

# Bölüm 63

## KANSER ARAŞTIRMALARINDA PROTEOMİKS TEKNİKLERİN KULLANIMI



Naz DİZECİ<sup>1</sup>

### GİRİŞ

Postgenomikte biyolojik karmaşıklığın derinlemesine anlaşılması için proteinler ve işlevleri üzerine sistematik çalışmalar devam etmektedir. Proteomik teknolojiler, proteinlerin büyük ölçekli ve derinlemesine araştırılmasını, özellikle de potansiyel biyobelirteçlerin karmaşık biyolojik matrislerde yüksek verimli bir şekilde taranmasını sağlar. Bugüne kadar, proteomik biyolojik çalışma için temel bir bileşen haline geldi ve yeni biyobelirteç keşfi ve kişiselleştirilmiş terapi için anahtar bir yöntem olarak kabul edildi. Patojenik süreçlerin ve terapötik bir müdahaleye verilen farmakolojik tepkilerin göstergeleri olarak biyobelirteçler, patofizyoloji vakaları doğru bir şekilde teşhis etmemizin yanı sıra tedavilerle nasıl değiştirildiğini anlamamızı sağlar. Bu yolda, en önemli konulardan biri de analiz için uygun materyalin nasıl seçileceğidir.

Kanserin erken teşhisi için klinik uygulama amacıyla, geniş kapsama alanına sahip, basit ve genel olarak kabul edilen invaziv olmayan bir örnekleme yöntemine şiddetle ihtiyaç duyulmaktadır. Kan plazması, kanser teşhisi ve kişiselleştirilmiş tıpta devrim yaratma potansiyeli ile kanser biyobelirteçlerinin tam olarak taranmasına ve ta-

nımlanmasına izin verme vaadi ile birçok nedenden dolayı proteomik analiz için uygun bir matris olarak kabul edilmiştir. İlk olarak, kanın birçok doku proteom alt kümesini yansıtan karmaşık bir proteomu vardır (1). İkinci olarak, standartlaştırılmış formatlar kullanılarak plazmanın elde edilmesi kolaydır (2). Çünkü klinik değerlendirmede yaygın kullanım için noninvaziv ve kabul edilebilir bir örnekleme yöntemi hayati önem taşır ve kan alma işlemi genel olarak kabul edilir ve kemik iliği aspirasyonu gibi diğer doku örnekleme yöntemlerine kıyasla daha az ağrılıdır. Üçüncüsü, plazmanın dinamik doğası, hastanın çeşitli fiziksel durumlarını yansıtır, bu sayede hastalık ilerlemesini uzamsal ve zamansal olarak izlemek mümkündür, bu da tümörjenezdeki moleküler olayların daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına yol açar (2). Son olarak, kanın incelenmesi, bir dizi kilit teknolojinin halihazırda kurulmuş olduğu rutin biyokimyasal tahlillere uzun süredir dahil edilmiştir. Bu nedenle, birlikte ele alındığında, insan plazmasının veya uygun hayvan modeli sistemlerinin proteomik profili, kanser biyobelirteç keşfi için çekici bir profil sağlar. Plazmada bulunan proteinler çeşitli kaynaklardan elde edilir. Katı dokular, özellikle bağırsak ve karaciğer, plazmada işlevle-

<sup>1</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Ankara Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. naz.dizeci@ankaramedipol.edu.tr

üzere birçok plazma proteininin, pankreas kanseri hastalarından ve sağlıklı kontrollerden alınan plazmada farklı şekilde eksprese edildiği bulunmuştur, ancak bu henüz daha fazla doğrulanmamıştır (65). Nötrofil jelatinaz ile ilişkili lipokalin (LCN2), litostatin 1 (REG1A), yenileyici adacık türevli protein 3 (REG3), metalloproteinaz 1 doku inhibitörü (TIMP1) ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 4 (IGFBP4) dahil olmak üzere seçilen beş protein ayrıca pankreas kanserli hastalardan alınan klinik kan örneklerinde umut verici sonuçlarla değerlendirilmiştir (66).

### Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser (CRC), dünya çapında en yaygın üçüncü kanserdir (67). Metalloproteinaz-1 (TIMP-1) ve karsinoembriyonik antijenin (CEA) bir kombinasyonunun 4509 bireyi içeren prospektif, popülasyon temelli bir çalışmaya dayalı olarak öngörücü potansiyele sahip olabileceği bildirilmiştir (68). LCN2 olarak da bilinen nötrofil jelatinazla ilişkili lipokalin (NGAL), 526 katı doku ve plazma örneğinin proteomik profiliyle kolorektal kanserin potansiyel bir biyobelirteci olduğu gösterilmiştir (69). Bununla birlikte, NGAL'nin plazma seviyesi de pankreas kanseri ile ilişkili olduğundan, NGAL kolorektal kanserin spesifik bir biyobelirteçleri olmayabilir (70). Kolorektal adenom ve kolorektal karsinom vakalarını karşılaştıran plazma proteinlerinin başka bir proteomik taraması, hemoglobin alt birim beta (HBB), alfa-2-HS-glikoprotein (AHSG), transtiretin (TTR), çinko alfa 2 glikoprotein (ZAG) ve retinol bağlayıcı protein 4 (RBP4), kolorektal kanser için biyobelirteç olma potansiyeline sahip olduklarını düşündürür (71). İlginç bir şekilde, bu proteinlerin bir kısmı, çoğullanmış MRM analizi kullanılarak nicel bir insan fekal proteomik çalışmasında da tanımlanmıştır (72).

### Mide Kanseri

Mide kanseri, metastatik hastalık için yaklaşık 1 yıllık medyan sağkalım ile dünya çapında kanser ölümlerinin bir başka önde gelen nedenidir (73).

Bu düşük sağkalım oranı kısmen, plazma proteomiklerinin ortaya çıkarılabileceği etkili biyobelirteçlerin eksikliğinden kaynaklanmaktadır (74). 2DE ve MS tabanlı proteomik profil oluşturmada önce HAP'leri tüketmek için IAC kullanan, haptogloblin öncüsü, tamamlayıcı C4-B öncüsü ve tamamlayıcı faktör I öncüsü dahil olmak üzere üç protein öncüsü, mide kanserli hastalardan alınan plazma numuneleri ve sağlıklı kontrol grubu arasında farklı ekspresyon paternleri gösterdi (75). Western blot tarafından yapılan daha ileri analizler, plazmada kompleman faktör I prekürsörünün ekspresyonunun bir mide kanseri kohortunda aşağı regüle edildiğini doğruladı ve bunun mide kanseri teşhisi için potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini düşündürdü (76).

### KAYNAKLAR

1. Liotta, L. A., Ferrari, M., Petricoin, E., Clinical proteomics: written in blood. *Nature* 2003, 425, 905.
2. Hanash, S. M., Pitteri, S. J., Faca, V. M., Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature* 2008, 452, 571–579.
3. Inal, J. M., Kosgodage, U., Azam, S., Stratton, D. et al., Blood/plasma secretome and microvesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1834, 2317–2325.
4. Issaq, H. J., Xiao, Z., Veenstra, T. D., Serum and plasma proteomics. *Chem. Rev.* 2007, 107, 3601–3620.
5. Geyer, P. E., Kulak, N. A., Pichler, G., Holdt, L. M. et al., Plasma proteome profiling to assess human health and disease. *Cell Syst.* 2016, 2, 185–195.
6. van Waarde, A., Rybczynska, A. A., Ramakrishnan, N. K., Ishiwata, K. et al., Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 2015, 1848, 2703–2714.
7. Walzl, G., Ronacher, K., Hanekom, W., Scriba, T. J., Zumla, A., Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, 11, 343–354.
8. Huang, C. H., Chiou, S. H., Clinical proteomics identifies potential biomarkers in *Helicobacter pylori* for gastrointestinal diseases. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, 1529–1536.
9. Karve, T. M., Cheema, A. K., Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *J. Amino Acids* 2011, 2011, 207691.
10. Anderson, N. L., Anderson, N. G., The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* 2002, 1, 845–867.
11. Carrette, O., Burkhard, P. R., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nat. Protoc.* 2006, 1, 812–823.
12. Nice, E. C., Rothacker, J., Weinstock, J., Lim, L., Catimel,

- B., Use of multidimensional separation protocols for the purification of trace components in complex biological samples for proteomics analysis. *J. Chromatogr. A* 2007, 1168, 190–210; discussion 189.
13. Stellwagen, E., Dye affinity chromatography. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2001, Chapter 9, Unit 9.2.
  14. Andac, M., Cibacron blue immobilized poly (glycidyl-methacrylate) nanobeads for albumin removal in proteome studies. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2015, 43, 133–139.
  15. Odabasi, M., Magnetic dye-affinity beads for human serum albumin purification. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2011, 41, 287–304.
  16. Altintas, E. B., Denizli, A., Efficient removal of albumin from human serum by monosize dye-affinity beads. *J. Chromatogr. B* 2006, 832, 216–223.
  17. Pompon, D., Guiard, B., Lederer, F., Binding of Cibacron blue F3GA to the flavin and NADH sites in cytochrome b5 reductase. *Eur. J. Biochem.* 1980, 110, 565–570.
  18. Prestera, T., Prochaska, H. J., Talalay, P., Inhibition of NAD(P)H:(quinone-acceptor) oxidoreductase by cibacron blue and related anthraquinone dyes: a structure-activity study. *Biochemistry* 1992, 31, 824–833.
  19. Arnold, F. H., Haymore, B. L., Engineered metal-binding proteins: purification to protein folding. *Science* 1991, 252, 1796–1797.
  20. Block, H., Maertens, B., Spiestersbach, A., Brinker, N. et al., Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol* 2009, 463, 439–473.
  21. Wang, F., Chmil, C., Pierce, F., Ganapathy, K. et al., Immobilized metal affinity chromatography and human serum proteomics. *J. Chromatogr. B* 2013, 934, 26–33.
  22. Richardson, M. A., Gerlitz, B., Grinnell, B. W., Enhancing protein C interaction with thrombin results in a clot-activated anticoagulant. *Nature* 1992, 360, 261–264.
  23. Feffer, S. E., Carosino, L. S., Fox, R. L., Acquired protein C deficiency in patients with breast cancer receiving cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Cancer* 1989, 63, 1303–1307.
  24. Denizli, A., Alkan, M., Garipcan, B., Ozkara, S., Piskin, E., Novel metal-chelate affinity adsorbent for purification of immunoglobulin-G from human plasma. *J. Chromatogr. B* 2003, 795, 93–103.
  25. Hari, P. R., Paul, W., Sharma, C. P., Adsorption of human IgG on Cu (2+)-immobilized cellulose affinity membrane: preliminary study. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 50, 110–113.
  26. Xu, G., Paige, J. S., Jaffrey, S. R., Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat. Biotechnol.* 2010, 28, 868–873.
  27. Haudenschild, D. R., Eldridge, A., Lein, P. J., Chromy, B. A., High abundant protein removal from rodent blood for biomarker discovery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014, 455, 84–89.
  28. Huang, L., Harvie, G., Feitelson, J. S., Gramatikoff, K. et al., Immunoaffinity separation of plasma proteins by IgY microbeads: meeting the needs of proteomic sample preparation and analysis. *Proteomics* 2005, 5, 3314–3328.
  29. Zolotarjova, N., Martosella, J., Nicol, G., Bailey, J. et al., Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics* 2005, 5, 3304–3313.
  30. Tan, S. H., Mohamedali, A., Kapur, A., Baker, M. S., Ultradepletion of human plasma using chicken antibodies: a proof of concept study. *J. Proteome Res.* 2013, 12, 2399–2413.
  31. Zhou, M., Lucas, D. A., Chan, K. C., Issaq, H. J. et al., An investigation into the human serum “interactome”. *Electrophoresis* 2004, 25, 1289–1298.
  32. Lee, H. J., Lee, E. Y., Kwon, M. S., Paik, Y. K., Biomarker discovery from the plasma proteome using multidimensional fractionation proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006, 10, 42–49.
  33. Lesur, A., Ancheva, L., Kim, Y. J., Berchem, G. et al., Screening protein isoforms predictive for cancer using immunoaffinity capture and fast LC-MS in PRM mode. *Proteomics Clin. Appl.* 2015, 9, 695–705.
  34. Karisch, R., Fernandez, M., Taylor, P., Virtanen, C. et al., Global proteomic assessment of the classical proteintyrosine phosphatome and “Redoxome”. *Cell* 2011, 146, 826–840.
  35. Anderson, L., Hunter, C. L. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 2006, 5, 573–588.
  36. Wu, C., Duan, J., Liu, T., Smith, R. D., Qian, W. J., Contributions of immunoaffinity chromatography to deep proteome profiling of human biofluids. *J. Chromatogr. B* 2016, 1021, 57–68.
  37. Layton, D., Laverty, C., Nice, E. C., Design and operation of an automated high-throughput monoclonal antibody facility. *Biophys. Rev.* 2012, 5, 47–55.
  38. Pacholarz, K. J., Garlish, R. A., Taylor, R. J., Barran, P. E., Mass spectrometry based tools to investigate proteinligand interactions for drug discovery. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 4335–4355.
  39. Bensimon, A., Heck, A. J., Aebersold, R., Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annu. Rev. Biochem.* 2012, 81, 379–405.
  40. Ahrens, C. H., Brunner, E., Qeli, E., Basler, K., Aebersold, R., Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010, 11, 789–801.
  41. Guo, X., Hao, Y., Kamilijiang, M., Hasimu, A. et al., Potential predictive plasma biomarkers for cervical cancer by 2D-DIGE proteomics and ingenuity pathway analysis. *Tumour Biol.* 2015, 36, 1711–1720.
  42. Brauer, H. A., Lampe, P. D., Yasui, Y. Y., Hamajima, N., Stolowitz, M. L., Biochips that sequentially capture and focus antigens for immunoaffinity MALDI-TOF MS: a new tool for biomarker verification. *Proteomics* 2010, 10, 3922–3927.
  43. Longuespee, R., Casadonte, R., Kriegsmann, M., Pottier, C. et al., MALDI mass spectrometry imaging: a cutting-edge tool for fundamental and clinical histopathology. *Proteomics Clin. Appl.* 2016, 10, 701–719.
  44. Soltwisch, J., Kettling, H., Vens-Cappell, S., Wiegelmann, M. et al., Mass spectrometry imaging with laser-induced postionization. *Science* 2015, 348, 211–215.
  45. Lou, S., Balluff, B., de Graaff, M. A., Clevens, A. H. et al., Highgrade sarcoma diagnosis and prognosis: biomarker discovery by mass spectrometry imaging. *Proteomics*

- 2016, 16, 1802–1813.
46. Van de Ven, S. M., Bemis, K. D., Lau, K., Adusumilli, R. et al., Protein biomarkers on tissue as imaged via MALDI mass spectrometry: a systematic approach to study the limits of detection. *Proteomics* 2016, 16, 1660–1669.
  47. Na, C. H., Hong, J. H., Kim, W. S., Shanta, S. R. et al., Identification of protein markers specific for papillary renal cell carcinoma using imaging mass spectrometry. *Mol. Cells* 2015, 38, 624–629.
  48. Goto, T., Terada, N., Inoue, T., Nakayama, K. et al., The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. *PLoS One* 2014, 9, e90242.
  49. Frank, R., Hargreaves, R., Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 2, 566–580.
  50. Aebersold, R., Mann, M., Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003, 422, 198–207.
  51. Gundry, R. L., White, M. Y., Murray, C. I., Kane, L. A. et al., Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2009, Chapter 10, Unit 10.25
  52. Engwegen, J. Y., Gast, M. C., Schellens, J. H., Beijnen, J. H., Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006, 27, 251–259.
  53. Hung, K. E., Yu, K. H., Proteomic approaches to cancer biomarkers. *Gastroenterology*. 2010, 138, 46–51 e41.
  54. Mateo, J., Carreira, S., Sandhu, S., Miranda, S. et al., DNA repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 2015, 373, 1697–1708.
  55. Gann, P. H., Hennekens, C. H., Stampfer, M. J., A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *JAMA* 1995, 273, 289–294.
  56. Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R. et al., Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001, 412, 822–826.
  57. Rantalainen, M., Cloarec, O., Beckonert, O., Wilson, I. D. et al., Statistically integrated metabolomic-proteomic studies on a human prostate cancer xenograft model in mice. *J. Proteome Res.* 2006, 5, 2642–2655.
  58. Nazarian, A., Lawlor, K., Yi, S. S., Philip, J. et al., Inhibition of circulating dipeptidyl peptidase 4 activity in patients with metastatic prostate cancer. *Mol. Cell. Proteomics*. 2014, 13, 3082–3096.
  59. Kalin, M., Cima, I., Schiess, R., Fankhauser, N. et al., Novel prognostic markers in the serum of patients with castration-resistant prostate cancer derived from quantitative analysis of the pten conditional knockout mouse proteome. *Eur. Urol.* 2011, 60, 1235–1243.
  60. Poon, T. C., Sung, J. J., Chow, S. M., Ng, E. K. et al., Diagnosis of gastric cancer by serum proteomic fingerprinting. *Gastroenterology*. 2006, 130, 1858–1864.
  61. Kudo, M., Surveillance, diagnosis, treatment, and outcome of liver cancer in Japan. *Liver Cancer* 2015, 4, 39–50.
  62. Sato, Y., Nakata, K., Kato, Y., Shima, M. et al., Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. *N. Engl. J. Med.* 1993, 328, 1802–1806.
  63. Shang, S., Plymoth, A., Ge, S., Feng, Z. et al., Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012, 55, 483–490.
  64. Ahn, Y. H., Shin, P. M., Oh, N. R., Park, G. W. et al., A lectin-coupled, targeted proteomic mass spectrometry (MRM MS) platform for identification of multiple liver cancer biomarkers in human plasma. *J. Proteomics* 2012, 75, 5507–5515.
  65. Ferrin, G., Ranchal, I., Llamaza, C., Rodriguez-Peralvarez, M. L. et al., Identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma in plasma of HCV-infected cirrhotic patients by 2-D DIGE. *Liver Int.* 2014, 34, 438–446.
  66. Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N. et al., Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2015, 372, 2018–2028.
  67. Leighl, N. B., Treatment paradigms for patients with metastatic non-small-cell lung cancer: first-, second-, and third-line. *Curr. Oncol.* 2012, 19, S52–S58.
  68. Guergova-Kuras, M., Kurucz, I., Hempel, W., Tardieu, N. et al., Discovery of lung cancer biomarkers by profiling the plasma proteome with monoclonal antibody libraries. *Mol. Cell. Proteomics* 2011, 10, M111.010298.
  69. Cheng, Z. Z., Corey, M. J., Parepalo, M., Majno, S. et al., Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer. *Clin. Chem.* 2005, 51, 856–863.
  70. Yu, K. H., Rustgi, A. K., Blair, I. A., Characterization of proteins in human pancreatic cancer serum using differential gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2005, 4, 1742–1751.
  71. Tan, F., Jiang, Y., Sun, N., Chen, Z. et al., Identification of isocitrate dehydrogenase 1 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer by proteomic analysis. *Mol. Cell. Proteomics*. 2012, 11, M111.008821.
  72. Seton-Rogers, S., Pancreatic cancer: a matter of timing. *Nat. Rev. Cancer*. 2015, 15, 256–257.
  73. Chen, R., Pan, S., Brentnall, T. A., Aebersold, R., Proteomic profiling of pancreatic cancer for biomarker discovery. *Mol. Cell. Proteomics* 2005, 4, 523–533.
  74. Kakisaka, T., Kondo, T., Okano, T., Fujii, K. et al., Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein in pancreatic cancer. *J. Chromatogr. B* 2007, 852, 257–267.
  75. Faca, V. M., Song, K. S., Wang, H., Zhang, Q. et al., A mouse to human search for plasma proteome changes associated with pancreatic tumor development. *PLoS Med.* 2008, 5, e123.
  76. Saldanha, R. G., Molloy, M. P., Bdeir, K., Cines, D. B. et al., Proteomic identification of lynchpin urokinase plasminogen activator receptor protein interactions associated with epithelial cancer malignancy. *J. Proteome Res.* 2007, 6, 1016–1028.