

Proteomiks nedir? Tiroid hastalıklarıyla ilgili araştırmalarda proteomiks

What is proteomics? Proteomics in thyroid diseases research

Gürler Akpınar¹, Murat Kasap¹, Zeynep Cantürk², Nuh Zafer Cantürk³

¹Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Klinik Araştırmalar Birimi Proteomiks Laboratuvarı, Kocaeli

²Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma BD, Kocaeli

³Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD, Kocaeli

Özet

Son yıllarda “OMICS” teknolojileri gelişen alanlardan biridir. Özellikle kanser tanı ve prognozunu kolaylaştıran biyoışaretleyicilerin belirlenebilmesi için kanser araştırmalarında geniş şekilde kullanılmaktadır. Bu araştırmaların esas amacı cerrahi öncesi malign ve benign neoplazmalar arasında ayırıcı tanı yapabilmek için yöntem geliştirmektir. Bu makalede biz tiroid tümör araştırmalarında proteomiks uygulamalarını tartışmayı amaçladık. İlk olarak proteomiks nedir onu anlattık. İkinci olarak da insanlarda tiroid hastalıkları ile ilgili yayınlanmış proteomiks çalışmalarının sonuçlarını özetledik. Sonuç olarak tiroid neoplazmaları için işe yarar işaretleyicileri belirlemek ve tiroid kanser biyolojisi ile ilgili bilgilerimizi derinleştirmek için daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu kanaatine vardık.

Anahtar sözcükler: tiroid, proteomiks

Abstract

In recent years “OMICS” technologies are one of developing fields and are becoming widely used in cancer research especially for the discovery of biomarkers facilitating diagnosis and prognosis of cancer patients. Scientists have long been searching for useful markers in patients with thyroid neoplasms. The major goal of this research is to discover markers to distinguish between malignant and benign thyroid tumors prior to surgery. In this manuscript we aimed to discuss the application of proteomics to thyroid tumor research. Firstly we gave a definition of proteomics and secondly we summarized the results of published proteomics studies on human thyroid disease. We conclude that there is a need for further studies to identify useful markers for thyroid tumors which will also serve to deepen our understanding of thyroid cancer biology.

Keywords: thyroid, proteomics

Proteomiks

Yeni bir yaklaşım olarak önemi giderek artan “proteomics” çalışmaları, özellikle insan genom projesinin tamamlanmasının ardından hız kazanmış ve yaygın bir uygulama alanı bulmuştur. Genom araştırmaları, özellikle insan genom projesi, genlerin yapı, fonksiyon ve ekspresyonlarına ait ayrıntılı bilgileri gün ışığına çıkarmıştır. Bunun yanında genom projesi genetik bilginin organizma tarafından nasıl kullanıldığını açıklamakta

yetersiz kalmıştır. Bu noktadan sonra genetik bilginin son ürünü olan proteinlerin işlev, yapı ve yerlerini belirlemek amaçlı yeni bir yaklaşım olan ve “genom sonrası çağ” olarak belirlenen proteomiks uygulamaları her geçen gün önemini artırmıştır.

Proteomikse ilişkin araştırmaların tarihi protein çalışmaları ile başlasa da bilinen anlamı ile metot olarak kökenleri 1975’li yıllara uzanmaktadır¹. “Proteom” terimi ise ilk defa 1994 yılında bir sempozyumda Marc Wilkins ve ark. tarafından bir genomun ifade ettiği tüm

Yazışma Adresi | Correspondence: Prof.Dr.Nuh Zafer Cantürk
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı Umuttepe
Kocaeli, Tel: (0262) 303 07 41; Faks:0.262.3037003
e-posta: canturkz@yahoo.com

Başvuru tarihi | Submitted on: 28.06.2011

Kabul tarihi | Accepted on:24.08.2011

proteinleri tanımlamak için önerilmiş (PROTein-ge-nOME) ve 1995 yılında doktora tezinin parçası olarak bilim literatürüne kazandırılmıştır². Daha genel bir tanımlama ile “proteom” terimi, belirli bir anda ve şartlar altında hücrenin veya organizmanın sahip olduğu proteinlerin tümünü tanımlamak için kullanılmaktadır. Bir organizmada genomun değişmeyen doğasının tam tersi şekilde proteomun içeriği dokudan dokuya hatta bir hücreden diğer bir hücreye farklılaşabilmekte, çevresel faktörler, yaş, cinsiyet, hastalıklar ve fizyolojik durumlar (hücre siklusu, apoptoz gibi) gibi iç ve dış faktörlere etkileşerek değişim gösterebilmektedir.

Son yıllarda, biyomedikal araştırmalarda genomiks (genomics) baskın araştırma alanı olsa da proteomiks alanında araştırmalar bilimsel araştırma grupları ve klinik araştırma laboratuvarlarında çok hızlı bir şekilde yayılmakta ve genomiks’in yerini almaktadır. Bu eksen kaymasının en önemli sebebi, biyolojik örnek olarak proteinlerin bir organizmanın o an içinde bulunduğu fizyolojik durumunu yansıtmasıdır, bu özelliği ile özellikle klinik araştırmalarda hastalıkların teşhis ve ilerle-yişinin belirlenmesinde büyük öneme sahiptir.

Genom ve proteom

Çalışma alanı olarak hedef makromoleküller göz önüne alınarak genomiks ve proteomiks kavramları karşılaştırıldığında, proteomiks çok daha karmaşık ve zor bir alan olduğu ortaya çıkacaktır. DNA ve proteinlerin kabaca genel özelliklerine bakılması bile bu karmaşıklığın ve zorluğun nedenini ortaya koyacaktır (Tablo 1). Proteinlerin aminoasit dizileri ait oldukları gen tarafından belirlenmekle birlikte sadece genetik kodun kendisi bir protein hakkındaki tüm bilgiyi sağlamaz. Yalnız dört nükleotidin kombinasyonundan oluşan sabit, esnek olmayan tek boyutlu genomik organizasyonun aksine proteinlerde kodlanan bilgi sadece aminoasit dizeleriyle sınırlı deęildir³. Genler tarafından kodlanan mesajcı RNA’nın (mRNA) birden çok alternatif işleniş şekillerinin olması (alternative splicing), protein sentezi sonrası meydana gelen füzyonlar ve post-translasyonel

modifikasyonlar gibi düzenlemeler proteomun sıkı bir şekilde kontrol edilen dinamik yapısını, çok boyutluluğunu, değişkenliğini etkilemektedir. Bu durum gen sayısından çok daha fazla sayıda özgün protein molekülünün nasıl oluştuğunu açıklamaktadır⁴.

Genomiks çalışmaları, hastalıklar ve ilgili genler arasındaki ilişkinin bir kısmını ortaya koymasına rağmen son ürün olan proteinlerin çoğunun maruz kaldığı translasyon sonrası modifikasyonları post translation modifications (PTM) öngöremez ve bunlarla hastalıklar arasındaki ilişkiyi kuramaz. DNA/RNA elde edilmesi ve çalışılması kolay örnekler olmasına rağmen bunlardan elde edilen bilgide sınırlamalar mevcuttur. Bir hücredeki gen dizisi bilgilerinin ve gen aktivite motiflerinin niçin proteinlerin miktar, nihai yapıları veya aktivite durumları hakkındaki doğru profilleri yansıtmadığını gösteren pek çok sebep vardır. Ribozomların sentezi sonrası proteinler başlangıç, geçiş ve sinyal peptidlerinden kurtularak basit kimyasal grupların veya kompleks moleküllerin eklenmesi ile translasyon sonrası modifikasyona uğrarlar. Bir gen transkripti proteine çevrilmeden önce pek çok değişik şekilde işlenebilir. Translasyonun ardından, çoğu protein translasyon sonrası modifikasyonlar yoluyla kimyasal olarak değiştirilirler. En çok gözlenen modifikasyonlar proteinlere karbonhidrat ve fosfat gruplarının eklenmesi ile olmaktadır. Bu gibi modifikasyonlar, proteinlerin fonksiyonları üzerinde çok önemli etkileri olmasına rağmen genler tarafından kontrol edilmezler. Sabit ve dinamik 300’den fazla PTM belirlenmiştir, bunlardan başlıcaları fosforilasyon, glikolizasyon, asetilasyon, deaminasyon, sülfasyon, palmitoylasyondur. Sonuç olarak tek bir gen 50’den fazla farklı proteini kodlayabilir. Genom Projesinin tamamlanmasının ardından insanda yaklaşık olarak 20.000 ila 25.000 arasında protein kodlayan genin var olduğu tahmin edilmektedir. Bu genler potansiyel olarak 25.000 farklı proteini kodlamaktadır, fakat mRNA’nın farklı kesilmeleri (alternative splicing) ve PTM’ler göz önüne alındığında bu sayı 2.000.000 protein veya protein fragmentine ulaşabilmektedir^{5,6,8}.

Tablo 1: DNA ve proteinlerin genel olarak karşılaştırılması

DNA	Proteinler
Sabit bir yapıya sahiptir.	Dinamiktir ve başka proteinlerle interaksiyon yapabilir.
PCR ile çoğaltılması mümkündür.	Basit bir metotla tek basamakta çoğaltulamaz.
Karmaşık bir yapıya sahip değildir.	Sentez sonrası modifikasyonlardan dolayı çok komplekstir.
Kolay ve iyi çözünür.	Proteinden proteine değişen çok farklı çözünme dereceleri vardır.
Sadece dört nükleotidden meydana gelen basit, sade bir diziyeye sahiptir.	Yirmi modifiye olmamış ve pek çok modifiye olmuş aminoasitten meydana gelen karmaşık bir makromoleküldür.

Aktif bir proteinin aminoasit sırası DNA dizi analizi ile önceden belirlenemediği gibi, belirlenen RNA seviyeleri hücredeki doğru protein miktarlarını da yüzde yüz doğrulukta yansıtmamaktadır PTM'ler ve mRNA farklı kesimleri de hesaba katıldığında her bir genden çok sayıda farklı protein elde edildiği görülecektir⁷.

Yukarıda bir kısımdan bahsedilen pek çok kısıtlamadan dolayı, DNA ve RNA'dan yola çıkarak hücrelerde fonksiyonel görev yapan proteinler hakkında kesin verilere ulaşmak mümkün değildir. Bundan dolayı proteomiks alanı, gen ekspresyonunun proteom seviyesinde incelenmesine olanak sağlayan, nispeten yeni ve bilimin çok hızlı şekilde gelişen bir bilim dalıdır.

Proteomiks denildiğinde sadece proteinlerin adlandırılması anlaşılmalıdır. Yaşlanmaya, strese ve ilaçlara verilen cevaplarda, hastalık durumlarında değişen protein profillerinin belirlenmesi, proteinlerin miktarlarının tayin edilmesi (quantification), hücre, doku ve organ seviyesinde lokalizasyonları, sahip oldukları transkripsiyon sonrası modifikasyonların betimlenmesi, yapı ve fonksiyonlarının ortaya çıkarılmasının yanında mümkün olan protein-protein ilişkilerinin ortaya konması proteomiks çalışmalarının başlıca alt başlıkları arasındadır.

Proteomiks alanında çalışmalar, hastalık ve sağlık koşullarında farklı şekilde eksprese olan proteinlerin belirlenmesi, araştırılması ve tanımlanması için çok geniş bir fırsat sunmuştur. Bu alana odaklanmış olan klinik proteomiks çalışmaları sayesinde daha iyi diagnostik ve prognostik işaretleyicilerin (biomarker'ların) geliştirilmesi, yeni tedavi hedeflerinin keşfi ve en sonunda kişiye özgü tedavilerin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Klinikte kullanılacak iyi bir protein biyoişaretleyicinin (biomarker) özellikleri

Meydana gelen bir patolojik süreçte doğru ve hızlı tanı hastanın tedavisini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Tanı amaçlı kullanılacak olan bir biyon, normal biyolojik veya hastalığa ait süreçlere ait objektif olarak ölçülebilen ve değerlendirilen bir işaretleyicidir. Patolojik duruma bağlı olarak değişimleri gözlenebilen bir biyoişaretleyici, yüksek risk altındaki bireyleri izleme imkanı verdiği gibi, hastalığın tedavi edilebilir erken bir safhasında teşhisini de kolaylaştırmaktadır. İdeal bir biyoişaretleyicinin genel olarak şu özelliklerinin olması beklenmektedir. **(a)** belirli bir hastalık için ileri derecede özgül olmalıdır; **(b)** yüksek hassasiyete sahip olmalıdır; **(c)** kolay kullanımı olmalıdır; **(d)** standart sonuç vermelidir; **(e)** tekrarı kolay olmalıdır; **(f)** kullanılacak örnek mümkün olduğunca kolay elde edilmelidir ve **(g)** sonucu değerlendirecek olan klinisyen için açık ve kolay anlaşılabilir olmalıdır. Bütün bu sayılanlar bir klinik kullanımını etkileyecek faktörlerdir. Teorik olarak her bir hastalık kendine özel biyoişaretleyici ile belirlenebilir ve

tanımlanabilir olmalıdır. Fakat çoğu hastalık durumu için biyoişaretleyiciler, panel olarak artan ya da azalan proteinlere bakılarak veya değişen transkripsiyon sonrası modifikasyonların özellikleri araştırılarak bulunmaya çalışılmaktadır.

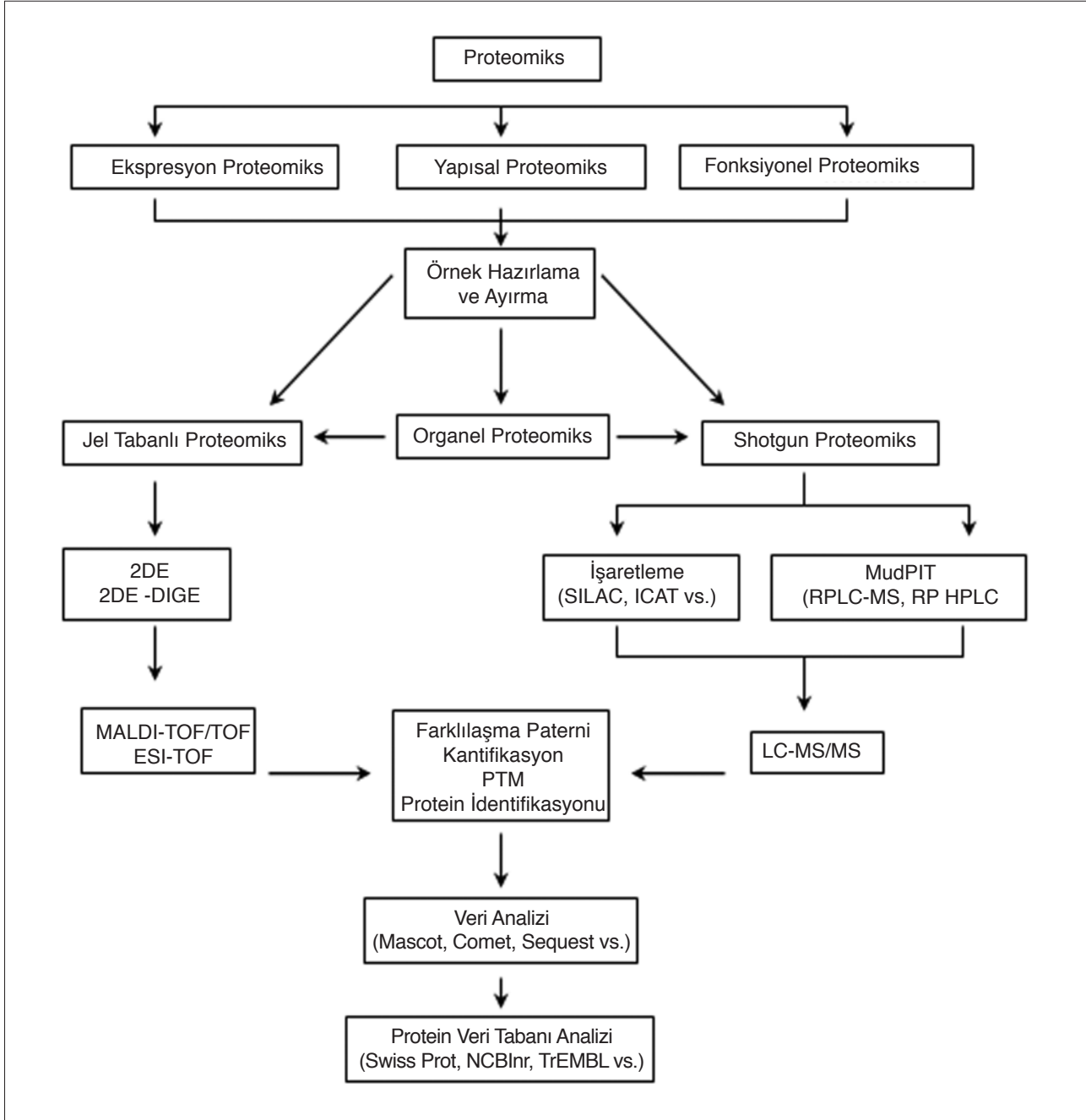
Tedavi ve tanı amaçlı protein biyoişaretleyici panelin keşfedilmesi günümüzde klinik proteomikse ilişkin klinik çalışmaların en önemli ilgi alanlarından birisidir. Dokulardan klinik olarak kolay ulaşılabilen biyolojik sıvılara (kan, idrar, BOS vb.) sızan peptid ve proteinler biyoişaretleyici arayışında en sık kullanılan kaynaklardır. Kullanılabilecek pek çok vücut sıvısı arasında kan, kolay erişilebilir, en az invazif, ucuz ve plazmaya çevrilmesi pek çok klinik laboratuvarında kolaylıkla yapılabilir olmasından dolayı en çok tercih edilmektedir⁹.

Bir proteomiks çalışmasında en önemli aşamalardan biri öncelikle araştırmanın yapılacağı konuya uygun örnek materyalinin seçilmesi ve bu materyalden protein özütünün elde edilmesidir. Klinik proteomiks çalışmaları göz önüne alındığında karşımıza en sık örnek elde edilen üç kaynak çıkmaktadır. Bunlar biyolojik sıvılar, doku örneği ve hücre kültürü örnekleridir. Çalışılacak her bir örneğin kaynağına ve proteomiks uygulamasına bağlı olarak protein özütünün elde edilme metodu da farklılaşmaktadır. Proteomiks çalışmalarında kullanılan teknolojileri ve kullanım alanlarını tanımlamaya çalışacağız.

Protein ayırma metotları

Proteinlerin kütle spektrometresi (Mass Spectrometry, MS) kullanılarak belirlenmeleri ve adlandırılmaları proteomiks analizlerde kullanılan en temel yaklaşımdır. Protein veya daha karmaşık bileşim örneklerinin MS analizleri için hazırlanmalarında pek çok adımı içeren ayırma metotları kullanılmaktadır. Proteinlerin, MS analizinde kullanılmak üzere kimyasal veya enzimatik olarak peptid seviyesinde parçalanmaları gerekmektedir. Protein ayırma stratejilerinin temel adımları protein örneklerinin kesim için hazırlanmaları, araştırılan herhangi bir peptidin zenginleştirilmesi, MS analizinde kullanılacak peptid karışımının tuzlardan uzaklaştırılması ve temizlenmesidir (Şekil 1).

Proteom analizlerinde parçalanmamış protein ayırımı ve peptid ayırımı olarak iki genel yaklaşım sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Özellikle protein ve protein komplekslerinin ayırımında kullanılan metotlar arasında bir ve iki boyutlu jel elektroforezi (1-DE ve 2-DE), bir ve iki boyutlu sıvı kromatografisi (1D LC ve 2D LC) ve afinite kromatografisi bulunmaktadır. Peptid ayırımı için ise daha sınırlı ayırım metotları ile ana proteini temsil eden peptidlerin elde edilmesinde fosfopeptid zenginleştirilmesi ve ters faz kromatografisi (reversed-phase chromatography) teknikleri kullanılmaktadır¹⁷.

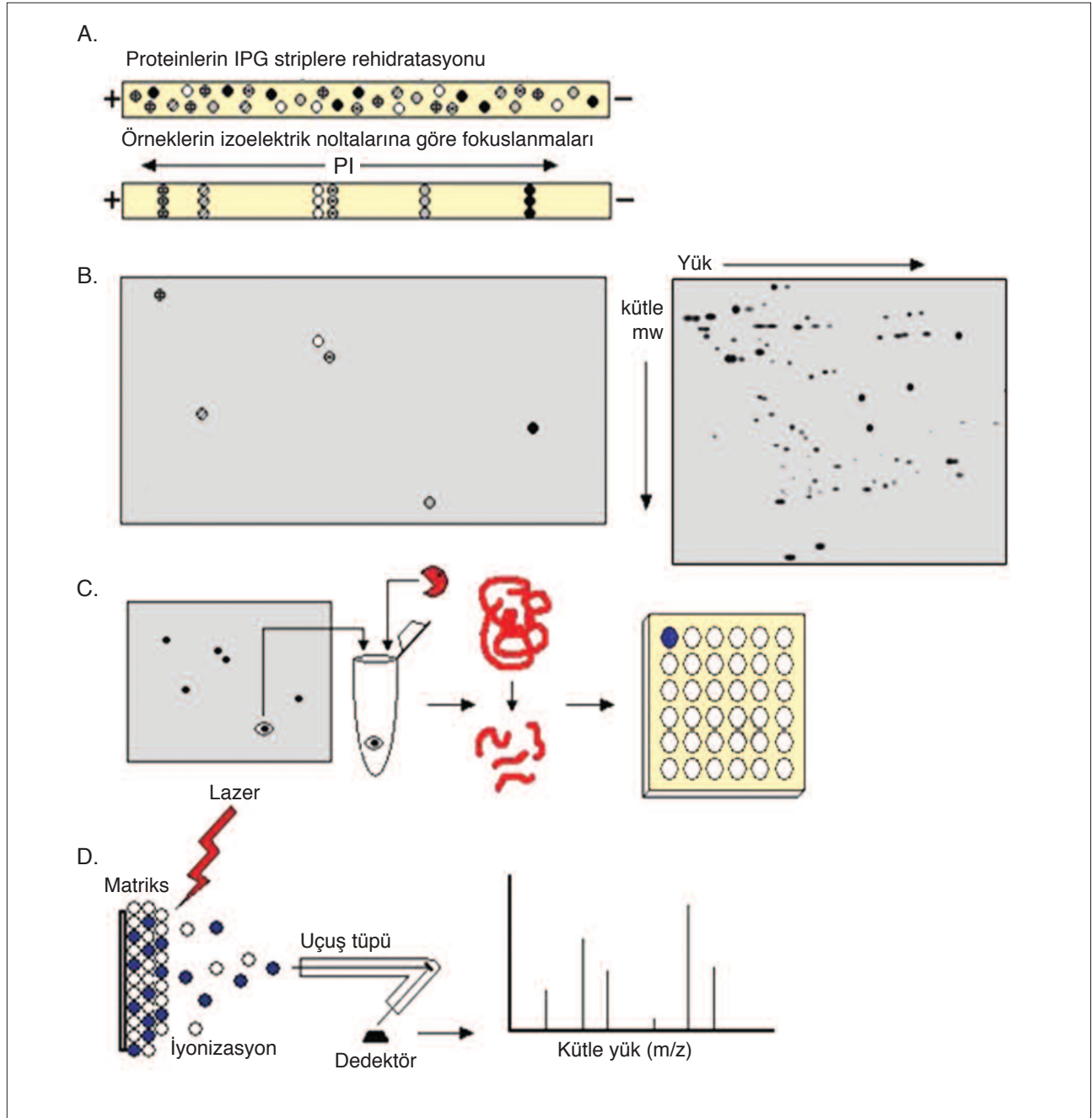


Şekil 1. Genel olarak proteomiks çalışmalarının akış şeması

İki boyutlu jel elektroforezi (2-D PAGE)

İlk bilim sahnesine çıktığı 1975 yılından bu yana, proteinlerin kütle (MW) ve izoelektrik noktalarına (pI) göre ayırılmalarının yapıldığı etkili ve güvenilir metot olarak iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2-D PAGE) kullanılmaya devam etmektedir¹. Bu iki boyutlu yöntem ile binlerce farklı proteini tek jel üzerinde birbi-

rinden ayırmak mümkündür. Bu metotta ilk önce proteinler izoelektrik noktalarına göre birinci boyutta ayrılırlar. Daha sonra ise kütlelerine göre ikinci boyutta ayırma tabi tutulurlar. Odaklama (focusing) esnasında proteinler değişmeyen pH gradyant jeller (IPG strip) üzerinde izoelektrik noktalarına göre hareket ederler (Şekil 2). İkinci boyutta ayırım ise değişik yüzdelerdeki lineer veya gradyant sodyum dedosil sülfat jelleri (SDS-



Şekil 2. Protein örneklerinin 2D jellerle ve MALDI ile analizi. Biyolojik örneklerden elde edilen protein özütlünün IPG striplere rehidratasyonu ve odaklanması (A). Odaklanma esnasında izoelektrik noktalarına göre ayrılan proteinler 2D jellerde moleküler büyüklüklerine göre ayırma tabii tutulurlar (B). Jellerin uygun bilgisayar programlarında analizleri sonucunda belirlenen farklılaşmış protein spotlarının kesilerek, uygun proteolitik enzimlerle peptidlerine ayrılması ve MALDI plaklarına yerleştirilmeleri (C). İyonizasyon sonrası peptidlerin m/z oranlarının bulunması ve veri tabanı analizi (D).

PAGE) kullanılarak proteinlerin kütle büyüklüklerine göre yapılır^{11,12}. Bu teknik insan hücre kültürü, doku ve serum proteom analizlerinde ön fraksiyonlama veya zenginleştirmeye ihtiyaç duyulmaksızın kullanılabilir⁶. Bu transasyon sonrası modifikasyonlarında

belirlenebildiği oldukça güçlü bir ayırma yöntemi olarak klinik proteomik çalışmalarının vazgeçilmez bir tekniğidir. 2D jeller üzerindeki protein spotları Coomassie mavisi G-250, R-250, gümüş, SYPRO Ruby ve Deep Purple gibi boyalar kullanılarak görünür hale getirile-

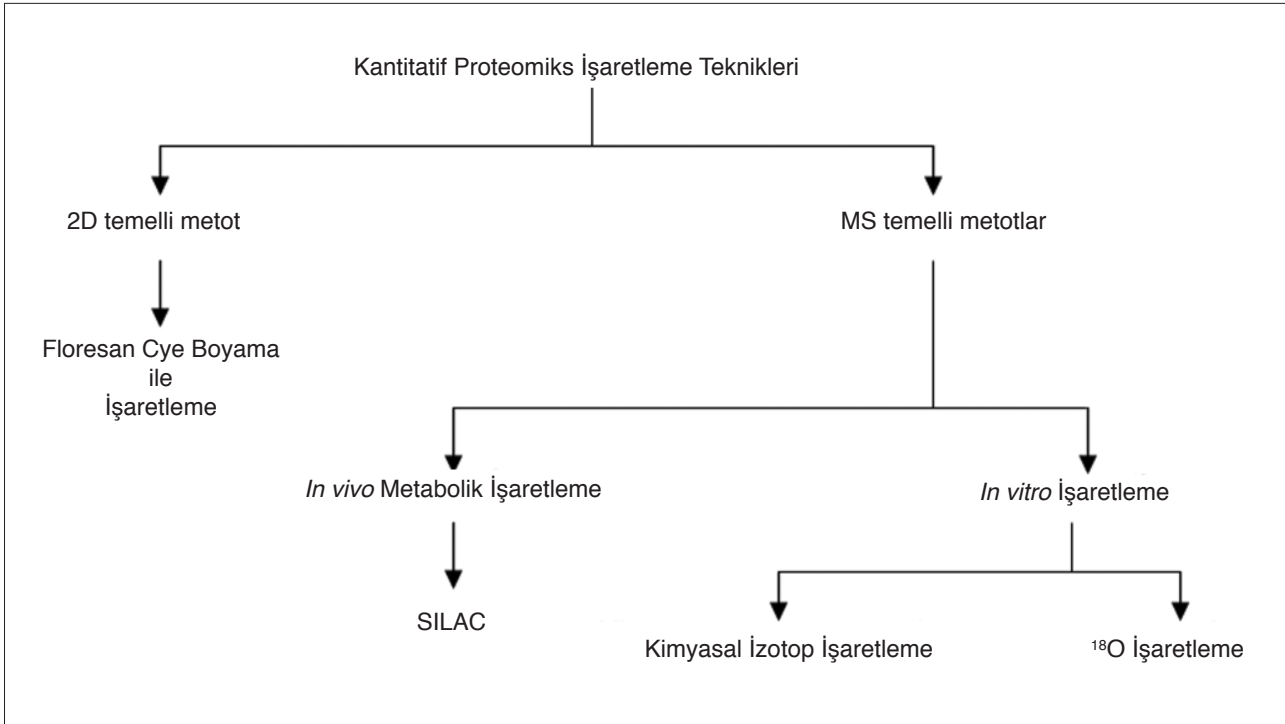
bilir. Bu boyama metotları arasında en yüksek çözünürlüğe sahip olanları gümüş ve SYPRO Ruby boyamalar olmasına rağmen gümüş boyama daha ileri MS için uygun değildir. Görünür hale getirilen jeller uygun ışık kaynağı ve kameralar kullanarak daha ileri analizlerin yapılmasına izin verecek formatta kaydedilebilir.

Değişik floresan boya kullanıldığı farklı jel elektroforezi (Difference Gel Electrophoresis, DIGE) son yıllarda 2D jel analizlerinde sıkça kullanılan ve büyük avantajlar sağlayan bir metot olmuştur. Bu metot odaklama öncesi protein örnekleri üzerindeki lizin gruplarının floresan bir boya olan Cyanin (Cy) ile direkt olarak işaretlenmesi prensibine dayanmaktadır¹³. Bu metodu en güçlü kılan özellik, birden fazla örneği farklı Cy boya- larla (CyDye) işaretleyerek aynı jel üzerinde yürütüp görüntülemeye olanak vermesidir. Bu sayede farklı örneklerden elde edilecek olan jelden jelle farklılaşmalar ortadan kaldırılabilir, spotlar arasındaki eşleştirme zorlukları en aza indirgenmekte ve tek bir jel sayesinde çok daha kesin sonuçlar daha basitçe elde edilebilmektedir. CyDye'ler kullanılarak yapılan çalışmalar arasında en yaygın olan deneysel plan, iç standardın Cy2 ile işaretlenirken kontrol ve hasta/deney grubunun ise Cy3 veya Cy5 kullanılarak işaretlenmesidir. Analiz esnasında iç standarda göre yapılan sinyal normalizasyonu sonrasında iki grup arasında hem kantitatif hem de kalitatif karşılaştırma istatistiki olarak kolayca ya-

pılabilmektedir. Bu boya- ların görüntülenmesinde her biri için ayrı lazer kaynakları ve filtreler gerekmektedir. CyDye'ler kullanıldığında işaretlenen proteinin kütle- sinde 500 Da artış olduğunu daha sonraki analizler sırasında unutmamak gerekmektedir. Her ne kadar bu floresan boya- lar lizin aminoasidine bağlansa da daha sonra gerçekleştirilecek olan tripsin kesimi ve TOF/MS analizleri için sorun oluşturmamaktadır^{14,15}.

Sıvı Kromatografisi

Bir ve iki boyutlu sıvı kromatografisi (Liquid Chromatography, LC) proteomikste protein ayırımında kullanılan en güçlü metotlardandır. Bir boyutlu sıvı kromatografisi proteinlerin büyüklük (MW), yük (pI) veya hidrofobisite gibi kimyasal özelliklerini kullanarak ayırım yapar. En yaygın olarak kullanılan 1D LC ters faz kromatografisidir. Bu yöntemde proteinlerin ayırımı hidrofobisitelerine dayanılarak yapılmaktadır. 1D LC en sıklıkla MS analizi öncesi peptid ayırımında kullanılmaktadır fakat aynı zamanda proteinlerin enzimatik kesimleri ve MS analizi amaçlı protein ayırımında da kullanılmaktadır. 2D LC'de ise proteinler ilk boyutta izoelektrik kromatografisi (pI) ikinci boyutta hidrofobisitelerine göre ayırma tabi tutulurlar. İki boyutlu jel elektroforezi ve sıvı kromatografisi gibi tekniklerin kombine olarak kullanılması ayırım gücünü artırmakta ve



Sekil 3. Sıklıkla kantitatif analizler için kullanılan protein ve peptid işaretleme yöntemleri

özellikle protein izoformlarının ve translasyon sonrası modifikasyonların (PTMs) belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır²².

İzotopik işaretleme

İzotopik işaretleme *in vivo* veya *in vitro* olarak yapılabilmektedir. Farklı izotopların protein ve peptidlerin yapısına katılması ve daha sonrasında araştırılan protein veya peptidlerin (ağır izotop) kontrollerle (işaretlenmiş veya hafif izotop) karşılaştırılması prensibinden yola çıkılarak geliştirilmiştir. Özellikle jelden arınmış (gel-free) kantitatif proteomiks yapmaya olanak sağlayan hücre kültüründe aminoasitlerle stabil izotopla işaretleme/Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC) ve izotop eklenmiş kuyruk Isotope-Coded Affinity Tags (ICAT) teknikleri sıklıkla karşımıza çıkmaktadır (Şekil 3).

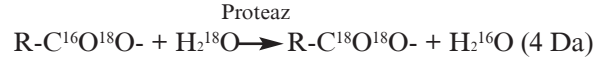
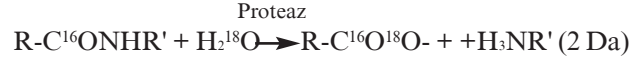
Hücre Kültüründe Aminoasitlerle Stabil İzotopla İşaretleme (SILAC)

Özellikle hücre kültürü örneklerinin kütle spektrometresi kullanarak tüm proteomu kantitatif olarak karşılaştırma olanağı sağlayan en önemli metotlardan biri stabil izotop işaretlemesidir (SILAC)¹⁶. Hücreler izotopik olarak işaretlenmiş aminoasitleri içeren (¹³C veya ¹⁵N işaretli aminoasitler) ortamda normal olarak büyüme ve gelişmelerine devam ederken bu aminoasitler bu hücrelerin proteomlarına entegre olmaktadır. Bu metotun en büyük avantajı farklı aminoasitlerle işaretlenmiş örneklerin proteoin ekstraksiyonu, ayrımı ve analizi öncesi bir araya getirilmeleri ve birlikte bu süreçlere tabi tutulmalarıdır. Böylelikle bu basamaklardan kaynaklanacak örnekler arası ayrıcalık ortadan kaldırılmaktadır. Bu teknik özellikle metabolik olarak aktif hücrelere kolaylıkla uygulanabilmektedir. Farklı izotopla işaretlenmiş aynı proteinin hangi izotopik aminoasitlerle işaretlendiğine bağlı olarak kütlede MS analizinde kolaylıkla ortaya çıkabilen bir farklılaşma meydana gelir. Sonuç olarak iki farklı izotopla işaretlenmiş hücre kültürlerinin proteomları birlikte aynı MS/MS analizine tabi tutulur, izotopların peptidler arasında yarattıkları kütle farkından dolayı seçilen peptidlerin kantitatif olarak karşılaştırılması mümkün olur¹⁷.

¹⁸O proteolitik işaretleme

¹⁸O ile yapılan proteolitik işaretleme diğer yöntemlerle kıyaslandığında, kolaylığı ve hemen uygulanabilir oluşu ile özellikle klinik uygulamalardaki biyoişaretleyici araştırmalarında tercih edilen bir yaklaşımdır. Enzimatik olarak yapılan bu işaretleme reaksiyonu, proteolitik kesim esnasında veya proteolizis sonrası

proteazlar ile beraber ikinci bir kesim sırasında gerçekleştirilir.



Kantitatif olarak karşılaştırılmak istenilen örnek gruplarından bir tanesi ¹⁶O içeren tamponda proteolitik kesime tabi tutulurken ¹⁶O işaretlenir, diğer örnek ise ¹⁸O bulunan tamponda kesilir ve ¹⁸O ile işaretlenmiş olur. Burada işaretleme proteolitik peptidlerin C-terminal karboksil gruplarındaki oksijen atomunun değiştirilmesi ile olmaktadır. Kesim sonucunda işaretlenen örnekler daha sonra 1:1 oranında karıştırılarak analiz edilir. Örnek üzerinde proteolitik olarak eklenen bir ¹⁸O atomu, peptidin kütlede 2 Da'luk bir kaymaya neden olur, eğer işaretleme tam olarak gerçekleştirilmiş ve iki ¹⁸O atomu eklenebilmişse kütledeki kayma 4 Da çıkmaktadır. Tripsin ve Glu-C gibi proteolitik enzimler iki oksijen atomu üzerinde değişiklik yaparken, Lys-N ve diğer enzimler sadece tek oksijen atomunu işaretleyebilmektedirler¹⁸⁻²⁰.

Kimyasal işaretleme

Günümüzde proteomiks araştırmalarında en sık ve yaygın olarak kullanılan kimyasal yolla işaretleyip miktar tayini yapmaktadır. Peptid veya proteinlerin üzerine eklenen tag'ların (kuyruk) farklı kimyasal reaksiyonlar yoluyla istenilen şekilde eklenebilmesi araştırmacılara birden çok sayıda işaretleme seçeneği sunmaktadır. Ancak metodolojinin çok sayıda olması, bu konuda yapılan çalışmalara geniş bir bakış imkansız kılmaktadır. Yine de bir genelleme yapmak gerekirse üç temel işaretleme stratejisi verilebilir. Bunlardan ilki, küçük molekülleri kullanarak verimi yüksek bir şekilde işaretleme yapan tekniklerdir. İkincisi katı bir destek matriksi kullanılarak peptidleri işaretleme yoludur, bu yolda işaretlenmiş peptidlerin temizlenmesi ve yüksek verimle geri kazanılması kolaydır. Son olarak üçüncü stratejide ise destek matriksi üzerine kaplanmış çözülebilir bir polimer kullanılmakta ve böylelikle daha homojen bir işaretleme sağlanabilmektedir²¹.

İzotopla işaretlenmiş kuyruk (ICAT)

Bu teknikte izotopla işaretleme SILAC'de olduğu gibi *in vivo* olarak gerçekleştirilmemektedir. Elde edilen protein yada peptid örnekleri kimyasal problemler kullanılarak işa-

Tablo 2: Tiroid dokusunda proteomik çalışmaları (24 ve 25 no'lu makalelerden adepte edilmiştir.)

Kaynak	Teknik	Bulgu
Tiroid dokusu (39)	2D jel elektroforezi	31 farklı protein eksprese edildi. Özellikle S1006A papiller tiroid kanserinde 6.5 kat fazla
Tiroid dokusu (40)	2D jel elektroforezi	Histon H2Bi sitokeratin 7 Foliküler kanserde adenoma göre daha fazla, Sitokeratin 8 78-1Da, glikoz regulated protein, calreticulin, annexin A3, α -actin
Tiroid dokusu (34)	Kantitatif 2D jel elektroforezi	Soğuk nodülde normoaktif nodüle göre Annexin A4, annexin V, apolipoprotein A-I prekürsörü, apolipoprotein, DJ-1, glutation, S transferaz π , heat şok proteini 90 v.d.
Serum (42)	SELDI-TOF-MS	Papiller karsinom ile sağıklı, papiller karsinom ile benign nodül, papiller karsinomun farklı safhaları, tiroid kanserinin farklı patolojik tiplerini ayırmaya yarayan ekspresyon paterni
Serum (43)	SELDI-TOF-MS	Benign ile papiller kanser arasında ayırma yarar
Hücre kültürü (31)	Glikoprotein denatürasyonu, sindirim, solid faz ekstraksiyonu ve ESI-MS/MS analiz identifikasyonu	Her hücre hattında ortalama 150 glikoprotein saptandı. Bazı proteinler diferansiye veya anaplastik kanser için spesifiktir.

retlenmektedir. Bu kimyasal problemler üç ana parçadan oluşmaktadır. Bunlar, belirli aminoasitlerin yan zincirlerine işaretleme yapma kapasitesindeki reaktif grup (örneğin iodosetamid sistein rezidülerini modifiye eder), bir izotopik olarak kodlanmış bağlayıcı kısım ve işaretli protein veya peptidlerin afinite izolasyonuna imkan sağlayan kuyruk (örneğin biotin) kısmıdır. İki proteomun kantitatif olarak karşılaştırması için bir örnek izotopik olarak hafif problemler işaretlenirken diğeri ağır olanla işaretlenmektedir. Hata payını en aza indirmek için iki örnek daha sonra birleştirilerek proteazlarla (örneğin tripsin) kesilir ve örnek zenginleştirmek için afinite kromatografisinin (örneğin avidin veya streptavidin) ardından LC-MS ile peptidler analiz edilir. Farklı işaretlenmiş olan peptid çiftleri arasındaki intensite oranı iki örnek arasındaki proteinlerin rölatif seviyelerini belirlemede kullanılır²¹.

Kütle spektrometresi (MS)

MS ile yapılacak analizlerde peptid ya da proteinin öncelikle gaz fazındaki iyonlara ayrılması gerekmektedir. Proteomiks uygulamalarından önce de kütle analiz cihazları kullanılmaktaydı, fakat bu cihazların özellikle iyonlaştırma yöntemleri çok şiddetli olduğunda protein ve peptidlere uygulanabilir değillerdi. Seksenli yılların sonlarında geliştirilen birbirinden farklı yumuşak iyonizasyon (soft ionization) teknikleri ile MS teknolojisinin proteomikse uygun hale gelmesi bu alanda çok büyük bir gelişmeye neden olmuştur. Bu yeni iyo-

nizasyon teknikleri sayesinde büyük molekülleri bütünselliklerini bozmadan analizi yapılacak gaz fazında iyonlara çevirmek mümkün olmuştur. Kütle spektrometresi çok küçük ağırlıktaki ve az miktarlardaki örnekleri yüksek doğrulukta analiz etme olanağı sağlamıştır. Proteinler genellikle enzimatik kesim (çoğunlukla tripsin) sonrası peptidler halinde analiz edilirler. Proteinleri, peptidleri ve diğeri analistleri kütle/yük oranına (m/z) göre sınıflandıran kütle spektrometresi kullanılmaya başlandığından günümüzde proteomiks uygulamalarının vazgeçilmez bir enstrümanıdır. MS'lerde proteomiks amaçlı olarak sıklıkla kullanılan yumuşak iyonizasyon metodları elektrosprey iyonizasyon, matriks yardımcı lazer salınım iyonizasyon Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, (MALDI) ve yüzey yardımcı lazer salınım iyonizasyonudur Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization, (SELDI)⁶. Kullanılan MS türüne bağlı olarak iyonize edilen moleküller yüksek vakum altında oluşturulmuş olan elektriksel alan vasıtasıyla kütle analizcisine içersine itilirler, burada her bir iyon m/z oranına göre belirlenirler. Peptidlerin kütlelerini belirlemek üzere farklı tiplerde kütle analizcileri geliştirilmiştir. Örneğin uçuş zamanı/Time of Flight, (TOF) analizcisinde peptidlerin yüksek vakum altında çalışan bir tüp içindeki detektöre kadar olan uçuş sürelerinden kütleleri hesaplanmaktadır. Bundan başka "Quadrupole", "Ion Trap" ve "Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR)" gibi peptid analizcilerde en sık kullanılan MS enstrümanlarıdır.

Her bir protein aminoasit dizisine bağlı olarak kendisine özel peptid kütle parmak izine Peptide Mass Fingerprint (PMF) sahiptir. MS'den elde edilen kütle spektrumları veri bankalarında karşılaştırmalı olarak araştırıldıktan sonra hangi proteine ait oldukları belirlenir. Bunun yanında MS ile peptidlerin daha ileri fragmente edilmelerinden elde edilen aminoasitlerin analiz edilmesi (MS/MS), böylelikle proteinlerin aminoasit dizilerinin elde edilmesi mümkündür ve veri analizleri yapılarak aminoasit dizisinden protein tanımlanmasına gidilebilmektedir.

Tiroid hastalıklarında proteomiks

Gerek temel bilimciler gerekse klinisyenler özellikle tiroid neoplazmalarında olmak üzere pek çok tiroid hastalığı için erken tanı ve prognoz açısından kullanışlı biyoşaretleyici bulmak için araştırmalarına yoğun şekilde devam etmektedir. Bu amaçla tiroid kanseri hastalarının biyokimyasal değerlendirmesinde serum tiroglobülini (Tg) ve kalsitonin tayininden genomik ve proteomiks araştırmalarına kadar çok sayıda alanda gerçekleştirilmektedir²³⁻²⁵ (Tablo 2). Bu araştırmalarda özellikle neoplastik tiroid hastalıklarında amaçlanan başlıca husus, cerrahiye karar vermeden önce benign ve malign ayırımını yapmaktır^{26,27}. Bunun dışında, tedaviye rehberliğin yanında tiroid hastalıklarının gelişme, progresyon ve agresifliğindeki heterojenlik nedeni ile prognozu belirlemede de işe yarayabilirler. İnce iğne biyopsisinin (İİAB) tanısız açıdan yanlış negatiflik ve pozitiflikler gösterebilmesi nedeni ile birtakım sınırlılıkları söz konusudur. Tiroid tümörü gelişimine katılan moleküler mekanizmaların anlaşılmasına başlaması ile İİAB ile aşılabilen zorlukları aşmak için moleküler araçların kullanılması gündeme gelmiştir. Preoperatif İİAB örneklerinde genomik, transkriptomik ve proteomik analizler tiroid nodüllerinin preoperatif benign ve malign ayırımında işe yarayabilir. Bu analizler operasyon kararını, seçimini ve daha etkili tedavilerin uygulanmasını sağlar²³. Bu amaçla özellikle genetik değişiklikleri kullanmak gündeme gelmiş olsa da bunlar tiroid tümörlerinin küçük bir alt grubunda etkin olmaktadır. Öte yandan soğuk nodüllerin moleküler patogenezi daha çözülememiştir²⁴. Bundan dolayı tiroid tümörlerinde farklı ekspresyon şekillerinin belirlenmesinde yeni araçlara gereksinim duyulmuştur^{24,28}. Klinik doktorlarına hastalarını yeterli ve etkin şekilde tedavi edebilmeleri amacıyla kapsamlı veriler sağlamak için tek molekül assay'den tam bir biyoşaretleyici paneline kadar değişen tanısız testler üzerinde çalışılmalıdır. Transkriptomiks ve proteomiks tarama, tanı, prognoz ve tedavi için hedefleri belirlemede kapsamlı yeni biyoşaretleyici saptanması, tiroid kanserlerinin yönetilmesinde işe yarayacak potansiyel taşımaktadır²⁴. Yukarıda da ifade edildiği gibi proteomiks terimi özel bir biyolo-

jik durumda belirli bir zaman ya da durumda eksprese edilen tüm proteinlerin toplamından oluşan proteomun bütün olarak analizidir²⁹. Araştırmalardaki temel hedef spesifik bir protein biyoşaretleyicinin belirlenmesi ve bu biyoşaretleyici ile belirli bir tiroid kanseri histotipinin eşleştirilmesi düşüncesidir. Transkriptomiks ise genom tarafından üretilen tüm mRNA ürünlerinde meydana gelen değişimlerin takip edilmesi yöntemidir.

Proteinler yapılacak çalışmaya uygun olarak serumdan, tiroid dokusundan ve hücre hatlarından farklı tekniklerle elde edilebilir ve bu örnekler ile proteomiks uygulamaları gerçekleştirilebilir^{24,30,31}.

Bu alanda ilk çalışma 2D-GE (iki boyutlu jel elektroforezi) metodunu kullanan araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Araştırmacılar deneysel modellerinde tiroid dokusunda TSH uyarısı sonrası fosforilasyon aşamasındaki değişiklikleri incelemişlerdir³². Bundan sonra ise iki boyutlu analizin tiroid dokusunda uygulanması için farklı metotlar tanımlanmıştır³³. Ancak insan tiroid dokusunda proteomiks çalışmaları için bazı örneklerden kaynaklanan zorluklar ortaya çıkmıştır. Bu zorluklar arasında tiroid doku örneğinde tiroglobülin (Tg) miktarındaki çeşitlilik, tümörlerin köken aldığı hücre ve doku tipindeki heterojenlik, özellikle çalışmada kullanılan doku örneklerinin sınıflandırılmasında yaşanan güçlükler ve tiroid dokusundan elde edilen protein örneklerinin çok geniş bir dinamik yapı göstermesi sayılabilir. Bunlara şöyle örnekler verebiliriz: İlk olarak Tg içeriği açısından bakıldığında makro ve mikrofoliküler yapılar yüksek ya da düşük hücre sayısı ile ilişkisiz Tg düzeyi gösterirler. Folikül, kan damarı ya da eritrosit gibi yapıların proteomik örüntüsü (paterni) farklılık gösterdiği için spesifik bir proteindeki artış ya da azalış için alt sınır değerinin tanımlanması zorlaşabilir. Tiroid proteomunda bu değerler örneğin tiroglobülin için 75 mg/mL'ye kadar çıkarken interlökinler için 1 ng/mL'den daha az bir değer gösterir²⁴. Bu sorunları aşmak için araştırmacılar farklı stratejiler kullanmışlardır. Sentrifugal ultrafiltrasyon ve "size-exclusion" kromatografisi iki boyutlu (2D) jel örneğinin oluşturulmasındaki güçle birlikte Tg dışındaki önemli proteinlerin kaybı ile sonuçlanmaktadır. Bu problem farklı denatüre veya denatüre olmayan örneklerin protein özütlerinin hazırlanması ve HPLC-elüsyon tamponu, farklı akım hızı ve protein elüsyonu için farklı gradyanlar kullanmakla çözümlenemiştir³⁴. Hücre tiplerindeki heterojenite sorununu çözmek ve belli hücre tiplerini izole etmek için "laser-capture" mikrodiseksiyon denenmiştir. Özellikle proteomiks çalışmalarında tirosit yönünden zenginleştirmenin oldukça işe yaradığı bildirilmiştir³⁴. Tg folikül lümeninde ekstrasellüler depolandığı için önce stromal sonra koloidal 2 basamaklı mikrodiseksiyon gerektirir. Bu yöntem Tg'yi uzaklaştırmak için yeterli ise de proteomda çok az olan proteinler gösterilemez ve 2D jeller üze-

rinde oluşan yatay süprüntüler (horizontal streaks) jellerin kalitesini ve spotların analizini bozmaktadır. Bu yüzden kaliteli bir sonuç için en az yüz bin mikrodiseksiyon gerekmektedir. Bu da örneklerin proteolitik degradasyon riskini artırmaktadır. Bunun için her dokudaki spesifik Tg içeriği için düzenleme yapmak gerekmektedir^{24,34}.

Srisomsap ve arkadaşları 2D jel elektroforezi kullanarak tiroid dokusunu normal tiroid dokusu, multinodüler guatr, diferansiye tiroid karsinomları, foliküler adenom, Graves hastalığı olan tiroid dokusu gibi farklı örneklerde incelemişler ve bu doku örneklerinde 32 farklı protein belirlemişlerdir. Katepsin B'nin her formunu özellikle papiller tiroid kanserli dokuda tespit etmişlerdir³⁵. Bunun dışında başka bir çalışmada ise SELDI-TOF kullanılarak normal tiroid dokusu, papiller tiroid kanserleri ve diğer tümör tipleri incelenmiştir³⁶. SELDI-TOF yöntemiyle kütle spektrometri ile spesifik protein setini yakalamak için farklı kromatografik yüzeyler kullanılarak protein çipleri işlenir. Bu yöntemin zorluğu proteinlerin yüklerinden ve kütlelerinden etkilenmesidir. Oluşan pikler proteinlerin kütlesi ile ilişkilidir. Bu yüzden Sofiadis ve arkadaşları diferansiye tiroid karsinomlarından elde ettikleri sitoplazmik ve nükleer protein özütlerinin detaylı analizini yaptıklarında papiller ve foliküler kanserlerde farklılaşan 13 proteini göstermişlerdir. Bunların içinde en yüksek skorla tespit edileni S100A6 proteini olarak bildirilmiştir. Bu durum immünopresipitasyon, sıvı kromatografi kütle spektrometrisi ile doğrulandığı gibi Western blotlama ile de papiller kanserlerde daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur^{24,36-38}. Yine araştırmacılar BRAF mutasyonunun bu belirlenen proteinle ilişkili olmadığını göstermişlerdir³⁹. Başka bir araştırmacı grubu ise yine foliküler ve papiller kanserlerde önce jel elektroforezi ardından MALDI-TOF yöntemi ile ekspresyonu artmış proteinleri belirlemişler ve diğer aday proteinlerle birlikte S100A6'nın papiller tiroid kanserlerinde potansiyel biyoişaretleyici olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Brown ve ark. 16 vakaya ait doku incelemelerinde papiller kanserler ile normal tiroid dokusundan elde edilen örnekleri karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada 5 papiller karsinom, 3 foliküler adenom vakasından ve normal bireylerden alınan tiroid dokuları incelenmiştir. Papiller kanser grubundan ve foliküler adenomdan elde edilen normal tiroid dokusu örnekleri 2D'li jel elektroforezinde benzer bir ekspresyon profili göstermiştir. Normal doku ile papiller kanserde farklılık arz eden 31 proteinin eksprese olduğu gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal yöntemler ile yapılan doğrulama çalışmaları sonucunda S100A6 proteininin papiller kanserlerde normal tiroid dokusuna göre 6.5 kat daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir³⁹.

Diğer bir çalışmada ise 5 foliküler tiroid kanseri ve 6 foliküler adenomdan oluşan bir vaka serisinde jel elek-

troforezi kullanılarak foliküler kanser örnekleri foliküler adenom örneklerinden elde edilen proteinler ile karşılaştırılmıştır. Aralarında başka çalışmalarda da gösterilmiş olan annexin A3, protein disülfid izomeraz, katepsin B gibi 54 protein kütle spektrometrisi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar immünohistokimyasal olarak da doğrulanmıştır. Bu çalışmada örneklerdeki Tg içeriği dikkate alınmamıştır^{40,41}.

Krause ve ark. 20 benign soğuk nodül, ayrıca normal tiroid dokusu örneklerinde kantitatif proteom analizi yaptıklarında soğuk nodüllerde normal tiroid dokusuna göre farklılaşan 13 protein spotu saptamışlardır^{34,41}. Diğer iki çalışmada ise papiller tiroid kanserli hastaların serumları ya da biyopsileri SELDI-TOF tekniği ile incelenmiştir. Çalışmalarda kanser, benign doku ve sağlıklı bireye ait örneklerde farklı protein örnekleri bulunmuřtur⁴²⁻⁴⁴.

2007 yılında yapılan bir çalışmada tiroid hücre dizilerinin *in vivo* tümörlerin özelliklerini taşımadıkları ileri sürülmüştü. Ancak son zamanlarda Arcinas ve ark. tiroid tümör hücre dizilerinde insan tiroid kanseri için protein profilleri tanımlamışlardır. Bu araştırmacılar glikoproteinleri özel bir denatürasyon süreci, sindirim, solid faz ekstraksiyonu ve elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometrisi (ESI-MS/MS) analizine tabi tutmuşlardır³¹. Sonuçlar proteomiksin farklı tiroid kanseri histolojik tiplerinde farklı olduğunu göstermiştir. Bunun dışında ince iğne aspirasyon biyopsisi örneklerinde^{44,46} ve insan tümör dokularında proteomiks analizi yapılmıştır^{34,38,41,47}. Sonuç olarak tiroid neoplazmaları için işe yarar biyoişaretleyicileri belirlemek ve tiroid kanser biyolojisi ile ilgili bilgilerimizi derinleştirmek için daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu kanaatine vardık.

Yayına hazırlanması için alınmış herhangi bir bağış ya da destek yoktur.

Kaynaklar

1. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250(10):4007-4021.
2. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicules: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995;7(7):1090-1094.
3. Tambor V, Fuříková A, Leno J, et al. Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiol Res* 2010;59(4):471-497
4. Nair KS, Jaleel A, Asmann YW, Short KR, Raghavakaimal S. Proteomic research: potential opportunities for clinical and physiological investigators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286(6):863-874.
5. Kosak ST, Groudine M. Gene order and dynamic domains, *Science* 2004;306:644-647.
6. Cho WC. Proteomics technologies and challenges. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2007;5(2):77-85.
7. Gry M, Rimini R, Strömberg S, et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics* 2009;10:365.
8. Hattori M. Finishing the euchromatic sequence of the human

- genome. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 2005;50(2):162-168.
9. Boja E, Hiltke T, Rivers R, et al. Evolution of clinical proteomics and its role in medicine. *J Proteome Res* 2011; 10(1):66-84.
 10. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 1982; 6:317-339.
 11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
 12. Unlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 1997;18(11):2071-2077.
 13. Minden JS, Dowd SR, Meyer HE, Stühler K. Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2009; 30:156-161.
 14. Tannu NS, Hemby SE. Methods for proteomics in neuroscience. *Prog Brain Res* 2006;158:41-82.
 15. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:376-386.
 16. Rigbolt KT, Blagoev B. Proteome-wide quantitation by SILAC. *Methods Mol Biol* 2010; 658:187-204.
 17. Gundry RL, White MY, Murray CI, et al. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr Protoc Mol Biol* 2009;Chapter 10:Unit10.25.
 18. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 2007;389(4):1017-1031.
 19. Miyagi M, Rao KC. Proteolytic 18O-labeling strategies for quantitative proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2007;26(1):121-136.
 20. Ye X, Luke B, Andresson T, Blonder J. 18O stable isotope labeling in MS-based proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2009;8(2):136-144.
 21. Iliuk A, Galan J, Tao WA. Playing tag with quantitative proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393(2):503-513.
 22. Guo Y, Fu Z, Van Eyk JE. A proteomic primer for the clinician. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(1):9-17.
 23. Giordano TJ. Genome-wide studies in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008; 37:311-331.
 24. Krause K, JeBnitzer Bi Fuhrer D. Proteomics in thyroid tumor research. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2717-2724.
 25. Carpi A, Mechanick JI, Saussez S, Nicolai A. Thyroid tumor marker genomics and proteomics: Diagnostic and clinical implications. *J Cell Physiol* 2010;224:612-619.
 26. Castro MR, Gharib H. Continuing controversies in the management of thyroid nodules. *Ann Intern Med* 2005; 142:926-931
 27. Hegedüs L. Clinical Practice. The thyroid nodule. *N Eng J Med* 2004;351:1764-1771.
 28. Haugen BR, Duncan MW. Application of proteomics to thyroid neoplasms: Are we there yet? *Thyroid* 2010;20:1051-1052.
 29. Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, et al. Gene expression arrays in cancer research: Methods and applications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54:95-105.
 30. Lubitz CC, Ugras SK, Kazam JJ, et al. Microarray analysis of thyroid nodule fine-needle aspirates accurately classifies benign and malignant lesions. *J Mol Diagn* 2006;8:490-498.
 31. Arcinas A, Yen TY, Kebebew E, Macher BA. Cell surface and secreted protein profile of human thyroid cancer cell lines reveal distinct glycoprotein patterns. *J Proteome Res* 2009;8:3958-3968.
 32. Lecocq R, Lamy F, Dumont JE. Pattern of protein phosphorylation in intact stimulated cells: thyrotropin and dog thyroid. *Eur J Biochem* 1979;102:147-152.
 33. Lecocq R, Lamy F, Dumont JE. Use of two-dimensional gel electrophoresis and autoradiography as a tool in cell biology: the example of the thyroid and the liver. *Electrophoresis* 1990;11:200-212
 34. Krause K, Schierhorn A, Sinz A, et al. Toward the application of proteomics to human thyroid tissue. *Thyroid* 2006;16:1131-1143.
 35. Srisomsap C, Subhasitanont P, Otto A, et al. Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis. *Proteomics* 2002;2:706-712.
 36. Sofiadis A, Dinets A, Orre LM, et al. Proteomic study of thyroid tumors reveals frequent up-regulation of the Ca(2+)-binding protein S100A6 in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2010; 20(10):1067-1076.
 37. De Petris L, Orre LM, Kanter L, et al. Tumor expression of S100A6 correlates with survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 63:410-417.
 38. Orre LM, Pernemalm M, Lenquist J, Lowensohn R, Lehtio J. Up regulation, modification, and translocation of S100A6 induced by exposure to ionizing radiation revealed by proteomics profiling. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6:2122-2131.
 39. Brown LM, Helmke SM, Hunsucker SW, et al. Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. *Mol Carcinog* 2006; 45:613-626.
 40. Netea-Maier RT, Hunsucker SW, Hoevenaars BM, et al. Discovery and validation of protein abundance differences between follicular thyroid neoplasms. *Cancer Res* 2008;68:1572-1580.
 41. Krause K, Karger S, Schierhorn A, Poncin S, Many MC, Fuhrer D. Proteomic profiling of cold thyroid nodules. *Endocrinology* 2007;148:1754-1763.
 42. Moretz 3rd WH, Gourin CG, Terris DJ, et al. Detection of papillary thyroid carcinoma with serum protein profile analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:198-202.
 43. Wang JX, Yu JK, Wang L, Liu QL, Zhang J, Zheng S. Application of serum protein fingerprint in diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Proteomics* 2006;6:5344-5349.
 44. Suriano R, Lin Y, Ashok BT, et al. Pilot study using SELDI-TOF-MS based proteomic profile for the identification of diagnostic biomarkers of thyroid proliferative diseases. *J Proteome Res* 2006;5:856-861
 45. Van Staveren WC, Soli's DW, Delys L, et al. Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. *Cancer Res*. 2007;67(17):8113-8120.
 46. Giusti L, Iaconi P, Ciregia F, et al. Fine needle aspiration of thyroid nodules: proteomic analysis to identify cancer biomarkers. *J Proteome Res* 2008;7:4079-4088.
 47. RussoD, Bisca A, Celano M, et al Proteomic analysis of human thyroid cell lines reveals reduced nuclear localization of Mn-SOD in poorly differentiated thyroid cancer cells. *J Endocrinol Invest* 2005;28:137-144.