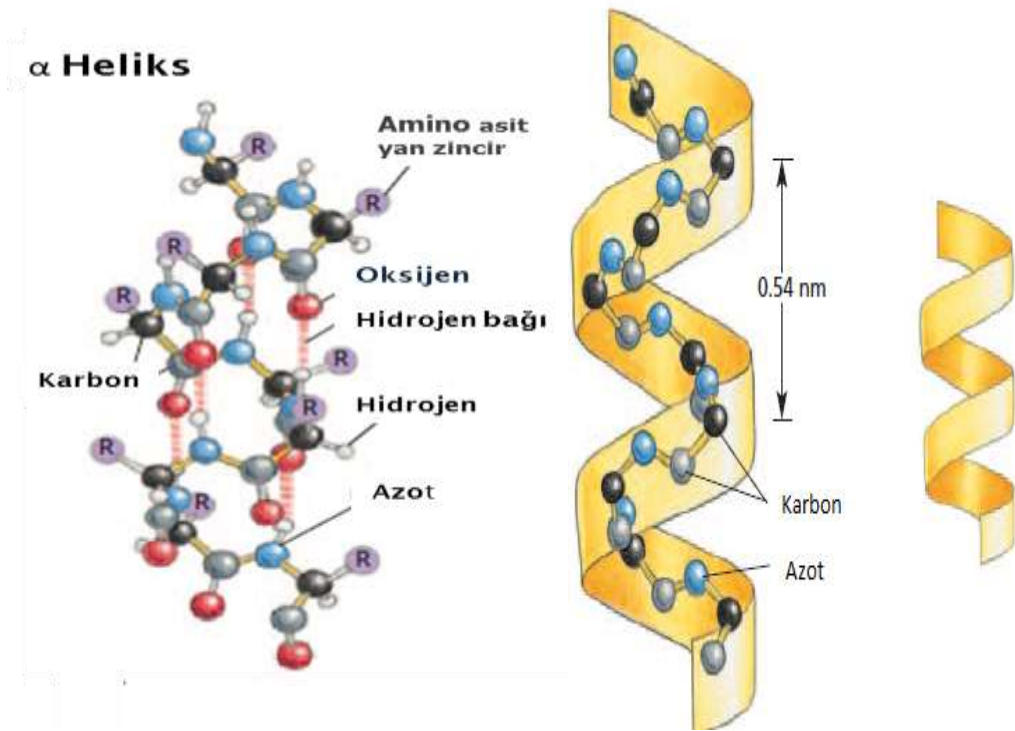
2.2.3.1. Birincil yapısı

Bir proteinin birincil yapısı peptit bağları ile bir arada tutulan amino asitin doğrusal dizilimidir. Birincil yapı alfa-karboksil ve alfa-amino grupları arasındaki rezonansa göre dengelenmiş düzlemsel bir yapıdır. Yan zincirler, peptit zincirinden dışarı uzanabilir ve birbirleriyle veya diğer moleküllerle etkileşime geçebilir (Pelley, 2012).

2.2.3.2. İkincil yapı

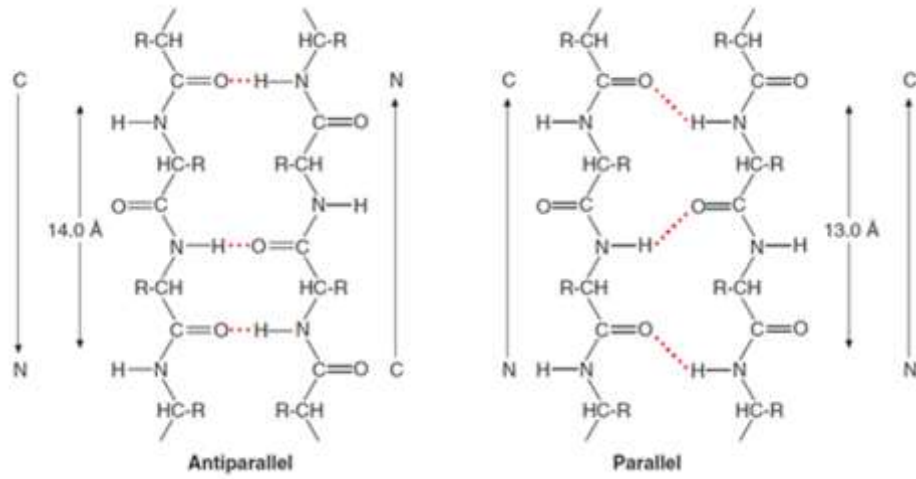
İkincil yapı, peptit bağları arasında hidrojen bağıyla sabitlenmiş düzenli bir yapıdır. En yaygın olarak görülen ikincil yapı türleri α -heliks ve β -sheettir (Beta kırmalı tabaka). Hem α -heliks hem de β -sheet polipeptitin iskelet yapısı içerisinde karbonil ve N-H grubu arasında lokalize olmuş hidrojen bağları ile stabilize olur.

α -heliks bir polipeptit zinciri sağ elle sarmal yapıya döndüğü zaman sert çubuğa benzer bir yapı oluşur. Her bir amino asidin N-H grubu, dört rezidü uzaktaki amino asit karbonil grubu arasında hidrojen bağları oluşturur. Sarmalın her dönüşünde 3,6 adet amino asit rezidü vardır ve dönüş başına karşılık gelen noktalar arasındaki mesafe 0.54 nm'dir (Şekil 2.11.). Amino asit R grupları sarmaldan dışarı doğru uzanır. Birkaç yapısal kısıtlama nedeniyle (yani, peptit bağlarının sertliği ve α ve β açılarındaki izin verilen sınırlar) bazı amino asitler sarmal oluşumunu teşvik etmezler. Örneğin, glisin'in R grubu (bir hidrojen atomu) çok küçük olduğundan, polipeptid zinciri çok esnek olabilir (McKee ve McKee, 2012).

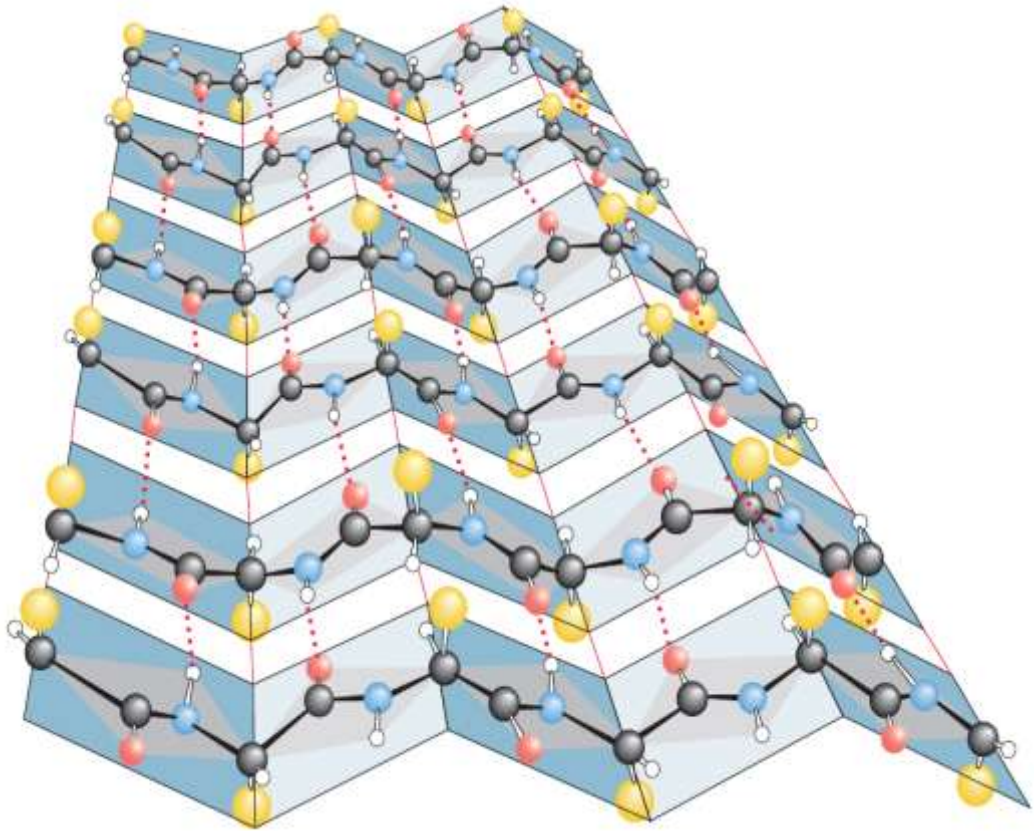


Şekil 2.11. α heliks yapısı (Alberts ve ark., 2014)

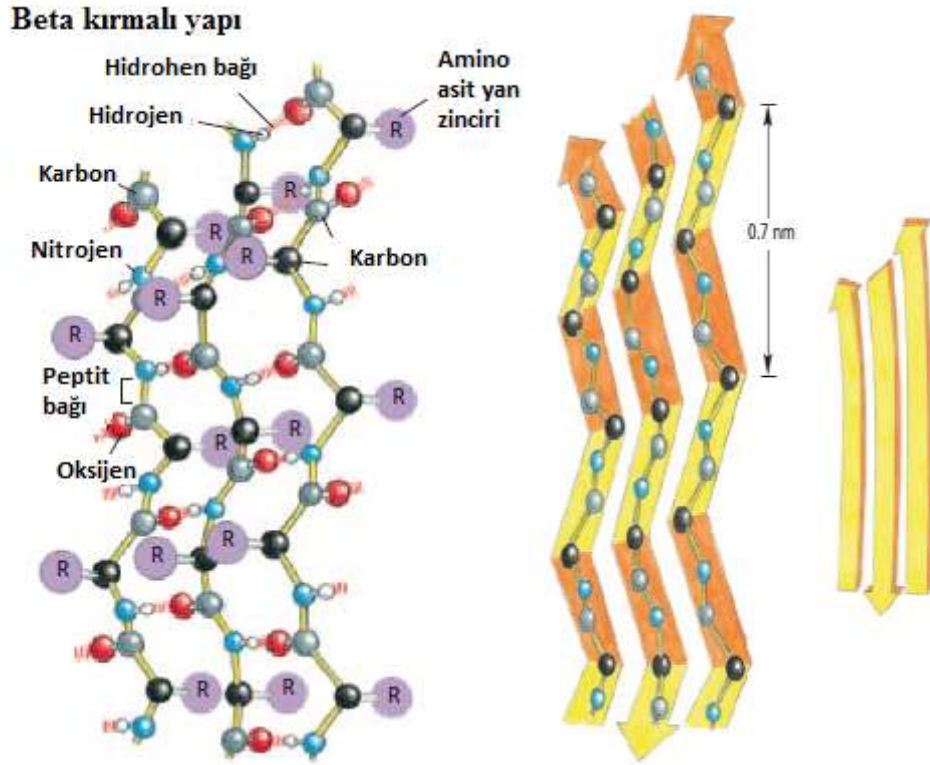
β -pleated sheets (Beta kırmalı tabaka) yapıda ise iki veya daha fazla polipeptit zinciri parçaları yanyana dizilirler. Herbir bireysel polipeptit zincir parçası β –strand olarak tanımlanır. Kıvrılmaktan ziyade her bir beta-strand uzatılmıştır. Beta kırmalı tabaka yan zincirlerin N-H gurubu ve karbonil grubu arasında oluşan hidrojen bağı tarafından stabilize olur. Beta kırmalı tabaka ya paraleldir ya da antiparaleldir. Paralel beta kırmalı tabakalarda polipeptit zincirlerindeki hidrojen bağları aynı yönde düzenlenir. Antiparalel zincirlerde ise bu bağlar zıt yönde düzenlenir. Ara sıra paralel-antiparalel beta kırmalı tabaka gözlenir. Şekil 2.12.'de beta kırmalı yapı gösterilmektedir.



Şekil 2.12. Beta kırmalı yapının iki formu ; paralel ve antiparalel. (McKee ve McKee, 2012) Hidrojen bağları noktalı çizgilerle gösterilir.



Şekil 2.13. Beta kırmalı yapının daha detaylı görünümü (McKee ve McKee, 2012)



Şekil 2.14. Beta kırmalı yapının detaylı görünümü (Alberts ve ark., 2014)

2.2.3.3. Üçüncül yapı

Tersiyer yapı, bir polipeptidin 3-D yapısındadır. Alfa sarmal ve beta yapraklar kompakt bir yapı oluşturacak şekilde katlanırlar. Spontan olarak oluşur ve hem yan zincir etkileşimleri hem de hücre dışı proteinlerde disülfür bağları tarafından stabilize edilir.

Çözünür proteinlerde hidrofobik yan zincirler bir proteinin iç kısmında bulunur. Suyu hidrojen bağları oluşturabilen hidrofilik amino asitler, çözünür proteinlerin yüzeyindedir. Herhangi bir fizyolojik koşul altında en kararlı yapı, bir proteinin doğal konformasyonu olarak adlandırılır (Pelley, 2012).

Doğal konformasyonu hidrofobik bağlar, elektrostatik bağlar ve van der Waals kuvvetleri gibi kovalent olmayan etkileşimler ile muhafaza edilir (Vasudevan ve ark., 2011).

2.2.3.4. Kuarterner yapı

Kuvaterner yapı bir proteinin altbirim bileşimine karşılık gelir. Birçok protein, birden fazla polipeptit alt birimine sahiptir. Çoklu altbirim proteini bir multimer olarak ifade edilir. Multimerik proteinler iki ila yüzlerce altbirime sahip olabilirler.

Sadece birkaç altbirime sahip bir multimer, genellikle oligomer (oligo= birkaç, mer (vücut)) olarak adlandırılır. Eğer bir multimer, belirli sayıda özdeş olmayan altbirimden oluşuyorsa, proteinin genel yapısı asimetrik ve oldukça karmaşık olabilir.

En yaygın alt birim sayısı 2 (dimer) veya 4 (tetramer), ancak trimerler, pentamerler ve heksadekamerler ve yüksek mertebeden yapılar da oluşur. Kuvaterner yapı, polipeptit altbirimlerindeki tamamlayıcı yüzey hidrofobik ve hidrofilik bölgeler arasındaki kovalent bağlarla birarada tutulur (Nelson ve Cox, 2012; McLaughlin ve Dryer, 2000).

2.2.4. Proteinlerin karakterizasyonunda kullanılan analitik yöntemler

2.2.4.1. Kromatografi

Başlangıçta şekerler ve amino asitler gibi düşük molekül ağırlıklı maddeleri ayırmak için tasarlanmış olan kromatografi, protein saflaştırmada paha biçilmez bir araç haline gelmiştir.

Protein karışımlarını boyut, şekil ve ağırlık gibi moleküler özelliklere veya bazı bağlanma afinitelerine göre ayırmak için çok çeşitli kromatografik teknikler kullanılır.

Tüm kromatografik yöntemlerde protein karışımı, hareketli faz olarak bilinen bir sıvı içinde çözülür. Protein molekülleri durağan fazdan (katı bir matris) geçerken birbirlerinden ayrılırlar çünkü iki faz arasında farklı şekilde dağıtılırlar. Her bir

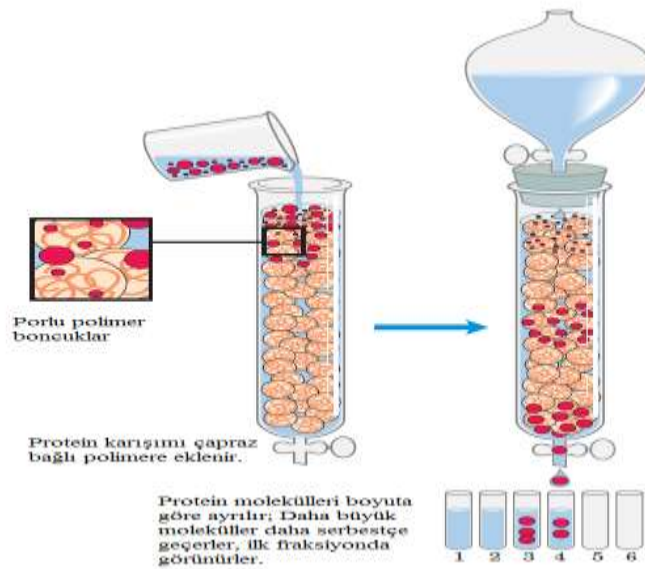
molekülün görelî hareketi, hareketli fazın akmaya devam ettiği sürece durağan faz ile bağlantılı kalma kapasitesinden kaynaklanmaktadır.

Protein saflaştırmasında yaygın olarak kullanılan üç kromatografik yöntem jel filtreleme kromatografisi, jel elektroforez ve afinite kromatografisidir.

2.2.4.2. Jel-filtrasyon kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisinde sabit faz, moleküllerin boyutlarına göre ayrılması için deneyci tarafından seçilen gözenek boyutlarına sahip jelatinimsi bir polimerdir. Numune, kolonun tepesine uygulanır ve tamponla (mobil faz) elüe edilir.

Elüsyon ilerledikçe, daha büyük moleküller, küçük moleküller gibi gözeneklere girmediklerinden dolayı jel içerisinde daha hızlı ilerlerler. Fraksiyonlar toplanırsa, daha büyük moleküller ilk fraksiyonlarda ortaya çıkar ve küçük moleküller ise daha sonraki fraksiyonlarda gözlemlenir (Şekil 2.14.) (McKee ve McKee, 2012).

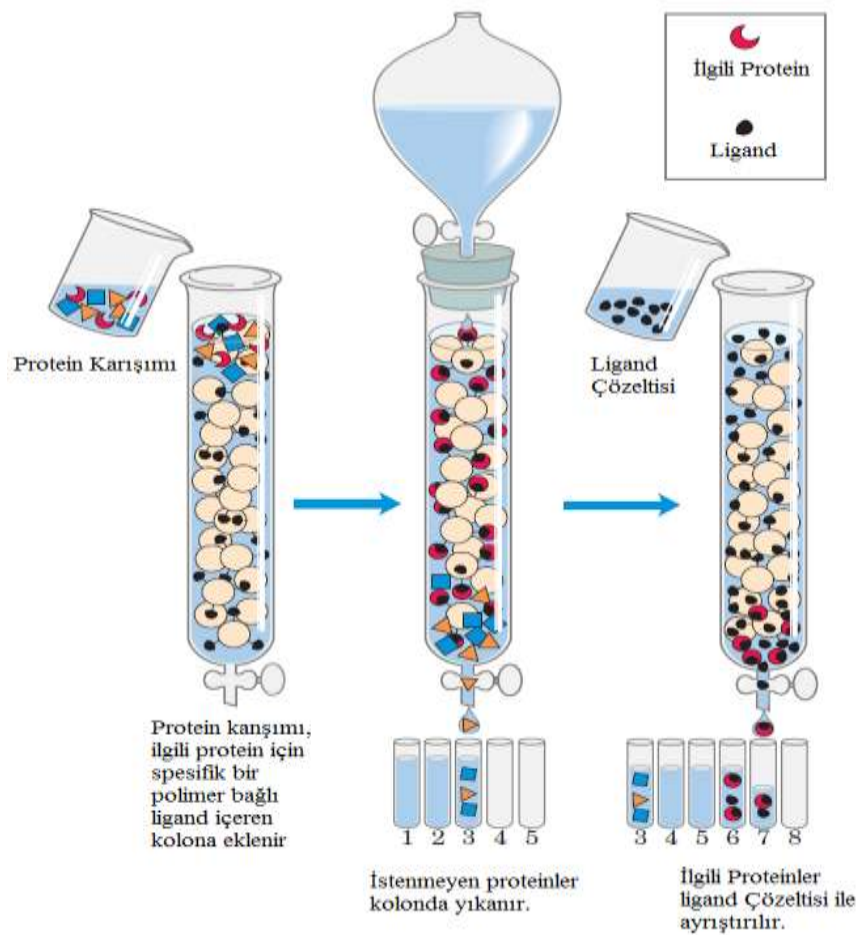


Şekil 2.15. Jel-Filtrasyon Kromatografisi (Nelson ve Cox, 2012)

2.2.4.3. Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisinde, proteinlerin eşsiz biyolojik özelliklerinden yararlanır. Bu teknikte protein ve özel bir molekül (ligant) arasında özel bir kovalent olmayan bağlanma afinitesi kullanılır.

Ligant, kovalent olarak bir kolona yerleştirilen çözünmeyen bir matrise bağlanır. Bağlayıcı olmayan protein molekülleri kolondan geçtikten sonra, ilgilenilen protein bağlanmayı etkileyen koşulları (yani pH veya tuz konsantrasyonu) değiştirerek kaldırılır (Şekil 2.15.) (McKee ve McKee, 2012).

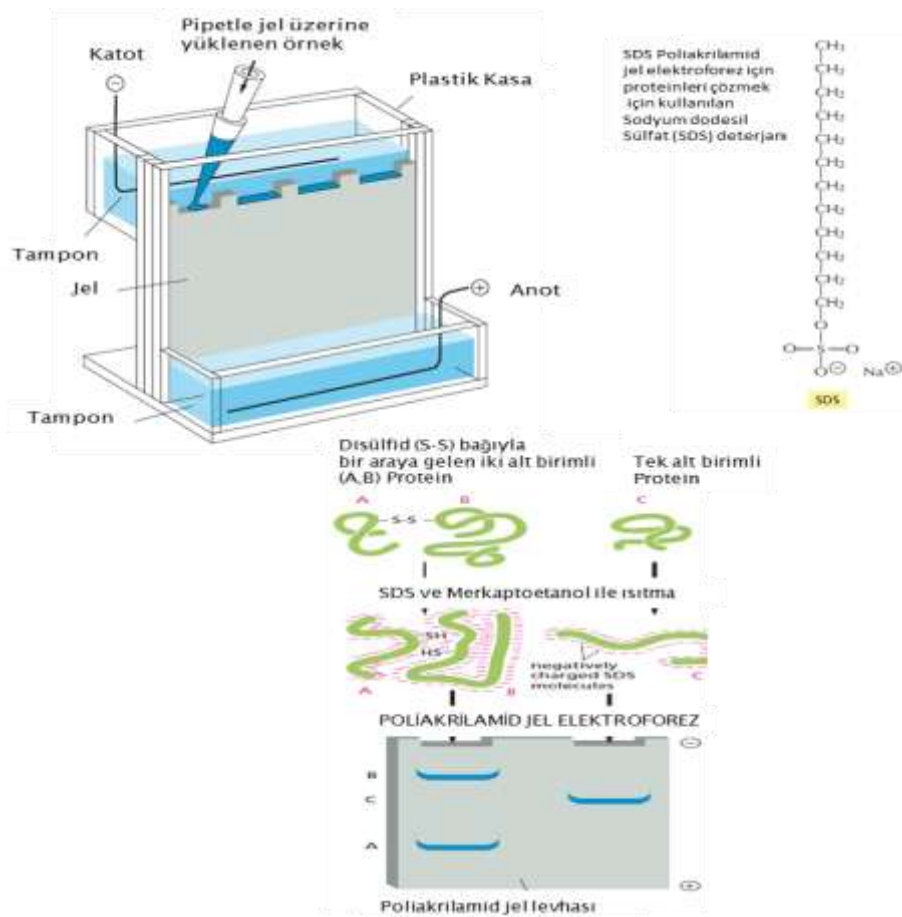


Şekil 2.16. Afinite kromatografisi (Nelson ve Cox, 2012)

2.2.4.4. Jel elektroforez

Protein molekülleri içeren bir çözeltiye bir elektrik alan uygulandığında, moleküller boyutlarını ve net yükünü yansıtan bir yönde hızla göç ederler. Bu, elektroforez tekniğinin temelini oluşturur. Jel elektroforez; SDS poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi olarak ayrılmaktadır.

SDS-PAGE; bireysel polipeptit zincirleri, negatif yüklü sodyum dodesil sülfat (SDS) moleküllerine sahip bir kompleks oluşturur ve bu nedenle, negatif yüklü SDS-protein kompleksleri gözenekli bir poliakrilamid jelin bir dökmesinden geçirilir (Alberts ve ark., 2014).

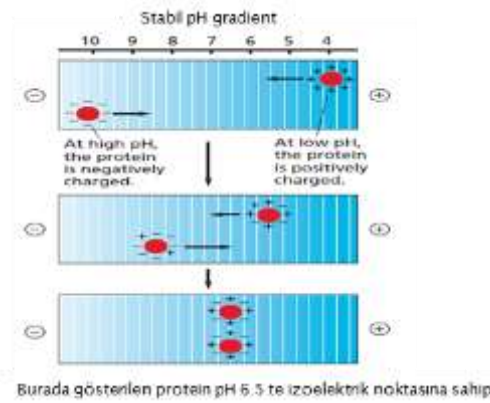


Şekil 2.17. SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) (Alberts ve ark., 2014)

Bu elektroforez tekniği için kullanılan cihaz yukarıda gösterilmektedir. İndirgeyici bir madde (merkaptoetanol) genellikle proteinlerin içindeki -S-S-bağlarını kırmak için eklenir. Bu koşullar altında, açılmış polipeptit zincirleri, molekül ağırlığını yansıtan bir oranda yer değiştirirler (Şekil 2.16.) (Alberts ve ark., 2014).

İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi ise kompleks protein karışımları bir boyutlu jellerde iyi çözümlenemez ve iki boyutlu protein haritasında 1000'den fazla proteini çözmek için kullanılabilir. İlk aşamada, doğal proteinler, izoelektrik odaklamayı kullanarak kendi iç yüklerine dayanarak dar bir jelde ayrılır. İkinci aşamada, bu jel, bir jel levhanın üzerine yerleştirilir ve proteinler, birinci aşamada kullanılan dikey bir yönde SDS-PAGE'ye tabi tutulur. Her protein ayrı bir nokta oluşturacak şekilde yer değiştirir. Jelde her nokta farklı bir polipeptit zincirine karşılık gelir. İsoelektrik noktalarına göre soldan sağa doğru ve molekül ağırlığına göre yukarıdan aşağıya doğru ayrılırlar (Alberts ve ark., 2014).

İsoelektrik odaklama, molekülün pozitif ve negatif yükünün sıfır olduğu, elektrik alanda molekülün hareket etmediği pH derecesidir. Proteinlerin net yükü olmadığından dolayı proteinler elektrik alanda hareket etmez. İsoelektrik odaklama işleminde, proteinler, özel bir tampon karışımı ile bir pH gradyanının oluşturulduğu poliakrilamid jelinin dar bir tüpünde elektroforezlenir. Her protein pH degradasyonunda, izoelektrik noktasına tekabül eden bir noktaya taşınır ve orada kalır (Şekil 2.17.) (Alberts ve ark., 2014).



Şekil 2.18. İsoelektrik odaklama (Alberts ve ark., 2014)

2.2.4.5. Kütle spektrometresi

Kütle spektrometresi (MS), proteinlerin kalitatif ve kantitatif analizleri ve genel olarak biyomoleküllerin çalışılması için yaygın olarak kullanılan bir analitik tekniktir.

Proteinleri hassas bir şekilde tanımlama, karakterize etme ve ölçme ihtiyacı ile giderek daha da karmaşık olan örneklerde geniş kapsamlı yeni kütle spektrometri tabanlı analitik platformlar ve deneysel stratejiler ortaya çıkmıştır (Domon ve Aebersold, 2006).

Proteomikte son zamanlarda kaydedilen ilerlemeler, MS'in düşük protein düzeylerini tespit etme ve karakterize etme yeteneğinin artmasını sağlamıştır.

MS temelli proteomik, femtomole duyarlılığın rutin olarak sağlandığından, sınırlı örnek materyalinin bulunduğu biyomedikal araştırmalarda giderek artan bir role sahiptir (Aebersold ve Mann, 2003).

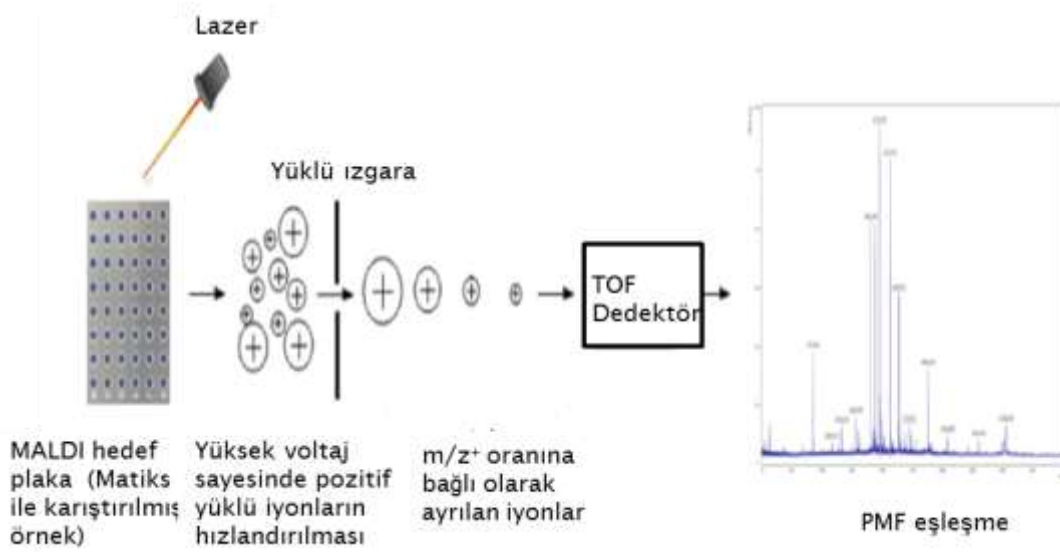
Son birkaç yılda MS tabanlı proteomik yaklaşımı, iletişim yollarını araştırmak için kullanışlı ve güçlü bir araç olmuştur. Bu yaklaşımlar, hücre, doku veya ortamda bulunan proteinlerin genel bir görünümünü; sinyal verme ve salgılama da dahil olmak üzere çok çeşitli proseslerle ilgili protein seviyesi değişikliklerinin ölçülmesini ve PTM'le bilgi alınmasını sağlamaktadır (Dudley, 2014).

Diğer kromatografik dedektörlere kıyasla, MS'in hassas ve yüksek oranda spesifik doğasından dolayı MS'in kromatografik tekniklerle birleştirilmesi her zaman istenmiştir (Pitt, 2009).

Genellikle proteomikte uygulanan kütle spektrometreleri matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu – uçuş süresi- uçuş süresi (MALDI-TOF-TOF) ve nano Sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi-kütle spektroskopisi (LC-MS /

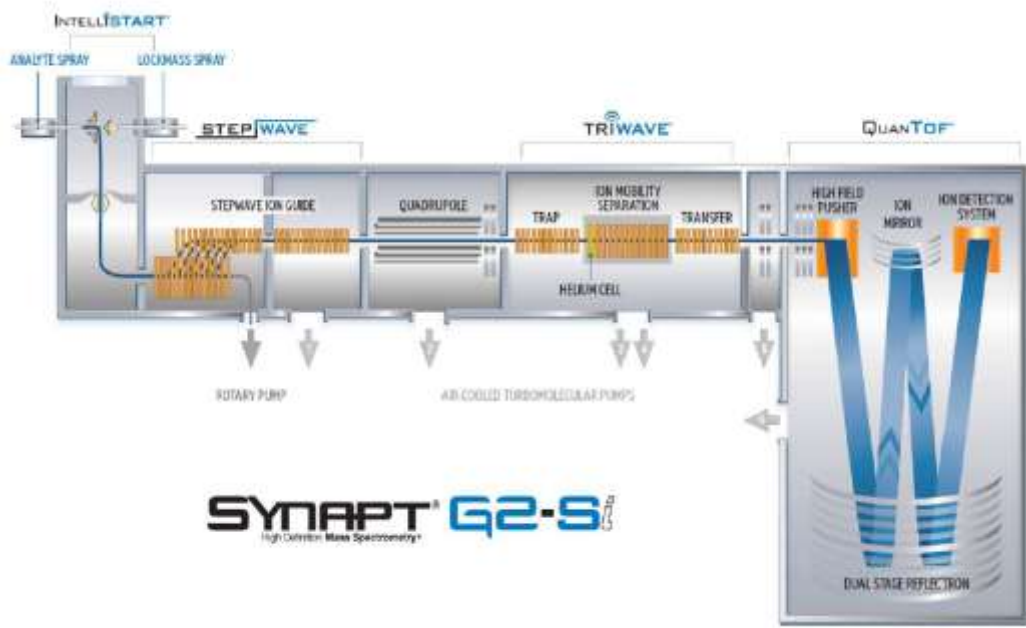
MS)'dir. MALDI-TOF-TOF'da, peptitler bir matrikse gömülür ve lazer darbelerine (ayrıca lazer atışları olarak adlandırılır) tabi tutulan bir hedef plakaya yüklenir.

Lazerden gelen enerji, peptid iyonlaşmasını ve desorpsiyonunu teşvik eder. İyonlar elektromanyetik alanla hızlandırılır ve m/z oranlarına göre ayrılan iyonlar TOF tüpüne doğru bir elektromanyetik alanla hızlandırılır. MALDI-TOF kütle spektroskopisine ait diagram Şekil 2.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.19. MALDI Kütle spektroskopisi (Dudley, 2014)

Tipik LC-MS sistemi, ara yüzey (iyonizasyon kaynağı) kullanılan HPLC ile MS kombinasyonudur. Numune LC ile ayrılır ve ayrılan numune türleri atmosferik basınç iyonu kaynağına püskürtülerek gaz fazındaki iyonlara dönüştürülür. Daha sonra kütle özümleyicisi, iyonları kütle yüklenme oranlarına göre sıralamak için kullanır ve dedektör, kütle analizöründen çıkan iyonları sayar ve her iyondan üretilen sinyali de yükseltebilir (Şekil 2.19.).



Şekil 2.20. WATERS SYNAPT G2 Si HDMS kütle spektrofotometrenin şeması (Ponthus ve Riches, 2013)

Sonuç olarak bu teknikte bir numunenin, parçacıkların ve moleküllerin kütlelerinin elemental orisotopik yapısını belirlemek için kullanılan kütle spektrumu (kütle / yük oranının bir fonksiyonu olarak iyon sinyalinin bir grafiği) oluşturulur ve moleküllerin kimyasal yapıları aydınlatılır (Subramani Parasuraman, 2014; Korfmacher, 2005).

Kompleks numunelerin analizi için entegre sıvı kromatografisi (LC) kütle spektroskopisi (MS) sistemleri tercih edilirken MALDI-MS normal olarak nispeten basit peptit karışımlarını analiz etmek için kullanılır (Aebersold ve Mann, 2003).

2.2.5. LC-MS-MS'in prostat kanseri tanısındaki uygulamaları

Pisitkun ve arkadaşları 2004 yılında insan idrarında eksozomların protein profilleri ve tanımlası ile ilgili çalışma yaptılar. Bir integral membran proteini olan aquaporin-2 (AQP2) ve diğer apikal plazma proteinlerin idrara nasıl geçtiği ile ilgili bir araştırma yapmışlardır. İmmünoelektron mikroskopi ve nanosprey sıvı kromatografisi-tandem MS teknikleri kullanarak üriner membran proteinleri, AQP2 ve diğer apikal plazma-membran proteinlerinin exosome oluşum süreci boyunca atıldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada LC-MS-MS analizleri ile 295 protein tespit

edilmiştir. Tespit edilen bu proteinlerden 21 tanesi, spesifik böbrek hastalıkları veya kan basıncı regülasyonunu ortaya koymuştur. Bu çalışma, hastalık biyolojik belirteç keşifini amaçlayan çalışmalarda üriner eksosomların başlangıç materyali olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır (Pisitkun ve ark., 2004).

Wei sun ve arkadaşları 2005 yılında 10 kDa dan daha düşük moleküllere sahip olan proteinleri çalıştılar. Bunun için sağlıklı erkek ve kadın gönüllülerden idrar örnekleri toplandı ve karıştırıldı. Üriner proteinler asetonla çöktürüldü, ayrıldı ve SDS-PAGE ve 1-D LC / MS / MS kombinasyonu, doğrudan 1-D LC / MS / MS ve 2-D LC / MS / MS teknikleri kullanılarak proteom profil analizleri yapıldı. On iki düşük moleküler kütle proteini tespit edildi. Çoğu idrar proteinlerinin 30 ila 60 kDa arasında bir moleküler kütle ve 4 ila 10 arasında bir pI'ye sahip olduğunu tespit ettiler (Sun ve ark., 2005).

Lnjie ve arkadaşları 2006 yılında N- bağlı glikoproteinlerin analizleri üzerine çalışmalar yaptı. Bu çalışmada sağlıklı erkek ve kadınlardan alınan idrar örnekleri kullanıldı. Lectin konanavalin A (Con A) 1, N-bağlı glikoproteinleri zenginleştirmek için kullanıldı. Zenginleştirilmiş glikoproteinler SDS-PAGE, LC-MS-MS ve 2D-LC-MS-MS ile analiz edilerek toplamda 225 tane idrar proteini tespit edildi. Tanımlanan bu proteinler arasında 94 tanesi, daha önceki çalışmalarda tespit edilmiş ve 150 tanesi de hastalıkla ilgisi olan glikoprotein olarak tespit edilmiştir. (Wang ve ark., 2006).

Richard ve arkadaşları 2008 yılında klinik olarak yararlı biyolojik belirteçlerin tespiti için üriner proteomun sorgulanması, protein ekstraksiyonu ve numune alma yöntemlerinin normalleştirilmesini gerektirdiğini, örnek toplama ve işleme yöntemlerinde çeşitliliklerin, niteliksel ve nicelik bakımından önemli tutarsızlıklara neden olabileceğini öne sürdüler. Sağlıklı yetişkin erkeklerden alınan idrar örneklerine liyofilizasyon, % 90 etanol ile çöktürme, Vivaspin 5 kDa mikro yoğunlaştırıcı ve ters faz yakalama kolonu tekniklerini uygulayarak bu tutarsızlıkları test ettiler. Burada, protein ekstraksiyonu yönteminin, oda sıcaklığında tutma

süresinin ve tekrarlayan dondurarak-eritme döngülerinin protein veya peptid düzeyinde üriner proteomu değiştirmediklerini tespit ettiler (Lee ve ark., 2008).

Qing Run Li ve arkadaşları 2010 yılında fosforilasyon karakterizasyonu üzerine çalışmalar yaptılar. 2010 yılına kadar idrar proteomiks çalışmalarında ön fraksiyonlama yapılmıştır. Bu çalışmalarda ön fraksiyonlama kullanmadan peptid fraksiyonu için kendi laboratuvarlarında geliştirdikleri ve entegre çok boyutlu sıvı kromatografisi (IMDL) ve Yin-yang çok boyutlu sıvı kromatografisi (MDLC) tandem kütle spektrometresi adını verdikleri iki teknik kullandılar. Bu iki tekniği doğrusal bir iyon tuzak-orbitrap (LTQ-Orbitrap) tekniği ile entegre ederek her iki teknikte 59 fosforilasyon bölümlerini içeren toplamda 1310 protein tanımladılar (Li ve ark., 2010).

Arivusudor ve arkadaşları 2011 yılında idrar numunelerinde bulunan proteinlerin geniş kapsamlı haritalanması üzerine çalışmalar yaptı. LC-MS-MS tekniğini kullanarak sağlıklı insan idrarında daha önce tanımlanmamış 671 proteinle beraber toplamda 1823 tane protein tespit ettiler. Bu veri seti, çeşitli hastalıklar için üriner biyolojik belirteçlerin tanımlanmasına yönelik gelecekteki çalışmalar için kapsamlı bir referans listesi olmuştur (Marimuthu ve ark., 2011).

Irene ve arkadaşları 2013 yılında, kanserli olmayan hücreleri etkileyebilecek proteinlerin tespiti ve yüksek riskli PCa hastalarını tanımlamak için idrar eksozomal proteinlerinin kullanılıp kullanılmayacağı üzerine araştırmalar yaptılar.

İdrar örnekleri ve hücre hatlarındaki eksozomları ultrasantrifüj tekniği ile izole ettiler. Proteinleri LC-MS-MS cihazı ile tanımladılar ve western blot tekniği ile valide ettiler. Exozomal ITGA3'ün inhibisyonunun, kanserli olmayan prostat epitelinin migrasyonunu ve istilasını azalttığını gözlemlediler. ITGA3 ve ITGB1 proteinleri, benign prostat hiperplazisi veya PCa'ya kıyasla, metastatik hastaların idrar eksozomlarında daha fazla bulunmuştur. Elde ettikleri bu veriler eksozomal ITGA3'ün ve ITGB1'in kanserli olmayan hücrelerin manipülasyonunda rol oynayabileceği ve idrar eksozomlarındaki ITGA3 ve ITGB1 ölçümlerinin, invaziv

olmayan bir şekilde metastatik PCa'lı hastaları tanımlama potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Bijnsdorp ve ark., 2013).

Haj-Ahmad ve arkadaşları 2014 yılında benign prostat hiperplazisi (BPH) arasında prostat kanseri (PCa) saptamak için üriner proteinlerin deregülasyonunun kullanılma potansiyelini araştırdılar. PCa'ya özgü protein işaretlerini tanımlamak için, PCa hastası, BPH hastası ve sağlıklı erkeklerden idrar numuneleri topladılar ve izole ettikleri proteinlerin ekspresyon profillerini LC-MS-MS cihazı kullanarak belirlediler. PCa hastaları arasında fibronektin ve TP53INP2'nin down-regülasyonu belirgin bir şekilde tespit edildi. PSA ile karşılaştırıldığında fibronektin mRNA'nın down-regülasyonunun ve fibronektin mRNA'nın PSA ya göre özgülüğünün % 50 oranında arttığı tespit edilmiştir. TP53INP2 proteini ise prostat kanserli hastaların % 75 inde tespit edildi. Fakat özgünlük % 7 olarak bulundu. Elde edilen sonuç, kantitatif gerçek-zaman-PCR (Gerçek-zaman Polimeraz zincir reaksiyonu) kullanılarak tüm hasta idrarlarında belirlenen proteinlerin relatif ekspresyon düzeyleri ile doğrulandı (Haj-Ahmad ve ark., 2014).

Andrej ve arkadaşları 2015 yılında BPH PCa arasında ayırım yapan yeni invaziv olmayan biyolojik belirteçleri keşfetmek ve doğrulamayı amaç edinmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda BPH ve PCa'lı hastalardan idrar örnekleri toplandı ve iTRAQ LC/LC/MS cihazı kullanılarak proteinler tanımlandı. ITRAQ ile üç protein, β 2M, PGA3 ve MUC3 benign prostat hiperplazisi (BPH) ile prostat kanseri (PCa) arasında ayırım yapan proteinler olarak anlamlı bulundu ve imünoblot analizleri ile elde edilen sonuçlar doğrulandı. Bu üç proteinin, BPH ve lokalize PCa arasında etkin bir şekilde ayırım sağlanması ve bu ikisi arasında yaşanan ikilemin noninvaziv olarak çözülmesinde klinik olarak yararlı olabileceği sonucuna varıldı (Jedinak ve ark., 2015).

Kazutoshi ve arkadaşları 2017 yılında kantitatif proteomik yoluyla idrardaki hücre dışı kesecikler (extracellular vesicles) içerisinde yüksek gleason skora (GS) sahip PCa için yeni bir biyobelirteç keşfetmeyi amaçladılar. Farklı GS'ye sahip olan hastalar gruplandırıldılar ve bu hastalardan toplanan idrarlardaki hücre dışı kesecikler

izole edildi. Hücre dışı keseciklere ait olan proteinler ITAQ ile etiketlendi ve LC-MS-MS ile analiz edildi. İdrardan izole edilen hücre dışı keseciklerden 4710 protein tanımlandılar ve 3528 proteinin miktar tayinini gerçekleştirdiler. Bulunan proteinler arasında 7 tane protein anlamlı olarak bulundu. Bu aday biyobelirteçler arasında, yağ asidi bağlama proteininin 5 (FABP5) kanser grubunda negatif gruba göre daha yüksek olduğu ve GS ile anlamlı derecede ilişkili olduğu tespit edildi (Fujita ve ark., 2017)

2.2.6. Prostat kanseri tanısı için belirlenmiş olan biyobelirteçler

Prostat kanserinde ilk biyobelirteç aramaları 1960'lı yıllarda başlamıştır. Hara ve arkadaşları, 1966 senesinde, seminal plazmada gamma-seminoprotein adını verdikleri bir protein izole etmişlerdir (Hara ve ark., 1971).

Richard J. Ablin 1970'li yıllarda normal, benign ve malign prostat dokularının antijenik yapısı ile ilgili çalışmalar yürütmüştür. Çalışmaların sonucunda insan prostat dokusuna özgü üç antijen bulunduğu, antijenlerden ikisinin prostatik doku ekstraktına spesifik olduğu, üçüncüsünün ise hem prostat dokusu hem de prostatik sıvıda görüldüğü tespit edildi. Prostat dokusuna özgün iki antijenden birisinin prostatik asit fosfataz olduğu, diğerinin ise daha detaylı bir şekilde karakterize edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Prostatik asit fosfatazdan farklı özellikteki bu antijeni tanımlarken “prostat spesifik antijen” tanımını kullanmışlardır (Ablin, 1972).

Papsidero ve arkadaşları 1980 yılında prostat antijenini prostat kanserli ve sağlıklı olan insanların serum örneklerinden roket immünoelektroforezi tekniği ile tespit etmişlerdir. Antikor afinite kromatografisi ve radyoimmünopresipitasyon teknikleri kullanılarak serumdaki antijeni saflaştırdılar (Papsidero ve ark., 1980).

Papsidero ve Kuriyama 1980 lerde prostat kanserli hastalarda PSA'nın arttığını buldular. PSA testi, prostat kanseri progresyonunu izlemek için 1986'da FDA tarafından onaylandı (Papsidero ve ark., 1980).

1994 yılında, FDA, prostat kanseri için asemptomatik erkekleri test etmek için bir parmakla rektal muayene (PRM) ile birlikte PSA testinin kullanımını onayladı (Filella ve Foj, 2016).

1997 yılında Mikolajczyk SD ve arkadaşları serbest PSA üzerine çalışmalar yaptı. Bu çalışma da, PCa serumunda saptanan serbest PSA'nın yapısını hidrofobik etkileşim kromatografisi-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HIC-HPLC) ve western blot analizi teknikleri kullanarak incelendi. PSA'nın bir kısmının PSA'nın inaktif bir prekürsörü (pPSA) olduğunu gösterdiler (Mikolajczyk ve ark., 1997).

1998 yılında serbest PSA prostat kanserinin tespiti için FDA tarafından onaylandı (Filella ve Foj, 2016).

1999 yılında Bussemakers ve arkadaşları Ters transkripsiyon-PCR analizi kullanarak PCA3 (DD3) geninin prostata spesifik olduğunu ve prostat kanser dokularında çok fazla ekspres edildiğini tespit ettiler (Bussemakers ve ark., 1999).

De Kok ve arkadaşları 2002 yılında Ters transkripsiyon-PCR analizi yaparak PCA3 geninin prostat tümör hücrelerinin saptanması için çok duyarlı ve spesifik bir belirteç olduğunu, PCA3 (DD3) ölçümleri, kan, idrar gibi vücut sıvılarında klinik uygulama için kullanılabileceğini tespit ettiler (de Kok ve ark., 2002).

2008 yılında Mitchell ve arkadaşları prostat kanserli hastaların kanında mikroRNA'ların varlığını transkripsiyon-PCR analizi ile tespit ettiler (Mitchell ve ark., 2008). 2012 yılında PCA3, prostat kanserinin tespitinde kullanılması için FDA tarafından onay aldı. 2012 yılında PHI, prostat kanserinin tespiti için kullanılmasında FDA tarafından onay aldı (Filella ve Foj, 2016).

2.2.7. İdrarda tespit edilen prostat kanseri biyobelirteç adayları

İdrarda tespit edilen prostat kanserine özgü belirteçler Tabla 2.5.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.5. İdrarda tespit edilen prostat kanseri biyobelirteç adayları (Jamaspishvili et al., 2010)

Sembol	Belirteçlerin açıklamaları	Referanslar
AMACR	α -Methylacyl coenzyme A racemase	(Chiou ve ark., 2003)
ANXA3	Annexin	(Schostak ve ark., 2009; Gerke ve ark., 2005; Kollermann ve ark., 2008; Pisitkun ve ark., 2004)
BHUAE ^a	Basic human urinary arginine amidase	(Matsuda ve ark., 1996)
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (alias survivin)	(Wang ve ark., 2004; Smith ve ark., 2001)
F3	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	(Lwaleed ve ark., 2000)
FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	(Chopin ve ark., 1993)
FN1	Bladder tumor fibronectin	(Sanchez-Carbayo ve ark., 2000)
MCM5	Minichromosome maintenance complex component 5	(Stoeber ve ark., 2002)
MMP9	Matrix metalloproteinases 9	(Moses ve ark., 1998; Roy ve ark., 2008; Chan ve ark., 2004)
PCA1 ^a	Prostate cancer antigen 1	(Edwards ve ark., 1982)
PIP ^a	Prostatic inhibin-like peptide	(Teni ve ark., 1989)
PSA	Urinary prostate specific antigen	(Irani ve ark., 2005)
S100A9	S100 calcium binding protein A9 (alias calgranulin B)	(Rehman ve ark., 2004)
SRD5A2	Steroid 5-alpha-reductase type 2	(Lombardo ve Hudson, 1997)
TF	Urinary transferring	(van Dieijen-Visser ve ark., 1988)
TMSB15A	Thymosin beta 15a	(Hutchinson ve ark., 2005)
VEGF	Vascular endothelial growth factor	(Miyake ve ark., 2005; Chan ve ark., 2004; Bok ve ark., 2001)

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

LC-MS-MS ile prostat kanserinde proteom profillerinin incelenmesi için analizde kullanılan araç ve gereçler Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Deneyde kullanılan araç ve gereçler

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodları
Santrifüj	Orto Alsera	Biocen 22R
Multi-Therm Shaker	Benchmark Scientific	H5000-HC
Vorteks	Benchmark Scientific	BV1000
Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Scientific	Fisher Q32866
SYNAPT G2-Si High Definition Mass Spectrometry	Waters	
nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column	ACQUITY Waters	UPLC,
nanoACQUITY UPLC BEH C18 Column	ACQUITY Waters	UPLC,
Ultrasonicator	Bandelin Sonarex	
Laminar Flow	ESCO	
-20 dolap	Thermo Scientific	
-80 dolap	Arctiko	
+4 dolap	Uğur	
Terazi	Ohaus Explorer	EX124-US
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Scientific	H400HSB
pH metre	Isolab	pH7110
Spin down santrifüj	Sprout	

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

LC-MS-MS ile prostat kanserinde proteom profillerinin incelenmesi için analizde kullanılan kimyasal materyel listesi Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Deneyde kullanılan kimyasal ve materyal listesi

Sarf Malzemesi	Firma	Katalog Numarası
FASP Protein Digestion Kit	EXPEDON	44250
UPX Universal Protein Extraction Kit	EXPEDON	44101
Proteolock Protease Inhibitor Cocktail	EXPEDON	42506
Eppendorf® epT.I.P.S. Reloads volume range 0.1-10 µL 960EA	THERMO	90057
Eppendorf® epT.I.P.S. Reloads Z640433 volume range 50-1000 µL 960EA	EPPENDORF	0030073363
Eppendorf® epT.I.P.S. Reloads volume range 2-200 µL 960 EA	EPPENDORF	0030073460
Acetonitrile Hypergrade For Liquid Chromatography Lichrosolv	EPPENDORF	0030073428
Water For Chromatography Lichrosolv	MERCK	1.00029.2500
Eppendorf® LoBind microcentrifuge tubes Protein, volume 1.5 mL 100EA	MERCK	1.15333.25
LC-Vial	Supelco	29413-U

3.3. Protein Analizleri

3.3.1. Örnek toplama

Prostat kanseri olan erkeklerden idrar numuneleri genel anestezi altında sonda ile alındı. Sağlıklı erkeklerden alınan 24 saatlik orta idrar steril bir falkona alındı. Toplanan numuneler hücre debrilerini uzaklaştırmak için 10 dakika boyunca 3300 devir/dakika'da santrifüjlendi. Supernatantlar; -80 °C'de muhafaza edildi. Numuneler

-80 °C deki buzdolabına kaldırma aşamasına kadar olan tüm aşamalarda +4 °C'de muhafaza edildi.

Örneklerin -80 °C'de muhafaza edilmesine kadar geçen süre 3 saatten fazla olmamasına dikkat edildi.

3.3.2. Örnek saklama

Weissinger ve ark. (Weissinger ve ark., 2007) birkaç yıl -20 °C'de saklanan idrar örneklerinde idrar proteomunda önemli bir değişiklik olmadığını bildirmiştir.

Klasen ve ark. (Klasen ve ark., 1999) albümin, transferrin, IgG, α 1-mikroglobülin ve β 2-mikroglobülin içeren idrar örneğinin içeriğinin -70 °C'de -20 °C'de olduğundan daha stabil olduğunu bildirmiştir.

Zerefos ve Vlahou (Zerefos ve Vlahou, 2008) 4 °C'de 24 saatlik bir depolama süresince protein profilinde zaman zaman meydana gelen değişikliklerin gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Böylece, +4 °C'de daha kısa depolama süresi (6 saate kadar) olabilir.

Bu nedenle, elde edilen bulgulara göre, proteinlerin ve polipeptitlerin idrar örneklerinde oldukça dengeli olduğu sonucuna varılabilir. Stabilité, idrar boşaltma öncesi mesanedeki saklama süresinin, proteolitik bozunmanın endojen proteazlar tarafından tamamlanması için yeterli olması gerçeğine bağlı olabilir.

Bununla birlikte, idrardaki eksozomların kararlılık süresi daha kısadır. Zhou ve ark. (Zhou ve ark., 2006) -20 °C'de depolamanın üriner eksozomla ilişkili proteinlerin büyük bir kayba (% 72,6) uğradığını bildirmişken, -80 °C'de saklamada az bir kayıp (% 14) gözlemlenmiştir.

Bu nedenle, sınırlı bir süre için, idrar +4 °C'de saklanabilir ve nispeten uzun bir saklama süresi -80 °C'de dondurmak en iyisidir (Wu ve ark., 2010).

3.3.3. Örnek hazırlama

İdrar numuneleri steril bir falkon içerisine alınıp +4 °C de buz banyosu üzerine alındı. Örnekler %1 proteaz inhibitör kokteyli (PIC) ilave edilip çok kısa bir zaman içerisinde 5720 devir/dakika'da 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilip supernatant yeni bir 50 mL'lik steril polipropilen falkonlara transfer edilmiştir. Örnekler analiz edilene kadar -80 °C'de buzdolabına konulup burada saklanmıştır. Örneklerin transfer aşamalarında geçen süreye mümkün olduğunca dikkat edilmiştir.

3.3.4. İdrardan protein eldesi

3.3.4.1. Aseton presipitasyonu

15 mL aseton polipropilen falkon içerisinde -80 °C'de 1 gün boyunca bekletildi. Numuneler örnek hacminin beş katı olacak şekilde aseton ile karıştırılarak -80 °C'ye kaldırılıp bir saat boyunca inkübe edildi. Numuneler her 15 dakikada bir buz üzerinde tutularak vortekslendi. Numuneler 12790 devir/dakika'da 10 dakika süresince +4 °C'de santrifüj yapılarak üst fazları pipet ucu ile dikkatli bir şekilde alındı. Aseton ile üç defa yıkama işlemi yapıldıktan sonra üst faz tekrar pipet ucu ile alınıp geriye kalan üst fazın tamamen uçması için oda sıcaklığında bir müddet bekletildi. Tüm bu aşamalar boyunca örneklerin tamamen kurumamasına dikkat edildi. Örnekler amonyum bikarbonat çözeltisinde çözülerek kısa bir süre pipetaj yapıldı.

150 µL örnekler %4 SDC, 0,1 M DTT, 1 M amonyum bikarbonat içeren 1450 µL liziz tamponu ile karıştırıldı. Karışım 1 saat boyunca 350 devir/dakika'da 55 °C'de Termal çalkalayıcı cihazı kullanılarak inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra Filtre yardımcı örnek hazırlama (FASP) protokolü aşamasına geçilmiştir.

3.3.5. Protein konsantrasyon tayini

FASP protokolüne başlamadan önce FASP metodunda kullanılacak yeterli örnek miktarının belirlenebilmesi için protein konsantrasyonu tayini yapıldı. Qubit 2,0 fluorometre cihazı protokole uygun olarak kullanıldı.

Cihaz standartlarının ve numunelerin hazırlanması için karışım çözeltisi ve standart çözeltiler hazırlandı.

Karışım çözeltileri, kit içerisinde bulunan tampon çözeltisi ile floresans özelliği olan boya ile numune başına ; 199 μL tampon çözelti ve + 1 μL floresans boya olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

Standartlı çözeltiler, kit içerisinde 0 ng/ μL , 200 ng/ μL , ve 400 ng/ μL Sodyum azid içeren üç adet standart kullanarak aşağıda tarif edildiği şekilde hazırlanmıştır.

Standart 1 : 0 ng/ μL 10 μL standard + 190 μL karışım solüsyonu

Standart 2 : 200 ng/ μL : 10 μL standard + 190 μL karışım solüsyonu

Standart 3 : 400ng/ μL : 10 μL standard + 190 μL karışım solüsyonu şeklinde hazırlandı.

Numune çözeltilerinin hazırlanması, 2 μL numune çözeltisi 198 μL karışım solüsyonu ile karıştırılarak hazırlandı.

Numune ve standart karışımları oda şartlarında 15 dk süresince karanlıkta inkübe edildi.

Bu belirtilen üç standart cihazda okutularak cihaz kalibrasyonu yapılmıştır. Cihaz kalibrasyonu tamamlandıktan sonra örneklerin protein konsantrasyon ölçümleri alınarak her bir örnekten gerekli olan 50 μg protein hesaplanarak FASP aşamasının ilk aşaması gerçekleştirilmiş oldu.

Triptik peptid eldesi için FASP kiti protokole uygun olarak kullanıldı. FASP kiti içinde bulunan filtrelili tüplere protein miktar tayini yapılmış olan her bir örnekten 50 µg protein içeren çözelti ve üzerlerine 200 µL amonyum bikarbonat içinde çözülmüş üre eklendi. 12350 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi. Filtre üzerine 200 µL üre eklenerek tekrar 12350 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi. 10x iyodoasetamid (IAA) solüsyonu üre ile 1x olacak şekilde seyreltilerek filtre üzerine eklendi. Örnekler vorteks ile karıştırıldıktan sonra karanlıkta 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 15 dakika 12350 devir/dakika'da santrifüj edildi. İşlem iki defa tekrarlandı. Bu yıkamalar sonucu filtre çıkarılarak tüpte biriken çözelti atıldı. 100 µL 50 mM AmBic solüsyonu eklenerek 12350 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edildi. Bu aşama 2 defa tekrarlandıktan sonra 1 µg / 75 µL olacak şekilde tripsin enzimi eklendi. Tüpler gece boyu 18 saat süresince 37 °C'de inkübe edildi. Filtre altındaki tüpler değiştirilip filtre üzerine 40 ul 50mM AmBic eklenerek 12350 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem tekrarlandıktan sonra 50 µL 0,5M NaCl çözeltisi eklenerek 10 dakika 12350 devir/dakika'da santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki triptik peptidler LoBind tüplere alınarak liyofilize edildi. Liyofilizasyon sonrası örnekler 20 µL 0,1 formik asit çözeltisinde çözüldü ve ikinci kez Qubit cihazı ile konsantrasyon tayini yapıldı.

3.3.6. Sıvı kromatografisi – kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizleri

Her bir deneysel grup için 200 ng'lık triptik peptit olacak şekilde örnekler % 0,1 formik asit ile tamamlanarak LC viallere konuldu . LC viallerindeki karışımdan sisteme 2 µL enjekte edilerek LC-MS/MS system (nanoACQUITY ultra pressure liquid chromatography (UPLC) ve SYNAPT high definition mass spectrometer (Waters) cihazları ile analiz edildi. Analitik kolon (BEH C18, 1,7 µm, 75 µm i.d. × 250 mm) (Waters) % 97'lik mobil faz A (% 0,1 formik asit içeren yüksek saflıkta su) ile dengeye getirildi. Kolon sıcaklığı 55 °C ye ayarlandı. Peptitler % 99 lik mobil faz A (% 0,1 formik asit içeren yüksek saflıkta su) ile trap kolonda (Symmetry C18 5 µm, 180 µm i.d. × 20 mm) (Waters) alıkonulduktan sonra analitik kolonda (BEH C18, 1,7 µm, 75 µm i.d. × 250 mm) (Waters) mobil faz B (% 0,1 formik asit içeren

yüksek saflıkta asetonitril) ile %3 den % 40 a kadar değişen doğrusal bir gradient ile 400 nL/dk akış hızında peptitler elüe edildi.

Veri bağımsız edinim yöntemi (Data independent acquisition mode (HDMSE)) , pozitif iyon V modu, MS ve MS/MS fonksiyonları (0,7 saniye aralıklar ile 2V düşük enerji ve 15-40 V yüksek enerji) kullanılarak peptit kütle/elektriksel yük (mass/charge; m/z) değerleri ve ürün iyon bilgisi elde edildi. Glu-fibrinopeptit (iç kütle kalibrantı) 500 nL/dk hız oranı ile enjekte edildi. m/z değeri 50-1900 olarak analiz edildi.

3.3.7. Biyoinformatik analiz

3.3.7.1. Progenesis QI

Progenesis QI, örnekler içerisindeki proteinleri tanımlayan ve kantifiye eden yeni nesil LC-MS veri analiz yazılımıdır. Data analizi için LC-MS-MS'den alınan işlenmemiş data programa yüklendi, insan veri tabanı kullanıldı. Veri tabanı sorgulama için beş adet Modifikasyon (Carbamidomethyl-cysteine modifikasyon, Acetyl N-TERM, Deamidation N, Deamidation Q ve Methionine Oxidation modifikasyonları), her bir peptit için en az 3 tane fragman, her bir protein için en az yedi tane fragman ve her bir protein için en az üç tane peptiden tanımlanacak şekilde ayarlandı.. Örnekler arasındaki normalizasyon toplam iyon yoğunlu baz alınarak hesaplandı. Aynı proteinler gruplandı ve en yüksek skora sahip bir örnek için kantitatif değerler en yüksek skora sahip bir örnek için verildi.

3.3.7.2. STRING

HücreSEL fonksiyonun sistemsEL olarak nasıl çalıştığının anlaşılması proteinler arasındaki tüm fonksiyonel etkileşimlerin bilgisini gerektirir. STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) bilinen ve tahmin edilen protein-protein etkileşimlerinin biyolojik bir veritabanı ve web kaynağıdır. STRING

veritabanı, deneysel veriler, hesaplamalı tahmin yöntemleri dahil olmak üzere çok sayıda kaynaktan bilgi içerir. Serbestçe erişilebilir

(https://stringdb.org/cgi/input.pl?sessionId=DeZk8LgYrGSJ&input_page_show_search=on). Anlamalı 124 proteinin erişim numaraları ve insan organizması girilerek tarama yapıldı.

3.3.7.3. Ingenuity pathway analysis (IPA)

IPA omiks deneylerinden elde edilen dataların yorumlanması için kullanılan IPA, web tabanlı bir yazılım uygulamasıdır. Progenesis QI for Proteomics analizi sonucu elde ettiğimiz proteinlerin IPA yazılımı ile hangi hastalıklar ile ilişkili olduğu IPA yazılımı ile belirlendi. Bunun için Progenesis QI for Proteomics yazılımı ile elde ettiğimiz anlamalı 124 proteinin erişim numaraları, p değerleri, ekspresyon değişim oranları girildi, insan organizması seçildi ve analiz yapıldı.

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

FASP protoküne başlamadan önce FASP metodunda kullanılacak yeterli örnek miktarının belirlenmesi için ölçülen protein konsantrasyonları ve LC-MS-MS cihazına verilmeden önce triptik peptitlerin 100 ng/ μ L'lik konsantrasyona ayaralanabilmesi için yapılan konsantrasyon tayinleri Tablo 4.1.'de verilmiştir. Qubit 2,0 flurometre cihazı protokole uygun olarak kullanıldı.

Tablo 4.1. LC-MS-MS analiz sonucunda elde edilen proteinler

Örnekler	Liyofilizasyon öncesi Qubit 2,0 spektrometre ile ölçülen protein konsantrasyonları (μ g/ mL)	Liyofilizasyon sonrası Qubit 2,0 spektrometre ile ölçülen triptik peptid konsantrasyonları (μ g/ mL)
Prostat Kanseri_1	2030	796
Prostat Kanseri_2	1930	807
Prostat Kanseri_3	1930	766
Kontrol_1	2350	679
Kontrol_2	1910	854
Kontrol_3	1820	799

4.1. LC-MS-MS ile Göreceli Protein Analizleri

Prostat kanserli ve sağlıklı hastalardan ve sağlıklı erkeklerden elde edilen idrar numunelerinden elde edilen saflaştırılmış proteinlerin LC-MS-MS analiz sonucunda elde edilen işlenmemiş veri Progenesis QI programı ile prostat kanseri olan hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. $P < 0.05$ olan up-regüle (Kontrol örneğine göre ekspresyonun artması) ve down-regüle (Kontrol örneğine göre ekspresyonun azalması) olmuş 124 anlamlı protein bulundu. Tespit edilen proteinler Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. LC-MS-MS analiz sonucunda elde edilen proteinler

Erişim Numarası	Gene	Protein	upregülasyon/down regülasyon
P02768	ALB	Serum albumin	up-regülasyon
P07911	UMOD	Uromodulin	down-regülasyon
P02788	LTF	Lactotransferrin	up-regülasyon
P02760	AMBP	Protein AMBP	down-regülasyon
P25311	AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein	down-regülasyon
P69905	HBA1	Hemoglobin subunit alpha	up-regülasyon
P04264	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	up-regülasyon
P01009	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin	up-regülasyon
P01133	EGF	Pro-epidermal growth factor	down-regülasyon
P04745	AMY1A	Alpha-amylase 1	down-regülasyon
P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	up-regülasyon
Q12907	LMAN2	Vesicular integral-membrane protein VIP36	down-regülasyon
P01834	IGKC	Ig kappa chain C region (Immunoglobulin kappa constant)	up-regülasyon
P26842	CD14	Monocyte differentiation antigen CD14	down-regülasyon
P02750	LRG1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	down-regülasyon
P05090	APOD	Apolipoprotein D	down-regülasyon
P06396	GSN	Gelsolin	down-regülasyon
P54802	PE	Alpha-N-acetylglucosaminidase	down-regülasyon

Tablo 4.2. (Devamı).

P41222	PTGDS	Prostaglandin-H2 D-isomerase	up-regülasyon
P01011	SERPINA3	Alpha-1-antichymotrypsin	down-regülasyon
O00187	MASP2	Mannan-binding lectin serine protease 2	down-regülasyon
P63267	ACTG2	Actin, gamma-enteric smooth muscle	down-regülasyon
C9JV77	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	down-regülasyon
P01871	IGHM	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3	down-regülasyon
P07602	PSAP	Prosaposin	down-regülasyon
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	down-regülasyon
A0A087X2C0	IGHM	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=1	down-regülasyon
P05451	REG1A	Lithostathine-1-alpha	down-regülasyon
P07339	CTSD	Cathepsin D	down-regülasyon
A0A087WYJ9	IGHM	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=1	down-regülasyon
P00749	PLAU	Urokinase-type plasminogen activator	down-regülasyon
P01023	A2M	Alpha-2-macroglobulin	up-regülasyon
Q12805	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	down-regülasyon
O95678	KRT75	Keratin, type II cytoskeletal 75	up-regülasyon
P07998	RNASE1	Ribonuclease pancreatic	down-regülasyon

Tablo 4.2. (Devamı).

P00915	CA1	Carbonic anhydrase 1	up-regülasyon
P11117	ACP2	Lysosomal acid phosphatase	down-regülasyon
P13987	CD59	CD59 glycoprotein	down-regülasyon
P08294	SOD3	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	down-regülasyon
Q7Z794	KRT77	Keratin, type II cytoskeletal 1b	up-regülasyon
P06870	KLK1	Kallikrein-1	down-regülasyon
Q6UX06	OLFM4	Olfactomedin-4	down-regülasyon
A0A075B6K8	IGLC1	Ig lambda-1 chain C regions (Fragment)	down-regülasyon
P05787	KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8	up-regülasyon
P24855	DNASE1	Deoxyribonuclease-1	down-regülasyon
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PE=1 SV=5	up-regülasyon
O75594	PGLYRP1	Peptidoglycan recognition protein 1	down-regülasyon
P0DJJ8	PGA3	Pepsin A-3 OS=Homo sapiens GN= PE=1 SV=1	up-regülasyon
P08174	CD55	Complement decay-accelerating factor	down-regülasyon
A0A0C4DGZ9	TPP1	Tripeptidyl-peptidase 1	down-regülasyon
P12035	KRT3	Keratin, type II cytoskeletal 3	up-regülasyon
P14618	PKM	Pyruvate kinase PKM	up-regülasyon
O95336	PGLS	6-phosphogluconolactonase	down-regülasyon
P01625	IGKV3-20	Ig kappa chain V-IV region (Immunoglobulin kappa variable 3-20)	down-regülasyon

Tablo 4.2. (Devamı).

P02671	FGA	Fibrinogen alpha chain	down-regülasyon
P09603	CSF1	Macrophage colony-stimulating factor 1	down-regülasyon
Q01546	KRT76	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	up-regülasyon
Q96FE7	PIK3IP1	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1	down-regülasyon
P60174	TPI1	Triosephosphate isomerase	up-regülasyon
Q02487	DSC2	Desmocollin-2	down-regülasyon
P01620	IGKV3-20	Ig kappa chain V-III region SIE (Immunoglobulin kappa variable 3-20)	down-regülasyon
P62805	HIST1H4A	Histone H4	up-regülasyon
O94919	ENDOD1	Endonuclease domain-containing 1 protein	down-regülasyon
Q8WVN6	SECTM1	Secreted and transmembrane protein 1	down-regülasyon
P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	up-regülasyon
P02008	HBZ	Hemoglobin subunit zeta	up-regülasyon
P18065	IGFBP2	Insulin-like growth factor-binding protein 2	down-regülasyon
Q99878	HIST1H2AJ	Histone H2A type 1-J	up-regülasyon
Q6UXB8	PI16	Peptidase inhibitor 16	down-regülasyon
B2R4S9	HIST1H2BF	Histone H2B	up-regülasyon
P26842	CD27	CD27 antigen	down-regülasyon

Tablo 4.2. (Devamı).

Q03403	TFF2	Trefoil factor 2	down-regülasyon
Q6GTX8	LAIR1	Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	down-regülasyon
P05783	KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18	up-regülasyon
O95865	DDAH2	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	down-regülasyon
E9PHK0	CLEC3B	Tetranectin	down-regülasyon
	CDH11	Cadherin-11	down-regülasyon
Q5T123	SH3BGRL3	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	down-regülasyon
Q9Y5Y7	LYVE1	Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1	down-regülasyon
Q9BYX7	POTEKP	Putative beta-actin-like protein 3	up-regülasyon
Q5TCP6	HMCN1	Hemicentin-1 (Fragment)	down-regülasyon
O43653	PSCA	Prostate stem cell antigen	down-regülasyon
P01779	IGHV3-23	Ig heavy chain V-III region TUR (Immunoglobulin heavy variable 3-23)	down-regülasyon
P14384	CPM	Carboxypeptidase M	down-regülasyon
O96009	NAPSA	Napsin-A	down-regülasyon
Q15828	CST6	Cystatin-M	down-regülasyon

Tablo 4.2. (Devamı).

P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1 (HSP27)	up-regülasyon
P07737	PFN1	Profilin-1	up-regülasyon
P17752	TPH1	Tryptophan 5-hydroxylase 1	down-regülasyon
P55000	SLURP1	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1	down-regülasyon
E9PK25	CFL1	Cofilin-1	down-regülasyon
P00918	CA2	Carbonic anhydrase 2	up-regülasyon
P07355	ANXA2	Annexin A2	up-regülasyon
P02652	APOA2	Apolipoprotein A-II	up-regülasyon
Q00796	SORD	Sorbitol dehydrogenase	up-regülasyon
P07858	CTSB	Cathepsin B	down-regülasyon
E9PNQ8	THY1	Thy-1 membrane glycoprotein (Fragment)	down-regülasyon
O75144	ICOSLG	ICOS ligand OS=Homo sapiens GN=PE=1 SV=2	down-regülasyon
Q92618	ZNF516	Zinc finger protein 516 OS=Homo sapiens GN=PE=1 SV=1	down-regülasyon
Q12931	TRAP1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	up-regülasyon
O76013	KRT36	Keratin, type I cuticular Ha6 OS=Homo sapiens GN= PE=2 SV=1	up-regülasyon
P98172	EFNB1	Ephrin-B1	down-regülasyon
J3QQR8	ICAM2	Intercellular adhesion molecule 2 (Fragment)	up-regülasyon

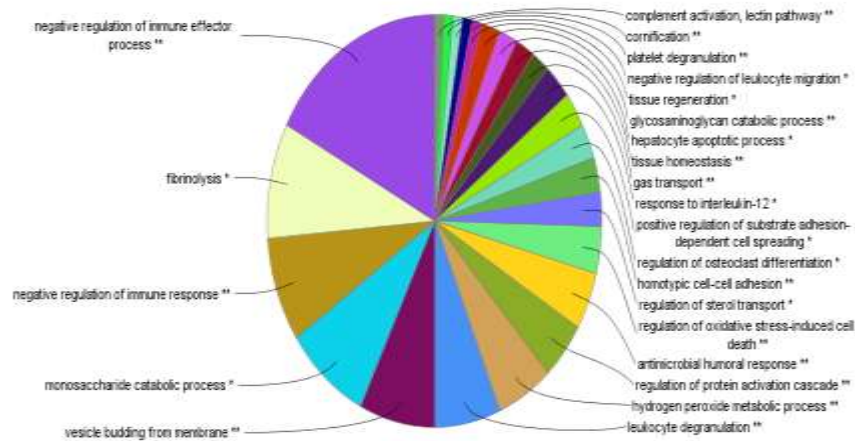
Tablo 4.2. (Devamı).

Q9UIB8	CD84	SLAM family member 5		down-regülasyon
A0A075B7B8	IGHV3OR16-12	Protein (Fragment)	IGHV3OR16-12	down-regülasyon
P01764	IGHV3-23	Ig heavy chain V-III region 23		down-regülasyon
Q6UXG3	CD300LG	CMRF35-like molecule 9		down-regülasyon
Q9GZX9	TWSG1	Twisted gastrulation homolog 1	protein	down-regülasyon
K7EK07	H3F3B	Histone H3 (Fragment)		up-regülasyon
G3V479	CALM1	Calmodulin		down-regülasyon
P15328	FOLR1	Folate receptor alpha		down-regülasyon
Q9UGN4	CD300A	CMRF35-like molecule 8		down-regülasyon
P13727	PRG2	Bone marrow proteoglycan		down-regülasyon
Q13268	DHRS2	Dehydrogenase/reductase family member 2, mitochondrial	SDR	down-regülasyon
M0QYW4	KLK11	Kallikrein-11 (Fragment)		up-regülasyon
P16591	FER	Tyrosine-protein kinase Fer		down-regülasyon
Q9H977	WDR54	WD repeat-containing protein 54		down-regülasyon
Q5XG99	LYSMD4	LysM and putative peptidoglycan-binding domain-containing protein 4		down-regülasyon

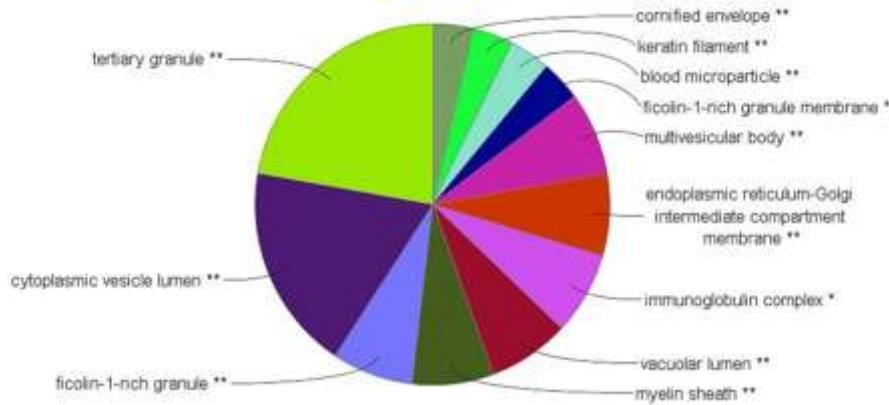
Tablo 4.2. (Devamı).

E9PKE3	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	down-regülasyon
P48061	CXCL12	Stromal cell-derived factor 1	down-regülasyon
P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	up-regülasyon
F6Q0M4	TNFRSF14	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14 (Fragment)	down-regülasyon
P51688	SGSH	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	down-regülasyon
H0YDD9	ANO1	Anoctamin (Fragment)	down-regülasyon

İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein ($p < 005$) biyolojik prosese dayalı farklı kategorilerde sınıflandırıldı. Bağışıklık sistemi ile ilgili protein valığının daha fazla oranda tespit edildi. Biyolojik prosese ait diagram Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

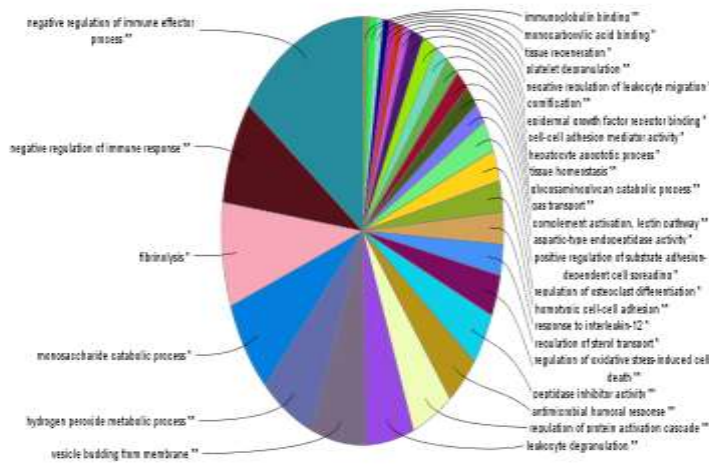
Şekil 4.1. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein ($p < 005$) biyolojik prosesi

İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein ($p < 005$) hücresel prosese dayalı farklı kategorilerde sınıflandırıldı. Tertiary granule oranının yüksek olduğu tespit edildi. Hücresel prosese ait diagram Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Tertiary granule, kthepsin ve jelatinaz içeren ve hücre aktivasyonu üzerine kolaylıkla eksiz edilen bir salgı granülü; öncelikle olgun nötrofil hücrelerinde bulundu.



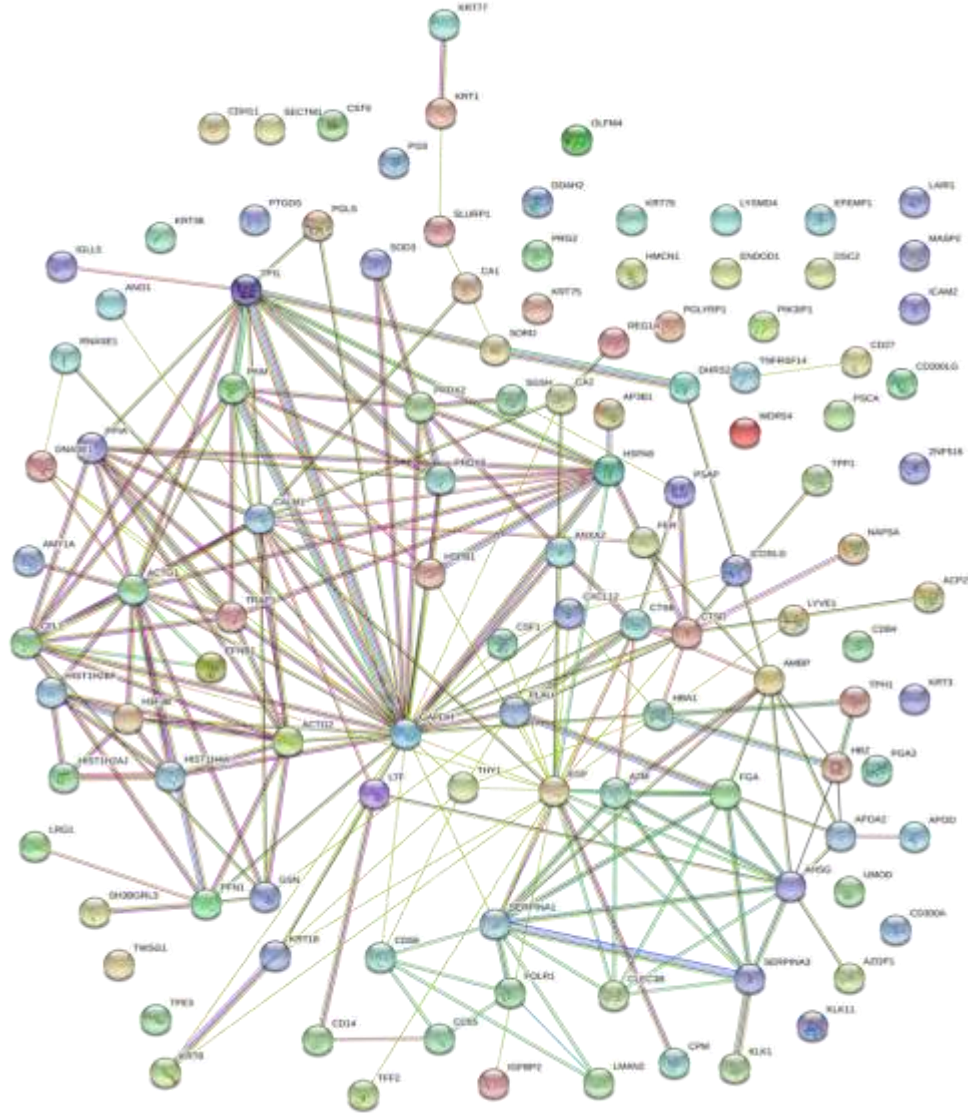
Şekil 4.2. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein ($p < 005$) hücresel prosesi

İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein ($p < 005$) moleküler fonksiyona dayalı farklı kategorilerde sınıflandırıldı. Bağışıklık sistemi ile ilgili fonksiyonun yüksek oranda olduğu tespit edildi. Moleküler fonksiyona ait diagram Şekil 4.4.'de gösterilmiştir



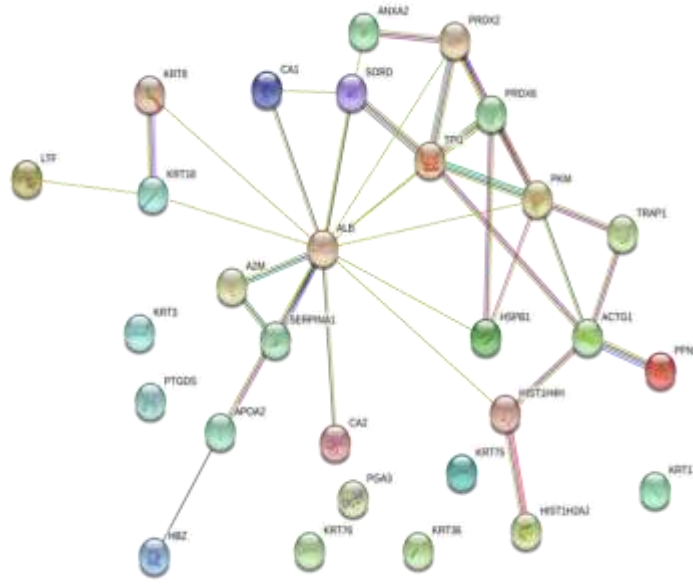
Şekil 4.3. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein ($p < 005$) moleküler fonksiyonu

İdrar numunesinde iki grup arasında anlamlı olarak belirlenen 124 protein, STRING yazılımı kullanılarak protein etkileşim yolak analizi yapıldı. Bu proteinlerin yaklaşık %76'sının birbiri ile bağlantılı olduğu tespit edildi. Şekil 4.4.'de gösterilmiştir.



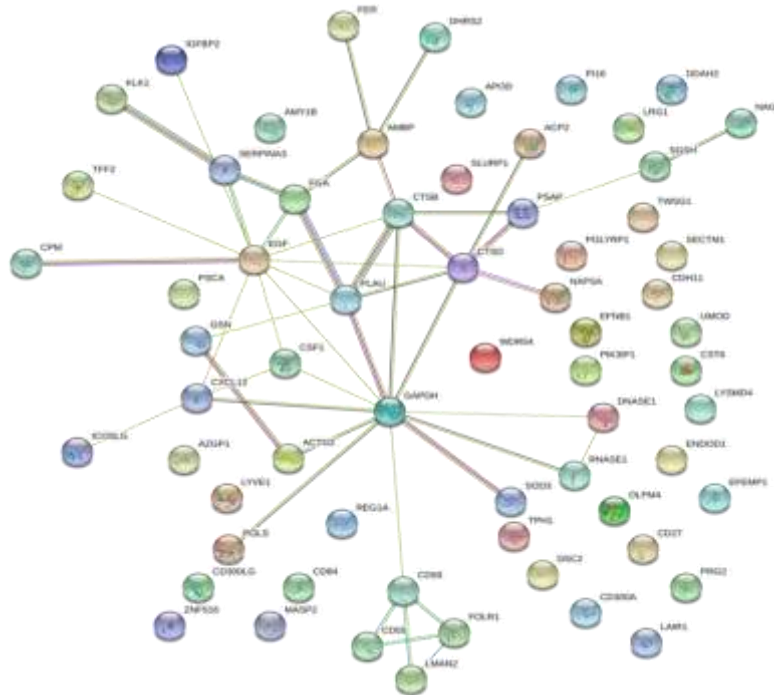
Şekil 4.4. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı 124 protein ($p < 005$) stringe göre pathway analizi

İdrar numunesinde iki grup arasında anlamlı olarak belirlenmiş up-regüle olan proteinler, STRING yazılımı kullanılarak protein etkileşim yolak analizi yapıldı. Bu proteinlerin yaklaşık %75.9'unun birbiri ile bağlantılı olduğu tespit edildi. Protein etkileşim yolak analizi Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



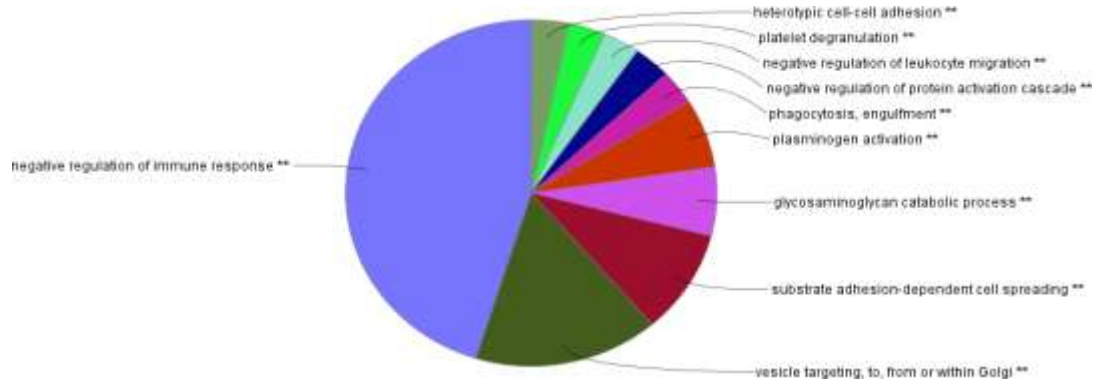
Şekil 4.5. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı up-regüle olmuş proteinlerin ($p < 005$) stringe göre pathway analizi

İdrar numunesinde iki grup arasında anlamlı olarak belirlenmiş down-regüle olan proteinler, STRING yazılımı kullanılarak protein etkileşim yolak analizi yapıldı. Bu proteinlerin yaklaşık %75,9'unun birbiri ile bağlantılı olduğu tespit edildi. Protein etkileşim yolak analizi Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



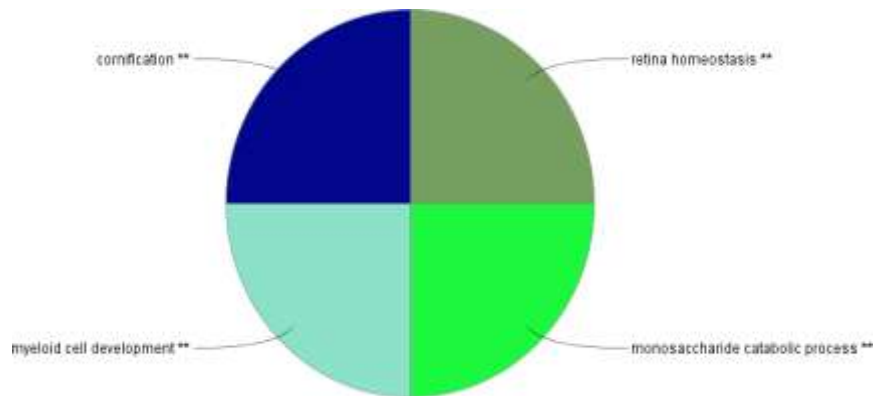
Şekil 4.6. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı down-regüle olmuş proteinlerin ($p < 005$) stringe göre pathway analizi

İdrar numunelerinde bulunan anlamlı down-regüle olan proteinler ($p < 005$) biyolojik prosese dayalı farklı kategorilerde sınıflandırıldı. Bağışıklık sistemi ile ilgili protein valığının daha fazla oranda olduğu tespit edildi. Biyolojik prosese ait diagram Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



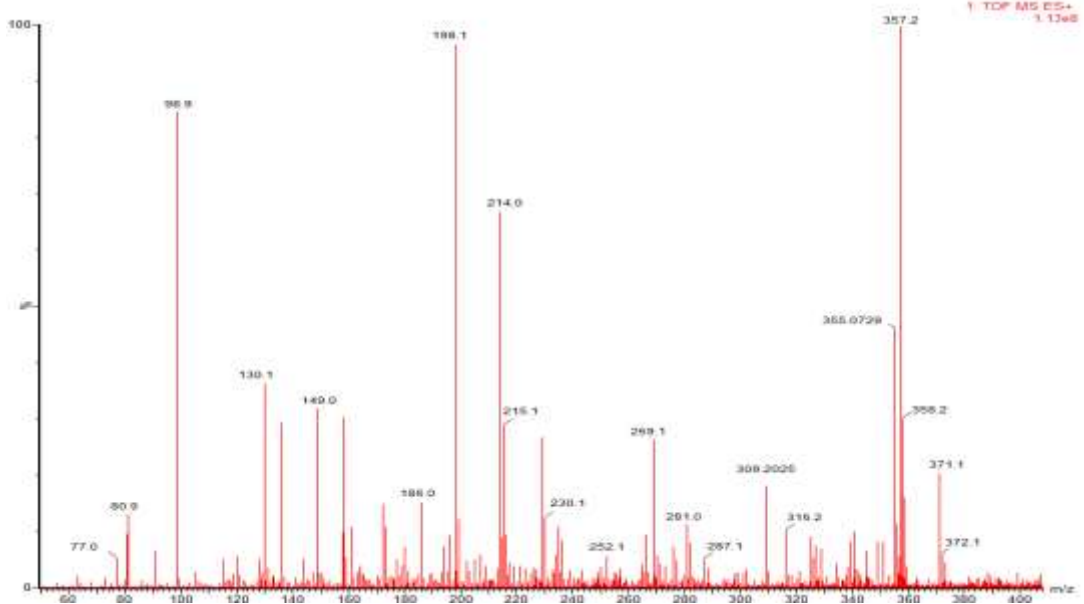
Şekil 4.7. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı down-regüle olmuş proteinlerin ($p < 005$) biyolojik fonksiyonlarının sınıflandırılması

İdrar numunelerinde bulunan anlamlı up-regüle olan proteinler ($p < 005$) biyolojik prosese dayalı farklı kategorilerde sınıflandırıldı. Kornifikasyon, myeloid hücre gelişimi, monosakkarit katabolik proses ve retina homeostazı olan biyolojik proseslerde eşit oranda olduğu tespit edildi. Biyolojik prosese ait diagram Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.

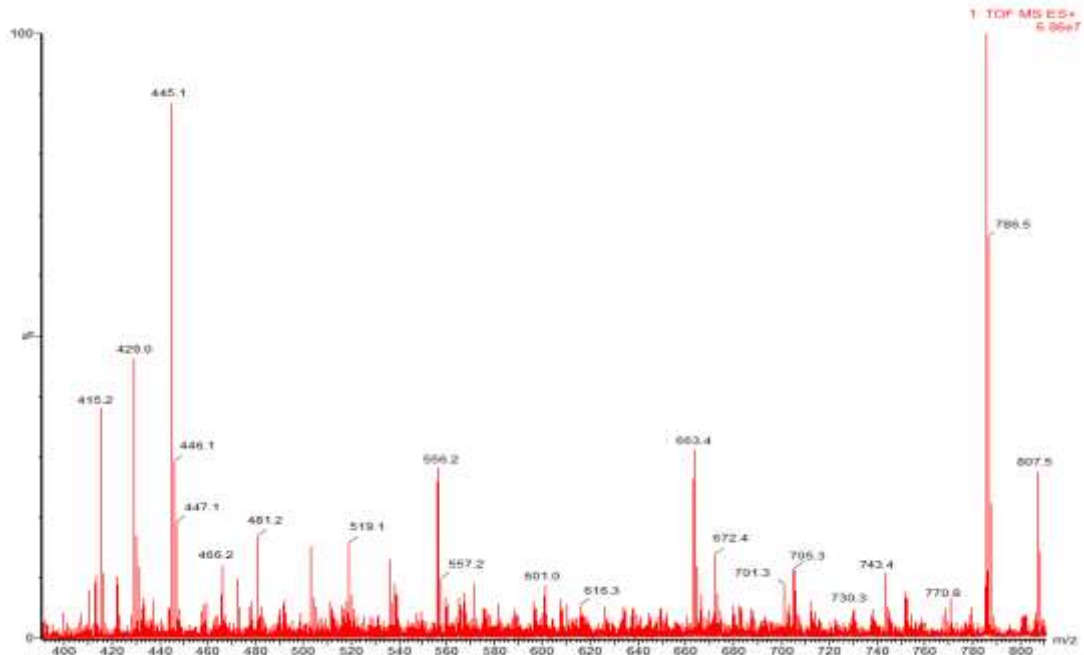


Şekil 4.8. İdrar numunelerinde bulunan anlamlı up-regüle olmuş proteinlerin ($p < 005$) biyolojik fonksiyonlarının sınıflandırılması

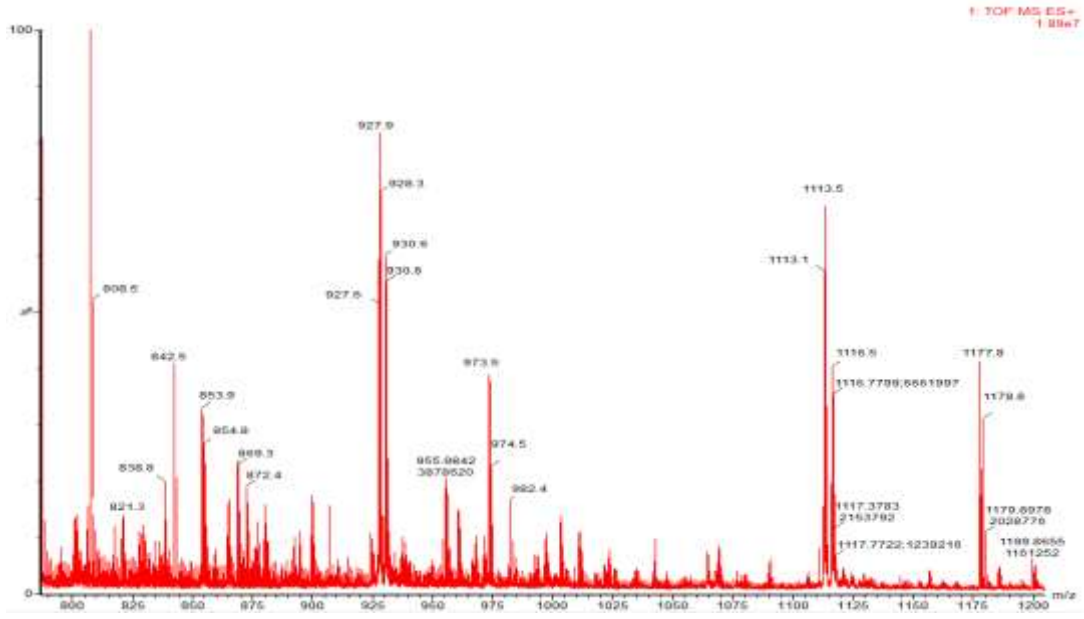
Sağlıklı ve prostat kanser idrar örneğine ait LC-MS-MS spekturumları Şekil 4.9. ve Şekil 4.12.'de gösterilmiştir.



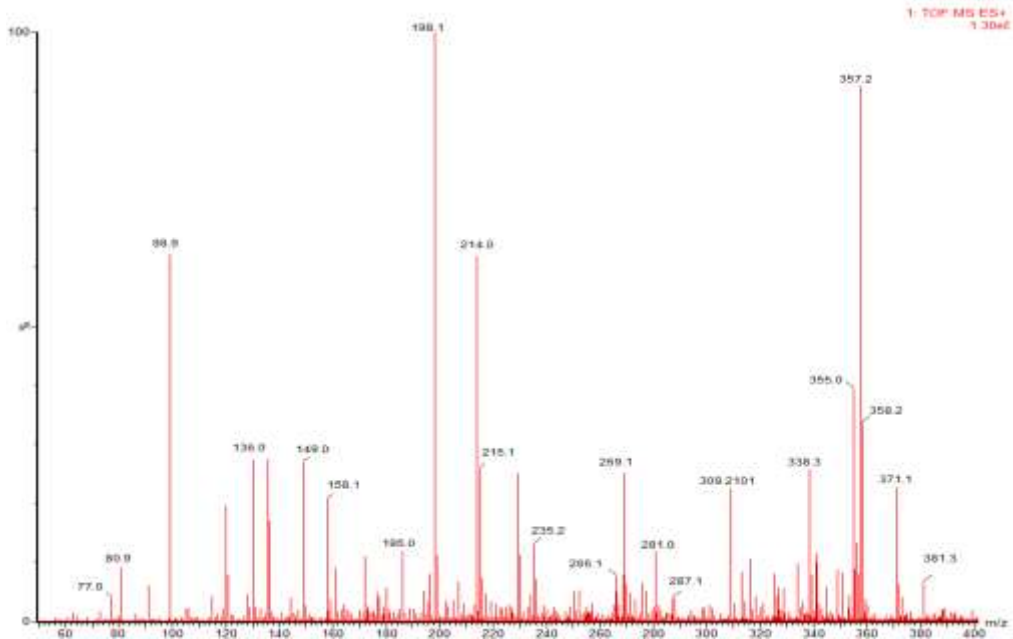
Şekil 4.9. Sağlıklı idrar örneğinden elde edilen triptik peptit karışımların pozitif iyonlaşmada, 0-400 m/z arası LC-MS-MS spekturumu



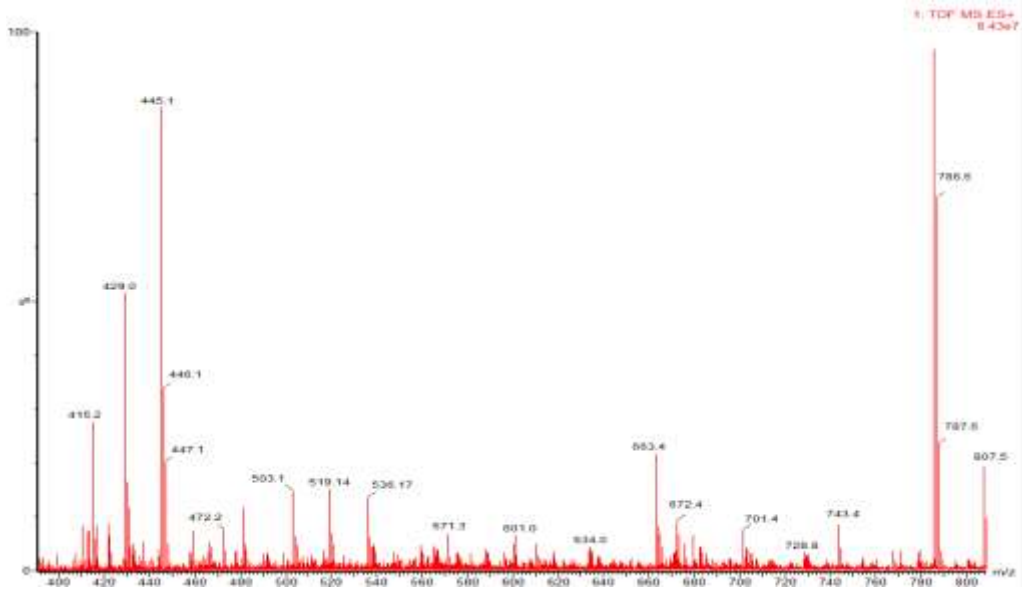
Şekil 4.10. Sağlıklı idrar örneğinden elde edilen triptik peptit karışımların pozitif iyonlaşmada, 400-800 m/z arası LC-MS-MS spekturumu



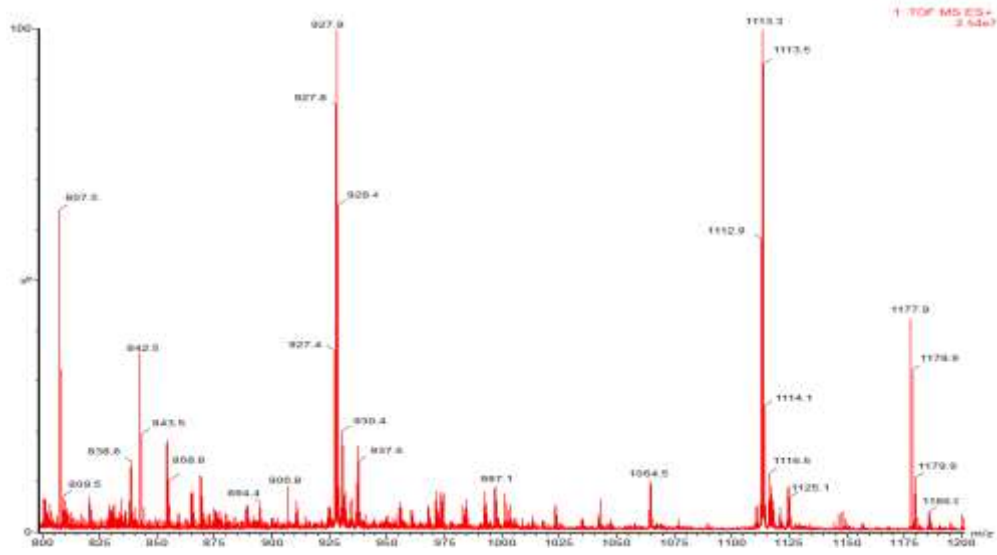
Şekil 4.11. Sağlıklı idrar örneğinden elde edilen triptik peptid karışımların pozitif iyonlaşmada, 800-1200 m/z arası LC-MS-MS spektrumu



Şekil 4.12. Prostat kanserlinin idrar örneğinden elde edilen triptik peptid karışımların pozitif iyonlaşmada, 0-400m/z arası LC-MS-MS spektrumu



Şekil 4.13. Prostat kanserinin idrar örneğinden elde edilen triptik peptit karışımların pozitif iyonlaşmada, 400-800 m/z arası LC-MS-MS spektrumu



Şekil 4.14. Prostat kanserinin idrar örneğinden elde edilen triptik peptit karışımların pozitif iyonlaşmada, 800-1200 m/z arası LC-MS-MS spektrumu

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Prostat kanseri hastalarının idrar protein profillerinin belirlenmesi kanser patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlar. Hasta ve kontrol grubu için belirlenen proteinler Progenesis Q programı ile karşılaştırıldığında 37 tanesi up-regüle ve 87 tanesi down-regüle olmuş anlamlı 124 tane protein tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Ingenuity Pathways Analysis (IPA) kullanılarak iki grup arasında anlamlı olarak belirlenen 124 protein içerisinde 34 tanesinin kanserle ilişkili olabilecek biyobelirteç adayları olduğu tespit edilmiştir. Piruvat Kinaz M (PKM) ve Kallikrein-11 (KLK11) genlerine sahip olan Pyruvate kinase PKM ve Kallikrein-11 proteinleri ise prostat kanseri ile ilgili biyobelirteç adayları olarak karşımıza çıkmaktadır.

Normal hücre metabolizması enerji ihtiyacını glikoliz ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon (Krebs çemberi) ile sağlar. Kanser hücrelerinde ise Warburg oksijen mevcudiyeti ne olursa olsun, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yerine glikolize oldukça bağımlı olan farklı bir metabolizmaya sahiptir. Bu proses Warburg ekisi veya oksijenli glikoliz olarak isimlendirilir (Dong ve ark., 2016).

Kanser hücrelerinin ürettiği enerji normal hücre metabolizmasının ürettiği enerji ile kıyaslandığında çok düşüktür. Kanser hücreleri bu enerji kaybını karşılamak için, glikoz taşıyıcılarını ve glikolitik enzimleri kodlayan genleri upregüle ederek glikoz alımı ve değiştirilmiş metabolizmaya yol açar (Dong ve ark., 2016).

Piruvat Kinaz PKM glikolizin son adımında fosfoenolpiruvat (PEP) ve adenosin difosfat'ı (ADP) piruvat ve ATP'ye katalizleyen bir enzimdir. Piruvat kinazın normal dokulardaki baskın hali PKM1 olarak bilinmektedir. Kanser hücrelerinde ise PKM2

çok fazla ekspres edilmesine rağmen aktivitesi PKM1 e göre çok düşüktür ve prostat kanserinde daha önce biyobelirteç olarak tespit edilememiştir. PKM2 şuan kadar idrarda prostat kanseri ile ilişkili biyomarker olarak tespit edilmemiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise idrar numunesinde PKM2'nin upregüle olduğu tespit edilmiştir (Alves-Filho ve Palsson-McDermott, 2016).

Serin proteazlar, iltihaplanma, tümör büyümesi, ve metastaz gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik fonksiyonlara hizmet eden protein indirgeyici enzimlerin bir ailesini içerir. Serin proteazların bir alt gurubu olan İnsan kallikrein ailesi on beş adet gene sahiptir. Kan basıncı, sperma sıvılaşması ve cilt soyulması gibi çeşitli fizyolojik işlevlerin koordinasyonundan sorumludur. KLK11 bu aile üyesinden biridir (Bi ve ark., 2010).

Birçok kallikrein meme, yumurtalık, prostat ve testis gibi endokrin ile ilişkili organlarda ekspres edilir ve farklı malignitelerle ilişkilidir (Stavropoulou ve ark., 2005).

Kallikreinin bir üyesi olan KLK11 prostat kanserinde protein ekspresyonları incelenmiş ve KLK11'in prostat dokusunda ve serumda yüksek oranda ekspres olduğu bulunmuştur (Paliouras ve ark., 2007).

İdrar numunesinde bu zamana kadar KLK11 genine ait olan Kallikrein-11 proteini prostat kanseri ile ilişkili bir biyomarker olarak tespit edilmemiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise KLK11 upregüle olarak tespit edilmiştir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada elde ettiğimiz bu sonuçlar, Piruvat Kinaz-2 (PKM2) ve kallikrein-11 (KLK11) proteinlerinin prostat kanseri için yeni bir biyobelirteç adayı olduğunu ortaya çıkarmıştır.

KAYNAKLAR

- Ablin, R. J. 1972. Immunologic studies of normal, benign, and malignant human prostatic tissue. *Cancer*, 29, 1570-4.
- Acar, Ö. & Şanlı, Ö. 2012. PSA: Tarihçe, Biyokimyasal ve Klinik Özellikler ve İzofomları,. *Ömer Kutlu Türk Üroloji Seminerleri*, 3, 49-54.
- Adachi, J., Kumar, C., Zhang, Y., Olsen, J. V. & Mann, M. 2006. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol*, 7, R80.
- Aebersold, R. & Mann, M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, 198-207.
- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts & Walter 2014. Protein Structure and Function. *Essential cell biology* 4nd edition ed.
- Alves-Filho, J. C. & Palsson-Mcdermott, E. M. 2016. Pyruvate Kinase M2: A Potential Target for Regulating Inflammation. *Front Immunol*, 7, 145.
- Aus, G., Abbou, C. C., Bolla, M., Heidenreich, A., Schmid, H. P., Van Poppel, H., Wolff, J., Zattoni, F. & European Association of, U. 2005. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol*, 48, 546-51.
- Aydın, S., 2007. Türkiye’de üriner sistem kanserlerin görülme sıklığı. *Türk Üroloji Dergisi* 33 392-397.
- Ayyıldız, S. N. & Ayyıldız, A. 2014. PSA, PSA derivatives, proPSA and prostate health index in the diagnosis of prostate cancer. *Turk J Urol*, 40, 82-8.
- Baquet, C. R., Horm, J. W., Gibbs, T. & Greenwald, P. 1991. Socioeconomic-Factors and Cancer Incidence among Blacks and Whites. *Journal of the National Cancer Institute*, 83, 551-557.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. & Gregory J. Gatto, J. 2012. Protein Composition and Structure. *Biochemistry*. 7nd edition ed.
- Bi, X., He, H., Ye, Y., Dai, Q., Han, Z., Liang, Y. & Zhong, W. 2010. Association of Tmprss2 and Klk11 gene expression levels with clinical progression of human prostate cancer. *Med Oncol*, 27, 145-51.

- Bijnsdorp, I. V., Geldof, A. A., Lavaei, M., Piersma, S. R., Van Moorselaar, R. J. & Jimenez, C. R. 2013. Exosomal ITGA3 interferes with non-cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes of metastatic prostate cancer patients. *J Extracell Vesicles*, 2.
- Bok, R. A., Halabi, S., Fei, D. T., Rodriguez, C. R., Hayes, D. F., Vogelzang, N. J., Kantoff, P., Shuman, M. A. & Small, E. J. 2001. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor urine levels as predictors of outcome in hormone-refractory prostate cancer patients: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*, 61, 2533-6.
- Boyle, P. & Ferlay, J. 2005. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology*, 16, 481-488.
- Bussemakers, M. J., Van Bokhoven, A., Verhaegh, G. W., Smit, F. P., Karthaus, H. f., Schalken, J. A., Debruyne, F. M., Ru, N. & Isaacs, W. B. 1999. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*, 59, 5975-9.
- Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., Hudson, M. A., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., Dekernion, J. B., Ratliff, T. L., Kavoussi, L. R., Dalkin, B. L. & ET AL. 1994. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*, 151, 1283-90.
- Chan, L. W., Moses, M. A., Goley, E., Sproull, M., Muanza, T., Coleman, C. N., Figg, W. D., Albert, P. S., Menard, C. & Camphausen, K. 2004. Urinary VEGF and MMP levels as predictive markers of 1-year progression-free survival in cancer patients treated with radiation therapy: a longitudinal study of protein kinetics throughout tumor progression and therapy. *J Clin Oncol*, 22, 499-506.
- Chiou, C. C., Chang, P. Y., Chan, E. C., Wu, T. L., Tsao, K. C. & Wu, J. T. 2003. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an Elisa and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin Chim Acta*, 334, 87-94.
- Chopin, D. K., Caruelle, J. P., Colombel, M., Palcy, S., Ravery, V., Caruelle, D., Abbou, C. C. & Barritault, D. 1993. Increased immunodetection of acidic fibroblast growth factor in bladder cancer, detectable in urine. *J Urol*, 150, 1126-30.
- Clements, J. & Mukhtar, A. 1994. Glandular kallikreins and prostate-specific antigen are expressed in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 78, 1536-9.
- De Kok, J. B., Verhaegh, G. W., Roelofs, R. W., Hessels, D., Kiemeny, L. A., Aalders, T. W., Swinkels, D. W. & Schalken, J. A. 2002. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res*, 62, 2695-8.

- Denis, L., Morton, M. S. & Griffiths, K. 1999. Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol*, 35, 377-87.
- Domon, B. & Aebersold, R. 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312, 212-7.
- Dong, G., Mao, Q., Xia, W., Xu, Y., Wang, J., Xu, L. & Jiang, F. 2016. Pkm2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncol Lett*, 11, 1980-1986.
- Dudley, E. 2014. Maldi profiling and applications in medicine. *Adv Exp Med Biol*, 806, 33-58.
- Edwards, J. J., Anderson, N. G., Tollaksen, S. L., Von Eschenbach, A. C. & Guevara, J., JR. 1982. Proteins of human urine. II. Identification by two-dimensional electrophoresis of a new candidate marker for prostatic cancer. *Clin Chem*, 28, 160-3.
- Ferlay, J., F, B., P, P. & PARKIN 2004. *Globocan 2002: cancer Incidence, mortality and prevalence worldwide.*, International Agency for Research on Cancer
- Filella, X. & Foj, L. 2016. Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers. *Int J Mol Sci*, 17.
- Fossati, N., Buffi, N. M., HAESE, A., STEPHAN, C., Larcher, A., Mcnicholas, T., De La Taille, A., Freschi, M., Lughezzani, G., Abrate, A., Bini, V., Palou Redorta, J., Graefen, M., Guazzoni, G. & Lazzeri, M. 2015. Preoperative Prostate-specific Antigen Isoform p2PSA and Its Derivatives, %p2PSA and Prostate Health Index, Predict Pathologic Outcomes in Patients Undergoing Radical Prostatectomy for Prostate Cancer: Results from a Multicentric European Prospective Study. *Eur Urol*, 68, 132-8.
- Frantzi, M., Latosinska, A., Merseburger, A. S. & Mischak, H. 2015. Recent progress in urinary proteome analysis for prostate cancer diagnosis and management. *Expert Rev Mol Diagn*, 15, 1539-54.
- Fujita, K., Kume, H., Matsuzaki, K., Kawashima, A., Ujike, T., Nagahara, A., Uemura, M., Miyagawa, Y., Tomonaga, T. & Nonomura, N. 2017. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. *Sci Rep*, 7, 42961.
- Gamagedara, S. & Ma, Y. 2011. Biomarker analysis for prostate cancer diagnosis using LC-MS and CE-MS. *Bioanalysis*, 3, 2129-42.
- Gerke, V., Creutz, C. E. & Moss, S. E. 2005. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 449-61.
- Gittes, R. F. 1987. Prostate-specific antigen. *N Engl J Med*, 317, 954-5.
- Goo, Y. A. & Goodlett, D. R. 2010. Advances in proteomic prostate cancer biomarker discovery. *J Proteomics*, 73, 1839-50.

- Gosselaar, C., Roobol, M. J., Roemeling, S. & Schroder, F. H. 2008. The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC), Rotterdam. *Eur Urol*, 54, 581-8.
- Gronberg, H., Damber, L. & Damber, J. E. 1996. Familial prostate cancer in Sweden - A nationwide register cohort study. *Cancer*, 77, 138-143.
- Haj-Ahmad, T. A., Abdalla, M. A. & Haj-Ahmad, Y. 2014. Potential Urinary Protein Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients. *J Cancer*, 5, 103-14.
- Hanchette, C. L. & Schwartz, G. G. 1992. Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer*, 70, 2861-9.
- Hara, M., Koyanagi, Y., Inoue, T. & Fukuyama, T. 1971. [Some physico-chemical characteristics of " -seminoprotein", an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII]. *Nihon Hoigaku Zasshi*, 25, 322-4.
- Harvey, R. A. & Ferrier, D. 2011. Protein Structure and Function. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. 5th ed.
- Hutchinson, L. M., Chang, E. L., Becker, C. M., Shih, M. C., Brice, M., Dewolf, W. c., Gaston, S. M. & Zetter, B. R. 2005. Use of thymosin beta15 as a urinary biomarker in human prostate cancer. *Prostate*, 64, 116-27.
- Imai, K., Ichinose, Y., Kubota, Y., Yamanaka, H. & Sato, J. 1995. Diagnostic significance of prostate specific antigen and the development of a mass screening system for prostate cancer. *J Urol*, 154, 1085-9.
- Irani, J., Salomon, L., Soulie, M., Zlotta, A., De La Taille, A., Dore, B. & Millet, C. 2005. Urinary/serum prostate-specific antigen ratio: comparison with free/total serum prostate-specific antigen ratio in improving prostate cancer detection. *Urology*, 65, 533-7.
- Jain, S., Bhojwani, A. G. & Mellon, J. K. 2002. Improving the utility of prostate specific antigen (PSA) in the diagnosis of prostate cancer: the use of PSA derivatives and novel markers. *Postgrad Med J*, 78, 646-50.
- Jedinak, A., Curatolo, A., Zurakowski, D., Dillon, S., Bhasin, M. K., LIBERMANN, T. A., Roy, R., Sachdev, M., Loughlin, K. R. & Moses, M. A. 2015. Novel non-invasive biomarkers that distinguish between benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *BMC Cancer*, 15, 259.
- Klasen, I. S., Reichert, L. J., De Kat Angelino, C. M. & Wetzels, J. F. 1999. Quantitative determination of low and high molecular weight proteins in human urine: influence of temperature and storage time. *Clin Chem*, 45, 430-2.

- Kollermann, J., Schlomm, T., Bang, H., Schwall, G. P., Von Eichel-Streiber, C., Simon, R., Schostak, M., Huland, H., Berg, W., Sauter, G., Klocker, H. & Schrattenholz, A. 2008. Expression and prognostic relevance of annexin A3 in prostate cancer. *Eur Urol*, 54, 1314-23.
- Korfmacher, W. A. 2005. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today*, 10, 1357-67.
- Kutlu, Ö. & Köksal, İ. T. 2012. PSA Etkinliğini Artırıcı Çabalar: PSA Dansitesi, PSA Hızı, Yaşa Özgü PSA, Serbest ve Kompleks PSA. *Türk Üroloji Seminerleri*, 3, 55-60.
- Lee, R. S., Monigatti, F., Briscoe, A. C., Waldon, Z., Freeman, M. R. & Steen, H. 2008. Optimizing sample handling for urinary proteomics. *J Proteome Res*, 7, 4022-30.
- Li, Q. R., Fan, K. X., Li, R. X., Dai, J., Wu, C. C., Zhao, S. L., Wu, J. R., Shieh, C. h. & Zeng, R. 2010. A comprehensive and non-prefractionation on the protein level approach for the human urinary proteome: touching phosphorylation in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 24, 823-32.
- Lilja, H. 1993. Structure, function, and regulation of the enzyme activity of prostate-specific antigen. *World J Urol*, 11, 188-91.
- Lombardo, M. E. & Hudson, P. B. 1997. Preliminary evaluation of 5 alpha-reductase type 2 in urine as a potential marker for prostate disease. *Steroids*, 62, 682-5.
- Lundwall, A. 1989. Characterization of the gene for prostate-specific antigen, a human glandular kallikrein. *Biochem Biophys Res Commun*, 161, 1151-9.
- Lundwall, A. & Lilja, H. 1987. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett*, 214, 317-22.
- Lwaleed, B. A., Francis, J. L. & Chisholm, M. 2000. Urinary tissue factor levels in patients with bladder and prostate cancer. *Eur J Surg Oncol*, 26, 44-9.
- Marimuthu, A., O'meally, R. N., Chaerkady, R., Subbannayya, Y., Nanjappa, V., Kumar, P., Kelkar, D. S., Pinto, S. M., Sharma, R., Renuse, S., Goel, R., Christopher, R., Delanghe, B., Cole, R. N., Harsha, H. C. & Pandey, A. 2011. A comprehensive map of the human urinary proteome. *J Proteome Res*, 10, 2734-43.
- Matsuda, Y., Miyashita, A., Fujimoto, Y., Umeda, T. & Akihama, S. 1996. Clinical application of basic arginine amidase in human male urine. *Biol Pharm Bull*, 19, 1083-5.
- Mckee, T. & Mckee, J. R. 2012. Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Biochemistry, The Molecular Basis of Life*. 5th edition ed.
- Mclaughlin, J. R. & Dryer, D. 2000. Canadian Cancer Statistics 2000.

- Meyer, F., Bairati, I., Shadmani, R., Fradet, Y. & Moore, L. 1999. Dietary fat and prostate cancer survival. *Cancer Causes & Control*, 10, 245-251.
- Mikolajczyk, S. D., Grauer, L. S., Millar, L. S., Hill, T. M., Kumar, A., Rittenhouse, H. G., Wolfert, R. L. & Saedi, M. S. 1997. A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum. *Urology*, 50, 710-4.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'briant, K. C., ALLEN, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B. & Tewari, M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10513-8.
- Miyake, H., Muramaki, M., Kurahashi, T., Yamanaka, K. & Hara, I. 2005. Urinary levels of vascular endothelial growth factor in patients with prostate cancer as a predictor of disease progression. *Anticancer Res*, 25, 3645-9.
- Moses, M. A., Wiederschain, D., Loughlin, K. R., Zurakowski, D., Lamb, C. C. & Freeman, M. R. 1998. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. *Cancer Res*, 58, 1395-9.
- Nelen, V. 2007. Epidemiology of prostate cancer. In: J. Ramon, L. J. D. (ed.) *Prostate Cancer*.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2012. Amino Acids, Peptides, and proteins. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th edition ed.: Freeman, W. H. & Company.
- Oesterling, J. E., Jacobsen, S. J., Klee, G. G., Pettersson, K., Piironen, T., Abrahamsson, P. A., Stenman, U. H., Dowell, B., Lovgren, T. & Lilja, H. 1995. Free, complexed and total serum prostate specific antigen: the establishment of appropriate reference ranges for their concentrations and ratios. *J Urol*, 154, 1090-5.
- Okotie, O. T., Roehl, K. A., Han, M., Loeb, S., Gashti, S. N. & Catalona, W. J. 2007. Characteristics of prostate cancer detected by digital rectal examination only. *Urology*, 70, 1117-20.
- Paliouras, M., Borgono, C. & Diamandis, E. P. 2007. Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Lett*, 249, 61-79.
- Papsidero, L. D., Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P. & Chu, T. M. 1980. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res*, 40, 2428-32.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55, 74-108.
- Pelley, J. W. 2012. Protein Structure and Function. *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*

- Pienta, K. J. & Esper, P. S. 1993. Risk-Factors for Prostate-Cancer. *Annals of Internal Medicine*, 118, 793-803.
- 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. 2004. 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, 1159-74.
- Pisitkun, T., Shen, R. F. & Knepper, M. A. 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 13368-73.
- Pitt, J. J. 2009. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 30, 19-34.
- Ponthus, J. & Riches, E. 2013. Evaluating the multiple benefits offered by ion mobility-mass spectrometry in oil and petroleum analysis. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*, 16, 95-103.
- Rehman, I., Azzouzi, A. R., Catto, J. W., Allen, S., Cross, S. S., Feeley, K., Meuth, M. & Hamdy, F. C. 2004. Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: a pilot study. *Urology*, 64, 1238-43.
- Richie, J. P., Catalona, W. J., Ahmann, F. R., Hudson, M. A., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., Dekernion, J. B., Ratliff, T. L., Kavoussi, L. R., Dalkin, B. L. & Et Al. 1993. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology*, 42, 365-74.
- Roy, R., Louis, G., Loughlin, K. R., Wiederschain, D., Kilroy, S. M., Lamb, C. C., Zurakowski, D. & Moses, M. A. 2008. Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species. *Clin Cancer Res*, 14, 6610-7.
- Sanchez-Carbayo, M., Urrutia, M., Gonzalez De Buitrago, J. M. & NAVAJO, J. A. 2000. Evaluation of two new urinary tumor markers: bladder tumor fibronectin and cytokeratin 18 for the diagnosis of bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 6, 3585-94.
- Schaller, J., Akiyama, K., Tsuda, R., Hara, M., Marti, T. & Rickli, E. E. 1987. Isolation, characterization and amino-acid sequence of gamma-seminoprotein, a glycoprotein from human seminal plasma. *Eur J Biochem*, 170, 111-20.
- Shao, C., Wang, Y. & Gao, Y. 2011. Applications of urinary proteomics in biomarker discovery. *Sci China Life Sci*, 54, 409-17.

- Schostak, M., Schwall, G. P., Poznanovic, S., Groebe, K., Muller, M., Messinger, D., Miller, K., Krause, H., Pelzer, A., Horninger, W., Klocker, H., Hennenlotter, J., Feyerabend, S., Stenzl, A. & Schrattenholz, A. 2009. Annexin A3 in urine: a highly specific noninvasive marker for prostate cancer early detection. *J Urol*, 181, 343-53.
- Smith, S. D., Wheeler, M. A., Plescia, J., Colberg, J. W., Weiss, R. M. & Altieri, D. C. 2001. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *JAMA*, 285, 324-8.
- Stamey, T. A., Yang, N., Hay, A. R., Mcneal, J. E., Freiha, F. S. & Redwine, E. 1987. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*, 317, 909-16.
- Stavropoulou, P., Gregorakis, A. K., Plebani, M. & Scorilas, A. 2005. Expression analysis and prognostic significance of human kallikrein 11 in prostate cancer. *Clin Chim Acta*, 357, 190-5.
- Steinberg, G. D., Carter, B. S., Beaty, T. H., Childs, B. & Walsh, P. C. 1990. Family History and the Risk of Prostate-Cancer. *Prostate*, 17, 337-347.
- Stephan, C., Lein, M., Jung, K., Schnorr, D. & Loening, S. A. 1997. The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia. *Cancer*, 79, 104-9.
- Stoeber, K., Swinn, R., Prevost, A. T., DE Clive-low, P., Halsall, I., Dilworth, S. M., Marr, J., Turner, W. H., Bullock, N., Doble, A., Hales, C. N. & Williams, G. H. 2002. Diagnosis of genito-urinary tract cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments. *J Natl Cancer Inst*, 94, 1071-9.
- Subramani Parasuraman, A. R., Subramani Balamurugan, Selvadurai Muralidharan, Kalaimani Jayaraj Kumar And Venugopal Vijayan 2014. *An Overview of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Instrumentation*.
- Sun, W., Li, F., Wu, S., Wang, X., Zheng, D., Wang, J. & Gao, Y. 2005. Human urine proteome analysis by three separation approaches. *Proteomics*, 5, 4994-5001.
- Tefekli, A. H. 2012. Prostat Kanserinde Yeni Belirteçler ve Phi Skoru. *Türk Üroloji Seminerleri*, 3, 61-69.
- Teni, T. R., Bandivdekar, A. H., Sheth, A. R. & Sheth, N. A. 1989. Prostatic inhibin-like peptide quantified in urine of prostatic cancer patients by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*, 35, 1376-9.
- Tenke, P., HORTI, J., Balint, P. & Kovacs, B. 2007. Prostate Cancer Screening. In: Jacob Ramon, L. J. D. (ed.) *Prostate Cancer*.

- Ünal, M. S., Özer, M. C., Sönmez, F. H., Bayrak, G. & Demirbağ, H. O. 2017. Seminal sıvının fertilizasyondaki rolü. *Androloji Bülteni*.
- Van Dieijen-Visser, M. P., Hendriks, M. W., Delaere, K. P., Gijzen, A. H. & Brombacher, P. J. 1988. 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.
- Vasudevan, D., S, S. & Vaidyanathan, K. 2011. Proteins: Structure and Function. *Textbook of Biochemistry for Medical Students* 8nd edition ed.
- Wang, H., Xi, X., Kong, X., Huang, G. & Ge, G. 2004. The expression and significance of survivin mRNA in urinary bladder carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130, 487-90.
- Wang, L., Li, F., Sun, W., Wu, S., Wang, X., Zhang, L., Zheng, D., Wang, J. & Gao, Y. 2006. Concanavalin A-captured glycoproteins in healthy human urine. *Mol Cell Proteomics*, 5, 560-2.
- Weissinger, E. M., Schiffer, E., Hertenstein, B., Ferrara, J. L., Holler, E., Stadler, M., Kolb, H. J., Zander, A., Zurbig, P., Kellmann, M. & Ganser, A. 2007. Proteomic patterns predict acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 109, 5511-9.
- Wilt, T. J., Scardino, P. T., Carlsson, S. V. & Basch, E. 2014. Prostate-specific antigen screening in prostate cancer: perspectives on the evidence. *J Natl Cancer Inst*, 106, dju010.
- Wolf, A. M., Wender, R. C., Etzioni, R. B., Thompson, I. M., D'AMICO, A. V., Volk, R. J., Brooks, D. D., Dash, C., Guessous, I., Andrews, K., Desantis, C., Smith, R. A. & American Cancer Society Prostate Cancer Advisory, C. 2010. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010. *CA Cancer J Clin*, 60, 70-98.
- Wu, J., Chen, Y. D. & Gu, W. 2010. Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases. *J Zhejiang Univ Sci B*, 11, 227-37.
- Wulfkühle, J. D., Liotta, L. A. & Petricoin, E. F. 2003. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer*, 3, 267-75.
- Zerefos, P. G. & Vlahou, A. 2008. Urine sample preparation and protein profiling by two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy. *Methods Mol Biol*, 428, 141-57.
- Zhou, H., Yuen, P. S., Pisitkun, T., Gonzales, P. A., Yasuda, H., Dear, J. W., Gross, P., Knepper, M. A. & Star, R. A. 2006. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int*, 69, 1471-6.

EKLER

EK A: Etik Kurulu Belgesi



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.8366
Konu : Etik Kurulu Kararı

08/03/2018

Sayın İhsan YOZGAT

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Le-MS-MS İle Prostat Kanseri Proteom Profillerinin İncelenmesi" isimli başvurunuz ile ilgili olarak;

Etik Kurulu onayı, henüz başlatılmamış araştırmalar için verilir ve daha sonra çalışmalar başlatılmaktadır. Ancak insanlar üzerinde girişimsel bir uygulama yapılmadığı takdirde, araştırma gerçekleştirilmiş bile olsa araştırma protokolünün Etik yönden uygun olup olmadığı ayrıca değerlendirilebilir. Bu durum araştırılma başlatılmadan önce Etik Kurulu onayı alınması gerekliliğini ortadan kaldırmaz. Bu bilgiler ışığında araştırma protokolünüz incelenmiş ve Etik yönden uygun olduğu kanaatine varılmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 08.03.2018 tarihinde e-İmzalanmıştır. Evrakınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden FBBC1C71XA kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kavacak Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Lc-Ms-Ms İle Prostat Kanserinde Proteom Profillerinin İncelenmesi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	İhsan YOZGAT			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kimyager			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	22/02/2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRELMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	22/02/2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No: 180	Tarih: 07/03/2018				
	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 GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		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"/>	
Prof. 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 checked="" type="checkbox"/>	H <input 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 checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İkmur 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"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet HİKMET 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"/>	

* :Teplentide Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

İhsan YOZGAT, 11.09.1980 İstanbul doğumlu. İlköğretimini Kılıç Ali Paşa ilkokulu'nda, ortaöğretimini Gazi Osman Paşa Ortaokulu'nda ve lise öğrenimini Beşiktaş Lisesi'nde tamamladı. 1999 yılında başladığı Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Kimya Bölümü'nü 2004 yılında bitirdi. 2016 yılında Sakarya Üniversitesi'nde Kimya Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. 2004-2007 yılları arasında eğitim sektöründe görev aldı. 2007-2009 yılları arasında Biofarma İlaç Sanayi A.Ş.'de Kalite Kontrol Departmanında uzman yardımcısı olarak görev aldı. 2010 yılı içerisinde Memorial Sloan Kettering Cancer Center Newyork/USA'de kan kanseri üzerine odaklanmış araştırmalarda ilaç geliştirme ve organik sentez üzerine yapılan çalışmalarda yer aldı. 2014-2015 yılları arasında World Medicine ilaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.'de Araştırma ve Geliştirme Departmanında uzman yardımcısı olarak görev aldı. 2015 yılından itibaren Medipol Üniversitesi Rejeneratif Ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi proteomiks laboratuvarında proteomiks çalışmaları yapmaktadır.