

# Tümör Doku Heterojenitesinin 2DE Proteomik Yaklaşımıyla Gösterilmesi

## The Demonstration Of Tumor Heterogeneity Using 2DE Proteomic Approach

Aylin Kanlı<sup>1\*</sup>, Turgay Şimşek<sup>2</sup>, Murat Kasap<sup>1</sup>, Gürler Akpınar<sup>1</sup>, Nuh Zafer Cantürk<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Protein Araştırmaları ve Proteomiks Laboratuvarı, Umuttepe Yerleşkesi, İzmit-Kocaeli-TÜRKİYE

<sup>2</sup> Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Umuttepe Yerleşkesi, İzmit-Kocaeli-TÜRKİYE

Yazışma Adresi / Correspondence:

**Aylin Kanlı**

Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Protein Araştırmaları ve Proteomiks Laboratuvarı, Umuttepe Yerleşkesi, İzmit-Kocaeli-TÜRKİYE

T: +90 533 646 55 45

E-mail : aylinkanlı@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 02.02.2022

Kabul Tarihi / Accepte : 07.04.2022

Orcid :

Aylin Kanlı <https://orcid.org/0000-0002-0674-0072>

Turgay Şimşek <https://orcid.org/0000-0002-5733-6301>

Murat Kasap <https://orcid.org/0000-0001-8527-2096>

Gürler Akpınar <https://orcid.org/0000-0002-9675-3714>

Nuh Zafer Cantürk <https://orcid.org/0000-0002-0042-9742>

( Sakarya Tıp Dergisi / Sakarya Med J 2022, 12(2):301-314 ) DOI: 10.31832/smj.1066524

### Öz

Amaç	Birçok hastalığın ve kanserlerin biyolojik mekanizmalarının incelenmesinde yaygın olarak kullanılan proteomik yaklaşımlar, hastalık sürecinin izlenmesinde, biyobelirteçlerin ve potansiyel terapötik hedeflerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Proteomik alanında kullanılan biyolojik örnekler arasında serum gibi biyolojik sıvılar ve doku gibi katı örnekler sayılabilir. Bu bağlamda analiz edilen doku örneklerinin kalitesi, örneğin alındığı bölgenin doğruluğu ve hatta örneğin alınmasından sonra proteomik araştırma laboratuvarına ulaşıncaya kadar geçen süre gibi pre-analitik süreçler çok önemlidir. Biz bu çalışmamızda, tümör dokusu içerisinde iki farklı bölgeden alınan örneklerin çözünür proteom profillerini karşılaştırmayı ve varsa tümör heterojenitesini göstermeyi amaçladık.
Gereç ve Yöntemler	Cushing sendromu tanısı ile opere edilen bir hastanın adrenokortikal tümör dokusunun iki farklı bölgesinden (adenoma ve adenoma içi) ve sağlıklı dokusundan elde edilen proteinler 2DE yöntemi ile ayrıştırılarak karşılaştırmalı analize tabi tutulmuştur. Örnekler arasında regülasyon düzeyinde farklılık görülen protein sayısı belirlenmiş ve jellerden kesilerek MALDI-TOF/TOF kütle spektrometresi aracılığı ile tanımlanmıştır.
Bulgular	Kontrol dokusuna göre adenom bölgesinde 17 protein, adenom içi bölgede ise 13 proteinin seviyelerinde regülasyon tespit edilmiştir. Bu proteinler çoğu enerji metabolizması, hücre iskeleti organizasyonu ve hücre stres ile ilişkili proteinlerdir.
Sonuç	Bu çalışma tümör dokusu içerisinde örneğin alındığı bölgenin proteom profilini ne ölçüde etkilediğini göstermiştir. Tümör dokusundan iki farklı bölgeden aldığımız örneklerde daha çok enerji metabolizması ile ilişkili proteinler olmak üzere bazı proteinlerin ifadelerinde ciddi farklılıklar görülmüştür. Bu durum özellikle biyobelirteç arayışlarının olduğu çalışmalarda proteomik bulgularının yorumlanmasında dikkat edilmesi gerektiği ve proteomik çalışmalarında örnek sayısının mümkün olduğunca fazla tutulması gerektiğini vurgulamaktadır.
Anahtar Kelimeler	Cushing sendromu; tümör heterojenitesi; proteomiks.

### Abstract

Objective	Proteomic approaches, have been used in monitoring the disease processes and identification of biomarkers. Biological samples used in the field of proteomics include biological fluids and solid samples. In this context, pre-analytical processes e.g., tissue sample quality, sampling site accuracy and sample transfer time to the site of proteomic laboratory are very important. In this study, the proteome profiles of samples taken from two different regions within a tumor tissue were compared to show tumor heterogeneity.
Materials and Methods	Proteins obtained from two different regions of adrenocortical tumor tissue (adenoma and intra-adenoma) and healthy tissue of a patient who was operated on with the diagnosis of Cushing's syndrome were separated by 2DE and subjected to comparative analysis. The number of differentially regulated proteins among the samples was determined and identified by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry.
Results	Seventeen and thirteen proteins were differentially regulated in the adenoma and intra adenoma regions compared to the control tissue, respectively. These proteins mostly associated with energy metabolism, cytoskeletal organization, and cellular stress.
Conclusion	This study showed to what extent the sample area in the tumor tissue affects the proteome profile. The samples taken from two different regions of a same tumor tissue displayed serious differences in the expressions of some proteins, mostly those associated with energy metabolism. This highlights the need to be careful in interpreting proteomic findings, especially in studies where biomarkers are sought. To minimize sample variation, as many samples as possible should be studied in proteomic studies.
Keywords	Cushing syndrome; tumor heterogeneity; proteomics.

## GİRİŞ

2002 yılında insan genom dizisinin çıkartılmasından bu yana hastalıkların etiyojisine tüm cevapları sağlayamayacağı anlaşılmış ve dikkatler genomumuz tarafından ifade edilen proteinlerdeki değişikliklerin araştırılmasına çevrilmiştir.<sup>1</sup> Omik yaklaşımları (genomik, epigenomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik) içerisinde hızla büyüyen bir araştırma alanı olarak karşımıza çıkan “proteomik”, bir hücre, doku veya organizmaya ait tüm protein içeriğinin, belirli bir proteinin varlığı veya yokluğunun ve post-translasyonel değişikliklerin analizini ifade etmektedir.<sup>1,2</sup> Proteinler, hücrelerde moleküler mekanizmaların aktif oyuncuları olan gen ürünlerini temsil ettikleri için proteomik yaklaşımlar genomik yaklaşımları tamamlayıcı niteliktedir.<sup>2</sup> Proteomik yaklaşımlar, birçok hastalığın ve özellikle kanserlerin biyolojik mekanizmalarını incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu yaklaşımlar hastalıkların ilerlemesinin izlenmesinde, biyobelirteçlerin ve potansiyel terapötik hedeflerin tanımlanmasında uygulama alanı bulmuştur.<sup>3-6</sup> Proteomik çalışmalarda protein ekspresyonundaki nicel değişiklikleri incelemek için doku, idrar, serum, primer ve sekonder hücre hatları, sekretom ve ksenograftlar dâhil olmak üzere çok çeşitli biyolojik materyaller kullanılmaktadır.<sup>7</sup> Bu materyallerin incelenmesinde iki boyutlu jel elektroforezi (2-D poliakrilamid jel elektroforezi, 2-DE), kromatografi, kapiler elektroforez ve kütle spektrometrisi gibi çeşitli proteomik yaklaşımlar bulunmaktadır.<sup>8,9</sup>

Proteomik araştırmalarda analiz edilen doku örneklerinin kalitesi, örneğin alındığı bölgenin doğruluğu ve hatta örneğin alınmasından sonra proteomik araştırma laboratuvarına ulaşıncaya kadar geçen süre çok önemlidir. Çünkü bu noktalarda bir standardizasyonun olmaması örneklerin protein profillerini etkileyebilir.<sup>10</sup> Bu nedenle proteomik çalışmalar için yeterli örnek sayısının belirlenmesi, doğru bölgeden örnek alımı, örnek alındıktan sonraki süreçler ile ilgili olarak uyumlu bir şekilde çalışılması gerekmektedir. Becker (2015) biyolojik örneklerde ameliyat öncesi ilaç tedavisi ve anestezi türünün, örnek tipinin, örneğin çıkarıl-

masından sonraki sürecin, örneğin alındığı yerin (örneğin bir tümörün merkezinden veya çevresinden) ve ortamın ısısı gibi pre-analitik parametrelerin protein profillerini nasıl etkilediğini tartışmıştır. Pre-analitik süreçlerde bir standardizasyonun proteomik yöntemlerle kişiselleştirilmiş tıp vaadini gerçekleştirebileceğini, daha iyi biyobelirteçler bulunabileceğini, hastalık mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilirliğini ve potansiyel yeni terapötik hedeflerin belirlenebileceğini vurgulamıştır.<sup>10</sup> Bu çalışmamızda, tek bir tümör dokusu içerisinden alınan farklı iki bölgeye ait proteom profillerini karşılaştırmalı olarak analiz etmeyi amaçladık. Çalışmada Cushing Sendromlu bir hastanın adenom dokusundan iki farklı bölgeden aldığımız örnekler kullanıldı. Bu iki doku parçasından izole edilen proteinlerin profilleri sağlıklı doku parçasından izole edilen proteinlerin profili ile karşılaştırıldı. Beklentimiz tümörden alınan doku protein profillerinin birbirlerine yüksek derecede benzerlik göstermesi, sağlıklı dokudan ise ciddi manada ayrılması idi. Ancak yapılan analizde tümörün farklı bölgelerinden alınan dokular arasında da ciddi proteom farklılıklarının olduğu görüldü. Bu bulgu literatürde yapılan proteom analizlerinde doku-içi heterojenitenin elimine edilmesi gerektiğini ve bunun için çok sayıda örnekle çalışılarak grup-içi örnekler arası farklılıkların istatistiksel olarak değerlendirme dışı bırakılması gerektiğinin altını çizdi.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (KÜ GOKAEK 2019/233) tarafından Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak onaylanmış ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nın ortak projesi kapsamında (KOÜ-BAP TSA-2020-1545) Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Protein Araştırmaları ve Proteomiks Laboratuvarında gerçekleştirildi.

## Örneğin Alınması

Üniversite Hastanemizde herhangi bir neo-adjuvan kemo-terapi veya radyoterapi almayan hastadan Bilgilendirilmiş

Onam Formu imzalandıktan sonra cerrahi müdahale sırasında örnekler alındı. Patolojik tanıyı etkilemeyecek şekilde cerrahi sınırdan ayrılan parça sıvı nitrojen içinde Proteomik laboratuvarına teslim edildi. Tümör örneği ve eşleştirilmiş bitişik normal adrenokortikal doku örneği hemen sıvı nitrojen içinde hızlı bir şekilde donduruldu ve protein ekstraksiyonu yapılabildiği kadar -80°C'de saklandı.

### Adrenokortikal Dokuların

#### Histopatolojik Değerlendirmesi

Adrenokortikal adenom tümör dokusu içindeki farklı iki bölgeyi değerlendirmek için, adenom dokusu formalin içinde sabitlendi, parafine gömüldü, seri olarak kesitler alındı ve hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyandı. Preparatlar, ışık mikroskobu ile (BX50, Olympus) incelendi.

#### Adrenokortikal dokudan protein ekstraksiyonu

Doku numuneleri buz üzerinde kıyılarak soğuk (ice-cold) yıkama tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 250 mM sakaroz) ile yıkandı ve lizis tamponunda (7 M üre, 2 M tiyoüre, %4 CHAPS w/v, 30 mM Tris-HCl, pH 8.5) 0.5 mM paslanmaz çelik boncuklu homojenleştirici sistemi aracılığıyla (Next Advance, ABD) lize edildi. Çözünür proteinler, +4°C'de 30 dakika süreyle 20.000 x g'de santrifüjleme ile elde edildi ve protein konsantrasyonu, BSA standardı (BioRad®, ABD) ile modifiye Bradford Assay kullanılarak belirlendi. Çözünür proteinleri içeren süpernatantlar Lo-bind tüplerinde (Eppendorf®, ABD) -80°C'de saklandı.

#### 2D SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Her örnekten 500 µg protein pasif rehidrasyon ile immobilize 11 cm'lik pH gradyan şeritlerine (IPG) (pH 3-10 NL) yüklendi. İzoelektrik noktalara dayalı ayırmalar, bir protean izoelektrik odaklama cihazı (protean isoelectric focusing cell, Bio-Rad, ABD) kullanılarak elde edildi. IEF için aşağıdaki koşullar kullanıldı: 20°C'de toplam 30.000 V/h'ye ulaşılabildiği kadar hızlı rampa ile 250 V'de 20 µdk, yavaş rampa ile 10000 V'de 2 saat ve hızlı rampa ile 10000 V için 2,5 s. İzoelektrik odaklamadan sonra, şeritler daha sonra tampon I (6 M Üre, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS, %20

gliserol, %2 (a/h) DTT) ile tampon II [6 M Üre, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS, %20 gliserol, %2.5 iyodoasetamid (a/h)] ile oda sıcaklığında 30'ar dakika yıkandı ve çalışan bir Dodeca jel yürütme sisteminde (Bio-Rad, ABD) ikinci boyut ayırımı için SDS-PAGE'ye tabi tutuldu. Proteinleri ayırımıktan sonra jeller %40 Metanol, %10 asetik asit içinde sabitlendi ve ardından koloidal Coomassie blue G250 (Bio-Rad, ABD) ile boyandı.

#### Görüntü analizi

Jel görüntüleri VersaDoc MP 4000 (Bio-Rad, ABD) kullanılarak çekildi. Protein noktalarının karşılaştırmalı analizi için PD quest advance 2D analiz yazılımı (Bio-Rad, ABD) kullanıldı. Her noktanın miktarı yerel regresyon modeli ile normalleştirildi. İfade açısından farklılık gösteren (2 kat fazla) protein benekleri seçildi ve ExQuest Spot-cutter (Bio-Rad, ABD) kullanılarak protein tanımlaması için çıkarıldı.

#### Kütle spektrometrisi ile protein tanımlaması ve Biyoinformatik Analiz

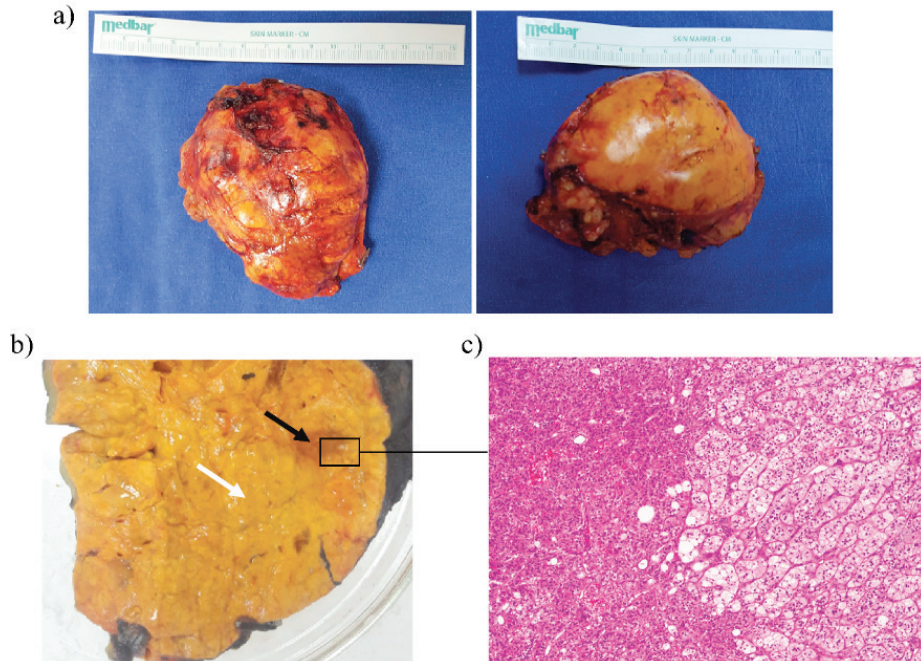
Protein tanımlama deneyleri ABSCIEX MALDI-TOF/TOF 5800 sistemi (Applied Biosystems®, Framingham, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Proteinlerin jel içi triptik sindirimi, önerilen protokol (Pierce, ABD) izlenerek bir jel içi sindirim kiti kullanılarak yapıldı. Bir MALDI plakasına yerleştirmeden önce, tüm protein örnekleri 10 µL ZipTipC18 (Millipore®, ABD) ile tuzdan arındırıldı. Peptidler, su içinde %50 asetonitril ve %0.1 trifloroasetik asit içinde konsantre bir a-Siyano-4-hidroksisinnamik asit çözeltisi kullanılarak 1 µL'lik bir hacimde ayrıştırıldı (elute) ve MALDI plakasına yüklendi. TOF spektrumları, 400 ila 2000 Da arasında bir kütle aralığı ile pozitif iyon yansıtıcı modunda kaydedildi. Her spektrum 2000 lazer atışının kümülatif ortalamasıydı. Spektrumlar, iç standartlar olarak tripsin oto-sindirime iyon pikleri m/z (842.510 ve 2211.1046) ile kalibre edildi. MS/MS analizi için numune başına TOF spektrumunun en güçlü on piki seçildi. MALDI-TOF/TOF'dan elde edilen veriler, aşağıdaki kriterlere sahip bir yazılım olan Protein Pilot (ABSCIEX, ABD)

kullanılarak MASCOT veri tabanı sürüm 2.5'e (Matrix Science) karşı arandı: Yedeksiz Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi; H. sapiens için tür kısıtlaması; tripsin enzimi; eşleştirilmiş en az beş bağımsız peptit; en fazla bir eksik bölünme bölgesi; MS toleransı  $\pm 50$  ppm'ye ve MS/MS toleransı  $\pm 0.4$  Da'ya ayarlanmıştır; sabit modifikasyon karbamidometildir ve değişken modifikasyon oksidasyondur; 1+ peptit yükü ve monoizotopik olma. Yalnızca MASCOT olasılık analizi ( $P < 0.05$ ) tarafından tanımlandığı gibi önemli hitler kabul edildi. Tanımlanan proteinlerin protein-protein etkileşim ağı, çevrimiçi analiz aracı STRING v10.0 (<http://www.string-db.org>)<sup>11</sup> ile oluşturulmuştur.

### BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen hasta halsizlik, yorgunluk ve tüylenme şikâyetiyle gelmiş ve yapılan deksametazon testinde baskılanma olmadığı görülmüştür. 47 yaşında olan kadın hastanın Diabetes Mellitus ve Hipertansiyon geçmişi yoktur. Cushing Sendromu şüphesi ile çekilen MR'da sağ sürrenal bezde 7x4 cm boyutlu adenomla ilişkili görünüm

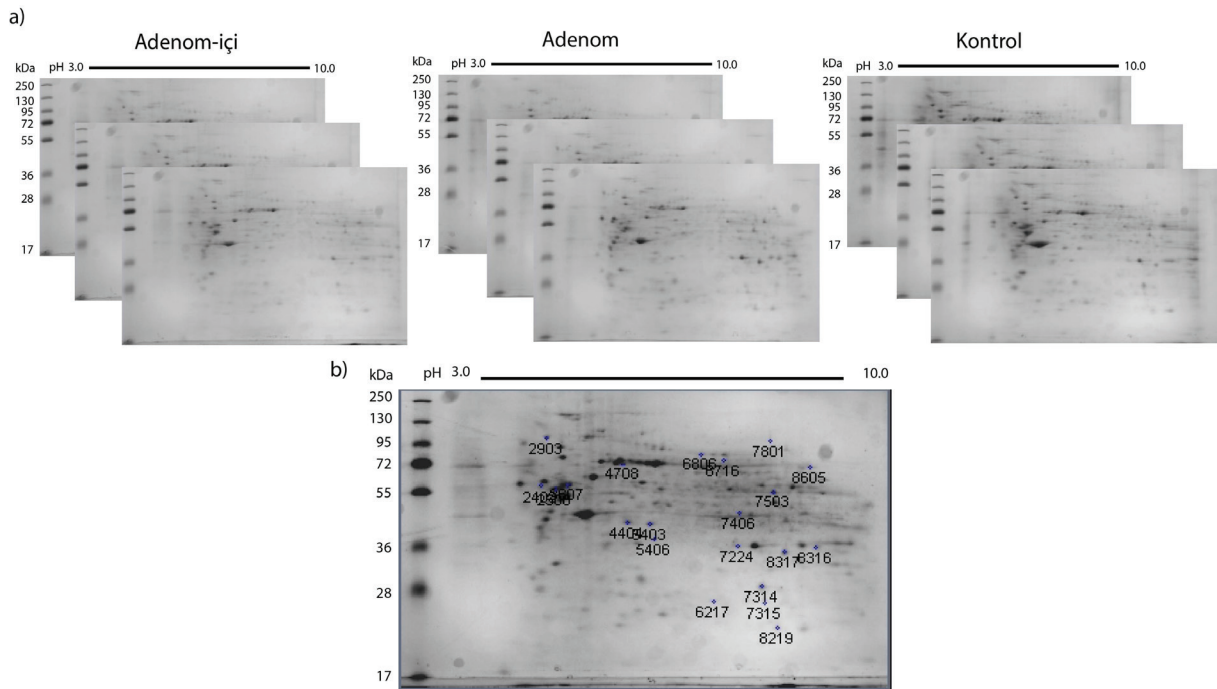
gelmesi üzerine hasta opere edilmiştir. Hastanın operasyon sonrası çıkarılan 110 gr ağırlığında 8,5x7,5x3,5 cm boyutundaki sürrenalektomi materyalinin iki yönlü fotoğrafı Şekil 1a'da görülmektedir. Yapılan incelemede Proteomik çalışma için laboratuvarımıza gelen adenom dokusu içerisinde farklı bölgelerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1b) Bu nedenle doku bir bütün olarak değerlendirilmemiş ve iki kısma ayrılmıştır; (1) adenom dokusu (2) adenom-İçi heterojen doku. Sonrasında bu farklı bölgelerden alınan doku parçalarından ve sağlıklı adrenokortikal doku örneğinden protein izolasyonu yapılarak karşılaştırmalı proteom deneyleri gerçekleştirilmiştir. Adenom dokusuna ve adenom-İçi heterojen dokuya ait histopatolojik mikrokopi görüntüleri Şekil 1c'de görülmektedir. Sol tarafta koyu olarak boyanan alanın belirgin hücre sınırlarına sahip granüler eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluştuğu, sağ taraftaki açık alanın ise lipitten zengin geniş sitoplazmalı hücre kümeleri (açık alan-sağ taraf) olduğu görülmektedir.



**Şekil 1.** Çıkarılan adenom dokusunun iki yönlü fotoğrafı (a). Karşılaştırmalı proteomik analiz yapılan doku bölgeleri (b). Histopatolojik görüntü, belirgin hücre sınırlarına sahip granüler ve eozinofilik sitoplazmalı hücreler (koyu alan-sol taraf) ile lipitten zengin geniş sitoplazmalı hücre kümeleri (açık alan-sağ taraf) (H&E x100) (c). Siyah ok: Adenom-İçi doku; Beyaz ok: Adenom dokusu.

Protein izolasyonu sonrasında protein konsantrasyonları ölçüldü ve protein özütlerinin kalitesini ve miktarını değerlendirmek için SDS-PAGE analizleri yapıldı. Keskin ve belirgin protein bantları protein özütlerinin yüksek çözünürlükte 2D analizine uygun olduğunu gösterdi. Adenom, adenom-ichi ve kontrol protein örnekleri kullanılarak, 3 ila 10 pH aralığını kapsayan IPG şeritleri yardımı ile iyi çözülmüş ve yeniden üretilebilir 2D jeller üretildi (Şekil 2). Jel görüntüleri fotoğraflandı ve jeller iki-kat regülasyon kriteri temel alınarak analiz edildi.  $475 \pm 20$  protein beneki saptandı ve eşleştirildi. Eşleşen beneklerin analizi, adenom, adenom-ichi ve kontrol örnekleri arasında farklı

şekilde regüle olan protein noktalarının varlığını ortaya çıkardı. 20 adet protein beneginin regülasyonlarında değişiklik görüldü ve bu protein benekleri jellerden kesilerek tanımlandı. Tanımlanan proteinlerin isimleri, ilgili MALDI skorları Tablo 1'de sunulmuştur. Protein tanımlaması, birden fazla benek tarafından temsil edilen bazı düzenlenmiş proteinlerin (Endoplazmin, Fibrinojen beta zinciri ve Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz) olduğunu gösterdi. Bu durum, deneysel bir problemden ziyade odaklanma pozisyonlarında değişikliklere neden olan proteinler üzerinde meydana gelen post-translasyonel değişikliklerden kaynaklanmaktadır.<sup>12</sup>



**Şekil 2.** Çalışma gruplarını temsil eden proteinlerin 2D jel görüntüleri (a). Düzenlenmiş protein noktalarının ve karşılık gelen SSP numaralarının konumunu gösteren 2D jel görüntüsü (b).

**Tablo 1.** 2DE deneylerinde tanımlanan proteinlerin adı ve ilgili MALDI skorları

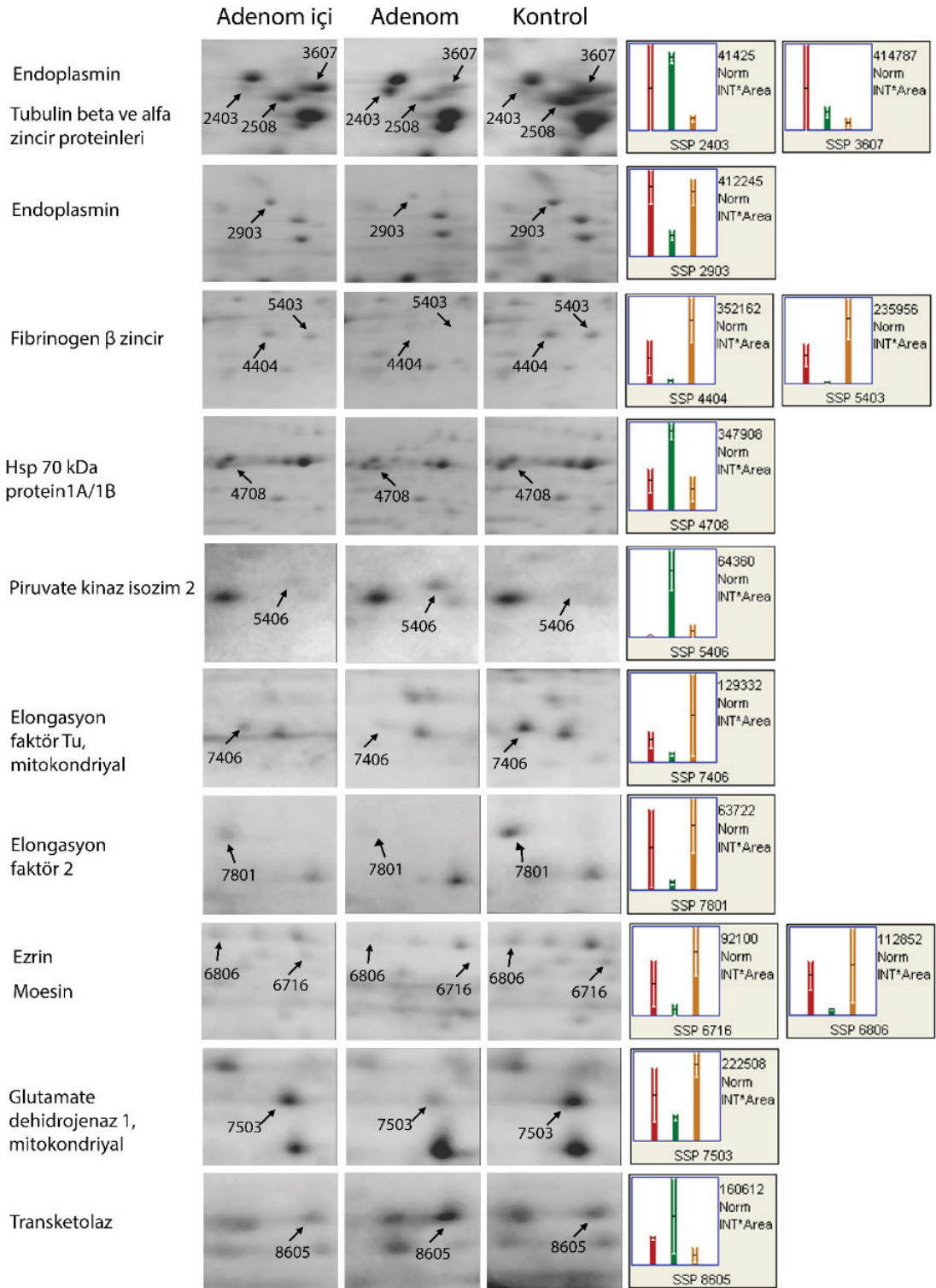
SSP No.	AC no	Protein Kayıt Adı	Protein Kütlesi	Protein Skoru	Beklenen	Eşleşme	Hesaplanan pI	Eşleşme Oranı (%)	Protein Adı
2403	P14625	ENPL_HUMAN	92411	168	3,20E-13	27	4,76	20	Endoplazmin
2508	P07437	TBB5_HUMAN	49639	160	2e-012	29	4,78	47	Tubulin beta zincir
2903	P14625	ENPL_HUMAN	92411	192	1.3e-015	40	4,76	32	Endoplazmin
3607	P68363	TBA1B_HUMAN	50120	189	2.6e-015	24	4,94	41	Tubulin alfa-1B zincir
4404	P02675	FIBB_HUMAN	55892	278	3.2e-024	35	8,54	54	Fibrinojen beta zincir
4708	P08107	HSP71_HUMAN	70009	144	8.1e-011	30	5,48	34	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
5403	P02675	FIBB_HUMAN	55892	253	1e-021	35	8,54	51	Fibrinojen beta zincir
5406	P14618	KPYM_HUMAN	57900	97	4.4e-006	22	7,96	34	Piruvat kinaz izozimleri M1/M2
6217	P30041	PRDX6_HUMAN	25019	208	3.2e-017	21	6	59	Peroksiredoksin 6
6716	P26038	MOES_HUMAN	67778	163	1e-012	31	6,08	37	Moesin
6806	P15311	EZRI_HUMAN	69370	93	1.1e-005	26	5,94	34	Ezrin
7314	P00915	CAH1_HUMAN	28852	279	2.6e-024	14	6,59	50	Karbonik anhidraz 1
7315	P60174	TPIS_HUMAN	26653	435	6.4e-040	30	6,45	73	Triozofosfat izomeraz
7406	P49411	EFTU_HUMAN	49510	269	2.6e-023	24	7,26	45	Elongasyon faktörü Tu, mitokondriyal
7503	P00367	DHE3_HUMAN	61359	356	5.1e-032	34	7,66	38	Glutamat dehidrojenaz 1, mitokondriyal
7801	P13639	EF2_HUMAN	95277	93	9.90E-06	26	6,41	22	Elongasyon faktörü 2
8219	P04179	SODM_HUMAN	24707	302	1.3e-026	15	8,35	45	Süperoksit dismutaz [Mn], mitokondriyal
8316	P04406	G3P_HUMAN	36030	215	6.4e-018	16	8,57	32	Gliseralehit-3-fosfat dehidrojenaz
8317	P04406	G3P_HUMAN	36030	212	1,30E-17	20	8,57	38	Gliseralehit-3-fosfat dehidrojenaz
8605	P29401	TKT_HUMAN	67835	197	4,00E-16	24	7,58	32	Transketolaz

Tanımlanan proteinlerin regülasyon oranları ile eğilimleri ve kontrole göre gruplardaki regülasyon durumları Tablo 2’de sunulmuştur. Tablo 2’ye göre kontrol ile karşılaştırdığımızda adenom içi bölgede 13 proteinin ifadesinde anlamlı değişiklik görülmüştür. ENPL(SSP 2403), TBB5, TBA1B, PRDX6, TPIS, GAPDH (SSP 8316), TKT ve CAH1 proteinlerinin daha fazla ifade edilirken, MOES, KPYP, GAPDH (SSP 8317), EFTu, EF2 ve FIBB proteinleri daha az ifade edilmiştir. ENPL (SSP 2903), HSP71, EZRI, DHE3 ve SODM proteinlerinin ifadelerinde bir değişiklik olmamıştır. Kontrol ile karşılaştırdığımızda adenom bölgesinde ise 17 proteinin ifade seviyelerinde anlamlı değişiklik görüldü. ENPL (SSP 2403), HSP71, TBB5, TBA1B, PRDX6, KPYP, TPIS, GAPDH (SSP 8316), TKT ve SODM proteinleri daha fazla ifade edilmiş olup, ENPL (SSP 2903), MOES, EZRI, DHE3, EFTu, EF2, CAH1 ve FIBB proteinlerini

daha az ifade edilmiştir. Sadece GAPDH (SSP 8317) proteinin ifadesinde değişiklik olmadığı görüldü. Adenom-içi ve adenom bölgelerini karşılaştırdığımızda ise ENPL, MOES, EZRI, PRDX6, EFTu, EF2 ve FIBB proteinlerinin daha fazla ifade edildiği; ENPL, HSP71, TBB5, TBA1B ve KPYP proteinlerinin daha az ifade edildiği; TPIS, GAPDH (SSP 8316 ve SSP 8317), TKT ve DHE3 proteinlerinin ifadelerinde ise bir değişiklik olmadığı görüldü. Şekil 3’te, gruplar arasında nispi miktarları değişen tüm protein beneklerinin yakın çekim görüntüleri sunulmuştur. Yakın çekim görüntüleri proteinlerin düzenlenme eğilimlerini doğrulamaktadır.

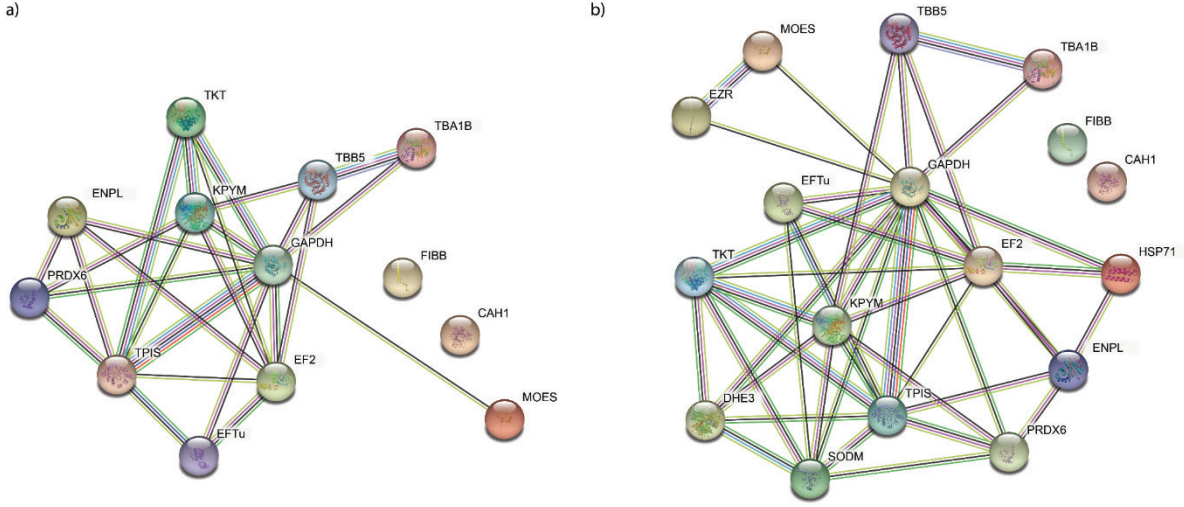
**Tablo 2.** Adenom-içinin kontrole, adenomun kontrole ve adenom-içinin adenoma göre düzenlenme oranları ve düzenlenme eğilimleri. ADN içi: Adenom içi, ADN: Adenom, Kont: Kontrol, : Aşağı düzenlenme (yeşil), : Yukarı düzenlenme (kırmızı), NR: Düzenlenme yok.

Protein	ADN içi / Kont	ADN / Kont	ADN içi / ADN	Kontrolle göre gruptaki durum
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B (HSP71) SSP 4708	NR	4 ↑	3 ↓	Bir grupta regülasyon göstermeyip diğer grupta regülasyon görülen proteinler.
Superoksit dismutaz [Mn], mitokondriyal (SODM) SSP 8219	NR	7 ↑	4 ↓	
Endoplazmin (ENPL) SSP 2903	NR	4 ↓	3 ↑	
Ezrin (EZRI) SSP 6806	NR	10 ↓	8 ↑	
Glutamat dehidrojenaz 1, mitokondriyal (DHE3) SSP 7503	NR	3 ↓	NR	
Gliseralehit-3-fosfat dehidrojenaz (G3P, GAPDH) SSP 8317	3 ↓	NR	NR	
Karbonik anhidraz 1(CAH1) SSP 7314	2 ↑	3 ↓	9 ↑	
Piruvat kinaz izozimler M1/M2 (KPYM) SSP 5406	4 ↓	14 ↑	56 ↓	
Endoplazmin (ENPL) SSP 2403	2 ↑	7 ↑	3 ↓	
Tubulin beta zincir (TBB5) SSP 2508	2 ↑	7 ↑	3 ↓	
Tubulin alfa-1B zincir (TBA1B) SSP 3607	3 ↑	7 ↑	2 ↓	
Peroksiredoksin-6 (PRDX6) SSP 6217	7 ↑	3 ↑	2 ↑	
Moesin (MOES) SSP 6716	2 ↓	12 ↓	6 ↑	
Fibrinojen beta zincir (FIBB) SSP 4404	3 ↓	26 ↓	10 ↑	
Fibrinojen beta zincir (FIBB) SSP 5403	2 ↓	79 ↓	34 ↑	
Elongasyon faktör Tu, mitokondriyal (EFTu) SSP 7406	2 ↓	6 ↓	3 ↑	
Elongasyon faktör 2 (EF2) SSP 7801	2 ↓	9 ↓	5 ↑	
Triozfosfat isomeraz (TPIS) SSP 7315	2 ↑	3 ↑	NR	
Gliserraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (G3P, GAPDH) SSP 8316	4 ↑	3 ↑	NR	
Transketolaz (TKT) SSP 8605	3 ↑	5 ↑	NR	



Şekil 3. Gruplar arasında nispi miktarları değişen, farklı olarak düzenlenmiş seçilmiş protein beneklerinin yakın çekim görüntüleri.





**Şekil 4.** İki boyutlu elektroforez ile tanımlanan farklı şekilde eksprese edilen proteinlerin STRING analizi. Adenom-İçi ve kontrol grubu karşılaştırması (a) Adenom ve kontrol grubu karşılaştırması (b). CAH1: Karbonik anhidraz 1; DHE3: Glutamat dehidrojenaz 1, mitokondriyal; EF2: Elongasyon faktör 2; EFTu: Elongasyon faktör Tu, mitokondriyal; ENPL: Endoplazmin; EZRI: Ezrin; FIBB: Fibrinojen beta chain; GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz; HSP71: Heat shock 70 kDa protein 1A/1B; KPYM: Piruvat kinaz izozimler M1/M2; MOES: Moesin; PRDX6: Peroksiredoksin-6; SODM: Superoksit dismutaz [Mn], mitokondriyal; TBA1B: Tubulin alfa-1B zincir; TBB5: Tubulin beta zincir; TPIS: Triosefosfat izomeraz; TKT: Transketolaz

### TARTIŞMA

Proteomik yaklaşımlar, çeşitli tümörlerin (meme, prostat gibi) erken tespiti için faydalı biyobelirteçleri belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.<sup>13,14</sup> Özellikle, tümörde tanımlanan biyobelirteçlerin kan dolaşımında farklı şekilde ifade edildiği bulunduğu, bulunan biyobelirtecin kliniğe yansımalarının olması muhtemeldir.<sup>15</sup> Ancak bu çalışmalarda pre-analitik süreçlerde bir standardizasyonun olması, kişiselleştirilmiş tıp, daha iyi biyobelirteçlerin keşfedilmesi, hastalık mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi ve potansiyel yeni terapötik hedeflerin belirlenebilmesi açısından önem arz etmektedir.<sup>10</sup> Pre-analitik değişkenlik sorununun Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından kaliteli araştırma ve kişiselleştirilmiş tıbbın önündeki en büyük engel olduğu belirtilmiştir.<sup>16</sup> Örneğin, Espina ve arkadaşları (2009), ameliyatta çıkarılan dokunun canlı olduğunu ve çevredeki değişikliklere tepki verdiğini bildirmiştir. Yaptıkları zaman süreci deneyinde, numunenin dondurulmasındaki

gecikmelerin, translasyon sonrası değişiklikler ve protein hücre altı konumundan bağımsız olarak, zaman içinde fosfoprotein seviyelerinde önemli artışlar ve düşüşler ortaya koyduğunu bulmuşlardır.<sup>17</sup> Başka bir makalede, Meric-Bernstam ve arkadaşları (2014), numune tipi (merkezi ve periferik cerrahi tümör numunelerinin ex vivo toplanmasına karşı ince iğne aspiratlarının in vivo toplanması veya kor biyopsinin) dâhil olmak üzere biyomüme değişkenlerinin protein ve fosfoprotein profillerini etkileyip etkilemediğini belirlemek için bir klinik çalışma gerçekleştirmişlerdir.<sup>18</sup> Yaptıkları çalışmada fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolu aktivasyonu belirteçleri de dâhil olmak üzere, potansiyel olarak kliniğe yansıtılabilir birkaç biyobelirteç düzeyinin, biyoörnek tipi ve biyoörnek işleme değişkenlerinden etkilendiğini göstermişlerdir. Spesifik olarak, PI3K yolu aktivasyonunun, cerrahi numunelere kıyasla kor iğne biyopsilerinde daha fazla olduğunu ve bu nedenle bu tür numunelerde sıcak iskemide olmadığından yolak aktivitesini değerlendirmek için kor iğne biyopsilerinin cerrahi nu-

munelere tercih edilebileceğini bildirmişlerdir.<sup>18</sup> Bu bulgular, tümörlü olmayan karaciğer ve bağırsak örneklerinden elde edilen sonuçlarla da uyumludur.<sup>19,20</sup> Gastroözofageal tümörler ve meme kanserleri için de benzer sonuçlar bildirilmiştir.<sup>21,22</sup> Gao ve arkadaşları (2020) ACTH'den bağımsız Cushing sendromu ile ilişkili olan kortizol üreten adrenokortikal adenomlarda görülen iki hücresel alt tip tümör hücrelerinde (lipidden fakir olan kompakt ve lipide zengin olan berrak tümör hücreleri) morfolojik özellikler ile steroidojenik enzimlerin immünoaktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Ayrıca bunları vakaların klinikopatolojik faktörlerinin yanı sıra hücresel yaşlanma belirteçleri ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar kompakt tümör hücrelerinin şeffaf tümör hücrelerinden hormonal olarak daha aktif olduğunu ve daha fazla yaşlandığını gösterdiler.<sup>23</sup>

Bu çalışma Cushing Sendromu tanısı almış ve opere edilmiş bir hastanın adrenokortikal adenom örneğinde gerçekleştirilmiştir. Cushing Sendromu, vücudun kronik olarak endojen veya eksojen kaynaklardan aşırı glukokortikoidlere maruz kalmasını yansıtan karmaşık bir metabolik bozukluktur.<sup>24-28</sup> Endojen Cushing Sendromunun teşhisi genellikle klinik semptomlar ve çoklu biyokimyasal testler kullanılarak yapılır. Kesin tanı koymak için kullanılan biyokimyasal testlerin her birinin sınırlamaları Bansal ve diğerleri (2015) tarafından tartışılmıştır. Bansal ve ekibi, Cushing Sendromu olan hastalar için optimal tanı ve tedavide, yönetim ekibinin tüm üyelerinin kapsamlı ve yakın koordinasyonu ve katılımını gerektirdiğini vurgulamışlardır.<sup>29</sup> Cushing sendromunun tanısının konması kritiktir, çünkü orta-şiddetli hiperkortizolizmden kaynaklanan genel mortalite, makrovasküler (miyokard enfarktüsü, felç) ve enfeksiyöz komplikasyonlar nedeniyle iki kat artmaktadır. Bu hastalık, adrenal (%20) ve adrenal olmayan (%80) etiyolojiler içermektedir. Vakaların çoğu hipofiz veya ektopik kortikotropin (ACTH) aşırı üretimine bağlansa da, Cushing Sendromunun patofizyolojisinde primer kortizol üreten adrenal kortikal lezyonların tanısı giderek artmaktadır.<sup>30</sup> Cushing sendromlu vakaların %45'ini adrenokor-

tikal adenomların, %35'ini ise adrenokortikal karsinomların oluşturduğu bildirilmiştir.<sup>31</sup> Literatürde adrenokortikal adenom ve adrenokortikal kanser dokuları,<sup>15,32,33</sup> idrar örnekleri<sup>34-37</sup> ve hücre hatları<sup>38-41</sup> ile ilgili proteom tabanlı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Kim ve arkadaşları (2016) bu çalışmaların, adrenokortikal adenomlar ve adrenokortikal kanserler arasında tanısal karardaki zorluklara yeterince açıklık getirmediğini vurgulamıştır. Bu zorlukların çalışmalarda kullanılan örneklerin (idrar ve doku numuneleri ve hücre kültürü) ve analiz yöntemlerinin (ters faz sıvı kromatografisi, geleneksel 2-DE ve 2D-farklı jel elektroforezi) farklılığından kaynaklandığını ve bu nedenle her çalışmada farklı potansiyel biyobelirteçlerin bulunduğu dikkat çekmiştir.<sup>42</sup> Önceki tüm çalışmalar adrenokortikal tümörler hakkında önemli bilgiler ortaya koymuş olsa da, altta yatan mekanizmaları hala tam olarak açıklayamamaktadır.

Bu çalışmada, adrenokortikal adenom dokusunda iki farklı bölgeden alınan örneklerde seviyelerinde farklılık görülen proteinlerin kontrol örneğine kıyasla 2D-PAGE kullanılarak analiz edilmiştir. Adenom ve kontrol grubu karşılaştırıldığında regülasyona uğrayan ve analiz edilmesi gereken 17 protein (ENPL, HSP71, TBB5, TBA1B, PRDX6, KP YM, TPIS, GAPDH (SSP 8316), TKT, SODM, MOES, EZRI, DHE3, EFTu, EF2, CAH1 ve FIBB) tespit edilmiştir. Bu proteinlerin STRING analizi, 15 düğümlü bir metabolik ağ oluşturmuştur (Şekil 4a). Farklı olarak düzenlenmiş proteinlerin, karbon ve amino asit metabolizmalarının yanı sıra hücre iskeleti yapısının düzenlenmesinde rol oynadığı görülmüştür. Karbon metabolizmasının proteinleri, yani Piruvat kinaz izozimleri M1/M2 (PKM1/M2 veya KP YM), Triozfosfat izomeraz (TPIS) ve Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (G3P, GAPDH), özellikle glikoliz ve glukoneogenezde rol oynarken, Glutamat dehidrojenaz 1 (mitokondriyal) (DHE3) trikarboksilik asit döngüsünde aktivite göstermektedir. Tanımlanan proteinlerin dördü amino asit biyosentez sürecine aittir (PKM1/M2, TPIS, GAPDH ve Transketolaz-TKT). Tubulin alfa-1B zinciri-TUBA1B, Tubulin beta zinciri-TUBB, Moesin-MOES ve Ezrin-EZRI proteinleri ise hücre iskeletinin organizasyonu ile ilişkilen-

dirilmiştir. Biyolojik süreçlere göre değerlendirildiğinde, proteinlerin çoğunun organik madde ve kimyasal uyarana hücresel yanıtta ve monosakkarit biyosentetik sürecinde rol oynadığı görülmüştür. Adenom içi ve kontrol grubunu karşılaştırdığımızda ise 13 proteinin regülasyonunda (ENPL(SSP 2403), TBB5, TBA1B, PRDX6, TPIS, GAPDH, TKT, CAH1, MOES, KP YM, EFTu, EF2 ve FIBB) değişiklik göze çarpmıştır. Bu proteinlerin STRING analizi, 11 düğümlü bir metabolik ağ oluşturmuştur (Şekil 4b). Bu çalışmada dikkat çeken en önemli noktalardan birisi bir tümör dokusu içerisinde belirlenen iki farklı bölgeden alınan doku örneklerinden tanımlanan proteinlerin farklı metabolik ağlara ait oluyor olmasıdır. Adenom-içi (ADN içi) olarak adlandırdığımız bölge belirgin hücre sınırlarına sahip granüler ve eozinofilik sitoplazmalı hücreler içerirken adenom (ADN) olarak adlandırdığımız bölge lipitten zengin geniş sitoplazmalı hücre kümeleri içermektedir. Dolayısıyla farklı hücre tiplerini içeren heterojen tümörlerin farklı proteomik profilleri oluşturması muhtemeldir. Kontrole göre gruplardaki durumlara baktığımızda ADN içi ve ADN dokularında aynı proteinlerin farklı seviyelerde ve/veya farklı yönlerde regülasyonları görülmektedir (Tablo 2). Örneğin post-translasyonel modifikasyon sonucu jelde birden fazla noktada temsil edilen proteinlerin regülasyonları kontrol ile karşılaştırıldığında farklılık göstermektedir. Bunlardan biri olan glikolitik enzim Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazın bir beneği ADN içinde 4 kat fazla eksprese olurken diğer benek 3 kat daha az eksprese olmuştur. Aynı şekilde salgılanan proteinlerin işlenmesinde ve taşınmasında işlev gören Endoplazminin bir beneği ADN içinde 2 kat fazla eksprese olurken diğer beneğinde bir ekspresyon farklılığı görülmemiştir. Benzer farklılıklar SODM, HSP71, EZRI, DHE3 proteinleri için de geçerlidir. Bu çalışmada bizim en çok dikkatimizi çeken ADN içi ve ADN dokularında CAH1 ve KP YM proteinlerinin ekspresyon farklılıkları olmuştur. Her iki protein de ters yönlü bir regülasyon göstermiştir. CAH1'in de dahil olduğu karbonik anhidrazlar, karbondioksitin tersine çevrilebilir hidrasyonunu yani bikarbonat ve protonlara hızlı dönüşümünü katalize eden metalloenzimlerdir ve organizmalarda

asit-baz dengesinin düzenlenmesinde çok önemlidirler. Ek olarak, karbonik anhidradlar omurgalılarda kemik rezorpsiyonu, glukoneogenez, vücut sıvılarının üretimi ve CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub>'ün taşınması gibi birçok başka fizyolojik sürece katılır.<sup>43,44</sup> Önceki bir çalışmada CAH1'in endometriyal kanserlerde erken evrede aşağı regüle edilirken ileri evrede yukarı regüle edildiği görülmüştür.<sup>45</sup> Literatürde CAH izoenzimleri CAH2, CAH9 ve CAH12'nin endometriyal kanserlerin gelişimi ile ilgili olduğunu gösteren bazı çalışmalar vardır.<sup>46,47</sup> Progresif böbrek hastalığının fare modelinde yapılan bir çalışmada, kronik böbrek hastalıkları sürecine eşlik eden ilerleyici böbrek fibrozunun tedavisinde kullanılan mikofenolat mofetil (MMF) muamelesi sonrasında VEGF sinyal yolu (TAGL2, EF1D ve ACTB) ve hipoksi (CAH1, PSB6 ve ACTG) ile ilişkili proteinlerin seviyelerinde değişiklikler tespit edilmiştir. CAH1 protein seviyesi MMF sonrası düşüş göstermiştir.<sup>48</sup> Çalışmamızda, kontrol ile kıyaslandığında CAH1 proteini ADN dokusunda 3 kat aşağı regüle iken ADN içi dokuda 2 kat yukarı regüle idi. Yani ADN içi dokuda ADN dokusuna göre CAH1 ekspresyonu 9 kat artmıştır. Literatürde CAH1'in Cushing sendromu veya adrenokortikal tümörler ile bir ilişkisine rastlanmamıştır. Glikolitik bir protein olan KP YM'nin çeşitli kanser türlerinde tümör oluşumu, hücre çoğalması, göç veya apoptoz üzerinde etkileri olduğu gösterilmiştir.<sup>49</sup> Bir çalışmada piruvat kinaz protein isoformlarının normal adrenal doku örneklerine göre karsinomda daha fazla olmak üzere adrenokortikal karsinom ve adenom örneklerinde daha fazla eksprese olduğu bildirilmiştir.<sup>50</sup> Bilindiği gibi kanser hücreleri yüksek oksijenli bir ortamda bile daha fazla glikoz tüketir ve yüksek miktarda laktat üretirler.<sup>51</sup> Dolayısıyla glikolitik enzimlerin seviyelerinde anormal artışlar görülür. Bizim çalışmamızda da glikolitik proteinler olan GAPDH ve KP YM proteinlerinin ADN dokusunda yukarı regüle idi. GAPDH'nin bir izoformunun hem ADN içi hem de ADN dokularında yukarı regüle edilirken diğer bir izoformunun ADN içi dokuda aşağı regülasyonu görülmüştür. KP YM proteini majör bir değişiklik göstermiş olup, kontrol ile kıyaslandığında ADN dokusunda 14 kat yukarı regüle iken ADN içi dokuda 4 kat aşağı regüle idi.

Yani ADN içi dokuda ADN dokusuna göre KPYM ekspresyonu 56 kat azalmıştır. ADN içi dokuda ADN dokusuna göre glikolitik aktivitede belirgin bir şekilde düşüşün olduğu görülmektedir. Dolayısıyla enerjetik olarak farklı bir metabolik yol kullanılıyor olabilir. Önceki çalışmalarda farklı örneklerde (kolon, meme, akciğer, karaciğer ve gastroözofageal) numune tipi (merkezi veya periferik cerrahi tümör örnekleri, kor biyopsi örnekleri) ve numunenin dondurulma süresi gibi pre-analitik değişkenlerin bazı proteinlerin ve daha çok da fosfoprotein profillerini etkilediği gösterilmiştir.<sup>17-22</sup> Bu çalışma adrenokortikal adenoma örneğinde tümör dokusu içerisinde örneğin alındığı bölgenin proteom profillerini ne ölçüde etkilediğini ve ortak olan bazı proteinlerin belirgin derecede farklı seviyelerde eksprese edildiğini gösteren ilk çalışmadır. Tümör dokusundan iki farklı bölgeden aldığımız örneklerde daha çok enerji metabolizması ile ilişkili proteinler olmak üzere bazı proteinlerin ifadelerinde ciddi farklılıklar görülmüştür. Bu durum özellikle biyobelirteç arayışlarının olduğu çalışmalarda proteomik bilgilerin dikkatle yorumlanması gerektiğini ve bu çalışmalarda örnek sayısının mümkün olduğunca yüksek tutulmasının önemini vurgulamaktadır.

#### **Teşekkür**

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (KÜ GOKAEK 2019/233) tarafından Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak onaylanmış ve Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: KOÜ-BAP TSA-2020-1545). Dokunun patolojik incelemesini yaptığı için Dr. Büşra Yaprak Bayrak'a teşekkür ederiz.

#### **Çıkar Çatışması**

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

## Kaynaklar

- Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis*. Mar 1996;17(3):443-53. doi:10.1002/elps.1150170303
- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. Jun 15 2000;405(6788):837-46. doi:10.1038/35015709
- Gramolini A, Lau E, Liu PP. Identifying Low-Abundance Biomarkers: Aptamer-Based Proteomics Potentially Enables More Sensitive Detection in Cardiovascular Diseases. *Circulation*. Jul 26 2016;134(4):286-9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022940
- Hanash S, Taguchi A. Application of proteomics to cancer early detection. *Cancer J*. Nov-Dec 2011;17(6):423-8. doi:10.1097/PPO.0b013e3182383cab
- Jiang S, Wang Y, Liu Z. The application of urinary proteomics for the detection of biomarkers of kidney diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2015;845:151-65. doi:10.1007/978-94-017-9523-4\_15
- Lin JL, Bonnicksen MH, Nogeh EU, Raftery MJ, Thomas PS. Proteomics in detection and monitoring of asthma and smoking-related lung diseases. *Expert Rev Proteomics*. Jun 2010;7(3):361-72. doi:10.1586/ep.10.9
- Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clinical Biochemistry*. Nov 2004;37(11):943-952. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.09.002
- Conrotto P, Souchehytskyi S. Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications. *Exp Oncol*. Sep 2008;30(3):171-80.
- Nakayasu ES, Gritsenko M, Piehowski PD, et al. Tutorial: best practices and considerations for mass-spectrometry-based protein biomarker discovery and validation. *Nat Protoc*. Aug 2021;16(8):3737-3760. doi:10.1038/s41596-021-00566-6
- Becker KF. Using tissue samples for proteomic studies-Critical considerations. *Proteom Clin Appl*. Apr 2015;9(3-4):257-267. doi:10.1002/prca.201400106
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*. 2015;43(D1):D447-D452.
- Uslubas I, Kanli A, Kasap M, Akpınar G, Karabas L. Effect of aflibercept on proliferative vitreoretinopathy: Proteomic analysis in an experimental animal model. *Exp Eye Res*. Feb 2021;203doi:ARTN 108425 10.1016/j.exer.2020.108425
- Yoneten KK, Kasap M, Arga KY, Akpınar G, Utkan NZ. Decreased serum levels of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 and monoacylglycerol lipase act as diagnostic biomarkers for breast cancer. *Cancer Biomark*. Oct 12 2021;doi:10.3233/CBM-203093
- Teke K, Kasap M, Simsek E, et al. SERPIN A5 may have a potential as a biomarker in reflecting the improvement of semen quality in infertile men who underwent varicocele repair. *Andrologia*. Aug 2021;53(7):e14081. doi:10.1111/and.14081
- Poli G, Ceni E, Armignacco R, et al. 2D-DIGE proteomic analysis identifies new potential therapeutic targets for adrenocortical carcinoma. *Oncotarget*. Mar 20 2015;6(8):5695-706. doi:10.18632/oncotarget.3299
- Lim MD, Dickherber A, Compton CC. Before You Analyze a Human Specimen, Think Quality, Variability, and Bias. *Anal Chem*. Jan 1 2011;83(1):8-13. doi:10.1021/ac1018974
- Espina V, Edmiston KH, Heiby M, et al. A portrait of tissue phosphoprotein stability in the clinical tissue procurement process. *Mol Cell Proteomics*. Oct 2008;7(10):1998-2018. doi:10.1074/mcp.M700596-MCP200
- Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H, et al. Influence of biospecimen variables on proteomic biomarkers in breast cancer. *Clin Cancer Res*. Jul 15 2014;20(14):3870-83. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1507
- Gundisch S, Hauck S, Sarioglu H, et al. Variability of protein and phosphoprotein levels in clinical tissue specimens during the preanalytical phase. *J Proteome Res*. Dec 7 2012;11(12):5748-62. doi:10.1021/pr300560y
- Gundisch S, Grundner-Culemann K, Wolff C, et al. Delayed times to tissue fixation result in unpredictable global phosphoproteome changes. *J Proteome Res*. Oct 4 2013;12(10):4424-34. doi:10.1021/pr400451z
- Baker AF, Dragovich T, Ihle NT, Williams R, Fenoglio-Preiser C, Powis G. Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling. *Clin Cancer Res*. Jun 15 2005;11(12):4338-40. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0422
- Pinhell IF, Macneill FA, Hills MJ, et al. Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R76. doi:10.1186/bcr2719
- Gao X, Yamazaki Y, Tezuka Y, et al. Intratumoral heterogeneity of the tumor cells based on in situ cortisol excess in cortisol-producing adenomas; similar to An association among morphometry, genotype and cellular senescence similar to. *J Steroid Biochem*. Nov 2020;204doi:ARTN 105764 10.1016/j.jsbmb.2020.105764
- Bertagna X, Guignat L, Groussin L, Bertherat J. Cushing's disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Oct 2009;23(5):607-23. doi:10.1016/j.beem.2009.06.001
- Hatipoglu BA. Cushing's syndrome. *J Surg Oncol*. Oct 1 2012;106(5):565-71. doi:10.1002/jso.23197
- Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*. May 13 2006;367(9522):1605-17. doi:10.1016/S0140-6736(06)68699-6
- Nieman LK, Biller BM, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. May 2008;93(5):1526-40. doi:10.1210/jc.2008-0125
- Tabarin A, Perez P. Pros and cons of screening for occult Cushing syndrome. *Nat Rev Endocrinol*. Mar 22 2011;7(8):445-55. doi:10.1038/nrendo.2011.51
- Bansal V, El Asmar N, Selman WR, Arafah BM. Pitfalls in the diagnosis and management of Cushing's syndrome. *Neurosurg Focus*. Feb 2015;38(2):E4. doi:10.3171/2014.11.FOCUS14704
- Clayton RN, Raskauskienė D, Reulen RC, Jones PW. Mortality and morbidity in Cushing's disease over 50 years in Stoke-on-Trent, UK: audit and meta-analysis of literature. *J Clin Endocrinol Metab*. Mar 2011;96(3):632-42. doi:10.1210/jc.2010-1942
- Duan K, Hernandez KG, Mete O. Clinicopathological correlates of adrenal Cushing's syndrome. *Postgrad Med J*. Jun 2015;91(1076):331-42. doi:10.1136/postgradmedj-2014-202612rep
- Kjellin H, Johansson H, Hoog A, Lehtio J, Jakobsson PJ, Kjellman M. Differentially expressed proteins in malignant and benign adrenocortical tumors. *PLoS One*. 2014;9(2):e87951. doi:10.1371/journal.pone.0087951
- Yang MS, Wang HS, Wang BS, et al. A comparative proteomic study identified calreticulin and prohibitin up-regulated in adrenocortical carcinomas. *Diagn Pathol*. Apr 15 2013;8:58. doi:10.1186/1746-1596-8-58
- Kotlowska A, Malinski E, Sworczak K, Kumirska J, Stepnowski P. The urinary steroid profile in patients diagnosed with adrenal incidentaloma. *Clin Biochem*. Apr 2009;42(6):448-54. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.12.027
- Kotlowska A, Sworczak K, Stepnowski P. Urine metabolomics analysis for adrenal incidentaloma activity detection and biomarker discovery. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Feb 15 2011;879(5-6):359-63. doi:10.1016/j.jchromb.2010.12.021
- Arlt W, Biehl M, Taylor AE, et al. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. Dec 2011;96(12):3775-84. doi:10.1210/jc.2011-1565
- Kerkhofs TM, Kerstens MN, Kema IP, Willems TP, Haak HR. Diagnostic Value of Urinary Steroid Profiling in the Evaluation of Adrenal Tumors. *Horm Cancer*. Aug 2015;6(4):168-75. doi:10.1007/s12672-015-0224-3
- Minowada S, Kinoshita K, Hara M, Isurugi K, Uchikawa T, Nijijima T. Measurement of urinary steroid profile in patients with adrenal tumor as a screening method for carcinoma. *Endocrinol Jpn*. Feb 1985;32(1):29-37. doi:10.1507/endocrj1954.32.29
- Stigliano A, Cerquetti L, Sampaoli C, Bucci B, Toscano V. Current and emerging therapeutic options in adrenocortical cancer treatment. *J Oncol*. 2012;2012:408131. doi:10.1155/2012/408131
- Tremoen NH, Fowler PA, Ropstad E, Verhaegen S, Krogenaes A. Exposure to the three structurally different PCB congeners (PCB 118, 153, and 126) results in decreased protein expression and altered steroidogenesis in the human adrenocortical carcinoma cell line H295R. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77(9-11):516-34. doi:10.1080/15287394.2014.886985
- Sbiera S, Leich E, Liebisch G, et al. Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Endocrinology*. Nov 2015;156(11):3895-908. doi:10.1210/en.2015-1367
- Kim HM, Lee YK, Koo JS. Proteome analysis of adrenal cortical tumors. *Expert Rev Proteomics*. Aug 2016;13(8):747-55. doi:10.1080/14789450.2016.1210008
- Sly WS, Hu PY. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:375-401. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.002111
- Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*. Feb 2008;7(2):168-81. doi:10.1038/nrd2467
- Ceylan Y, Akpınar G, Doger E, et al. Proteomic analysis in endometrial cancer and endometrial hyperplasia tissues by 2D-DIGE technique. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. Feb 2020;49(2):101652. doi:10.1016/j.jogoh.2019.101652
- Jo MS, Choi OH, Suh DS, et al. Correlation between expression of biological markers and [F]fluorodeoxyglucose uptake in endometrial cancer. *Oncol Res Treat*. 2014;37(1-2):30-4. doi:10.1159/000358163
- Sadlecki P, Bodnar M, Grabiec M, et al. The role of Hypoxia-inducible factor-1 alpha, glucose transporter-1, (GLUT-1) and carbon anhydrase IX in endometrial cancer patients. *Biometa Res Int*. 2014;2014:616850. doi:10.1155/2014/616850
- Petrova DT, Brehmer F, Schultze FC, et al. Differential kidney proteome profiling in a murine model of renal fibrosis under treatment with mifepristone. *Pathobiology*.

2011;78(3):162-70. doi:10.1159/000324597

49. Zahra K, Dey T, Ashish, Mishra SP, Pandey U. Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Front Oncol.* 2020;10:159. doi:10.3389/fonc.2020.00159
50. Duan K, Gucer H, Kefeli M, Asa SL, Winer DA, Mete O. Immunohistochemical Analysis of the Metabolic Phenotype of Adrenal Cortical Carcinoma. *Endocr Pathol.* Sep 2020;31(3):231-238. doi:10.1007/s12022-020-09624-3
51. Warburg O, Wind F, Negelein E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol.* Mar 7 1927;8(6):519-30. doi:10.1085/jgp.8.6.519