

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İki Boyutlu ve Üç Boyutlu KHDAK Modellerinde Hücre
Membran Protein İmzalarının Normoksik ve Hipoksik
Koşullarda Araştırılması

Ayca SEZAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Eylül, 2025

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ONAYI

İki Boyutlu ve Üç Boyutlu KHDAK Modellerinde Hücre
Membran Protein İmzalarının Normoksik ve Hipoksik
Koşullarda Araştırılması

Aycan SEZAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Doktora Tezi 29/09/2025 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER(Danışman)
: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Prof. Dr. Gülay SEZGİN
: Prof. Dr. Dilek GÖKTÜRK
: Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç. Ü. Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi (Proje No:14423) ve Tübitak
1002-A (Proje No:223S656) Tarafından Desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
GİRİŞ.....	1
1.1.Araştırmanın Amacı.....	2
1.2.Araştırmanın Hipotezi.....	2
1.3.Araştırmanın Yeri	2
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Akciğer Kanseri.....	3
2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	7
2.1.3. Akciğer Kanseri Histopatolojik Sınıflandırması.....	7
2.1.4. Akciğer Kanseri Klinik Tanısı ve Tarama Yöntemleri.....	11
2.1.5. Akciğer Kanseri Evreleme Sistemi	12
2.2. Kök Hücre ve Kanseri Kök Hücreleri	15
2.2.1. Kök Hücreler.....	15
2.2.2. Kanseri Kök Hücreleri	17
2.3. Hipoksik Yolağın Tümör Oluşumuna Etkisi ve Kanseri Kök Hücreleri ile İlişkisi	22
2.3.1. Hipoksik Yolak.....	22
2.3.2. Hipoksi ve Kanseri Kök Hücreleri	26
2.4. Üç Boyutlu (3D) Hücre Kültürü ve Kanseri Araştırmalarındaki Kullanımı	27
2.5. Protein İfade Profili ve Hücre Yüzey Moleküllerinin Terapötik Yaklaşımındaki Önemi.....	30
2.5.1. Hücre Membran Proteinleri ve İzolasyonları.....	31
3. MATERYAL VE METOT	37
3.1. Materyal	37
3.1.1. Laboratuvar Ekipmanları	37
3.1.2. Kimyasallar, ticari kitler, primerler ve antikorlar	38
3.2. Metot	40
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	40
3.2.2. Hipoksik koşulun oluşturulması	41
3.2.3. Koloni Oluşum Testleri	42

3.2.4. İmmünohistokimya Deneyleri (IHC)	43
3.2.5. İmmünooblotlama (İB)	43
3.2.6. LC-MS/MS ve Veri Analizi	44
3.2.7. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (qPCR)	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1. Bulgular	47
4.1.1. Sağlıklı Bronş Epitel Hücre Hattı ile (Beas2B) 3D Ön Kültür Denemesi	47
4.1.2. Akciğer Kanseri Hücre Hatları A549 ve Calu-1 Hücrelerinden Tümöroidlerinin Oluşturulması	47
4.1.3. Hipoksik Mikroçevrenin Oluşturulması	51
4.1.4. Hipoksinin Koloni Formasyona Etkisi	58
4.1.5. Hipoksinin bilinen kanser kök hücre biyobelirteçleri üzerindeki etkisinin KHDAK tümöroidlerinde araştırılması	60
4.1.6. Hücre Membran Biyotinyalizasyonu	64
4.1.7. 2D ve 3D Hücre Kültüründe Büyütülen KHDAK Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik koşullarda Proteomik ve Fonksiyonel Biyoinformatik Analizleri	65
4.1.8. Normoksik ve Hipoksik Mikroçevre koşullarında Koşullarında 2D ve 3D Akciğer Kanseri Modellerinde Tanımlanan Ortak Proteinlerin Literatür Bazlı İncelenmesi	75
4.1.9. Proteomik analiz sonrası tanımlanan bazı proteinlerin mRNA düzeyindeki ifade değişikliklerinin araştırılması	87
4.2. Tartışma	90
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	105
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	129
EKLER	131

İki Boyutlu ve Üç Boyutlu KHDAK Modellerinde Hücre Membran Protein İmzalarının Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Araştırılması

Aycan SEZAN

Danışman: Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Akciğer kanseri, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olup, bu hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçlerin tanımlanması veya yeni moleküler mekanizmaların aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Kanser kök hücreleri (KKH), kök hücre benzeri özellikler gösteren, tümörün oluşumu, proliferasyonu, invazyonu ve metastazında rol oynayan kritik hücre popülasyonlarıdır. Dolayısıyla KKH'leri hedeflenmesi, başta akciğer kanseri olmak üzere pek çok kanser türünün tanı ve tedavisinde hayati bir rol üstlenmektedir.

Bu çalışmada 3D (üç boyutlu) küçük hücreli dışı akciğer (KHDAK) tümöroidleri oluşturulmuş, bu tümöroidlerin KKH gelişimini indüklemek amacıyla hipoksik mikroçevreye maruz bırakılmışlardır. Hipoksik ve normoksik ortamlarda büyütülmüş tümöroidlerden zenginleştirilmiş hücre membran proteinlerin izole edilmiştir. Elde edilen zenginleştirilmiş hücre membran protein lizatı proteomik yöntemler ile analiz edilmiştir. Toplamda tüm koşullarda 2225 adet protein tanımlanmıştır. Bu tanımlanan proteinlerin önemli bir kısmı (yaklaşık %40) hücre membranına lokalizedir. Proteomik analiz sonucunda hem normoksik hem de hipoksik koşullarda KKH ilişkili (DLL1, NOTCH1, TSPAN5, THBS1, CALR, PLXNB2, ABCA5, NOTCH2NLB vb.) proteinler tanımlanmıştır. Sonuç olarak normoksik ve hipoksik mikroçevre koşullarında elde edilen bu proteinler KHDAK'de tanı ve tedaviye yönelik potansiyel biyobelirteç adayları sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kanser kök hücresi, Akciğer kanseri, Proteomik, Tümöroid, Biyobelirteç

PhD THESIS

**Investigation of Cell Membrane Protein Signatures in
Two-Dimensional and Three-Dimensional NSCLC
Models under Normoxic and Hypoxic Conditions**

Aycan SEZAN

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Yasemin Saygıdeğer

Department of Biotechnology

ABSTRACT

Lung cancer, one of the leading causes of cancer-related deaths in man and woman. Cancer stem cells (CSCs) play an important role in tumor recurrence, progression, and therapy resistance. Therefore, targeting CSCs plays a vital role in the diagnosis and treatment of lung cancers.

In this study, 3D (three-dimensional) non-small cell lung cancer (NSCLC) tumoroids were generated and exposed to a hypoxic microenvironment to induce CSC development. Enriched cell membrane proteins were isolated from tumoroids grown under hypoxic and normoxic conditions. The enriched cell membrane protein lysate obtained was analyzed by proteomic methods. In total, 2225 proteins were identified under all conditions. A significant portion of these identified proteins (approximately 40%) were localized in the cell membrane. Proteomic analysis were identified CSC-related proteins (such as DLL1, NOTCH1 TSPAN5, THBS1, CALR, PLXNB2, ABCA5, NOTCH2NLB, etc.) in normoxic and hypoxic conditions.

As a result, these proteins obtained under normoxic and hypoxic microenvironmental conditions in this study present potential biomarker candidates for the diagnosis and treatment of NSCLC.

Keywords: Cancer stem cell, Lung cancer, Proteomics, Tumoroids, Biomarker

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim hayatım boyunca bana yol gösteren, tezimin her aşamasında değerli bilgi ve deneyimleriyle katkı sağlayan, güvenini daima hissettiren, özgüvenimi pekiştiren, sabır ve hassasiyetiyle beni yetiştiren değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER'e en derin teşekkürlerimi sunarım.

GD-lab kapılarının sonuna kadar açtığı, İstanbul Teknik Üniversitesi'nde bulunduğum süre boyunca değerli bilgi ve deneyimlerini paylaştığı, gelişimime gösterdiği katkı, eşsiz protein dünyasıyla tanışmamı sağladığı, araştırmalarımın her aşamasına maddi ve manevi desteğini esigremediği, sabrı, şefkati ve güler yüzü için Sayın Prof. Dr. Gizem DİNLER DOĞANAY'a gönülden teşekkür ederim.

Doktora eğitim hayatımın ilk iki yılında danışmanlığını esirgemeyen, değerli bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan, desteğini her zaman arkamda hissettiğim yüksek lisans danışmanım Sayın Prof. Dr. Makbule BAYLAN'a en içten şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim boyunca değerli katkı ve yönlendirmeleriyle desteklerini esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN hocalarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca IHC uygulamalarında yardımcı olan değerli bilgi ve deneyimlerini, paylaşan Prof. Dr. Emine KILIÇ BAĞIR'a ve Dr. Ayşe Büşra BEREKETOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu yolculukta “ne biliyorsam ondan öğrendiğim” diyebileceğim, hem bir hoca hem de bir arkadaş olan değerli hocam Dr. Burcu SAYGIDEĞER'e; her türlü işime yetişen, koştan ve dostluğunu, desteğini arkamda hissettiren M. Yağız ÇAPANOĞLU'na; doktoramın ilk yıllarında birlikte yürüdüğüm, öğrendiğim, desteklerini hep hissettiğim Mehmet ÖZERTEN, Eylem NAS ve Ezgi DERİNÖZ'e; naifliği ve yardımseverliği için Hamide AKSEL'e, Merve AKSOYLU'ya ve tüm Saygıdeğer-Lab üyelerine kalpten teşekkür ederim. Ayrıca “organoid” uygulamalarında değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Deren ASLAN'a; İstanbul Teknik Üniversitesi'nde bulunduğum süre boyunca desteği esirgemeyen GD-Lab üyelerine, bu yolculuğumda bana katkısı olan tüm meslektaş ve arkadaşlarıma manevi desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduklarını hissettiren, tüm yolculuklarımda sorgusuz sualsiz benimle birlikte yürüyen, ışıkları ile yolumu aydınlatan ve kızları olmaktan onur duyduğum canım annem Meliha SEZAN ve canım babam Kerim SEZAN başta olmak üzere tüm kardeşlerime, yeğenlerime sonsuz minnetlerimi sunuyorum.

Son olarak doktora yolculuğum boyunca her düştüğümde beni kaldıran, motive eden, inanan, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan, aklı ve kalbiyle hayatımı

güzelleştiren Ugan GÜRLEK'e, varlıklarıyla bana güzellik katan kedilerim "Mayıs" ve "Karamel'e" gönülden teşekkür ederim.



ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 2.1. Türkiye’de trake, bronş ve akciğer kanseri yüzde dağılımları (2009-2019).....	6
Tablo 2.2. Türkiye’de trake, bronş ve akciğer kanseri insidans oranları (2009-2019).	6
Tablo 2.3. Akciğer Kanseri Sınıflandırması (2021, DSÖ).....	8
Tablo2.4. Akciğer Kanseri Sınıflandırması (2021, DSÖ).....	8
Tablo 2.5. Akciğer Kanseri 9.TNM evrenlendirmesi (IASLC, 2024).	13
Tablo 2.6. KHDAK biyobelirteçleri	20
Tablo 2.7. KHAK biyobelirteçleri	21
Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan ekipmanlar	37
Tablo 3.2. Kullanılan kimyasallar, kitler, antikorlar ve primerler	38
Tablo 4.1. A549 koloni formasyonunda oluşan koloni sayıları	58
Tablo 4.2. A549 soft agar koloni formasyonunda oluşan koloni sayıları	60
Tablo 4.3. Calu-1 soft agar koloni formasyonunda oluşan koloni sayıları	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil. 2.1.	Trake, bronş ve akciğer kanseri ölüm oranları (2022, DSÖ).....	3
Şekil.2.2.	Akciğer kanseri insidans oranları (2020, DSÖ).....	4
Şekil 2.3.	2022 yılında Türkiye’de akciğer kanseri insidans oranları.....	5
Şekil 2.4.	Kök hücre ve kanser kök hücre dönüşümü.....	18
Şekil 2.5.	HIF- α ve HIF1- β izoformlarının domain yapıları.....	22
Şekil 2.6.	VHL geni (Frost’ten (2018) uyarlanmıştır.).....	24
Şekil 2.7.	Hipoksik Yolak (Watts ve ark.’dan (2022) modifiye edilmiştir.).....	24
Şekil 2.8.	Hipoksi ve KKH arasındaki ilişki (Zaarour ve ark.’dan (2023) modifiye edilmiştir.).....	27
Şekil 2.9.	Biyotin yapısı (PubChem ID:171548).....	33
Şekil 2.10.	Sulfo-NHS-SS-Biotin reaktifinin hücre yüzey biyotiniasyonu (Qiu ve Wang ark.,’dan (2007) modifiye edilmiştir.).....	34
Şekil 2.11.	Sulfo-NHS-SS-Biotin yapısı (PubChem ID:71571496).....	35
Şekil 3.1.	Agaroz iskeleli tümöroid formasyon iş şeması.	40
Şekil 3.2.	Matrijel iskeleli tümöroid iş şeması.....	41
Şekil 4.1.	Sağlıklı bronş epitel hücre hattı ile (Beas2B) ile ön kültür denemesi.	47
Şekil 4.2.	A549 ve Calu-1 hücrelerinin agaroz iskele üzerinde tümöroid formasyonu.	48
Şekil 4.3.	A549 hücrelerinin agaroz iskele üzerinde tümöroid formasyonu.....	48
Şekil 4.4.	3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinin hematoksil-eozin (HXE) boyamaları.	49
Şekil 4.5.	3D-A549 tümöroidlerinin inverted mikroskop görüntüsü ve DAPI boyaması..	49
Şekil 4.6.	Matrigel destekli 3D-A549 tümöroidlerinin formasyonu-1.	50
Şekil 4.7.	Matrigel destekli 3D-A549 tümöroidlerinin formasyonu-2.	50
Şekil 4.8.	Matrigel destekli Calu-1 hücrelerinin formasyonu.....	51
Şekil 4.9.	Hipoksik chamber koşullarında 2D-A549 ve 3D-A549’de GLUT1 ifadesinin mRNA ifadesi.....	52
Şekil 4.10.	Hipoksik chamber koşullarında 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde GLUT1, HIF1 α , VEGFA mRNA düzeyindeki değişimi.	53
Şekil 4.11.	Hipoksik chamber koşulunda 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde GLUT1 protein düzeyi.....	53
Şekil 4.12.	Hipoksik chamber koşulunda 3D Calu-1’de GLUT1 protein düzeyi ve hematoksil-eozin boyamaları.....	54
Şekil 4.13.	Hipoksik chamber koşulunda 3D-A549’de GLUT1 protein ifadesi ve hematoksil-eozin boyamaları.....	55

Şekil 4.14.	Hipoksik chamber koşullarında 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde HIF2 α protein ifadesi (b) ve hematoksilin-eozin boyamaları (a).....	56
Şekil 4.15.	3D-A549 tümöroidlerinde CoCl ₂ optimizasyonu.	57
Şekil 4.16.	CoCl ₂ hipoksisinde 3D-A549’de GLUT1 ve HIF1 α proteinlerinin ifadesi	58
Şekil 4.17.	A549 hücrelerinin normal koloni formasyonu.	59
Şekil 4.18.	Soft agar koloni formasyonu A549 ve Calu-1 kolonileri.	59
Şekil 4.19.	Hipoksik chamber koşulunda 3D-A549 (a) ve 3D Calu-1 (b) tümöroidlerde	
Şekil 4.20.	CoCl ₂ hipoksisinde 3D-A549’de OCT4 ve SOX2 mRNA ifadesi.....	61
Şekil 4.21.	Hipoksik koşullarda (Chamber ve CoCl ₂) 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde KKH belirteçlerinin protein ifadeleri.....	62
Şekil 4.22.	Hipoksik chamber koşulunda 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde CD44 ve ALDH1a protein ifadeleri.	63
Şekil 4.23.	Hipoksik chamber koşulunda 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinin ALDH1a ve CD44 protein ifadeleri.	64
Şekil 4.24.	Sulfo-NHS-SS-Biotin reaktifi ile biyotinyasyonunun kontrolü	64
Şekil 4.25.	2D-A549 hücrelerinde farklı koşullarda tanımlanan toplam protein ve hücre membran protein dağılımları.	65
Şekil 4.26.	2D-A549’e ait tanımlanan proteinlerin GO biyolojik süreç analizi.	66
Şekil 4.27.	2D-A549’e ait tanımlanmış proteinlerin KEGG yolak analizi.	67
Şekil.4.28.	3D-A549 tümöroidlerinde farklı koşullarda tanımlanan toplam protein ve hücre membran protein dağılımları.	68
Şekil.4.29.	3D-A549’e ait tanımlanmış proteinlerin biyolojik süreç analizleri.....	69
Şekil 4.30.	3D-A549’e ait tanımlanmış proteinlerin KEGG yolak analizleri.....	70
Şekil 4.31.	2D-A549 ve 3D-A549’de tanımlanmış proteinlerin KEGG yolak analizleri. ...	71
Şekil 4.32.	2D-A549 ve 3D-A549’de tanımlanmış proteinlerin moleküler fonksiyon analizleri.	72
Şekil 4.33.	3D Calu-1 tümöroidlerinde farklı koşullarda tanımlanan toplam protein ve hücre membran protein dağılımları.	73
Şekil 4.34.	3D Calu-1’e ait tanımlanmış proteinlerin biyolojik süreç analizleri.	74
Şekil 4.35.	3D Calu-1’e ait tanımlanmış proteinlerin KEGG yolak analizleri.	74
Şekil 4.36.	3D Calu-1’de tanımlanmış proteinlerin moleküler fonksiyon analizleri	75
Şekil 4.37.	A549 ve Calu-1 modellerinde normoksik koşullar altında tanımlanan hücre membran proteinleri.	76
Şekil 4.38.	Normoksik koşullarda 2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1’e modellerinde tanımlanan tüm proteinlerin ortak ve özgün dağılım profili.....	77
Şekil 4.39.	A549 ve Calu-1 modellerinde hipoksik chamber koşullarında tanımlanan hücre membran proteinleri.....	81

Şekil 4.40. A549 ve Calu-1 modellerinde hipoksik koşullarda (chamber ve CoCl_2) tanımlanan hücre membran proteileri.....	81
Şekil 4.41. Hipoksik chamber koşulunda 2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1'da tanımlanan proteinlerin karşılaştırmalı analizi.	85
Şekil 4.42. Proteomik analizler sonucunda tanımlanan bazı hücre membran proteinlerinin, hipoksik koşullarda 3D-A549 tümöroidlerinde mRNA ifadeleri.....	88
Şekil 4.43. A549 modellerinde tanımlanan bazı hücre içinde lokalize olan proteinlerinin, hipoksik koşullarda 3D-A549 tümöroidlerinde mRNA ifadeleri	89



SİMGELER VE KISALTMALAR

BCA	: Bikinkonik Asit
CoCl ₂	: Kobalt (II) Klorür
KKH	: Kanser Kök Hücreleri
2D	: İki Boyutlu
3D	: Üç Boyutlu
HRE	: Hipoksiye Yanıt Elementi
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
GO	: Gen Ontoloji
LC-MS/MS	: Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
PLGS	: ProteinLynx Global Server
IHC	: İmmünohistokimya
İB	: İmmünblotlama
WB	: Western Blot
HXE	: Hematoksilen-Eozin
ECM	: Ekstraselüler matriks/Hücre Dışı Matriks
EMT	: Epithelial- Mesenchymal Transition/Epitelial Mezenkimal Geçiş
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ct	: Cycle Threshold/Eşik Döngü Sayısı
RT-PCR	: Reverse Transcription PCR
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
FDR	: False Discovery Rate/Yanlış Keşif Oranı
DAVID	: Database for Annotation, Visulation and Integrated Discovery
DAPI	: 4', 6-diamidino-2-phenylindole
FBS	: Fetal Bovine Serumu/Fetal Sığır Serum
BSA	: Bovine Serum Albumin/sığır Serum Albumini
CD	: Cluster of Differentiation

GİRİŞ

Kanser, günümüzde önemli bir halk sağlığı sorunu olarak varlığını sürdürmekte ve hem kadınlarda hem de erkeklerde neden olduğu ölüm oranları giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ)'nün 2022 verilerine göre, kansere bağlı ölümler arasında akciğer kanserinin dikkat çekici düzeyde bir artış gösterdiği bildirilmiştir (GLOBOCAN, 2022).

Bu yüksek ölüm oranlarının temel nedenlerinden biri, tedavi yaklaşımlarının sınırlılıklarının yanı sıra, kanser kök hücrelerinin (KKH) metastazın başlatılmasında ve yayılımının sürdürülmesinde oynadığı kritik roldür. Tümör kitlesi içinde normal kanser hücrelerin dışında bir popülasyonu temsil eden KKH'leri; tümörün başlaması, proliferasyonu, invazyonu ve metastazından sorumludur. Güncel bulgular, mevcut akciğer kanseri tedavi yöntemlerinin (cerrahi, kemoterapi, radyoterapi vb.) hastalık nüksünün ana nedeni olan KKH popülasyonunu tamamen ortadan kaldıramadığını ortaya koymaktadır. Bu nedenle akciğer kanseri kök hücrelerini (AKKH) hedef alacak yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi veya spesifik belirteçlerin tanımlanması, hastalığın kesin ve etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için umut vaadeden yaklaşımlardır (Maiuthed ve ark., 2018).

Tümörler karakteristik olarak hipoksik (oksijen azlığı) ortamlara sahiptir ve bu nedenle büyümelerini sürdürebilmek için yeni damar oluşumuna ihtiyaç duyarlar. Hipoksik koşullarda hücreler yaşamlarını devam ettirmek için bir dizi genin transkripsiyonuna ihtiyaç duyarlar (VEGF, GLUT1 vb.). Bu koşullarda sentezlenen ve bir transkripsiyon faktörü olan "Hipoksi ile İndüklenen Faktör" olarak bilinen HIF proteini; hipoksik koşullarda hücrenin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için ihtiyaç duyduğu genlerin transkripsiyonunu sağlar. HIF proteini birçok insan malign kanserde (akciğer, kolon, meme, over, prostat, deri, mide vb.) aşırı ifade edilmektedir. Yapılan araştırmalar hipoksinin, 100'den fazla genin transkripsiyonel uyarımını başlatarak angiyojeniz, metabolizma, hücre proliferasyonu ve sağ kalım üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. HIF- α aktivasyonu yaklaşık %5 oksijende başlar ve oksijen konsantrasyonu neredeyse anoksik koşullara düştüğünde aktive olmaya devam eder. Araştırmalara göre KKH'lerle ilgili olarak, HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın kanser hücrelerinde kök hücre özelliklerini (stemness) koruduğu bildirilmiştir. Her iki faktör de KKH'nin hayatta kalması ve stemness özelliklerinin korunmasında önemli role sahiptir. Hipoksik yolağının tümör biyolojisindeki yeri, KKH'leri mekanizmasını anlamada ve KKH hedefli tedavilerin geliştirilmesinde önemlidir ((Demirel, 2013; Schöning ve ark., 2017; Tong ve ark., 2018).

Sonuç olarak akciğer kanseriyle mücadelede, özellikle KKH hedefli yeni stratejilerin ve biyobelirteç adaylarının (hücre membran/yüzey proteinleri vb.) tanımlanması önemlidir. Modern bilimin son yıllarda gelişen teknolojilerinden (üç boyutlu hücre kültürü teknikleri, proteomik yaklaşımlar vb.) yararlanılarak akciğer kanserlerinin en yaygın alt tipi olan küçük hücreli dışı

akciğer kanserinde (KHDAK) için potansiyel terapötik hedeflerin ortaya konulması, gelecekteki tanı ve tedavi yaklaşımlarına yeni olanaklar sunacaktır.

1.1.Araştırmanın Amacı

Araştırmanın temel amacı; KHDAK’nde özellikle KKH ilişkili mekanizmalara odaklanarak, tanı ve tedavide kullanılabilecek potansiyel biyobelirteç adaylarını tanımlamaktır. Bu kapsamda;

- Normoksik ve hipoksik koşullar altında proteomik yaklaşımlar kullanarak özellikle hücre yüzey proteinlerinin (hücre membran proteinleri) izole edilmesi ve tanımlanması,
- Kimyasal (CoCl₂) ve fiziksel (Chamber) olmak üzere iki farklı hipoksi mikroçevre modeli oluşturulması ve değerlendirilmesi,
- Fizyolojik uygunluğu değerlendirmek amacıyla iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) hücre kültürü modellerinin karşılaştırılması planlanmıştır.

1.2.Araştırmanın Hipotezi

Hipoksik mikroçevre KKH gelişiminde rol oynayan mekanizmaları uyarır. Bu durum özellikle hücre yüzeyinde yer alan proteinlerin ifadelerinde değişikliğe neden olur. Bu farklılıkların belirlenmesi, KHDAK’ın tanı ve tedavisinde kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçlerin ve hedef proteinlerin tanımlanmasına katkı sağlayacaktır.

1.3.Araştırmanın Yeri

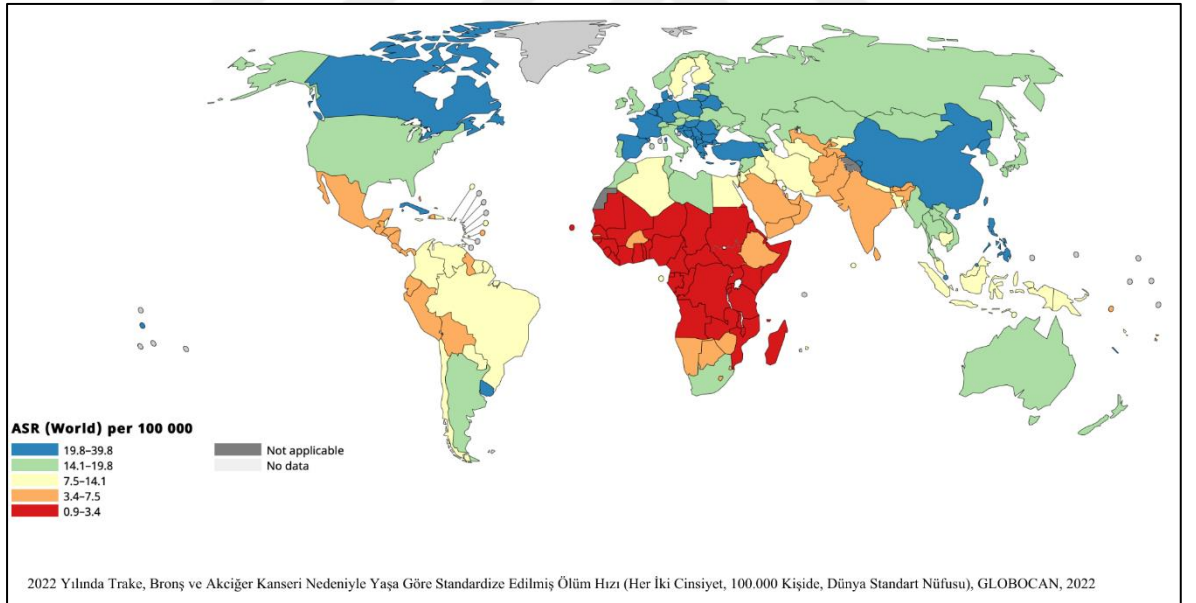
Bu araştırma Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde bulunan Göğüs Hastakları Moleküler Araştırma Laboratuvarı’nda ve İstanbul Teknik Üniversitesi bünyesinde Dr. Orhan Öcalgiray Moleküler Biyoloji-Biyoteknoloji ve Genetik Araştırmalar Merkezi (MOBGAM)’da bulunan GD Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kanser, dünya çapında ölümlerin başlıca nedenleri arasında yer alan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kanser insidansı ve mortalitesi her geçen gün artmaya devam etmektedir. 2020’de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 19,3 milyon yeni vakası tanımlanmış ve 10 milyon kanser ölümü açıklanmıştır. Kadınlarda sıklıkla rastlanan meme kanseri %11,7 oranı ile en sık teşhis edilen kanser olarak ilk sırada yer alırken, %11,4 oranıyla akciğer kanseri ikinci sırada yerini almaktadır. Bunu takiben; prostat kanseri %7,3, kolon kanseri %6, mide kanseri %5,6 ve karaciğer kanseri %4,3 gelmektedir (Sung ve ark., 2021).

Aynı verilere göre kansere bağlı ölümlerin %18 ise akciğer kanserine atfedilmiştir. Bunu %8,3 karaciğer kanseri, %7,7 mide kanseri, %6,9 meme kanseri ve %5,8 kolon kanseri izlemektedir. Dünya Sağlık örgütünün 2020’daki verilerine dayanarak tahmin edilen ulusal oranların sabit kaldığı varsayımıyla küresel ölçekte ileriye dönük kanser vakalarının 20 yılda %47 oranında artacağı öngörülmektedir (Sung ve ark., 2021).

2022 yılında trake, bronş ve akciğer kanseri nedeniyle yaşanan ölümlerin dünya çapında haritası GLOBOCAN 2022 verilerine göre Şekil.2.1’de oluşturulmuştur (GLOBOCAN, 2022)



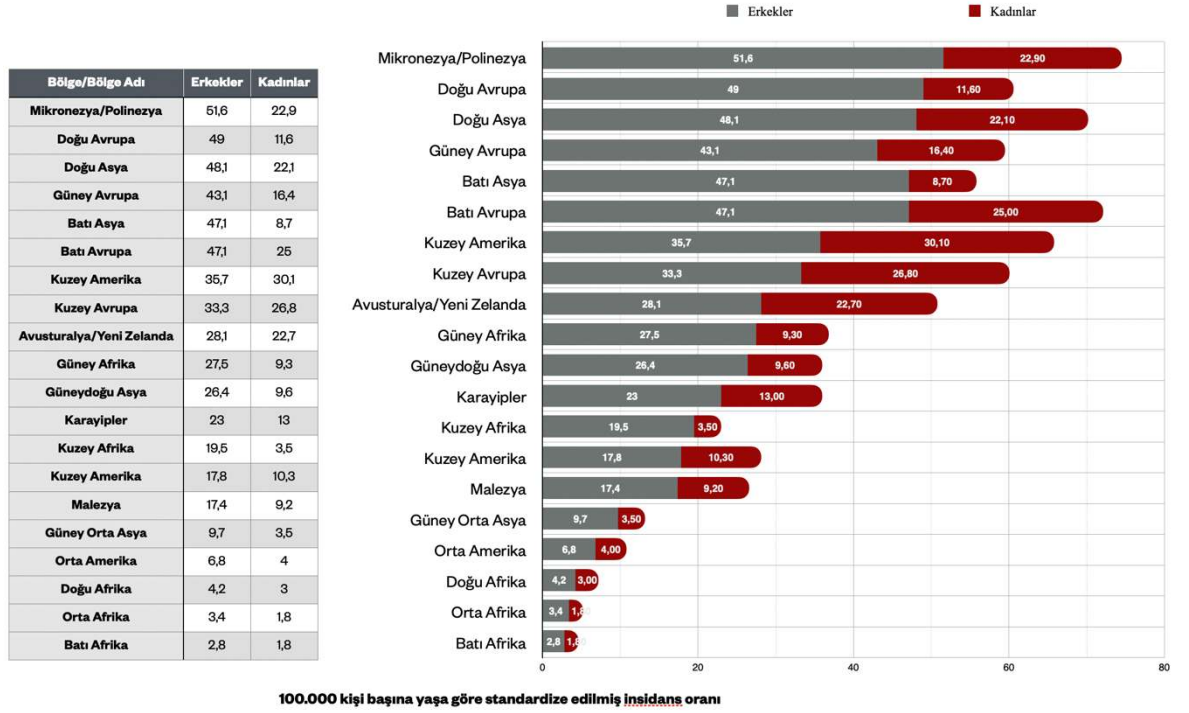
Şekil. 2.1. Trake, bronş ve akciğer kanseri ölüm oranları (2022, DSÖ).

2.1. Akciğer Kanseri

2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

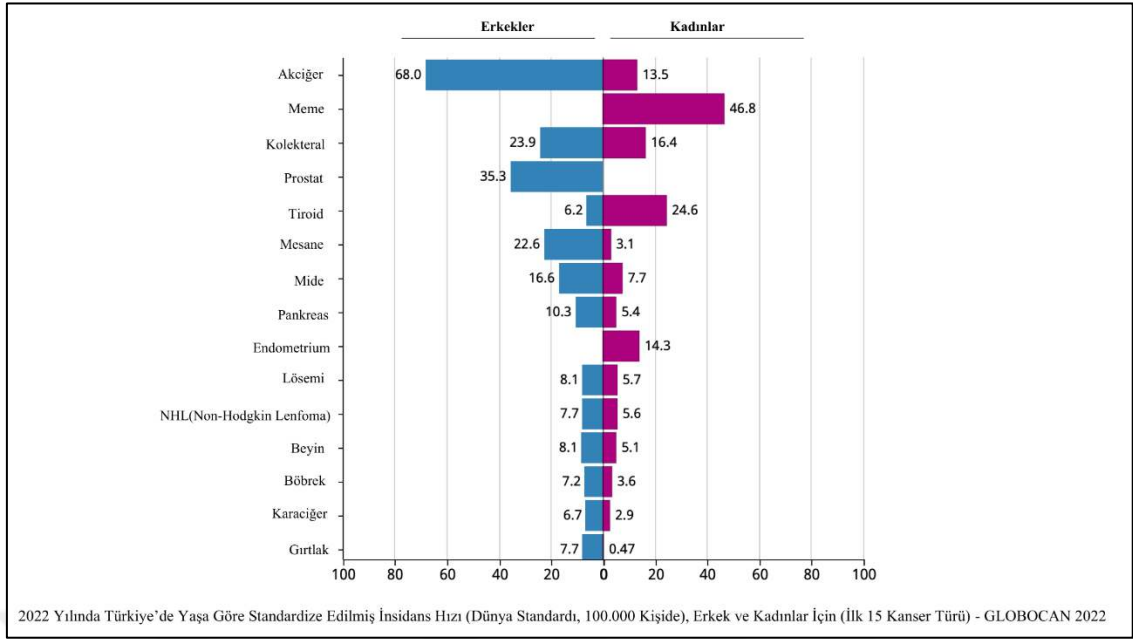
Akciğer kanseri kadınlarda ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir. 2020’de DSÖ verilerine göre 1,8 milyon kişi akciğer kanserine bağlı olarak yaşamlarını yitirmiştir. Erkeklerde ise akciğer kanseri en sık görülen ve en yüksek ölüm oranına sahip kanser türüdür: 93

ülkede akciğer kanseri erkeklerde kansere bağlı ölümlerin önünde gelen nedenidir. Kadınlarda kanser mortalite profili heterojen olsa da akciğer kanseri yaygın ölüm nedenlerinden biri olarak dikkat çekmektedir: meme kanseri 110 ülkede, rahim ağzı kanseri 36 ülkede ölümlerin önde gelen nedeni iken, bunu 25 ülkede akciğer kanseri takip etmektedir. Aşağıda DSÖ 2020 verilerine göre Şekil.2.2’de erkeklerde ve kadınlarda dünya bölgelerine göre insidanslar verilmiştir. Türkiye burada Batı Asya grununda yer almaktadır (Sung ve ark., 2021).



Şekil.2.2. Akciğer kanseri insidans oranları (2020, DSÖ).

Şekil.2.3’te 2022 yılında Türkiye’de yaşa göre standardize edilmiş insidans hızı 15 kanser türü için verilmiştir. Akciğer kanseri erkeklerde ilk sırada yer alırken, kadınlarda beşinci sırada yer alır ((GLOBOCAN, 2022)).

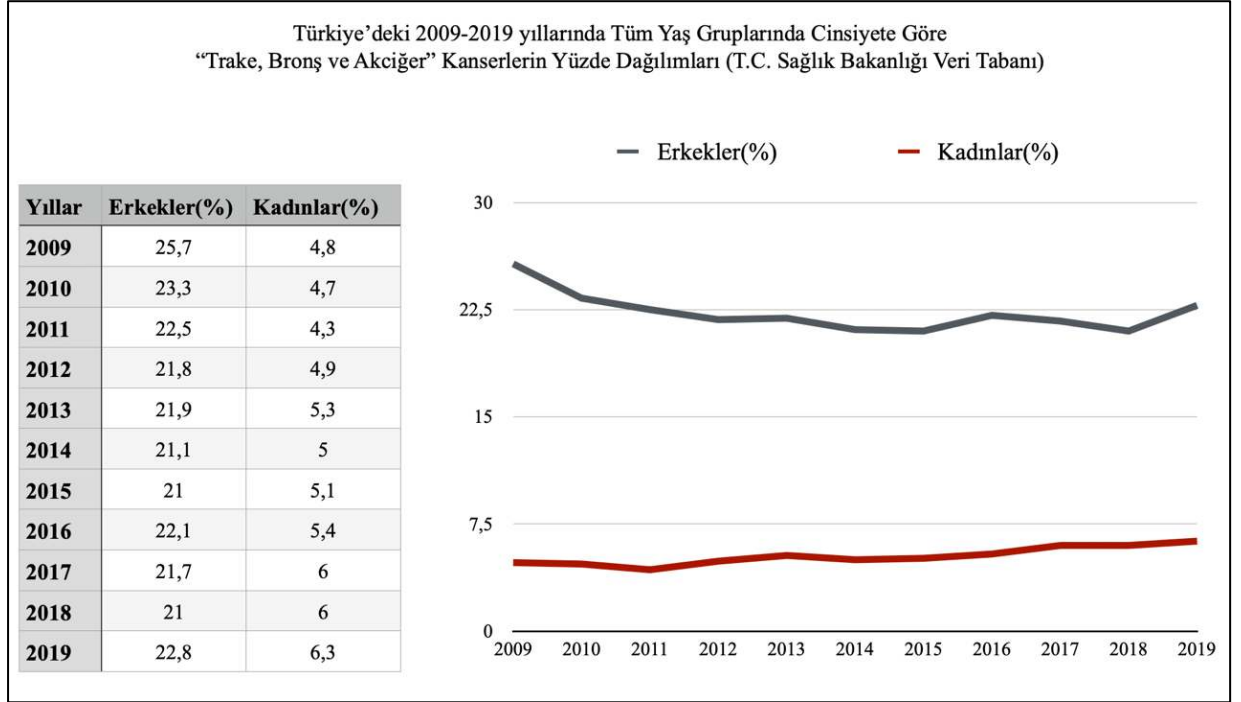


Şekil 2.3. 2022 yılında Türkiye’de akciğer kanseri insidans oranları.

Türkiye’de T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yayımlanan 2009 ve 2019 kanser istatistik raporlarında, akciğer kanseri verileri “Trake, bronş ve akciğer” olarak ortak bir başlık altında sunulmuştur. Bu kapsamda 10 yıllık süreçte akciğer kanserinin yaş gurubu ve cinsiyete göre görülme oranları şu şekildedir;

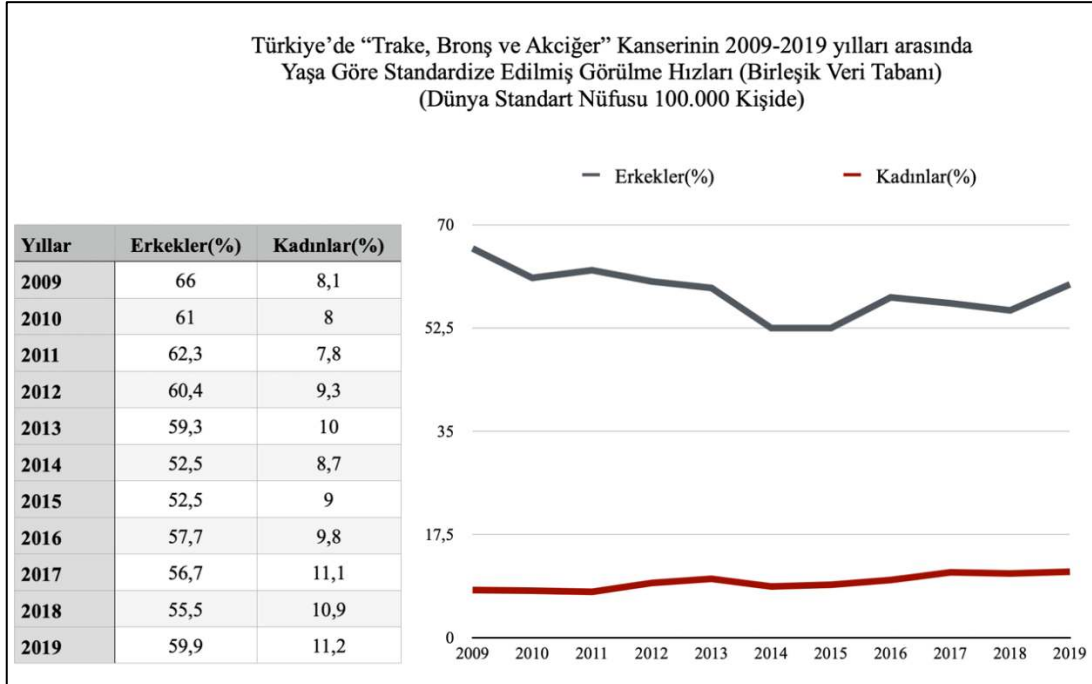
- 25-49 yaş grubunda, 2019 yılında erkeklerde %9,9 ile dördüncü sırada yer alırken, %2,4 kadınlarda ise yedinci sırada yer almaktadır. 2009 yılında ise erkeklerde %20,6 ile ilk sırada yer alırken, kadınlarda ise %2,8 ile dokuzuncu sırada yer almaktadır.
- 50-69 yaş grubunda, 2019’da erkeklerde %26,6 ilk sırada yer alırken, kadınlarda %7,7 ile beşinci sırada yer almaktadır. 2009 verilerinde bu oran erkeklerde %30,3 ile ilk sırada yer alırken, kadınlarda %5,6 ile beşinci sırada yer almaktadır.
- 70 yaş ve üzerinde ise, 2019 yılında erkeklerde %23,6 ile ilk sırada yer alırken, kadınlarda %9,4 ile üçüncü sırada yer almaktadır. 2009 yılı verilerinde ise erkeklerde %22,5 ile ilk sırada yer alırken, kadınlarda %6,4 ile dördüncü sırada yerini almaktadır.
- Tüm yaş gruplarında ise, 2019’da erkelerde %22,8 oranında ilk sırada yer alırken, kadınlarda %6,3 oranında ise dördüncü sırada yer almaktadır. 2009 verilerinde ise erkeklerde %25,7 ile ilk sırada yer alırken, kadınlarda %4,8 ile beşinci sırada yer almaktadır (Tablo.2.1).

Tablo 2.1. Türkiye’de trake, bronş ve akciğer kanseri yüzde dağılımları (2009-2019).



2009-2019 yılları arasında Türkiye’de erkeklerde ve kadınlarda yaşa göre standardize edilmiş akciğer kanseri insidans hızı verilmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri). (Tablo.2.2).

Tablo 2.2. Türkiye’de trake, bronş ve akciğer kanseri insidans oranları (2009-2019).



2.1.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Akciğer kanseri çoğu ülkede en sık görülen, kötü prognoza sahip ve en önde gelen ölüm nedenlerindendir. Tanı ve tedavideki teknolojiyle paralel olarak yaşanan ilerlemelere rağmen, sağ kalım oranları akciğer kanseri hastalarında tatmin edici düzeyde değildir. Geçmişten günümüze yürütülen araştırmaların sonucunda akciğer kanseri gelişimi için en önemli risk faktörünün uzun süreli sigara kullanımı olduğu doğrulanmıştır. Sigara içmek akciğer kanseri için en önemli risk faktörüdür ve sigara içmek akciğer kanseri vakalarının %80-90'ının nedenidir. Akciğer kanseri geliştirme riski sigaraya bağlı olarak erkeklerde % 17, kadınlarda ise %12 iken, sigara kullanmayan bireylerde ise %1.5 oranındadır. Literatürde, nikotin apoptotik süreci engelleyebildiği bildirilmiştir. Ayrıca tütün dumanı bileşenleri bağışıklık tepkilerini inhibe ederek vücudun doğal savunma mekanizmasını etkileyerek karsinogeneze yol açabilmektedir (Smolarz ve ark., 2025).

Aynı zamanda genetik faktörlerin dışında, radon, asbest, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, arsenik, berilyum, kadmiyum, silikon, vinil klörür, nikel ve krom bileşikler ve dizel motor egzozu gibi bileşiklere uzun süreli maruziyetler akciğer kanseri gelişimine katkı sağladıkları vurgulanmaktadır. Bu bileşikler çoğunlukla DNA'ya bağlanma yeteneğine sahiptir ve bu durum yeni mutasyonların oluşmasına katkı sağlamaktadır (Smolarz ve ark., 2025). Örneğin; dünya çapında asbestin mesleki kanser için morbidite, sakatlık ve mortalitenin önde gelen nedeni olduğu, 4120 bin vakada 236 bin ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir (Mukhopadhyay ve ark., 2025).

Akciğer kanseri gelişiminin olumsuz çevre koşulları veya uygunsuz yaşam koşulları dışında genetik yatkınlığa bağlı olarakta meydana gelmektedir. Amerikalı araştırmacılar, kalıtsal genetik değişikliklerin (patolojik germ hattı varyantları (PGV)) tespiti, akciğer kanseri riskinin ortaya konulmasında büyük önem taşıdığını vurgulamışlardır. Genetik yatkınlığın erken tespiti bu hastalığın riskini azaltmada, erken tanı ve tedavide önemlidir. 7788 akciğer kanseri hastası ile yapılan bir araştırmada bu hastalardan 1161 tanesinin şu ana kadar bilinen 91 kanser mutasyonunda kalıtsal olarak değişikliklere sahip olduğu tespit edilmiş ve bu lezyona sahip hastaların %95,1'nin mevcut tedaviler ile tedavi edilebilir olduğu veya erken tanı kapsamında olduğu görülmüştür (Smolarz ve ark., 2025).

Bazı araştırmalar kronik akciğer inflomasyonunun akciğer karsinogeneze katkı sağladığı bildirilmiştir. Ek olarak KOAH (Kronik obstrüktif akciğer hastalığı) ve tüberkülozun akciğer kanseri ilişkisini araştıran araştırmalarda mevcuttur (Saygıdeğer Kont, 2015)

2.1.3. Akciğer Kanseri Histopatolojik Sınıflandırması

Yüksek mortalite ve morbiliteye sahip olan akciğer kanseri geçmişten günümüze kadar kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir. Geleneksel olarak akciğer kanseri küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olarak sınıflandırılmaktadır. KHDAK tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'i iken, KHAK ise %15'ni kapsadığı

bilinmektedir. KHDAK içinde; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom en sık görülen histolojik subtipleridir (Duma ve ark., 2019).

DSÖ, 2021 yılında mevcut sınıflandırmayı güncelleyerek detaylı ve kapsamlı Torasik Tümörleri Sınıflandırması yapmıştır. Güncelleme, morfoloji göz önünde bulundurularak, immünohistokimya (IHC) ve moleküler tekniklere dayanan ilkelere göre yapılmıştır (Tablo.2.3 ve Tablo.2.4) (Duma ve ark., 2019). Sınıflandırmasında adenokarsinomlardaki baskın patern ile alt tip sınıflandırması yerini korumuş ve prognoz ile ilişkili üç kademeli yeni bir derecelendirme sistemi kullanılmaya başlanmıştır (Çakır, 2024; Nicholson ve ark., 2021).

Tablo 2.3. Akciğer Kanseri Sınıflandırması (2021, DSÖ).

Epitelyal Tümörler			
	Papillomlar	Adenomlar	Prekürsör glandüler lezyonlar
	◊Skuamöz hücreli papillom	◊Sklerozan pnömositom	◊Atipik adenomatöz hiperlazi
	◊NOS	◊Alveolar adenom	◊Adenokarinoma in situ
	◊inverted	◊Papillar adenom	◊Nonmüsinöz
	◊Glandüler papillom	◊Bronşiyolar adenom/Sili muonodüller papiller	◊Müsinöz
	◊Miks skuamöz hücreli ve glandüler papillom	◊Müsinöz kistadenom	
		◊Mukoz gland adenom	Adenoskuamöz karsinomlar
			◊Adenoskuamöz karsinom
	Adenokarsinomlar	Skuamöz prekürsör lezyonlar	Sarkomatoid karsinomlar
	◊Minimal invaziv adenokarsinom	◊Skuamöz hücreli karsinoma in situ	◊Pleomorfik karsinom
	◊Nonmüsinöz	◊Hafif skuamöz displazi	◊Dev hücreli
	◊Müsinöz	◊Ortaskuamöz displazi	◊İğsi hücreli
	◊Invaziv nonmüsinöz adenokarsinom	◊Şiddetli skuamöz displazi	◊Pulmoner blastom
	◊Lepidik		◊Karsinosarkom
	◊Asiner	Skuamöz hücreli karsinomlar	
	◊Papiller	◊Skuamöz hücreli karsinom, NOS	Tükürük bezi tümörleri
	◊Mirkopailler	◊Keratinize	◊Pleomorfik adenom
	◊Solid	◊Nonkeratinize	◊Adenoid kistik karsinom
	◊Invaziv müsinöz adenokarsinom	◊Bazaloid	◊Epitelyal-myoepitelyal karsinom
	◊Miks invaziv müsinöz ve nonmüsinöz adenokars	◊Lenfepitelyal karsinom	◊Mukoepidermoid karsinom
	◊Koloid adenokarsinom	Büyük hücreli karsinomlar	◊Hiyalizan şeffaf hücreli karsinom
	◊Fetal adenokarsinom	◊Büyük hücreli karsinom	◊Myoepitelyom
	◊Adenokarsinom, enterik tip		◊Myoepitelyom karsinom
	◊Adenokarsinom,NOS		
	Diğer epitelyal tümöröidler		
	◊NUT karsinom		
	◊Torasik SMARCA4-eksikliği gösteren idiferansiye tümör		

Tablo2.4. Akciğer Kanseri Sınıflandırması (2021, DSÖ).

Nöroendokrin Neoplaziler			
	Prekürsör lezyon	Nöroendokrin karsinomlar	Nöroendokrin tümörler
	◊Diffüz idiyopatik nöroendokrin hücre hiperplazisi	◊Küçük hücreli karsinom	◊Karsinoid tümör
		◊Büyük hücreli nöroendokrin karsinom	◊Tipik
			◊Atipik
	Akciğerin Mezenkimal Tümörleri	PEComatöz tümörler	
	◊Pulmoner hamartom	◊Lenfanjiyoleiomyomatozis	
	◊Kondrom	◊PEComa benign	
	◊Diffüz lenfanjiyomatozis	◊PEComa malign	
	◊Plevropulmoner blastom		
	◊İntimal sarkom		
	◊Konjenital peribronşiyal myofibroblastik tümör		
	◊Pulmoner miksoid sarkom, EWSR1-CREB füzyonu ile		
	Ektopik Hücre Kaynaklı Tümörler	<i>NOS; not otherwise specified</i> <i>NUT; nuclear protein in testis</i> <i>MALT; mukosa associated lymphoid tissue</i> <i>PEComa; perivascular epithelioid cell tumor</i>	
	◊Melanom		
	◊Menenjiyom		
	Hematolenfoid Tümörler		
	◊MALT lenfoma		
	◊Diffüz büyük hücreli B lenfoma, NOS		
	◊Lenfomatoid granülomatozis, NOS		
	◊İntravasküler büyük hücreli B lenfoma		
	◊Langerhans hücreli histiyositoz		
	◊Erdheim-Chester hastalığı		

2.1.3.1. Adenokarsinom

Adenokarsinomlar akciğer kanserinin en yaygın (%40) histolojik alt tipidir ve oldukça farklı klinik, radyolojik, moleküler ve histolojik spektrumlarda bulunurlar. Adenokarsinomlar; adenokarsinoma in situ, minimal invaziv adenokarsinoma ve invaziv karsinoma olmak üzere birden fazla alt tiplere ayrılmıştır (Tablo.2.3) (Sharma ve ark., 2025).

Akciğer parankimindeki pulmoner epitelden köken alan adenokarsinomlar, belirli papiller yapılar ile grandüler özellikler gösterirler. Akciğer adenokarsinomunda bulunan en yaygın onkogen mutasyonları; %25 KRAS, %14 EGFR, %8 ALK, %7 BRAF, %5 MET, %5 ROS1, %4 RET, %3 HER2 vb. şeklinde görülmektedir. Ayrıca sıklıkla EGFR, MET ve BRAF gen mutasyonlarına 7. kromozomda rastlandığı bildirilmiştir (Shen ve ark., 2025).

2.1.3.2. Skuamöz Hücreli Karsinom (Yassı Hücreli Karsinom)

Akciğer kanserinin diğer en yaygın (%30) histolojik alt tipi skuamöz hücreli karsinomdur. Akciğer skuamöz hücreli karsinomu, akciğerin solunum yollarının bazal hücrelerinden köken alırken, keratinize bölgeler ve hücreler arası köprüler ile karakterizedir. Başlıca onkogen mutasyonları arasında; %20 FGFR1 amplifikasyonu, %12 PIK3CA, %3 DDR2 vb. bulunur. PIK3CA, SOX2 ve TP63 gibi gen mutasyonlarına sıklıkla 3. kromozom üzerinde rastlandığı bildirilmiştir. Akciğer adenokarsinomundaki EGFR ve KRAS gibi yüksek frekanslı gen mutasyonları akciğer skuamöz hücreli karsinomda bulunabilmesine rağmen mutasyon sıklıkları yaklaşık % 5 'tir. Ayrıca buradaki EGFR mutasyonları sıklıkla klasik hassas mutasyonlardan farklılıklar gösterebilmektedir. Sigara ve tütün kullanımı ile yakından ilişkilidir (Aydın, 2024; Shen ve ark., 2025)

2.1.3.3. Adenoskuamöz Karsinom

Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %0,6-2,8'ni oluşturan adenoskuamöz karsinomu nadir bir KHDAK varyantıdır. Çoğunlukla yaşlı erkeklerde (yaklaşık 3:1 erkek: kadın oranı) etkilediği gözlemlenmiş ve yaş ortalaması 69 olarak bildirilmiştir. Çoğunlukla tütüne maruziyet ve sigara kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Adenoskuamöz karsinomu, patolojik olarak hem adenokarsinom hem de skuamöz hücreli karsinom bulgularının en az %10'unun içermektedir. IHC analizlerinde adenokarsinomu ve skuamöz hücreli karsinom biyobelirteçlerinin değişken ekspresyonunu gösterirken, tanıda her iki türün eş zamanlı ekspresyonunu gerektirir.

Adenoskuamöz karsinomu, %67 oranında p53 mutasyonlarını; %31-55 oranlarında EGFR mutasyonlarını (L858R, T790M vb.); %10,5 KRAS (G12V/V); %5 EML4-ALK; %4 KIF5BRET; %2,6 AKT1 ve %1,3 oranında ERBB2 mutasyonlarını olmak üzere değişken bir genetik profille sahiptir (Shields ve ark., 2025).

2.1.3.4. Büyük Hücreli Karsinom

Akciğer kanserinin %5-10'nunu oluşturan büyük hücreli karsinom, nöroendokrin farklılaşması olmayan ve küçük hücreli karsinomun özellikleri ile benzeşmeyen malign epitel kökenli akciğer kanseri türüdür. Sigara ve tütün kullanımı ile yakından ilişkili olan büyük hücreli akciğer karsinomu morfolojisi skuamöz veya glandüler farklılaşma gösterebilmektedir ((Aydın, 2024)

2.1.3.5. Sarkomatoid Karsinom

Pulmoner sarkomatoid karsinomu, tüm akciğer tümörlerinde yaklaşık %0,1-0,4 oranında görülen, oldukça kötü prognoza sahip küçük hücreli dışı akciğer kanseri türüdür. Son derece agresif karakteri nedeniyle sık metastaz eğilimine sahiptir. Radyoterapi vb. geleneksel tedavilere genelde düşük yanıt vermektedir (Li ve ark., 2020).

Sarkomatoid karsinomun birçok biyolojik davranışları ve klinikopatolojik özellikleri ile ilgili yeterli bilgi mevcut değildir. Mezenkimal farklılaşma ile ortaya çıkan vimentin vb. genlerin aşırı ekspresyonu sarkomatoid karsinomlar için de geçerlidir. Erken teşhis edilebilmesi durumunda bile diğer KHDAK tiplerine kıyasla hızlı invazyon ve uzak bölgelere metastazı daha agresif klinik özelliklerine sahiptir. Dolayısıyla diğer KHDAK ile kıyaslandığında 5 yıllık sağ kalım oranları düşüktür (Yanık ve ark., 2017; Li ve ark., 2020).

2.1.3.6. Nöroendokrin Neoplaziler

Pulmoner nöroendokrin hücrelerden kaynaklanan akciğer nöroendokrin neoplazmaları, nispeten nadir olarak görülürler ve tüm primer akciğer kanserlerinin %20'sini oluşturlar (Aydın, 2024).

WHO tarafından yapılan sınıflandırmaya göre 4 histolojik alt tipi kapsamaktadır (Tablo.4): Tipik ve atipik karsinoidlerden oluşan nöroendokrin tümörler (NET'ler) ve büyük hücreli nöroendokrin karsinomu ve küçük hücreli karsinomu dahil olmak üzere çeşitli karsinomları (NEC'ler yada NEK'ler) kapsar. NEC'ler daha çok sigara kullanıcılarında ve çoğunlukla erkeklerde gözlemlenmiştir. 5 yıllık sağ kalı oranları; NET'lerde tipik karsinoidlerde %92-98, atipik karsinoidlerde %40-70 arasındadır. NEC'lerde ise büyük hücreli nöroendokrin karsinomu %13-17 iken, küçük hücreli karsinomunda %15-20 arasında değişmektedir. Visseral metastaz oranı NEC'lerde daha fazladır, özellikle küçük hücreli karsinomunda yaklaşık %75 oranındadır (Metovic ve ark., 2021).

2.1.3.6.1. Küçük Hücreli Karsinom (KHAK)

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) sigara öyküsü bulunan bireylerde ağırlıklı olarak rastlanan bir nöroendokrin karsinomudur. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'ni oluşturur ve erken metastatik ve yüksek proliferatif özelliklere sahip olan KHAK kötü prognoz gösterir.

Erkeklerde daha çok yaygınlık gösterse de son yıllarda kadınlarda da görülme sıklığı artmaya başlamıştır. KHAK vakalarında yoğunlukla p53 ve RB1 olmak üzere iki tümör baskılayıcı genin inaktivasyonunu içerir. Yapılan araştırmalarda KHAK tümörlerinin bir alt kümesinde MYC gen ailesinde amplifikasyonları tanımlanmıştır. Ek olarak KMT2D, PTEN, CREBBP, APC gibi genlerin inaktivasyonu tanımlanmıştır (Rudin ve ark., 2021).

2.1.3.6.2. Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinom

Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %3'ünü oluşturan akciğer büyük hücreli nöroendokrin karsinom, yüksek metastaz oranı ve kısa hayatta kalma süresine sahip nispeten nadir akciğer kanseri türüdür (Kang ve ark., 2024).

Büyük hücreli nöroendokrin karsinomu, akciğerdeki argirofilik hücrelerden kaynaklanır ve nöroendokrin tümörün morfolojisi ve farklılaşma özelliklerini içerir. İlk olarak 1991 yılında diğer akciğer tümörlerinden bağımsız olarak Travis ve ark. Tarafından tanımlanmıştır. Patolojik olarak KHDAK grubunda sınıflandırılmasına rağmen, diğer KHDAK'den daha agresif ve kötü bir prognoza sahiptir. Biyolojik davranışı ise KHAK'ne benzer. Büyük hücreli nöroendokrin karsinomu, ameliyat sonrasında nüks ve metastatik eğilimli, kemoterapiye dirençli bir akciğer kanseri türüdür ve hastaların çoğunlukla sigara öyküsü olduğu bildirilmiştir. Spesifik bir nöroendokrin belirteci olan Nöron-spesifik enolaz (NSE)'nin burada yükseldiği görülür. IHC analizlerine göre CgA, Syn ve CD56 gibi nöroendokrin belirteçler burada pozitifdir. Gen mutasyon profilinde %11,9 EGFR; %82,3 p53; %39,1 RB1; %20,9 KEAP1; %12,7 KRAS mutasyonları yer alır. Erken evrelerde bile kötü bir prognoza sahip olan akciğer büyük hücreli nöroendokrin karsinomu için hala standart bir tedavi planı mevcut değildir. Rezeksiyon sonrası yaygın nükslerden dolayı bir tedavi seçeneği olarak kemoterapi önemlidir. Ancak biyolojik olarak KHDAK benzediği için kemoterapi konusunda tartışmalıdır (Yang ve ark., 2022).

2.1.4. Akciğer Kanseri Klinik Tanısı ve Tarama Yöntemleri

2.1.4.1. Klinik Tanısı

Klinik tanı süreci, klasik bir fiziksel muayene, ayrıntılı bir tıbbi öykü ve sigara ve tütün kullanımına dair bilgiler, ailede kanser öyküsü ve bilinen diğer kanserojen bileşiklere maruziyetin değerlendirildiği bir süreci temsil eder. Akciğer kanseri tanısı için öncü fiziksel muayenede; bronşiyal stenoza veya obstrüksiyonla ilişkili semptomlar (alveoler üfürümün zayıflaması, bronşiyal veya trakeal üfürüm, lokalize bronşlar üzerinde hırıltı vb.) genişlemiş lenf düğümlerinin olup olmadığı, plevra boşluğunda sıvı varlığı ile ilişkili semptomlara dikkat edilir.İleri evrelerde; yüzde şişlik, boyun çevresinde genişleme, üst ekstremitelerde şişlik, juguler venlerde ve göğüs duvarı venlerinde genişleme ve yüz derisi ve mukoza zarlarında morarmada dikkate değer majör belirtilerdir. Akciğer kanserinin seyri sırasında ortaya çıkan lokal belirtiler; öksürük, nefes darlığı,

hemoptizi (öksürürken ağızdan kan gelmesi), göğüs ağrısı, tekrarlayan zatüre, ses kısıklığı, yutma bozukluğu, omuz ağrısı, Horner sendromu vb. dir. Genel semptomlar ise; eklem ağrısı, genel zayıflık, kilo kaybı veya alımı, yüzeysel duyusal bozukluklar, tromboflebit belirtileri ve paranoplastik (zayıflama sendromu, Cushing sendromu, bitkinlik sendromu, hiperkalsemi vb.) sendromların belirtileri şeklindedir (Smolarz ve ark., 2025).

2.1.4.2. Tarama Yöntemleri

Kliniğe başvuran hastalarda kitle akciğer röntgeni ve bilgisayarlı tomografi ile görülür, ancak kesin tanı için; balgam sitolojisi veya bronkoskopi, transtorasik ince iğne ile aspirasyon veya biyopsi (torakoskopik girişimle) örneğinde yapılan patoloji incelemesi sonucunda tanı konur (Saygıdeğer Kont, 2015).

2.1.5. Akciğer Kanseri Evreleme Sistemi

Kanserin klinik tanısı sırasında evreleme hastalığın tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde ve prognozu ile ilgili durumu tahmin etmede kullanıldığı için büyük önem taşır. Akciğer kanseri evrelmesi için TNM (primer tümör, lenf nod, uzak metastaz) evreleme sistemi kullanılmaktadır. 2024 yılında Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Derneği (IASLC) 9.TNM evrenlendirmesini yayımlamıştır. Bu rapora göre güncel evreleme sistemi Tablo.2.5’da gösterilmiştir (IASLC, 2024).

Tablo 2.5. Akciğer Kanseri 9.TNM evrenlendirmesi (IASLC, 2024).

T-Primer tümör	
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor (malign hücrelerin balgam ya da bronşiyal yıkama sıvısında gösterildiği ancak tümörün bronkoskopi veya görüntüleme yöntemleri ile saptanamadığı durumlar dahil)
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	Karsinoma in situ ¹
T1	Visseral plevra veya akciğer ile çevrili olan, ya da lobar veya daha periferik bronşların içindeki tümör ²
	T1mi Minimal invaziv adenokarsinom ²
	T1a Tümörün en geniş çapı ≤1 cm ³
	T1b Tümörün en geniş çapı >1 cm, ≤2 cm
	T1c Tümörün en geniş çapı >2 cm, ≤3 cm
T2	Aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör
	*Tümörün en geniş çapı >3 cm, ≤4 cm
	*Visseral plevrayı invaze eden
	*Komşu lobu invaze eden
	*Karinayı invaze etmeden ana bronşu tutan, ya da hiler bölgeye uzanan atelektazi veya obstruktif pnömoni ile ilişkili (atelektazi/pnömoni akciğerin bir bölümünü veya tümünü kapsayabilir)
T3	T2b Tümörün en geniş çapı >4 cm, ≤5 cm
	Aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör
	*Tümörün en geniş çapı >5 cm, ≤7 cm
	*Parietal plevrayı veya göğüs duvarını invaze eden
	* Perikardi, frenik siniri veya azigos venini invaze eden ⁴
	*Torasik sinir köklerini (T1, T2 gibi) veya stellat ganglionu invaze eden
	*Primer tümörle aynı lobda metastatik nodül(ler)
	*Tümörün en geniş çapı >7 cm
	Aşağıdaki yapılardan herhangi birini invaze eden tümör,
	• mediasten, timus, trakea, karina, rekürren laringeal sinir, vagus siniri, özofagus veya diyafram
T4	• kalp, büyük damarlar (aort, vena kava inferior/superior, intraperikardiyal supra-aortik arterler veya brakiosefali damarlar
	• subklavian damarlar, vertebra gövdesi, lamina, spinal kanal, servikal sinir kökleri veya pulmoner arterler /venler, damarlar) brakial pleksus (gövdeleri, dalları, kordonları veya terminal sinirleri)
	* Primer tümörle aynı akciğerde fakat farklı lobda nodül(ler)

¹Tis adenokarsinoma in situ ve skuamöz hücreli karsinoma in situ'yu kapsar.

²Ana bronşun proksimaline uzanan, bronşiyal duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki nadir yüzeysel tümör yayılımı da T1a olarak sınıflandırılır.

³Soliter adenokarsinom (3 cm'den daha büyük boyutta olmayan), daha baskın olarak lepidik paternli ve herhangi bir odakta 5 mm'den daha büyük boyutta invazyona sahip olmayan

⁴Bu yapılar mediastende yer alsa da bu yapıların invazyonu için tümörün mediastene penetrasyonu T4 sayılmaz.

N - Bölgesel lenf bezleri		
Nx		Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemiyor
N0		Bölgesel lenf bezi metastazı yok
N1		İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf bezlerine ve/veya intrapulmoner lenf bezlerine metastaz veya direkt invazyon
N2		İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz
	N2a	Tek N2 istasyona metastaz
	N2b	Multipl N2 istasyona metastaz
N3		Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklavikuler lenf bezlerine metastaz

M - Uzak metastaz		
M0		Uzak metastaz yok
M1		Uzak metastaz yok
	M1a	Plevral veya perikardiyal metastatik nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon ⁵ Karşı akciğerde metastatik nodül(ler)
	M1b	Tek bir ekstratorasik organ sisteminde, tek metastaz ⁶
	M1c	Multipl ekstratorasik metastaz
	M1c1	Tek organ sisteminde multipl ekstratorasik metastaz ⁷
	M1c2	Multipl organ sisteminde multipl ekstratorasik metastaz

⁵Akciğer kanseriyle birlikte olan çoğu plevral (perikardiyal) efüzyonlar tümöre bağlı gelişir. Bazı hastalarda multipl mikroskopik incelemelerde plevral (perikardiyal)sıvı tümör açısından negatiftir ve sıvı hemorajik ve eksudatif değildir. Bu bulgular varsa ve klinik değerlendirme efüzyonun tümörle ilgili olmadığı yönündeyse, efüzyon evreleme belirleyicisi olmaktan çıkarılmalıdır. Mikroskopik olarak kanıtlanınsın ya da kanıtlanmasın malign düşünülen efüzyonlar M1a olarak değerlendirilmelidir.

⁶Bu durum bölgesel olmayan tek bir lenf bezi metastazını kapsar

⁷Örneğin iskelet bir organ sistemidir. Farklı kemiklerdeki multipl metastazlar M1c1 olarak değerlendirilir. Karaciğerdeki multipl metastazlar M1c1 olarak değerlendirilir. Hem kemiklerde hem de karaciğerde multipl metastaz varsa M1c2 olarak değerlendirilir.

2.2. Kök Hücre ve Kanser Kök Hücresi

2.2.1. Kök Hücreler

Özelleşmemiş hücreler olarak bilinen kök hücreleri, bir organizmanın herhangi bir hücresine farklılaşabilen, kendi kendini yenileyebilme yeteneğine sahip, progenitör oluşturabilme kapasitesi olan, birden fazla hücre veya doku tiplerine farklılaşabilen, meydana gelen doku veya organ hasarının onarılmasını (homeostasi) sağlayan hücrelerdir (Zakrzewski, 2019; Tian ve ark., 2023).

21. yüzyılın en dikkat çekici gelişmelerinden biri olan kök hücreler, tıbbi teknoloji ve tedavideki yenilik kapsamında büyük bilimsel öneme sahiptir. Özellikle günümüzde rejeneratif tıpta yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Doku mühendisliği gibi alanlarda önemli bir materyal olan kök hücreler, gelecekte yapay doku ve organların gelişimine katkı sağlayarak organ nakli teknolojisinin dönüşümünü teşvik etmektedir (Tian ve ark., 2023).

Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücreler genel olarak; **totipotent**, **pluripotent**, **multipotent** ve **unipotent** şeklinde sınıflandırılmışlardır. Daha geniş bir sınıflandırma da ise; oligopotent, qudripotent, tripotent ve bipotent kök hücreler şeklinde yapılmaktadır (Darıcı, 2013; Atar, 2018 Tian., 2023)

2.2.1.1. Totipotent Kök Hücreleri

Tek bir organizmayı oluşturabilecek kapasiteye sahip, her yönde farklılaşabilen kök hücrelerdir. Totipotent hücreler insan veya hayvan yaşamı boyunca 250'den fazla hücre tipine (hücre tiplerinin tanımına bağlı olarak) farklılaşabilme yeteneğine sahiptir

2.2.1.2. Pluripotent Kök Hücreleri

Organizmada bulunan tüm somatik hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahip kök hücrelerdir.

2.2.1.3. Multipotent Kök Hücreleri

Yalnızca bulundukları doku veya organdaki hücelere farklılaşabilen kök hücrelerdir. Doku ve organ bütünlüğü ölen hücrelerin yerine yeni hücrelerin oluşturulmasıyla korunur. Mezenkimal kök hücreler (MKH) ve hematopoetik kök hücreler bu hücelere örnek olarak verilebilir.

2.2.1.4. Unipotent Kök Hücreleri

Yalnızca tek bir hücre tipine farklılaşma özelliği olan kök hücrelerdir. Prostat kök hücreleri bunlara örnek verilebilir.

Kök hücreler elde edildikleri kaynak dokulara göre ise; embriyonik kök hücreler, fetal kök hücreler, erişkin kök hücreler ve KKH'leri olmak üzere sınıflandırılırlar (Darıcı, 2013; Atar, 2018 Tian., 2023):

2.2.1.5. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreleri adında anlaşılabilecek üzere embriyodan türetilen hücrelerdir. Embriyonun blastosist dönemindeki iç hücre kitlesinden (ICM) köken alan hücreler olup, kendi kendilerini yenileyebilme özelliğine sahiptirler. Ayrıca mezoderm, endoderm ve ektoderm tabakalarına farklılaşabilen pluripotent özellikteki hücrelerdir (Golchin ve ark., 2020).

2.2.1.6. Fetal Kök Hücreler

Fetusa ait organlar gelişim için yeterli sayıda kök hücre ve progenitör hücre barındırır ve bunlar fetal kök hücreler olarak bilinirler (Ishii ve Eto, 2014). Fetal kök hücreler multipotent olarak tanınmaktadır. Mezoderm kökenli dokulara dönüşüm potansiyeli bilinmekte olup, endoderm ve ektoderm kaynaklı dokulara farklılaşma potansiyeli araştırılmaktadır. Bu hücreler fetal kan ve kemik iliğinin yanı sıra, böbrek ve karaciğer gibi diğer fetal dokulardan izole edilebilirler. Fetal kök hücreleri kendi içerisinde; hemopoietik kök hücreleri (kan, kemik iliği, karaciğer), mezenkimal kök hücreler (kan, kemik iliği, karaciğer, akciğer, böbrek, pankreas), endotel kök hücreleri (Kemik iliği, plasenta), epitel kök hücreleri (karaciğer, pankreas) ve nöral kök hücreleri (Beyin, omurilik) olarak sınıflandırılmaktadır (O'Donoghue ve Fisk, 2004).

2.2.1.7. Erişkin Kök Hücreleri

Yetişkin kök hücreleri, yetişkin bireylerin dokularından elde edilen kök hücreler olarak bilinir. Bu hücreler de kendini yenileyebilen ve sınırlı olsa farklılaşma özellikleri olan hücrelerdir. Tüm yetişkin dokularında nadir olarak bulunan, farklılaşmış hücreler olan yetişkin kök hücreleri; doğal olarak ölen hücrelerin yerini almak için veya yaralanmalara yanıt olarak çoğalabilir ve farklılaşabilirler. Yalnızca embriyonik kök hücrelere kıyasla çok daha yavaş çoğalmaya ve daha az hücre tipine farklılaşabilme yetenekleri mevcuttur. Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler uygun indüksiyon koşulları altında yetişkin kök hücrelere farklılaştırılabilmektedir (Cable ve ark., 2020; Tian ve ark., 2023).

2.2.1.8. İndüklenmiş (Uyarılmış) Pluripotent Kök Hücreleri (iPSC)

İndüklenmiş pluripotent hücreler (iPSC), üç germ tabakasının (ektoderm, mezoderm ve endoderm) her bir hücre tipine farklılaşabilen yeniden programlanmış somatik hücreler olarak bilinirler. Bu hücrelerde embriyonik hücreler gibi sınırsız çoğalma ve farklılaşma potansiyeline sahiptirler (Aquirre ve ark., 2023).

2006 yılında embriyonik kök hücrelere benzeyen profil ve gelişim potansiyeline sahip olan hücrelerin, dört farklı transkripsiyonel faktör (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, “Yamanaka Faktörleri”) ile somatik hücrelerden oluşturulabileceği (somatik hücrelerin yeniden programlanması) açıklandı (Shi ve ark., 2017). iPSC’ler için genellikle kullanılan somatik hücre tipi fibroblastlardır.

Oct4 embriyogenez ve farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde spesifik olarak ifade edilir. Yapılan çalışmalarda bu transkripsiyon faktörünün eksikliğinin blastositin iç hücre kütlesi gelişimini durdurduğu ve embriyo mortalitesine neden olduğu gösterilmiştir. Sox2 doku ve organların gelişiminde önemli olmakla birlikte embriyonun geç dönemlerinde de ifade edilmektedir. Sox2 hücrel pluripotansın korunmasında rol oynayan Nanog vb. genlerin ekspresyonlarını düzenlemek için Oct4 ile etkileşime girer. Nanog aktivasyonunu sağlayan Klf4; Oct4 ile doğrudan etkileşime girmek için özel bir bölgeye sahiptir. Bu dört transkripsiyon faktörünün zorla ekspresyonu fibroblast hücrelerin pluripotent bir duruma dönüşmesine ve erken embriyonik dönemde ifade edilen Nanog’un yeniden aktive olmasına yol açabilir. c-Myc ise kendi kendini yenileme süreçlerinde rol oynar ve hücre farklılaşmasını önleyerek epigenetik değişikliğe neden olur (Schmidt ve Plath, 2012; Aquirre ve ark., 2023).

2.2.2. Kanser Kök Hücreleri

2.2.2.1. Kanser Kök Hücresi ve Tümör Mikroçevresi ile Etkileşimi

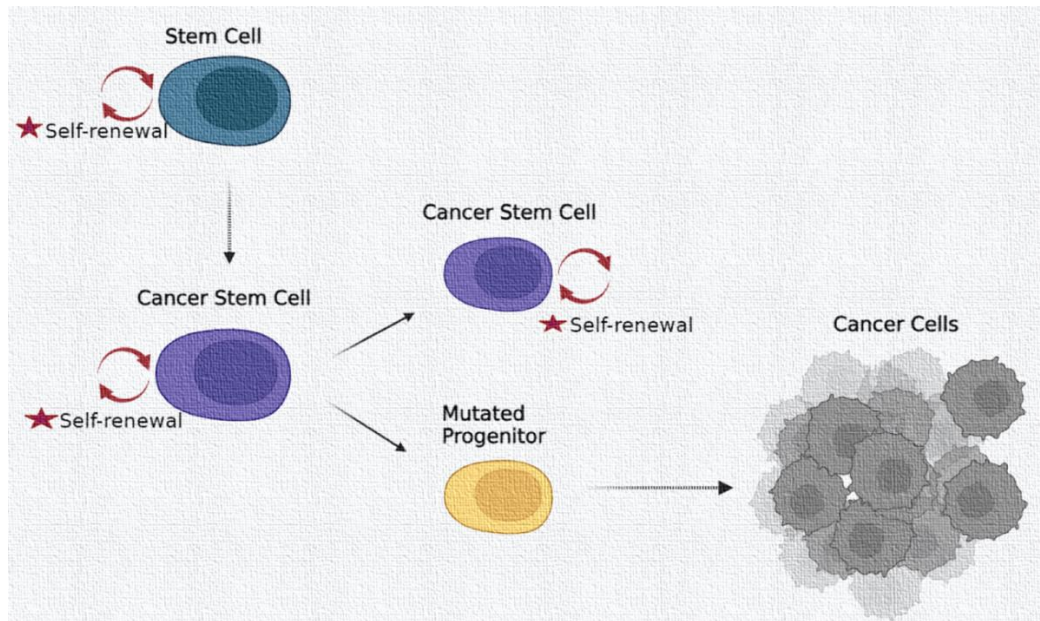
Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümü çok basamaklı bir süreçtir. Kanser, malign bir fenotip oluşturan mustayonların birikmesiyle ortaya çıkar. Neoplastik lezyonlar arttıkça mutant klonlar genişler ve daha fazla epigenetik/genetik değişikliklere ve mikroçevresel baskıya maruz kalırlar (Prasetyanti ve Medema, 2017). Onkogeneze neden olan bu epigenetik/genetik değişiklikler hücrenin birkaç temel özelliğini değiştirerek hücrelerin normal büyüme kontrolünden kaçmalarına ve sonunda tam kanser fenotipinin ortaya çıkmasına neden olurlar. Kanser hücreleri uyarıcı bir dış sinyale ihtiyaç duymaksızın çoğalırlar. Hücre bölünmesini engelleyici sinyallere karşı duyarsızdırlar ve normalde ölmeleri gerekirken, yaşamaya devam ederler. Bu hücreler genellikle çevrelerindeki hücrelerle veya hücre dışı matriksle olan bağlantılarını değiştirerek uzak bölgelere giderek tümörü yayarlar. Kanser hücresi bir dereceye kadar hızlı bölünen normal bir hücreye benzer. Tümörler karakteristik olarak hipoksik olup, bu yüzden büyümeleri için mutlaka bir kan kaynağına ihtiyaç duyarlar. Bu ihtiyacı genellikle tümör içerisine doğru kan damarlarının büyümesini teşvik edici sinyaller aracılığı ile sağlarlar (Lodish ve ark., 2020).

Tümör kitlesi genellikle bir hiyerarşi içinde bir araya gelen heterojen kanser hücrelerinden oluşmuştur. Bu ‘hiyerarşi hipotezi’ bize bir tümör kitlesi içinde genel yığından daha farklı özelliklere sahip, sayıca az olan bir alt hücre popülasyonu olduğunu anlatmaktadır. Tümör kitlesi içinde çok az sayıda bulunan bu hücreler, normal kök hücreye benzer şekilde kendi kendini yenileyebilen ve aynı zamanda da tümör başlatma yeteneğine sahiptir. Bu nedenle bu hücreler,

‘KKH (cancer stem cells)’, ‘kanser kök-benzeri hücreler (cancer stem-like cells)’ ya da ‘tümör-başlatan hücreler (tumor-initiating cells)’ olarak adlandırılırlar. (Eren, 2017; Prasetyanti ve Medema, 2017).

İlk olarak 1997 yılında akut miyeloid lösemiden (AML) izole edilmişlerdir (CD34 (+); CD 38 (-)) (Maiuthed ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018). KKH’leri; normal kök hücreler gibi kendini yenileme yeteneği olan, radyoterapi ve kemoterapiye dirençli, bulunduğu dokunun dışında vücudun diğer dokularında da koloni oluşturabilen, tümörün başlaması, çoğalması, invazyonu ve hatta metastazından sorumlu olan hücrelerdir (Açıkgöz,2014; Maiuthed ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018). Birkaç klinik önce ve klinik sonrası yapılan araştırmalarda KKH’lerinin tedaviye seçici olarak direndiğini ve tümör nüksüne yol açabileceği bildirilmiştir (Prasetyanti ve Medema, 2017).

Tamamen özelleşmiş hücreler genellikle bölünmezler; yıprandıklarında veya öldüklerinde bu hücrelerin yeri, kök hücrelerin bölünüp farklılaşması sonucunda dolar. Kök hücreler, organizmanın yaşamı süresi boyunca sürekli bölünebildikleri için DNA’larındaki onkojenik mutasyonlar biriktirebilir ve bu mutasyonlardan kaynaklı kanser hücresine dönüşebilirler. Apoptozu önleyen veya uygunsuz büyümeyi teşvik eden pek çok onkojenik mutasyon daha da farklılaşmış ancak, hala replike olabilen progenitör hücrelerde de oluşabilir. Tümörler, normal kök hücrelerinden kaynaklanabileceği gibi, bazı tümörlerin kendi içinde tümör başlatma yeteneğine sahip özel bir kök hücre popülasyonu barındırabilmesinden ötürü de gelişebilirler. Genel itibariyle tümör hücreleri heterojendir, bazıları bölünme yeteneklerini kaybetmişken, bir kısmı tümör oluşumuna neden olabilir. KKH’leri normal kök hücreler gibi iki yavru hücre oluşturmak için bölünür; bu yavru hücreler farklı tipte tümör kök hücreleri olup, daha sınırlı replikatif potansiyele sahiptir (Lodish ve ark., 2020).



Şekil 2.4. Kök hücre ve kanser kök hücre dönüşümü.

Somatik bir kök hücrenin ya da farklılaşmamış öncül hücrelerin genetik/epigenetik değişiklikler nedeni ile kanser KKH'ne dönüşebilme potansiyeli vardır. Dahası bu dönüşüm sonucunda oluşan KKH, kendini yenileme (self-renewal) yeteneklerini korurlar ve çoklu asimetrik hücre bölünmeler sonucunda tümör kütesinin bir kısmını oluşturabilecek yeni hücreler üretirler (Şekil 2.4.)(Greenow ve Clarke, 2012).

KKH ile ilgili bulgular önemli üç noktayı işaret eder: *Birincisi*; tümörler tek başlatıcı hücreden köken alsalar bile, tek tip hücrelerden oluşmamışlardır. *İkincisi*; tümör başlaması, metastaz, invazyon ve nüksünden sorumlu gerçekte sadece küçük bir hücre grubu vardır. *Üçüncüsü*; tümör mikroçevresinin kanser başlangıcını veya sürecini etkilediği bilinmektedir. Bazı komşu hücreler veya tümör hücreleri tümör kök hücrelerinin büyümelerini destekledikleri düşünülmektedir. Özellikle enflamasyon sırasında bağışıklık hücreleri tarafından salınan enflamatuar sitokinler (IL-1, IL-6 ve IL-8) tümör mikroçevresine etki ederler. Bu sitokinlerden IL-6'nın farklılaşmış tümör hücrelerinin KKH'lerine farklılaşmasına neden olduğu bildirilmiştir. Mikroçevrenin kanser hücresi üzerine etkilerinden biri de ekstraselüler matriks (ECM) aracılığıyla gerçekleşmektedir. ECM yapısındaki değişikliklerin tümör gelişimi öncesinde meydana geldiği, neoplastik büyümeyi desteklediği ve metastatik süreci etkilediği gösterilmiştir. Örneğin; ECM'de artan kollajen miktarı meme tümörü oluşumu riskini artırdığı gösterilmiştir. ECM bileşimindeki mekanik değişiklikler (ECM sertleşmesi, kollajen miktarı değişikliği vb.) hücre iskeleti üzerinden iletilerek Hippo yolağının yeniden düzenlenmesine neden olabilmektedir. Bu durumda Hippo yolağının ko-aktivatörleri olan YAP/TAZ ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Kanserli dokularda, özellikle daha yüksek kollajen içeren bölgelerde YAP/TAZ aktivitesi artar. Ko-aktivatörlerden biri olan TAZ'ın KKH olmayan hücrelere, kendi kendini yenilebilme gibi KKH özelliklerini kazandırdığı bilinmektedir. TAZ'ın bu işlevi KKH popülasyonunun artmasını sağlar. ECM'nin mekanik olarak daha sertleşmesi, β 1- integrinler aracılığı ile ILK (Integrin Linked Kinase) aktivasyonuna neden olur ve bu aktivasyon ile KKH'lerinin kendini yenileme kapasitesini arttıran PI3K/Akt yolu uyarılır. Bu hipoksik bir mikroçevrede bu daha da artmaktadır. (Prasetyanti ve Medema, 2017; Lodish ve ark., 2020).

2.2.2.2. Akciğer Kanseri Kök Hücresi ve Belirteçleri

Akciğer kanseri, farklı hücresel sinyalizasyonlarından kaynaklanan, farklı hücre fenotipleri sergileyen kanser hücrelerinin heterojenliği ile karakterize edildiği bilinmektedir. Dünya çapında kansere bağlı ölümlerin yaklaşık beşte birinden sorumlu olan akciğer kanseri, kanser kaynaklı ölümlerin başında gelir. Bu yüksek ölüm oranlarının temel nedenlerinden biri, tedavideki başarısızlıkların yanı sıra, KKH'lerinin metastazın başlatılmasında ve yayılımın sürdürülmesinde oynadığı kritik roldür. Güncel bulgular, mevcut akciğer kanseri tedavi yöntemlerinin (cerrahi, kemoterapi, radyoterapi veya hedefe yönelik terapötik yaklaşımlar) hastalık nüksünün ana nedeni olan KKH popülasyonunu tamamen ortadan kaldıramadığını ortaya koymaktadır. Bu amaçla

akciğer kanseri kök hücrelerini hedef alacak yeni terapötik stratejilerin veya spesifik belirteçlerin geliştirilmesi, hastalığın kesin ve etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için umut vaadeden bir yaklaşım olarak görülmektedir (Maiuthed ve ark., 2018).

Akciğer kanseri gelişiminde önemli bir role sahip olan akciğer kanseri kök hücreleri yapılan bazı çalışmalara göre; normal doku kök hücrelerinden veya normal KKH'lerinin farklılaşmasıyla ortaya çıkmıştır. Akciğer kanseri kök hücrelerinin tümör kürecikleri (sferoid) oluşturma özellikleri bilinmektedir (Wang ve ark., 2018). Dahası aynı tümörden elde edilen kanser hücrelerinin hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda tümör kürecikleri oluşturma yeteneklerinin farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur (Maiuthed ve ark., 2018).

Heterojenite gösteren akciğer kanserinde, akciğer kanseri kök hücreleri popülasyonlarının tanımlanmasında bazı biyobelirteçler tanımlanmıştır. Hücre yüzey ve hücre içi belirteçler olarak KHDAK için Tablo 2.6 ve KHAK için Tablo 2.7'de tanımlanmıştır (Zheng ve ark., 2022).

Tablo 2.6 KHDAK biyobelirteçleri

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Kök Hücre Biyobelirteçleri		Yapısı	İşlevi	Yapısı	İşlevi
Hücre yüzeyi biyobelirteçleri			Hücre içi biyobelirteçleri		
CD44	Tip I transmembran glikoprotein (85-250 kDa)		Hyaluronik asit reseptörü	ALDH	Poliipeptit tetramer (50-55 kDa)
CD90	Glikozilfosfatidilinositol-bağlantılı glikoprotein (25-35 kDa)		Hücre-hücre/ çevre etkileşimi	SOX2	SRY ilişkili HMG kutusu gen ailesi üyesi (~ 2.5 kb)
CD117	Tip I transmembran glikoprotein (~ 145 kDa)		Tirozin kinaz bütüne faktör reseptörü	OCT4	POU transkripsiyon faktörü ailesi üyesi (~ 16.4 kb)
CD133	Kolesterol bağlayıcı-beş transmembranlı glikoprotein (97-129 kDa)		VEGF ile etkileşir; sinyal iletimine katılır.	NANOG	DNA'ya bağlanan homeobox transkripsiyon üyesi (~ 150 kb)
CD166	Tip I transmembran glikoprotein (100-105 kDa)		Aktive olmuş lökosit adhezyon molekülü	BMI1	Protoonkogen
EpCAM	Tek geçişli transmembran proteini (30-40 kDa)		Hücre ahdeyonu, proliferasyonu, farklılaşması ve göçü		
ABCG2	ATP taşıyıcı bölgeden oluşan yarı bağlayıcı protein (~ 72 kDa)		Kemoterapi direnci ile ilişkili yabancı madde taşıyıcısı ve çoklu ilaç dışı atım pompası		
FZD	7- transmembran proteini (~ 64 kDa)		Wnt sinyal iletim reseptörü		
CXCR4	G protein ile ilişkili yedi transmembran protein (40-70kDa)		Kemokin reseptörü		

Zheng ve ark., (2022)'dan modifiye edilmiştir.

Tablo 2.7. KHAK biyobelirteçleri

Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Kök Hücre Biyobelirteçleri		Yapısı	İşlevi	Yapısı	İşlevi
Hücre yüzeyi biyobelirteçleri			Hücre içi biyobelirteçleri		
CD24	Glikozilfosfatidilinositol(GPI) ile zara bağlı, sialo glikoprotein (30- 70 kDa)	Hücre yüzeyi adhezyonu ve sinyal iletimi	ALDH	Polipeptit tetramer (50-55 kDa)	Alkol metabolizması, hücre farklılaşması, ilaç direnci ve oksidatif stres cevabı
CD44	Tip I transmembran glikoprotein (85-250 kDa)	Hyaluronik asit reseptörü	SOX2	SRY ilişkili HMG kutusu gen ailesi üyesi (~ 2.5 kb)	Hücre proliferasyonu, apoptoz, EMT, tümör göçü, invazyonu ve kemodirenci
CD87/ uPAR	GPI-bağımlı glikoproteini (45-65 kDa)	uPA reseptör, proteoliz regülasyonu, hücre adhezyonu, göç ve proliferasyonu	OCT4	POU transkripsiyon faktörü ailesi üyesi (~ 16.4 kb)	Hücre pluripotensi, tümör metastazi, tedavi direnci
CD90	GPI-bağımlı glikoprotein (25-35 kDa)	Hücre-hücre/ çevre etkileşimi	BMI1	Protoonkogen	Hücre proliferasyonu, yaşlanması ve tümör oluşumunun desteklenmesi
CD133	Kolesterol bağlayıcı-beş transmembranlı glikoprotein (97- 129 kDa)	VEGF ile etkileşir; sinyal iletimine katılır.			
CD166	Tip I transmembran glikoprotein (100-105 kDa)	Aktive olmuş lökosit adhezyon molekülü			
EpCAM	Tek geçişli transmembran proteini (30-40 kDa)	Hücre adhezyonu, proliferasyonu, farklılaşması ve göçü			
ABCG2	ATP taşıyıcı bölgeden oluşan yarı bağlayıcı protein (~ 72 kDa)	Kemoterapi direnci ile ilişkili yabancı madde taşıyıcısı ve çoklu ilaç dışı atım pompası			
PODXL1	Hücre yüzeyinde sialo-musin içeren transmembran protein(~ 55 kDa)	Na-H değişim ko faktörü 2, hücre şekli ve adhezyon			
PTCH	~ 55 kb uzunluğunda Patched geni, 22 ekzonuna ek 5 ilk ekzon içerir.	Hücre farklılaşması ve morfogenezi			

Zheng ve ark., (2022)'dan modifiye edilmiştir.

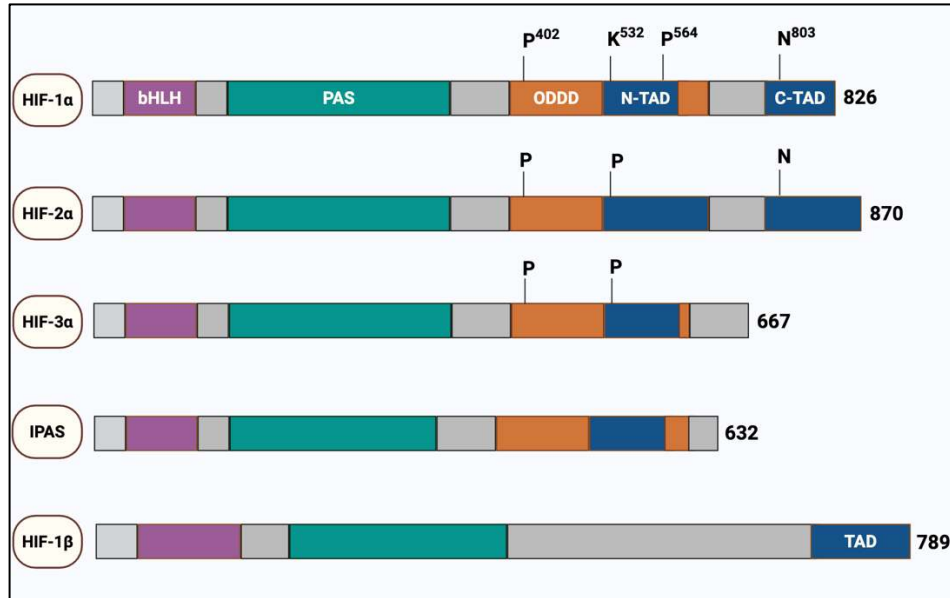
Normal doku kök hücrelerinin kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme potansiyeli çeşitli sinyal yolları tarafından titizlikle düzenlenir. Bu sinyallerin anormal aktivasyonu KKH'lerin devamlılığını, kemoterapi direncini ve kanser oluşumunu uyarabilir. Akciğer kanseri kök hücrelerinde bilinen biyobelirteçlerinin de benzer şekilde bu gibi sinyal mekanizmaları tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Bu sinyal yolları arasında özellikle Notch, Wnt ve HH (Hedgehog) öne çıkmaktadır. Notch sinyal yolu; hücreler arası iletişim, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, hücre adhezyonu ve EMT (Epiltelyal-Mezenkimal Geçiş) gibi temel biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Ayrıca kök hücre özelliklerinin korunmasında kritik bir öneme sahip olup, tümör hücrelerinin büyümesini ve metastazı uyarabilir. Akciğer kanseri kök hücre belirteçleri CD44, CD133, ALDH, OCT4 ve SOX2 ile ilişkili olduğu bilinen Notch1 ve Notch2, KHDAK'de yüksek düzeyde ifade edilmektedir. KHAK ise Notch etkisi net değildir; bazı durumlarda tümör baskılayıcı olarak görev alırken bazen de onkogen gibi davranabilmektedir. Embriyonik gelişimde önemli rolü bulunan HH (Hedgehog) sinyal yolunun anormal aktivasyonu, KKH düzenlenmesinde ve tümör oluşumunda pozitif bir etki gösterebilmektedir. HH ve Wnt sinyal yolları birlikte CD44, CD133, BMI1, LGR5 gibi KKH biyobelirteçlerini uyarabilir, EMT'yi de teşvik edebilirler. Sonuçta kanser hücresinin uzak dokulara invazyonu ve metastazını destekler, KKH ve ilaç direncini artırırlar. Wnt sinyal yolu ise merkezi sinir sisteminin ve memeli embriyolarının gelişiminde kritik rol oynamasının yanı sıra, KKH farklılaşmasını, karsinogenez sürecini ve tümör hücrelerinin invazyon yeteneğini de destekleyebilmektedir. Hipoksik bir mikroçevre Wnt sinyal yolunu aktive edebilir, bu da KKH farklılaşma ve kendini yenileme yeteneğini destekleyebilir (Zheng ve ark., 2022).

2.3. Hipoksik Yolağın Tümör Oluşumuna Etkisi ve Kanser Kök Hücresi ile İlişkisi

2.3.1. Hipoksik Yolak

Oksijen hücresel metabolizma ve biyoenerjetik olaylarda önemli bir substrat olup; yetersizliğinde ise canlı hücrelerde strese yol açar. Oksijen konsantrasyonunun azalması ve oksijenin kritik bir seviyeye kadar düşmesi sonucunda; hücre, doku ve organ fonksiyonlarının aksaması ve bozulması, hipoksik koşullar olarak ifade edilmektedir. Hipoksik koşullarda yaşamlarını sürdürmeye çalışan hücreler; anjiogenezi, demir metabolizmasını, glukoz metabolizmasını, hücre sağ kalım ve proliferasyonunu kontrol eden bir dizi genin transkripsiyonuna ihtiyaç duyarlar. İşte hücreler tarafından bu koşullarda (hipoksik) sentezlenen ve bir transkripsiyon faktörü olan HIF (Hipoksi ile İndüklenen Faktör) bilinen proteini, birçok insan maling kanserde (akciğer, kolon, meme, over, prostat, deri, mide vb.) aşırı ekspresse olduğu immünohistokimsal analizlerle gösterilmiştir. DNA mikrodizileri, ChIP analizleri ve genom düzeyinde kromatin immünprespitasyon çalışmaları yaklaşık 800'den fazla genin HIF'ler tarafından düzenlendiğini ortaya çıkarmıştır. Ek olarak HIF transkripsiyon faktörü elemanları birçok mikroRNA'yı ve kromatin düzenleyici enzimleri düzenler (Demirel, 2013; Calapoğlu, 2016; Watts ve ark., 2022).

HIF transkripsiyon faktörü yapısal olarak; α ve β olmak üzere iki alt birimden oluşan bir heterodimerdir. α alt birimi oksijene duyarlı olup, değişkenlik gösterebilir. Bugüne kadar tanımlanmış 3 farklı HIF proteini vardır: HIF1- α , HIF2- α ve HIF3- α (Şekil.2.5) Watts ve ark., 2022).



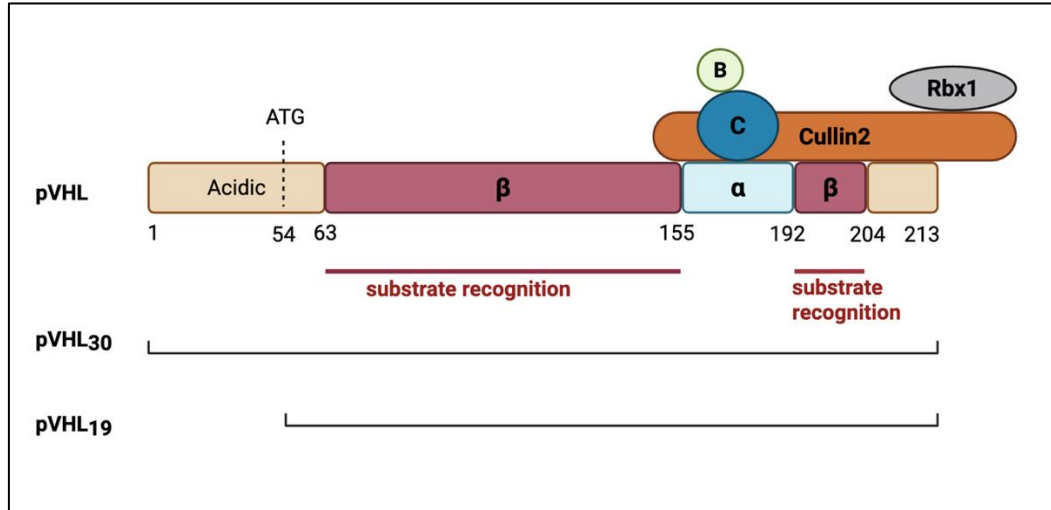
Şekil 2.5. HIF- α ve HIF1- β izoformlarının domain yapıları.

HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α ve HIF3 α 'nın alternatif splicing ürünü IPAS) ile HIF-1 β , N-terminalinde bHLH (basic helix-loop-helix) ve bunu takiben PAS (Per-ARNT-Sim) bölgelerine

sahiptirler. HIF-1 α iki prolin hidroksilasyonu ve bir lizin asetilasyonu ile oksijen regülasyonunu stabilize etmeye aracılık eden bir ODDD'ye (oxygen-dependent degradation domain) bölgesine sahiptir. Prolin rezidüleri HIF-2 α ve HIF-3 α içersinde de korunurlar. HIF-1 α ve HIF-2 α C-Terminal (C-TAD) ve N-Terminal (N-TAD) transaktivasyon bölgelerine sahipken, HIF-1 β sadece bir transaktivasyon domaini (TAD) içerir. Her alt birimin amino uzunluğu domain şemasının sonunda yer almaktadır. Literatürde HIF-1 β , ayrıca aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) olarak da adlandırılmaktadır (Chun, 2002; Demirel, 2013; Liao ve ark., 2024).

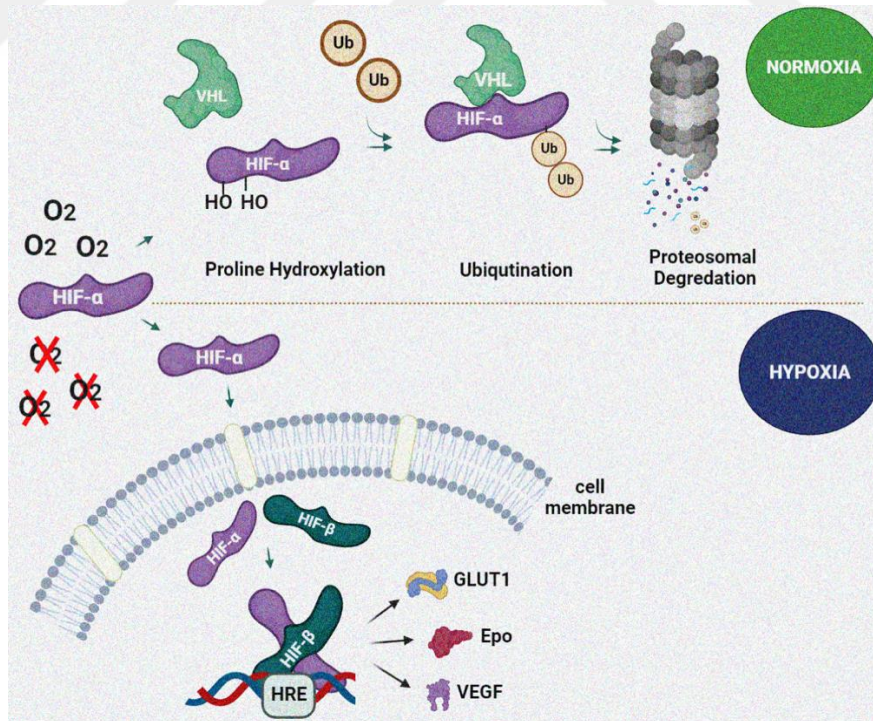
HIF-1 α geni 15 exon ile 14 intron bölgesinden oluşmaktadır ve HIF-1 α proteini (**Şekil.2.5**) bHLH (basic helix-loop-helix) ve PAS (PERN-ARNT-SİM) domainlerini içermektedir. Bu domainler HIF-1 β ile dimerizasyonda yer alırlar. C terminal bölgesi; TAD (transaktivatör bölgesi), ID (inhibitör bölgesi) ve NLS (nükleer lokalizasyon bölgesinden) oluşur. ODDD (oksijen bağımlı degradasyon bölgesi) bölgesi ise VHL proteini tarafından hedeflenen bölgeleri içerir (Chun, 2002). HIF-2 α protein yapısı bakımından büyük ölçüde HIF-1 α 'ya benzerlik gösterir; ancak dokuya özgü ifade edildikleri ve farklı fonksiyonlara sahip oldukları bildirilmektedir. HIF-1 α ve HIF-2 α yapısal olarak oldukça benzemelerine ve HIF- β ile dimer oluşturarak aynı DNA sekanslarına bağlanmalarına rağmen farklı doku ve hücresele dağılım paternlerine sahip olabilir ve farklı hedef genleri aktive edebilirler. HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α 'nın mevcut üç izoformu, HIF- β ile dimerize edildikten sonra farklı fonksiyonlara sahip transkripsiyon faktörlerinin oluşumuna izin verir. HIF-3 α 'nın çoklu izoformları mevcuttur. HIF-3 α bağımsız olarak veya HIF-1 α ile çalışarak bazı hedef genleri aktive edebildiğinden, glikoz ve amino asit metabolizması, apoptoz, proteoliz, p53 sinyalizasyonu gibi olaylarda rol oynadığını düşündürmektedir. HIF-3 α 'nın alternatif splicing seçeneklerinden biri olan inhibitör PAS domain proteininin (IPAS) HIF-1 α için negatif bir regülatör gibi davrandığı bildirilmiştir (Demirel, 2013). (**Şekil.2.5**)

VHL (von Hippel-Lindau) tümör baskılayıcı bir gen olup, kromozom 3'ün kısa kolunda lokalize olan (3p25-26) 3 ekzonlu bir gendir. Bu genin kodladığı 4-7 kb uzunluğundaki mRNA'dan, farklı büyüklükte iki protein sentezlenir. Bunlardan biri 30 kDa moleküler ağırlıklı bir protein olup VHL30 (213 amino asit) diye adlandırılır. Diğer alternatif transkripsiyonla sentezlenen yaklaşık 18-19 kDa'luk daha kısa bir VHL19 (160 amino asit) proteindir. Her iki molekül de tümör baskılayıcı aktiviteyi sağlar. VHL terimi benzer fonksiyona sahip olmalarından dolayı her iki izoform için de kullanılır. VHL proteini α ve β olmak üzere işlevsel iki tane domain içerir (**Şekil.2.6**) (Maher, 2004; Hes ve ark., 2005; Chittiboina ve Lonser 2015; Frost, 2018)



Şekil 2.6. VHL geni (Frost'ten (2018) uyarlanmıştır.).

VHL geni iki protein kodlar: pVHL30 ve pVHL19. VHL; birçok hücre proteiniyle etkileşime girerek, ekstrasellüler matriksin formasyonunda, anjiyogenezin kontrolünde, hücre metabolizmasında ve mitogenezde rol alır. En iyi tanımlanmış VHL işlevi; E3 ubiküitin ligaz kompleks mekanizmasıdır. VHL proteini, elongin B ve elongin C ile Cullin2'nin heterodimerik kompleks oluşturarak HIF-1α ve HIF-2α'ya bağlanıp bu proteinlerin ubiküitin aracılı degradasyonuna hizmet eder (Şekil.2.6) (Maher, 2004; Schöning vd, 2017).



Şekil 2.7. Hipoksik Yolak (Watts ve ark.'dan (2022) modifiye edilmiştir.)

Oksijen varlığında; HIF-1α'nın hidroksilasyonu sonucunda etkinleşen VHL, fonksiyonel hedefi olan iki regülatör altyapıya, Elongin C ve Elongin B'ye (hücrel transkripsiyon faktörleri) bağlanır ve bağlantı sonrası Cullin2 (Cul2) diye adlandırılan dördüncü bir proteinle etkileşir. Bu

VHL/elonginCB/Cul2 kompleksi ring bax protein 1 (Rbx1) denilen bir proteinle daha etkileşerek poliubikitinasyon için uygun bir hedef oluşur. Yapıya eklenen bu enzimler genellikle ubikütün ligazlar (E2, E3 kompleksleri) olarak bilinir ve böylece oluşan poliubikütün kuyruğu yıkıma uğrayacak substrata bir sinyal ya da flama hizmeti yaparak intrasellüler yıkım için hedef proteinle bağlanırlar) (Şekil 2.6.) (Maher, 2004; Zimmer ve ark., 2004; Hes ve ark., 2005; Demirel, 2013 Chittiboina ve Lonser 2015; Schöning ve ark. 2017)

Normoksik koşullarda (oksijen yaklaşık %21 ya da yeterli Fe^{+2} ve 2-oksoglutarat mevcut olduğunda); prolil hidroksilazlar (PHD) tarafından HIF-1 α proteinleri, iki prolin rezüdüsünden (P^{402} ve P^{564}) hidroksile olarak VHL ile etkileşir. PHD aktivitesi sonucunda prolinler hidroksiproline dönüştürüldükten sonra VHL proteinini HIF-1 α 'yı yakalar. Böylece HIF-1 α 'nın ubikütün süreci başlar. Fakat HIF-1 α stabil olması durumunda yani hipoksik koşullarda (oksijen yaklaşık %1); prolin hidroksilasyonu için substrat olarak oksijene ihtiyaç duyulduğundan iki prolin rezüdüsü hidroksillenemez, hidroksillenemeyen HIF- α yıkım için VHL proteinine bağlanamaz ve birikir. Bu durumlarda yıkılamayarak stabil hale gelen HIF- α ünitesinin nükleusa geçtiği, HIF'in diğer ünitesi HIF- β ile birleşerek özel DNA sekanslarına bağlanır ve (HRE (Hypoxia-Response Element) bölgesi), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), eritropoietin (Epo) gibi bir takım hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar. VEGF ve Epo gibi proteinlerin transkripsiyonu, tümör ilerlemesi ve metastaz sürecine katkı sağladıkları gösterilmiştir) (Şekil 2.7.) HIF-1 α 'nın VHL proteinine bağlanan bölgesi olarak bilinen oksijen bağımlı degradasyon bölgesi (ODDD), HIF-1 α 'nın N-terminal transaktivasyon bölgesi olarak bilinir (N-TAD). HIF-1 α 'nın ikinci transaktivasyon bölgesi C-terminal bölgesi (C-TAD) içerisinde bulunan asparajin hidroksilaz ile hidroksillenen asparajin N^{803} konumlu bölgesidir. Hipoksi koşullarında prolin ve asparajinlerin hidroksilasyonu gerçekleşmez ve VHL protein HIF- α 'ya bağlanamaz (Maher, 2004; Zimmer ve ark., 2004; Hes ve ark., 2005; Demirel, 2013 Chittiboina ve Lonser 2015; Schöning ve ark. 2017; Liao ve ark., 2024).

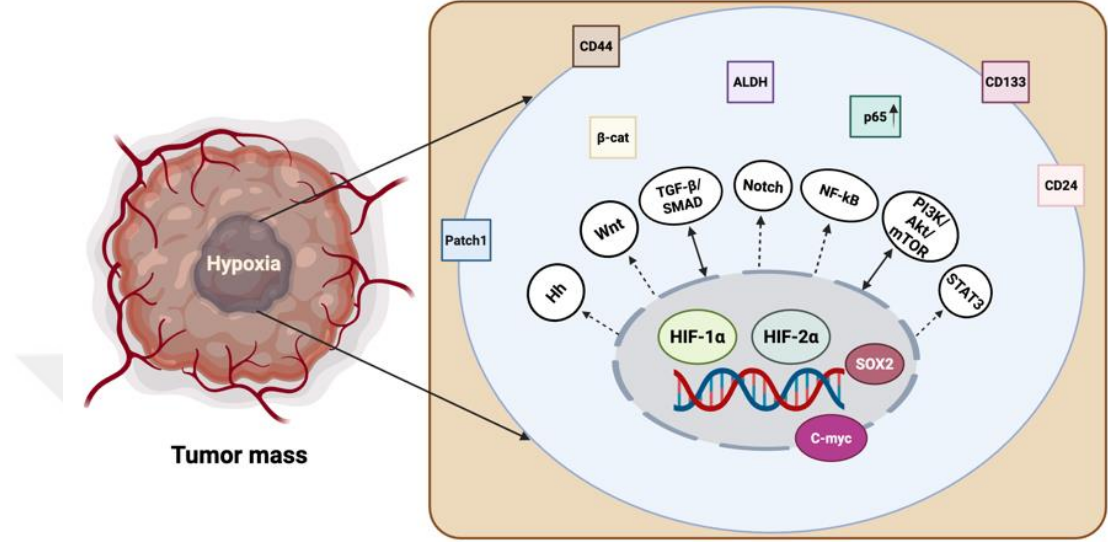
Son olarak VHL geninde tüm bu mekanizmaların dışında çeşitli gen mutasyonları meydana gelebilir. Bu durumda hücreler hipoksi durumundaymış gibi hareket ederler. Hücrelerde VHL proteininin yetersiz olması durumunda, ortamda oksijen olsa bile, HIF- α alt ünitelerinin yıkımı gerçekleşmez. VHL hastalıklarında VHL'nin elongin B ve elongin C'ye bağlandığı yerlerinin sıklıkla mutasyona uğradıkları gösterilmiştir. VHL'de oluşan bu değişimler nedeniyle de hipoksiyle indüklenebilir proteinler uygun şekilde yıkılamaz, birikir ve stabil hale gelerek HIF tarafından regüle edilen hedef genleri indükleyebilir ve yeni kan damarları oluşabilir. Böylece VHL yetersizliğinde, HIF degradasyonu bozulur ve hücreler oksijensizmiş gibi davranabilirler. Bu durumun, solid tümörlerin damarlanmasını ve gelişimini kolaylaştırarak tümör büyümesine yardımcı olduğu gösterilmiştir (Zimmer ve ark., 2004; Hes ve ark., 2005; Demirel, 2013).

2.3.2. Hipoksi ve Kanser Kök Hücresi

Hipoksinin angiyoenez, demir metabolizması, glukoz metabolizması, hücre proliferasyonu ve hücre sağ kalımı üzerine etkili 100'den fazla genin transkripsiyonel uyarımını başlattığı belirlenmiştir. HIF- α aktivasyonu yaklaşık %5 oksijende başlar ve oksijen konsantrasyonu neredeyse anoksik koşullara düştüğünde aktive olmaya devam eder. Araştırmalara göre KKH'lerle ilgili olarak, HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın kanser hücrelerinde kök hücre özelliklerini koruduğu bildirilmiştir. Her iki faktör de KKH'nin hayatta kalması ve kök hücre özellikleri korunmasında önemli role sahiptir, bu da özellikle KKH'leri mekanizmasını anlama ve kontrol etmede hipoksik yolağı moleküllerinin önemini vurgular. Hem HIF-1 α hem de HIF-2 α , KKH'leri koruyabilse bile bu süreçte farklı katkıları olduğu bildirilmiştir. Yapısal benzerliğe ve özdeş DNA bağlanma bölgelerine sahip olmalarına rağmen, HIF- α izoformları aynı gen takımlarını aktive etmez; hem ortak hem de kendilerine özgü gen hedeflerine sahiptir (Schöning ve ark., 2017; Tong ve ark., 2018).

Genel olarak, HIF-1 α , glikoliz yolu genleri gibi düşük oksijenli hayatta sağkalımını destekleyen genleri aktive ederken; HIF-2 α , Oct4, Sox2 ve Notch gibi kök hücre fenotipinin korunmasından sorumlu genleri aktive eder. Hipoksi ile uyarılan KKH'leri, çeşitli sinyal yollarını aktive ederek hücre içi veya hücre yüzeyinde bazı belirteçlerin ekspresyonuna neden olur. Hipoksik koşullar altında; Notch, Wnt Hh, NF-kB, TGF- β /SMAD, PI3K/Akt/mTOR ve STAT3 sinyal yolları HIF aracılığı ile aktive edilebilir ve bu bazı belirteç (CD44, CD24, ALDH, Patch-1, SOX2, C-myc, p65 vb.) ekspresyonlarını uyarabilir (Şekil.2.8). KKH'leri söz konusu olduğunda, bu ilişki birkaç çalışma tarafından deneysel olarak desteklenmektedir. Beyin tümörü hücrelerinde, HIF-2 α tek başına C-myc ve Nanog ekspresyonunu artırır ve kanser hücrelerinde *in vitro* olarak farklılaşmamış bir durumu korur. Covello ve ark., (2006) hem embriyonik hücrelerde hem de teratomlarda HIF-2 α 'nın kök hücre fonksiyonlarını doğrudan düzenlediğini ve bir başka önemli kök hücre bakım geni olan Oct4 aktivasyonu yoluyla büyümeyi desteklediğini göstermiştir. Li ve ark. (2009), hipoksik koşullar altında glioblastoma KKH'lerinin, kök olmayan kanser hücreleri ve nöral progenitör hücrelere kıyasla çok daha yüksek HIF-2 α ekspresyonu ve protein seviyelerine sahip olduğunu bildirilmişlerdir. Ayrıca HIF-2 α ortadan kaldırılmasının yalnızca KKH'leri etkilediğini ve hücrelerin farklılaşmasını desteklediğini ortaya koymuşlardır. Buna karşılık, <%1 oksijen koşullarında HIF-1 α aktivitesinin, KKH, nöral progenitör hücre ve kök hücre olmayan kanser hücreleri arasında benzer düzeyde olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak bu durumun HIF-2 α 'nın glioblastomdaki KKH'leri için spesifik bir belirteç olabileceğini öne sürmüşlerdir. HIF-2 α , KKH'lerde stemness (kök hücre özellikleri) gen aktivasyonundan ve özelliklerinden sorumluyken, HIF-1 α , hayatta kalma yollarını aktive ederek, hipoksik koşullarda KKH ve KKH olmayan canlılığı destekler (Schöning ve ark., 2017; Tong ve ark., 2018). Najafi ve ark. (2020) hipoksik nişler içindeki tercihli lokalizasyonun, KKH'lerinin çeşitli stres faktörlerine verilen yanıtların modifikasyonu yoluyla aracılık eden adaptif mekanizmalar geliştirmesine ve sonuç olarak agresif

bir davranış göstermesine yardımcı olabileceğini ortaya koymuşlardır. Tüm bunlarla beraber iyice karmaşılaşan HIF mekanizmasının KKH ilişkili işleyişinin, modern bilimin son yıllarda gelişen ve ilerleyen teknolojilerinden yararlanarak aydınlatılması ve bu bilginin tedavide terapötik hedefler geliştirmede kullanılması büyük önem taşımaktadır.



Şekil 2.8. Hipoksi ve KKH arasındaki ilişki (Zaarour ve ark.'dan (2023) modifiye edilmiştir.).

2.4. Üç Boyutlu (3D) Hücre Kültürü ve Kanser Araştırmalarındaki Kullanımı

Bilimsel çalışmalarda; hücre ve organ biyolojisi, sinyal yolları, canlılık, apoptoz, kanser biyolojisi, çeşitli hastalık modellemeleri, kök hücre çalışmaları ve hedefe yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılmak üzere model sistemlere veya organizmalara ihtiyaç vardır. Ökaryotik bir yüksek organizasyonlu organizmalarda hücreler, hücre-hücre etkileşimleri sağlayan moleküller (CAMs) aracılığıyla birbirlerine (örneğin; kaderinler, integrinler, hücreler arası kanal proteinleri) ve hücreler arası boşluğu dolduran fibroblastlar, kollagen, laminin gibi proteinlerce zengin olan extrasellüler matriks (ECM) ile de etkileşim halindedir. Hücre-hücre bağlantıları ile en temelde doku bütünlüğü sağlanırken; ECM böylece doku için bir iskelet görevi görür (Fatehullah ve ark., 2016; Akbari, 2018; Frum ve Spence, 2021).

Geçmişten günümüze deneysel araştırmalarda yaygın olarak kullanılan iki boyutlu (2D) hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda hücre biyolojisi, kanser yolları vb. alanlarda yadsınamaz bilgiler elde edilmiştir. Yine de 2D hücre kültüründe kullanılan hücre hatları zaman içinde genotipik değişimler ve sınırlı pasaj kapasitesi göstermesi, çapraz-kontaminasyonu önlemek için sürekli kontrol gurubu oluşturma zorunluluğu bulundurması ve primer doku özelliğini tam olarak yansıtmaması gibi dezavantajlar içerir. (Lin ve Baker 2011; Er, 2016; Sachs ve Clevers, 2014). Ek olarak CAMs ve ECM olmadan 2D kültürde hücreleri büyütmenin yeterli ve verimli olmadığı daha önce gösterilmiş ve bu yöntemle elde edilen hücrelerin gerçek doku özelliklerini ve fonksiyonlarını yansıtmadığı ile ilgili araştırmalar literatürde yerlerini almışlardır. Fare gibi hayvan modellerin

maliyetli olması, çalışmanın sonunda farenin öldürülecek olması, tümör-konakçı ilişkisinin her zaman sağlanamaması, insan hasta dokusu ve insan genetik altyapısını birebir yansıtmaması ve bir takım etik problemlerden ötürü dezavantajlara sahiptir (Er, 2016). Teknolojik ilerlemenin hızla ivme kazandığı 21. yy'da üç boyutlu (3D) hücre kültürlerinin geliştirilmesiyle çarpıcı bir başarı elde edilmiş ve bu teknoloji bilimsel araştırmalarda kullanılmak üzere yerini almıştır. 3D hücre kültürü teknolojisi, hücrelerin CAMs bağlantıları ile birbirine tutunarak 3D bir organizasyon oluşturmasına olanak tanımıştır. ECM benzeri malzemelerin eklenmesiyle bu organizasyon daha fizyolojik hale getirilmiştir. Primer dokudan ya da pluripotent kök hücrelerden türetilen kendi kendini yenileyebilme ve organize edebilme kapasitesine sahip ve doku fizyolojisiyle mimarisini yansıtan organ benzeri yapıların elde edildiği organoid modellemesi ile de 3D hücre kültür sistemleri daha ileri bir düzeye taşınmıştır. (Fatehullah ve ark., 2016; Akbari, 2018; Frum ve Spence, 2021).

2.4.1. Üç Boyutlu (3D) Hücre Kültürü Sistemleri

2.4.1.1. 3D Hücre Kültürü Modelleri

Özellikle klinik öncesi araştırmalarda, 3D hücre kültürü modelleri geleneksel 2D hücre kültürü ile hayvan modelleri arasındaki boşluğu kapatmanın yenilikçi ve umut verici bir yoldur. Genel itibariyle 3D hücre kültürü yöntemleri sferoid ve organoid modellere ayrılabilir. Çoğunlukla birbirinin yerine kullanılabilen terimler olan sefroidler ve organoidler birçok hücrenin toplanmasıyla oluşan 3D hücre kültürü modelleridir. Sferoidler basitçe hücrelerin 3D yapılar halinde toplanması olarak tanımlanabilirken; organoidler insan organinkine bezer yapı ve işlevleri gösteren kendi kendine farklılaşabilen modeller olarak bilinirler (Lee ve ark., 2023).

2.4.1.1.1. Sferoidler

Sferoidler, serbest yüzen agregatlar olarak kültürlen; tümör dokuları, embriyonik cisimler, hepatositler, nöronal dokular ve meme benzeri gibi çok çeşitli hücrelerin basit kümeleri olarak tanımlanan 3D hücre kültürü sistemleridir. Mevcut 2D hücre modellerine kıyasla sferoidler, hücre-hücre etkileşimlerinin daha etkili bir şekilde incelenmesine olanak tanır. Ancak bazı durumlarda ECM benzeri bir iskele olmadan kültürlendikleri için nispeten düşük bir yapısal karmaşıklık gösterirler. Kanser hücrelerinin 3D kültürünü sağladıkları için, kanser araştırmalarında, antikanser direnci, radyasyon direnci çalışmalarında, tümör sferoidleri (tümöroidler) sıklıkla kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2023).

Sferoidlerin histolojik yapıları solid tümörler gibi heterojen hücre popülasyonlarından ve patafizyolojik gradyanlardan oluşur. Dış katmandaki hücrelerin, besinlere ve oksijene erişimi merkez katmanları oluşturan hücrelere göre daha kolaydır. Merkeze doğru gidildikçe besin ve oksijenlere erişim ve tedarik azalır ve karbondioksit miktarı artar. Bu da merkezdeki hücrelerin

dışarıdaki hücelere nazaran daha nekrotik ve yaşlı kalmasını açıklamaktadır. Tek tip hücre oluşturulmuş sferoid kültürde bile, oksijen ve besinin sınırlı difüzyonuna bağlı olarak dıştan içe doğru heterojen hücre katmanlarının oluştuğu söylenebilir (Han, vd 2021).

2.4.1.1.2. Organoidler

Organoidle yapısal olarak karmaşık ve organa özgü kümeleri olup, embriyonik kök hücreler, yetişkin kök hücreler veya indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden kültürlenebilirler. Matrigel veya kollajen gibi ECM benzeri iskele ile kültürlenmiş hücrelerin bir araya gelmesi ve çok aşamalı organogenez özelliklerinin yansıtılması ile geliştirilen 3D hücre kültürüdür. Kanser araştırmalarında da sıklıkla kullanılan bu organoid modelleri; kanser ilerlemesi, çoğalması, kendi kendini yenileyebilen özelliklere sahip olması ve farklılaşma yeteneklerinden kaynaklı tümör içi heterojeniteyi iyi taklit ederler. Kanser çalışmalarında kullanılan organoid modeller, sferoidlerden daha karmaşık bir yapıya sahiptir (Lee ve ark., 2023).

2.4.1.2. 3D Hücre Kültürü Teknikleri

2.4.1.2.1. İskele (Scaffold) bağı olmayan 3D hücre kültürü sistemleri

Herhangi bir iskele desteği olmadan hücre-hücre etkileşimleri ile 3D hücre kültürü organizasyon oluşturan sistemlerdir. Bu teknikte herhangi bir destekleyici bir yapı bulunmadan, küçük hacimli damlalar içerisinde hücrelerin hücre-hücre etkileşimleri ile bir agregat oluşturması prensibine dayanmaktadır. Asılı damla (hanging drop) tekniğinde, küçük hacimli damlalar içerisinde hücreler kendiliğinden bir araya gelirler. Yaygın olarak kullanılan diğer bir teknik ise; düşük yapışma kapasiteli (low-attachment) platelerin kullanılmasıyla geliştirilen 3D hücre kültürüdür.

2.4.1.2.2. İskele (Scaffold) bağı olan 3D hücre kültürü sistemleri

Yüksek miktarlarda suyu emebilen ve tutabilen çapraz bağı polimer yapıdaki bazı doğal veya sentetik malzemeler 3D hücre kültürü çalışmalarında hidrojel olarak kullanılabilir. Bu doğal malzemelere örnek olarak fare tümör dokusundan elde edilen ECM proteinlerince zengin olan ‘Matrigel’ ya da doğal bir biyopolimer olan agaroz, doğal hidrojellere örnek verilebilir. Ek olarak deniz yosunlarından elde edilen aljinatta 3D kültürde bir iskele olarak kullanılabilir. Yaygın olarak kullanılan sentetik iskeleler poli-ε-kaprolakton (PCL), polietilen glikol (PEG), polivinil alkol ve poli-laktid-ko-glikolid (PLGA)’den oluşur. Hem doğal hem de sentetik iskeleler 3D hücre kültüründe hücre-hücre (CAM) etkileşimlerinin dışında, hücre-matriks (ECM) gelişimi için bir alt yapı sunmaktadır.

Bilimsel yeni tekniklerden olan organ-on-chip modelleri de bir organın fizyolojisini taklit etmek için tasarlanmış olan mikroakışkan temelli sistemlerdir. Bu organ-on-chip modellerinde, çip

içerisinde tasarlanmış olan küçük kanallar boyunca hücrelere besin ve oksijen akışı sağlanır. Ek olarak günümüzde önemli bilimsel gelişmelerden olan 3D biyoyazıcılarda, klinik öncesi araştırmalarda kullanılan yeni tekniklerdendir ve özellikle organ transplantsyonu için geleceğin umududur (Habbanjar ve ark., 2021; Li ve ark., 2021; Sigma Aldrich, 2025)

2.5. Protein İfade Profiline ve Hücre Yüzey Moleküllerinin Terapötik Yaklaşımındaki Önemi

Kanser ölümcül bir halk sağlığı sorunu olarak dünyada ölümlerin başlıca nedeni olmaya devam etmektedir. Bilim ve teknolojiadaki gelişmeler, kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıklarda tedavi seçeneklerini arttırmış; kişiselleştirilmiş/kişiyeye veya hedefe özgü tedavi yaklaşımları gibi yeni yaklaşımların ortaya çıkmasını sağlamıştır. Genomik ve transkriptomik alanındaki ilerlemeler, başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıkların karakteristik özelliklerini, prognozu ve diğer biyolojik etkileri hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Ancak, proteomik temelli yaklaşımlar, hastalıkla ilişkili proteinlerin tanımlanmasında daha kapsamlı bilgiler verdiği için klinik öncesi çalışmalarda gittikçe artan bir popülerite kazanmaktadır. İnsan genomunun ve proteomunun detaylı analizini mümkün kılan genomik, transkriptomik ve proteomik teknolojilerin gelişimi, bu tedavi yaklaşımlarının başarıya ulaşma potansiyelini günden güne arttırmaktadır.

Bir hücre, doku ve organizmada belirli bir anda bulunan proteinlerin tümü “proteom” olarak adlandırılır. Proteinler, yaşamın sürdürülmesinde doğrudan rol oynayan, vücuttaki doku ve organların yapısı, işlevi ve düzenlenmesinde görev alan temel moleküllerdir. Proteomik, belirli bir durumda bir hücrenin, dokunun veya organizmanın tüm proteinlerin ifade düzeyleri, transkripsiyon sonrası modifikasyonu, lokalizasyonu ve kimliği hakkında kapsamlı bilgi sağlayan ve çok sayıda analitik tekniği kapsayan bir araştırma alanıdır. Organizmanın içinde bulunduğu fizyolojik duruma göre meydana gelen protein seviyesindeki değişiklikleri yansıtan ve bu değişiklikleri incelemeye olanak veren proteomik teknolojiler, kanser gibi ölümcül hastalıkların erken tanı ve tedavisinde potansiyel yeni biyobelirteçlerin belirlenmesine katkı sağlamakta, bu biyobelirteçlerin klinik kullanıma kazandırılmasında ve en nihayetinde hastalığa bağlı ölüm oranlarının azaltılmasında umut vaat etmektedir. Ayrıca kanser hücrelerinin moleküler profillerine uygun olarak, hedefe yönelik ilaç geliştirilmesinde ve yeni tedavi yaklaşımlarının kazanılmasında proteomik teknikler önemli bir rol üstlenmektedir (Gezici, 2017; Su ve ark., 2021).

Biyobelirteç ve ilaç çalışmalarında erişebilirliği nedeniyle çoğunlukla hücre yüzey proteinleri (hücre membran proteinleri) ya da plazma membran proteomu hedeflenmektedir. Bu proteinler genel olarak hücre-hücre etkileşimlerinde, hücre dışı sinyallerin hücre içi tepkilere dönüşümünde (veya tersi), besin ve madde taşınması gibi biyolojik süreçlerde kritik rol oynarlar. Kanser gibi hastalıklarda bu proteinlerin ifade düzeyindeki meydana gelen değişikliklerin analiz edilmesi, yeni tanı ve prognostik biyobelirteç potansiyellerinin tanımlanmasına olanak tanırken, terapötik amaçlı kullanılabildiklerinden dolayı da hayati öneme sahiptirler (Ye ve ark., 2020; Larkin ve Aukim-Hastie, 2011).

Hücresel homeostazinin önemli bir parçası olan hücre membranı (hücre zarı) esnek bir yapıya sahiptir. Membran yapısını oluşturan fosfolipitler temelde negatif yüklü hidrofilik bir baş ve yanyana duran hidrofobik özellikteki iki yağ asidi zincirinin oluşturduğu kuyruk bölümünden meydana gelirler. Fosfolipit çift tabakası ise, hidrofobik kuyruklar iç içe birbirine bakacak şekilde dizilirken, hidrofilik başlar ise hücre içi ve hücre dışı yüzeyi ile temasta bulunur. Böylelikle hücre içi ve hücre dışı ortamda bulunan sulu ortamda kendiliğinden düzenli bir yapı oluşturular. Membran yapısında, zar akışkanlığına katkıda bulunan kolesterol ve zara işlevsellik kazandıran proteinler bulunur. Membran yapısının önemli bir özelliğide seçici geçirgen olmasıdır yani; lipitte çözünen oksijen, karbondioksit vb. maddeler geçebilirken hücre içi ve dışına kolaylıkla geçebilirken glukoz veya yüklü moleküller kolaylıkla geçemezler. Bunlar için kanallar veya transmembran (taşıyıcı proteinler) proteinlere ihtiyaç vardır (Anamourlis, 2020).

Hücre membranının çift fosfolipid tabakası içerisinde pek çok dağılmış protein bulunur. Hatta buradaki bazı proteinler karbonhidrat gruplarına bağlanarak glikoprotein yapısını oluşturular. Bu dağılmış proteinler kimi zaman fosfolipit tabakası içerisinde gömülü halde bulunur ve *integral proteinler* olarak adlandırılırlar. Bu proteinlere örnek olarak; kanal ya da taşıyıcı proteinler, reseptörler, glikoproteinler verilebilir. Bazı proteinler ise sadece membran yüzeyine tutunur ve bunlarda *periferal proteinler* olarak bilinirler. Periferal proteinlere örnek olarak bazı enzimler örnek verilebilir. Hücre membran proteinleri ORF'lerin (açık okuma çerçevesi-open reading frames) yaklaşık %20-30 oluşturmalarına rağmen, hücrede az bulunmaları ve zayıf çözünürlükleri çoğu zamanda yapılan proteomik çalışmalarda yetersiz şekilde temsil edilirler. İntegral proteinlerin sekonder yapısı α -heliks ve β -sheet yapıdan oluşur. Bu proteinlerin tanımlanmaları içinde barındırdığı hidrofobik transmembran bölgelerden ötürü zordur, ayrıca α -heliks yapıları yoğun olarak barındırmaları bu zorluğu arttırmaktadır. Proteinin hidrofobik yönelimi genellikle transmembran helikslerin varlığına bağlıdır (Anamourlis, 2020).

Sonuç olarak mevcut ilaç hedeflerinin yaklaşık %70 ni oluşturan (bunların yaklaşık %25'i GPCR'lerdir) hücre membran proteinlerinin keşfi son derece önemlidir. Bu yüzden tanımlanmalarında yaşanan analitik zorlukların üzerinden gelmek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilse de hala bu zorluklar güncelliğini korumaktadır (Vuckovic ve ark., 2013).

2.5.1. Hücre Membran Proteinleri ve İzolasyonları

Çift fosfolipit tabakadan oluşan ve seçici geçirgen bir yapıya sahip hücre membranı üzerindeki proteinler; hücreler arası iletişim, sinyal iletimi ve madde taşınmasında görev alırlar. Bu proteinler arasında reseptörler, transpot proteinler (taşıyıcı proteinler), iyon kanalları ve adhezyon proteinleri yer alır ve bunlar ilaç keşfi çalışmalarında hedeflenebilecek potansiyel adaylar arasındadır. Dolayısıyla bu proteinlerin incelenmesi, hastalık ilişkisinin araştırılması yeni tanı ve tedavileri ortaya koymada büyük önem taşır. Yapılan proteomik tabanlı hücre membran proteini araştırmalarında bu proteinler düşük oranda raporlanmaktadır. Bunun temel iki nedeni; düşük

miktarda bulunmaları ve hidrofobik yapılarından kaynaklanmaktadır. Günümüzde çeşitli zenginleştirme yöntemleri (enrichment), solubilizasyon, sindirim ve fraksiyonlama stratejileri ortaya çıkmış ve bahsedilen zorluklar aşılmaya çalışılmıştır. Teknolojinin ilerlemesiyle farklı proteomik yöntemler ve yaklaşımlar ortaya çıkmış olsa da ne yazık ki hücre membran proteinleri hala az sayıda raporlanmaktadır (Vuckovic ve ark., 2013).

Protein zenginleştirme biyolojik bir numunedeki belli türdeki proteinlerin daha fazla analiz ve tanımlanması için yoğunlaştırılmasıdır. Böylece sonraki analizlerin iyileştirilmesine katkı sağlanır. Bilinen ve uygulanan bir çok zenginleştirme yöntemi vardır. Bunlardan en klasik zenginleştirme yöntemi; hücre total protein lizatının diferansiyel santrifüjlenmesi yöntemidir. Bir başka membran zenginleştirme yöntemi ise zayıf bağlanan proteinleri uzaklaştırmak için uygulama protokollerine eklenen soğuk 0.1 M Na_2CO_3 çözeltisi ile yıkama işlemi ve sonrasında santrifüj aşamalarını içerir. Böylece membran içerisine sıkışmış olan integral proteinlerin serbest kalması sağlanır. Bir diğer yöntem ise plazma membranının doğal anyonik yapısı kullanılarak katyonik kolloidal silika boncuklarının elektrostatik olarak membrana bağlanmasıdır. Poliakrilik asit gibi çapraz bağlayıcı bir anyonik bileşiğin eklenmesi ile silika kaplı boncukların sağlam hücre zarına bağlanmasını sağlar. Hücre lizisi sonrasında membran proteinleri ile diğer hücre bileşenlerinden ayrılır ve silikaya bağlı proteinler elüe edilir. Bir diğer yaklaşım da fosfolipid kaplı süpermanyetik nanopartiküllerdir. Basitçe hücreler, fosfolipid kaplı nanopartiküller ile inkübe edildikten sonra liz edilir ve santrifüjlenir, ardından manyetik alan kullanılan bir kolon aracılığıyla membran proteinleri elde edilir. Son olarak en yaygın yaygın kullanılan zenginleştirme yöntemlerinden biri de biyotininilasyondur (Vuckovic ve ark., 2013).

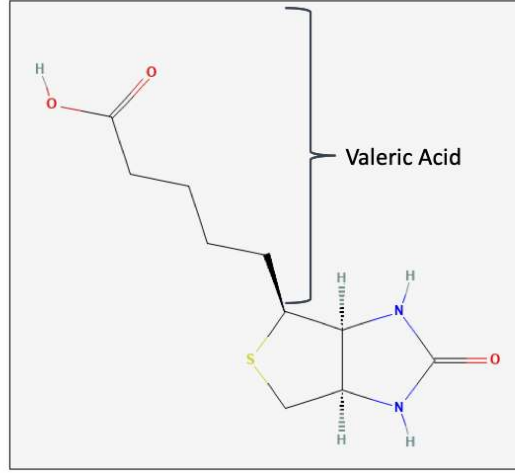
2.5.1.1. Biyotininilasyon

Biyotin, vitamin H veya B7 vitamini olarakta bilinen doğal bulunan bir vitamindir ve çeşitli biyolojik süreçlerde yer alır. Tüm yaşam formları için gerekli bir koenzimdir ve genellikle karboksilazlar için kovalent bağlanan bir koenzim olarak bilinir. Histonlardaki farklı lizin kalıntılarına bağlanarak kromatin yapısına etki eder ve böylece gen düzenlenmesinde rol oynar. Biyotinin hücre sinyalizasyonunda, genlerin epigenetik düzenlenmesinde de rol oynadığı da bildirilmiştir (Chapman-Smith ve Cronan, 1999a; Zemleni ve ark., 2009).

Küçük bir molekül olan biyotinin doğal olarak avidin, neutravidin, streptavidin gibi bileşiklere yüksek bağlanma afinitesi oluşturarak non-kovalent bağlanır. Oluşan bu bağ çok hızlıdır ve bir kez oluştuğunda pH, organik çözücüler veya deterjanlardan kolaylıkla etkilenmez. Bu aktivitesinden ötürü biyoteknoloji, biyokimya, hücre biyolojisi gibi alanlarda (protein saflaştırma, molekül etiketleme, immünohistokimya, immünoiblotlama, immünorespiyasyon, ELISA, görüntüleme vb.) yaygın olarak kullanılmaktadır (Chapman-Smith ve Cronan, 1999a).

Biyotin, birbirine tiyofen halkası ile bağlanan imidazol grubu ve valerik asit yan zincirlerinden oluşur. Biyotin molekülünün valerik yan asit zinciri avidin ile etkileşimde önemlidir.

Ancak bu zincirin terminal karboksilik grubu biyotini diğer moleküllere bağlamak için kullanılan çeşitli reaktif grupları içerecek şekilde modifiye edilebilir (Elia, 2008) (PubChem, 2025a) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Biotin yapısı (PubChem ID:171548).

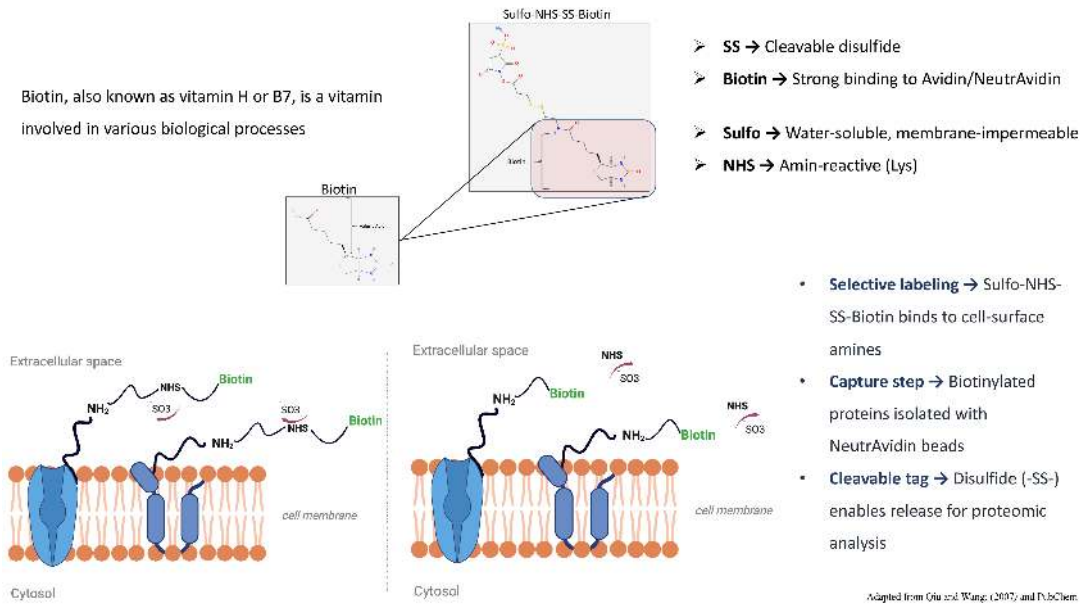
Biyotinilasyon (biyotin ile etiketleme), biyotin molekülünün hedef bir moleküle (ör; antikör peptit, protein) bağlanması işlemidir. Biotin küçük bir molekül olduğu için bağlandığı moleküllerin yapısını ve aktivitesini bozmadığı, toksik değildir. İki farklı biyotinilasyon yöntemi vardır: enzimatik biyotinilasyon ve kimyasal biyotinilasyon.

Enzimatik biyotinilasyon; biyotin protein ligaz enzimleri kullanılarak gerçekleştirildiğinden doğal bir post transkripsiyonel modifikasyondur. *E. coli* nin biyotin protein ligaz enzimi olan BirA (35k Da) enzimi $MgCl_2$ ve ATP varlığında hedef dizi (AviTag dizisi-15 amino asit) içerisindeki lizin amino asidine biyotin bağlar. Çoğu organizmada biyotinlenmiş en az beş biyotinlenmiş protein bulunur. Biotini bu proteinlere bağlayan reaksiyon oldukça spesifikdir. Deneysel olarak hedeflenen moleküllerin enzimatik biyotinilasyonu yüksek homojenite ve özgüllük sağlar. Kimyasal biyotinilasyon ile kıyaslandığında; toksisitesi daha düşüktür ve doğal bir süreç olduğu için moleküllerin yapısını ve fonksiyonunu neredeyse etkilemez (Sarıhan, 2023; Chapman-Smith ve Cronan, 1999a).

Enzimatik biyotinilasyona göre daha sıkça kullanılan kimyasal biyotinilasyon hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gerçekleştirilebilir. Kimyasal biyotinilasyon reaktiflerine örnek olarak polietilen glikol reaktifleri (NHS-(PEG4)-Biotin), NHS-Biotin, Sülfon-NHS-Biotin verilebilir. Kimyasal biyotinilasyonda kullanılan biyotinilasyon reaktifinin çözünürlüğü, hedef protein veya molekülleri etiketleme verimliliğini etkiler. Proteinler hem hidrofilik hem de hidrofobik yapılara sahiptir ve bu bölgeler biyotinilasyon reaktifinin çözünürlüğüne bağlı olarak etiketleme verimliliğini etkileyebilir. Bu nedenle uygun biyotinilasyon reaktifi çok önemlidir. Biyotinilasyonun amacı hedef proteini, onun fonksiyonuna ve yapısına etki etmeden etiketlemektir.

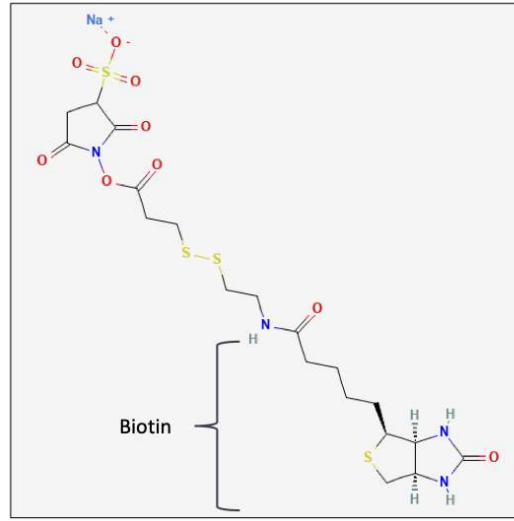
Biyotin küçük bir molekül olsa da, biyotinyasyon reaktifleri substratlara bağlanma gibi protein fonksiyonlarını düzenleyen amino asitlere konjuge olması durumunda protein fonksiyonunu bozabilir. Bu durumun önüne geçebilmek amacıyla spesifik amino asit fonksiyonel gruplarını (Aminler (-NH₂), sülfhidriller (-SH), karboksiller (-COOH), karboniller (-CHO)) hedefleyen birçok biyotinyasyon reaktifleri mevcuttur.

Aminler, lizin yan zinciri bol miktarda ε-aminleri ve N-terminal α-aminleri içerdiği için biyotinyasyonda sıkça hedeflenen fonksiyonel gruplar arasında yer alır. N-hidroksisüksinimid (NHS) esterleri aminler ile kolayca stabil bağlar oluşturur. Elektiriksel yük taşımadıkları için suda hemen çözünmezler. Bu yüzden önce organik bir çözücüde çözündükten sonra sulu çözeltilere eklenir. NHS hücre zarından kolaylıkla sızabilirler bu yüzden hücre içindeki proteinleri etiketlemek için kullanılabilirler. NHS esteri içeren biyotinyasyon reaktifleri kolaylıkla sentezlenebilmektedir. N-hidroksisüksinimid halkasının sülfonlanması sulu reaksiyonlarda organik çözücülere ihtiyaç duymadan çözünür hale getirilebilir. Bu formu sulfo-NHS olarak bilinir. Sulfo-NHS negatif yük taşır ve bu nedenle hücre zarından geçemez (Şekil.2.10). Bu özellik kullanılarak hücre yüzeyindeki proteinler etiketlenebilir. Genellikle biyotinyasyon reaktifleri yapısı birbirine benzer ve üç bileşenden oluşur: biyotin kısmı, değişken büyüklükte bir ara parça ve proteinler ile etkileşime girecek bir kısım (Sulfo-NHS, NHS gibi). Biyotin konjugasyonundan sonra, çözündürülmüş protein örnekleri, avidin etkileşimine tabi tutlur, bağlanmayan proteinler yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra, biyotinlenmiş proteinler elüe edilirler. Biyotin-avidin yüksek afinite ile birbirine bağlandığı için proteinlere zarar vermeden elüe etmek önem taşır. Bu amaçla bağlayıcı bölgede disülfid köprüsü eklenmesi veya benzer alternatif yaklaşımların kullanılmasıyla geliştirilen biyotinyasyon reaktifleri (Sulfo-NHS-SS-Biotin) mevcuttur (Şekil.2.11) (Vuckovic ve ark., 2013).



Şekil 2.10 Sulfo-NHS-SS-Biotin reaktifinin hücre yüzey biyotinyasyonu (Qiu ve Wang ark.,'dan (2007) modifiye edilmiştir.).

Membran proteinleri etiketlemede kullanılan bir biyotinyasyon reaktifi olan Sulfo-NHS-SS-Biotin (sulfosuccinimidyl-2[biotinoamido]ethyl-1,3-dithiopropionate) Şekil.2.11’da (PubChem, 2025b) gösterilmiştir. Reaktifteki NHS esterleri lizin yan zinciri bol miktarda ϵ -aminlere stabil halde bağlanır. Ancak NHS-esterleri her ne kadar N-terminal α -aminleri ile de tepkimeye girebilse de proteinlerdeki α -aminleri genellikle konjugasyon için erişilebilir değildir. Sulfo-NHS-SS-Biotin içindeki NHS esterleri deprotonize olmuş aminler ile bağlandığı için pH nötr ile hafif bazik koşullarında olması beklenir (Thermo Fisher Scientific, 2025) (Thermo Fisher Scientific kit no:A44390).



Şekil 2.11. Sulfo-NHS-SS-Biotin yapısı (PubChem ID:71571496).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Laboratuvar Ekipmanları

Kullanılan laboratuvar ekipmanları Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan ekipmanlar

Ekipman/Firma/Model Bilgileri
Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LS/MS) (Waters Synapt G2-Si)
Hipoksi Chamber (STEMCELL)
Soğutmalı santrifüj (Beckman(Allegra)),21R Centrifuge)
Vakum Santrifüj (Eppendorf AG Concentrator Plus)
-20 derin dondurucu (Bosh, GSD1140NE)
-80 derin dondurucu (Eppendorf (New Brunswick), U410 HEF)
+4 dolap (UĞUR, Elektrolux ZANUSSIA)
Mikroskop (OLYMPUS, CKX53)
Elektronik pipetör (Blue-Ray Biontech BlueSwan)
Su banyosu (Thermomac, WB15)
CO ₂ inkübatörü (Thermo Electron Corporation, RS 485)
Hücre kültürü kabini (TEZ SAN Laboratuvar tezgah,)
Cell counter (NanoEntek EVE)
Cerrahi aspiratör (Elmaslar (Life Time) SA0820020345)
NanoDrop 2000 (UV-Vis spektrofotometre) (Thermo Scientific)
Quantus Flourometer (Promega, TM396)
Termal cycler (Applied Biosystem, seri no:7500)
Termal cycler ((Applied Biosystem), 2720) TZ
Manyetik karıştırıcı (OSCILLATOR, TYZD-IIIA)
Heat Blok (VWR)
Rotator (DLAB MX-RL-Pro)
Mini spin (Weightlab Instruments/WN-CMV600)
Mini santrifüj (Operation manual) (ALLSHENG, Mini-6KC)
Western Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad Chemidoc™ XRS Imaging System
Western Blot Transfer Sistemi (Bio-Rad Mini PROTEAN® mini trans blot cell
Power Supply (Bio-Rad PowerPack™ Basic Power Supply)
Mikropipetler (Ependorf mikropipet 0.1-2.5 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)
pH metre (Mettler Toledo/Seven compact S210)
Ultra-pure su cihazı (Merck/Direct-Q 3 UV)
Buz makinesi (Automatic Ice Marker, IMS 50)
Vorteks (VELP scientifica, C17)

3.1.2. Kimyasallar, ticari kitler, primerler ve antikorlar

Kullanılan kimyasallar, kitler, antikorlar ve primerler Tablo 3.2’de listelenmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan kimyasallar, kitler, antikorlar ve primerler

Kimyasal/Firma Bilgileri/Cat No
Western ECL substrat (Bio-Rad) (1705061)
Isopropanol(2-propanol) (TEKKIM) (TK090250.0250)
Acetonitril (Merck) (100029)
DAPI (4', Diamidino-2-2Phenylindole) (Invitrogen) (P36962)
Nitroselluloz membran (Bio-Rad) (1620115)
Proteaz inhibitör kokteyl (Roche) (4693159001)
BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo) (23225)
Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce, Thermo) (A44390)
EasyPep MS Sample Prep Kit (Pierce, Thermo) (A40006)
Ethanol (Merck) (1009832511)
Gliserol (Winsent Multicell) (800-040 LL)
Methanol (Merck)(1060072500)
Bovine Serum Albumin (BSA) Capricorn (BSA-PF-1U)
Phosphate Buffered Saline (1X) (Gibco) (10010023)
Agaroz (Invitrogen) (16500-500)
Tris Base (Biomatik) (A4021)
Glysin (Wisent Bioproducts)(800-045 LG)
Tween-20 (Biomatik) (A4031-500 ML)
SDS (Sodium dodesyl sulphate) (AB-Sciex)(391168)
DMSO (Genaxxon) (M6323)
Amonyum bikarbonat (Sigma)(09830-500)
Formik Asit (Merck) (1002641000)
Protein Marker (Page Ruler PreStained Protein Ladder, Thermo)(26619)
SYBR-Green master mix (abm)(G891)
cDNA kit (Thermo) (K1622)
PMSF (GENAXXON)(M3194.0005)
Bromophenol Blue (Biomatik) (A22223-5G)
Milk Powder (Neofroxx) (1172)
Matrigel (Corning)(356234)
B27 (Thermo) (17504044)
N2 (Thermo) (17502048)
DMEM (Gibco) (41966029)
DMEM/F12 (Gibco) (11320074)
FBS (Gibco) (10500064)
Penisilin/streptomisin (Gibco) (15140122)
Rock İnhibitör (Tocris) (Y0503-1MG)
EGF (Thermo)(AF-100-15-100UG)
bFGF (Thermo)(13256029)
TrypLE express (Gibco)(12604013)
Tripsin/EDTA (Gibco) (25200056)

Tablo 3.2. Kullanılan kimyasallar, kitler, antikorlar ve primerler (devamı)

Antibody/Cat. No/Firma Bilgileri	
Vinculin antibody (13901S)	Cell Signalling Technology
GLUT1 antibody (21829-1-AP)	Proteintech
HIF1 α antibody (3716)	Cell Signalling Technology
HIF2 α antibody (66731-1-Ig)	Proteintech
GAPDH antibody (ab6759)	Abcam
β -Aktin antibody (AF7018)	Affinity Biosciences
Biotin antibody (7075)	Cell Signalling Technology
ALDH1a antibody (54135)	Cell Signalling Technology
CD44 antibody (5640)	Cell Signalling Technology
Anti-mouse IgG, HRP-linked	Cell Signalling Technology
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signalling Technology
Primerler	
18S_Fwd 5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'	
18S_Rev 5'-ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA-3'	
Glut1_Fwd 5'-GGACAGGCTCAAAGAGGTTAT-3'	
Glut1_Rev 5'-AGGAGGTGGGTGGAGTTAAT-3'	
GAPDH_Fwd 5'-ATGCCTCCTGCACCACCAACT-3'	
GAPDH_Rev 5'-ATGGCATGGACTGTGGTCATGAGT-3'	
NOTCH2NL_Fwd 5'-GGCAGACTGGTGACTTCACTT-3'	
NOTCH2NL_Rev 5'-TCGTGTTCTTTTCCATTCCAG-3'	
NOTCH2NLB_Fwd 5'-TCGAGATGGCTATGAACCCT-3'	
NOTCH2NLB_Rev 5'-TGAGATGTCGAGTACTGGCA-3'	
ENO1_Fwd 5'-CCTTAGAACCCACAGCCCAT-3'	
ENO1_Rev 5'-CATGCTTGGGTTCCTGTCCT-3'	
SOX2_Fwd 5'-GGAGAGTAAGAAACAGCATGGA-3'	
SOX2_Rev 5'-GTGGATGGGATTGGTGTCT-3'	
ALDH1A_Fwd 5'-GTCAAACCAGCAGAGCAAAC-3'	
ALDH1A_Rev 5'-GGCCATAACCAGGAACAATA-3'	
Nanog_Fwd 5'-ATTCAGGACAGCCCTGATTCTTC-3'	
Nanog_Rev 5'-TTTTTGCGACACTCTTCTCTGC-3'	
CD44_Fwd 5'-GCAGGTATGGGTTCATAGAAGG-3'	
CD44_Rev 5'-GGTGTGGATGTGAGGATGT-3'	
HIF1 α _Fwd 5'-TATGAGCCAGAAGAAGTTTATAGGC-3'	
HIF1 α _Rev 5'-CACCTCTTTTGGCAAGCATCCTG-3'	
CXCL5_Fwd 5'-TGGCGAACACTTGCAGATTAC-3'	
CXCL5_Rev 5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'	
TSPAN17_Fwd 5'-CACCAGCATTTCCAGGAACC-3'	
TSPAN17_Rev 5'-CGCCTCCAACCTACCACAAAC-3'	
TKT_Fwd 5'-CGCCAATACAAAGGGTATCTG-3'	
TKT_Rev 5'-TTTCTTTCTTCAGCAGTTCGG-3'	
Sdc1(CD138)_Fwd 5'-AGGACGAAGGCAGCTACTCCT-3'	
Sdc1(CD138)_Rev 5'-TTTGGTGGGCTTCTGGTAGG-3'	
ATXN3_Fwd 5'-TGACGGGTCCAGAATTAATATCAG-3'	
ATXN3_Rev 5'-TGCATCTGTTGGACCCTAATCA-3'	
PKM_Fwd 5'-CCCACTCGGGCTGAAGGCAGTG-3'	
PKM_Rev 5'-GCTGCCTCAGCCTCACGAGC-3'	
FCER1G_Fwd 5'-CTCTGCTATATCCTGGATGC-3'	
FCER1G_Rev 5'-CTAAAGCTACTGTGGTGGTT-3'	
PTMS_Fwd 5'-CACTCTGCCATTGTTCCAACC-3'	
PTMS_Rev 5'-CAGGGATCAGGCAGGATAGG-3'	

3.2. Metot

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

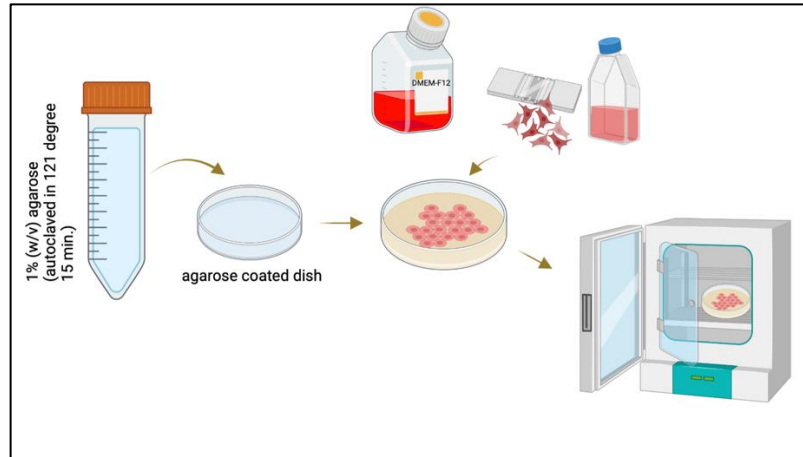
3.2.1.1. İki Boyutlu (2D) Hücre Kültürü Çalışmaları

A549 hücreleri ve Calu-1 KHDAK hücre hatları kullanıldı. Hücreler %10 FBS ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) ile desteklenen DMEM içerisinde büyütülüp, %5 CO₂ ve %21 O₂ içeren 37 °C inkübe edildi. Plate'yi kaplayan hücreleri gerektiğinde yıkamak için 1XPBS (Ca⁺ ve Mg⁺ içermeyen), kaldırmak için ise tripsin kullanıldı.

3.2.1.2. Üç Boyutlu (3D) Hücre Kültürü Çalışmaları (Sferoid Kültür)

3.2.1.2.1. Agaroz iskeleli 3D akciğer kanseri sferoidlerinin (tümöroid) oluşturulması

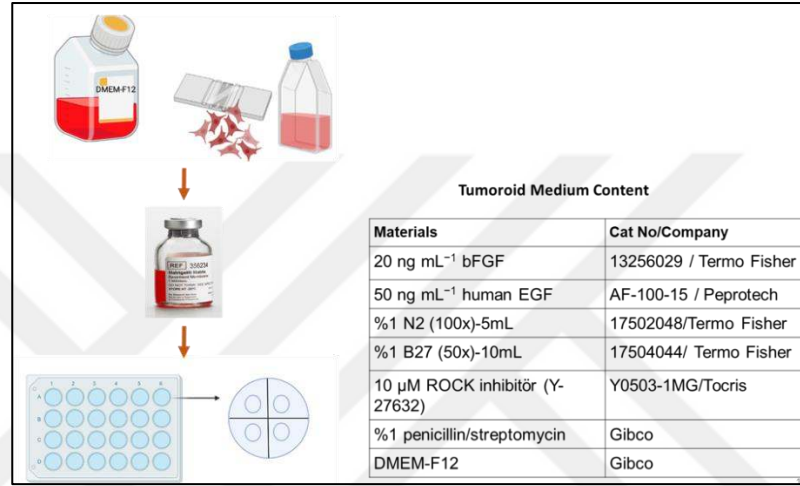
Sferoid oluşumu öncesinde 96 kuyucuklu plate, hücrelerin yüzey tutunmasını önlemek amacıyla %1 (w/v) agaroz ile kaplanmış ve oda sıcaklığında jelleşmesi beklendi. 2D'da kültüre edilen hücreleri thoma lamı yöntemi ve cell counter ile sayıldı ve önceden agaroz kaplı 96 ve 12 kuyucuklu plate'in her bir kuyucuğuna sırası ile 1x10⁴ ile 25x10⁵ hücre gelecek şekilde ekimi yapıldı. Hücreler %10 FBS ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) ile desteklenen DMEM/F12 içerisinde büyütülüp, %5 CO₂ ve %21 O₂ içeren 37 °C inkübe edildi. Sferoidlerin ortamı 2 güne bir yenilendi. (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Agaroz iskeleli tümöroid formosyon iş şeması.

3.2.1.2.2. Matrigel iskeleli 3D akciğer kanseri sferoidlerinin (tümöroid) oluşturulması (Kim ve ark.,'dan (2019) modifiye edilmiştir.)

2D hücreler serumsuz (FBS (Fetal Bovine Serum) olmayan) DMEM/F12 içerisine; 20 ng mL⁻¹ bFGF, 50 ng mL⁻¹, hEGF, N2, B27, 10 µM ROCK inhibitör, %1 penisillin/streptomisin (tümöroid ortamı) eklenerek hazırlandı. Akciğer kanseri tümöroidleri oluşturmak için her 50 µL süspansiyona 100 µL Matrigel ilave edildi. Elde edilen süspansiyonun önceden 10 dk boyunca 37°C'de ısıtılan 6, 12 ve 24 well doku kültürü platelerinde katılaşmasına izin verildi. Jelleşmeden sonra kuyucuklara 3 mL tümöroid ortamı eklendi ve ortam 4 güne bir değiştirildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Matrijel iskeleli tümöroid iş şeması.

NOT: Bundan sonra 3D her iki iskele kullanılarak oluşturulan akciğer kanseri sferoidlerinden ‘tümöroid’olarak bahsedilecektir.

3.2.2. Hipoksik koşulun oluşturulması

Hipoksik mikroçevre iki farklı yöntem kullanılarak oluşturuldu: Hipoksi inkübatörü (hipoksi chamber) ve CoCl₂.

3.2.2.1. Hipoksi İnkübatörü (Hipoksik chamber)

Oluşturulan tümöroid hipoksi chamber içerisinde alınarak gelişim süreçleri takip edildi. Normoksik koşullarda oluşturulup, oluşturulan her iki koşul için ayrı ayrı karakterizasyon analizleri yapıldı. Bu amaçla optimizasyon çalışmaları KKH ilişkili popülasyonun artışı sağlamak amacıyla literatürle bağlantılı olarak hipoksik chamber için 72 saat olarak belirlendi. Tümöroidler geliştirildikten sonra 72 saat %94 azot %1 oksijen ve %5 karbondioksit içeren bir hipoksik chamberda 37°C'de inkübe edildi.

3.2.2.2. CoCl₂ yöntemi

Araştırmada uygun dozu belirlemek amacıyla A549 tümöroidleri model olarak kullanıldı. Farklı CoCl₂ dozlarında (0, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM) tümöroidler inkübe edildi ve 4 saat sonra mRNA izolasyonu yapıldı. Protein izolasyonu ise 0, 8, 24 ve 48. saatlerde yapıldı. Tümöroidlerde kullanılacak en uygun doz bu deney sonuçlarına bağlı olarak belirlendi.

3.2.3. Koloni Oluşum Testleri

3.2.3.1. Koloni Formasyon

Koloni formasyon analizi için A549 hücreleri 6 kuyucuklu plate içerisine her bir kuyuya 350 hücre düşecek şekilde ekildi. Hücreler yapıştıktan sonra hücreler hipoksiye alındı, (200 µM CoCl₂ hipoksik koşul için kullanıldı.) süre sonunda (48h) hücrelerin ortamı değiştirilerek yerine CoCl₂ içermeyen normal büyüme ortamı verildi. Koloni oluşumu için plate yaklaşık 15-21 gün boyunca %5 CO₂ içeren ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Koloniler metilen mavisi çözeltilisi (%50 metanol, 0,4 g metilen mavisi; %50 ddH₂O) ile boyandı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra ve kuyucuklar dikkatli bir şekilde distile su ile koloniler görünür olana kadar yıkamaları yapıldı. Son olarak koloniler fotoğraflanıp ve ImageJ yazılımında analiz edildi. Bar grafikleri ve istatistiksel analiz için GraphPad Prism kullanıldı.

3.2.3.2. Soft-Agar Koloni Formasyonu

A549 ve Calu-1'nin hipoksik ve normoksik koşullarda geliştirilen koloni oluşturma yeteneklerini kıyaslamak amacıyla soft agar koloni formasyon analizi yapıldı. Deney protokolü Borowicz ve ark., (2014)'nin protokolünden modifiye edildi. En alt tabakayı oluşturmak için, 24 kuyucuklu plate %0.5 agar ile kapladı. Donması için yaklaşık 30 dk beklendikten sonra, üst tabakayı oluşturmak için %0.35 agar ile süspanse edilen olan hücrelerin (A549 için 1000 hücre; Calu-1 için 1500 hücre) olduğu bir karışım hazırlandı. Agar-hücre süspansiyonu ile oluşturulan üst tabakanın jelleşmesi için yaklaşık 30 dk oda sıcaklığında beklendikten sonra, plate kurumasını engellemek amacıyla üst tabakanın üzerine hücre ortamı eklendi (Tüm katmanlar eşit hacimdedir ve ortam katmanlar ile aynı miktarda eklenmiştir.). Akabinde hipoksi ve normoksik koşullar oluşturuldu (200 µM CoCl₂ hipoksik koşul için kullanıldı.). 48. saat sonra hipoksik ortam çekilerek, yerine CoCl₂ içermeyen ortam verildi. Koloni oluşumu için plate yaklaşık 15-21 gün boyunca %5 CO₂ içeren ve 37°C'de inkübatörde koloni oluşumu takip edildi. Koloniler metilen mavisi çözeltilisi (%50 metanol, 0,4 g metilen mavisi; %50 ddH₂O) ile boyandı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra ve kuyucuklar dikkatli bir şekilde distile su ile koloniler görünür olana kadar yıkamalara devam edildi. Son olarak koloniler fotoğraflanıp ve ImageJ yazılımında analiz edildi. Bar grafikleri ve istatistiksel analiz için GraphPad Prism kullanıldı.

3.2.4. İmmünohistokimya Deneyleri (IHC)

Toplanan tümöröidler %10 formalin ile fikse edilip, parafine gömüldü. Parafine gömülü dokulardan 4-5 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Alınan kesitler 60 derecelik etüvde 1 saat bekletildi. Ardından 15 dk ksilol ile muamele edilip deparafinize edilmiş, dehidrasyonları için derecesi azalan alkol serilerinden geçirildi. Dokular HIF2a, ALDH1A, CD44 ve GLUT1 antikorlar ile boyandı. Hazırlanan kesitler iki patalog tarafından incelendi ve boyama şiddetine göre “0, +1, +2 ve 3” skora ile değerlendirildi (Yanar, 2024).

3.2.5. İmmünoblotlama (İB)

3.2.5.1. Total Protein İzolasyonu:

Kültüre edilmiş tümöröidler toplanarak ve RIPA solüsyonu eklendi. RIPA solüsyonuna işlemiden önce proteaz ve fosfataz inhibitörler kokteyl ilave edildi. RIPA solüsyonu ile muamele edilen tümöröidlerin bulunduğu tüpler 20 dakika buz üzerinde bekletilip 30 dakika +4 derecede çalkalandıktan sonra 20 dakika +4 derecede 13000 rpm’de santrifüj edilerek pelletten ayrıldı ve lizattaki total protein miktarı BCA ile belirlendi.

3.2.5.2. BCA Yöntemi ile Total Protein Tayini:

Total protein tayini için BCA solüsyon kiti (Pierce, katalog no: 23225) kullanıldı. BSA (bovine serum albümin) ile 2000 µg, 1000 µg, 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62.5 µg, 31.25 µg ve 0 µg standartlar hazırlandı. Ependorf içindeki proteinlerden 5’er µL alınarak 1:5 oranında distile su ile dilüe edildikten sonra hem standartlar hem de proteinler, 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 10’ar µL ve ikişerli olarak kuyucuklara aktarıldı. Üzerlerine 200 µL BCA çalışma solüsyonu eklenip kaplar plate çalkalayıcısında çalkalandıktan sonra 30 dakika 37 derecede inkübe edildi ve plate okuyucuda 562 nm dalga boyunda okutuldu. Elde edilen ve total protein miktarı belirlenen örnekler jelde yürütölmek üzere Lamelli solüsyonu ile 95 °C’de 10 dakika kaynatılarak jelle yüklemeye hazır hale getirildi.

İn-vitro oluşturulan hipoksik koşullarda büyüöülen tümöröidler ile normoksik koşullarda büyüöülen tümöröidlerin, hipoksik yolak ve KKH ilişkisini ortaya koymak, KKH gelişim mekanizmalarını araştırmak vb. amacıyla β -aktin, Vinculin, HIF1- α , GLUT1 ile kök hücre belirteçlerinden CD44, ALDH1A proteinlerin ifadeleri Western-blot yöntemiyle kullanılarak gösterildi. Ayrıca biyotininleme aşamasının optimizasyonu için ‘Biotin’ antikorı kullanıldı. Bu amaçla; tümöröiden total protein elde edildi ve protein miktarı BCA yöntemi ile belirlendikten sonra incelenecek proteinler %10’lik SDS (sodyumdodesilsülfat) jelde yürütöldü. Jeldeki proteinler nitrosellöloz membrana elektroforetik yöntemle transfer edildi (16 V, değışken amper, 16 saat, soğuk oda). Transfer sonrası membran Ponceau S ile boyanıp transferin olup olmadığı kontrol edildi. Transfer sonrasında boya membrandan TBST ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Ardından

membran, kullanılacak antikorun özelliğine göre TBST (Tris-buffered saline- Tween-20) içinde hazırlanmış %5 yağsız süt tozu veya %0.5 BSA (bovine serum albümin) ile 1 saat bloklandı. Sonrasında primer (overnight, dönen bir platformda, soğuk oda) ve sekonder antikorlar (1-2 saat) ile inkübe edilerek elde edilen bantlar görüntülendi.

3.2.5.3. Hücre Membran Proteinleri İzolasyonu

Sulfo-NHS-SS-Biotin reaktifi yalnızca membran proteinlerine bağlanan bir biotindir. İzolasyon Thermo Scientific Pierce™ Hücre Yüzeyi Protein Biotinilasyon ve İzolasyon Kiti (A44390) ile gerçekleştirildi. Ancak hücre içine biotin reaktifinin sızmasının önüne geçebilmek amacıyla hücreler, kit protokolünden farklı olarak Sulfo-NHS-SS-Biotin reaktifi ile soğuk odada buz üzerinde yaklaşık 1 saat arasında inkübe edildi. Biotinlenmiş proteinler soğuk odada neutravidin boncukları ile inkübe edildikten sonra kitte tarif edilen protokol adımlarıyla devam edildi. Protein konsantrasyonları BCA yöntemi ile hesaplandı. İzolasyon kiti tarafından önerilen EasyPep™ Mini MS Örnek Hazırlama Kiti (Ürün No. A40006) protokolüne göre proteinler kütle spektrometrisi için hazırlandı.

LC-MS/MS analizi için solvent solüsyonu (%95 ddH₂O; %1 FA; %5 ACN) hazırlandı ve her numuneye bu çözeltiden 50-30 µL'si eklendi. Ardından 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant, mass viallerine aktarılmış ve analiz için cihaza verildi.

3.2.6. LC-MS/MS ve Veri Analizi

İzolasyonu yapılan hücre membran proteinleri EasyPep™ MS Sample Kit (Kat no:A40006) protokolüne göre kütle spektrometre analizi için hazırlandı. Ayrıca 3D-A549 tümöroidlerinden elde edilen toplam proteinler (72. saat normoksik ve 72. saat hipoksik koşulda; biyotinlenmemiş) SDS-PAGE jele yüklenip, ardından protein bantları kesilerek enzimatik sindirime (peptidlere ayırma) tabi tutularak ve kütle spektrometresi için hazırlandı.

3.2.6.1. Jelden Kesilen Bantlarının Enzimatik Sindirimi

3D-A549 tümöroidlerinden elde edilen biyotinlenmemiş toplam proteinler (72. saat normoksik ve 72. saat hipoksik koşulda) %10'luk SDS-PAGE jeline yüklenerek ayrıldı. Ardından protein bantları kesilerek küçük parçalara bölünmüş ve 1,5 mL eppendorflara yerleştirildi. 1:1 oranında 100 mM AMBIC (Amonyum bikarbonat pH: 8,0): ACN (Asetonitril) ile üç kez 3'er dakika jeller yıkandı. Sonrasında, jeller her biri 3'er dakika olmak üzere üç kez yalnızca ACN ile yıkandı. Yıkama sonrasında, 20 mM DTT (DTT AMBIC'te hazırlanır) ile oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda, 50 mM IAA (IAA AMBIC'te hazırlanır) ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 45 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. 50:50 AMBIC + ACN (3 dakika) ile bir kez ve ACN (3 dakika) ile iki kez yıkandıktan sonra, yaklaşık 10 dakika vakumlu santrifüj ile kurutma yapıldı. Örnekler oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra, 1 µg tripsin eklendi ve

aüzerini örtecek kadar AMBIC eklendi. Örnekler 37°C'de bir gece inkübe edildi ve süre sonunda tripsin sindirimi reaksiyonunu durdurmak için %0,1 µL Formik Asit (FA) eklendi. Süpernatant toplandıktan sonra jeller ACN: AMBIC ile yıkandı, en son yalnızca ACN ile yıkaması yapıldı. Toplanan süpernatantlar yani örnekler vakumlu santrifüjde kurutuldu. Peptit haritalama analizi için resüspansiyon solüsyonu (%95 ddH₂O; %0,1 FA; %5 ACN) hazırlandı ve her örneğe bu solüsyondan 50-30 µL eklendi. 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant, mass viallerine aktarıldı ve analiz için cihaza verildi.

3.2.6.2. Kütle Spektrometrisi Analizi (LC-MS/MS)

Enzimatik kesim sonucu oluşan peptitler, Waters Synapt G2-Si HDMS (Waters) ile Acquity UPLC kullanılarak kütle spektrometrisi ile analiz edildi. Kromatografik yöntemde üç mobil faz kullanıldı: su (A), asetonitril (ACN, B) ve %1 (v/v) formik asitli su (C). Numuneler BEH C18 ters faz analitik kolona enjekte edildi ve ayırım, 10 dakika boyunca faz B'nin %1'den %40'a artışıyla sağlandı. Ardından 1 dakika içinde faz B, %80'e çıkarıldı ve 3.5 dakika boyunca %80 B'de izokratik koşullarda tutuldu. Kolon sıcaklığı 65 °C'de çalışıldı. Tüm numuneler pozitif elektrosprey iyonizasyon ve çözünürlük modunda analiz edildi. Kütle spektrometresinin kalibrasyonu için Glu-fibrinojen peptidi kullanılarak 50 ila 2000 m/z arasında kalibre edildi. Ayrıca 30^{s-1} frekansında referans püskürtmede dahili standart olarak kullanıldı. Düşük enerji modunda, çarpışma enerjisi 4 V olarak ayarlandı, ayrıca yüksek çarpışma enerjisi 25 V - 40 V arasında arttırıldı. Kaynak sıcaklığı 120 °C'ye, kapiler voltaj ise 3 kV olarak ayarlandı.

3.2.6.3. Ham Verilerin Analizi

Kütle spektrometrisi analiz ham veri dosyaları PLGS (ProteinLynx Global Server) yazılımı kullanılarak işlendi ve arama veritabanı olarak UNIPROT Homo sapiens taksonomisi seçildi. Karbamidometil (C) sabit modifikasyon olarak tanımlanırken Oksidasyon (M), Asetilasyon (N-term), Deamidasyon (N, Q) ve Fosforilasyon (S, T, Y) değişken modifikasyonlar olarak dahil edildi. Kesim enzimi olarak tripsin ve lys-C ile kullanıldı. FDR (False discovery rate/Yanlış keşif oranı) ≤ 5 % ve kaçırılmış kesim (missed cleavage) ≤ 2 olarak ayarlandı. Proteinler, proteine özgün peptitlere dayalı etiketsiz göreceli (relative) kantifikasyon kullanılarak tayin edildi. PLGS skorları 200'den büyük ve %25'ten büyük dizi kapsamı (coverage), tanımlanan proteinlerde, protein kimliğine daha fazla güven olduğunu göstermektedir.

3.2.6.4. Protein sınıflandırması ve organizasyonu

Proteinler, Gen Ontolojisi (GO) zenginleştirme ve DAVID fonksiyonel açıklama aracı kullanılarak değerlendirildi.. Elde edilen sonuçlar proteinlerin lokalizasyonları, hücresel bileşenleri (Cellular Component=CC), biyolojik süreç (Biological Process=BP), moleküler işlevleri

(Molecular Function=MF) ve ilgili metabolik/yolak ağları (KEGG Pathway) temelinde sınıflandırıldı. Grafikler için SRplot online yazılımı kullanılmıştır.

3.2.7. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (qPCR)

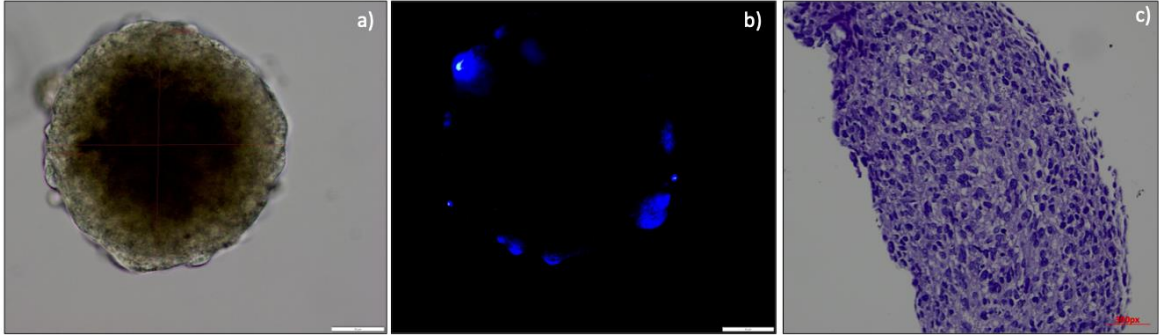
Tanımlanan proteinlerin gen düzeyinde kontrolünü sağlamak amacıyla qPCR yapıldı. Primerler tasarımı *Primer.3* programı kullanılarak yapıldı. Tümöröidlerden elde edilen tek zincirli RNA'ların gerçek zamanlı PCR işleminde kullanılabilmesi için öncelikle RNA örneklerinin konsantrasyonları Promega QuanFluor ® RNA Sample Kit (E3311) ve Quantus Fluometer (Promega, TM396) cihazı kullanılarak ölçüldü. RNA konsantrasyonlarına göre RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, K1622) protokolünün adımları izlenerek cDNA sentezlendi. Kantitatif PCR için, SYBR-Green karışımı kullanıldı. Reaksiyonlar 96 kuyucuklu bir plakada (Roche LightCycler480) en az ikili tekrar ile kuruldu. PCR sonucunda her kuyucuk için elde edilen Ct (cycle treshold) değeri ile koşullar arasındaki fark, 18S ve GAPDH iç kontrolleriyle normalize edildikten sonra $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ formülü kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Sağlıklı Bronş Epitel Hücre Hattı ile (Beas2B) 3D Ön Kültür Denemesi

Araştırmanın başlangıç aşamasında sağlıklı bronş epitel hücre hattı olan Beas2B hücreleri ile agaroz kaplı platelerde 3D kültür formasyonu açısından test edilmiştir. Agaroz kaplı 96 kuyucuklu platelere ekilen Beas2B (1×10^4 hücre/kuyu) hücreleri beşinci günde inverted mikroskopta görüntülenmiş (Şekil 4.1 a), ve DAPI ile nükleer boyaması yapılmıştır (Şekil 4.1 a). 3D-Beas2B'nin beşinci günde ortalama çapları 236,175 μm olarak kaydedildi. Ayrıca kesit alınarak hematoksilin-eozin (HXE) boyaması yapıldı (Şekil 4.1 a). 3D-Beas2B sferoidlerinin histolojik yapısının yoğun ve kompakt olduğu görünmektedir.

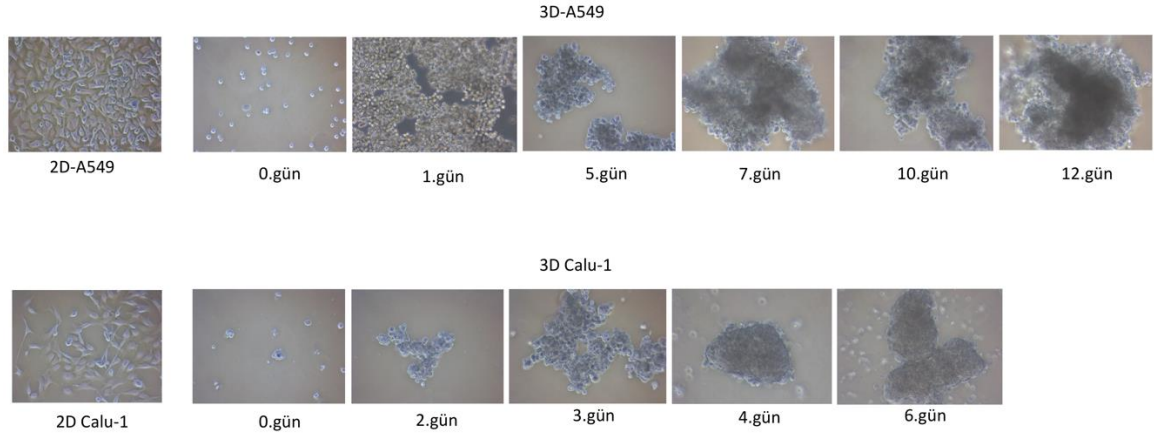


Şekil 4.1 Sağlıklı bronş epitel hücre hattı ile (Beas2B) ile ön kültür denemesi.

4.1.2. Akciğer Kanseri Hücre Hatları A549 ve Calu-1 Hücrelerinden Tümöroidlerinin Oluşturulması

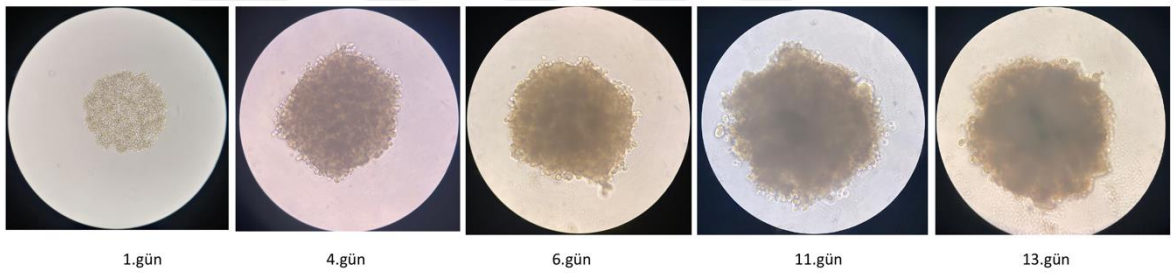
4.1.2.1. Agaroz İskele

Agaroz kaplı platelerde büyütülen iki boyutlu (2D) ticari hücre hatları olan A549 ve Calu-1 hücreleri inverted mikroskopla takip edildi ve görüntüleri kaydedildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. A549 ve Calu-1 hücrelerinin agaroz iskele üzerinde tümöroid formasyonu.

3D kültür dönüşümünde kullanılan iskele tümöroid formasyonunda etkilidir. Şekil.4.3’de agaroz iskele kullanılarak A549 hücrelerinin 3D formasyonu uyarılmıştır ((1×10^4 hücre/kuyu) (10X).).

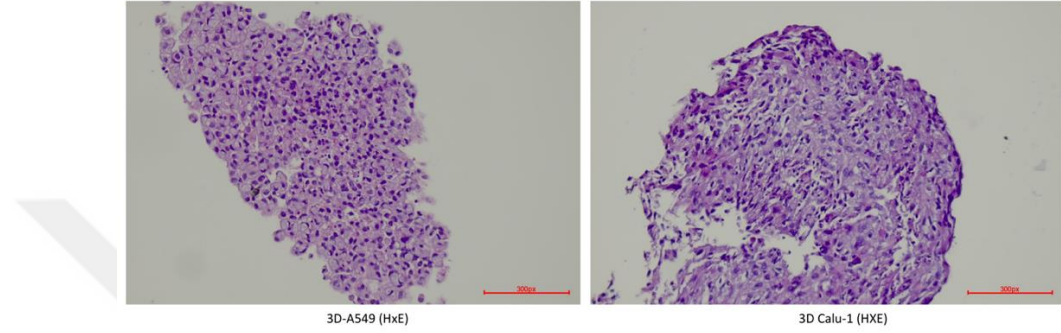


Şekil 4.3. A549 hücrelerinin agaroz iskele üzerinde tümöroid formasyonu.

Sferoidler, serbest yüzen agregatlar olarak kültürlen; tümör dokuları, embriyonik cisimler, hepatositler, nöronal dokular ve meme benzeri gibi çok çeşitli hücrelerin basit kümeleri olarak tanımlanan 3D hücre kültürü sistemleridir (Lee ve ark., 2023). Hücre tipi, kültür tekniği, ortam bileşimi ve hacmi, hücre konsantrasyonu/sayısı vb etkenler bu 3D formasyonuna etki etmektedir. Sferoidlerin morfolojisi kompakt yapıların göre üçe ayrılır: a) kompakt kürecikler (compact spheroids); hücreler burada birbirlerine çok sıkı bağlıdır ve hücreleri tek tek ayırt etmek zordur; b) sıkı kümeler (tight aggregates) ve c) gevşek kümeler (loose aggregates); bunlar ise tam bir kürecik oluşturmazlar, hücrelere tek tek sayılabilir ve kolayca dağılabilirler (Han, ve ark., 2021). Sferoid kültürde hücrelerin ilk kümelenmesi integrin aracılı bağlanma ile başlatılırken, kompaktlaşma ile birlikte E-kaderin seviyesinin arttığı görülmüştür. Kompakt sferoid oluşturan hücrelerde E-kadherin seviyesinin yüksek ekspresyonu göze çarparken, sıkı kümeleşme (tight aggregates) özelliği gösteren sferoidlerde ise N-kadherinin hızlandırılmış ekspresyonu gösterilmiştir (Han, ve ark., 2021). Şekil.4.3’te A549 hücrelerinin 1. gün tümöroid oluşumları

onların daha düşük bağlantılı bir formasyon (sıkı kümeler/tight aggregates) yöneliminde olduğu görterse de, kültür ilerledikçe kompaktlaşmanın arttığı görülmüştür. Calu-1 hücrelerinin 3D formasyonunda birinci kültür gününde A549 hücrelerine kıyasla daha kompakt bir 3D oluşumu gösterdiği gözlenmiştir (Şekil.4.2).

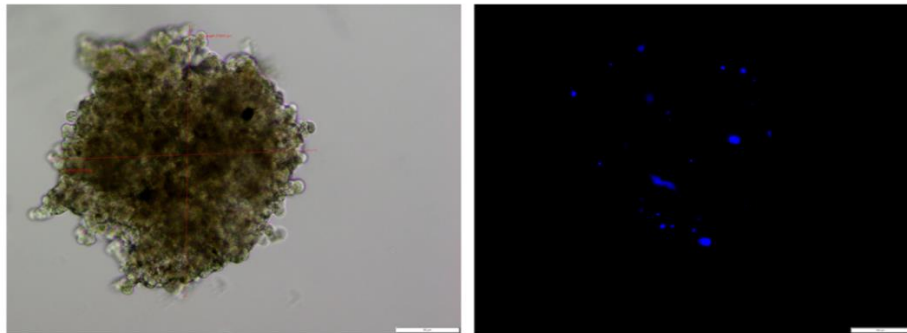
Agaroz iskeleli tümöroid oluşturmak üzere 96 ve 12 kuyucuklu plateler kullanılmıştır. Tümöroidler %10 formalin ile fikse edilmiş ve paraffine gömülerek kesitleri alınmıştır. Alınan kesitlerin HXE boyamaları yapılmıştır (Şekil 4.4)



Şekil 4.4. 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinin hematoksilin-eozin (HxE) boyamaları.

Şekil 4.4’de 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinin histolojik kesitlerine ait HxE boyamaları verilmiştir. Bu çalışmada, benzer koşullarda parafine gömülerek kesitleri alınan A549 ve Calu-1 hücre hatlarına ait doku örnekleri HXE ile boyanarak histolojik olarak karşılaştırılmıştır. Her iki hücre hattı da oldukça küçük doku kitlesi oluşturmasına rağmen, A549 hücrelerine ait kesitlerde dokunun mikroskopik düzeyde daha dağınık bir görünüm sergilediği, hücre sınırlarının daha belirsiz olduğu ve doku bütünlüğünün kısmen zayıf olduğu dikkat çekmiştir. Buna karşılık Calu-1 hücrelerinden elde edilen kesitlerde, daha kompakt, düzenli ve solid yapıların izlendiği; hücre sınırlarının daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir.

Şekil 4.5’te 5. günün sonunda 3D-A549’un ortalama çapı 217,255 µm (ölçüm çubuğunun ortalaması) olarak bulunmuştur. DAPI boyaması sonrası çekirdek ışıması (mavi) gözlenmiştir. (96 kuyucuklu plate kullanılmıştır (1x10⁴ hücre/kuyu).

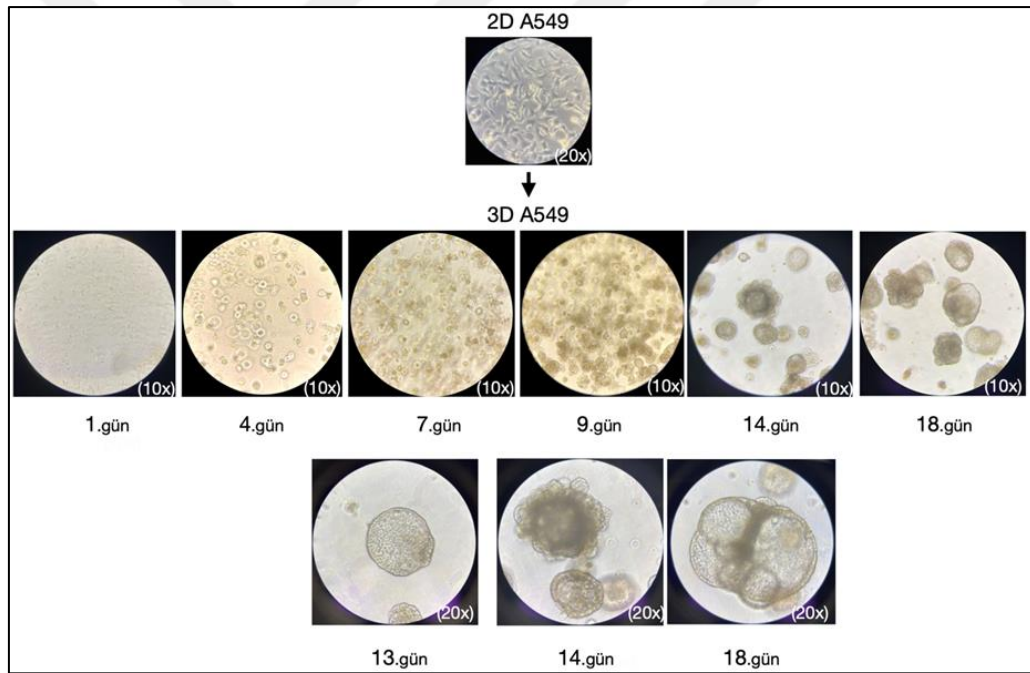


Şekil 4.5. 3D-A549 tümöroidlerinin inverted mikroskop görüntüsü ve DAPI boyaması.

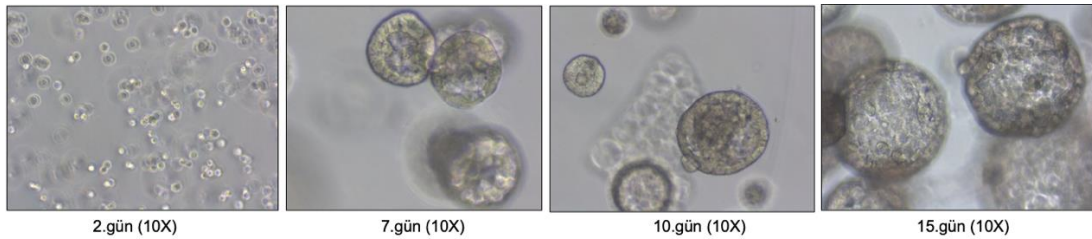
4.1.2.2. Matrigel

Matrigel; laminin, kollajen IV, heparin sülfat proteoglikanları, entaktin/ nidojen ve bir dizi büyüme faktörü içeren ECM benzeri molleküler içeren bir hidrojel olup, Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) fare sarkomundan elde edilen bazal membran preparatıdır. Bu araştırmada kullanılan başka bir iskelede (scaffold) matrigeldir. FBS'siz (Fetal Bovine Serum) içermeyen büyüme ortamında geliştirilen 3D akciğer tümöroidlerinin hücre farklılaşmasının sağlanması amacıyla DMEM/F12 içerisine destekleyici faktörler eklenmiştir. 2D hücrelerin ECM benzeri ortamda ve hücre farklılaşmasını destekleyici büyüme ortamı içerisinde 3D akciğer tümöroidleri oluşturulmuş ve inverted mikroskopi ile inverted mikroskopi ile gelişimi gözlenmiştir.

Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de matrigel iskeleli 3D-A549 tümöroidlerin formasyonu gösterilmiştir. Burada A549 akciğer tümöroidlerinin gelişimi zamana bağlı olarak takip edilmiştir. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de görüldüğü üzere kültürün ilk günlerinde kürecik oluşumu düzensizken, 7. gün itibariyle oluşan küreciklerde hücreleri seçemeyecek kadar kompakt bir yapıya dönüşmüştür.

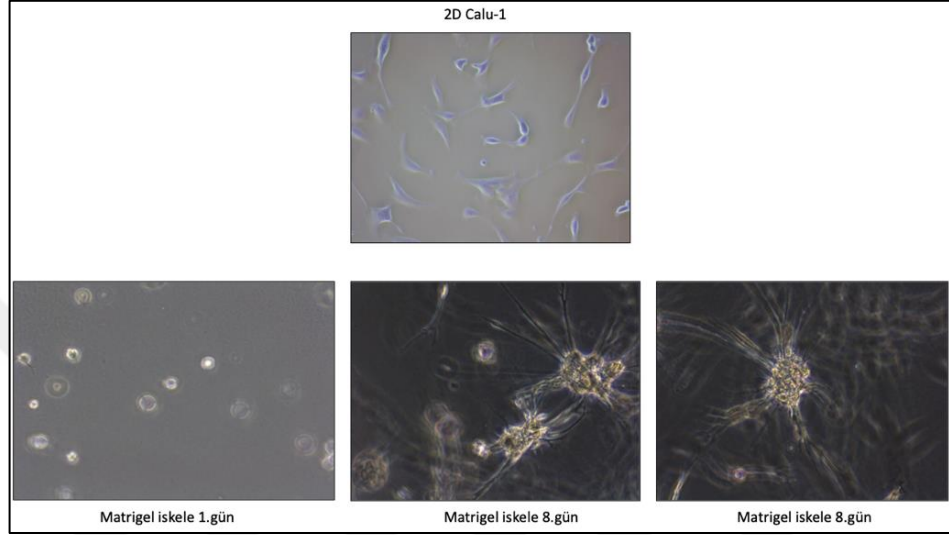


Şekil 4.6. Matrigel destekli 3D-A549 tümöroidlerinin formasyonu-1.



Şekil 4.7. Matrigel destekli 3D-A549 tümöroidlerinin formasyonu-2.

Matrigel içerisine gömülen Calu-1 hücrelerinin 1 ve 8. günlere ait morfolojik değişimlerinin mikroskop görüntüleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Burada Calu-1 hücrelerinin tümöroid oluşturmak üzere, kürecik oluşumunun varlığı görülse de eş zamanlı olarak 2D kültür morfolojisi eğilimi de gösterdikleri görülmektedir. Sonuç olarak matrigel destekli iskelede Calu-1 tümöroid formasyonu başarılı olamamıştır. Bu nedenle deneylere Calu-1 hücre hattının sadece agaroz destekli tümöroidleri ile devam edilmiştir.



Şekil 4.8. Matrigel destekli Calu-1 hücrelerinin formasyonu.

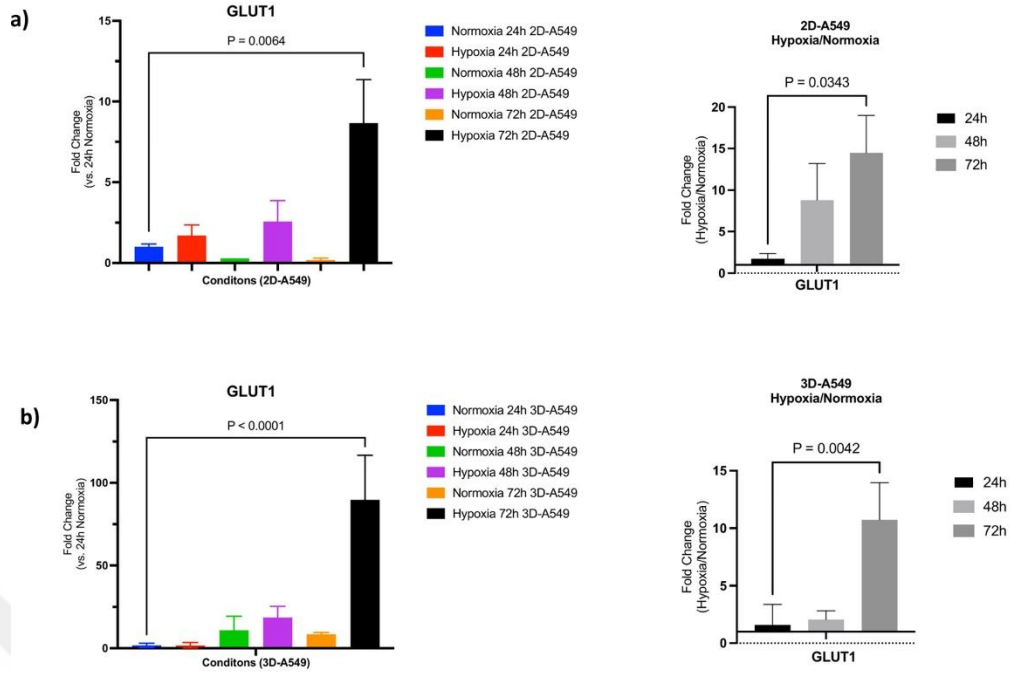
4.1.3. Hipoksik Mikroçevrenin Oluşturulması

3D tümöroidlerde hipoksik mikroçevre; hipoksik chamber ve CoCl_2 kullanılarak iki farklı yöntemle oluşturulmuştur. Bu amaçla yapılan hipoksik optimizasyon deneylerinde model olarak 3D-A549 kullanılmıştır.

4.1.3.1. Hipoksik Chamber Optimizasyonu

4.1.3.1.1. Hipoksik Chamber Modeline Bağlı Hipoksik 2D-A549 ve 3D-A549’de GLUT1 mRNA Düzeyine Etkisi

Tümöroidler geliştirildikten sonra 24, 48 ve 72 saat %94 azot, %1 oksijen ve %5 karbondioksit içeren hipoksik chamberda 37°C ’de inkübe edilmiştir. İlk olarak GLUT1 ifadesi 2D-A549 ve 3D-A549’da mRNA düzeyinde değerlendirilmiştir (Şekil 4.9). Şekil 4.9’da hipoksik chamber kullanılarak 2D-A549 ve 3D-A549’ın hipoksik belirteç olan GLUT1 ifadesindeki kat değişimi verilmiştir. Hem 2D-A549 hücrelerinde hem de 3D-A549 tümöroidlerinde GLUT1 ifadesindeki kat değişiminin 72h hipoksik koşulda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.9).

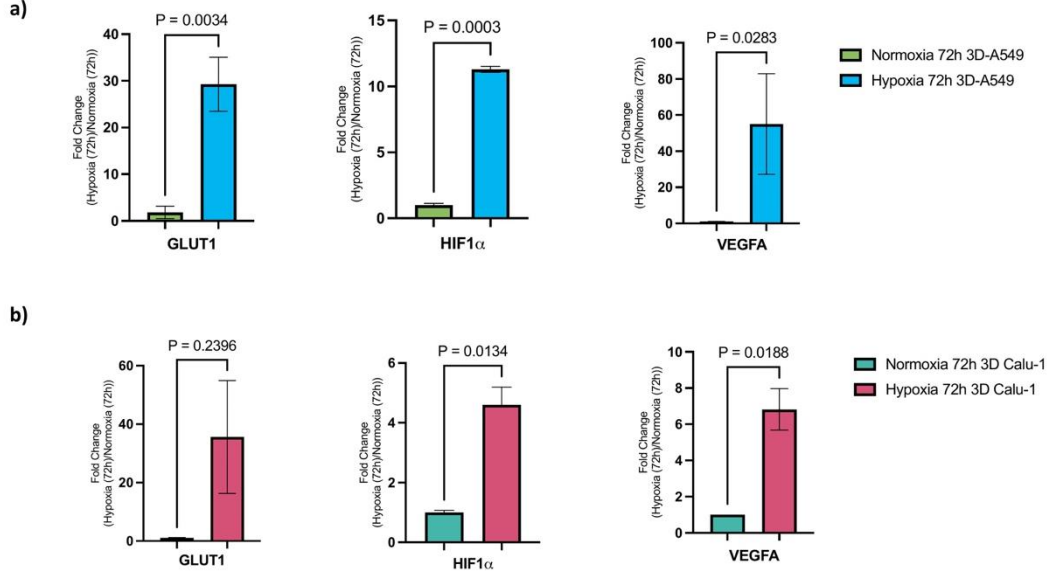


Şekil 4.9. Hipoksik chamber koşullarında 2D-A549 ve 3D-A549’de GLUT1 ifadesinin mRNA ifadesi

2D-A549 hücrelerinde Şekil 4.9 (a)’da GLUT1 ifadesindeki mRNA kat değişimi 24, 48 ve 72h normoksi ve hipoksi koşullarında değerlendirilmiştir. Soldaki grafik 24. saatteki normoksik koşula göre normalize edilmiştir. Sağdaki grafikte ise her bir zaman, kendi kontrol zamanına göre normalize edilmiştir. 3D-A549 hücrelerinde Şekil 4.9 (b)’de GLUT1 ifadesindeki mRNA düzeyinde kat değişimi 24, 48 ve 72h normoksi ve hipoksi koşullarında değerlendirilmiştir. Soldaki grafik 24. saatteki normoksik koşula göre normalize edilmiştir. Sağdaki grafikte ise her bir zaman, kendi kontrol zamanına göre normalize edilmiştir. İnternal kontrol olarak 18S kullanılmıştır. İstatistiksel analiz olarak one-way ANOVA uygulanmıştır; anlamlılık düzeyleri grafik üzerlerinde gösterilmiştir.

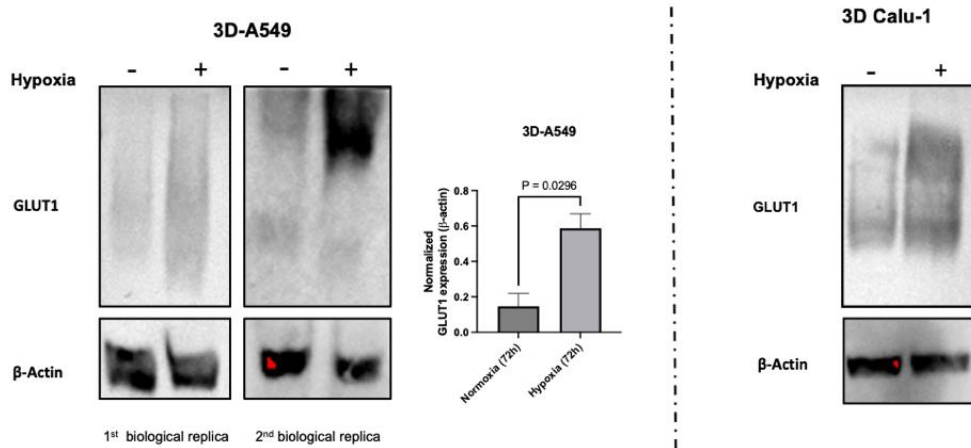
4.1.3.1.2. Hipoksik Chamber Modelinde 3D-A549 ve 3D Calu-1 Tümöroidlerinde Hipoksik Yanıtın İncelenmesi

Hipoksik chamber ile oluşturulan 72 saatlik mikroçevrede 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde hipoksik belirtçelerin (GLUT1, HIF1 α , VEGFA) mRNA düzeyindeki kat değişimi araştırılmıştır (Şekil 4.10). Hem 3D-A549 hem de 3D Calu-1 tümöroidlerinde HIF1 α , VEGFA ifadesindeki kat değişiminin 72h hipoksik koşulda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.10). GLUT1 ifadesinde ise 3D-A549 ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmesine rağmen, 3D Calu-1 tümöroidlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (P=ns (0.2396)). qPCR sonuçlarına göre her iki tümöroid modelinde hipoksik koşul başarı ile oluşturulmuştur. İnternal kontrol olarak 18S kullanılmıştır. İstatistiksel analiz olarak one-way ANOVA uygulanmıştır; anlamlılık düzeyleri grafik üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Hipoksik chamber koşullarında 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde GLUT1, HIF1 α , VEGFA mRNA düzeyindeki değişimi.

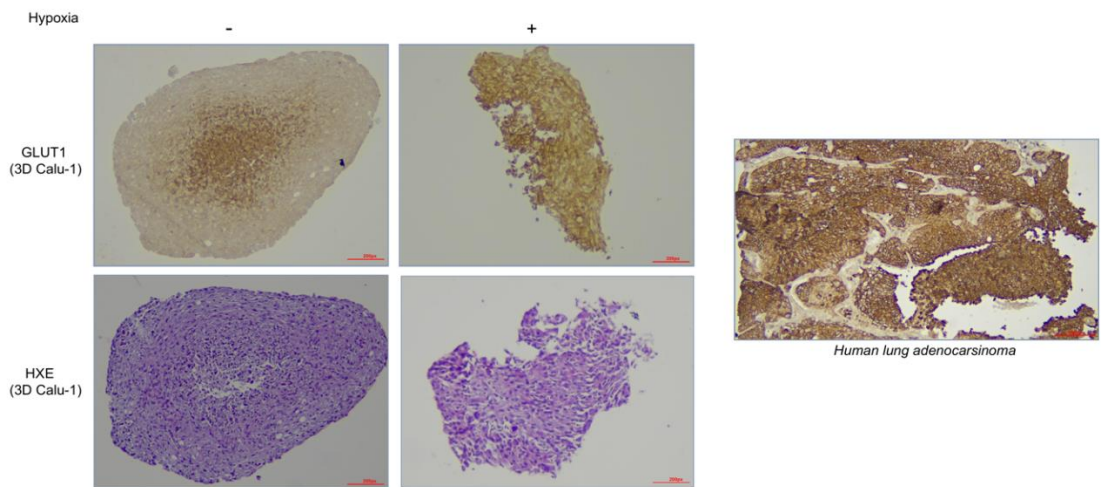
72 saat hipoksik chamberda inkübe edilen 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde GLUT1 proteininin ifade düzeyi immünblotlama (İB) yöntemiyle araştırılmıştır (Şekil 4.11.). Şekil.24'te 3D-A549 tümöroidlerinde iki farklı biyolojik replikanın protein düzeyinde GLUT1 ifadesine yer verilmiştir. Bu sonuçlar 3D-A549 tümöroidleri için 72h hipoksik koşulunda normoksiye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. 3D Calu-1 tümöroidlerinde ise 72h hipoksik koşulda da normoksik koşula göre artış gözlenmiştir (Şekil 4.11.)İnternal kontrol olarak β -Actin kullanılmıştır. 3D-A549 tümöroidlerinde iki farklı biyolojik replikaya ait immünblotlama sonuçları verilmiş ve istatistiksel analiz olarak one-way ANOVA uygulanmıştır; anlamlılık düzeyleri grafik üzerinde gösterilmiştir. ImageJ yazılımı kullanılarak bant yoğunlukları analiz edilmiştir (hipoksik koşul (hypoxia "+"); normoksik koşul (hypoxia "-") şeklinde gösterilmiştir.).



Şekil 4.11. Hipoksik chamber koşulunda 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde GLUT1 protein düzeyi.

72h hipoksik chamberda inkübe edilen 3D Calu-1 tümöroidleri, normoksik koşulu ile birlikte GLUT1 ifadesinin protein düzeyindeki değişimi IHC yöntemiyle araştırılmıştır (Şekil 4.12.). Pozitif kontrol olarak insan akciğer adenokarsinoma dokusu kullanılmıştır. Ek olarak 3D Calu-1 tümöroidlerinin normoksi (hypoxia “-”) ve hipoksi (hypoxia “+”) koşullarında HXE boyamaları yapılmış ve Şekil 4.12.’te verilmiştir. Calu-1 hücre hattından elde edilen hipoksik ve normoksik doku örneklerinin GLUT1 IHC boyamaları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Hipoksik koşullarda elde edilen dokularda GLUT1 ekspresyonunun genellikle 2(++) ve 3(+++) düzeyinde olduğu ve boyanmanın daha yaygın ve yer yer daha koyu olduğu izlenmiştir. Buna karşın normoksik koşullarda elde edilen dokularda daha heterojen bir dağılım saptanmış olup, hem 1(+), hem 2(++), hem de 3(+++) pozitif alanlar belirlenmiştir. Her iki koşul arasında GLUT1 ekspresyonu açısından belirgin düzeyde dramatik bir fark saptanmamış olmakla birlikte, dağılım paternleri farklılık göstermektedir. Özellikle normoksik dokunun periferik bölgelerinde zayıf pozitif 1(+) ya da tamamen negatif boyanan alanlar gözlenirken, santral bölgelerde GLUT1 ekspresyonu 2(++) ve 3(+++) düzeyinde daha yoğun olarak saptanmıştır. Bu durum, normoksik koşullarda dahi doku kitlesinin santral bölgelerinin yeterli oksijen difüzyonu sağlayamaması sonucu nispi bir hipoksiye maruz kaldığını göstermektedir. Bu tür santral hipoksik bölgeler, özellikle hızlı büyüyen ya da kompakt yapıdaki solid tümörlerde sıkça izlenen bir fenomendir ve bu bölgelerde GLUT1 gibi hipoksi-indüklenebilir proteinlerin ekspresyonunun artması beklenebilir.

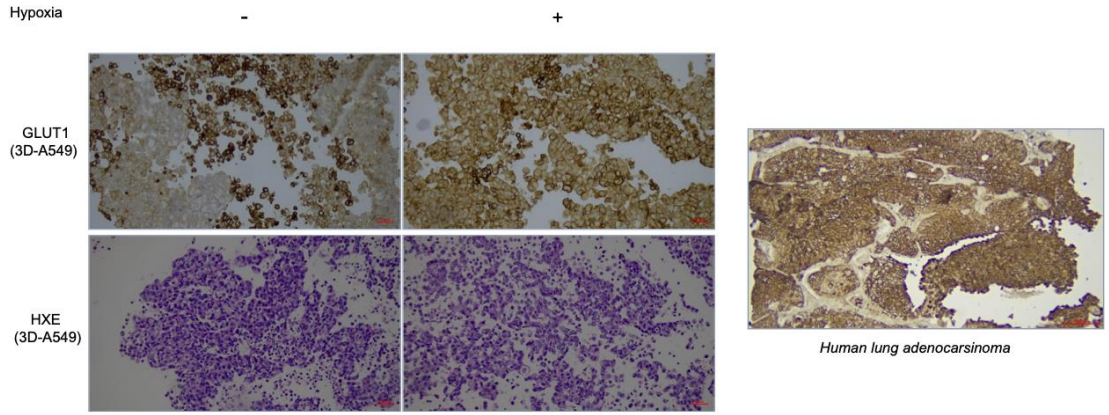
Hipoksik doku örneklerinde GLUT1 ekspresyonunun daha koyu ve yaygın olması, hipoksik sinyal yollarının aktivasyonunun bu hücre hattında etkili olduğunu göstermektedir. Ancak, normoksik koşullarda da santral bölgelerde belirgin GLUT1 ekspresyonu saptanması, doku içerisindeki mikrosantral hipoksinin önemini vurgulamakta ve tümör içi heterojenliğin değerlendirilmesinde sadece çevresel oksijen düzeylerinin değil, aynı zamanda doku mimarisi ve hücre yoğunluğunun da dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.12. Hipoksik chamber koşulunda 3D Calu-1’de GLUT1 protein düzeyi ve hematoksilin-eozin boyamaları.

72h hipoksik chamberda inkübe edilen 3D-A549 tümöroidleri, 72h normoksik koşulu ile birlikte GLUT1 ifadesinin protein düzeyindeki değişimi IHC yöntemiyle araştırılmıştır (Şekil 4.13). Pozitif kontrol olarak insan akciğer adenokarsinoma dokusu kullanılmıştır. Ek olarak 3D-A549 tümöroidlerinin normoksi (hypoxia “-”) ve hipoksi koşulunda (hypoxia “+”) HXE boyamaları yapılmış ve Şekil 4.13’de verilmiştir.

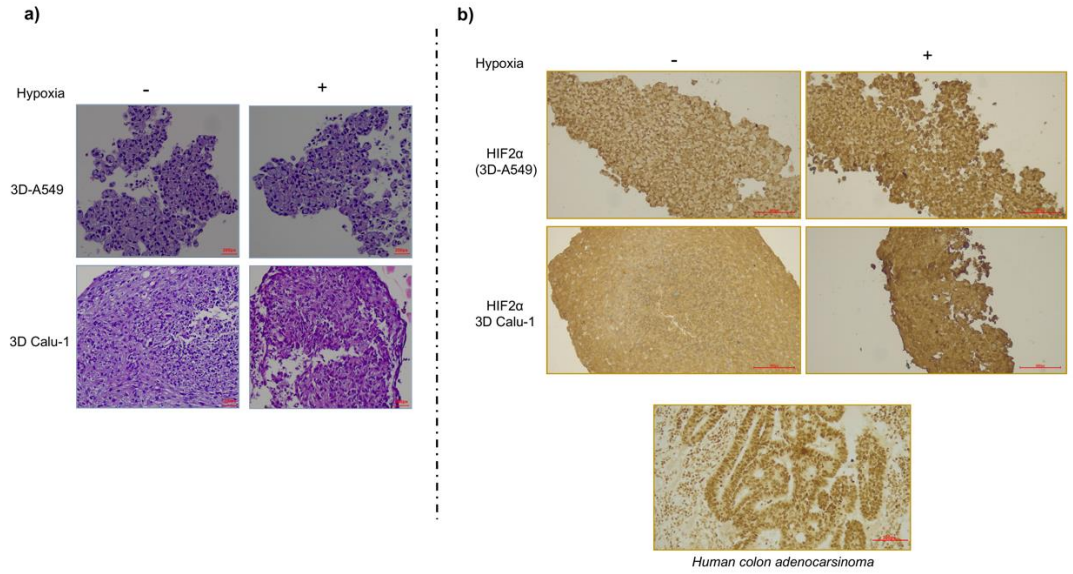
A549 hücre hattına ait doku kesitlerinde yapılan GLUT1 IHC boyamalarda, hipoksik koşullarda daha homojen ve yaygın pozitiflik izlendiği saptanmıştır. Buna karşın normoksik koşullarda elde edilen dokularda GLUT1 ekspresyonu daha heterojen bir dağılım göstermiş, pozitiflik düzeyleri arasında alansal farklılıklar izlenmiştir. Ancak normoksik dokunun genel olarak daha düzensiz ve dağınık histolojik yapısı, boyanmanın değerlendirilmesini zorlaştırmakta ve gözlenen paternin biyolojik anlamlılığını sorgulanabilir kılmaktadır. Bu nedenle normoksik A549 dokusunda saptanan GLUT1 dağılımının, hipoksiye bağlı gerçek bir artıştan ziyade doku yapısına bağlı teknik bir yansıma olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Hipoksik chamber koşulunda 3D-A549’de GLUT1 protein ifadesi ve hematoxilen-eozin boyamaları

Hipoksik chamberda 72h boyunca inkübe edilen 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidleri, normoksik koşulları ile birlikte HIF2 α ifadesinin protein düzeyindeki değişimi IHC yöntemiyle araştırılmıştır (Şekil 4.14 (b)). Pozitif kontrol olarak insan kolon adenokarsinoma dokusu kullanılmıştır. Ayrıca HXE boyamaları Şekil 4.14 (a)’da verilmiştir. IHC analizine bakıldığında kesit alınırken dokusal bütünlüğün nispeten her iki tümöroid modelinde de yüksek oranda korunduğu görülmektedir. Özellikle 3D Calu-1’de 3D-A549’lara göre daha kompakt bir organizasyon yer yer görülmektedir. HIF2 α ’nın literatürde kök hücre KKH’lerinde stemness gen aktivasyonundan ve özelliklerinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Ek olarak üç boyutlu sferoid formasyonunun kök hücre benzeri gelişimi indüklediği literatürde bilinmektedir. A549 hücre hattında yapılan HIF2 α IHC boyamalarında, hipoksik ve normoksik koşullar arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Her iki koşulda da benzer düzeyde 2(++) ve 3(+++) pozitiflik izlenmiş olup,

boyanma sitoplazmik ve membranöz lokalizasyonda yoğunlaşmıştır. Bu benzer dağılım paterni, A549 hücrelerinde HIF2 α ekspresyonunun yalnızca hipoksik yanıtla sınırlı kalmadığını, normoksik koşullarda da bazal düzeyde yüksek olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, HIF2 α 'nın hücredeki lokalizasyonunun nükleer yerine sitoplazmik ve membranöz alanlarda yoğunlaşması, bu proteinin oksijen bağımsız regülasyon mekanizmaları ya da hücreye özgü farklı fonksiyonlarıyla ilişkili olabileceğini gündeme getirmektedir (Şekil 4.14 (b)). Calu-1 hücre hattında gerçekleştirilen HIF2 α IHC boyamalarında, genel olarak sitoplazmik ve membranöz lokalizasyonda 1(+) ve 2(++) düzeyinde pozitiflik gözlenmiştir. Hipoksik koşullarda normoksik dokulara kıyasla yer yer daha koyu boyanma alanları izlenmiş olmakla birlikte, bu fark sınırlı düzeyde olup belirgin bir artış göstermemiştir. Ayrıca, hipoksik dokularda gözlenen bu koyuluk artışı, doku içerisinde sınırlı alanlarda ortaya çıkmakta ve eşlik eden morfolojik düzensizliklerle birlikte değerlendirildiğinde, bu durumun teknik kaynaklı boyanma artefaktından ileri gelme olasılığı da göz ardı edilememelidir. Dolayısıyla, Calu-1 hücre hattında hipoksiye özgü anlamlı bir HIF2 α artışından bahsetmek güçtür ve bu bulgular daha ileri tekniklerle doğrulanmaya ihtiyaç duymaktadır (Şekil 4.14 (b)).

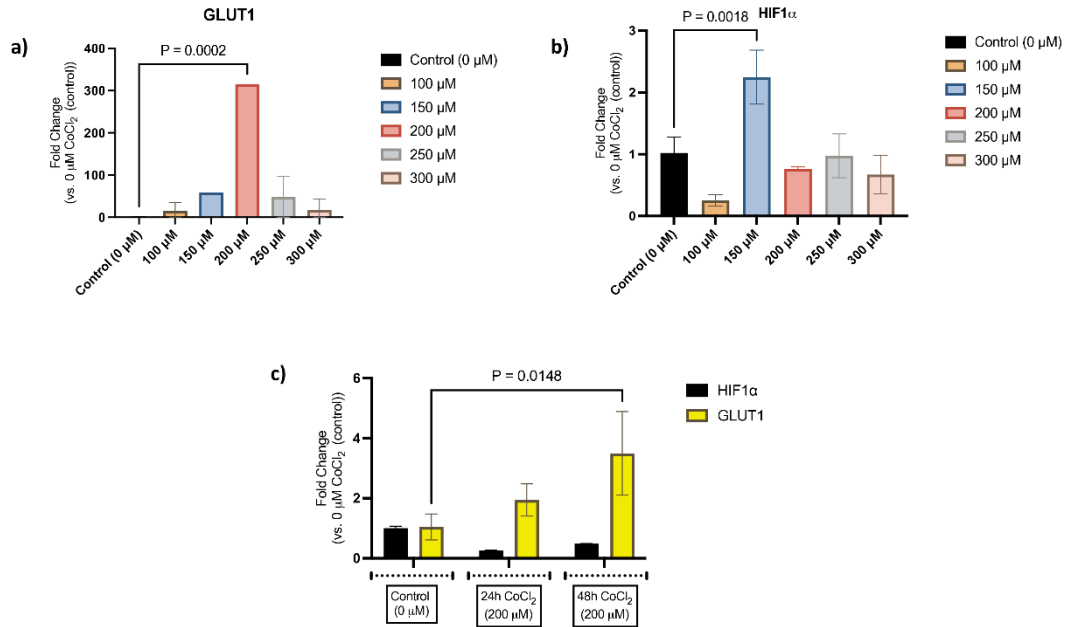


Şekil 4.14. Hipoksik chamber koşullarında 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde HIF2 α protein ifadesi (b) ve hematoksilen-eozin boyamaları (a).

4.1.3.2. CoCl₂ ile Hipoksik Koşul Optimizasyonu

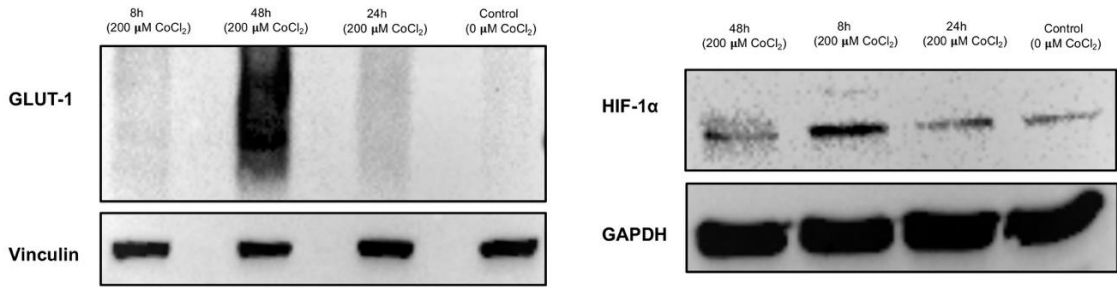
Kobalt, PHD (prolin hidroksilazlar) enzimleri üzerindeki demir bağlanma bölgelerine etki ederek HIF1 α nın stabilizasyonunu ve hipoksik bir ortamın oluşumunu sağlar (Mattia et al.2022). Tümöroidlere hipoksik koşul için uygun dozu CoCl₂ belirlemek amacıyla A549 tümöroidleri model olarak kullanılmıştır. Farklı CoCl₂ dozlarında (0, 100, 150, 200, 250 ve 300 μ M) tümöroidler inkübe edilmiş, 4 saat sonra mRNA izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.15 (a,b)). Protein izolasyonu ise 0, 8, 24 ve 48. saatlerde yapılmıştır (Şekil 4.16).

CoCl₂ yöntemi ile hipoksik koşul oluşturabilmek amacıyla uygun CoCl₂ dozunu ve uygulama zamanını belirlemek amacıyla; 0, 100, 150, 200, 250 ve 300 CoCl₂ koşullarında tümöroidler inkübe edilmiştir. CoCl₂ dozunu belirlemek amacıyla, 4 saat inkübasyon süresinin ardından mRNA izolasyonu yapılmıştır. Hipoksik belirteçler olan GLUT1 ve HIF1 α ifade düzeyi araştırılmıştır (Şekil 4.15 (a,b)). Bunun ile ilgili bunun ile ilgili kat değişim sonuçları verilmiştir: GLUT1 ifadesinde en yüksek artışın 200 μ M uygulamasında (p=0.0002); HIF1 α ifadesinin ise en yüksek artışın 150 μ M uygulamasında olduğu (p=0.0018) görülmektedir. Araştırmada kullanılacak uygun doz 200 μ M CoCl₂ olarak belirlenmiştir. Şekil 4.15 (c)'de zaman bağımlı CoCl₂ etkisini görmek amacıyla HIF1 α ve GLUT1'in mRNA ifadelerinin 0, 24 ve 48 saat uygulamalarına bakmıştır. İnternal kontrol olarak GAPDH kullanılmıştır. İstatistiksel analiz olarak one-way ANOVA (a, b) ve two-way ANOVA (c) uygulanmıştır; anlamlılık düzeyleri grafik üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.15. 3D-A549 tümöroidlerinde CoCl₂ optimizasyonu.

3D-A549 tümöroidlerinde 200 μ M CoCl₂ uygulama sonrası GLUT1 ve HIF1 α protein seviyeleri immünoiblotlama yöntemiyle incelenmiştir. Zamana bağımlı değişimi görmek amacıyla 8., 24. ve 48. saatlerde kontrol grubu ile kıyaslanmıştır (Şekil 4.16). GLUT1 ifadesinde 48. saatte belirgin bir artış gözlemlenmiştir. HIF1 α ' da ise tüm zaman uygulamalarında ifade edildiği görülmüş ama en yüksek ifadenin 8. saatte olduğu gözlenmiştir. Her iki proteinin ifadesinin kontrol grubunda az miktarda da olsa gözlenmesi, tümöroid yapısının merkezi kısma doğru gittikçe artan hipoksik karakterinden kaynaklanmaktadır. İnternal kontroller olarak GAPDH ve Vinculin kullanılmıştır. Sonuç olarak araştırma için uygun uygulama zamanı 48. saat olarak seçilmiştir (Şekil 4.16)



Şekil 4.16. CoCl₂ hipoksisinde 3D-A549’de GLUT1 ve HIF1α proteinlerinin ifadesi

4.1.4. Hipoksinin Koloni Formasyona Etkisi

4.1.4.1. Hipoksinin A549 ve Calu-1 hücrelerinde koloni formasyona etkisinin araştırılması

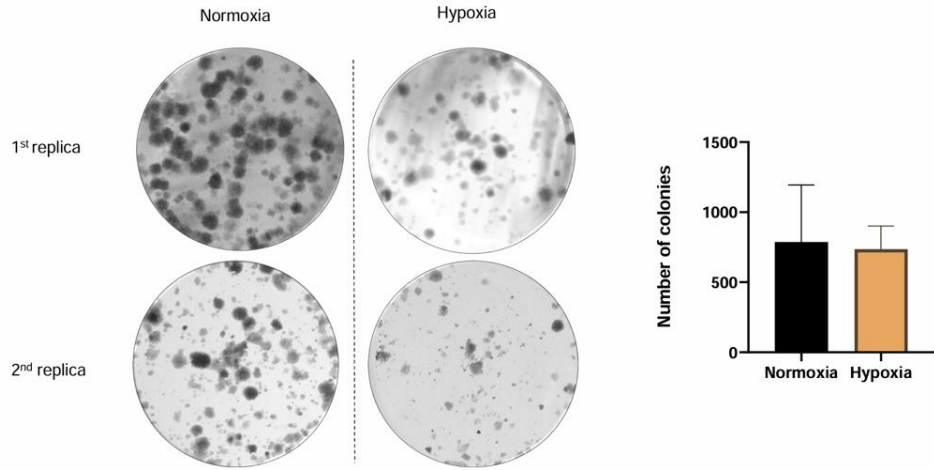
Hipoksik mikroçevrenin koloni formasyonuna etkisinin araştırılması amacıyla koloni formasyon ve soft agar (yumuşak-agar) koloni formasyon deneyleri yapılmıştır. Normal koloni formasyonunda 2D hücrelerin plate yüzeyine tutunarak koloni oluştururlar. Ancak soft agar koloni formasyonunda 2D hücreler yarı katı agar içerisine gömülürler ve yüzeye yapışmazlar. Hücreler yüzeye yapışmadıkları için hücre döngüsünde duraksama veya anoikise uğrayabilirlerken, kötü huylu hücrelerde ise koloni oluşturma eğilimi gözlemlenir (Nakamura, 2023).

Araştırmada ilk olarak A549 hücrelerinin normal koloni formasyon deneyi yapılmıştır. Hipoksik koşul için 200 μ M CoCl₂ kullanılmıştır. 11. Günü sonunda koloniler boyanmış ve ImageJ yazılımı kullanılarak sayılmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. A549 koloni formasyonunda oluşan koloni sayıları

Teknik replikalar	Normoksi koşulunda koloni sayısı	Hipoksi koşulunda koloni sayısı
1. teknik replika	1075	853
2. teknik replika	499	619

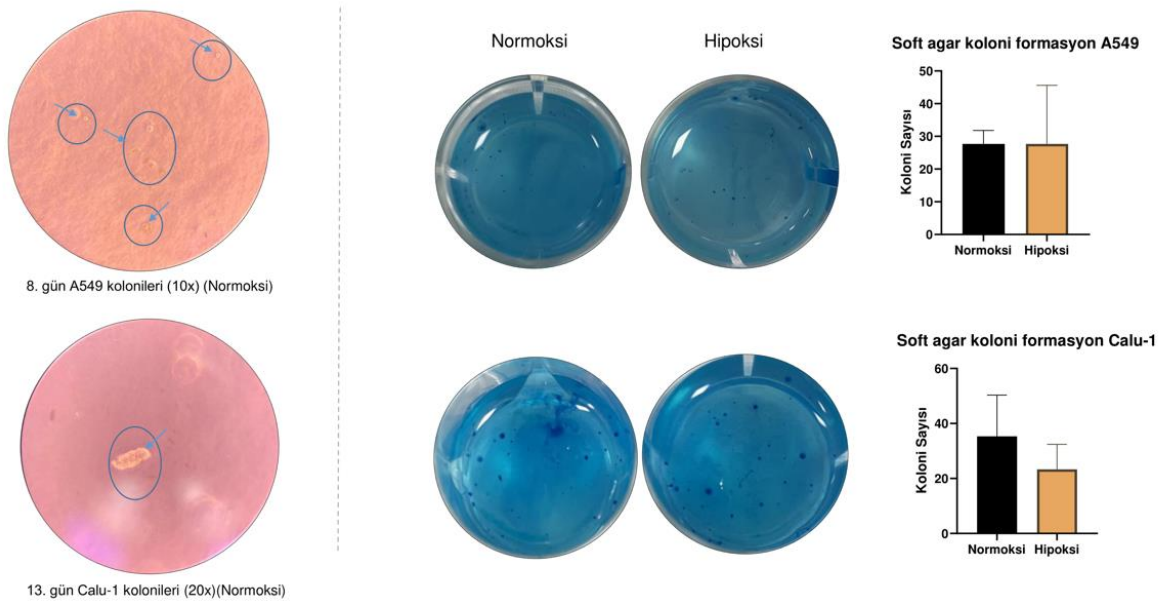
A549 hücrelerine ait iki teknik tekrar; aynı gün, aynı kültürden elde edilen koloni sayıları Tablo 4.1’de verilmiştir. 2D koloni oluşum deneyinde sadece iki teknik tekrar kullanıldığı ve biyolojik tekrar içermediği için istatistiksel analiz yapılamamıştır. Tablo 4.1’de verilen 1. teknik replikada normoksi de 1075 koloni, hipokside ise 853 koloni sayılmıştır. Hipokside daha az koloni oluşumu adapte olamayan hücrelerin öldüğünü düşündürmektedir. 2. teknik replikada ise; normoksidede 499, hipokside ise 619 koloni tespit edilmiştir. Burada normoksi koşulunda daha düşük koloni tespit edilmesinin olası bir nedeni, koloni birleşmesi (büyük koloniler aslında birden fazla koloninin birleşmesi durumundan kaynaklanıyor olabilir) olabileceği düşünülmektedir. Bu durum toplamda hesap edilen koloni sayısının daha düşük olmasına yol açar (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. A549 hücrelerinin normal koloni formasyonu.

Soft agar koloni formasyon deneyinde A549 ve Calu-1 hücreleri kullanılmıştır. Hipoksik koşul uygulama dozu 200 μ M CoCl₂ 'dir.

A549 ve Calu-1 hücrelerine ait soft agar koloni oluşumunun; sırasıyla 8. gün (A549) ve 13. gün (Calu-1) inverted mikroskop görüntüleri Şekil 4.18'de verilmiştir. Koloniler mavi daire ve oklar ile gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Soft agar koloni formasyonu A549 ve Calu-1 kolonileri.

A549 ile yapılan soft agar koloni formasyon analizinde oluşan koloni sayıları Tablo 4.2.'da verilmiştir. Her iki koşuldaki (normoksi ve hipoksi) koloni oluşturma yetenekleri değerlendirilmek üzere, elde edilen koloni sayıları ImageJ yazılımı kullanılarak sayılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için Mann Whitney testi uygulanmıştır. Analiz sonucunda elde edilen veriler yalnızca teknik tekrar düzeyinde olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.7000$, $n=3$ (teknik tekrar)).

Tablo 4.2. A549 soft agar koloni formasyonunda oluşan koloni sayıları

Teknik replikalar	Normoksi koşulunda koloni sayısı	Hipoksi koşulunda koloni sayısı
1. teknik replika	29	39
2. teknik replika	23	7
3. teknik replika	31	37

Calu-1 ile yapılan soft agar koloni formasyon analizinde oluşan koloni sayıları Tablo 4.3.'da verilmiştir. Her iki koşuldaki (normoksi ve hipoksi) koloni oluşturma yetenekleri değerlendirmek amacıyla, koloni sayıları ImageJ yazılımı ile sayılmış ve istatistiksel anlamlılık için Mann Whitney testi uygulanmıştır. Analiz sonucunda elde edilen veriler yalnızca teknik tekrar düzeyinde olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.4000$, $n=3$ (teknik tekrar)).

Tablo 4.3. Calu-1 soft agar koloni formasyonunda oluşan koloni sayıları

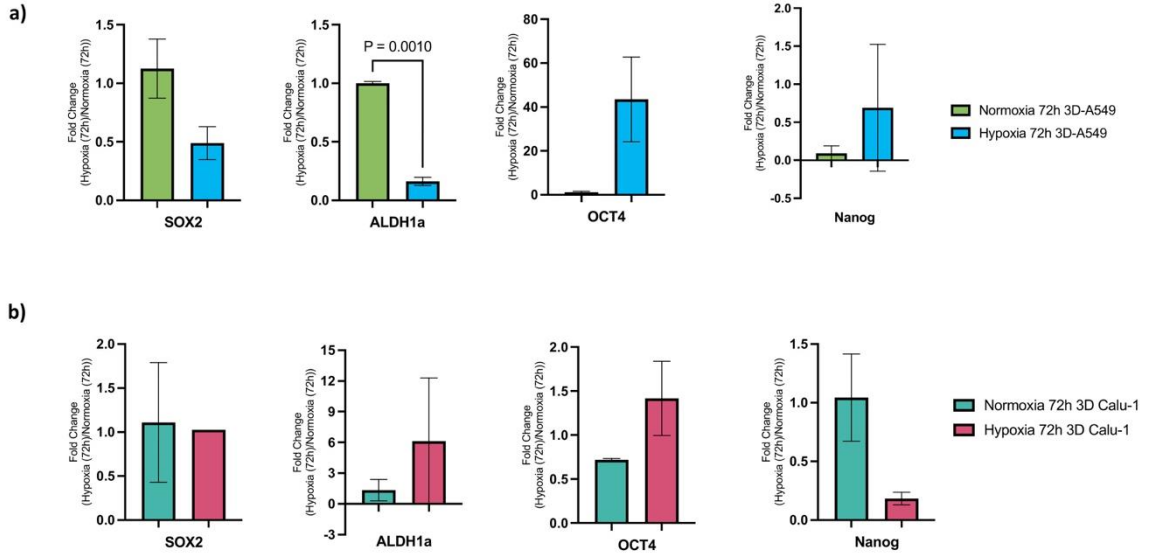
Teknik replikalar	Normoksi koşulunda koloni sayısı	Hipoksi koşulunda koloni sayısı
1. teknik replika	23	33
2. teknik replika	31	15
3. teknik replika	52	22

4.1.5. Hipoksinin bilinen kanser kök hücre biyobelirteçleri üzerindeki etkisinin KHDAK tümöroidlerinde araştırılması

Literatürde KKH biyobelirteçleri olarak bilinen ALDH1a, CD44, OCT4, Nanog, SOX2'nin hipoksik koşullarla olan ilişkisi qPCR, immünblotlama ve immünhistokimya gibi yöntemler kullanılarak araştırılmıştır.

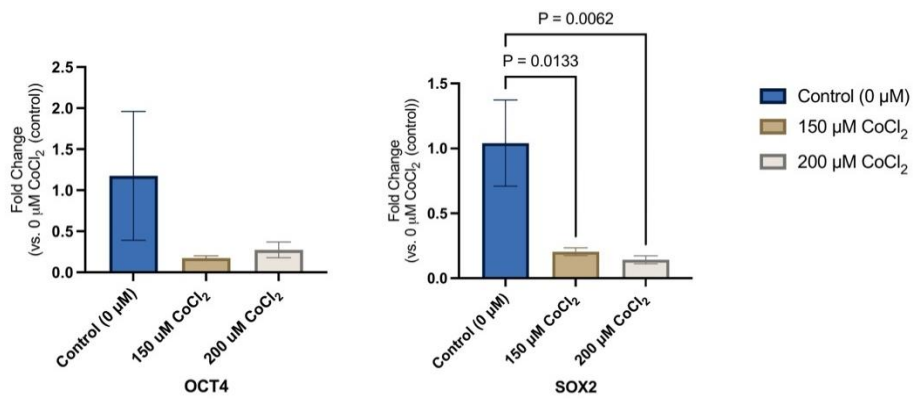
Hipoksik chamber koşullarında 3D-A549 (a) ve 3D Calu-1 (b) tümöroidlerde ALDH1a, OCT4, Nanog, ve SOX2 genlerinin mRNA düzeyindeki kat değişimleri gösterilmiştir. İstatistiksel analiz olarak one-way ANOVA uygulanmıştır; anlamlılık düzeyleri grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.19.). 3D-A549 tümöroidlerinde Şekil 4.19. (a)'da ALDH1a'nın mRNA düzeyinde hipoksik koşulda baskılandığı görülmektedir ($P=0.0010$). OCT4 ve SOX2 de ise hipoksi koşulunda bir artış olduğu görülsede yüksek bir standart sapmaya sahiptir, ayrıca istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç vermemiştir. SOX2'de ise hipoksidede baskılanmış olduğu görünmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç vermemiştir.

Hipoksik chamber koşullarında 3D Calu-1'e ait mRNA düzeyindeki kat değişimleri ie Şekil 4.19 (b)'de gösterilmiştir. ALDH1a ve OCT4 genlerinde mRNA düzeyinde hipoksik bir artış olduğu görülsede hem yüksek bir standart sapma değerine sahip hem de istatistiksel olarak anlamlı değildir. Aynı şekilde SOX2 ve Nanog genlerinin kat değişim grafiklerinde hipoksiyle baskılandıkları görülsede istatistiksel anlamlı değildir.



Şekil 4.19. Hipoksik chamber koşulunda 3D-A549 (a) ve 3D Calu-1 (b) tümöroidlerde ALDH1a, OCT4, Nanog, ve SOX2 mRNA ifadeleri

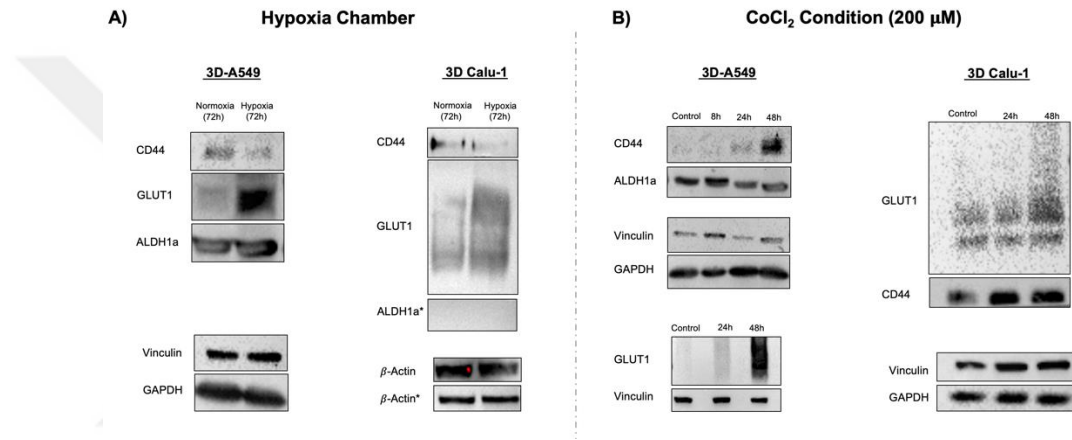
CoCl₂ kullanılarak oluşturulan hipoksik mikroçevrede 3D-A549 tümöroidlerde OCT4 ve SOX2 genlerinin mRNA düzeyindeki kat değişimleri doz-bağımlı olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analiz olarak one-way ANOVA uygulanmıştır; anlamlılık düzeyleri grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.20). CoCl₂ doz optimizasyonları deneylerinde öne çıkan iki dozun (150 ve 200 μ M CoCl₂) OCT4 ve SOX2 genleri üzerindeki etkisi 0 μ M CoCl₂ (control) grubu ile kıyaslanarak incelenmiştir. SOX2'nin hipoksida doza bağlı olarak ifadesinin baskılandığı görülmüştür (p=0.0133; p=0.0062). OCT4 ifadesinde ise hipoksida yine baskılandığı görülsede istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.20. CoCl₂ hipoksisinde 3D-A549'de OCT4 ve SOX2 mRNA ifadesi

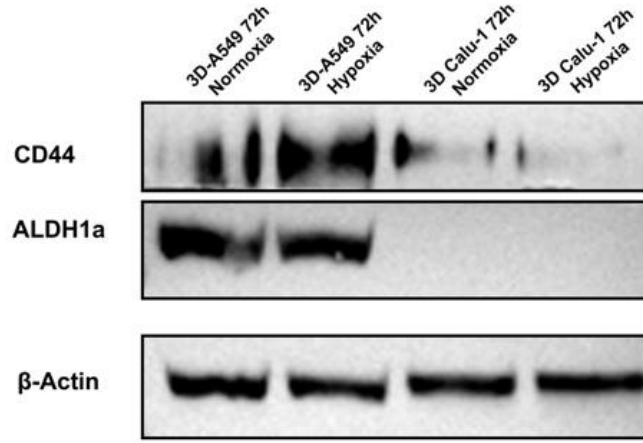
Hipoksik chamber ve CoCl₂ hipoksilerinde 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinin GLUT1, CD44 ve ALDH1a protein ifadeleri immünblotlama yöntemiyle araştırılmıştır. Internal kontrol olarak Vinculin ve GAPDH kullanılmıştır. ImageJ yazılımı kullanılarak bant yoğunlukları analiz edilmiştir (Şekil 4.21).

Hipoksik chamber modelinde 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde Şekil 4.21 (A)'de GLUT1 ifadesi artmıştır. CoCl₂ hipoksisinde ise 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde Şekil 4.21 (B)'de GLUT1 ifadesi zaman bağımlı artma eğilimli olması, her iki modelde de hipoksik yanıtın başarılı bir şekilde indüklendiğini göstermektedir. İki hipoksi modelinde de 3D-A549 tümöroidlerinde ALDH1a ifadesi bir değişiklik göstermemiştir. 3D Calu-1 tümöroidlerinde ise hipoksi chamber koşulunda ALDH1a ifade edilmemiş, CoCl₂ hipoksi modelinde ifade düzeyi araştırılmamıştır. CD44 ifadesi; hipoksik chamber modelinde Şekil 4.21 (A)'de her iki tümöroid modelinde normoksik koşulda artma eğilimli olduğu gözlenirken, CoCl₂ hipoksisinde ise Şekil 4.21 (B)'de zaman bağımlı 3D-A549 (özellikle 48. saatte) ve 3D Calu-1 (24 ve 48h) belirgin bir artış göstermiştir.



Şekil 4.21. Hipoksik koşullarda (Chamber ve CoCl₂) 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde KKH belirteçlerinin protein ifadeleri

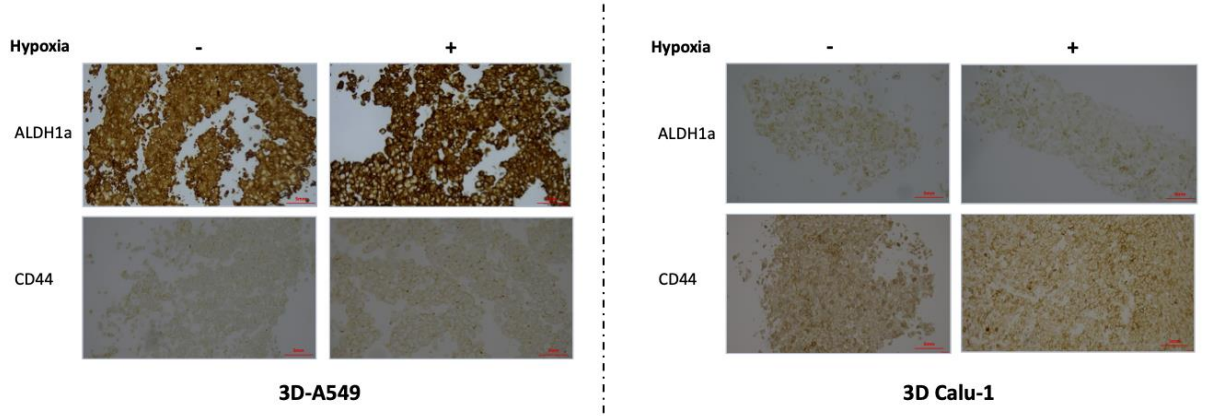
Hipoksik chamber kullanılarak 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde CD44 ve ALDH1a proteinlerinin hipoksiye yanıtları biyolojik tekrarlarla yeniden değerlendirilmiş ve immünblotlama sonuçları Şekil 4.22'de gösterilmiştir. ImageJ yazılımı kullanılarak bant yoğunlukları analiz edilmiştir. İnternal kontrol olarak β -Actin kullanılmıştır. CD44 ifadesinin 3D-A549 tümöroidlerinde hipoksi koşulunda belirgin bir şekilde ifade ettiği gözlenmiştir. Bu sonuç Şekil 4.21 (A) ile uyumlu bir sonuç değildir. Bu farklılığın 3D tümöridlerin heterojeniteleri veya kompakt yapısı; biyolojik tekrarlar arasında oluşabilen varyasyonlardan kaynaklabileceği düşünülmektedir. ALDH1a protein ifadelerinin ise Şekil 4.21 (A) ile uyumlu olarak hem normoksi hem de hipoksiste neredeyse benzer seviyelerde ifade edilmiştir. Şekil 4.22'de 3D Calu-1 hücrelerinde ise; ALDH1a protein düzeyinde ne normoksik koşulda ne de hipoksik koşulda ifade edilmiştir. CD44 ifadesinin ise hipoksiste nispeten baskılandığı yönünde bir sonuç görülmektedir.



Şekil 4.22. Hipoksik chamber koşulunda 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde CD44 ve ALDH1a protein ifadeleri.

Hipoksik chamber koşulunda 72 saat inkübe edilen 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinin ALDH1a ve CD44 protein ifadeleri IHC yöntemi ile araştırılmıştır (Şekil 4.23). 3D-A549 tümöroidlerinde ALDH1a ifadesi hem hipoksi hem de normoksi koşullarında şiddetli 3(+++) pozitif olarak değerlendirilebilirken, hipoksida boyanma şiddeti normoksiye göre daha yoğun membranöz ve yer yer sitoplazmik görünümde olduğu gözlenmiştir. ALDH1a'nın IHC boyamaları, her iki hücre hattında da hipoksik ve normoksik koşullarda benzer bir dağılım göstermiştir; ancak boyanma yoğunluğu ve yaygınlığı açısından belirgin farklılıklar dikkat çekmektedir. 3D Calu-1 dokularında ALDH1a ekspresyonu genel olarak düşük düzeyde olup, hem hipoksik hem de normoksik koşullarda boyanmayan veya yalnızca 1(+) düzeyinde zayıf pozitiflik gösteren alanlar mevcuttur. Nadiren ve sınırlı sayıda hücrede fokal 2(++) pozitiflik izlenmiştir.

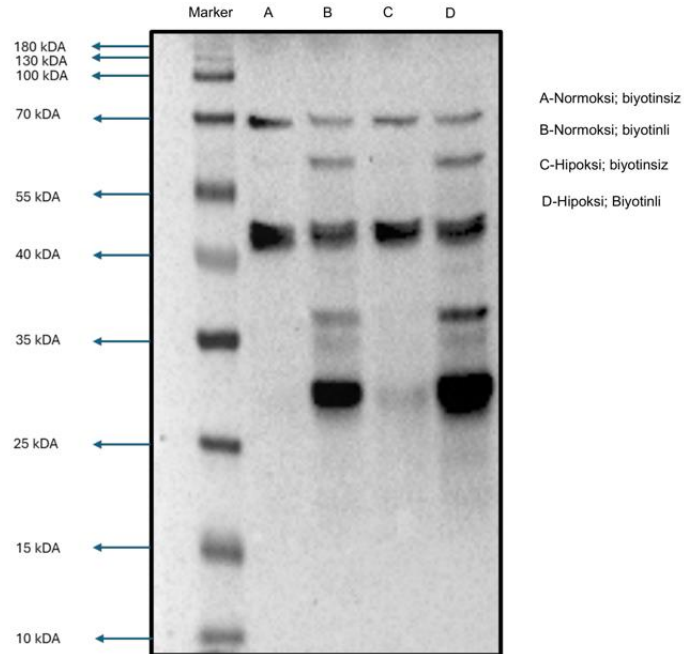
CD44'ın IHC boyamaları, her iki tümöroidlerinde de membranöz lokalizasyon göstermiştir. 3D Calu-1 tümöroidlerinde hem hipoksik hem de normoksik koşullarda yaygın membranöz pozitiflik izlenmiş olup, özellikle normoksik dokularda 3(+++) düzeyinde boyanmanın bazı doku fragmanlarında daha fazla sayıda hücrede yer aldığı ve bu pozitifliğin alansal olarak dağınık bir dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Buna karşın 3D-A549 tümöroidlerinde CD44 ekspresyonu hem hipoksik hem de normoksik koşullarda belirgin şekilde daha sınırlıdır. A549 dokularında geniş alanların CD44 açısından negatif ya da zayıf pozitiflik göstermesi, bu hücre hattında CD44 ekspresyonunun genel olarak düşük düzeyde olduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.23.)



Şekil 4.23. Hipoksik chamber koşulunda 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinin ALDH1a ve CD44 protein ifadeleri.

4.1.6. Hücre Membran Biotinilizasyonu

Thermo Scientific Pierce™ Hücre Yüzeyi Protein Biotinilasyon ve İzolasyon Kiti (A44390) protokolünce zenginleştirilmiş hücre membran proteinleri izole edilmiştir. Biotinilasyon adımı; hücreler 10 mM Sulfo-NHS-SS-Biotin reaktifi ile soğuk odada buz üzerinde 1 saat inkübe edilmiştir. Soğuk oda da buz üzerinde biyotinilasyon işlemi ile Sulfo-NHS-SS-Biotin reaktifinin hücre içindeki proteinlere bağlanma riskini azaltmaktadır. Biotinilasyon kontrolü protein düzeyinde immünblotlama yöntemi ile araştırılmış ve biyotinilasyon işlemi başarıyla gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Sulfo-NHS-SS-Biotin reaktifi ile biyotinilasyonunun kontrolü

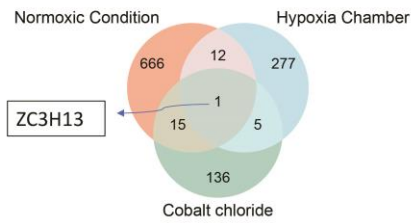
4.1.7. 2D ve 3D Hücre Kültüründe Büyütülen KHD AK Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik koşullarda Proteomik ve Fonksiyonel Biyoinformatik Analizleri

4.1.7.1. Normoksik ve Hipoksik koşullarda 2D-A549 Hücrelerinin Proteomik ve Zenginleştirilmiş Fonksiyonel Analizleri

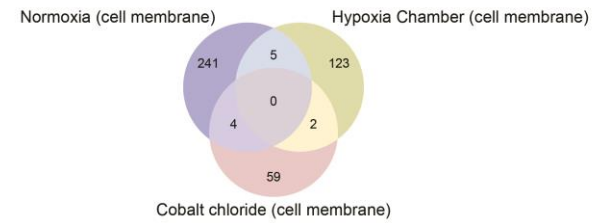
2D-A549 hücrelerinden normoksik ve hipoksik koşullarda izole edilen hücre membran proteinleri LS-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiş, ham veriler ise PLGS kullanılarak işlenmiştir. Hipoksik koşulların oluşturulmasında iki farklı model kullanılmıştır: Hipoksik chamber ve CoCl_2 . PLGS analizleri sonucunda 1112 farklı protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinlerin yaklaşık %39'u hücre yüzeyine lokalizedir (Gene Ontology (GO); Subcellular Localization) (Şekil 42.5.). Tüm bu koşullarda (normoksik, hipoksik chamber ve CoCl_2) bir protein ortak (ZC3H13) olarak saptanmıştır (Şekil 4.25).

Bu proteinlerin 694'ü normoksik koşulda, 446 tanesi ise hipoksik koşullarda tanımlanmıştır. Hipoksik koşullarda; chamber sisteminde 295, CoCl_2 sisteminde ise 157 protein tanımlanmıştır. Normoksik koşullarda tanımlanan proteinlerin yaklaşık %36'sı hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Hipoksik chamber koşulunda tanımlanan proteinlerin yaklaşık %44 hücre yüzeyinde yer alırken, CoCl_2 koşullarında tanımlanan proteinlerin ise %41 tespit edilen hücre yüzeyinde lokalizedir (Şekil 4.25).

- **2D-A549** hücrelerinde tüm koşullar altında tanımlanan tüm proteinlerin Venn diyagramı



- **2D-A549** hücrelerinde tüm koşullar altında tanımlanan hücre zarına yerleşmiş proteinlerin (hücre membran proteinlerinin) Venn diyagramı



Condition (2D-A549)	Total Proteins	Cell Membrane Proteins (%)
Normoxia	694	~36%
Hypoxia chamber	295	~44%
CoCl_2 hypoxia	157	~41%
All conditions	1112	~39%

Şekil 4.25. 2D-A549 hücrelerinde farklı koşullarda tanımlanan toplam protein ve hücre membran protein dağılımları.

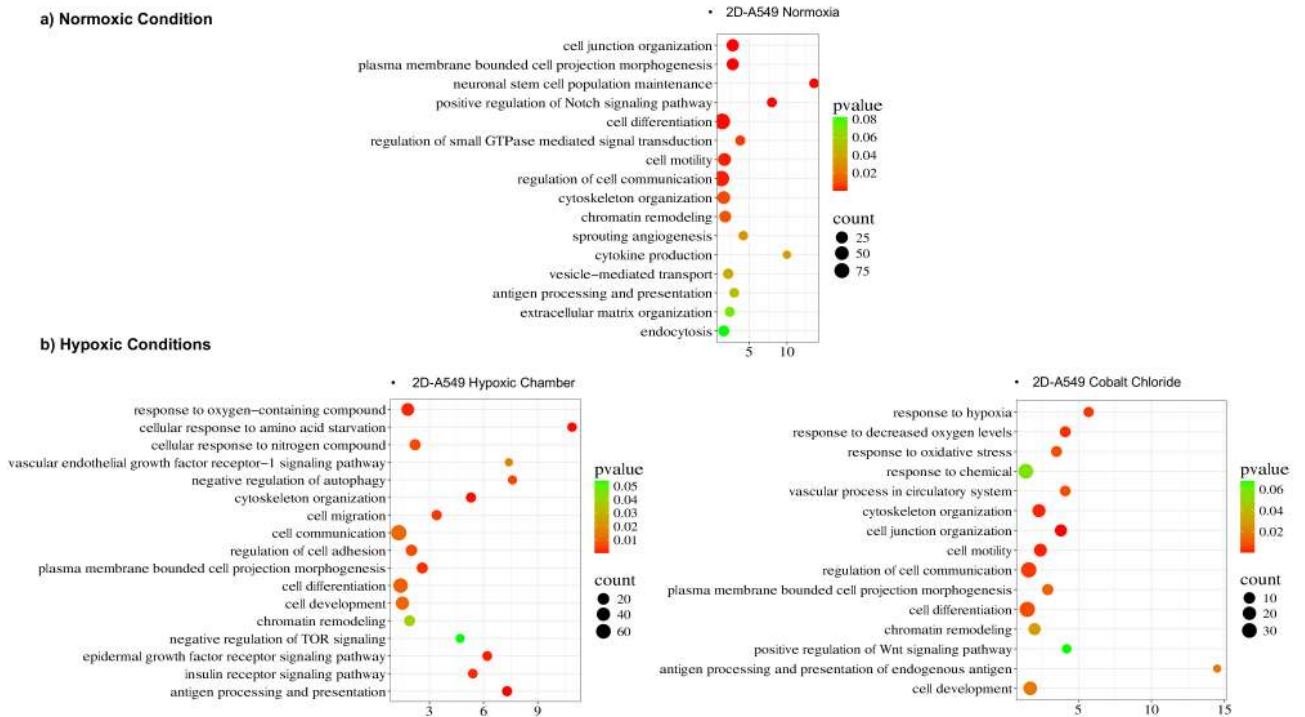
2D-A549'e ait tanımlanmış proteinlerin biyolojik süreçle (Gene Ontology (GO); Biological process) ilgili zenginleştirilmiş fonksiyonel analizleri Şekil 4.26'da verilmiştir. Hipoksik koşula özgül biyolojik süreçler, her iki hipoksi modelinde de belirlenmiştir. Hipoksik modellerde kök hücre ilişkili süreçlerin anlamlı dahil olsa da, normoksik koşulda da Notch sinyal yolağı ilişkili sürecin

tanımlanmış olması dikkat çekicidir. Bunun kök hücre ilişkili fonksiyonları dışında Notch yolağının hücre-hücre ilişkili fonksiyonlarıyla ilgili olabileceğini akla getirmektedir.

Normoksik koşullarında iskelet sistemi organizasyonu (*cytoskeleton organization*), ECM organizasyonu (*extracellular matrix organization*), kromatinin yeniden düzenlenmesi (*chromatin remodeling*), hücre farklılaşması (*cell differentiation*), GTPaz aracılı sinyal iletiminin düzenlenmesi (*regulation of small GTPase mediated signal transduction*) ve antijen sunumu (*antigen processing and presentation*) gibi önemli biyolojik süreçlerin varlığı dikkat çekmektedir (Şekil 4.26 (a)).

Hipoksik koşullarda ise hipoksi ile ilişkilendirilebilecek önemli biyolojik süreçler dahil olmuştur; oksijen yanıtı (*response to oxygen-containing compound*, $p=0.014$) VEGFR-1 sinyal yolağı (*vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling pathway*, $p=0.016$), azot içeren bileşiklere hücresel yanıt (*cellular response to nitrogen compound*, $p=0.0054$), amino asit yoksunluğuna karşı hücresel yanıt (*cellular response to amino acid starvation*, $p=0.00021$). Ayrıca hücre farklılaşması (*cell differentiation* $p=0.0084$) gibi önemli süreçlerin anlamlı olarak zenginleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.26 (b)).

CoCl₂ modelinde ise; hipoksiye yanıt (*response to hypoxia*, $p=0.004$), düşük oksijen durumuna yanıt (*response to decreased oxygen level*, $p=0.0032$), oksidatif stress yanıtı (*response to oxidative stress*, $p=0.0074$), hücre farklılaşması (*cell differentiation*, $p=0.0071$) ve Wnt sinyal yolağının pozitif düzenlenmesi (*positive regulation of Wnt signaling pathway*, $p=0.068$) gibi süreçler öne çıkmaktadır ((Şekil 4.26 (b)).

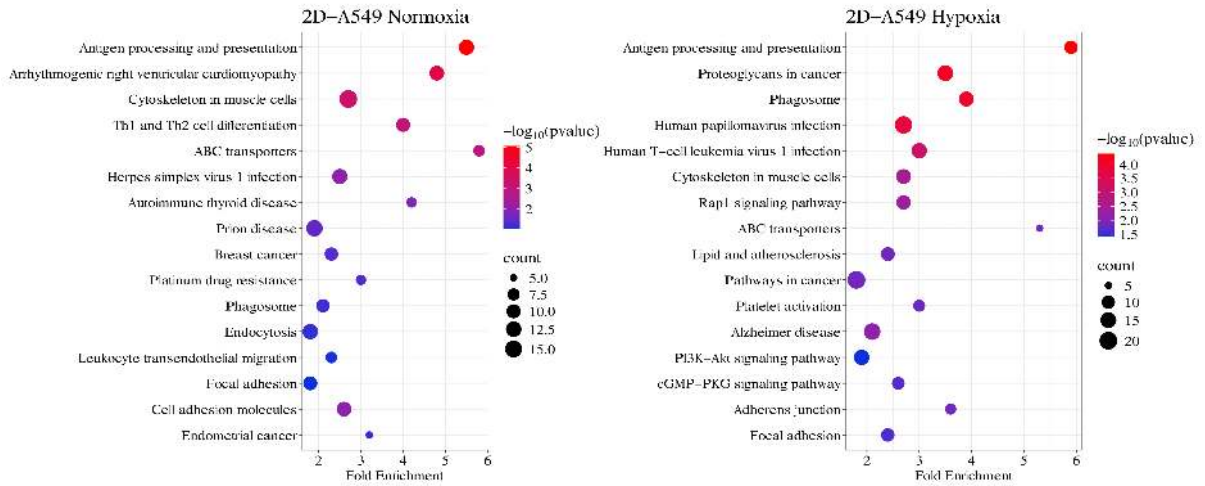


Şekil 4.26 2D-A549'e ait tanımlanan proteinlerin GO biyolojik süreç analizi.

2D-A549'e ait tanımlanmış proteinler ile ilgili KEGG yolak analizleri (Gene Ontology (GO); KEGG pathway) Şekil 4.27.'de verilmiştir. Analiz sonuçları, normoksik ve hipoksi koşullarında anlamlı düzeyde öne çıkan pek çok yolağın varlığını ortaya koymaktadır.

Normoksik ve hipoksik koşullarda, Şekil 4.27.'da zenginleşen tümör hücrelerinin immün sistem mekanizmalarına ait yolakların (antigen processing and presentation, virus infections vb.) aktivasyonu beklenen bir durumdur. Tümör hücrelerinin sergileyeceği davranış, tümör gelişimi sırasında, immün denetim altında şekillenen bir mikroçevre ile uyumludur. Antijen sunumu, virüs enfeksiyonları veya fagosom (phagosome) gibi diğer yolaklar, tümör hücresinin immün sistemden kaçma eğilimi ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca hipoksik koşullarda ise mikroçevrenin değişmesi ile birlikte tümör hücresi daha farklı adaptasyonlar geliştirmek için farklı yolları aktive edebilmektedir.

Hipoksida; hücre sağkalımı, proliferasyonu ve anjiyogenez gibi fizyolojik süreçlerde rol oynayan PI3K-Akt sinyal yolağının (PI3K-Akt signaling pathway) saptanması hipoksi ile ilişkili biyolojik düzenlemeleri işaret etmektedir. Diğer yandan ABC taşıyıcıları (ABC transporter/ATP-binding cassette transporter) gibi kanserlerde ilaç direnci ile ilişkili olan yolağın normoksida ($p=0.0011$) hipoksiye ($p=0.014$) kıyasla daha anlamlı olarak dahil olduğu görünmektedir. Hipoksik koşulda anlamlı olarak ifade edilen ($p=0.0046$) Rap1 sinyal yolağı (Rap1 signaling pathway) hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinden hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinden sorumlu olan bir yolaaktır ve hipoksida hücresel adaptasyon süreçlerinde rol alabilmektedir (Şekil 4.27)



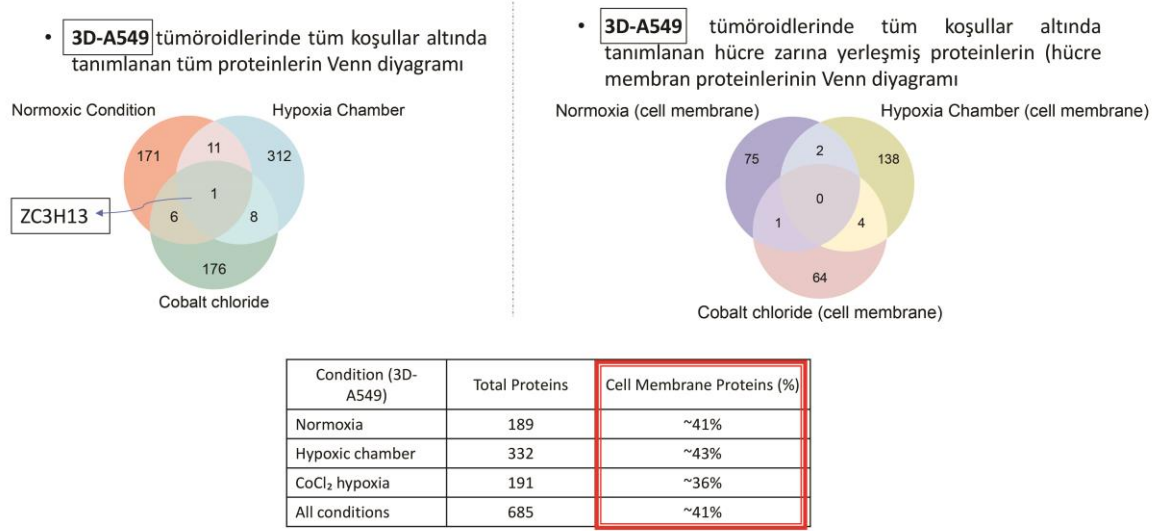
Şekil 4.27. 2D-A549'e ait tanımlanmış proteinlerin KEGG yolak analizi.

4.1.7.2. Normoksik ve Hipoksik koşullarda 3D-A549 Tümöröidlerinin Proteomik ve Zenginleştirilmiş Fonksiyonel Analizleri

3D-A549 hücrelerinden normoksik ve hipoksik koşullarda izole edilen total ve hücre membran proteinleri LS-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiş, ham veriler ise PLGS kullanılarak

işlenmiştir. Hipoksik koşulların oluşturulmasında iki farklı model kullanılmıştır: Hipoksik chamber ve CoCl_2 . PLGS analizleri sonucunda 685 farklı protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerin yaklaşık %41'i hücre yüzeyine lokalizedir (Gene Ontology (GO); Subcellular Localization). Tüm koşullarda (normoksik, hipoksik chamber ve CoCl_2) bir protein (ZC3H13) ortak olarak saptanmıştır (Şekil.4.28.).

Bu proteinlerin 189'u normoksik, 514 tanesi ise hipoksik koşullarda tanımlanmıştır. Hipoksik koşullarda; chamber sisteminde 332 farklı protein tanımlanmış, CoCl_2 sisteminde ise 191 protein tanımlanmıştır. Normoksik koşullarda tanımlanan proteinlerin yaklaşık %41'i hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Hipoksik chamberda tanımlanan proteinlerin yaklaşık %43'ü, CoCl_2 koşullarında tanımlanan proteinlerin yaklaşık %36 hücre yüzeyinde lokalizedir (Şekil.4.28).



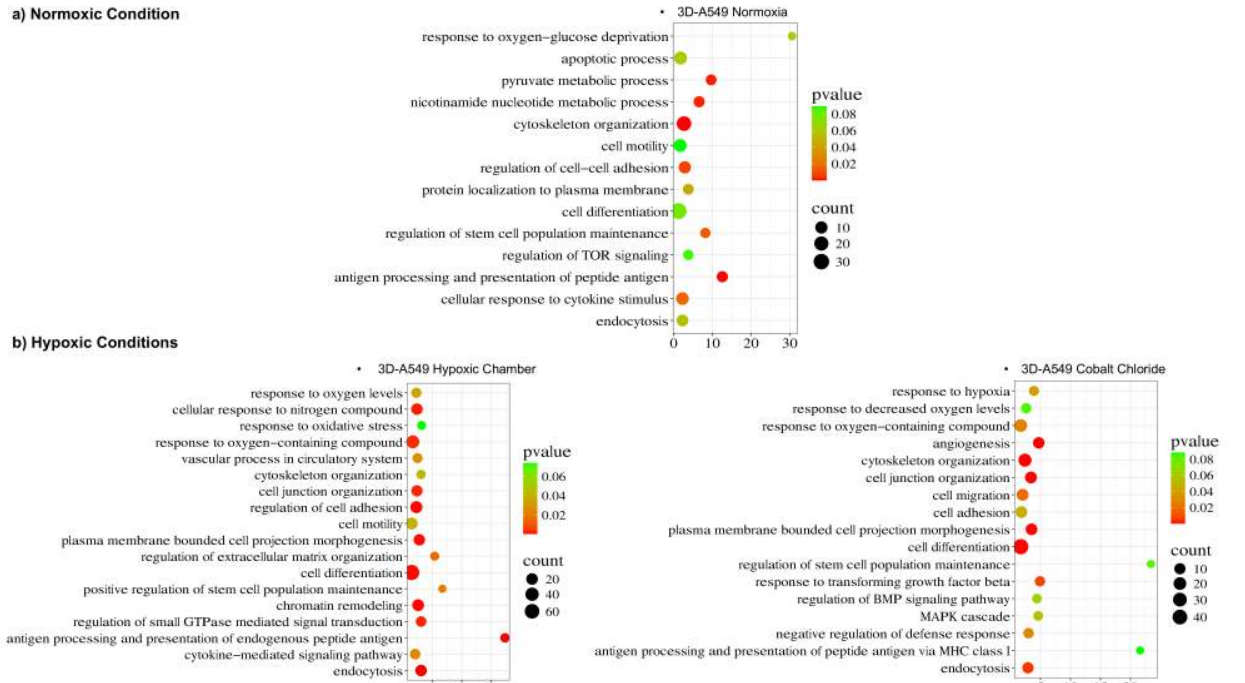
Şekil.4.28. 3D-A549 tümöröidlerinde farklı koşullarda tanımlanan toplam protein ve hücre membran protein dağılımları.

3D-A549'e ait tanımlanmış proteinler ile ilgili biyolojik süreç analizleri (Gene Ontology (GO); Biological Process) Şekil.4.29.'te sunulmuştur. Analiz sonuçlarında normoksik ve hipoksi koşullarında öne çıkan biyolojik süreçleri ortaya koymaktadır. Özellikle hipoksik koşullarda her iki hipoksi modelinde de kendilerine özgü süreçleri aktive ettiği gözlenmiştir.

Normoksi koşullarında oksijen-glukoz yoksunluğuna yanıt (*response to oxygen-glucose deprivation*, $p=0.063$) iskelet sistemi organizasyonu (*cytoskeleton organization*, $p=0.00004$), apoptotik süreç (*apoptotic process*, $p=0.061$), piruvat metabolizması (*pyruvate metabolic process*, $p=0.0017$), hücre motilitesi (*cell motility*, $p=0.089$), hücre farklılaşması (*cell differentiation*, $p=0.077$), kök hücre popülasyonunun sürdürülebilirliğin düzenlenmesi (*regulation of stem cell population maintenance*, $p=0.013$), TOR sinyalinin düzenlenmesi (*regulation of TOR signaling*, $p=0.086$), antijen sunumu (*antigen processing and presentation of peptide antigen*, $p=0.00011$) gibi çoğunlukla anlamlı olan bu önemli biyolojik süreçlerin varlığı dikkat çekmektedir (Şekil.4.29).

İki hipoksi modelinde de genel hipoksik koşullu ile ilişkilendirilebilecek önemli biyolojik süreçler belirgin bir şekilde tanımlanmıştır. Hipoksik chamber modeli incelendiğinde; oksijen içeren bileşiğe yanıt (*response to oxygen-containing compound*, $p=0.0029$), oksijen seviyesine yanıt (*response to oxygen levels*, $p=0.035$), oksidatif stress yanıtı (*response to oxidative stress*, $p=0.074$), hücre farklılaşması (*cell differentiation*, $p=0.00034$) kök hücre popülasyonunun sürdürülebilirliğin düzenlenmesi (*regulation of stem cell population maintenance*, $p=0.021$), küçük GTPaz aracılı sinyal iletiminin düzenlenmesi (*regulation of small GTPase mediated signal transduction*, $p=0.002$), sitokin aracılı sinyal yolağı (*cytokine-mediated signaling pathway*, $p=0.025$), antijen sunumu (*antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen*, $p=0.000022$) gibi süreçler öne çıkmaktadır (Şekil.4.29).

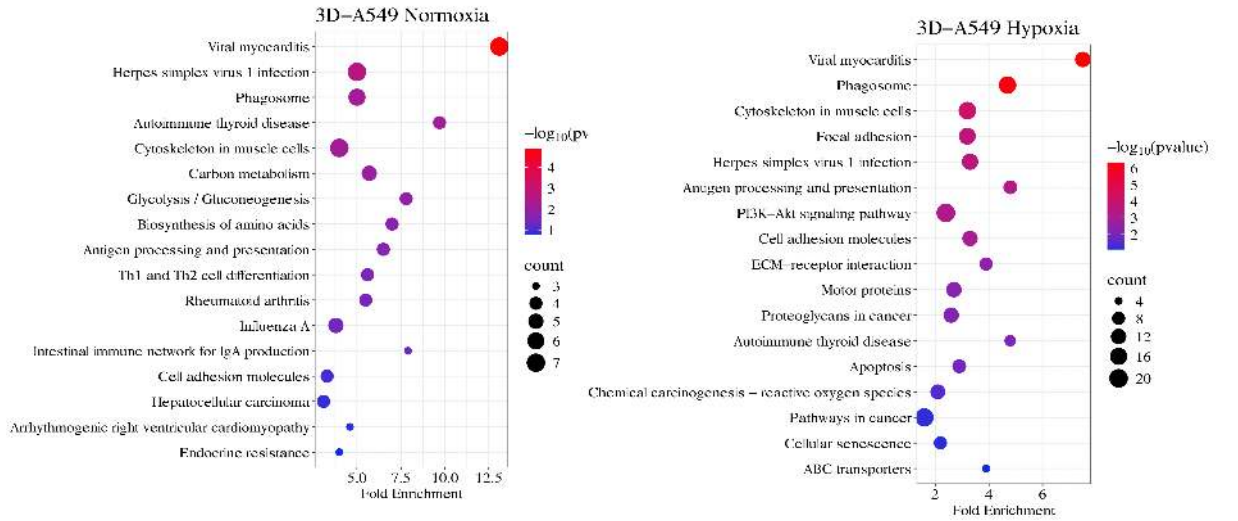
CoCl₂ modelinde ise; hipoksiye yanıt (*reponse to hypoxia*, $p=0.038$), düşük oksijen durumuna yanıt (*response to decreased oxygen level*, $p=0.083$), oksijen içeren bileşiğe yanıt (*response to oxygen-containing compound*, $p=0.027$), anjiyogenez (*angiogenesis*, $p=0.000052$), BMP sinyal yolunun düzenlenmesi (*regulation of BMP signaling pathway*, $p=0.063$), MAPK kaskadı (*MAPK cascade*, $p=0.056$), hücre farklılaşması (*cell differentiation*, $p=0.00023$) kök hücre popülasyonunun sürdürülebilirliğin düzenlenmesi (*regulation of stem cell population maintenance*, $p=0.082$), antijen sunumu (*antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I*, $p=0.088$) ve hücre göçü (*cell migration*, $p=0.018$) gibi süreçler dahil olmuştur (Şekil.4.29).



Şekil.4.29. 3D-A549'e ait tanımlanmış proteinlerin biyolojik süreç analizleri

3D-A549'e ait tanımlanmış proteinler ile ilgili KEGG yolak analizleri (Gene Ontology (GO); KEGG pathway) Şekil.45'de verilmiştir. Analiz sonuçları normoksik ve hipoksi koşullarında anlamlı düzeyde pek çok yolağın varlığı öne çıkmıştır.

Normoksik koşullarda hücresel başlıca metabolik aktivite ile ilgili önemli yollar olan; karbon metabolizması (*carbon metabolism*), glikoliz/glukogenez (*Glycolysis/Gluconeogenesis*) ve amino asit biyosentezi (*Biosynthesis of amino acids*) gibi yolların varlığının, hücre aktivitesinin hem metabolik hem de biyosentetik süreçlerde belirgin bir şekilde temsil edildiğini göstermektedir. Öte yandan immün sistem mekanizmalarına ilişkin yolların (*antigen processing and presentation, virus infections vb.*) hem normoksik koşullarda hem de hipoksik koşullarda dahil olan yollar arasındadır. Hipoksik koşulda ise hücre sağkalımında, anjiyogenez gibi temel süreçlerde rol oynayan PI3K-Akt yolağı öne çıkan yollar önemli yollar arasındadır. Yine ABC taşıyıcıları (*ABC transporter/ATP-binding cassette transporter*) gibi kanserlerde ilaç direnci ile ilişkili olan yolların hipoksizde gözlenmiştir. ECM-reseptör etkileşimi (*ECM-receptor interaction*) kanser ilişkili yollar (*pathway in cancer*) ve hücre yaşlanması (*cell senescence*) da hipoksizde göze çarpan diğer yollar arasındadır (Şekil 4.30).



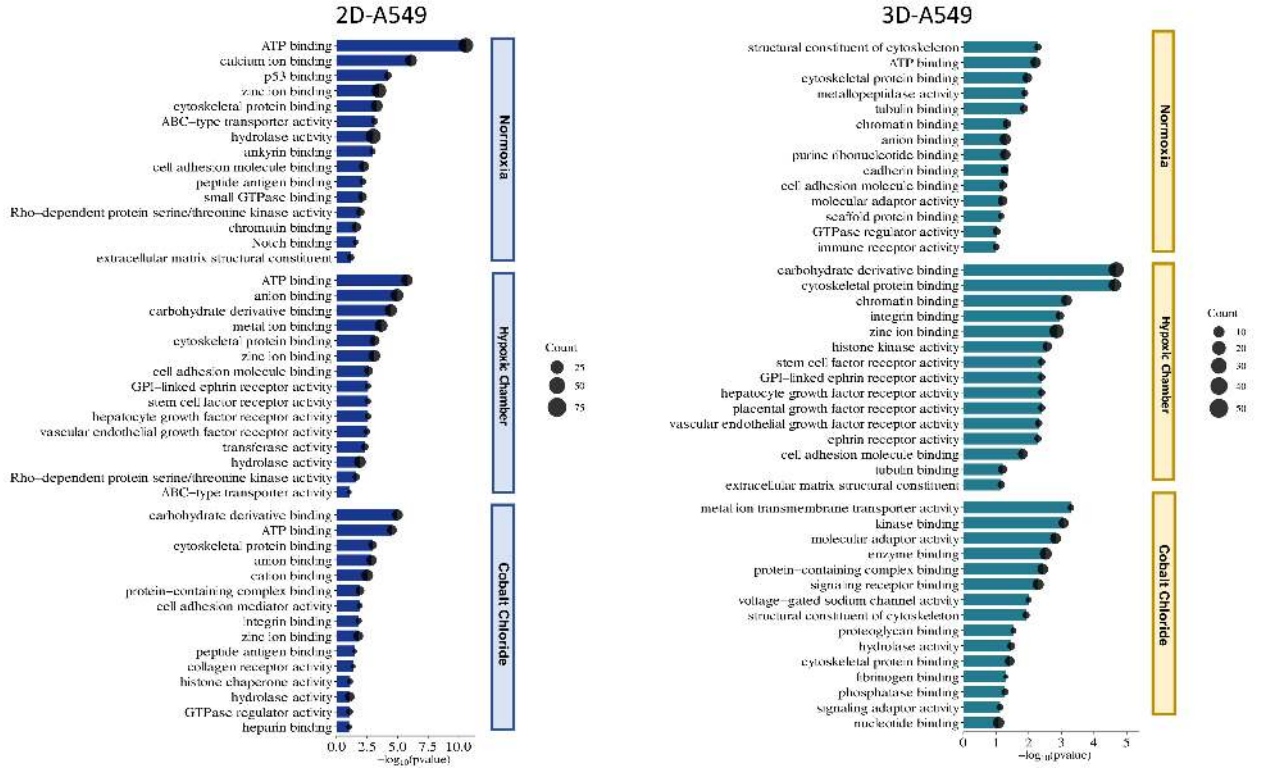
Şekil 4.30. 3D-A549'e ait tanımlanmış proteinlerin KEGG yollar analizleri

4.1.7.3. Normoksik ve Hipoksik Koşullarda 2D-A549 ve 3D-A549 Modellerinin Karşılaştırmalı KEGG ve Moleküler Fonksiyon Analizleri

2D-A549 ve 3D-A549'de tanımlanmış proteinlerin KEGG yollar analizleri (Gene Ontology (GO); KEGG pathway) Şekil 4.31'da verilmiştir. Analiz sonuçları iki farklı hipoksi modelde karşılaştırmalı olarak verilmiştir. İki hipoksi modelde de farklı hipoksi ile ilişkili yolların dahil olduğu gözlenmektedir.

2D-A549 hipoksik chamber modelinde, hücre iskeleti düzenlenmesinde görev alan Rap1 sinyal iletim yolu öne çıkarken; 2D-A549 CoCl₂ modelinde ise, PI3K-Akt sinyal yolağı öne çıkmaktadır (Şekil 4.31).

3D-A549 CoCl₂ modelinde yoğunlaşmış iskelet organizasyon ve yapısal proteinler ile ilişkili fonksiyonlara ek olarak, yoğunlukla enzim aktivitesi ve sinyal düzenlenmesi (*molecular adaptor activity*, *signal adaptor activity*) ilişkili fonksiyonlar yer almaktadır. Ancak 3D-A549 hipoksik chamber modelinde belirgin olan kök hücre gelişimi ile ilişkili fonksiyonların daha az olduğu görülmektedir. Benzer bir durum kısmen 2D-A549 CoCl₂ modelinde de gözlenmiştir. Bu modelde ise genel fonksiyonlar dışında (“*ATP binding*” vb.) yoğunlukla iyon dengesi ilişkili fonksiyonların öne çıktığı görülmektedir (Şekil 4.32).



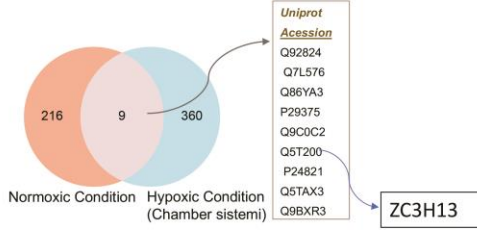
Şekil 4.32. 2D-A549 ve 3D-A549’de tanımlanmış proteinlerin moleküler fonksiyon analizleri.

4.1.7.4. Normoksik ve Hipoksik koşullarda 3D Calu-1 Tümöroidlerinin Proteomik ve Zenginleştirilmiş Fonksiyonel Analizleri

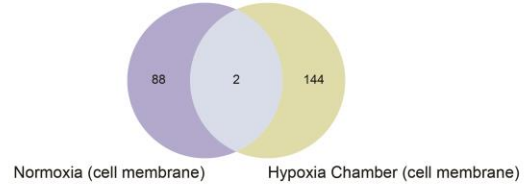
3D Calu-1 hücrelerinden normoksik ve hipoksik koşullarda izole edilen hücre membran proteinleri LS-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiş, ham veriler ise PLGS kullanılarak işlenmiştir. Hipoksik koşulların oluşturulmasında yalnızca hipoksik chamber kullanılmıştır. PLGS analizleri sonucunda 585 farklı protein tanımlanmıştır. Tüm izole edilen proteinlerin yaklaşık %39’u hücre yüzeyinde bulunan proteinlerdir (Gene Ontology (GO); Subcellular Localization) Ortak olarak 9 farklı protein belirlenmiştir. Bu ortak proteinler arasında diğer hücre modellerinde tanımlanan ZC3H13 proteini’de yer almaktadır (Şekil 4.33).

Bu proteinlerin 225’ü normoksik, 339 tanesi ise hipoksik koşullarda tanımlanmıştır. Normoksik koşullarda izole edilen proteinlerin yaklaşık %39’u hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Hipoksik chamber koşullarında tespit edilen proteinlerin yaklaşık %39’u hücre yüzeyinde lokalize olmuştur (Şekil 4.33).

- 3D Calu-1 tümöroidlerinde tüm koşullar altında tanımlanan tüm proteinlerin Venn diyagramı



- 3D Calu-1 tümöroidlerinde tüm koşullar altında tanımlanan hücre zarına yerleşmiş proteinlerin (hücre membran proteinlerinin Venn diyagramı)



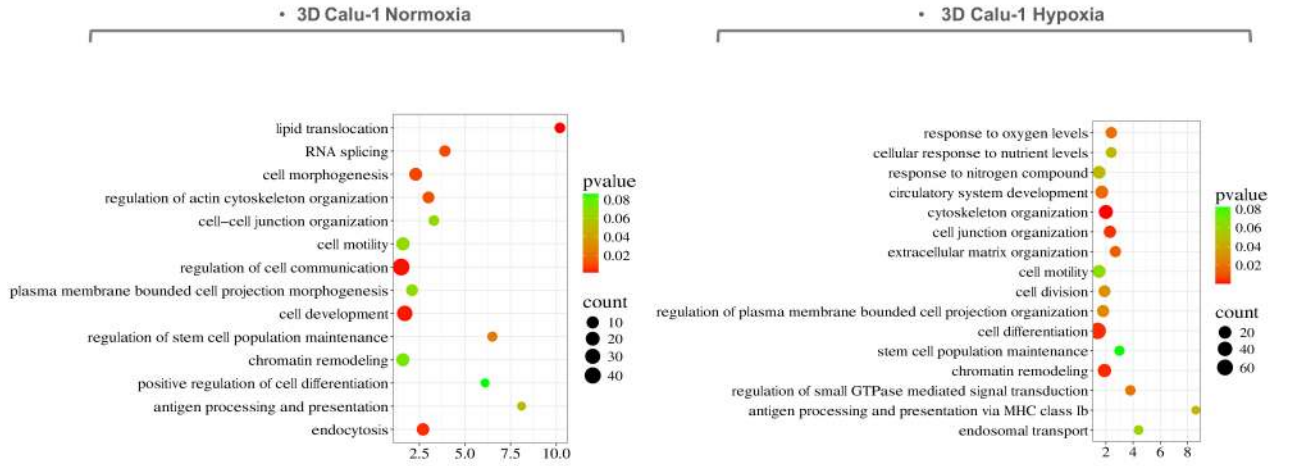
Condition (3D Calu-1)	Total Proteins	Cell Membrane Proteins (%)
Normoxia	225	~39%
Hypoxic chamber	369	~39%
All conditions	585	~39%

Şekil 4.33. 3D Calu-1 tümöroidlerinde farklı koşullarda tanımlanan toplam protein ve hücre membran protein dağılımları.

3D Calu-1'e ait tanımlanmış proteinler ile ilgili biyolojik süreç analizleri (Gene Ontology (GO); Biological Process) Şekil 4.34'da sunulmuştur. Analiz sonuçlarında normoksik ve hipoksi koşullarında öne çıkan biyolojik süreçleri ortaya koymaktadır. Hipoksi modelinde ise, hipoksi-spesifik süreçlerin belirginleştiği gözlenmiştir.

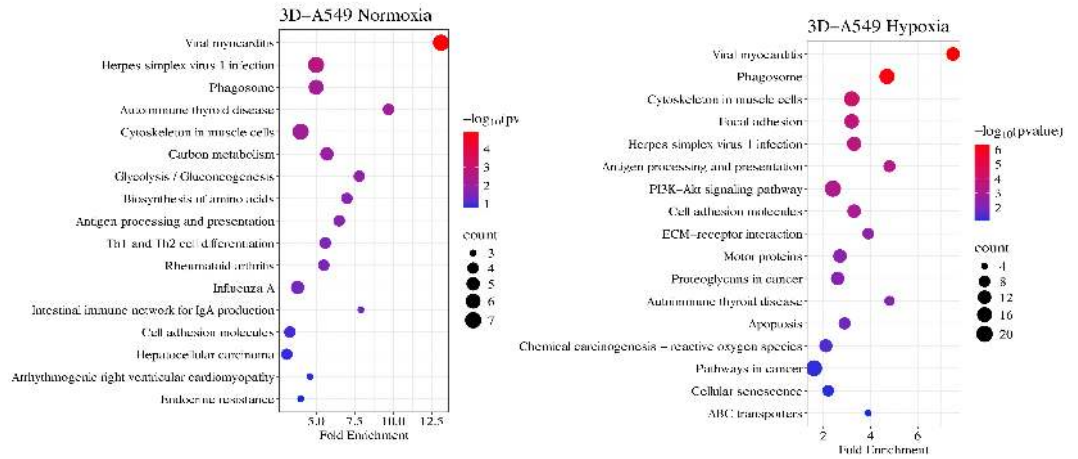
3D Calu-1 normoksi koşullarında hücre iskelet ve yapı organizasyonu ile ilişkili olan süreçler (*cell morphogenesis, regulation of actin cytoskeleton organization, cell-cell junction organization, microtubule anchoring, cell motility*) öne çıkarken, kromatin yeniden düzenlenmesi (*chromatin remodeling*), kök hücre popülasyonunun sürdürülebilirliğin düzenlenmesi (*regulation of stem cell population maintenance, p=0.024*), hücre farklılaşması (*positive regulation of cell differentiation, p=0.086*) ve antijen sunumu (*antigen processing and presentation, p=0.052*) süreçlerinde zenginleştiği saptanmıştır (Şekil 4.34).

Hipoksik koşulda ise; iskelet ve yapı organizasyonuna (*"cytoskeleton organization"*, *"ECM-organization"* vb.) ek olarak, oksijen seviyesine yanıt (*response to oxygen levels, p=0.018*), besin seviyesine yanıt (*cellular response to nutrient levels, p=0.047*), nitrogen bileşenlerine yanıt (*response to nitrogen compound, p=0.048*), dolaşım sisteminin gelişimi (*circulatory system development, p=0.16*) dikkat çeken süreçler yer almaktadır. Öte yandan hücre farklılaşması (*cell differentiation, p=0.0032*), kök hücre popülasyonunun sürdürülebilirliği (*stem cell population maintenance, p=0.082*) ve GTPaz sinyal iletiminin düzenlenmesi (*regulation of small GTPase mediated signal transduction, p=0.02*) hipoksida dikkat çeken diğer süreçlerdir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. 3D Calu-1'e ait tanımlanmış proteinlerin biyolojik süreç analizleri.

3D Calu-1'e ait tanımlanmış proteinler ile ilgili KEGG yolak analizleri (Gene Ontology (GO); KEGG pathway) Şekil Şekil 4.35'de verilmiştir. Analiz sonuçları normoksik ve hipoksi koşullarında anlamlı düzeyde pek çok yolağın varlığını göstermektedir. Normoksik koşullarda Rap1 sinyal yolağı (Rap1 signaling pathway), TNF sinyal yolağı (TNF signaling pathway) ve PI3K-Akt yolağı (PI3K-Akt signaling pathway) öne çıkan yolaklar arasındadır. Hipoksik koşullarda ise PI3K-Akt yolağı (PI3K-Akt signaling pathway) öne çıkmaktadır (Şekil 4.35).

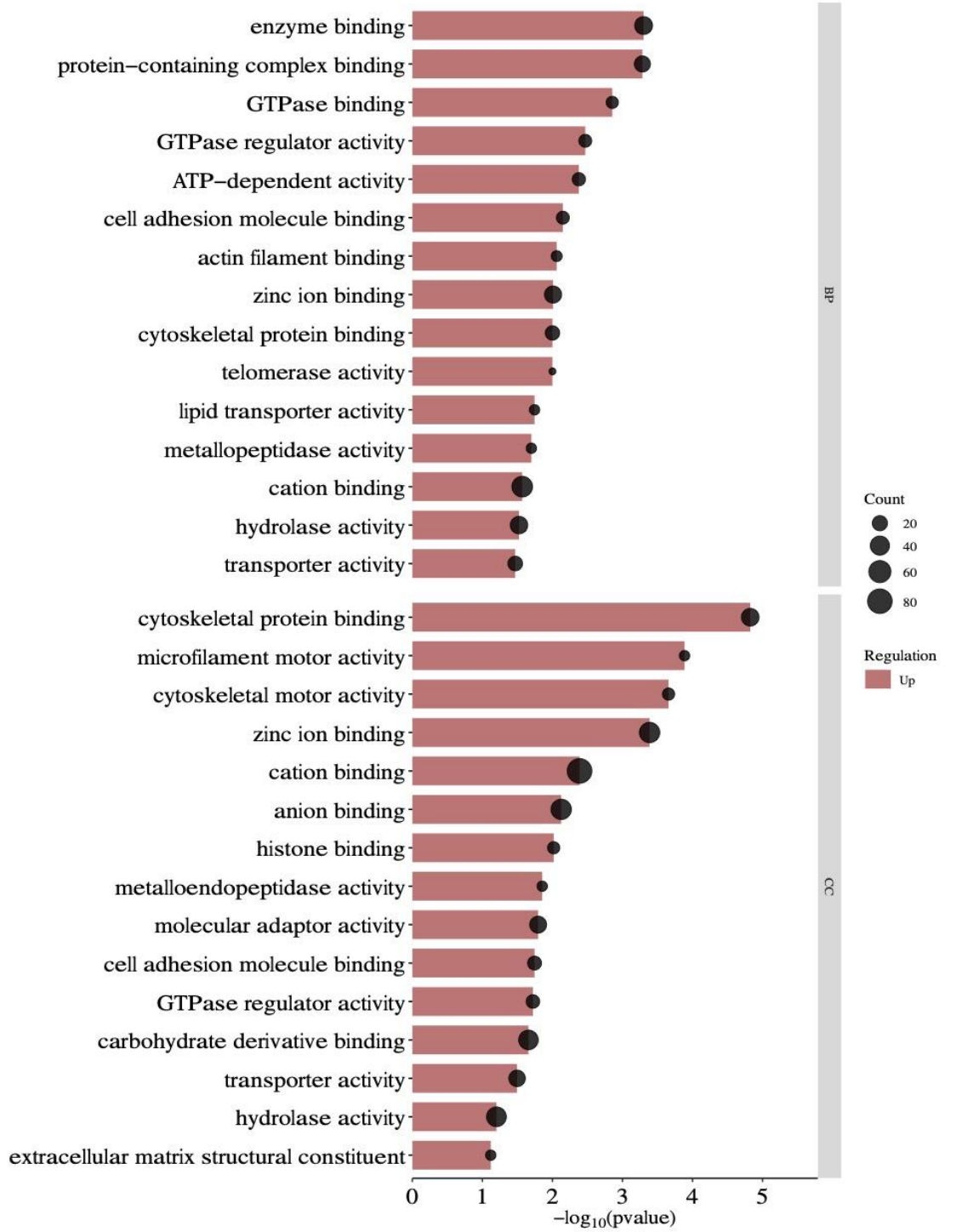


Şekil 4.35. 3D Calu-1'e ait tanımlanmış proteinlerin KEGG yolak analizleri.

3D Calu-1'de tanımlanmış proteinlerin moleküler fonksiyon yolak analizleri (Gene Ontology (GO); Molecular Function) Şekil 4.36'de sunulmuştur. Normoksi ve hipoksi koşullarında özgül fonksiyonların zenginleştiği gözlenmiştir.

3D Calu-1 normoksik koşulda iskelet organizasyon ve yapı organizasyonu ile ilgili fonksiyonların yanında, enzim aktivitesi, GTPaz aktivitesi ve iyon ilişkili fonksiyonların öne çıktığı görülmektedir. Benzer şekilde iskelet organizasyon ve yapı organizasyonu, GTPaz aktivitesi ve iyon ilişkili fonksiyonlar hipoksik koşulda da gözlenmektedir. Ek olarak hipoksik koşulda,

karbonhidrat türevlerine (*carbohydrate derivative binding*) bağlanma fonksiyonu da öne çıkmaktadır (Şekil 4.36).



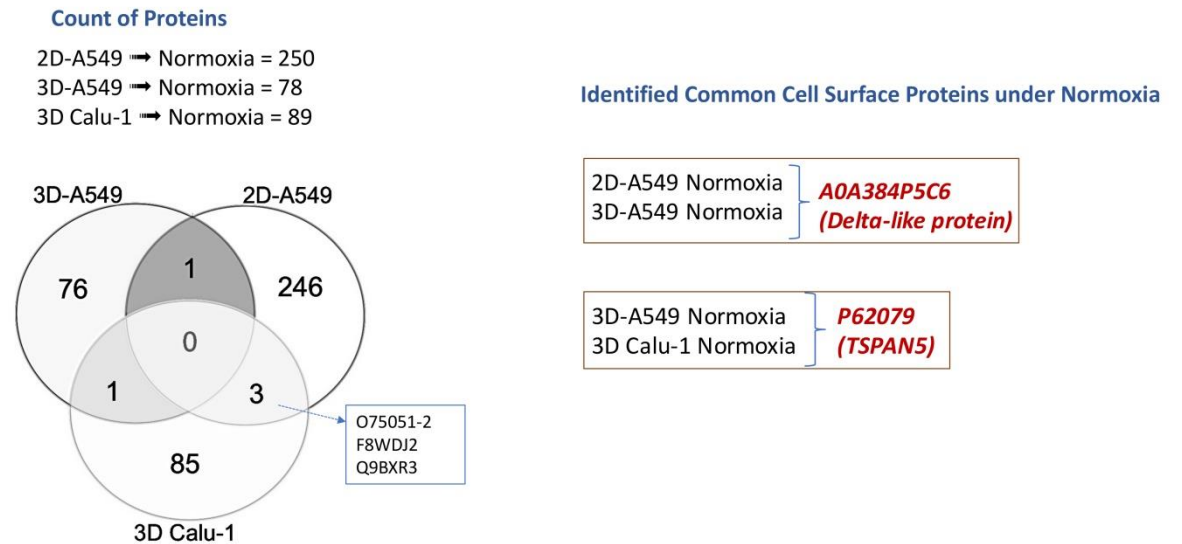
Şekil 4.36. 3D Calu-1’de tanımlanmış proteinlerin moleküler fonksiyon analizleri

4.1.8. Normoksik ve Hipoksik Mikroçevre koşullarında Koşullarında 2D ve 3D Akciğer Kanseri Modellerinde Tanımlanan Ortak Proteinlerin Literatür Bazlı İncelenmesi

4.1.8.1. Normoksik Koşullarda Tanımlanmış Hücre Membran Proteinlerinin Değerlendirilmesi

GO analizinde hücre yüzeyinde lokalize olduğu gösterilen proteinler Venn diagramında sunulmuştur. 2D-A549 hücrelerinde 250 adet protein tanımlanmıştır (Şekil 4.37). 3D-A549 tümöroidlerinde 78; 3D Calu-1 tümöroidlerinde ise 89 adet tanımlanmıştır. 2D ve 3D-A549 ‘da tanımlanan “Delta like protein (A0A384P5C6)” Notch ligandı olan Delta/Jagged transmembran ailesine ait protein olan bir protein olup; embriyonik gelişim, anjiogenez gibi süreçlerde rol almaktadır (Hildebrand ve ark., 2019). Notch sinyal yolunun KKH’leri koruduğu, EMT sürecine katıldığı ve kemoterapiye dirençliliği artırarak tümör hücrelerine hayatta kalma avantajı sağladığı bilinmektedir. Ek olarak DLL1’in gliomalarda aşırı eksprese olduğu bilinmektedir (Capaccione, 2013). DLL1 ayrıca 3D-A549 CoCl₂ koşulunda da varlığı tespit edilmiştir.

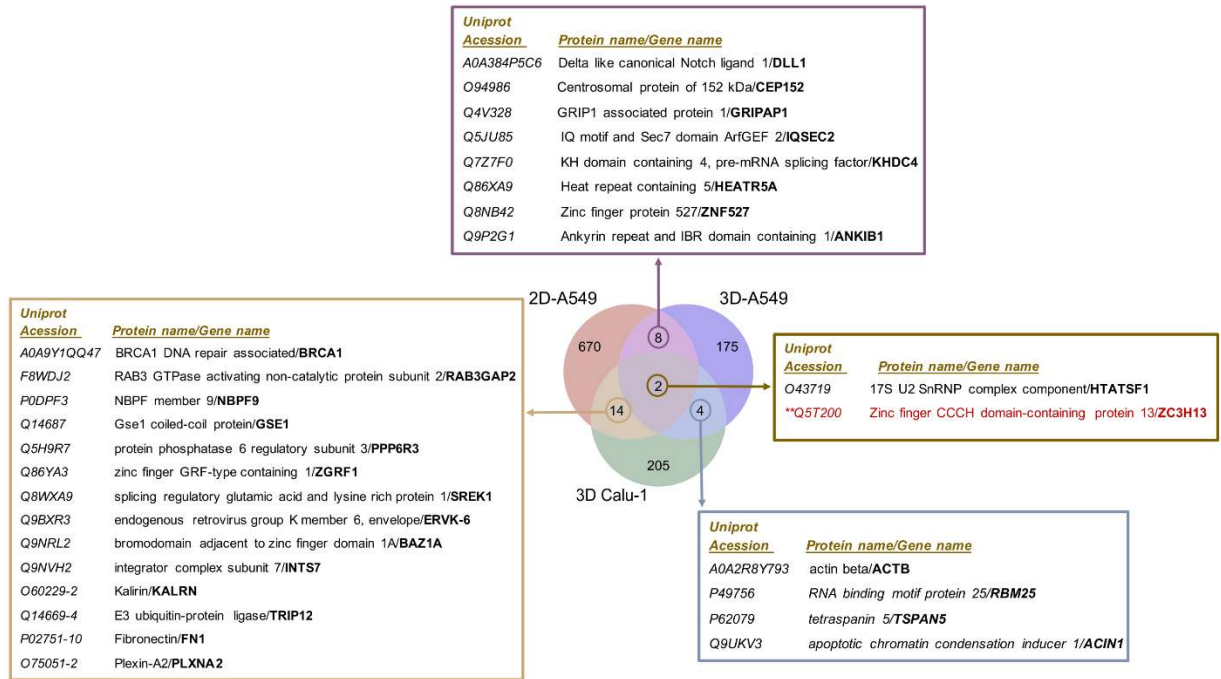
3D-A549 ve 3D Calu-1 arasında ortak olarak tanımlanan Tetraspanin ailesi üyesi olan TSPAN5, çeşitli doku ve organlarda yaygın eksprese edildiği ve Notch sinyal yolu aracılığı ile hücre farklılaşmasında rol oynadığı (ADAM10 ile etkileşime girer) bilinmektedir. Xie ve ark., (2021) TSPAN5’in Notch sinyal yolu üzerinden HCC’de EMT sürecini ve tümör metastazı teşvik ettiği göstermiştir. 3D Calu-1 ve 2D-A549’da ortak olarak tanımlanan insan genomuna entegre olmuş bir insan endojen retrovirus ailesi üyesi olan ERVK-6, başta kanser olmak üzere çeşitli hastalık süreçlerinde rol oynamaktadır. Literatürde ERVK-6’nın KKH süreci ile ilişkili olduğu bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak aynı aileye ait diğer proteinlerin (HERV-K) KKH gelişim sürecini desteklediği gösterilmiştir (Rivas ve ark., 2022).



Şekil 4.37. A549 ve Calu-1 modellerinde normoksik koşullar altında tanımlanan hücre membran proteinleri.

4.1.8.2. Normoksik Koşullarda Tanımlanmış Ortak Proteinlerin Değerlendirilmesi

Çalışmada tüm normal şartlar altında büyütülen 2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöröidlerinde tanımlanan tüm proteinler herhangi bir lokalizasyon ayrımı yapılmaksızın karşılaştırılmıştır (Şekil 4.38). Tüm koşulların normoksik koşullarında olan ortak olan 2 proteine rastanmıştır; O43719 (HTATSF1) ve Q5T200 (ZC3H13). Bu iki protein nükleusta lokalizedir. Bu proteinlerden nükleusta lokalize olan ZC3H13, m6A metilasyonunda rol oynayan bu protein embriyonik kök hücre pluripotensi özelliğini kontrol eder. mRNA işlenmesinde (alternative splicing) görev RNA bağlayıcı bir protein olan HTATSF1 ise çeşitli kanser türlerindeki ifadesi araştırılmıştır. Chang ve ark., (2021)'nın akciğer kanserinde hücre göçü ile ilgili yaptığı araştırmada, HTATSF1'nin akciğer kanseri göçünde fosfoglisenat kinaz (PGK1) ile birlikte aktif rol oynadığı gösterilmiştir. HTATF1'in knockdown'ı hücre göç kapasitesinde belirgin bir azalmaya yol açmıştır.



Şekil 4.38. Normoksik koşullarda 2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1'e modellerinde tanımlanan tüm proteinlerin ortak ve özgün dağılım profili

3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöröidlerinde ortak 4 protein tanımlanmıştır. Bunlardan ilki β -aktindir. RBM25 ise (P49756) Zhang ve ark., (2021) HCC (hepatoselüler karsinoma) kapsamında tarafından prognostik açıdan değerlendirdikleri araştırmalarında HCC hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edildiğini bulmuşlardır. İki hücre tümöröidi arasında ortak olarak tanımlanan Tetraspanin ailesi üyesi TSPAN5, çeşitli doku ve organlarda yaygın exprese edildiği ve Notch sinyal yolu aracılığı ile hücre farklılaşmasında rol oynadığı (ADAM10 ile etkileşime girer) bilinmektedir. Xie ve ark., (2021) çalışmalarında Notch sinyal yolu üzerinden HCC'de EMT sürecini ve tümör metastazı teşvik ettiği göstermiştir. İki tümöröid arasındaki diğer bir ortak protein olan ve apoptotik kromatin yoğunlaşma indükleyicisi olarak tanımlanan ACIN1 (Q9UKV3) hakkında Aoto ve ark.. (2025) ACIN1 knock-out fareler üzerinde yaptıkları araştırmada, fare embriyonik gelişimi için

önemli olduğunu ortaya koymuşlardır. HeLa hücrelerinde yapılan analizlerde knockdown edilmiş gen ekspresyonunu ve mRNA işlenmesinde değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (Rodor ve ark., 2016).

2D-A549 ve 3D-A549 örnekleri arasında 10 farklı protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden hücre yüzey Notch ligandı olan Delta/Jagged transmembran ailesine ait protein olan DLL1 (A0A384P5C6) embriyonik gelişim, anjiogenez gibi süreçlerde rol almaktadır (Hildebrand ve ark., 2019). Notch sinyal yolunun KKH'leri koruduğu, EMT sürecine katıldığı ve kemoterapiye dirençliliği arttırarak tümör hücrelerine hayatta kalma avantajı sağlar. Ek olarak DLL1'in gliomalarda aşırı eksprese olduğu bilinmektedir (Capaccione, 2013). CEP152 (O94986) 2D-A549 ve 3D-A549 modelleri arasındaki ortak tanımlanan proteinlerden biridir ve aynı zamanda 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinin hipoksi (chamber) koşullarında da ortak olarak tanımlanan proteinlerdendir. Sentrozomun ana bileşenini oluşturan sentriolün biyogenezinde ve hücre replikasyonunda rol oynayan CEP ailesinin bir üyesi olan CEP152, ekspresyon düzeyine bağlı olarak hücre bölünmesini önemli derecede etkileyebilir. CEP proteinlerinin aşırı ekspresyonu sentriol sayısında artmasına dolayısıyla daha fazla yavru hücrenin oluşmasına ve çoklu sentrozomlara yol açmaktadır. Düşük ekspresyonu ise iğ iplikçiklerinin oluşumunda sorunlara veya genetik materyalin doğru katılımını olumsuz bir şekilde etkileyebilmektedir. Dolayısıyla CEP proteinlerinde gerçekleşecek herhangi bir mutasyon veya modifikasyon karinogeneze yol açabilir (White, 2011). GRIPAP1 (Q4V328) ise translokasyon renal hücreli karsinomda rol oyandığı bildirilmiştir (Class ve ark., 2017; Du ve ark., 2023). IQSEC2 (Q5JU85), mutasyonlarının zihinsel engellilik vb. hastalıklara yol açtığı bilinmektedir (Ren ve ark., 2024). KHDC4 (Q7Z7F0) ise prostat kanserinde artan ifadesinin daha düşük sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hu ve ark., 2025). ANKIB1 (Q9P2G1), RING E3 ubiquitin ligaz ailesinin bir üyesidir, bu ailenin işlev bozukluğu, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, kanser veya metabolik rahatsızlıklar olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir (Liu ve ark., 2024).

2D-A549 ve 3D Calu-1 arasında 14 adet ortak protein tanımlanmıştır. Bunlardan BRAC1'nin (A0A9Y1QQ47) özellikle meme kanseri ilişkisi çok iyi bilinen bir proteindir (Rosen ve ark., 2003). Hücre çoğalması, farklılaşması gibi hücresel süreçlerde önemli genler arasında yer alan ve hücre içi vezikül trafiğinin düzenlenmesinde görev yapan RAB3GAP2 (F8WDJ2) ise; meme kanseri, osteosarkom, rahim ağzı kanseri gibi kanserlerde yüksek ifade edilmiştir (Pourrezaei ve ark., 2025). NBPF9 (P0DPF3), DUF1220 protein alanına bağlanma ile karakterize edilen NBPF ailesinin bir üyesidir. Otizm, şizofreni, nöroblastom gibi hastalıklar ile ilişkilendirilmesinin yanı sıra akciğer adenokarsinomunda da yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2015; Wang ve ark., 2020). Prolin bakımından zengin bir protein olan GSE1 (Q14687) ise, meme kanserinde proliferasyon ve metastazı desteklerken ve mide kanserinde onkogenik olduğu tespit edilmiştir (Ding ve ark., 2018). Bunun yanında akciğer adenokarsinomlarında KLF6 regülasyonu üzerinden hücrelerin göçünü ve çoğalmasını teşvik ettiği

gösterilmiştir (Meng ve ark., 2024). KHDAK tedavisi gören hastalardan izole edilen ekstra veziküller ile yapılan proteomik çalışmalarında da rastalanan PPP6R3 (Q5H9R7) (Torasawa ve ark., 2023) yine ortak olarak tanımlanan proteinler arasındadır. DNA onarımında ve hücrelerin sağkalımında rol oynayan ZGRF1'in (Q86YA3) yüksek ifadesi çeşitli kanserlerde kötü prognozla ilişkili olduğu öngörülmektedir (Yan ve ark., 2021). MCF7 mamosferler ile yapılan bir çalışmada ZGFR1 knockdown edilerek koloni oluşturma, göç ve mamosfer oluşturma yetenekleri araştırılmış, belirlilik kök hücre biyobelirteçlerine bakılmış ve sonuçta ZGFR1'in meme kanserinde kök hücre özelliklerini düzenleyen bir modülatör olduğunu bildirmişlerdir (Ge ve ark., 2020). SREK1 (Q8WXA9), HCC'de onkogen olarak karsinogenez ile ilişkilendirilmiştir (Chang ve ark., 2022). ERVK-6 (Q9BXR3) HIV ile ilişkilendirilmiş bir endojen retrovirüstür. Kromatin yeniden düzenlenmesinde görev alan BAZ1A (Q9NRL2) ise kollektoral kanseri hastalarında yüksek ifade seviyelerine sahip olduğu bulunmuştur (Mohan ve ark., 2024). INTS7 (Q9NVH2), yapılan bir çalışmada baskılanmasının kemik iliği mezenkimal kök hücresinin koloni oluşumunu ve göç kapasitesini bozabileceği, hücre apoptozunu uyarılabileceği bulunmuştur. Başka bir araştırmada ise akciğer adenokarsinomu, HCC ve meme kanserinde aşırı derecede ifade edildiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2024). KALRN (O60229-2), bu gen melanoma, akciğer kanseri, kollektoral kanser gibi çeşitli kanserlerde mutasyona uğradığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2020). TRIP12 (Q14669-4) tümör başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynamaktadır. Akciğer adenokarsinomunda yüksek mutasyon sıklığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2021). Yapılan bir araştırmada Wnt sinyali varlığında, kromatin yeniden şekillenmesinde rol oynayan SWI/SNF kompleksinin katalitik bileşenini übikitinasyona uğratarak bu mekanizmada rol alır (Kassel ve ark., 2025). Nöronal gelişim sırasında yaygın ifade edilen ve nöronal apoptozda rol oynayan PLXNA2 (O75051-2), şizofreni ile ilişkilendirilmiştir (Wray ve ark., 2007).

4.1.8.3. Hipoksik Koşullarda Tanımlanmış Hücre Mebmrn Proteinlerinin Değerlendirilmesi

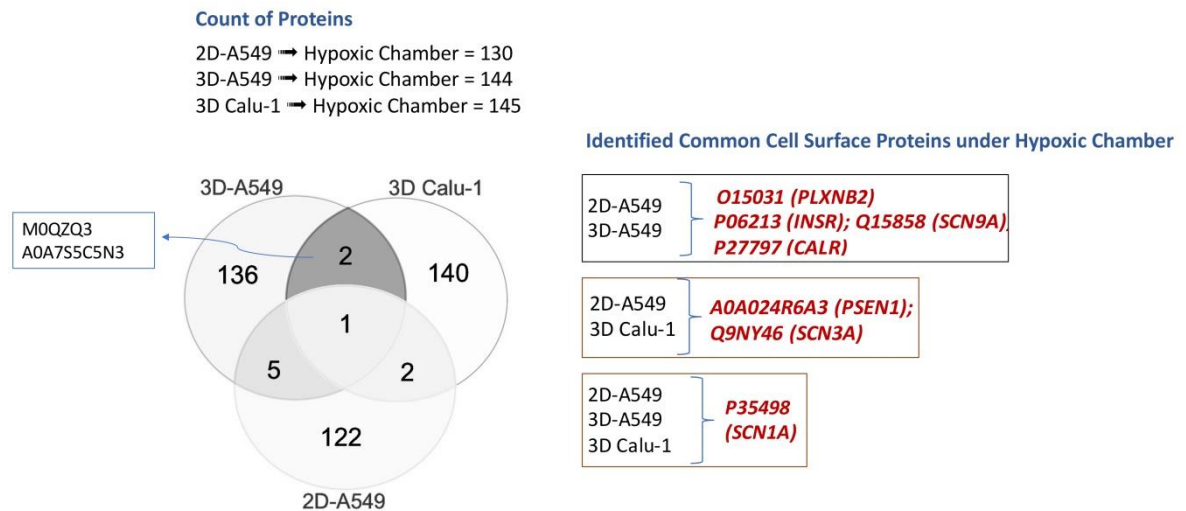
Hipoksik chamber koşullarında tanımlanan proteinler arasından, GO analizinde hücre yüzeyinde lokalize olduğu belirlenen proteinler Venn diyagramında sunulmuştur (Şekil 4.39). 2D-A549 hücrelerinde 130 adet protein tanımlanmıştır. 3D-A549 tümöroidlerinde 144; 3D Calu-1 tümöroidlerinde ise 145 adet tanımlanmıştır (Şekil 4.39).

2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1'de ortak tanımlanan yüzey proteini olan SCN1A (P35498), gerilim-kapılı sodyum kanalları (VGSC), membran boyunca sodyum iyonlarının geçirgenliğini artıran transmembran proteinleridir. Tümör hücreleri ve dokuları çeşitli iyon kanallarına sahiptir ve bu kanallar kanser gelişiminde metastazında rol oynayabilir. Bazı çalışmalarda VGSC'lerin meme kanseri, prostat kanseri gibi bazı kanserler için kritik hormonların salgılanmasına neden olduğu bildirilmiştir. Akciğer kanseri, VGSC mutasyonu yaygın görülen kanser türleri arasındadır. Kanserlerde en fazla mutasyon gözlenen VGSC'lerden biri de SCN1A'dır (Liu ve ark., 2024).

Hücre iskelet protein ailesi üyelerinden spektrin ailesine ait 3D-A549 ve 3D Calu-1’de ortak tanımlanan SPTBN4 (M0QZQ3) ise (membran ilişkili proteinler arasındadır), hücre döngüsü, sinir hücresi gelişimi gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynamaktadır. İnsan embriyonal karsinom hücre hattı olan NT2 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada SPTBN4 geninde yeni bir miRNA tanımlanmış (SPTBN4-miR1) ve birlikte yüksek ifadelerinin farklılaşma süreciyle ilişkili olarak pluripotent çıkışı teşvik ettiği bildirilmiştir (Hosseini ve ark., 2019). Ek olarak bir çalışmada DNA metilasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Sanchez-Mut ve ark., 2013).

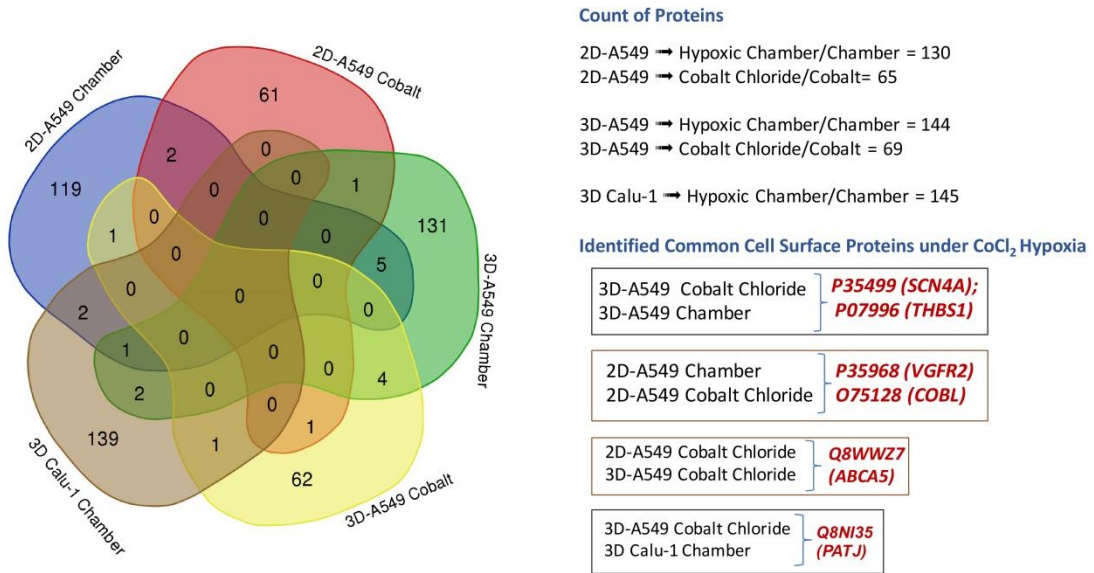
2D-A549 ve 3D-A549 ortak tanımlanan PLXNB2 proteini (O15031) kaynağı bilinmeyen primer kanserlerde (CUP,) mutasyonunun (G842C) KKH özelliklerini desteklediği bildirilmiştir (Brundu ve ark., 2023). PTPRN2 (Q92932), vezikül-aracılı salgı süreçlerinde rol oynayan bu proteindir. Meme kanserinde metastatik ilişkisi (Sengelaub ve ark., 2016), hipoksik koşullar altında PTPRN ve PTPRN2 gen değişimleri (Liang ve ark., 2018) ve DNA metilasyonunda biyobelirteç rolü bildirilmiştir (Tsai ve ark., 2025). CALR (P27797), kalsiyum homeostazı, adhezyonu, protein katlanması ve tümör progresyonunda rol oynayar. Meme kanserinde HIF-1a bağımlı bir şekilde Wnt/B-katenin sinyal yolu üzerinden meme kanseri kök hücre fenotipini teşvik ederek meme kanseri gelişimini arttırdığı (Liu ve ark., 2021) ve H3K9me2 metilasyonundan sorumlu olan G9a ile etkileşime girerek DNA metilasyonuna aracılık edebileceği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2022). SCN9A (Q15858), VGSC protein ailesinin bir üyesidir. Mide kanserinde yüksek ifade edildiği ve tümör ilerlemesine katkı sağladığı bildirilmiştir (Xia ve ark., 2016).

2D-A549 ve 3D Calu-1’de tanımlanan PSEN1, akciğer adenokarsinomunda Notch/EGFR yolunu aktive ederek EMT sürecine katkı sağlamıştır (Song ve ark., 2024). Notch sinyal yolunun KKH’leri koruduğu, EMT sürecine katıldığı ve kemoterapiye dirençliliği artırarak tümör hücrelerine hayatta kalma avantajı sağladığı bilinmektedir. SCN3A (Q9NY46) ise, gerilim-kapılı sodyum kanalları proteinlerindendir ve kanserlerde en fazla mutasyon gözlenen VGSC’lerden biri de SCN3A’dır (Liu ve ark., 2024).



Şekil 4.39. A549 ve Calu-1 modellerinde hipoksik chamber koşullarında tanımlanan hücre membran proteinleri.

Hipoksik chamber ve CoCl_2 koşullarında tanımlanan, GO analizinde hücre yüzeyinde lokalize olduğu gösterilen proteinler Venn diagramında sunulmuştur (Şekil 4.40). 2D-A549 CoCl_2 koşullarında 65; 3D-A549 tümöroidlerinde 69 protein tanımlanmıştır (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. A549 ve Calu-1 modellerinde hipoksik koşullarda (chamber ve CoCl_2) tanımlanan hücre membran proteileri.

4.1.8.4. Hipoksik Koşullarda Tanımlanmış Ortak Proteinlerin Değerlendirilmesi

Çalışmada yalnızca 72 saatlik chamber koşulunda hipoksik mikroçevrede büyütülen 3D Calu-1 tümöroidlerinde tanımlanan proteinler ile 2D-A549 ve 3D-A549 24, 48 ve 72 saatlik chamber koşulunda hipoksik mikroçevrede büyütülen örneklerde tanımlanan tüm proteinler herhangi bir lokalizasyon ayrımı yapılmaksızın karşılaştırılmıştır (Şekil 4.1). 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde yalnızca 72. saatte tanımlanan gruplar arasında yapılan karşılaştırmada ortak protein tespit edilememiştir.

Analiz sonuçlarına göre 3 protein 2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1 hipoksi chamber koşulları için ortaktır. Bu proteinlerden nükleusta lokalize olan ZC3H13 iki farklı hücrede ve iki farklı hücre kültürü modelinde normoksi ve hipoksi (CoCl_2 ve Hipoksik chamber) farketmeksizin tanımlanmıştır. Tanımlanan diğer bir protein olan SCN1A (P35498), gerilim-kapılı sodyum kanalları (VGSC), membran boyunca sodyum iyonlarının geçirgenliğini artıran transmembran proteinleridir. PCSK5 (Q92824) ise, kalsiyuma bağımlı bir serin proteazlardan oluşan proprotein konvertaz subtilisin kexin (PC/PCSK) ailesinin tümör ilerlemesini düzenleyen bir üyesidir. Bu proteaz ailesi olgunlaşmamış proteinleri işleyerek fonksiyonel proteinlere dönüştürürler. PCSK5 ayrıca VEGF-C ve VEGF-D'yi işleyerek VEGFR-3 ve VEGFR-2 ile etkileşimini artırır. Bu

etkileşimler sonucunda anjiyogenez ve lenfanjiyogenezini arttırarak tümör büyümesi ve metastazını artırır (Gong ve ark., 2025).

3D Calu-1 ve 3D-A549 tümöröidlerinde hipoksik chamber koşulunda ortak olarak tanımlanan proteinlerin 13 proteinin 10 tanesinin yalnızca bu iki grupta ortaktır (ŞekilX). ŞekilX.c 'de bu ortak 10 proteine ait GO analizleri ve protein "Uniprot accession" numaraları ve "protein/gen isimleri" verilmiştir. Bu proteinlerden özellikle ECM'nin önemli bileşenlerinden LAMB2 (P55268) ile ilgili literatürde hipoksiye dirençli mide kanseri hücrelerinden salınan veziküler ile taşınarak normoksik koşullardaki mide kanseri hücrelerinin metastatik karakterini arttırabileceğine yönelik bulgulara değinilmiştir (Li ve ark., 2024). ASXL2 (Q76L83), epigenetik regülasyonda, gen ekspresyonun dengelenmesinde ve hücre farklılaşmasında rol oynayan ASXL ailesinin bir üyesidir. ASXL2, diğer ASXL üyelerinden daha geniş bir tümör spektrumuna sahiptir ve karsinogenezde çeşitli önemli roller üstlenmektedir. ASXL2 mutasyonları mesane tümörleri, myeloid tümörleri ve KHDAK tümörlerinde yaygın olarak bulunur. ASXL2'nin aşırı ifadesi ise kolorektal kanserde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Meme kanserinde ise aşırı ifadesi tümör malignitesini hızlandırdığı bildirilmiştir. Ancak HCC doku ve hücre profilinde ASXL2'nin ifade düzeyinin belirgin bir şekilde azaldığı ve bu azalmanın hücre büyümesi, göçü ve invazyonunu etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca nazofarengeal karsinom (NPC) üzerinde yapılan bir çalışmada ASXL2'nin T hücrelerinin aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Böylece ASXL2'nin tümör ilerleyişinin yanı sıra tümör mikroçevresi ve bağışıklık üzerinde de etkisi olduğu anlaşılmaktadır (Liu ve ark., 2024). Yine başka bir çalışmada, petrol ve hipoksi gibi çevresel faktörler ile maruz bırakılan balıklarda, transkripsiyon ile ilgili genlerde DNA metilasyon değişikliklerinin kalıcı olarak devam ettiği gösterilmiş, bunun da epigenetik düzenlemelerin strese bağlı yeniden şekillenebileceğini ortaya koyabileceği bildirilmiştir (Jones ve Griffitt, 2022). Spektrin ailesine ait SPTBN4 (M0QZQ3) ise, hücre döngüsü, sinir hücresi gelişimi gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynamaktadır. İnsan embriyonal karsinom hücre hattı olan NT2 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada SPTBN4 geninde yeni bir miRNA tanımlanmış (SPTBN4-miR1) ve birlikte yüksek ifadelerinin farklılaşma süreciyle ilişkili olarak pluripotent çıkışı teşvik ettiği bildirilmiştir (Hosseini ve ark., 2019). Ek olarak bir çalışmada DNA metilasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Sanchez-Mut ve ark., 2013). Bromodomain ve PHD parmak içeren protein 3 olarak bilinen BRPF3 (Q9ULD4), HBO1 histon ve asiltransferaz (HAT) içeren ve başka alt birimler ile tetramerik bir iskele oluşturan bir protein olarak tanımlanır. Histon modifikasyonları transkripsiyon, replikasyon ve onarım süreçleri gibi kritik hücresel olayların düzenlenmesinde yer alırlar. Bromodomainler, gen transkripsiyonunu kolaylaştırmak amacıyla histon kuyruklarındaki asetillenmiş lizin kalıntılarına tanıyan evrimsel olarak korunmuş modüllerdir. BRPF3'ün yumurtalık kanserinde yüksek ifade edildiği ve düşük sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Barman ve ark., 2021; Bitler ve ark., 2023). SLTM (Q9NWH9), DNA ve RNA bağlayıcı bir bölgeye sahip nükleusta lokalize bir proteindir ve transkripsiyon baskılayıcı olarak görev yapar.

SLTM'nin baskılanması, hücre döngüsü bozuklukları, kromatin kondensasyonu ve sitokrom-c salınımı ile apoptozu uyarabilir. HCC'de yapılan bir çalışmada birçok tümörün progresyonunda rol oynayan ve kötü prognoz ile ilişkilendirilen DTL (denticleless E3 ubiquitin protein ligaz homologu) hipoksik mikroçevrede HIF1a aracılığıyla transkripsiyonel olarak aktive edilmiştir. DTL, SLTM'nin ubiquitinasyonunu ve bozunmasına neden olarak SLTM'nin Notch sinyal yolunu üzerindeki baskısını azaltır ve böylece Notch sinyal yolu aktive edilir. Böylece DTL onkogenik işlevini yerine getirir. Sonuç olarak HIF1a/DTL/SLTM birlikte HCC tümör progresyonunda önemli olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2024). ZNF644 (Q9H582), nükleusta lokalize, C2H2 benzeri çinko parmak motifleri içeren ve G9a/GLP ile etkileşen ve histon metilasyonunda rol bir proteindir. Histon modifikasyonlarında meydana gelen değişiklikler progenitör hücrelerin, hücre döngüsünden çıkmalarını ve farklılaşmasını sağlayabilmektedir. Bu süreçlere etki eden moleküllerden biri de G9a/GLP'dir. Bu moleküller embriyogenez sırasında hücre farklılaşmasında rol oynarlar. Embriyonik kök hücrelerde pluripotens ile ilişkili genlerin uzun süreli susturulmasını sağlarlar. ZNF644'ün G9a/GLP ile stabil bir kompleks oluşturulduğu bildirilmiştir (Olsen ve ark., 2016). Ek olarak ZNF644'ün yüksek ifadesi meme kanseri tedavisinde radyasyon tedavisine duyarlılığı etkilemesi ile ilişkilendirilmiştir (Zhao ve ark., 2023). INF2 (Q27J81) aktin polimerizasyonu ve depolimerizasyonunda rol oynayan formın ailesine ait bir proteindir. Bazı tümörler için onkogenik bazı tümörleri için ise tümör baskılayıcı olarak tanımlanmıştır. INF ayrıca oksidatif stres ile de ilişkili bir proteindir (Zhao ve ark., 2022). Yüksek ifadesinde apoptozu tetiklerken, susturulduğu çalışmalarda HIF1a ifadesi artmıştır. INF2 mitokondriyal stresi module ederek ve HIF1a sinyal yolunu bastırarak oksidatif stres aracılı hücre ölümü için yeni bir aracı olarak tanımlanabileceği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2019). IFIH1 (Q9BYX4) ise, çift iplikli RNA'yı indükleyerek immün sisteme katılır. PSAT1-IRF1-IFIH1 eksenini aracılığıyla transkripsiyonel yeniden programlanmayı teşvik eder ve akciğer kanseri hücre metastazını etkiler. Ayrıca ilaç dirençli yumurtalık kanserinde aşırı ifade edilmektedir (Li ve ark., 2024).

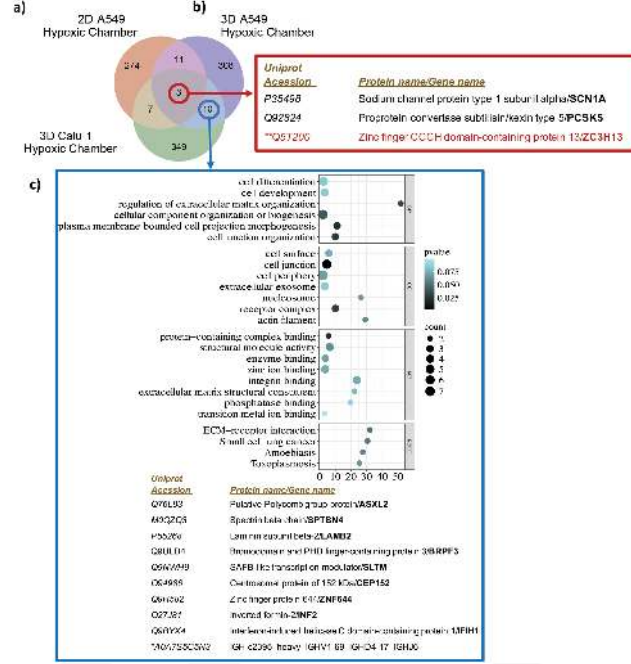
Hipoksik chamber koşulunda 2D-A549 ve 3D Calu-1 arasında 10 adet ortak protein tanımlanmış ve bu proteinlerden 7'si (uniprot accession no: A0A024R6A3, Q9NY46, O14802, Q9NV58, Q8IYD1, Q05BV3, O94964) bu iki grupta da saptanmıştır. Bu proteinlerden 10 protein arasında yer alan, Q5T200, O94964 ve Q9NV58 uniprot numaralı proteinler 72h'lik hipoksida ortaktır. PSEN1 (A0A024R6A3), Notch reseptörleri gibi integral proteinlerin intramembran bölünmesini katalize eden gama-sekretaz kompleksinin olası alt birimi olarak tanımlanmıştır. PSEN1, Alzheimer, kolon karsinomu, mesane, HCC ve insan T hücreli akut lenfoblastik lösemiler ile ilişkilendirilmiştir (Meng ve ark., 2016). Ek olarak DNA metilasyonu ile de ilişkilendirilmiştir (Kunoh ve ark., 2024). SCN3A (Q9NY46) ise, gerilim-kapılı sodyum kanalları proteinlerindendir ve kanserlerde en fazla mutasyon gözlenen VGSC'lerden biri de SCN3A'dır (Liu ve ark., 2024). RNF19A (Q9NV58), E3 ligaz aktivitesine sahip RING parmak protein süper ailesidir. Literatürde çeşitli kanserlerde RNF19A düzensizliği veya işlev bozukluğu doğrulanmıştır. Yüksek

ekspresyonunun KHDAK hastalarında kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Deng ve ark., 2024). Prostat kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada RNF19'un TRIP13'ü ubiquitin ile işaretlediği ve Androjen reseptörü ve HIF1a tarafından transkripsiyonel olarak aktive edildiği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2023).

Hipoksik chamber koşulunda 2D-A549 ve 3D-A549 arasında 14 adet ortak protein tanımlanmış ve bu proteinlerden 11'si (uniprot accession no: Q92932, O43719, A0A3B3IS53, Q15858, P60709, Q6DN14, O15031, Q9P2K8, P06213, Q13459, P27797) bu iki grupta da saptanmıştır. Bu proteinlerden ilki, PTPRN2 (Q92932), vezikül-aracılı salgı süreçlerinde rol oynayan bu proteinin meme kanserinde metastatik etkisi incelenmiştir (Sengelaub ve ark., 2016). Yine meme kanseri hücre hatlarında yapılan başka bir çalışmada hipoksik koşullar altında PTPRN ve PTPRN2 gen düzeyindeki ifadeleri araştırılmıştır (Liang ve ark., 2018). Ayrıca DNA metilasyonunda potansiyel bir metilasyon biyobelirteci olabileceği bildirilmiştir (Tsai ve ark., 2025).

HTATSF1 (O43719) ise tüm koşulların normoksik koşullarında da ortak olarak tanımlanan proteinlerden biridir. KAT6A (A0A3B3IS53), epigenetik modifikasyonlarının düzenlenmesinde, genomik stabilitenin korunmasında ve bağışlık tepkisinin aktivasyonunda, hematopoetik ve nöral kök hücrelerin bakımında ve hücre yaşlanmasında rol oynamaktadır. Lösemi, HCC ve meme kanseri gibi pekçok kanser türünde onkogen olduğu bildirilmiştir (Zheng ve ark., 2025). KAT6A'nın kök hücre ilişkili çalışmaları literatürde yerini almaktadır (Fei ve ark., 2021). Ca^{+2} sensörü olan MCPT1 (Q6DN14) ise, prostat kanserinde yapılan bir çalışmada hipoksiye bağlı bir şekilde uyarıldığını; tümör gelişiminde EMT sürecini teşvik ettiği bildirilmiştir. Tedavide hedeflenmesinin prostat kanserinde nöroendokrin farklılaşmayı önleyebileceği öngörülmektedir (Liu ve ark., 2024). Yapılan bir çalışmada MCPT1 geninin ilaca dirençli özofagus kanseri hücrelerinde hipermetile olduğu gösterilmiştir (Kong ve ark., 2021). Transmembran bir protein olan Plexin-B2 (O15031), birçok tümörde yüksek ifade edildiği bildirilmiştir. Meme kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada kanser kök hücreliliği, hücre döngüsü ve hücre kümelenmesi ile ilişkisini belirlemişlerdir. Dolaşımda oluşan hücre kümelenmesinin, akciğer metastazını teşvik edebileceği bildirilmiştir (Schuster ve ark., 2023). Başka bir çalışmada ise aynı aileden olan Plexin-B3'ün hipoksi indüklenen MET/SRC/FAK ve MET/SRC/STAT3/NANOG sinyal yolları için gerekli olduğu, hem hücre göçü hemde KKH özelliklerinin kazanılması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zuo ve ark., 2023). Glioblastoma kök hücre hattı kullanılarak yapılan bir çalışmada Plexin-B2'nin invazivlik kazanmalarında rol oynadığı bildirilmiştir (Huang ve ark., 2021). EIF2AK4 (Q9P2K8) amino asit yetersizliğinde rol oynayan bir protein kinazdır. HCC ile ilişkisi araştırılmıştır (Wen ve ark., 2021). Diğer ortak proteinlerinden olan insülin reseptörü (P06213), bir tirozin kinaz reseptörüdür. Miyozinler ATPaz aktivitesine sahip, aktin temelli motor moleküller olarak bilinir. GTPaz aktivatörü olarak görev yapan konveksiyonel olmayan miyozinler (Q13459), hücre içi organizasyonda rol oynar. ATP varlığında ve yokluğunda kuvvetli

bir afinite ile bağlanır. CALR (P27797), kalsiyum homeostazı, hücre adhezyonu, protein katlanması ve tümör progresyonunda rol oynayan bir proteindir. Meme kanserinde yapılan bir çalışmada CALR'ın HIF-1a bağımlı bir şekilde Wnt/B-katenin sinyal yolu üzerinden meme kanseri kök hücre fenotipini teşvik ederek meme kanseri gelişimini arttırdığı bildirilmiştir (Liu ve ark., 2021). Başka bir araştırmada ise CALR'ın H3K9me2 metilasyonundan sorumlu olan G9a ile etkileşime girerek DNA metilasyonuna aracılık edebileceği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2022).



Şekil 4.41. Hipoksik chamber koşulunda 2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1'da tanımlanan proteinlerin karşılaştırmalı analizi.

Hipoksik chamber koşulunda 2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1 modellerinde tanımlanan proteinlerin Venn diyagramları Şekil 4.41 (a)'da lokalizasyon ayrımı yapmaksızın ortak olarak tespit edilen proteinler Şekil 4.41. (b)'de ve 3D Calu-1 ve 3D-A549 tümöroidlerinde hipoksik chamber koşulunda ortak olarak tanımlanmış proteinlerin GO analizleri (Gene Ontology (GO); Molecular Function (MF); Biological Process (BP); Subcellular Localization (CC)) Şekil 4.41. (c)'de verilmiştir. Hücre yüzeyi, hücre-hücre etkileşimleri, bağlantıları ve ECM organizasyonu vb. bu ortak proteinler arasında zenginleşen süreçler olması dikkat çekicidir.

3D-A549 hipoksik chamber ve 3D-A549 CoCl₂ hipoksi koşullarında ortak 8 adet protein (uniprot accession no: O75146, Q8N6G6, Q9UKE5, Q8WXA9, Q7Z3U7, P35499, P07996 ve P20962) tanımlanmıştır. Bu proteinlerden bağışıklık ve taşıma mekanizmalarında görev yapan HIP1R (O75146) birçok tümörün oluşumunda rol aldığı bilinmektedir. Mide kanserinde yapılan bir araştırmada normal dokuya göre daha az ifade edildiği ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2020). ADAMTSL1 (Q8N6G6) ECM organizasyonundan ve ADAMTS proteazların aktivitesinin düzenlenmesinde görev yapmaktadır. Son yıllarda ADAMTSL ailesinin tümör ilerlemesindeki rolünü anlamaya yönelik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Zhang, ve ark.,

2021). Yine ortak proteinlerden biri olan TNK (Q9UKE5) Wnt sinyal yolunun temel aktivatörü olarak görev yapan serin/treonin kinazdır. Wnt sinyal yolu KKH özelliklerinin korunmasında rol oynar (Masuda ve ark., 2016). Ek olarak kolektoral kanserin proliferasyonunda ve ilerlemesine katkı sağlar (Takahashi ve ark., 2015). Alternatif splicing mekanizmasında rol oynayan SREK1 (Q8WXA9)'e ait bir varyantının (ekson 10 içeren) HCC tümörlerinde yüksek ifade edildiği ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chang ve ark., 2022). Kargo proteinlerinin membran trafiğini düzenlenmesinde rol oynayan MON2'de (Q7Z3U7) ortak proteinler arasındadır. Diğer ortak protein olan SCN4A (P35499), VGSC (voltaj kapılı sodyum kanalları) proteinlerdir. SCN4A'nın tümör gelişiminde ve bağışıklığa sızan hücrelerin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Lin ve ark., 2020). ECM proteinlerinden olan Thrombospondin-1 (P07996), tümör mikroçevresinde ana rol oynar. Thrombospondin-1 ayrıca anjiyogenez inhibitor görevi görür. Ayrıca kanser immün kaçısında da rol oynar. Tümör ilerlemesindeki rolü mikroçevrenin ve hücresel bileşimine bağlı olarak çok yönlüdür, bazı durumlarda zıt olabilmektedir. Sonuç olarak apoptoz, istila, göç, bağışıklık ve yapışma, kök hücre devamlılığı gibi süreçleri, düzenlediği bildirilmiştir (Huang ve ark., 2017; Kaur ve ark., 2021). Tümör oluşumunda ve ilerlemesinde alfa-timozin ailesinin bir üyesi olan Parathymosin (PTMS) (P20962), erken DNA replikasyonunda görev almaktadır. Çeşitli araştırmalarda homologu PTMA ile birlikte ifade seviyelerinin tümör göçü, malignitesi ve prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2018; Xiong ve ark., 2022).

2D-A549 hipoksik chamber ve 2D-A549 CoCl₂ hipoksi koşullarında ortak 4 adet protein (uniprot accession no: Q08050, O75128, P35968 ve Q13219) tanımlanmıştır. Bu ortak proteinlerden ilki olan FOXM1 (Q08050), DNA replikasyonunda ve mitozda rol oynayan genlerin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca FOXM1 insan kanserlerinin (akciğer, meme, HCC, pancreas) bir çoğunda ifade edilmiştir ve hücre göçü, metastaz, anjiyogenez süreçlerinde rol oynar (Quan ve ark., 2013; Halasi ve Gartel, 20113). HeLa, HepG2 ve MCF-7 hücreleri ile yapılan bir çalışmada FOXM1'in hipoksik koşullarda arttığını, aslında HIF1a'nın FOXM1'in promotorüne bağlandığını bildirmişlerdir (Xia ve ark., 2009). Daha da önemlisi FOXM1, pluripotens ilişkili genlerin (SOX2, KLF4, OCT4) transkripsiyonunu uyardığı bildirilmiştir (Kelleher ve O'Sullivan, 2016). Başka bir araştırmada ise DNA metilasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Teh ve ark., 2021). COBL (O75128) ise aktin iskeletinin yeniden organizasyonunda rol almaktadır. Yapılan bir araştırmada akciğer kanserinde DDC (Dopa dekarboksilaz) ve COBL arasında hücre döngüsünde rol oynayan yeni bir miRNA bulunduğu bildirilmiştir. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (P35968) ise bilindiği üzere VEGF-A, VEGF-C ve VEGF-D için bir hücre yüzeyi reseptörü görevi gören tirozin protein kinazdır. Anjiyogenez, vasküler gelişim ve geçirgenlik gibi önemli süreçlerde rol oynar. Ayrıca endotel hücrelerin, çoğalmasını, hayatta kalmasını, migrasyonunu ve farklılaşmasını sağlar. Aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesinde de rol oynadığı bildirilmiştir. Hipoksi ile de ilişkisi

(anjyogenez vb. süreçler) bilinmektedir. Son olarak epigenetik modifikasyonlar ile ilişkilendirilmiştir (Hedge ve ark., 2020). Pappalysin-1 (Q13219), IGF (insulin benzeri büyüme faktörü) ailesinin bir üyesidir. Pappalysin-1, IGF bağlayıcı proteinleri (IGFBP) keserek serbest bırakır. Pappalysin-1 çeşitli epitel kanseriyle ilişkilendirilmiştir.

3D Calu-1 hipoksik chamber ve 3D-A549 CoCl₂ hipoksi koşullarında ortak 6 adet protein (uniprot accession no: A0A096LNL9, Q8NI35, Q9UHB7, P24821, Q93074 ve Q8WWL7) tanımlanmıştır. Bu ortak proteinlerden ilki bir kromatin yeniden şekillenmesinde ve transkripsiyonel düzenlemelerde rol oynayan ATRX'dır (A0A096LNL9). İnsan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğramıştır (Pang ve ark., 2023). PATJ (Q8NI35) proteinlerin hücre zarına lokalizasyonlarını kolaylaştıran bir iskele proteinidir. Meme kanseri ile yapılan bir çalışmada meme kanseri kök hücrelerine ait sekrotomdan elde edilen biyobelirteç potansiyeli bildirilmiştir (Margaret ve ark., (2024). AFF4 (Q9UHB7), super elongation complex (SEC) transkripsiyon kompleksinin bir bileşenidir. AFF4 çok sayıda pluripotensi faktörünün transkripsiyonel uzamasının düzenlenmesinde görev alır. Baş boyun skuamöz hücreli karsinomda SOX'u artırarak, tümör başlatıcı kapasiteyi artırabileceği bildirilmiştir (Gao ve ark., 2020). TNC (P24821) bir ECM proteindir. Onkogenez sırasında geçici olarak ifade edilir. TNC KKH ile ilişkilendirilmiştir. Tümörlerde anjyogenez uyarır (Yang ve ark., 2019). MED12 (Q93074) RNA polimeraz II'ye bağlı genlerin transkripsiyonunda koaktivatör olan "Mediator" kompleksinin bir bileşenidir. Wnt sinyal yolu ile SHH (Sonic Hedgehog) sinyal yolu hedeflerinin sinyal yolunu düzenleyebilir. MED12 mutasyonları çeşitli kanserlerde görülmüştür. MED12'nin aşağı regülasyonu, TGF-Beta reseptör sinyalinin düzenlenmesi ve EMT'nin uyarımı yoluyla kolon ve akciğer kanserinde ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir (Luo ve ark., 2018). Siklin ailesinin bir üyesi olan CCNB3 (Q8WWL7), meme kanserinde yüksek ifadesinin, daha yüksek sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2022).

4.1.9. Proteomik analiz sonrası tanımlanan bazı proteinlerin mRNA düzeyindeki ifade değişikliklerinin araştırılması

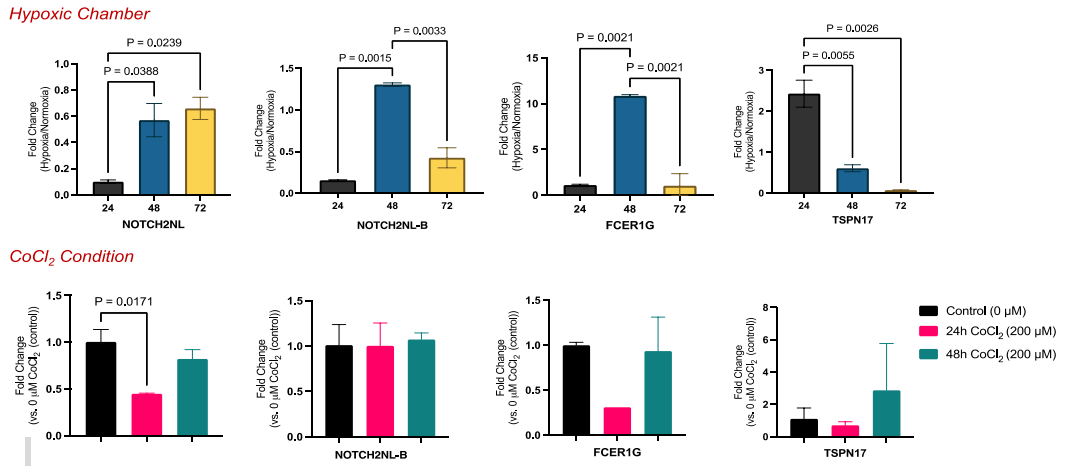
2D-A549 ve 3D-A549 tümöroidlerinde tanımlanan proteinlerden seçilmiş hücre yüzeyinde ve hücre içinde lokalize olan bazı proteinlerin gen düzeyindeki ifade değişiklikleri 3D-A549 modelinde analiz edilmiştir. Ek olarak bu proteinlerin iki hipoksi modelindeki ifade değişiklikleride araştırılmıştır.

3D-A549 tümöroidlerinde hücre yüzeyinde lokalize olan; **CXC5** (Chemokine XC receptor 1), **CD138** (Syndecan-1), **NOTCH2NL-B** (Notch homolog 2 N-terminal-like protein B), (NOTCH2NL-B, NOTCH2NL'nin bir paralogudur), **TSPN17** (TSPAN17, Tetraspanin 17) ve **FCER1G** (High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma) genlerinin iki farklı hipoksi modelinde mRNA düzeyindeki ifade profili incelenmiştir. İnternal kontrol olarak GAPDH

kullanılmıştır. İstatistiksel analiz olarak one-way ANOVA uygulanmıştır; anlamlılık düzeyleri grafik üzerlerinde gösterilmiştir (Şekil 4.42).

Beyin korteksi gelişiminde rol oynayan ve nöronal kök hücre popülasyonunu arttırdığına dair çalışmalar bulunan NOTCH2NL-B mRNA ifadesinin, hipoksi chamber 48. saatte anlamlı bir artış (1.305) göstermiştir (Suzuki ve ark., 2018; Lodewijk ve ark., 2020). Tümör mikroçevresinde de rol oynadığı bilinen ve bağışıklık sistemi ilişkili bir gen olan FCER1G, hipoksik chamber sisteminde anlamlı bir artış (10.8645) göstermiştir (Yang ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2022). Hipoksik chamber modelinde, tümör hücresinin büyümesi, metastazı ve invazyonunda rol aldığı bilinen bir transmembran bir protein olan TSPN17, 24. saatte artış (2.43123) gözlenmiştir (Şekil 4.42) (Guo ve ark., 2019).

Chamber modelinin aksine CoCl_2 modelinde, NOTC2NL-B ifadesinde anlamlı azalış ve artış görülmezken, FCER1G da hipoksida belirgin bir azalma (Control; 1.00027; 24h 0.310895; 48h 0.935161) görülmektedir. TSPN17’de 48. saatte belirgin bir artış görülmektedir (Control; 1.10747; 24h 0.713306; 48h 2.87551). Chamber sisteminden farklı olarak NOTCH2NL (Notch homolog 2 N-terminal-like protein) 24. saat hipoksida kontrole göre anlamlı bir azalış (0.449403) göstermiştir. Kemokin ailesinin bir üyesi olan CXCL5 geni ifadesinde, kontrole kıyasla 24. (0.263089) ve 48. (0.428878) saatte anlamlı bir azalma vardır. Hücre çoğalması, migrasyonu ve invazyonunda rol oynayan CD138, hipoksik chamber ve CoCl_2 modelinde de anlamlı bir değişime rastlanmamıştır (Şekil 4.42) (Mennerich ve ark., 2024; Qi ve ark., 2018).

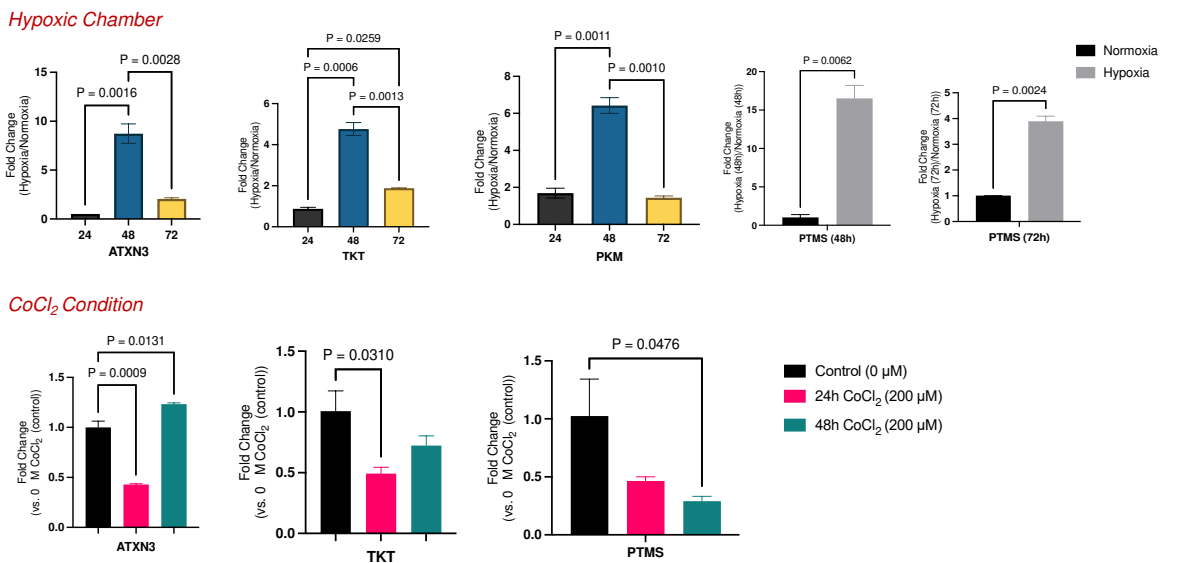


Şekil 4.42. Proteomik analizler sonucunda tanımlanan bazı hücre membran proteinlerinin, hipoksik koşullarda 3D-A549 tümöröidlerinde mRNA ifadeleri

3D-A549 tümöröidlerinde hücre içinde lokalize olan (intraselüler); **ATXN3** (Ataxin 3), **TKT** (Transketolase), **ENO1** (Alfa enolase), **PKM** (Pyruvate kinase) ve **PTMS** (Parathymosin) genlerinin mRNA düzeyindeki kat değişimi Şekil 4.43’te sunulmuştur. İnternal kontrol olarak GAPDH kullanılmıştır. İstatistiksel analiz olarak one-way ANOVA ve unpaired t-test uygulanmıştır; anlamlılık düzeyleri grafik üzerlerinde gösterilmiştir.

Hipoksik chamber kullanılarak oluşturulan modelde, hücre içinde lokalize olduğu belirlenen ATXN3, TKT, ENO1, PKM ve PTMS genlerinin 3D-A549 tümöroidlerinde mRNA ifade profili araştırılmıştır. ATXN3, TKT, ENO1, PKM ve PTMS genlerinin genel olarak anlamlı ve belirgin bir şekilde yüksek ifade düzeyleri dikkat çekmektedir. CoCl₂ hipoksi modelinde ise hücre içinde lokalize olduğu belirlenen ATXN3, TKT ve PTMS genlerinin mRNA ifade profili araştırılmıştır. Hücrede içinde dağınmış lokalize olan ATXN3; çeşitli kanserlerde onkogen olarak rol aldığı bilinmektedir (Cheng ve ark., 2024). Hipoksik chamber modelinde de ATXN3, 48. saatte anlamlı belirgin bir artış (8.72804) göstermişken, CoCl₂ modelinde 24. saatte anlamlı bir düşüş (0.429607) göstermiştir. EMT sürecinde, kemoterapi direnci gibi kanserde birçok olayın düzenlenmesinde rol oynayan TKT; 3D-A549 hipoksik chamber modelinde 48. saatte anlamlı belirgin bir artış göstermişken, CoCl₂ 24. saatte anlamlı bir azalış göstermektedir. PTMS ise; hücre çoğalmasında görevli nükleer bir protein olup pek çok kanser türünde yüksek ifade ettiği bildirilmiştir. PTMS, 3D-A549 hipoksik chamber modelinde anlamlı ve yüksek bir şekilde hem 48. saat (16.5273) hem de 72. saatte (3.8932) ifade edilirken, CoCl₂ modelinde ise özellikle 48. saatte anlamlı azalma (0.29) göstermiştir (Şekil 4.43) (Letsas ve ark., 2007; Hao ve ark., 2022).

Hem hücre yüzeyinde hem hücre içinde bulunan ve glikolizde görev alan ENO1 pek çok kanser için onkogen olarak görev yapar. Plazminojen reseptörü olarak görev yapmasının dışında angiogenezi uyarak kanser gelişimine katkı sağlar (Huang ve ark., 2022). ENO1 hipoksik chamber modelinde 24. saate (0.185) kıyasla 72. (1.05) saatte anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmektedir. Glikolizde görev alan ve çeşitli tümör süreçlerinde rol oynayan PKM, hipoksik chamber modelinde 3D-A549 tümöroidlerinde 48. saatte anlamlı yüksek (6.42235) bir şekilde ifade edilmiştir (Şekil 4.43) (Israelsen ve Vander Heiden, 2015).



Şekil 4.43. A549 modellerinde tanımlanan bazı hücre içinde lokalize olan proteinlerinin, hipoksik koşullarda 3D-A549 tümöroidlerinde mRNA ifadeleri

4.2. Tartışma

Bu araştırmada KHDAK tümöroidlerinde hipoksik ve normoksik mikroçevre koşullarında, özellikle akciğer kanseri kök hücrelerine ilişkili mekanizmalara odaklanılmış, ayrıca tanı ve tedavide kullanılabilecek potansiyel biyobelirteç adaylarının tanımlanması amaçlanmıştır. KKH'lerle ilgili olarak, HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın kanser hücrelerinde kök hücre özelliklerini (stemness) koruduğu bildirilmiştir. Her iki faktör de KKH'nin hayatta kalması ve stemness özelliklerinin korunmasında önemli role sahiptir. Dolayısıyla KKH'leri mekanizmasını anlamada ve yeni tedavi stratejilerinin ortaya çıkmasında, hipoksik yolağının tümör biyolojisindeki rolü önemlidir. ((Demirel, 2013; Schöning ve ark., 2017; Tong ve ark., 2018).

Biyobelirteç çalışmalarında daha öncede değindiğimiz üzere en fazla hücre yüzey membran proteinleri hedeflenmektedir. Ancak bu proteinlerin izolasyonu, tanımlanması kolay bir süreç değildir. Miktersal olarak hücrede az bulunmaları, çözünürlükleri, lipid içeriği, hidrofobik yapıları ve integral proteinlerin varlığı bu süreci karmaşık hale getirmektedir. Yine de teknolojinin gelişmesiyle artan yöntemsel çeşitlilikler bu zorlukların kısmi olarak üzerinden gelinmesini sağlamıştır. Özellikle kanser gibi ölümcül ve hayat kalitesini düşüren hastalıklar için bu proteinlerden, yeni biyobelirteçlerin tanımlanması çok değerlidir. Bilindiği üzere kanserde tekrarlama veya nüks etme oranları, ya da tedaviye direnç geliştirme vb. süreçlere KKH olarak tanımladığımız hücrelerin çok büyük etkisi vardır. KKH'ni hedefleyen tedaviler veya biyobelirteçlerin keşfi; kanserin nüksünü ve direnç geliştirmesinin önüne geçebilir. Bu yalnızca akciğer kanseri için değil bütün kanser türleri için önemlidir (Atar, 2018).

Bu araştırmada 2D ticari akciğer kanseri hücre hatlarından türetilen 3D tümöroid model kullanılmıştır. Bu hücre hatları (A549, Calu-1) 3D formasyona uygun hücrelerdir. Bilindiği üzere 3D hücre kültürünün canlı doku mimarisini daha iyi mimik etmesi, tanı ve tedaviye dönük çalışmada daha güvenilir sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır. Bu amaçla araştırmada 3D formasyon, hem ECM destekli hem de yalnızca hücre-hücre bağlantılarının öne çıktığı modellemelerden oluşturulmuştur. ECM destekli 3D modeli olarak matrigel modelinde, 2D ticari hücre hatlarından elde edilen tek hücre tipinden uzaklaşmak ve hücrelerde farklılaşmayı sağlamak amacıyla bazı destekleyici malzemeler tümöroid ortamına dahil edilmiştir. Böylece matrigel destekli tümöroidlerde farklılaşma sağlanmış, hem ECM benzeri malzemenin (3D-A549) hem de hücre-hücre bağlantılarının meydana gelmesiyle oluşan (3D-A549 ve 3D Calu-1) 3D KHDAK tümöroid modelleri geliştirilmiştir. Diğer yandan başka bir 3D tümöroid modeli olan agaroz destekli akciğer tümöroidlerinde ise herhangi bir farklılaştırmayı sağlayan bir destekleyici malzeme tümöroid ortamına eklenmemiştir. Bu modelleme, agarozun hücrelerde 3D formasyonu uyarması ve KKH gelişimini indüklemesine dayalı olarak (Li ve ark., 2021) yapılmıştır. Bu iki modelin optimizasyonu ve validasyonu sağlanmıştır. Ayrıca benzer koşullarda parafine gömülerek kesitleri alınan 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerine ait doku örnekleri HXE ile boyanarak histolojik olarak karşılaştırılmıştır. Her iki hücre hattı da oldukça küçük doku kitlesi oluşturmaya rağmen,

3D-A549'a ait kesitlerde dokunun mikroskopik düzeyde daha dağınık bir görünüm sergilediği, hücre sınırlarının daha belirsiz olduğu ve doku bütünlüğünün kısmen zayıf olduğu dikkat çekmiştir. Buna karşılık 3D Calu-1 tümöroidlerden elde edilen kesitlerde, daha kompakt, düzenli ve solid yapıların izlendiği; hücre sınırlarının daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Hücreler bir araya geldiğinde oluşturduğu 3D yapı çeşitli etkenlere göre daha az kompakt veya kompakt kürecikler (3D yapı, doku, sferoid, tümöroid) oluşabilmektedir. 3D morfolojisi; hücre tipi, yoğunluğu, kültür ortamı, kültür yöntemi ve mekanik stres gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu 3D yapıları kompaktlıklarına göre üç gruba ayırmak mümkündür; *kompakt küreler* (compact sferoids), *sıkı kümeler* (tight aggregates) ve *gevşek kümeler* (loose aggregates). Kompakt küreciklerde hücreler birbirine sıkıca bağlıdır ve hücreleri tek tek ayırt etmek zordur. Sıkı veya gevşek kümelerdeki hücreler tam bir küre oluşturmazlar ve kolayca parçalanabilirler. Bu durumlar kesit alımında doku bütünlüğünün bozulmasına etki edebilmektedir (Han, ve ark., 2021). HXE ve IHC kesitlerinde A549'un oluşturduğu 3 boyutlu yapıdaki (yani doku) bağlantıların, Calu-1'e kıyasla daha az kompakt olması, büyük ölçüde kesit alımından kaynaklandığı, aynı zamanda hücrelerin biyolojik ve yapısal özelliklerindeki bu süreci destekleyebileceği düşünülmektedir. Parafin blok hazırlanması ve kesit alınması sırasında dokunun fiziksel bütünlüğünü etkileyebilmekte, histolojik değerlendirmede yapısal farklar yaratabilmektedir. Ayrıca hücreler arası matriks yoğunluğu, adezyon molekülü ekspresyon düzeyleri ve hücre polaritesi gibi faktörler de bu histolojik farklılığa katkıda bulunabilir. A549 hücrelerinin adenokarsinom kökenli bir olması daha epitelyal karakterde, sıkı hücre-hücre bağlantılarına sahip olabilirken; Calu-1 daha invaziv, mezenkimal/bazaloid özellikler gösteren bir skuamöz hücre hattıdır. Sonuç olarak, HXE boyamada gözlenen bu yapısal farklar, sadece morfolojik bir gözlem olmanın ötesinde, hücre hatlarının biyolojik davranışları ve doku mimarisi açısından önemli ipuçları sunarken, ilerleyen çalışmalarda immünohistokimyasal ya da ultrastrüktürel düzeyde yapılacak analizlerle desteklenmelidir.

Kompakt bir organizasyon gösteren 3D tümöroidler, normal oksijen seviyelerinde de heterojen bir hücre organizasyonuna sahiptir ve merkezine doğru gidildikçe hipoksinin arttığı bilinmektedir. Difüzyon yoluyla beslenen tümöroidlerde yapının her yerine eşit miktarda besin ve oksijen ulaşamaz, dolayısıyla merkezine doğru hipoksik belirteçlerin ekspresyonu artabilir. Böylece normal tümör kitlesinde olduğu gibi, tümöroidlerde de farklı katmanlarda değişen şiddetlerde hipoksi görülebilmektedir (Li ve ark., 2021). Bu durum 3D Calu-1 tümöroidlerinde yapılan IHC analizinde GLUT1 boyamasında karşımıza çıkmıştır. Özellikle normoksik dokunun periferik bölgelerinde zayıf pozitif 1(+) ya da tamamen negatif boyanan alanlar gözlenirken, santral bölgelerde GLUT1 ekspresyonu 2(++) ve 3(+++) düzeyinde daha yoğun olarak saptanmıştır. Bu durum, normoksik koşullarda dahi doku kitlesinin santral bölgelerinin yeterli oksijen difüzyonu sağlayamaması sonucu nispi bir hipoksiye maruz kalabileceğini göstermektedir. Bu tür santral hipoksik bölgeler, özellikle hızlı büyüyen ya da kompakt yapıdaki solid tümörlerde sıkça görülmektedir ve bu bölgelerde GLUT1 gibi hipoksi-indüklenebilir proteinlerin ekspresyonunun

artması beklenebilir. Santral bölgelerde belirgin GLUT1 ekspresyonu saptanması, doku içerisindeki mikrosantral hipoksinin önemini vurgulamakta ve tümör içi heterojenliğin değerlendirilmesinde sadece çevresel oksijen düzeylerinin değil, aynı zamanda doku mimarisi ve hücre yoğunluğunun da dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Literatürde hipoksi araştırmalarında yaygın olarak kullanılan iki farklı hipoksi modeli bulunmaktadır: hipoksik chamber sistemi ve CoCl_2 sistemi. Hipoksik chamber düşük oksijen konsantrasyon bağımlı bir sistem olduğu için fizyolojik hipoksiyi daha gerçekçi mimik etmesi nedeniyle araştırmalarda sıklıkla tercih edilir. Kobalt, PHD (Prolin hidroksilazlar) enzimleri üzerindeki demir bağlanma bölgelerine etki ederek HIF1 α 'nın stabilizasyonunu ve hipoksik bir ortamın oluşumunu sağlar (Mattia ve ark., 2022). CoCl_2 sistemi ise HIF1 α 'nın stabilizasyonu yoluyla hipoksi modeli oluşturmada kullanılan hızlı, erişilebilir ve ekonomik bir yöntemdir. Bu amaçla bu yöntemde pek çok araştırmada hipoksi oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu iki hipoksi modelinin aktive edeceği veya ettiği biyolojik süreçler, yollar birbirlerinden farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılığa rağmen genel hipoksik yanıt altında hedeflenebilecek ortak proteinlerin tanımlanması büyük önem taşır. Bu araştırmada özellikle KKH bağlamında vereceği hücresel yanıtların benzerlik ve farklılıklarını karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla her iki model kullanılarak hipoksik koşul oluşturulmuştur. Bu kapsamda literatürde akciğer kanseri araştırmalarında yaygın kullanan A549 hücre hattı hem 2D hem de 3D kültür sistemlerinde ve hipoksi modellemelerine yönelik yapılan optimizasyon çalışmalarında ana model hücre hattı olarak kullanılmıştır.

Bu kapsamda A549 hücreleri hem 2D hemde 3D hücre kültürü sisteminde hipoksik ve normoksik koşullarda büyütülmüştür. İlk olarak hipoksik chamber koşulunda hem 2D-A549 hem de 3D-A549'de 24, 48 ve 72. saatlerde hipoksik mikroçevre oluşturulmuştur. KKH benzeri hücrelerin gelişimini indüklemek için, tümöroidler uzun süreli hipoksilere maruz bırakılmış ve süre sonunda hücre membran protein izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İkinci olarak CoCl_2 hipoksisinde (200 μM) 8, 24 ve 48 saatlik uygulamalar gerçekleştirilmiş ve uygun optimizasyon süresi 48. saat olarak belirlenmiştir. Bu nedenle 2D-A549 ve 3D-A549'den hücre membran protein izolasyonu 48. saatte yapılmıştır. Calu-1 hücreleri için ise hipoksik chamber koşullarında 3D formasyonunun ardından 72. saat hipoksi ve normoksi koşullarında hücre membran proteinleri izole edilmiştir. Araştırmada ayrıca, hipoksik ve normoksik koşullarda koloni oluşturma yetenekleri araştırılmış ve literatürle uyum sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak hipoksiye adapte olmayan hücreler ölürken, bu koşula adapte olabilen hücreler koloni oluşturarak çoğalmaktadır.

Araştırmada iki farklı hipoksi modelinde, KKH belirteçlerinin mRNA ve protein düzeyindeki yanıtları araştırılmıştır ve genel itibarıyla özellikle hipoksik chamber modelinde belirteçlerde anlamlı bir değişim saptanmamıştır. KKH belirteçlerinin ifadeleri hücre tipine, maruz kaldıkları hipoksinin süresine, hipoksi modeline vb. bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bu çalışmada ifadeleri araştırılan KKH belirteçleri literatürde yaygın olarak kullanılan belirteçleridir

ve KKH'ye spesifik değildir ve tanısal özüllükleri sınırlıdır. Bu belirteçler pek çok hücrede (normal kök hücre, normal hücre gibi) ifade edilebilmektedir. Dolayısıyla bu belirteçlerin artışı her zaman KKH fenotipini yansıtmayabilir veya başka KKH belirteçleri seti üzerinden yansıtır olabilir. KKH fenotipi, belirteç artışının yanı sıra, sfer (kürecik) oluşumu, ilaç direnci, EMT süreci gibi farklı biyolojik mekanizmalar üzerinden de ortaya çıkabilmektedir. Literatürde birçok kök hücre fonksiyonel analizlerinde sfer oluşumu bir stemness özelliğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan tümöroidler "3D akciğer kanseri sferoidleri"dir. Diğer yandan sonuçlara bakıldığında CoCl_2 hipoksisinde CD44'ün zaman bağımlı olarak iki tümöroid modelinde de arttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla bu KKH belirteçleri üzerinden hipoksi modeli bir etkininde varlığı görülmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde iki hipoksi modelinin oluşturduğu stres yanıtları farklılık göstermekte olup, bu farklılığın yanı sıra genetik arka planlarındaki çeşitliliğin de proteomik sürece yansımış olması muhtemeldir.

Biyotin doğalında çok güçlü bir kovalent bağ eşleşmesi yapan küçük bir moleküldür. Vitamin H ve B7 olarak bilinen biyotinin sağlık üzerine olumlu etkileri bulunduğu gibi (saç, tırnak, sindirim sistemi gibi), biyoteknolojik alanda da yaygın olarak kullanılan bir moleküldür. Protein izolasyonu, protein-protein etkileşimleri vb. tekniklerde de kullanılmaktadır. Küçük bir molekül olması ve bağlandığı proteinde bir aktivite, yapı farklı oluşturmaması onu daha elverişli kılar. Bu araştırmada kullanılan Sulfo-NHS-SS-Biotin reaktifi yalnızca membran proteinlerine bağlanan modifiye bir biotindir. Hücre içerisine girmeyecek şekilde modifiye edilmiş suda çözünebilen bir biyotin formudur (Thermo Fisher Scientific kit no:A44390). Çalışmada Sulfo-NHS-SS-Biotin reaktifi kullanılmıştır ve bu reaktifin yaklaşık %20 civarında hücre içi proteinlere bağlanabilme riski mevcuttur (bu bilgi ürünün bilgi kataloğunda mevcuttur). Bu kontaminasyonu azaltmak amacıyla biyotinyasyon protokolü optimize edilmiştir. İzolasyon sonrası elde edilen lizat "hücre membran proteinleri" olarak adlandırılrsa da; aslında biyotinyasyon temelli bir yöntemle hücre membran proteinlerince zenginleştirilmiş bir fraksiyondur. Karmaşık proteomlarda hedeflenen protein gruplarının veya fraksiyonlarının elde edilmesinde zenginleştirme yöntemlerinin kullanılması önemlidir. Aksi takdirde yüksek miktarda bulunan proteinler, hedeflenen protein gruplarını maskeleyebilir. Zenginleştirme yöntemlerinin kullanılmasıyla proteomik analiz derinliği artırılmıştır. LC-MS/MS analizi sonrası işlenen ham verilerden hücre yüzey membran proteinleri dışında, başka hücre kompartmanlara (nucleus, ER gibi) ait proteinlerin de tanımlanmıştır. Hücre membran proteinlerinin izolasyonu, karmaşık ve zorlu bir işlemdir. İzolasyon sırasında birçok teknik sorun ortaya çıkabilmektedir. Özellikle proteinler, hidrofobik yapılarından kaynaklı çökme eğilimi gösterebilir. İntegral membran proteinlerin varlığı ise bu süreci daha karmaşık hale getirmektedir. Ayrıca, yeterli miktarda hücre membran protein lizatı elde edebilmek için çok sayıda tümöroidin oluşturulması gereklidir. Bu durum özellikle matrigel destekli tümöroidler üzerinden düşünüldüğünde hayli ekonomik açıdan zorlayıcı olabilmektedir. Bunun yanı sıra, membran proteinlerinin biyotin etiketlenmesi sırasında biyotinyasyon reaktifi hücre zarını geçerek hücre içi

proteinlere de sızabilir ve onları etiketleyebilir. Bu durum, hücre içi proteinlerinin de biyotinlenmesine yol açarak, izolasyon ve analizde karışıklıklara neden olabilir. Sonuç olarak, elde edilen hücre membran proteinlerince zenginleştirilmiş lizat miktarı beklenenin altında kalabilmekte ve intraselüler proteinler de tanımlanabilmektedir. Diğer önemli bir nokta ise bu araştırma hücre membran proteinleri hedefli bir çalışma olsa da normoksi ve hipoksi durumunda tespit edilen intraselüler proteinlerin biyolojik önemi özellikle kanser tanı ve tedavisi düşünüldüğünde göz ardı edilmemelidir. Bu amaçla tanımlanan tüm proteinlerin bu pencereden değerlendirilmesi önemlidir. Tüm örnekler Waters Synapt-G2-Si kütle spektrometresi kullanılarak LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen ham veriler PLGS (ProteinLynx Global Server) yazılımı kullanılarak işlenmiş ve proteinler tanımlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan analiz yazılımı (PLGS) bir “abundance” değeri vermediği için gruplar arası kantitatif karşılaştırma sınırlı kalmıştır. Tanımlanan proteinlerin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmek üzere DAVID Bioinformatics zenginleştirme aracı kullanılarak GO (Gene Ontology) analizleri yapılmıştır.

Tüm koşullarda toplam bu örneklerden toplam 2225 adet protein tanımlanmıştır (EK-1) Bu tanımlanan proteinlerin büyük bir kısmı çeşitli kanserlerde prognostik önem taşımaktadır. Tanımlanan proteinlerin 1733 tanesi A549 (2D ve 3D ortak) hücrelerine aittir.

2D-A549 modelinde tüm koşullarda toplam 1112 protein tanımlanmış ve bu tanımlanan proteinlerin yaklaşık %39'u hücre yüzeyinde lokalizedir. Bu proteinlerin 694'ü normoksik koşullardadır. Hipoksik koşullarda; chamber sisteminde 295 farklı protein, CoCl₂ sisteminde ise 157 protein tanımlanmıştır. Normoksik koşullarda tanımlanan proteinlerin yaklaşık %36'sı; hipoksik chamberda tanımlanan proteinlerin yaklaşık %44'ü ve CoCl₂ koşullarında tanımlanan proteinlerin %41'i hücre yüzeyinde lokalizedir. Bu veriler ışığında bu proteinlerin önemli bir kısmının hücre yüzeyinde lokalize olduğu göstermektedir. Diğer yandan tüm bu koşullarda (normoksik, hipoksik chamber ve CoCl₂) 1 protein ortak ZC3H13 (Q5T200) olarak saptanmıştır (Şekil 4.25). Ek olarak, 2D-A549 hipoksik koşullarında ise hipoksi ile ilişkilendirilebilecek önemli biyolojik süreçler (Şekil 4.26) ve yolaklar dahil olmuştur (Şekil 4.27). Bu durum iki hipoksik modelde de hücrelerin hipoksiye yanıt doğrultusunda bazı adaptif mekanizmaların aktive edildiği anlamına gelmektedir. Bu yolaklardan birisi, hücre sağkalımı, proliferasyonu ve anjiyogenez gibi fizyolojik süreçlerde rol oynayan PI3K-Akt sinyal yolağıdır (PI3K-Akt signaling pathway). Normokside Notch yolağı ile ilişkili fonksiyonun varlığı dikkat çekicidir ve hücre-hücre vb. süreçleri ile ilişkili olarak zenginleşmiş olabileceği düşünülmektedir. Chamber sisteminde ise, VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor activity) aktivitesi damar oluşumunda yani anjiyogenezden sorumlu fonksiyonu temsil eder. Bu durum hipoksik mikroçevre ile karakterize bir durumdur. Öte yandan kök hücre reseptör aktivitesi hipoksik koşul altında beklenen kök hücre uyarımı ile ilgili fonksiyonu ilişkili olduğu düşünülmektedir.

3D-A549 tümöroidlerinde PLGS analizleri sonucunda tüm koşullarda toplam 685 farklı protein tanımlanmıştır. Tüm izole edilen proteinlerin yaklaşık %41'i hücre yüzeyinde bulunan

proteinlerdir (Şekil.4.28). Bu proteinlerin 189'u normoksik, 514 tanesi ise hipoksik koşullarda tanımlanmıştır. Hipoksik koşullarda; chamber sisteminde 332 farklı protein tanımlanmış, CoCl_2 sisteminde ise 191 protein tanımlanmıştır. Normoksik koşullarda tanımlanan proteinlerin yaklaşık %41'si hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Hipoksik chamberda yaklaşık %43'ü, CoCl_2 koşullarında tespit edilen proteinlerin yaklaşık %36'sı hücre yüzeyinde lokalize olmuştur. Tüm bu koşullarda (normoksik, hipoksik chamber ve CoCl_2) 1 protein ortak ZC3H13 (Q5T200) olarak saptanmıştır. Bu veriler tanımlanan proteinlerin önemli bir kısmının hücre yüzeyinde lokalize olduğunu göstermiştir. Ayrıca 3D-A549 hipoksik koşullarında ise hipoksi ile ilişkilendirilebilecek önemli biyolojik süreçler (Şekil.4.29) ve yollar (Şekil.4.30) belirlenmiştir. Hipoksik koşullarda her iki hipoksi modelinde de kendilerine özgü süreçlerin aktive olduğu gözlenmiştir. 2D-A549' kıyasla 3D-A549 tümöroidlerinde normoksik koşullar altında 3D yapıya bağlı olarak bazı bölgelerde hipoksik alan oluşumu, iskelet yeniden düzenlemesi ve kök hücre ilişkili süreçlerin ve ilişkili yolların bulunması normaldir. Dolayısıyla 3D-A549 normoksi koşulunda bu başlıklar ile bağlantılı süreç ve yollar Şekil.4.29 ve Şekil.4.29'de ortaya konmuştur. Kök hücre popülasyonunun sürdürülebilirliğinin düzenlenmesi (*regulation of stem cell population maintenance*, $p=0.013$) ve TOR sinyalinin düzenlenmesi (*regulation of TOR signaling*, $p=0.086$) süreci ayrıca dikkat çekicidir ve 3D formasyonu ile uyumludur. Bazı araştırmalarda mTOR yolunun KKH'leri oluşumunda ve onların pluripotens özelliklerinin korunmasında ve hatta belirli kanser tiplerine dönüşümlerinde rol oynadıkları gösterilmiştir (Son ve ark., 2024). Her iki hipoksi modelinde de genel hipoksik koşul ile ilişkilendirilebilecek önemli biyolojik süreçler belirlenmiştir. Hipoksik chamber modelinde, hipoksik bir mikroçevrenin varlığını işaret eden "*response to oxygen levels* ($p=0.035$)" gibi süreçler yer almaktadır. Ayrıca hipoksik mekanizmanın etkisi ile "*cell differentiation* ($p=0.00034$)" ve "*regulation of stem cell population maintenance* ($p=0.021$)" gibi KKH ilişkilendirilebilecek süreçler bulunmaktadır (Şekil.4.29). Bu sonuçlar, hipoksinin ve 3D formasyonunun KKH gelişimini uyarması ile uyumlu bir sonuçtur. CoCl_2 modelinde ise; "*response to hypoxia*, ($p=0.038$)" gibi hipoksik bir mikroçevrenin varlığına işaret eden süreçler tespit edilmiştir. Ek olarak "*regulation of BMP signaling pathway* ($p=0.063$), "*cell differentiation*, ($p=0.00023$)", "*regulation of stem cell population maintenance*, ($p=0.082$)" gibi farklılaşma ve kök hücre ilişkili süreçler tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada CoCl_2 ile oluşturulan bir hipoksik çevrede, embriyogenezde rol oynayan TGF- β süper ailesine ait BMP ailesinden mezenkimal kök hücrelerde BMP-9'un kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada hipoksinin BMP bileşenlerini ve hedeflerini düzenlediğini ve aynı zamanda hücre göçü ve osteoblast farklılaşmasını desteklediği bulunmuştur (Paz ve ark., 2023). KEGG analizlerine göre; 3D-A549 tümöroidlerinde normoksik koşullarda hücresel başlıca metabolik aktivite ile ilgili önemli yollar olan; karbon metabolizması, glikoliz/glukoneogenez ve amino asit biyosentezi gibi yolların varlığına dayanarak hücre aktivitesinin hem metabolik hem de biyosentetik süreçlerde aktif olduğu söylenebilir. Hipoksik koşulda ise hücre sağkalımı, anjiyogenez gibi temel süreçlerde rol oynayan PI3K-Akt yolu öne çıkan yollar önemli yollar arasındadır. Ek

olarak kanserde ilaç direnci ile ilişkili olan “*ABC transporter*” hipoksik koşulda göze çarpan diğer yollar arasındadır (Şekil.4.30). Bu hipoksinin ilaca direnç mekanizmasını da aktive ettiğini düşündürmektedir. 3D-A549’da moleküler fonksiyon grafiği incelendiğinde, normoksik koşullarda hücre iskeleti organizasyonu, hücre-hücre etkileşimi ve ECM etkileşimi ile ilgili fonksiyonlar öne çıkmaktadır. Chamber sisteminde ise hücre iskeleti organizasyonu, hücre-hücre etkileşimi ve ECM etkileşiminin yanı sıra hipoksik strese adaptasyon mekanizmasıyla ilişkilendirilen fonksiyonlar (*VEGF receptor activity vb.*), kök hücre ile ilişkili aktiviteler (*stem cell factor receptor activity*), kromatin (*chromatin binding*) ile ilişkili aktiviteler öne çıkmaktadır. CoCl₂ modelinde ise daha çok iyon taşınımı ve sinyal iletimi süreçleri ön plandadır (Şekil 4.32).

2D-A549 ve 3D-A549’da tanımlanmış proteinlerin moleküler fonksiyonları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.32’de verilmiştir. Genel olarak 2D’ye kıyasla 3D kültürün her koşulunda (Normoksi-Chamber ve Cobalt Chloride (CoCl₂)) hücre iskeleti organizasyonu, hücre-hücre ve ECM-hücre gibi tümöroid formasyonunu karakterize eden aktiviteler daha belirgin temsil edilmiştir. Özellikle 2D-A549 normoksi koşulunda kök hücre ile ilişkili bir sinyal yolu olan Notch bağlanması, ilaç direnç mekanizmalarında önemli olan ABC transport aktivitesi, hücre döngüsü kontrolünde rol oynayan p53 bağlanması gibi önemli fonksiyonlar öne çıkmaktadır. 3D-A549 normoksida hücre iskeleti ve ECM-cell ilişkili fonksiyonlar ön plandadır. 2D-A549 ve 3D-A549’nın hipoksik chamber modelinde, tüm ortak fonksiyonlar 3D-A549’da neredeyse daha belirgindir. CoCl₂ modeli hem 2D hem de 3D’de karşılaştırıldığında, iyon bağlama fonksiyonunun 2D’de öne çıktığı; 3D’de ise bu iyon bağlama fonksiyonuna ek olarak sinyal iletim adaptasyon süreçleri dikkat çekmektedir. Son olarak 3D-A549 hipoksik chamber modeli ile 3D-A549 CoCl₂’ye karşılaştırıldığında, hipoksiye adaptasyon, kromatin bağlanması ve kök hücre fenotipi ilişkili fonksiyonların çok daha belirgin olduğu görülmektedir.

3D Calu-1 tümöroiderinden PLGS analizleri sonucunda toplamda 585 protein tanımlanmıştır. Tüm izole edilen proteinlerin önemli bir kısmı (yaklaşık %39) hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Bu proteinlerin 225’ü normoksik, 339 tanesi ise hipoksik koşulda tanımlanmıştır. (Şekil 4.33). 3D Calu-1 normoksi koşullarında çoğunlukla hücre iskelet ve yapı organizasyonu ile ilişkili olan biyolojik süreçler öne çıkarken, kromatin yeniden düzenlenmesi, kök hücre popülasyonunun sürdürülebilirliğinin düzenlenmesi ve hücre farklılaşması gibi süreçler saptanmıştır (Şekil 4.34). Hipoksik koşulda ise; iskelet ve yapı organizasyonuna ek olarak, hipoksik mikroçevrenin varlığına işaret eden, oksijen seviyesine yanıt, dolaşım sisteminin gelişimi vb. hipoksi ilişkili süreçler saptanmıştır. Ek olarak hücre farklılaşması ve kök hücre popülasyonunun sürdürülebilirliği hipoksida karşımıza çıkan süreçlerdir. Normoksik koşullarda hücresel başlıca metabolik aktivite ile ilgili önemli yollar olan; Rap1 sinyal yolağı, TNF sinyal yolağı ve PI3K-Akt yolağı zenginleşmiş yollar arasındadır. Normoksik koşullarda bu metabolik, yapısal ve immün yanıt mekanizmalarının belirgin bir şekilde beraber temsil edilmesi hücrelerin dengeli bir proliferasyon, mikroçevre etkileşim profili sergilediği söylenebilir. Hipoksi de ise stres öncelikli hayatta kalma ve adaptasyon ilişkili PI3K-Akt

sinyal yolağının belirgin bir şekilde ifade edilmesi hipoksiye yanıt olarak geliştiğini göstermektedir (Şekil 4.35)

Tüm bunların yanında önemli başka bir nokta ise, normoksida ve hipoksida tümör hücrelerinin immün sistem mekanizmalarına ait yolakların (*antigen processing and presentation, virus infections vb.*) belirgin bir şekilde temsil edilmiş olmasıdır. Normoksidede anjien sunumlarına dair yolaklar veya bağışıklık sistemi ile ilgili diğer yolakların aktive olabildiği GO analizlerinde görülmüştür. Bu hücrenin immün denetim altında olduğu bir mikroçevre ile uyumlu bir davranıştır. Hipoksik koşullarda ise mikroçevrenin değişmesi ile birlikte tümör hücresi daha farklı adaptasyonlar geliştirmek için farklı yolları aktive edebilmektedir. Bu yolaklardan; antijen sunumu, virus enfeksiyonları veya fagosom (phagosome) gibi diğer yolaklar, tümör hücresinin immün sistemden kaçma eğilimi ile ilişkilendirilebilir.

GO analizleri sonrasında hücre yüzeyinde lokalize olan proteinlere ait Venn diyagramı Şekil 4.37, Şekil 4.39 ve Şekil 4.40’de verilmiştir. Buradaki verilere göre normoksik koşullarda 2D-A549 hücrelerinde tanımlanan proteinlerin 250; 3D-A549’de 78 ve 3D Calu-1’de 89 protein hücre yüzeyinde lokalize veya ilişkili olarak tanımlanmıştır. Bu proteinlerden 2D-A549 ve 3D-A549 ‘da tanımlanan “Delta like protein (A0A384P5C6)” ile 3D-A549 ve 3D Calu-1 arasında ortak olarak tanımlanan “TSPAN5 (P62079) ” Notch sinyali ile ilişkili oldukları bilinmektedir. Notch sinyal yolunun KKH özelliklerinin sürdürülmesi, EMT sürecinde ve tedaviye direnç gelişiminde kritik olduğu bilinmektedir. 3D Calu-1 ve 2D-A549 da ortak olarak tanımlanan insan genomuna entegre olmuş bir insan endojen retrovirüs ailesi üyesi olan ERVK-6 için doğrudan literatürde ERVK-6’nın KKH süreci ile ilişkili olduğu bir çalışma bulunmasa da aynı aileye ait HERV-K proteinlerinin KKH gelişim fenotipini desteklediği bildirilmiştir.

Hipoksik chamber koşullarında 2D-A549 hücrelerinde 130; 3D-A549’da 144 ve 3D Calu-1’de 145 protein hücre yüzeyinde lokalize veya ilişkili olarak tanımlanmıştır. Bu proteinlerden 2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1’de ortak tanımlanan yüzey proteini olan SCN1A (P35498) voltaj kapılı sodyum kanalları ailesinin (VGSC) bir üyesidir ve akciğer kanserinde VGSC mutasyonu yaygın görülen kanser türleri arasındadır. Kanserlerde en fazla mutasyon gözlenen VGSC’lerden biri de SCN1A’dır (Liu ve ark., 2024). 3D-A549 ve 3D Calu-1’de ortak saptanan SPTBN4 (M0QZQ3) için embriyonal karsinom hücrelerinde yeni bir miRNA tanımlanmış (SPTBN4-miR1) ve birlikte yüksek ifadelerinin pluripotent çıkışı ve farklılaşmayı teşvik ettiği (Hosseini ve ark., 2019) ve ayrıca DNA metilasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sanchez-Mut ve ark., 2013). 2D-A549 ve 3D-A549’da ortak tanımlanan PLXNB2 proteini (O15031) kaynağı bilinmeyen primer kanserlerde (CUP,) G842C mutasyonu ile KKH özelliklerini desteklediği bildirilmiştir. CALR (P27797) ise meme kanserinde HIF-1a bağımlı bir şekilde Wnt/B-katenin sinyal yolu üzerinden meme kanseri kök hücre fenotipini teşvik ederek meme kanseri gelişimini arttırdığı (Liu ve ark., 2021) ve H3K9me2 metilasyonundan sorumlu olan G9a ile etkileşime girerek DNA metilasyonuna aracılık edebileceği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2022). Wnt/B-katenin sinyal yolunun KKH’lerinin

kendi kendini yenileyebilme ve pluripotensi özelliklerinin desteklenmesinde kritik rol oynayan bir sinyal yoludur. Ayrıca 2D-A549 ve 3D Calu-1’de tanımlanan PSEN1, akciğer adenokarsinomunda Notch/EGFR yolunu aktive ettiği bildirilmiştir. (Song ve ark., 2024).

Kanserin başlaması, nüksü ve progresyonunda kritik rol oynayan KKH’lerinin hedeflenmesi kanser tanı ve tedavi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada normoksik koşullarda ortak olarak tanımlanan hücre membran proteinlerinin bir kısmının KKH ilişkili olduğu görülmüştür. Aynı zamanda hipoksik chamber koşullarında da benzer şekilde KKH ilişkili proteinlerin zenginleştiği görülmektedir. Ayrıca yalnızca belirli koşullarda saptanan kök hücre ilişkili proteinlerde dikkate değerdir (ör; NOTCH2NLB). Hem normoksik hemde hipoksik koşullarda elde edilen bu proteinler KHDAK tanı ve tedavide potansiyel biyobelirteç adayları olarak ileri çalışmalar için önemlidir. CoCl₂ koşullarında 2D-A549 hücrelerinde 65; 3D-A549’da 69 protein hücre yüzeyinde lokalize veya ilişkili olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.40). 3D-A549 CoCl₂ ve hipoksik chamber koşullarında ortak olarak tanımlanan TNIK (Q9UKE5) Wnt sinyal yolunun temel aktivatörü olarak görev yapan serin/treonin kinazdır. Wnt sinyal yolu KKH özelliklerinin korunmasında rol oynadığı bilinmektedir (Masuda ve ark., 2016). THBS1 (P07996) ise yine bu iki koşulda ortak olan proteinler arasındadır. THBS1, CD47 aracılığıyla kök hücrelerin kendi kendini yenilemesini inhibe ettiği ve muhtemelen kök hücre transkripsiyon faktörleri POU5F1/OCT4, SOX2, MYC/c-Myc ve KLF4’ün düzenlenmesi yoluyla bunu gerçekleştirdiği düşünülmektedir. 2D-A549 ve 3D-A549 CoCl₂ koşullarında tanımlanan ABCA5 (Q8WWZ7) KKH ve/veya osteosarkomun olası bir biyobelirteci olarak tanımlanmıştır (Saini ve ark., 2012).

Bu çalışmada elde edilen bulgular literatür ile uyumlu olarak, hem 2D hem de 3D hücre kültürlerinde, her iki hipoksi modelinde de kök hücre gelişimini ve farklılaşmayı teşvik eden bir mikroçevre oluşturabileceğini göstermektedir (Zhang ve ark., 2020). Literatürde 2D hücre kültürüne kıyasla, 3D hücre formasyonun hücrelerin “stemness” özelliğini anlamlı bir şekilde arttırdığı iyi bilinmektedir (Su ve ark., 2013). Li ve ark. (2021) insan dental folikül hücreleriyle (HDFC) yaptıkları çalışmada, kök hücre belirteçleri; Sox2, Oct4 ve Nanog ifadesinin sferoidlerde (3D) önemli ölçüde arttığını bildirmiştir (Li ve ark., 2021). Sonuçlara bakıldığında 2D modele kıyasla hem hücre organizasyonunun hem de kök hücre ve farklılaşmaya ilişkin biyolojik süreçlerin GO analizleri kapsamında belirgin şekilde öne çıktıkları görülmüştür. Bu analizlerde özellikle kromatin yeniden düzenlenmesi gibi süreçler dikkat çekicidir. Dolayısıyla bulgulardan elde edilen bu sonuçlar hipoksik mikroçevre ile birlikte değerlendirildiğinde, KKH fenotipinin korunması ve farklılaşma süreçlerinin aktivasyonunun hipoksik strese bağlı olarak hücresel yeniden programlama veya kromatin yeniden düzenlenmesi gibi süreçler üzerinden gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca 3D formasyonda bu kromatin yeniden düzenlemeyi destekleyici bir etki gösterebilir. Literatürde de bunun destekler nitelikte hipoksinin epigenetik modifikasyonlar ile ilişkisi üzerine pek çok çalışma mevcuttur. Hipoksinin özellikle histon modifikasyonlarını (histon metilasyonu, asetilasyonu ve DNA metilasyonu) etkilediği bilinmektedir. Yapılan bir araştırmada %0.1

oksijende inkübe edilen A431 kanser hücrelerinin mononükleaz sindirimine karşı daha az duyarlı olduğu ve bunun artan heterokromatin yapı ile ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada yapılan proteomik analizler sonucunda “Heterochromatin Protein 1 Binding Protein 3” miktarının arttığı tespit edilmiştir (Batie ve ark., 2018). Bu çalışmada elde edilen verilerde tüm koşullarda veya koşullar arasında ortak olarak tanımlanan proteinlerin kanser, hipoksi ve kök hücre ile ilişkisine dair kısa bir literatür araştırması yapılmıştır. Analizlerimiz bu ortak proteinlerin bir kısmının epigenetik modifikasyon, hücre farklılaşması ve kanser kök gücre gelişimi (özellikle Notch sinyal yolu) gibi süreçlerle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu kapsamda; 2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinden hem hipoksik hem de normoksik koşullarda tanımlanan proteinler karşılaştırılmış, ortak olanlar Venn diyagram üzerinde gösterilmiş ve listelenmiştir (Şekil.4.38 ve Şekil.4.41). Bu sonuçlara göre; ortak proteinlerin neredeyse tamamı kanser sürecinde rol oynaktadır. Tüm normoksik koşullarda ortak olan iki protein bulunmaktadır; ZC3H13 (Q5T200) ve HTATSF1 (O43719) (Şekil.4.41). Nükleusa lokalize olan m6A metilasyonunda rol oynayan ZC3H13, hipoksik koşullarda dahil olmak üzere her iki hücre hattında ve tüm koşullarda (2D, 3D hücre modeli, hipoksik chamber ve CoCl₂ ve normoksiler) ortak olan protein olarak önemini korumaktadır. Tümör gelişiminde epigenetik düzenlemelerin etkinliği ile ilgili çalışmalar son dönemlerde artmıştır. GO analizi sonuçlarında kromatin yeniden modellenmesi ile ilgili süreçlere sıklıkla rastlanmıştır. RNA modifikasyonları, transkripsiyon sonrası epigenetik modifikasyon türleri arasına girer ve m6A metilasyonu (N6-metiladenozin) sıklıkla görülen bir mRNA modifikasyonudur. Bu modifikasyon aynı zamanda pluripotent kök hücrelerinin kendini yenilemesini ve farklılaşmasını düzenlediği bilinmektedir. Ayrıca bazı çalışmalarda m6A düzenleyicilerinin anormal ifadesinin çeşitli kanserlerde tümör gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir (Wu ve ark., 2019; Gong ve 2020). Bu modifikasyonun bir düzenleyicisi olan ZC3H13, hem normoksik hem de hipoksik koşullar olmak üzere ortak çıkan tek proteindir. Yaptığımız PLGS analizi bize tanımlanan proteinlerin bir ekspresyon profilini sunmadığı için ZC3H13 hangi koşulda ne kadar ifade edildiği hakkında bilginiz sınırlıdır. Tüm koşulların normoksisinde ortak olarak tanımlanan ikinci protein HTATSF1 aynı zamanda, hipoksik chamber koşulunda 2D-A549 ve 3D-A549 arasında ortak olarak tanımlanan proteinler arasındadır. HTATSF1 RNA bağlayıcı bir protein olarak bilinmektedir. Protein sentezi, rRNA transkripsiyonunu ve işlenmesi gibi süreçlere katılan HTATSF1’nin ribozom biyogenezi sırasında embriyonik kök hücre farklılaşmasını kontrol ettiği bilinmektedir. Corsini ve ark. (2018)’nın yaptıkları çalışmada Nanog, Oct4, Sox2 gibi kök hücre biyobelirteçlerinin HTATSF1 kaybına bağlı olarak azaldığı ve HTATSF1 eksikliği olan hücrelerde koloni oluşumunun azaldığı ve bu hücrelerin G2/M fazında biriktiği ve uzun kültür sonrası hücre ölümüne uğradıkları bildirilmiştir 3D-A549 ve 3D Calu-1 normoksilerinde tanımlanan ortak proteinlerden biri de (Şekil.4.41) TSPAN5 ise hücre yüzeyine lokalize bir protein olup, Notch sinyal yolu üzerinden hücre farklılaşmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir. Xie ve ark. (2021) HCC üzerinde yaptıkları çalışmada, TSPAN5 ifadesinin invazyon derinlik, vasküler

invazyon, klinik evre ve hastaların sağ kalımı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. TSPAN5'in HCC hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* metastazı arttırdığını, Notch sinyal yolunu aktive ettiğini ve EMT sürecini desteklediğini bildirmişlerdir. Bir diğer dikkat çekici protein olan apoptotik kromatin yoğunlaşma indükleyici ACIN1, Aoto ve ark.'nın (2025) yaptıkları çalışmada embriyonik gelişimde rol oynadığı, Shu ve ark. (2006)'nın yaptıkları araştırmada ise erken evre akciğer adenokarsinomunda ACIN1'in hipermetilasyonları gözlemlenmiştir. Bu metilasyonun akciğer adenokarsinomunun gelişimindeki erken olaylardan biri olabileceği düşünülmektedir (Shu ve ark., 2006). 2D-A549 ve 3D-A549 normoksik koşullarında tanımlanan hücre yüzey Notch ligandı olan Delta/Jagged transmembran ailesine ait bir protein olan DLL1 hücre kaderi kararları ve hücre-hücre iletişiminin düzenlenmesi, embriyonik gelişim, angiogenez gibi süreçlerde rol almaktadır (Hildebrand ve ark., 2019). Notch sinyal yolu; hücre proliferasyonunu sağladığı, KKH'lerini koruduğu, EMT sürecine katıldığı ve kemoterapiye dirençliliği artırarak tümör hücrelerine hayatta kalma avantajı sağladığı bilinen oldukça korunmuş moleküler sinyal yoludur. KKH'nin kendi kendini yenileyebilmesinde kritik rol oynayan bir sinyal yolu olarak tedavilerde çokça hedeflenmektedir. Kanser dokularında bu yolun inhibe edilmesi KKH veya KKH benzeri hücre popülasyonlarının tamamen ortadan kaldırılmasına katkı sağlayabilecek bir terapötik stratejidir (Venkatesh ve ark., 2018). Bu çalışmada bu yolak ile ilişkili hücre yüzeyine lokalize (NOTCH2NLB vb.) veya hücre içinde lokalize pek çok protein (SLMT vb.) tanımlanmıştır.

2D-A549, 3D-A549 ve 3D Calu-1 hipoksik chamber koşulunda tanımlanan proteinler de karşılaştırılmış, ortak olanlar Venn diyagram üzerinde gösterilmiş ve listelenmiştir (Şekil 4.41). Ortak 3 protein tanımlanmıştır; ZC3H13, SCN1A ve PCSK5. SCN1A bir gerilim-kapılı sodyum kanalları (VGSC) ailesine ait bir protein olup, bu kanalların tümör progresyonunda önemli olduğu bilinmektedir. Kanserlerde en fazla mutasyon gözlenen VGSC'lerden biri de SCN1A'dır (Liu ve ark., 2024). PCSK5 anjiyogenez ve lenfanjiyogenezi artırarak tümör büyümesi ve metastazını artırdığı bilinmektedir. Yapılan bir araştırmada PCSK5'nin (ekson 1 ve 4) silinmesinin, doğum öncesi veya erken embriyonik ölüme yol açtığı bildirilmiştir (Szumska ve ark., 2017). 3D-A549 ve 3D Calu-1 tümöroidlerinde hipoksik chamber modelinde tanımlanan proteinlerin bir kısmı yine epigenetik mekanizmalarda rol oynar (Şekil 4.41). Bunlardan; ASXL2, nükleer reseptöre bağlı transkripsiyonel düzenleme ve transkripsiyonel baskılamada rol oynayan epigenetik iskele protein ailesinin bir üyesidir (Katoh, 2015). ASXL2 mutasyonu karaciğer kanseri kök hücreleri belirteçlerinden CD133 ile ilişkili olarak saptanmıştır ve CD133-pozitif hücrelerde KKH özelliklerinin korunması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Kim ve ark., 2023). ZNF644'de histon modifikasyonu üzerinden epigenetik regülasyona katkı sağlamaktadır. G9a/GLP ile etileşime giren ZNF644 histon metilasyonunun eş düzenleyicisi olarak tanımlanır. Histon metilasyonu sonucunda meydana gelen değişiklikler, progenitör hücrelerin hücre döngüsünden çıkmasını ve farklılaşmasını sağlayan gen aktivasyonlarına neden olur. G9a/GLP embriyogenez sırasında hücre farklılaşması için gereklidir (Olsen ve ark., 2016). 2D-A549 ve 3D Calu-1 hipoksik chamber

koşulunda ortak olarak tanımlanan PSEN1 ise, Alzheimer hastalığıyla ilişkilendirilmiş proteinlerden biridir. PSEN1, akciğer adenokarsinomunda Notch/EGFR yolunu aktive ederek EMT sürecine katkı sağlamıştır (Song ve ark., 2024).

Araştırmada hipoksik chamber ve CoCl_2 koşullarında tanımlanan ortak proteinler de değerlendirilmiştir. Burada tanımlanan ortak proteinler bize iki farklı hipoksik koşul sonucunda meydana gelen ortak hücresel yanıtlar hakkında bilgi vermektedir. Bu ortak proteinlerin neredeyse tamamı kanser progresyonunda önemlidir ve hedeflenebilir proteinlerdir. Bu proteinlerin (PATJ, MED12, TNIK vb.) önemli bir kısmı stemness özellik ile ilişkili yollar ve/veya epigenetik modifikasyon (ATRX vb.) mekanizmalarında önemli rol oynamalarının yanı sıra; tümör mikroçevresi, immün sistemden kaçış vb. süreçlere de katkı sunarlar.

Bu çalışma kapsamında A549 modellerinde proteomik analizler sonucunda tanımlanan bazı hücre yüzeyinde (NOTCH2NLB, FCER1G, TSPAN17 (TSPN17) CXCL5, CD138) ve hücre içinde lokalize olan (ATXN3, TKT, ENO1, PKM, PTMS) proteinlerin qPCR analizi ile mRNA ifade profilleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.42 ve Şekil 4.43). Bu değerlendirme hiposkinin kanser hücrelerinde yol açtığı farklı adaptif yanıtları ortaya koymaktadır. Bu bulgular her iki hipoksi modelinde çok keskin ifade farklılıklarının hipoksi modeline bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Öne çıkan proteinlerden biri olan NOTCH2NLB proteini CoCl_2 modelinde tanımlanmıştır. NOTCH2NLB, NOTCH2NL geni tarafından kodlanan üç üyelik bir protein ailesinin üyesidir. Hücre dışında bulunduğu tahmin edilmektedir. Evrimsel biyolojide çalışılan bir protein olmakla birlikte, beynin neokorteksinin Notch sinyal yolunu düzenleyerek progenitör proliferasyonunu ve evrimsel olarak genişlemesini destekleyen insana özgü bir protein olarak bilinir. Nöronal progenitörlerin farklılaşmasını geciktirerek ve nöronal üretimde genel bir artışa yol açarak, nöronal progenitörlerin kendini yenilmesini destekleyebilmektedir. Evrimsel biyoloji çalışmalarının dışında kanser ile ilgili NOTCH2NLB protein ile ilgili net bir araştırma literatürde mevcut değildir (Fiddes ve ark., 2018; The Human Protein Atlas). Bulgularımızda hipoksik chamber modelinde NOTCH2NLB'in mRNA ifadesinin 48. saatteki anlamlı artışı bu genin hücre farklılaşması, progenitör proliferasyonu gibi bilinen rollerinin hipokside artmasını destekler niteliktedir. CoCl_2 modelinde ise mRNA ifadesinde anlamlı anlamlı azalış ve artış görülebilmiştir. Tümör mikroçevresinde de rol oynadığı bilinen ve bağışıklık sistemiyle ilişkili bir gen olan FCER1G hipoksik koşulda chamber sisteminde anlamlı bir artış (10.8645) göstermiştir. Hipoksik chamberdaki yaklaşık %1000 anlamlı artışa ters bir şekilde, CoCl_2 modelinde belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir. Tümör hücresinin büyümesinde, metastazında ve invazyonunda yer aldığı bilinen bir transmembran bir protein olan TSPAN17 hipoksik chamber modelinde 24. saat koşulunda artmıştır (2.43123). CoCl_2 modelinde ise, TSPN17'de 48. saatte anlamlı olmayan belirgin bir artış görülmektedir (48h; 2.87551) (Şekil 4.42) (Guo ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2022).

3D-A549 tümöroidlerinde hücre içinde lokalize olan proteinlerden hipoksi chamber kullanılarak oluşturulan hipoksi modelinde ATXN3, TKT, ENO1, PKM ve PTMS genlerinin genel olarak anlamlı ve belirgin bir şekilde yüksek ifade düzeyleri dikkat çekmektedir. TKT, ATXN3, PTMS genlerinde hipoksik chamber sisteminde görülen anlamlı yüksek artış oranları, CoCl₂ modelinde görülmemiştir. Tam tersine burada çoğunlukla anlamlı veya belirgin bir azalış göstermektedir (Şekil 4.43). CoCl₂ modeli çoğunlukla bu gen aktivitelerinde baskılayıcı bir rol oynamaktadır. Hem hücre yüzeyinde hem hücre içinde bulunan ve glikolizde görev alan ENO1 pek çok kanser için onkojendir. Plazminojen reseptörü olmasının dışında, angiyojenezi uyarak kanser gelişimine katkı sağlar ENO1'in Şekil 4.43'te hipoksik chamber modelinde 24. saate (0.185) kıyasla 72. (1.05) saatte anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmektedir. Glikolizde görev alan ve çeşitli tümör süreçlerinde rol oynayan PKM, hipoksik chamber modelinde 3D-A549 tümöroidlerinde 48. saatte anlamlı yüksek (6.42235) bir şekilde ifade edilmiştir (Şekil 4.43) (PKM ve ENO1 için kurulan qPCR analizde Ct değeri alınamamıştır. Bu yüzden CoCl₂ mRNA ifade düzeyi değerlendirilmesi yapılamamaktadır.) (Israelsen ve Vander-Heiden, 2015; Huang ve ark., 2022).

Özellikle TKT, ATXN3 ve PTMS genlerinde hipoksik chamber sisteminde anlamlı yüksek artış gösterirken, CoCl₂ modelinde anlamlı veya belirgin bir azalış göstermiştir. Sonuçlar CoCl₂ modelinin çoğunlukla bu gen aktivitelerinin ifadelerinde baskılayıcı bir rol oynadığını düşündürmektedir. Çeşitli kanserlerde onkogen olarak rol aldığı bilinen aynı zamanda kromatin regülasyonunda da rol oynayan ATXN3, hipoksik chamber modelinde 48. saatte anlamlı belirgin bir artış (8.72804) göstermiş, ancak CoCl₂ modelinde 24. saatte anlamlı bir düşüş (0.429607) göstermiştir. EMT sürecinde, kemoterapi direncinin oluşmasında rol oynayan TKT, 3D-A549 hipoksik chamber modelinde 48. saatte anlamlı belirgin bir artış göstermişken, CoCl₂ 24. saatte anlamlı bir azalış göstermektedir. Hücre çoğalmasında görevli nükleer bir protein olup pek çok kanser türünde yüksek ifade edildiği bildirilen ve kromatin yeniden düzenlenmesinde de rol oynayan PTMS, iki farklı hipoksi modelinde de tanımlanan ortak proteinler arasındadır. PTMS, 3D-A549 hipoksik chamber modelinde anlamlı ve yüksek bir şekilde hem 48. saatte (16.5273) hem de 72. saatte (3.8932) anlamlı yüksek bir artış gösterirken, CoCl₂ modelinde ise bir özellikle 48. saatte anlamlı azalma (0.29) göstermiştir (Şekil 4.43) (Hernandez-Carralero ve ark., 2023).

Bu araştırmanın bulguları doğrultusunda iki farklı hipoksik modelinin aktive edeceği strese adaptasyon mekanizmalarının farklı olabileceği görülmektedir. Hipoksik chamber modeli üzerinden değerlendirildiğinde, Notch aracılı kök hücre düzenlenmesinde rol oynayan NOTCH2NLB, tümör mikroçevresinde ve immün sistemde rol oynayan FCER1G, metabolik yollarda rol oynayan TKT ve PKM, epigenetik modifikasyonlarda da rol oynayan ve tümör gelişimine katkı sağladığı bilinen ATXN3 ile PTMS'in mRNA ifadelerindeki ciddi anlamlı artışlar, hücrenin hipoksiye adaptasyonunu yansıtmaktadır. Özellikle tanımlanan koşullarda ortak olan proteinlerin (PTMS) epigenetik modifikasyon mekanizmalarında da rol alıyor olması ayrıca ilginç

bir durumdur. Hipoksik mikroçevrenin ve 3D formasyonun bu modifikasyonlarda yukarıda da tartışıldığı gibi etki ettikleri bilinmektedir. CoCl_2 modelinde Co^{+2} iyonları, HIF1a'yı prolin rezidülerinden hidroksilasyonu aracılığıyla yıkımında rol oynayan prolinhidroksilazların koaktivatörü olan Fe^{+2} iyonları ile rekabete girer ve prolinhidroksilazlara bağlanarak aktivitelerini inhibe eder. Sonuç olarak yıkılamayan HIF1a'nın birikiminden kaynaklı hipoksi yanıt (HRE) genleri transkribe edilir. CoCl_2 modelinde, bulgularımızdaki mRNA seviyelerinin hipoksik chamber modeli ile neredeyse ters düşmesi, oksijen-bağımlı bir mekanizma olmadığından kaynaklandığını ve bundan ötürü farklı adaptif yanıtların ortaya çıktığını düşündürmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak Calu-1 hücreleriyle yürütülen deneylerde fizyolojik hipoksiyi daha iyi taklit ettiğini düşündüğümüz hipoksik chamber kullanılarak hipoksik mikroçevre oluşturulmuştur.

Kanser tanı ve tedavisinde, ayrıca terapötik stratejilerin geliştirilmesinde hücre membran proteinleri büyük önem taşır. Özellikle bu yüzey proteinlerinin potansiyel bir biyobelirteç olma durumu klinik uygulamalar için kritiktir. KKH'lerinin tümör başlamasına, gelişimine, tedaviye direnç ve nüksünde krittik roller göz önüne alındığında bu hücreler ile ilişkili proteinlerin belirlenmesi çok büyük önem taşır. Bu çalışmada normoksik ve hipoksik koşullarda tanımlanan ve KKH ile bağlantılı olduğu düşünülen proteinlerin KHDAK için potansiyel biyobelirteç adayı olabileceği görülmektedir. Gelecekte bu bulgular ile yapılacak ileri araştırmalar tanı ve tedavinin gelişmesine katkı sağlayabilir. Sonuç olarak bu araştırmada hem normoksik hem de hipoksik koşulda, KKH gelişimi, EMT süreci, immün sistem kaçıışı, kötü prognoz ve tümör progresyonu ile ilişkili hücre membran proteinleri (TSBH1, PLXNB2, ABCA5, CALR, TSPAN5, DLL1, NOTCH2NLB vb.) tanımlanmıştır. Literatürde hipoksinin KKH popülasyonunu arttırdığı ve bu hücrelerin özelliklerinin korunmasını sağladığı bilinmektedir. Benzer şekilde hipoksik stres dahil olmak üzere pek çok stres koşullarının hücre yüzey membran organizasyonunda değişikliklere yol açtığı da bilinmektedir. Aynı zamanda hipoksinin epigenetik mekanizmalar üzerine etkisi de araştırılmıştır. Ek olarak 3D formasyonun kendi başına nispi hipoksik alanlar oluşturduğu da göz önünde bulundurulduğunda, hipoksinin uyardığı adaptif mekanizmalar ve epigenetik modifikasyonların, hücre yüzeyi kompozisyonunda ve organizasyonunda önemli değişikliklere yol açabileceği düşünülmektedir. Bu değişikliklerin, protein düzeyinde KKH ilişkileri çerçevesinde araştırılmasının, klinik uygulamalarda ve terapötik hedeflerin yeniden şekillendirilmesinde potansiyel öneme sahip olabileceği öngörülmektedir. Bulgularımızda epigenetik modifikasyonlarda rol oynayan pek çok proteinin farklı koşullarda ortak proteinler arasında yer alması ve bu proteinlerin önemli bir kısmının literatürde kök hücre ilişkili süreçler ile ilişkilendirilmiş olmaları, hipoksinin yalnızca KKH mekanizmalarını uyarmakla kalmayıp, aynı zamanda epigenetik yeniden düzenleme süreçlerini de tetiklediğini göstermektedir.

Sonuç olarak proteomik analizler sonucunda, tanı ve tedavide potansiyel biyobelirteç adayı olabilecek, ileri araştırmalar ile doğrulanması gereken, kapsamlı bir protein kütüphanesi elde edilmiştir. Bu protein kütüphanesinin önemli bir kısmını hücre yüzeyine lokalize proteinler

oluşturmaktadır. Ayrıca, bu proteinlerin bir kısmının kanser progresyonuna katıldığı literatürde gösterilmiş, önemli bir kısmının ise bu sürece katkı sağlayabileceği öngörülmektedir. Araştırmada hücre membran proteinleri öncelikli hedeflenmiş olsa da, hücre içi proteinlerinin de tanı ve tedavide çok kritik roller üstlendiği ve KKH gelişimi ile ilişkili süreçleri yönlendirdiği saptanmıştır. Özellikle hem epigenetik modifikasyonda hem de KKH ilişkili süreçlerde rol oynayan proteinler bunlara örnektir. Ek olarak 2D ve 3D hücre kültür modelleri karşılaştırılmış ve gerçek tümör dokusunu daha iyi mimik edebilen 3D akciğer tümöroidlerinin avantajları bulgularımıza yansımıştır. Genel olarak değerlendirildiğinde bulgularda yer alan geniş hücre membran protein verisinin, özellikle hipoksik adaptasyon yanıtına uyum sağlayan proteinlerin her birinin, potansiyel biyobelirteç olarak ileri çalışmalarda ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Verilerden tanımlanan hücre içi proteinler de tanı ve tedavide potansiyel biyobelirteç adayları arasında yer alabilir ve ileri araştırmalar için önem arz etmektedir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 3D hücre kültürü modeli iki boyutlu kültür modeline kıyasla hipoksik tümör mikroçevresini ve fizyolojik yanıtı daha iyi mimik ettiğini göstermiştir. Özellikle 3D kültür modellerde oluşan farklı oksijen gradyanlarının oluşması (tümörodin sentral kısmının daha hipoksik olması) tümör heterojenitesine katkı sağlamaktadır. Ayrıca iki farklı hipoksi indüksiyon modelinin (CoCl₂ ve Chamber) farklı transkripsiyonel yanıtlar ortaya koyduğu görülmüş, chamber sisteminin hipoksik mikroçevreyi daha gerçekçi biçimde yansıttığı belirlenmiştir. Chamber sisteminde; FCER1G, TKT ve PTMS mRNA ifadeleri artarken, CoCl₂ sisteminde; FCER1G, TKT ve PTMS mRNA ifadeleri azalmıştır.

Proteomik analiz sonucunda toplam 2225 protein tanımlanmış, bu proteinlerin önemli bir bölümünün hücre yüzeyinde lokalize proteinler olduğu (yaklaşık %40) tespit edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda tanımlanan proteinlerin önemli bir kısmı kanser progresyonunda, ilaç direnci gibi süreçlere katkı sağlamaktadır. Hem normoksik (TSPAN5, DLL1) hemde hipoksik koşullarda (TSBH1, PLXNB2, ABCA5, CALR, NOTCH2NLB) KKH ilişkili potansiyel biyobelirteç adayı olabilecek proteinler tanımlanmıştır. Ancak tanımlanan bu proteinlerin gerçekten KKH ile ilişkili olup olmadığının ve potansiyel bir biyobelirteç adayı olarak değerlendirilip değerlendirilmeyeceğinin anlaşılabilmesi için ileri düzey fonksiyonel doğrulama çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Genel olarak tanımlanan ortak proteinlerin önemli bir kısmı epigenetik modifikasyon ve kök hücre gelişimi ile ilişkili olması dikkat çekicidir. Özellikle ZC3H13 tüm koşullarda ve modellerde tanımlanan bir proteindir. Bu protein hem hücrenin bazal ihtiyaçlarında hem de KKH gelişim mekanizmasında rol oynayabilecek bir protein de olabileceği düşünülmektedir.

Tüm bu bulgular, öne çıkan proteinlerin daha ileri araştırmalar ile doğrulanmasının ve KHDAK'da tanı ve tedavi için potansiyel biyobelirteçlerin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayabileceğini göstermektedir. Bu çalışma aynı zamanda KKH ilişkili potansiyel biyobelirteçlerin tanımlanmasına yönelik öncü bir pilot araştırma niteliğini taşımaktadır. Araştırma kapsamında tanımlanan ve öne çıkan proteinlerin (özellikle KKH ilişkili proteinlerin) fonksiyonel validasyonu, klinik örnekler ile validasyonu ve terapötik hedef potansiyelinin değerlendirilmesi gelecek çalışmalar için kritik önem taşımaktadır.

Bu kapsamda;

- Elde edilen proteomik verilerin transkriptomik, hasta veri tabanı vb. (GEPIA, TCGA vb.) üzerinden ileri biyoinformatik analizlerinin yapılması, literatür taramalarıyla da desteklenerek öne çıkan proteinlerin belirlenmesi,

- Özellikle hücre yüzeyine lokalize ve/veya KKH ilişkili öne çıkan proteinlerin fonksiyonel deneylerle doğrulanması (ör; qPCR, siRNA, CRISPR vb.), farklı hücre hatlarından geliştirilen tümöroidler üzerinde deneylerin tekrarlanması,
- Fonksiyonel doğrulanması yapılan proteinlerin hasta örnekleri üzerinden validasyonu (qPCR, IHC, ICC, IB vb.) ve ayrıca KHDAK hasta türevli organoidler üzerinde benzer analizlerin yapılması,
- Fonksiyonel analizlerle doğrulanan, önemi ortaya koyulan özellikle hücre membran proteinlerinin, gelecekte monoklonal antikor geliştirme çalışmaları ve ilaç hedefi olarak ileriye dönük değerlendirilmesi, KHDAK'da yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı.

Sonuç olarak bu önerilerin hayata geçirilmesi, KHDAK'da KKH ilişkili biyobelirteçlerin tanımlanması ve klinik uygulamalara aktarılması sürecine önemli katkılar sağlayacak; yalnızca biyobelirteçlerin tanımlanmasında değil; KHDAK için yeni ve etkili stratejilerin geliştirilmesinin önünü açacaktır.

KAYNAKLAR

- Açıkgöz, E., 2014. Trabected'in (Yondelis; ET-743) CD133+/CD44+ İnsan Prostat Kanseri Kök Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İki Boyutlu (2D) ve Üç Boyutlu (3D) İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, T.C. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 145 s.
- Aguirre, M., Escobar, M., Amezcua, S. F., Cubillos, D., Rincon, C., Vanegas, P., Tarazona, M. P., Escobar, S. A., Blanco, J. C., ve Celis, L. G., 2023. Application of the Yamanaka Transcription Factors Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc from the Laboratory to the Clinic. *Genes (Basel)*, 14(9): 1697. doi: 10.3390/genes14091697
- Akbari, S., 2018. In-Vitro Hepatik Organoid Modelinin Geliştirilmesi. Doktora tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir, 130 s.
- Anamourlis, C., 2020. The cell membrane. *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia*, 26(6): S1–S7. doi:10.36303/SAJAA.2020.26.6.S3.2527.
- Aoto, M., Sakai, H., Tokunaga, N., Miyazaki, M., Kiyoi, T., Ohkubo, N., Imai, Y., ve Mitsuda, N., 2025. The splicing factor Acin1 is essential for embryonic development but has limited effects on muscle structure and homeostasis. *Scientific Reports*, 15: 14017. doi:10.1038/s41598-025-98851-x
- Atar E., 2018. *Akciğer Kanseri Hastalarında Kanseri Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı, Kayseri, 70 s.
- Aydın, B. A., 2024. COVID-19 pandemisi döneminde tanı alan akciğer kanseri olgularında pandeminin hastalığın tanı ve tedavi sürecine etkisinin incelenmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara, 124 s.
- Barman, S., Roy, A., Bardhan, I., Kandasamy, T., Shivani, S., ve Sudhamalla, B., 2021. Insights into the molecular mechanisms of histone code recognition by the BRPF3 bromodomain. *Chemistry – An Asian Journal*, 16(21): 3404–3412. doi:10.1002/asia.202100793
- Batie, M., Peso, L. D., ve Rocha, S., 2018. Hypoxia and chromatin: a focus on transcriptional repression mechanisms. *Biomedicine*, 6(2): 47. doi:10.3390/biomedicine6020047
- Bitler, B. G., Bailey, C. A., Yamamoto, T. M., McMellen, A., Kim, H., ve Watson, Z. L., 2023. Targeting BRPF3 moderately reverses olaparib resistance in high-grade serous ovarian carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, 62(11): 1717–1730. doi:10.1002/mc.23610.
- Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M. K., Tauler, J., Bikkavilli, R. K., ve Winn, R. A., 2014. The soft agar colony formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, (92): e51998. doi:10.3791/51998.

- Brundu, S., Napolitano, V., Franzolin, G., Lo Cascio, E., Mastrantonio, R., Sardo, G., Cascardi, E., Verginelli, F., Sarnataro, S., Gambardella, G., Pisacane, A., Arcovito, A., Boccaccio, C., Comoglio, P. M., Giraudo, E., ve Tamagnone, L., 2023. Mutated axon guidance gene PLXNB2 sustains growth and invasiveness of stem cells isolated from cancers of unknown primary. *EMBO Molecular Medicine*, 15(3):e16104. Doi:10.15252/emmm.202216104
- Cable, J., Fuchs, E., Weissman, I., Jasper, H., Glass, D., Rando, T. A., Blau, H., Debnath, S., Oliva, A., Park, S., Passegue, E., Kim, C., ve Krasnow, M. A., 2020. Adult stem cells and regenerative medicine – a symposium report. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1462(1): 27-36. doi:10.1111/nyas.14243
- Çakır, İ.,E., 2024. Akciğer adenokarsinomlarında Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması, histopatolojik derece ve pattern analizi. *Akdeniz Tıp Dergisi*, 10(3): 572-579.doi: 10.53394/akd.1230983
- Calapoğlu, N. Ş., 2016. Hipoksiye karşı hücrel cevabın düzenleyicisi: HIF-1 regulator of cellular response to hypoxia. *Smyrna Tıp Dergisi*, 48-53
- Capaccione, K. M., ve Pine, S. R., 2013. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*, 34(7): 1420–30. doi:10.1093/carcin/bgt127
- Chang, C., Rajasekaran, M., Qiao, Y., Dong, H., Wang, Y., Xia, H., Deivasigamani, A., Wu, M., Sekar, K., Gao, H., Sun, M., Niu, Y., Li, Q., Tao, L., Yan, Z., Wang, M., Chen, S., Zhao, S., Chen, D., Li, L., Yang, F., Gao, H., Chen, B., Su, L., Xu, L., Chen, Y., Seshachalam, V. P., Chen, G., Gunaratne, J., Hong, W., Shi, J., Chen, G., Grierson, D. S., Chabot, B., Xie, T., Hui, K. M., ve Chen, J., 2022. The aberrant upregulation of exon 10-inclusive SREK1 through SRSF10 acts as an oncogenic driver in human hepatocellular carcinoma. *Nature Communications*, 13: 1363. doi:10.1038/s41467-022-29016-x
- Chang, C., Rajasekaran, M., Qiao, Y., Dong, H., Wang, Y., Xia, H., Deivasigamani, A., Wu, M., Sekar, K., Gao, H., Sun, M., Niu, Y., Li, Q., Tao, L., Yan, Z., Wang, M., Chen, S., Zhao, S., Chen, D., Li, L., Yang, F., Gao, H., Chen, B., Su, L., Xu, L., Chen, Y., Seshachalam, V. P., Chen, G., Gunaratne, J., Hong, W., Shi, J., Chen, G., Grierson, D. S., Chabot, B., Xie, T., Hui, K. M., ve Chen, J., 2022. The aberrant upregulation of exon 10-inclusive SREK1 through SRSF10 acts as an oncogenic driver in human hepatocellular carcinoma. *Nature Communications*, 13: 1363. doi:10.1038/s41467-022-29016-x
- Chang, Y. C., Chan, M. H., Li, C. H., Yang, C. J., Tseng, Y. W., Tsai, H. F., Chiou, J., ve Hsiao, M., 2021. Metabolic protein phosphoglycerate kinase 1 confers lung cancer migration by directly binding HIV Tat specific factor 1. *Cell Death Discovery*, 7: 135. doi:10.1038/s41420-021-00520-1
- Chapman-Smith, A., ve Cronan, J. E. Jr., 1999. In vivo enzymatic protein biotinylation. *Biomolecular Engineering*, 16(1–4): 119–25. doi:10.1016/s1050-3862(99)00046-7.

- Chapman-Smith, A., ve Cronan, J. E. Jr., 1999. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(9): 359–363. doi:10.1016/s0968-0004(99)01438-3
- Chen, K., Xiong, L., Yang, Z., Huang, S., Zeng, R., ve Miao, X., 2018. Prothymosin- α and parathymosin expression predicts poor prognosis in squamous and adenosquamous carcinomas of the gallbladder. *Oncology Letters*, 15(4): 4485–4494. doi:10.3892/ol.2018.7824
- Chen, Z., Wang, C., Yu, N., Si, L., Zhu, L., Zeng, A., Liu, Z., ve Wang, X., 2019. INF2 regulates oxidative stress-induced apoptosis in epidermal HaCaT cells by modulating the HIF1 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111: 151–161. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.046.
- Chen, Z.X., Mu, M.Y., Yang, G., Qi, H., Fu, X.B., Wang, G.-S., Jiang, W.W., Huang, B.J., ve Gao, F., 2024. Hypoxia-induced DTL promotes the proliferation, metastasis, and sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma through ubiquitin-mediated degradation of SLTM and subsequent Notch pathway activation. *Cell Death & Disease*, 15: 734. doi:10.1038/s41419-024-07089-4.
- Cheng, Y., Wang, S., Gao, Q., ve Fang, D., 2024. ATXN3 functions as a tumor suppressor through potentiating galectin-9-mediated apoptosis in human colon adenocarcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 300(7): 107415. doi:10.1016/j.jbc.2024.107415
- Chittiboina, P., ve Lonser, R. R., 2015. Von Hippel- Lindau diseases. In: *Handbook of Clinical Neurology*, 132: 139-156. doi:10.1016/B978-0-444-62702-5.00010-X
- Chun, Y. S., Kim, M. S., ve Park, J. W., 2002. Oxygen-dependent and independent regulation of HIF-1 α . *Journal of Korean Medical Science*, 17(5): 581-588. doi:10.3346/jkms.2002.17.5.581
- Classe, M., Malouf, G. G., Su, X., Yao, H., Thompson, E. J., Doss, D. J., Grégoire, V., Lenobin, J., Fantoni, J. C., Sudour-Bonnange, H., Khayat, D., Aubert, S., Tannir, N. M., ve Leroy, X., 2017. Incidence, clinicopathological features and fusion transcript landscape of translocation renal cell carcinomas. *Histopathology*, 70(7):1089-1097. doi:10.1111/his.13167
- Corsini, N. S., Peer, A. M., Moeseneder, P., Roiuk, M., Burkard, T. R., Theussl, H.C., Moll, I., ve Knoblich, J. A., 2018. Coordinated control of mRNA and rRNA processing controls embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *Cell Stem Cell*, 22(4): 543–558.e12. doi:10.1016/j.stem.2018.03.002
- Covello, K. L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J. D., Arsham, A. M., Hu, C. J., Labosky, P. A., Simon, M.C., ve Keith B., 2006. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & Development*, 20(5): 557-570. doi:10.1101/gad.1399906

- Darici, H., 2013. *Pluripotent kök hücre sinyal yollarına etki eden kimyasal uyaranların değerlendirilmesi*. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta, 239 s.
- Defining the needle in a haystack: a compendium of genomic, pathologic, and clinical characteristics of rare pulmonary tumors. *Lung Cancer*, 199:108035. doi:10.1016/j.lungcan.2024.108035
- Demirel, S. H., 2013. Kolorektal kanser riski ile hipoksiyle indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1a) ve Von Hippel Lindau (VHL) gen polimorfizmleri arasındaki ilişki. Doktora Tezi, T.C. Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Konya, 93 s.
- Deng, H., Ji, G., Ma, J., Cai, J., Cheng, S., ve Cheng, F., 2024. RNF19A inhibits bladder cancer progression by regulating ILK ubiquitination and inactivating the AKT/mTOR signalling pathway. *Biology Direct*, 19: 102. doi:10.1186/s13062-024-00562-2.
- Ding, K., Tan, S., Huang, X., Wang, X., Li, X., Fan, R., Zhu, Y., Lobie, P. E., Wang, W., ve Wu, Z., 2018. GSE1 predicts poor survival outcome in gastric cancer patients by SLC7A5 enhancement of tumor growth and metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, 293(11): 3949–3964. doi:10.1074/jbc.RA117.001103
- Du, Y., Zhang, S., Zhang, G., Hu, J., Zhao, L., Xiong, Y., Shen, L., Chen, R., Ye, K., ve Xu, Y., 2023. Mutational profiling of Chinese patients with thyroid cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 14: 1156999. doi:10.3389/fendo.2023.1156999
- Duma, N., Santana-Davila, R., ve Molina, J.R., 2019. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 94(8): 1623-1640. doi: 10.1016/j.mayocp.2019.01.013
- Elia, G., 2008. Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics*, 8(19): 4012–24. doi:10.1002/pmic.200800097.
- Er, İ., 2016. Fare İnce Bağırsak Kriptillerinden Elde Edilen Hücrelerden 3-Boyutlu Kültür ile Organoid Oluşturulması. Yüksek Lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim
- Eren, M. K., 2017. Meme kanser kök hücre fenotipi ve tümör hipoksisi ile ilişkisi. *International Journal of Innovative Approaches in Science Research*, 1(1): 9-19. doi:10.29329/ijiasr.2017.99.2
- Fatehullah, A., Tan, S. H., ve Baker, N., 2016. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature Cell Biology*, 18(3): 246-254. doi:10.1038/ncb3312.
- Fei, D., Wang, Y., Zhai, Q., Zhang, X., Zhang, Y., Wang, Y., Li, B., ve Wang, Q., 2021. KAT6A regulates stemness of aging bone marrow-derived mesenchymal stem cells through Nrf2/ARE signaling pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1): 104. doi:10.1186/s13287-021-02164-5

- Fiddes, I. T., Lodewijk, G. A., Mooring, M., Bosworth, C. M., Ewing, A. D., Mantalas, G. L., Novak, A. M., van den Bout, A., Bishara, A., Rosenkrantz, J. L., Lorig-Roach, R., Field, A. R., Haeussler, M., Russo, L., Bhaduri, A., Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Dougherty, M. L., Nuttle, X., Addor, M.C., Zwolinski, S., Katzman, S., Kriegstein, A., Eichler, E. E., Salama, S. R., Jacobs, F. M. J., ve Haussler, D., 2018. Human-specific NOTCH2NL genes affect Notch signaling and cortical neurogenesis. *Cell*, 173(6): 1356–1369.e22. doi:10.1016/j.cell.2018.03.051
- Frost, J., 2018. VHL inhibitors as chemical probes of hypoxia signaling pathway. Doktora Tezi, University of Dundee, Dundee, 232 s.
- Frum, T., ve Spence, J. R., 2021. hPSC-derived organoids: models of human development and disease. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*, 99(4): 463–473. doi:10.1007/s00109-020-01969-w.
- Gao, Q., Zheng, J., Ni, Z., Sun, P., Yang, C., Cheng, M., Wu, M., Zhang, X., Yuan, L., Zhang, Y., ve Li, Y., 2020. The m6A methylation-regulated AFF4 promotes self-renewal of bladder cancer stem cells. *Stem Cells International*, 2020(1): 8849218. doi:10.1155/2020/8849218
- Ge, W., Jiang, M., Zhang, F., Ma, Y., Wang, H., ve Xu, Y., 2020. ZGRF1 is associated with poor prognosis in triple-negative breast cancer and promotes cancer stemness based on bioinformatics. *OncoTargets and Therapy*, 13: 2843–2854. doi:10.2147/OTT.S234250
- Gezici, S., 2017. Proteomics techniques and their applications in cancer research. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi (Turkish Journal of Scientific Reviews)*, 10(2): 54–61.
- GLOBOCAN, 2022. Cancer Today: estimates of incidence, mortality and prevalence worldwide. International Agency for Research on Cancer (IARC). <http://gco.iarc.who.int/today/en> [Son erişim tarihi: 03.10.2025]
- Golchin, A., Chatziparasidou, A., Ranjbarvan, P., Niknam, Z., ve Ardeshirylajimi, A., 2020. Embryonic stem cells in clinical trials: current overview of developments and challenges. In: *Cell Biology and Translations Medicine*, Volume 11. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 1312. Springer, Cham, pp. 19-37. doi:10.1007/5584_2020_592
- Gong, H., Yang, X., An, L., Zhang, W., Liu, X., Shu, L., ve Yang, L., 2025. PCSK5 downregulation promotes the inhibitory effect of andrographolide on glioblastoma through regulating STAT3. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 480: 521–533. doi:10.1007/s11010-024-04977-3
- Gong, P.J., Shao, Y.C., Yang, Y., Song, W.J., He, X., Zeng, Y.F., Huang, S.R., Wei, L., ve Zhang, J.W., 2020. Analysis of N6-methyladenosine methyltransferase reveals METTL14 and ZC3H13 as tumor suppressor genes in breast cancer. *Frontiers in Oncology, Sec. Cancer Molecular Targets and Therapeutics*. 10: 578963. doi:10.3389/fonc.2020.578963

- Greenow, K., ve Clarke, A. R., 2012. Controlling the stem cell compartment and regeneration in vivo: the role of pluripotency pathways. *Physiological Reviews*, 92(1): 75-99. doi:10.1152/physrev.00040.2010
- Guo, X.B., Zhang, X.C., Chen, P., Ma, L.M., ve Shen, Z.Q., 2019. miR-378a-3p inhibits cellular proliferation and migration in glioblastoma multiforme by targeting tetraspanin 17. *Oncology Reports*, 42(5): 1957–1971. doi:10.3892/or.2019.7283
- Guo, X.B., Zhang, X.C., Chen, P., Ma, L.M., ve Shen, Z.Q., 2019. miR-378a-3p inhibits cellular proliferation and migration in glioblastoma multiforme by targeting tetraspanin 17. *Oncology Reports*, 42(5): 1957–1971. doi:10.3892/or.2019.7283
- Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., ve Delort, L., 2021. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22): 12200. doi:10.3390/ijms222212200.
- Halasi, M., ve Gartel, A. L., 2013. Targeting FOXM1 in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 85(5): 644–652. doi:10.1016/j.bcp.2012.10.013
- Han, S. J., Kwon, S., ve Kim, K. S., 2021. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell International*, 21:152. doi:10.1186/s12935-021-01853-8
- Hao, S., Meng, Q., Sun, H., Li, Y., Li, Y., Gu, L., Liu, B., Zhang, Y., Zhou, H., Xu, Z., ve Wang, Y., 2022. The role of transketolase in human cancer progression and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154: 113607. doi:10.1016/j.biopha.2022.113607
- Hegde, M., Guruprasad, K. P., Ramachandra, L., Satyamoorthy, K., ve Joshi, M. B., 2020. Interleukin-6-mediated epigenetic control of the VEGFR2 gene induces disorganized angiogenesis in human breast tumors. *Journal of Biological Chemistry*, 295(34): 12086–12098. doi:10.1074/jbc.RA120.012590
- Hernández-Carralero, E., Cabrera, E., Rodríguez-Torres, G., Hernández-Reyes, Y., Singh, A. N., Santa-María, C., Fernández-Justel, J. M., Janssens, R. C., Martejn, J. A., Evert, B. O., Mailand, N., Gomez, M., Ramadan, K., Smits, V.A.J., Freire, R., 2023. ATXN3 controls DNA replication and transcription by regulating chromatin structure. *Nucleic Acids Research*, 51(11): 5396–5413. doi:10.1093/nar/gkad212
- Hes, F. J., Höppener, J. W., van der Luijt, R. B., ve Lips, C. J., 2005. Von Hippel-Lindau diseases. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 3(4): 171-178. doi:10.1186/1897-4287-3-4-171
- Hildebrand, D., Decker, S. O., Koch, C., Schmitt, F. C. F., Ruhrmann, S., Schneck, E., Sander, M., Weigand, M. A., Brenner, T., Heeg, K., ve Uhle, F., 2019. Host-derived Delta-like canonical Notch ligand 1 as a novel diagnostic biomarker for bacterial sepsis—Results from a combinational secondary analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9: 267. doi:10.3389/fcimb.2019.00267

- Hildebrand, D., Decker, S. O., Koch, C., Schmitt, F. C. F., Ruhrmann, S., Schneck, E., Sander, M., Weigand, M. A., Brenner, T., Heeg, K., ve Uhle, F., 2019. Host-derived Delta-like canonical Notch ligand 1 as a novel diagnostic biomarker for bacterial sepsis—results from a combinational secondary analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9: 267. doi:10.3389/fcimb.2019.00267
- Hosseini, F. S., Mohamad Soltani, B., Baharvand, H., ve Hosseinkhani, S., 2019. Investigation of the expression and the effect of SPTBN4-miR1 in process of nerve differentiation of NT2 cells. *Modares Journal of Biotechnology (JMBS)*, 10(4): 609–615. doi:20.1001.1.23222115.1398.10.4.12.0
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71571496> (PubChem, 2025b)
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Biotin> [Son erişim tarihi: 03.10.2025]
- <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/3d-cell-culture/3d-cell-culture-technology> [Son erişim tarihi: 03.10.2025]
- <https://www.thermofisher.com> [Son erişim tarihi: 29.08.2025]
- <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O75051/entry#function> [Son erişim tarihi: 03.10.2025]
- Hu, S. W., Wu, C. C., Dong, S. W., Tzou, K. Y., Chen, C. H., Wang, Y. H., Liu, Y. N., Liao, C. C., ve Li, C. H., 2025. Implications of the KHDC4-TRAF2 axis in the context of prostate cancer prognosis. *Aging*, 17(6): 1544–1570. doi:10.18632/aging.206273
- Huang, C. K., Sun, Y., Lv, L., ve Ping, Y., 2022. ENO1 and cancer. *Molecular Therapy – Oncolytics*, 24: 288–298. doi:10.1016/j.omto.2021.12.026
- Huang, T., Sun, L., Yuan, X., ve Qiu, H., 2017. Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. *Oncotarget*, 8: 84546–84558. doi:10.18632/oncotarget.19165
- Huang, Y., Tejero, R., Lee, V. K., Brusco, C., Hannah, T., Bertucci, T. B., Alves, C. J., Katsyv, I., Kluge, M., Foty, R., Zhang, B., Friedel, C. C., Dai, G., Zou, H., ve Friedel, R. H., 2021. Plexin-B2 facilitates glioblastoma infiltration by modulating cell biomechanics. *Communications Biology*, 4: 145. doi:10.1038/s42003-021-01667-4
- International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), 2024. 9. *TNM Evreleme Şeması (Türk Toraks Derneği (TTD) Türkçe çeviri, Staging Cards in Thoracic Oncology, 9th Edition)*. IASLC. <https://www.iaslc.org/research-education/publications-resources-guidelines/staging-cards-thoracic-oncology-9th-edition>, [Son erişim tarihi: 03.10.2025]
- Ishii, T., ve Eto, K., 2014. Fetal stem cell transplantation: past, present, and future. *World Journal of Stem Cells*, 6(4): 404–20. doi:10.4252/wjsc.v6.i4.404
- Israelsen, W. J., ve Vander Heiden, M. G., 2015. Pyruvate kinase: function, regulation and role in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 43: 43–51. doi:10.1016/j.semcdb.2015.08.004

- Jones, E. R., ve Griffitt, R. J., 2022. Oil and hypoxia alter DNA methylation and transcription of genes related to neurological function in larval *Cyprinodon variegatus*. *Aquatic Toxicology*, 251: 106267. doi:10.1016/j.aquatox.2022.106267
- Kang K., Li, B., Wang, S., Wang, J., ve Liang, X., 2024. Clinical characteristics and treatment management of combined large cell neuroendocrine carcinoma, a subtype of large cell neuroendocrine carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 14:1449490. doi:10.3389/fonc.2024.1449490
- Kassel, S., Yuan, K., Bunnag, N., Neitzel, L. R., Lu, W., Schwarzkopf, A., Maines, B., Loberg, M. A., Xu, G., Adams, A., McCray, A. D., Cho, A., Rockouski, M., Orton, G., Goldsmith, L., Aronno, M. M. A., Spencer, Z. T., Khan, O. M., Ye, F., Williams, C., Lebensohn, A. M., Rohatgi, R., Wang, X., Weiss, V. L., Hong, C. C., Kettenbach, A. N., Robbins, D. J., Ahmed, Y., ve Lee, E., 2025. The TRIP12 E3 ligase induces SWI/SNF component BRG1- β -catenin interaction to promote Wnt signaling. *Nature Communications*, 16: 5248. doi:10.1038/s41467-025-60535-5
- Katoh, M., 2015. Functional proteomics of the epigenetic regulators ASXL1, ASXL2 and ASXL3: a convergence of proteomics and epigenetics for translational medicine. *Expert Review of Proteomics*, 12(3): 317–328. doi:10.1586/14789450.2015.1033409
- Kaur, S., Bronson, S. M., Pal-Nath, D., Miller, T. W., Soto-Pantoja, D. R., ve Roberts, D. D., 2021. Functions of Thrombospondin-1 in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9): 4570. doi:10.3390/ijms22094570
- Kelleher, F. C., ve O’Sullivan, H., 2016. FOXM1 in sarcoma: role in cell cycle, pluripotency genes and stem cell pathways. *Oncotarget*, 7: 42792–42804. doi:10.18632/oncotarget.8669
- Kim, M., Jo, K.W., Kim, H., Han, M.E., ve Oh, S.O., 2023. Genetic heterogeneity of liver cancer stem cells. *Anatomy & Cell Biology*, 56(1): 94–108. doi:10.5115/acb.22.161
- Kim, M., Mun, H., Sung, C. O., Cho, E. J., Jeon, H. J., Chun, S. M., Jung, D. J., Shin, T. H., Jeong, G. S., Kim, D. K., Choi, E. K., Jeong, S. Y., Taylor, A. M., Jain, S., Meyerson, M., ve Jang, S. J., 2019. Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nature Communications*, 10 (1): 3991. doi:10.1038/s41467-019-11867-6.
- Kong, L., Yang, W., Chen, L., ve Qian, L., 2021. The DNA methylation-regulated MCTP1 activates the drug-resistance of esophageal cancer cells. *Aging*, 13(3): 3342–3352. doi:10.18632/aging.104173
- Kunoh, S., Nakashima, H., ve Nakashima, K., 2024. Epigenetic Regulation of Neural Stem Cells in Developmental and Adult Stages. *Epigenomes*, 8(2): 22. doi:10.3390/epigenomes8020022
- Larkin, S., ve Aukim-Hastie, C., 2011. Proteomic evaluation of cancer cells: Identification of cell surface proteins. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols (Methods in Molecular*

- Biology, Vol. 731), Humana Press, New York, s. 395–405. doi:10.1007/978-1-61779-080-5_32
- Lee, K. K., Rajagopalan, D., Bhatia, S. S., Tirado-Magallanes, R., Chng, W. J., ve Jha, S., 2021. The oncogenic E3 ligase TRIP12 suppresses epithelial–mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal traits through ZEB1/2. *Cell Death Discovery*, 7: 95. doi:10.1038/s41420-021-00479-z
- Lee, S. Y., Koo, I. S., Hwang, H. J., ve Lee, D. W., 2023. In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discovery*, 28(4): 119–137. doi:10.1016/j.slasd.2023.03.006
- Lee, S. Y., Koo, I. S., Hwang, H. J., ve Lee, D. W., 2023. In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discovery*, 28(4):119–137. doi:10.1016/j.slasd.2023.03.006.
- Letsas, K. P., Vartholomatos, G., Tsepi, C., Tsatsoulis, A., ve Frangou-Lazaridis, M., 2007. Fine-needle aspiration biopsy-RT-PCR expression analysis of prothymosin alpha and parathymosin in thyroid: novel proliferation markers? *Neoplasma*, 54(1): 57–62.
- Li, D., Jin, Y., He, X., Deng, J., Lu, W., Yang, Z., Zheng, X., Hou, K., Tang, S., Bao, B., Ren, J., Zhang, X., Wang, J., Yan, H., Qu, X., Liu, Y., ve Che, X., 2024. Hypoxia-induced LAMB2-enriched extracellular vesicles promote peritoneal metastasis in gastric cancer via the ROCK1-CAV1-Rab11 axis. *Oncogene*, 43(37): 2768–2780. doi:10.1038/s41388-024-03124-y
- Li, M., Fu, T., Yang, S., Pan, L., Tang, J., Chen, M., Liang, P., Gao, Z., ve Guo, L., 2021. Agarose-based spheroid culture enhanced stemness and promoted odontogenic differentiation potential of human dental follicle. doi: 10.1007/s11626-021-00591-5
- Li, M., Fu, T., Yang, S., Pan, L., Tang, J., Chen, M., Liang, P., Gao, Z., ve Guo, L., 2021. Agarose-based spheroid culture enhanced stemness and promoted odontogenic differentiation potential of human dental follicle cells in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 57: 620–630. doi:10.1007/s11626-021-00591-
- Li, M., Ma, Y., Zhong, Y., Liu, Q., Chen, C., Qiang, L., ve Wang, X., 2020. KALRN mutations promote antitumor immunity and immunotherapy response in cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer (J Immunother Cancer)*, 8(2): e000293. doi:10.1136/jitc-2019-000293
- Li, X., Ding, N., Ma, W., ve Zhang, M., 2024. IFIH1-mediated post-transcriptional regulation of PTTG1 promotes proliferation and affects PHA-848125 sensitivity and prognosis in oropharyngeal carcinoma. *American Journal of Cancer Research (Am J Cancer Res)*, 14(5): 2157–2171. doi:10.62347/YLCQ4222.

- Li, X., Lu, F., Cao, M., Yao, Y., Guo, J., Zeng, G., ve Qian, J., 2024. The pro-tumor activity of INTS7 on lung adenocarcinoma via inhibiting immune infiltration and activating p38MAPK pathway. *Scientific Reports*, 14: 25636. doi:10.1038/s41598-024-77093-3
- Li, X., Wu, D., Liu, H., ve Chen, J., 2020. Pulmonary sarcomatoid carcinoma: progress, treatment and expectations. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 12:17588359209502207. doi: 10.1177/17588359209502207
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R. E., Hiemeland, A. B., ve Rich, J. N., 2009. Hypoxia-inducible factors tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*, 15(6): 501-13. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018
- Liang, H., Xiao, J., Zhou, Z., Wu, J., Ge, F., Li, Z., Zhang, H., Sun, J., Li, F., Liu, R., ve Chen, C., 2018. Hypoxia induces miR-153 through the IRE1 α -XBP1 pathway to fine tune the HIF1 α /VEGFA axis in breast cancer angiogenesis. *Oncogene*, 37: 1961–1975. doi:10.1038/s41388-017-0089-8
- Liao, C., Hu, L., ve Zhang, Q., 2024. Von Hippel-Lindau protein signalling in clear cell renal cell carcinoma. *Nature Reviews Urology*, 21(11): 662-675. doi:10.1038/s41585-024-00876-w
- Liao, C., Hu, L., ve Zhang, Q., 2024. Von Hippel-Lindau protein signaling in clear cell renal cell carcinoma. *Nature Reviews Urology*, 21: 662-675. doi:10.1038/s41585-024-00876-w
- Lin, S. A., ve Barker, N., 2011. Gastrointestinal stem cells in self-renewal and cancer. *Journal of Gastroenterology*, 46(9): 1039–55. doi:10.1007/s00535-011-0424-8.
- Lin, W., Lin, A., Li, Z., Zhou, C., Chen, C., Chen, B., Lyu, Q., Zhang, J., ve Luo, P., 2020. Potential predictive value of SCN4A mutation status for immune checkpoint inhibitors in melanoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131: 110633. doi:10.1016/j.biopha.2020.110633
- Liu, H., Weng, J., Huang, C. L.-H., ve Jackson, A. P., 2024. Voltage-gated sodium channels in cancers. *Biomarker Research*, 12:70. doi:10.1186/s40364-024-00620-x
- Liu, N.Q., Cao, W.H., Wang, X., Chen, J., ve Nie, J., 2022. Cyclin genes as potential novel prognostic biomarkers and therapeutic targets in breast cancer. *Oncology Letters*, 24(4): 374. doi:10.3892/ol.2022.13494
- Liu, Q., Zhu, W., Tang, C., Liu, W., ve Luo, X., 2024. Integrative analysis of ASXL family genes reveals ASXL2 as an immunoregulatory molecule in head and neck squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, 14: 31368. doi:10.1038/s41598-024-82815-8
- Liu, W., Yuan, C., Fu, B., Xie, J., Li, W., Zhang, G., Ma, Z., ve Jiao, P., 2024. E3 ubiquitin ligase ANKIB1 attenuates antiviral immune responses by promoting K48-linked polyubiquitination of MAVS. *Cell Reports*, 43(9): 114687. doi:10.1016/j.celrep.2024.114687

- Liu, X., Xie, P., Hao, N., Zhang, M., Liu, Y., Liu, P., Semenza, G. L., He, J., ve Zhang, H., 2021. HIF-1-regulated expression of calreticulin promotes breast tumorigenesis and progression through Wnt/ β -catenin pathway activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)*, 118(44): e2109144118. doi:10.1073/pnas.2109144118
- Liu, Y.N., Chen, W.Y., Yeh, H.L., Chen, W.H., Jiang, K.C., Li, H.R., Dung, P. V. T., Chen, Z.Q., Lee, W.J., Hsiao, M., Huang, J., ve Wen, Y.C., 2024. MCTP1 increases the malignancy of androgen-deprived prostate cancer cells by inducing neuroendocrine differentiation and EMT. *Science Signaling*, 17(840): eadc9142. doi:10.1126/scisignal.adc9142
- Lodewijk, G. A., Fernandes, D. P., Vretzakis, I., Savage, J. E., ve Jacobs, F. M. J., 2020. Evolution of human brain size-associated NOTCH2NL genes proceeds toward reduced protein levels. *Molecular Biology and Evolution*, 37(9): 2531–2548. doi:10.1093/molbev/msaa104
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., ve Ploegh, H., 2020. *Moleküler Hücre Biyolojisi*, (H. Gerçil, M. Ozmen, Ö. Yeşilada, eds.), 6. Baskı, Palme Yayınevi, Ankara, 1150s.
- Luo, X.L., Deng, C.C., Su, X.D., Wang, F., Chen, Z., Wu, X.P., Liang, S.B., Liu, J.H., ve Fu, L.W., 2018. Loss of MED12 induces tumor dormancy in human epithelial ovarian cancer via downregulation of EGFR. *Cancer Research*, 78(13): 3532–3543. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0134
- Maher, E. R., 2004. Von Hippel-Lindau diseases. *Current Molecular Medicine*, 4(8): 833-842. doi:10.2174/1566524043359827
- Maiuthed, A., Chantarawong, W., ve Chanvorachote, P., 2018. Lung cancer stem cells and cancer stem cell-targeting natural compounds. *Anticancer Research*, 38(7): 3797-3809. doi:10.21873/anticancer.12663
- Margaret, A. L., Wanandi, S. I., Fadilah, F., ve Paramita, R. I., 2024. Identification of Potential Breast Cancer Stem Cell Biomarkers in the Secretome Using a Network Interaction Approach Analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 25(5): 1803–1813. doi:10.31557/APJCP.2024.25.5.1803
- Masuda, M., Uno, Y., Ohbayashi, N., Ohata, H., Mimata, A., Kukimoto-Niino, M., Moriyama, H., Kashimoto, S., Inoue, T., Goto, N., Okamoto, K., Shirouzu, M., Sawa, M., ve Yamada, T., 2016. TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness. *Nature Communications*, 7:12586. doi:10.1038/ncomms12586
- Mattia, M.D., Mauro, A., Monache, S. D.F, Pulcini, F., Russo, V., Berardinelli, P., Citeroni, M. R., Turriani, M., Peserico, A., ve Barboni, B., 2022. Hypoxia-mimetic CoCl₂ agent enhances pro-angiogenic activities in ovine amniotic epithelial cells-derived conditioned medium. *Cells*, 11(3): 461. doi:10.3390/cells11030461

- Meng, F., Qian, L., Lv, L., Ding, B., Zhou, G., Cheng, X., Niu, S., ve Liang, Y., 2016. miR-193a-3p regulation of chemoradiation resistance in oesophageal cancer cells via the PSEN1 gene. *Gene*, 579(2): 139–145. doi:10.1016/j.gene.2015.12.060.
- Meng, Z., Yang, Y., Li, S., Huang, L., Yao, Z., Chen, Y., Wang, J., Shen, Y., Liang, P., Zhang, H., Wang, W., ve Wang, F., 2024. GSE1 promotes the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells by downregulating KLF6 expression. *Cell Biology International*. doi:10.1002/cbin.12208
- Mennerich, D., Vogel, A., Klamann, I., Dahl, E., Lichtner, R. B., Rosenthal, A., Pohlenz, H.D., Thierach, K.H., ve Sommer, A., 2004. Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. *European Journal of Cancer*, 40(9): 1373–82. doi:10.1016/j.ejca.2004.01.038
- Metovic, J., Barella, M., Bianchi F., Hofman, P., Hofman, V., Remmelink, M., Kern, I., Carvalho, L., Pattini, L., Sonzogni, A., Veronesi, G., Harari, S., S., Forest, F., Papotti, M., ve Pelosi, G., 2021. Morphologic and molecular classification of lung neuroendocrine neoplasms. *Virchows Archiv*, 478:5-19. doi: 10.1007/s00428-020-03015-z
- Mohan, N., Johnson, G. S., Tovar Perez, J. E., Dashwood, W. M., Rajendran, P., ve Dashwood, R. H., 2024. Alternative splicing of BAZ1A in colorectal cancer disrupts the DNA damage response and increases chemosensitization. *Cell Death & Disease*, 15: 570. doi:10.1038/s41419-024-06954-6
- Mukhopadhyay, D., Cocco, P., Orru, S., Cherchi, R., ve De Matteis, S., 2025. The role of microRNAs as early biomarkers of asbestos-related lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Pulmonology*, 31(1): 2416792. doi: 10.1016/j.pulöo.2024.02.002
- Najafi, M., Farhood, B., Mortezaee, K., Kharazinejad, E., Majidpoor, J., ve Ahadi, R., 2020. Hypoxia in solid tumors: a key promoter of cancer stem cell (CSC) resistance. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 146(1): 19-31. doi:10.1007/s00432-019-03080-1
- Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., Dacic, S., Jain, D., Kerr, K.M., Lantuejoul, S., Nouguchi, M., Papotti, M., Rekhtman, N., Scagliotti, G., Schil P.V, Sholl, L., Yatabe, Y., Yoshida, A., ve Travis, W.D., 2021. The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015. *Journal of Thoracic Oncology*, 17(3): 362-387. doi: 10-1016/j.jtho.2021.11.003
- O'Donoghue, K., ve Fisk, N. M., 2004. Fetal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18(6): 853-75. doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.06.10
- Olsen, J. B., Wong, L., Deimling, S., Miles, A., Guo, H., Li, Y., Zhang, Z., Greenblatt, J. F., Emili, A., ve Tropepe, V., 2016. G9a and ZNF644 physically associate to suppress progenitor gene expression during neurogenesis. *Stem Cell Reports*, 7(3): 454–470. doi:10.1016/j.stemcr.2016.06.012.

- Olsen, J. B., Wong, L., Deimling, S., Miles, A., Guo, H., Li, Y., Zhang, Z., Greenblatt, J. F., Emili, A., ve Tropepe, V., 2016. G9a and ZNF644 physically associate to suppress progenitor gene expression during neurogenesis. *Stem Cell Reports*, 7(3): 454–470. doi:10.1016/j.stemcr.2016.06.012
- Pang, Y., Chen, X., Ji, T., Cheng, M., Wang, R., Zhang, C., Liu, M., Zhang, J., ve Zhong, C., 2023. The Chromatin Remodeler ATRX: Role and Mechanism in Biology and Cancer. *Cancers*, 15(8): 2228. doi:10.3390/cancers15082228
- Paz, J. E. R. M., Adolpho, L. F., Ramos, J. I. R., Bighetti-Trevisan, R. L., Calixto, R. D., Oliveira, F. S., Almeida, A. L. G., Beloti, M. M., ve Rosa, A. L., 2023. Effect of mesenchymal stem cells overexpressing BMP-9 primed with hypoxia on BMP targets, osteoblast differentiation and bone repair. *Biology*, 12(8): 1147. doi:10.3390/biology12081147
- Pourrezaei, S., Letafati, A., Molaverdi, G., Norouzi, M., ve Mozhgani, S. H., 2025. RAB3GAP2 dysregulation in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) compared to acute lymphoblastic leukemia (ALL): a molecular perspective. *BMC Research Notes*, 18: 28. doi:10.1186/s13104-025-07084-8
- Prasetyani, P. R., ve Medema, J. P., 2017. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Molecular Cancer*, 16:41. doi:10.1186/s12943-017-0600-4
- Qi, Y., Zhao, W., Li, M., Shao, M., Wang, J., Sui, H., Yu, H., Shao, W., Gui, S., Li, J., Jia, X., Jiang, D., Li, Y., Zhang, P., Wang, S., ve Wang, W., 2018. High C-X-C motif chemokine 5 expression is associated with malignant phenotypes of prostate cancer cells via autocrine and paracrine pathways. *International Journal of Oncology*, 53(1): 358–370. doi:10.3892/ijo.2018.4388
- Quan, M., Wang, P., Cui, J., Gao, Y., ve Xie, K., 2013. The roles of FOXM1 in pancreatic stem cells and carcinogenesis. *Molecular Cancer*, 12: 159. doi:10.1186/1476-4598-12-159
- Ren, Y., Luo, X., Tong, H., Wang, S., Yan, J., Lin, L., ve Chen, Y., 2024. Preliminary study on clinical characteristics and pathogenesis of IQSEC2 mutations patients. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 17: 289–318. doi:10.2147/PGPM.S455840
- Rivas, S.R. Mendez Valdez M.J., Govindarajan, V., Seetharam, D., Doucet-O'Hare, T.T., Heiss, J.D., ve Shah, A. H., 2022. The role of HERV-K in cancer stemness. *Viruses*, 14(9):2019. Doi:10.3390/v14092019
- Rodor, J., Pan, Q., Blencowe, B. J., Eyra, E., ve Cáceres, J. F., 2016. The RNA-binding profile of Acinus, a peripheral component of the exon junction complex, reveals its role in splicing regulation. *RNA*, 22(9): 1411–1426. doi:10.1261/rna.057158.116
- Rosen, E. M., Fan, S., Pestell, R. G., ve Goldberg, I. D., 2003. BRCA1 gene in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 19: 19–41. doi:10.1002/jcp.10257

- Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., ve Sage, J., 2021. Small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1): 3. doi: 10.1038/s41572-020-00235-0
- Sachs, N., ve Clevers, H., 2014. Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 24: 68–73. doi:10.1016/j.gde.2013.11.012
- Saini, V., Hose, C. D., Monks, A., Nagashima, K., Han, B., Newton, D. L., Millione, A., Shah, J., Hollingshead, M.G., Hite, K. M., Burkett, M.W., Delosh, R. M., Silvers, T. E., Scudiero, D. A., ve Shomaker, R. H., 2012. Identification of CBX3 and ABCA5 as putative biomarkers for tumor stem cells in osteosarcoma. *PloS One*, 7(8): e41401. Doi:10.1371/journal.pone.0041401
- Sanchez-Mut, J. V., Aso, E., Panayotis, N., Lott, I., Dierssen, M., Rabano, A., Urdinguio, R. G., Fernandez, A. F., Astudillo, A., Martin-Subero, J. I., Balint, B., Fraga, M. F., Gomez, A., Gurnot, C., Roux, J.-C., Avila, J., Hensch, T. K., Ferrer, I., ve Esteller, M., 2013. DNA methylation map of mouse and human brain identifies target genes in Alzheimer's disease. *Brain*, 136(10): 3018–3027. doi:10.1093/brain/awt237
- Sarıhan, M., 2023. Meme kanseri hücre hatlarında karşılaştırmalı yüzey proteom analizi. Doktora tezi, Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Programı, Kocaeli, 243 s.
- Saygıdeğer Kont, Y. 2015. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücrelerinde Ezrin Proteininin EGFR Yolağının Etkisinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İzmir, 122 s.
- Schmidt, R., ve Plath, K., 2012. The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation. *Genome Biology*, 13:251. doi:10.1186/gb-2012-13-10-251
- Schöning, J.P., Monterio, M., ve Gu, W., 2017. Drug resistance and cancer stem cells: the shared but distinct roles of hypoxia-inducible factors HIF1a and HIF2a. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(2): 153—161. doi:10.1111/1440-1681.12693
- Schuster, E., Dashzeveg, N., Jia, Y., Golam, K., Zhang, T., Hoffman, A., Zhang, Y., Zheng, C., Ramos, E., Taftaf, R., El-Shennawy, L., Scholten, D., Kitata, R. B., Adorno-Cruz, V., Reduzzi, C., Spahija, S., Xu, R., Siziopikou, K. P., Plataniias, L. C., Shah, A., Gradishar, W. J., Cristofanilli, M., Tsai, C.-F., Shi, T., ve Liu, H., 2023. Computational ranking-assisted identification of Plexin-B2 in homotypic and heterotypic clustering of circulating tumor cells in breast cancer metastasis. *bioRxiv*. doi:10.1101/2023.04.10.536233
- Sengelaub, C. A., Navrazhina, K., Ross, J. B., Halberg, N., ve Tavazoie, S. F., 2016. PTPRN2 and PLCβ1 promote metastatic breast cancer cell migration through PI(4,5)P2-dependent actin remodeling. *EMBO Journal*, 35(1): 62–76. doi:10.15252/emboj.201591973

- Sharma, J., Zhou, F., ve Moreira, A. L., 2025. Pulmonary adenocarcinoma updates: histology, cytology, and grading. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 149(4): e82-e86. doi: 10.5858/arpa.2023-0540-RA
- Shen, Y., Chen, J-Q., ve Li, X-P., 2025. Differences between lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma: driver genes, therapeutic targets, and clinical efficacy. *Genes & Diseases*, 12(3): 101374. doi: 10.1016/j.gendis.2024.101374
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., ve Yamanaka, S., 2017. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(2): 115-130. doi:10.1038/nrd.2016.245
- Shields, M. D., Minton, K. G., Tran, M., Gunderman, P. R., Larsson, L.G., Guo, S., Kniese, C. M., Wei, C.X., Marin-Acevedo, J.A., Maniar, R., Durm, G.A., He, W., ve Hanna, N. H., 2025.
- Shu, Y., Iijima, T., Sun, W., Kano, J., Ishiyama, T., Okubo, C., Anami, Y., Tanaka, R., Fukai, S., ve Noguchi, M., 2006. The ACIN1 gene is hypermethylated in early stage lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(2): 160–167. doi:10.1016/S1556-0864(15)31532-X
- Smolarz, B., Lukasiewicz, H., Samulak, D., Pierkarska, E., Kolacinski, R., ve Romanowicz, H., 2025. Lung cancer -epidemiology, pathogenesis, treatment and molecular aspect (review of literature). *International Journal of Molecular Sciences*, 26(5): 2049. Doi:10.3390/ijms2605249
- Son, B., Lee, W., Kim, H., Shin, H., ve Park, H. H., 2024. Targeted therapy of cancer stem cells: inhibition of mTOR in pre-clinical and clinical research. *Cell Death & Disease*, 15: 696. doi:10.1038/s41419-024-07077-8
- Song, C., Gao, M., He, R., Liu, Y., Wang, W., Fu, T., Li, B., Li, N., ve Geng, Q., 2024. The γ -secretase catalytic subunit PSEN1, regulated by YY1, promotes lung adenocarcinoma progression via the Notch1/EGFR pathway. *Research Square*. doi:10.21203/rs.3.rs-4811218/v1
- Su, G., Zhao, Y., Wei, J., Han, J., Chen, L., Xiao, Z., Chen, B., ve Dai, J., 2013. The effect of forced growth of cells into 3D spheres using low attachment surfaces on the acquisition of stemness properties. *Biomaterials*, 34(13): 3215–3222. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.044
- Su, M., Zhang, Z., Zhou, L., Han, C., Huang, C., ve Nice, E. C., 2021. Proteomics, Personalized Medicine and Cancer. *Cancers*, 13(11): 2512. doi:10.3390/cancers13112512.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversame, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimate of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3): 209-249.

- Suzuki, I. K., Gacquer, D., Van Heurck, R., Kumar, D., Wojno, M., Bilheu, A., Herpoel, A., Lambert, N., Cheron, J., Polleux, F., Detours, V., ve Vanderhaeghen, P., 2018. Human-specific NOTCH2NL genes expand cortical neurogenesis through Delta/Notch regulation. *Cell*, 173(6): 1370–1384.e16. doi:10.1016/j.cell.2018.03.067
- Szumaska, D., Cioroch, M., Keeling, A., Prat, A., Seidah, N. G., ve Bhattacharya, S., 2017. Pcsk5 is required in the early cranio-cardiac mesoderm for heart development. *BMC Developmental Biology*, 17: 6. doi:10.1186/s12861-017-0148-y.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2014. Türkiye Kanser İstatistikleri 2009. Rapor, Ankara, 42 s.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri 2010. Rapor, Ankara, 44 s.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri 2011. Rapor, Ankara, 46 s.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri 2012. Rapor, Ankara, 46 s.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri 2013. Rapor, Ankara, 52 s.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri 2014. Rapor, Ankara, 48 s.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri 2015. Rapor, Ankara, 48 s.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri 2016. Rapor, Ankara, 46 s.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri 2017. Rapor, Ankara, 53 s.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri 2018. Rapor, Ankara, 38 s.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri 2019. Rapor, Ankara, 40 s.
- Takahashi, H., Ishikawa, T., Ishiguro, M., Okazaki, S., Mogushi, K., Kobayashi, H., Iida, S., Mizushima, H., Tanaka, H., Uetake, H., ve Sugihara, K., 2015. Prognostic significance of Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK) in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 15: 794. doi:10.1186/s12885-015-1783-y.
- Teh, M.-T., Gemenetzidis, E., Patel, D., Tariq, R., Nadir, A., Bahta, A. W., Waseem, A., ve Hutchison, I. L., 2012. FOXM1 induces a global methylation signature that mimics the cancer epigenome in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, 7(3): e34329. doi:10.1371/journal.pone.0034329

The Human Protein Atlas.

- Tian, Z., Yu, T., Liu, J., Wang, T., ve Higuchi, A., 2023. Introduction to stem cells. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 199: 3-32. doi:10.1016/bs.pmbts.2023.02.012
- Tian, Z., Yu, T., Lui, J., Wang, T., ve Higuchi, A., 2023. *Introduction to stem cells. Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 199: 3-32. doi:10.1016/bs.pmbts.2023.02.001
- Tong, W. W., Tong, G. H., ve Liu, Y., 2018. Cancer stem cells and hypoxia-inducible factors. *International Journal of Oncology*, 52: 469-476. doi: 10.3892/ijo.2018.4417
- Torasawa, M., Horinouchi, H., Yagishita, S., Utsumi, H., Okuda, K., Takekoshi, D., Ito, S., Wakui, H., Murata, S., Kaku, S., Okuma, K., Matsumoto, Y., Shinno, Y., Okuma, Y., Yoshida, T., Goto, Y., Yamamoto, N., Araya, J., Ohe, Y., Fujita, Y., 2023. Exploratory analysis to predict pneumonitis during durvalumab consolidation therapy for patients with locally advanced non-small cell lung cancer from proteomic profiling of circulating extracellular vesicles. *Thoracic Cancer*. doi:10.1111/1759-7714.15077
- Tsai, Y.-H., Mitra, P., Taniar, D., ve Pai, T.-W., 2025. DNA methylation biomarker analysis from low-survival-rate cancers based on genetic functional approaches. *Frontiers in Bioinformatics*, 5: 1523524. doi:10.3389/fbinf.2025.1523524
- Venkatesh, V., Nataraj, R., Thangaraj, G. S., Karthikeyan, M., Gnanasekaran, A., Kaginelli, S. B., Kuppanna, G., Kallappa, C. G., ve Basalingappa, K. M., 2018. Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem Cell Investigation*, 5:(2). doi:10.21037/sci.2018.02.02
- Vuckovic, D., Dagley, L. F., Purcell, A. W., ve Emili, A., 2013. Membrane proteomics by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Analytical approaches and challenges. *Proteomics*, 13(3–4): 404–423. doi:10.1002/pmic.201200340.
- Wang, C. Z., Guo, L. L., Guo, Q. H., ve Mu, Y. M., 2020. NBPF9 gene may be involved in congenital hypopituitarism: A whole-genome study of a boy with pituitary stalk interruption syndrome and his family. *International Journal of Endocrinology*, 2020: 5401738. doi:10.1155/2020/5401738
- Wang, L., Chen, J., Zuo, Q., Wu, C., Yu, T., Zheng, P., Huang, H., Deng, J., Fang, L., Liu, H., Li, C., Yu, P., Zou, Q., ve Zheng, J., 2022. Calreticulin enhances gastric cancer metastasis by dimethylating H3K9 in the E-cadherin promoter region mediating by G9a. *Oncogenesis*, 11: 29. doi:10.1038/s41389-022-00405-7
- Wang, Y., Jiang, M., Du, C., Yu, Y., Liu, Y., Li, M., ve Luo, F., 2018. Utilization of lung cancer cell lines for the study of lung cancer stem cells (review). *Oncology Letters*, 15(5):6791-6798. doi:10.3892/ol.2018.8265

- Watts, D., Jaykar, M. T., Bechmann, N., ve Wielockx, B., 2022. Hypoxia signaling pathway: a central mediator in endocrine tumors. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 13: 1103075. doi:10.3389/fendo.2022.1103075
- Watts, D., Jaykar, M. T., Bechmann, N., ve Wielockx, B., 2022. Hypoxia signaling pathway: a central mediator in endocrine tumors. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 13: 1103075. doi:10.3389/fendo.2022.1103075
- Wen, K., Yan, Y., Shi, J., Hu, L., Wang, W., Liao, H., Li, H., Zhu, Y., Mao, K., ve Xiao, Z., 2021. Construction and Validation of a Combined Ferroptosis and Hypoxia Prognostic Signature for Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8: 809672. doi:10.3389/fmolb.2021.809672
- White, W. L., 2011. Erratum to: Why I hate the index finger. *Hand (New York)*, 6(2):233. doi:10.1007/s12013-014-0153-8
- Wray, N. R., James, M. R., Mah, S. P., Nelson, M., Andrews, G., Sullivan, P. F., Montgomery, G. W., Birley, A. J., Braun, A., ve Martin, N. G., 2007. Anxiety and comorbid measures associated with PLXNA2. *Archives of General Psychiatry (JAMA Psychiatry)*, 64(3): 318–326. doi:10.1001/archpsyc.64.3.318
- Wu, R., Liu, Y., Zhao, Y., Bi, Z., Yao, Y., Liu, Q., Wang, F., Wang, Y., ve Wang, X., 2019. m6A methylation controls pluripotency of porcine induced pluripotent stem cells by targeting SOCS3/JAK2/STAT3 pathway in a YTHDF1/YTHDF2-orchestrated manner. *Cell Death & Disease*, 10: 171. doi:10.1038/s41419-019-1417-4.
- Xia, J., Huang, N., Huang, H., Sun, L., Dong, S., Su, J., Zhang, J., Wang, L., Lin, L., Shi, M., Bin, J., Liao, Y., Li, N., ve Liao, W., 2016. Voltage-gated sodium channel Nav1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1. *International Journal of Cancer*, 139(11): 2553–2569. doi:10.1002/ijc.30381
- Xia, L.M., Huang, W.J., Wang, B., Liu, M., Zhang, Q., Yan, W., Zhu, Q., Luo, M., Zhou, Z.Z., ve Tian, D.A., 2009. Transcriptional up-regulation of FoxM1 in response to hypoxia is mediated by HIF-1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(2): 247–56. doi:10.1002/jcb.21996
- Xie, Q., Guo, H., He, P., Deng, H., Gao, Y., Dong, N., Niu, W., Liu, T., Li, M., Wang, S., Wu, Y., ve Li, J. L., 2021. Tspan5 promotes epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis of hepatocellular carcinoma by activating Notch signalling. *Molecular Oncology*, 15(11): 3184–3202. doi:10.1002/1878-0261.12980
- Xie, Q., Guo, H., He, P., Deng, H., Gao, Y., Dong, N., Niu, W., Liu, T., Li, M., Wang, S., Wu, Y., ve Li, J.L., 2021. Tspan5 promotes epithelial mesenchymal transition and tumour metastasis of hepatocellular carcinoma by activating Notch signalling. *Molecular Oncology*, 15(11): 3184–3202. doi:10.1002/1878-0261.12980

- Xiong, Y., Qi, Y., Pan, Z., Wang, S., Li, B., Feng, B., Xue, H., Zhao, R., ve Li, G., 2022. Pancancer landscape analysis of the thymosin family identified TMSB10 as a potential prognostic biomarker and immunotherapy target in glioma. *Cancer Cell International*, 22: 294. doi:10.1186/s12935-022-02698-5
- Yan, S., Song, M., Ping, J., Lai, S. T., Cao, X. Y., Bai, C. J., Xie, D. F., Guan, H., Gao, S. S., ve Zhou, P. K., 2021. ZGRF1 promotes end resection of DNA homologous recombination via forming complex with BRCA1/EXO1. *Cell Death Discovery*, 7: 260. doi:10.1038/s41420-021-00633-7
- Yanar, H., 2024. Adrenokortikal neoplazilerde IGF-2 ve FGFR-4'ün prognostik ve tanısal öneminin immünohistokimya ve real-time PCR ile araştırılması. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Adana, 90 s.
- Yang L., Fan, Y., ve Lu H., 2022. Pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *Pathology & Oncology Research*, 28: 1610730. doi:10.3389/pore.2022.1610730
- Yang, R., Chen, Z., Liang, L., Ao, S., Zhang, J., Chang, Z., Wang, Z., Zhou, Y., Duan, X., ve Deng, T., 2022. Fc fragment of IgE receptor Ig (FCER1G) acts as a key gene involved in cancer immune infiltration and tumour microenvironment. *Immunology*, 168(2): 302–319. doi:10.1111/imm.13557
- Yang, Z., Zhang, C., Feng, Y., Qi, W., Cui, Y., ve Xuan, Y., 2019. Tenascin-C is involved in promotion of cancer stemness via the Akt/HIF1 α axis in esophageal squamous cell carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*, 109: 104239. doi:10.1016/j.yexmp.2019.03.007
- Yanık, y. F., Karamustafaoglu, Y. A., Karataş, A., Taştekin, E., ve Yörük, Y., 2017. Sarkomatoid akciğer kansinimleri. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi*, 31(2): 93-99
- Ye, X., Kaczmarczyk, J. A., Luke, B., Saul, R. G., Whiteley, G. R., Nissley, D. V., ve Blonder, J., 2020. Cell surface protein enrichment for biomarker and drug target discovery using mass spectrometry-based. doi:10.1016/B978-0-12-818607-7.00024-4.
- Zaarour, R. F., Riberio, M., Azzarone, B., Kapoor, S., ve Chouaib, S., 2023. Tumor microenvironment-induced tumor cell plasticity: relationship with hypoxic stress and impact on tumor resistance. *Frontiers in Oncology*, 13: 1222575. doi:10.3389/fonc.2023.1222575
- Zakrzewski, W., Dobrzynski, M., ve Rybak, Z., 2019. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10: 68. doi:10.1186/s13287-019-1165-5
- Zempleni, J., Wijeratne, S. S. K., ve Hassan, Y. I., 2009. Biotin. *BioFactors*, 35(1): 36–46. doi:10.1002/biof.8.
- Zhang, C., Yang, Z., Dong, D.L., Jang, T.S., Knowles, J. C., Kim, H.W., Jin, G.Z., ve Xuan, Y., 2020. 3D culture technologies of cancer stem cells: promising ex vivo tumor

- models. *Journal of Tissue Engineering*, 11: 2041731420933407. doi:10.1177/2041731420933407
- Zhang, N., Huang, D., Ruan, X., Ng, A. T.-L., Tsu, J. H.-L., Jiang, G., Huang, J., Zhan, Y., ve Na, R., 2023. CRISPR screening reveals gleason score and castration resistance related oncodriver ring finger protein 19 A (RNF19A) in prostate cancer. *Drug Resistance Updates*, 67: 100912. doi:10.1016/j.drug.2022.100912
- Zhang, X., Cai, J., Song, F., ve Yang, Z., 2022. Prognostic and immunological role of FCER1G in pan-cancer. *Pathology - Research and Practice*, 240: 154174. doi:10.1016/j.prp.2022.154174
- Zhang, X., Cai, J., Song, F., ve Yang, Z., 2022. Prognostic and immunological role of FCER1G in pan-cancer. *Pathology - Research and Practice*, 240: 154174. doi:10.1016/j.prp.2022.154174
- Zhang, X., Yang, W., Chen, K., Zheng, T., Guo, Z., Peng, Y., ve Yang, Z., 2021. The potential prognostic values of the ADAMTS-like protein family: an integrative pan-cancer analysis. *Annals of translational medicine*, 9(20): 6297–6312. doi:10.21037/atm-21-4946.
- Zhang, Y. F., Wang, Y. X., Zhang, N., Lin, Z. H., Wang, L. R., Feng, Y., Pan, Q., ve Wang, L., 2021. Prognostic alternative splicing regulatory network of RBM25 in hepatocellular carcinoma. *Bioengineered*, 12(1): 1202–1211. doi:10.1080/21655979.2021.1908812
- Zhang, Y., Wang, H., Wang, J., Bao, L., Wang, L., Huo, J., ve Wang, X., 2015. Global analysis of chromosome 1 genes among patients with lung adenocarcinoma, squamous carcinoma, large-cell carcinoma, small-cell carcinoma, or non-cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(2): 249–64. doi:10.1007/s10555-015-9558-0
- Zhao, J., Wen, D., Zhang, S., Jiang, H., ve Di, X., 2023. The role of zinc finger proteins in malignant tumors. *The FASEB Journal*, 37: e23157. doi:10.1096/fj.202300801R.
- Zhao, Y., Zhang, H., Wang, H., Ye, M., ve Jin, X., 2022. Role of formin INF2 in human diseases. *Molecular Biology Reports*, 49(1): 735–746. doi:10.1007/s11033-021-06869-x
- Zheng, T., Wang, S., Liu, W., ve Lu, Y., 2025. Targeting KAT6A/B as a New Therapeutic Strategy for Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 68(2): 1002-1020. doi:10.1021/acs.jmedchem.4c02613
- Zheng, Y., Wang, L., Yin, L., Yao, Z., Tong, R., Xue, J., ve Lu, Y., 2022. Lung cancer stem cell markers as therapeutic targets: an update on signalling pathways and therapies. *Frontiers in Oncology*, 12: 873994. doi:10.3389/fonc.2022.873994
- Zhu, J., Wang, X., Guan, H., Xiao, Q., Wu, Z., Shi, J., Zhang, F., Gao, P., Song, Y., ve Wang, Z., 2020. HIP1R acts as a tumor suppressor in gastric cancer by promoting cancer cell apoptosis and inhibiting migration and invasion through modulating Akt. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(9): e23425. doi:10.1002/jcla.23425

- Zimmer, M., Doucette, D., Siddiqui, N., ve Iliopoulos, O., 2004. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/-tumors. *Molecular Cancer Research*, 2(2): 89-95
- Zuo, Q., Yang, Y., Lyu, Y., Yang, C., Chen, C., Salman, S., Huang, T. Y.T., Wicks, E. E., Jackson, W. 3rd, Datan, E., Qin, W., ve Semenza, G. L., 2023. Plexin-B3 expression stimulates MET signaling, breast cancer stem cell specification, and lung metastasis. *Cell Reports*, 42(3): 112164. doi:10.1016/j.celrep.2023.112164





ÖZGEÇMİŞ

Aycan SEZAN, Küçük yaşlardan itibaren biyoloji alanında araştırmacı olmayı hedefledim. Bu amaçla keyifle okuduğum Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2015 yılında mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım ve "B-1,4-glukanaz enzimini üreten toprak bakterisinin izolasyonu ve in vitro mutagenез ile genetik modifikasyonu" başlıklı tezimi tamamladım. 2019 yılında yine aynı Biyoteknoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimime başladım. Doktora sürecimde kanser biyolojisi alanında yoğunlaştım; in vitro kanser ilaç çalışmaları, Covid-19'un kanser hastaları üzerindeki etkileri, iki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültürü teknikleri, hipoksik mikroçevre koşullarında kanser kök hücre mekanizmaları, proteomik analizler, protein saflaştırma ve moleküler docking gibi konularda kapsamlı çalışmalar yürüttüm ve halen bu alanlardaki araştırmalarımaya devam etmekteyim.





EKLER

EK-1-PLGS analizi sonrası tanımlanan proteinler;

2D-A549 NORMOXIA					
	<u>Identified Proteins at 24 hours</u>				
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
1	Q6LD33	Melanoma growth stimulatory activity beta	666.5	1	100.0
2	O60885	Bromodomain-containing protein 4	573.3	23	32.4
3	Q9UQT5	Leucocyte antigen B	552.6	1	33.0
4	B4DUK6	cDNA FLJ51097_ highly similar to HLA class I histocompatibility antigen_ B-7alpha chain	414.6	8	48.5
5	A0A5C2FWD4	IGL c1398_light_IGKV1-5_IGKJ1	380.2	1	39.3
6	A0A0S2Z693	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1 isoform 1	374.4	12	43.4
7	B4E171	Tetraspanin-7	372.4	6	14.3
8	P30622	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	370.9	16	18.2
9	A0A5C2G8U0	IGL c4127_light_IGKV1-5_IGKJ3	367.3	1	39.8
10	O95696	Bromodomain-containing protein 1	352.0	9	18.1
11	P32418	Sodium/calcium exchanger 1	342.8	8	28.3
12	A0A5C2G2U6	IGL c3032_light_IGKV1-5_IGKJ2	338.0	1	39.3
13	V9GYT3	RUNX family transcription factor 1	334.3	1	100.0
14	B4DH59	NBPF family member NBPF26	315.7	16	24.4
15	L7RSL3	receptor protein-tyrosine kinase	302.6	16	22.0
16	Q15329	Transcription factor E2F5	282.7	4	43.4
17	A0A5C2GL02	IG c202_heavy_IGHV3-48_IGHD3-10_IGHJ4	281.0	1	36.4
18	P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule	278.9	9	24.9
19	A0A5C2FUN2	IGL c711_light_IGKV1-5_IGKJ3	277.0	1	39.3
20	A2BCX7	MHC class I antigen	276.8	3	34.8
21	Q9NS82	Asc-type amino acid transporter 1	276.6	6	27.2
22	A0A5F9ZHN7	Phosphatidylinositol-3-phosphatase SAC1	270.2	2	11.8
23	A0A5C2FXZ7	IGL c137_light_IGKV1-5_IGKJ1	267.9	1	39.3
24	P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	265.1	6	37.6
25	Q9NR16	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M160	265.0	16	33.3
26	Q9BY07	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 4	259.4	12	26.6
27	A0A5C2G9Y8	IGH + IGL c644_heavy_IGHV1-69_IGHD5-12_IGHJ4	256.1	1	20.3
28	Q9Y2L1	Exosome complex exonuclease RRP44	254.5	13	16.0
29	P28288	ATP-binding cassette sub-family D member 3	251.4	12	41.0
30	A0AV96	RNA-binding protein 47	247.4	3	13.5
31	P34932	Heat shock 70 kDa protein 4	241.6	15	27.5

32	Q9Y6L6	Solute carrier organic anion transporter family member 1B1	240.1	11	40.4
33	P23142	Fibulin-1	235.2	9	29.3
34	P11277	Spectrin beta chain_ erythrocytic	232.9	28	25.0
35	H0YBW8	E2F transcription factor 5	230.5	3	65.4
36	Q8IVM0	Coiled-coil domain-containing protein 50	229.7	3	19.6
37	A0A5C2GE07	IG c792_heavy_IGHV3-21_IGHD3-3_IGHJ3	227.3	3	60.5
38	A0A5C2GDI3	IG c661_heavy_IGHV1-69_IGHD5-12_IGHJ5	224.0	3	71.5
39	K7ZK48	MHC class II antigen	219.7	1	27.0
40	B4DHY8	Elongation factor Ts_ mitochondrial	219.2	2	15.1
41	Q00597	Fanconi anemia group C protein	218.1	5	17.9
42	B4DWN3	cDNA FLJ56584_ highly similar to Dickkopf-related protein 4	217.8	1	18.0
43	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	217.5	38	25.8
44	A0A7S5C282	IGH c1729_heavy_IGHV3-11_IGHD1-1_IGHJ4	215.4	3	53.5
45	Q15154	Pericentriolar material 1 protein	209.1	21	20.3
46	Q92823	Neuronal cell adhesion molecule	207.8	11	15.1
47	Q9NUE0	Palmitoyltransferase ZDHHC18	206.8	10	59.5
48	A0A7S5EXU1	IGH c2774_heavy_IGHV3-11_IGHD3-10_IGHJ4	199.1	1	20.3
49	A0A5C2GRI2	IG c1324_heavy_IGHV3-49_IGHD3-22_IGHJ3	195.1	2	31.5
50	Q86UY8	5'-nucleotidase domain-containing protein 3	194.7	6	23.9
51	A0A7L4X720	MHC class I antigen	189.0	4	19.1
52	D6MJH5	MHC class I antigen	188.4	5	28.2
53	Q86WT6	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM69	187.9	7	18.6
54	S5NU80	Sodium channel protein	187.5	10	13.5
55	P51798	H(+)/Cl(-) exchange transporter 7	179.6	11	27.8
56	Q14524	Sodium channel protein type 5 subunit alpha	178.2	11	12.5
57	Q14588	Zinc finger protein 234	177.6	7	11.7
58	A0A384P5C6	Delta-like protein	177.0	10	37.6
59	A0A494C1A4	Leucine rich repeat containing 7	176.8	13	18.5
60	A0A7S5EY07	IGH c3104_heavy_IGHV1-69_IGHD3-22_IGHJ4	175.7	4	71.7
61	A0A024F9R7	HLA class II histocompatibility antigen DR beta chain	169.8	2	20.7
62	A0A5C2G657	IGH c456_heavy_IGHV1-69_IGHD3-10_IGHJ2	166.5	2	27.2
63	P58743	Prestin	166.1	5	21.6
64	Q9P0L1	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 7	165.2	6	15.8
65	A0A286MC66	MHC class I antigen	164.9	3	27.6
66	A6NMZ7	Collagen alpha-6(VI) chain	161.1	23	22.1
67	P04070	Vitamin K-dependent protein C	158.3	6	22.1
68	Q13017	Rho GTPase-activating protein 5	156.8	16	20.5

69	Q5W0A0	Glutamate-rich protein 6B	154.7	9	28.2
70	O94851	[F-actin]-monooxygenase MICAL2	151.6	15	15.7
71	A0A7S5C3W6	IGH c3099_heavy_IGHV3-49_IGHD3-22_IGHJ6	151.4	2	41.4
72	Q8NG83	Olfactory receptor 2M3	151.4	2	19.9
73	E5RIW1	Exportin 7	150.5	4	29.5
74	Q13123	Protein Red	148.4	10	27.6
75	Q9HCE6	Rho guanine nucleotide exchange factor 10-like protein	146.8	12	23.3
76	A0A678ZIC1	MHC class I antigen	146.5	5	25.4
77	E9LY29	MHC class I antigen	145.2	2	34.8
78	A0A7I2V381	Insulin like growth factor 2 receptor	145.1	19	29.1
79	H0Y659	HECT-type E3 ubiquitin transferase	142.5	12	18.0
80	Q6UXG2	Endosome/lysosome-associated apoptosis and autophagy regulator 1	141.9	11	23.9
81	Q96B86	Repulsive guidance molecule A	140.8	6	27.8
82	Q96GC9	Vacuole membrane protein 1	140.0	4	26.1
83	Q2KJY2	Kinesin-like protein KIF26B	138.5	23	23.6
84	A0A5F9ZHZ7	CFAP298-TCP10L readthrough	136.6	5	22.3
85	A0A7S5C403	IGH c3402_heavy_IGHV3-15_IGHD5-24_IGHJ4	136.2	3	48.7
86	Q9HCM2	Plexin-A4	134.5	23	26.1
87	Q9BXN1	Asporin	133.0	4	22.9
88	B4DHN0	Mitogen-activated protein kinase	132.5	1	7.5
89	A0A5C2G5N2	IGH c119_heavy_IGHV3-48_IGHD2-15_IGHJ3	131.6	3	46.9
90	A0A7R8GUE3	MHC class I antigen	131.3	5	20.8
91	Q05516	Zinc finger and BTB domain-containing protein 16	130.2	8	23.8
92	A0A2R8Y840	DNA helicase	130.2	24	21.5
93	Q9NV72	Zinc finger protein 701	130.1	10	32.0
94	Q7Z589	BRCA2-interacting transcriptional repressor EMSY	129.7	11	17.1
95	H3BQS4	Cerebellar degeneration related protein 2	127.8	2	71.7
96	H0YET8	EMSY transcriptional repressor_ BRCA2 interacting	127.5	3	18.0
97	Q5C9Z4	Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1	127.3	10	26.0
98	B3KM26	Alpha-methylacyl-CoA racemase	126.7	6	39.8
99	O75051	Plexin-A2	126.5	17	13.8
100	A0A023T787	RNA-binding protein 8A	125.0	4	33.9
101	Q8NAF7	cDNA FLJ35424 fis_ clone SMINT2001461	125.0	1	13.1
102	Q4G0P3-10	Isoform 7 of Hydrocephalus-inducing protein homolog	124.8	12	29.4
103	D1MEQ5	MHC class I antigen	123.2	1	12.7
104	Q9NR61	Delta-like protein 4	119.8	12	33.1
105	B7Z4B2	Aminopeptidase	118.9	8	12.8
106	Q6TFL3	Coiled-coil domain-containing protein 171	116.8	17	24.7
107	A6NGD5	Zinc finger and SCAN domain-containing	115.0	11	44.6

		protein 5C			
108	O95785	Protein Wiz	114.4	12	19.0
109	Q6NSI8	SANT and BTB domain regulator of class switch recombination	113.2	11	20.3
110	Q96T76-9	Isoform 6 of MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	110.2	9	24.3
111	B4DEE7	Cytosolic iron-sulfur assembly component 3	109.7	5	64.9
112	P47972	Neuronal pentraxin-2	109.6	4	20.2
113	O15232	Matrilin-3	109.5	9	37.2
114	P04746	Pancreatic alpha-amylase	108.7	6	21.1
115	M9TIT3	MHC class I antigen	108.7	2	19.4
116	Q5T586	Family with sequence similarity 219 member A	108.7	1	18.9
117	Q08043	Alpha-actinin-3	108.4	10	20.5
118	Q86UH7	Envelope glycoprotein	108.1	5	21.3
119	B4DQN8	cDNA FLJ50056_ highly similar to Homo sapiens BAT2 domain containing 1 (BAT2D1)_ mRNA	108.0	18	22.3
120	O75093	Slit homolog 1 protein	107.5	12	22.4
121	Q9UIA9	Exportin-7	107.0	11	18.7
122	Q8NAP8	Zinc finger and BTB domain-containing protein 8B	106.9	6	24.4
123	Q9H582	Zinc finger protein 644	106.7	13	18.3
124	A0A8I5QJE1	Regulator of G protein signaling 7	106.7	3	46.9
125	C1PHA2	Tyrosine-protein kinase receptor	106.1	15	16.5
126	Q96J92	Serine/threonine-protein kinase WNK4	105.9	15	26.6
127	Q14028-4	Isoform 4 of Cyclic nucleotide-gated channel beta-1	105.9	13	23.5
128	A0A5C2GNL1	IG c788_heavy_IGHV3-21_IGHD6-13_IGHJ4	105.1	1	20.3
129	Q76M96	Coiled-coil domain-containing protein 80	105.1	11	16.9
130	Q9P2G1	Ankyrin repeat and IBR domain-containing protein 1	104.6	10	20.7
131	Q96Q06	Perilipin-4	103.7	10	13.3
132	A0A5C2GIA4	IGH + IGL c485_heavy_IGHV1-69_IGHD1-7_IGHJ4	103.6	2	30.0
133	Q14687	Genetic suppressor element 1	102.9	15	18.0
134	A0A7S5BZ35	IGH c832_heavy_IGHV1-69_IGHD3-22_IGHJ4	102.8	1	37.8
135	Q4LDE5-2	Isoform 2 of Sushi_ von Willebrand factor type A_ EGF and pentraxin domain-containing protein 1	101.8	11	25.3
136	H7BXL6	Otogelin like	101.7	12	38.2
137	P54132	RecQ-like DNA helicase BLM	101.4	15	20.2
138	O43491	Band 4.1-like protein 2	101.4	6	10.6
139	Q8N5H7-2	Isoform 2 of SH2 domain-containing protein 3C	101.2	7	18.6
140	A5D8W1	Cilia- and flagella-associated protein 69	100.9	12	23.2
141	E5RHD4	E2F transcription factor 5	100.7	2	37.6
142	Q7Z3D6	D-glutamate cyclase_ mitochondrial	100.6	6	26.8

143	Q6P1L6	Zinc finger protein 343	100.4	3	8.5
144	O60518	Ran-binding protein 6	99.4	9	17.0
145	Q57Z94	E3 ubiquitin-protein ligase	99.1	2	34.1
146	P56559	ADP-ribosylation factor-like protein 4C	99.0	4	39.6
147	Q8WVZ9	Kelch repeat and BTB domain-containing protein 7	98.8	5	10.7
148	Q92800-2	Isoform 2 of Histone-lysine N-methyltransferase EZH1	98.5	8	21.8
149	P51689-2	Isoform 2 of Arylsulfatase D	98.4	7	53.9
150	D3YTG3	ABI family member 3 binding protein	98.1	11	11.3
151	A0A804HI83	Kalirin RhoGEF kinase	98.0	12	23.4
152	P13667	Protein disulfide-isomerase A4	97.0	9	29.5
153	A0A3S6RIQ5	MHC class II antigen	96.6	1	14.8
154	B3KTP2	Puromycin-sensitive aminopeptidase	96.4	4	11.6
155	O00370	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein	96.2	22	26.0
156	Q08379	Golgin subfamily A member 2	96.1	10	20.5
157	Q8TF17	SH3 domain and tetratricopeptide repeat-containing protein 2	96.1	7	13.3
158	A0AAQ5BGS8	Spectrin beta_ non-erythrocytic 2	96.0	18	15.3
159	Q5VV43	Dyslexia-associated protein KIAA0319	93.8	9	17.3
160	Q8WWZ7	Cholesterol transporter ABCA5	92.8	16	23.6
161	Q5W0B1	ORC ubiquitin ligase 1	92.1	17	42.8
162	Q8NFA0	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 32	91.4	12	15.9
163	Q6UXH9	Inactive serine protease PAMR1	91.2	6	18.5
164	O60566	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta	90.7	12	24.7
165	P35125-2	Isoform 2 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 6	90.7	9	20.1
166	A8K4L6	Vang-like protein	90.4	7	28.6
167	Q8TBZ5	Zinc finger protein 502	90.1	10	22.8
168	Q9P260	RAB11-binding protein RELCH	89.8	15	26.5
169	Q9UBW5	Bridging integrator 2	89.4	6	23.4
170	H0Y897	ABI family member 3 binding protein	89.1	6	9.9
171	Q5THK1	Protein PRR14L	89.1	22	17.7
172	P55283-2	Isoform 2 of Cadherin-4	88.6	9	26.2
173	A7E2F9	SIPA1L2 protein	87.8	10	15.3
174	Q8NB50	Zinc finger protein 62 homolog	87.2	11	15.8
175	Q7Z7G0-2	Isoform 2 of Target of Nesh-SH3	86.2	3	18.1
176	Q12873	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3	85.7	17	17.3
177	P02771	Alpha-fetoprotein	85.0	8	25.6
178	X6R7S7	FERM domain containing 7	84.8	1	2.4
179	A0A5C2GDA1	IG c674_heavy_IGHV1-69_IGHD3-22_IGHJ4	84.3	2	34.7
180	A0A6Q8PGQ8	Histidine triad nucleotide binding protein 1	84.0	3	29.4
181	Q8IX74	AG6	83.2	4	10.6
182	A0A8V8TLX5	Trio Rho guanine nucleotide exchange factor	83.0	21	22.1

183	Q96S37	Solute carrier family 22 member 12	82.8	3	18.3
184	Q9NPD5	Solute carrier organic anion transporter family member 1B3	82.6	7	28.6
185	Q2VWA4	SKI family transcriptional corepressor 2	82.5	10	26.7
186	Q8IVF5	Rho guanine nucleotide exchange factor TIAM2	82.2	17	21.6
187	A0A5C2GBP6	IGH + IGL c158_heavy_IGHV1-69_IGHD6-13_IGHJ6	81.6	3	29.9
188	Q8TDI0	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5	81.5	19	18.2
189	A0A2R8Y590	A-kinase anchoring protein 9	81.3	23	18.5
190	Q92800	Histone-lysine N-methyltransferase EZH1	81.3	8	17.1
191	Q8N8B7	Transcription elongation factor A N-terminal and central domain-containing protein	81.2	6	31.6
192	Q9ULB1	Neurexin-1	80.9	12	15.6
193	Q9H4Q4	PR domain zinc finger protein 12	80.7	5	36.5
194	O94986	Centrosomal protein of 152 kDa	80.2	20	26.1
195	P09884	DNA polymerase alpha catalytic subunit	79.8	10	13.1
196	Q8TDD1	ATP-dependent RNA helicase DDX54	79.5	7	13.4
197	O15374-2	Isoform 2 of Monocarboxylate transporter 5	79.2	4	26.8
198	A8K276	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2	79.0	3	10.0
199	Q6ZNH5	Zinc finger protein 497	78.3	7	28.7
200	Q9BXP8	Pappalysin-2	78.1	11	12.6
201	O75891	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	77.8	12	25.1
202	P51805	Plexin-A3	77.5	16	21.9
203	A0A5C2G7W4	IGL c568_light_IGKV1-5_IGKJ2	77.3	1	38.7
204	O60229-2	Isoform 2 of Kalirin	77.2	15	20.3
205	Q9UQ52	Contactin-6	77.0	8	18.8
206	Q96JE9	Microtubule-associated protein 6	76.9	10	20.5
207	A0A0A0MR42	Centrosomal protein 192	76.9	16	18.7
208	B3KND5	cDNA FLJ14354 fis_ clone Y79AA1001384_ highly similar to Monogenic audiogenic seizure susceptibility protein 1 homolog	76.4	13	20.7
209	A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F	76.2	11	17.4
210	O75420	GRB10-interacting GYF protein 1	75.5	8	16.0
211	Q9HC52	Chromobox protein homolog 8	74.5	4	14.4
212	Q6FHY4	Gamma-soluble NSF attachment protein	74.2	4	22.4
213	A0A1U9X8Z0	Corneodesmosin	74.0	3	14.6
214	Q59EI7	Cytoplasmic nuclear factor of activated T-cells 3 isoform 4 variant	73.9	4	16.4
215	Q9UIF8	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B	73.8	20	14.8
216	O60241	Adhesion G protein-coupled receptor B2	73.7	10	14.4
217	A0A1W2PQL4	Zinc finger protein 722	73.6	4	25.3
218	Q6UB98	Ankyrin repeat domain-containing protein	73.2	23	20.5

		12			
219	Q92794	Histone acetyltransferase KAT6A	73.2	23	24.7
220	Q6V1X1	Dipeptidyl peptidase 8	73.0	12	26.6
221	P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	72.7	24	23.2
222	A0A6B7HGF3	MHC class I antigen	71.8	5	21.3
223	A0A8I5KSX3	Neurobeachin	71.6	16	13.9
224	A0A5C2GL66	IG c272_heavy_IGHV3-48_IGHD2-15_IGHJ6	71.5	2	35.0
225	A6NHR9	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	71.3	19	16.6
226	Q5H962	HECT_UBA and WWE domain containing 1	70.4	9	15.4
227	J3KT19	ubiquitinyl hydrolase 1	69.9	3	37.0
228	Q9HCH5	Synaptotagmin-like protein 2	69.8	6	10.3
229	Q9BXR3	Endogenous retrovirus group K member 6 Pol protein	69.1	9	20.5
230	Q8TC59	Piwi-like protein 2	68.6	14	21.1
231	A0A3S6EM97	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	68.4	3	7.6
232	G3V583	Family with sequence similarity 177 member A1	68.3	3	41.4
233	A0A3B3ITI3	Histone acetyltransferase	68.1	21	25.6
234	Q8NBH6	Fibulin-1	68.0	4	14.4
235	Q9ULV0	Unconventional myosin-Vb	67.9	19	24.2
236	Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	67.2	9	14.2
237	M1V487	Tyrosine-protein kinase receptor	66.2	13	18.3
238	A0AAQ5BH17	Desmoplakin	66.2	21	21.6
239	P20908	Collagen alpha-1(V) chain	65.8	16	19.0
240	P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	65.8	4	16.3
241	F5GZZ9	CD163 molecule	65.5	15	25.5
242	Q09MP3	RAD51-associated protein 2	65.1	8	17.9
243	Q9BXT6	RNA helicase Mov10l1	64.9	13	21.6
244	B3KN94	cDNA FLJ13982 fis_ clone Y79AA1001711_ highly similar to 60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	64.9	6	19.7
245	O43196	MutS protein homolog 5	64.6	5	15.6
246	A0A2I8B3A3	MHC class I antigen	63.4	4	19.1
247	P78504	Protein jagged-1	63.2	18	33.6
248	Q5VWI1	Transcription elongation regulator 1-like protein	62.8	6	20.1
249	B7Z4I3	cDNA FLJ53424_ highly similar to Mus musculus cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (Cyfip2)_ mRNA	62.4	9	15.4
250	Q6P158	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	62.2	11	17.0
251	P36575	Arrestin-C	61.6	5	26.8
252	B7ZKN7	DNA 3'-5' helicase	61.3	11	22.6
253	P11274	Breakpoint cluster region protein	61.3	13	24.9
254	Q63HR2	Tensin-2	61.2	13	22.4

255	A0A2X0SFI2	SRGAP1	60.8	9	19.6
256	A8MQ14	Zinc finger protein 850	60.3	7	16.1
257	O60763	General vesicular transport factor p115	60.3	9	17.0
258	Q969G9	Protein naked cuticle homolog 1	59.9	5	29.8
259	Q02952	A-kinase anchor protein 12	59.8	13	16.6
260	P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	59.6	6	19.2
261	A0A384P5M7	Tudor domain-containing protein 7	59.5	7	14.7
262	M0QXS5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	58.5	4	20.9
263	Q4J6C6	Prolyl endopeptidase-like 1	58.5	8	21.7
264	O60306	RNA helicase aquarius	58.3	11	16.0
265	Q9Y6D5	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	58.3	13	15.5
266	Q969K3	E3 ubiquitin-protein ligase RNF34	58.1	5	20.2
267	P79483	HLA class II histocompatibility antigen_DR beta 3 chain	58.1	2	17.7
268	M0R0K3	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 2	58.1	3	9.1
269	Q8WV37	Zinc finger protein 480	57.5	6	15.3
270	P52848	Bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 1	57.3	8	14.6
271	Q14114-4	Isoform 4 of Low-density lipoprotein receptor-related protein 8	57.1	7	20.6
272	A0A590UJT0	LDL receptor related protein 8	56.7	7	21.6
273	Q9UI33	Sodium channel protein type 11 subunit alpha	56.3	20	19.9
274	B4DQZ0	cDNA FLJ57066_ highly similar to Collagen alpha-1(XI) chain	56.3	6	29.9
275	A0A126LB22	U95	56.0	14	30.3
276	H3BNR5	G protein subunit alpha o1	55.9	3	26.4
277	A0A994J4S0	E3 ubiquitin-protein ligase	55.8	2	12.6
278	Q8NBH2	Kyphoscoliosis peptidase	55.8	6	15.1
279	A0A068LKQ2	Ig heavy chain variable region	55.0	1	14.2
280	A0A1X9MJ81	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	55.0	3	7.5
281	P05060	Secretogranin-1	54.6	10	26.4
282	Q9BQ39	ATP-dependent RNA helicase DDX50	54.5	10	30.7
283	Q5JSG7	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	54.4	12	14.3
284	P35813	Protein phosphatase 1A	54.2	6	32.5
285	P27815-6	Isoform 6 of 3'_5'-cyclic-AMP phosphodiesterase 4A	53.9	2	5.0
286	Q63HK3	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 2	53.2	16	29.8
287	Q96PC5	Melanoma inhibitory activity protein 2	52.9	10	14.7
288	P16144	Integrin beta-4	52.6	15	20.1
289	Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1	52.4	6	10.8
290	O75051-2	Isoform 2 of Plexin-A2	51.8	3	13.6
291	P13591	Neural cell adhesion molecule 1	51.2	10	22.3
292	A0A3Q8UG56	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	50.8	4	22.3

293	O43451-1	Isoform 1 of Maltase-glucoamylase	50.5	17	24.9
294	Q8WUB8-3	Isoform 3 of PHD finger protein 10	50.1	4	21.5
295	Q8N9B5	Junction-mediating and -regulatory protein	50.0	6	11.8
296	P54277	PMS1 protein homolog 1	50.0	10	15.2
297	B9EK48	ZFH2 protein	49.9	15	20.8
298	A0A0J9YVP0	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	49.7	11	13.4
299	A0A2R8YD87	Vacuolar protein sorting 13 homolog D	49.7	7	10.1
300	Q03701	CCAAT/enhancer-binding protein zeta	49.2	14	22.2
301	Q9C0D4	Zinc finger protein 518B	49.1	8	15.0
302	A0A024QYS2	Transmembrane 9 superfamily member	48.8	5	12.1
303	Q5SZL2	Centrosomal protein of 85 kDa-like	48.7	5	14.4
304	O14637	Laminin alpha 3b chain	48.1	20	28.5
305	P48742	LIM/homeobox protein Lhx1	48.1	3	11.3
306	E5RH05	TUB like protein 2	47.4	5	15.9
307	A0A8V8TPE9	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 E	47.1	10	19.8
308	Q8IWY4	Signal peptide_ CUB and EGF-like domain-containing protein 1	46.8	7	14.5
309	Q9UPQ9	Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein	46.4	18	18.9
310	P15313	V-type proton ATPase subunit B_ kidney isoform	46.2	6	25.0
311	Q9Y2T1	Axin-2	46.0	5	7.5
312	P35609	Alpha-actinin-2	45.6	9	18.8
313	A8K8H0	Chloride channel protein	45.6	5	17.8
314	C9JSJ3	Meiosis initiator protein	45.3	9	26.2
315	Q86TZ1	Tetratricopeptide repeat protein 6	45.2	4	21.9
316	Q13255	Metabotropic glutamate receptor 1	45.2	12	22.7
317	A0A1W7HCV9	Truncated WD repeat-and FYVE domain-containing protein 4	45.0	17	18.4
318	Q9BYC5	Alpha-(1_6)-fucosyltransferase	44.6	4	10.1
319	H3BN21	StAR related lipid transfer domain containing 9	44.6	12	17.2
320	O95672	Endothelin-converting enzyme-like 1	44.2	8	19.5
321	A9NIU4	Obscurin isoform B	44.0	12	14.4
322	A8K0Y0	Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like preprotein isoform a	43.9	2	11.9
323	O15072	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3	43.7	8	17.4
324	A0A7P0TA56	Neurogenic locus notch homolog protein 1	43.6	11	14.3
325	Q6ZN16	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15	43.5	9	13.6
326	Q9Y2H0	Disks large-associated protein 4	43.3	6	10.5
327	A0A7S5EUS6	IGH c137_heavy_IGHV1-46_IGHD2-15_IGHJ5	43.2	1	12.1
328	Q6ZT12-4	Isoform 4 of E3 ubiquitin-protein ligase UBR3	43.2	2	3.1
329	P08514	Integrin alpha-IIb	42.8	5	11.0
330	Q5D862	Filaggrin-2	42.7	17	22.5

331	Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	42.1	11	15.5
332	P57740-3	Isoform 3 of Nuclear pore complex protein Nup107	42.1	4	18.2
333	Q5JSZ5	Protein PRRC2B	42.0	16	12.9
334	Q92845	Kinesin-associated protein 3	41.3	9	25.9
335	Q3BBV0	NBPF family member NBPF1	40.3	9	10.4
336	M0R2J8	Doublecortin domain-containing protein 1	39.9	10	10.9
337	Q86VM9	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	39.7	8	17.0
338	Q8IUA7	ATP-binding cassette sub-family A member 9	38.6	8	12.7
339	Q6P2S7	Putative tetratricopeptide repeat protein 41	38.3	13	19.6
340	Q93073	Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2-like	38.2	5	9.9
341	Q13064	E3 ubiquitin-protein ligase makorin-3	37.3	5	20.5
342	Q8IWI2	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2	36.6	16	16.9
343	Q9BQS8	FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1	35.9	9	13.2
344	O00329	Phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	35.2	10	16.7
345	Q92598	Heat shock protein 105 kDa	34.8	10	24.0
346	Q9HCF6	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3	34.2	12	15.5
347	Q9UKA4	A-kinase anchor protein 11	34.1	16	17.7
348	P48634	Protein PRRC2A	33.3	16	13.1
349	Q96IR2	Zinc finger protein 845	33.0	10	17.7
350	Q69YH5	Cell division cycle-associated protein 2	32.9	8	14.8
351	A0A087WWW8	Calcineurin binding protein 1	32.7	17	13.4
352	A0A8V8TL21	Coiled-coil domain containing 144A	32.6	15	17.4
353	Q9Y6N6	Laminin subunit gamma-3	30.3	16	19.7
354	A0A7I2V3H0	GRB10 interacting GYF protein 2	29.8	5	13.7
355	Q9UIW2	Plexin-A1	29.4	7	9.3
356	Q9C093	Sperm flagellar protein 2	29.4	17	16.5
357	Q14839	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	28.6	16	15.1
358	A0A7I2V516	GRB10 interacting GYF protein 2	27.8	6	10.3
359	B7Z3U7	cDNA FLJ56007_ highly similar to Cip1-interacting zinc finger protein	27.4	6	16.5
360	O95644	Nuclear factor of activated T-cells_ cytoplasmic 1	26.2	6	10.9
361	P07357	Complement component C8 alpha chain	26.1	4	18.3
362	P01024	Complement C3	24.2	14	15.2
363	B1AJZ9	Forkhead-associated domain-containing protein 1	22.8	13	14.2
364	H0YLN8	non-specific serine/threonine protein kinase	21.7	9	10.4
365	Q12840	Kinesin heavy chain isoform 5A	21.1	7	12.8
366	Q9ULH0	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	19.7	10	14.1
367	Q14BN4	Sarcolemmal membrane-associated protein	19.5	6	12.6

368	Q13428	Treacle protein	11.9	9	12.9
	Identified Proteins at 48 hours				
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
369	A0A5K1TTM9	HLA-DRB1*1419	1412.1	2	69.1
370	A0A090KM51	HLA class I antigen	856.0	3	17.4
371	K7ELJ6	Lysophosphatidic acid receptor 2	592.4	2	60.6
372	Q99590	Protein SCAF11	577.6	15	12.6
373	Q12809	Voltage-gated inwardly rectifying potassium channel KCNH2	568.3	13	28.5
374	A0A0S4XRH3	MHC class I antigen	531.0	1	14.5
375	Q15042	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	430.3	13	24.6
376	Q86UY6	N-alpha-acetyltransferase 40	399.9	3	17.7
377	P14314	Glucosidase 2 subunit beta	382.9	8	25.4
378	P30876	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	371.1	16	27.5
379	B4DYQ6	cDNA FLJ51579_ highly similar to Calcineurin subunit B isoform 2	367.0	3	46.0
380	Q86XA9	HEAT repeat-containing protein 5A	324.4	27	25.5
381	A0A0G2R0X9	MHC class I antigen	312.9	2	42.5
382	Q01826	DNA-binding protein SATB1	303.0	13	28.6
383	A2KBB9	Anti-(ED-B) scFV	300.8	2	25.6
384	A0A7S5EU33	IGH c345_heavy_IGHV3-53_IGHD5-18_IGHJ6	291.6	3	53.3
385	Q9Y6A5	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	215.7	10	19.8
386	P0CL83	Putative STAG3-like protein 1	205.6	2	23.4
387	O94956-2	Isoform 2 of Solute carrier organic anion transporter family member 2B1	202.7	10	39.6
388	E3NZD7	KIR2DL3	156.6	7	31.2
389	Q9BPZ7-2	Isoform 2 of Target of rapamycin complex 2 subunit MAPKAP1	138.2	5	26.1
390	Q8TF72	Protein Shroom3	133.7	24	26.5
391	O14628-5	Isoform 5 of Zinc finger protein 195	113.3	3	12.7
392	Q4V328	GRIP1-associated protein 1	85.1	9	22.6
393	Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	554.1	45	37.6
394	Q8IUB9	Keratin-associated protein 19-1	550.9	3	100.0
395	O75915	PRA1 family protein	481.3	9	53.2
396	P22748	Carbonic anhydrase 4	465.0	7	55.4
397	Q96IK1	Biorientation of chromosomes in cell division protein 1	719.4	4	50.3
398	Q9BUW7	Bublin coiled-coil protein	547.8	7	77.1
399	Q8TDU6	G-protein coupled bile acid receptor 1	520.7	5	51.2
400	O95800	Probable G-protein coupled receptor 75	472.5	6	48.1

401	Q9BVX2	Transmembrane protein 106C	478.4	5	50.4
402	Q9NWC5	Transmembrane protein 45A	385.4	9	64.4
403	A6NGD5	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 5C	381.2	20	52.0
404	Q9Y337	Kallikrein-5	352.2	6	55.6
405	P13569	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	35.4	15	23.6
	Identified Proteins at 72 hours				
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
406	O00267	Transcription elongation factor SPT5	940.2	15	24.0
407	Q8WZ73-3	Isoform 3 of E3 ubiquitin-protein ligase rififylin	824.3	1	19.0
408	Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	675.3	20	16.5
409	A0A5C2GM26	IG c565_heavy_IGHV3-33_IGHD2-2_IGHJ6	602.4	1	39.7
410	J3KNF0	GDNF family receptor alpha 2	565.8	3	82.3
411	Q9Y2P4	Long-chain fatty acid transport protein 6	560.5	10	24.9
412	B2R8P6	long-chain-fatty-acid--CoA ligase	548.2	11	28.3
413	I6L893	Phospholipase A2 domain-containing protein	519.4	2	12.0
414	Q14192	Four and a half LIM domains protein 2	518.2	7	38.7
415	Q0ZCH6	Immunglobulin heavy chain variable region	501.9	3	58.8
416	A0A2I4PZI2	MHC class I antigen	455.2	1	31.5
417	A0A087WUD0	Phosphodiesterase 10A	427.4	3	44.3
418	Q9NVH2	Integrator complex subunit 7	389.0	8	12.6
419	Q9NVH2-4	Isoform 4 of Integrator complex subunit 7	381.7	10	20.0
420	P24001	Interleukin-32	380.0	4	37.6
421	A0A7S5BZX7	IGH c1496_heavy_IGHV1-2_IGHD2-15_IGHJ3	375.5	1	32.8
422	A0A5C2GKZ0	IG c225_heavy_IGHV3-30_IGHD5-12_IGHJ4	374.8	1	36.7
423	Q13018-2	Isoform 2 of Secretory phospholipase A2 receptor	374.6	13	22.8
424	A0A5C2GNY4	IG c1135_heavy_IGHV5-51_IGHD6-25_IGHJ3	361.7	2	53.3
425	P43353	Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1	358.3	5	24.8
426	O95045	Uridine phosphorylase 2	358.0	6	36.3
427	L0R6E1	Alternative protein CACNA2D2	356.0	2	48.7
428	Q9BUB4	tRNA-specific adenosine deaminase 1	347.8	9	29.9
429	B4DL42	tRNA-specific adenosine deaminase 1	341.2	12	32.3
430	A0A7S5C4G6	IGH c1720_heavy_IGHV1-2_IGHD3-9_IGHJ4	330.4	1	33.1
431	A0A5C2GEJ0	IG c339_heavy_IGHV3-33_IGHD3-22_IGHJ1	316.7	5	45.1
432	O00423	Echinoderm microtubule-associated protein-like 1	298.1	7	16.9

433	A5PLL7	Plasmanylethanolamine desaturase 1	289.9	3	29.6
434	A0A343SUV0	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	278.6	4	39.0
435	Q10589	Bone marrow stromal antigen 2	278.4	2	29.4
436	Q9NWH9	SAFB-like transcription modulator	271.7	6	13.4
437	P02751-10	Isoform 10 of Fibronectin	264.1	20	25.6
438	P27708	Multifunctional protein CAD	262.0	20	22.1
439	A0A5C2GMR4	IG c735_heavy_IGHV5-51_IGHD3-22_IGHJ6	260.8	2	46.8
440	A0A7H1D1Z2	ATP synthase subunit a	256.5	1	26.7
441	Q9NQ30	Endothelial cell-specific molecule 1	253.6	6	51.6
442	Q9UKA8-3	Isoform 3 of Calcipressin-3	247.7	2	45.1
443	A0A3B3IT11	Heparan sulfate proteoglycan 2	238.6	6	64.2
444	K9JA46	Epididymis luminal secretory protein 52	238.0	10	25.7
445	Q6UXC1	Apical endosomal glycoprotein	232.2	9	21.8
446	Q9UPR5	Sodium/calcium exchanger 2	230.6	10	25.1
447	Q9NSY1	BMP-2-inducible protein kinase	230.5	10	22.0
448	Q06124	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	229.9	7	26.1
449	O00329	Phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	229.5	16	31.0
450	A0A343H8W6	ATP synthase subunit a	229.1	1	25.7
451	E5RGJ7	Regulator of G protein signaling 22	226.2	4	42.8
452	O60237	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	224.4	9	24.5
453	Q5T160	Probable arginine--tRNA ligase_mitochondrial	221.1	5	18.0
454	F8WDJ2	RAB3 GTPase activating non-catalytic protein subunit 2	218.0	4	56.1
455	A0A7I2V2Y7	Golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1	212.1	2	40.9
456	Q8N3X1	Formin-binding protein 4	209.5	11	26.7
457	Q8IYR6	Tomoregulin-1	207.3	5	30.0
458	P60660-2	Isoform Smooth muscle of Myosin light polypeptide 6	207.2	2	23.8
459	R4GMR7	Tubulin tyrosine ligase like 3	205.5	4	40.9
460	Q8ND09	Uncharacterized protein DKFZp434K1130	204.1	3	67.3
461	Q99578-2	Isoform 2 of GTP-binding protein Rit2	202.7	4	72.5
462	Q9UL01	Dermatan-sulfate epimerase	202.3	5	11.1
463	A0A5C2GMV1	IG c508_heavy_IGHV3-30_IGHD3-22_IGHJ4	196.5	1	31.0
464	B3KMM7	cDNA FLJ11524 fis_clone HEMBA1002547_ highly similar to Agrin	195.7	4	23.0
465	Q01118	Sodium channel protein type 7 subunit alpha	195.3	14	16.4
466	Q8TBY8	Polyamine-modulated factor 1-binding protein 1	188.7	8	8.6
467	A0A8I5KXU2	Tubulin tyrosine ligase like 3	188.4	11	23.4
468	Q7RTW8	Otoancorin	188.1	11	23.3
469	Q9Y2D2	UDP-N-acetylglucosamine transporter	185.3	5	40.9
470	P45844	ATP-binding cassette sub-family G	184.8	6	21.1

		member 1			
471	A0A1S5V2W1	HLA class I histocompatibility antigen	180.5	1	14.6
472	A0A7S5EY07	IGH c3104_heavy_IGHV1-69_IGHD3-22_IGHJ4	177.8	1	22.8
473	D6RAA5	Transforming acidic coiled-coil containing protein 2	173.4	7	11.3
474	Q7RTV3	Zinc finger protein 367	168.7	2	10.0
475	B3KY59	cDNA FLJ46903 fis_ clone MESAN2003661_ highly similar to Cdc42 effector protein 3 (Binder of Rho GTPases 2)	165.4	5	36.6
476	A0A7S5C678	IGH c4115_heavy_IGHV3-73_IGHD1-26_IGHJ4	164.1	2	35.0
477	A0A7S5C2P5	IGH c1984_heavy_IGHV5-51_IGHD3-22_IGHJ3	161.7	2	46.0
478	A0A7S5BZT6	IGH c1553_heavy_IGHV5-51_IGHD6-19_IGHJ3	160.0	1	29.3
479	Q02487	Desmocollin-2	154.3	6	8.8
480	O75665	Centriole and centriolar satellite protein OFD1	154.2	10	18.8
481	Q96NG8	Zinc finger protein 582	149.6	7	31.3
482	L7RSL3	receptor protein-tyrosine kinase	147.0	19	21.5
483	P63010	AP-2 complex subunit beta	145.2	7	21.1
484	Q9P0V8-2	Isoform 2 of SLAM family member 8	143.8	3	19.9
485	P29374-2	Isoform II of AT-rich interactive domain-containing protein 4A	142.5	16	27.3
486	A0A8V8TLD7	Dedicator of cytokinesis 10	142.4	10	34.5
487	A0A8V8TPS8	Amyloid beta precursor protein binding family A member 1	141.2	3	13.5
488	B7Z6T5	cDNA FLJ58949_ highly similar to Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-3	140.1	1	15.9
489	X2C0V4	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	137.0	3	70.4
490	Q12888	TP53-binding protein 1	117.9	22	31.1
491	A0A1B0GVS8	Kinesin family member 16B	113.4	26	25.3
492	Q5JU85	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2	109.9	15	20.4
493	A6NNK5	Tumor protein p53 binding protein 1	108.5	21	30.6
494	Q6ZUJ8	Phosphoinositide 3-kinase adapter protein 1	106.7	12	34.9
495	Q8NE09	Regulator of G-protein signaling 22	105.9	12	15.6
496	Q7Z7F0	KH homology domain-containing protein 4	104.2	8	36.6
497	P19022	Cadherin-2	101.8	8	27.0
498	O14976	Cyclin-G-associated kinase	101.2	9	14.4
499	O15397	Importin-8	100.6	10	21.8
500	P48634	Protein PRRC2A	98.7	20	22.9
501	Q8NBS3	Solute carrier family 4 member 11	98.4	11	30.1
502	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	95.0	27	20.1
503	P29692-2	Isoform 2 of Elongation factor 1-delta	89.7	9	24.3
504	D3YTG3	ABI family member 3 binding protein	88.6	16	21.1
505	B4E3H1	Supervillin	88.0	11	17.4

506	Q59HA5	Cyclin G-associated kinase variant	87.1	9	17.3
507	P46934	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	86.0	18	27.1
508	O95425	Supervillin	85.9	17	16.0
509	Q9ULV0	Unconventional myosin-Vb	81.0	22	21.9
510	Q9Y6N7	Roundabout homolog 1	80.5	17	28.4
511	Q02952	A-kinase anchor protein 12	78.4	23	23.2
512	A0A6Q8PGR8	Ligand dependent nuclear receptor corepressor	77.5	10	29.7
513	Q7Z3C4	Uncharacterized protein DKFZp686J0330	76.6	9	14.5
514	Q9NYB9	Abl interactor 2	76.1	7	29.4
515	P09958	Furin	75.1	8	29.6
516	O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	74.8	24	21.0
517	A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F	72.8	13	26.4
518	A0A3B3IS53	Histone acetyltransferase	72.5	22	26.8
519	A0A7P0T8U2	furin	71.9	6	23.0
520	Q02880	DNA topoisomerase 2-beta	71.1	12	15.4
521	A0A804HIA4	Forkhead associated phosphopeptide binding domain 1	71.0	15	15.1
522	P14598	Neutrophil cytosol factor 1	70.5	5	29.0
523	Q13075	Baculoviral IAP repeat-containing protein 1	65.9	15	29.1
524	Q8IXF0	Neuronal PAS domain-containing protein 3	65.7	10	25.5
525	Q86YA3	5'-3' DNA helicase ZGRF1	62.5	21	19.7
526	Q8NI27	THO complex subunit 2	62.0	18	20.2
527	A0A994J4T6	Centrosomal protein 43	59.9	5	23.0
528	Q86YW9	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12-like protein	57.9	19	19.9
529	A8MW92	PHD finger protein 20-like protein 1	50.1	8	13.9
530	Q9Y4I1	Unconventional myosin-Va	46.9	23	15.2
531	Q5JSZ5	Protein PRRC2B	46.7	25	19.6
532	A0A8V8TRI9	Dedicator of cytokinesis 9	44.7	18	15.9
533	Q15858	Sodium channel protein type 9 subunit alpha	41.1	13	18.1
534	P01024	Complement C3	40.3	23	27.7
535	Q7Z3U7	Protein MON2 homolog	37.7	12	13.2
536	P00414	Cytochrome c oxidase subunit 3	436.0	4	22.6
537	Q9UBR5	Chemokine-like factor	415.6	7	78.9
538	Q96AT9	Ribulose-phosphate 3-epimerase	393.9	6	64.9
539	P35225	Interleukin-13	332.4	8	65.1
540	A0A7P0T8T5	Leucine rich repeat kinase 2	33.9	4	11.2
541	P20020	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	23.8	7	13.3

2D-A549 HYPOXIA					
Identified Proteins at 24 hours					
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
1	Q9Y2L6	FERM domain-containing protein 4B	702.1	17	26.0
2	A0A5H2UD34	MHC class II antigen	664.0	2	41.0
3	E9PJF0	Mitogen-activated protein kinase	612.7	6	37.3
4	A0A3S6RIX4	MHC class II antigen	598.3	3	71.9
5	H9BYU6	MHC class I antigen	556.0	1	70.3
6	A0A1U9X8R9	RING-type E3 ubiquitin transferase	548.2	4	21.6
7	A0A288Q967	MHC class I antigen	522.7	1	29.3
8	A0A7S5EWH4	IGH c453_heavy_IGHV1-2_IGHD3-9_IGHJ1	509.2	1	32.0
9	O60424	histone acetyltransferase	466.9	5	11.1
10	E5KR06	non-specific serine/threonine protein kinase	428.1	3	17.2
11	P16278	Beta-galactosidase	407.7	7	24.5
12	O75460	Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1	384.1	10	24.3
13	Q9Y4E1	WASH complex subunit 2C	383.8	13	17.8
14	Q13319	Cyclin-dependent kinase 5 activator 2	373.9	4	39.8
15	Q08050	Forkhead box protein M1	366.3	7	23.6
16	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	351.1	28	16.7
17	Q2M3W8	Zinc finger protein 181	342.5	6	15.2
18	A0A8Q3SID6	Complement C5	335.0	13	17.1
19	Q5QTR6	FWP010	327.5	1	19.5
20	O15055	Period circadian protein homolog 2	324.8	5	10.8
21	P16471	Prolactin receptor	323.3	9	40.7
22	Q86W56	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	313.7	17	32.5
23	A0A059RH94	Cytochrome b	293.2	2	25.0
24	P35498	Sodium channel protein type 1 subunit alpha	284.8	24	25.6
25	Q8TB22	Spermatogenesis-associated protein 20	269.9	7	22.6
26	B4DWF9	cDNA FLJ60358_ highly similar to Regulator of G-protein signaling 3	268.3	5	32.7
27	A0A4P8D7H5	MHC class II antigen	263.4	2	31.4
28	Q15608	Troponin T_ cardiac muscle	262.5	2	27.4
29	P35968	Vascular endothelial growth factor receptor 2	261.5	10	15.4
30	X2BYT9	SETDB2-PHF11 fusion protein variant 3	261.1	3	41.2
31	A0A7S5C3Z4	IGH c2930_heavy_IGHV3-49_IGHD2-15_IGHJ4	254.1	1	31.0
32	H0Y8M7	ATPase phospholipid transporting 10D	253.1	3	19.2
33	Q05BV3	Echinoderm microtubule-associated protein-like 5	248.1	24	23.5
34	A0A7S5EXU1	IGH c2774_heavy_IGHV3-11_IGHD3-10_IGHJ4	244.5	2	20.3

35	A0A7H0RR18	MHC class I antigen	241.1	1	33.0
36	P55286	Cadherin-8	221.4	7	23.5
37	Q9UIF9	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A	218.3	15	15.7
38	A0A5C2GEE8	IG c554_heavy_IGHV1-2_IGHD6-19_IGHJ4	215.5	1	33.1
39	A0A7S5C552	IGH c3545_heavy_IGHV3-48_IGHD6-13_IGHJ4	213.7	2	52.1
40	Q13620	Cullin-4B	213.2	18	28.0
41	Q7YEF8	Cytochrome b	191.5	2	25.1
42	P02671	Fibrinogen alpha chain	187.9	8	16.9
43	F8WF46	Methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit 1	184.6	1	71.4
44	F8WD11	Fission_ mitochondrial 1	184.5	3	86.7
45	B3KUI0	cDNA FLJ39945 fis_ clone SPLEN2023977_ highly similar to Homo sapiens CD97 antigen (CD97)_ transcript variant 2_ mRNA	183.8	5	19.1
46	Q9Y4F9	Rho family-interacting cell polarization regulator 2	181.2	13	18.2
47	O95780	Zinc finger protein 682	179.3	6	16.3
48	B2RB53	cDNA_ FLJ95315_ highly similar to Homo sapiens actin related protein M2 (ARPM2)_ mRNA	178.2	5	26.5
49	Q96JM7	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 3	177.1	10	26.9
50	P09958	Furin	176.2	10	20.2
51	Q9NZL3	Zinc finger protein 224	175.6	9	19.0
52	Q6P996	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	170.8	10	16.9
53	A0A060VCW9	MHC class I antigen	169.4	1	6.8
54	Q8WYB5-2	Isoform 2 of Histone acetyltransferase KAT6B	166.7	21	18.4
55	Q5H9U9	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60-like	166.3	21	20.6
56	B4DH16	cDNA FLJ54709_ highly similar to Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha_ mitochondrial	164.9	4	8.5
57	Q9H6Y2	WD repeat-containing protein 55	164.6	7	25.3
58	Q8TE30	RNA-directed DNA polymerase	162.3	13	19.7
59	Q8TD57-3	Isoform 3 of Dynein axonemal heavy chain 3	158.9	22	20.9
60	Q70EL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 54	158.2	14	14.0
61	O15031	Plexin-B2	158.0	16	17.4
62	B4DZI7	Exocyst complex component 2	157.5	12	34.5
63	Q9UHX3-4	Isoform 4 of Adhesion G protein-coupled receptor E2	156.7	2	8.6
64	A0A5C2GGU3	IG c1032_heavy_IGHV3-30_IGHD1-1_IGHJ6	155.3	1	15.2
65	A0A2U8J922	Ig heavy chain variable region	152.2	1	20.4
66	Q9NPD5	Solute carrier organic anion transporter family member 1B3	150.7	7	25.2
67	Q641Q2	WASH complex subunit 2A	147.7	15	20.7

68	A0A7S5EWW8	IGH c918_heavy_IGHV3-15_IGHD6-19_IGHJ4	147.5	1	10.7
69	Q14CX7	N-alpha-acetyltransferase 25_ NatB auxiliary subunit	147.4	9	16.2
70	A0A8V8TKJ0	Fas cell surface death receptor	145.0	3	36.0
71	Q8IYD1	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B	142.4	9	30.9
72	Q9HBT7	Zinc finger protein 287	142.4	11	17.9
73	Q8N8J7	Uncharacterized protein FAM241A	141.5	2	23.5
74	Q6NUT2	Probable C-mannosyltransferase DPY19L2	140.2	10	28.2
75	Q7Z6C1	histone acetyltransferase	137.8	9	13.3
76	H0YCE8	CTR9 homolog_ Paf1/RNA polymerase II complex component	137.1	8	27.0
77	H3BMZ9	Mannose-6-phosphate isomerase	136.4	1	14.4
78	Q8N7E8	cDNA FLJ25713 fis_ clone TST05089	136.2	3	52.3
79	Q8IYN0	Zinc finger protein 100	136.1	6	22.3
80	Q86Y13	E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3	135.0	13	16.7
81	Q3T1D4	RAET1E protein	133.8	2	53.8
82	Q9NY46	Sodium channel protein type 3 subunit alpha	132.3	16	22.4
83	A0A7I2YQ72	RING-type E3 ubiquitin transferase	130.5	3	27.9
84	A0A3S6RG02	MHC class I antigen	129.6	2	18.6
85	A0A678ZHE3	MHC class II antigen	127.8	2	53.6
86	Q9UPS8	Ankyrin repeat domain-containing protein 26	127.7	19	18.5
87	Q9UPV9	Trafficking kinesin-binding protein 1	126.8	12	26.5
88	Q8IWU2	Serine/threonine-protein kinase LMTK2	123.1	12	21.4
89	Q53RZ9	GPN-loop GTPase	120.6	3	22.2
90	Q59H94	Gamma filamin variant	118.7	12	20.1
91	Q8IVU3	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC6	118.6	10	18.4
92	O15439	ATP-binding cassette sub-family C member 4	114.1	11	18.6
93	O95197	Reticulon-3	113.2	9	18.5
94	Q6PD62	RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog	113.2	14	22.8
95	Q15147	1-phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4	113.0	18	28.6
96	Q2M1Z3	Rho GTPase-activating protein 31	111.3	10	19.5
97	Q8IYB9	Zinc finger protein 595	110.3	6	15.1
98	P06213	Insulin receptor	110.2	14	20.2
99	O00462	Beta-mannosidase	109.3	6	15.5
100	Q59G42	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	108.3	9	14.8
101	H3BMM1	Myosin IXA	108.0	24	26.3
102	B7ZAD2	Filensin	107.8	6	20.5
103	H0Y3P2	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	107.8	8	14.2
104	A0A455QZK9	HLA class I histocompatibility antigen B alpha chain	107.4	2	11.3

105	Q9H4Z2	Zinc finger protein 335	106.6	6	11.4
106	P45379-11	Isoform 11 of Troponin T_ cardiac muscle	103.9	3	18.6
107	Q86X10	Ral GTPase-activating protein subunit beta	103.8	14	28.0
108	P51160	Cone cGMP-specific 3'_5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha'	102.8	9	22.0
109	Q9H379	Putative uncharacterized protein PRO3102	101.4	2	48.4
110	A0A8I5KSG5	Intraflagellar transport protein 122 homolog	101.2	13	22.1
111	Q5JST6	EF-hand domain-containing family member C2	100.1	11	24.2
112	A0JLR0	non-specific serine/threonine protein kinase	99.8	10	24.1
113	P16581	E-selectin	96.4	6	25.7
114	Q14940	Sodium/hydrogen exchanger 5	95.8	9	28.9
115	Q8IYH5	ZZ-type zinc finger-containing protein 3	93.4	9	30.9
116	Q9HBU1	Homeobox protein BarH-like 1	93.3	6	36.6
117	Q9Y4F5	Centrosomal protein of 170 kDa protein B	92.3	20	21.6
118	A0AAQ5BHJ9	Filamin C	92.0	16	10.8
119	Q92878	DNA repair protein RAD50	90.1	20	18.5
120	Q9UPZ3	BLOC-2 complex member HPS5	89.8	15	27.5
121	A0A994J4S5	Transformation/transcription domain associated protein	89.6	17	18.4
122	Q9NUQ2	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase epsilon	88.8	5	19.8
123	Q5JSL3	Dedicator of cytokinesis protein 11	88.8	20	22.7
124	A0A024R6A3	Presenilin (Fragment)	87.2	4	23.8
125	Q9H7R0	Zinc finger protein 442	86.4	12	29.5
126	Q9BYV6-2	Isoform 2 of Tripartite motif-containing protein 55	85.8	6	37.8
127	E9KL29	Epididymis tissue protein Li 176	83.9	4	18.2
128	Q8NG31-3	Isoform 3 of Outer kinetochore KNL1 complex subunit KNL1	83.8	18	17.4
129	O14802	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1	83.3	19	27.8
130	Q6ZP01	RNA-binding protein 44	83.3	9	13.5
131	O43719	17S U2 SnRNP complex component HTATSF1	81.5	13	31.1
132	O00160	Unconventional myosin-Ib	81.3	12	18.9
133	Q6P0Q8	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2	80.9	11	10.7
134	M1V487	Tyrosine-protein kinase receptor	79.0	13	25.5
135	Q8IVF7	Formin-like protein 3	78.5	9	17.4
136	Q5T5P2	Sickle tail protein homolog	78.3	18	16.7
137	P27797	Calreticulin	75.6	3	18.0
138	Q5SRE5-2	Isoform 2 of Nucleoporin NUP188	75.0	7	11.6
139	Q9ULH0	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	74.4	20	18.0
140	Q99698-2	Isoform 2 of Lysosomal-trafficking regulator	72.0	16	16.2
141	Q00722	1-phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase beta-2	69.8	16	31.7

142	P23508-2	Isoform 2 of Colorectal mutant cancer protein	69.7	16	28.3
143	Q13459	Unconventional myosin-Ixb	69.4	28	20.7
144	A0A3B3IS53	Histone acetyltransferase	69.2	17	19.9
145	P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	69.0	9	21.5
146	O15357	Phosphatidylinositol 3_4_5-trisphosphate 5-phosphatase 2	68.9	15	27.7
147	Q9H1P3	Oxysterol-binding protein-related protein 2	68.7	6	18.1
148	Q6XZF7	Dynamin-binding protein	68.7	13	17.1
149	Q9C0F0	Putative Polycomb group protein ASXL3	66.2	21	20.2
150	P12883	Myosin-7	65.7	21	19.3
151	P17022	Zinc finger protein 18	64.4	5	15.8
152	Q9H9B1	Histone-lysine N-methyltransferase EHMT1	63.5	14	20.0
153	K7ENM7	Zinc finger protein 284	63.4	5	18.1
154	Q8NEY1	Neuron navigator 1	60.6	16	14.8
155	O95153	Peripheral-type benzodiazepine receptor-associated protein 1	58.1	10	13.2
156	Q8NEY1-4	Isoform 4 of Neuron navigator 1	57.6	17	13.6
157	Q5T5P2-2	Isoform 2 of Sickie tail protein homolog	57.6	13	15.3
158	P78332	RNA-binding protein 6	56.3	17	23.8
159	Q9UPX8	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2	55.7	16	17.7
160	Q6PCB7	Long-chain fatty acid transport protein 1	50.0	9	20.6
161	O94823	Phospholipid-transporting ATPase VB	50.0	10	13.7
162	Q15858	Sodium channel protein type 9 subunit alpha	49.8	23	23.2
163	Q9P2R6	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	48.7	15	14.6
164	A0A0A0MQW0	Myelin expression factor 2	47.5	8	20.5
165	H0YLY0	non-specific serine/threonine protein kinase	46.0	16	19.1
166	Q6PJ19	GATOR2 complex protein WDR59	45.1	8	12.5
167	Q9Y3Q7	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 18	44.2	8	19.1
168	Q92824	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	41.8	26	24.8
169	Q8WX93	Palladin	38.0	11	20.5
170	P12882	Myosin-1	33.8	16	12.6
171	O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	29.8	29	19.7
172	P54252	Ataxin-3	444.3	10	49.9
173	P18827	Syndecan-1	476.4	8	61.0
174	O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2	549.9	6	25.2

Identified Proteins at 48 hours					
	Accession	Description	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
175	U3KQI8	Antizyme inhibitor 1	1969.4	2	50.9
176	Q75N88	Fibrillin 1	599.6	12	15.8
177	O15055	Period circadian protein homolog 2	581.1	11	15.5
178	P49840	Glycogen synthase kinase-3 alpha	571.3	8	34.2
179	O19594	MHC class II HLA-DR beta 1 chain	541.8	2	66.7
180	H7C1U6	Zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 3	491.8	2	48.3
181	A0A0C4DH34	Immunoglobulin heavy variable 4-28	456.5	1	36.8
182	Q13444	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 15	439.8	5	17.7
183	P17661	Desmin	413.4	5	24.5
184	A0A059QQT1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	369.6	1	22.6
185	Q8NG31-3	Isoform 3 of Outer kinetochore KNL1 complex subunit KNL1	366.9	26	27.5
186	Q8IZS8	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-3	365.0	12	27.5
187	O00410	Importin-5	358.1	11	19.9
188	A0A090N8E9	Histone-lysine N-methyltransferase EZH2	346.6	9	17.6
189	A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F	342.2	20	28.2
190	Q8IZD2	Inactive histone-lysine N-methyltransferase 2E	341.4	16	16.3
191	E9PEI4	Protein tyrosine kinase 2	325.1	7	24.6
192	A8WBZ2	Potassium voltage-gated channel subfamily H eag-related member 2	315.1	4	56.3
193	Q5VZL5	Zinc finger MYM-type protein 4	304.8	19	23.7
194	Q92932	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2	298.3	8	18.8
195	A0A348GSH6	MHC class I antigen	296.7	1	19.4
196	A0A2R8YH69	Glyceronephosphate O-acyltransferase	291.5	1	30.1
197	H3BVH3	Centriolar coiled-coil protein 110	289.0	1	73.1
198	Q5T3U5	ATP-binding cassette sub-family C member 10	287.7	13	20.9
199	Q6P387	Uncharacterized protein C16orf46	286.1	6	23.3
200	A4ZL69	ATP synthase protein 8	285.6	1	39.7
201	A0A7S5EXA9	IGH c1428_heavy_IGHV4-59_IGHD4-17_IGHJ6	273.2	1	28.2
202	P60709	Actin_cytoplasmic 1	272.5	5	24.5
203	A0A8I5QJG2	Guanylate cyclase	269.3	12	22.2
204	B6ECA2	MUC1 isoform SV7-LSP	253.5	2	62.2
205	A0A8V8TNR8	NLR family pyrin domain containing 1	249.3	1	32.3
206	A8K7K0	cDNA FLJ78111_ highly similar to Homo sapiens regulator of G-protein signalling 18 (RGS18)_ mRNA	245.3	5	26.4
207	Q5SRE5	Nucleoporin NUP188	243.3	8	14.8
208	A0A140VKA0	Caldesmon 1_ isoform CRA_i	238.7	6	20.4

209	Q96J65	ATP-binding cassette sub-family C member 12	235.7	13	22.1
210	A0A5C2GUP4	IG c1539_heavy_IGHV4-34_IGHD2-2_IGHJ4	232.0	1	36.4
211	A0A5C2G9S7	IGH + IGL c14_heavy_IGHV2-5_IGHD6-19_IGHJ4	231.8	3	35.8
212	A0A2U8J8M9	Ig heavy chain variable region	218.5	1	22.0
213	Q2VPK5	Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 2	217.1	8	26.2
214	Q7Z6M3	Allergin-1	215.1	3	22.2
215	Q96QD8	Sodium-coupled neutral amino acid symporter 2	190.1	5	27.1
216	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	172.5	46	23.1
217	Q5U623	Activating transcription factor 7-interacting protein 2	146.8	11	27.9
218	Q8N3Z3	GTP-binding protein 8	142.5	9	51.1
219	P18615	Negative elongation factor E	142.2	14	41.8
220	A0A8V8TQ09	Pleckstrin homology domain containing A5	136.9	9	17.2
221	Q9Y6M7	Sodium bicarbonate cotransporter 3	115.2	19	38.3
222	Q05193	Dynamin-1	107.1	15	31.4
223	A6NKB5	Pecanex-like protein 2	103.9	25	22.8
224	B3KNZ5	Pecanex-like protein	95.8	12	23.2
225	Q96QT6	PHD finger protein 12	89.5	11	24.0
226	Q96K76	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	82.8	17	26.0
227	Q99615	DnaJ homolog subfamily C member 7	81.7	8	24.9
228	Q9Y6N5	Sulfide:quinone oxidoreductase_mitochondrial	79.3	7	31.6
229	Q9P2R6	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	78.5	14	17.9
230	O14607	Histone demethylase UTY	74.5	11	15.7
231	Q13219	Pappalysin-1	66.8	14	17.2
232	O75128	Protein cordon-bleu	52.7	13	16.7
233	Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	41.5	20	17.4
	Identified Proteins at 72 hours				
	Accession	Description	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
234	A0A087WZC0	Uncharacterized protein	1368.7	1	94.2
235	A0A0S2Z4Q1	Sarcoglycan alpha isoform 1	689.1	2	20.9
236	A0A1C8DSY2	MHC class II antigen	666.6	1	59.6
237	A0A5C2G1H2	IGL c3138_light_IGLV2-11_IGLJ3	642.5	2	51.8
238	A0A5C2GVS7	IG c599_light_IGLV2-8_IGLJ2	611.1	3	74.8
239	A0A7S5C3N1	IGH c2509_heavy_IGHV1-69_IGHD1-14_IGHJ5	565.3	1	46.7
240	Q6WCQ1	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	546.3	12	19.4
241	A0A5C2GN43	IG c651_light_IGLV2-11_IGLJ2	539.4	2	45.9
242	A0A7S5EW26	IGH c33_heavy_IGHV1-18_IGHD3-10_IGHJ4	536.7	2	42.1

243	Q13514	Gp130	497.2	3	65.3
244	A0A5C2H043	IG c1308_light_IGLV2-8_IGLJ3	421.8	2	51.4
245	A0A5C2GCA8	IGH + IGL c378_heavy_IGHV1-69_IGHD3-10_IGHJ4	421.3	2	62.7
246	A0A5C2GV09	IG c1374_light_IGLV2-8_IGLJ1	419.0	2	40.5
247	Q53S70	Uncharacterized protein MGC4677	411.9	2	53.8
248	A0A5C2G594	IGL c3035_light_IGLV3-1_IGLJ2	403.9	2	47.7
249	Q9NZL9	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	381.4	2	23.7
250	A8K6J9	RNA helicase	375.4	3	5.3
251	B4DJG4	cDNA FLJ50549_ highly similar to Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1B	373.7	1	23.8
252	A0A7S5C213	IGH c280_heavy_IGHV1-69_IGHD3-16_IGHJ6	347.6	3	75.6
253	A0A2P1HA27	Truncated MHC class II antigen	318.7	2	36.9
254	A0A5C2G6L4	IGH c297_heavy_IGHV1-69_IGHD3-22_IGHJ3	312.7	2	31.5
255	A0A5C2FV94	IGL c809_light_IGKV1-5_IGKJ1	301.2	2	33.6
256	P23381	Tryptophan--tRNA ligase_ cytoplasmic	298.7	9	38.6
257	Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	268.9	17	15.7
258	A0A5C2FV48	IGL c642_light_IGKV1-5_IGKJ2	263.8	1	39.3
259	A0A384MED8	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	259.3	6	15.7
260	Q70CQ4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31	254.5	15	19.7
261	A0A5C2FWR5	IGL c1538_light_IGLV2-23_IGLJ2	251.6	1	34.5
262	A0A5C2GPQ6	IG c1178_heavy_IGHV1-69_IGHD5-5_IGHJ4	244.5	4	31.0
263	A0A7S5C010	IGH c1663_heavy_IGHV3-49_IGHD2-21_IGHJ4	239.3	3	49.2
264	Q0ZCG5	Immunoglobulin heavy chain variable region	232.7	2	54.9
265	Q9ULZ9	Matrix metalloproteinase-17	220.3	6	23.5
266	Q0VG99	Mesoderm posterior protein 2	220.3	4	36.8
267	Q9NYV8	Taste receptor type 2 member 14	218.9	6	48.6
268	Q4VAT1	GLP2R protein	217.6	4	24.7
269	O14578	Citron Rho-interacting kinase	216.9	19	15.9
270	A0A5C2GDX6	IGH c191_heavy_IGHV1-46_IGHD1-14_IGHJ4	213.9	3	51.7
271	A0A3Q8QX02	ATP synthase protein 8	210.3	1	39.7
272	Q14QQ0	MHC class I antigen	208.4	2	20.8
273	A0A7S5EXZ8	IGH c2388_heavy_IGHV1-18_IGHD3-16_IGHJ1	199.3	1	21.6
274	A0A0U1RRB9	FGGY carbohydrate kinase domain containing	194.6	5	24.5
275	Q9UJU5	Forkhead box protein D3	190.9	5	37.7
276	A0A5C2GKF3	IG c761_light_IGLV2-14_IGLJ3	187.7	1	35.1
277	O14792	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 1	187.1	6	39.1
278	Q4FD37	ZBP-89 delta-Nter isoform	186.3	8	28.3
279	P07902	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	147.3	5	24.3
280	Q8TA94	Zinc finger protein 563	136.1	8	30.9

281	P56703	Proto-oncogene Wnt-3	136.0	8	36.1
282	P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	131.6	10	33.5
283	O60296	Trafficking kinesin-binding protein 2	129.0	15	30.1
284	Q9P2F8	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2	121.5	18	24.9
285	O94964	Microtubule cross-linking factor 2	110.0	26	31.1
286	Q96IY4	Carboxypeptidase B2	108.0	4	42.1
287	Q6DN14	Multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1	98.4	13	28.0
288	C9J5X1	Tyrosine-protein kinase receptor	97.9	16	28.6
289	P46459	Vesicle-fusing ATPase	83.9	9	22.0
290	P08581	Hepatocyte growth factor receptor	78.1	13	23.6
291	Q8NHM5	Lysine-specific demethylase 2B	77.4	18	26.0
292	A2CJ06	Dystrotelin	74.4	7	19.2
293	Q9P2K8	eIF-2-alpha kinase GCN2	64.9	15	18.9
294	Q8NDV7	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein	61.7	19	22.4
295	Q99615	DnaJ homolog subfamily C member 7	58.8	5	19.0
296	A0A8Q3SIA1	Sushi domain-containing protein	57.1	14	22.5
297	Q9BXW4	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C	780.0	4	37.4
298	Q96T54	Potassium channel subfamily K member 17	516.6	11	59.3
299	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	499.4	70	22.0
300	Q8N6F1	Claudin-19	486.8	5	55.4
301	Q9NV58	E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A	52.8	12	26.3
302	Q8N157	Joubertin	44.4	13	19.7
	2D-A549 NORMOXIA (0 μM Cobalt Chloride)				
	<u>Identified Proteins at 48 hours</u>				
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
1	I3L1T7	Cholinergic receptor nicotinic beta 1 subunit	484.9	3	14.7
2	P08195	Amino acid transporter heavy chain SLC3A2	301.2	14	28.1
3	A0A7P0T8F1	Solute carrier family 3 member 2	227.9	11	43.5
4	P11274-2	Isoform 2 of Breakpoint cluster region protein	89.8	15	28.0
5	A0A5C2FTK4	IGL c159_light_IGLV2-14_IGLJ2	570.3	1	38.7
6	A0A8V8TQN4	T-cell surface glycoprotein CD3 zeta chain	478.2	2	20.2
7	Q6ZN30	Zinc finger protein basonuclin-2	346.8	10	24.6
8	P35670	Copper-transporting ATPase 2	321.2	16	26.2
9	A0A7I2V514	Golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1	300.3	17	20.9
10	A9YQ98	MHC class II antigen	292.9	1	25.8

11	A2RRD8	Zinc finger protein 320	287.8	7	32.4
12	B4DR27	cDNA FLJ58607_ highly similar to Zinc finger protein basonuclin-2	266.7	10	27.8
13	O43196	MutS protein homolog 5	262.9	8	15.2
14	A0A0S2Z5G1	Leucine-rich glioma-inactivated protein 1	260.5	1	23.9
15	G1EMU7	MHC class I antigen	255.8	1	22.7
16	F5H586	Basonuclin zinc finger protein 2	237.6	9	28.4
17	Q86UP2	Kinectin	230.1	16	18.3
18	Q8WWZ4-3	Isoform 3 of ATP-binding cassette sub-family A member 10	229.7	3	23.9
19	A6NES4	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 2A	210.0	18	21.7
20	Q8IY17-2	Isoform 2 of Patatin-like phospholipase domain-containing protein 6	201.1	5	9.6
21	A0AAG2UWZ2	PTPRF interacting protein alpha 1	201.0	13	23.9
22	A0A7S5EYA0	IGH c2748_heavy_IGHV3-23_IGHD5-24_IGHJ6	198.5	3	38.0
23	Q14739	Delta(14)-sterol reductase LBR	198.4	8	40.3
24	P11277	Spectrin beta chain_ erythrocytic	198.1	17	14.2
25	Q8TAG9	Exocyst complex component 6	197.6	9	18.3
26	L8E9A5	Alternative protein KLF7	197.6	5	88.1
27	P51956	Serine/threonine-protein kinase Nek3	194.8	11	33.2
28	Q7L2R6	Zinc finger protein 765	192.2	4	17.0
29	Q96IR2	Zinc finger protein 845	188.7	10	15.6
30	Q9UKA8	Calciressin-3	188.0	3	27.0
31	H0YLE6	SAFB like transcription modulator	187.0	3	45.3
32	A0A3B3IRP5	Cell division cycle 73	186.4	10	36.9
33	P08195	Amino acid transporter heavy chain SLC3A2	185.9	9	21.4
34	A0A068B6T4	MHC class I antigen	185.3	3	33.7
35	Q9Y2A4	Zinc finger protein 443	179.4	8	15.5
36	Q6P0Q8-2	Isoform 2 of Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2	177.9	12	15.0
37	Q93033	Immunoglobulin superfamily member 2	177.4	6	11.9
38	H0YGU5	Paired like homeobox 2A	172.5	1	32.9
39	A6NP11	Zinc finger protein 716	167.8	5	19.2
40	A4D126	D-ribitol-5-phosphate cytidyltransferase	165.5	3	16.9
41	Q9BUJ2-5	Isoform 5 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	165.5	2	11.0
42	Q5JSZ5	Protein PRRC2B	164.8	18	17.4
43	Q9BTC8	Metastasis-associated protein MTA3	164.7	3	9.3
44	Q8NB42	Zinc finger protein 527	160.0	6	20.9
45	Q8HWQ9	MHC class I antigen	159.3	4	17.5
46	A0A3B3IS53	Histone acetyltransferase	158.1	17	23.6
47	P11142-2	Isoform 2 of Heat shock cognate 71 kDa protein	157.3	10	49.3
48	Q9Y3D8	Adenylate kinase isoenzyme 6	155.8	2	14.5
49	Q8IYD8-3	Isoform 3 of Fanconi anemia group M	155.8	19	21.1

		protein			
50	A8CDT9	MYO5A variant protein	142.9	21	18.1
51	Q9C0F0	Putative Polycomb group protein ASXL3	142.9	18	12.2
52	P40692	DNA mismatch repair protein Mlh1	142.7	6	16.0
53	A0A5C2FYJ7	IGL c2041_light_IGLV2-14_IGLJ1	141.1	2	31.8
54	A6NMZ7	Collagen alpha-6(VI) chain	139.4	25	24.9
55	A0A126GVJ2	Olfactory receptor	139.2	7	41.4
56	Q68EM7-7	Isoform 7 of Rho GTPase-activating protein 17	138.0	1	8.0
57	Q9UL68	Myelin transcription factor 1-like protein	137.4	11	18.4
58	Q5W041-5	Isoform 5 of Armadillo repeat-containing protein 3	136.4	5	22.7
59	P00491	Purine nucleoside phosphorylase	134.5	4	24.9
60	E9PKF6	Protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	133.5	9	22.3
61	A0A1B0GTV9	RP1 axonemal microtubule associated	132.2	11	22.4
62	P45379-11	Isoform 11 of Troponin T_ cardiac muscle	130.5	3	18.6
63	Q5H9R7	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	130.1	10	23.4
64	O95785	Protein Wiz	129.5	13	18.2
65	A0A5H2UUH1	MHC class I antigen	129.0	1	14.5
66	A6NM11	Leucine-rich repeat-containing protein 37A2	128.2	13	20.3
67	A0A7P0TA34	ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor 2	127.7	15	19.8
68	Q6N017	ATP binding cassette subfamily A member 5	127.6	4	28.3
69	O14628-5	Isoform 5 of Zinc finger protein 195	123.9	3	9.7
70	P51610	Host cell factor 1	122.6	11	17.7
71	A0A8Q3SJ05	FA complementation group M	120.8	11	20.8
72	Q32MH5	Atos homolog protein A	116.7	8	13.1
73	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	116.1	12	41.3
74	A0A286SD67	DExD-box helicase 39B	114.9	1	42.9
75	B3KP76	cDNA FLJ31308 fis_ clone LIVER1000139_ highly similar to Kinectin	114.4	3	42.1
76	Q6ZNU3	RNA-directed DNA polymerase	114.3	5	57.5
77	J3QKU8	Testis expressed 14_ intercellular bridge forming factor	112.9	2	26.3
78	G0Z6Y6	MHC class I antigen	112.8	3	23.1
79	P51677	C-C chemokine receptor type 3	111.9	4	30.7
80	P26715	NKG2-A/NKG2-B type II integral membrane protein	110.6	2	15.0
81	Q9P1Z0	Zinc finger and BTB domain-containing protein 4	110.2	9	23.6
82	Q5Q0U2	Fucosyltransferase	109.9	2	23.1
83	A0A9Y1QQ47	Breast cancer type 1 susceptibility protein	109.1	3	12.2
84	A0A2S1B6W6	MHC class I antigen	108.9	1	8.2
85	Q5THK1	Protein PRR14L	108.9	25	21.7
86	Q7Z606	Breast and ovarian cancer susceptibility protein	108.9	8	10.3

87	B2RBJ5	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2_ mitochondrial	108.6	3	11.7
88	A0A6M3SL20	MHC class II antigen	108.5	1	14.2
89	J3KTI7	Cell division cycle 6	107.6	2	28.0
90	A8MT65	Zinc finger protein 891	103.8	6	17.8
91	Q9NQT8	Kinesin-like protein KIF13B	101.8	10	9.0
92	A0A1C3PHT5	MHC class I antigen	100.9	1	8.2
93	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	100.5	34	20.9
94	A0A6I8PIX5	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	99.4	9	36.5
95	A0A5C2GTB1	IG c1904_heavy_IGHV3-13_IGHD3- 3_IGHJ2	98.9	1	15.0
96	Q5T2S8	Outer dynein arm-docking complex subunit 2	97.6	11	22.3
97	P21675	Transcription initiation factor TFIID subunit 1	96.1	12	19.0
98	B4DNS6	cDNA FLJ54278_ highly similar to SPARC-like protein 1	95.8	9	36.2
99	Q9Y5V3	Melanoma-associated antigen D1	94.8	2	11.4
100	Q496M5	Inactive serine/threonine-protein kinase PLK5	94.2	5	25.9
101	Q96HD1	Protein disulfide isomerase CRELD1	94.1	8	36.9
102	A0A0S2Z333	Serpin peptidase inhibitor clade G member 1 isoform 4	94.0	3	47.7
103	A0A5F9ZGS5	Ankyrin 2	92.9	14	14.5
104	A0A1B0GV12	Golgin A8 family member N	92.9	4	16.3
105	B7ZC34	ethanolamine kinase	92.5	2	19.8
106	Q9ULZ2	Signal-transducing adaptor protein 1	92.2	5	22.7
107	A0A288R129	MHC class I antigen	91.5	1	14.4
108	D6RFW1	Small glutamine rich tetratricopeptide repeat co-chaperone beta	91.4	2	19.0
109	D6RGC4	Membrane associated ring-CH-type finger 1	91.4	4	13.9
110	P42338	Phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate 3- kinase catalytic subunit beta isoform	91.4	7	16.6
111	A0A075X6P1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	90.9	3	21.5
112	A0A6H0W9J6	Nociceptin receptor	90.9	2	26.9
113	P53794	Sodium/myo-inositol cotransporter	90.5	6	15.3
114	B3KSE4	cDNA FLJ36076 fis_ clone TESTI2019760_ highly similar to TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR CTCF	90.2	3	36.4
115	Q96LW7-2	Isoform 2 of Caspase recruitment domain- containing protein 19	90.2	2	31.7
116	Q9Y6N8	Cadherin-10	89.4	8	24.0
117	Q9NYI0	PH and SEC7 domain-containing protein 3	87.5	11	22.4
118	P35527	Keratin_ type I cytoskeletal 9	87.1	8	37.9
119	Q9P2G9	Kelch-like protein 8	85.6	10	36.0
120	P51684	C-C chemokine receptor type 6	85.0	6	34.2
121	A0A994J4T6	Centrosomal protein 43	84.8	4	31.7

122	Q9GJN6	MHC class I antigen	84.4	3	28.2
123	Q8IYR6	Tomoregulin-1	83.4	8	42.9
124	O43896	Kinesin-like protein KIF1C	82.4	10	22.1
125	Q14515	SPARC-like protein 1	82.1	9	28.0
126	P48751-2	Isoform CAE3 of Anion exchange protein 3	81.6	8	25.0
127	O43719	17S U2 SnRNP complex component HTATSF1	81.5	15	43.2
128	Q8TC27	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 32	81.5	9	26.8
129	Q9HAV5	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 27	81.3	4	35.7
130	A0A7S5EWR3	IGH c1379_heavy_IGHV3-13_IGHD6-13_IGHJ6	80.4	1	16.7
131	E2GH23	T-cell factor-4 variant E	80.3	4	16.1
132	A4FU69	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 5	79.7	12	20.6
133	A0A024RCN9	EHMT2	79.4	17	30.7
134	O75747	Phosphatidylinositol 3-kinase C2 domain-containing subunit gamma	79.1	19	26.2
135	A0A2U3RU64	MHC class I antigen	78.8	3	13.5
136	B4DH59	NBPF family member NBPF26	78.2	9	9.3
137	Q9H8B7	cDNA FLJ13786 fis_ clone PLACE4000654_ highly similar to Mus musculus ubiquitin conjugating enzyme	78.2	18	22.7
138	Q8N7H5	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog	78.1	14	43.7
139	P27348	14-3-3 protein theta	77.4	4	27.8
140	P20700	Lamin-B1	75.6	7	21.2
141	P21675-13	Isoform 13 of Transcription initiation factor TFIID subunit 1	74.5	16	17.8
142	A0A1D8GZ55	NUP98/NSD1 fusion protein	74.1	10	14.0
143	Q8N7H5-2	Isoform 2 of RNA polymerase II-associated factor 1 homolog	73.1	13	45.4
144	Q13616	Cullin-1	72.6	8	16.1
145	P48751	Anion exchange protein 3	71.1	8	19.1
146	P24386	Rab proteins geranylgeranyltransferase component A 1	69.0	9	29.4
147	Q92620	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	67.9	11	16.2
148	Q96J66	ATP-binding cassette sub-family C member 11	67.6	13	21.4
149	Q9UJV9	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	65.8	5	17.8
150	A0A583ZB57	HLA-A*0204 protein	64.0	3	23.9
151	Q96MX6	Dynein axonemal assembly factor 10	63.4	8	38.1
152	Q8WWZ7	Cholesterol transporter ABCA5	62.6	15	20.5
153	Q00341	Vigilin	61.5	14	22.2
154	Q5RHP9	Glutamate-rich protein 3	60.7	29	34.8
155	Q9H5J4	Very long chain fatty acid elongase 6	58.1	3	21.9

156	Q8N119	Matrix metalloproteinase-21	54.9	7	20.2
157	P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit_ mitochondrial	54.7	11	31.5
158	Q56UN5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19	54.5	19	23.7
159	Q7Z3U7	Protein MON2 homolog	53.7	14	19.3
160	P0DPF3	NBPF family member NBPF9	51.9	10	15.3
161	Q9NV72	Zinc finger protein 701	51.3	4	20.7
162	Q9Y6L7	Tolloid-like protein 2	50.6	11	20.1
163	Q9UPY3	Endoribonuclease Dicer	48.8	14	15.0
164	P16885	1-phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2	47.9	11	16.4
165	A0A2R8Y590	A-kinase anchoring protein 9	47.7	23	18.5
166	Q6ZS03	Vigilin	46.2	11	25.5
167	Q7Z570	Zinc finger protein 804A	45.2	17	22.0
168	Q9NRL2	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	43.7	15	17.9
169	Q5T890	DNA excision repair protein ERCC-6-like 2	42.7	12	14.3
170	P35658-3	Isoform 3 of Nuclear pore complex protein Nup214	42.3	12	12.4
171	B4DMN4	non-specific serine/threonine protein kinase	41.9	5	18.6
172	B4E2H2	Serine/threonine-protein kinase mTOR	39.9	17	21.9
173	P42695	Condensin-2 complex subunit D3	38.8	9	10.4
174	A0A994J4J0	E3 ubiquitin-protein ligase	38.5	20	19.9
175	Q8IVV2	Lipoxygenase homology domain-containing protein 1	38.3	22	19.7
176	Q59G54	Bromodomain adjacent to zinc finger domain_ 1A isoform b variant	38.0	15	20.5
177	O43897	Tolloid-like protein 1	35.0	9	14.4
178	A8K3H9	Transcription factor RelB	34.4	4	15.2
179	Q8WWZ4	ATP-binding cassette sub-family A member 10	34.3	12	16.5
180	A0A2R8Y5N1	Diaphanous related formin 1	34.1	9	13.4
181	P42694	Probable helicase with zinc finger domain	33.8	15	19.3
182	P49619	Diacylglycerol kinase gamma	31.0	7	17.4
183	Q14669-4	Isoform 4 of E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	29.7	18	16.3
184	Q9UG01	Intraflagellar transport protein 172 homolog	28.8	15	16.5

2D-A549 HYPOXIA (200 μ M Cobalt Chloride)					
Identified Proteins at 48 hours					
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
1	Q92823	Neuronal cell adhesion molecule	399.8	17	28.5
2	I3L176	SMG6 nonsense mediated mRNA decay factor	328.1	3	50.0
3	Q02952	A-kinase anchor protein 12	307.3	25	28.8
4	P08195	Amino acid transporter heavy chain SLC3A2	281.8	13	31.9
5	A0A7P0T9G6	Tubulin gamma chain	186.6	7	30.2
6	O15072	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3	30.1	16	27.1
7	Q8WWZ7	Cholesterol transporter ABCA5	508.9	20	25.3
8	O95260	Arginyl-tRNA--protein transferase 1	470.3	6	19.7
9	B7ZAP6	cDNA_ FLJ79260_ highly similar to Actin_ cytoplasmic 2	438.5	5	39.1
10	Q01850	Cerebellar degeneration-related protein 2	393.4	7	29.1
11	Q6PK81	Zinc finger protein 773	344.8	5	27.1
12	Q8NDV7	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein	324.5	18	20.7
13	B7Z9M2	cDNA_ FLJ78886_ highly similar to Natural resistance-associated macrophage protein 2	288.8	3	20.8
14	A0A5C2GNT9	IG c1016_heavy_IGHV4-59B_IGHD6-19_IGHJ6	269.7	1	36.2
15	P50549	ETS translocation variant 1	268.5	3	17.0
16	D7NSR9	MHC class I antigen	258.4	2	29.3
17	P05556	Integrin beta-1	252.1	16	36.7
18	A0A5C2GF16	IG c117_heavy_IGHV3-48_IGHD3-10_IGHJ6	244.5	1	35.4
19	J3KRY7	Transmembrane protein 208	236.8	5	60.2
20	F4NBY5	MHC class I antigen	228.4	2	21.7
21	Q9BTW9	Tubulin-specific chaperone D	222.6	13	21.1
22	Q0ZCI8	Immunoglobulin heavy chain variable region	221.1	2	29.8
23	F2ZC06	Thyroid hormone receptor interacting protein 6 isoform 1	211.8	2	12.1
24	C9JFF9	Discs large MAGUK scaffold protein 2	207.7	2	23.1
25	Q9ULE3	DENN domain-containing protein 2A	206.5	10	22.4
26	A0A7P0TAN7	Solute carrier family 3 member 2	197.0	12	27.1
27	A0A5C2GSD5	IG c1331_heavy_IGHV3-48_IGHD3-22_IGHJ6	194.9	2	24.4
28	A0A5C2G4P2	IGL c2487_light_IGKV2D-29_IGKJ2	191.3	2	29.5
29	A0A384MR03	Fibronectin	190.2	25	25.0
30	Q6PGP7	Superkiller complex protein 3	181.6	13	14.5
31	Q96K75	Zinc finger protein 514	178.7	5	25.0
32	A0A0S2Z4S4	Toll-like receptor	175.8	4	15.8

33	O76062	Delta(14)-sterol reductase TM7SF2	166.6	4	16.5
34	A0A7S5EWY3	IGH c3975_heavy_IGHV5-51_IGHD3-10_IGHJ3	164.2	3	31.5
35	P35968	Vascular endothelial growth factor receptor 2	162.7	9	11.7
36	A0A0N7A4P8	MHC class II antigen	161.8	1	27.0
37	Q6MZM7	Fibronectin (Fragment)	160.1	16	20.6
38	P17301	Integrin alpha-2	159.0	14	27.4
39	A6NDD5	Synapse differentiation-inducing gene protein 1-like	155.9	3	49.2
40	A0A2R8YD40	DNA helicase	155.3	14	17.0
41	Q5THK1	Protein PRR14L	154.3	20	21.1
42	A0A346LZU5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	154.2	3	10.6
43	O75891	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	146.9	8	14.2
44	D6RD50	Rabenosyn_ RAB effector	146.5	1	48.8
45	Q9NQX4	Unconventional myosin-Vc	145.6	14	18.9
46	C9JSF2	Heat shock transcription factor 2 binding protein	144.3	1	15.0
47	A0A5C2GTX3	IG c851_light_IGLV1-47_IGLJ2	143.7	2	36.7
48	O75128	Protein cordon-bleu	141.8	6	12.5
49	A1DV00	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	139.8	6	10.9
50	B2R9B4	cDNA_FLJ94314_ highly similar to Homo sapiens FOS-like antigen 1 (FOSL1)_ mRNA	138.0	2	30.6
51	P35712	Transcription factor SOX-6	134.2	6	18.2
52	Q9H7Z3	Nuclear exosome regulator NRDE2	133.0	9	18.4
53	P20020	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	128.7	13	18.0
54	Q9UI08-3	Isoform 3 of Ena/VASP-like protein	128.6	6	31.8
55	B3KTJ1	cDNA FLJ38349 fis_ clone FEBRA1000057_ highly similar to PCTP-like protein	126.8	4	21.6
56	B2RAQ9	Proteasome subunit beta	123.6	3	18.4
57	B4DUK6	cDNA FLJ51097_ highly similar to HLA class I histocompatibility antigen_ B-7alpha chain	122.7	6	34.0
58	A0A9L9PY17	Guanylate kinase 1	122.3	2	24.9
59	A0A5C2GM97	IG c308_heavy_IGHV3-53_IGHD2-2_IGHJ4	120.9	2	40.2
60	A0A7S5C201	IGH c2636_heavy_IGHV3-48_IGHD1-14_IGHJ6	119.4	2	35.0
61	Q6ZSZ6	Teashirt homolog 1	119.2	15	21.0
62	O95622	Adenylate cyclase type 5	119.2	6	15.9
63	A0A8V8TNW3	Adenylate cyclase type 5	118.7	8	21.9
64	Q3V6T2	Girdin	116.4	14	13.3
65	Q9BY89	Uncharacterized protein KIAA1671	115.0	18	18.5
66	Q8N0V4	Leucine-rich repeat LGI family member 2	114.5	5	29.5
67	B9EES5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	113.1	3	10.9
68	B3KV38	cDNA FLJ16098 fis_ clone TESTI2005767_ highly similar to Homeodomain-interacting protein kinase 1	112.6	6	14.3

69	Q08050	Forkhead box protein M1	112.2	10	21.6
70	B4DQN8	cDNA FLJ50056_ highly similar to Homo sapiens BAT2 domain containing 1 (BAT2D1)_ mRNA	109.9	18	25.9
71	A0A5C2G5S3	IGL c3786_light_IGLV1-44_IGLJ1	109.5	2	29.1
72	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	109.4	35	20.1
73	Q8WY24	SNC66 protein	108.4	3	19.7
74	P53355	Death-associated protein kinase 1	105.4	13	19.8
75	Q8N2F6	Armadillo repeat-containing protein 10	104.7	4	28.9
76	F5H114	Pleckstrin homology domain containing B1	103.0	2	23.3
77	Q12860	Contactin-1	102.7	20	30.1
78	Q9NYW8	RB-associated KRAB zinc finger protein	102.7	7	22.3
79	Q9BW85	Splicing factor YJU2	101.6	6	34.4
80	B8X5N5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	101.4	3	10.6
81	Q7Z6I6	Rho GTPase-activating protein 30	99.1	9	22.6
82	Q5VU43-2	Isoform 2 of Myomegalin	96.3	11	23.9
83	Q9HBG4	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a 4	95.7	4	11.5
84	A0A0B4J279	T cell receptor alpha variable 21	95.1	2	42.0
85	Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	94.8	11	17.1
86	H9A780	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	93.4	3	10.4
87	A0A126GW05	Olfactory receptor	93.3	1	16.7
88	B3KTV6	cDNA FLJ38812 fis_ clone LIVER2006469_ highly similar to PLASMA SERINE PROTEASE INHIBITOR	92.4	4	21.3
89	A0A059RRD7	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	92.0	3	9.5
90	P01042	Kininogen-1	90.2	7	23.4
91	Q86V97	Kelch repeat and BTB domain-containing protein 6	90.0	5	15.3
92	Q9Y2Z4	Tyrosine--tRNA ligase_ mitochondrial	87.7	10	32.1
93	Q8NA69	Stabilizer of axonemal microtubules 5	87.4	5	21.2
94	B4E0R3	cDNA FLJ56761_ highly similar to Homo sapiens Rho GTPase activating protein 15 (ARHGAP15)_ mRNA	87.2	2	13.0
95	O60315	Zinc finger E-box-binding homeobox 2	87.1	16	23.3
96	Q8WYT0	Uncharacterized protein pp9003	86.1	4	22.8
97	Q8TCU5	Glutamate receptor ionotropic_ NMDA 3A	82.0	11	20.0
98	O14917	Protocadherin-17	82.0	12	19.0
99	Q8NER5	Activin receptor type-1C	81.9	6	22.7
100	P06576	ATP synthase F(1) complex subunit beta_ mitochondrial	81.7	6	18.3
101	P04234	T-cell surface glycoprotein CD3 delta chain	81.4	4	36.8
102	K9JA46	Epididymis luminal secretory protein 52	79.8	11	18.4
103	Q9BQG0	Myb-binding protein 1A	79.8	13	19.7
104	A0A0A7C3J8	MHC class II antigen (Fragment)	79.7	1	19.1
105	A0A384NPY7	Epididymis secretory sperm binding protein	79.1	5	38.5
106	A1L390	Pleckstrin homology domain-containing family G member 3	78.4	15	20.0

107	A8YQF3	MHC class I antigen	78.2	5	24.2
108	P59045	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 11	77.3	9	15.8
109	A0A7S5BYT5	IGH c399_heavy_IGHV3-48_IGHD2-21_IGHJ4	77.1	1	31.0
110	Q9UIK5	Tomoregulin-2	76.8	8	44.1
111	B7ZLW2	HELZ protein	76.2	17	18.4
112	Q8N5P1	Zinc finger CCCH domain-containing protein 8	75.9	6	40.9
113	P00533	Epidermal growth factor receptor	71.0	19	28.8
114	Q9H172	ATP-binding cassette sub-family G member 4	70.1	6	21.5
115	Q13219	Pappalysin-1	67.9	13	21.7
116	Q7Z3X4	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F	67.7	10	18.4
117	E9BVF4	MHC class I antigen	66.1	3	17.9
118	Q711Q0	Cardiac-enriched FHL2-interacting protein	64.0	15	23.3
119	A4ZVL4	MHC class I antigen	63.9	2	16.8
120	P49736	DNA replication licensing factor MCM2	63.7	7	17.7
121	Q16625	Occludin	62.2	6	29.7
122	A0JP08	Zinc finger E-box binding homeobox 2	61.6	19	28.4
123	P04275-2	Isoform 2 of von Willebrand factor	61.3	7	49.0
124	Q7Z745	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 2B	58.4	17	26.2
125	Q9ULV0-2	Isoform 2 of Unconventional myosin-Vb	57.1	8	16.0
126	P14625	Endoplasmic	55.3	6	14.7
127	P08235	Mineralocorticoid receptor	55.3	9	17.9
128	O94830	Triacylglycerol hydrolase DDHD2	54.2	9	30.0
129	Q9BXT6	RNA helicase Mov10l1	53.8	10	14.5
130	A0A2X0SFW5	PLEKHG4B	53.3	16	23.8
131	Q86YA3	5'-3' DNA helicase ZGRF1	53.3	26	23.3
132	O95996	Adenomatous polyposis coli protein 2	52.6	13	14.8
133	A0A5F9ZGS5	Ankyrin 2	50.8	13	14.1
134	Q9NRL2	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	50.6	19	24.1
135	Q9H330	Transmembrane protein 245	50.2	8	27.2
136	H0Y931	Ankyrin 2	48.4	10	20.8
137	A0A3B3ITI0	histone acetyltransferase	48.2	19	24.0
138	A0A3B3ISI1	histone acetyltransferase	47.7	20	23.8
139	O96028	Histone-lysine N-methyltransferase NSD2	47.6	12	17.3
140	O60303	Katanin-interacting protein	43.8	12	16.7
141	Q659C4	La-related protein 1B	43.2	6	17.3
142	P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase	43.1	8	12.0
143	P29590	Protein PML	42.9	6	18.0
144	Q8NDI1	EH domain-binding protein 1	41.6	14	24.4
145	Q12756	Kinesin-like protein KIF1A	40.3	11	14.2
146	Q2M243	Coiled-coil domain-containing protein 27	40.2	5	16.3
147	Q9NVU0	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5	40.2	10	26.6

148	Q16849	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N	39.8	9	16.9
149	Q09328	Alpha-1_6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A	38.4	7	13.2
150	C9IYZ1	Asparagine synthetase domain-containing protein 1	37.7	7	24.8
151	Q9ULK2	Ataxin-7-like protein 1	37.5	7	16.6
152	P25440	Bromodomain-containing protein 2	32.5	9	16.6
153	Q13796	Protein Shroom2	32.1	9	14.2
154	Q53F19	Nuclear cap-binding protein subunit 3	30.6	9	21.1
155	A0A096LNL9	Transcriptional regulator ATRX	29.9	21	20.7
156	P35251	Replication factor C subunit 1	21.7	11	13.6
157	Q13618	Cullin-3	17.0	6	10.5
	3D-A549 NORMOXIA				
	<u>Identified Proteins at 24 hours</u>				
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
1	A0A8I5KPJ6	Cold shock domain containing E1	527.8	5	11.9
2	A0A8I5KPQ8	Cold shock domain containing E1	527.8	6	31.4
3	A0A8I5KW29	Cold shock domain containing E1	527.8	5	25.4
4	A0A8I5KYL4	Cold shock domain containing E1	527.8	5	31.8
5	O75534	Cold shock domain-containing protein E1	527.8	7	20.6
6	A0A8I5KPC0	Cold shock domain containing E1	527.8	5	12.8
7	A0A8I5KS07	Cold shock domain containing E1	491.6	5	29.7
8	A0A8I5KTQ3	Cold shock domain containing E1	491.6	6	22.7
9	A0A8I5KV85	Cold shock domain containing E1	491.6	5	14.5
10	A0A8I5KW72	Cold shock domain containing E1	491.6	6	18.9
11	A0A8I5KWW0	Cold shock domain containing E1	491.6	6	32.4
12	A0A8I5KXH5	Cold shock domain containing E1	491.6	4	10.1
13	A0A8I5KXL1	Cold shock domain containing E1	491.6	6	24.7
14	A0A8I5KYL8	Cold shock domain containing E1	491.6	6	24.6
15	A0A8I5QJA6	Cold shock domain containing E1	491.6	4	11.0
16	E9PLD4	Cold shock domain containing E1	491.6	4	77.7
17	O75534-2	Isoform 2 of Cold shock domain-containing protein E1	491.6	6	19.3
18	Q96L66	NRAS-related protein	491.6	6	20.9
19	A4D0T7	Small integral membrane protein 30	672.5	6	91.5
20	A0A8I5KNL1	Cold shock domain containing E1	491.6	4	29.3

	Identified Proteins at 48 hours				
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
21	H0Y7J2	Patched 2	996.1	2	70.5
22	B4DJQ5	Glucosidase 2 subunit beta	689.6	5	18.5
23	A0A1B0GUM8	Zinc finger E-box binding homeobox 2	675.2	1	33.6
24	A0A5C2GAT3	IGH c335_heavy_IGHV1-69_IGHD6-6_IGHJ4	673.8	1	27.5
25	P33992	DNA replication licensing factor MCM5	560.2	16	31.6
26	B7Z5X7	tryptophan--tRNA ligase	521.5	3	17.3
27	A0A6B9W032	Dystrophin (Fragment)	520.2	7	48.2
28	A0A7S5EW46	IGH c3015_heavy_IGHV1-24_IGHD3-9_IGHJ5	506.1	3	54.5
29	H0YHV0	DNA damage regulated autophagy modulator 1	475.9	2	52.8
30	A0A5C2GLW3	IG c452_heavy_IGHV3-33_IGHD6-19_IGHJ4	472.4	1	46.7
31	A0A7S5C3Q2	IGH c3643_heavy_IGHV4-34_IGHD2-2_IGHJ4	469.3	2	38.6
32	A0A5C2G6L4	IGH c297_heavy_IGHV1-69_IGHD3-22_IGHJ3	462.6	2	31.5
33	Q14126	Desmoglein-2	434.5	15	27.5
34	Q9Y6I9	Testis-expressed protein 264	424.2	6	41.2
35	A0A5C2GR32	IG c990_heavy_IGHV3-23_IGHD1-7_IGHJ5	406.8	1	37.2
36	A0A5C2GN57	IG c457_heavy_IGHV3-30_IGHD3-3_IGHJ4	399.2	1	35.0
37	Q7Z4D5	MSTP104	398.2	7	48.6
38	Q96N67	Dedicator of cytokinesis protein 7	395.7	27	23.0
39	Q5JU85	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2	388.5	15	23.7
40	A0A5C2GNI6	IG c90_heavy_IGHV4-31_IGHD3-10_IGHJ4	367.8	2	56.2
41	A0A7S5BZS7	IGH c909_heavy_IGHV1-69_IGHD3-22_IGHJ4	341.7	2	32.3
42	A0A5C2GV49	IG c1351_light_IGLV2-11_IGLJ3	340.1	2	74.3
43	Q7Z7F0	KH homology domain-containing protein 4	330.3	12	41.7
44	A0A7S5C1Y5	IGH c235_heavy_IGHV3-33_IGHD2-2_IGHJ6	320.8	2	32.8
45	O60488	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	316.3	11	25.6
46	A0A8I5KP51	Probable arginine--tRNA ligase_mitochondrial	311.4	8	24.5
47	Q4KMQ2	Anoctamin-6	308.1	5	14.8
48	Q8N693	Homeobox protein ESX1	306.7	4	34.2
49	P18615	Negative elongation factor E	305.7	8	19.5
50	A8K3H7	cDNA FLJ77831_ highly similar to Homo sapiens leucine-zipper protein	305.5	1	12.8
51	Q6UXZ3	CMRF35-like molecule 5	298.7	2	25.8
52	A0A1W2PRJ5	IQ motif and Sec7 domain ArfGEF 2	293.0	6	22.8
53	Q5T0M2	Surfactant protein D	284.2	3	36.2
54	E7ES26	IKAROS family zinc finger 2	283.8	2	57.6

55	A0A7T0LNX5	Immunoglobulin lambda chain variable region	252.3	1	39.3
56	H0Y8F3	Folliculin interacting protein 2	251.5	5	39.8
57	A0A5C2GSF2	IG c1604_heavy_IGHV4-39_IGHD3-10_IGHJ4	250.0	2	55.5
58	A0A5C2FX61	IGL c1559_light_IGLV2-8_IGLJ3	249.0	1	35.1
59	A0A7S5EVU1	IGH c2655_heavy_IGHV5-51_IGHD2-15_IGHJ5	241.7	1	31.5
60	A0A5C2GV75	IG c1361_heavy_IGHV3-7_IGHD3-3_IGHJ4	240.6	4	46.5
61	B9EE38	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3	238.6	2	28.4
62	H0YAV0	Peroxidasin like	229.9	7	25.3
63	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	229.8	42	26.0
64	A0A5C2GGB5	IG c656_heavy_IGHV5-51_IGHD1-1_IGHJ3	229.0	2	63.9
65	Q9UKV3	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	228.6	16	25.0
66	Q86WJ1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like	227.9	14	32.2
67	Q8WVX9	Fatty acyl-CoA reductase 1	194.7	13	45.2
68	P49756	RNA-binding protein 25	183.1	16	22.3
69	Q13627-2	Isoform 1 of Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A	177.4	8	32.1
70	O43719	17S U2 SnRNP complex component HTATSF1	175.9	15	38.5
71	P10809	60 kDa heat shock protein_ mitochondrial	172.8	8	27.6
72	A0A024R178	non-specific serine/threonine protein kinase	166.1	3	18.0
73	Q6BDS2	Bridge-like lipid transfer protein family member 3A	150.9	18	27.5
74	Q9P2G1	Ankyrin repeat and IBR domain-containing protein 1	132.9	13	25.7
75	Q6IN85	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	121.7	14	34.0
76	O75182	Paired amphipathic helix protein Sin3b	115.6	14	28.9
77	Q504U8	Receptor protein-tyrosine kinase	115.4	14	21.5
78	Q9UQ90	Mitochondrial inner membrane m-AAA protease component paraplegin	115.0	6	17.4
79	Q70EL2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 45	114.0	12	24.4
80	O95163	Elongator complex protein 1	110.0	15	25.4
81	Q6P2D8	X-ray radiation resistance-associated protein 1	106.8	7	15.2
82	Q9UHP3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25	105.4	16	25.4
83	Q8TDY4	Arf-GAP with SH3 domain_ ANK repeat and PH domain-containing protein 3	102.9	13	33.4
84	P49815	Tuberin	98.9	20	22.2
85	Q5M775	Cytospin-B	97.6	10	19.3
86	A0A1W6AYU6	Glucose-6-phosphate isomerase	92.1	5	16.6
87	Q86TI1	Uncharacterized protein NUP98/HOXC13	88.8	4	25.8
88	O00533	Neural cell adhesion molecule L1-like protein	85.5	8	15.9
89	M0R0L2	Coenzyme Q8B	81.6	4	20.8

90	A0A384P5C6	Delta-like protein	80.1	8	22.3
91	Q9P219	Protein Daple	78.9	20	20.9
92	P55808	Glycoprotein Xg	993.9	4	55.0
93	A0A8I5KRB5	Zinc finger and BTB domain containing 11	69.0	9	23.4
94	Q460N5	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP14	59.3	21	18.9
Identified Proteins at 72 hours					
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
95	A4D0T7	Small integral membrane protein 30	1054.4	2	91.5
96	A0A6Q8PFR8	N-myc downstream regulated 1	956.0	1	92.5
97	A0A5K1TTT8	MHC class II antigen	718.7	2	36.6
98	P0DMS9	Transmembrane domain-containing protein TMIGD3	642.7	4	23.7
99	A0A5C2GFW3	IG c71_heavy_IGHV4-39_IGHD2-8_IGHJ3	561.0	1	33.3
100	A0A5H2UTL7	MHC class II antigen	559.3	2	35.5
101	P48357	Leptin receptor	526.6	11	23.0
102	A0A286SD59	DExD-box helicase 39B	372.3	2	47.1
103	A0A0B4J1Y9	Immunoglobulin heavy variable 3-72	371.8	1	31.1
104	B2RAZ5	Beta-1_4-galactosyltransferase	156.6	4	23.3
105	A2RRH5	WD repeat-containing protein 27	116.5	6	12.5
106	Q5SYE7	NHS-like protein 1	112.5	14	23.0
107	A0A6I8PL85	C8orf44-SGK3 readthrough	1241.1	2	75.0
108	O00327	Basic helix-loop-helix ARNT-like protein 1	681.6	8	20.8
109	Q9NV58	E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A	521.4	13	34.5
110	O94986	Centrosomal protein of 152 kDa	507.6	28	24.4
111	A0A678ZG11	MHC class II antigen	456.4	1	59.6
112	A0A5C2GVI4	IG c557_heavy_IGHV3-74_IGHD2-21_IGHJ6	449.3	3	60.3
113	Q86YW5	Trem-like transcript 1 protein	403.9	4	14.8
114	A0A7S5EXX7	IGH c2954_heavy_IGHV3-9_IGHD3-10_IGHJ3	403.3	2	45.2
115	L8ECC9	Alternative protein ENPP2	402.3	3	54.4
116	Q14993	Collagen alpha-1(XIX) chain	386.8	15	37.2
117	A0A5C2GSW6	IG c1580_heavy_IGHV1-69_IGHD6-6_IGHJ4	356.6	1	33.9
118	L0BVM1	MHC class I antigen	353.0	1	13.3
119	O00139	Kinesin-like protein KIF2A	327.4	13	32.6
120	Q96LW1	Zinc finger protein 354B	304.7	5	13.4
121	P51531	Probable global transcription activator SNF2L2	301.0	16	21.8
122	A0A5C2GJN2	IG c1083_heavy_IGHV3-48_IGHD4-17_IGHJ4	294.0	3	60.2
123	D6CJH3	MHC class II antigen	288.8	3	36.5

124	A0A5C2G927	IGH + IGL c264_heavy_IGHV1-69_IGHD2-2_IGHJ6	287.6	2	46.5
125	P57052	Splicing regulator RBM11	280.4	5	55.5
126	A0A7S5C4W8	IGH c3777_heavy_IGHV3-11_IGHD3-9_IGHJ4	280.1	1	35.6
127	A0A7S5C3Y5	IGH c3758_heavy_IGHV3-20_IGHD3-10_IGHJ6	276.3	1	31.0
128	P13762	HLA class II histocompatibility antigen_DR beta 4 chain	273.1	4	31.2
129	A0A5C2GDN1	IGH + IGL c107_heavy_IGHV3-74_IGHD7-27_IGHJ4	262.5	4	47.4
130	A0A7S5C1T2	IGH c1519_heavy_IGHV5-51_IGHD3-22_IGHJ4	260.1	2	46.4
131	A0A7S5C440	IGH c3848_heavy_IGHV1-69_IGHD5-18_IGHJ6	255.0	2	52.3
132	A2J1N0	Rheumatoid factor RF-IP14	247.4	2	35.4
133	A0A7S5BY62	IGH c386_heavy_IGHV1-69_IGHD2-2_IGHJ6	244.0	2	30.2
134	E7EP87	Nuclear prelamin A recognition factor	218.2	6	19.7
135	P07196	Neurofilament light polypeptide	188.6	12	19.2
136	Q92622	Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein	173.0	10	22.9
137	P00747	Plasminogen	156.8	10	26.5
138	Q4V328	GRIP1-associated protein 1	134.3	10	20.8
139	Q8NB42	Zinc finger protein 527	134.0	6	14.9
140	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	128.6	25	14.7
141	O75077	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 23	92.9	18	44.4
142	Q8NG48	Protein Lines homolog 1	87.1	10	30.8
143	A0A2R8Y4Y7	SPG7 matrix AAA peptidase subunit_paraplegin	78.2	10	30.6
144	P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	632.5	3	100.0
145	P30414	NK-tumor recognition protein	66.8	15	27.3
	3D-A549 HYPOXIA				
	Identified Proteins at 24 hours				
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
1	A0A6C0SGW3	MHC class II antigen	890.2	1	28.0
2	Q6EMB2	Tubulin polyglutamylase TTLL5	600.3	12	23.2
3	A0A5C2GFA7	IG c1008_heavy_IGHV1-46_IGHD3-3_IGHJ5	586.5	1	32.0
4	Q15858	Sodium channel protein type 9 subunit alpha	522.0	21	22.2
5	A0A4P2SRZ1	MHC class I antigen	482.7	2	21.1
6	O43719	17S U2 SnRNP complex component HTATSF1	477.7	13	40.3

7	A0A8I5KT93	SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1	459.7	17	35.2
8	A0A7D9BUX4	MHC class I antigen	458.8	4	27.3
9	A0A7S5BY75	IGH c568_heavy_IGHV1-69_IGHD5-12_IGHJ2	457.2	2	48.8
10	A0A0A7C4R8	MHC class II antigen	437.4	1	67.4
11	A0A678ZG31	MHC class II antigen	420.1	1	26.8
12	Q9UKV3	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	419.4	13	16.6
13	A0A7S5EUD9	IGH c765_heavy_IGHV3-48_IGHD4-17_IGHJ3	412.2	2	73.8
14	A0A2X0SFH4	PLEKHG3	401.9	20	33.8
15	Q8NBN3	Transmembrane protein 87A	397.6	10	32.8
16	A0A068LKS6	Ig heavy chain variable region	394.3	1	34.2
17	P51795	H(+)/Cl(-) exchange transporter 5	362.1	7	23.2
18	Q9P2N2	Rho GTPase-activating protein 28	359.7	8	19.3
19	A0A669KB77	Microtubule-associated protein	356.6	20	20.7
20	A0A1W7IP31	MHC class I antigen	356.5	1	24.0
21	A0A0U1RR71	Pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G3	339.3	17	26.4
22	Q7Z3C6	Autophagy-related protein 9A	332.0	5	17.6
23	A0A7S5BZT5	IGH c1543_heavy_IGHV3-48_IGHD5-18_IGHJ6	331.2	3	56.7
24	P04629	High affinity nerve growth factor receptor	330.8	3	12.9
25	A0A7S5EYD3	IGH c2898_heavy_IGHV1-8_IGHD2-15_IGHJ5	325.5	3	57.5
26	Q8N859	Zinc finger protein 713	303.9	8	29.8
27	P35225	Interleukin-13	284.3	2	30.1
28	P53618	Coatomer subunit beta	280.5	12	21.8
29	A0A5C2GEL3	IG c1279_heavy_IGHV1-46_IGHD1-7_IGHJ3	270.4	2	52.1
30	A0A8V8TR54	DNA helicase	269.7	26	24.0
31	P17097	Zinc finger protein 7	263.8	8	22.3
32	A0A1B1II15	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	261.2	3	18.2
33	A0A7S5C3H6	IGH c2419_heavy_IGHV3-48_IGHD3-22_IGHJ3	256.9	2	40.2
34	A0A0B7NXW5	MHC class I antigen	250.1	2	11.2
35	A0A5C2GCS0	IG c82_heavy_IGHV1-18_IGHD7-27_IGHJ6	249.4	2	36.1
36	Q7Z7K2	Zinc finger protein 467	246.8	7	26.7
37	Q8TBY0	Probable RNA-binding protein 46	244.5	8	39.0
38	Q9H3P2	Negative elongation factor A	239.8	6	21.0
39	Q68CR1-3	Isoform 3 of Protein sel-1 homolog 3	235.4	9	20.4
40	Q76L83	Putative Polycomb group protein ASXL2	229.4	11	17.4
41	P00533	Epidermal growth factor receptor	226.8	12	21.8
42	Q68DA7	Formin-1	225.6	13	16.2
43	Q8NGC5	Olfactory receptor 6J1	221.9	4	27.4
44	Q12979	Active breakpoint cluster region-related protein	221.8	12	28.2
45	P00519	Tyrosine-protein kinase ABL1	221.2	12	25.0

46	B3KQF9	cDNA FLJ90388 fis_ clone NT2RP2005425_ highly similar to A- kinase anchor protein 9	221.0	14	20.1
47	Q96JG8	Melanoma-associated antigen D4	220.3	9	24.4
48	Q9BZ71	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 3	213.0	11	27.0
49	P05155	Plasma protease C1 inhibitor	212.5	5	29.4
50	A0A2R8YFK5	SWI/SNF related_ matrix associated_ actin dependent regulator of chromatin_ subfamily a_ member 4	209.8	6	39.6
51	Q8TAG9	Exocyst complex component 6	209.6	11	28.2
52	P55268	Laminin subunit beta-2	205.6	16	21.7
53	A0A4P2SRK1	MHC class I antigen	203.2	1	19.9
54	A0AAG2UXD8	Olduvai domain-containing protein	200.8	8	8.0
55	H0YMR6	SAFB like transcription modulator	199.0	3	41.2
56	Q27J81	Inverted formin-2	196.7	12	23.5
57	A0A5C2GM04	IG c1240_heavy_IGHV1-2_IGHD6- 13_IGHJ6	196.3	1	21.0
58	Q9NXX9	FLJ00006 protein	195.1	2	14.5
59	Q13634	Cadherin-18	192.4	10	37.2
60	Q15059	Bromodomain-containing protein 3	187.3	8	14.6
61	Q9UHN6-2	Isoform 2 of Cell surface hyaluronidase CEMP2	183.5	15	18.6
62	P35658	Nuclear pore complex protein Nup214	183.0	11	9.9
63	B4DXQ5	cDNA FLJ55937_ highly similar to Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4	181.9	9	31.2
64	A0A5C2GMP0	IG c616_heavy_IGHV1-2_IGHD3- 10_IGHJ4	181.8	3	40.7
65	Q9H1A4	Anaphase-promoting complex subunit 1	180.6	19	21.8
66	A0A7S5C0M4	IGH c1916_heavy_IGHV1-46_IGHD2- 15_IGHJ4	180.0	3	22.8
67	Q9ULD4	Bromodomain and PHD finger-containing protein 3	177.2	14	27.1
68	A0A5C2G8M1	IGH c274_heavy_IGHV1-69_IGHD1- 20_IGHJ5	172.6	1	18.3
69	A0A7S5EWB1	IGH c899_heavy_IGHV3-23_IGHD6- 19_IGHJ6	172.6	1	17.9
70	A0A087WU14	Secretory carrier-associated membrane protein	171.8	1	22.8
71	D6RER2	Cadherin 18	170.3	8	37.4
72	Q9NWH9	SAFB-like transcription modulator	169.6	15	20.8
73	A0A096LNL7	Transcriptional regulator ATRX	168.3	2	26.9
74	A0A5C2GP59	IG c474_heavy_IGHV1-8_IGHD5- 24_IGHJ3	168.1	2	48.3
75	Q9Y3M8	StAR-related lipid transfer protein 13	167.4	7	15.8
76	A0A0A0MSY9	[histone H3]-lysine(27) N- trimethyltransferase	167.0	17	37.9
77	A0A5C2GI30	IG c576_heavy_IGHV1-2_IGHD3- 3_IGHJ4	166.9	3	69.6
78	Q9HC24	Protein lifeguard 4	164.5	3	44.1
79	Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	164.4	13	15.6

80	P49641	Alpha-mannosidase 2x	163.6	13	23.4
81	Q9C0I4	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B	163.4	20	27.6
82	A0A7S5BYG4	IGH c596_heavy_IGHV4-39_IGHD3-9_IGHJ6	159.4	1	29.8
83	Q8TBL5	LARP4 protein	154.2	4	33.5
84	Q5VYS8	Terminal uridylyltransferase 7	153.0	19	18.7
85	P10632	Cytochrome P450 2C8	151.7	10	32.0
86	Q6ZMW2	Zinc finger protein 782	151.6	8	22.7
87	A5YM63	Neurofilament medium polypeptide	151.1	6	9.8
88	A0A067ZVI9	Nuclear pore complex-interacting protein B type	144.6	4	19.5
89	Q92753	Nuclear receptor ROR-beta	143.7	5	25.5
90	Q5TD94	Radial spoke head protein 4 homolog A	143.5	10	33.2
91	Q4LE39	AT-rich interactive domain-containing protein 4B	143.4	19	18.8
92	Q9H0E9	Bromodomain-containing protein 8	142.9	17	27.9
93	A0A5C2GM32	IG c1048_heavy_IGHV1-46_IGHD3-22_IGHJ4	140.8	1	24.4
94	Q92824	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	140.2	35	38.8
95	Q9H582	Zinc finger protein 644	138.9	10	14.8
96	Q17RY0	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4	138.5	6	24.7
97	B0I1R7	DNAH5 variant protein (Fragment)	138.4	22	18.4
98	Q86VH2	Kinesin-like protein KIF27	138.2	13	19.3
99	Q2NL82	Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog	137.6	10	25.0
100	A0A109PS45	MS-D1 heavy chain variable region	136.0	2	27.9
101	F5GZF6	Serine/threonine/tyrosine kinase 1	135.0	3	86.2
102	A0A5C2GNX1	IG c1056_heavy_IGHV1-18_IGHD5-18_IGHJ4	133.7	3	80.3
103	A0A7S5EXL3	IGH c1818_heavy_IGHV3-48_IGHD6-19_IGHJ4	132.5	2	17.1
104	A0A068BFW2	Truncated breast and ovarian cancer susceptibility protein 1	129.5	2	63.9
105	B7ZA35	cDNA_ FLJ79049_ highly similar to Homo sapiens mannosidase_ alpha_ class 2A_ member 2 (MAN2A2)_ mRNA	128.6	7	39.1
106	A0A096WFT6	Cytochrome c oxidase subunit 1	128.0	1	9.7
107	O60508	Pre-mRNA-processing factor 17	127.9	9	32.1
108	Q5JUK3	Potassium channel subfamily T member 1	127.3	9	15.7
109	A0A1L5YTP0	ATP synthase subunit a	126.8	2	28.8
110	Q86Y25	Zinc finger protein 354C	125.7	8	28.0
111	Q14320	Protein FAM50A	125.7	5	26.8
112	Q8WV15	Transmembrane protein 255B	125.5	1	18.4
113	K4RH57	MHC class I antigen	124.0	1	27.7
114	P49754	Vacuolar protein sorting-associated protein 41 homolog	122.8	6	11.6
115	A0A5C2G821	IGH c548_heavy_IGHV1-69_IGHD6-25_IGHJ4	122.2	1	21.1

116	P49747	Cartilage oligomeric matrix protein	120.9	8	20.9
117	H0YEV6	LDL receptor related protein 8	120.8	4	48.4
118	Q96DX7	Tripartite motif-containing protein 44	120.8	6	28.2
119	Q92576	PHD finger protein 3	119.8	16	13.6
120	B4DDK2	cDNA FLJ57044_ highly similar to Homo sapiens fetal Alzheimer antigen (FALZ)_ transcript variant 1_ mRNA	119.7	7	20.9
121	B4DIQ8	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	116.1	14	31.7
122	A0A125U0U7	MS-C1 heavy chain variable region (Fragment)	115.2	2	27.1
123	Q9HCC9	Lateral signaling target protein 2 homolog	115.0	10	21.9
124	Q7L945	Zinc finger protein 627	113.8	5	17.4
125	P37275	Zinc finger E-box-binding homeobox 1	113.6	14	31.8
126	Q7Z6W7	DnaJ homolog subfamily B member 7	113.2	4	27.2
127	Q9H1E5	Thioredoxin-related transmembrane protein 4	112.7	6	33.2
128	A0A8V8TQK9	Cytoplasmic linker associated protein 1	111.9	21	29.1
129	A0A0A0MQR0	Cytochrome P450 family 4 subfamily F member 2	111.6	1	12.3
130	B7WPD9	Kinesin family member 26B	111.3	20	25.9
131	A0A7S5EVA0	IGH c737_heavy_IGHV1-69_IGHD3-10_IGHJ6	111.0	3	58.1
132	P12036	Neurofilament heavy polypeptide	109.5	15	28.2
133	A0A8I5KSV3	Golgin A3	109.2	4	9.7
134	A0A7S5C5N3	IGH c2395_heavy_IGHV1-69_IGHD4-17_IGHJ6	108.6	3	55.0
135	Q9BYT3	Serine/threonine-protein kinase 33	108.6	6	14.0
136	Q495N2	Proton-coupled amino acid transporter 3	108.2	2	16.4
137	P15170-2	Isoform 2 of Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A	106.1	6	27.7
138	Q6XPS3	Phosphatidylinositol 3_4_5-trisphosphate 3-phosphatase TPTE2	105.5	9	30.3
139	A0A5A4LHX5	MHC class I antigen	105.2	3	22.7
140	A0A8V8TLX5	Trio Rho guanine nucleotide exchange factor	104.6	16	21.2
141	P78412	Iroquois-class homeodomain protein IRX-6	102.8	5	25.8
142	Q7Z3U7	Protein MON2 homolog	101.4	16	23.9
143	P37275-5	Isoform 5 of Zinc finger E-box-binding homeobox 1	99.1	13	23.0
144	Q2KJY2	Kinesin-like protein KIF26B	98.7	18	19.0
145	O94967	WD repeat-containing protein 47	98.3	11	23.2
146	B4DN75	cDNA FLJ60724_ highly similar to Cartilage oligomeric matrix protein	98.1	5	14.3
147	A0A0S2Z3W6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	97.5	11	18.3
148	Q4VBN4	CCRL1 protein	97.3	2	11.5
149	Q9NY15-2	Isoform 2 of Stabilin-1	96.7	8	25.9
150	Q6PHW0-7	Isoform 7 of Iodotyrosine deiodinase 1	96.5	1	14.1
151	Q14126	Desmoglein-2	96.3	13	22.8

152	Q8N7X0	Androglobin	95.9	15	14.8
153	A0A0X9T7T4	MS-D3 heavy chain variable region	94.7	2	29.1
154	Q14694	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	94.5	9	25.7
155	Q7Z656	Uncharacterized protein DKFZp779C185	94.3	5	35.3
156	Q8N6K0	Testis-expressed protein 29	94.1	4	31.1
157	A0A1B0GUE5	Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha	93.7	15	19.6
158	P27797	Calreticulin	93.7	6	26.1
159	P41161	ETS translocation variant 5	92.4	4	18.6
160	A0A2R8Y590	A-kinase anchoring protein 9	92.4	17	15.0
161	P07996	Thrombospondin-1	92.3	16	33.8
162	A0A2U8J8C7	Ig heavy chain variable region	92.0	2	27.4
163	H0YND9	Zinc finger E-box binding homeobox 1	91.3	4	24.3
164	A0A7S5EWT6	IGH c1469_heavy_IGHV1-2_IGHD3-10_IGHJ5	91.2	1	31.7
165	Q3KR37-4	Isoform 4 of Protein Aster-B	91.0	6	13.7
166	Q9H9A5	CCR4-NOT transcription complex subunit 10	90.8	18	38.0
167	P08240	Signal recognition particle receptor subunit alpha	90.5	8	34.8
168	Q8N6G6	ADAMTS-like protein 1	88.8	9	11.9
169	Q9H9A5-6	Isoform 6 of CCR4-NOT transcription complex subunit 10	86.6	13	28.5
170	O60229-2	Isoform 2 of Kalirin	85.0	16	19.4
171	Q99708	DNA endonuclease RBBP8	84.8	11	24.3
172	A0A5F9ZGS5	Ankyrin 2	84.7	22	25.2
173	Q6DN14	Multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1	82.9	15	27.6
174	Q9UPQ9	Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein	81.6	23	26.1
175	O00291	Huntingtin-interacting protein 1	81.5	13	26.5
176	P49746	Thrombospondin-3	81.3	11	31.3
177	Q9UPZ9	Serine/threonine-protein kinase ICK	79.5	6	24.2
178	O75146	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	79.2	7	13.6
179	Q9UQB3	Catenin delta-2	78.9	11	22.5
180	A0A804HIN3	Kalirin RhoGEF kinase	78.0	12	20.4
181	A5JJ20	Anion exchange protein	77.7	8	23.9
182	Q8NCM8-3	Isoform 3 of Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1	77.6	8	21.5
183	O94880	PHD finger protein 14	75.6	12	23.7
184	Q9HCD6	Protein TANC2	74.4	12	11.8
185	Q9UNS1	Protein timeless homolog	73.9	11	18.1
186	Q8TDI0	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5	73.6	24	20.7
187	Q96QB1	Rho GTPase-activating protein 7	73.6	15	20.7
188	Q9UPP1	Histone lysine demethylase PHF8	72.5	8	16.8
189	P48634	Protein PRRC2A	72.5	22	20.8
190	A0A3B3IS53	Histone acetyltransferase	71.0	23	29.5

191	P43146	Netrin receptor DCC	70.5	14	20.5
192	Q96JN0-3	Isoform 3 of Ligand-dependent corepressor	70.2	15	20.9
193	Q7Z406	Myosin-14	69.6	20	18.1
194	B2R5W3	Poly [ADP-ribose] polymerase	68.8	13	21.4
195	P49588	Alanine--tRNA ligase_ cytoplasmic	67.7	9	19.9
196	Q9P2K8	eIF-2-alpha kinase GCN2	64.0	19	26.6
197	P35498	Sodium channel protein type 1 subunit alpha	62.6	18	23.3
198	Q3KNS1	Patched domain-containing protein 3	62.4	9	22.1
199	P06213	Insulin receptor	62.3	17	24.0
200	Q6N021	Methylcytosine dioxygenase TET2	62.3	22	20.2
201	Q9HD20	Endoplasmic reticulum transmembrane helix translocase	62.2	10	21.1
202	Q92932	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2	61.9	8	18.8
203	P11712	Cytochrome P450 2C9	58.9	8	22.9
204	Q96P48	Arf-GAP with Rho-GAP domain_ ANK repeat and PH domain-containing protein 1	58.8	11	14.8
205	P15169	Carboxypeptidase N catalytic chain	58.3	5	14.2
206	A0A8V8TM52	Myosin VB	57.5	27	24.8
207	O15031	Plexin-B2	57.1	18	21.5
208	O94986	Centrosomal protein of 152 kDa	55.5	13	15.6
209	P35499	Sodium channel protein type 4 subunit alpha	54.5	16	18.0
210	P45844	ATP-binding cassette sub-family G member 1	53.7	7	23.0
211	Q13459	Unconventional myosin-Ixb	53.4	25	19.1
212	B3KU84	cDNA FLJ39327 fis_ clone OCBBF2015506_ highly similar to Mus musculus FAT tumor suppressor homolog 4 (Drosophila) (Fat4)_ mRNA	53.2	9	21.4
213	Q6P2D8	X-ray radiation resistance-associated protein 1	51.7	9	17.4
214	M0QZQ3	Spectrin beta chain OS	51.7	18	20.0
215	P14735	Insulin-degrading enzyme	50.8	12	21.6
216	Q14669	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	50.4	13	18.5
217	Q14839	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	49.5	15	16.7
218	Q8IWB9	Testis-expressed protein 2	48.3	10	14.3
219	Q86XX4-5	Isoform 5 of Extracellular matrix organizing protein FRAS1	46.6	20	23.0
220	B3KY63	DNA helicase	46.1	17	17.2
221	Q86SQ0	Pleckstrin homology-like domain family B member 2	45.2	11	16.8
222	Q9NQX4	Unconventional myosin-Vc	44.2	22	24.7
223	G8JL96	protein-tyrosine-phosphatase	41.9	14	17.3
224	Q16363	Laminin subunit alpha-4	41.4	15	17.1
225	A0A2R8Y521	DNA helicase	40.3	16	17.0
226	O15440	ATP-binding cassette sub-family C member 5	38.8	9	16.1
227	Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich	457.1	40	34.3

		protein 1			
228	P20962	Parathymosin	406.2	6	79.4
229	Q96IK1	Biorientation of chromosomes in cell division protein 1	403.4	5	32.4
230	P16389	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 2	385.2	15	65.1
231	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	380.9	80	22.5
232	Q96KF7	Small integral membrane protein 8	357.3	6	68.0
233	Q13363	C-terminal-binding protein 1	323.2	13	38.6
234	P21860	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3	33.2	12	18.4
Identified Proteins at 48 hours					
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
235	P0DP06	Immunoglobulin heavy variable 4-30-4	913.7	1	37.3
236	P05023-3	Isoform 3 of Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	763.5	16	30.8
237	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	746.2	31	16.4
238	A0A7S5C3J8	IGH c2919_heavy_IGHV4-34_IGHD3-22_IGHJ4	732.2	3	72.4
239	P52701	DNA mismatch repair protein Msh6	696.2	18	26.1
240	A0A1B0GW16	NOP protein chaperone 1	654.4	1	46.8
241	A0A5C2G887	IGL c3835_light_IGLV3-25_IGLJ2	646.1	1	40.7
242	A0A068LKQ4	Ig heavy chain variable region	615.6	2	51.2
243	A0A1C4HDY7	MHC class II antigen	612.5	2	55.7
244	B3KW60	cDNA FLJ42236 fis_clone TKIDN2000701_highly similar to Ankyrin-3	603.6	4	31.1
245	A2JNH3	MLL/GAS7 fusion protein	586.4	3	27.8
246	A0A5C2GPU1	IG c485_heavy_IGHV4-59_IGHD1-26_IGHJ6	577.9	2	65.3
247	Q14571-2	Isoform Short of Inositol 1_4_5-trisphosphate-gated calcium channel ITPR2	552.5	1	26.0
248	A0A7S5C227	IGH c2666_heavy_IGHV4-39_IGHD3-9_IGHJ1	536.7	2	50.8
249	A0A5C2GHL2	IGH + IGL c225_heavy_IGHV3-7_IGHD4-23_IGHJ3	534.5	3	72.7
250	O00329	Phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	490.2	8	15.4
251	B4DF51	CD33 molecule	468.7	2	24.1
252	A0A7S5BY82	IGH c411_heavy_IGHV4-59B_IGHD2-15_IGHJ6	457.8	1	36.6
253	A0A1B0GWB9	SAM and SH3 domain containing 1	446.3	3	15.0
254	A0A5C2GFS3	IG c612_heavy_IGHV4-39_IGHD6-13_IGHJ4	443.8	3	69.8

255	Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	401.3	18	35.5
256	Q6P589	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8-like protein 2	400.8	2	24.5
257	L7XMG0	Cytochrome c oxidase subunit 2	384.1	2	41.4
258	P32418	Sodium/calcium exchanger 1	378.0	9	20.9
259	A6NCQ8	Fc epsilon receptor Ig	351.0	2	47.3
260	Q96D71	RalBP1-associated Eps domain-containing protein 1	317.7	7	16.8
261	Q9BYX4	Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1	304.7	13	21.1
262	Q7Z4S9	SH2 domain-containing protein 6	302.3	6	32.5
263	P20718	Granzyme H	299.9	3	32.1
264	C9JTS9	Kelch like family member 13	291.8	2	53.2
265	D3DUC1	Zinc finger protein 263	287.6	6	16.3
266	Q76B58	BMP/retinoic acid-inducible neural-specific protein 3	283.9	14	35.2
267	A0A5C2GPY1	IG c1392_heavy_IGHV3-53_IGHD2-8_IGHJ4	279.2	2	39.5
268	P03897	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3	275.8	2	74.8
269	A0A126GV84	Olfactory receptor	261.8	3	31.7
270	A0A5C2G6B2	IGH c540_heavy_IGHV3-74_IGHD5-12_IGHJ4	259.6	1	15.8
271	Q9NR11	Zinc finger protein 302	258.9	10	22.4
272	A0A7S5C324	IGH c2922_heavy_IGHV3-21_IGHD3-16_IGHJ6	251.4	1	35.6
273	Q9NX76	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 6	249.5	3	30.1
274	L8E7C7	Alternative protein ITGA9	244.4	2	53.2
275	A6NCQ5	L-methionine (R)-S-oxide reductase	244.0	1	31.4
276	O00374	p40	238.1	5	35.2
277	C9J4H2	Transmembrane protein 127	235.7	1	21.4
278	P15884	Transcription factor 4	235.0	4	14.2
279	A8K181	cDNA FLJ76222	228.8	14	30.6
280	Q08378	Golgin subfamily A member 3	228.2	25	35.4
281	O14829	Serine/threonine-protein phosphatase with EF-hands 1	227.8	12	33.7
282	A0A7T5BNP1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3	224.4	2	56.5
283	Q5EKM8	C-C chemokine receptor type 5	193.8	5	39.8
284	P47897	Glutamine--tRNA ligase	191.7	11	26.3
285	Q5VTB9	E3 ubiquitin-protein ligase RNF220	185.0	10	32.0
286	Q9BTZ2	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	172.2	6	45.0
287	B4DZD1	cDNA FLJ52452_ highly similar to Latent-transforming growth factor beta-binding protein_ isoform 1S	168.1	10	46.0
288	Q9NZC7	WW domain-containing oxidoreductase	149.1	6	44.7
289	Q9Y6U7	RING finger protein 215	147.1	7	31.3
290	P61201	COP9 signalosome complex subunit 2	144.6	12	41.1

291	A0A3B3ITY8	TATA-box binding protein associated factor 11	141.2	4	39.0
292	Q15572	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit C	140.8	9	27.4
293	A0A3B3ITQ1	Inositol 1_4_5-trisphosphate receptor	140.4	20	28.8
294	O15534	Period circadian protein homolog 1	128.9	12	20.5
295	Q14151	Scaffold attachment factor B2	119.5	9	21.1
296	Q0IJ51	P2X purinoceptor	119.4	4	18.6
297	Q8TBY9	Cilia- and flagella-associated protein 251	117.3	9	15.7
298	A0A3B3IU13	Inositol 1_4_5-trisphosphate receptor type 1	116.7	17	22.8
299	Q9NZ08	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	116.5	8	17.2
300	O00482	Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2	109.8	10	32.3
301	Q9H583	HEAT repeat-containing protein 1	91.1	26	24.8
302	Q92574	Hamartin	89.6	18	34.4
303	Q9H4G0	Band 4.1-like protein 1	84.9	10	22.8
304	Q99650	Oncostatin-M-specific receptor subunit beta	78.7	10	13.9
305	P03951	Coagulation factor XI	75.5	8	18.4
306	A0A7P0T9Y3	Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1	64.3	21	23.9
307	P35609	Alpha-actinin-2	64.3	16	33.7
308	Q86UL8	Membrane-associated guanylate kinase_WW and PDZ domain-containing protein 2	57.1	6	12.6
309	Q9UKE5	TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	54.1	15	23.8
310	P78414	Iroquois-class homeodomain protein IRX-1	684.9	13	52.7
311	Q9UJW9	SERTA domain-containing protein 3	559.2	4	56.6
312	Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	364.3	27	29.9
313	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	359.8	74	21.9
314	P25208	Nuclear transcription factor Y subunit beta	463.7	16	71.5
315	Q6NVH7	ATPase SWSAP1	393.0	3	48.9
316	H0YBY1	Thyroglobulin	50.9	12	20.9
Identified Proteins at 72 hours					
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
317	N0BUK3	Cytochrome c oxidase subunit 3	1145.2	2	23.4
318	D6RG24	EGF like_ fibronectin type III and laminin G domains	912.5	2	89.4
319	A0A7S5EYL1	IGH c4064_heavy_IGHV1-46_IGHD1-26_IGHJ4	735.6	2	46.2
320	Q5MJ09	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome N3	640.6	7	56.0
321	P30273	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	422.6	2	54.7
322	Q8NHC5	Olfactory receptor 14A16	406.8	8	57.0

323	Q6ZU64	Cilia- and flagella-associated protein 65	726.1	23	23.3
	3D-A549 NORMOXIA (0 μM Cobalt Chloride)				
	Identified Proteins at 48 hours				
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
1	P60709	Actin_ cytoplasmic 1	304.2	9	44.8
2	Q9NPR9	Protein GPR108	241.2	4	22.7
3	A0A804F6T5	Pyruvate kinase	161.4	10	36.2
4	K7EJK5	Proline dehydrogenase	153.9	3	36.1
5	Q8N1G1	RNA exonuclease 1 homolog	79.4	16	27.6
6	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	74.2	31	21.3
7	Q13490	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2	59.0	6	17.2
8	H0Y9E9	Ankyrin 3	50.0	20	21.8
9	Q13136	Liprin-alpha-1	34.1	20	28.5
10	A0A7S5BZR4	IGH c894_heavy_IGHV4-39_IGHD5-12_IGHJ5	870.3	2	41.6
11	A0A7S5EV85	IGH c1965_heavy_IGHV4-34_IGHD3-10_IGHJ4	645.9	2	41.6
12	H0Y7J2	Patched 2	517.9	2	70.5
13	Q9UNB4	p58 killer cell inhibitory receptor KIR-K7c	509.0	2	28.9
14	Q8NI22	Multiple coagulation factor deficiency protein 2	752.7	6	71.9
15	P42830	C-X-C motif chemokine 5	572.4	4	56.1
16	Q3LI64	Keratin-associated protein 6-1	549.0	4	62.0
17	Q9P2K8	eIF-2-alpha kinase GCN2	60.5	14	19.3
18	Q86XA9	HEAT repeat-containing protein 5A	396.1	23	25.2
19	B4DSK0	cDNA FLJ61752	310.3	1	35.3
20	A0A075B709	T cell receptor alpha joining 13	876.8	2	71.4
21	A0A7I2V5M6	N-myristoyltransferase 1	778.7	4	100.0
	3D-A549 HYPOXIA (200 μM Cobalt Chloride)				
	Identified Proteins at 48 hours				
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
1	Q7Z6J0	E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF1	694.3	5	13.1
2	E9PEI4	Protein tyrosine kinase 2	514.5	6	19.7
3	Q14192	Four and a half LIM domains protein 2	405.3	6	35.5
4	A0A7S5EW21	IGH c4186_heavy_IGHV3-23_IGHD5-12_IGHJ5	323.1	2	34.7
5	A0AAG2UXJ2	Defensin beta 109D	308.7	3	92.0

6	O19580	MHC class I antigen	294.4	1	33.0
7	Q9ULD9	Zinc finger protein 608	271.9	7	15.5
8	A0A0S2Z4W1	Serine/arginine repetitive matrix 1 isoform 1	240.5	9	16.8
9	A0A2U8J9A9	Ig heavy chain variable region	240.4	1	35.3
10	Q0P6D2	Divergent protein kinase domain 1C	236.8	5	28.4
11	Q86UP2	Kinectin	226.2	15	19.5
12	Q14114	Low-density lipoprotein receptor-related protein 8	223.1	10	21.7
13	Q9P1C8	PRO2577	214.7	1	50.9
14	Q8NI35	InaD-like protein	201.5	16	18.5
15	A0A212MHS7	MHC class I antigen	193.4	2	11.1
16	A0A804HKD7	RAB GTPase activating protein 1 like	191.4	5	15.6
17	K7EKL3	Granulin precursor	176.4	5	30.9
18	Q9UNB7	p50 killer cell activating receptor KAR-K1d	176.1	1	15.9
19	A0A0S1S4Y4	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	165.3	3	33.7
20	B3KQI5	Neurofilament light polypeptide	163.6	4	12.2
21	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	160.8	24	17.0
22	A0A0A0MR25	Fibroblast growth factor receptor	155.7	5	13.3
23	A0A068BTP6	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	154.7	5	22.2
24	A0A6G6CYT8	KIR2DL1 OS=Homo sapiens	151.4	2	16.7
25	Q15061	WD repeat-containing protein 43	150.5	7	13.7
26	O94892	Zinc finger protein 432	149.3	10	19.8
27	P07996	Thrombospondin-1	148.2	15	34.4
28	A4FUJ8	MKL1 protein	146.6	8	29.7
29	Q6ZRS4	Protein ITPRID1	146.3	10	25.9
30	Q8N9M3	Zinc finger protein 135	137.7	3	7.0
31	Q7Z3I7	Zinc finger protein 572	133.1	6	18.0
32	Q70EL2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 45	130.7	14	28.0
33	A0A059RZW9	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	125.0	6	24.7
34	H9Q5T8	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	124.8	4	14.4
35	Q9UJW8-2	Isoform 2 of Zinc finger protein 180	124.5	5	12.6
36	P07355-2	Isoform 2 of Annexin A2	122.1	2	13.2
37	A0A5C2GNV1	IG c541-heavy_IGHV3-53_IGHD6-13_IGHJ6	122.0	2	31.2
38	Q9BS86	Zona pellucida-binding protein 1	121.2	3	25.6
39	O00322	Uroplakin-1a	118.5	3	38.0
40	D3VVG5	ubiquitinyl hydrolase 1	117.7	3	27.9
41	A0A060VCP6	MHC class I antigen	116.8	1	35.9
42	Q8TBZ8	Zinc finger protein 564	115.5	3	7.4
43	O43314	Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2	114.3	12	18.0
44	Q93074	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12	114.0	8	7.9
45	F5H7J8	Chromosome 7 open reading frame 57	113.9	3	14.6
46	P48551	Interferon alpha/beta receptor 2	113.1	6	27.4
47	A0A0A0MR79	Mediator complex subunit 12	112.4	9	7.7

48	Q8WXF7	Atlastin-1	112.3	4	15.4
49	Q17RG1	BTB/POZ domain-containing protein KCTD19	112.0	5	14.7
50	A0A3Q8AIS5	Protein arginine N-methyltransferase 1 transcript variant 35	112.0	2	17.8
51	Q9NS00	Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1	111.3	3	15.4
52	Q12798	Centrin-1	110.3	3	23.3
53	J3KRJ5	Protein EVI2A	110.0	2	18.7
54	B4DDY2	UDP-glucuronosyltransferase	110.0	2	16.4
55	P05186-2	Isoform 2 of Alkaline phosphatase_ tissue-nonspecific isozyme	109.1	2	16.8
56	P23497	Nuclear autoantigen Sp-100	109.1	6	15.6
57	I1VE15	Phosphodiesterase 4D interacting protein	108.3	1	33.3
58	O75410	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1	106.3	10	21.6
59	Q2TU89	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	102.3	8	28.5
60	P00352	Aldehyde dehydrogenase 1A1	101.8	12	47.9
61	Q96D46	60S ribosomal export protein NMD3	99.4	8	29.8
62	B3KPS3	Tubulin alpha chain	96.3	8	31.3
63	A0A343V8B8	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	94.7	2	20.7
64	A0A7S5EUU1	IGH c1365_heavy_IGHV3-30_IGHD7-27_IGHJ6	92.9	1	19.4
65	A0A1C3PHM2	MHC class I antigen	92.8	2	6.9
66	O75146	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	92.1	7	13.9
67	A0A5C2GI61	IGH + IGL c445_heavy_IGHV3-33_IGHD4-23_IGHJ6	91.8	2	19.0
68	Q8NDV7	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein	91.7	20	21.5
69	H0YED6	Nuclear pore complex interacting protein family_ member A6	91.2	5	25.2
70	Q684P5	Rap1 GTPase-activating protein 2	90.9	10	24.1
71	F5H296	Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase	88.9	2	46.6
72	B4DP35	cDNA FLJ51587_ highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	88.8	4	35.6
73	O95782	AP-2 complex subunit alpha-1	87.6	8	19.1
74	Q7Z4V0	Zinc finger protein 438	87.2	6	18.4
75	A0A5C2GFP4	IG c623_heavy_IGHV3-30_IGHD3-16_IGHJ4	86.5	2	24.0
76	Q8NDV7-5	Isoform 5 of Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein	84.9	18	20.4
77	A0A3B3ISQ5	Discs large MAGUK scaffold protein 4	83.8	7	17.7
78	Q7Z3U7	Protein MON2 homolog	83.4	11	17.5
79	Q6XZF7	Dynammin-binding protein	82.5	9	12.8
80	Q5JU85-3	Isoform 2 of IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2	81.4	10	20.4

81	A6H8Y1-3	Isoform 3 of Transcription factor TFIIIB component B" homolog	81.2	14	19.3
82	Q8WWQ0	PH-interacting protein	80.5	9	13.6
83	A0A583ZBV1	MHC class I antigen	79.7	4	33.4
84	H0YBD1	Pecanex-like protein	79.2	2	26.5
85	Q00872	Myosin-binding protein C_ slow-type	78.7	11	16.9
86	A8K8P3	Protein SFI1 homolog	77.4	12	22.0
87	Q5JU85	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2	75.7	18	20.3
88	A0A1X9I466	MHC class I antigen	74.6	1	22.7
89	A0AAQ5BIK4	Unc-80 homolog_ NALCN channel complex subunit	72.0	3	6.2
90	B4DUZ8	Adenylyl cyclase-associated protein	71.1	2	15.4
91	A0A2I4PZI6	MHC class I antigen	69.7	2	11.6
92	A8K7V7	cDNA FLJ75522_ highly similar to Homo sapiens von Willebrand factor (VWF)_ mRNA	69.7	6	19.8
93	Q3KNS6	Zinc finger protein 829	69.4	7	30.1
94	A0A5C2GN17	IG c835_heavy_IGHV3-23_IGHD3-22_IGHJ6	68.7	3	38.2
95	B2RU33	POTE ankyrin domain family member C	68.4	7	24.5
96	Q8NA42	Zinc finger protein 383	68.3	4	22.1
97	Q9UJW2	Tubulointerstitial nephritis antigen	68.2	9	30.7
98	Q9HCS4	Transcription factor 7-like 1	67.5	5	22.1
99	Q13740	CD166 antigen	66.4	5	15.1
100	Q8N7B1	HORMA domain-containing protein 2	66.0	6	38.1
101	E1U1M2	[histone H3]-trimethyl-L-lysine(27) demethylase	65.5	7	14.5
102	Q8IVE3	Pleckstrin homology domain-containing family H member 2	64.3	13	17.8
103	A0A5C2GNY2	IG c533_heavy_IGHV3-33_IGHD7-27_IGHJ3	63.4	2	19.0
104	A0A087WWN8	Diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 2	62.7	6	31.9
105	O14607	Histone demethylase UTY	62.5	11	16.4
106	A6NF89	Olfactory receptor 6C6	62.3	3	43.6
107	D6RGZ6	Versican	61.9	8	20.2
108	Q8NDV7-6	Isoform 6 of Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein	60.2	16	17.3
109	A0AAG2TVJ9	POTE ankyrin domain family member B	59.4	6	29.6
110	Q2V2M9-2	Isoform 2 of FH1/FH2 domain-containing protein 3	59.3	16	25.3
111	A8K6F4	cDNA FLJ77991_ highly similar to Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 7B_ mRNA	59.0	4	17.8
112	A0A0C4ZLQ8	KIR3DL1	58.6	2	8.1
113	C9JT95	Nucleic acid binding protein 2	58.3	1	14.6
114	Q9UM73	ALK tyrosine kinase receptor	58.2	15	22.0
115	A6NKB5	Pecanex-like protein 2	57.7	11	10.7
116	A0A5C2GIK8	IGH + IGL c535_heavy_IGHV3-33_IGHD2-2_IGHJ6	57.2	3	30.4

117	Q9HBH0-2	Isoform 2 of Rho-related GTP-binding protein RhoF	57.0	3	27.1
118	A0A126LB25	Immediate early protein IE2	56.5	14	17.4
119	P54259	Atrophin-1	56.0	6	11.9
120	Q14515	SPARC-like protein 1	55.4	6	23.6
121	Q9Y483-4	Isoform 4 of Metal-response element-binding transcription factor 2	55.3	5	22.6
122	Q8TCN5	Zinc finger protein 507	53.7	8	15.4
123	Q8WWI5	Choline transporter-like protein 1	52.5	9	38.5
124	Q15361	Transcription termination factor 1	51.8	9	13.9
125	P35658-4	Isoform 4 of Nuclear pore complex protein Nup214	50.7	24	21.2
126	Q2TB18	Single-strand DNA endonuclease ASTE1	48.8	4	15.3
127	Q8WWL7	G2/mitotic-specific cyclin-B3	45.4	21	24.8
128	Q5H9R4	Armadillo repeat-containing X-linked protein 4	42.8	15	17.2
129	Q6UXB8	Peptidase inhibitor 16	42.7	5	25.9
130	B2RWN8	histone acetyltransferase	42.5	5	7.6
131	P35499	Sodium channel protein type 4 subunit alpha	41.6	11	13.5
132	Q13164	Mitogen-activated protein kinase 7	41.4	5	13.0
133	A0A384P5C6	Delta-like protein	40.9	9	25.9
134	Q8IVT4	Hypothetical MGC50722	39.8	7	14.7
135	O95259	Voltage-gated delayed rectifier potassium channel KCNH1	36.3	9	17.7
136	A0A590UK43	Sodium channel protein	35.4	15	14.1
137	Q96MN2	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 4	35.2	9	19.0
138	A0A096LNL9	Transcriptional regulator ATRX	35.1	22	30.9
139	P01024	Complement C3	34.5	13	16.4
140	A0A2R8YD45	Tripeptidyl peptidase 1	32.4	3	14.6
141	Q13433	Zinc transporter ZIP6	31.7	5	22.8
142	Q5CZA0	Uncharacterized protein DKFZp686D1070	31.4	14	15.2
143	Q06278	Aldehyde oxidase	31.4	12	19.8
144	Q13733	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-4	31.3	11	15.8
145	Q6NWR3	G protein-coupled receptor 83	31.1	3	14.7
146	C1PHA2	Tyrosine-protein kinase receptor	30.8	14	16.1
147	A0A1W2PQX5	Coiled-coil domain containing 187	29.6	10	7.0
148	Q9UMD9	Collagen alpha-1(XVII) chain	29.0	13	21.2
149	Q9NXG0	Centlein	27.9	13	16.2
150	Q8WVM7	Cohesin subunit SA-1	27.6	14	20.0
151	Q9UHB7	AF4/FMR2 family member 4	26.9	7	16.1
152	Q5SRE5	Nucleoporin NUP188	26.1	10	10.2
153	Q96SN8	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2	25.3	13	12.2
154	Q15067	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	23.8	4	12.3
155	Q13114	TNF receptor-associated factor 3	22.5	5	18.5
156	Q8N6G6	ADAMTS-like protein 1	21.1	11	14.8

157	Q9C007	Sodium channel protein	20.4	17	17.3
158	P63261	Actin_ cytoplasmic 2	1013.3	13	50.9
159	Q3LI64	Keratin-associated protein 6-1	712.1	6	62.0
160	P04264	Keratin_ type II cytoskeletal 1	512.3	12	49.4
161	Q8TCW9	Prokineticin receptor 1	440.4	8	36.4
162	Q9UPQ8	Dolichol kinase	406.1	16	69.3
163	Q8IZ08	G-protein coupled receptor 135	377.0	13	62.3
164	P20962	Parathymosin	361.1	2	45.1
165	Q9BXD5	N-acetylneuraminate lyase	346.5	13	44.7
166	P48742	LIM/homeobox protein Lhx1	340.9	12	58.9
167	P0DPK3	Notch homolog 2 N-terminal-like protein B	334.9	15	76.0
168	P24821	Tenascin	17.1	12	10.7
169	A0A1S5UZH4	Neuronal cell adhesion molecule	322.1	12	21.3
170	Q5T200	Zinc finger CCH domain-containing protein 13	216.2	44	27.3
171	A0A7P0NMY4	Filamin A	196.1	28	36.8
172	Q86XA9	HEAT repeat-containing protein 5A	187.9	18	21.3
173	P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	174.8	13	31.4
174	A2RRA6	USP35 protein	166.4	5	21.7
175	O75153	Clustered mitochondria protein homolog	161.3	17	27.0
176	A6NDY9	Filamin A	126.0	30	26.1
177	Q15485	Ficolin-2	115.3	2	20.8
178	Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	97.4	16	45.3
179	Q9BYV9	Transcription regulator protein BACH2	73.4	11	27.9
180	Q14114	Low-density lipoprotein receptor-related protein 8	550.0	10	22.7
181	A0A078BCH8	Transforming growth factor_ beta 1	501.6	4	76.9
182	L8EC89	Alternative protein CAV1	384.7	3	70.1
183	A0A180H7B8	MHC class I antigen	294.0	1	29.3
184	Q8WWZ7	Cholesterol transporter ABCA5	286.7	12	15.0
185	P00352	Aldehyde dehydrogenase 1A1	269.8	5	17.8
186	A0A0S2Z669	Testis expressed 9 isoform 1	268.3	6	32.2
187	O02970	HLA-B*13 protein	262.3	1	33.0
188	A0A5C2G6A4	IGH c207_heavy_IGHV4-39_IGHD2-15_IGHJ4	255.6	3	52.8
189	Q13367	AP-3 complex subunit beta-2	236.3	9	16.9
190	Q2M3G0	ATP-binding cassette sub-family B member 5	235.6	13	19.0
191	Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	233.7	12	31.3
192	P33151	Cadherin-5	232.1	3	12.5
193	O15034	RIMS-binding protein 2	66.5	10	26.0
194	Q9UKE5	TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	55.9	17	24.3
195	A5PLK6	Regulator of G-protein signaling protein-like	45.6	10	19.4

3D-A549 NORMOXIA (total protein using in-gel method)					
Identified Proteins at 72 hours					
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
1	A0A2R8Y793	Actin beta	1349.0	6	38.2
2	Q86YC2	Partner and localizer of BRCA2	527.2	7	14.4
3	P05783	Keratin_ type I cytoskeletal 18	415.2	12	32.6
4	P12883	Myosin-7	374.7	22	22.6
5	Q9NZ08	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	308.6	6	12.9
6	P00352	Aldehyde dehydrogenase 1A1	198.2	8	15.4
7	A0A7S5C141	IGH c1385_heavy_IGHV2-5_IGHD5-24_IGHJ6	195.8	1	11.1
8	Q9HBZ2	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	185.8	6	19.1
9	P57764	Gasdermin-D	135.6	5	21.1
10	A0A8V8TNX9	Pyruvate kinase	134.6	6	17.7
11	Q9BYG7	Protein maestro	112.1	4	30.6
12	Q5U5Z8	Cytosolic carboxypeptidase 2	93.5	14	29.2
13	Q27J81	Inverted formin-2	80.4	7	11.0
14	Q9NYF8	Bcl-2-associated transcription factor 1	69.3	9	19.9
15	P29401	Transketolase	297.6	11	32.3
16	P14618	Pyruvate kinase PKM	270.4	10	33.1
17	P60709	Actin_ cytoplasmic 1	927.6	13	50.1
18	P05783	Keratin_ type I cytoskeletal 18	601.3	22	56.5
19	Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	413.3	18	31.4
20	P05787	Keratin_ type II cytoskeletal 8	402.2	19	47.6
21	P00352	Aldehyde dehydrogenase 1A1	355.9	11	34.5
22	P06733	Alpha-enolase	294.6	11	34.1
23	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	262.6	8	32.5
24	Q96FV3	Tetraspanin-17	250.4	10	67.0
25	P82970	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5	233.2	14	25.2
26	A4D1N5	Putative uncharacterized protein FLJ40288	220.3	3	39.3
27	Q14582	Max dimerization protein 4	216.8	2	33.5
28	O76087	G antigen 7	216.1	1	47.9
29	P62079	Tetraspanin-5	206.8	11	68.3
30	Q4VNC1	Probable cation-transporting ATPase 13A4	50.0	12.0	12.9

3D-A549 HYPOXIA (total protein using in-gel method)					
	Identified Proteins at 72 hours				
Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)	
1	P30273	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	834.4	2	61.6
2	A0A6Q8PFE4	Actin beta	699.5	6	35.8
3	P05783	Keratin_ type I cytoskeletal 18	431.0	13	46.0
4	Q6ZN06	Zinc finger protein 813	235.5	6	15.6
5	P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	198.1	3	18.6
6	Q7L2R6	Zinc finger protein 765	184.3	4	12.0
7	P05787	Keratin_ type II cytoskeletal 8	134.8	7	17.6
8	Q96LU7	Myelin regulatory factor-like protein	131.6	4	10.7
9	A0A7P0T843	RING-type E3 ubiquitin transferase	112.0	5	22.4
10	A0A0J9YX57	MAGE family member B6B	422.4	2	17.0
11	P05783	Keratin_ type I cytoskeletal 18	558.6	24	50.0
12	P60709	Actin_ cytoplasmic 1	384.8	10	46.7
13	Q676U5	Autophagy-related protein 16-1	94.3	7	27.3
14	P05107	Integrin beta-2	35.0	7	19.0
	3D Calu-1 NORMOXIA				
	Identified Proteins at 72 hours				
Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)	
1	A0A0C4ZN11	Killer cell immunoglobulin-like receptor	1470.2	1	23.8
2	Q0ZCF6	Immunoglobulin heavy chain variable region	1155.0	2	53.5
3	Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	750.0	22	37.0
4	P49756	RNA-binding protein 25	712.1	21	27.8
5	A0A5C2G8V5	IGH + IGL c113_heavy_IGHV3-33_IGHD6-6_IGHJ6	696.0	1	35.0
6	A0A5C2G821	IGH c548_heavy_IGHV1-69_IGHD6-25_IGHJ4	692.1	2	35.1
7	A0A8I5KP66	Arginyltransferase 1	668.7	3	61.4
8	A0A5C2FVZ0	IGL c1099_light_IGLV3-1_IGLJ2	650.4	2	67.9
9	B4E0E0	Transmembrane protein 41B	639.4	3	31.3
10	Q96P56	Cation channel sperm-associated protein 2	634.0	12	35.7
11	A0A455JVL9	MHC class I antigen	615.3	1	15.6
12	A0A5C2GFT3	IG c966_heavy_IGHV4-34_IGHD6-13_IGHJ4	610.6	2	71.8
13	Q9Y2G8	DnaJ homolog subfamily C member 16	607.3	15	30.8

14	A0A7S5C254	IGH c2828_heavy_IGHV4-4_IGHD3-16_IGHJ6	606.9	3	61.7
15	Q96JU8	cDNA FLJ14963 fis_clone PLACE4000522_ weakly similar to NEUROGENIC LOCUS NOTCH PROTEIN	604.6	10	25.7
16	Q05066	Sex-determining region Y protein	589.6	6	52.5
17	H7BZT0	Apolipoprotein L3	564.1	2	46.6
18	Q8N769	Putative uncharacterized protein SLIRP-OT1	541.6	1	60.7
19	A0A7R6M6R3	Sodium voltage-gated channel alpha subunit 5	513.2	1	34.1
20	F8W6I7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	504.3	3	35.2
21	A0A858LKH8	MHC class I antigen	492.9	8	45.2
22	A0A411ELR1	Sex-determining region Y protein	491.0	6	50.0
23	A2N0U2	VH6DJ protein	487.5	1	37.7
24	Q53S40	Uncharacterized protein ADAM17	483.3	2	48.0
25	Q86VP1	Tax1-binding protein 1	471.5	10	26.4
26	Q5H9R7	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	460.4	12	29.0
27	P09651-2	Isoform A1-A of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	458.8	5	34.7
28	P29074	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 4	443.0	8	19.7
29	A0A7S5EV72	IGH c3181_heavy_IGHV3-43_IGHD5-12_IGHJ1	439.8	1	35.2
30	Q7L576	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	419.4	16	25.1
31	L8E979	Alternative protein MYO19	418.5	2	45.3
32	Q08499-2	Isoform 3 of 3'-5'-cyclic-AMP phosphodiesterase 4D	414.3	11	30.3
33	P10912	Growth hormone receptor	372.4	7	23.7
34	Q68CY7	Uncharacterized protein DKFZp686P05226	369.0	6	26.0
35	F8WDJ2	RAB3 GTPase activating non-catalytic protein subunit 2	367.8	2	56.1
36	Q8NDL9	Cytosolic carboxypeptidase-like protein 5	360.5	6	23.3
37	Q8NG31-3	Isoform 3 of Outer kinetochore KNL1 complex subunit KNL1	338.1	29	31.4
38	Q15020	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	337.9	12	23.4
39	A0A9E8DG70	SART3-RARG fusion protein	331.7	13	19.9
40	A0A1B0GUW7	Small integral membrane protein 27	328.8	2	85.5
41	Q14669-4	Isoform 4 of E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	325.9	15	22.0
42	A0A2H4FZ36	MHC class I antigen	316.6	1	37.0
43	A0A8S4QCZ9	mRNA	315.1	3	31.3
44	A0A804HIA2	Desmoglein 2	310.8	3	41.5
45	A0A6Q8PGG9	E3 ubiquitin-protein ligase	303.4	20	21.2
46	Q6J4I5	Sex-determining region Y protein	296.3	4	42.9
47	P08621-4	Isoform 4 of U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	296.3	9	46.3

48	A0A023W4F4	Rhesus blood group D antigen	295.7	1	52.7
49	O43719	17S U2 SnRNP complex component HTATSF1	291.9	25	47.5
50	A0A9Y1QQ47	Breast cancer type 1 susceptibility protein	290.4	12	30.1
51	J7F508	MHC class I antigen	289.8	1	30.4
52	A0A2U7MZK9	MHC class I antigen	289.3	3	64.6
53	Q8IZU1	Protein FAM9A	286.9	9	57.5
54	A0A8Q3SJG7	GATA binding protein 2	284.2	4	25.5
55	C9JI46	Ligand dependent nuclear receptor corepressor like	280.9	6	19.3
56	A4D1I0	HCG1741805_ isoform CRA_c	279.3	23	37.7
57	A0A5C2GPZ3	IG c1278_heavy_IGHV3-21_IGHD4-23_IGHJ4	277.7	2	29.8
58	Q8NHY6	Zinc finger protein 28 homolog	277.4	12	21.8
59	Q0VDF9	Heat shock 70 kDa protein 14	274.9	6	24.4
60	A0A0A7C816	MHC class I antigen	274.2	1	29.3
61	H9RZ55	ATP synthase protein 8	270.5	3	39.7
62	Q8NCA5	Protein FAM98A	267.8	5	17.0
63	A6YTJ7	ATP synthase protein 8	266.5	2	38.2
64	B4DK25	Arginyl-tRNA--protein transferase 1	262.4	9	36.0
65	Q9UHV7	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13	261.2	13	14.6
66	B0IIS9	MYO1B variant protein	258.9	9	13.9
67	Q9UKT9-3	Isoform 3 of Zinc finger protein Aiolos	256.6	11	43.4
68	A0A0C4DH38	Immunoglobulin heavy variable 5-51	255.7	2	26.5
69	B4E107	Arginyl-tRNA--protein transferase 1	255.6	8	39.1
70	E2GJH9	MHC class I antigen	251.1	1	35.9
71	L7SJG0	Cytochrome c oxidase subunit 3	250.7	1	24.9
72	Q9H252	Voltage-gated inwardly rectifying potassium channel KCNH6	250.6	7	17.5
73	A0A7S5C5X9	IGH c4014_heavy_IGHV3-15_IGHD2-15_IGHJ3	247.5	2	31.0
74	Q9UKT9-11	Isoform 11 of Zinc finger protein Aiolos	244.0	6	45.0
75	Q8NDV7	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein	239.4	22	22.6
76	H0YMW2	A-kinase anchoring protein 13	234.3	20	20.5
77	O15360	Fanconi anemia group A protein	234.1	15	28.2
78	Q9Y608	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	233.6	10	28.2
79	Q9Y6X1	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	232.6	1	47.0
80	A0A2U8J8D9	Ig heavy chain variable region	230.7	1	39.6
81	Q14721	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1	230.1	9	19.0
82	A0A140T930	Major histocompatibility complex_ class I_ C	229.9	1	14.9
83	H0YAH3	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	228.8	8	19.9
84	O60637-3	Isoform 3 of Tetraspanin-3	228.3	4	37.6
85	A0A5C2GRE0	IG c1090_heavy_IGHV3-30_IGHD5-5_IGHJ6	223.6	1	34.7

86	P55196	Afadin	219.9	18	22.9
87	B4DZ24	cDNA FLJ52876_ moderately similar to Homo sapiens conserved nuclear protein NHN1 (NHN1)_ mRNA	219.7	4	35.6
88	P55196-2	Isoform 1 of Afadin	218.6	21	24.6
89	A0A8V8TQ33	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4	216.4	2	18.8
90	Q5SWA1	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15B	210.5	11	32.1
91	P06310	Immunoglobulin kappa variable 2-30	205.4	4	78.3
92	O60374	WUGSC:H_DJ1086D14.1 protein	204.1	6	24.9
93	A8K4T7	cDNA FLJ77111_ highly similar to Homo sapiens microtubule-associated protein 1A (MAP1A)_ mRNA	203.3	13	18.8
94	Q9UKV3	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	203.2	13	27.0
95	B2R8G9	cDNA_ FLJ93894_ highly similar to Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 9 (CCR9)_ transcript variant A_ mRNA	203.1	7	51.5
96	O15392-6	Isoform 6 of Baculoviral IAP repeat-containing protein 5	199.6	2	52.6
97	A0A3Q8ATF5	Protein arginine N-methyltransferase 1 transcript variant 24	199.3	4	19.3
98	Q14114	Low-density lipoprotein receptor-related protein 8	199.0	15	29.5
99	O15068	Guanine nucleotide exchange factor DBS	198.2	9	17.2
100	A0A7S5BXV5	IGH c206_heavy_IGHV1-69_IGHD3-22_IGHJ6	196.3	4	67.7
101	A6NFU0	Ig-like V-type domain-containing protein FAM187A	195.8	5	28.8
102	Q8NFM7	Interleukin-17 receptor D	194.3	9	30.7
103	Q5JQC9	A-kinase anchor protein 4	191.9	8	16.7
104	Q5VWP3	Muscular LMNA-interacting protein	190.3	9	25.5
105	K0A7K7	TNF receptor-associated protein 1	189.3	10	32.0
106	B7Z3A3	cDNA FLJ54686_ highly similar to Homo sapiens Rho GTPase activating protein 21 (ARHGAP21)_ mRNA	189.2	14	18.3
107	Q9NVH2	Integrator complex subunit 7	189.0	7	16.8
108	B4DM37	cDNA FLJ55339_ highly similar to Homo sapiens Rho GTPase activating protein 21 (ARHGAP21)_ mRNA	183.9	11	23.2
109	A0A0A0MQX5	Contactin-5	183.2	7	17.0
110	P46736	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36	183.0	6	38.3
111	A0A2X0SFX5	ARHGEF16	182.1	9	33.3
112	B4DYP8	cDNA FLJ61479	181.4	1	14.4
113	Q8TD91	Melanoma-associated antigen C3	179.5	12	42.0
114	Q14687	Genetic suppressor element 1	179.5	22	20.8
115	Q147U1	Zinc finger protein 846	177.8	3	15.8
116	F8VVM2	Solute carrier family 25 member 3	177.5	5	42.9

117	A0A2R8Y793	Actin beta	177.3	5	27.5
118	A0A5C2GQR2	IG c239_heavy_IGHV3-33_IGHD3-10_IGHJ4	176.6	2	30.4
119	O60229-2	Isoform 2 of Kalirin	174.2	11	13.1
120	G3V3B0	Apoptotic chromatin condensation inducer 1	174.1	7	24.1
121	A0A994J3M8	Dynamin-1-like protein	173.4	8	22.1
122	Q14999	Cullin-7	173.0	17	22.7
123	A0A7I2V2K3	Cathepsin F	170.4	6	27.1
124	B4DRS4	cDNA FLJ60139_ highly similar to Homo sapiens HIV TAT specific factor 1 (HTATSF1)_ mRNA	169.5	24	48.8
125	O15063	Granule associated Rac and RHOG effector protein 1	164.1	16	29.5
126	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	164.0	32	18.8
127	A0A590UK53	LDL receptor related protein 8	162.7	10	26.6
128	A2N0T4	VH6DJ protein	161.5	1	25.3
129	F6IR50	MHC class I antigen	161.0	5	36.8
130	Q6PIL8	IGK@ protein	161.0	1	16.1
131	Q9P232	Contactin-3	159.1	12	29.0
132	Q86UL8	Membrane-associated guanylate kinase_ WW and PDZ domain-containing protein 2	159.0	8	12.1
133	H0Y613	Gse1 coiled-coil protein	158.4	19	18.9
134	A0A994J4U5	Centrosomal protein 43	154.4	3	32.2
135	A2VDJ0	Transmembrane protein 131-like	153.9	19	33.4
136	P08962-3	Isoform 3 of CD63 antigen	153.6	3	17.9
137	Q9Y2P9	Retinol dehydrogenase homolog	153.3	1	21.1
138	Q8N9F8	Zinc finger protein 454	153.0	5	24.3
139	O75051-2	Isoform 2 of Plexin-A2	152.7	7	34.4
140	Q96SR6	Zinc finger protein 382	152.7	9	25.3
141	Q96AJ9	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A	151.3	5	40.6
142	Q86X10	Ral GTPase-activating protein subunit beta	151.2	15	23.6
143	H3BR52	Cytochrome b-245 light chain	150.3	2	44.5
144	E9PCX8	Tensin 3	150.1	10	17.7
145	Q8NBR6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-2	148.1	5	20.8
146	A0A087WV25	Centrosomal protein 43	147.9	5	32.2
147	Q9H9G7	Protein argonaute-3	147.9	10	30.8
148	A0A7S5BZR1	IGH c1162_heavy_IGHV5-51_IGHD6-13_IGHJ6	147.4	4	41.1
149	Q9P241	Phospholipid-transporting ATPase VD	146.8	17	21.8
150	P49796	Regulator of G-protein signaling 3	143.6	20	31.6
151	B4DHA8	CUGBP Elav-like family member 4	143.4	7	16.5
152	A0A1B5BA03	KIR2DL1	142.7	2	25.3
153	Q9UP79	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 8	136.2	11	34.2
154	P17021	Zinc finger protein 17	135.7	10	25.4

155	A0A024R138	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	133.7	4	23.8
156	P59045	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NLRP11 PE=1 SV=2	133.6	9	21.3
157	B3K WG8	cDNA FLJ43069 fis_ clone BRTHA3009037_ highly similar to Regulator of G-protein signaling 3	131.5	20	31.0
158	Q9BXR3	Endogenous retrovirus group K member 6 Pol protein	130.9	11	17.4
159	Q9NXL6	SID1 transmembrane family member 1	125.8	9	31.7
160	Q9UEE9	Craniofacial development protein 1	124.1	6	41.5
161	Q9WJR5	Endogenous retrovirus group K member 19 Pol protein	120.2	16	25.0
162	O75410-5	Isoform 5 of Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1	116.5	7	37.1
163	Q8N1W1	Rho guanine nucleotide exchange factor 28	115.0	21	28.9
164	P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	114.5	19	26.8
165	Q9C0C2	182 kDa tankyrase-1-binding protein	114.1	18	24.3
166	Q96F07	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2	111.2	13	18.6
167	Q14832	Metabotropic glutamate receptor 3	110.5	7	16.2
168	Q92824	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	109.3	37	44.7
169	P24821	Tenascin	108.5	25	25.3
170	P29375	Lysine-specific demethylase 5A	107.5	29	29.9
171	Q9NQW8	Cyclic nucleotide-gated channel beta-3	107.0	13	32.4
172	Q4LE39	AT-rich interactive domain-containing protein 4B	105.8	21	28.7
173	A8K5U1	Metabotropic glutamate receptor 3	105.4	6	16.2
174	Q16670	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 26	102.4	11	33.7
175	Q13219	Pappalysin-1	102.4	22	34.1
176	P61244	Protein max	100.3	4	41.9
177	A0A7U3K2D1	MHC class I antigen	100.2	5	24.1
178	Q8TET4	Neutral alpha-glucosidase C	100.0	10	18.8
179	Q8N4C6	Ninein	99.8	29	24.0
180	Q06455	Protein CBFA2T1	98.4	5	19.2
181	B7Z539	cDNA FLJ56954_ highly similar to Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	98.2	8	28.8
182	Q8NE01	Metal transporter CNNM3	97.7	8	16.5
183	A0A9Y1QQ02	RING-type E3 ubiquitin transferase BRCA1	94.8	9	31.8
184	O60260	E3 ubiquitin-protein ligase parkin	93.7	7	27.1
185	E7ENB7	Breast cancer type 1 susceptibility protein	91.5	14	14.2
186	P04066	Tissue alpha-L-fucosidase	90.6	3	22.7
187	Q5VTT5	Myomesin-3	87.5	12	22.1
188	Q9BY66	Lysine-specific demethylase 5D	84.6	16	20.7
189	Q9H8H2	ATP-dependent DNA helicase DDX31	83.7	17	26.3
190	B4E2M0	cDNA FLJ55443_ highly similar to Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	83.5	10	18.1

191	Q9NQX3	Gephyrin	83.3	12	31.7
192	Q59E93	Aminopeptidase	79.8	6	18.1
193	O94823	Phospholipid-transporting ATPase VB	79.5	19	32.2
194	P42356	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	78.1	21	22.4
195	P08581	Hepatocyte growth factor receptor	77.8	14	25.9
196	P0DPF3	NBPF family member NBPF9	75.5	15	31.3
197	Q15047	Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1	74.2	15	18.0
198	Q8WUT4	Leucine-rich repeat neuronal protein 4	73.6	4	16.8
199	Q96MT7	Cilia- and flagella-associated protein 44	73.0	19	17.0
200	P02751-10	Isoform 10 of Fibronectin	72.6	15	20.2
201	Q8TDY2	RB1-inducible coiled-coil protein 1	70.9	23	26.0
202	Q86YA3	5'-3' DNA helicase ZGRF1	69.1	24	21.9
203	O60312	Phospholipid-transporting ATPase VA	67.8	9	18.5
204	P17022	Zinc finger protein 18	65.2	9	23.9
205	Q641Q2	WASH complex subunit 2A	65.1	15	19.4
206	Q8TDM6	Disks large homolog 5	64.0	18	20.2
207	Q5TAX3	Terminal uridylyltransferase 4	62.3	17	20.3
208	Q8N163	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	61.9	10	20.0
209	Q9P202	Whirlin	59.6	10	27.5
210	Q5VZ89	DENN domain-containing protein 4C	59.6	23	24.0
211	Q14766	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	57.8	27	33.9
212	Q9P2D0	Inhibitor of Bruton tyrosine kinase	49.3	14	16.1
213	Q99758	Phospholipid-transporting ATPase ABCA3	48.7	17	20.0
214	Q92608	Dedicator of cytokinesis protein 2	48.3	25	23.2
215	Q9NQX4	Unconventional myosin-Vc	46.6	24	24.3
216	Q9NRL2	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	46.1	18	25.3
217	A0A0A0MQR4	Capicua transcriptional repressor	35.2	8	9.5
218	A0A2R8YCJ5	Small integral membrane protein 41	435.8	2	35.5
219	P48509	CD151 antigen	43.5	10	5.7
220	Q70IA6	MOB kinase activator 2	423.0	9	65.4
221	O60812	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	385.7	3	19.1
222	Q8NG94	Olfactory receptor 11H1	382.1	4	33.4
223	P08247	Synaptophysin	382.0	7	59.4
224	P62079	Tetraspanin-5	343.8	16	89.9
225	B4DG22	non-specific serine/threonine protein kinase	17.4	5	12.7
	3D Calu-1 HYPOXIA				
	<u>Identified Proteins at 72 hours</u>				
	Accession	Protein name	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
1	M0QYI4	Zinc finger protein 730	1760.5	1	62.2

2	A0A7S5C0W9	IGH c1280_heavy_IGHV1-46_IGHD2-2_IGHJ4	1358.9	2	62.7
3	A0A1B0GVC4	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 9	1198.7	6	32.6
4	A0A0S2Z614	Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	973.6	4	61.5
5	H0YLF1	DDB1 and CUL4 associated factor 11	818.2	1	100.0
6	A0A5C2GS37	IGH c461_heavy_IGHV1-2_IGHD4-4_IGHJ6	756.3	3	63.6
7	A0A5C2GKT7	IGH c165_heavy_IGHV4-61_IGHD1-26_IGHJ4	673.6	1	33.1
8	O76074	cGMP-specific 3'-5'-cyclic phosphodiesterase	669.6	15	29.8
9	B2R7Z9	cDNA_FLJ93678_ highly similar to Homo sapiens surfactant_ pulmonary-associated protein A2 (SFTPA2)_ mRNA	665.4	3	49.2
10	Q96NG8	Zinc finger protein 582	645.5	7	24.0
11	P15941-11	Isoform Y-LSP of Mucin-1	633.3	5	46.2
12	Q00341	Vigilin	539.6	26	32.4
13	Q9UI25	Putative uncharacterized protein PRO0461	514.2	3	71.4
14	A0A7S5C042	IGH c1718_heavy_IGHV4-34_IGHD5-12_IGHJ5	512.8	2	48.0
15	Q9HCM9	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM39	502.7	6	19.9
16	Q9UJU3	Zinc finger protein 112	498.0	8	12.2
17	A0A7S5EYM4	IGH c3408_heavy_IGHV1-2_IGHD2-8_IGHJ4	478.8	2	49.6
18	Q9Y487	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a 2	444.0	17	38.8
19	A0A7S5EV37	IGH c512_heavy_IGHV1-69_IGHD3-22_IGHJ3	441.6	3	53.2
20	A0A0J9YW37	Microtubule associated protein 4	440.0	3	69.3
21	A0A5C2GH48	IGH + IGL c511_light_IGLV3-1_IGLJ2	433.5	2	40.2
22	Q14585	Zinc finger protein 345	432.6	6	16.4
23	B4E1Z2	cDNA FLJ58353_ moderately similar to Protein EMSY	430.4	14	34.8
24	E9PNS4	Cleavage and polyadenylation-specific factor 3-like protein	426.0	3	39.2
25	A0A5C2GMI9	IGH c617_light_IGLV1-51_IGLJ2	425.9	1	35.5
26	P82970	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5	423.2	12	31.6
27	A0A7S5C196	IGH c2037_heavy_IGHV1-24_IGHD1-26_IGHJ4	401.5	3	78.3
28	Q7Z4Q2	HEAT repeat-containing protein 3	401.2	19	50.4
29	Q5T1C6	Acyl-coenzyme A thioesterase THEM4	393.4	5	45.8
30	A0A5C2GU20	IGH c1012_light_IGLV1-51_IGLJ3	387.6	1	35.5
31	A0A5C2GFS9	IGH c764_heavy_IGHV4-39_IGHD7-27_IGHJ4	386.9	2	54.2
32	Q5JWD1	GNAS complex locus	377.7	3	74.7
33	Q71H61	Immunoglobulin-like domain-containing receptor 2	358.4	5	20.5
34	Q9UKS7-4	Isoform 4 of Zinc finger protein Helios	352.9	7	36.9
35	Q13422	DNA-binding protein Ikaros	348.1	10	44.5

36	O94964	Microtubule cross-linking factor 2	347.2	21	23.4
37	J3QLT6	Nuclear prelamin A recognition factor	345.7	2	53.5
38	Q02218-2	Isoform 2 of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E1	344.2	12	27.7
39	M0QXP0	Myosin IXB	342.7	1	23.1
40	A0A075C9B0	ATP synthase subunit a	332.1	4	58.4
41	A0A5C2GQW6	IG c1275_heavy_IGHV1-69_IGHD2-2_IGHJ3	320.5	1	44.8
42	Q2XQU9	FHL2 isoform 5	320.3	9	45.8
43	H7C3J9	GRB2 associated binding protein 3	313.5	1	21.3
44	Q9NQW1	Protein transport protein Sec31B	313.4	13	26.0
45	Q6R327	Rapamycin-insensitive companion of mTOR	306.0	18	19.2
46	B1NU66	ATP synthase subunit a	300.0	5	81.4
47	A0A6Q8PFJ4	Mitofusin 2	300.0	5	11.4
48	A0A7T0LNZ1	Immunoglobulin heavy chain variable region	298.8	1	33.9
49	A0A068BFW8	Truncated breast and ovarian cancer susceptibility protein 2	294.8	2	57.7
50	Q9P0K1	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 22	294.4	14	24.2
51	Q969J3-2	Isoform 2 of BLOC-1-related complex subunit 5	290.5	3	21.6
52	Q96T76	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	288.4	8	21.4
53	H0Y9Z6	Slit guidance ligand 2	282.5	3	54.1
54	A0A0C4DFM5	Myotilin	280.3	2	12.9
55	Q5SYE7	NHS-like protein 1	276.2	10	15.3
56	Q6ZTQ9	cDNA FLJ44342 fis_clone TRACH3005294	272.7	1	26.2
57	A0A7S5EY09	IGH c2433_heavy_IGHV1-46_IGHD2-8_IGHJ5	268.4	3	63.3
58	Q9NVM9	Integrator complex subunit 13	267.4	7	20.0
59	Q8WWL7	G2/mitotic-specific cyclin-B3	262.3	25	28.5
60	Q64GA8	Interferon regulatory factor 5 variant 9	261.8	2	31.2
61	Q9Y2Z9	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6_mitochondrial	259.8	6	30.3
62	Q8IVF5	Rho guanine nucleotide exchange factor TIAM2	259.2	20	23.3
63	P29375	Lysine-specific demethylase 5A	257.3	25	26.5
64	A0A5C2GHR2	IG c106_heavy_IGHV1-18_IGHD3-3_IGHJ4	256.9	2	36.7
65	P08684	Cytochrome P450 3A4	256.4	6	32.0
66	B4DVX3	cDNA FLJ50105_ highly similar to Jumonji/ARID domain-containing protein 1A	250.8	8	25.5
67	Q9UBS8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF14	248.6	8	36.9
68	A0A7S5C5Z7	IGH c2545_heavy_IGHV1-69_IGHD6-13_IGHJ6	247.8	1	31.5
69	P08962-2	Isoform 2 of CD63 antigen	246.1	1	20.0
70	G9BAV9	Lens epithelium-derived protein	244.7	15	18.4
71	P35498	Sodium channel protein type 1 subunit alpha	243.7	19	20.3

72	Q86UR5	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	242.1	18	20.0
73	A0A5C2GKX6	IG c266_light_IGLV3-25_IGLJ3	242.0	2	67.6
74	A0A8V8TNH7	NLR family pyrin domain containing 1	242.0	13	20.6
75	A0A7S5C5N3	IGH c2395_heavy_IGHV1-69_IGHD4-17_IGHJ6	237.6	2	39.7
76	A0A7S5C1Z7	IGH c2397_heavy_IGHV1-8_IGHD5-24_IGHJ1	237.6	3	71.3
77	A0A7S5C403	IGH c3402_heavy_IGHV3-15_IGHD5-24_IGHJ4	237.1	1	25.2
78	Q969W1	Palmitoyltransferase ZDHHC16	236.7	7	37.1
79	P26010	Integrin beta-7	235.3	8	23.6
80	Q9NPR9	Protein GPR108	235.2	9	32.0
81	P24821	Tenascin	234.2	25	26.3
82	A0A068BFV4	Truncated breast and ovarian cancer susceptibility protein 1	234.0	1	30.4
83	Q9UBW7	Zinc finger MYM-type protein 2	231.7	17	25.3
84	E9PC84	Tenascin C	231.4	19	23.7
85	A0A7S5C5M4	IGH c2380_heavy_IGHV3-15_IGHD3-10_IGHJ4	230.8	3	42.0
86	Q9HD67	Unconventional myosin-X	230.0	14	12.7
87	Q8N755	Solute carrier family 66 member 3	227.5	5	47.5
88	Q9NTJ5	Phosphatidylinositol-3-phosphatase SAC1	225.1	7	21.8
89	Q14966	Zinc finger protein 638	224.8	19	16.6
90	P35580	Myosin-10	223.9	22	19.6
91	Q76L83	Putative Polycomb group protein ASXL2	221.6	13	15.9
92	Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	221.4	23	16.1
93	Q99250	Sodium channel protein type 2 subunit alpha	218.0	20	22.2
94	A0A0C4DFP8	Meckelin	217.8	11	25.0
95	Q57Z90	Uncharacterized protein NP220	216.1	11	24.3
96	A0A1G4P1K8	MHC class I antigen	215.9	1	16.0
97	A0A6M5CDG2	Tetraspanin	214.7	3	34.4
98	Q15468	SCL-interrupting locus protein	214.7	13	21.0
99	A2I827	NF-kappaB repressing factor	214.2	1	39.1
100	Q9Y3R0	Glutamate receptor-interacting protein 1	213.4	6	13.4
101	Q8NA31	Telomere repeats-binding bouquet formation protein 1	210.3	7	21.6
102	O75151	Lysine-specific demethylase PHF2	209.1	6	15.1
103	P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1	208.2	9	34.8
104	Q93074	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12	206.4	18	16.1
105	A0A087WUM5	GLI pathogenesis related 2	206.1	1	37.5
106	Q92526	T-complex protein 1 subunit zeta-2	205.7	10	39.1
107	O75078	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 11	204.8	10	31.7
108	P01706	Immunoglobulin lambda variable 2-11	202.4	2	21.8
109	O14802	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1	201.8	27	32.3

110	Q14524	Sodium channel protein type 5 subunit alpha	201.7	22	20.9
111	C9JZZ1	Rabenosyn_ RAB effector	200.3	2	42.0
112	A0A5C2GEZ5	IG c1113_heavy_IGHV1-18_IGHD2-15_IGHJ3	200.0	2	35.2
113	Q9Y2H5	Pleckstrin homology domain-containing family A member 6	199.6	13	27.7
114	A0A3S6RI51	MHC class I antigen	199.3	5	25.1
115	B2R9L6	cDNA_ FLJ94450_ highly similar to Homo sapiens cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase) (CDK9)_ mRNA	197.8	3	19.4
116	A0A5C2GD70	IG c848_heavy_IGHV1-2_IGHD2-15_IGHJ4	196.1	3	77.4
117	Q9Y3V7	Uncharacterized protein DKFZp586A1519	195.2	10	44.8
118	A0A8I5KQV3	Bridge-like lipid transfer protein family member 1	194.8	12	15.7
119	Q08AE8	Protein spire homolog 1	194.7	8	26.1
120	Q86UR5-10	Isoform 10 of Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	194.2	11	30.7
121	Q93075	Putative deoxyribonuclease TATDN2	193.4	16	34.7
122	A0A8I5KQ02	SET binding factor 2	191.0	17	19.6
123	Q8NG11-3	Isoform 3 of Tetraspanin-14	189.4	3	27.2
124	Q8NET8	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 3	189.2	9	22.9
125	Q5HYC2	Uncharacterized bromodomain-containing protein 10	188.8	20	22.4
126	A0A7S5C5P6	IGH c3894_heavy_IGHV4-34_IGHD3-9_IGHJ5	188.5	2	53.0
127	A0A8I5KTA9	SET binding factor 2	187.2	15	16.9
128	A0A1C8DTI6	MHC class I antigen	187.0	3	21.0
129	A0A7P0TA23	O-phosphoseryl-tRNA(Sec) selenium transferase	186.0	4	21.2
130	O14544	Suppressor of cytokine signaling 6	186.0	5	17.4
131	Q5TB80	Centrosomal protein of 162 kDa	186.0	7	7.3
132	Q9NRX6	Protein kish-B	185.3	3	44.6
133	P63092-3	Isoform 3 of Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	184.1	5	39.8
134	A0A5C2G4W4	IGH c9_heavy_IGHV1-18_IGHD3-16_IGHJ4	183.5	1	24.6
135	Q8TE82	SH3 domain and tetratricopeptide repeat-containing protein 1	183.2	10	16.0
136	A0A7S5C2U6	IGH c3188_heavy_IGHV1-69_IGHD3-22_IGHJ4	182.8	2	19.5
137	P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	182.0	5	26.6
138	O00159	Unconventional myosin-Ic	180.4	10	16.4
139	P55201	Peregrin	179.6	13	21.5
140	Q8WYA6	Beta-catenin-like protein 1	177.6	6	21.5
141	A0A7S5EXH1	IGH c3287_heavy_IGHV1-2_IGHD6-19_IGHJ3	177.4	3	50.0
142	P27816	Microtubule-associated protein 4	177.3	12	22.5
143	A0A7S5EYE6	IGH c3704_heavy_IGHV1-18_IGHD3-3_IGHJ5	177.2	5	80.2

144	E9PK68	Serine/threonine-protein phosphatase	176.9	1	16.3
145	A0A7S5EU92	IGH c570_heavy_IGHV4-39_IGHD3-10_IGHJ5	173.9	1	36.1
146	A0A5H2UW3	MHC class I antigen	173.6	3	24.7
147	A0JP26	POTE ankyrin domain family member B3	173.5	9	22.2
148	A0A5C2GGI6	IG c155_heavy_IGHV3-15_IGHD3-22_IGHJ4	173.2	3	30.5
149	Q9HBZ2	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	172.7	7	14.9
150	Q0D2I6	Fasciculation and elongation protein zeta 2 (Zygin II)	171.3	2	15.6
151	P02768	Albumin	170.2	10	23.8
152	Q14008	Cytoskeleton-associated protein 5	169.9	26	19.7
153	A0A5C2GGV1	IG c147_heavy_IGHV4-39_IGHD6-6_IGHJ4	169.2	4	69.8
154	A0A7S5C4H2	IGH c1750_heavy_IGHV3-49_IGHD3-9_IGHJ6	167.9	3	32.3
155	A0A5C2GBR1	IGH + IGL c641_heavy_IGHV1-69_IGHD6-19_IGHJ6	167.8	2	51.6
156	P11464	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 1	166.8	6	25.8
157	B4DQD9	cDNA FLJ61154_ highly similar to Replication protein A 32 kDa subunit	165.5	2	27.3
158	A0A096LNL9	Transcriptional regulator ATRX	163.9	20	20.4
159	Q5SSK0	MFSD2 lysolipid transporter A_lysophospholipid	162.7	1	22.6
160	A8MYU2	Potassium channel subfamily U member 1	162.3	15	26.5
161	Q9NZL6	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	160.5	11	23.6
162	B2ZCW9	MHC class I antigen	160.4	1	34.8
163	Q9BYX4	Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1	160.2	16	31.0
164	A0A7S5C375	IGH c3383_heavy_IGHV1-2_IGHD6-19_IGHJ3	159.0	2	34.6
165	Q9P2I0	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	158.8	8	20.6
166	Q9UHB7	AF4/FMR2 family member 4	158.6	12	22.4
167	O95631	Netrin-1	158.2	9	29.8
168	P98095	Fibulin-2	156.0	12	30.5
169	P15621	Zinc finger protein 44	155.7	10	27.1
170	Q9H582	Zinc finger protein 644	154.7	9	10.2
171	P55268	Laminin subunit beta-2	154.5	19	28.7
172	Q9C0C9	(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme	154.3	15	27.2
173	P28799	Progranulin	153.4	5	20.1
174	P15622	Zinc finger protein 250	151.4	10	38.9
175	A0A5C2GMI8	IG c63_heavy_IGHV4-39_IGHD7-27_IGHJ4	150.7	2	57.7
176	Q14190	Single-minded homolog 2	150.2	4	18.9
177	Q8N841	Tubulin polyglutamylase TTLL6	150.0	7	13.9
178	Q5SXM2	snRNA-activating protein complex subunit 4	149.6	19	24.9
179	P43005	Excitatory amino acid transporter 3	147.8	7	24.0

180	H9R171	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	147.5	1	9.4
181	Q08945	FACT complex subunit SSRP1	146.9	10	26.9
182	Q8IYD8	Fanconi anemia group M protein	144.2	21	24.1
183	H0YJS3	FA complementation group M	143.7	19	22.5
184	A0A7T0LNK9	Immunoglobulin heavy chain variable region	142.7	2	17.6
185	Q8TC59	Piwi-like protein 2	142.5	8	17.9
186	H3BUU5	Sp1 transcription factor	142.3	2	40.1
187	Q86UU1	Pleckstrin homology-like domain family B member 1	142.3	11	15.9
188	P16499	Rod cGMP-specific 3'-5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha	142.1	18	32.2
189	O60343	TBC1 domain family member 4	142.1	12	23.0
190	A6NNK5	Tumor protein p53 binding protein 1	141.7	14	15.9
191	A0A3S8PMP8	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	141.5	2	13.4
192	A0A142DV49	Killer-cell immunoglobulin-like receptor 3DL3	141.4	3	25.4
193	Q9BXM0	Periaxin	140.7	10	16.8
194	A1Z593	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	139.4	2	12.1
195	A0A0S4T3Y5	MHC class I antigen	139.2	2	10.1
196	P52739	Zinc finger protein 131	138.8	8	25.8
197	A0A5H2UZ78	MHC class I antigen	138.8	3	19.1
198	D6RBU3	Ring finger protein 14	138.1	4	39.5
199	A0A5C2G7N9	IGL c478_light_IGLV2-11_IGLJ3	137.8	3	57.3
200	Q8NI35	InaD-like protein	135.9	18	21.4
201	Q53RD9	Fibulin-7	135.1	6	34.4
202	A0A024R6A3	Presenilin	133.6	5	29.3
203	Q14678	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	132.4	13	22.5
204	Q8WZ74	Cortactin-binding protein 2	132.1	18	20.5
205	Q96I99	Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta_mitochondrial	132.0	7	33.3
206	Q86UD5	Sodium/hydrogen exchanger 9B2	129.2	10	39.9
207	H0Y9P0	Small ribosomal subunit protein RACK1	128.3	1	34.9
208	A0A5C2H0X4	IG c586_light_IGLV3-25_IGLJ2	127.7	1	26.6
209	Q7Z3K6-2	Isoform 2 of Mesoderm induction early response protein 3	127.2	8	35.9
210	A2RUU9	PCM1 protein	127.0	21	22.4
211	Q9BZQ8	Protein Niban 1	126.6	6	16.6
212	O43897	Tolloid-like protein 1	126.5	14	27.8
213	A0A223PYF0	MHC class I antigen	125.4	4	26.0
214	B4DNH4	cDNA FLJ57405_ highly similar to Delta-like protein	124.8	4	25.8
215	A0A804HIY0	Actinin alpha 1	124.3	2	30.3
216	Q69YH5	Cell division cycle-associated protein 2	122.6	11	20.0
217	Q00987-4	Isoform Mdm2-B of E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	122.5	2	22.0
218	Q96PC5	Melanoma inhibitory activity protein 2	122.2	12	15.4
219	Q15154	Pericentriolar material 1 protein	121.0	23	22.1

220	Q9BTE3-2	Isoform 2 of Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	120.8	6	30.0
221	Q9UJW8-3	Isoform 3 of Zinc finger protein 180	120.7	10	32.1
222	P82279	Protein crumbs homolog 1	120.1	16	26.7
223	A0A7S5C130	IGH c2258_heavy_IGHV1-69_IGHD5-18_IGHJ4	119.1	1	41.7
224	Q9C093	Sperm flagellar protein 2	118.4	14	14.6
225	A0A4P8D7G4	MHC class I antigen	117.8	2	17.0
226	Q9Y2K7	Lysine-specific demethylase 2A	117.2	19	27.4
227	O75521	Enoyl-CoA delta isomerase 2	116.9	6	31.5
228	Q8IZF5	Adhesion G-protein coupled receptor F3	116.7	5	15.5
229	E9PR86	Low density lipoprotein receptor class A domain containing 3	116.4	6	51.0
230	Q9NWH9	SAFB-like transcription modulator	116.1	9	16.2
231	Q9P2D6	Protein FAM135A	115.7	21	29.0
232	A0A5C2GIF3	IG c302_heavy_IGHV1-18_IGHD3-10_IGHJ5	115.7	3	46.7
233	Q92618	Zinc finger protein 516	115.2	11	26.6
234	A0A0J9YW50	Myosin XVB	114.4	9	15.7
235	Q9NRE2-2	Isoform 2 of Teashirt homolog 2	113.2	17	30.7
236	O75094	Slit homolog 3 protein	112.6	22	32.8
237	E9LY39	MHC class I antigen	111.6	1	13.3
238	B4E268	cDNA FLJ61542_ highly similar to Myosin-5C	111.4	7	45.3
239	O60674	Tyrosine-protein kinase JAK2	110.5	16	24.7
240	Q86YA3	5'-3' DNA helicase ZGRF1	110.4	17	18.9
241	Q96JM2-2	Isoform 2 of Zinc finger protein 462	109.8	19	21.3
242	A0A0S2PZM4	Bifunctional arginine demethylase and lysyl-hydroxylase JMJD6	109.2	6	33.8
243	Q9H6T3	RNA polymerase II-associated protein 3	108.8	7	24.1
244	Q14865	AT-rich interactive domain-containing protein 5B	108.6	8	15.6
245	A0A994J563	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3	108.1	1	11.6
246	A0A5C2G8P9	IGH c304_heavy_IGHV3-30_IGHD3-16_IGHJ1	108.0	2	30.4
247	F8VUW4	Plexin C1	107.9	4	67.0
248	Q9UI33	Sodium channel protein type 11 subunit alpha	107.9	25	30.3
249	B4DH28	Sodium channel protein	107.9	7	28.2
250	Q96HI0	Sentrin-specific protease 5	106.2	12	24.2
251	A0A5C2GDL1	IGH c61_heavy_IGHV1-3_IGHD1-26_IGHJ4	105.2	2	33.1
252	Q8IVT5	Kinase suppressor of Ras 1	104.9	17	33.4
253	B7Z4I6	cDNA FLJ55581_ highly similar to AF4/FMR2 family member 3	103.8	10	26.9
254	Q8IYD1	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B	103.5	3	12.6
255	A0A7S5C3A8	IGH c3112_heavy_IGHV1-2_IGHD3-10_IGHJ5	103.3	3	52.8

256	Q12888	TP53-binding protein 1	103.3	16	17.0
257	A0A2R8YDR3	TSC complex subunit 2	102.7	16	18.5
258	Q30171	Lymphocyte antigen	102.5	5	26.1
259	Q7Z589-4	Isoform 4 of BRCA2-interacting transcriptional repressor EMSY	102.3	12	23.5
260	Q6ZWH1	BRISC and BRCA1-A complex member 2	102.2	2	17.6
261	O94991	SLIT and NTRK-like protein 5	100.2	15	33.2
262	Q9H5I5-3	Isoform 3 of Piezo-type mechanosensitive ion channel component 2	100.0	11	27.4
263	Q5JSZ5	Protein PRRC2B	99.9	18	16.5
264	O15054-1	Isoform 1 of Lysine-specific demethylase 6B	99.6	14	24.1
265	A0A7S5C776	IGH c4000_heavy_IGHV1-18_IGHD1-26_IGHJ4	99.6	2	39.3
266	A0A494C0F1	ALMS1 centrosome and basal body associated protein	99.5	13	26.9
267	Q9NV88	Integrator complex subunit 9	99.4	6	14.6
268	Q2V2M9	FH1/FH2 domain-containing protein 3	99.0	21	30.2
269	M0QZQ3	Spectrin beta chain	98.5	32	29.7
270	P18084	Integrin beta-5	96.9	14	44.1
271	Q9H254-4	Isoform 4 of Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 4	95.3	33	27.7
272	Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	95.1	26	13.8
273	Q9UQ16	Dynamin-3	94.3	8	14.2
274	Q9NV58	E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A	94.3	12	27.2
275	P58397	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12	94.0	13	21.1
276	O95425-2	Isoform 2 of Supervillin	93.4	20	24.4
277	Q92824	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	93.4	35	39.1
278	A0A6B9VRK8	MHC class I antigen	92.9	3	19.3
279	O75420	GRB10-interacting GYF protein 1	92.7	14	24.9
280	Q9Y2K7-4	Isoform 4 of Lysine-specific demethylase 2A	92.6	14	38.1
281	Q5JSG7	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	92.5	32	38.4
282	Q8N720-3	Isoform 3 of Zinc finger protein 655	92.3	10	33.8
283	O94986	Centrosomal protein of 152 kDa	91.2	21	21.3
284	P51826	AF4/FMR2 family member 3	90.2	13	22.8
285	Q9BXR3	Endogenous retrovirus group K member 6 Pol protein	89.9	21	41.1
286	Q14139	Ubiquitin conjugation factor E4 A	88.8	16	26.3
287	P04070	Vitamin K-dependent protein C	88.2	5	39.3
288	O43497-18	Isoform 17 of Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G	87.3	20	26.0
289	Q6ZUX3	TOG array regulator of axonemal microtubules protein 2	87.2	13	28.0
290	B2RBI8	Zinc finger E-box-binding homeobox 1	87.1	8	17.6
291	Q5JTV8	Torsin-1A-interacting protein 1	86.6	8	27.1

292	Q2V2M9-4	Isoform 4 of FH1/FH2 domain-containing protein 3	86.5	19	26.2
293	O15016-2	Isoform 2 of Tripartite motif-containing protein 66	85.0	12	20.9
294	O95425	Supervillin	84.4	26	24.5
295	A0A6Q8PFM9	Ligand dependent nuclear receptor corepressor	83.4	10	36.2
296	Q96KG7	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 10	81.9	12	24.9
297	Q6ZRI6	Uncharacterized protein C15orf39	81.7	11	25.2
298	Q9NY46	Sodium channel protein type 3 subunit alpha	81.7	21	25.9
299	Q05BV3	Echinoderm microtubule-associated protein-like 5	80.7	16	22.7
300	Q92922	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	79.8	12	19.8
301	O14787	Transportin-2	79.4	9	24.4
302	B4DYQ1	cDNA FLJ57671_ highly similar to SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C member 1	78.3	10	17.9
303	O75891	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	77.8	8	21.6
304	Q5TDH0	Protein DDI1 homolog 2	77.0	6	33.1
305	Q9BYT8	Neurolysin_ mitochondrial	76.8	7	19.3
306	P48995	Short transient receptor potential channel 1	76.7	10	33.2
307	A0A0A0MSN4	Angiotensin-converting enzyme	76.1	10	19.6
308	Q9H089	Large subunit GTPase 1 homolog	74.9	10	28.4
309	A6NHR9	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	74.8	23	20.0
310	O14646	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1	74.4	20	21.7
311	Q9NW75	G patch domain-containing protein 2	74.2	7	18.9
312	Q9ULV0	Unconventional myosin-Vb	73.9	20	20.1
313	O75051	Plexin-A2	72.4	18	19.9
314	Q96J66	ATP-binding cassette sub-family C member 11	72.2	13	26.8
315	Q9C0C2	182 kDa tankyrase-1-binding protein	71.6	14	21.5
316	O43497-22	Isoform 21 of Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G	71.6	25	29.4
317	B4DR53	Anion exchange protein	71.5	17	32.3
318	Q9NWL6	Asparagine synthetase domain-containing protein 1	71.2	8	30.6
319	Q4V328	GRIP1-associated protein 1	70.3	10	20.2
320	A0A3F2YNX0	Protein transport protein sec16	69.2	20	22.1
321	A0A6Q8PGR8	Ligand dependent nuclear receptor corepressor	68.5	14	43.8
322	Q6P1J9	Parafibromin	67.8	6	16.9
323	O60522	Tudor domain-containing protein 6	67.7	22	19.5
324	A0A7I2V411	Cathepsin F	67.7	6	23.9
325	O60486	Plexin-C1	66.9	19	23.0
326	Q76FK4	Nucleolar protein 8	66.0	17	20.1
327	A0A1B0GVL4	Family with sequence similarity 193	63.8	17	23.7

		member A			
328	Q9NY46-2	Isoform 2 of Sodium channel protein type 3 subunit alpha	63.2	14	21.5
329	Q12774	Rho guanine nucleotide exchange factor 5	63.1	17	20.7
330	Q86VM9	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	62.7	13	18.8
331	P51793	H(+)/Cl(-) exchange transporter 4	61.5	10	30.9
332	Q9UHN6	Cell surface hyaluronidase CEMIP2	60.0	16	23.5
333	Q9Y6U3	Scinderin	59.2	13	34.4
334	Q3SYG4-4	Isoform 4 of Protein PTHB1	59.1	7	15.5
335	Q9P219	Protein Daple	58.4	25	24.9
336	P12107	Collagen alpha-1(XI) chain	57.8	22	24.1
337	Q6ZT12	E3 ubiquitin-protein ligase UBR3	57.4	14	19.1
338	Q92621	Nuclear pore complex protein Nup205	57.2	22	26.3
339	Q5TAX3	Terminal uridylyltransferase 4	56.8	23	29.1
340	O95239	Chromosome-associated kinesin KIF4A	56.7	17	22.6
341	Q8N1I0	Dedicator of cytokinesis protein 4	55.5	25	22.8
342	Q9NR80	Rho guanine nucleotide exchange factor 4	55.4	8	20.1
343	Q96JM4	Leucine-rich repeat- and IQ domain-containing protein 1	55.2	18	15.4
344	P20592	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	54.1	8	24.5
345	Q7L576	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	53.9	18	27.9
346	Q8N5Q1	Golgi-associated RAB2 interactor protein 5B 3	53.3	7	16.4
347	P12107-3	Isoform C of Collagen alpha-1(XI) chain	53.1	20	20.8
348	Q9ULD4	Bromodomain and PHD finger-containing protein 3	53.1	8	17.7
349	Q6YHU6	tRNA (32-2'-O)-methyltransferase regulator THADA	51.7	17	21.6
350	Q04656	Copper-transporting ATPase 1 4	51.4	13	17.7
351	P35789	Zinc finger protein 93	51.3	6	16.5
352	P29400	Collagen alpha-5(IV) chain	50.9	14	21.7
353	Q4UJ75	Putative ankyrin repeat domain-containing protein 20A4	50.6	9	16.8
354	Q12873	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3	50.5	19	22.2
355	A0A0F7G8J1	Plasminogen	50.1	9	18.8
356	O94953	Lysine-specific demethylase 4B	49.5	12	17.8
357	Q7Z7G8-3	Isoform 3 of Intermembrane lipid transfer protein VPS13B	48.3	15	23.3
358	Q8NDM7	Cilia- and flagella-associated protein 43	45.7	17	16.3
359	A0A0S2Z3W3	Beta-hexosaminidase subunit alpha	44.7	4	12.5
360	A0A9L9PYG2	Plasminogen	40.0	7	31.6
361	Q14028	Cyclic nucleotide-gated channel beta-1	38.3	11	17.7
362	Q27J81	Inverted formin-2	37.9	8	15.6
363	Q9HCM2	Plexin-A4 O	36.7	18	19.3
364	Q13615	Phosphatidylinositol-3_5-bisphosphate 3-phosphatase MTMR3	36.4	16	19.4

365	O75976	Carboxypeptidase D	34.2	14	18.2
366	P35749	Myosin-11	33.0	16	13.9
367	O15550	Lysine-specific demethylase 6A	25.4	7	13.1
368	A6NJY1	Putative SLC9B1-like protein SLC9B1P1	615.1	11	71.6
369	Q7Z4V5	Hepatoma-derived growth factor-related protein 2	25.3	10	28.9

