

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı**
bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HASTA
ÖRNEKLERİNİN İLERİ PROTEOMİK ANALİZ
YÖNTEMLERİ KULLANILARAK İNCELENMESİ**

SAİME SÜRMEN

**DANIŞMAN
PROF. DR. İLHAN YAYLIM**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Saime SÜRMEN



İTHAF

Hocama, anne&babama, kardeşime ve eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen, akademik yönüyle de bana çok destek olan, ilgisini ve sevgisini hissettiğim kıymetli Hocam İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

Eğitimimde emeği olan ve yine bu süreç içerisinde yardım ve desteklerini esirgemeyen başta Prof. Dr. Sadrettin Pençe Hocama ve Prof. Dr. Arzu Ergen Hocama, tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve çalışanlarına,

Her konuda bilgi ve tecrübesinden faydalandığımız samimi ilgisi ve desteğini sürekli hissettiğimiz Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Derya Büyükkayhan Hocama,

Çalışmalarımızda emeği geçen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi çalışanlarına ve İstanbul Medipol Üniversitesinin değerli yöneticilerine ve çalışanlarına,

Laboratuvar çalışmalarımızda bize gösterdikleri samimi desteklerini unutmayacağım Prof. Dr. Murat Kasap, Doç. Dr. Gürler Akpınar ve tüm laboratuvar ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu çalışma sürecinin başından sonuna her aşamasında bilgi, tecrübe ve sevgisini bizden esirgemeyen ve bize, tarif edemeyeceğim kadar emek veren çok kıymetli Hocam Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, TÜBİTAK ARDEB 1003 projesi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 115S113/215S091

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	3
2.2. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri	4
2.2.1. Sigara	4
2.2.2. Yaş	4
2.2.3. Mesleki ve Çevresel Karsinogenlere Maruziyet	4
2.2.4. Beslenme	5
2.2.5. Akciğer Hastalığı Öyküsü	5
2.2.6. Genetik Yatkınlık	5
2.3. Akciğer Kanserinin Patolojik Sınıflandırması	6
2.3.1. Adenokarsinom	7
2.3.2. Skuamöz Hücreli Karsinom	8
2.3.3. Büyük Hücreli Akciğer Karsinomu	8
2.3.4. Nöroendokrin Tümörler	9
2.4. Akciğer Kanseri Patogenezi ve Moleküler Değişiklikler	10
2.5. PROTEOMİK	18
2.5.1. Göreceli Kantitatif Proteomik	21
2.5.1.1. Etiketli Yöntemler	22
2.5.1.2. Etiketsiz Miktar Tayini (Label-Free Quantitation)	25
2.5.2. Bir Kütle Spektrometresinin Çalışma Prensibi Ve Temel Enstrümanları.....	26

2.5.3. Proteomik Çalışmalarda Kullanılan Bazı Kütle Spektrometreleri	28
2.5.4. Bottom-up Proteomik Yaklaşımına Göre Örnek Hazırlığı	31
2.5.5. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde LC-MS/MS Tabanlı Proteomik	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. GEREÇ	34
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar	34
3.2. YÖNTEM	36
3.2.1. Seçilen Örneklerin Tanımı	36
3.2.2. Deney Tasarımı	36
3.2.3. Doku Homojenizasyonu ve Protein Ekstraksiyonu:	38
3.2.4. Protein Miktarının Hesaplanması.....	39
3.2.5. İmmündepleksiyon	40
3.2.6. Triptik Peptit Eldesi:	41
3.2.7. Fraksiyonlama ve Temizleme	42
3.2.8. Optimizasyon Çalışmalarına ait Analizler	43
3.2.8.1. Nano Akış Sıvı Kromatografisi - MS/MS (NanoLC-MS/MS) Analizleri ...	43
3.2.8.2. ProteinLynx Global Server ile Verilerin Analizi:	44
3.2.9. Gruplar arası Karşılaştırmaların Yapıldığı Analizler.....	45
3.2.9.1. Nano Akış Sıvı Kromatografisi - MS/MS (NanoLC-MS/MS) Analizleri ...	45
3.2.9.2. Proteome Discoverer Programıyla Verilerin İşlenmesi	47
3.2.9.3. Biyoinformatik Yazılımlarla Proteinlerin Sınıflandırılması ve Protein Etkileşim Analizleri	47
3.2.9.4. PRM (Parallel Reaction Monitoring) Analizleri	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. NanoLC-MS/MS Analiz Verileri.....	48
4.2. Büyük Hücreli Akciğer Karsinomu Doku Gruplarının Protein Profiline ait Veriler	51
4.3. Serum Örneklerinin Protein Profiline ait Veriler	53
4.4. Serum ve Doku Protein Profillerinin Karşılaştırılması	56
4.5. Protein İfade Farklılıklarına ait Veriler.....	56
4.6. Protein Sınıflandırmalarına ait Veriler.....	59
4.7. Protein-protein Etkileşim Analizleri	61
4.8. PRM Analizlerine ait Sonuçlar	64

5. TARTIŞMA	78
KAYNAKLAR	95
HAM VERİLER	113
FORMLAR	130
ETİK KURUL KARARI	132
PATENT HAKKI İZNİ	135
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	136
ÖZGEÇMİŞ	137



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde LC-MS/MS Tabanlı Proteomik Çalışmalar	33
Tablo 3-1: Kullanılan Cihazlar	34
Tablo 3-2: Kullanılan Kit, Enzim ve Kimyasallar	35
Tablo 3-3: Kullanılan Diğer Sarf Malzemeler	35
Tablo 3-4: Serumdan Uzaklaştırılan En yüksek 12 Proteinin Listesi	40
Tablo 4-1: Tümör ve Kontrol Grubu Doku Örneklerinde Tanımlanan Protein ve Peptit Sayıları	51
Tablo 4-2: Serum Gruplarında Tanımlanan Protein ve Peptit Sayıları	53
Tablo 4-3: Sadece Büyük Hücre Karsinom Hastalarının Serum Örneklerinde Tanımlanan Proteinler	54
Tablo 4-4: Doku Ve Serum Gruplarında Ortak Bulunan Anlamlı İfade Farklılıkları	58
Tablo 4-5: Dokuda PRM Analizi Yapılan Proteinlerin Listesi	64
Tablo 4-6: Serumda PRM Analizi Yapılan Proteinlerin Listesi	64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Akciğerin Heterojen Mikroortamı.....	11
Şekil 2-2: Akciğer Karsinogenezi-Skuamöz hücreli karsinom.....	12
Şekil 2-3: Akciğer Kanserinde Genetik Değişimler	14
Şekil 2-4: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörünün Mekanizması	16
Şekil 2-5: Proteomikteki Çeşitli Araştırma Alanlarına Genel Bakış	18
Şekil 2-6: Bottom-up ve Top-down Yaklaşımları için Genel İş Akışı	20
Şekil 2-7: Nicel Proteomikte Temel Stratejilerin Sınıflandırması.....	22
Şekil 2-8: Bottom-up Proteomikte Kararlı İzotop Etiketleme Yöntemlerinin Şeması ...	24
Şekil 2-9: Q Exactive Kütle Spektrometresinin Şematik Gösterimi.....	30
Şekil 3-1: Proteomik Çalışmalara ait İş Akışı	37
Şekil 3-2: Homojenizasyona ait Görüntüler	38
Şekil 3-3: Elde Edilen Proteinlerin Konsantrasyon ve Kalite Tayini	39
Şekil 3-4: SYNAPT-G2-Nano ACQUITY Sistemi ile 3-Boyutlu Ayrımın Şematik Gösterimi	43
Şekil 3-5: Valf Geçişinin Şematik Gösterimi	44
Şekil 3-6: Kütle Spektrometresi – Sıvı Kromatografi Sistemi.	45
Şekil 3-7: Elektrospray İyonizasyon.....	46
Şekil 4-1: Total İyon Kromatogramı-Keşif Modu	48
Şekil 4-2: Total İyon Kromatogramı-PRM Modu	48
Şekil 4-3: Tekrarlı Analizler Arasındaki Örtüşme.....	49
Şekil 4-4: Örnek Konsantrasyonlarına ait Kutu-Bıyık Grafikleri.....	50
Şekil 4-5: Her Bir Grupta Ortak tanımlanan Protein ve Peptit Sayıları.....	52
Şekil 4-6: Her Bir Olguda Tanımlanan Protein Sayıları ve Numuneler arasındaki Benzerlik Oranları.....	52
Şekil 4-7: Serum Tümör Ve Kontrol Gruplarında Ortak Tanımlanan Toplam Protein ve Peptit Sayıları.....	53
Şekil 4-8: Serum ve Doku Örnek Setlerinde Tanımlanan Ortak Proteinler	56
Şekil 4-9: Tümör Doku Grubunda İfade Değişimi Görülen Proteinlere ait Volcano Plot Grafiği.....	57
Şekil 4-10: Doku ve Serum Örnek Setlerinde Ortak İfade Farklılığı Bulunan Protein Sayıları	57

Şekil 4-11: Doku Örnek Setinde İfade Değişimi olan Proteinlerin Sınıflanlandırması..	59
Şekil 4-12: Serum Örnek Setinde İfade Değişimi olan Proteinlerin Sınıflanlandırması	60
Şekil 4-13: Doku Proteinlerine ait Protein-Protein Etkileşim Ağı	61
Şekil 4-14: Serum Proteinlerine ait Protein-Protein Etkileşim Ağı.....	63
Şekil 4-15: PRM Analiziyle Elde Edilen Collagen alpha-1(VI) chain proteinine ait Görseller.....	65
Şekil 4-16: Collagen alpha-1(VI) chain proteinine ait Fragment İyon Kromatogramları	66
Şekil 4-17: PRM Analiziyle Elde Edilen Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 proteinine ait Görseller	67
Şekil 4-18: Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 proteinine ait Fragment İyon Kromatogramları.....	68
Şekil 4-19: PRM Analiziyle Elde Edilen Decorin proteinine ait Görseller.....	69
Şekil 4-20: Decorin proteinine ait Fragment İyon Kromatogramları	70
Şekil 4-21: Metalloproteinase inhibitor 1 Proteinine ait Bar Grafiği	71
Şekil 4-22: Isoform 4 of Extracellular matrix protein 1'e ait Bar Grafiği.....	72
Şekil 4-23: Insulin-like growth factor-binding protein 2'ye ait Bar Grafiği	73
Şekil 4-24: Collagen alpha-3(VI) chain proteinine ait Bar Grafiği	74
Şekil 4-25: Isoform 5 of Tenascin-X proteinine ait Bar Grafiği.....	75
Şekil 4-26: Adiponectin Proteinine ait Bar Grafiği	76
Şekil 4-27: Complement factor H-related protein 1'e ait Bar Grafiği	77

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

2DE	2 Boyutlu Jel Elektroforezi
AAH	Atipikal Adenomatöz Hiperplazi
ADIPOQ	Adiponektin
AIS	Adenokarsinom in situ
BHK	Büyük Hücreli Karsinom
CFHR1	Komplement Faktör H Reseptörü 1
COL6A1	Kolajen Tip 6 alfa-1
COL6A3	Kolajen Tip 6 alfa-3
DTT	Ditiotreitol
ECM	Hücre Dışı Matriks – Extracellular Matrix
ECM1	Hücre Dışı Matriks Proteini 1
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
FASP	Filtre Destekli Örnek Hazırlığı
FT-ICR	Fourier Dönüşümü İyon Siklotron Rezonansı
IAA	Iodoasetamid
ICAT	İzotopla Kodlanmış Afinite Etiket
IGFBP2	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein 2
IHK	İmmünohistokimya
ITRAQ	Göreceli Ve Mutlak Ölçüm İçin İzotop Etiketleme
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LC	Sıvı Kromatografisi
LIT	Doğrusal İyon Kapanı
LITQ	Doğrusal Üçlü Kuadropol
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MIA	Minimal İnvaziv Adenokarsinom
MS	Mass Spectrometry-Kütle Spektrometresi
MudPIT	Çok Boyutlu Protein Tanımlama Teknolojisi

PD	Proteome Discoverer
PLGS	ProteinLynx Global Server
PPI	Protein-protein Etkileşimi
PRM	Paralel Reaksiyon İzleme
PSM	Peptit-Spektrum Eşleşmesi
PTM	Post-translasyonel Modifikasyon
SILAC	Hücre Kültüründe Kararlı İzotopla Etiketleme
TIC	Total İyon Kromatogram
TIMP1	Metaloproteinaz İnhibitör 1 Proteini
TKİ	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TMT	Tandem Kütle Etiketli
TNC	Tenascin C
TNXB	Tenascin-X
TOF	Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü - Time Of Flight

ÖZET

Sürmen S. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hasta Örneklerinin İleri Proteomik Analiz Yöntemleri Kullanılarak İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2020.

Kütle spektrometrelerindeki son teknolojik ilerlemeler ve buna paralel olarak geliştirilen yöntemler, kompleks biyolojik numunelerdeki proteinlerin derinlemesine incelendiği geniş ölçekli çalışmalara imkan sağlamaktadır. Proteomik stratejilerdeki bu etkileyici gelişim sayesinde kanser biyolojisindeki anlayışımız da artmaktadır. Kötü prognoz sergileyen ve düşük sağkalım oranına sahip akciğer kanseri için çalışmalar, genel olarak erken tanı ve kişiselleştirilmiş tedaviye odaklanmıştır. Bu nedenle kütle spektrometresi tabanlı proteomik yaklaşımlar, daha etkili ve uygun tedavi için doku veya vücut sıvılarındaki hedeflenebilecek proteinlerin tespitinde modern ve umut verici teknolojiler olarak görülmektedir.

Bu amaçla çalışmamızda büyük hücreli karsinom (BHK) hastalarına ait klinik örneklerin geniş ölçekli proteomik analizleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle doku örnek setinin protein profili ortaya çıkarılmış ve ifade değişimi olan proteinler tespit edilmiştir. Daha sonra aynı hastalara ait serum örnekleri incelenmiş ve doku örnek setiyle ortak protein ifade farklılığı görülen proteinlerin PRM analiziyle doğrulaması yapılmıştır.

Yapılan informatik analiz sonrasında doku örnek setinde 6000'in üzerinde ve serum örnek setinde 500'ün üzerinde protein tanımlanmıştır. Gruplar arası değerlendirme sonrasında anlamlı ifade farklılığı olan tümör doku grubunda 503 ve BHK serum grubunda 52 protein tespit edilmiştir. Ayrıca 7 proteinin hem serum hem de dokuda benzer ifade değişimine sahip oldukları tespit edilmiş, elde edilen sonuçlar serum örneklerindeki tekrarlı PRM analizleriyle doğrulanmıştır.

Bu çalışma sayesinde diğer akciğer kanserlerinin yaygın görülen histolojik alt türlerinin aksine daha az çalışmaya rastlanılan büyük hücreli karsinom olgularında, MS tabanlı proteomik yaklaşımlar kullanılarak binlerce protein aynı anda hassas bir şekilde incelenmiş ve geniş kapsamlı veriler elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızın, BHK için yapılacak sonraki çalışmalara katkı sağlayacak önemli bir veri kaynağı olacağını değerlendirmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Proteomik, Kütle Spektrometresi, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, Etiketsiz Kantifikasyon, Paralel Reaksiyon İzleme

Bu çalışma, TÜBİTAK ARDEB 1003 projesi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 115S113/215S091

ABSTRACT

Sürmen S. Investigation of Non-Small Cell Lung Cancer Patient Samples Using Advanced Proteomic Analysis Methods. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. Phd Thesis. İstanbul. 2020.

Recent technological advances in mass spectrometers and methods developed in parallel allow large-scale studies in which proteins in complex biological samples are examined in depth. Thanks to this impressive development in proteomic strategies, our understanding in cancer biology is also strengthened. Studies have generally focused on early diagnosis and personalized treatment for the lung cancer which has poor prognosis and low survival rates. Therefore, proteomic approaches based on mass spectrometry are seen as modern and promising technologies in detecting possible target proteins in tissue or body fluids for more effective and appropriate treatment.

For this purpose, large-scale proteomic analyzes were carried out in clinical samples from large cell carcinoma (LCC) patients. Firstly, protein profile of tissue sample set was revealed and differentially expressed proteins were found out. Later, serum samples of the same patients were examined and proteins with common expression differences in tissue sample set were confirmed by PRM analysis.

Mass spectrometry analysis resulted in identification of over 6000 and 500 proteins in the tissue and serum sample sets, respectively. Among these proteins, 503 proteins in tissue sample groups, and also 52 proteins in serum sample groups were found to be statistically significant. In addition, 7 proteins were detected to have similar expression changes in both serum and tissue samples, and the results were confirmed by repeated PRM analysis in serum samples.

Lots of proteins were examined refinedly using MS-based proteomic approaches and comprehensive data were obtained in serum and tissue samples of the large cell carcinoma that was studied much less than the common lung cancer subtypes. Hereby, we are of the opinion that our study will be an important data source that will contribute to future studies for BHK.

Key Words: Proteomics, Mass Spectrometry, Non-Small Cell Lung Cancer, Label-Free Quantification, Parallel Reaction Monitoring

The present work was supported by the TUBITAK ARDEB 1003 project. Project No. 115S113/215091

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri, hastalığın önlenebilen başlıca risk faktörü bilinmesine rağmen, dünya genelinde kanser ölüm oranlarının önemli bir kısmına sahiptir. Akciğer kanserlerinin büyük bir çoğunluğunu ise adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere 3 ana grupta sınıflandırılan KHDAK oluşturur (1). Son on yılda KHDAK'nin tedavisinde umut verici ilerlemelere rağmen cerrahi müdahale en iyi tedavi edici seçenek olarak görülmekte ve en çok erken evre akciğer kanseri tanılarına uygulanabilmektedir. Çevresel risk faktörlerinin engellenemediği durumda hastalıkla mücadelenin yolu ise tanının erken konulabilmesi ve tedavi sürecinde prognoz tahmin edilebilmesidir (2, 3). Bu nedenle hastalığın erken tanısı üzerine çok sayıda çalışma yapılırken bazı çalışmalar da ilaç uygulamaları öncesinde hastaya özgü moleküler değişikliklere odaklanmıştır (4, 5).

Hücrel aktiviteden sorumlu biyomoleküller olan proteinler, aynı zamanda fizyolojik durumun ve bir hastalık sürecindeki değişimin belirteçleridir (6). Sağlıklı bir hücrenin neoplastik bir hücreye dönüşmesi sürecinde proteinlerin; ekspresyon, modifikasyon, aktivasyon ve lokalizasyon gibi çeşitli özellik ya da koşullarında önemli değişiklikler meydana gelir. Kanser genellikle sinyal yolları gibi çeşitli moleküler etkileşim ağlarındaki proteinlerin değişen koşulları ile ilişkilidir. Karsinogenezle birlikte bulundukları yolda değişiklik gösteren proteinler, terapötikler için potansiyel moleküler hedeflerdir ve bu tür proteinlere karşı inhibitör ilaçlar daha az toksik, daha etkili ve spesifiktirler. Hücre hatları, dokular ve plazma/serum gibi insan numunelerinin çeşitli kaynakları, yeni biyobelirteçleri ve tümör oluşum mekanizmalarına ait ilişkileri ve basamakları keşfetmek için farklı proteomik yaklaşımlarla incelenir. Proteomik çalışmaların sürekli güncellenen yöntem ve teknolojileri ile ortaya çıkardığı yeni keşifler, deneysel ve klinik olarak kanser biyolojisindeki anlayışımızı artırmaya devam etmektedir (7). Dahası bu alanın güçlü araçları olan kütle spektrometreleri, proteinlerin değişen bu durumlarının tespiti için modern ve gelecek vaadeden teknolojiler olarak görülmektedir (8). Daha önceleri sınırlı sayıda proteinin incelendiği proteomik çalışmaların aksine kütle spektrometreleri araştırmacılara çok daha büyük hacimli veriler sunmaktadır (9).

Bu sayede geçtiğimiz yıllar içerisinde yapılan proteomik çalışmalar; akciğer kanseri dahil çeşitli kanser türlerinin patogeneğinde görev alan mekanizmaları anlamak, erken aşamada ve doğru bir şekilde tespitine yardımcı olacak protein belirteçlerini tanımlamak, kanser hücrelerinin tedaviye yanıtını izlemek ve hedefe yönelik tedavilerde yeni terapötikler tasarlamak için literatüre katkıda bulunmuştur (10). Ancak oldukça heterojen bir kanser türü olan akciğer kanserinin alt türlerinin net bir şekilde ayrımını sağlayacak belirteçler yetersizdir. Bununla birlikte doğru teşhis ve etkili tedavi için sarfedilen yoğun çabanın çoğu, adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom alt türleri için harcanırken büyük hücreli karsinom için bu oran çok düşüktür (11-13).

Bu nedenle çalışmamızda öncelikle hastaların doku ve serum numuneleri kullanılarak büyük hücreli karsinom alt türü için geniş kapsamlı protein profili oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmamızın diğer hedefleri arasında MS-tabanlı profillemeye aşamasını takiben, etiketsiz kantifikasyon yöntemiyle protein ifade farklılıklarının ortaya çıkarılması ve bu ifade farklılıklarının doğrulamasının yapılması yer almaktadır. Hedeflenen çok sayıdaki proteinin keşfi ve gruplar arası ifade farklılıklarının ortaya çıkarılmasıyla çalışmamızın, KHDAK ve büyük hücreli karsinomda moleküler sürecinin anlaşılmasına ve protein belirteçlerin bulunmasına önemli bir katkı sağlayacağı, yapılacak sonraki çalışmalara bir öncü olarak hizmet edeceği düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Dünya genelinde milyonlarca insana tanısı konulan kanser, ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. GLOBOCAN 2018 verilerine göre yeni vaka sayısı 18.1 milyona ve kansere bağlı ölümler 9.6 milyona (melanoma dışı cilt kanseri hariç) yükselmiştir. Dünya nüfusunun %60'ının yer aldığı Asya kıtası yeni kanser vakalarının neredeyse yarısını ve kanser ölümlerinin ise yarısından fazlasını oluşturmaktadır (14). En yaygın ve ölümcül kanser türleri arasında yer alan akciğer kanseri de başta sigara kullanım alışkanlığı olmak üzere ülkelerin sosyoekonomik düzeyleri ve sağlık hizmetlerinin kalitesi gibi etkenlere bağlı olarak bölgeler arasında değişkenlik göstermektedir. Doğu Avrupa'ya yakın Asya ülkeleri en yüksek akciğer kanseri oranına sahipken Yemen ve Suudi Arabistan dahil bazı Orta Doğu ülkelerindeki insidans oranları dünya genelinin altında kalmaktadır. Her yıl güncellenen istatistiksel veriler akciğer kanseri insidansının erkeklerde azalma eğilimi gösterdiğini buna karşın sanayileşmiş ülkelerde gelişen sosyal ve kültürel sigara içme alışkanlıklarının, kadınlarda hastalığın insidansında artışa yol açtığını göstermektedir (15). Amerika'daki 2019 yılı yeni akciğer kanseri vakalarının erkeklerde 116.440 (%13) ve kadınlarda 111.710 (%13) olduğu rapor edilmiştir. Amerika'daki sigara bırakma kampanyalarının ve bununla birlikte erken teşhis ve tedavideki ilerlemelerin sonucu olarak ölüm oranının, erkeklerde 1990'dan 2016'ya % 48, kadınlar arasında 2002'den 2016'ya %23 azalmasına rağmen akciğer kanseri her iki cinsiyette en çok teşhis edilen ikinci kanser türüdür (16). Dünya nüfusunun %9'unu temsil eden Avrupa ülkelerinde ise 2018 yılında 3.91 milyon yeni vaka (melanom dışı cilt kanserleri hariç) ve 1.93 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşeceği tahmin edilmektedir. Bu verilere göre akciğer kanseri olan kadınlar tüm kanser vakalarının %8,5'ini, erkek vakalar %15,1'ini oluşturmaktadır. Akciğer kanserine bağlı ölüm oranları ise erkeklerde ilk sırada, kadınlarda ikinci sırada yer almaktadır (17).

Ülkemizdeki kanser kayıtları 1992 yılında ilk olarak İzmir'de, son olarak 2012 yılında İstanbul'da olmak üzere 14 farklı ilimizde açılan merkezler tarafından toplanmaktadır. Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan "Sağlık İstatistikleri Yıllığı" verilerine göre en sık görülen kanser türleri sıralamasında akciğer kanseri, erkeklerde (trakea ve bronş dahil) ilk sırada, kadınlarda beşinci sıradadır (18).

2.2. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri

Akciğer kanserlerinin nedenleri arasında sigara kullanımı ilk sırada yer alırken çevresel tütün dumanına maruziyetin de bu riski arttığı bilinmektedir. Bununla birlikte ailede akciğer kanseri öyküsünün olması, genetik yatkınlık, bulaşıcı ajanlar, mesleki kanserojen maruziyeti ve hava kirliliği gibi diğer faktörler de sigara/tütün kullanımından bağımsız veya bununla sinerjik olarak akciğer kanseri etiyolojisinde rol oynayabilmektedir (19).

2.2.1. Sigara

Dünyada akciğer kanseri vakalarının, erkeklerde % 80'inin ve kadınlarda % 50'sinin sigara içiminden kaynaklandığı tahmin edilmektedir (20). Akciğer kanseri riski ile ilgili genel bir çerçeve çizmek gerekirse hiç sigara kullanmayan erkek ve kadınlarda risk binde beşin altında kalırken eski kullanıcılar %5 civarında aktif kullanıcılar %10-16 ve yoğun kullanıcılar ise %18-25 aralığındadır. Sigara içilme süresinin ve günde içilen sigara miktarının artışı riski artırmaktadır. Sigaraya başlama ve bırakma yaşı, teneffüs derecesi, kullanım sıklığı, sigaranın katran ve nikotin içeriği gibi faktörler de hastalığa yakalanma riski açısından büyük önem taşımaktadır. Genç yaşta sigaraya başlanması, uzun yıllar kullanılması ve yüksek katran içerikli sigaraların tercih edilmesi akciğer kanseri riskini artırırken erken yaşta sigaranın bırakılması yaşa bağlı olarak riski azaltmaktadır (21-23). Ayrıca yapılan bir meta analiz sonucu, çevresel tütün dumanına maruziyet ile akciğer kanseri arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir (24).

2.2.2. Yaş

Yaşlılık, zaman içinde DNA hasarı ve telomerleri kısaltmayı içeren biyolojik faktörler nedeniyle kanser gelişimi ile ilişkili görülmektedir. Buna göre, Akciğer kanseri vakalarının yarısından fazlası 55-74 yaş arası bireyler olup tanı konma yaşı ortalama 70 kabul edilmektedir. Tespit edilen vakaların %40'ından fazlası 75 yaş üstü ve %10'u ise 55 yaşın altındadır (25).

2.2.3. Mesleki ve Çevresel Karsinojenlere Maruziyet

Asbest, silika, radon, polisiklik hidrokarbonlar ve çeşitli ağır metaller başta olmak üzere 12 farklı mesleki akciğer kanserojeni tanımlanmıştır. Bununla birlikte kirli hava, pişirme dumanı ya da iç mekan dekorasyonundan kaynaklanan formaldehit gibi iç ve dış mekanlarda bulunan karsinojenlere maruziyetin de riski artırdığı tespit edilmiştir (20).

2.2.4. Beslenme

Akciğer kanserinin beslenme ile ilişkisini gösteren çok sayıda meta-analiz yapılmış olsa da elde edilen bulgular tutarlılık göstermemektedir. Taze sebze ve meyvelerde bulunan özellikle flavonoid, Vitamin A-C-E, β -karoten ve diğer fitokimyasalların; antioksidan, antiöstrojenik ve antiproliferatif etkileri sayesinde akciğer kanserine karşı koruyucu olduğu yönünde çalışmalar vardır. Antioksidanların; DNA metilasyonunun düzenlenmesi, DNA hasarının onarılması ve detoksifiye edici faz-II enzimlerin (sitokrom P450) indüksiyonu üzerine etki ederek kansere karşı koruma sağladığı tahmin edilmektedir (26-28).

2.2.5. Akciğer Hastalığı Öyküsü

Vaka-kontrol ve kohort çalışmalarını içeren meta-analizlerle kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), tüberküloz, astım ve interstisyel fibroz ve asbestozis de dahil olmak üzere bazı akciğer hastalıkları, akciğer kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasında en güçlü ilişki, akciğer kanseri ile ortak risk faktörü olarak sigara kullanımını paylaşan KOAH'dır. Yapılan kohort çalışmaları, KOAH'ın özellikle erkeklerdeki artmış akciğer kanseri riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu risk amfizem ve kronik bronşit gibi spesifik KOAH fenotiplerine göre değişebilmektedir. Akciğer hastalıklarına bağlı olarak artmış risk için en olası açıklama, bu hastalıkların akciğer dokusu üzerinde inflamatuvar etkilere sahip olduğudur (29).

2.2.6. Genetik Yatkınlık

Hastalık riski, etiyolojik ajanların maruziyeti ile bu ajanlara dair bireysel duyarlılık arasındaki ilişkinin ortak sonuçlarını yansıtabilmektedir. Sigara kullanan kişilerde sadece %15 gibi bir oranla akciğer kanseri gelişirken, akciğer kanseri vakalarının %10-15'i hiç sigara kullanmayan bireylerdir.

Birinci derece akrabalarında akciğer kanseri öyküsü olması hiç sigara içmeyen bir kişi de bile hastalık riskini artırabilmektedir. Yüksek penetranslı düşük frekanslı genlerin incelendiği ailesel agregasyon çalışmaları göstermiştir ki ailede akciğer kanseri öyküsü olan kişilerde akciğer kanseri riski 2 kat artmaktadır (30).

Yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmalarıyla (GWAS) akciğer kanseri riskindeki farklılıkların açıklanmasına yardımcı olabilecek bazı kromozom bölgeleri tanımlanmıştır.

Çalışmalar tütün kaynaklı kanserojenlerin metabolizmasıyla büyük oranda ilişkili olan spesifik genler üzerine yoğunlaşmıştır. GWAS bulgularına göre akciğer kanseri ile önemli ölçüde ilişkili olabilecek 15q24-25.1, 5q15.33 ve 6p21 kromozomlarında üç ana yatkınlık lokusu tanımlanmıştır (31).

15q25 duyarlılık bölgesi, nöronal ve diğer dokulardaki nikotinik asetilkolin reseptörlerini kodlayan üç kolinerjik nikotin reseptör geni (CHRNA3, CHRNA5 ve CHRNB4) de dahil olmak üzere altı tanımlanmış kodlama bölgesi içermektedir. 15q25 lokusundaki varyantlar, tütüne bağımlılık derecesini, günde içilen sigara miktarını yine bunlara bağlı olarak sigara içme davranışını etkileyebilmektedir. Nikotinik asetilkolin varyant reseptörlerinin, nikotin duyarlılığında değişikliğe neden olması, tütün bağımlılığını arttırarak tütün karsinojenlerine daha çok maruziyete yol açabilir (32). 5p15 kromozom lokusundaki TERT (insan telomeraz ters transkriptaz) geni ise, telomer uzunluğunun kontrol edilmesinde, telomer replikasyonunda ve stabilizasyonunda önemli bir role sahiptir. TERT genindeki özellikle rs2736100 polimorfizmi ile uzun telomer uzunluğu ve akciğer adenokarsinomları arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (33). Bunlar dışında DNA tamir genleri (XRCC1, XPA, XPC ve XPD), interlökinleri kodlayan genler (IL-8,10) ve metalloproteazları (MMP-1,3,9) kodlayan genler üzerindeki bazı polimorfizmler, akciğer kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir (34-37).

2.3. Akciğer Kanserin Patolojik Sınıflandırması

Akciğer kanseri, klinikopatolojik olarak iki ana grup (KHAK ve KHDAK) altında toplansa da histolojik olarak sıklıkla adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom olmak üzere 4 ana tip karşımıza çıkar. Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomun bir araya toplandığı KHDAK, %80'lik bir oranla oldukça yaygın görülen bir grubu temsil etmektedir (38,39).

Akciğer kanseri, her alt tipte tanı ve tedavide anlamlı bir fark bulunan heterojen bir hastalık olması sebebiyle yapılan tanımlama, tedavinin etkinliği ile oldukça ilişkilidir. Pek çok ülkede akciğer kanserinin histolojik tiplemesi, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflamasına göre yapılmaktadır.

2004 yılı sınıflandırma sistemi, büyük hücre morfolojisine sahip tüm akciğer kanserlerini bir grupta toplamış ancak bu histolojik değişkenlerin biyolojik davranışlarını ele alamamıştır (40). 2015'te yayınlanan yeni sınıflandırmada ise büyük hücreli karsinom tanımında kapsamlı bir değişiklik yapılmış ve büyük hücreli nöroendokrin karsinomları, BHK'dan ayırarak KHAK ile birlikte nöroendokrin tümörleri altında yeniden sınıflandırılmıştır (41). BHK'nın daha spesifik patolojik durumlara göre yeniden sınıflandırılmasına; patolojik, genomik ve klinik ilerlemelerin birbirleriyle yaklaşması yol açmıştır. Daha kesin bir sınıflandırma sistemi hedefe yönelik tedaviler için gerekmektedir. Son yıllarda yaygınlaşan ileri moleküler araçlar, yeni genetik değişikliklerin tanımlanmasına ve bu sınıflandırma çabalarına yardımcı olmaktadır (42, 43). Bu bağlamda KHDAK tanısı alan hastaların tedavisinde son yıllarda önemli ölçüde değişiklikler olmuştur. Tedavide tümör histolojisine ve hedeflenebilir moleküler değişikliklere dayanan bireyselleştirilmiş bir yaklaşıma geçilmiştir (44).

2.3.1. Adenokarsinom

Akciğer kanseri vakalarının neredeyse yarısı için tanı konulan yaygın bir histolojik tiptir. Adenokarsinom, glandular farklılaşmaya sahip epitel tümörler olarak tanımlanır. Bu tümörlerin bir kısmında müsin üretimi gözlenirken büyük bir çoğunluğu TTF1 ve Napsin A gibi pnömosit belirteçlerini eksprese eder (45). Dünya Sağlık Örgütü'nün bu alt tip için yapmış olduğu 2015 yılı sınıflandırması, 2004 sınıflandırmasına kıyasla oldukça gelişmiş prognostik bilgiler sunmaktadır. Bu yeni sınıflandırma sistemi, adenokarsinomları klinik karar vermeyi etkileyebilecek morfolojik alt gruplara ayırır (46). Genel olarak adenokarsinomlar invazivlik derecelerine göre preinvaziv lezyonlar (Adenokarsinom in situ: AIS ve atipikal adenomatöz hiperplazi: AAH), minimal invaziv adenokarsinom (MIA) veya invaziv adenokarsinom olarak ayrılır. İnvaziv adenokarsinomlar ise neoplastik hücrelerin predominant büyüme paternine göre lepidik (önceki sınıflandırmada müsin olmayan broşiyoloalveoler adenokarsinom olarak tanımlanırdı), asiner, papiller, mikropapiller ve solid olarak beş gruba ayrılmıştır (47).

Lepidik patern olumlu prognoz ile ilişkilendirilirken, mikropapiller ve solid tipler daha agresif özellik gösterir. Solid tip adenokarsinomun, skuamöz ya da büyük hücreli karsinomu ile karıştırılabildiği bazı durumlarda müsin üretimi ya da TTF-1 ve napsin A'nın ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak incelenmesi tanıda yardımcı olabilmektedir (45).

2.3.2. Skuamöz Hücreli Karsinom

Skuamöz hücreli karsinom, tanı konulan akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %20'lik bir kısmında görülmekle birlikte bu oran, sigara içme davranışındaki farklılıklara bağlı olarak değişebilmektedir. Adenokarsinomdan farklı olarak skuamöz hücre karsinomu, predominant histolojik alt tiplerin prognostik önemine izin veren bir sınıflandırma sistemine sahip değildir. Geleneksel olarak keratinizasyon varlığı ve derecesiyle karakterizedir. Mevcut güncellenmiş sınıflandırma şemasında, bu histolojik grup keratinize edici, keratinize edici olmayan ve bazaloid (daha önceki sınıflandırmada büyük hücreli karsinomun bir varyantı olarak kategorize edilen) alt tiplere bölünmüştür. Ancak bu sınıflama hastalığın prognostik veya klinik önemi ile ilişkili değildir (39,46). Mikroskopik incelemede tümör histolojisi, karakteristik olarak keratinizasyon gösterir ve hücreler arası köprüler orta ila bol sitoplazmalı ve hücre çekirdeği hiperkromatiktir. Tümör hücreleri, glandüler yapı veya münasip üretimi olmaması sebebiyle adenokarsinomlardan ayrılırlar. Bununla birlikte adenokarsinom alt tiplerinin aksine bu alt sınıflandırma, sitotoksik kemoterapiye özgü direnç kazandıran farklı moleküler profildeki bazaloid skuamözler dışında belirgin bir prognostik özellik göstermezler. Morfolojik ayrımın net olmadığı durumlarda immünohistokimyasal olarak p63, CK5/6, p40 ve CK5 belirteçleri aranır (39).

2.3.3. Büyük Hücreli Akciğer Karsinomu

Akciğer kanserinin dört ana histopatolojik tümör alt tipinden biri olan büyük hücreli karsinomu genel olarak yüksek derecede agresif bir malignite türü olarak kabul edilir. Bu histolojik tip akciğer kanseri sınıflamasında ana tartışmalı konu olmuştur ve zaman içerisinde sınıflandırmasında değişikliklere gidilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) akciğer tümörlerinin 2004 sınıflandırmasına göre küçük hücreli karsinomun sitolojik ve mimari özelliklerinden yoksun ve ayrıca glandüler veya skuamöz farklılaşması olmayan KHDAK'leri olarak tanımlanmaktadır.

Bu tanıma göre kendine özgü histolojik özelliklere sahip olmayan ve “waste basket” olarak nitelendirilen BHK, çok sayıda KHDAK'lerinden oluşan bir alt grubu kapsamaktaydı.

Yeni WHO 2015 sınıflandırmasına göre ise BHK, küçük hücreli karsinom, adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinomun sitolojik, mimari ve immünohistokimyasal özelliklerinden yoksun farklılaşmamış bir KHDAK olarak tanımlanmaktadır (41, 48). Ayrıca bazaloid karsinom, rabdoid fenotip, büyük hücreli nöroendokrin karsinom ve lenfoepitelyoma benzeri karsinom gibi nadir görülen spesifik hücre tipleri artık BHK altında sınıflandırılmamaktadır. Bu yeni sınıflandırma sistemi, BHK vakalarının oranını önemli ölçüde azaltmıştır (12, 49). Güncellenen sınıflandırma, rutin histolojik özelliklere sahip olmayan akciğer kanserlerini ayırt etmek için genişletilmiş immünohistokimyasal (IHK) boyama kullanımının önemini vurgulamaktadır. Pnömosit belirteçlerini (tiroit transkripsiyon faktör 1 [TTF1] ve napsin A) ifade edenler solid yapıli adenokarsinom olarak ve skuamöz bir belirtece (p40, CK5/6 ya da p63) pozitif test verenler keratinize olmayan veya bazaloid skuamöz hücre karsinomu olarak sınıflanırken cerrahi olarak rezeke edilmiş tümörlerde bu belirteçlerin ekspresyonu olmayanlar (null immünofenotip) BHK olarak değerlendirilmektedir. Klinik olarak büyük hücreli karsinom, sigara kullanımı ile önemli ölçüde ilişkilidir ve tanı, daha farklılaşmış bileşenlerin dışlanması da gerektirdiğinden yalnızca cerrahi bir rezeksiyon yoluyla yapılabilir. Ancak yeni sınıflandırma ile birlikte BHK için tedavi rejimleri güncellenmemiştir ve halen önceki stratejiler önerilmektedir (12, 50, 51).

2.3.4. Nöroendokrin Tümörler

Akciğer nöroendokrin tümörleri düşük dereceli tipik karsinoid (TC), orta dereceli atipik karsinoid (AC), büyük hücreli nöroendokrin karsinom ve küçük hücreli karsinom (KHAK) olmak üzere dört ana histotipte sınıflandırılırlar. Tipik karsinoid daha uzun yaşam beklentisi ve tekrarlama süresi olan düşük dereceli bir malign tümör olarak kabul edilir. Atipik karsinoid daha agresif klinik seyirli, kısmen öngörüleemeyen klinik davranış gösteren ve tekrarlama süresi kısa olan, orta dereceli bir malign tümördür. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom ve küçük hücreli karsinom ise klinikopatolojik ve prognoz yönüyle benzerlik gösteren yüksek dereceli malign tümörlerdir (40, 52).

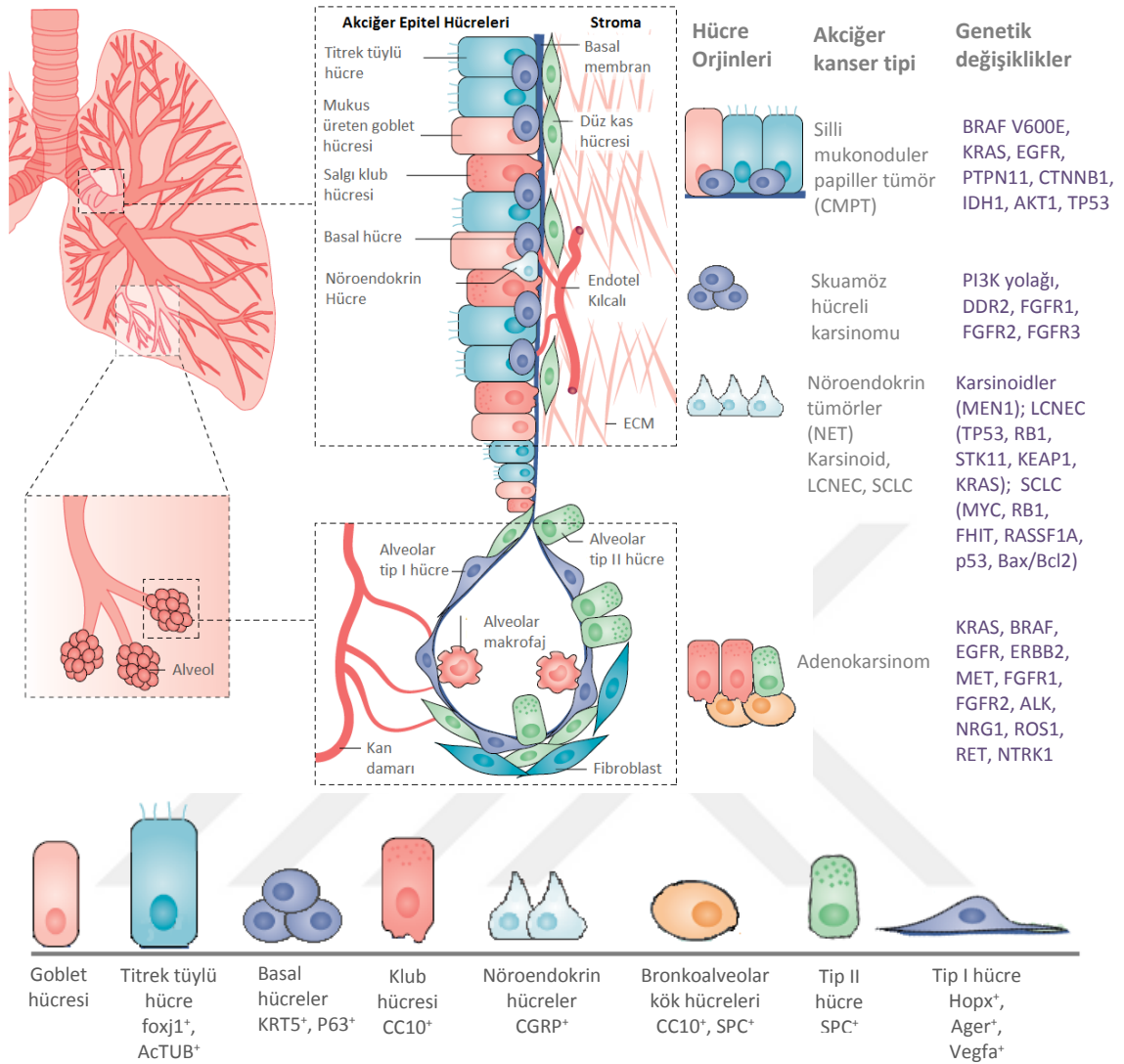
Bununla birlikte büyük hücreli nöroendokrin karsinomlar; daha büyük hücre büyüklüğü, bol miktarda sitoplazma, belirgin nükleoller, veziküler çekirdekler veya kaba kromatin ve fusiform bir şekil yerine bir poligonal de dahil olmak üzere histolojik kriterlere dayanan KHAK'den ayrılır (53). Kötü prognoza sahip büyük hücreli nöroendokrin karsinomlar nadir görülen bir akciğer kanseri alt grubudur. Bu histolojik tip nöroendokrin tümörlerin %15'ini ve tüm akciğer kanserlerinin %3'ünü oluşturur. 2004 yılı WHO sınıflandırmasına göre büyük hücreli karsinomun bir nöroendokrin varyantı olarak görülürken, şu anki 2015 WHO sınıflandırmasında bu tümörler artık nöroendokrin neoplazm içinde sınıflandırılmaktadırlar (54). CD56, sinaptofizin ve kromogranin yaygın olarak kullanılan nöroendokrin belirteçleridir (51).

2.4. Akciğer Kanseri Patogenezi ve Moleküler Değişiklikler

Akciğer kanseri klinik önemi olan ve histopatolojik olarak farklı alt tiplerden oluşan kompleks bir hastalıktır. Adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomlar akciğer kanserleri vakalarının çoğunluğunu oluşturur ve premalign histolojileri diğerlerine nazaran daha iyi tanımlanmıştır (55).

Akciğer kanserinin alt tipleri her ne kadar patogenezi açısından bazı benzerlikleri paylaşıyor da patogenezin anatomik yerleşimine ve kökenindeki hücrelere bağlı olarak, meydana gelen onkojenik değişiklikler çeşitlilik gösterebilir. Bu nedenle akciğer kanseri moleküler, hücresel ve histolojik düzeyde, heterojen bir malignite grubu olarak kabul edilir. Solunum yolu boyunca hücre çeşitliliğinin fazla olması, akciğer kanseri heterojenitesinin altında yatan önemli faktörlerden biri olarak gösterilmektedir.

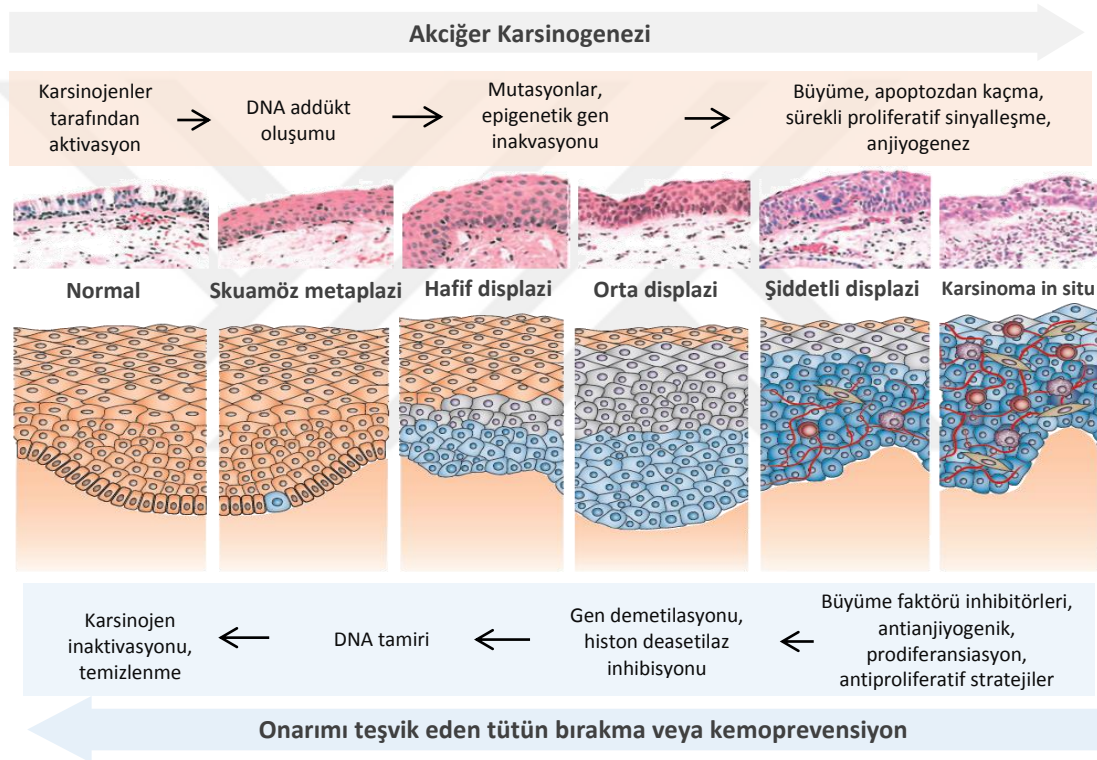
Akciğer dokusu hücrelerinin bileşimi proksimalden distale doğru değişir. Proksimal solunum yolu; titretilmiş tüylü hücreler, az sayıda klüp (klara) hücreleri, farklılaşmamış bazal hücreler, mukus üreten goblet hücreleri ve nöroendokrin hücrelerden oluşur. Distal hava yolu ise çoğunlukla alveolar tip I - II ve bronkoalveolar kök hücrelerinden oluşur (Şekil 2-1). Akciğer mikro-ortamındaki diğer hücre tipleri arasında düz kas hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri ve bağışıklık hücreleri (alveoler makrofajlar ve dendritik hücreler dahil olmak üzere) bulunur (56).



Şekil 2-1: Akciğerin Heterojen Mikroortamı

Proksimal-distal solunum yollarındaki farklı hücrelerden köken alan akciğer kanseri tipleri ve ilişkili genetik değişiklikler. Proksimal solunum yolları titrek tüylü hücreler, salgı klüp hücreleri, farklılaşmamış bazal hücreler, goblet hücreleri ve nöroendokrin hücrelerden oluşur. Distal solunum yolları alveolar tip I ve tip II hücrelerden oluşur. Akciğer mikroortamındaki diğer hücre tipleri arasında düz kas hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri immün hücreleri (alveolar makrofaj ve dendritik hücreler). Altorki (44,56)'den değiştirilerek.

Tüm akciğer kanserlerinin neredeyse yarıya yakınına oluşturan adenokarsinomlar, periferik bronşlarda ortaya çıkar ve histolojik olarak, glandüler görünümleriyle diğer akciğer tümör tiplerinden ayırt edilir. Bu histolojik tip, atipik adenomatoz hiperplazi (AAH) olarak bilinen öncü lezyon ya da premalign lezyon olarak başlar. AAH'nin tip II alveolar ile kulüp hücrelerden köken aldığı ve müsinöz olmayan bronkoalveolar karsinom başlangıcından önce meydana geldiği ileri sürülmüştür. Bunu takiben preinvaziv adenokarsinom in situ (AIS) ve minimal invaziv adenokarsinoma (MIA) gelişir ve son olarak lepidik bir patern gösteren invaziv adenokarsinoma izler (57).



Şekil 2-2: Akciğer Karsinogenezi-Skuamöz hücreli karsinom

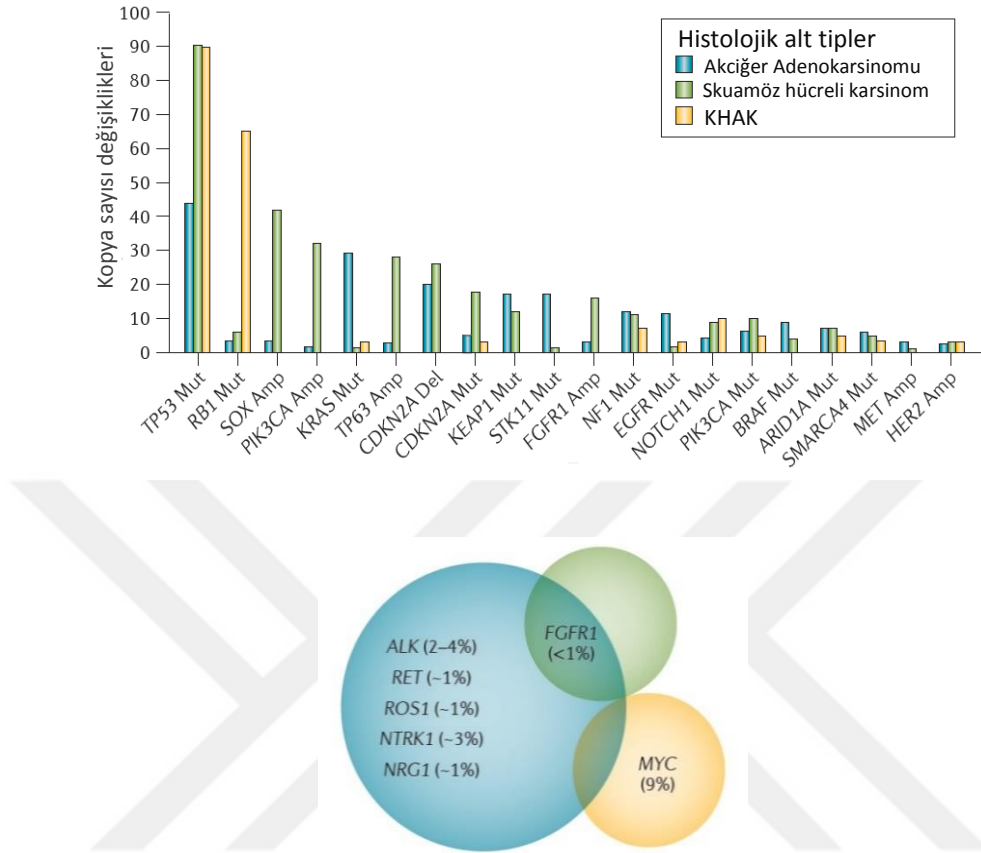
Tütün dumanı karsinojenik süreci tetikleyebilir. Bununla birlikte tütünün bırakılması ve kemoprevatif ajanlar onarımı teşvik edebilir ve ilerlemeyi engelleyebilir. Keith (55)'den değiştirilerek.

Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 25 ila % 30'unu temsil eden ve proksimal hava yolunda (ana bronşlarda) ortaya çıkan skuamöz hücre karsinomlarının ise bazal hücrelerden köken aldığı bilinmektedir. İnvaziv skuamöz karsinomdan önce sırasıyla hiperplazi, skuamöz metaplazi, displazi (hafif-orta ve şiddetli) ve karsinoma in situ şeklinde ilerleyen bir dizi patolojik değişiklikler meydana gelir (Şekil 2-2).

Skumöz hücreli karsinomların öncüleri olarak işlev gören metaplastik ve displastik skuamöz hücrelere dönüşmesinde büyük hava yollarındaki bazal hücrelerin sigara dumanına maruz kalmasının neden olduğu ileri sürülmüştür (3, 58). Bununla birlikte tüm invaziv akciğer malignitelerinin yaklaşık %20-25'ini nöroendokrin tümörler oluşturmaktadır. Büyük hücreli nöroendokrin, karsinoid ve küçük hücreli akciğer tümörlerinin de nöroendokrin hücrelerden köken aldığı tahmin edilmektedir. Diffüz tip idiyopatik akciğer nöroendokrin hücre hiperplazisi, karsinoid tümörlerin pre-invaziv lezyonları olarak bilinirken büyük hücreli nöroendokrin ve KHAK öncü lezyonları henüz bilinmemektedir. Büyük hücreli karsinomlar veya farklılaşmamış karsinomlar genellikle lenf bezlerine ve uzak bölgelere yayılır. BHK; skuamöz, büyük hücreli nöroendokrin, küçük hücreli veya adenokarsinomlarla histolojik özellik paylaşmaz. Bununla birlikte elektron mikroskobu analizleri, immünohistokimyasal yöntemler ve yeni nesil dizileme çalışmalarıyla elde edilen bilgiler ışığında, büyük hücreli karsinomların çeşitli hücre soylarından kaynaklandığı ve diğer histolojik tiplere dönüşebileceği ileri sürülmüştür (56).

Solunum yolu boyunca proksimal-distal dağılım gösteren akciğer kanserinin oldukça heterojen doğası, teşhis ve tedavi yönetimini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, akciğer kanseri biyolojisinin anlaşılması, erken tanının konulabilmesi ve hücre hedefli tedavilerin geliştirilmesi amacıyla akciğer kanseri alt tiplerinde meydana gelen moleküler değişiklikler çok yoğun bir şekilde araştırılmıştır (3, 56).

Normal epitel hücre fenotipinin malign fenotipe dönüşmesi, çevresel faktörlerin de etkisinin olduğu çok sayıda genetik ve epigenetik değişikliğin birikiminin nihai sonucudur. Kanser oluşumu ve gelişimi sürecinde büyüme sinyallerinde düzensizlik, DNA tamir mekanizmalarında hatalar, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu gibi hücresel olaylar meydana gelir (59). Akciğer kanseri genetiği üzerine yapılan araştırmalar, “Sürücü Mutasyonları” olarak da bilinen onkogenezi etkileyen çok sayıda mutasyonun keşfedilmesine olanak sağlamıştır (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: Akciğer Kanserinde Genetik Değişimler

En yaygın mutasyonlar – a. kopya sayısı değişiklikleri b. tranlokasyonlar Gridelli (61)’den değiştirilerek

Yapılan çalışmalarla büyümeyi teşvik eden onkogenlerin aktivasyonuna neden olan nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları, translokasyonları ve füzyonlarının yanı sıra tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olan allel kayıpları, mutasyonlar ve hipermetilasyonlar ortaya çıkarılmıştır (59-61).

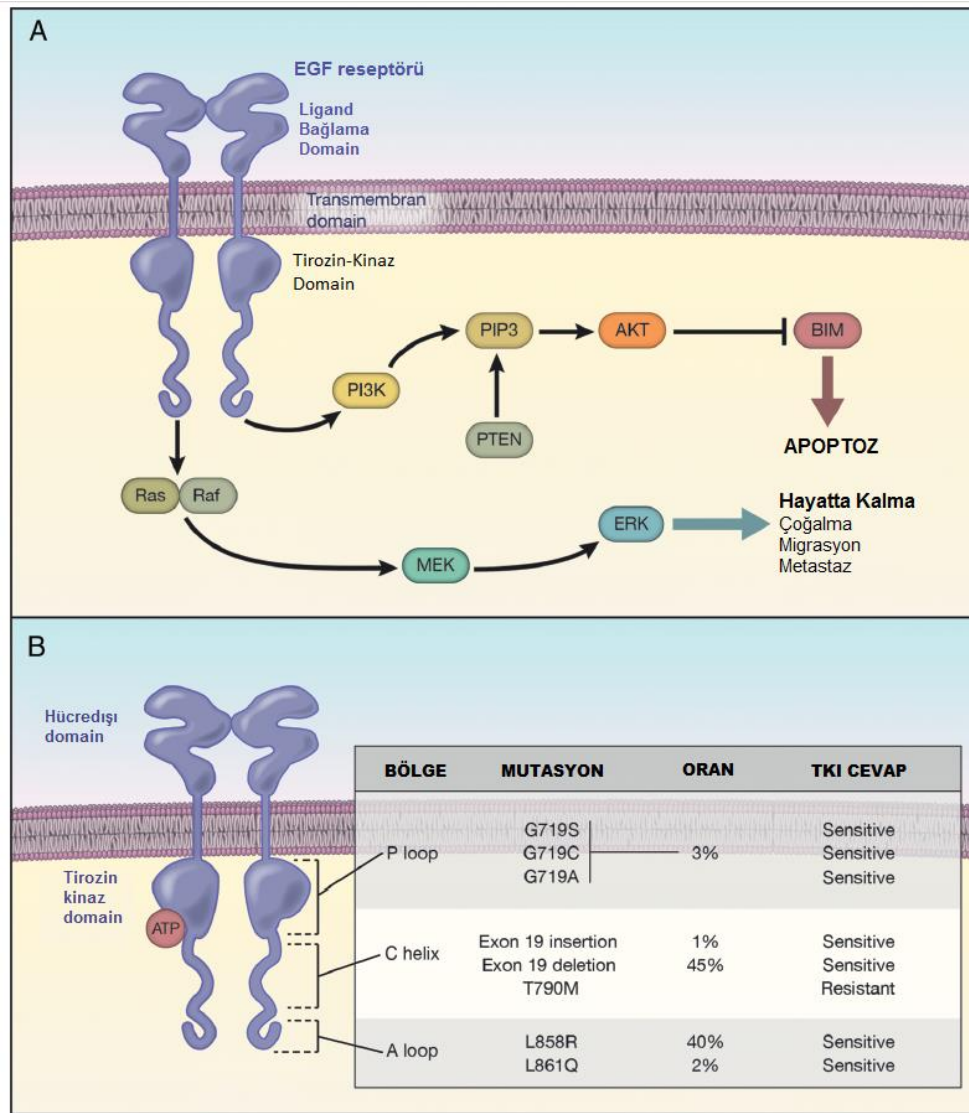
Akciğer kanserlerinde gözlenen sürücü değişikliklerine ait genel spektrum; KRAS, EGFR, BRAF, NF1 ve MET genlerinde mutasyonlar; ERBB2, MET, FGFR1 ve FGFR2 amplifikasyonları; ALK, ROS1, RET, NTRK1 ve NRG1 gibi füzyon onkogenlerinde translokasyonlar ve STK11 (serin teonin kinaz) p53, PTEN, retinoblastoma, p16 tümör baskılayıcı genlerinin inaktivasyonu şeklindedir (60, 62).

Meydana gelen mutasyonların bir kısmı sigara içme durumu ile yakın ilişkilidir. KRAS mutasyonlarının görülme sıklığı sigara içen bireylerde yüksek olup sigara içen hastaların %25-30'unda KRAS mutasyonu tanımlanmıştır. G12C eski ve mevcut sigara içicilerinde, G12D mutasyonu ise sigara içmeyen bireylerde sıklıkla görülen KRAS mutasyonlarıdır (63). Mutasyonlara bağlı olarak bozulan GTPase aktivitesi, protoonkogenik GTP-KRAS bileşiğinin daha yüksek sitoplazmik konsantrasyonlarına yol açarak çok sayıda efektörün aktive edilmesine neden olur. Bu ise hücrede proliferasyonu, migrasyonu, metastazı ve apoptozu düzenleyen RAS/RAF/MEK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarının aşırı aktivasyonuna neden olur. NRAS ise akciğer adenokarsinomlarında mutasyonun nadir görüldüğü diğer bir RAS ailesi üyesidir (62, 63).

EGFR, ERBB transmembran büyüme faktörü reseptör ailesinin bir parçasıdır. EGFR'de görülen mutasyonların %90'ını oluşturan ekson 19 delesyonları ve ekson 21'deki L858R nokta mutasyonları ligand bağlanmasından bağımsız olarak reseptörün yapısal aktivasyonuna neden olur (45). Aktivasyon üzerine bu reseptörler diğer ERBB üyeleriyle homo-heterodimerize olarak RAS/RAF/MEK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarını tetikler (62). Bu mutasyonlar genellikle sigara içmeyen ve kadın bireylerde yüksek oranda görülür. EGFR mutasyonlu tümörler gefitinib, erlotinib ve afatinib gibi EGFR tirozin kinaz inhibitörleriyle yapılan tedaviye yüksek derecede yanıt verebilirler. Bununla birlikte EGFR mutasyonu taşıyan hastaların tümör dokularında çeşitli direnç mekanizmaları rapor edilmiştir (Şekil 2-4). Bunlar arasında en iyi bilinen kazanılmış direnç mekanizması, ekzon 20'deki T790M EGFR mutasyonudur (45, 64).

EML4-ALK, sitoplazmada bulunan ve kinaz aktivitesine sahip kimerik bir proteini kodlayan bir füzyon genidir. EML4-ALK füzyonları, daha önce hiç sigara içmemiş veya hafif sigara içme öyküsü olan (<10 paket yıl) genç hastalarda ve bazı adenokarsinom alt tip tümörlerinde daha sık görülür. KIF5B ve TFG gibi ALK için daha az yaygın olan diğer füzyon ortakları da KHDAAK'da tarif edilmiştir (45).

Adenokarsinom ile ilişkili ROS1 geni yeniden düzenlemeleri de hafif ya da hiç sigara içmeyenlerde ve genç hastalarda tespit edilmiştir. RET geni, hücre çoğalması, göçü ve farklılaşmasını teşvik eden bir tirozin kinazı kodlar. Bu gendeki mutasyonlar akciğer adenokarsinomlarının %1-2'sini oluşturur. ALK ve ROS1'in yeniden düzenlemeleri gibi, RET füzyonları da sigara içme öyküsü, genç hastalar ve adenokarsinom histolojisi gibi klinikopatolojik özelliklerle ilişkilendirilmiştir (45, 65).



Şekil 2-4: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörünün Mekanizması

a. EGFR Sinyal Yolu. b. En yaygın EGFR mutasyonlarının yeri ve etkisi. Rooney (64)'den değiştirilerek.

Hücre dışından gelen sinyalleri hücre çekirdeğine iletmeye yardımcı olan BRAF; proliferasyon, farklılaşma, göç ve apoptoz gibi önemli hücre fonksiyonlarını düzenleyen RAS/MAPK sinyal iletim yolağının bir parçasıdır. Melanomdaki rolü ile daha iyi bilinen BRAF mutasyonları, akciğer adenokarsinomunun % 1-4'ünde görülür (45). Klinik öneme sahip V600E nokta mutasyonu (ekzon 15) başta olmak üzere, tanımlanmış birkaç mutasyonu (D594G, L596R, G465V ve G468A) vardır. En sık adenokarsinomlarda tespit edilen BRAF mutasyonlarının, eski ve mevcut sigara içicilerde görülme olasılığı daha yüksektir (45, 60).

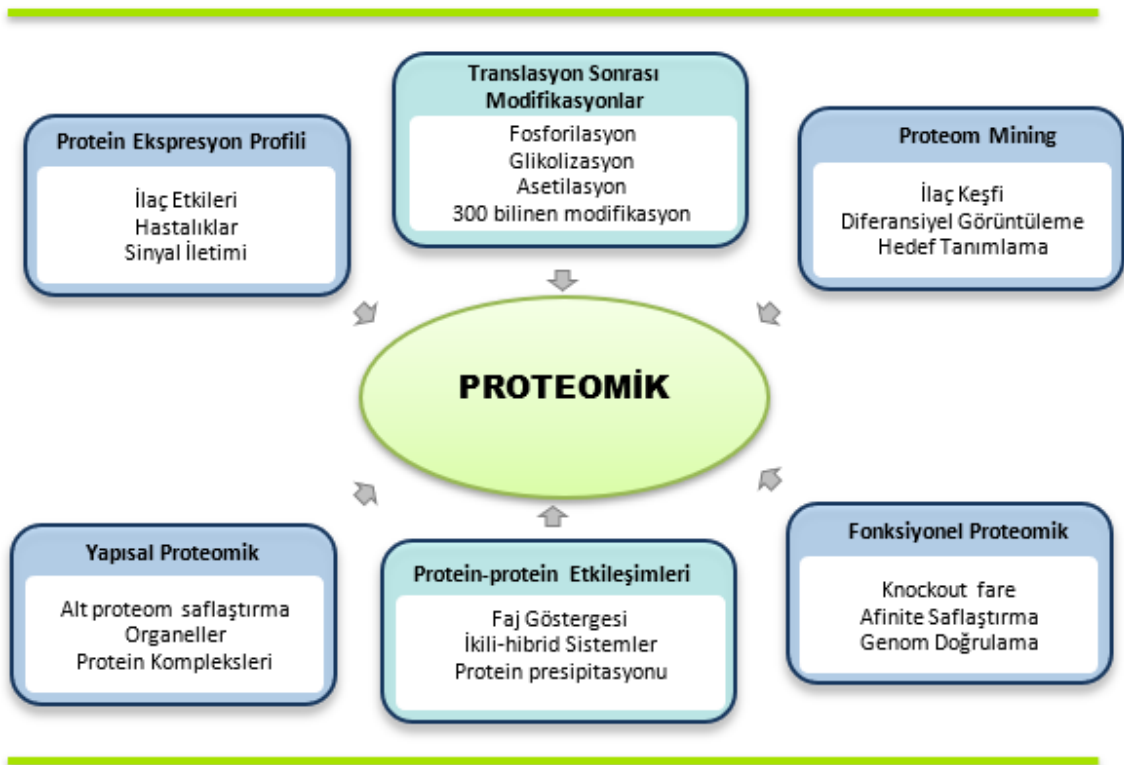
Fibroblast büyüme faktörü reseptörü-1 (FGFR1), MAPK ve PI3K yollarının aktivasyonu ile hücre çoğalmasını düzenleyen başka bir membran reseptör tirozin kinazdır. FGFR1'de meydana gelen amplifikasyon skuamöz hücreli karsinomların yaklaşık %15-20'sinde tespit edilirken adenokarsinomlarda yaygın değildir. MET amplifikasyonu ise tedavi edilmemiş KHDAK'nin %2-4'ünde saptanırken bu oran TKI'lere direnç geliştirmiş olan EGFR pozitif kanserlerde %20'ye çıkmaktadır (65).

Onkogen aktivasyonu ile birlikte tümör gelişimine katkı sağlayan tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonel duruma gelmesi; allel kayıpları (p53: 17p13, p16: 9p21, RB: 13q12, PTEN: 10q22), mutasyonlar (LKB1, p53) ya da epigenetik mekanizmalar (p16 hipermetilasyonu) aracılığıyla gerçekleşir. Hasarlı DNA veya stres, DNA tamiri veya apoptozu başlatmak için siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin ekspresyonunu indükleyerek hücre döngüsünün durdurulmasına yol açan TP53'ü uyarır. Küçük hücreli karsinomların % 70-80'inde ve KHDAK'nin yarısında TP53'ün inaktivasyonu söz konusudur. Bu nedenle TP53 lokusunu içeren 17p13'ün homozigot delesyonu akciğer kanserinde önemli genetik anormalliklerden biri olarak görülür. Sigara ile ilişkilendirilen TP53'ü mutasyonlarının çoğunlukla DNA-bağlanma domainindeki yanlış anlamlı mutasyonları olduğu bildirilmiştir (60, 66). P16 (INK4A) ve RB (retinoblastom) akciğer kanserinde yaygın olarak mutasyonların tespit edildiği diğer önemli tümör baskılayıcı genlerdir. Bu genin kodladığı RB proteini E2F1 transkripsiyon faktörüne bağlanarak hücre döngüsü G1/S geçişini düzenler. INK4A ise RB proteininin siklin D1'e bağlı fosforilasyonunu inhibe eder, böylece G1/S kontrol noktası boyunca hücre döngüsü geçişini önler. KHDAK'lerinin %80'inde p16'nın ve %10-15'inde RB'nin inaktivasyonu söz konusudur. PTEN, LKB1, CDKN2A, FHIT ve RASSF1A akciğer kanserlerinde inaktive olan tümör baskılayıcı genler arasındadır (60).

Akciğer kanseri etiyolojisinde tümör baskılayıcı genlerin susturulması ya da onkogenlerin aktivasyonu yoluyla rol oynayan, çeşitli epigenetik modifikasyonların olduğu bilinmektedir. miRNA promotor bölgesindeki CpG adalarının metilasyonu, en sık bildirilen epigenetik modifikasyon olup mir-9, 34s, 124, 125, 126, 127, 137, 148, 152, 193, 375, 487, 503, 886 ve 1258 gibi miRNA'ların metilasyonu akciğer kanserinde rapor edilmiştir (67).

2.5. PROTEOMİK

Genomik yaklaşımın sınırlamalarını tamamlayan proteomik yaklaşımlar, geniş ölçekli kanser çalışmalarında kullanılan önemli bir araştırma alanıdır. Proteomik analizler, kanser tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesi konusunda genomik ve transkriptomik analizlere önemli katkılar sağlamaktadır. Ancak bazı mRNA dizileri kodlayıcı değildir ve herhangi bir protein ürününe yol açmaz. Bununla birlikte elde edilen mRNA verileri, kodlanmış proteinlerin bolluğunu ve fonksiyonel durumunu tam olarak yansıtamamaktadır. Sonuçta hastalık gelişiminin altında yatan mekanizmanın belirlenmesi için hücre durumunu daha net şekilde yansıtacağı düşünülen protein analizlerine de ihtiyaç vardır (68, 69).



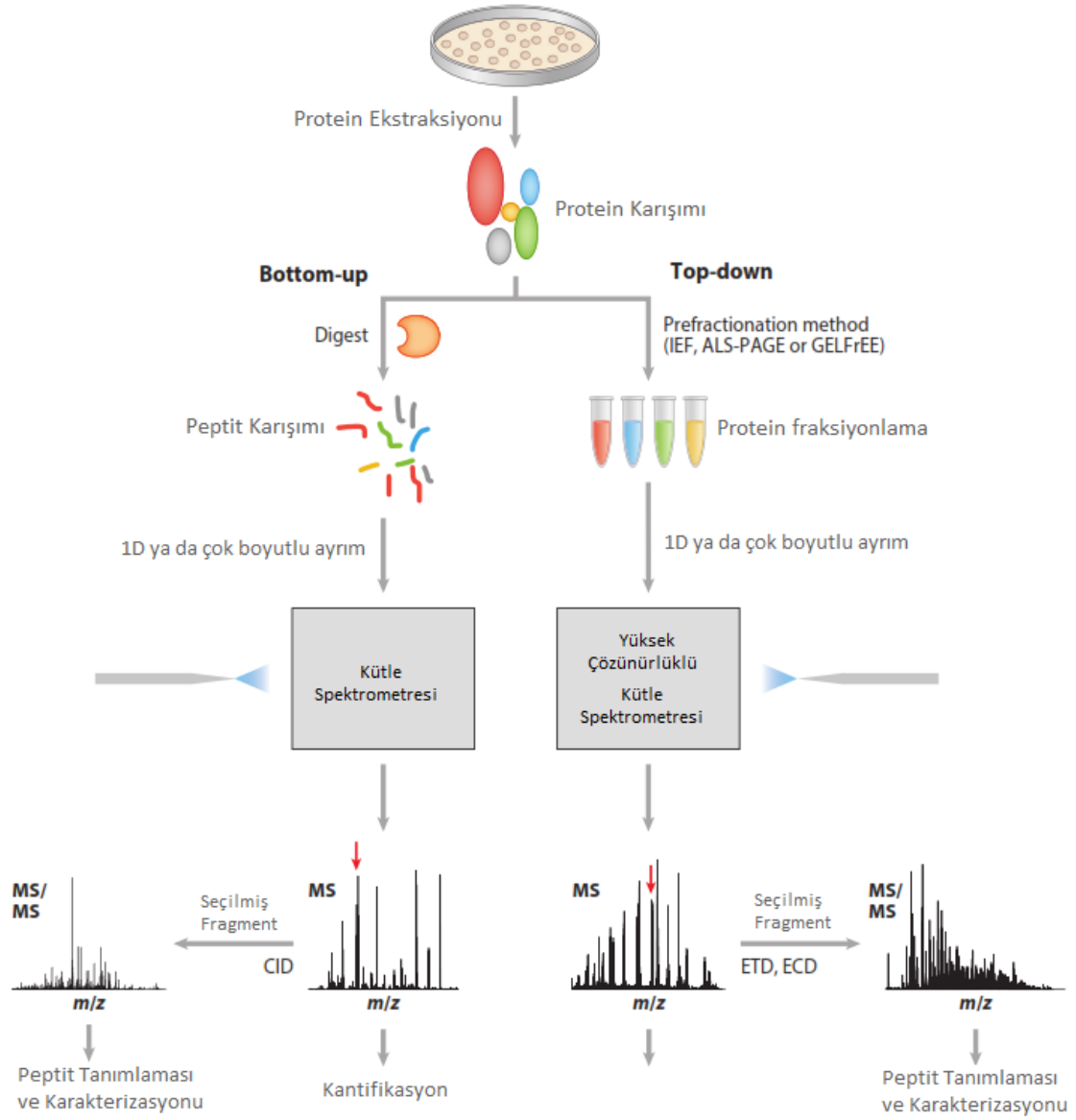
Şekil 2-5: Proteomikteki Çeşitli Araştırma Alanlarına Genel Bakış

Proteomik günümüz araştırmalarında biyoloji, kimya ve biyokimya gibi temel doğa bilimlerini birleştiren önemli, disiplinlerarası bir alanı temsil etmektedir. Proteomik çalışmaların temel amacı, hücre, doku veya organizmada, düzenleyici mekanizmayı ayrıntılı olarak açıklayabilmek için, hastalık nedenleri hakkında kapsamlı bir genel bakış elde etmektir. Marcus (71)'dan değiştirilerek.

1990'ların ortalarında Marc Wilkins tarafından önerilen “Proteom” terimi, belirli bir zamanda bir hücre, doku ya da organizmaya ait tüm protein profilini ifade etmektedir. Proteomik ise protein profillerinin bir bütün olarak incelendiği analizleri ifade eden bir terim olarak kullanılmaktadır (70). Proteomik; biyoloji, kimya ve biyokimya gibi temel bilimleri birleştiren birçok dalda araştırma alanına sahiptir (Şekil 2-5). Proteomik analizlerle protein lokalizasyonlarının, modifikasyonlarının, fonksiyonlarının ve birbirleriyle etkileşimlerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Ancak bir doku, hücre ya da organizmanın proteomu, genomun aksine fizyolojik ve patolojik koşullar altında değişkenlik göstermektedir. İnsan proteomu, gen anlatımı sonrasında gerçekleşen modifikasyonlar nedeniyle genomun içerdiği protein kodlayıcı gen sayısından çok daha fazla (geniş ve dinamik bir protein aralığına sahiptir) sayıda protein içermektedir (68, 71).

Günümüzde proteinlerin tanımlanmasına ve yapılarının, işlevlerinin ve proteinlerin diğer moleküllerle olan etkileşimlerinin ortaya çıkarılması amacıyla yardımcı olacak “Bottom-up” ve “top-down” proteomik yaklaşımları benimsenmiştir (Şekil 2-6). Top-down yaklaşımda, proteinlere proteolitik sindirim uygulanmaz ve intakt olarak karakterize edilir. Bottom-up ise proteinlerin belirli bölgelerden kimyasal ya da enzimatik olarak sindirilmesiyle elde edilen peptitlerin analizlerine dayanan bir yaklaşımdır. Kompleks biyolojik örneklerdeki insan proteomunun dinamik protein aralığı (farklı protein konsantrasyonlarının geniş dağılımı) nedeniyle kullanılan yöntemler çok adımlı süreçlerden oluşmaktadır (69).

Proteomik çalışmalar, "birinci nesil" proteomik olarak adlandırılan iki boyutlu jel elektroforezi (2DE) sistemlerinin kullanılmasıyla başlamıştır (72). Son yirmi yılda ise proteomik alanındaki hızlı ilerlemeler ve gelişen teknoloji sayesinde, kompleks biyolojik örneklerden elde edilen proteinlerin daha hassas bir şekilde tanımlanmasını sağlayacak yüksek teknolojiye sahip enstrümanlar ve teknikler geliştirilmiştir. Kütle spektrometrelerinin proteomik çalışmalarda kullanılması ve bu teknolojinin jelli sistemlere entegrasyonu sayesinde hem hedefe yönelik proteomik analizler hem de global proteomik analizler yapılabilmektedir (10, 73, 74).



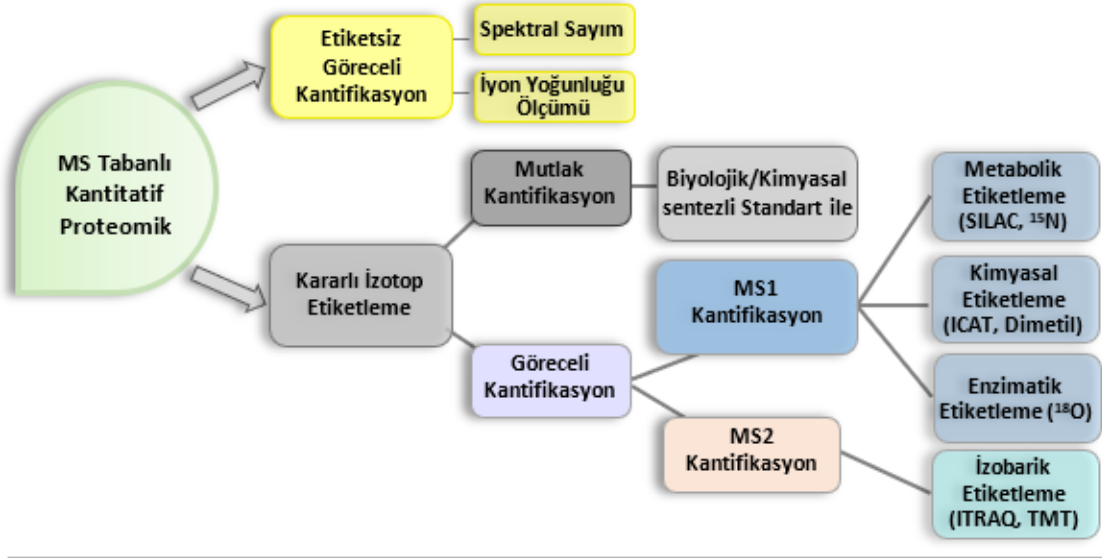
Şekil 2-6: Bottom-up ve Top-down Yaklaşımları için Genel İş Akışı

Her iki yaklaşım da proteinlerin izolasyonu ile başlar. Bottom-up yaklaşımda tripsin gibi bir endopeptidaz ile peptitlerin sindirimi gerçekleştirilir. Numune karmaşıklığının azaltılması amacıyla her iki yaklaşımda da farklı boyutlarda (1D-2D-3D) ayırım yapılabilir. Zhang (69)'den değiştirilerek.

2.5.1. Göreceli Kantitatif Proteomik

Proteomun zamanla nasıl değiştiğini ölçebilmek sistem biyolojisinde önemli bir ilerleme olacaktır. Ancak proteom son derece dinamiktir ve hücre biyolojisinin anlaşılmasını sağlayacak verileri oluşturabilmek için binlerce proteini tek bir çalışmada karakterize etmek gerekir. Bu amaçla sıvı kromatografinin kütle spektrometreleriyle birleştirilmesi ve çok boyutlu protein tanımlama teknolojisinin (MudPIT) ortaya çıkışı serum ya da doku gibi kompleks numunelerde çok sayıda proteinin tanımlanmasına olanak tanımıştır. Proteinlerin tanımlanması, kantitatif analizlerinin yapılması ya da farklı fizyolojik veya patolojik durumdaki hücrelere ait proteomların karşılaştırılması; MS/MS spektrumlarının peptit dizileri şeklinde okunması ve elde edilen verilerin bilgisayar yazılımları kullanılarak veritabanlarında araştırılmasıyla gerçekleştirilmektedir (69, 75-77).

MS cihazlarıyla daha kısa sürede güvenilir analizler yapılabilmesi amacıyla etiketsiz tekniklerin yanı sıra kararlı izotop etiketleme yöntemleri de geliştirilmiştir (Şekil 2-7). Günümüzde kütle spektrometresi tabanlı kantitatif protein tayininde farklı avantaj ve dezavantajlarından dolayı etiketli ve etiketsiz yaklaşımların her ikisi de kullanılmaktadır (78). Kütle spektrometresi kullanılarak kararlı izotoplar ile yapılan kantifikasyon, etiketli ve etiketsiz iyonlar arasındaki kütle farkına dayanır. Numunelerin karıştırılmasından sonra, izotop varyantları arasındaki sinyal yoğunlukları oranı, miktarları arasındaki kat farkını yansıtır. Bir kütle spektrometresi tarafından tanınabilen ve aynı zamanda kantifikasyon için temel oluşturan spesifik kütle etiketleri metabolik katılım yoluyla, kimyasal ya da enzimatik olarak protein veya peptitlere dahil edilebilmektedir. Metabolik etiketlemenin yapıldığı SILAC gibi (Hücre kültüründe kararlı izotopla etiketleme) ve kimyasal etiketlemenin yapıldığı ICAT (izotopla kodlanmış afinite etiketleri), TMT (Tandem kütle etiketleri) ve ITRAQ (göreceli ve mutlak ölçüm için izotop etiketleme) gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (69, 79).



Şekil 2-7: Nicel Proteomikte Temel Stratejilerin Sınıflandırması

Kantitatif proteomik etiketli ve etiketsiz olarak temelde ikiye ayrılır. SILAC, ITRAQ ve TMT yaygın kullanılan etiketleme yöntemleridir. Zhang (82)'den değiştirilerek.

2.5.1.1. Etiketli Yöntemler

- **Metabolik Katılım ile Etiketleme**

Proteinlerin metabolik olarak etiketlenmesinde, kararlı bir izotop bakımından zenginleştirilmiş besiyeri ya da diyetle besleme sistemi kullanılır. Kararlı izotop atomları, protein döngüsü ve protein sentezi vasıtasıyla hücre proteomuna dahil edilir (80).

Hücre Kültüründe Kararlı İzotoplarla Etiketleme (SILAC):

SILAC, doğal (hafif) amino asitleri içeren hücre popülasyonu ile kararlı izotop etiketli (ağır) esansiyel amino asitleri içeren hücre popülasyonu proteomlarının karşılaştırılması esasına dayanır (Şekil 2-8). Memeli hücreleri tarafından sentezlenemeyen arginin ve lizin esansiyel amino asitleri (genellikle $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -lizin ve $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -arginin) metabolik olarak işaretlenir. Hücre besiyerine eklenen ^{13}C ve ^{15}N ile işaretlenmiş (ağır) aminoasitler, 6-8 pasaj sonrasında hücrelerdeki sırasıyla normal (hafif) olan arginin ve lizin amino asitleriyle tamamen yer değiştirir. Etiketli (ağır olan) ve etiketsiz aminoasitleri içeren numuneler birbiriyle karıştırılarak arginin ve lizin amino asitlerini karboksil terminalinden kesen tripsin enzimi ile sindirim gerçekleştirilir.

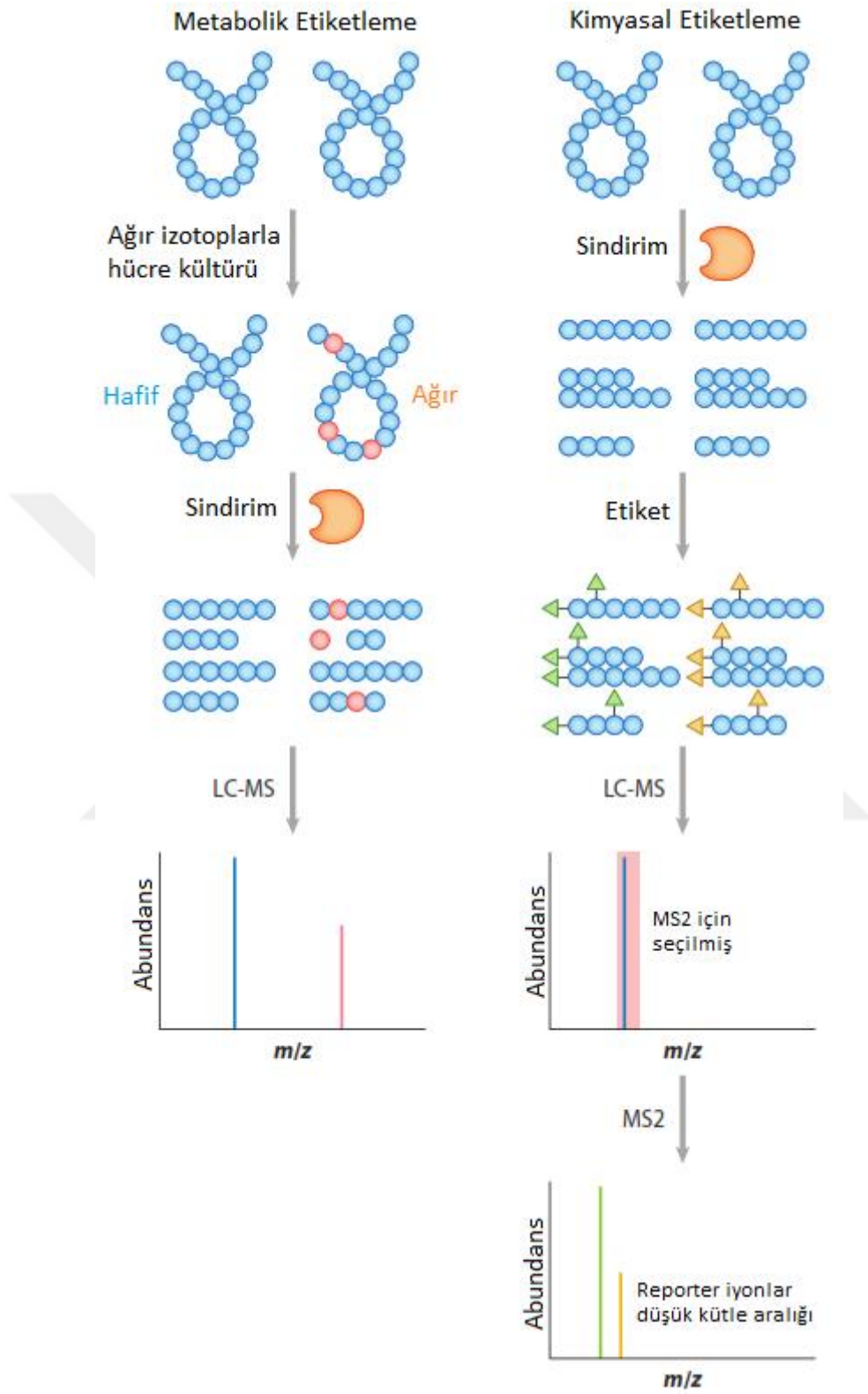
Böylece bir proteine ait tüm triptik bölünme ürünleri (C-terminal peptitler hariç), en az bir etiketli amino asitten oluşur. MS sürecinde aminoasitlerin kütle spektrometreleri karşılaştırılırken $^{13}\text{C}_6$ / $^{15}\text{N}_4$ -arjinin etiketli peptitler için sırasıyla 6 ve 4 Da kütle kayması olur. İki numune arasındaki göreceli protein miktarı, 'hafif' ve 'ağır' peptitler arasındaki iyon yoğunluğu oranının karşılaştırılmasıyla elde edilir. İyon yoğunluğunun aynı anda ölçülmesi, sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrisinin performansındaki farklılıkları ortadan kaldırarak deneysel hataları azaltır (80,81). Klasik SILAC yöntemiyle tek bir LC-MS çalışmasında iki ya da üç numune karşılaştırılırken, dahili standartların kullanıldığı süper-SILAC yönteminin geliştirilmesi daha çok örnekte karşılaştırma yapma imkanı sunmuştur. SILAC yöntemi daha da geliştirilerek maya, zebrafish, bakteri, yuvarlak solucan, meyve sineği ve fare gibi organizmalara uygulanmıştır. Ancak kültüre hücrelerin metabolik hızı, fare ve sıçan gibi memelilerden çok yüksektir ve güvenilir bir çalışma için etiketleme oranının % 100'e yakın olması gerekir. SILAC yöntemi, etiketlemenin tam olamaması riskine karşın, hayvan deneylerinde nadiren de olsa kullanılır (82, 83).

- **Kimyasal Etiketleme**

ICAT, TMT ve iTRAQ etiketleme stratejilerinde proteinler, tiol- ve amin- içeren aminoasit kalıntılarından yapısal olarak özdeş fakat farklı molekül ağırlığına sahip etiketlerle işaretlenirler. Sonuçta benzer olan fakat farklı kütlelere sahip peptitler karşılaştırılır (84).

İzotopla İşaretlenmiş Afinite Etiketleme (ICAT):

İzotopla kodlanmış afinite etiketleme (ICAT) tekniğinde proteinlerdeki sistein amino asitinin sülfidril grupları, hafif (C_{12}) ve ağır (C_{13}) ICAT reaktifleri kullanılarak işaretlenir. ICAT ile sadece sistein içeren peptitlerin etiketleniyor olması, peptit karışımının karmaşıklığını önemli ölçüde azaltabilir. ICAT yöntemi bu sayede kompleks numunelerin analizini basitleştirerek düşük miktarda bulunan proteinlerin değerlendirilmesine olanak sağlar. Ancak bu yöntem, sistein kalıntılarından yoksun peptitleri tespit edemediğinden geniş ölçekli kantifikasyon çalışmalarındaki kullanımı pek yaygın değildir (7).



Şekil 2-8: Bottom-up Proteomikte Kararlı İzotop Etiketleme Yöntemlerinin Şeması

a. Metabolik Etiketleme: Proteinler hücre kültüründe izotopik olarak zenginleştirilmiş ortam kullanılarak etiketlenir. Hafif ve ağır izotop etiketli protein karışımları daha sonra miktar tayini için sindirilir. b. Kimyasal etiketleme: İzobarik etiketlemede, proteinler genellikle sindirilir ve daha sonra izobarik etiketlerle etiketlenir. Zhang (69)'den değiştirilerek

Göreceli ve mutlak ölçüm için izotop etiketleme (ITRAQ):

Diğer etiketli yöntemlerden farklı olarak iTRAQ, sekiz numunenin karşılaştırmalı analizine imkan sağlayarak analitik süreyi önemli ölçüde azaltır. MS analizinden önce tripsin ile sindirilmiş peptitler, afinite yakalama aşamasından sonra amin-spesifik reaktiflerle etiketlenir (84).

¹⁸O Etiketleme:

Proteolitik peptitlerin C-terminal karboksil grubuna H₂¹⁸O solventinden 2 oksijen atomunun katılımı esasına dayanır. Etiketli ve etiketlenmemiş peptitler, kütle spektrometrisinde 4 Da kütle farkıyla ayırt edilirler. Uygulaması kolay aynı zamanda ucuz bir yöntemdir. Bununla birlikte bir peptidin tek ya da çift etiketlenme olasılığı, karmaşık veri analizine neden olur. (82).

2.5.1.2. Etiketsiz Miktar Tayini (Label-Free Quantitation)

Etiketsiz kantitatif yöntemlerde her numune ayrı ayrı hazırlanır ve tek tek LC-MS/MS analizleri gerçekleştirilir. Peptit pik yoğunluğuna dayalı miktar tayini ve spektral sayım hesaplaması en yaygın etiketsiz miktar tayini yöntemleridir (85). İlk yöntem, bir kütle spektrometresinde parçalanma için bir peptit öncü iyonunun seçilme hızının peptit miktarıyla korele olduğu varsayımına dayanmaktadır. Bu yaklaşımda öncü (prekürsör) iyon düşük çarpışma enerjisinde, ürün (product) iyonu ise yüksek çarpışma enerjisinde kaydedilir. Analiz süresince peptit sinyalleri seçilir, elde edilen pik kromatogramları karşılaştırılır ve hizalanır. Oluşturulan spektra, bazı yazılım programları ve veritabanları kullanılarak analiz edilir (86). Aynı koşullarda hazırlanmış farklı örnekler arasındaki protein seviyelerindeki fark, göreceli olarak karşılaştırılır. Spektral sayım stratejisinde ise bir proteinin parçası olan peptitlere karşılık gelen spektrumlar sayılır. Aslında bir protein ne kadar bol ve ne kadar büyük olursa o kadar çok peptidin tanımlanacağı gözlemine dayanır. (85). Ancak, kompleks karışımlardaki protein değişikliklerinin doğru ve güvenilir bir şekilde saptanması için spektral sayımda veri kümelerinin normalizasyonu ve istatistiksel analizi gereklidir. Bununla birlikte etiketsiz kantitatif proteomik tekniklerin hızlı gelişimi, kompleks biyolojik numunelerde protein ekspresyon seviyelerinin hızlı ve düşük maliyetli bir şekilde ölçülmesine imkan sağlamıştır (87).

2.5.2. Bir Kütle Spektrometresinin Çalışma Prensipleri Ve Temel Enstrümanları

Bir kütle spektrometresi ana hatlarıyla gaz fazı iyonların üretildiği bir iyon kaynağı, kütle/yük (m/z) oranına bağlı olarak iyonların ayrıldığı bir kütle analizörü ve oluşan sinyali bir spektrum biçiminde kaydeden bir detektörden oluşur. İki aşamalı MS sisteminden oluşan bir tandem kütle spektrometresi (MS/MS), tanımlanan proteinlerin peptit dizisi ve post-translasyonel modifikasyonları hakkında da bilgi sağladığından proteomik çalışmalarda oldukça yaygın kullanıma sahiptir (88). Sıvı kromatografisi ile birleştirilmiş bir tandem kütle spektrometresinin (LC-MS/MS) kullanıldığı tipik bir iş akışında fraksiyonlama, iyonizasyon, ayırlama, parçalanma ve okuma basamakları gerçekleştirilir. Bottom-up proteomik yaklaşımlarının benimsendiği büyük ölçekli proteomik çalışmalarda kütle spektrometresi analizinden önce bir kesim enzimi yardımıyla proteinlerden triptik peptitler elde edilir (69). Peptitler, daha sonra yüksek performanslı sıvı kromatografisinde temel olarak polaritelerine ve molekül büyüklüklerine göre ayrılanıp iyon kaynağı içine taşınırlar. Pozitif ya da negatif yükle yüklenen iyonize peptitler kütle spektrometresine taşınır. İlk kütle analizöründe tüm iyonların spektrumları saptanır ve öncü iyonlar (precursor ion) seçilir. Öncü iyonların, çarpışma hücresinde (collision cell) inört gaz (örn: azot, argon) yardımıyla parçalanmasıyla ürün iyonları (product ion) ve nötr fragmentler meydana gelir. İkinci MS'de ürün iyonların spektrumları kaydedilir. Elde edilen spektrumlar, çeşitli algoritmalar kullanılarak veri tabanlarındaki peptit dizileriyle karşılaştırılır. Analiz sırasında kullanılan algoritmalar, ilgili peptit dizisi için beklenen seviyeye ne kadar iyi uyduğuna ilişkin puanı (skor) hesaplar. Anlamlılık sınırının üzerindeki skor kabul edilir (86, 90).

- **İyon Kaynağı**

Peptitlerin iyonlaşması, iyon kaynağındaki elektrik potansiyeline ve analiz edildiği pH'ya bağlıdır. Düşük pH'da peptidler, arjinin (Arg) veya lizin (Lys), histidin (His) gibi amonyak grubu içeren bazik amino asitler vasıtasıyla protonlanırken, yüksek pH'da, peptidler, aspartat (Asp) veya glutamat (Glu) gibi karboksil içeren asidik amino asitler vasıtasıyla deprotonize edilir. Elektriksel potansiyelin pozitif olduğu pozitif iyon modu ve elektriksel potansiyelin negatif olduğu negatif iyon modu olmak üzere iki tip iyonizasyon modu vardır. Proteomik çalışmalarda pozitif mod sıkça kullanılmaktadır.

Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI), proteinlerin ve peptitlerin kütle analizörü bölgesinden önce iyonize edilmesinde kullanılan en yaygın iyon kaynaklarındandır. ESI ve MALDI'ye ek olarak, kimyasal iyonizasyon (CI), elektron iyonlaşması (EI) veya atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) gibi iyonizasyon çeşitleri de vardır (91).

Elektrosprey İyonizasyon (ESI): Bu tip bir iyonizasyon kaynağında spektrometrenin iyonizasyon kaynağına gelen örnekler yüksek voltaj (genel olarak 2-6 kV) uygulanır. Polariteye bağlı olarak uygulanan voltaj, örneklerin pozitif veya negatif olarak şarj edilmesine neden olur. Püskürtme ucundan analit iyonlarını içeren ve bir mikrometreden daha küçük boyutlarda olan damlacıklar üretilir. Buharlaştırıcı olarak azot gazının kullanıldığı bu iyonizasyon sisteminde aynı yükte yüklenmiş analitleri içeren damlacıkların boyutu küçülür ve moleküller arasındaki mesafe azalır. Bu iyonizasyon tekniği ile birden fazla yüklü iyonlar elde edilebilir (92, 93).

Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon (MALDI): Bir matriks içinde çözündürülen analit, analiz öncesi MALDI hedef plakası üzerine yerleştirilerek kurumaya bırakılır. Çözücü sıvının uzaklaşmasıyla kristalize hale gelen matriks üzerine ultraviyole lazer ışını tutularak analit molekülleri iyonize hale getirilir. MALDI kaynağının darbeli yapısı, uçuş zamanlı (TOF) analizör için uygundur (92, 88).

- **Kütle analizörleri**

Proteomik deneylerde kullanılan iyon kapanı (kuadropol iyon kapanı-QIT, doğrusal iyon kapanı-LIT, Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı-FT-ICR ve Orbitrap), kuadropol (Q) ve time of flight (TOF) olmak üzere üç temel kütle analizörü vardır. Kütle spektrometresi cihazları, tek bir analizör içerebildiği gibi iki veya üç analizörün kombinasyonundan da oluşabilir. Böylece tek bir enstrüman içerisindeki kombine analizörlerin kuvvetinden aynı anda yararlanılabilir. Bu enstrümanlara örnek olarak QIT, LTQ, Q-q-Q, Q-TOF, TOF-TOF, LTQ-Orbitrap kombinasyonları verilebilir. Tasarım ve performans açısından farklı olan bu enstrümanların birbirlerine göre güçlü ve zayıf yönleri vardır (94).

- **Dedektör**

Kütle analizöründen gelen iyonlar bir elektrot üzerine düşerek iyon akımı oluşturur. Dedektör oluşan sinyalin bilgisayar ekranında spektrum şeklinde görünmesini sağlar (91).

2.5.3. Proteomik Çalışmalarda Kullanılan Bazı Kütle Spektrometreleri

- **İyon Kapanı Kütle Spektrometresi**

Bu tip kütle analizörü, iyonların yakalanacağı merkezi bir tuzak sayesinde iyonları yakalama, depolama, manipüle etme ve atma işlemlerinin tekrar eden döngülerini gerçekleştirir. Kütle analizörüne giren çok sayıda peptit iyonu içerisinde belirli bir m/z oranına sahip olanlar izole edilir diğerleri ise atılır. Ayrılan peptit iyonlarının enerjileri artırılıp azot ya da helyum gazı gibi inert özellikteki bir gazla çarpıştırılarak parçalanırlar. Ana peptit iyonundan elde edilen fragmanlar dedektöre gönderilir ve m/z oranları kaydedilir (95).

- **Fourier Transform İyon Siklotron Rezonans Kütle Spektrometresi**

Fourier transform iyon siklotron rezonans (FT-ICR) kütle spektrometresi, iyon tuzağı (kapanı) gibi işlev görür ve bu cihazla peptit iyonu izole edilebilir, parçalanabilir ve MS2 spektrumu kaydedilebilir. Ayrıca diğer iyon kapanı kütle spektrometrelerinden farklı olarak iyonları, güçlü bir manyetik alanda ve yüksek vakum altında yakalayıp büyük silindirik bir hacimde depolar. Bu sayede tuzağın içindeki iyonların siklotron frekansında rezonansına neden olur. İyonlar tuzağın karşısına yerleştirilmiş dedektör plakaları boyunca geçerken siklotron frekansında ölçüm yapılır. Dedektör, tuzağın içinde depolanan iyonların tümünün siklotron frekanslarını ölçtükten sonra bu frekansları m/z değerlerine dönüştürmek için bir Fourier dönüşümünü kullanır. Hassasiyeti ve dinamik aralığı oldukça yüksek FTICR kütle spektrometreleri yüksek çözünürlük ve kütle doğruluğu sunar. Ancak büyüklüğü, kullanım karmaşıklığı ve maliyeti nedeniyle proteomik araştırmalarda rutin olarak kullanılamamaktadır. FTICR ile karşılaştırılabilir performansa sahip olan az maliyetli, daha kolay bakım isteyen Orbitrap kütle spektrometreleri geliştirilmiştir (95, 96).

- **Triple-Quadrupole Kütle Spektrometresi**

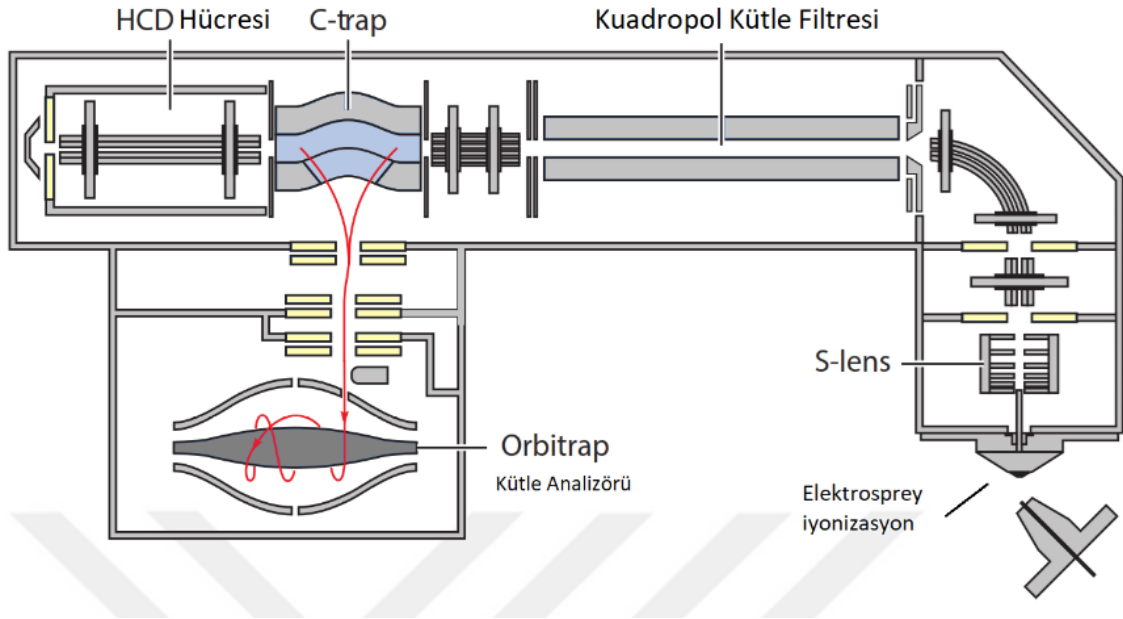
MS2'nin yapamadığı Single-Kuadropol analizörler, proteomikte sınırlı kullanıma sahiptir. MS2 yapabilen gelişmiş Triple-Kuadropol analizörleri ise yaygın olarak kullanılmaktadır. Peptit tanımlamada triple-kuadropol kullanıldığında cihaz iki farklı tarama modu arasında geçiş yapar. "Tam tarama" modunda, geniş bir m/z aralığında iyonların triple-kuadropole ve sonrasında dedektöre geçmesine izin verilir. İkinci tarama modunda, ilk kuadropol bir kütle filtresi görevi görür ve belirli iyonların ikinci kuadropole geçmesini sağlar. İyonlar, ikinci kuadropol içerisinde azot ya da helyum gazıyla parçalanmaya maruz bırakılır. Parçalanma ürünleri daha sonra diğer kuadropolü geçer ve detektörde tespit edilirler. Triple-kuadropol kütle spektrometreleri çok yönlüdür; ürün iyonu, öncü iyon ve nötr kayıp taramalarını yapabilirler (95).

- **“Time of Flight (TOF)” Kütle Spektrometresi:**

Yüksek çözünürlük, yüksek kütle doğruluğu ve ölçüm hızı nedeniyle sık tercih edilen analizörlerdir. TOF kütle analizörlerinde iyonların, elektriksel bir alanda hızlandırılıp yol almaları sağlanarak iyon kaynağından dedektöre gidiş (geçiş) süresi ölçülür. İyonların analizör uzunluğu boyunca ilerlemeleri için gerekli olan süre, m/z değeriyle orantılıdır; daha büyük iyonlar dedektöre ulaşmak için daha uzun zamana ihtiyaç duyarken daha küçük iyonlar daha kısa sürede detektöre ulaşırlar. Dedektör, tüm iyonların uçuş sürelerini kaydeder ve sonuçlar kütle spektrumu olarak sunulur (91). Proteomik çalışmalarda MALDI-TOF-MS, MALDI-TOF-TOF ya da ESI-Q-TOF-MS/MS şeklinde kullanımları vardır (97, 98).

- **Q-Exactive Orbitrap Kütle Spektrometresi:**

2000 yılında Makarov tarafından geliştirilen orbitrap kütle analizörü proteomik alanında önemli gelişmeler sağlamıştır. Eksenel simetrik yapı gösteren orbitrap aslında iki dış elektrot ve bir merkezi elektrottan oluşan bir iyon tuzağı kütle analizörüdür. Analizöre gelen iyonlar z eksenini boyunca harmonik olarak sabit bir yörüngede dönerler. Dış elektrotlarda iyonların neden olduğu salınım frekansları ölçülür ve iyonların kütle spektrumları, görüntü akımı tespiti kullanılarak elde edilir. Fourier Transform kütle analiz cihazının analogu sayılan orbitrap teknolojisinin, aslında FT-iyon siklotron rezonans (ICR) teknolojisine aksine daha küçük cihaz boyutu ve daha kolay cihaz kullanımı mevcuttur (99, 100).



Şekil 2-9: Q Exactive Kütle Spektrometresinin Şematik Gösterimi

HCD: Yüksek enerji çarpışmasına bağlı ayrışma Eliuk (102)'den değiştirilerek

Aynı zamanda orbitrap kütle spektrometreleri TOF sistemlerinden çok daha yüksek m/z 200'de 140.000 - 1.000.000 FWHM (Full width at half maximum) çözünürlük gücüne sahiptir (101). LTQ-Orbitrap, Orbitrap Velos, Orbitrap Elite, Fusion ve Q Exactive serisi bu analizöre sahip sistemlerdir (102). Proje çalışması kuadropol-orbitrap kombinasyonuna sahip hibrit MS sistemleri olan Q Exactive serisinin Plus modelinde gerçekleştirildiğinden bu sistemden daha detaylı olarak bahsedilmiştir.

Q Exactive Plus modeli altı ana bileşenden oluşan tezgah üstü bir cihazdır. Bunlar; iyon kaynağı, enjeksiyon flatapolü, öncü iyon seçimi için kuadropol, C-trap, parçalama hücresi ve fourier dönüşüm kütle analizi için orbitrap analizörüdür (Şekil 2-9). İyon kaynağında üretilen iyonlar sistem içerisine püskürtülür ve buradaki iyon optiği iyonların geçişini hızlandırır. Elektriksel olarak bağlantılı, karşılıklı ikişer çubuktan oluşan Kuadropol, kütle filtresi görevi yapar. Buraya uygulanan farklı voltaj değerleri kuadropolden geçecek belirli m/z 'ye sahip iyonları belirler. Bu koşullar altında iyonlar hızlarına göre kütle filtresinden geçerken sadece belirli m/z oranına sahip iyonlar tutulur. İyonlar C-trap bölgesine geldiklerinde burada kalmaları için azot gazı ile çarpıştırılarak kinetik enerjilerini kaybetmeleri sağlanır.

MS/MS yapılması için iyonlar C-trap içinden HCD çarpışma hücresine geçiş yapar. Parçalanma sonrasında iyonlar tekrar C-trap'e aktarılır ve kütle spektrumlarının tespiti için orbitrap analizörüne yani merkezi ve dış elektrotlar arasına gönderilir. Burada iki kuvvet, salınım hareketine neden olur. Farklı iyonlar farklı frekanslarda salınır ve iyonların ayrılmasına neden olur. Dış elektrotlar bu eksenel salınımların görüntü akımı olarak algılanmasını sağlar. Sayısallaştırılmış görüntü akımı ise, FTICR'dekiyle benzer şekilde fourier-frekans alanına ve sonrasında kütle spektrumuna dönüştürülür (100, 103).

2.5.4. Bottom-up Proteomik Yaklaşımına Göre Örnek Hazırlığı

Proteinlerin triptik hale getirildiği Bootm-up proteomik yaklaşımda 3 temel örnek hazırlığı metodolojisi kullanılır (Surmen M 2018). Her bir yöntemin farklı avantajları olmakla birlikte iyon kaynağı MALDI olan kütle spektrometrelerinin kullanılacağı durumlarda “in gel digestion” yöntemi tercih edilir (104). ESI iyonizasyon sistemlerinin kullanılacağı çalışmalarda ise genellikle “in solution” ve “filtre destekli örnek hazırlığı (FASP)” yöntemleri uygulanır (105, 106). Kısaca “In gel digestion” yönteminde proteinlerin jelde ayrımı yapılır, sonrasında spotlar halinde kesilerek tüp içine alınır ve indirgeme, alkilasyon ve proteolitik sindirim işlemi gerçekleştirilir (104). “In-solution” sindirim ise ilk olarak 8M üre ve sonrasında amonyum bikarbonat gibi tamponlar yardımıyla bir mikrosantrifüj tüp içerisinde gerçekleştirilir (107). SDS gibi güçlü bir deterjan yardımıyla çözünür hale getirilen proteinlerden, SDS'in ve hücre içeriğinde bulunan protein dışı moleküllerin uzaklaştırılması problem olabilmektedir. Bu nedenle ekstraksiyon sonrası sindirim işlemine geçmeden önce aseton ya da TCA/aseton çöktürme yöntemleriyle temizleme işlemi gerekebilir (108). Ayrıca sindirim öncesinde indirgeme ve alkiyasyon işlemleri için proteinleri denatüre halde tutan yüksek molaritedeki üre enzim aktivitesini azaltmaktadır. Enzimin en uygun çalışma tamponu olan amonyum bikarbonat ile üre konsantrasyonu azaltılarak bu sorun giderilir. Ancak sindirim işleminin tüm aşamalarında tamponların pH aralığına dikkat edilmesi gerekmektedir (107).

Çalışmamızda kullandığımız FASP yönteminde ise ekstrakte edilen proteinlerden SDS'in uzaklaştırılması filtreli kolonlar yardımıyla gerçekleştirilir. Üre ile yıkama sonrasında filtreli kolon birkaç defa amonyum bikarbonat tamponuyla da yıkanır ve ortam pH'nın 7-9 olması sağlanır (106). Ancak bu yöntemin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Kolona yüklenecek protein miktarı sınırlıdır ve filtreler kirlenebilmekte ve yıkama aşamalarında tıkanabilmektedir. Ayrıca çok uzun santrifüj süreleri ve çok sayıda yıkama işlemleri deney süresini uzatmaktadır. Sindirim sonrasında peptit geri kazanımı ise düşünülmesi gereken ayrı bir meseledir. FASP yönteminin geliştirilmesine yönelik yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Peptit geri kazanımının iyileştirilmesi için çalışmaların bir kısmında farklı enzimlerin artırılması amaçlanmış bir kısmında ise farklı tip filtreli kolon kullanımının etkisi gösterilmiştir (109, 110).

2.5.5. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri LC-MS/MS Tabanlı Proteomik

Yaklaşık on yıl öncesine kadar KHDAK kanseri üzerine yapılan proteomik çalışmalarda 2D-PAGE, 2D-DIGE ve MALDI-TOF-MS sistemlerinin kullanımı dikkat çekicidir (6). Son yıllarda ise LC-MS/MS sistemlerinin ve buna paralel çok çeşitli preparasyon yöntemlerinin ve informatik programlarının hızlı gelişiminin çalışmalara yansıdığını görüyoruz. Dikkat çeken bir diğer nokta ise çok sayıda insanı etkilemesi nedeniyle KHDAK histolojik alt gruplarından özellikle adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom üzerine yapılan çalışmaların çokluğudur. Proteomik araştırmaların sayısı arttıkça hücre hattı, doku ve serum gibi yaygın kullanılan örneklerin BALF, eksozom, plevral efüzyon sıvısı dahil çeşitli biyolojik materyallerin de incelendiği görülmektedir. Bu bağlamda gerçekleştirilen proteomik analizlerle daha etkili ve uygun tedavi için hedeflenebilecek çok sayıda protein ortaya çıkarılmıştır (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde LC-MS/MS Tabanlı Proteomik Çalışmalar

Numune Tipi	Histolojik Tip	MS Sistemi	Tanımlanan & İfade Değişimi olan Proteinlerin Sayısı	Kaynak
Doku	Adenokarsinom & Sukamöz	Orbitrap Fusion LC-MS/MS	Toplam 4342; İfade farklılığı olan 610 protein	(111)
Ekzosom	KHDAK	Q Exactive	Toplam 628 protein; Miktar tayini yapılan 552	(112)
NCI-H1975, NCI-H1650, HCC827	KHDAK	Q-Exactive HF	Miktar tayini yapılan 5600 protein	(113)
H358 Hücreleri	KHDAK	LTQ-Orbitrap Velos LC-MS/MS	Toplam 2610; İfade farklılığı olan 690	(114)
NCI-H1299	KHDAK	LTQ Orbitrap XL MS/MS	Toplam tanımlanan 832 protein	(115)
Taze ve Parafin Doku	Adenokarsinom	LTQ Orbitrap Elite	Toplam tanımlanan 6577, Miktar tayini yapılan 3960	(116)
H460 hücreleri	Büyük hücreli karsinom	Q Exactive	Toplam tanımlanan 2092 protein	(117)
H292 Hücreleri	KHDAK	LTQ-Orbitrap Velos LC-MS/MS	Toplam 3959 protein; 303↑ 112↓	(118)
Doku	Adenokarsinom, Sukamöz	LC-MS/MS	Miktar tayini yapılan toplam >8000 Adc, 6900 Sqc	(119)
BALF, plazma	Adenokarsinom, Sukamöz	LC-MS/MS	İfade farklılığı olan Adc:267, Sqc:199 Adc&Sqc: 292	(120)
Doku	KHDAK	LTQ LC-MS	Toplam tanımlanan 4047, ifade farklılığı olan 91	(121)
23 ayrı hücre Hattı	KHDAK	LC-MS/MS LTQ-Orbitrap	Miktar tayini yapılan toplam 2187 protein	(122)
PC9 Hücreleri	Adenokarsinom	LTQ Orbitrap XL MS	Toplam 900; İfade farklılığı olan 14 protein	(123)
NCI-H1993 ve NCI-H2073 (sekretom)	Adenokarsinom	LTQ-Orbitrap Velos	Miktar tayini yapılan toplam 2713 protein	(124)
11 farklı Hücre hattı	KHDAK	nLC-MS/MS	Tanımlanan toplam: Dokuda 800-2300 protein Hücre hattında 1500-4500	(125)
Plevral Efüzyon Sıvısı	KHDAK	LTQ-Orbitrap MS	Toplam 772 non-redundant protein, 30 aday protein	(126)
Plazma	KHDAK	LC-MS TOF	Miktar tayini yapılan toplam >650, Belirteç adayı CRP, LRG1	(127)
SPC-A-1 Hücre hattı	Adenokarsinom	nLC-MS/MS	Toplam miktar tayini yapılan 4923; 62↑ 50↓	(128)

LC-MS/MS tabanlı bottom-up yaklaşımı kullanılarak 2015 yılı sonrasında yapılan bazı proteomik çalışmalar yer almaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

Örnek hazırlığı ve LC-MS/MS analizlerinde kullanılan cihazlar Tablo 3-1’de, kimyasallar Tablo 3-2’de ve bazı sarf malzemeler Tablo 3-3’de verilmiştir.

Tablo 3-1: Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Gereçler	Marka
-80 °C	ESCO
-20 °C	Siemens
+4 °C	Siemens
TissueLyser LT	Qiagen
Qubit 4.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
Termal Çalkalayıcı	Biosan
Ultrasonik Su banyosu	Bandelin Sonarex
Mikrosantrifüj	Nüve
Mikrospin santrifüj	Biosan
Laminar Flow	ESCO
Etüv	Nuve
Liyofilizatör	Christ
Manyetik Karıştırıcı	Isolab
Vakum Konsantratör (Speedvac)	Eppendorf
Vorteks	Biosan
Pipet Takımı	Rainin
Elektronik Termometre	Isolab
SYNAPT G2-Si HDMS	Waters
NanoACQUITY UPLC Sistem	Waters
Q Exactive Plus Mass Spectrometry	Thermo Scientific
Dionex Ultimate 3000 RSLC	Thermo Scientific

Tablo 3-2: Kullanılan Kit, Enzim ve Kimyasallar

Kimyasal Adı	Marka
Protein Ekstraksiyon Kiti	Expedeon
Proteaz inhibitör Kokteyli	Sigma-Aldrich
FASP Protein Digestion Kit	Expedeon
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Amonyum bikarbonat	Fluka
Tripsin	Thermo Scientific
Formik Asit	Fluka
Trifloroasetik asit (TFA)	Merck
Top 12 Abundant Protein Deplezyon Kiti	Thermo Scientific
Asetonitril LiChrosolv	Merck Millipore
Water LiChrosolv	Merck Millipore
Metanol LiChrosolv	Merck Millipore
Etanol	Isolab
Qubit Deney Kiti	Thermo Scientific
HeLA Protein Digest Standart	Thermo Scientific
LTQ Velos ESI Pozitif iyon Kalibrasyonu	Thermo Scientific

Tablo 3-3: Kullanılan Diğer Sarf Malzemeler

Malzeme Adı	Marka
Filtreli Pipet ucu (10-200-1000µl)	Rainin
Lobind Tüp (0,5-1,5-2 ml)	Eppendorf
Konik Tabanlı Santrifüj Tüp (15-50 ml)	Isolab
Çelik Boncuk	Qiagen
pH meter strip	Isolab
C18 Spin Kolon	Thermo Scientific
Trap Kolon	Thermo Scientific, Waters
Analitik Kolon	Thermo Scientific, Waters
Micro Union	Thermo Scientific
Autosampler Vial	Thermo Scientific, Waters
Emitter	Thermo Scientific Waters

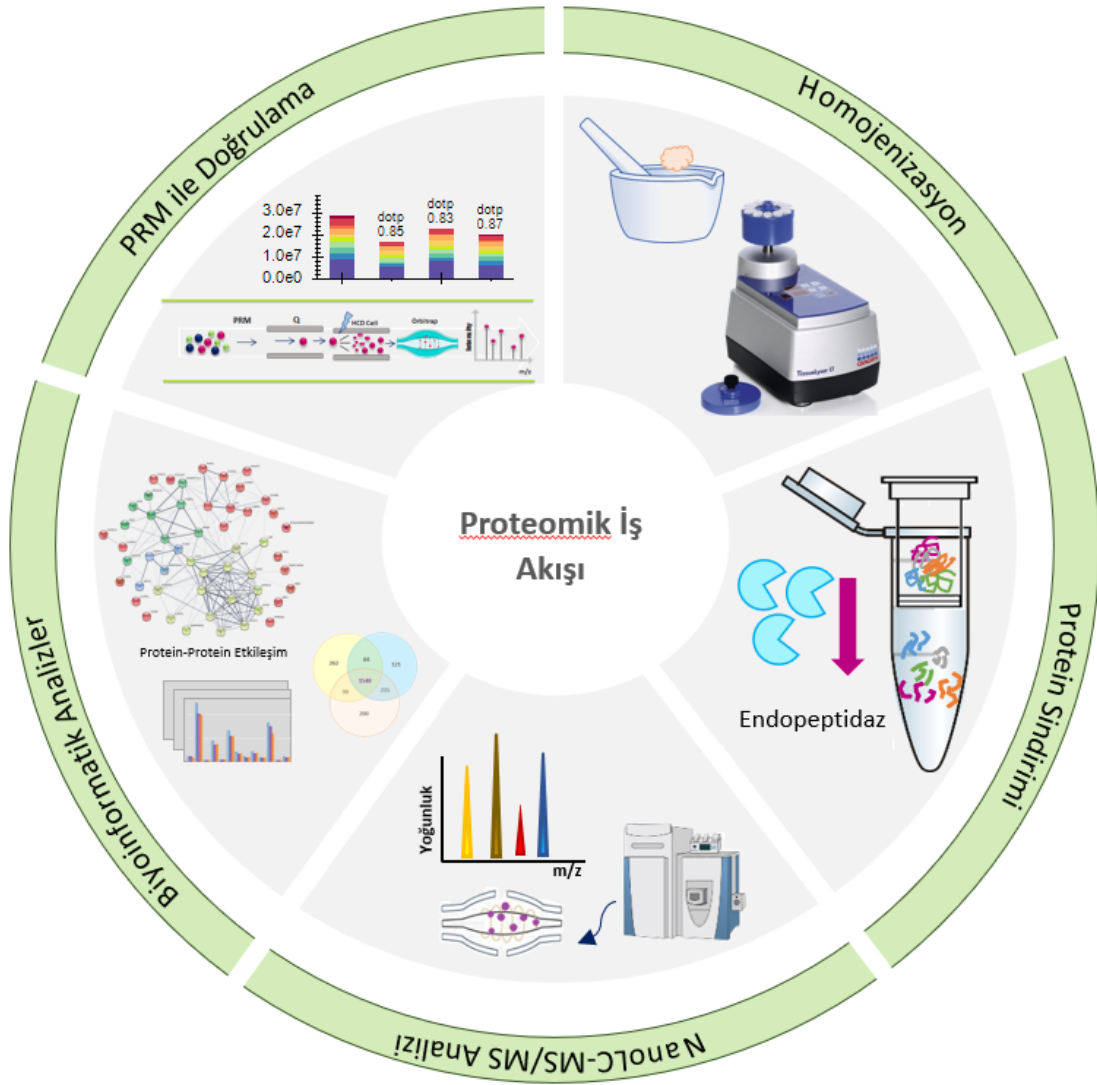
3.2. YÖNTEM

3.2.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Deneyisel çalışmalarda kullanılacak numunelerin toplanması 2015-2018 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi cerrahi kliniğinde KHDAK tanısı konulan, 7 hastaya ait tümör dokusu, aynı hastanın normal akciğer dokusu, serum numuneleri ve kontrol serum numuneleri çalışmaya dahil edilmiştir. Numune alımından önce çalışmaya katılan gönüllüler yapılacak araştırma ile ilgili bilgilendirilmiş, gönüllü onam formu okutularak imzalatılmıştır. Ameliyattan bir gün önce hastadan 10 ml steril düz kan tüpüne kan örnekleri alınarak optimum çalışma koşulları içerisinde serum ayrımı yapılmıştır. Ayrılan serum hemen -80°C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır. Aynı hastadan ameliyat esnasında alınan doku örnekleri de istenilen büyüklüklerde parçalanıp kryo tüplere konularak sıvı azot ile hızlı dondurma yapılmıştır. Tüm örnekler çalışma öncesine kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Deney Tasarımı

İki kısımdan oluşan deneyisel çalışma proje kapsamında belirlenen yerlerde gerçekleştirilmiştir. İlk kısım deneyler proteomik iş akışındaki basamakların optimizasyon çalışmalarını içermektedir. Ana çalışmayı oluşturan ikinci aşama ise 3 ana başlıktan oluşmaktadır. İlk olarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarından alınan tümörlü akciğer dokusu, tümöral yapı içermeyen akciğer dokusu, serum numuneleri ve kontrol numunelerinin protein profili ortaya çıkarılmıştır. Sonrasında gruplar arası yapılan informatik analizlerle protein ifade değişimleri hesaplanmıştır. Son olarak ise anlamlı ifade değişimi tespit edilen proteinlerin PRM yöntemiyle doğrulaması yapılmıştır. Protein profillerinin ortaya çıkarılmasında “Bottom-up Proteomik” yaklaşımı benimsenmiş ve Şekil 3-1’de verilen deney basamakları gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşıma göre proteinler, yüksek kalitede elde edildikten sonra triptik peptit haline getirilmiştir. Doku örnekleri gibi kompleks numunelerde örnek hazırlığına bağlı varyasyonun en aza indirilmesi için FASP yöntemi tercih edilmiştir. Daha sonra her numune fraksiyonlanarak kapsamlı bir profil ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Analizlerin tekrarlanabilirlik oranını görebilmek amacıyla seçilen bir örnek en az 3 tekrarlı analiz edilmiştir. Ayrıca serum örneklerinin her bir PRM analizi iki tekrarlı çalışılmıştır.



Şekil 3-1: Proteomik Çalışmalara ait İş Akışı

Çalışmada gerçekleştirilen yöntemler sırasıyla Homojenizasyon, protein sindirimi, LC-MS/MS analizleri, İnfomatik Analizler ve PRM analizlerinden oluşmaktadır.

3.2.3. Doku Homojenizasyonu ve Protein Ekstraksiyonu:

-80°C’de saklanan doku numuneleri, buz üzerinde amonyum bikarbonat tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli bulunan lobind tüplere alınarak çelik boncuklar yardımıyla TissueLyser LT (Qiagen) cihazında homojenize edildi (Şekil 3-2). Kullanılan amonyum bikarbonat ve proteaz inhibitör kokteyli doku miktarına göre ayarlandı. Homojenizasyon sürecinde 1dk’lık kısa turlar uygulandı ve aralarda tüp haznesi buz üzerine alınarak numunenin soğuk kalması sağlandı (129). Elde edilen homojenat yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra DTT ve SDS içeren farklı bir ekstraksiyon tamponu ile eşit miktarda (v:1/1) karıştırıldı. Karışım termal karıştırıcıda 95°C, 600rpm’de 10dk boyunca çalkalandı. Bu aşamada proteinler denatüre edilirken aynı zamanda DTT indirgeme ajanıyla sistein disülfid bağları, serbest sülfhidril gruplarına dönüştürüldü. Homojenat, soğuması için bir saat +4°C’de bekletildi. Daha sonra 14.000xg’de 10dk santrifüj yapılarak homojenat içerisinde bulunan hücre artıkları uzaklaştırıldı. Süpernatant temiz bir lobind tüpe aktarılarak toplam protein miktarı hesaplandı.

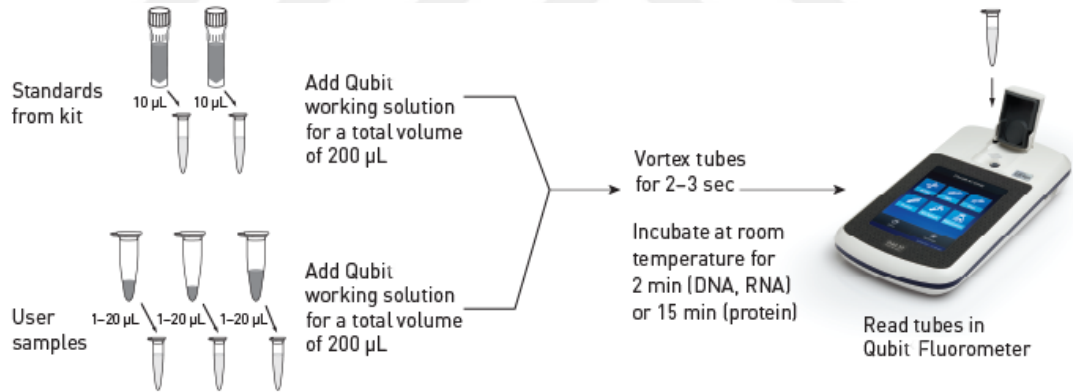


Şekil 3-2: Homojenizasyona ait Görüntüler

Akciğer dokularının Homojenizasyon Sonrası Görüntüsü ve Kullanılan Homojenizasyon Cihazı

3.2.4. Protein Miktarının Hesaplanması

Total protein miktarı Qubit 4.0 Fluorometre (Thermo Scientific) cihazı ve protein deney kiti (Thermo Scientific) kullanılarak hesaplandı (Şekil 3-3). Kit; protein reaktifi, BSA'nın farklı konsantrasyonlarından (0 ng/μl - 200 ng/μl - 400 ng/μl) oluşan 3 standardını ve dilüsyon tamponunu içerir. Protein ölçümü üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Örnek sayısı kadar ve 3 standart için 199'ar μl dilüsyon tamponu, 1'er μl protein reaktifi ile karıştırıldı. Elde edilen karışımdan standartlar için 190'ar μl, örnekler için ise 199'ar μl alınarak 500 μl'lik şeffaf tüplere dağıtıldı. Standart 1-2-3'den sırasıyla 10 μl ve örneklerden 2'şer μl alınarak her bir tüpteki toplam hacim 200 μl'ye tamamlandı. Hazırlanan tüpler oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 15dk boyunca inkübasyona bırakıldı. Ölçüm sonuçlarının deney sürecinden etkilenmemesi için pipetlemeler mümkün olduğunca hızlı bir şekilde ve direkt ışıktan korunarak gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında cihaza sırasıyla standartlar okutuldu ve cihazın düzgün bir standart eğri çizmesi beklenildi (130).



Şekil 3-3: Elde Edilen Proteinlerin Konsantrasyon ve Kalite Tayini

3.2.5. İmmündepleksyon

Serumda bol bulunan proteinler LC-MS/MS analizi aşamasında düşük miktarda bulunan diğer proteinleri maskeler. Bu nedenle triptik peptit eldesi öncesinde Tablo-5’de listesi verilen albümin ve globulinler dahil olmak üzere toplam 12 protein immünafinite prensibi temel alınarak uzaklaştırıldı (Tablo 3-4). Depleksyon, Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Kolonları (Thermo Scientific Pierce™) kullanılarak yapıldı (131). Deney basamakları üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Buna göre;

1. Depleksyon Spin Kolonu oda ısısına getirildi.
2. 10 µL serum (≈600 µg protein) ilave edikten sonra kolonun altındaki koruyucu kapak çıkartılıp toplama tüpüne yerleştirildi.
3. Kolon birkaç kez ters çevrilerek serumun dağılması sağlandı.
4. Daha sonra antikor bağlanmasını gerçekleştirmek üzere end-over-end cihazına konuldu ve oda sıcaklığında 60 dakika boyunca inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası 1000 × g’de 2 dakika santrifüj yapıldı.
6. Dolgu maddesini içeren içeren kolon atıldı.
7. Santrifüj sonrası toplama tüpüne biriken filtratın protein ölçümü gerçekleştirildi.

Tablo 3-4: Serumdan Uzaklaştırılan En yüksek 12 Proteinin Listesi

α1-Acid Glycoprotein	Fibrinogen
α1-Antitrypsin	Haptoglobin
α2-Macroglobulin	IgA
Albumin	IgG
Apolipoprotein A-I	IgM
Apolipoprotein A-I	Transferrin

3.2.6. Triptik Peptit Eldesi:

Protein ölçümünün hemen sonrasında proteinlerden yeterli miktarda alınarak filtre destekli sindirim işlemi uygulamasıyla triptik peptitler elde edildi (106). Sindirim işlemi için FASP (Filter-aided Sample Preparation, Protein Digestion Kit, Expedeon) kiti kullanıldı. Deney basamakları üretici firma tarafından önerilen protokole uygun şekilde gerçekleştirildi. Özetle DTT (ditiotreitol) ile indirgenmiş proteinler, üre tamponu içinde filtreli kolona (MWCO 30 kDa) alındı. Filtreye IAA (Iodoasetamide) eklenerek alkilleme yapıldı. Alkilasyon sonrasında üre ile yıkama işlemi yapılarak filtereden geçebilecek büyüklükteki istenmeyen küçük moleküller uzaklaştırıldı. Daha sonra sindirim enziminin çalışma pH'sına uygun koşulları sağlamak üzere amonyum bikarbonat yıkamaları yapılarak filtreli kolondaki üre konsantrasyonu azaltıldı. Yıkama işleminin ardından tripsin eklenerek 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında oluşan triptik peptid amonyum bikarbonat elüsyonuyla elde edildi. Çalışmanın detayında aşağıdaki deney basamakları takip edildi.

1. Çalışmada kullanılan tüm örneklerin başlangıç protein miktarları aynıdır.
2. Çalışma öncesinde 0,75g üre 100 mM Tris HCl, pH 8,5 eklenerek vorteks yardımıyla tamamen çözündürüldü.
3. 30 µl protein örneği toplam hacim 230 µl olacak şekilde üre tamponu ile karıştırılıp filtreli kolona eklendi. 14 000xg'de 15dk santrifüj yapıldı
4. Filtreye 200 µl üre eklenerek tekrar 14 000xg'de 15dk santrifüj yapıldı.
5. Tüpler santrifüj aşamasında iken liyofilize haldeki 9,8 mg IAA (iyodoasetamid) içeren tüpe 100 µl üre eklenerek 100X konsantrasyonda taze IAA hazırlandı.
6. Santrifüj sonrasında toplama tüpündeki sıvı atıldı.
7. Son konsantrasyonun 1X olması için; IAA 1:9 oranında üre ile karıştırıldı.
8. 1dk vorteks sonrası 20dk boyunca karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon sonrasında 14 000xg'de 10dk santrifüj yapıldı.
10. Yıkama işlemleri için filtreye 100 µl üre çözeltisi eklendi ve 14 000xg'de 15dk santrifüj yapıldı.
11. Bu basamak 2 defa daha tekrarlandı. Santrifüj sonrasında ise toplama tüpü boşaltıldı.

12. Üre konsantrasyonunun azaltılması ve tripsinin maksimum aktivite gösterdiği pH ortamının yakalanabilmesi için filtreler, 100 µl 50mM Amonyum bikarbonat tamponu ile yıkandı. Bu basamakta santrifüj süresi 10dk'ya indirildi. Filtreler toplamda 3 defa yıkandı.
13. Son santrifüj aşamasında liyofilize haldeki tripsin enzimi 50mM amonyum bikarbonat ile çözündürüldü.
14. Enzim:Protein oranı 1:100 olacak şekilde 75 µl tripsin filtreler eklendi. 1dk vorteks yapıldı.
15. Buharlaşmayı önlemek için filtre kapakları parafilm ile sarıldı.
16. 37°C'de 16saat inkübasyona bırakıldı.
17. İnkübasyon sonrasında filtrelili tüpler yeni bir toplama tüpüne alındı ve 50mM amonyum bikarbonat tamponu ile kademeli olarak elüsyon işlemi gerçekleştirildi.
18. Peptit örnekleri istenilen tamponda tekrar çözündürülmek üzere liyofilize edildi.

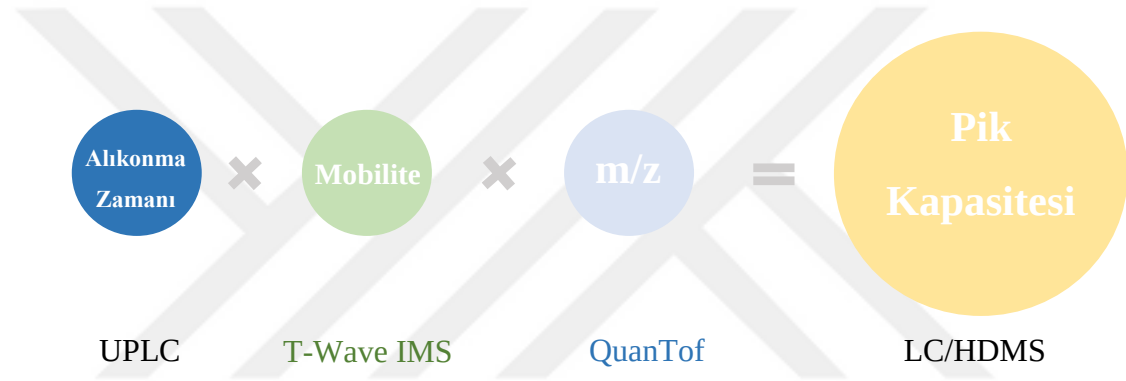
3.2.7. Fraksiyonlama ve Temizleme

Doku gibi kompleks biyolojik örneklerin içeriğinin sadeleştirilmesi ve kapsamlı bir proteomik analizin yapılabilmesi amacıyla peptit örneklerinde ters faz fraksiyonlama yöntemi kullanılarak aynı anda hem temizleme hem de fraksiyonlama işlemi gerçekleştirildi. Dolgu maddesi içeren kolondaki peptitler, farklı asetronitril konsantrasyonları ile elüsyon yapılarak farklı tüplere toplandı. Fraksiyonlama sonrasında elde edilen örnekler analiz aşamasına kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.8. Optimizasyon Çalışmalarına ait Analizler

3.2.8.1. Nano Akış Sıvı Kromatografisi - MS/MS (NanoLC-MS/MS) Analizleri

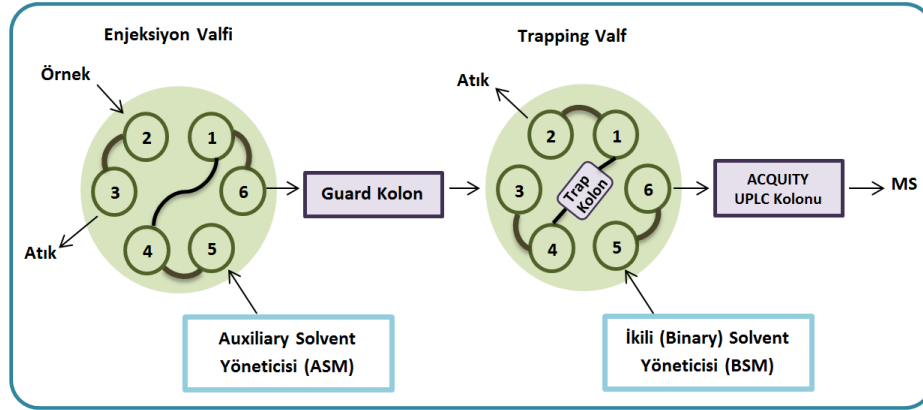
Deneme dokularından elde edilen triptik peptitlerin m/z değerlerine göre tanımlamalarının yapılmasında SYNAPT G2 UPLC-MS/MS (nanoACQUITY ultra pressure liquid chromatography, Waters, Milford, MA) sistemi kullanıldı. Sistem; peptitleri, UPLC cihazıyla alıkonma zamanına göre ayrımını sağladıktan sonra MS kısmında iyonlaşan peptitlerin T-Wave IMS teknolojisiye iyon hareketi özelliğine göre ve QToF kısmında m/z değerlerine göre ayrımını sağlar. Hem kuadropol hem de uçuş süresi (TOF) kütle analizörlerini kullanan sistem sayesinde üç farklı boyutta (kromatografik, iyon hareketliliği, kütle) çözünürlük sağlanır (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: SYNAPT G2-Nano ACQUITY Sistemi ile 3-Boyutlu Ayrımın Şematik Gösterimi

- **Nano Akış Sıvı Kromatografi Sistemine ait Koşullar**

Liyofilize peptitler %0,1'lik formik asit ile çözündürüldü. Triptik peptidler, ters faz trap kolonuna (M-Class Symmetry C18; 100Å por çapı, 5µm partikül boyutu, 180 µm iç çap x 20 mm uzunluk) enjekte edildi. Kromatografi sistemine ait ikili solvent yöneticisi sayesinde (Binary solvent manager) trap kolonunda peptitler, tuz ve diğer kirliliklerden uzaklaştırıldı. Daha öncesinde ayarlanan süre sonunda valf pozisyonunun değişmesiyle peptitlerin analitik ayırma kolonuna (M-Class CSH C18, 130Å, 1.7 µm, 75 µm x 250 mm, Waters Corporation, Milford, MA, ABD) geçişi sağlandı (Şekil 3-5). Burada peptitler % 0.1 FA ve asetronitril hareketli fazları kullanılarak yapılan gradient akış yardımıyla güçlü bir ayırım gerçekleştirildi. Kromatografik ayırma kullanılan diğer parametreler; enjeksiyon hacmi 2 µl, numune sıcaklığı +4 °C, mobil faz akış oranı 0,04µl/dk ve kolon sıcaklığı 45°C olarak ayarlandı.



Şekil 3-5: Valf Geçişinin Şematik Gösterimi

- **MS/MS analizine ait Koşullar:**

Sıvı kromatografi sisteminde örnek karışımındaki azaltılan peptitler atmosfer basıncında MS sisteminin ilk bölümünü oluşturan iyon kaynağına gelir. Kütle spektrometresi MS ve MS/MS fonksiyonlarının uygulandığı pozitif V modunda çalıştırıldı. Veriler, MS^E olarak da bilinen, kütle spektrometresinin düşük ve yüksek çarpışma enerji durumları arasında toplanan ve spesifik öncü iyonlarının seçilmediği, veri bağımsız toplama (DIA) modunda elde edildi. Düşük enerjili MS taramaları 10 eV'de toplandı ve yüksek enerjili MS/MS taramaları 30 eV'de toplandı. MS spektrumları, 50 ila 1950 m / z arasında 0.7 s tarama süresiyle elde edildi. Çalışma sırasında “Lock mass” iyon kaynağından 60 dakika aralıklarla sisteme verilen 100 fmol/ μ L Glu1-Fibrinopeptid B (Sigma Aldrich) kütle kalibrantı ile anlık cihaz kalibrasyonları gerçekleştirildi.

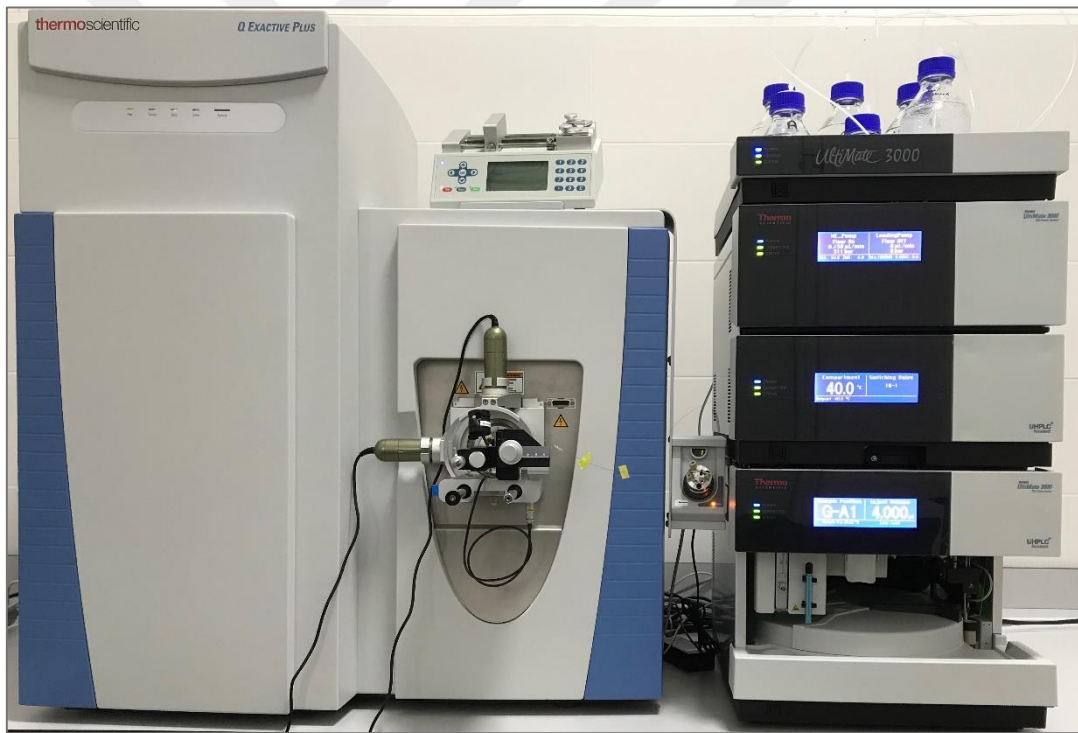
3.2.8.2. ProteinLynx Global Server ile Verilerin Analizi:

MassLynx yazılımından informatik bilgisayarına aktarılan ham veri dosyaları, ProteinLynx Global Server 2.5.2'de (PLGS, Waters Corp., Milford, MA) işlendi. Protein tanımlamaları için programa şu parametreler girildi: proteolitik enzim olarak tripsin seçildi, bir kaçırılmış tripsin bölünme bölgesine izin verildi, öncü ve parça iyon toleransları otomatik olarak belirlendi. Veri tabanı arama sorgusunun diğer parametreleri ise peptit başına minimum 3 fragman iyon eşleşmesi, protein başına minimum 7 fragman iyon eşleşmesi, protein başına minimum 1 peptid eşleşmesi olarak ayarlandı. Sabit ve değişken modifikasyonlar seçildi.

3.2.9. Gruplar arası Karşılaştırmaların Yapıldığı Analizler

3.2.9.1. Nano Akış Sıvı Kromatografisi - MS/MS (NanoLC-MS/MS) Analizleri

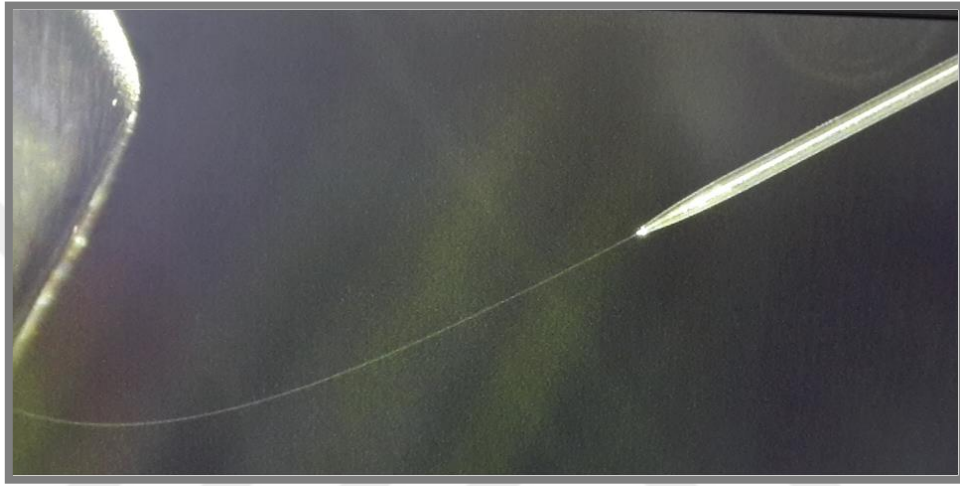
Optimizasyon sonrasında verileri değerlendirilecek olan bütün örneklerin analizleri için daha geniş profiller sunan NanoLC-MS/MS analizleri için UltiMate™ 3000 NanoLC kromatografi sistemi ile birleştirilmiş Q-Exactive Plus kütle spektrometresi (MS) cihazı kullanıldı. Liyofilize peptitler %0.1'lik formik asit ile sulandırıldı ve peptit ölçümleri gerçekleştirildi. Peptitler MS analizi öncesinde nL düzeyinde akış sağlayan sıvı kromatografisindeki hareketli fazlarla oluşturulan gradient ile polaritelerine göre ayrıldı. Ayrım Şekil 3-6'da gösterilen kromatografi sistemine bağlı C18 dolgu maddesi içeren trap kolonu ve analitik kolonu kullanılarak gerçekleştirildi. Oluşturulan farklı LC metotlarında su ve asetonitril hareketli fazlarının gradiyentleri kullanıldı.



Şekil 3-6: Kütle Spektrometresi – Sıvı Kromatografi Sistemi.

Görseldeki kütle spektrometresi Q Exactive Serisinin Plus modeline aittir. Sıvı kromatografi sistemi ise nano akış sağlayan Ultimate 3000 serisidir.

Örnek enjeksiyonlarına başlamadan önce LC-MS sisteminin kalibrasyon ve kontrolleri yapılarak analize hazır hale getirildi. Bunun için öncelikle kromatografi sisteminin mobil fazları hazırlandı. Mobil fazlar hazırlandıktan sonra mobil faz akış hattının düzgün çalışması için “purge” işlemi yapıldı. Kromatografi hattında kaçak olup olmadığı kontrol edildikten sonra sistem kalibrasyonu yapıldı. Analizler pozitif iyon modunda gerçekleştirildiği için pozitif iyon kalibrasyonu yapıldı.



Şekil 3-7: Elektrospray İyonizasyon

Trap ve analitik kolona belirli bir süre asetonitril akışı verilerek sistem hatları yıkandı. Emitter ucu iyon kaynağına takılı kameradan izlenerek emitterin düzgün spreyleme yapıp yapmadığı kontrol edildi (Şekil 3-7). Düzgün bir akış sağlandıktan sonra HeLa digest standardı ile cihaz performansı değerlendirildi. İstenilen değerler görüldükten sonra analiz yapılacak örnek seti dizayn edildi ve analiz başlatıldı. Analiz süreci zamana bağlı total iyon kromatogram (TIC) grafiği üzerinden gerçek zamanlı olarak takip edildi. Analiz sonrasında elde edilen ham veriler informatik programına aktarıldı.

3.2.9.2. Proteome Discoverer Programıyla Verilerin İşlenmesi

Protein ve peptit tanımlamaları Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific) analiz programında gerçekleştirildi. Analiz programına yüklenen ham datanın işlenebilmesi için İnsan Protein Veritabanından (UniProtKB/Swiss Prot and TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <http://ca.expasy.org/sprot/>) insan proteomuna (Taxonomy ID: 9606) özgü FASTA dosyası indirildi. Ham data, informatik programında çeşitli parametreler (sindirim enzimi, modifikasyonlar, FASTA dosyası gibi) seçilerek oluşturulan iki farklı iş akışı kullanılarak işlendi. PD analizi ile her bir örneğe ait protein profili oluşturuldu ve gruplar arası ifade farklılıkları etiketsiz (label-free) miktar tayini yöntemiyle belirlendi. Gruplar arası farklılıkların istatistiksel değerlendirmesinde ANOVA testi kullanılırken, $p < 0.05$ anlamlılık sınırı kabul edildi.

3.2.9.3. Biyoinformatik Yazılımlarla Proteinlerin Sınıflandırılması ve Protein Etkileşim Analizleri

Tanımlanan proteinler hakkında daha fazla bilgi için (hücre altı yerleşimi, moleküler fonksiyon, biyolojik işlem ve hücresel bileşen gibi), PANTHER 13.1 Sınıflandırma Sistemi Veri Tabanı (Protein ANALysis Through Evrimsel İlişkiler, <http://pantherdb.org>) kullanıldı. Ayrıca proteinler arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarabilmek için STRING v 11.0 veritabanı kullanıldı.

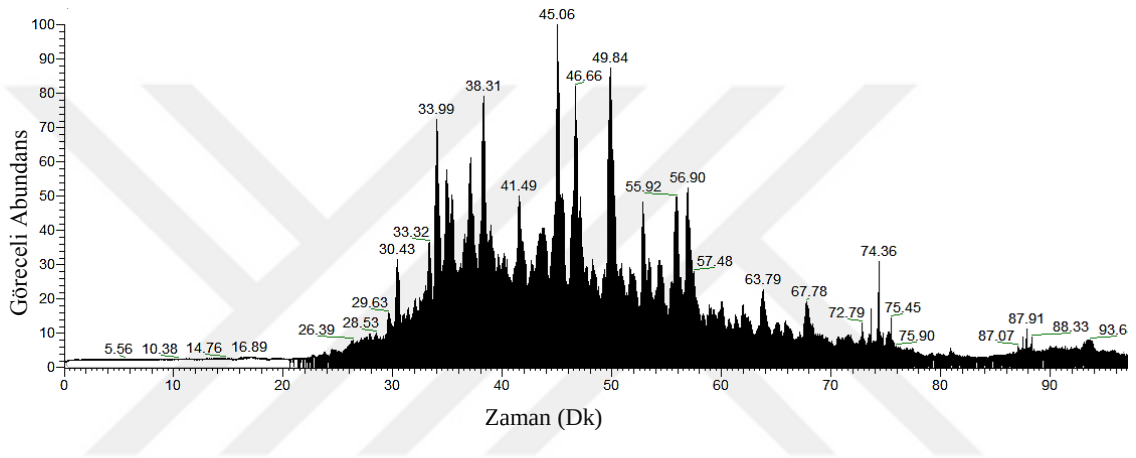
3.2.9.4. PRM (Parallel Reaction Monitoring) Analizleri

Keşif analizi sonrasında tespit edilen protein ifade farklılıkları hedefli proteomik yöntemlerden PRM modu kullanılarak örneklerin tekrar MS analizleri yapılmıştır. Analiz sonrası ham veriler; pik alanları ve peptit kromatogram bilgileri elde edilmek üzere informatik programına yüklenmiştir. Elde edilen sonuçlar daha öncesinde oluşturulan kütüphane ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

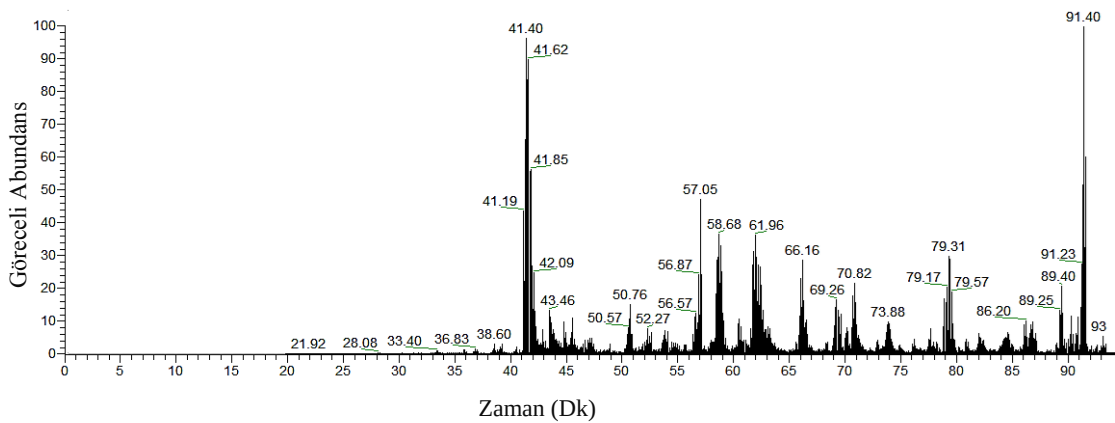
4.1. NanoLC-MS/MS Analiz Verileri

Çalışmaya dahil edilen büyük hücreli akciğer karsinom örneklerinin LC-MS/MS analizleri sonrasında yapılan biyoinformatik analizlerle geniş kapsamlı protein profili ortaya çıkarıldı. Ayrıca protein ifade farklılıkları incelenerek, anlamlı farklılık bulunan proteinlerin doğrulaması yapıldı. Tam tarama modu yapılan analizlere ait örnek kromatogram Şekil 4-1’de ve PRM tarama moduyla gerçekleştirilen analize ait genel bir kromatogram görüntüsü Şekil 4-2’de verilmiştir.



Şekil 4-1: Total İyon Kromatogramı-Keşif Modu

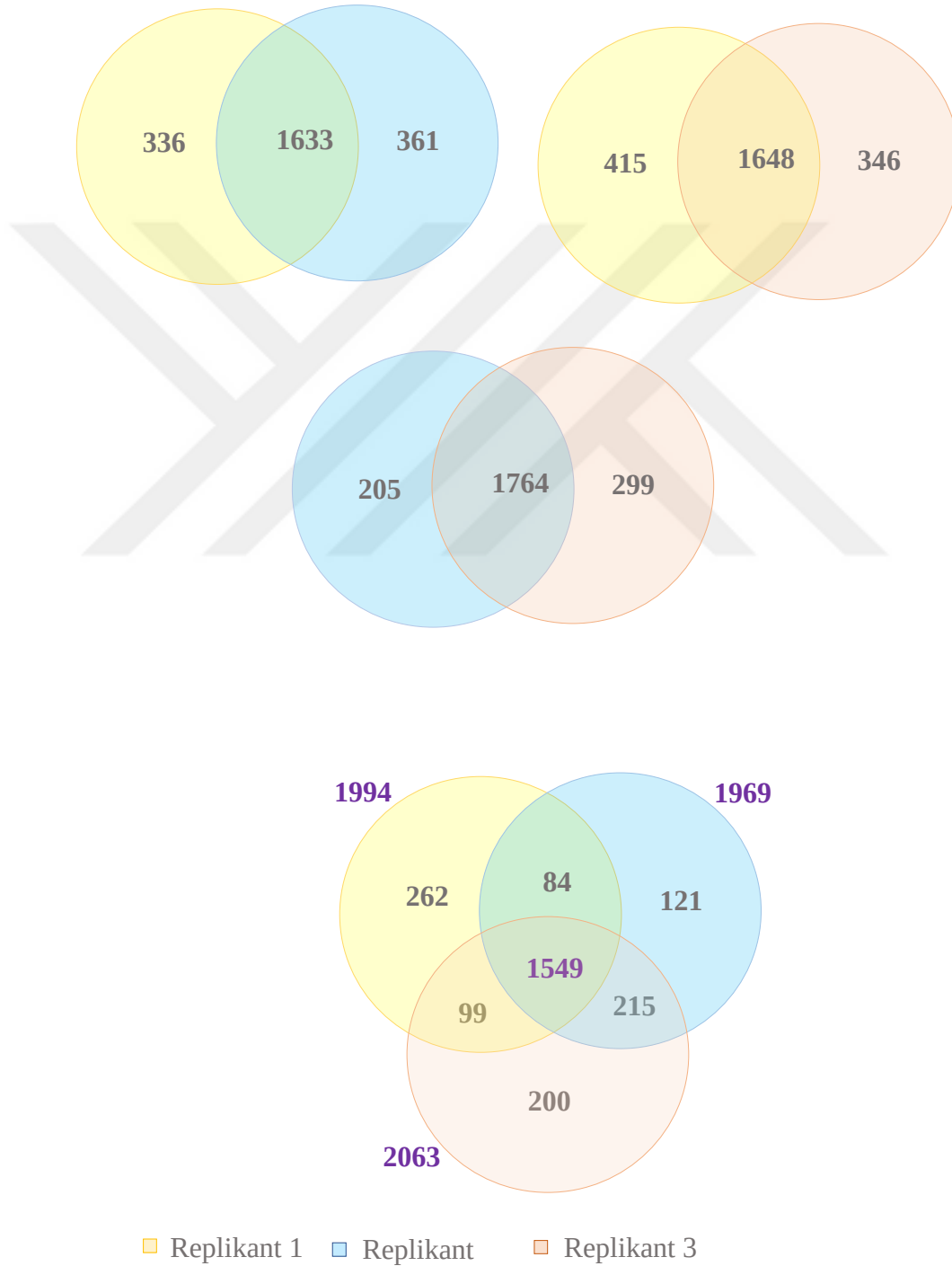
Tam tarama modu ile gerçekleştirilen analiz sonrasında elde edilen total iyon kromatogramına ait görüntü. Grafik, analiz boyunca detektör tarafından ölçülen iyonların nisbi abundanslarını göstermektedir.



Şekil 4-2: Total İyon Kromatogramı-PRM Modu

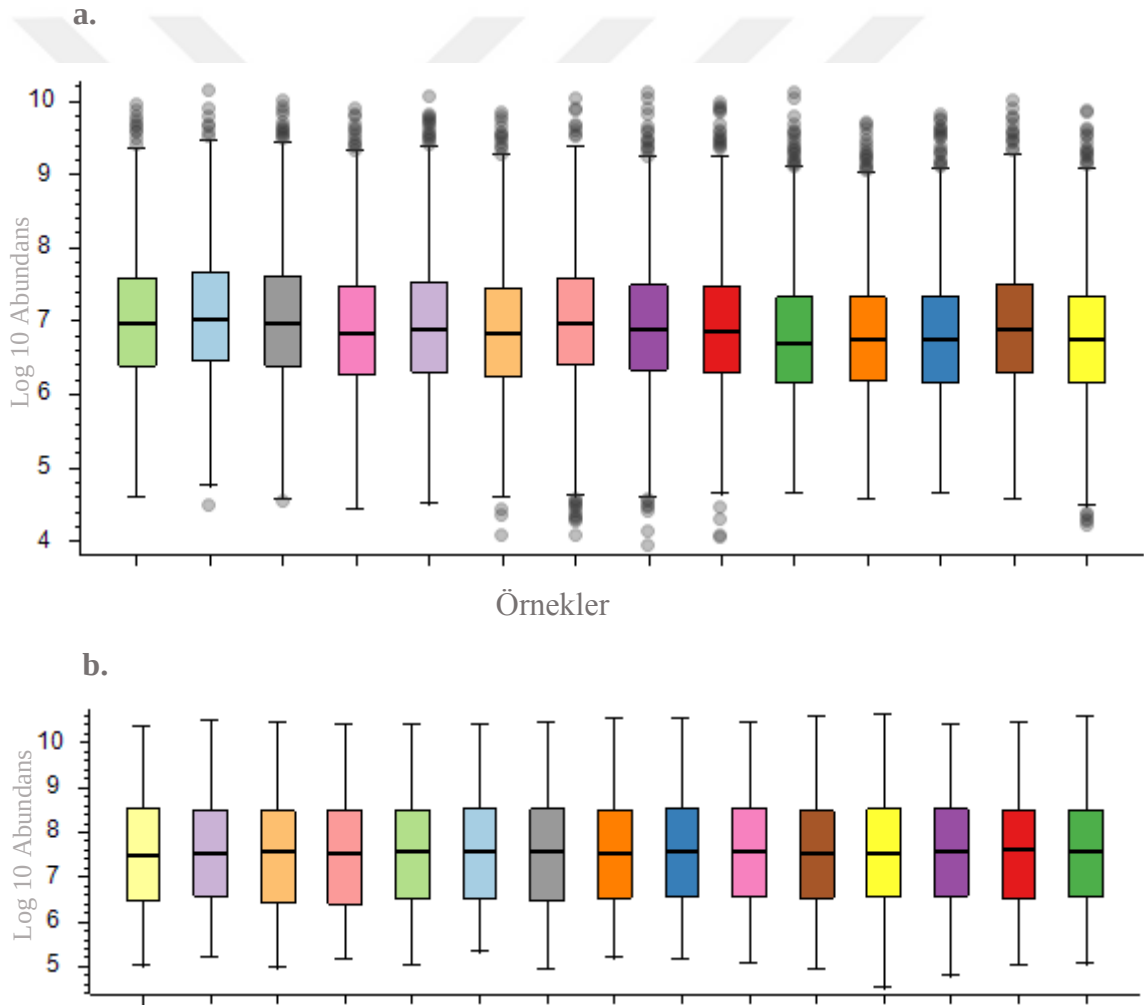
PRM tarama modu ile gerçekleştirilen analiz sonrasında elde edilen total iyon kromatogram görüntüsü. Grafik, analiz boyunca detektör tarafından ölçülen iyonların nisbi abundanslarını göstermektedir.

Çalışmada sistem performansı teknik tekrarlar yapılarak değerlendirilmiştir. Aynı örneğin arka arkaya 3 kez verilen enjeksiyonunda 1994, 2063 ve 1969 protein tanımlanmıştır. Ortalama protein sayısı ise 2008'dir. Ayrıca tekrarlar arasındaki örtüşme oranı venn şeması çizilerek değerlendirilmiştir. Buna göre ikili tekrarlarda ortalama örtüşme oranı %72 ve 3'lü tekrarda %61 bulunmuştur.



Şekil 4-3: Tekrarlı Analizler Arasındaki Örtüşme

Analiz edilen örneklerin miktarları, göreceli kantifikasyonla değerlendirilen ifade farklılıklarının doğruluğunu etkileyen bir unsurdur. Bu nedenle sisteme verilen örnek miktarları birbirine eşit miktarda olmalıdır. Her ne kadar sisteme eşit miktarda örnek yüklense de sistemin sıvı kromatografi kısmında örneğin analitik kolondan geçiş süreci ve bununla birlikte örneklerin iyon kaynağındaki iyonizasyon verimliliği gibi etkenler ölçümü yapılan örnek abundansını etkileyebilmektedir. Analiz sonrası oluşturulan kutu-bıyık grafiklerinde doku ve serum örnek setlerine ait abundanslar gösterilmiştir (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: Örnek Konsantrasyonlarına ait Kutu-Bıyık Grafikleri

a. Doku Örnek Seti b. Serum Örnek Seti

4.2. Büyük Hücreli Akciğer Karsinomu Doku Gruplarının Protein Profiline ait Veriler

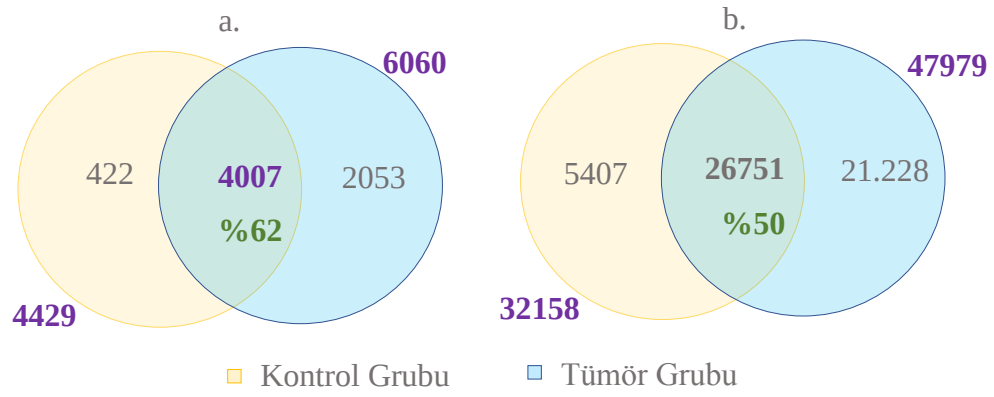
Protein tanımlamaları Proteome Discoverer informatik programında SwissProt insan proteom veri tabanına ait FASTA dosyası ve Sequest HT arama motoru kullanılarak yapıldı. Büyük hücre karsinom hastalarına ait dokularda tanımlanan toplam 6730 proteinden 6313'ü yüksek güven (high confidence) aralığındaydı. Her bir grupta tanımlanmış toplam protein ve özgün peptit sayıları ise Tablo 4-1'de verilmiştir.

Tablo 4-1: Tümör ve Kontrol Grubu Doku Örneklerinde Tanımlanan Protein ve Peptit Sayıları

Doku	Protein	Peptit	Özgün Peptit	PSMs
Tümör & Kontrol Grubu (total)	6313	58.371	53.004	1.428.036
Tümör Grubu	6060	52.639	47.978	475.212
Kontrol Grubu	4429	35.013	32.157	393.726

False Discovery Rate (FDR) %1. Yüksek güvende (high confidence) tanımlanan protein sayıları

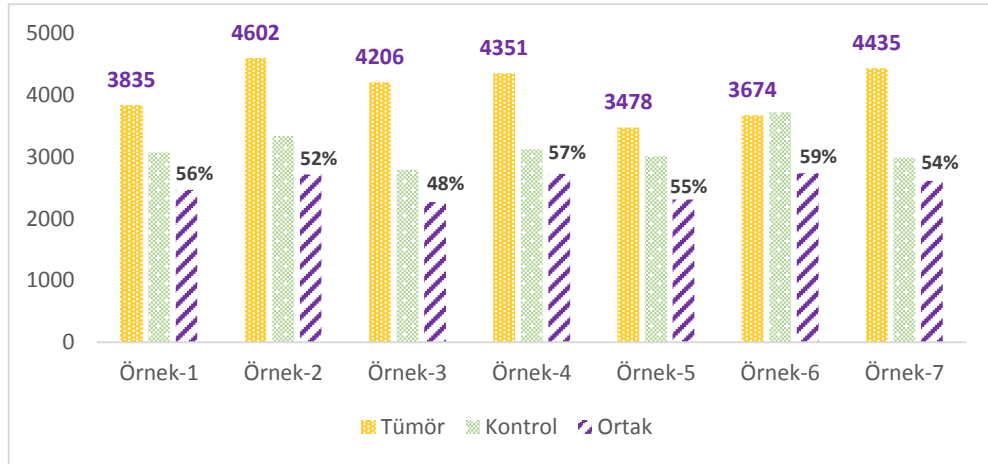
Tümör ve kontrol grubu doku örneklerinde %60'ın üzerinde ortak protein tanımlanmıştır. Her iki grupta tanımlanan peptitlerin ise %50'sinin benzer olduğu görülmüştür. Gruplar arası benzerlikler Şekil 4-5'de verilen ven şeması ile gösterilmiştir. Ayrıca tüm tümör grubu örneklerinde ortak tanımlanan 2036 protein olduğu tespit edilmiş ve bu proteinler kontrol grubunda tanımlanmış 4696 proteinle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda tümör grubunda tanımlanmış proteinlerin 1986'sının aynı zamanda kontrol grubunda da tanımlanmış olduğu görülmüştür. Bununla birlikte kontrol grubunda tanımlanmayan ve tümör grubuna özgü olabileceği düşünülen 50 protein tanımlanmıştır.



Şekil 4-5: Her Bir Grupta Ortak tanımlanan Protein ve Peptit Sayıları

a. Tanımlanan protein sayısı, b. Tanımlanan peptit sayısı

Her bir olguya ait tümör ve kontrol dokularının protein profili açısından karşılaştırması, Şekil 4-6'daki bar grafikleri ile sunulmuştur. En yüksek benzerlik %59 ile Örnek-6'da görülmüştür. Ayrıca her bir olgunun tümör ve kontrol dokuları arasındaki benzerlik %50'nin üzerinde bulunmuştur.



Şekil 4-6: Her Bir Olguda Tanımlanan Protein Sayıları ve Numuneler arasındaki Benzerlik Oranları

Dikey eksenindeki değerler protein sayılarını ifade etmektedir. İlk iki sütun tümör ve kontrol dokularına ait protein sayılarını temsil etmektedir. Çizgili olan son sütun ise her bir olgunun tümör ile kontrol numunesinin benzerlik oranını göstermektedir.

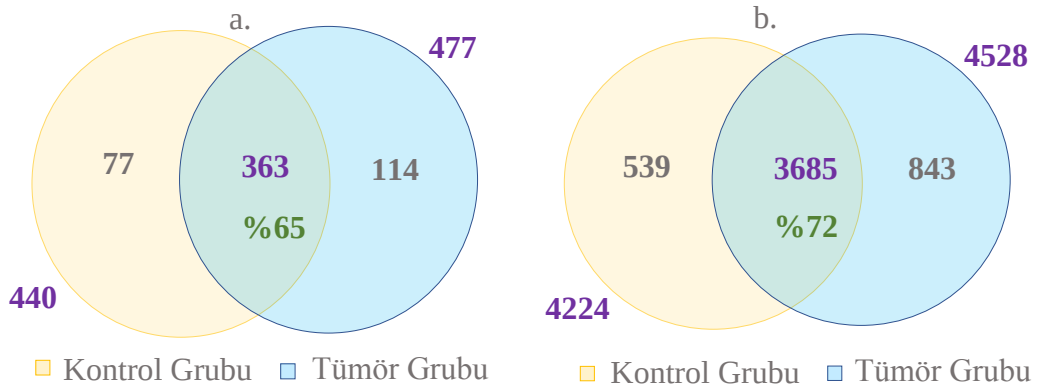
4.3. Serum Örneklerinin Protein Profiline ait Veriler

Serum örneklerinin LC-MS/MS analizi sonrasında tanımlanan toplam 554 proteinden 537'si yüksek güven aralığında olup bunların 477'si büyük hücreli karsinom grubunda, 440'ı kontrol grubunda tanımlanmıştır. Her iki grupta tanımlanan benzer protein oranı %65'tir. Özgün peptitlerin benzerlik oranı ise %72 olarak bulunmuştur (Şekil 4-7). Hastalara ait serum protein profili ayrıca bir öneme sahip olması nedeniyle Tablo 4-3'te sadece hastalara ait örneklerde tanımlanan 114 proteine ait bilgiler verilmiştir.

Tablo 4-2: Serum Gruplarında Tanımlanan Protein ve Peptit Sayıları

Serum	Protein	Peptit	Özgün Peptit	PSMs
Tümör Grubu	477	5201	4528	74514
Kontrol Grubu	440	4865	4224	71593
Total (Tümör&Kontrol)	537	5785	5022	146026

False Discovery Rate (FDR) %1. Yüksek güvende (high confidence) tanımlanan protein sayıları



Şekil 4-7: Serum Tümör Ve Kontrol Gruplarında Ortak Tanımlanan Toplam Protein ve Peptit Sayıları

a. Tanımlanan protein sayısı, b. Tanımlanan peptit sayısı

Tablo 4-3: Sadece Büyük Hücre Karsinom Hastalarının Serum Örneklerinde Tanımlanan Proteinler

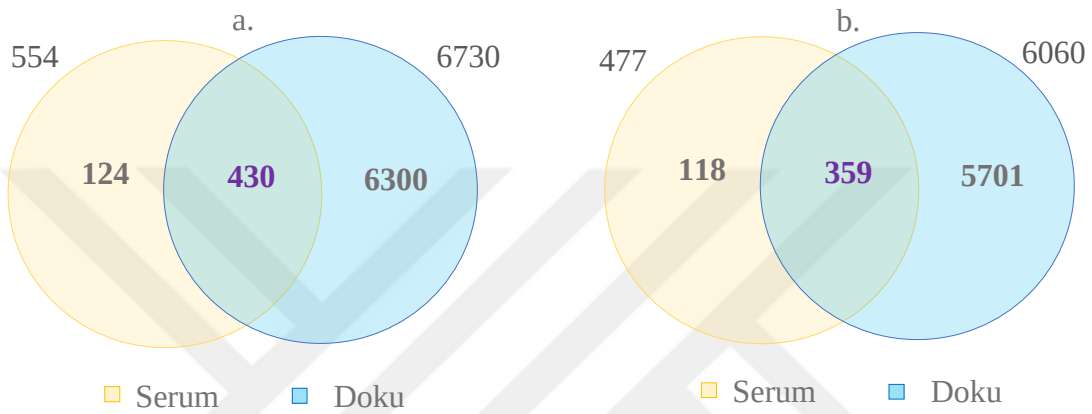
Swiss-Prot Erişim No	Protein Adı	Moleküler Ağırlık
P07900-2	Isoform 2 of Heat shock protein HSP 90-alpha	98.1
P35916	Vascular endothelial growth factor receptor 3	152.7
Q6ZRP7	Sulfhydryl oxidase 2	77.5
P09603	Macrophage colony-stimulating factor 1	60.1
P78371-1	T-complex protein 1 subunit beta	57.5
P35579-1	Myosin-9	226.4
P06310	Immunoglobulin kappa variable 2-30	13.2
P02679	Fibrinogen gamma chain	51.5
P07478	Trypsin-2	26.5
P22897-1	macrophage mannose receptor 1	165.9
Q96CX2	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	35.7
P08833	Insulin-like growth factor-binding protein 1	27.9
P24158	Myeloblastin	27.8
Q8WZ75-1	Roundabout homolog 4	107.4
P14923	Junction plakoglobin	81.7
Q8IWL2-2	Isoform 2 of Pulmonary surfactant-associated protein A1	27.7
P61981	14-3-3 protein gamma	28.3
P60900	Proteasome subunit alpha type-6	27.4
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	50.1
P07355-2	Isoform 2 of Annexin A2	40.4
P30086	phosphatidylethanolamine-binding protein 1	21
P07988	Pulmonary surfactant-associated protein B	42.1
P24387	Corticotropin-releasing factor-binding protein	36.1
Q14960	Leukocyte cell-derived chemotaxin-2	16.4
P13639	Elongation factor 2	95.3
P60174	Triosephosphate isomerase	30.8
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	108.5
P02144	Myoglobin	17.2
Q9BX93	Group XIIB secretory phospholipase A2-like protein	21.6
Q9H299	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	10.4
Q99972	myocilin	56.9
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16	51.2
P14314	Glucosidase 2 subunit beta	59.4
P15090	Fatty acid-binding protein, adipocyte	14.7
Q8N1N4	Keratin, type II cytoskeletal 78	56.8
P50395-1	Rab GDP dissociation inhibitor beta	50.6
Q9NQ76-2	Isoform 2 of Matrix extracellular phosphoglycoprotein	62.1
P07951-1	Tropomyosin beta chain	32.8
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	61
P06733-1	alpha-enolase	47.1
P09211	Glutathione S-transferase P	23.3
P10153	Non-secretory ribonuclease	18.3
Q16627	C-C motif chemokine 14	10.7
P02792	Ferritin light chain	20
Q00610-1	Clathrin heavy chain 1	191.5
P07451	carbonic anhydrase 3	29.5
Q13231-1	Chitotriosidase-1	51.6
Q9UEW3	macrophage receptor MARCO	52.6
Q14767	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	194.9
P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	44.9
Q16270-1	Insulin-like growth factor-binding protein 7	29.1
P34096	Ribonuclease 4	16.8
P19971	thymidine phosphorylase	49.9
P08637	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A	29.1
Q8NFY4	Semaphorin-6D	119.8
P28827-2	Isoform 2 of Receptor-type tyrosine-protein phosphatase mu	165
Q9H4G4	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	17.2

P36222	Chitinase-3-like protein 1	42.6
P31151	Protein S100-A7	11.5
P04792	Heat shock protein beta-1	22.8
Q02985-1	Complement factor H-related protein 3	37.3
P24592	insulin-like growth factor-binding protein 6	25.3
P08670	Vimentin	53.6
P05451	Lithostathine-1-alpha	18.7
Q14974	Importin subunit beta-1	97.1
P04908	histone H2A type 1-B/E	14.1
P0DJ19	Serum amyloid A-2 protein	13.5
Q7Z794	Keratin, type II cytoskeletal 1b	61.9
Q13509	tubulin beta-3 chain	50.4
P39060-3	Collagen alpha-1(XVIII) chain	178.1
Q13332	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	216.9
P23528	Cofilin-1	18.5
Q93063-3	Isoform 3 of Exostosin-2	85.8
P00558	phosphoglycerate kinase 1	44.6
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	36.6
O00299	chloride intracellular channel protein 1	26.9
P48668	Keratin, type II cytoskeletal 6C	60
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	35.5
Q71U36	tubulin alpha-1A chain	50.1
Q02413	Desmoglein-1	113.7
P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule	82.5
P31025	Lipocalin-1	19.2
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89.3
P08758	annexin A5	35.9
Q15335	Chondroadherin	40.4
Q8WWZ8-1	Oncoprotein-induced transcript 3 protein	60
Q9NR63-1	Cytochrome P450 26B1	57.5
Q03154-1	Aminoacylase-1	45.9
P09467	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	36.8
P11142-1	Heat shock cognate 71 kDa protein	70.9
Q5T749	Keratinocyte proline-rich protein	64.1
P03973	Antileukoproteinase	14.3
Q96RG2-2	Isoform 2 of PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase	143.6
Q9P291	Armadillo repeat-containing X-linked protein 1	49.2
P21810	biglycan	41.6
P15151-1	Poliovirus receptor	45.3
P0DOX4	Immunoglobulin epsilon heavy chain	60.3
A0A0B4J1V1	Immunoglobulin heavy variable 3-21	12.8
P51570-2	Isoform 2 of Galactokinase	45.3
Q9Y2F5	Little elongation complex subunit 1	247.7
O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	69.6
Q9H0K1	Serine/threonine-protein kinase SIK2	103.8
P20827-1	Ephrin-A1	23.8
P09960-1	leukotriene A-4 hydrolase	69.2
P48357-3	Isoform C of Leptin receptor	109.3
P46952	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	32.5
Q14240-2	Isoform 2 of Eukaryotic initiation factor 4A-II	46.5
P46821	microtubule-associated protein 1B	270.5
Q8NH63	Olfactory receptor 51H1	33.7
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	77.3
Q5TBA9	Protein furry homolog	338.7
A6NIJ5	Putative protein FAM90A20P	50
Q96DY2-1	IQ domain-containing protein D	52.3
P20700	Lamin-B1	66.4

Tabloda normal serum örneklerinde tanımlanan proteinlerden farklı olarak büyük hücre karsinom hastalarının serum örneklerinde tanımlanmış proteinlerin bir listesi verilmiştir.

4.4. Serum ve Doku Protein Profillerinin Karşılaştırılması

Serum örneklerinden elde edilen protein profili, büyük hücre karsinom hastalarının doku örneklerinde tanımlanan toplam 6730 proteinle kıyaslandığında, 430 proteinin ortak olduğu görülmüştür. Benzer şekilde sadece tümör grubu doku örneklerindeki protein profili aynı hastaların serum profili ile karşılaştırıldığında ise 359 proteinin ortak olduğu bulunmuş ve bunlar Şekil 4-8’deki venn şeması ile gösterilmiştir.



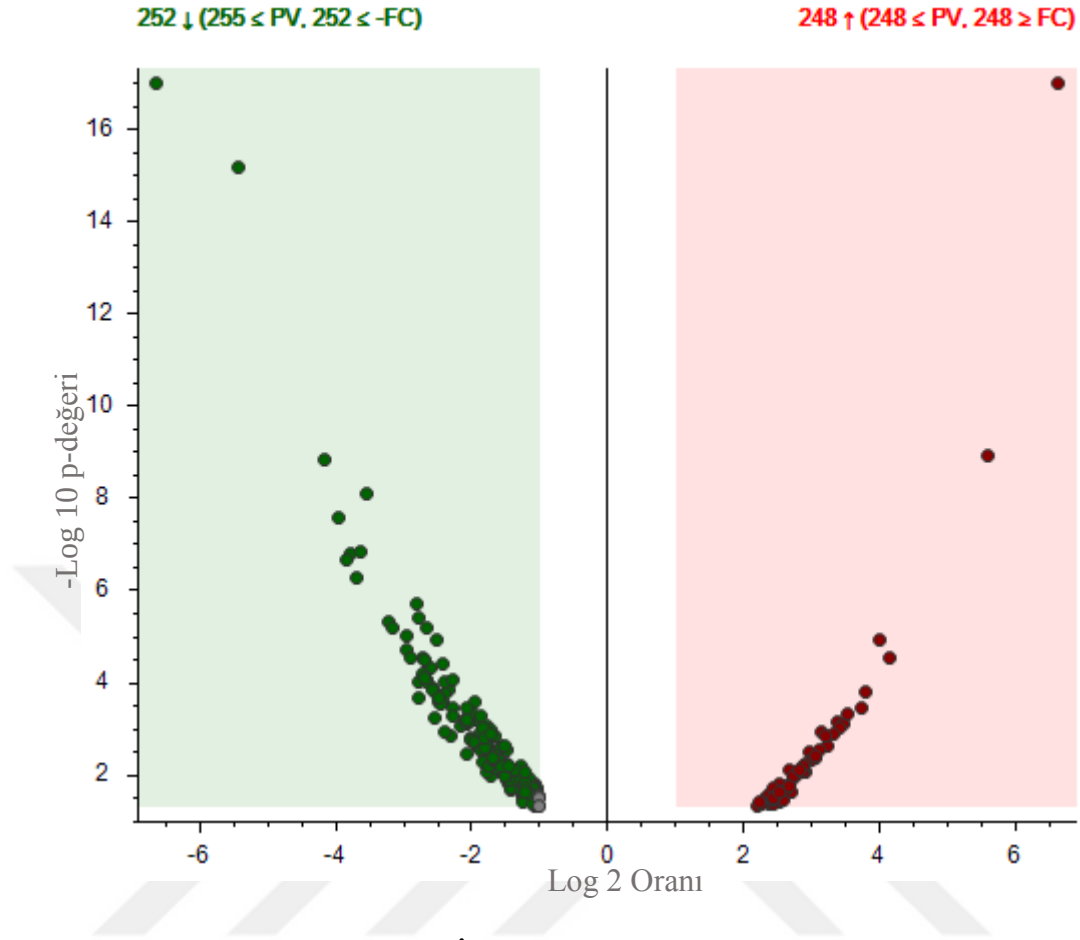
Şekil 4-8: Serum ve Doku Örnek Setlerinde Tanımlanan Ortak Proteinler

a. Serum ve doku örnek setlerinde tanımlanan toplam protein sayılarının karşılaştırması b. Büyük hücre karsinom hastalarının serum ve doku numunelerinde ortak bulunan protein sayıları

4.5. Protein İfade Farklılıklarına ait Veriler

Dokulardan oluşan örnek setinde 4020 proteinin etiketsiz kantifikasyon analizi yapılmış ve bu proteinlerden yüksek güvenilirlikte olan 3690’ının kat değişimleri dikkate alınmıştır. Yapılan filtrelemelerle en az iki kat ifade değişimi olan 1576 proteinin 503’ünde istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p < 0,05$). Anlamlı ifade değişimi olan proteinlerin 255’inin tümör grubunda azalan ifade değişimi olduğu, 248’inde ise artış olduğu görülmüştür (Şekil 4-9).

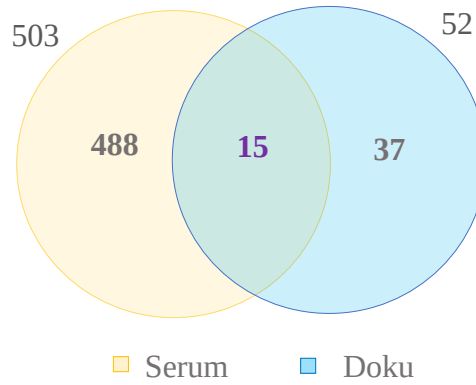
Serum örnek setinin etiketsiz kantifikasyon analizinde 330 proteinden yüksek güven aralığında tanımlanan 273’ü değerlendirmeye alınmıştır. Kontrol serum grubuna göre büyük hücre karsinom hastalarının serum örneklerinde en az 0,5 kat azalan ya da en az 1,5 kat artan ifade değişimi olan 82 protein olduğu bulunmuştur. Bunlar arasında 51 proteindeki ifade değişimi istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0,05$) bir tanesi anlamlılık sınırındadır.



Şekil 4-9: Tümör Doku Grubunda İfade Değişimi Görülen Proteinlere ait Volcano Plot Grafiği

p değeri<0.05; Log2 kat değişimi: 2; Yeşil ve pembe alanlar kat değişim alanını belirtmektedir.

- Anlamli ve kat değişim eşiği 2 ve daha yüksek olan proteinleri
- Anlamli ve kat değişim eşiği 0,5 ve daha az olan proteinleri
- Anlamli ancak kat değişim eşiğini karşılamayan proteinleri temsil etmektedir.



Şekil 4-10: Doku ve Serum Örnek Setlerinde Ortak İfade Farklılığı Bulunan Protein Sayıları

Anlamli ifade farklılığı tespit edilen dokudaki 503 protein ve serumdaki 52 protein karşılaştırıldığında 15 proteinin ortak olduğu görülmüştür (Şekil 4-10). Bu 15 protein daha detaylı incelendiğinde dört proteinin hem dokuda hem de serumda ifadesinin arttığı, üçünün ise her iki örnek setinde ifadesinin azaldığı bulunmuştur (Tablo 4-4).

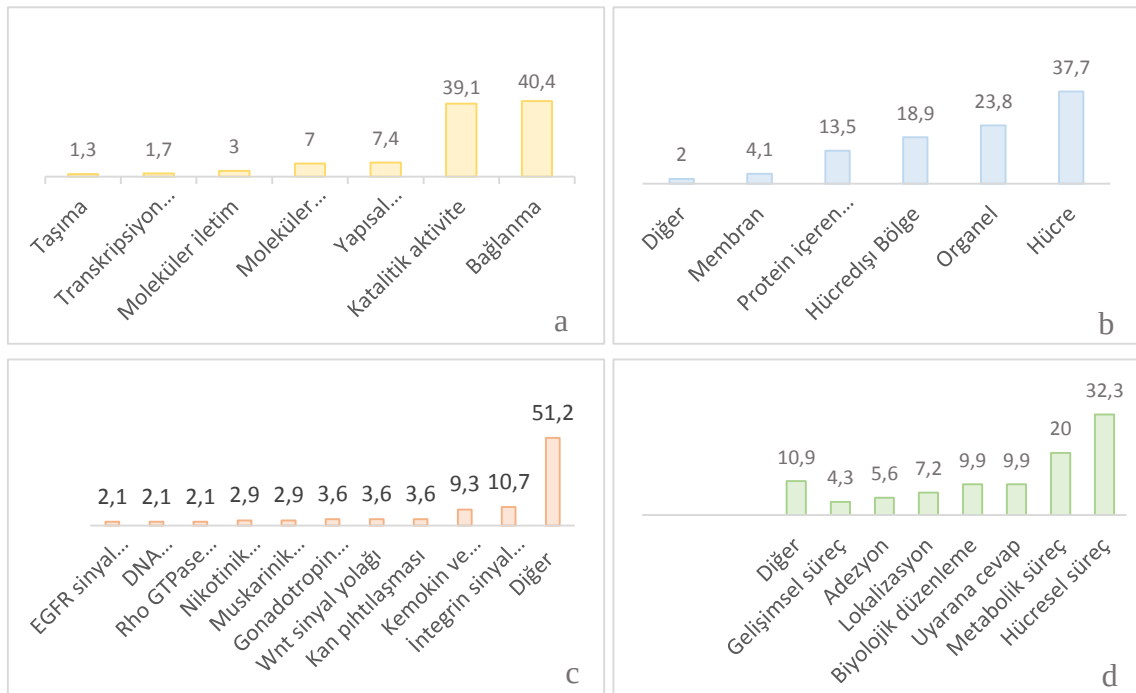
Tablo 4-4: Doku Ve Serum Gruplarında Ortak Bulunan Anlamli İfade Farklılıkları

Erişim Numarası	Protein Adı	Dokudaki Kat değışimi	Serumdaki Kat değışimi
P00738	Haptoglobin	0.49	3.699
P01033*	Metalloproteinase inhibitor 1	5.539	3.631
P02042	Hemoglobin subunit delta	0.299	6.482
P02655	Apolipoprotein C-II	0.32	7.039
P02656	Apolipoprotein C-III	0.314	4.116
P02743	Serum amyloid P-component	0.27	1.671
P02775	Platelet basic protein	0.435	1.999
P03950	Angiogenin	0.365	1.759
P04275	Von Willebrand factor	0.319	4.085
P12111*	Collagen alpha-3(VI) chain	0.471	0.417
P18065*	Insulin-like growth factor-binding protein 2	5.309	1.923
P22105-4*	Isoform 5 of Tenascin-X	0.208	0.403
Q03591*	Complement factor H-related protein 1	100	4.979
Q15848*	Adiponectin	0.287	0.186
Q16610-4*	Isoform 4 of Extracellular matrix protein 1	100	1.654

Anamlılık sınırı $p < 0,05$; azalan ifade değışimleri mavi, artan ifade değışimleri pembe renk ile belirtilmiştir.

4.6. Protein Sınıflandırmalarına ait Veriler

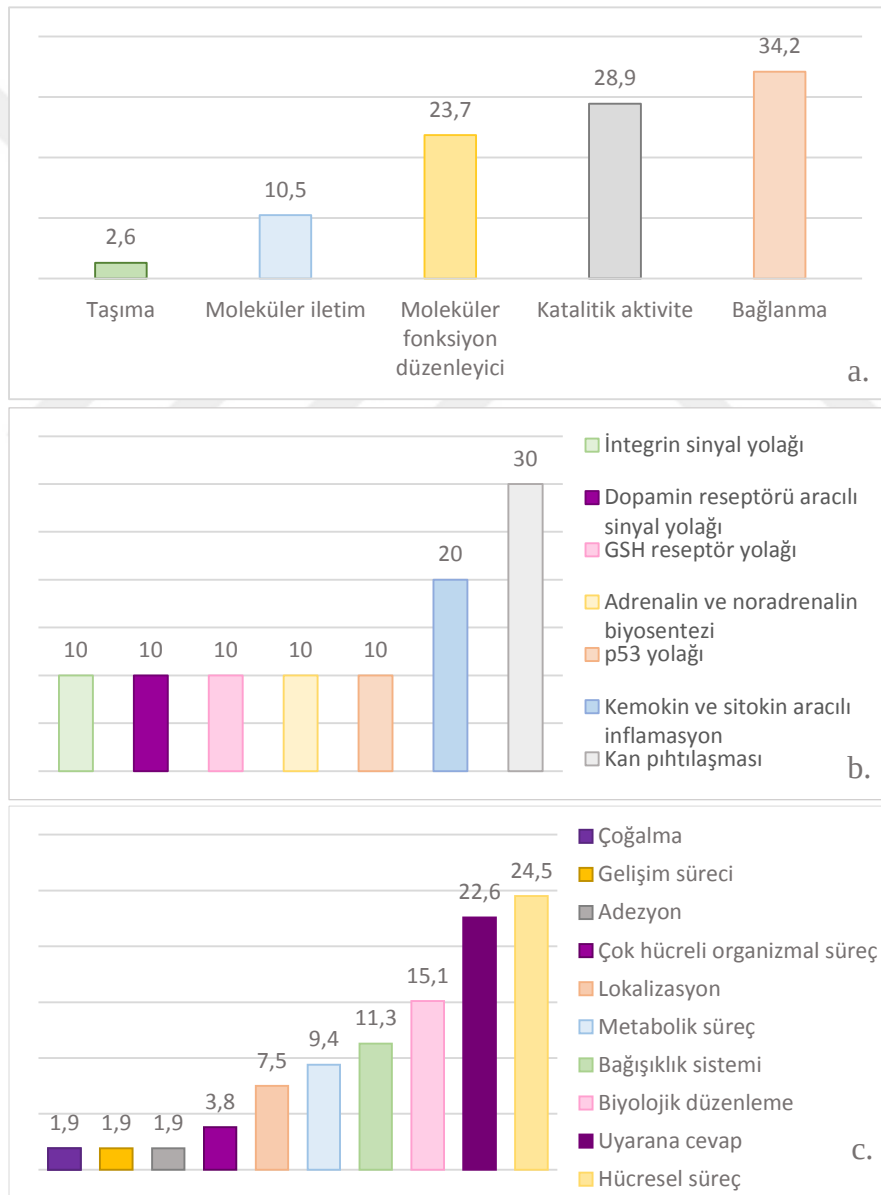
İfade değişimi olan proteinlere ait erişim numaraları PANTHER veritabanına yüklendikten sonra proteinler moleküler fonksiyonları, bulundukları hücresel yapıları, rol aldıkları biyolojik süreçleri ve yolakları dikkate alınarak farklı gruplar altında sınıflandırılmıştır (Şekil 4-11). Doku örnek setindeki proteinlerin önemli bir kısmı bağlanma (%40,4) ve katalitik aktivite (%39,1) ile ilişkili bulunmuştur. Yine bu proteinlerin yarısından fazlasının hücre ve organellerde yer alan proteinler olduğu tespit edilmiştir. İfade farklılığı tespit edilen membran proteinlerinin sayısı ise %5'in altında kalmıştır. Ayrıca Şekil 4-11c görseline ait bar grafiğinde ilk 10 sinyal yolağı ve yüzde oranları gösterilmiştir. Bu yolaklarda rol alan proteinlerin %50'ye yakını hücre-hücre dışı matris (ECM) yapışmasını sağlayan ve transmembran reseptörlerden oluşan integrin sinyal yolağı başlığı altında sınıflandırılmış olup bu sınıfı kaveolin (CAV1), aktin (ACTA2), kolajen (COL8A1, COL6A2, COL10A1, COL6A1), integrin alfa (ITGA1), laminin (LAMA5, LAMB2, LAMB3), parvin (PARVA) ve Ras (RRAS) proteinleri oluşturmaktadır. Ayrıca sınıflandırmanın ilk on sırasını oluşturan yolaklar arasında akciğer kanserinde önemi bilinen DNA replikasyonu, EGFR ve Wnt sinyal yolakları da yer almaktadır.



Şekil 4-11: Doku Örnek Setinde İfade Değişimi olan Proteinlerin Sınıflandırılması

a. Moleküler Fonksiyon, b. Hücresel Yapı, c. Yolak, d. Biyolojik Süreç

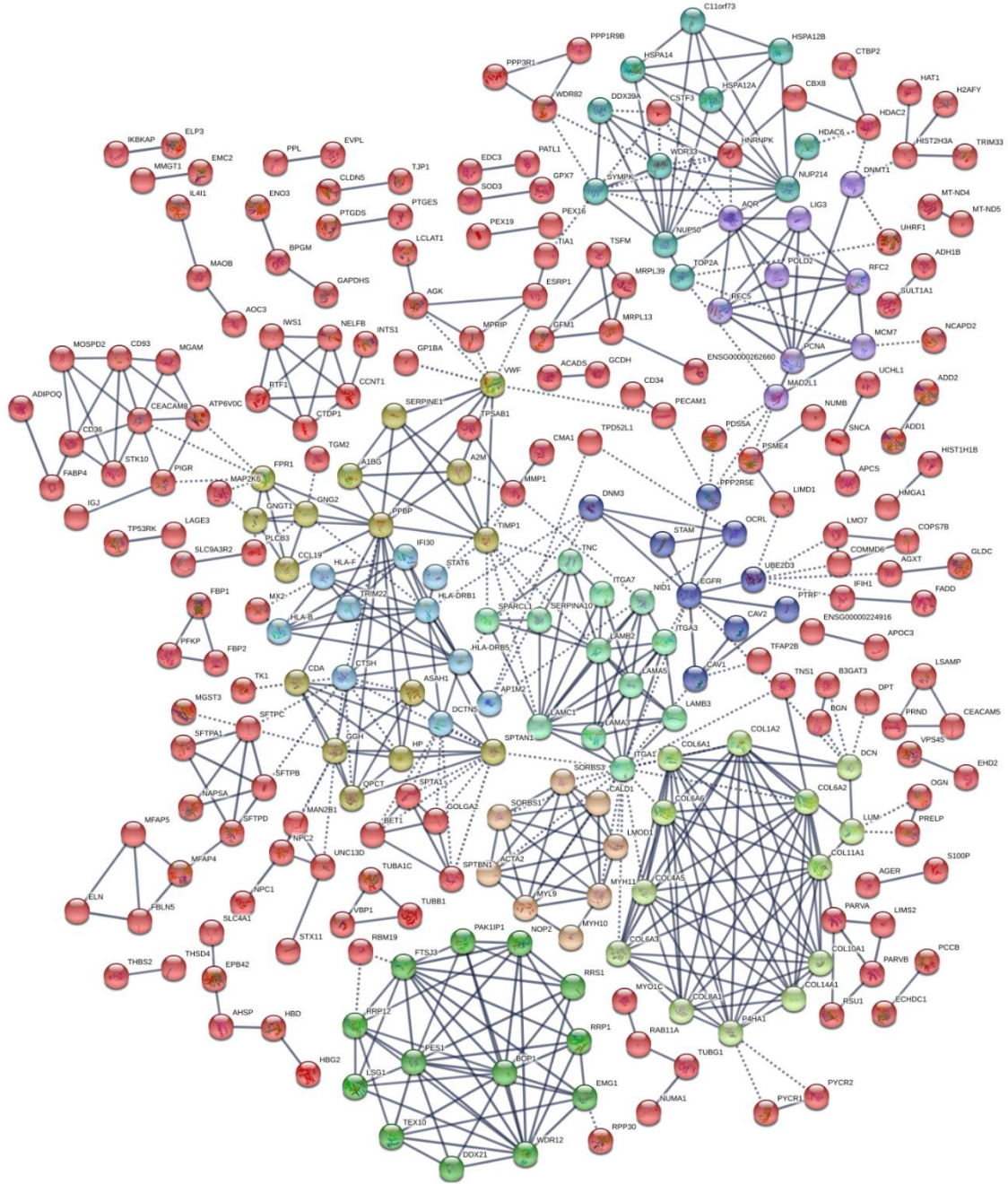
Serumda ifade farklılığı bulunan 52 protein ise üç farklı kategoride sınıflandırılmıştır (Şekil 4-12). Moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılan serum proteinlerinin önemli bir kısmı doku proteinlerinde olduğu gibi bağlanma ve katalitik aktivite ile ilişkili bulunmuştur. Aralarında bağlanma aktivitesine sahip proteaz inhibitörleri sınıfından IGFBP2 ile TIMP1 ve serin proteaz inhibitörleri sınıfından ADAMTS13, SERPINA4 ve SERPINA6’nın da bulunduğu 13 protein tespit edilmiştir. Bununla birlikte artan ifade değişimi gösteren angiogenin (ANG) ile azalan ifade değişimi gözlenen dopamin beta-hidroksilaz (DBH) ve glutatyon preoksidaz 3’ün (GPX3) katalitik aktivite gösteren proteinler sınıfına dahil edildiği görülmüştür.



Şekil 4-12: Serum Örnek Setinde İfade Değişimi olan Proteinlerin Sınıflanlandırması

a. Moleküler Fonksiyon, b. Yolak, d. Biyolojik Süreç

4.7. Protein-protein Etkileşim Analizleri

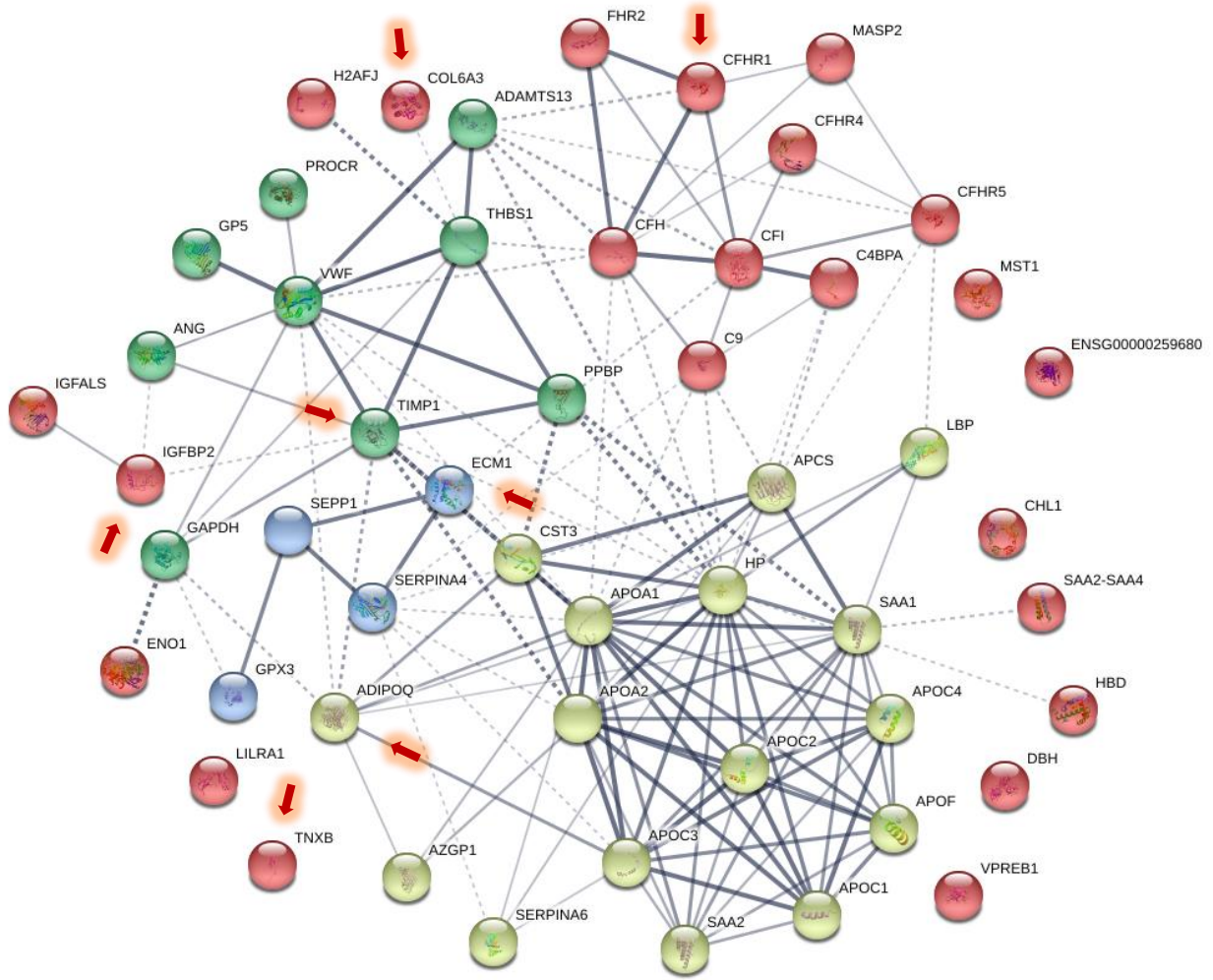


Şekil 4-13: Doku Proteinlerine ait Protein-Protein Etkileşim Ağı

Ağ sistemiyle bağlantısı bulunamayan proteinlere ait düğümler gizlenmiştir. 503 protein girişinden 494'ü veri tabanı ile eşleşmiştir.

Anlamalı ifade değişimi olan 503 protein STRING Version 11 online veri tabanına yüklenerek protein-protein etkileşim ağı (PPI: protein-protein interaction) oluşturulmuştur. Veri tabanında minimum etkileşim puanı 0.900 (en yüksek güven) ayarlanmıştır (Şekil 4-13). Bağlantılı olmayan proteinlerin çıkarılmasıyla ağ sisteminde 190 proteini temsil eden düğüm ve 556 bağlantı kenarı elde edilmiştir. Ağ sistemine ait bazı değerlerden ortalama düğüm derecesi: 2,25 Ortalama yerel kümeleme katsayısı: 0,407 ve PPI zenginleştirme p değeri $<1.0e-16$ olarak bulunmuştur. Elde edilen etikeşim ağında en az 5 proteinle ortak fonksiyonu paylaşan 50'nin üzerinde protein olduğu görülmüştür. Şekil 4-13'de de görüldüğü gibi ribosome biogenesis protein (BOP1), cytidine deaminase (CDA), kolajenler (COL4A5, COL6A1-2-6, COL8A1, COL10A1, COL11A1), Integrin alpha-1 (ITGA1), Laminin subunit beta 2-3 (LAMB2-3), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Cyclin T1 (CCNT1), Procathepsin H (CTSH), Gamma-glutamyl hydrolase (GGH) ve TIMP 1 (SPARCL1) birden fazla proteinle ilişkileri olan proteinlerden bazılarıdır.

Sisteme yüklenen serum örnek setine ait 52 proteinin hepsi veri tabanıyla eşleşmiştir. Bununla birlikte aralarında TNXB'nin de bulunduğu yedi proteinin (MST1, CHL1, ENSG00000259680, DBH, VPRED1, TNXB ve LILRA1) ağ sistemindeki herhangi bir proteinle ilişkisi bulunamamıştır (Şekil 4-14). Ancak PRM analizini yaptığımız TIMP1'in 11 farklı proteinle (THBS1, CST3, VWF, PPBP, APOA1, APOA2, ADIPOQ, GAPDH, ANG, HP, IGFBP2) ilişkili olduğu görülmüştür. Ayrıca TIMP1'in doğrulamasını yaptığımız yedi protein arasından direkt ilişkili olduğu ADIPOQ ve IGFBP2'nin yanı sıra COL6A3 ile bağlantısı olan thrombospondin 1 (THBS1) proteini ile güçlü ilişkisi olduğu görülmektedir. Ağ sistemi dikkatli incelendiğinde THBS1'in, aynı zamanda CFHR1 ile ilişkisi olan ADAMTS13 ile güçlü bağlantısı olduğu anlaşılmaktadır. CFHR1 ayrıca ADAMTS13'ün de ilişkili olduğu complement factor 1 (CF1) ile bağlantılı olup CF1 aynı zamanda ECM1 ile ilişkilidir. IGFBP2 ise TIMP1 dışında IGFALS ve angiogenin (ANG) ile ilişkili iken ADIPOQ'nun çok sayıda proteinle bağlantısı olduğu görülmektedir. Sonuç olarak doğrulaması yapılan proteinlerin genel itibarıyla güçlü ya da zayıf bir şekilde birbirleriyle ilişkili olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4-14: Serum Proteinlerine ait Protein-Protein Etkileşim Ağı

Serum örneklerinde PRM analizi yapılan proteinler kırmızı ok ile gösterilmiştir.

4.8. PRM Analizlerine ait Sonuçlar

Doku örnek setini oluşturan tümör ve kontrol grubu arasında keşif modu ile anlamlı ifade farklılığı tespit edilen proteinlerden 15'inin PRM analizleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 4-5). Analiz sonrası alan hesaplamaları yapılarak sonuçlar ayrıca kontrol edilmiştir. Sonuçta tümör grubunda artan ifadeye sahip 5 proteinin ve azalan ifadeye sahip 10 proteinin doğrulaması yapılmış ve üç proteine ait bazı görseller Şekil 4-15 – 20 arasında verilmiştir

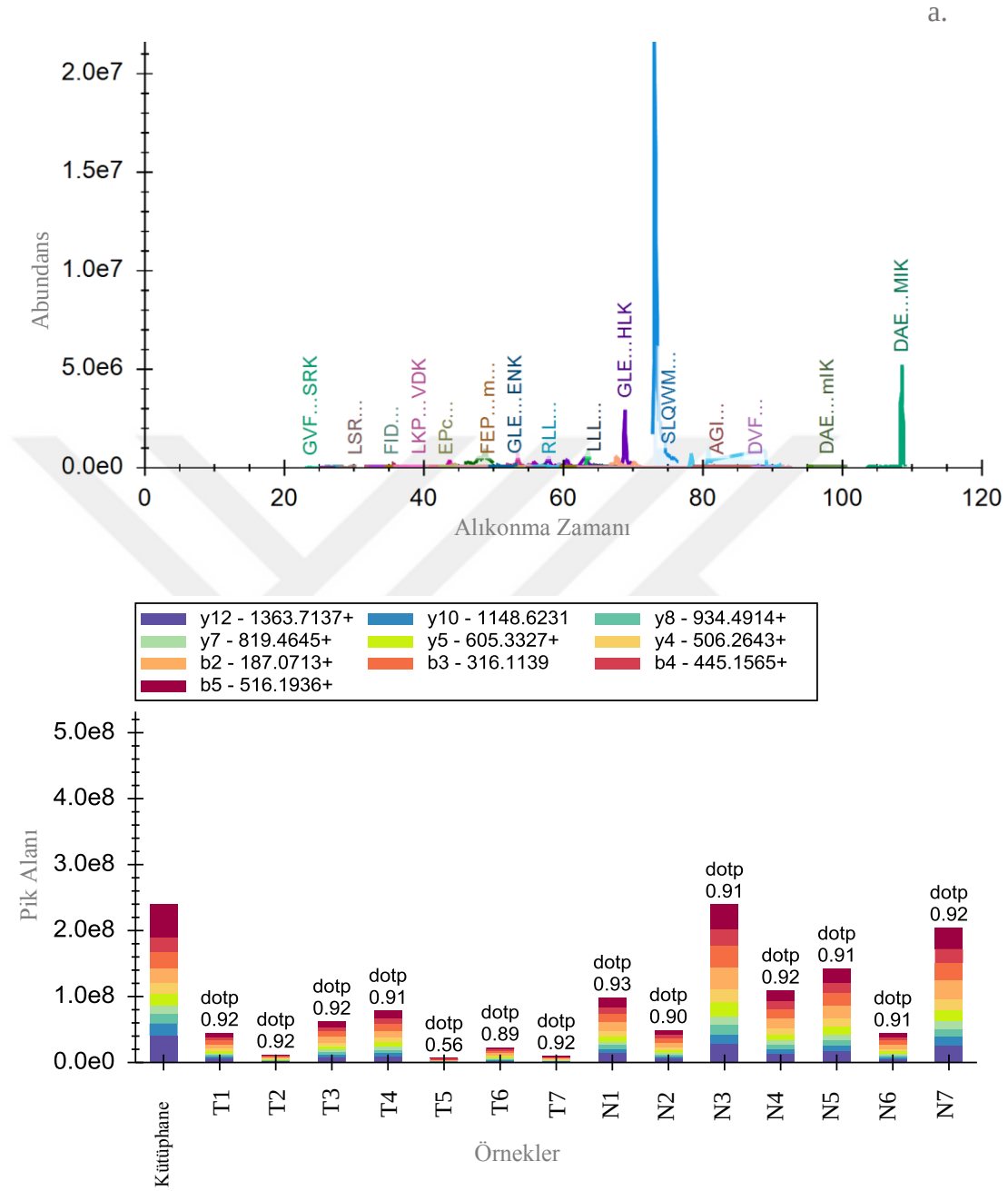
Tablo 4-5: Dokuda PRM Analizi Yapılan Proteinlerin Listesi

<i>Erişim No.</i>	<i>Gen Sembolü</i>	<i>Protein Adı</i>	<i>Kat Değişimi</i>	<i>Özgün Peptit Sayısı</i>
<i>O96009</i>	NAPSA	Napsin-A	0.074	5
<i>P00325</i>	ADH1B	Alcohol dehydrogenase 1B	0.13	24
<i>P01023</i>	A2M	Alpha-2-macroglobulin	0.472	60
<i>P02730</i>	SLC4A1	Band 3 anion transport protein	0.335	27
<i>P07585</i>	DCN	decorin	0.283	22
<i>P12109</i>	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	0.311	40
<i>P12110</i>	COL6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	0.296	7
<i>P12111</i>	COL6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	0.469	147
<i>P13674-1</i>	P4HA1	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	5.209	24
<i>P17096-2</i>	HMGA1	Isoform HMG-Y of High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	7.572	1
<i>P35749</i>	MYH11	Myosin-11	0.21	134
<i>P51884</i>	LUM	Lumican	0.398	17
<i>Q01813</i>	PFKP	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	5.346	18
<i>Q71D13</i>	HIST2H3A	Histone H3.2	5.154	1
<i>Q9HB71</i>	CACYBP	Calcyclin-binding protein	5.349	11

Serum örnek setinde ise dokuda ortak bulunan proteinlerden benzer ifade farklılığı gözlenen 7 proteinin tamamının doğrulaması yapılmıştır (Tablo 4-6).

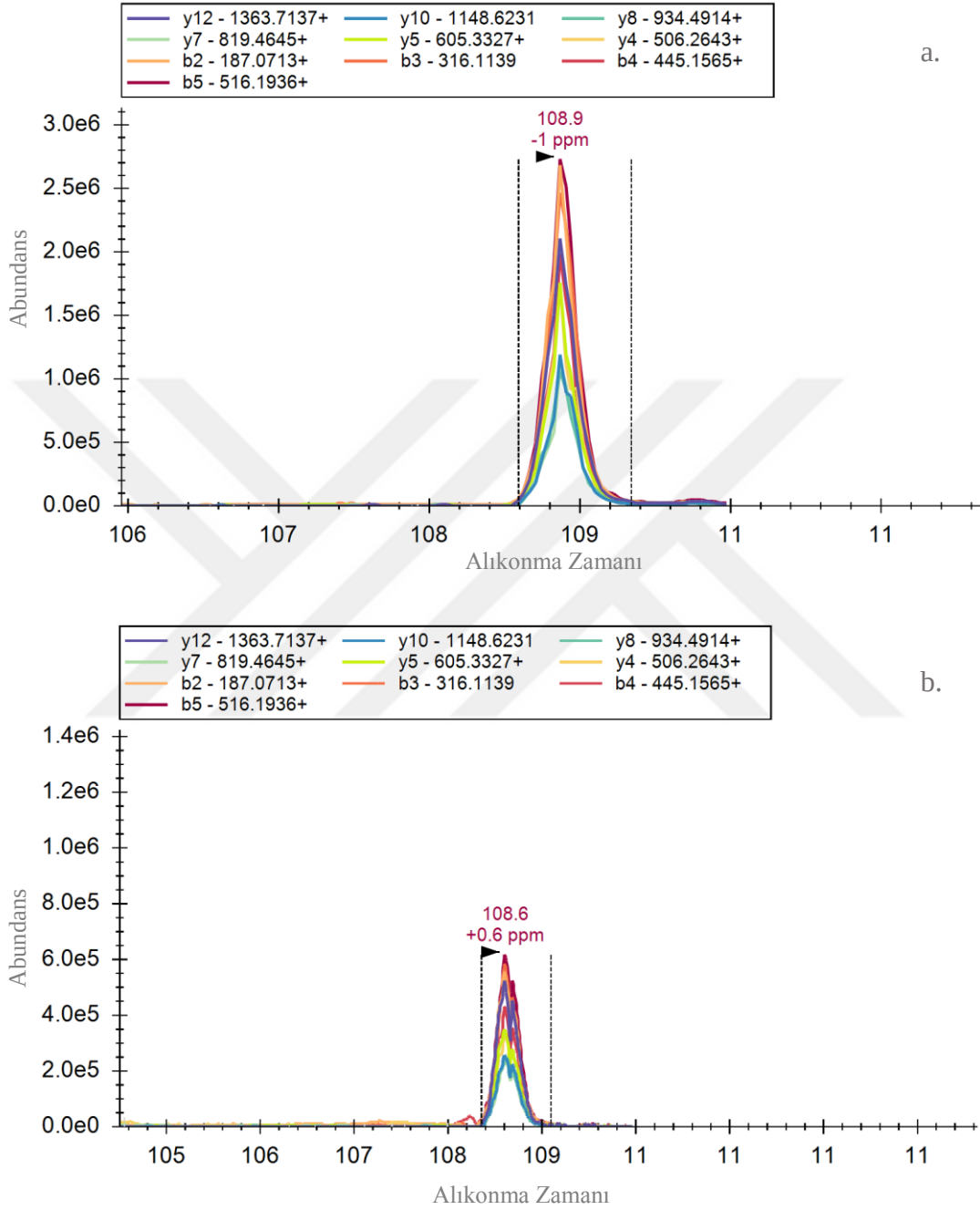
Tablo 4-6: Serumda PRM Analizi Yapılan Proteinlerin Listesi

<i>Erişim No.</i>	<i>Gen Sembolü</i>	<i>Protein Adı</i>	<i>Kat Değişimi</i>	<i>Özgün Peptit Sayısı</i>
<i>Q16610-4</i>	ECM1	Isoform 4 of Extracellular matrix protein 1	1,654	13
<i>P18065</i>	IGFB2	Insulin-like growth factor-binding protein 2	1,923	1
<i>P01033</i>	TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1	3,631	1
<i>P12111</i>	COL6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	0.417	2
<i>P22105-4</i>	TNXB	Isoform 5 of Tenascin-X	0.403	4
<i>Q15848</i>	ADIPOQ	Adiponectin	0.186	1
<i>P01033</i>	CHFR1	Complement factor H-related protein 1	3.631	1



Şekil 4-15: PRM Analiziyle Elde Edilen Collagen alpha-1(VI) chain proteinine ait Görseller

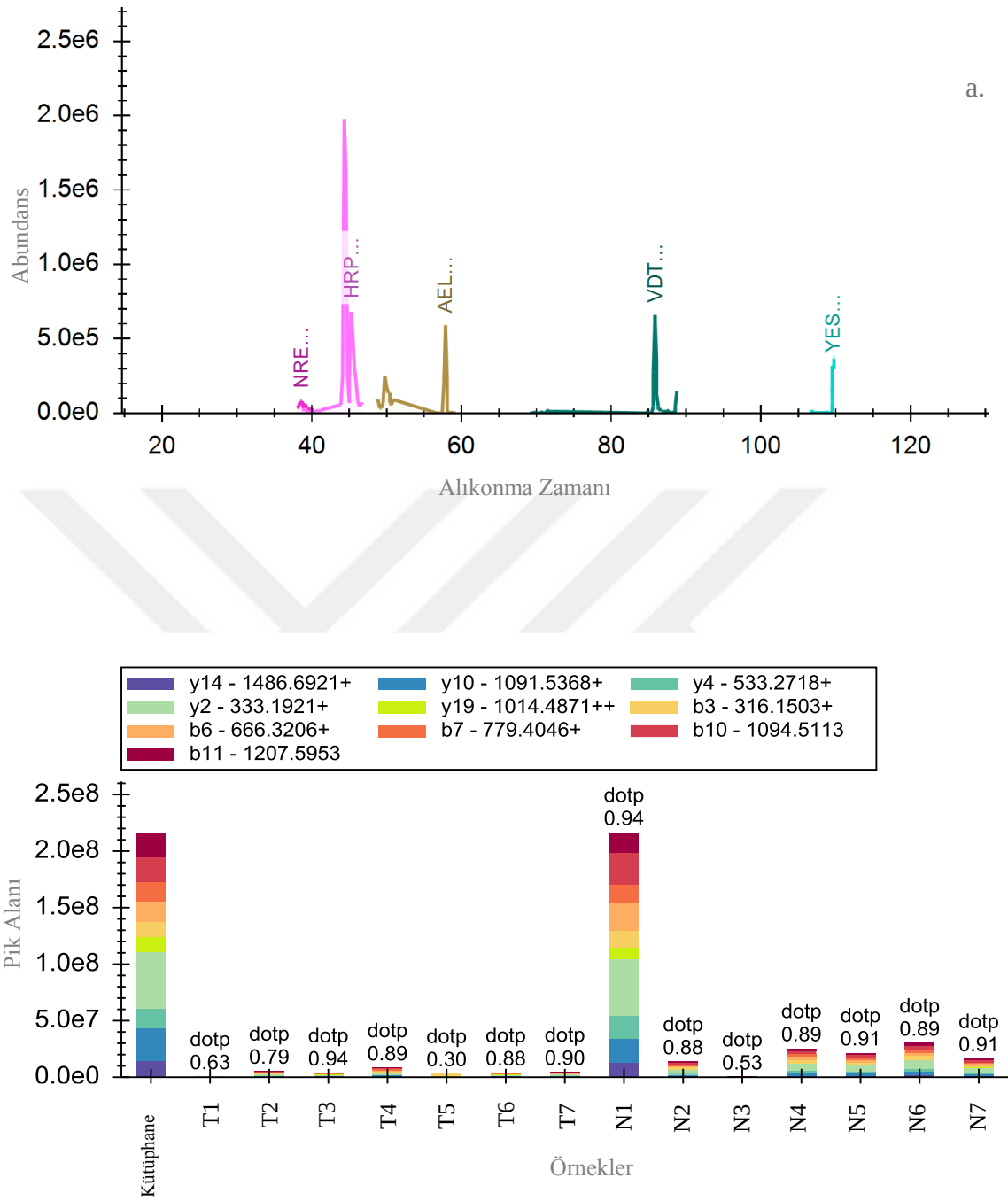
SwissProt|P12109 a. Proteine ait genel kromatogram. b. Her bir örneğin R.DAEEAISQTIDTIVDMIK.N [222, 239] peptidinde ait bollukları gösteren bar grafiği. Fragment iyonların her biri farklı renk ile temsil edilmiştir. Grafikte verilen “dotp” değeri ise kütüphane ile benzerlik derecesini gösterir.



Şekil 4-16: Collagen alpha-1(VI) chain proteinine ait Fragment İyon Kromatogramları

Fragmentler aynı hastaya ait kontrol (N) ve tümör (T) örneklerinin R.DAEEAISQTIDTIVDMIK.N [222, 239] peptidine aittir.

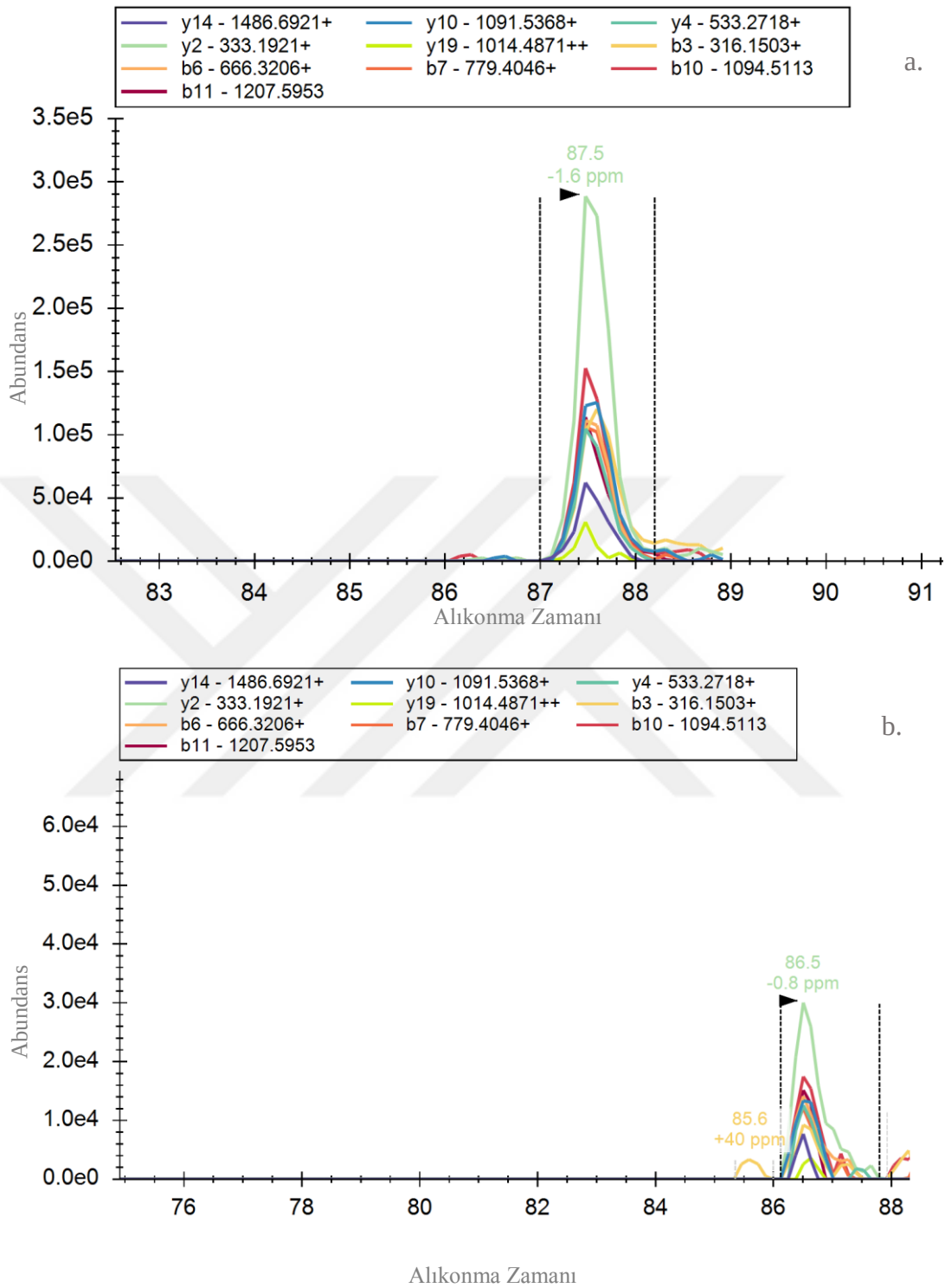
a. N3 örneğinin pik alan entegrasyonu b. T3 örneğinin pik alan entegrasyonu



Şekil 4-17: PRM Analiziyle Elde Edilen Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 proteinine ait Görseller

SwissProt| Q01082-1 a. Proteine ait genel kromatogram.

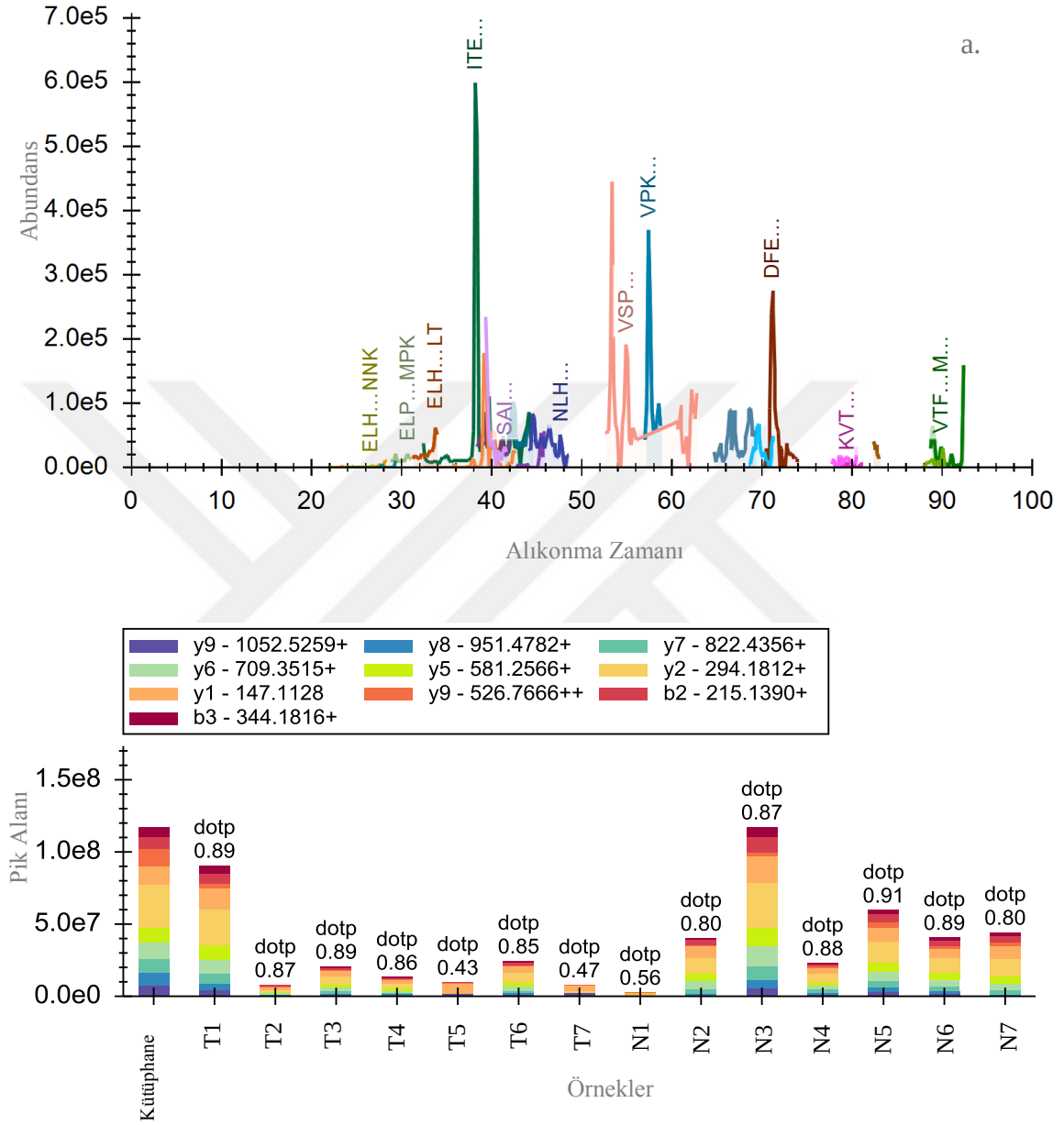
b. Her bir örneğin R.VDTVNHLADELINSGHSDAATIAEWK.D [1754, 1779] peptidine ait bollukları gösteren bar grafiği. Fragment iyonların her biri farklı renk ile temsil edilmiştir. Grafikte verilen “dotp” değeri ise kütüphane ile benzerlik derecesini gösterir.



Şekil 4-18: Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 proteinine ait Fragment İyon Kromatogramları

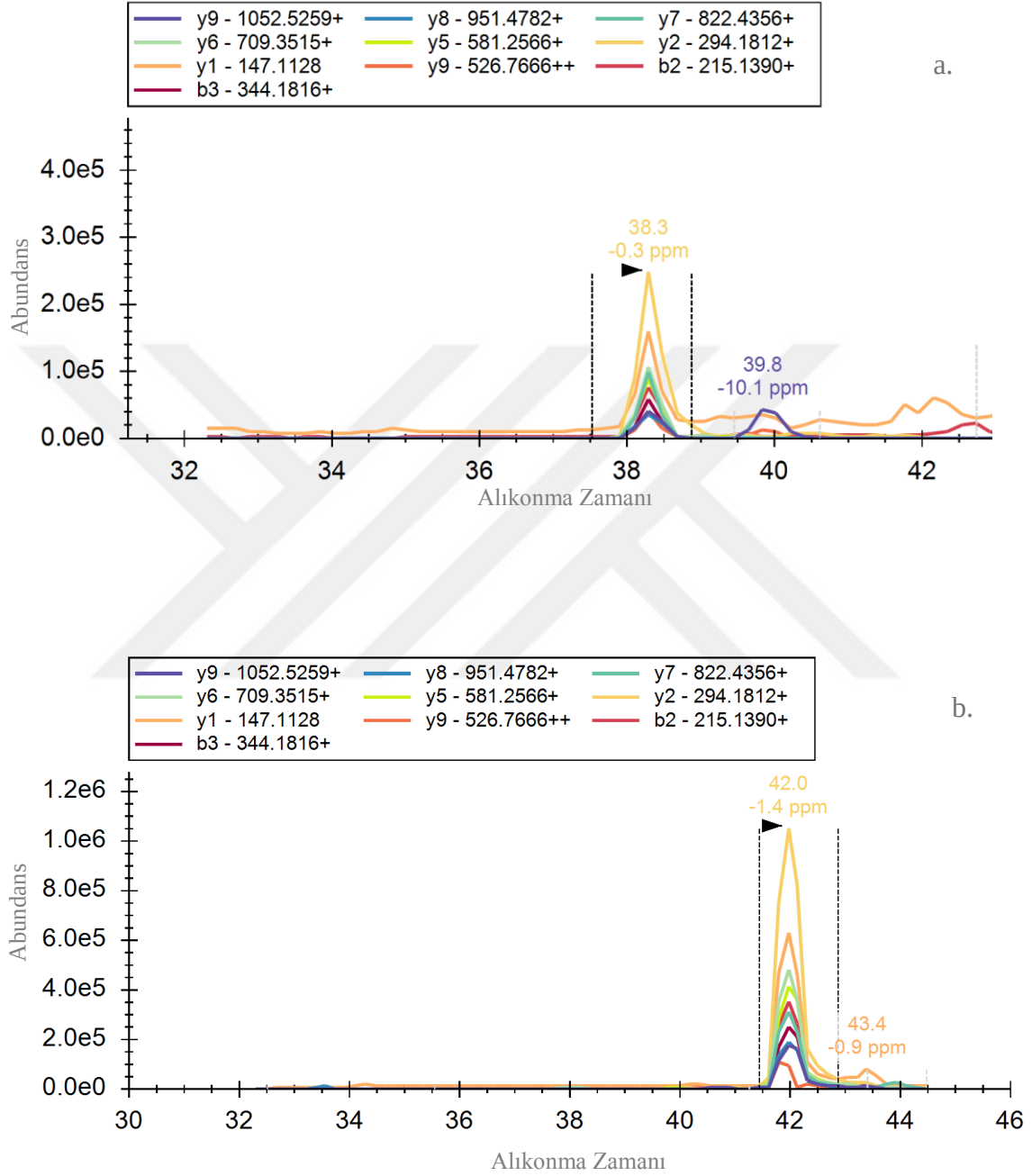
Fragmentler aynı hastaya ait kontrol (N) ve tümör (T) örneklerinin R.DAEEAISQTIDTIVDMIK.N [222, 239] peptidine aittir.

a. N5 örneğinin pik alan entegrasyonu b. T5 örneğinin pik alan entegrasyonu



Şekil 4-19: PRM Analiziyle Elde Edilen Decorin proteinine ait Görseller

SwissProt| P07585 a. Proteine ait “genel kromatogram. b. Her bir örneğin K.ITEIKDGDFK.N [92, 101] peptidine ait bollukları gösteren bar grafiği. “Fragment iyonların her biri farklı renk ile temsil edilmiştir. Grafikte verilen “dotp” değeri ise kütüphane ile benzerlik derecesini gösterir.

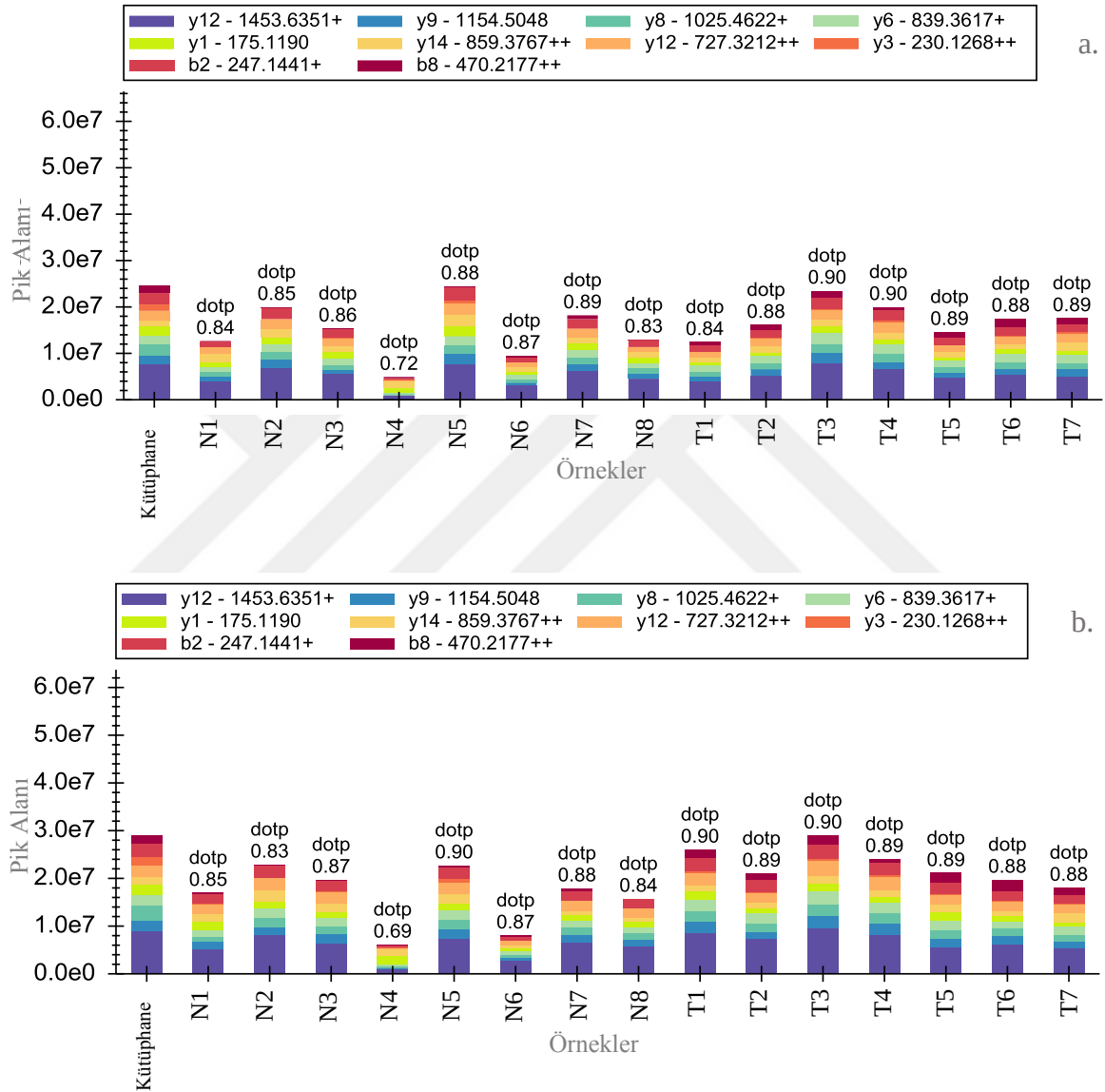


Şekil 4-20: Decorin proteinine ait Fragment İyon Kromatogramları

Fragmentler aynı hastaya ait tümör (T) ve kontrol (N) örneklerinin K.ITEIKDGDFK.N [92, 101] peptidine aittir.

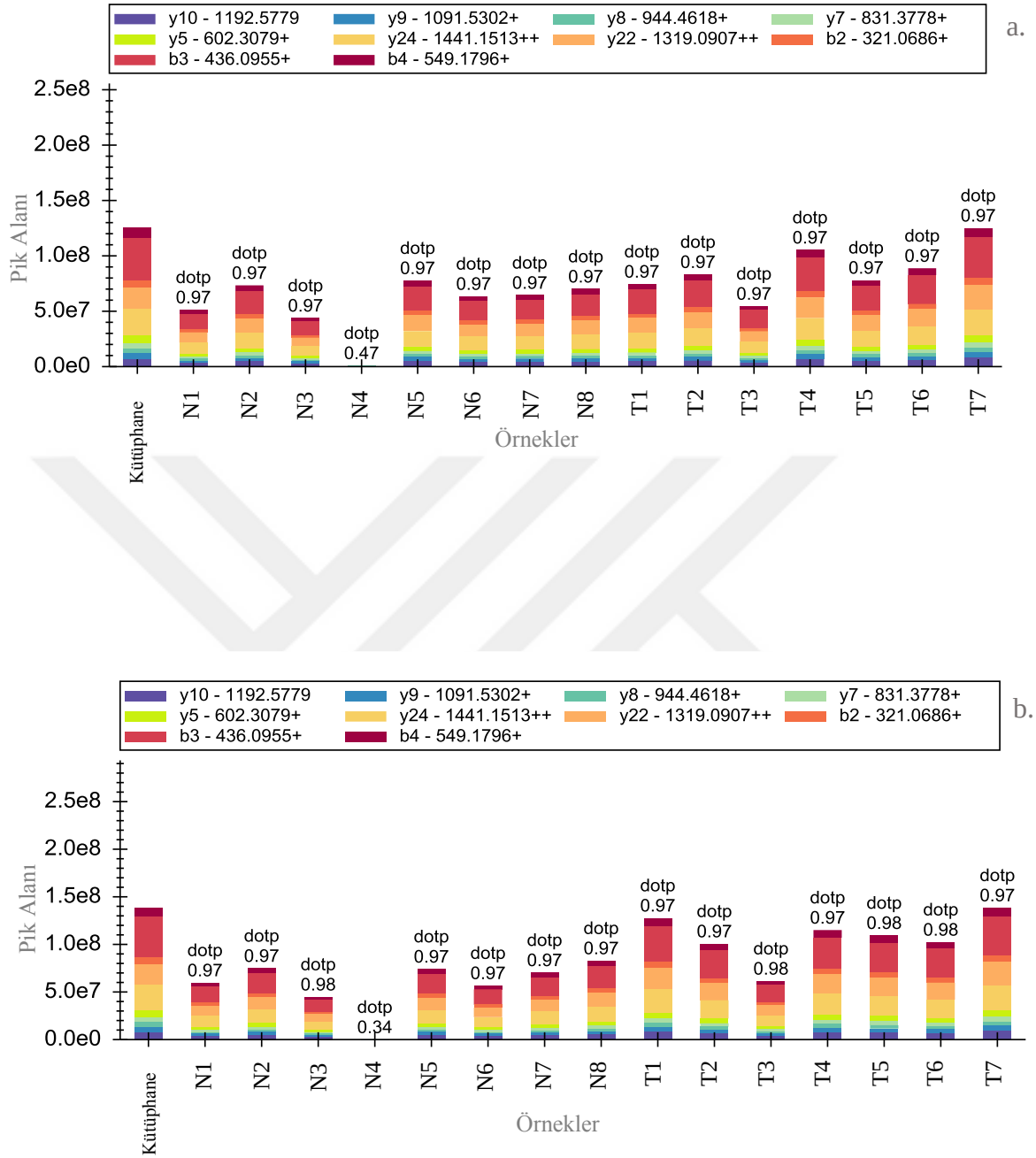
a. T3 örneğinin pik alan entegrasyonu b. N3 örneğinin pik alan entegrasyonu

Hem serumda hem dokuda aynı yönde ifade değişimi gösteren 7 proteinin serum örneklerinde gerçekleştirilen PRM analizleri iki tekrarlı çalışılmıştır. Tekrar analizlerinin kolay kıyaslanabilmesi için elde edilen bar grafikleri alt ata verilmiştir (Şekil 4-21-27). Bu proteinlerin 4'ünün (TIMP1, IGFBP1, CHFRP1 ve ECM1) tümör grubunda artış gösterdiği ve 3'ünün (COL6A3, TNXB ve ADIPOQ) de azaldığı doğrulanmıştır.



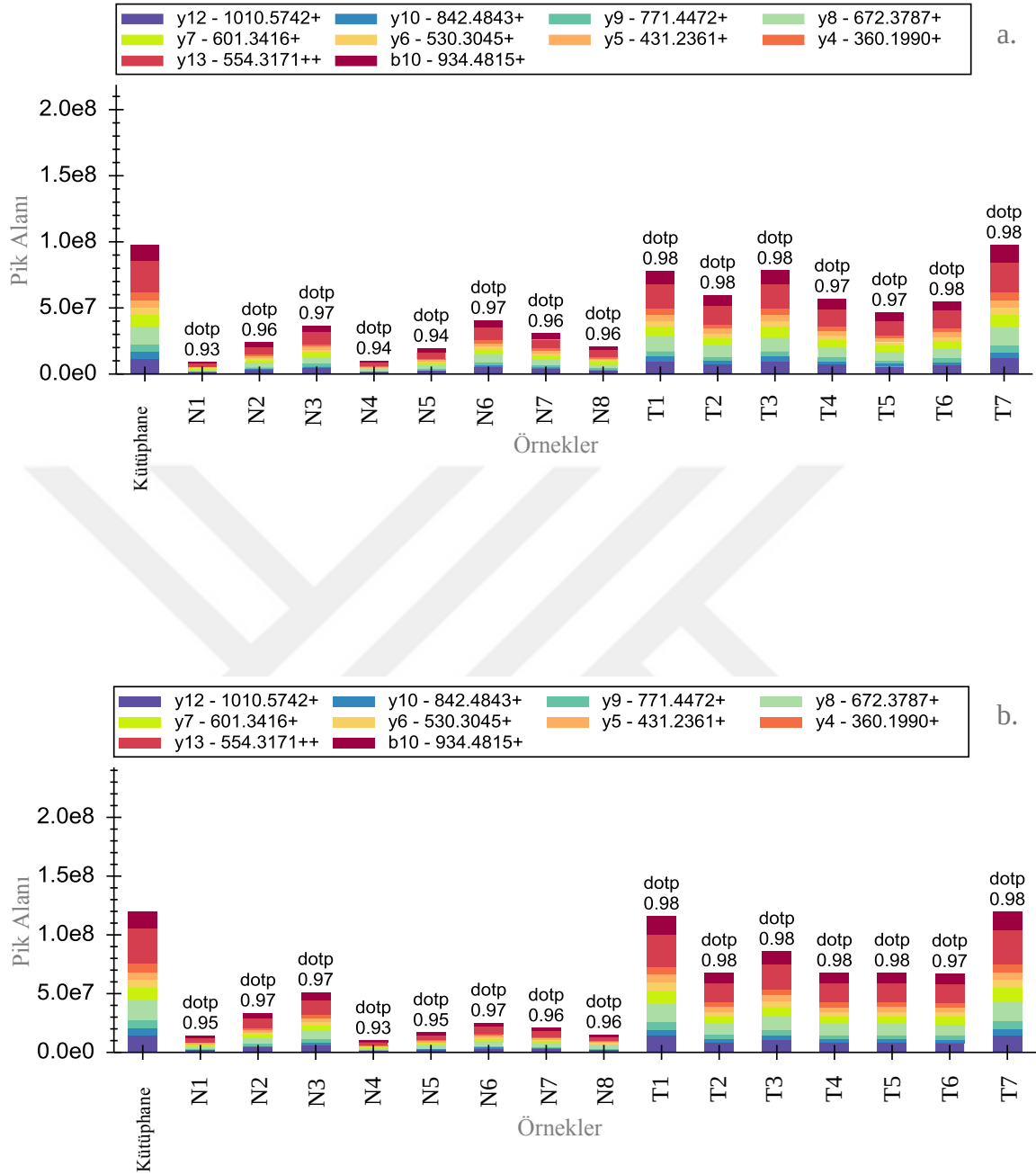
Şekil 4-21: Metalloproteinase inhibitör 1 Proteinine ait Bar Grafiği

TIMP1 (P01033) proteinine ait R.FVYTPAMESVCGYFHR.S [82, 97] 982.4451 ++ (dotp 0.9) peptit bolluğunun örnekler arasındaki karşılaştırması. a. ilk serum PRM analizi b. tekrar analizi



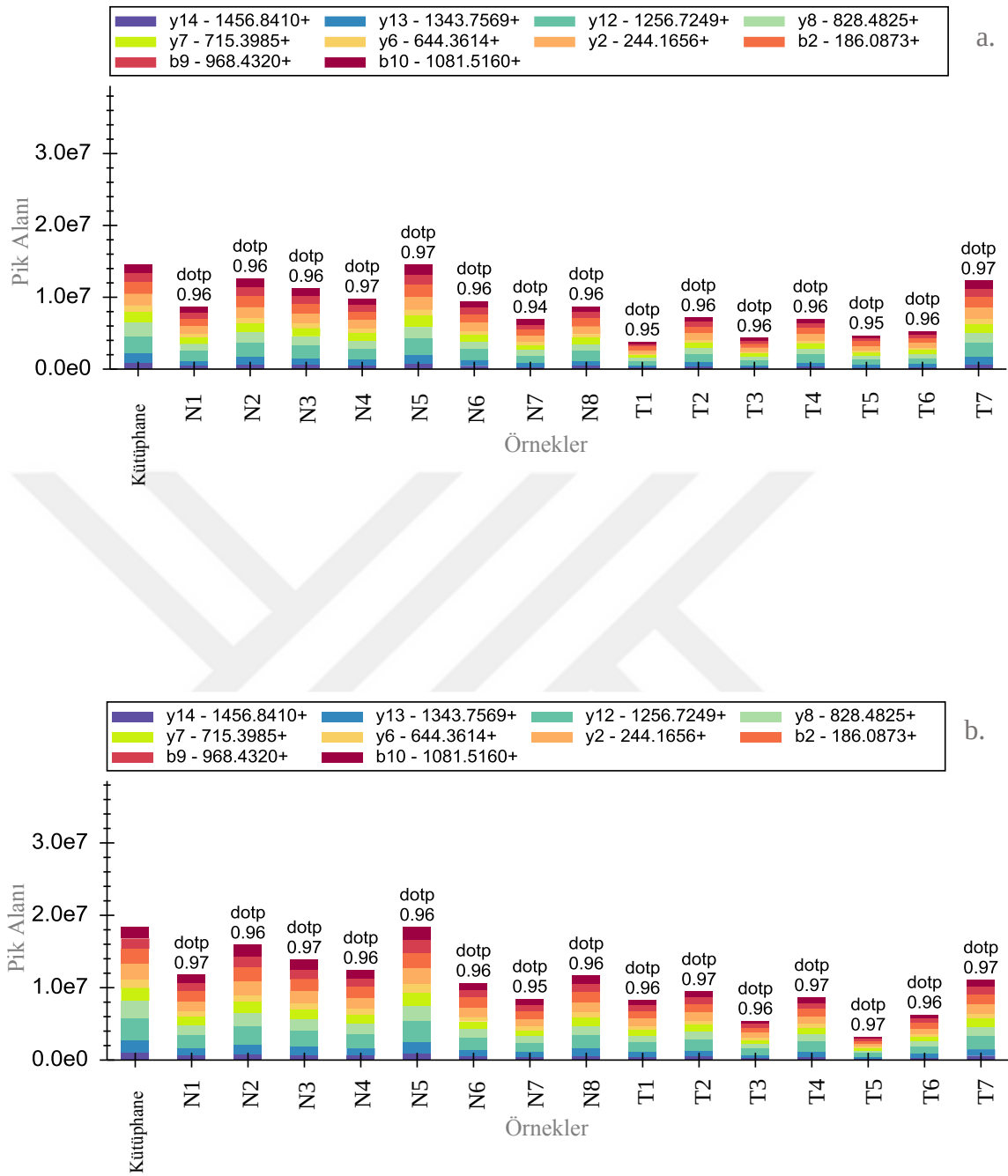
Şekil 4-22: Isoform 4 of Extracellular matrix protein 1'e ait Bar Grafiği

ECM1 (Q16610-4) proteinine ait R.CCDLPFPEQACCAEELKLTFINDLCGPR.R [475, 502] peptit bolluğunun örnekler arasındaki karşılaştırması. a. ilk serum PRM analizi b. tekrar analizi



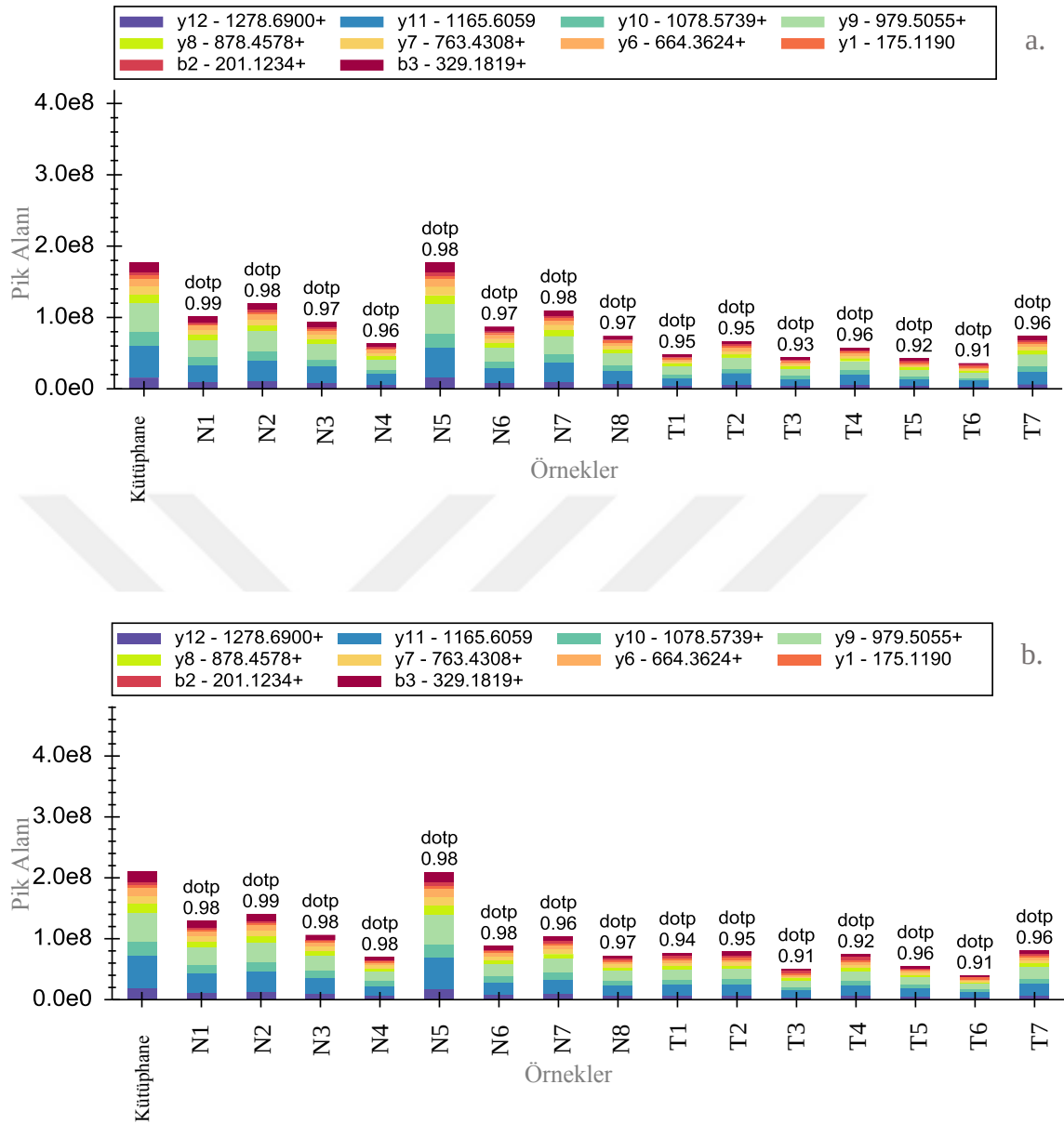
Şekil 4-23: Insulin-like growth factor-binding protein 2'ye ait Bar Grafiği

IGFB2 (P18065) proteinine ait R.LAACGPPPVAPPAAVAAGGAR.M [49, 71] peptit bolluğunun örnekler arasındaki karşılaştırması. a. ilk serum PRM analizi b. tekrar analizi



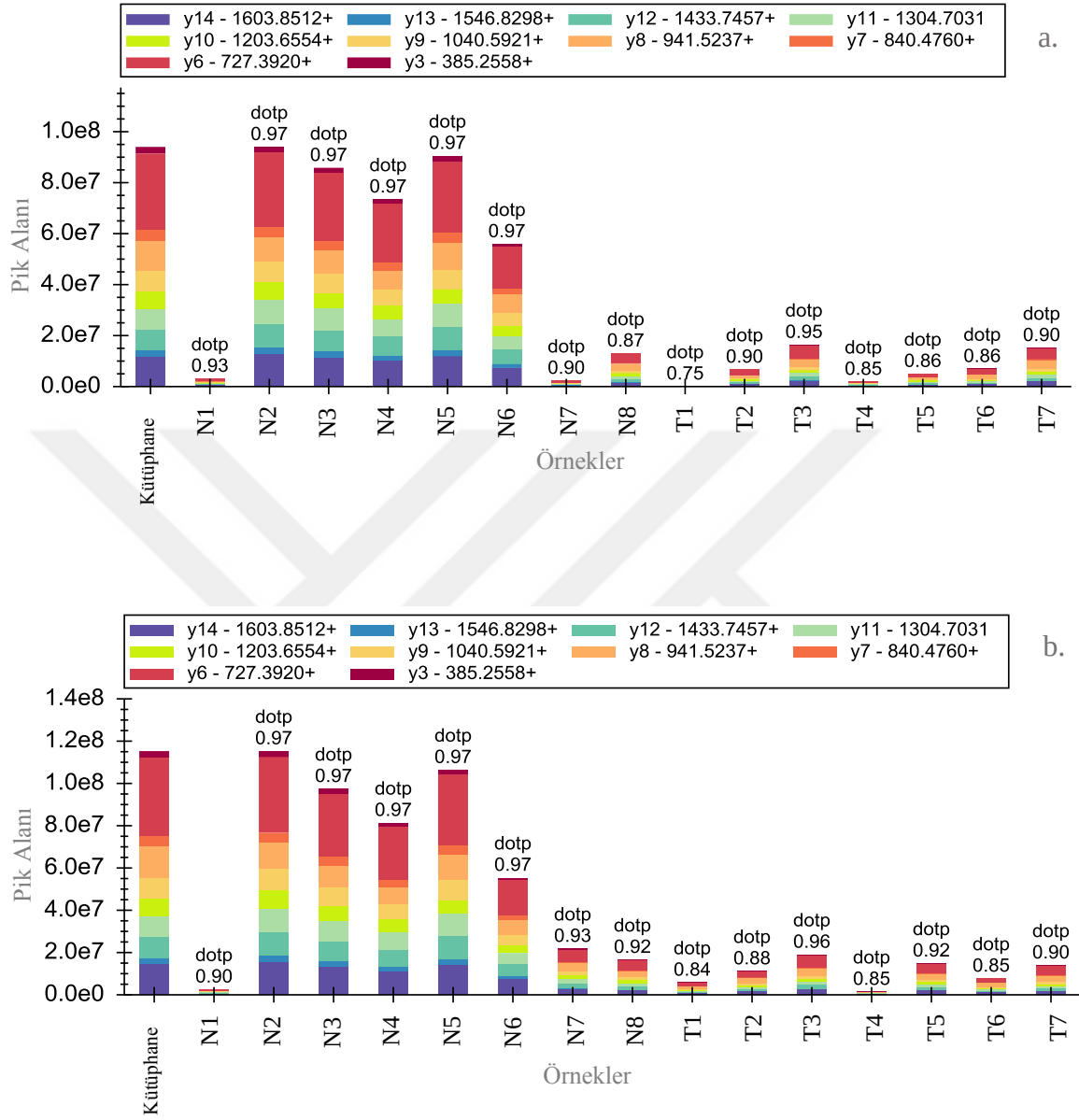
Şekil 4-24: Collagen alpha-3(VI) chain proteinine ait Bar Grafiği

COL6A3 (P12111) proteinine ait K.NADPAELEQIVLSPAFILAAESLPK.I [976, 1000] 879.4776+++ [(dotp 0.96)] peptit bolluğunun örnekler arasındaki karşılaştırması. a. ilk serum PRM analizi b. tekrar analizi



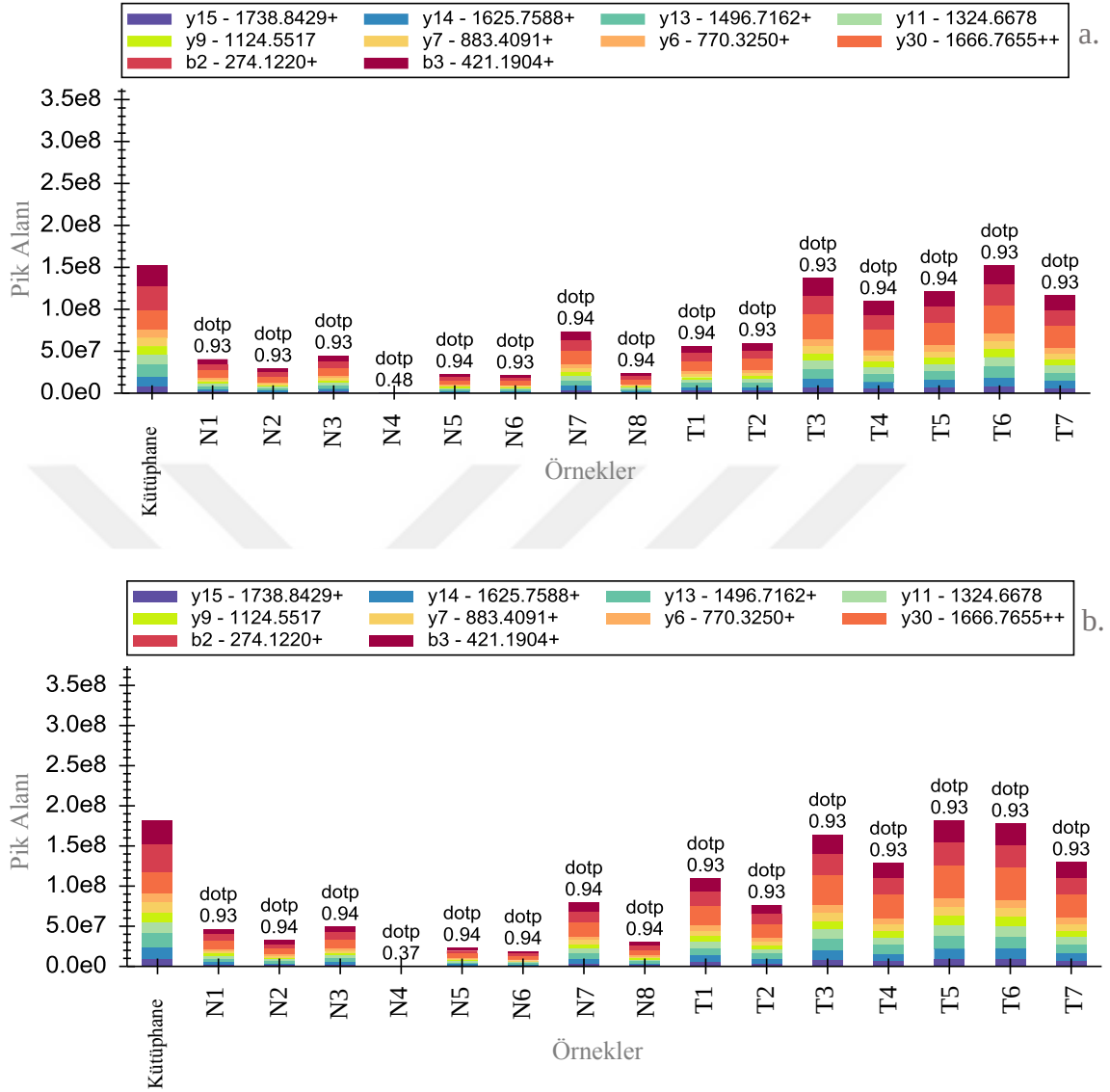
Şekil 4-25: Isoform 5 of Tenascin-X proteinine ait Bar Grafiği

TNXB (P22105-4) proteinine ait R.LSQLSVTDVTTSSLR.L [3658, 3672] peptit bolluğunun örnekler arasındaki karşılaştırması: a. ilk serum PRM analizi b. tekrar analizi



Şekil 4-26: Adiponectin Proteinine ait Bar Grafiği

ADIPOQ (Q15848) proteinine ait R.SAFSVGLEITYVTIPNMPiR.F [112, 130] 1048.0483++ (dotp 0.9) peptit bolluğunun örnekler arasındaki karşılaştırması. a. ilk serum PRM analizi b. tekrar analizi



Şekil 4-27: Complement factor H-related protein 1'e ait Bar Grafiği

CFHRP1 (Q03591) proteinine ait R.LCFFPFVENGHSESSGQTHLEGDTVQII~~C~~NTGYR.L [85, 118] peptit bolluğunun örnekler arasındaki karşılaştırması. a. ilk serum PRM analizi b. tekrar analizi

5. TARTIŞMA

Kanser bu yüzyılın toplumlarını önemli ölçüde etkileyen son derece karmaşık bir hastalıktır. Akciğer kanseri de insidans ve mortalite oranları oldukça yüksek kanser türleri arasında yer alır. Erken evrede asemptomik olduğundan akciğer kanserinde tanılarının büyük çoğunluğu ileri evrede konur. Tanı konulan evre ise hastaların sağkalım oranlarıyla yüksek oranda ilişkilidir. Hastalar son derece düşük bir sağkalım oranına sahiptir ve uygulanan tedaviler mortaliteyi azaltmak için yeterli olamamaktadır. Akciğer kanserinde sağkalım oranlarını artırmak için en iyi strateji, erken tanı ve buna bağlı olarak uygulanan etkili tedavi gibi görünüyor (132).

Proteinler, çoğu hücreysel aktiviteden sorumlu biyomoleküllerdir. Buna bağlı olarak proteinlerin, hücreysel durumu daha doğru yansıtacağı ve hastalığın ilerlemesinin altında yatan mekanizmanın belirlenmesinde büyük öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Bilim insanları bu nedenle akciğer kanserinde hastalığın tanısına yardımcı olacak biyobelirteçlerin keşfine ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yoğun çaba sarf etmektedir. Kütle spektrometresi tabanlı proteomik araştırmalar, hastalığı erken aşamada tespit edilmesine yardımcı olacak protein belirteçlerini tanımlamak, tümörlerin tedaviye yanıtını izlemek, kanser patogenezeine yol açan mekanizmaları anlamak ve hedefe yönelik tedavilerde yeni terapötikler tasarlamak için önemli veriler sunar (7, 10).

Dokuda gerçekleştirilen proteomik analizlerle daha etkili ve uygun tedavi için hedeflenebilecek çok sayıda protein ortaya çıkarılmıştır. Standart bir shotgun proteomik analiz yöntemini ilk olarak kullanan Kikuchi ve ark. analiz verimliliğini artırmak için 19/20 örneği havuzlayarak dört set (adeno-skumöz-2 kontrol) oluşturmuştur. Toplamda 3621 protein, adeno ve skumöz histolojik tiplerde 3500 üzeri ve kontrol havuzlarında 2968 protein tanımlayabilmiştir. Tüm grupta ortak tanımlanan protein sayısının ise 2863 olduğu bildirilmiştir (133).

Literatürdeki çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada büyük hücreli karsinom tanısı konmuş hastalardan alınan yedi tümör ve yedi normal dokudan ekstrakte edilen proteinlerin MS analizi gerçekleştirilmiştir. Toplamda 6730 protein tanımlanırken 6000'in üzerinde proteinin yüksek güven aralığında olduğu görülmüştür. Tümör grubundaki 6437 proteinin 6060'ı ve kontrol grubundaki 4696 proteinin 4429'u yüksek güven aralığında tanımlanmıştır. Yüksek güvende tanımlanan proteinlerden 4007'sinin (%62) ise her iki grupta ortak olduğu tespit edilmiştir.

Doku biyopsilerine kıyasla kan alma kolaylığı nedeniyle, özellikle insan proteomu çalışmalarında serum ve plazma kullanımı, oldukça cazip gibi görülmektedir. Ancak sadece serum albumin toplam protein içeriğinin yarısını oluşturmakta ve düşük miktarda bulunan proteinlerin tespitini engellemektedir. Bu süreçte MS analizinden önce, albumin gibi yüksek miktarda bulunan diğer proteinleri de uzaklaştırmak gereklidir (76). Serumda bol bulunan proteinler ultrafiltrasyon, presipitasyon, çeşitli ticari kitler ve kromatografik yöntemlerle uzaklaştırılabilmektedir. Yakın zamanda Pinasu ve ark.'nın çalışmasında farklı firmalar tarafından geliştirilen deplesyon kitleri test edilmiştir. Güçlü bir MS metodu sayesinde ortalama 449 protein tanımlanırken ulaşılabilen en yüksek protein sayısı 553 olmuştur (131). Geliştirilen çok sayıda tekniğe rağmen serum/plazma örnekleriyle çalışmak zorlayıcı olabilmektedir. Bu çalışmada ise serumda yüksek miktarda bulunan on iki protein uzaklaştırılmıştır ve toplamda 537 protein tanımlanmıştır. Aynı zamanda tümör grubunda 477, kontrol grubunda 440 protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden 363'ü her iki grupta ortak iken 115'i sadece tümör grubunda tanımlanmıştır. KHDAK'ın iki histolojik tipine nazaran literatürde hakkında çok daha az araştırma bulunan BHK'in doku ve serumları ile yaptığımız geniş profilli ve yüksek veri hacimli proteomik çalışma, büyük hücreli karsinoma dair önemli veriler içermektedir.

Kütle spektrometreleri bir numunede tanımlanan proteinlerin kantitatif analizini de yapmaya imkan sağlayan çok yönlü analitik cihazlardır. Tümör-kontrol, erken evre-ileri evre ya da tedavi öncesi-sonrası şeklinde oluşturulan gruplar arasında tespit edilen protein ifade farklılıkları, hastalığın tanısı ve prognozuna yönelik önemli ipuçları olabilmektedir. Başka bir deyişle belirli proteinlerin artış ya da azalışı tedavi rejimini belirleyebilir ve bu sayede akciğer kanseri tedavisinde çok sık rastlanan kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmasının önüne geçilebilir.

Bu nedenle hastalığın gidişatına göre değişmiş ifade farklılıkları, bu mekanizmaların aydınlatılması için büyük önem taşımaktadır. Özellikle akciğer kanserindeki sağkalım oranlarını artırmak için hem teşhis hem de prognostik biyobelirteçlere çok acil ihtiyaç vardır (134).

Khan ve ark. primer skuamöz hücre karsinom ve akciğer adenokarsinom dokuları ile iki alt tipi ayırt etmek için birbirlerinden farklı olarak eksprese olan proteinleri ortaya koymaya çalışmışlardır. Bu iki grup arasında farklı şekilde eksprese edilen 610 protein tanımlamışlardır (111). 8 tümör dokusu ve 8 komşu akciğer dokusunu etiketsiz kantifikasyon yöntemi kullanarak değerlendiren Wang ve ark. ise tanımladıkları 4047 proteinden 1,5 kat ve üzeri anlamlı ifade farklılığı bulunan 91 protein tespit etmişlerdir. Araştırmacılar tümör örneklerinde ifadesi artan 71 proteinden seçtikleri ikisini (CALR ve PDIA3) daha detaylı inceleyerek ve immünohistokimyasal boyama ile validasyonunu da yaparak bu proteinlerin KHDAK pronozu için etkin bir biyobelirteç görevi görebileceğini bildirmişlerdir (121). Akciğer kanserinde metastatik süreci incelemek için 2 hücre hattında (Skuamöz-Evre I ve Adeno-Evre IV) etiketsiz kantifikasyonun yapıldığı başka bir çalışmada 2130 protein tanımlanmış ve bunların 242'sinde ifade farklılığı tespit edilmiştir. Çalışmada ifadesinde artış görülen 6 proteinin ve azalış görülen 3 proteinin, metastazda önemli bir yolak olduğu düşünülen fokal adezyon ile ilişkisi değerlendirilmiştir (135). İfade farklılıklarını incelemek üzere etiketli kantifikasyon yapılan çalışmalar da mevcuttur. Hsu ve ark.ları iTRAQ tabanlı kantitatif proteomik analiz kullanılarak farklı lenf nodu (LN) tutulumu ile eşleştirilmiş adenokarsinom (ADC) dokularından 1763 protein tanımlamışlardır. İmmünohistokimya ve western blotlama yöntemleriyle doğrulamasını yaptıkları 6 protein (ERO1L, PABPC4, RCC1, RPS25, NARS ve TARS) arasından NARS ve ERO1L'in aşırı ifadesinin lenf nodu metastazıyla ve ERO1L'in, erken evre adenokarsinomu olan hastalarda kötü sağkalım ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (136).

Literatürde ayrıca KHDAK hastalarından alınan doku örneklerinin histolojik ayırımı yapılmaksızın kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında farklı seviyede eksprese olan çok sayıda protein rapor edilmiştir. Isı-şok proteini Hsp20-benzeri, Timosin β 4-10, süperoksit dismutaz 2 (SOD2), selenyum bağlayıcı protein (SELENBP1), trioz-fosfat-izomeraz (TIM) ve makrofaj göçünü inhibe edici faktör (MIF) kütle spektrometreleri kullanılarak tespit edilen tanısal biyobelirteçlerden bazılarıdır (6). Bununla birlikte MS-tabanlı proteomik analizler, adenokarsinom ve skuamöz hücre karsinom olmak üzere KHDAK'nin histolojik iki ana alt tipi üzerinde yoğunlaşmıştır.

Adenokarsinom histolojik tip doku örneklerinde ifade farklılığı tespit edilen proteinler arasında annexin (ANXA1), transgelin (TAGLN), siklofilin A (CyP-A), ubiquitin karboksi-terminal hidrolaz L1 (UCH-L1) ve kofilin-1 (CFL1) tanısal biyobelirteçler olarak rapor edilmiştir. Skuamöz hücre karsinomu üzerinde yapılan çalışmalarda ise ENO1 (alfa enolaz), Peroxiredoxin 2-6 (PRDX), Protein S100A6-8-9, ANXA2-3-5-6, HSP70-60-27, skuamöz hücre karsinoma antijen (SCCA1) ve gamma aktin (ACTG1) proteinleri bildirilmiştir (6, 137). Ancak literatüre bakıldığında büyük hücreli karsinom hasta dokularında tespit edilen protein belirteçleri tam olarak ortaya çıkarılmamıştır. Çalışmamızda büyük hücreli karsinom hastalarının tümörlü ve tümöre uzak akciğer dokularında 4000'in üzerindeki proteinin kantifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Etiketsiz kantifikasyon yöntemiyle analiz sonrasında iki grup arasında en az iki kat protein ifade değişimi görülen 1576 proteinden 503'ünde istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Bu proteinlerin önemli bir kısmı ECM-reseptör etkileşimi, fokal adezyonu, PI3K-Akt sinyal yolu ve çeşitli metabolik yollarda rol almaktadır.

Tümör belirteçleri, tümör dokusunda tespit edilebildiği gibi tümöral faaliyet sonucu salgılandıklarından vücut sıvılarında da tespit edilebilirler. LC-MS/MS tabanlı proteomik teknolojisinin büyük gelişimi, serum veya plazma örneklerinde doğrulanabilen yeni akciğer kanseri protein biyobelirteçlerinin belirlenmesine yardımcı olmuştur. Serum amiloid A (SAA), haptogloblin, plazma kallikrein (KLKB1) protein parçaları, kompleman bileşeni 9 (C9) ve C4d, Ciz1, IGFBP-2, Pgrmc1, Prx1, matriks metallopeptidaz 9 (MMP-1) ve uPAR1 akciğer kanserinde keşfi ve validasyonu yapılan protein belirteçlerinden bazılarıdır. Bunlar arasında sitokeratin fragmanı 19 (CYFRA 21-1), Karsinoembriyonik antijen (CEA), nöron spesifik enolaz (NSE) skuamöz hücre karsinoma antijen (SCC) pro-gastrin salıcı peptid (ProGRP) ve EGFR akciğer kanserinde sınırlı klinik kullanımı olan serum protein biyobelirteçleridir (138).

Çalışmamızda aynı hasta grubunun serum örnekleri kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve anlamlı ifade farklılığı bulunan 52 protein tespit edilmiştir. Bunlardan 16'sının ifadesinde en az iki kat azalma görülürken, 36'sının ifadesinde en az 1,5 kat artış görülmüştür. Dahası, bulunan bu proteinler tümör dokusu grubunda anlamlı ifade değişimi olan proteinlerle karşılaştırılmış ve 15 proteinin ortak olduğu görülmüştür.

Bu proteinlerin sekizi serumda bol bulunan serum proteinleridir. İlginçtir ki aralarında serum biyobelirteci olarak bilinen haptoglobinin, serum amiloid P, apolipoprotein C-II ve III proteinlerinin olduğu bu sekiz proteinin hepsinin tümör dokusundaki ifadesi azalırken serum örneklerindeki ifadeleri artmıştır. Metalloproteinase inhibitor 1, Collagen alpha-3(VI) chain, Insulin-like growth factor-binding protein 2, Isoform 5 of Tenascin-X, Complement factor H-related protein 1, Adiponectin ve Isoform 4 of Extracellular matrix protein 1 olmak üzere diğer 7 protein serum ve doku örneklerindeki ifade değişimleri pozitif korelasyon göstermiştir. Bununla birlikte tespit edilen bu yedi proteinin PRM yöntemi kullanılarak doğrulaması yapılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla literatürde büyük hücreli karsinom hastalarının doku ve serumlarının hem protein profilinin hem de protein ifade farklılıklarının bu kadar ayrıntılı incelendiği başka çalışma bulunmamaktadır.

KHDAK için 18 serum örneğinde tanısal biyobelirteç bulmayı amaçlayan Liu ve ark. tanımladıkları 600'ün üzerinde proteinden 101'inin, istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir (134). Bu proteinlerden Apolipoprotein C-III, Platelet basic protein, Haptoglobin ve C4b-binding protein alpha chain bizim çalışmamızda da anlamlı ifade artışı gösterirken Kallistatin ifadesinde aksine azalma gözlenmiştir. Ayrıca aşırı ifade edildiğini MRM yöntemiyle gösterdikleri Alfa-1B-glikoprotein (A1BG) ve Lösin-zengin alfa-2-glikoprotein (LRG1), bu çalışmada büyük hücreli karsinom serum örneklerinde tanımlanmış ancak anlamlı ifade farklılığı bulunamamıştır.

Farklı çalışma grupları ve farklı örnek grupları arasında yapılan biyobelirteç keşfinin entegrasyonu, ileride yapılması düşünülen klinik validasyon çalışmaları için değerli olabilir. Üç farklı platformdan (akciğer kanseri hücre hatları, şartlandırılmış ortam ve taze rezeke edilmiş doku) akciğer kanseri için 179 aday biyobelirteci tespit eden Birse ve diğ. daha sonra farklı şekilde eksprese edilen 9 proteinin (CEA, MDK, MMP2, SLPI, TIMP1, TFPI, CYFRA 21-1, SCC ve OPN) doğrulamasını yapmışlardır (139). Serum seviyesinde artış olduğu doğrulanan TIMP1, bizim de doku ve serum örnek setlerimizde tespit ettiğimiz ve ayrıca PRM ile doğrulamasını yaptığımız proteinler arasında yer almaktadır.

Kim ve ark. ise KHDAA ile fonksiyonel ilişkileri olan ve tümör dokularında anormal ifade seviyeleri olduğu önceden bilinen 95 biyobelirteç adayından plazmada en az iki kat artış olduğunu tespit ettikleri 17 tanesini seçerek, daha geniş örnek setinde ve hedefli proteomik yaklaşımı olan LC-SRM yöntemiyle doğrulamışlardır. Listedeki 6 protein (ALDOA, ENO1, ENO2, GPI, LDHB, PGK1 ve PKM2), glikoliz yolunda majör glikolitik enzimler olarak hücresel fonksiyonlarda görev alır (140). Plazmada doğrulaması yapılan ENO1 (alfa enolaz) bizim  alışmamızda BHK serum örneklerinde 3,2 kat anlamlı artış tespit ettiğimiz bir proteindir. Ek olarak çalışmamızda glikoliz basamağının altıncı basamağını katalizleyen gliseraldehid-3-fosfoat dehidrogenaz enziminde de 2,5 kat anlamlı artış bulunmuştur. Ayrıca direkt enerji metabolizmasıyla ilgili dokuda ifade değişimi olan ise 8 protein (PLCB3, AK1, PFKP, FBP1, FBP2, GPD1, GPD1L ve INPPL1) tespit edilmiştir.

Tanı konmuş bir çok KHDAA hastasının tedavi edilmesinin önündeki en büyük engel olarak görülen metastaz, etkili cerrahi müdahale firsatının kaybedilmesine ve sonuç olarak kötü prognoza neden olur. Metastaz gelişimi, kanser hücrelerinin migrasyonu, anjiyogenezi,  evre dokuya invazyonu ve proliferasyonu da dahil olmak üzere çeşitli süreçlere eşlik eder. Hastaların sağkalım sürelerini artırmak için bu metastatik süreçleri yönlendiren mekanizmaların derinlemesine incelenmesi gerekmektedir (135, 136, 141). Çalışmamızda hem doku hem de serumda tespit ettiğimiz ve doğrulamasını yaptığımız yedi proteinin (IGFBP2, TNXB, COL6A3, TIMP1, ECM1, ADIPOQ ve CFHR1) metastaz oluşumundaki önemli adımları modüle eden ve bu nedenle kötü prognoz ile ilişkilendirilen proteinler olduğu dikkat çekmektedir. Metastaz gelişimi; tümördeki hücreler arası köprülerin kaybı ve hücre dışı matrisin (ECM) bozulması olmak üzere iki sürecin eşzamanlı seyrine bağlıdır (142). Özellikle IGFBP2, COL6A3, TIMP1, ADIPOQ , ve ECM1'in bu süreçlerde rol alan proteinler olduğu rapor edilmiştir (141, 143-146).

 ns lin benzeri büyüme faktörleri (IGF I-II); hücresel metabolizma, büyüme ve hayatta kalmanın önemli düzenleyicileridir.  ns lin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler (IGFBP 1-6) de, IGF'lere bağlanarak onların aktivitelerini ve lokal konsantrasyonlarını düzenleyen bir protein ailesidir.

Tüm IGFBP'lerde ortak olan IGF bağlayıcı alanlara ek olarak içerdikleri GlyArg-Asp (RGD) ve heparin bağlayıcı motifler sayesinde IGFBP2, integrin reseptörleri ve proteoglikanlar gibi hücre dışı matriks moleküllerine doğrudan bağlanarak IGF'lerden bağımsız bir şekilde hücre göçünü, proliferasyonu ve invazyonunu artırabilir (147). Farklı kanser türlerinde antitümör aktiviteyi indükleyen IGFBP3'ün aksine, IGFBP2'nin tümör oluşumu, metastaz ve tümör anjiyogenezini desteklediği bildirilmiştir (143). IGFBP2'nin akciğer dahil glioma, prostat, kolorektal ve mide olmak üzere bazı kanser türlerinde aşırı eksprese olması çeşitli kanser türleri için ortak bir onkojenik protein olabileceğini düşündürmektedir (148). Yakın zamanda Wang J ve ark. IGFBP2'yi adeno ve skuamöz hücre karsinom histolojik alt tiplerinde mRNA seviyesinde incelediklerinde anlamlı bir şekilde upregüle olduklarını tespit etmişlerdir (149). Hu ve ark. ise immünohistokimyasal boyamayla 110 tümör örneğinin 57'sinde pozitif IGFBP2 ifadesi tespit etmişlerdir (150). Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında IGFBP2 ekspresyonu, tümör dokusu grubunda 5 kat daha yüksek olup bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. IGFBP2'nin sekrete edilen bir protein olması sebebiyle tümör dokularında artan ekspresyonunun kandaki konsantrasyonuna yansıdığına dair raporlar olsa da mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Yapılan farklı çalışmalarla akciğer kanseri hastalarının plazma ve serum IGFBP2 seviyelerinin de kontrol grubuna göre yüksek olduğu rapor edilmiştir (151, 143). Çalışmamızda anlamlı ifade artışı bulunduğumuz IGFBP2'nin, kontrol grubu serumlarına göre büyük hücreli karsinom hastalarının serum seviyelerinde de anlamlı ifade artışı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte hem serum hem de doku örneklerinde anlamlı ifade farklılığı tespit ettiğimiz IGFBP2'nin, büyük hücreli karsinom hastalarının serumlarındaki ifade artışı PRM yöntemiyle doğrulanmıştır. IHK tekniklerle tespit edilen IGFBP2, adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom histolojik alt tipleri için düşük duyarlılık ve spesifiteye sahip olsa da (150), çalışmamızda daha güçlü analiz araçlarıyla tespit ettiğimiz IGFBP2'nin büyük hücreli karsinom için umut verici bir biyobelirteç adayı olabileceği düşüncesindeyiz.

IGFBP2 artışı, ileri evre kanserlerde metastaz ve tümör invazyonu gibi malign klinik özelliklerle ilişkili bulunmuş ve IGFBP2'nin hücre invazyonu ve migrasyonunun önemli bir düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir. ECM proteinlerinin parçalanması, tümör invazyonu ve metastazı için gerekli koşul olarak ifade edilir.

IGFBP2, bu aşamada kolajen, proteoglikan, laminin ve fibronektin gibi ECM bileşenlerinin neredeyse tamamını bozan MMP'leri aktive ederek rol alır. Aşırı eksprese olan IGFBP2'nin glioblastoma hücrelerinde MMP2 gen transkripsiyonunu ve sonuçta invazyon potansiyelini artırdığı bildirilmiştir (152). Benzer sonucun elde edildiği başka bir çalışma; IGFBP-2'nin aşırı ekspresyonunun, MMP-2 üretimini uyararak mesane kanserinin metastatik potansiyelinin artmasına neden olduğunu göstermiştir (153).

Bununla birlikte daha önceki çalışmalarında insan mezenkimal kök hücrelerinin migrasyon potansiyelinin MMP-1 ekspresyonu ve proteaz aktivitesi ile ilişkili olduğunu gösteren Guan ve ark. migrasyon mekanizmasını IGF-2 sinyal yolağı üzerinden araştırmışlardır. Elde ettikleri bulgular MMP1'in, IGF-2/IGFBP2 kompleksi için proteaz işlevi görerek serbest IGF-2'nin hücre dışına salınmasına neden olduğunu göstermiştir (154). Çalışmamızda doku örneklerinde MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP11, MMP12, MMP14, MMP19, MMP23B, MMP28 protein ürünleri tanımlanırken interstisyel kolejenaz olarak bilinen MMP1'in protein ifadesinde anlamlı artış olduğu görülmüştür.

Vücudumuzdaki hücreler; hücreleri ve organları bir arada tutmak için yapısal öneme sahip hücre dışı matriks (ECM) ile çevrilidir. Buna bağlı olarak hücreler, hücre dışı matristeki spesifik bileşenler ve reseptör aracılı etkileşimler yoluyla hücrel davranışı ve morfolojiyi dolayısıyla hücre büyümesini ve farklılaşmasını kontrol ederler. Bu nedenle hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimleri, çok hücreli organizmaların normal gelişiminin düzenlenmesinde önemlidir. ECM yapısı polisakkaritler, proteoglikanlar, proteinler ve glikoproteinler de dahil olmak üzere karmaşık bir makromoleküler ağ örgüsünden oluşmaktadır. Kollajenler, elastinler, fibronektinler ve lamininler ECM mimarisinde en çok temsil edilen ve incelenen proteinlerdir (155, 156). Bununla birlikte ECM'nin temel proteinlerini, insan vücudundaki toplam protein kütlesinin % 30'unu temsil eden kollajenler oluşturur. Kollajen ailesinin şu an bilinen 28 üyesi vardır ve fibril oluşturup oluşturmamalarına göre gruplara ayrılırlar (157).

Bu kollajenler arasında araştırmacılar tarafından oldukça ilgi gören Tip VI kollajen, ECM stromasında kanser ilişkili fibroblastlar tarafından sentezlenebilir (158). Yapılan çalışmalarda sunulan raporlar Tip VI kollajenin susturulmasının, ilişkili olduğu çeşitli proteinler nedeniyle apoptozu teşvik ederken hücre çoğalması ve anjiyogenezi inhibe edebileceği yönündedir (144, 159).

Farklı kanser türleriyle yapılan çeşitli çalışmalarda COL6A1 (Collagen alpha-3(VI) chain), COL6A2 ve COL6A3 transkriptlerinin ekspresyonu ve tümör dokularındaki kollajen VI proteini seviyesinin, karşılık gelen normal dokulardakinden çok daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (144, 160-163). Önceki çalışmalarda kullanılan gen ekspresyon yöntemleri, immün boyama ya da ELISA gibi yöntemlerden farklı olarak bu çalışmada LC-MS tabanlı proteomik yöntemlerle aralarında COL6A3'ün de olduğu 14 farklı kollajen tespit edilmiştir. Bu proteinlerden COL8A1, COL10A1 ve COL11A1 protein ifadelerinin tümör doku gurubunda arttığı ve COL1A2, COL4A5, COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL6A6 ve COL14A1 ifadelerinin azaldığı tespit edilmiş ve bu ifade değişiklikleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Voiles ve ark.ları akciğer adenokarsinom ve skuamöz hücre karsinom dokularında COL6A1'in protein seviyelerinin yükseldiğini göstermiştir (164). Huang ve ark. ise mesane kanseri dokularında ve hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen COL6A3'ün downregüle edilmesinin; MMP2, MMP-9 ve vimentin seviyelerinin düşmesine, bir metaloproteinaz tümör inhibitörü olan TIMP1'in seviyelerinin ise önemli ölçüde artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir (144). İlginçtir ki Voiles ve ark. çalışma sonuçlarının aksine COL6A1'in büyük hücreli karsinom doku örneklerinde, COL6A3'ün ise hem doku hem de serum örneklerinde ifadesinin azaldığını bulduk. Daha da önemlisi Huang ve ark. nın bildirdiği gibi çalışmamızda azalan COL6A3 ifadesine karşılık TIMP1'in ifadesinde anlamlı ifade artışı görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda anlamlı artış bulunan bir diğer kollajen COL10A1'in, Gu ve ark. tarafından yapılan çalışmada mir-384 tarafından düzenlenebileceği bildirilmiştir. Sunulan veriler COL10A1'in miR-384'ün aşağı yönlü bir hedefi olduğunu göstermiştir (165).

Tenaskinler vücudumuzdaki birçok ECM'de bulunan bir glikoprotein ailesi olup tenascin-X, tenascin-C, tenascin-R ve tenascin-W olmak üzere dört üyesi vardır. Ailenin en çok çalışılan üyesi tenascin-C (TNC)'embriyodaki bağ dokusu morfogenezinde rol oynar (166). Ayrıca tümör stromasında ekprese edildiği gösterilen TNC'nin çeşitli tümör tiplerinde artan ekspresyonunun, tümör ilerlemesini, anjiyogenezi ve metastazı teşvik ettiği ileri sürülmüştür (167). Bu bağlamda, yapılan çok sayıda çalışmayla da TNC'nin prognostik önemi vurgulanmıştır (168-170).

KHDAK hastalarının tümör mikroçevresinden alınan doku örnekleriyle yapılan bir çalışmada Onion ve ark.'ları immünohistokimyasal yöntemle tespit ettikleri düşük kaveolin-1 ve yüksek tenascin-C seviyelerinin, genel sağkalımın önemli prognostik belirteçleri olabileceğini rapor etmişlerdir (169). Büyük hücreli karsinom hastalarının genellikle kötü prognoz sergilediği bilinmektedir. Çalışmamızda tümör doku grubunda düşük kaveolin-1, düşük kaveolin-2 ve yüksek tenascin-C protein ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Bu bağlamda, Onion ve ark. tarafından yapılan çalışmada her ne kadar KHDAK'nin histolojik alt tipleri belirtilmese de, elde ettiğimiz veriler bu proteinlerin ifade değişimlerinin genel olarak KHDAK'inde kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulgusunu desteklemektedir.

ECM proteinlerinin hem protein hem de mRNA seviyesinde daha detaylı incelendiği başka bir çalışmada, araştırmacılar fibronectin ve TNC'nin yanı sıra birçok S100 proteininin normal dokuya göre primer akciğer tümörlerinde ve ilişkili lenf nodu metastazlarında önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir (170). Çalışmamızda tanımlanan 14 farklı S100 proteininden S100A2 ve S100P'nin tümör grubundaki ifadelerinin sırasıyla 8,7 ve 10,8 kat artışı anlamlı bulunurken fibronectin ifadesinde tespit edilen 2,7 katlık artışta anlamlılık görülememiştir. KHDAK hasta serumlarında TNC seviyelerini inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalarda sTNC konsantrasyonunun, sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde yükseldiği ve bu yüksekliğin daha kısa genel sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (168, 171). Çalışmamızda hem kanser hastalarının hem de kontrol grubunun serum örneklerinde TNC proteini tanımlanmış ancak kantitatif analizi yapılmamıştır. Daha az sayıda çalışmaya rastlanılan Tenascin-X ise kollajen organizasyonunda rol alır ve bağ dokusunun yapısal bütünlüğü için gereklidir. TNX, TNXA ve TNXB olmak üzere iki gen kopyasına sahiptir. Tip I kolajen ile ilişkili TNXB varyantı Ehlers–Danlos sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Kanserdeki rolü hakkında ise daha az bilgi bulunmaktadır (172, 173). Yapılan çalışmalarda TNX eksikliğinin, tümör invazyonu ve metastazında kritik rol oynadığı düşünülen MMP'lerin üretimini artırdığını göstermektedir. Ayrıca tümör derecesi ilerledikçe TNX proein ifadesinin azaldığı ve tümör hücrelerinin istilas ve metastazını engellemek için TNX'in gerekli olduğu vurgulanmıştır. (174, 175).

TNxB'yi hem protein hem de mRNA seviyesinde inceleyen Yuan ve ark., over ve meme karsinomuna göre malign mezotelyomada daha yüksek TNXB seviyeleri bulduklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada TNX protein ekspresyonunun, efüzyonlardaki metastatik karsinom ile karşılaştırıldığında malign mezotelyomada anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (176). Son veriler de, TNXB'nin malign mezotelyoma için yeni bir tanısal biyobelirteç olduğunu göstermektedir. TNXB protein seviyesi, malign mezotelyomanın akciğer adenokarsinomundan ayırt edilmesinde de yardımcı olabilir (173). Çalışmamızda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında tümör doku grubundaki TNX protein ifadesinin ve serum TNX seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldıkları tespit edilmiş ve azalan ifade değişimi PRM yöntemiyle doğrulanmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçların Tenascin-X'in akciğer kanseri ile ilişkisini gösteren kısıtlı bilgilere önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Adiponektinler, adipoz doku tarafından üretilen ve dolaşımda da bulunabilen önemli adipositokinlerdir. Vasküler düz kas hücrelerinin ve endotel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek anti-aterojenik özellik gösteren adiponektinler, hücre proliferasyonu, apoptoz, tümör hücresi invazyonu ve anjiyogeneze de ilişkilendirilmişlerdir (145, 177). Bazı çalışmalar, dolaşımdaki adiponektin düzeylerinin KHDAK vakaları ve sağlıklı kontroller arasında benzer olduğunu gösterse de, son çalışmalarda serum adiponektinin ileri evre akciğer kanserinde önemli ölçüde daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır (145, 178). Çalışmamızda BHK vakalarına ait serum ve tümör dokusunda adiponektin ifadesinin azaldığı görülmüştür. Elde ettiğimiz bu sonuçlar akciğer kanseri vakalarında düşük adiponektin serum düzeyinin ölçüldüğü önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Biriken kanıtlar adiponektinin tümör büyümesini sınırlayıcı özelliklere sahip olduğunu göstermektedir ve bu bağlamda azalan adiponektin seviyeleri tümör gelişimine katkıda bulunabilir (145, 178, 179). Cui ve ark. adiponektinin kanser hücresindeki varlığının, hücrelerin göç ve invazyon yeteneklerini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (180). İlliano ve ark. da adiponektinin eksojen olarak eklenmesinin, esasen hücre döngüsü kinetiklerini değiştirerek insan akciğer adenokarsinomu A549 hücrelerinin tümör hücresi proliferasyonunu azaltmada önemli bir etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir (178). Tümör büyümesi ve metastazı üzerinde engelleyici rolü tespit edilen adiponektin, bu nedenle küçük hücreli dışı akciğer kanseri için yenilikçi bir tedavi yaklaşımı olabilir (181).

Hücre Dışı Matris Proteini 1 (Extracellular matrix protein 1; ECM1), diğer ECM proteinlerinin bağlanma fonksiyonunun aktivasyonu, hücre göçü, inflamatuvar olaylar, kemik doku oluşumu, anjiyogenez, tümöral yayılımın uyarılması ve anti kanser ilaç direnci gibi çeşitli olaylara farklı dokularda aracılık edebilen bir glikoproteindir (182). Bu nedenle hücre dışı matris proteinlerinin akciğer kanseri ve diğer kanserlerle ilgili olası ilişkileri uzun yıllardan bu yana araştırılmaktadır (183-186). Yapılan araştırmalar, bir hidrofobik sinyal peptidine ve çeşitli glikozilasyon bölgelerine sahip olan ECM1 proteininin, belirli hücreler faliyetlerin yanında meme, özofagus, larinks, mide, kolon, akciğer ve mesane dokularına ait çeşitli kanserlerde hücrelerin migrasyonu ve hastalığın seyriyle ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (184, 187-190). Meizhen Gu ve arkadaşlarının laringeal kanser üzerine yaptıkları bir çalışmada benign lezyon, prekanseröz lezyon, malignant lezyon ve metastatik olmak üzere 4 farklı gruptaki ECM1 ekspresyonunda, hastalığın evrelerine paralellik gösteren bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. ECM-1 ekspresyonunun kanser hücrelerinin büyümesi ve migrasyonu ile ilişkili olduğunu gösteren bu bulgular, ECM-1'in laringeal karsinomun başlaması, ilerlemesi ve metastazında destekleyici rol oynadığını düşündürmektedir (188). 2016 yılında Haiqiong Ye ve arkadaşları servikal kanser hastaları üzerine yaptıkları bir çalışmada önceki çalışmaları destekler şekilde ECM1 ekspresyon seviyelerinin kötü klinik prognoz ve metastatik potansiyelle ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmada miR-486-3p uygulamasının HeLa ve SiHa hücrelerinde ECM1 ifadesini mRNA ve protein seviyesinde indirgediği göstererek bunun hücre çoğalması ve metastaz yeteneğini de benzer şekilde indirgediğini aynı zamanda ECM1 ekspresyonunun serviks kanserinin seyri hakkında önemli bir bilgi sağlayabileceğini bildirmişlerdir (189). Zhicai Wang ve arkadaşlarının 2019'da mesane kanserinde hem doku hem hücre kültürü üzerine yaptıkları deneyler de yine önceki çalışmaları destekler şekildedir. Çalışmalarında kanseröz olmayan örneklerle kıyaslanan mesane kanseri örneklerinde belirgin bir ECM1 ekspresyon artışı tespit etmişlerdir. ECM1 gen ifadesinin köreltilmesiyle sadece hücre proliferasyonu ve göçü değil aynı zamanda mesane kanserinde kötü prognoza neden olan invazyon yeteneğinin ve apoptoz potansiyelinin etkilendiğini göstermişlerdir (190).

KHDAK hastalarının serum örneklerinde eksozomal proteinleri araştıran Limin Niu ve arkadaşları, ELISA ile tespit ettikleri Alfa- 2- HS- glikoprotein (AHSG) ve ECM1'in eksozomal ekspresyon düzeylerinin, sağlıklı gruba kıyasla önemli ölçüde arttığını tespit etmişler ve sonrasında bu bulguyu western blot yöntemiyle doğrulamışlardır. Kısa süre önce yaptıkları benzer bir çalışmanın sonuçlarına da atıfta bulunan Limin Niu ve arkadaşları, AHSG ve ECM1'in artan ifadelerinin erken evre KHDAK vakalarında belirgin bir şekilde yükseldiğini kaydetmiş ve bulgularının karsinoembriyonik antijenle (CEA) birlikte akciğer kanserlerinin serum örnekleri üzerinden teşhisinde tanısal verimliliğe katkı sağlayabileceğini bildirmişlerdir (191). Gerek farklı kanserlerle ECM1 ekspresyonu arasında bağlantı kuran çeşitli çalışmalar gerekse Meizhen Gu, Haiqiong Ye, Zhicai Wang ve Limin Niu öncülüğündeki araştırmalar ECM1'in KHDAK ve BHK için önemli bir diagnostik ve prognostik aday belirteç olarak incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (188-191). MS-tabanlı yaptığımız proteomik analizlerimizde BHK hasta dokularında anlamlı artış tespit ettiğimiz ECM1, aynı hastaların serum örneklerinin analizlerinde de anlamlı artış göstermiştir. Kontrol ve hasta serumlarında yaptığımız çift tekrarlı PRM analizleri de keşif modu analizlerinde tespit ettiğimiz anlamlı ECM1 artışını doğrulamıştır.

Metaloproteinazlar (Matrix Metalloproteinases: MMPs); aktiviteleri için Çinko gibi metal atomlarına ihtiyaç duyan, hücre dışı ortamın çeşitli bileşenlerini parçalamakta kullanılan ve aynı ada sahip genler tarafından kodlanan bir enzim ailesidir. Hücre dışı matrisin yeniden şekillendirilmesinde görevli bu enzimler proenzim olarak salınır ve aktivasyona ihtiyaç duyarlar. Regülasyonlarında rol alan önemli bir grup protein ise metaloproteinaz inhibitörleridir. MMP regülasyonundaki bozukluklar inflamatuvar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojik süreçlerle ilişkili bulunmuştur. Bu protein ailesinin önemli bir kısmının ise kanser gelişiminde tümöral yayılım, anjiyogenez ve metastaz gibi süreçlerde rol aldığı düşünülmektedir. (192, 193). Bu nedenle geçtiğimiz on yıllar içerisinde MMP'ler, çeşitli araştırmalarda tedavi süreçlerinin aday hedef proteinleri olarak değerlendirilmiş ve metaloproteinaz inhibitörleri (TIMPs; Tissue inhibitor of metalloproteinases) kullanılarak tümöral gelişim durdurulmaya çalışılmıştır. Zaman içerisinde yayılan bu denemelerin başarısızlıkları hakkında farklı görüşler ortaya atılmakla birlikte sonraki deneyimler kanser gelişimi sırasında metaloproteinaz inhibitörlerinin bazı üyelerinin farklı koşullara sahip olduklarını göstermektedir.

Genel olarak TIMP proteinlerinin deregülasyonunun metastatik yayılımı desteklediği öngörülse de TIMP-1 aşırı ekspresyonunun çeşitli kanserlerde kötü prognozla ilişkili olduğu, aksine TIMP-3'ün ise kötü prognoz gözlenen hastalarda azaldığı bildirilmiştir (194).

Yaptığımız LC-MSMS analizlerinde tümör dokusuna paralel olarak hasta serumunda da TIMP-1'in anlamlı artış gösterdiğini tespit ettik. Her iki örnek setinde yaptığımız kantitatif analizlerde bulduğumuz artmış TIMP-1 seviyelerini doğrulamak üzere serumda yapılan çift tekrarlı PRM analizleri, yine benzer şekilde hasta serumu TIMP-1 seviyelerinde artış olduğunu göstermiştir.

Kompleman sistemi, patojenlerin ve kanser hücresi gibi normal yapı ve fonksiyonları değişmiş hücrelerin ortadan kaldırılmasında doğuştan gelen bağışıklık sisteminin başlıca bileşenlerindendir. Bu sistem ayrıca doğal ve sonradan kazanılmış immun sistem arasında da hayati öneme sahip bir bağ kurar. Kompleman regülatörleri ise organizmaya ait hücreleri bu sistemin olası hasar verici etkilerinden korur. Kompleman faktörü H de bu düzenleyici sistemin kandaki ve hücre yüzeylerindeki alternatif yolunun kontrolünde görev alan çözümlü bir regülatördür (195). CFHR1, C5 konvertaz aktivitesini bloke eden ve C5b yüzey birikimi ile membran atak kompleksi (membrane attack complex; MAC) oluşumuna müdahale eden alternatif yolun bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Faktör H ve CFHR1, hücre yüzeylerinde aynı veya benzer bölgelere bağlanmaktadır. Bu bağlamda kompleman aktivasyonunu ardışık bir düzende kontrol ettikleri ve CFHR1'nin aktivite kazanımının, CFH aracılı C3 konvertaz inhibisyonu ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (196, 197). Yapılan çeşitli araştırmalar, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve diğer birçok kanserde, tümör çevresinde kompleman sistemin aktivasyonuna ve ilişkili proteinlerin birikimine rastlandığını bildirmektedir. (198). CFH'nin kutanöz skuamöz hücreli karsinomda (cSCC) arttığını gen ekspresyonu seviyesinde gösteren bir çalışmada normal insan epidermal keratinosit hücre (NHEK) kültürleri, primer cSCC ve metastatik cSCC hücre kültürleri ile karşılaştırılmıştır. Oligonükleotid tabanlı gen ifade farklılıklarını profilleyen bir platformda CHF ve CFHR1 ayırımı yapmaksızın (CFH/CFHR1; 215388_s_at) NHEK hücre hatlarına karşı ekspresyon farklılığı tespit etmişlerdir (199).

Literatüre bakıldığında CFHR1 üzerine, LC-MS tabanlı kanser çalışmalarına ışık tutacak seviyede yeterli kaynağın bulunmadığı anlaşılmaktadır. CFHR1 ve Faktör H proteinlerinin A grubu streptokoklarla ilişkisini araştıran bir çalışmada CFHR1 ve Faktör H proteinlerinin iki insan kompleman inhibitörü olarak streptokok yüzey proteinleri olan Scl1.6 ve Scl1.55'e bağlandıkları bildirilmiştir. Çalışmada *S. Pyogenes*'in yüzeyine topladığı konak canlıya ait Faktör H, FHL-1, CFHR1, C4BP (C4-binding protein) gibi kompleman sistemi regülatör proteinlerinin; konak tarafından geliştirilecek kompleman aracılı saldırıyı kontrol etmede yardımcı olduğu vurgulanmaktadır. CFHR1'in içinde bulunduğu etki mekanizmalarının karmaşıklığına dikkat çekilen Michael Reuter ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma, benzer ilişkilerin kanser hücrelerinin gelişiminde de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. (197). Orofaringeal kanser üzerine yapılan bir proteomik çalışmada serum proteinlerinden hastalığın erken evresine dair belirteçler araştırılmıştır. 25 hasta ve 12 sağlıklı bireyden oluşan grupların ekspresyon farklılıkları, 176 serum proteini üzerinden değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda erken evre orofaringeal kanserlerin teşhisi için CFHR2, MYL12A, C9, FCN3 ve C4BPA olmak üzere 5 aday biyobelirteç önerilmiştir. Çalışmada değerlendirilen protein sayısı kısıtlı olmakla beraber 5 protein biyobelirteç içerisinde bulunan CFHR2 kompleman sistemi ile ilgili proteinlerin hasta grubunda anlamlı artış göstermesi dikkat çekicidir (200).

Tuhkuri ve arkadaşlarının sonuçlarıyla örtüşecek şekilde proje çalışmamızın hasta grubu serum örneklerinde CFHR2, C9 ve C4BPA proteinlerinde anlamlı artış kaydedilmiştir. Ayrıca farklı olarak ise yine kompleman sistemi ile ilgi olan diğer CFHR proteinleri (CFHR 1,4, 5), kompleman faktör H (CFH), mannan bağlayıcı protein (MBP, veya MBL; lektin yoluna ait bir opsonin), kompleman faktör I (C3b/C4b inactivator) çalışmamızın hasta grubu serum örneklerinde anlamlı artış göstermiştir.

SONUÇ

Çalışmamızda yüksek veri hacmi sunan MS-tabanlı proteom yaklaşımı kullanılarak, KHDAK'nin skuamöz ve adenokarsinom histolojik alt gruplarına nazaran literatürde çok az sayıda çalışmasına rastlanan büyük hücreli karsinom (BHK) grubu incelenmiştir. Bu amaçla çalışmaya BHK hastalarının tümöral ve tümör yapısı içermeyen akciğer dokusu, aynı hastaların serum numuneleri ve kontrol numuneleri dahil edilmiştir. Bu çalışmayla BHK için önemli veriler sunan çok sayıda hedef gerçekleştirilmiştir. Öncelikle doku ve serum örneklerinde proteom kapsamını artıracak yöntemler kullanılarak profillemeye çalışması yapılmıştır. Sonrasında etiketsiz kantifikasyon yöntemi kullanılarak protein ifade farklılıkları tespit edilmiştir. Hem doku hem de serum örneklerinde anlamlı değişim tespit edilen proteinler informatik programlarıyla daha detaylı incelenmiş ve son olarak da PRM ile doğrulaması yapılmıştır.

Sonuçlar özetlendiğinde;

- Kütle spektrometresinin tam tarama moduyla gerçekleştirilen keşif analizlerinde doku numunelerinde toplam 6313'ü yüksek güven aralığında olmak üzere 6730 protein ve serum örneklerinde toplam 554 protein tanımlanmıştır. Ayrıca serum ve dokuda tanımlanan proteinlerden 430'unun ortak olduğu görülmüştür.
- 4020 proteinin etiketsiz kantifikasyon yöntemiyle miktar analizi yapılmış ve doku grupları arasında en az iki kat anlamlı değişim olan 503 protein tespit edilmiştir. Bununla birlikte tümör doku grubunda 248 proteinin ifadesinde artış ve 255 proteinin ifadesinde azalış olduğu görülmüştür. Serum grubunda ise 52 proteinin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüş ve bunlardan 36'sının büyük hücreli karsinom hasta serumundaki seviyesi artmış, 16'sının ise azalmıştır. Bununla birlikte 15 proteinin hem doku hem de serum örneklerindeki ifade farklılıkları anlamlı değişim göstermiştir.
- Anlamlı değişim gözlenen bu proteinler online veri tabanları kullanılarak farklı özelliklerine göre sınıflandırılmıştır.

- Dokuda anlamlı farklılık tespit edilen proteinler seçilmiş, informatik programında uygulanan filtrelemeler ve literatür taraması sonrasında 15'nin PRM yöntemiyle doğrulaması yapılmıştır. Serum örneklerinde ise dokuda da anlamlı ifade değişimi olan 7 ortak proteinin (Metalloproteinase inhibitor 1, Collagen alpha-3(VI) chain, Insulin-like growth factor-binding protein 2, Isoform 5 of Tenascin-X, Complement factor H-related protein 1, Adiponectin ve Isoform 4 of Extracellular matrix protein 1) iki tekrarlı PRM analizi yapılmıştır.

- Doğrulaması yapılan 7 protein, hastada metastaz gelişimine neden olan hücre proliferasyonu, apoptoz, tümör hücresi invazyonu ve anjiyogenez süreçleriyle ilişkili olarak kötü prognoz göstergesi için aday belirteçler olabilir.

- İlgili kaynaklarda, tümöral gelişimin erken evrelerinden başlayarak apoptoz, anjiyogenez, invazyon ve metastaz süreçleriyle ilişkili olabileceği ifade edilen 7 proteinin anlamlı ifade değişimleri çalışmamızla güçlü bir şekilde ortaya konulmuştur. Bu bağlamda bu 7 protein, BHK'da hastalığın erken teşhisine katkı sağlayacak veya hastalığın seyrinin incelenip daha etkin tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine hizmet edecek aday biyobelirteçler olabilirler.

Kapsamlı bir protein profilinin ortaya çıkarılmasında biyolojik numunenin karmaşıklığı, dinamik protein aralığı ve analitik enstrümanların uygunluğu gibi sınırlılıklar söz konusu olsa da gelişen MS-tabanlı proteomik yaklaşımlar, kanser biyolojisindeki anlayışımızı güçlendirerek, kişiselleştirilmiş tedavi uygulamaları için yeni yollar açmaktadır. Bu bağlamda yapmış olduğumuz çalışma, akciğer kanserleri ve özellikle de büyük hücreli karsinom için yapılacak sonraki çalışmalara önemli veriler sunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019 Aug;94(8):1623-1640.
2. Hoy H, Lynch T, Beck M. Surgical Treatment of Lung Cancer. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2019 Sep;31(3):303-313.
3. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Dec;1856(2):189-210.
4. Calabrese F, Lunardi F, Pezzuto F, Fortarezza F, Vuljan SE, Marquette C ve ark. Are There New Biomarkers in Tissue and Liquid Biopsies for the Early Detection of Non-Small Cell Lung Cancer? *J Clin Med.* 2019 Mar 26;8(3).
5. Tang Y, Qiao G, Xu E, Xuan Y, Liao M, Yin G. Biomarkers for early diagnosis, prognosis, prediction, and recurrence monitoring of non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther.* 2017 Sep 12;10:4527-4534.
6. Kisluk J, Ciborowski M, Niemira M, Kretowski A, Niklinski J. Proteomics biomarkers for non-small cell lung cancer. *J Pharm Biomed Anal.* 2014 Dec;101:40-9.
7. Tan HT, Lee YH, Chung MC. Cancer proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 2012 Sep-Oct;31(5):583-605.
8. Zhou W, Petricoin EF 3rd, Longo C. Mass Spectrometry-Based Biomarker Discovery. *Methods Mol Biol.* 2017;1606:297-311.
9. Wither MJ, Hansen KC, Reisz JA. Mass Spectrometry-Based Bottom-Up Proteomics: Sample Preparation, LC-MS/MS Analysis, and Database Query Strategies. *Curr Protoc Protein Sci.* 2016 Nov 1;86:16.4.1-16.4.20.
10. Cheung CHY, Juan HF. Quantitative proteomics in lung cancer. *J Biomed Sci.* 2017 Jun 14;24(1):37.
11. Lehtiö J, De Petris L. Lung cancer proteomics, clinical and technological considerations. *J Proteomics.* 2010 Sep 10;73(10):1851-63.
12. Harms A, Endris V, Winter H, Kriegsmann M, Stenzinger A, Schirmacher P ve ark. Molecular dissection of large cell carcinomas of the lung with null immunophenotype. *Pathology.* 2018 Aug;50(5):530-535.

13. Sears CR, Mazzone PJ. Biomarkers in Lung Cancer. *Clin Chest Med*. 2020 Mar;41(1):115-127
14. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424.
15. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health*. 2019 Jan 22;85(1).
16. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7-34.
17. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M ve ark. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018 Nov;103:356-387.
18. <https://www.saglik.gov.tr/TR,52696/saglik-istatistikleri-yilligi-2017-yayinlanmistir.html> Erişim Tarihi 05.01.2020
19. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 2016 Sep;48(3):889-902.
20. Mao Y, Yang D, He J, Krasna MJ. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016 Jul;25(3):439-45.
21. Harris JE, Thun MJ, Mondul AM, Calle EE. Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort,1982-8. *BMJ*. 2004 Jan 10;328(7431):72.
22. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT ve ark. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jan 21;96(2):99-106. Review.
23. Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM. Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol*. 2003 Jan;4(1):45-55. Review.
24. Stayner L, Bena J, Sasco AJ, Smith R, Steenland K, Kreuzer M, Straif K. Lung cancer risk and workplace exposure to environmental tobacco smoke. *Am J Public Health*. 2007 Mar;97(3):545-51.
25. de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2018 Jun;7(3):220-233.
26. Fabricius PG, Lange P. [Diet and lung cancer]. *Ugeskr Laeger*. 2003 Aug 18;165(34):3234-7. Review. Danish.

27. Luo J, Shen L, Zheng D. Association between vitamin C intake and lung cancer: a dose-response meta-analysis. *Sci Rep*. 2014 Aug 22;4:6161.
28. Yu N, Su X, Wang Z, Dai B, Kang J. Association of Dietary Vitamin A and β -Carotene Intake with the Risk of Lung Cancer: A Meta-Analysis of 19 Publications. *Nutrients*. 2015 Nov 11;7(11):9309-24.
29. Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2011 Mar 31;6(3):e17479.
30. Schwartz AG, Cote ML. Epidemiology of Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016;893:21-41.
31. Yokota J, Shiraishi K, Kohno T. Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions. *Adv Cancer Res*. 2010;109:51-72.
32. Brennan P, Hainaut P, Boffetta P. Genetics of lung-cancer susceptibility. *Lancet Oncol*. 2011 Apr;12(4):399-408.
33. Wei R, DeVilbiss FT, Liu W. Genetic Polymorphism, Telomere Biology and Non-Small Lung Cancer Risk. *J Genet Genomics*. 2015 Oct 20;42(10):549-61.
34. Mei C, Hou M, Guo S, Hua F, Zheng D, Xu F et al. Polymorphisms in DNA repair genes of XRCC1, XPA, XPC, XPD and associations with lung cancer risk in Chinese people. *Thorac Cancer*. 2014 May;5(3):232-42.
35. Wang XB, Li YS, Li J, Han Y, Liu ZD. Interleukin-8 -251A/T gene polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis. *J Cell Mol Med*. 2015 Jun;19(6):1218-22.
36. Liu L, Zheng F. IL-10 -1082A/G, -592C/A, and -819T/C polymorphisms in association with lung cancer susceptibility: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2016 Oct 7;9:6083-6091.
37. McColgan P, Sharma P. Polymorphisms of matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 and susceptibility to lung, breast and colorectal cancer in over 30,000 subjects. *Int J Cancer*. 2009 Sep 15;125(6):1473-8.
38. Zhang Y, Wang H, Wang J, Bao L, Wang L, Huo J et al. Global analysis of chromosome 1 genes among patients with lung adenocarcinoma, squamous carcinoma, large-cell carcinoma, small-cell carcinoma, or non-cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2015 Jun;34(2):249-64.
39. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016 Jul;25(3):447-68.

40. Zhou Z, Zhu L, Niu X, Shen S, Zhao Y, Zhang J ve ark. Comparison of genomic landscapes of large cell neuroendocrine carcinoma, small cell lung carcinoma, and large cell carcinoma. *Thorac Cancer*. 2019 Apr;10(4):839-847.
41. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB ve ark. WHO Panel. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015 Sep;10(9):1243-1260.
42. Hwang DH, Szeto DP, Perry AS, Bruce JL, Sholl LM. Pulmonary large cell carcinoma lacking squamous differentiation is clinicopathologically indistinguishable from solid-subtype adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 May;138(5):626-35.
43. Rekhtman N, Travis WD. Large No More: The Journey of Pulmonary Large Cell Carcinoma from Common to Rare Entity. *J Thorac Oncol*. 2019 Jul;14(7):1125-1127.
44. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B ve ark. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2019 Jan;19(1):9-31.
45. Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba II. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treat Res*. 2016;170:25-46.
46. Beasley MB, Dembitzer FR, Flores RM. Surgical pathology of early stage non-small cell lung carcinoma. *Ann Transl Med*. 2016 Jun;4(12):238.
47. Kuhn E, Morbini P, Cancellieri A, Damiani S, Cavazza A, Comin CE. Adenocarcinoma classification: patterns and prognosis. *Pathologica*. 2018 Mar;110(1):5-11.
48. Bi Y, Qu Y, Liang Z, Liu Z, Zhang H, Liang X ve ark. Clinicopathological analysis of Large Cell Lung Carcinomas definitely diagnosed according to the New World Health Organization Criteria. *Pathol Res Pract*. 2018 Apr;214(4):555-559.
49. Pelosi G, Barbareschi M, Cavazza A, Graziano P, Rossi G, Papotti M. Large cell carcinoma of the lung: a tumor in search of an author. A clinically oriented critical reappraisal. *Lung Cancer*. 2015 Mar;87(3):226-31.
50. Sholl LM. The Molecular Pathology of Lung Cancer. *Surg Pathol Clin*. 2016 Sep;9(3):353-78.

51. Liu R, Liu J, Shi T, Li X, Ren D, Chen G ve ark. Clinicopathological and genetic characteristics of pulmonary large cell carcinoma under 2015 WHO classification: a pilot study. *Oncotarget*. 2017 Oct 11;8(59):100754-100763.
52. Righi L, Gatti G, Volante M, Papotti M. Lung neuroendocrine tumors: pathological characteristics. *J Thorac Dis*. 2017 Nov;9(Suppl 15):S1442-S1447.
53. Miyoshi T, Umemura S, Matsumura Y, Mimaki S, Tada S, Makinoshima H ve ark. Genomic Profiling of Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung. *Clin Cancer Res*. 2017 Feb 1;23(3):757-765.
54. Naidoo J, Santos-Zabala ML, Iyriboz T, Woo KM, Sima CS, Fiore JJ ve ark. Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung: Clinico-Pathologic Features, Treatment, and Outcomes. *Clin Lung Cancer*. 2016 Sep;17(5):e121-e129.
55. Keith RL, Miller YE. Lung cancer chemoprevention: current status and future prospects. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Jun;10(6):334-43.
56. Sarode P, Mansouri S, Karger A, Schaefer MB, Grimminger F, Seeger W, Savai R. Epithelial cell plasticity defines heterogeneity in lung cancer. *Cell Signal*. 2020 Jan;65:109463.
57. Inamura K. Clinicopathological Characteristics and Mutations Driving Development of Early Lung Adenocarcinoma: Tumor Initiation and Progression. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 23;19(4).
58. Kadara H, Scheet P, Wistuba II, Spira AE. Early Events in the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016 Jul;9(7):518-27.
59. Kitamura H, Yazawa T, Okudela K, Shimoyamada H,&Sato H. Molecular and genetic pathogenesis of lung cancer: differences between small-cell and non-small-cell carcinomas. *The Open Pathology Journal*The Open Pathology Journal,2008;2: 106-114
60. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013 Oct;5 Suppl 5:S479-90.
61. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T ve ark. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 May 21;1:15009. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013 Oct;5 Suppl 5:S479-90.
62. Sholl LM. Biomarkers in lung adenocarcinoma: a decade of progress. *Arch Pathol Lab Med*. 2015 Apr;139(4):469-80.

63. Kempf E, Rousseau B, Besse B, Paz-Ares L. KRAS oncogene in lung cancer: focus on molecularly driven clinical trials. *Eur Respir Rev*. 2016 Mar;25(139):71-6.
64. Rooney C, Sethi T. Advances in molecular biology of lung disease: aiming for precision therapy in non-small cell lung cancer. *Chest*. 2015 Oct;148(4):1063-1072.
65. Black RC, Khurshid H. NSCLC: An Update of Driver Mutations, Their Role in Pathogenesis and Clinical Significance. *R I Med J* (2013). 2015 Oct 1;98(10):25-8. Review.
66. Deben C, Deschoolmeester V, Lardon F, Rolfo C, Pauwels P. TP53 and MDM2 genetic alterations in non-small cell lung cancer: Evaluating their prognostic and predictive value. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Mar;99:63-73.
67. Singh DK, Bose S, Kumar S. Regulation of expression of microRNAs by DNA methylation in lung cancer. *Biomarkers*. 2016 Nov;21(7):589-99.
68. Shruthi BS, Vinodhkumar P, Selvamani. Proteomics: A new perspective for cancer. *Adv Biomed Res*. 2016 Apr 19;5:67.
69. Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Paša-Tolić L. High-throughput proteomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2014;7:427-54.
70. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996;13:19-50.
71. Marcus K, Schmidt O, Schaefer H, Hamacher M, van Hall A, Meyer HE. Proteomics--application to the brain. *Int Rev Neurobiol*. 2004;61:285-311.
72. Griffin TJ, Aebersold R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7;276(49):45497-500.
73. Ayyub A, Saleem M, Fatima I, Tariq A, Hashmi N, Musharraf SG. Glycosylated Alpha-1-acid glycoprotein 1 as a potential lung cancer serum biomarker. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Jan;70:68-75.
74. Swietlik JJ, Sinha A, Meissner F. Dissecting intercellular signaling with mass spectrometry-based proteomics. *Curr Opin Cell Biol*. 2020 Jan 9;63:20-30.

75. Chen EI, Hewel J, Felding-Habermann B, Yates JR 3rd. Large scale protein profiling by combination of protein fractionation and multidimensional protein identification technology (MudPIT). *Mol Cell Proteomics*. 2006 Jan;5(1):53-6.
76. Pan J, Chen HQ, Sun YH, Zhang JH, Luo XY. Comparative proteomic analysis of non-small-cell lung cancer and normal controls using serum label-free quantitative shotgun technology. *Lung*. 2008 Jul-Aug;186(4):255-261.
77. Wang H, Sun S, Zhang Y, Chen S, Liu P, Liu B. An off-line high pH reversed-phase fractionation and nano-liquid chromatography-mass spectrometry method for global proteomic profiling of cell lines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2015 Jan 1;974:90-5.
78. Ankney JA, Muneer A, Chen X. Relative and Absolute Quantitation in Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2018 Jun 12;11(1):49-77.
79. Rodríguez-Suárez E, Whetton AD. The application of quantification techniques in proteomics for biomedical research. *Mass Spectrom Rev*. 2013 Jan-Feb;32(1):1-26.
80. Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Sep;404(4):939-65.
81. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*. 2007 Oct;389(4):1017-31.
82. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR 3rd. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev*. 2013 Apr 10;113(4):2343-94.
83. Shenoy A, Geiger T. Super-SILAC: current trends and future perspectives. *Expert Rev Proteomics*. 2015 Feb;12(1):13-9.
84. Chahrour O, Cobice D, Malone J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Pharm Biomed Anal*. 2015 Sep 10;113:2-20.
85. Arike L, Peil L. Spectral counting label-free proteomics. *Methods Mol Biol*. 2014;1156:213-22.

86. Distler U, Kuharev J, Navarro P, Tenzer S. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nat Protoc.* 2016 Apr;11(4):795-812.
87. Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:840518.
88. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003 Mar 13;422(6928):198-207.
89. Macek B, Mann M, Olsen JV. Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009;49:199-221.
90. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Sep;5(9):699-711.
91. Woods AG., and Costel CD, editor. *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research. Switzerland Vol. 806.* Springer, 2014. pp 6-7
92. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009;11:49-79.
93. Kebarle P, Verkerk UH. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom Rev.* 2009 Nov-Dec;28(6):898-917.
94. Han X, Aslanian A, Yates JR 3rd. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 2008 Oct;12(5):483-90.
95. Timothy D. Veenstra, editor. *Proteomic Applications in Cancer Detection and Discovery 2013* John Wiley & Sons pp 33-38
96. de Hoog CL, Mann M. Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004;5:267-93.
97. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics.* 2007 Feb;7(3):340-50.
98. Matysiak J, Hajduk J, Mayer F, Hebeler R, Kokot ZJ. Hyphenated LC-MALDI-ToF/ToF and LC-ESI-QToF approach in proteomic characterization of honeybee venom. *J Pharm Biomed Anal.* 2016 Mar 20;121:69-76.
99. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* 2005 Apr;40(4):430-43.

100. Zubarev RA, Makarov A. Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem.* 2013 Jul 4;85(11):5288-96.
101. Litong N, Zhu M, Sun S, Zhai L, Wu Z, Qian L, Tan M. An optimization of the LC-MS/MS workflow for deep proteome profiling on an Orbitrap Fusion. *Anal. Methods*, 2016; 8(2):425-434
102. Eliuk S, Makarov A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2015;8:61-80.
103. <https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-plus-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm> Erişim Tarihi: 08.05.2019
104. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2856-60. PubMed PMID: 17406544.
105. Medzihradszky KF. In-solution digestion of proteins for mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 2005;405:50-65.
106. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009 May;6(5):359-62.
107. Dapic I, Uwugiaren N, Jansen PJ, Corthals GL. Fast and Simple Protocols for Mass Spectrometry-Based Proteomics of Small Fresh Frozen Uterine Tissue Sections. *Anal Chem.* 2017 Oct 17;89(20):10769-10775.
108. Kim SC, Chen Y, Mirza S, Xu Y, Lee J, Liu P ve ark. A clean, more efficient method for in-solution digestion of protein mixtures without detergent or urea. *J Proteome Res.* 2006 Dec;5(12):3446-52.
109. Wiśniewski JR, Mann M. Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis. *Anal Chem.* 2012 Mar 20;84(6):2631-7.
110. Lipecka J, Chhuon C, Bourderioux M, Bessard MA, van Endert P, Edelman A ve ark. Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics.* 2016 Jul;16(13):1852-7.
111. Khan AA, Mangalaparthy KK, Advani J, Prasad TSK, Gowda H, Jain D ve ark. Data from quantitative proteomic analysis of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma primary tissues using high resolution mass spectrometry. *Data Brief.* 2018 Jun 22;19:1631-1637.

112. Wang N, Song X, Liu L, Niu L, Wang X, Song X, Xie L. Circulating exosomes contain protein biomarkers of metastatic non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2018 May;109(5):1701-1709.
113. Mulder C, Prust N, van Doorn S, Reinecke M, Kuster B, van Bergen En Henegouwen P ve ark. Adaptive Resistance to EGFR-Targeted Therapy by Calcium Signaling in NSCLC Cells. *Mol Cancer Res.* 2018 Nov;16(11):1773-1784.
114. Babu N, Advani J, Solanki HS, Patel K, Jain A, Khan AA ve ark. miRNA and Proteomic Dysregulation in Non-Small Cell Lung Cancer in Response to Cigarette Smoke. *Microna.* 2018;7(1):38-53.
115. Caiola E, Falcetta F, Giordano S, Marabese M, Garassino MC ve ark. Co-occurring KRAS mutation/LKB1 loss in non-small cell lung cancer cells results in enhanced metabolic activity susceptible to caloric restriction: an in vitro integrated multilevel approach. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018 Dec 4;37(1):302.
116. Sharpnack MF, Ranbaduge N, Srivastava A, Cerciello F, Codreanu SG, Liebler DC ve ark. Proteogenomic Analysis of Surgically Resected Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2018 Oct;13(10):1519-1529.
117. Xu J, Patel NH, Saleh T, Cudjoe EK Jr, Alotaibi M, Wu Y ve ark. Differential Radiation Sensitivity in p53 Wild-Type and p53-Deficient Tumor Cells Associated with Senescence but not Apoptosis or (Nonprotective) Autophagy. *Radiat Res.* 2018 Nov;190(5):538-557.
118. Advani J, Subbannayya Y, Patel K, Khan AA, Patil AH, Jain AP ve ark. Long-Term Cigarette Smoke Exposure and Changes in MiRNA Expression and Proteome in Non-Small-Cell Lung Cancer. *OMICS.* 2017 Jul;21(7):390-403.
119. Yang S, Chen L, Chan DW, Li QK, Zhang H. Protein signatures of molecular pathways in non-small cell lung carcinoma (NSCLC): comparison of glycoproteomics and global proteomics. *Clin Proteomics.* 2017 Aug 15;14:31.
120. Himmier A, O'Brien ME, Lynch V, Clynes M, Morgan R, Dowling P. Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from lung cancer patients using label-free mass spectrometry. *BBA Clin.* 2017 Mar 6;7:97-104.
121. Wang K, Li H, Chen R, Zhang Y, Sun XX, Huang W ve ark. Combination of CALR and PDIA3 is a potential prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017 Jun 16;8(57):96945-96957.

122. Grundner-Culemann K, Dybowski JN, Klammer M, Tebbe A, Schaab C, Daub H. Comparative proteome analysis across non-small cell lung cancer cell lines. *J Proteomics*. 2016 Jan 1;130:1-10.
123. Bosse K, Haneder S, Arlt C, Ihling CH, Seufferlein T, Sinz A. Mass spectrometry-based secretome analysis of non-small cell lung cancer cell lines. *Proteomics*. 2016 Nov;16(21):2801-2814.
124. Hu R, Huffman KE, Chu M, Zhang Y, Minna JD, Yu Y. Quantitative Secretomic Analysis Identifies Extracellular Protein Factors That Modulate the Metastatic Phenotype of Non-Small Cell Lung Cancer. *J Proteome Res*. 2016 Feb 5;15(2):477-86.
125. Kitata RB, Dimayacyac-Esleta BR, Choong WK, Tsai CF, Lin TD, Tsou CC ve ark. Mining Missing Membrane Proteins by High-pH Reverse-Phase StageTip Fractionation and Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *J Proteome Res*. 2015 Sep 4;14(9):3658-69.
126. Liu PJ, Chen CD, Wang CL, Wu YC, Hsu CW, Lee CW ve ark. In-depth proteomic analysis of six types of exudative pleural effusions for nonsmall cell lung cancer biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2015 Apr;14(4):917-32.
127. Walker MJ, Zhou C, Backen A, Pernemalm M, Williamson AJ, Priest LJ ve ark. Discovery and Validation of Predictive Biomarkers of Survival for Non-small Cell Lung Cancer Patients Undergoing Radical Radiotherapy: Two Proteins With Predictive Value. *EBioMedicine*. 2015 Jun 19;2(8):841-50.
128. Deng W, Yan M, Yu T, Ge H, Lin H, Li J ve ark. Quantitative proteomic analysis of the metastasis-inhibitory mechanism of miR-193a-3p in non-small cell lung cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(5):1677-88.
129. Gündisch S, Schott C, Wolff C, Tran K, Beese C, Viertler C ve ark. The PAXgene(®) tissue system preserves phosphoproteins in human tissue specimens and enables comprehensive protein biomarker research. *PLoS One*. 2013;8(3):e60638.
130. Garcia S, Silva-Costa LC, Reis-de-Oliveira G, Guest PC, Baldasso PA, Cassoli JS, Martins-de-Souza D. Identifying Biomarker Candidates in the Blood Plasma or Serum Proteome. *Adv Exp Med Biol*. 2017;974:193-203.

131. Pisanu S, Biosa G, Carcangiu L, Uzzau S, Pagnozzi D. Comparative evaluation of seven commercial products for human serum enrichment/depletion by shotgun proteomics. *Talanta*. 2018 Aug 1;185:213-220.
132. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM ve ark. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Sep;69(5):363-385.
133. Kikuchi T, Hassanein M, Amann JM, Liu Q, Slebos RJ, Rahman SM ve ark. In-depth proteomic analysis of nonsmall cell lung cancer to discover molecular targets and candidate biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Oct;11(10):916-32.
134. Liu Y, Luo X, Hu H, Wang R, Sun Y, Zeng R ve ark. Integrative proteomics and tissue microarray profiling indicate the association between overexpressed serum proteins and non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2012;7(12):e51748.
135. Min H, Han D, Kim Y, Cho JY, Jin J, Kim Y. Label-free quantitative proteomics and N-terminal analysis of human metastatic lung cancer cells. *Mol Cells*. 2014 Jun;37(6):457-66.
136. Hsu CH, Hsu CW, Hsueh C, Wang CL, Wu YC, Wu CC ve ark. Identification and Characterization of Potential Biomarkers by Quantitative Tissue Proteomics of Primary Lung Adenocarcinoma. *Mol Cell Proteomics*. 2016 Jul;15(7):2396-410.
137. Pastor MD, Nogal A, Molina-Pinelo S, Carnero A, Paz-Ares L. Proteomic biomarkers in lung cancer. *Clin Transl Oncol*. 2013 Sep;15(9):671-82.
138. I H, Cho JY. Lung Cancer Biomarkers. *Adv Clin Chem*. 2015;72:107-70.
139. Birse CE, Lagier RJ, FitzHugh W, Pass HI, Rom WN, Edell ES ve ark. Blood-based lung cancer biomarkers identified through proteomic discovery in cancer tissues, cell lines and conditioned medium. *Clin Proteomics*. 2015 Jul 16;12(1):18.
140. Kim YJ, Sertamo K, Pierrard MA, Mesmin C, Kim SY, Schlessner M ve ark. Verification of the biomarker candidates for non-small-cell lung cancer using a targeted proteomics approach. *J Proteome Res*. 2015 Mar 6;14(3):1412-9.
141. Chang YH, Chiu YJ, Cheng HC, Liu FJ, Lai WW, Chang HJ ve ark. Down-regulation of TIMP-1 inhibits cell migration, invasion, and metastatic colonization in lung adenocarcinoma. *Tumour Biol*. 2015 May;36(5):3957-67.

142. Drzewiecka-Jędrzejczyk M, Wlazeł R, Terlecka M, Jabłoński S. Serum metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in lung carcinoma patients. *J Thorac Dis.* 2017 Dec;9(12):5306-5313.
143. Guo C, Lu H, Gao W, Wang L, Lu K, Wu S ve ark. Insulin-like growth factor binding protein-2 level is increased in blood of lung cancer patients and associated with poor survival. *PLoS One.* 2013 Sep 17;8(9):e74973.
144. Huang Y, Li G, Wang K, Mu Z, Xie Q, Qu H, Lv H, Hu B. Collagen Type VI Alpha 3 Chain Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Bladder Cancer Cells via Transforming Growth Factor β (TGF- β)/Smad Pathway. *Med Sci Monit.* 2018 Aug 1;24:5346-5354.
145. Boura P, Loukides S, Grapsa D, Achimastos A, Syrigos K. The diverse roles of adiponectin in non-small-cell lung cancer: current data and future perspectives. *Future Oncol.* 2015;11(15):2193-203.
146. Meng XY, Liu J, Lv F, Liu MQ, Wan JM. Study on the correlation between extracellular matrix protein-1 and the growth, metastasis and angiogenesis of laryngeal carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2313-6.
147. Tang D, Yao R, Zhao D, Zhou L, Wu Y, Yang Y ve ark. Trichostatin A reverses the chemoresistance of lung cancer with high IGFBP2 expression through enhancing autophagy. *Sci Rep.* 2018 Mar 2;8(1):3917.
148. Yuan Q, Cai HQ, Zhong Y, Zhang MJ, Cheng ZJ, Hao JJ ve ark. Overexpression of IGFBP2 mRNA predicts poor survival in patients with glioblastoma. *Biosci Rep.* 2019 Jun 14;39(6).
149. Wang J, Hu ZG, Li D, Xu JX, Zeng ZG. Gene expression and prognosis of insulin like growth factor binding protein family members in non small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2019 Nov;42(5):1981-1995.
150. Hu Q, Huang L, Kuang X, Zhang H, Ling G, Chen X ve ark. Is insulin-like growth factor binding protein 2 associated with metastasis in lung cancer? *Clin Exp Metastasis.* 2014 Jun;31(5):535-41.
151. Zhang Y, Ying X, Han S, Wang J, Zhou X, Bai E ve ark. Autoantibodies against insulin-like growth factor binding protein-2 as a serological biomarker in the diagnosis of lung cancer. *Int J Oncol.* 2013 Jan;42(1):93-100.

152. Wang H, Wang H, Shen W, Huang H, Hu L, Ramdas L ve ark. Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res.* 2003 Aug 1;63(15):4315-21.
153. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Muramaki M, Gleave M, Eto H. Introduction of insulin-like growth factor binding protein-2 gene into human bladder cancer cells enhances their metastatic potential. *Oncol Rep.* 2005 Feb;13(2):341-5.
154. Guan SP, Lam ATL, Newman JP, Chua KLM, Kok CYL, Chong ST ve ark. Matrix metalloproteinase-1 facilitates MSC migration via cleavage of IGF-2/IGFBP2 complex. *FEBS Open Bio.* 2017 Nov 23;8(1):15-26.
155. Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):488-99. Review.
156. Paolillo M, Schinelli S. Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 7;20(19). pii: E4947.
157. Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Mar 6;38(1):115.
158. Liu W, Li L, Ye H, Tao H, He H. Role of COL6A3 in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2018 Jun;39(6):2527-2536.
159. Ao R, Guan L, Wang Y, Wang JN. Silencing of COL1A2, COL6A3, and THBS2 inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion while promoting apoptosis through the PI3k-Akt signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2018 Jun;119(6):4420-4434.
160. Chen P, Cescon M, Bonaldo P. Collagen VI in cancer and its biological mechanisms. *Trends Mol Med.* 2013 Jul;19(7):410-7.
161. Qiao J, Fang CY, Chen SX, Wang XQ, Cui SJ, Liu XH ve ark. Stroma derived COL6A3 is a potential prognosis marker of colorectal carcinoma revealed by quantitative proteomics. *Oncotarget.* 2015 Oct 6;6(30):29929-46.
162. Arafat H, Lazar M, Salem K, Chipitsyna G, Gong Q, Pan TC ve ark. Tumor-specific expression and alternative splicing of the COL6A3 gene in pancreatic cancer. *Surgery.* 2011 Aug;150(2):306-15.
163. Kang CY, Wang J, Axell-House D, Soni P, Chu ML, Chipitsyna G ve ark. Clinical significance of serum COL6A3 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg.* 2014 Jan;18(1):7-15.

164. Voiles L, Lewis DE, Han L, Lupov IP, Lin TL, Robertson MJ ve ark. Overexpression of type VI collagen in neoplastic lung tissues. *Oncol Rep.* 2014 Nov;32(5):1897-904.
165. Guo Q, Zheng M, Xu Y, Wang N, Zhao W. MiR-384 induces apoptosis and autophagy of non-small cell lung cancer cells through the negative regulation of Collagen α -1(X) chain gene. *Biosci Rep.* 2019 Feb 1;39(2).
166. Chiquet-Ehrismann R. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Jun;36(6):986-90. Review.
167. Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett.* 2006 Dec 8;244(2):143-63.
168. Gebauer F, Gelis S, Zander H, Meyer KF, Wolters-Eisfeld G, Izbicki JR ve ark. Tenascin-C serum levels and its prognostic power in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016 Apr 12;7(15):20945-52.
169. Onion D, Isherwood M, Shridhar N, Xenophontos M, Craze ML, Day LJ ve ark. Multicomponent analysis of the tumour microenvironment reveals low CD8 T cell number, low stromal caveolin-1 and high tenascin-C and their combination as significant prognostic markers in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017 Jun 29;9(2):1760-1771.
170. Gocheva V, Naba A, Bhutkar A, Guardia T, Miller KM, Li CM ve ark. Quantitative proteomics identify Tenascin-C as a promoter of lung cancer progression and contributor to a signature prognostic of patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jul 11;114(28):E5625-E5634.
171. Ishiwata T, Takahashi K, Shimanuki Y, Ohashi R, Cui R, Takahashi F ve ark. Serum tenascin-C as a potential predictive marker of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2005 Jan Feb;25(1B):489-95.
172. Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 May 1;3(5). pii: a004960.
173. Nakayama K, Seike M, Noro R, Takeuchi S, Matsuda K, Kunugi S ve ark. Tenascin XB Is a Novel Diagnostic Marker for Malignant Mesothelioma. *Anticancer Res.* 2019 Feb;39(2):627-633.
174. Matsumoto K, Takayama N, Ohnishi J, Ohnishi E, Shirayoshi Y, Nakatsuji N ve ark. Tumour invasion and metastasis are promoted in mice deficient in tenascin-X. *Genes Cells.* 2001 Dec;6(12):1101-11.

175. Ikuta T, Ariga H, Matsumoto K. Extracellular matrix tenascin-X in combination with vascular endothelial growth factor B enhances endothelial cell proliferation. *Genes Cells*. 2000 Nov;5(11):913-927.
176. Yuan Y, Nymoen DA, Stavnes HT, Rosnes AK, Bjørang O, Wu C ve ark. Tenascin-X is a novel diagnostic marker of malignant mesothelioma. *Am J Surg Pathol*. 2009 Nov;33(11):1673-82.
177. Wan Mohd Tajuddin WNB, Lajis NH, Abas F, Othman I, Naidu R. Mechanistic Understanding of Curcumin's Therapeutic Effects in Lung Cancer. *Nutrients*. 2019 Dec 6;11(12).
178. Illiano M, Nigro E, Sapio L, Caiafa I, Spina A, Scudiero O ve ark. Adiponectin down-regulates CREB and inhibits proliferation of A549 lung cancer cells. *Pulm Pharmacol Ther*. 2017 Aug;45:114-120.
179. Petridou ET, Mitsiades N, Gialamas S, Angelopoulos M, Skalkidou A, Dessypris N ve ark. Circulating adiponectin levels and expression of adiponectin receptors in relation to lung cancer: two case-control studies. *Oncology*. 2007;73(3-4):261-9.
180. Cui E, Guo H, Shen M, Yu H, Gu D, Mao W ve ark. Adiponectin inhibits migration and invasion by reversing epithelial mesenchymal transition in non small cell lung carcinoma. *Oncol Rep*. 2018 Sep;40(3):1330-1338.
181. Chwalba A, Machura E, Ziora K, Ziora D. The role of adipokines in the pathogenesis and course of selected respiratory diseases. *Endokrynol Pol*. 2019;70(6):504-510.
182. Hardy SA, Mabotuwana NS, Murtha LA, Coulter B, Sanchez-Bezanilla S, Al-Omary MS ve ark. Novel role of extracellular matrix protein 1 (ECM1) in cardiac aging and myocardial infarction. *PLoS One*. 2019 Feb 21;14(2):e0212230.
183. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C ve ark. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med*. 1999 Jun;5(6):662-8.
184. Wang L, Yu J, Ni J, Xu XM, Wang J, Ning H ve ark. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) is over-expressed in malignant epithelial tumors. *Cancer Lett*. 2003 Oct 8;200(1):57-67.

185. Sercu S, Zhang L, Merregaert J. The extracellular matrix protein 1: its molecular interaction and implication in tumor progression. *Cancer Invest.* 2008 May;26(4):375-84.
186. Wu H, Qiao F, Zhao Y, Wu S, Hu M, Wu T ve ark. Downregulation of Long Non-coding RNA FALEC Inhibits Gastric Cancer Cell Migration and Invasion Through Impairing ECM1 Expression by Exerting Its Enhancer-Like Function. *Front Genet.* 2019 Mar 22;10:255.
187. Pauws E, Veenboer GJ, Smit JW, de Vijlder JJ, Morreau H, Ris-Stalpers C. Genes differentially expressed in thyroid carcinoma identified by comparison of SAGE expression profiles. *FASEB J.* 2004 Mar;18(3):560-1.
188. Gu M, Guan J, Zhao L, Ni K, Li X, Han Z. Correlation of ECM1 expression level with the pathogenesis and metastasis of laryngeal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013 May 15;6(6):1132-7.
189. Ye H, Yu X, Xia J, Tang X, Tang L, Chen F. MiR-486-3p targeting ECM1 represses cell proliferation and metastasis in cervical cancer. *Biomed Pharmacother.* 2016 May;80:109-114.
190. Wang Z, Zhou Q, Li A, Huang W, Cai Z, Chen W. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) is associated with carcinogenesis potential of human bladder cancer. *Onco Targets Ther.* 2019 Feb 20;12:1423-1432.
191. Niu L, Song X, Wang N, Xue L, Song X, Xie L. Tumor-derived exosomal proteins as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2019 Jan;110(1):433-442.
192. Alaseem A, Alhazzani K, Dondapati P, Alobid S, Bishayee A, Rathinavelu A. Matrix Metalloproteinases: A challenging paradigm of cancer management. *Semin Cancer Biol.* 2019 Jun;56:100-115.
193. Son J, Lee SY. Ursonic acid exerts inhibitory effects on matrix metalloproteinases via ERK signaling pathway. *Chem Biol Interact.* 2019 Nov 29;315:108910.
194. Su CW, Lin CW, Yang WE, Yang SF. TIMP-3 as a therapeutic target for cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2019 Jul 16;11:1758835919864247.
195. Ferreira VP, Pangburn MK, Cortés C. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol.* 2010 Aug;47(13):2187-97.

196. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse HM, Schirmer S ve ark. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2439-47.
197. Reuter M, Caswell CC, Lukomski S, Zipfel PF. Binding of the human complement regulators CFHR1 and factor H by streptococcal collagen-like protein 1 (Scl1) via their conserved C termini allows control of the complement cascade at multiple levels. *J Biol Chem*. 2010 Dec 3;285(49):38473-85.
198. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J Clin Invest*. 2017 Mar 1;127(3):780-789.
199. Riihilä P, Nissinen L, Farshchian M, Kivisaari A, Ala-Aho R, Kallajoki M ve ark. Complement factor I promotes progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2015 Feb;135(2):579-588.
200. Tuhkuri A, Saraswat M, Mäkitie A, Mattila P, Silén R, Dickinson A ve ark. Patients with early-stage oropharyngeal cancer can be identified with label-free serum proteomics. *Br J Cancer*. 2018 Jul;119(2):200-212.

HAM VERİLER

Keşif Modunda Tanımlanan Proteinler

O95881	O75147	O96008	Q8NFH4	P08729	O43674-1
B2RUZ4	O95870-1	Q9NXF1	P52294	O14787-2	P28907
Q9UBP6	O94851	P37802-2	Q6PI78	P23368-1	Q01105-2
Q9BWS9-2	Q14166	P98179	Q9NZN4	O14936	Q53EU6
P20936-1	Q01804-1	Q6NZY4	P35542	P22392-2	O60828
Q9GZP9	Q9UH62	Q969Y2-2	P28062-1	Q99961	P53671-3
P35609	Q14696	O75934	P10398-1	P07305	Q9NRX5
Q9NYF8-1	Q9Y316-1	Q9Y5K8	O95716	Q8IWJ2	Q16513
Q15942	P49247	Q04726	Q01082-1	P48556	Q9Y5J1
P01042	P04075-2	Q8IUH4	Q7Z3U7-1	Q03013-1	P21810
Q9P287	Q55RD1	Q01130	P49023-3	Q6PGP7	Q92882
Q15599-3	Q7L592	Q3KQV9	P30475	Q9Y5A7	Q11206-4
Q8IXT5	Q15025	Q8NFZ5-1	Q14642	P78417	A6NCS6
Q9P0L0-2	O75503	Q01082-3	Q96RS6	Q12906-1	Q9Y221-1
Q9Y303-3	P20160	Q13277-1	O75843	Q8N573-1	Q12824-2
Q96MU7-1	P56962	Q6NY19-1	Q9NXV6	P48426	Q96C86
O43292-1	Q13242	Q9BZF9	Q8NFH3	P54578	Q15155
Q3YEC7-1	Q96CT7	P46952	Q9H7Z7	Q86UL3	Q96A33-1
Q9BTW9-4	A6NDB9	P46776	Q9Y248	P21912	P08238
Q92754	O75925-2	Q9NUQ7	Q6KC79	Q96QD8	Q86W42
P29401-2	Q9UPY3	O75122-3	P09110-1	Q9NPH0-1	Q9NQ94
Q8TAE8	Q13620	O75884-1	P11215-2	Q86VP6-1	P21127-1
Q6IBS0	Q96T60	P13647	Q96KR1	P05156	Q9BUQ8
O76031	Q9P0I2	Q16401	Q8N0X7	O95251-1	P05141
P47972	P69892	Q9BU23-1	P22694-2	P20132	P62070-4
Q9NUD5	P35637-1	Q86UP2-1	Q86XR7-2	Q9UKV8	P01780
Q14181	Q8N0U8	O60879	Q7Z5L7-3	O95834-3	Q9NX02
P26368	P34913-1	Q8TE82	P56524	O14976	P63172
Q9BQ39	Q9BRF8-1	Q9Y5P6-2	Q16543	Q9NP77	Q06587
O94842	Q9UHG3	P43652	Q9H2U2-2	P52306-5	P62333
O75586-2	P54922	P04114	P02649	Q99569	Q96SQ9-2
P62263	Q9BQE5	O15335	Q5JPH6-2	P25208	O43150-1
Q9BQP7	P43307	P50213-1	Q8N5G0-2	Q8NHU6	P52926-1
Q8NI08	Q5VWC8	P51116	Q6P1X6	P20933	P05452
O14920-1	P06731	Q9NQR4	Q13464	Q15120-2	P31153
Q9UBR5-1	Q9H3K2	Q15370-2	O43676	P46926	P84098
Q9C0C2	Q96AB3	P11686	Q9GZV5	Q92620	P11047
Q6ZRP7	Q68CZ2-1	P46940	Q9Y6M7-7	P53701	Q9BVL2
Q8IV36	O43402	Q9H497-1	P78527	P07900-2	Q9NWU1-1
P02787	P62136-2	Q9GZZ1-1	Q92598	O00267	P50851-2
P29218-3	Q9P000-1	Q9NPJ3-1	Q98QJ9	Q06481	P60228
P60891	P67812-3	Q13503	P30466	Q92890-1	P55263-1
Q96CU9	Q8TDZ2-4	Q9NWW8	Q03405	Q9NR33	P56182
O15231-6	Q9Y237-2	Q08357	P25398	Q5VTR2	Q9BZG8
O95232-1	O95166	Q14C86-6	O43913	Q8N8A2-2	Q13263
Q96IU4	P53007	P08493-2	P40222	Q14192	P22059
Q9H3H3-3	Q9NPB8	Q9H490	Q13418	Q9UBU9-1	Q9Y673
Q93096	P11597-1	Q9UQ13	Q9NZ08-2	P01768	Q9H0N5
Q9NX24	O75489	Q9UDY8	Q6NYC1-3	Q76M96-2	P61160-1
P62701	P35232	Q9UPT8	P50151	Q86YQ8	P17568
Q15388	Q92626	Q9BTE7	Q8N556-2	Q7Z2W4	Q5ZPR3
Q96F15-2	Q15528-1	P20020	Q05048	P30050-1	Q9UKX7
Q9BUN8	P67936	Q6QNY1	Q9NP79	Q8NF50-1	Q9NP81-1
O00339-1	Q00325-2	P0DOX2	P14543-1	Q02952-1	Q9H201-1
P12074	Q9Y5X1	Q9H4A5	Q14978-2	Q92845	Q15404-1
P62158	Q9H0R4-1	Q14213	P08237-3	Q5ST30-4	Q9H7Z6-2
Q8WWW0	Q9UBF2	Q9Y5P4-3	Q9NUY8	P47895	O14561
P02724	Q13823	Q96JJ7-1	Q9P016	Q96KB5-2	Q9NRW1

Q15041	Q8IWW7-1	Q9NYF3	Q8N1G4	P02655	Q9NS86
Q9Y3F4-2	Q5UIP0	O14933	P07951-1	P11216	P46060
Q8WUD1	Q14746	Q16647	Q96N96-6	P13984	Q86UD1
P0DOX3	Q07075	Q9BYC9	P05162	Q8WZ82	Q86TS9-1
P78371-1	O94992	Q08380	Q92544	Q14331	Q10472
P49790-3	Q63HR2-4	P10586-1	O75643-1	P27816-1	Q32MZ4-2
Q15005	P23396-1	Q9NZB8	Q9BX40	Q9H3U1	Q86YS7-5
P28370-1	P18754-2	O75844	P09769	P52943-2	Q8N7H5
Q8TBA6	O00244	Q13586	O95864	Q9P035	P61224-1
P45984-1	P52815	Q6NYC8	Q05707-1	Q9P2P6-1	P46976-1
Q9NYM9	P78356	Q96RE7	Q4VC31	P13671	Q00013-1
Q5JTH9-1	Q8NFH5	P30837	Q0VGD4-1	Q96Q11-1	Q8TCG1
Q96HF1	Q55Y16	Q96CF2	Q5JRX3-2	Q9H6L2-2	Q14980-2
P46777	Q9H9E3-1	Q00613	Q15125	Q9NZI8	P04217
P13804-1	P31040	Q16527	Q13561-2	P09619	Q9BYE7-1
Q8IZ07	P33316-3	P30084	Q13107-1	P28074-1	Q96RP9
P30536	P49711-1	P32942	O94788-1	Q86X55	Q16602
P41223-2	O75530-2	Q13952-1	O43159	Q96QV6	O15511-1
Q969G6	Q5QJ74	Q96P44	P01116-2	Q9BQA1	P26641-2
Q00796	Q9NY27	Q8NBF2-1	P20839-6	Q9BY44-1	P22732-1
O14841	Q9NX14-2	Q9NNW5	P00751-1	Q8IZH2-1	E9PAV3
Q9NTJ5	Q30154	Q9Y4J8-15	O00391	Q9BZ95	Q9BUJ2-1
Q9BPX7-2	Q86WB0	Q16644	P83876	Q9NXE4-4	Q4U2R6
Q15172-1	Q5JS37	P11387	O14495	Q5T1J5	O43272
Q9UL45	O94886	O60936-3	Q9P289	Q96C36	Q9H2H8-1
Q695T7	O94906-1	Q6FI13	P42695	Q14515	Q9H4I9
O14497	Q8IU81	P42226	Q5T2E6-1	Q96HP0	Q9H2D6
Q9Y6D6	Q8NFK8	Q96LJ7	Q96CM8-2	Q14554	Q96HD1-2
Q9BYJ9-1	Q5T447	Q6P1M3-1	Q93100-3	Q99567	O75084
P53350	O43823	Q99808-2	Q08426	Q15326	P05787-2
P37198	P26639-1	O15446-2	Q01831	Q9H4Z3	Q8N7J2-1
Q07954	O14880	Q86UA1	Q9BTY7	O75964	Q96RW7-1
P08514-1	P80723	Q9BZF1-1	P53602	Q9Y394	Q9NQS1
Q9P0P0	P09488	P13674-2	P07359	P17152	O43852-3
Q8NEU8-3	Q9H792	P17028-1	Q9BTE3-1	Q96A29	Q8TCU6-1
Q9Y5B6	O00425	Q96A35	O00754	P40763	Q99758
Q3SXM5	O60248	P60983	P41221	P34059	Q9HD26-1
P42771-4	P04406-1	Q96TA2-1	P19237	P06331	P02008
Q16181	P42167	Q6Y7W6-1	Q9NR46	P06865	Q7L099-3
P50440-1	Q2VPK5-1	Q14185	Q96ER3	P01031	P00740
P40227-1	Q13596	Q641Q2	Q8WWQ0	O15389	P03915
Q63HN8-4	O95639	A0A087WSY6	Q14161-1	Q9BXJ9	Q9H8T0-2
Q96PU5	Q13573	Q8NEY8-3	Q9UQ16-4	Q13445	P00568
Q9BTE6-3	O00194	P30613	Q9NRQ2	O95164	Q96RT1-8
P86790	P11274-1	Q5W0V3	Q9BWF3-1	P05388	O95865
Q96CX2	Q9NNX6	Q02818	P84157-2	O00159-1	P16298-4
O43707	P08962	P25789	P23284	P02760	Q93009
Q8WUM4	Q9H254	Q9Y3D6	Q5TC12-1	Q9HCE5	Q9BYM8
Q8IXL7	Q9Y4P1-1	P31483	Q53H12	P22792	A0A0B4J1V1
Q9Y5Y6	Q5XPI4	P25685	Q9BQB6-1	Q9GZM7-1	P21980
O43156	P28289	Q9Y5Q9	Q08AF3-1	O00629	P42345
P30460	P54725-1	Q8N6C8-3	Q9NQW7-3	Q8NFT2	O14656
A0A0C4DH33	Q6YP21	Q9P0J7	O95167	P30039	Q32P44
P05107	P10314	Q99816	Q6P1L8	Q5JTZ9	P07093-3
Q9UN37	Q8WXA9-2	O95336	P78330	Q96SB8-2	O43504
P02778	O60841	Q969U7	O95644-1	P06239-3	P08240-1
Q6P1K2-2	Q92796-2	Q9P206-2	O95571	O60763-2	Q96QC0
Q8NEN9	Q92835	Q5T7M9-1	O94832	P46527	P20908
O15379-2	P57735	P99999	P36915-1	Q8N2G8-1	P22894
P06276	P61981	Q9C0D3	Q0PNE2	Q14651	O43390-2
O15061-1	Q9Y3E7	Q8WW22-2	Q14152	O75347	Q96I18-2
Q6ZN17-1	Q9BV79	P01920	P52788-1	Q9Y606	Q9Y2L9-3
O94855-2	Q11128	P16444	Q13442	Q15121-2	P55060-1

P40424-1	P05187	Q9BR39-1	P36551	Q9BRX8-1	Q99969
O43772	Q9BZZ5-2	Q5T160	O43290	P14678-3	Q9NR09
Q9BQA9-1	Q16630-2	O43516-1	Q9UI30	Q9H4K7	P98164
Q9UNM6	P63279	P52758	O15525	O14727	Q6P9B6
P43897	Q96AD5-1	Q15738	Q15027	Q9HAV0	Q53TN4
O00160	O75828	Q96S19-4	Q9UGV2	Q14139-2	Q13042
P26599-3	Q8NCG7	Q9H089	P43308	Q96RU2-2	Q9NP64
Q14643-1	Q7L2J0-1	Q9H3Z4	Q6YHK3-1	P12724	O75363
O00541-1	Q5VZM2	P08311	P07360	Q9BVP2	Q16851
Q5K4L6-1	Q9P2C4	P47914	Q8WX93-1	Q86UV5-8	P33993-1
Q9BW19	O95674-1	Q9UHN6-1	P19013	Q6PCE3	P01909
Q9UBI1	Q9UBG0	Q9P2K8-1	P43378	Q8TCT9-2	Q16204
O15344-1	Q92945	Q10567	Q14980-1	Q14683	Q9BUI4
Q86X27-1	Q9UJY5-1	O43670-4	P17480-1	P0CG13-1	Q9UGM6-1
P42330	P40939	Q9BZE1	Q9BUR5-1	Q96AE4	P51674
O15027-5	Q9H6R3	P28340	P34896-1	O00217	O94822-3
P53420	Q9UI10-1	Q13148-1	Q9UK45	Q05682-3	Q8IW50-1
P98194-7	Q6ULP2	P12111-4	P61978-3	Q6PCB7	P52823
P00167-1	Q12906-7	Q13243-1	P39748	P14625	Q7Z3C6
Q9UHQ9	P55064	Q06203	Q8TDP1	Q9Y333	Q9Y4R8
Q92541	Q9NXR1-1	Q9UPU5	P46087-4	Q7Z794	Q9NW08
Q15070-1	Q10713	Q9BQ75	P00505	P23786	Q9BWD1
P49588	O60645	O75223-1	P49590	Q9UI26-2	Q6GMV3
Q16585	Q12874	Q8N142-1	Q9NWS0-1	Q2Q1W2	Q9Y6C2-2
O60568	Q6PKG0-1	Q9HD33-1	Q8TCT9-1	Q8WUA8	Q14571-1
Q9BZQ6	Q9Y4C1	O75312	Q99613	P27824-2	Q9NPJ6-1
P19105	Q96DB5	Q3SY69-1	O96011-1	Q9UNN8	O75306-1
Q16594	P55957-2	Q9NNX1	P35613	Q96PY5-3	O60271-2
Q9NR56-1	Q9UBB4-1	Q9Y680-1	Q58WW2-3	P78549	P30490
Q99611	Q92530	Q96S96	P35606	P31944	Q9BXS6
Q15392	Q9BXN1	Q9NQP4	Q8IXB1-1	O14879	O15111
O96019-1	Q70E73	O75832	Q9H307	Q9NUQ6-3	Q8WY22
Q96EY8	P49756-1	Q12851	Q92954-1	Q9Y259-1	P12814-3
Q16656-4	Q9NRR5-1	P02775	Q9NQC3-3	Q08AM6	P13987
Q8NBZ7-2	Q643R3	Q9Y2L5-1	P32189-3	Q9BQ67	Q96HY6-1
Q8TF65	Q15004-1	A0A0C4DH31	Q8WWC4	Q16891-4	P32121-4
Q99614	Q96BR1-1	Q8N806	O15355	Q4G0F5	P07602-3
P33527	Q13094	P15531-2	Q13795	Q16853	Q8NEW0
Q9Y281-1	Q16222-1	Q9NZN8-1	P50225	P51970	P45877
Q5T9A4	P60900	Q7Z3B1	Q14137	Q9P0T7	Q6WCC1-2
P62851	P11717	P60604	Q8WYP5-2	Q9Y6D5	Q8NI27-1
Q9NZI7	Q9NUQ3-1	Q05209-1	A6NKG5	O60240	Q9H3H1
Q14498-1	O00193	Q13485	P46821	Q9H5N1	O95171-2
Q6FIFO	P42229	Q8N9N7	P07225	P11586	Q9H2M9
Q9POV3-1	P67809	Q16790	P36507	P30154	Q13546
Q9H9B4	Q96GS4	O00764-1	Q8NAT1	Q92805	Q8N4X5-4
O95563	A0A0J9YX35	Q15366-2	Q9GZU7-1	P01742	Q6IQ22
P02751-15	P02545	Q9BX59	Q9H9G7	O43815	Q9NVJ2
Q96LT4-1	P00915	Q15042-3	Q5T8P6	P62633-1	P16234-1
P35579-1	P02686-1	Q6PCB5-1	P08637	Q7L5N7	P26885
Q9UN36-6	Q8TB36	Q9Y6Y8	P05166-2	O15084-1	O00471
P83731	P61221	P07339	O75818-1	Q8TED0	Q9NZK5
Q9Y478	Q15365	Q9NZL9	O95551-2	P08476	P62861
P29144	Q15131-1	P01767	Q2NL82	P61026	Q8NAV1-1
P48735	Q9BV81	Q8N3U4-2	Q15118	Q9UBS4	Q03169
Q92667	Q9H8Y8-3	Q8N8A6	Q9UNH7-1	Q9H173	P55285-1
P06703	Q8NEJ9	Q9Y3I1	Q6ZS17-4	Q53SF7-1	Q9NX20
Q9BQC6	Q9Y2R9	O94804	Q9HB58-6	Q9BRT3	Q9NQG5
P62899-2	Q9HD89	Q9UBR2	Q9Y2R4	O15498	P30086
Q9Y6K0	Q9UBD5-2	A5D8V6	Q8WWM7-3	Q9Y4G6	O76041-2
Q14157-5	Q99549-2	P17812	Q9UNF1	P10644	Q68DK2
Q92859	O14949	Q9NTM9	O43765	P46977	O43692
P63027	Q13526	Q9NVD7	P01782	O15264	Q13231-1

Q9UPP1	Q9P032	Q96HW7	Q12959-2	O60234	O43639
P06753-2	Q9H267	P82970	Q9H078-1	O75381-1	P53618
O43169	Q15907	Q9BZL4	P25787	P53597	Q96B97-2
Q9NZJ9-1	P01040	O95050-1	P49841-2	Q96BX8	P61923
P10515	Q8WUUA4-1	Q96EK7	Q9BRJ6	Q5T280	A0A0C4DH38
Q12904-2	Q9H8L6	P62258-1	Q92522	Q9P0P8	P43007-1
O43242	P63208	Q8WWM9	Q7L2H7	Q0ZGT2-2	P30520
P33897	Q8TF66-2	P09132-1	Q9UBP0-1	Q9ULZ3	Q6EMK4
Q9UEW8	Q13247	Q16787-2	P30622-2	Q15080-1	Q01432-4
Q99836-6	Q9BTY2	Q9H4G0-1	Q01581	O43617-1	Q92759
Q9UFN0	Q9BRA2	Q6ZRV2	O75694	P21549	P12110-2
Q8N4Q1-2	O15523	P02144	O75394	P45974-1	O00411
P22033	Q9NR99	P48739-3	O75116	P57105	Q99828-2
Q5VW32	P0DOY2	P82930	Q8IXQ6-2	Q8N5C1	P17174
Q12912-1	P07766	Q9NUU7	Q15363	Q15750-1	Q9Y2G5
Q8IVF2-1	Q01518-1	Q9Y2K7	Q9Y617-1	Q13185	Q15102
O95479	Q6RW13	O95104	P61513	Q9UGI8	P07355-2
P04843	P23246-1	O95249-1	P26640	P56545-2	P55769
Q9P2D3-1	Q9H479	P36776	Q99747	Q15084-2	Q12857-3
P12883	O43776	P09651-1	Q9Y6X5	Q9C0J8	Q12965
P32243-2	P62760	Q07065	Q8NI60-1	Q9UIJ7-1	Q9NQX4
Q92747	Q9H4I3-1	P49959-3	Q9UJX3-1	Q12802-2	Q15257-1
P62256	Q9NPH2	P04040	Q9UBE0-1	P29728	Q6PD74
O75909-4	P15151-1	Q96NA2-1	Q96T58	P01614	Q13409-2
Q86U90	Q92841	O75575-1	Q96HC4	Q13423	Q14657
Q96P48-6	Q9Y6K9-2	Q14258	P62487	Q53EP0	P51688
Q9GZT8-1	Q9NRY4	P14384	O60518	O76071	Q9Y3X0
Q8NBJ7-1	O00151	Q63ZY3-2	P05186-1	Q96GX9-1	P07311
O94768	Q96F86	Q8WVQ1	P30043	O00330-1	O94808
Q96EK5	P23469	P56385	P38435-1	Q00577	Q32MZ4-4
Q9NR12-2	P05160	Q8TDD1-2	Q8TEQ8-1	Q9Y2S0-1	Q9Y2T7
Q9NZN5	Q14240-2	Q8IZQ1-1	Q8IZQ5	Q86SQ0-1	P68104
Q9NUQ9	Q9Y5L4	P35610	Q9ULX6	P31751	Q5VT66-2
Q16678	P06241-1	P36969	Q7L5L3-2	Q12979	Q96BM9
Q92901	Q9BSK2	Q15109-1	P55884-2	Q6IC98-1	Q9HBR0
P16112	Q8NBN7	Q9Y2R0	Q13151	Q05639	P52657
O15514	Q8ND04-2	A6NHX0	Q5T013	P83436	Q9UG63-2
O75792	P07741-1	Q8NDZ4	Q70CQ2	Q53T59	O75955
P04080	P10696	Q9H7C9-1	Q07157-2	Q9UI08-2	O95297-1
Q9UGT4	Q6N069	P60981-1	Q9H269	Q9HA77	P30825
O95817	O14966-1	E9PRG8	Q13405	P58546	P82921
P46459	Q9H2V7	Q29RF7-1	O43432-3	Q16363	O43293-1
P42858	P24752	P20645	Q8N1B4	P05534	Q6PJ77-1
O15247	P53396-1	P13591-2	Q96PD5-2	Q9NP55	O95983-1
Q8WWN8	Q9P015	Q8N5M4	P30405	P63104-1	Q7Z2K6
Q14008-3	Q96I99-1	O14684	O00743-3	Q96FV9-1	Q92995
Q9NZ43-1	P47736-4	P05387	P09668	Q6SJ93-1	O75352
P04433	Q96SB3	Q9Y2S2-1	Q9ULT8	P04632	Q14767
P98082	P46108-2	Q4V9L6	Q9NZB2-6	Q8N684-3	Q6IN85
P14866	Q9HAS0	P32929	Q9NTG7	Q13449	P51149
Q96HA8	O95208-1	P54727	Q00535	Q92538	Q14687
Q96QR8	Q709C8	Q9NPH3-5	P36959	Q9UBI9	O76003
P05154	Q07021	Q15293	P01033	Q9ULK4	O14639-5
P32320	Q15643	P15941-2	Q8NCN5	Q9UH17-1	P62081
P31937	Q9BRJ2	Q96A19	Q99996-6	P13929-1	P78324-2
Q96LD8	Q9H0F6-1	Q16799-1	Q9UNX4	Q14203-4	Q9Y512
Q99986	Q9NSK0-3	P27658	P12544-1	Q3MHD2-2	P24928
A8TX70-1	Q9Y2I1-1	O15116	Q7Z417	Q9UL54-1	O43704
P22897-1	P02730	Q9H299	Q93034	P24539	Q96GC9
P55011	P19784	O14979-2	Q96R05	P49441	P19623
O75923-13	Q14353-1	P50281	Q96PE3-1	P80188	Q9NRG9-1
O14874	Q16739	Q9UP83-2	P10109	P19823	Q8TDJ6-3
O75787	Q2PZI1-1	O43795-2	Q7L7X3	P35251-1	Q8WVJ2

Q9H7F0-1	Q14119	P20701-2	P61619	O14647	Q8WUY1
Q9NRG0	P17858-1	Q15493-1	P55145	Q16718	P20138-1
Q9POJ0	P28070	P61165	Q96BY6-1	Q96IW7	Q92572
Q6P6C2-1	O15455	Q14814-1	P06753-5	Q14914	Q9NRR3
Q8N386	O60762	Q8N6L1-2	Q9UGU0	P43304	Q9Y2Q3-1
P13693	P49674	P53680	Q9Y263	Q12929	Q9GZZ9-1
P01100	Q9BPZ7	Q9H2W6	Q5SZD4	P38606	Q96BI1
Q8N2S1-3	O94911-3	Q9BVA1	Q5T6X4	O95248-4	O60885-1
Q16134	Q96CD2-1	Q86U38	Q13637	P28838	P19174-2
P22314	Q02127	P62879	Q5MNZ6	P53365	Q969H8
P06576	P13073	P46779-3	Q9HBH5	Q2TAA2	Q08945
P27918	Q14160-3	O43447	P16333-1	Q92621	P29692-2
P25705-1	O95498-1	P30838	O95470	O60635	Q9H773
P35625	Q9NZZ3	Q16666-1	Q9Y618-1	Q8N1F8	P24593
Q16619	Q2TAL8	Q96PL5	P46109	P51532-1	A1L0T0
A6NDU8	Q8IVL6-1	O94929-1	Q9H5V9-1	Q9NY12-1	P05155-3
Q9UHB6	Q9H7B4-1	P35658-3	Q9GZS1-1	Q8WW12	P51151
Q93052	Q6PI73	P18084	Q9UHI6	Q9H910-3	Q8TC12
Q13488	Q13308-6	O60287	P16949-2	Q15631-1	Q9NUQ8
P30461	O75881	P46063	Q14728	O75112-7	Q9NZD4
Q5VZF2-1	Q86WJ1-1	Q9Y5S2	Q9Y3R5-1	P26373-1	Q8NE86
O94923	Q9Y4F1	Q5VU43-4	P62328	Q9UJC3	Q8N3R9-1
P40818	P43234	P28906-2	Q15063-5	P21757	P07948-2
P68431	Q13361	P02748	Q9BSF4	P08133-1	Q8NCW5
P0DP01	Q969G5	Q3T906	P55290-4	Q8NBU5	Q9NZJ7
P78381-4	Q8WWI5	Q9C075	P55056	O95155-4	Q6NXT2
Q9H814	Q07507	Q9NVH2	Q14764	P15428-1	P22352
O14730	P35573-1	Q9Y385	Q9NY33	Q9NXS2	Q53GG5-2
O75995	Q15637-5	Q9H553-1	Q9GZR7	Q6ZNA5-2	P00492
P10643	Q9HCE6	Q9Y4K3	O15160	Q15063-1	Q14699
Q13206	Q9UNK0	Q96PC5	Q10588	Q9BRP4	Q9BYG3
O60506-3	Q14558-2	Q9UIQ6-1	Q8NB78-1	Q14257-2	Q12805
Q9BV36-3	O43708	Q8IWA5	Q96A00	O60462-1	P07148
Q5TEJ8	Q9NQC3-5	P78332	Q9ULP9	Q7L5Y9-1	Q9HCC0-1
Q9UG56-3	Q92743	Q86VI3	P31327-3	P27695	P43250-2
P16402	P46778	O15144	P49589-3	Q12769	P07195
Q9GZY8-1	Q9NPL8	Q9BU89	P46783	O00462	Q9NWB6
P27487	Q2M1Z3	P14854	Q0ZGT2-4	P23497	Q00839
P20226-1	Q69YN2-1	P04181-1	Q96G25-2	P49447	P98171-2
O95159	P62937	A1KXE4	O75553	Q8N2K0-2	P50748
P22681	O95760-1	Q8NCE2-1	Q8TE57-1	P80511	Q9NP80-1
P19793	P22061-2	Q969Z3-1	Q7Z3E5	P05106	P36268-3
O43920	Q8NI22	P08579	Q99735	P80303	P25788-1
O60687	P36639	P47224	Q15746-1	Q96S66	P48163
Q9NW13-1	P35268	O75935	Q7RTV0	O15530-1	Q13158
P0DOX4	Q5C9Z4	Q8TE77	Q99436	Q9BUH6	Q8NBJ4
Q96L92	Q86VS8	P12109	P07858	Q99590-1	Q01484
Q4L180	Q9NV70-1	Q9Y2Y0	Q86V48-1	Q9NYB9	Q86VX2-1
Q96HE7	P52597	O95429	P01763	P34810	P23946
A6NHR9-1	P29400-2	Q93099	Q8WUA2	O96009	Q9BX97
P02679	P53992	P55001	P53990-5	Q719H9	Q27J81
P15848	P50542-4	P31997	Q92947-1	Q9BVC4	P16671
Q9UQB8	P48595	P62857	O95361-1	Q12996-1	Q9NXG2
P12081	Q96QR1	O75173-2	Q9NVH6-8	Q9NR28-1	Q8IV08
Q96EK6	P25090	Q7Z3E2	Q86YB7-1	P35247	Q96AY3
Q8N766-1	Q14004-1	Q9Y6F6-7	Q15050	Q9NRP0-2	Q9NTI5
Q7LDG7-2	O94901-9	P49354	Q9BZG1	P54687-5	P50583
P30626-1	P41240	Q6GTX8	P51649-2	Q9P1F3	Q92499
Q7Z3T8	A6NIH7	O00170	Q92766-2	O43847-2	Q8IYM9-1
Q96DE0	Q96AP7	P30481	O95400	Q9H1E3	P05771-2
Q6P1N0	Q96KN1	P61960	P27708	Q6P589	P53999
P62736	P35269	Q8NHP8	O95486-1	O00501	Q9H063
O00329	Q5TAQ9-1	Q15555	P28288	Q9UHL4	Q14966-1

Q02218	Q05397-5	P27797	P49591	Q15047	P32322-3
A0MZ66-3	Q53FT3	Q92889	Q14247-1	Q9H4L7-2	Q9GZT4
Q9HCUS	Q9Y262	Q9UKY0	Q43852-4	Q8ND24	Q04323-1
P14635	O15397-1	P0C2W1	Q9NXA8-1	O43422-1	P08174-2
P00748	Q6YN16	Q6PK04	P19971	Q9BZE9-2	P35754
Q14108-1	P78347	A0A0B4J1V6	Q9H6E4	P40306	P20338
O60603	O60437	Q16864-2	P55083-2	Q9Y4I1-3	Q96BR5
O60869-1	Q6Y288	Q9NZH0-2	Q9BXI6-2	O15438-4	P18440
Q8IZ52	Q08043	Q92783	Q9NQ29	Q15642	Q9UJ72
Q9Y4D7-1	Q9BRQ8-1	Q8TED1	O14734	Q86VY4	P14902
P06310	P49754	Q16822-1	Q9UBS0	Q9H4E7	P62847-4
P31689-1	P82987-1	Q9B5D7	Q13200	Q12756-2	P07358
P54802	P26006-1	P19404	Q96SM3	P39023	Q13835
Q9Y2X0-1	Q02318	Q9BVC6	Q8N3Y7-1	Q92733	P60468
O95070	Q9H074	Q96NT0	Q8ND56	Q9P2T1-2	A0FGR8-6
Q9NYH9	O75420	P32418	O75592-1	Q9NV11-3	Q5TA45-5
Q9H7B2	P62310	Q9BQG0-2	Q6DKI1	P69905	O60506
O94913	Q9UBW7	P55327-4	Q86XP3-1	Q5HYK3-1	P09874
Q99714-1	P12956	P20340-1	Q9UMD9-1	Q7Z2W9	Q8IY81
P24347	Q49A26-1	Q15029	Q2KJY2-1	Q06278	Q5T5C0-1
Q13136	Q14761	P17026	Q969X0	Q96F24-1	Q7Z3J2-1
O95425-4	Q9NS00-1	Q9NRY5	O43665-3	Q16836-1	Q9NQS3-1
P20774	Q13822-2	Q9NVS2-2	O95428	P09497-2	Q96DA6
Q10469	P08243-1	Q9TQE0	Q96QU8	Q9H1C4	Q96A26
Q9UL03	Q9Y6I9	Q9NR12-1	P43353-1	Q9H9Y6-3	Q5JUR7
O95825-1	Q9Y2Z0-1	Q9UI09	Q9HC35	Q96D71	P10619
Q96H79	Q5Y7A7	Q5JTV8-3	P61081	P08263	P40425
O95236-1	A0A0J9VYV3	Q8NDA8-1	O94979-8	Q00341-1	Q8TEQ6
O75569-1	Q8IW45	P78344-1	O15121	Q15366-3	Q59H18-1
P28702-3	Q8N3X1-2	Q9UEY8-1	O15230	Q8TAQ2	O00299
Q8N2H4	P62910	M5A8F1	Q06265-2	Q2M2I8-1	Q96I59
Q8WWA0	Q8N5M1	Q9Y485	P78346-2	A8K0Z3	Q9NYL9
P10415-1	P55259-1	P22087	Q92844	Q8TDH9	P18859-2
Q9NX46	P36871-1	Q13505-1	Q9H0C8	P36954	Q5VV41-1
Q8WUD4	O95218-1	Q8IVN8	P11277	Q15648	P83916
P53384	O95999	Q99497	Q16610-4	P50991	P49736
Q08623-4	Q8IVB4	P17900	P17010-3	Q9H0A8-1	O15127
Q5VZ89-7	Q16769	Q9Y4W2	P36405	P19367-1	Q8IZ69
P08123	P61626	P29590-11	O75179-1	Q9Y224	Q9BT25
Q13569	Q13501-1	P07951-2	Q96DU7	Q14974	O95140
Q3MJ16-3	Q6P4A8	Q99959-2	Q5JSL3	Q5T3I0-3	Q9Y2D4
O75367-1	P49961-6	O43347	Q96HQ2-1	Q16512-2	Q9Y3B2
P78310-1	Q9UJA5-1	Q14315	Q969E2-1	Q02083	P28330
Q567U6	P09417	P62249	Q9NZD2	O75165	O14908-1
Q9C0C9	Q9NPA0	Q96JB3-1	Q96DH6-1	Q6UW02	P43362
Q9UKF6	P49795	Q7Z422	P33176	P12110	O14791-2
O75022-2	Q9H772	Q9H8H3	Q9NXH9-1	P08581-2	P16284
Q6NXT4-2	Q14194-2	O14776-1	O14662-1	O60449-2	Q05682-1
Q9H4A6	Q9BQC3	P09917	P62318	Q9UGM3-9	Q96B26
Q9NP92	O95433	P46019	P42768	P39880-3	P26447
Q13555-6	Q9NZT1	Q9UBB9-1	Q15418-2	P82675	Q9NZQ3-1
P17931	Q8IYB8	P0DOX8	Q6ZUM4-1	Q15542	O14980
Q99470	Q9UJ70-2	P22492	O75521	Q9NYY8	P02746
Q5VWJ9	Q02241-1	Q12907	Q8N5I4	P33240	Q99797
P48651	O75396	P35612-1	Q8N163-1	Q6PL18-1	P52566
Q9UKK9	Q13162	O43681	Q6DKJ4	Q9P2P1	P16144-3
P13861	Q8TE68-1	Q8NEC7-1	Q96T23	P20036	Q969E4
O75718	Q8N3V7-2	P15498-1	P29083	Q9BY43-2	Q53H82
Q5M775-1	Q5VV42	Q6UXI9-3	Q96RL1	P39687	Q96BJ3-1
P17029	Q9POV9-2	O75368	Q14676	Q96T51	P48634-1
Q9NXW9-1	P35611-3	Q9Y4C8	Q86X29	P11172	Q9Y274-1
P42785-1	Q02153	Q9HAV7	P0DOX5	Q9UP38	Q00534
Q7LGA3-1	P15559-1	Q9Y5K6	Q08209-1	O75882-1	O95782

Q09161	P79483	Q9NUK0	Q9BQ48	O95747	Q86UW6
Q8NEZ5-1	P08519	Q8IXM2-3	Q86V88	P18887	P30048
Q9H9J2	P01743	P22307-1	Q00722	Q13630	Q96ED9-1
Q9H0H0	Q01664	Q93050-3	Q8NFF5	Q9NR50-1	Q04206
Q6ZXV5	P01042-2	P55081	Q15629	P55058	P51659-1
Q9Y3P9	P13727	Q99447-3	P00742	P56747	Q13093
Q16831	P14859-6	O75340	P10253	Q04837	Q330K2-1
Q8IXU6-1	P30042-1	Q49AR2-1	Q9Y5Y2	Q14435	Q29974
P82663	Q03252	Q9GZY0	Q9UPN6-2	Q9H0A0	A0A0J9YXX1
Q96Q15-1	Q6PJ69	Q9HB63-1	Q9Y3A3	P29373	Q4V328
Q9UI14	Q9H0E2	P23229-1	Q01433-1	P12236	P02545-2
Q99788-1	Q96AA3	P20742	P80748	P35998	Q9UHR4
P04275	O94905-1	O95219	Q15437	Q8IZP0	Q13825
Q86V81	P07988	O94888	P51690	Q8IXM6-1	P10451-1
P09669	Q5R3K3	P06737-1	P39019	P61601	P20073-1
P0DMV8	Q9H488-1	Q07817-1	Q8IX04	O75940	Q86X83
P16070	Q9Y6C2	Q96GD0	P09958	Q9Y3Z3	Q7L4I2-1
Q13976	Q96LD4	Q9UUMS0	Q9NTK5-1	P0DMM9	P00558
Q9BQS8-4	O60711-2	O75880	Q5U5X0	Q9H4X1	Q9HB90
O75821	Q9BY50	Q9Y342	P25940	P13674-1	Q96AQ6
Q9H6T0	P57737-3	P15735-1	Q10471	P00390	P40429
Q4G0I0	Q9H239	Q0VGL1	P29508	Q9UMS6-2	O76021
Q8WXH0-2	Q9Y2Q0	Q8WV74	Q9Y6M4-4	Q5T1C6	Q9NVR2
Q9H6Z4	A9UHW6-3	O60884	Q9Y2S7	O15118	Q04446
O15382	Q8TF42	P37837	P35908	Q6UW68	P13611
Q9H061-1	P00156	Q5R3I4	Q9UJW0-3	P62891	P49321-3
Q9H2P9-5	Q99542	P49840	Q9NUN5-1	O14562	P49721
A1X283	Q96RU3-1	Q9C035	O95544-2	Q16891-2	Q9NXU5
Q08752	P84090	Q92539	Q8N884	Q9BRZ2-1	O75506
Q9Y6A4	Q9BUL8	Q96BY9	Q96MW1	Q8IWA4-1	O94760-1
Q9BTU6	Q8ND71	Q16539	Q9UH65	O60486	P50990
Q9UDW1	Q9HCG8	Q15654-1	P36542-2	P32019-1	P31943
O94875-11	P05198	P09758	O43719	P09486	P21796
P13498	O00585	P05161	Q9Y4U1	P08575-1	P47756-2
Q92990	Q8IWB7	Q3KQZ1-1	Q9C0I1	Q05086	P05114
Q8IWW6-1	Q9BQS7-3	Q9H936	P53367	Q7Z2T5-1	P42704
Q9NWW5	P07737	O15143	Q5R372-3	O60784	Q9UQ35
Q6PIU2	Q9HB71	Q96PU4-1	Q9HBH0	Q7L5N1	Q6P1M0
P27105	P51606-1	Q9BZ67	Q96K17-1	Q15393-1	Q9UQR0
Q9UBV2	P41236	Q14692	P49720	P41227-1	P11532-1
P78316	Q9NRG7-2	Q96KC2	O76076	O00533-2	P09104
Q9BTZ2	P40261	P10321	Q9NVP1	P26583	P49189
Q7Z460-3	P13716-1	P48436	Q96N66-1	P57081-1	Q93074-2
Q12830-1	Q96KA5-1	O95163	Q9UNF0	Q8WUF5	Q9UIG0
O14519	P49914	P37840-1	Q9NP74-1	Q6UX53	Q99584
Q14894	P41214	Q8IXJ6	Q6ZUJ8	Q15836	Q8WUH1-2
Q6P5R6	Q9P258	P09661	Q8IU85-1	Q68DH5	P46199
Q9HBL0-2	Q96DG6	Q9H7E9-1	Q99731	Q15046-2	P55265-4
O43491-1	P27694	O43829	Q99848	Q96KN2	P56589
P05164-3	Q96EE3-1	P31350-2	O15381-1	P21964-1	Q8TD19
Q9HC07	P16615	O75448	Q96G03	Q96544	Q6KB66
Q15833-3	O15204-1	Q7LBC6-1	P31995	Q9Y624	P47897
P04083	P52735	Q8IUX4-1	Q05655-2	Q5TH69	Q09666-1
Q96FS4	P98175-1	Q14847	Q9P265	P01861	Q9NQZ5
Q9H425	Q8WWY3	Q9NVC6	P21399	A5PLL7	O14593
P51858	P62424	P16035	Q92820	Q8NHP6-1	Q09472
P43490	O94826	O76054	Q8N3D4	Q9Y653	Q9BYD2
P23634-1	Q86WV6	O96000	Q13451-1	Q9BRR9-2	P01023
Q9BSH4	P07099	Q9GZT6	Q9HBI0-1	L0R6Q1	Q9UIL1-1
P04179	A6NDG6	P14317	Q15424-3	P23141-2	Q9UNS2
Q969X5	P98175-3	Q9NY15-1	Q6P3W7	Q13636	Q9UEW3
Q9Y3C6	Q12789-2	A0A075B6J9	O43865	Q5T5P2-1	Q96555-1
Q9NRX4	P45973	P50453	Q9UBB6-3	P49792	P34932

P51808	P15291	Q96PZ0	Q9H9Q2	Q5TDH0-3	P13807
Q9NQ50	Q9Y3A5	P09211	Q96T88-2	Q9Y3E1	P32969
P18621-3	Q9BXJ0	Q9P2X0-2	Q9NY93	Q95IE3	P06681-1
Q12913-1	O14732-1	Q9UP95-7	P21281	P04003	Q9NZC4-3
P43251-2	O60216	Q9H2K8	Q92629-2	P01730	P23142-4
Q9HDC9	P02654	P17844	Q4G0N4	Q96D15	Q8NBN3-1
Q15139	Q9BRJ7-1	P35555	P08567	Q02880	O95396
Q08379	P24158	P19652	P82650	P60033	O60749
Q9Y5U9	O94973	Q96EP0-1	Q9NX58	Q86VM9	Q14376
Q13144	Q6UX07	P30495	Q8WZA9	Q9H1B7	P34096
P20061	Q96GQ5-1	Q16875-4	P16989-1	O00762	A0A0C4DH34
O75781	Q86UX2-1	Q96FZ2	P63010-2	P52565-1	P24390
Q07955-1	P49773	O75436-1	Q9Y2L1-1	Q15063-7	P09913
P49748-3	Q8N0Z6	P18124	P0C0S5	Q460N5	P17096-1
P46781	P61353	Q92896-2	P48723	Q9H3N1	Q14566
P46782	Q9UGP8	Q8IY17-4	O75367-2	Q9BYD3	P60953
P68400	Q9UL25	Q9UKI9-2	Q9H000	P16870	O15211
P29590	P62877	P42166	Q92520	O60344-4	P0CG39
P23142	P05091	Q9Y697	Q9BWH2	Q8WU79-1	P01903
Q06210-1	Q9Y320	Q9Y4K0	O94829	P56192	Q9Y3B6
P03956	O95210	Q14186	Q8NBX0	Q969T9	Q99719-1
P49593	P31323	Q9UBN7-1	P15170-3	P31946	Q07020
P46439	Q8NDH3	Q9HBF4-1	Q9GZQ3	P24941-1	P30153
P51531	Q9UFC0	Q9Y2Z9-3	Q9Y3Q0	Q96ST3	Q96AQ8-1
P11177	Q9UIV1-1	O95182	P28290	P52569-3	P56937-1
Q9NVM6	Q9NZM3	Q9H6T3	Q12792-3	P04004	O43172-1
P07902	P19838-2	Q8IVI9-4	Q04637-9	Q9NPJ8-3	P13598
Q13492-1	P55210-3	P36269-3	P67775	P22413	Q9H0L4
P55084	Q13724-1	Q8NI35-5	Q9NXH8	P07585	Q8WVM7
Q96H20-1	Q9GZP8-1	Q99541	Q16581	Q9UMX0-1	P06702
Q6XE24	Q15438-1	O43396	O75131	P23381	O60613-1
O60888-2	Q96RD7-1	Q00872-6	Q96PU8	Q15043	P46736
Q9BV44	O60547-1	O14653-2	Q9H4G4	P17213	P49913
Q9NUP9	Q6NZ67	P08574	Q9BYK8-1	Q13438-1	Q13496
O43924	Q9BR76	A0A0A0MS15	P09601	Q8NBL1	Q14938-4
P56181-2	P62495	Q14155	P17301	P17081	Q9Y2H6
Q8N6H7	Q13469	Q04941-1	P36222	A0A0B4J1V2	Q7Z739
Q86Y56	Q9NRG1	Q9HCS7	P48960-1	O15427	P06396
Q8N6R0-5	Q9UNL2-2	P16109	P01602	P0DOX6	Q9BQ61
P07451	Q8IWT0	P04216	Q9NQ79	O43278	Q71U36
Q92769	P68036-3	Q9H6X2	Q9UHY7	P43358	Q92613
Q96ST2	P08134	Q13895	Q9NV96	Q5VTL8	Q6P996-1
Q96PE7	Q9NYL2-2	P01011-1	Q9P107	Q9H832	Q13671
Q9NQX3-2	Q01955-1	Q8N5Y8-3	Q9H8H2	Q14165	Q14149
Q9NQ55-3	P12277	P15144	Q92879	Q9BV73-1	P25774-1
Q07960	Q687X5	Q9UK22	P25815	A1IGU5	P46013
P63313	Q9Y2V7-1	P30566	O75044	P55072	Q14005-1
Q9Y2D0	P54136-1	Q01081	Q7L5D6	Q01105	Q6P1R4
Q9HBL0	Q96SU4-6	Q96JJ3	Q99856	Q8WXI9	Q99943
P06756	Q9GZN8-2	P54753	Q8N128-2	P62714	Q96C90
P08582-1	Q9BTL3	Q96HS1-1	Q96C23	P17948-1	O60487
O14979-1	P15502-9	Q9HD42-1	O94874-1	O00483	Q92959
Q2TB90-1	Q13619-1	Q9BX68	Q9UKR5	O75110	Q8TD55
P50479-1	P60510	Q9BRX2	Q9NZW5	P50914	Q05193-1
Q16740	Q07666	O60502	Q8N2F6-1	Q9NR45	O95183
P23378	Q6NVY1	O95602	O60573	Q70IA6-3	Q8N4F0
Q13617-2	P01906	Q15645	P49327	P19320-1	P30533
P08603-1	O00499	P52272	Q10589	Q9BPY3	Q4G176
O14602	P37108	Q16850-1	P62906	Q16658	Q9ULD2-1
P39900	Q96BY7	Q9Y520-7	Q9NR31	O95793	P25311
Q96SI9	Q8TEM1-1	P62750	P39656	Q9H008-1	Q5VYY1
O60921	Q9BU61-1	Q9UPN7	P06132	P21675-4	Q9UBX1
Q9BV86-1	Q6IA69	P11137	A0AV96	P09012	P15311

P48637	Q15018	Q9BX66-1	O94875-10	Q03701	Q9Y2W1
Q9H118-1	Q9UIA9	P55287-1	Q8NE62	O00443	Q9HD34
P31930	Q5T1M5	Q6UWP7-1	P50750-2	Q9Y3Q8	O00292-1
Q8IYS2-2	Q9NQZ2	Q96P70	Q99615-1	Q9UL26	O00231
P12004	P27361-1	Q99707	Q03154-1	Q5T440	Q01459
Q9BWU0	Q6DD87	Q05519	Q95604	Q14195-2	Q12797
Q9H6B4	P84157-1	Q15021	P01876	P08670	P09543-1
Q7Z4G1-2	P00395	Q9NYV4-1	P36404	P09382	P28845
O60826	P25325-2	Q9BT40	Q8WUM0	A0A0C4DH29	P45381
Q5KU26	A1L020	Q96IJ6-2	Q99523	Q9H6R4-1	Q9HAT2
Q5JTB6	P07919	Q99733-2	Q8WVC0-1	Q9BW27	Q8WTS6
Q9Y2Q5	Q96BD5-3	O75962-1	Q13283	P48061-4	O95497
P62633-4	P08651-2	P20292	Q6NUM9-1	P60866-2	Q8IXH7
Q99627-1	Q5VYK3	O75251	Q13509	P01891	P49366-1
P21953	O43768-4	Q9H583	Q9BSC4-1	Q5JSH3	P51784
Q8WWB7	Q8WUJ3-1	Q8TAG9	O94985-1	Q9UJV9	O60725
P06899	Q9BUK6	Q9Y3Y2-3	Q00169	P31947-1	Q9BT73
P57076	Q9Y4H4	P24666-2	Q9Y446-2	Q16531	P35869
Q6UX04	Q9UP52	P07954	P63000-2	Q14156-1	P11142-1
P62140	P62888	Q9NYP7-2	Q7LG56-6	O43310-2	P49908
P35520-2	Q9Y6A5	O43809	Q92576-1	Q9NYP9-1	P15814
Q9GZU2	Q8NBJ5	Q9P2R7	P98088	P98196	Q14202
Q9H4A4	Q9Y6R0	P36382	O15145	Q8N4T8	Q9HAV4
Q9UFW8	Q86YV9	O95466-2	Q92542-1	Q9NW64-1	Q92552-2
Q06033-1	Q9NPQ8-4	Q15075	Q01844-5	P18206	Q14204
P02763	Q9H6V9-2	P61019-1	Q14789-2	Q8TAX9-4	Q9UBI6
P63098	P53609	Q9UKM7	Q96FN4	Q9NUJ3	P49411
P13686	P50452	Q86X10-1	Q9UHR5-1	Q1ED39	Q5EB52-1
Q9NUT2-1	Q8WUW1-2	Q9NWT1	Q9Y508-1	P27144	P49746
P50120	Q9BZH6	Q6UXG2-1	Q7Z392	P51687	Q9NZ32
O43490-1	Q9ULE0	Q13084	Q13217	Q96EY1-1	P21291
O15126-1	P62805	P13797	P98172	P63220	Q96L91
P14868	P31942	Q4KMQ2-2	Q9Y2H1	Q92575	P49419
P24666-1	Q5RI15-2	Q96EI5-2	P05413	Q13885	P16435
P41212	Q6P1A2	Q07973-1	O60830-2	Q9NUI1	Q8ND76
P13928	P14091	P30480	Q86Y39-1	P02768-1	Q9Y487
Q96HR8	P02751-5	Q92508	Q8IX01-1	Q96TC7	Q9Y4W6
O75462	P51572-2	Q9NQT8	Q9H3K6-1	Q13315	Q9BUA3
Q15154-1	O15372	O43143	P06729	Q7Z4H8	Q8N511
Q6UXV4	Q9H098-2	Q9UDY4	O95967	Q8NE71-1	P52564-1
Q9UBY9-2	Q00059	Q99983	P04792	P35270	P43155
Q53FV1	P56856-1	Q93008-3	P98095-2	Q16775-1	O75027-2
P0DOX7	Q9NY65	Q9UMX5	P11498	Q96P16-1	Q9C002
Q66K14-1	P51153	Q969Z0-1	Q9Y5M8	P52435	P16401
Q08AI8	P49747	Q9UBM7	P51610-1	Q9H7D0-1	Q14145
O60231	Q8TB96	Q04695	Q9BXW7	P27169	Q9UK59
Q9BS26	Q9H7D7	P07093-1	Q9NSD9	Q9HAB8-1	Q5JWF2-1
P15692-14	O75531	Q7Z4V5	O60343-1	Q6ZMI0-1	P04233-1
O43236-4	Q8N3P4-1	P10809	Q8WWI1-3	A6NMZ7-1	Q9Y5L0-2
O15269	P23470	Q3ZCQ8-2	Q9HAU0-6	A6NHL2-1	O43556-4
P01599	P30101	Q9NRW7	P49770	Q15149-4	P10768
O60493-1	Q13155	Q7Z7E8-1	Q9BQ69	P15408-1	Q68D91-1
Q92625	Q9NPR2-1	P15309-2	Q9BW61	Q7KZ85	Q96SL4
Q9NPA8-1	P01019	Q6RFH5-1	Q6P3X3	Q13347	P49863
P54577	P04839	O14646	Q86U44	Q96RQ9-2	Q9Y240
Q969V3	Q96B97-1	Q8WUP2-2	Q86T13	P55196-5	Q8WXF1
P45880-1	P00338-3	Q9BRG1	Q9UKW4-4	Q9Y6N5	Q9NP66
Q9Y277	O94776	Q6P161	Q8NBM8	P01732-3	Q9ULC5-3
Q14320	Q6IAA8	P06733-1	Q7Z7K6-3	O00534	P24821
Q96JY6-5	Q68CQ4	Q9H1Y0-1	Q14739	Q8TED9	Q6ZSR9
Q99700-1	Q96FW1	Q96FV2	Q6ZS81-1	Q9BVM4	P29536-1
P49768-1	Q9BV38	Q9P2N5	Q7L0Y3	Q9NVG8	Q9NTJ3-1
O95684	P56181	P38646	O43390-1	P16220-1	Q9ULC4-1

Q9H1A4	P04818	Q13641	Q9NQ66-1	O75348	O43399-7
Q5NDL2	Q9NZA1-1	Q5TFE4	O95861-1	Q96MW5	Q9Y2R5
Q8IX18	O75438-2	Q9BTC8	P01859	O75487	Q7L3B6
P01601	Q9UER7-1	Q13951-2	Q9Y4L1	Q2M389	P63316
Q96Q06-2	Q9Y6K1	Q9BW72	O43760-2	Q96AX1	P00450
Q14802-3	Q9BT78	O75494-1	O43915	P00325	P00367
Q96P11-4	Q68CP9-1	Q9UL46	Q9UJ83	O95994	Q9H788
P00491	P12429	Q5K651	Q9NUG6	P52298-1	Q15796-1
P25490	Q6NUK1	P35250-1	P55036-1	O15260-1	Q13428-4
P11171-2	Q99598	Q92696	Q96GC5-1	P27449	Q9UMY4-1
Q15390	Q9C005	O14975	Q8IWX8	Q5JTJ3-2	P04440
Q5JRK9	P24534	Q9NWU5	Q14653	Q9UDX5	Q15813-2
O60504-1	Q9BVJ7	Q9UGP4	Q9P0L2-1	P42892	P54886
Q6NUQ4	P42696	A0A0C4DH68	P50995	Q99543-1	Q14116
P50148	Q16719	Q9H1P3-1	Q9NZD8	P35749-4	P60059
Q7L576-1	P08571	P31146	Q9Y2J8	Q96EL2	P78325-1
Q9UDR5	Q9H446	P52630-3	Q04760-1	Q53GS9	P05386
Q6PD62	P08397-1	P41222	O94973-2	P63165-1	O43427
P00746	O14818-1	Q14520-1	Q16881-1	Q9H9L3	Q9BVI4
P01034	P60660-2	Q86X76	Q5SW79-1	O75976	Q8NFU3-4
Q9Y6Y0	P25440-2	P30038	P57772	P19387	P0CG08
Q15773	O15117-3	P00813	Q8TF68-1	Q9NUL3	Q8TCS8
P15121	Q14BN4	Q8NDI1	P57088	P53801	Q9HB40
Q96MF7	P38432	Q6P2Q9	O00562	Q9NWW4	Q9NS15-1
Q16186	P14060	Q13616	O60218	Q9UKG1	Q7Z3B4
P23526-1	P35219	Q7Z304-1	O75822	Q8TBQ9	P17987
Q9UPU7-1	P56211	O75907	P28072	Q9UJX4	P36578
P82909	Q9Y282-3	P42331-4	O14832	Q99832	Q96EY5-1
Q9Y6A9	Q9BRK5-1	Q92506	O43399-3	Q9NPE3	A0A0C4DH24
A0AVT1-1	Q9Y376	Q8N1I0	Q96HV5	P02042	P04264
P40305	O95453	P49916-1	Q9H4L5	P49257	Q13416
P62993	Q13177	P16083	P08842	Q9UKV3-1	P62979
Q92804-1	P82933	O00461	Q92692-1	Q9NQE9	P03886
Q96M96-1	Q00765	Q99715-1	Q9Y4Y9	Q92614-1	Q9UI12-1
Q13838-2	Q8TB03	P49643-1	O75356	Q9BT22	P35249
O75015	O95394-4	Q92466	O76062	Q9UID3-1	P78362-2
P62854	Q9NV59	Q8TF05	Q92673	Q06187-2	P49757
O75143-5	Q14978-3	Q02790	Q8TCJ2	P43121	Q9BYT8
O95822	Q96A49	Q12884-1	Q9NVI7-2	Q96EL3	P62269
P78345	P04217-2	Q00403	P52895	Q4ZHG4-1	Q5BKU9
Q6NXT6	O75191	P16150	Q9UHF1	Q8TAA9	P29466-1
P03952	A2RTX5	O00567	P62491-1	Q08188	P60484-2
O75594	P05067-1	Q92685-1	Q9BY77	Q9Y6M1	P08047
Q9P2B2	A6NC98	Q02108	P50895	Q53FZ2-1	Q86UE4
O75366-1	Q5JVF3-4	Q9NVV0	O00429-6	Q8WUB8	P19878
Q12788	B0I1T2-1	Q8WXX5	P41743	Q16576-1	Q99538
Q9NP97	Q96FX7	Q96TA1	P09972	P51991-1	Q9Y2U8
Q96RQ3	P00918	Q6GQQ9-1	Q02252	Q12923-4	Q9UPQ0-1
P48729-1	Q9NQ74	Q865F2	Q9BRT9	Q99519	Q5BKZ1
Q9NZN3	P33121	Q9H2I8	P12931-2	Q9Y6D9	P27338
O75794	Q6UWE0	Q9BYD1	Q13576-1	Q96DZ1	Q9BY32-1
P0CG29	Q9UBK9-2	P30711	Q02338	P55899	P55087
P05362	Q7KZF4	O94919	O15374	Q92982	P84077
Q9BW04	P41250	Q00610-1	Q9UKL0	O43570	Q86UU1-1
Q9Y2W2	Q8IV53-1	P61586	O60610-1	Q9UN86-2	O00142-6
Q68EM7	Q16774-2	Q71DI3	Q9Y6E2	Q9H223	Q9UBQ5
Q9HAU5	Q13868	Q96BZ9-3	Q9HCN8	P56693	P12107-2
Q03001-7	P61970	Q15057	Q9ULJ6-1	Q15067	Q8TD16-2
P13639	P02652	P06748	P08727	Q96ME7	P01024
O95671-1	O95562	Q9Y4X5	P04899-1	Q9Y5S1	Q8WU76-1
Q92485-1	O75886	P0COL4-1	Q13884	Q9UM07	Q9NW82
P29972-1	P11836	Q9UKN8	Q0VDF9	P14406	Q8NEY4-1
Q9Y6U3	P14314	Q9NU22	Q9Y625	Q12981-1	O75264

Q7L1Q6-3	P14324	O60496	P25391	O14974	Q8N139
Q96559-1	Q14997	O94915-1	Q86UW9	Q9Y230	Q04917
O43395	Q9P299	P48047	P42126	P61201-1	Q01518-2
Q8IWU6	Q6NXR4	O95379-4	O14618	Q9Y2Z4	P50749
Q96RQ1	O43149	Q5VSL9-1	O43175	Q9BXX5-1	Q5JRA6-1
P19388	Q6DD88	Q96AT9	P13796	Q5EBL4-1	P09884
P61225	O14972	Q6P2E9-1	Q99487	P07204	P13761
Q13976-2	P50579	Q6PML9	P42575-1	P09914	Q8NHG8
P54289	O75152	Q14344	P07942	Q99766-1	Q15369-1
Q8N699	O15013	Q15149-3	O94966-5	P46100	P98170
P12694	P08195-4	P30740	O14757	P17980	P30047
O60684	P61764-2	Q9BXS5-2	Q9Y286	Q9UJX2-1	P57764
P36542-1	Q9H6K4	P62834	Q7Z434	P04908	P04921-1
O43508-2	P63244	O95373	Q5VT52	Q8NBM4-1	P36543
Q14289-2	Q8WWP7	O60934	Q9P0M6	P41208	Q13362-5
Q6ZNL6-1	Q8N8S7	Q06124	Q13303-1	Q03519-1	P20339
P19338	Q03591	O00442-2	Q9NUB1	Q8N6M0	O43567
P09429	P08631-1	O95319-3	P11802	Q13753-1	P06280
Q9ULE6	O15394	P02792	O43301	P18669	P09525
Q9UGM5-1	A0A0B4J1Y8	O14981	Q9NP72	P13667	Q9NRF8
Q9HD45	Q9BPZ3	Q6ZVM7	Q9H270	Q9H410	P53634-1
P11117	Q9Y3C4	Q6UVK1	Q9Y4P3	O15347	O75323-1
P55809	O14672	Q9BSH5	P61964	Q3LXA3	O95989
P07686	Q8IUF8	Q7Z6M1-1	P35221	P26572	Q9UNN5-1
Q7Z6I6-1	Q96K21	Q9NTZ6	P62314	Q71UM5	Q13033
Q9NVP2	Q9Y3D9	P02647	Q9NY47-5	Q8N4A0	Q8IUR0
Q96K19	Q96C57	P41252	Q9C040-2	P26440	Q9P2W9
Q8NDX1	Q15126	P52594-4	Q86Y82	Q7Z7G0	Q8N1G0
Q08378	P13224-2	Q6L8Q7-1	P34947	Q5VWZ2	O60829
Q8N3C0	Q99624	Q969Q5	Q9HD15	Q9H0U3	Q8N3E9
O95630	Q6P179	P61020	P06493	Q9HCB6	P14618-2
P16152	Q9BRK3-2	Q9Y679-1	Q8IUI8-2	P04062	Q9NYF8-3
O75410-2	P49750-4	Q15274	P67870	Q6WKZ4-4	A2RRP1-1
P62306	P07384	Q96KP4	Q03518	P51668	P49459-1
O14744	Q9UBW5-1	Q96CN7	Q06330-1	Q13232	Q00587-1
P17252	Q9H0D6-1	P49406	Q14134-1	O95819-3	Q86TX2
Q8ND30	O60232	Q99643	O43818	P43487	Q96KQ7
O00712-5	Q96J01	Q9NYB0	Q8NHV1	Q99459	O60318
Q9NYK5-2	O43813	P48506	P43246-1	P14174	Q2TAA5
P08253	Q9GZT9-1	O14558	Q969K3-2	Q9BV57	Q12972-1
Q9BZQ8	P02771	P31513	P02765	Q96IY4	P51398-1
Q9UDT6-1	Q9BST9	Q4G0X4	P26927	Q96DI7	P61009
Q9BV10	Q5HYI8	Q9Y613	Q08477-1	Q9BYN0	O15553
P63151-2	P18858	Q8N183	O43583	O15075-1	Q9UBX3-2
Q14684	Q3MIT2	Q14738-1	O14756	P51911	Q5TOW9
Q08431	P50416	P21730	P49279	Q9NQH7-1	Q9BX67
Q96SY0	Q66K74	P13164	P00738	A4D1P6-1	Q9BXV9
P60903	O00186	P38919	Q7Z7H5	P04406-2	O60476
Q9HBM1	Q15428	Q9H939-1	Q96RF0	Q9BZE4	P51884
O75369-1	Q7L311	P43686	A6NED2	Q8TAB3	Q96D46
Q9BQI0-2	Q8TD06	Q96IX5	Q86V21-1	O95136	O95294-3
Q8TEA8	Q96DC8	Q6ICL3-4	P39060-3	O00625	P01619
P08572	Q96T76-8	Q99417	Q9Y490	P04066	P02458-2
Q9Y6C9	Q15124-1	Q86UW8	Q9NZU5	Q9H9A5-6	P40855-1
P78410-1	P35236-3	P82912-1	Q32P28-3	P08697-1	Q14993
Q4KWH8-1	Q9Y3C0	P02788	O75376-1	Q96EY4	P62341
Q9UPN9-1	Q9H3P7	P08246	Q13356-2	P13798	P22670
Q86TP1-1	P40616	P51570-2	O43747-2	Q9BY11	Q13608
P52701	Q9P260-1	O95139	P78537	Q13043-1	P49755
Q9NSC5-1	O75688	Q92791	P28067	Q8TCZ2-5	Q8NBP7-1
Q9NWQ8	Q9BU02-1	Q9BPU6	P34897-1	P07996	P02538
P10909-2	Q9NUL5	Q15459	P09210	O96013-1	O00410-3
P82664	P13591-3	P01111	P18085	Q8TAF3-1	O00505

Q9BY15	Q1KMD3	Q9H300	P51608-2	O00571	P37235
P31939	O95858	Q08117-2	P19474	Q9Y5N5	P47712
O75534-4	Q9NUJ1	P19827-1	Q9BZ29-4	Q02388-1	P18428
P42025	P50897	O95071	P35580	Q9P266	Q01814
P04439	Q3KQU3	P12314-1	P38159-1	P30291-1	Q9BZJ0
Q86WQ0-2	P30049	Q9BTC0	P41567	O43181	Q96AG4
Q9BY67-3	Q9H9C1-1	P48509	Q96FF9	Q9NR30-1	Q8N4P3
Q9H8G4	Q96I25	O43795	O95260	Q24JP5-2	P54868-1
O75563	P21397	P22748	P20618	O95292	O43581-3
Q9P291	Q55NT2-1	O95168-1	O60551	Q8IUE6	Q99933
P10145	O95376	Q9GZT3-1	P23434	Q96BW5-1	P63218
P78406	P32119	P20290-1	P22830-2	O95460	P42285
P23276	Q06323-1	Q13325	Q9BV19	Q5SRE7-1	Q5H9R7-5
P16455	O94766	Q07157	Q96GM5	Q8TET4	Q9UBQ7
Q9H124	Q96JP5-1	P13760	Q9Y6I3-1	P35914	Q9NZL4-3
Q53EL6-1	O96006	Q8IXM3	Q9Y4Z0	Q8N5I2	Q96GU1
O14686-3	O14786-1	Q969S9	O75874	Q8NFD5-3	P04432
P49137	Q9P2X3	P23219-5	Q8IXQ3	P54725-3	Q9Y266
Q15427	P27348	Q12888-2	Q5SW96	Q9NRZ7-3	Q9HCD6-2
Q9BUP0	Q96DX4	Q0VF96	P50336	P04183	P09471-2
Q14103	P29966	Q96EV2	P31151	Q9NZ45	Q99471-1
P18615-3	P00488	P33402-2	Q96AE4-2	P08865	Q96QG7
Q562R1	Q9H3S7	Q9BTT6	Q12834	O14531	Q9H019-1
Q9H6W3	P52434	Q9HC38	Q15661	Q06547	Q12955
P58335-1	P51648-2	Q16625-1	P46108-1	Q96HY7	Q5SWX8-1
Q8TDL5-1	Q9HC78	Q12768	Q9NPD3	O75954	Q9NVV4-2
Q8TBX8-1	O75636-1	P28161	P48147	Q5W111	Q9Y4B6
Q8IWT6	P20585	P31949	Q92979	P0DJ19	Q658Y4
Q9H4A3-7	P01703	Q969S3	Q13951	P20810-6	P17693
P39210	Q13938	Q96KP1	Q8TBC4-1	O94819	Q9BXM0
P62745	Q15286	Q9Y3E5	Q9NTX5	Q8I283	P53582
Q15819	P40199	Q96G23	O00233-1	Q9H1K0	Q8N122
Q08722	Q14562	Q15417	Q9P2I0	Q15035	O94903
Q9BQ13	P35475-2	P38117-2	Q12873-3	Q92734-1	Q92974
Q9H3P2-1	Q8NC96	Q9Y287	P52756	Q9H0H5	Q13595-1
O00478	Q8WUH2	P51178-1	Q6P4A7-1	P78539-1	Q8IZL8
Q8IV56	Q9H3S4	O60524	Q86Y56	O43684	P17813
P06727	P05556-1	Q13867	Q86TI2-2	P17661	P59998-3
Q15650	P32455	O43451	P01594	O60264	Q9Y3E0
Q6B0K9	Q9BV36	P12532	Q9Y4K1	A3KMH1	P14927
Q658P3-2	Q86UY5-1	Q9BZK7	P07947	P30085-1	O15551
P17612	Q13574	O76070	P02743	P18031	O43488
Q15435	Q13535	Q8IY95	Q9NT62	Q6XQN6-1	Q9NRRN5-1
Q70UQ0-4	Q8WVY7	Q9Y6B6	P62277	P30530	O75164-1
P23458	Q99594	P02794	A0A0C4DH55	Q96I15-1	Q08257
Q06830	Q8N5F7	P83111-1	Q9NX00	Q9NX08	Q8IVT2
Q53LP3	P50238	P11166	Q9NRL3-3	P04626-1	O95197-3
Q14254	O00757	Q92665	Q5QGZ9-1	Q99460	Q96QH2-1
Q9Y3D0	Q8IVP5	P08294	Q9P1Y5-2	Q7KZN9	Q9UJX5-3
Q9BW92	Q9BSL1	Q15397	O14772	Q92843-2	P80217-2
Q02040-1	P06753	Q9BWH6	P62316	O60508	Q6P4E1-4
Q02487	Q7Z6Z7	Q86WA6	P11169	Q9GZM5	P01911
Q9UPN3-5	Q8NHJ6	Q8NEB9	Q96JH7	Q9Y608	O75525-1
Q86TG7-1	Q69YQ0-1	P61313-1	P26022	P61978-2	Q7KZI7-1
O00487	P05165-1	P10153	Q5GLZ8-1	P49006	Q96CW1
P15880	P00374	O00469-2	P61289-2	Q9NPF4	P43034
Q9UJJ9	P02745	O15296	P49915	Q8TDY2-1	Q9UBK7-3
Q9UPN3	Q9Y2J2	P84103	Q8IV04-1	O96005-1	Q8N5W9
P55008-1	O15085-2	Q9BVG4	Q99496	P18583-9	Q86UY6
Q9Y3T9	Q9Y2I8-2	Q15149-8	P48507	P51114-1	Q7Z6K5-2
Q14011-2	Q9H9P8-1	P55160	Q9NY56	O00592	Q9Y6Q5-1
Q8NG11-1	Q9BT23	P07357	P98160	P05997	P43405-1
P16422	Q14241	P36955	Q9NQ48	P20674	P55209

P47929	A6NCE7	Q641Q3	Q86YL5-2	P60842	P69891
P35222	Q53GL7	O00635	Q9UBT2	Q86XA9	P35080-2
Q9NX63	Q8TB24-1	Q9UJC5	Q7Z3D6-2	O15439-1	O75339
Q9BXF6	O15212	Q7Z4Q2	Q9UEU0	Q96LR5	Q16537
P51553-1	P51689	Q13326	Q9BPX5	Q587I9	Q14956
Q8WV41	Q07866-9	Q96F63	Q9H4B7	O75663	Q9Y619
P21589-1	Q96J02	Q9H845	P67936-2	P49662	P34949
P61011-1	Q7Z5L9-1	Q9Y314	Q8NF91	Q13126-2	Q9BYX4-1
Q99102-1	P62191	O95721	Q9H2P0	Q9H9H4	Q9UBU6
A8MXV4	P53985	Q8NB16	Q8WXI7	O43929	Q9GZP4
P31948	Q9Y6G9	Q2TAY7	Q12800-1	O60292	Q9C0E2
Q969X6	O95685	Q03164-3	P52789	Q9UHI6	Q15386-1
Q6ZNI1-1	Q6NZI2-1	Q13137-4	Q9C037-1	Q03692	Q14790-9
P60660	Q8N7R7-1	P0C870	P28331-2	P61077-3	Q6MZZ7
Q9BTX1	O75153	Q9BQ52-1	Q6FHJ7	Q12931	P05546
P55786	Q9Y580	Q13610	O43299	O00468-7	Q9NS69
P53041	Q99729-2	Q9BQE3	P10721-1	Q96I51	O14545
Q92600	Q9UNX3	Q06136	Q9Y383	Q9UJU6-3	Q92922
P53814-6	Q8N6G6-3	P55010	Q13228-4	P12814-1	Q86U70
Q6JBY9	Q6IA86-6	Q9HA65	P18065	P50570-2	Q15020
P15374	Q96GW9	Q9NUP1	Q9NVT9	Q9H9T3	P80108
Q13085-4	P78536-1	Q9NWX3-1	O43148-2	Q99622	Q4AE62
P61254	Q96HN2	C9JLW8	O75390	Q5VWQ0	Q4ZIN3-1
P61247	Q9GZL7	P56199	O15460-1	O95954-1	P00403
Q10567-3	O15031	P53621-1	P42224-1	P03891	Q96B49
Q9UFG5-2	O15258	Q9Y6K5	Q9H2C0	P31415	Q9Y426
P01762	P04424	Q96PE2	P13688-1	Q8N5C6	Q9Y2J4-4
P15313	P27707	P50552	P15509-7	P23528	P62917
Q9UQ80	Q13330-1	Q6PI73-2	O75629	Q8TC07-3	P20337
Q96MH6-1	Q96JG6	Q9UKM9-1	Q8IVG5	Q14527	Q9Y6M9
O00408-1	P11908-2	P12268	Q9NRN7	P01008	P60520
O15162	O95295	Q9Y2B0	P51854	P15924-1	P15289-1
Q7Z222	Q9Y294	P05976-1	P61086	Q15269	Q9NRF9
Q00688	Q9BSE5	Q8NC56-1	Q9NWH9-1	P62280	Q86VN1
O43914-1	Q8IYB5	Q9P086	Q9UBB5-1	P15088	P61106
Q96FJ2	Q8TDQ7	P84085	P09493-5	Q9B540	O75208-1
O94769	Q8NI36	P28068	P51888	Q8N594-1	Q8WVV4-1
P16050	Q9H1E5	P01860	Q15334	P05783	Q9BTE1
P48200	P0C0L5	Q9NRX2	Q86TU7	O15540-2	P52292
Q9H0Q0	P11388-4	P04271	P11233	Q13642-4	Q96GM8
Q9UBS8-1	Q6NUK4	Q9BXD5-1	O75791	Q7Z478	Q53GT1
Q9Y365	Q9BT09	P16452-2	P61962	Q15276	P09651-2
P14923	P52209	Q01085-2	Q9Y371-2	O60825-1	Q9H1K4
Q92785	P78559-1	P62826	Q6P158-1	P10301	P50402
O43663-1	Q14624-1	P40123	Q8WYJ6-1	Q66PJ3-1	P62241
Q01415-1	P33151	Q5TC84	Q9H0P0-4	Q96G46	Q14839-2
Q9NRK6	Q9NRX1	P35659-1	Q13131-2	Q0JRZ9-1	O00422
Q9HCY8	Q15233	Q8N5K1	Q7Z5K2-3	Q9UQC2-1	Q9Y5S9
Q16378	P61088	O00746	Q9HB07	A0A0C4DH69	O75937
P48681	P35052	Q9Y5J9	Q9ULU4-19	P61457	Q9NPI1-2
P42356	P01130	O00519	O00161	P25098	Q8NFL0
O95049-3	O14617-5	Q9NXW2-2	Q9Y5Q8-3	Q9NWX4	P28300
P02751-10	Q9H0U9	Q9Y223-2	P11279	Q14112-1	Q9Y5R8
P62072	P62942	P02774-3	O43294-1	Q9BXX0	P24043
P55107	Q15031	Q15287-1	P49903-1	P49753-1	Q13425-1
P15153	Q15382	Q92615	Q96JQ2	Q15811	Q53533
O43464	Q9Y4K4	P61758	P15586	Q96IQ9-2	Q86U86-1
O60262	Q7Z404-1	P29034	Q9UPI3-1	Q9P2E9-1	Q9UHY1
Q5J8M3-1	Q9NVH1-1	O95365	Q96GG9	Q16563	Q9UII4
Q8IWL2-2	Q96EK9	Q8IVW6	O75150	Q96CV9-1	P51397
Q15052	Q9NVU7	Q9BYB4-1	Q96CW5	P57678	O75582-1
Q6UB35-1	Q13045-2	Q96LW7-2	P61421	P51148-2	O60361
P48444	P00736	P05089-2	Q8N201	Q92643	O95149

Q9BTM9-2	P49407-1	Q15006	Q9UL18	Q9NSY1	P30046
Q15477	Q9C0E8-4	P78380	Q02878	Q96PP8-1	O00453-11
P56556	Q70J99-3	O75607	Q969V3-2	O75717	Q9H029
P48059-3	O95785-3	P46934-4	Q8IWZ8-1	P14770	P52948-1
P62266	Q13601	Q9BUD6	Q16555-1	Q96T37-1	O14828
P62913	P52907	Q96C19	Q16270-1	P62873	P11766
Q92504	Q5XKP0	O95445-1	Q92556-1	Q8WU90	P59768
Q8NBS9-1	Q8N5X7	Q9BPPW8	Q13769	Q9H3G5	P61006
Q96552	O00303	Q9HCM4	P20827-1	P51159-1	A1L4H1-1
Q8NB37-2	Q9Y3C8	P27986-4	Q6UXH1-5	O75146	Q8TDX7-1
Q9Y3Q3	O60870	Q9NYU2-1	O95436-1	Q96QD9-1	Q9UK76-2
Q8IX19	Q92797-1	O76024	Q6UVY6	P0DJ18	P00739-2
Q8NI35	Q9Y3B7-1	Q7Z3K3-1	O75674	P50502	Q969G3
O94925-1	P01714	Q12872-2	Q6PCB0-2	Q00537	O95816
Q13510-2	Q9BW85	P07203	P08590	P35237	Q13618
Q8IVM0-2	Q9NR19-2	Q96FZ7	Q9Y2A7-2	P25786-2	P05109
Q5VT79	Q13459-1	Q8IUZ5	Q9BWW4	Q92616	Q14690
O43752	P46939-2	Q8WTW3	Q14693-7	P11684	Q9BV20-1
A6NI72	P40937-1	Q8TCC3-2	P14061	Q92851-4	P50993
Q6ZMZ3	P11217	Q14671-3	Q9UBV8	O60832-1	Q96D96-1
O00273-1	P61244	Q53FA7-1	Q9C0D9	Q9HD20	Q9UBL3-1
P80404	P11940-1	P30419	Q99685-1	Q8TDY4-1	Q15011-1
Q9UDY2-3	Q99504	Q09028	P28676	A0A0B4J1U3	Q96GK7
P07910-1	O43660-1	Q5T4S7-2	P02461	Q9UBW8	Q9NPP4-1
Q15843	Q9NVM9	O15228	Q7Z7K6-1	Q9UKB1-1	P42566-1
P48449-1	P63261	P59780-1	P09105	Q8N0X4	Q9BUP3-3
Q9UJS0-2	Q6UWY2	P22570-3	Q9HBU6-1	Q9UN81	Q99424
P84095	O43592	Q6UXG3	Q6IQ49-1	O75558	P24821-4
Q96RL7	Q96NY7-1	Q96SB4-3	P36957	Q8WU39-1	Q99674-5
P82979	Q9UHD8-1	Q9UQE7	Q8WUK0	Q9P253	Q9Y6E0
Q15436	Q712K3	Q02978	P01871	Q9UHX1-2	Q9BXJ2-2
P13473-3	Q9Y305-1	Q9Y666	Q15758-1	Q99720	Q13907-2
Q96AZ6-1	O60282-1	Q9NYL4	O95352	P10588	Q9BSJ2-4
P11021	Q9NRA2	Q7Z4S6-4	Q14457	Q02809-2	Q9BUV8-5
Q9ULC3	Q9NRW4-2	Q9NRV9	Q8IVD9	Q96F85-1	Q9NRL2
O00400	P55795	P14618	P00966	P02675	O15371
Q92973-2	P63167	A0A075B6R2	Q9H0S4	Q96CG8	P09493-10
O43251-8	Q7Z5G4-1	P07437	P19022	Q9BRP8	P51665
Q8TB61	Q9BPX3	Q9HB21-1	Q5JPE7	Q8WUX9	Q04828
P20039	Q9Y4E1-4	P04229	P22090	O43837-1	Q9BUR4
Q99805	Q71RC2-4	Q9BZZ2	O75128-2	Q5VZL5	Q7L9L4-2
P22695	Q86UN3	Q9Y296	Q4G0J3-3	P01137	Q8WUD6-1
Q16643	Q14CX7-1	Q14019	Q96HR9	Q6UXB8-1	Q16890-1
Q12905	P08648	P38571	Q99829	P21926	O43314-1
O75683	Q8NFI5	P09455-3	Q8N3F0-1	P28482	Q8TDB6-1
Q14766-1	Q96JB5	Q6P1Q9-1	Q6NS38-1	Q9BZV1	Q96EM0
Q6ZMP0-1	P08758	O00154	Q8WUH6	Q01118	Q5T5X7
Q9H9A6	Q01780	P35226	Q96K76	Q9UM00-1	Q9BZI7-1
Q96F07-2	P11413-2	Q96PL1	Q8IUUK5-1	Q96PP9	P18077
O43493-1	Q9H0U4	Q15208	Q15181	Q9H2G2-1	Q5HYK7
Q9UN76	Q6ZRS2	Q9Y4P8-4	P78318	P11441	Q13813-3
O95382-1	Q86TV6-2	P59665	Q5U651	Q96DM3	P33241-3
P08236	Q08211	Q969N2	P04350	Q6ZNW5	Q8IUR7-1
O95786	Q92905	Q9Y2P4	Q15063-4	Q92817	Q9BTV4
P61803	Q9UL15-2	Q14669-3	Q53H96	P21462	O75477
Q9H653	P45985-2	O60256-1	Q9Y2E5	Q9Y646	Q9BSV6
P35749-3	P13995	Q9Y6X9-1	P09871	Q92900	P35442
Q12846	Q93084-5	Q08174-2	Q9Y4A5	Q92599-1	O75298
Q13472-1	Q07812-2	P00846	Q14444-1	Q9BW30	P16278
Q9BUL9	Q14118	Q9BXP5	P27987	P26038	Q92963-3
Q7Z7A4-1	P62195-1	Q8N2U0	O43598-1	Q96GZ6	P33992
Q8N5M9	Q01658	Q15008	O95848	P21333-2	Q8N8N7-1
Q9BYN8	Q14126	Q13363-1	Q9H9S4	Q9Y5U2-1	P62304

P00352	P15090	Q9H720	P62253	Q9BW91-1	Q9Y6G5
Q99990	Q8IXK0-5	Q9UK41-1	Q15019-2	P49356	Q96ND0
Q15628	O95801	Q9UM22	Q9HBL7	P09467	O75175
O15014	Q9Y6R4-1	Q9UKJ3-1	P16989-2	Q9BZX2-1	Q7L2E3-2
Q9UKX5-2	P48643	P52747	O43615	O76074	P17066
Q9BVK6	Q969L2	A0A0C4DH25	Q96PK6-1	O60783	Q5UCC4-1
Q8IX12	Q08397	O15042	Q8NFW8	Q9HAN9	O60678
Q9P2M7-1	Q9ULA0	Q9UEE9-1	P62273-1	P46734-3	O95931
P43243	Q8IY21	Q6P587-1	Q8IY67-2	Q9H5K3	Q9Y2B9
Q9Y2Q9	P08708	P55039	Q08J23	P33991	O95757
Q9UNQ2	Q9BUB7	P02511	Q13201	Q99426	P06744
Q9NP61-1	Q9Y5X3	Q9BXP2-1	P30040-1	O43678	Q6ZVX7
Q13011	P01700	P52790	P49207	P42677	Q8WXG6-1
Q96ER9	O75400	Q9Y3B4	Q99873	A3KN83-1	Q6NXG1-1
Q96EY7-1	P39059	Q9Y2C4	Q15785	P46937-9	Q92608-1
Q06828	Q9Y5B9	P49368-1	Q9NYJ1-2	P08254	P20591
P00747	Q8IWL3	P23193	Q8N4V1-2	Q3B726	P08559-4
Q15185	Q9GZU8	P16930	O43903	Q9NXR7-1	P16219
Q99653	O94763-1	Q15003	Q96G97	Q9BUF5	O60716-1
Q9BWU1-1	Q01469	P20042	Q86YN1-1	O60664-1	Q07352
P07814	Q6ZT21-1	Q96LZ7-1	P31150	Q8IWA0	P35813-3
Q9Y2G8	P09960-1	Q92610	Q9Y4C2-1	P61604	Q68E01
Q56VL3	Q92619-2	Q9NX47	O95169	P40121	Q15904
Q16762	P13762	Q9UBQ6	P54819	Q02543	Q15036-1
P43003	Q8TBP6	P02790	P04233-2	Q12882-1	P40925-3
Q9Y3L5	P07108-5	Q06787	A0A0B4J1V0	Q9ULW0-2	Q13541
O15120	P56945-6	O15020	Q16698	Q55007	P13645
P58107	P12270	Q13797	P01834	Q9NXN4-1	P51452
P0DI81-3	O95347-1	P13612	P02656	Q9BWE0-4	O43521
Q15847	Q9Y2T2	P29992	Q13740-1	O43264	P15169
P06746	Q9BYC8	P07738	O95456	P10114	P09493-7
Q13557	Q96BS2-1	P50135	Q99536	P22234	P23083
Q86UT6	Q92597	P13284	Q8IYB3	O60925	O43709-3
Q9UM54-6	Q86TB9	O95299-2	Q8NEY1	P55735-3	Q6IAN0
Q9NX62	A0A0C4DH41	Q8N0W3-2	P15927-3	O75746	P62312
Q9H0W8	Q6R327-3	P01591	P09936	Q5VVQ6-1	Q53QV2
Q9H330	Q7L523	P50395-1	Q15007	Q5T6V5	Q96S11-1
Q9Y4E8	Q9BXW6-1	P50454	Q12765-2	Q8NCA5	P06732
P00734	Q13188-2	Q99798	Q9P121-4	Q8NCL4	O75167-4
Q96C01	P20711-1	Q96T66-1	Q92481-2	Q9P0U1	Q29960
Q9Y276	Q9BRT2	P37268	P09327	O75947-1	Q14141-1
P04196	P14209	P25205-2	Q14012	Q8TBC5-3	Q08495-2
P31749	Q96IZ0	P01824	P11182	Q14232	Q9UKU7
Q8NHV4-3	O60701	Q01543	Q8IUD2-1	Q8N5N7	Q9BVQ7-1
P85037-1	P55157	P54803	Q96NB2	Q8NHQ9	Q14146
O15213	O95777	P01721	P47755	Q96HU1-2	Q8IZD4
Q9UHQ1-2	P29353-6	O15270	Q16629	Q8N9V3	Q96S97
Q9H5Q4	P30504	P78560	Q9UJ68-1	Q9NNW7-1	Q6UXB2
Q15691	Q13435	P11678	P46379-3	P16188	O15431
P08185	O14681	P68371	P42766	Q9UNI6	P47985
O14498	O75439	P02749	O60507	P24557	Q14197
P40938	P19525	P17050	O00178	P51692	Q9UKS6
Q9NUV9	Q9P0K7-2	Q96IP4-2	Q8N755	Q8N129	O75380
P33908	Q6P9B9	O15400	P51003	P54619-3	P62829
Q6AI08	Q15717-2	Q9UH99	P82932	Q9HC84	P22105-4
Q9HCS2	P62244	O95340	Q9Y5B0	P30511-3	O60313-10
Q6UWP2	O95833	P29622	Q8IWE2	Q8WVM8	Q15059
Q5SQI0-1	Q9NZ01-1	Q6FI81-1	P08709-1	P02741-1	P01877
P35858-2	P83110	Q8TEW0	Q15582	P41226	Q12962
Q9NWM8	P54105	Q69YN4	Q15485-1	Q7Z7B0	Q15345-2
Q5QNW6-2	Q7Z4W1	Q9BWM7	P82094-2	P12830	Q9NSI8-3
Q16706	O75915	P51580	O95831-1	O00515	Q8IXI1
P01833	Q9Y5Z4-1	Q9Y2X7-3	P16885	Q9UKK3	P61769

P19012	Q8IXS6-2	Q9UK99	O00139-4	O60220	Q8WWX9
Q9Y547	P32456	Q9H0V9-2	Q9H857-2	Q9Y312	Q96582
O00264	P27701	P61916	P51809-2	Q9UMS4	Q15024
Q53F19	Q8N392-1	Q9Y3P4	P55212	Q0VD83-4	Q9Y310
Q9UHD1	Q86TM6	Q13404-1	Q9Y3U8	P35244	Q8NB90-1
Q6UN15-1	Q9H4M9	P01709	Q9Y2X3	Q96JC1-1	Q9NVA2-2
O75431	Q13439-5	Q8TEX9-2	P10155-1	A0A075B6K4	Q9Y295
P53611	Q9UNE7-1	Q15797	Q8WVV9	Q13790	P23258
Q9NV88-1	P08473	P19484-1	P11310-2	O14964	Q86VR2
Q53HC9	P02786	Q9UJ14-1	Q5TBB1	Q14694-2	P62330
Q14151	Q86VB7-1	O00204	Q9NZM1	Q96A65	Q6P1J9
Q9Y265	Q13564-1	P68032	Q8WYA6	O94887-1	Q16595-1
Q8N9U0	Q8WUY8	Q8N9F7	Q96KG9	Q8N697	P04844-1
P12318	Q5VT25-6	Q8WVNV6	P05026	P02753	Q14533
P57740	Q8IYI6	Q16795	P21283	P13489	Q96DX5
P04222	Q96KC8	Q9UNZ2	Q9C0B1-1	Q16873	P09326
Q5PRF9	O14907	Q9UBQ0-2	Q86W92-1	P29350-4	Q13098-7
P20340-2	Q9UJY4	Q7L014	P13010	O14929	Q12849
P32519-1	Q13287	P08754	Q5VIR6-4	P09001	P61024
Q9H993	P14780	Q9UNA1-1	Q86SX6	Q9BZL6	O75608
Q4KMP7	P06312	Q96G28-2	P55042	O95359	P16591-1
P41091	Q03135	Q96B54	O15327	P12259	O00232-1
Q9UK55	O75382-1	Q9Y3L3-1	Q8IZV5	P12955	Q9HBI1-2
P22626	Q99439	P10746	Q6PUV4	Q96JM3	Q9P2J5
Q9ULV4-3	Q9H974-4	O94811	P62820	Q01813	P07711
Q8NFBV4	Q7Z406-6	P18564	Q14244-7	Q9Y6X3-1	P68871
Q96CP2	P08183	Q6UWX4	P24844-1	O95302	O43252
P63173	Q13813-2	Q9HCN4-5	Q86UX7	O76094	Q93062-3
Q92604	P05455	O75083	Q9H444	Q15061	O75190
P28065	Q13613-1	O43805	P05121-1	Q96QK1	Q9HC21
Q86YV0	Q6ZNB6-1	O43741	P08621-1	Q96A08	P18433
Q03426	P30519	Q02539	P40763-2	Q96ME1-4	Q9GZS3
P23588	Q86YP4-3	Q9UHD2	P02747	P05023	O00148
P01701	P34910-2	P04920-1	Q96AC1-3	P49005	Q15022
Q9Y5J7	Q8IXI2-3	P10599-1	Q14677-3	P01009-1	O14579-1
O14735	Q9UJZ1	Q58FG1	Q9NPA3	Q13123	P20700
Q5BJF2	P12821-1	P56537-1	Q9NQT5	Q969X1	Q9P2K5-1
Q66GS9-1	P49642	O15173-2	P26196	Q8NBF6-1	Q13190
P03950	P63096-1	Q7Z6E9	O75064	Q6Y1H2	P55061-2
P56377	A0FGR8-2	Q9UPY8	P07332-1	Q9H1X3	P29372
P20702	Q9H8Y5	Q69YL0	Q9H2D6-5	P55854-2	Q9Y315
Q66K79-1	Q9HCD5	P61158	Q9UQV4	Q8WXF7	P26358-2
Q9P2R3-4	O95372	P21695-1	Q9BY76	P00387-3	Q96N67
Q96CS3	P60174	Q13421-2	Q12899	Q14573	Q99757
O00203-1	Q8N1F7-1	Q99575	P02462	Q9UIS9-2	Q99570
Q96QF0-1	Q9Y285	P86397	Q8IVF7	Q6UX06	O60306
Q8N436	P09622	P42574	P01892	Q5JSZ5-1	Q6PJG6-1
P01704	Q15056-1	Q8TEV9	Q15165-1	Q13045-1	Q8TAT6-2
P12235	O95487-3	Q9NVE7	P32321-2	P40926	Q8WWV59
Q9NVH0	Q96MV1	Q9BXY0	O95810	Q9NPY3	O60341-2
O43633	Q9P0J1-2	Q15848	Q969P0	O43927	P51571
Q9NRS6	A0AVF1	Q6UWY5	O00116	P49585	Q9UHB9
Q9NQC3-2	Q6QNY0	Q9Y2D5-4	Q96IG2-1	Q10570	P62841
Q13685	Q92930	Q52LJ0-2	O75695	P05543	O14950
Q5JTV8	P62995	Q6UXN9	Q96A57-2	Q9NZP8	Q96DF8
P61966	O43759-1	Q86VW0	Q9P003	P00973-1	Q9Y678
Q9NWS8	Q9P1Y6-1	P30876	P84243	Q92925-1	P0CAP1-11
Q13427	P68366	P02766	A0A0B4J2D9	Q8WVC6-1	Q01650
P23610	Q9BSJ8-2	Q8N118	Q13888-1	Q8NBQ5	Q9BVJ6-1
P02776	Q96M27-2	Q5SSJ5-1	Q9BWJ5	P30044-1	P17655-1
O95202-1	P54198	Q14314	O14958	Q9Y5X2	Q9NVZ3
P35749	Q8WTS1	Q8N442	Q8IZ81	Q5SRE5	Q86T03-2
O95573	Q9NR77	Q9Y570-4	Q13310-3	Q9Y3A6-1	Q5VZK9

P56134	Q8TCD5	Q8TDN6	O15294	P06730-3	Q13057-2
Q9Y217-1	Q53QZ3	P27635	Q96FQ6	O00221	Q96GQ7
Q9UBS3	P49821	Q8IY37	P54709	O15321-1	O00584
P07910-2	Q9BYD6	Q96S99	Q96ES6	Q8IWU2	O43414-1
Q9H3H1-4	Q9NPI6	Q9Y2P8	Q2TBE0	P49902	P42773
O15067	P51812	Q6BCY4	O60237	P54920	Q8WUZ0-2
Q01995	Q9NWU2	O14773	P05108	Q9UHV9	P00533-1
Q00653-1	Q96I24-1	O43566	Q9NRD1	P00749	O60563
Q99988	Q9Y696	O60760	Q14318-2	Q99623	O94925-3
Q9UBX5	Q13153	P16157-14	Q71UI9-5	P28906	O00423-3
Q9H8H0	Q8IZF2	Q9HA64	O43819	P82673-1	P49458
P36952-1	Q9H8W4	Q92609-2	A0A0B4J1X5	P54652	Q03111
P17936-2	Q96BP3	P02452	P63241-2	Q9HCE1	Q96BN8
P22676	Q6PCB0	Q9UNP9-3	P07237	P22102-1	P45954
O00401	P23919	Q9NW15-1	Q68DQ2	Q9UQR1	P01814
Q6ZN55-2	Q9Y450-1	P13747	Q9C0K0-1	P30041	Q9UHA3
Q9Y3C1	Q9UKY7	A2RUS2	Q8TAD8	Q9P270	P61326
O75475-1	P09496-2	P11234-2	P25686-3	P15104	P35241-5
O00560-1	Q96EP5	Q5EBM0-1	O00214-2	Q6PI48	Q9Y5K5-1
Q96KM6	Q7L266	Q8WTV0-1	Q8IWIY9	O14737	Q13683
Q96CP6-1	P19447	Q8IY31-2	Q6UX71-1	Q9Y657	P00441
P24821-5	P10606	P53004	Q9H0J9	O43324-1	P42765
Q8N1G2	P05204	Q9UHD9	P54760	Q8NF37	Q99956
Q15113	Q9BUT1-1	O94880-2	Q9NZR1	Q8N668	P02750
P14550	P05230-1	P62753	P30260-2	P04430	Q9BYX2
Q8WX92	Q92688	Q9BRR6-1	Q96MM6	P62308	Q92878-2
Q9ULH1-2	Q01970-1	P10620	P00750-1	Q92888-3	P02549-1
A8MVU1	Q9Y6W5	O14745	Q9NZT2-1	Q9BXB4	O14657
Q7L7V1-1	Q9UBC2-2	Q9NQ88	Q9NSE4	P01699	Q14919-2
Q12982-2	P01817	Q8N335	Q96G21	P22003	O15305
Q9NW68-3	P68402-1	Q05315	Q13523	O75533-1	P20592
P23743-1	Q9NP58	Q9BVC5	O60488-1	Q9NX40	Q6VY07
P54252	Q70UQ0	O43318	Q9UBF1	A5YKK6	Q9HAF1-3
Q9UJQ4	P43005	P57087-3	O00291	P35443	Q8NHH9
P05090	Q9UKD2	P14735	Q3ZCW2	Q96DV4	Q6ZT12-4
Q96RN5	Q15800	Q9H2U1	P50052	Q9UKU9	O95298-1
Q9BTT0	Q96NY8	Q8N1S5-1	Q13547	Q15149-1	P28066-1
Q5JSP0-1	Q9H7L9	Q14451-3	Q9BW60	Q9Y6W3	Q8IZW8
O95758-5	Q14697-1	O15254	Q9H7N4	Q9BXR0	O00602
Q6UX73	O75351	Q7Z5R6	P18577-1	Q9H2J4	P51948-1
Q96SZ5	P09234	O15484	Q02750	Q15814	
Q9H6F5	P61163	Q9NTJ4-4	Q15599	P11226	
P61018-2	O43237	A8MVS5	Q9Y3B8-1	Q8IZV2	
P55268	Q7L591-1	P24071-6	Q9NY61	Q96JB2-1	
Q8IY33-1	Q9H0W9	P52732	Q8WZA0-2	Q9Y2V2	
Q8NCH0	Q9P0M9	P52888	Q5RKV6	Q9UPT5	
P23921	Q9Y639-2	Q9UHA4	Q8NC51-1	P12111	
P41218	P18827	Q8IYS1	P19256	O60443	
O15533-3	O00182-1	Q7Z6P3	O15357	Q8IUX7	
Q53GQ0	Q5T0F9-2	Q6ZVE7	P02671-1	P21266	
Q8N6T3-1	Q8N3F8	Q5T9L3-2	Q13751	O60831	

FORMLAR

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Araştırmacının/Hekimin Açıklaması

Akciğer kanseri için erken tanı ve tedavi sistemi geliştirilmesi amacıyla "Biyobelirteç Temelli Akciğer Kanseri Erken Tanı ve Tarama Sistemi Geliştirilmesi" isimli bir bilimsel araştırma yapmayı planlamaktayız.

Akciğer kanseri tanısı konulmuş ve cerrahi tedavi uygulanan hastalar üzerinde uygulanacak olan bu çalışmaya, tıbbi durumunuz bu koşullara uyduğu için sizi de davet ediyoruz. Ancak hemen belirtilmelidir ki araştırmaya katılıp katılmamak gönüllülük esasına dayalıdır. Bu bilimsel çalışmaya katılma kararını tamamen hür iradeniz ile vermelisiniz. Bu kararı verirken hiç kimse tarafından size telkin ve baskıda bulunulamaz.

Kararınızdan önce söz konusu bilimsel araştırma ve bu araştırmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda yapılacak işlemler hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra bu bilimsel araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bilimsel çalışma hakkında bilgiler

Araştırmaya tıbbi teşhisiniz nedeniyle davet edilmiş bulunuyorsunuz. Bu araştırma **TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, İstanbul Medipol Üniversitesi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Sakarya Üniversitesi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi ve daha sonra projeye katılımı uygun görülen sağlık kurumları**nda gerçekleştirilecektir.

Çalışma hakkında kısa bilgi

Akciğer kanseri olan hastalarda etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için hastalığın oluşum ve ilerlemesinde rol oynayan moleküler yapı ve mekanizmaların ortaya konularak erken tanı amacı ile kullanılabilecek moleküllerin tespiti gerekmektedir. Halen etkin bir tarama veya erken tanı testi olmamasından dolayı hastalık ileri evrelerde teşhis edilmekte ve dolayısıyla etkin tedavi seçenekleri düşük kalmaktadır. Hastalık, başta sigara olmak üzere çevresel etmenlerin yol açtığı bir dizi genetik değişiklik sonucu meydana gelmektedir. Bu değişikliklerin ortaya çıkartılması, her hastada farklı genlerde meydana geldiği için, kapsamlı bir genom analizinin yanı sıra, genetik değişikliklerin protein seviyesinde de değişikliklere yol açabilmesine bağlı olarak kapsamlı bir proteom analizini de gerektirir. Bu projenin genel amacı bütüncül bir yaklaşım ile biyoenformatik destekli genom ve proteom analizlerini birlikte uygulayarak hastalığın moleküler bir kesitini ortaya çıkartmak ve bu görünüme dayalı olarak erken tanı ve tarama kiti geliştirmektir.

Bu kapsamda; halk sağlığı açısından kritik önem taşıyan bu araştırmaya katılımınız ile tıbbi durumunuz nedeniyle sizden ameliyat öncesi ve esnasında doku, biyolojik sıvı örnekleri (kan, idrar, tükürük, balgam, bronkoalveolar lavaj, vb.) ve dışkı alınacaktır.

Çalışma kapsamında bilinmesi gereken durumlar ve araştırmacılar ile gönüllülerin uyması gereken kurallar

Araştırmaya katılmanız durumunda;

1. Sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir.
2. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme yapılmayacaktır.
3. Hekim ile aranızda kalması gereken size ait bilgilerin gizliliğine büyük özen ve saygı gösterilecektir.
4. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgileriniz çok büyük bir hassasiyetle korunacaktır.
5. Çalışma sırasında meydana gelebilecek sağlığınız ile ilgili ve diğer olumsuzlukların sorumluluğu katılımcıya aittir.
6. Gönüllü olarak katıldığınız çalışmanın herhangi bir aşamasında araştırmadan ayrılabilirsiniz. Ancak ayrılmadan önce araştırmacılara bu durumu bildirmeniz önemlidir.
7. Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda tedavinizde ve klinik izlemelerinizde hiçbir değişiklik olmayacak, her zaman olduğu gibi aynı özen ve ihtimam ile hastalığınızın tedavisi sürdürülecektir.

Katılımcının (Gönüllü) / Hastanın Beyanı

Sayın tarafından, Dr. Abdullah Karadağ yürütücülüğünde TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Moleküler Onkoloji Laboratuvarı'nda bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler tarafıma aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam, hekim ile aramda kalması gereken, bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı gösterileceği, araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı kesin ve net bir şekilde belirtilmiştir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Benden herhangi bir ücret talep edilmeyeceği ve bana da herhangi bir ödeme yapılmayacağı net ve kesin bir şekilde ifade edilmiştir.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilme hakkına sahip olduğum bildirilmiştir. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını da bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim. İster doğrudan, ister dolaylı olsun, araştırma ile ilgili ortaya çıkabilecek sağlık durumuyla ilgili olumsuzluklarda sorumluluğun bana ait olduğunu biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı herhangi bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (gönüllü) olarak yer alma kararını tamamen hür iradem ile almış bulunuyorum. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllük içerisinde kabul ediyorum.

Tarih

Katılımcı (Gönüllü)

Adı, Soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Görüşme Tanığı

Adı, Soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Katılımcı (Gönüllü) ile Görüşen Araştırmacı

Adı, Soyadı, Ünvanı :
Adres :
Telefon :
İmza :

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

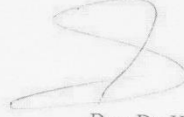
Sayı : 10840098 – 01
Konu: Etik Kurulu Kararı

07/01/2015

Sayın Dr. Abdullah KARADAĞ

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Biyobelirteç Temelli Akciğer Kanseri Erken Tanı ve Tarama Sistemi Geliştirilmesi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.



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

EK:
-Karar Formu (2 sayfa)

Tel: (0216)681 51 37
Faks: (0212)531 75 55
E-mail: ilknurfil@medipol.edu.tr

Adres: Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No: 19, 34810
Kavacık/BEYKOZ

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR
FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Biyobelirteç Temelli Akciğer Kanseri Erken Tanı ve Tarama Sistemi Geliştirilmesi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr. Abdullah KARADAĞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gebze/Kocaeli			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	29.12.2014		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	29.12.2014		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
Karar Bilgileri	Karar No: 01		Tarih: 07.01.2015	
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

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

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Tangül MÜDOK	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Emir YÜZBAŞIOĞLU	Protetik Diş Tedavisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Muhammed Fatih EVCİMİK	Kulak-Burun Boğaz	Özel Nisa Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	

* :Toplantıda Bulunma

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HASTA ÖRNEKLERİNİN İLERİ PROTEOMİK ANALİZ YÖNTEMLERİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%2	%1	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Eastern Mediterranean University Öğrenci Ödevi	<%1
2	www.ankarapatoloji.org İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Universidad Miguel Hernandez Servicios Informaticos Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Girne American University Öğrenci Ödevi	<%1
6	YALÇIN, Tuba and BESLER, Halit Tanju. "Plasental Hormonların Maternal Metabolizma ve Fetal Büyüme Üzerine Etkisi", Türkiye Diyetisyenler Derneği, 2014. Yayın	<%1

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Saime	Soyadı	Sürmen
Doğ.Yeri	Oltu	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi -Moleküler Tıp Anabilim Dalı	2013
Lisans	Marmara Üniversitesi – Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Mustafa Saffet Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi		81,25

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

ULUSAL YAYINLAR

1. Sürmen, M, **Sürmen, S**, Pençe, S. An Overview of The Phosphoproteomic Workflow. Experimed 2018: 8 (1), 23-32.
2. **Sürmen S**, Sürmen M, Pence S, Arslan SO Kronik Akciğer Hastalıklarının Tanımlanmasında Biyobelirteç Araştırmaları. Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics 2018;6(2):100-8.
3. Turna A, Horozoğlu C, Koç Erbaşoğlu Ö, Ercan Ş, Küçük Hüseyin Ö, **Turan S**, et al. The importance of programmed death ligand 1 gene expression, epidermal growth factor receptor

gene mutations and serum epidermal growth factor receptor levels in Turkish non-small cell lung cancer patients. Turk Göğüs Kalp Damar 2018;26(3):450-457.

4. İplik E, Nalkıran İ, **Turan S**, Arıkan S, Yaylım İ, Ergen A. Investigation of Gpx1 Gene Expression, Serum Gpx1 and Selenium Levels on Colorectal Cancer. Clinical and Experimental Health Sciences, (2018), 1-1.
5. Yıldız, Y. Arıkan, S. **Turan, S.** Candan G., Yaylım, İ. & Ergen A. Meme Kanseri Hastalarında ABCG2 G34A Gen Polimorfizminin İncelenmesi. Lectio scientific. 2017; 1(1), 8-17.
6. Arıkan S, Gümüş A, Küçüküseyin O, Coşkun C, **Turan S**, Cacina C, Talu CK, Akyüz F, Farooqi AA, Kıran B and Yaylım I. The effect of CTLA-4 and CD28 gene variants and circulating protein levels in patients with gastric cancer Mide Kanseri Hastalarında CTLA-4 ve CD28 Gen Varyantlarının ve Dolaşımdaki Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Turk J Biochem 2017
7. Cacina C, Arıkan S, Yıldız Y, Toptaş B, **Turan S**, N. Ozkan NE, Korkmaz G, Küçük S, Yaylım I, Isbir T. Meme Kanseri Hastalarında Nitrik Oksit Sentase 3 (NOS3) Glu298Asp Gen Varyantlarının incelenmesi. DETAE e-Journal, Issue 5, 2013.

ULUSLARARASI YAYINLAR

1. Aghayeva N, Benian A, İlhan Yaylım, **Turan S** and Sevinc A, Lack of association between the occurrence of ectopic pregnancy and variations in the TGF β 1 and E-Catherin genes. MOJ Proteomics Bioinformatics. 2019;8(1):1-5.
2. Ozkan Küçük N. Horozoglu C. & Timirci Kahraman O Arıkan S. Farooqi A. **Surmen S.** Korkmaz G Canan Kelten Talu E. Uteuliyev Y. Yaylım I. Gene Variants of TCF7L2 are Histopathologically Important in colorectal cancers but Do not have Direct Association with MYC Expression. 2019; Cellular and molecular biology.
3. Yanar K, Aydın S, Simsek B, Yaylım I, **Turan S**, Sitar ME, Cacina C, Kucukhuseyin O, Tuten A, Cakatay U, Ali Benian A, Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) Lys469Glu polymorphism, systemic redox homeostasis and gestational diabetes mellitus, Canadian Journal of Diabetes. 2018;S1499-2671(18)30184-9.
4. Timirci-Kahraman Ö, Verim A, Farooqi AA, **Turan S**, Özkan-Küçük NE, Yaylım İ. Expression of miR-373 and its predicted target genes E-cadherin and CD44 in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2017 Dec 30;63(12):29-33.

5. İlhan M, Turgut S, **Turan S**, Demirci Cekic S, Arzu Ergen H, Korkmaz Dursun G, Mezani B, Karaman O, Yaylım I, Resat Apak M, Tasan E. The assessment of total antioxidant capacity and superoxide dismutase levels, and the possible role of manganese superoxide dismutase polymorphism in acromegaly. *Endocr J*. 2017 Oct 17.
6. Turgut S, İlhan M, **Turan S**, Karaman O, Yaylım I, Kucukhuseyin O, Tasan E. The Role of p16 and MDM2 Gene Polymorphisms in Prolactinoma: MDM2 Gene Polymorphisms May Be Associated with Tumor Shrinkage. *In Vivo*. 2017 May-Jun;31(3):357-363.
7. Karakose Okyaltırık F, Rezvani A, **Turan S**, Uysal Ö, Yakar F, Sozgen H, Ozkan NE, Akkoyunlu ME, Bayram M, Kutbay Ozcelik H, Sezer M, Guler M, Yaylım İ, Kart L. Relationship of CTLA4 and CD28 Polymorphisms with Lung Involvement, HRCT Findings and Pulmonary Function Tests in Turkish Patients with Ankylosing Spondylitis. *Clin Respir J*. 2017 Sep;11(5):593-601.
8. A Preliminary Report On p16 540 C > G, p16 580 C>T and MDM2 SNP309 Gene Variants in Bladder Cancer. Yenilmez EN, Ercan S, Gültekin Inal G, Verim L, **Turan S**, Kucukhuseyin O, Korkmaz G, Cacina C, Findik H, Ozgen O, Yaylım I. *Global Journal of Pathology and Microbiology*, 2017, 5, 1-7.
9. Isitmangil G, Gurleyik G, Aker FV, Coskun C, Kucukhuseyin O, Arıkan S, **Turan S**, Talu CK, Dogan MB, Farooqi AA, Yaylım I. Association of CTLA4 and CD28 Gene Variants and Circulating Levels of Their Proteins in Patients with Breast Cancer. *In Vivo*. 2016 Jul-Aug;30(4):485-93.
10. Coskun C, Verim A, Farooqi AA, **Turan S**, Mezani B, Kucukhuseyin O, Tolgahan Hakan M, Ergen A, Yaylım I. Are there possible associations between MnSOD and GPx1 gene variants for laryngeal cancer risk or disease progression? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016 Apr 30;62(5):25-30.
11. Korkmaz G, Horozoglu C, Arıkan S, Gural Z, Sağlam EK, **Turan S**, Özkan NE, Kahraman OT, Yenilmez EN, Düzköylü Y, Doğan MB, Zeybek U, Ergen A, Yaylım İ. LGALS3 and AXIN1 gene variants playing role in the Wnt/ β -catenin signaling pathway are associated with mucinous component and tumor size in colorectal cancer. *Bosn J Basic Med Sci*. 2016 Feb 4;16(2):108-13.
12. Yanar K, Çakatay U, Aydın S, Verim A, Atukeren P, Özkan NE, Karatoprak K, Cebe T, **Turan S**, Ozkök E, Korkmaz G, Cacina C, Küçüküseyin O, Yaylım İ. Relation between Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotypes and Oxidative Stress Markers in Larynx Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 Jan; (2):1-8.
13. İlhan M, Kahraman OT, **Turan S**, Turgut S, Karaman O, Zeybek U, Shukurov S, Yaylım I, Tasan E. Does DRD2 polymorphism influence the clinical characteristics of prolactinoma? *Ann Endocrinol (Paris)*. 2015 Oct;76(5):614-9.

14. Kucukhuseyin O, **Turan S**, Yanar K, Arikan S, Duzkoğlu Y, Aydın S, Cakatay U, Mezani B, Farooqi AA, Isitmangil GA, Kiran B, Cacina C, Yenilmez EN, Ergen A, Zeybek U, Yaylim I. Individual and Combined Effects of CTLA4-CD28 Variants and Oxidant-Antioxidant Status on the Development of Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2015 Oct;35(10):5391-400.
15. Cacina C, Pence S, **Turan S**, Genc F, Ozdemir H, Kafadar A, Kaynar MY, Yaylim I. Analysis of CASP8 D302H Gene Variants in Patients with Primary Brain Tumors. *In Vivo.* 2015 Sep-Oct;29(5):601-4.
16. Düzköylü Y, Arikan S, **Turan S**, Yaylim İ, Doğan MB, Sarı S, Ersöz F, Zeybek Ü, Timirci Kahraman Ö, Çelikel B, Erdem S. Possible relationship between the resistin gene C-420G polymorphism and colorectal cancer in a Turkish population. *Turk J Gastroenterol.* 2015 Sep;26(5):392-6.
17. Kafadar A, Küçüküseyin Ö, **Turan S**, Yenilmez EN, Tunoglu S, Zeybek U, Kaynar MY, Kemerdere R, Yaylim I. Distribution and Effects of CDKN2 p16 540 C>G and 580 C>T, and MDM2 SNP309 T>G Polymorphisms in Patients with Primary Brain Tumors. *Anticancer Res.* 2015 Jul;35(7):3933-42.
18. Cacina C, Arikan S, Düzköylü Y, Doğan MB, Okay E, **Turan S**, Yaylim I, Isbir T. Analyses of EGF A61G Gene Variation and Serum EGF Level on Gastric Cancer Susceptibility and Clinicopathological Parameters. *Anticancer Res.* 2015 May;35(5):2709-13.
19. Timirci-Kahraman O, Ozkan NE, **Turan S**, Farooqi AA, Verim L, Ozturk T, Inal-Gultekin G, Isbir T, Ozturk O, Yaylim I. Genetic variants in the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and death receptor genes contribute to susceptibility to bladder cancer. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015 Jun;19(6):309-15.
20. Ilhan M, Toptas-Hekimoglu B, Yaylim I, Turgut S, **Turan S**, Karaman O, Tasan E. Investigation of the vitamin D receptor polymorphisms in acromegaly patients. *Biomed Res Int.* 2015;2015:625981.
21. Nalkiran I, **Turan S**, Arikan S, Kahraman ÖT, Acar L, Yaylim I, Ergen A. Determination of gene expression and serum levels of MnSOD and GPX1 in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2015 Jan;35(1):255-9.
22. Verim A, **Turan S**, Farooqi AA, Kahraman OT, Tepe-Karaca C, Yildiz Y, Naiboglu B, Ozkan NE, Ergen A, Isitmangil GA, Yaylim I. Association between laryngeal squamous cell carcinoma and polymorphisms in tumor necrosis factor related apoptosis induce ligand (TRAIL), TRAIL receptor and sTRAIL levels. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(24):10697-703.
23. Fayyaz S, Yaylim I, **Turan S**, Kanwal S, Farooqi AA. Hepatocellular carcinoma: targeting of oncogenic signaling networks in TRAIL resistant cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2014 Oct;41(10):6909-17.

24. Verim L, Timirci-Kahraman O, Akbulut H, Akbas A, Ozturk T, **Turan S**, Yaylim I, Ergen A, Ozturk O, Isbir T. Functional genetic variants in apoptosis-associated FAS and FASL genes and risk of bladder cancer in a Turkish population. *In Vivo*. 2014 May-Jun;28(3):397-402.
25. Dalan AB, Timirci-Kahraman O, **Turan S**, Kafadar AM, Yaylim I, Ergen A, Gormus U, Gulec-Yilmaz S, Kaspar C, Isbir T. Association between FAS and FASL genetic variants and risk of primary brain tumor. *Int J Neurosci*. 2014 Jun;124(6):443-9.
26. Verim A, Ozkan N, **Turan S**, Korkmaz G, Cacina C, Yaylim I, Isbir T. Association of the Cylin D1 G870A polymorphism with laryngeal cancer: are they really related? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(12):7629-34.
27. Zeybek U, Yaylim I, Ozkan NE, Korkmaz G, **Turan S**, Kafadar D, Cacina C, Kafadar AM. Cyclin D1 gene G870A variants and primary brain tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(7):4101-6.
28. Tuna G, Küçükhüseyin O, Arıkan S, Kaytan Sağlam E, Güler E, Cacina C, Oztop O, **Turan S**, Korkmaz G, Yaylim I. Do CDKN2 p16 540 C>G, CDKN2 p16 580 C>T, and MDM2 SNP309 T>G gene variants act on colorectal cancer development or progression? *DNA Cell Biol*. 2013 Jul;32(7):400-8.
29. Toptaş B, Kafadar AM, Cacina C, **Turan S**, Yurdum LM, Yiğitbaşı N, Gökçe MO, Zeybek U, Yaylim I. The vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in Turkish brain cancer patients. *Biomed Res Int*. 2013;2013:295791.
30. Verim L, Toptaş B, Ozkan NE, Cacina C, **Turan S**, Korkmaz G, Yaylim I. Possible relation between the NOS3 gene GLU298ASP polymorphism and bladder cancer in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(2):665-8.
31. Yıldız Y, Yaylim I, Ozkan N, Arıkan S, **Turan S**, Kucucuk S, Coskunpinar E, Isbir T Bax promoter G (– 248)A polymorphism in a Turkish clinical breast cancer patients: A case-control study. *AJMB*> Vol.3 No.1, January 2013.
32. Yaylim İ, Ozkan NE, **Turan S**, Korkmaz G, Yıldız Y, Cacina C, Toptaş B, Arıkan S. sTRAIL Serum Levels and TRAIL 1595 Genotypes: Associations with Progress and Prognosis of Colorectal Carcinoma *Journal of Cancer Therapy*, 2012, 3, 941-947.

ULUSAL POSTERLER

1. Amonyum Bikarbonatın Kütle Spektrometresi Protein Profili Verimliliğine Etkisi. Mustafa G. Sürmen, **Saime Sürmen**, Orhan Çakan, Sadrettin Pençe, İlhan Yaylım, Abdullah Karadağ, Nesrin Emekli. 2. Ulusal Proteomik Kongresi, 24-25 Kasım 2017, İstanbul.
2. Entegre Omiks Yaklaşımı İle Biyobelirteç Tabanlı Akciğer Kanseri Erken Tanı Sistemi (Sözlü Bildiri; II. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu “Biyobelirteçler” Turk J Biochem Dergisi Özel sayısı: Vol 42, Mayıs 2017, İzmir.
3. Ekstrasellülmatriks Ve Metalloproteinazlar Kolorektal Kanseri Hastalarda Konneksin Ve E-kaderin Gen Anlatımlarının Ve Serum Selenyum Düzeyinin İncelenmesi (II. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu “Biyobelirteçler” Turk J Biochem Dergisi Özel sayısı: Vol 42, Mayıs 2017, İzmir.
4. Meme Kanseri Hastalarında TGF-B1 Ve HER2 Gen Varyantları Ve TGF-B1 Serum Düzeyleri. Emel Zelal Erkişi Kardas, Soykan Arıkan, **Saime Turan**, Özlem Timirci Kahraman, Özlem Küçükhüseyin, Canan Cacına, Hayriye Arzu Ergen, Mehmet Baki Doğan, Turgay İsbir, İlhan Yaylım. 27. Ulusal Biyokimya Kongresi, Turk J Biochem Dergisi Özel sayısı: Vol 40, 3-6 Kasım 2015, Antalya.
5. miR-373 ve Hedef Transkript E-Cadherin ekspresyon seviyelerinin larinks kanserinde incelenmesi. Özlem Timirci-Kahraman, Ayşegül Verim, **Saime Turan**, Nazlı Ezgi Özkan, Gurbet Korkmaz, İlhan Yaylım. 7. DETAE Günleri, 11-12 Kasım 2015, İstanbul.
6. Galektin-3 Genine ait rs4644 ve rs4652 Polimorfizmlerinin Larinks Kanseri Gelişimi ve Prognozu Üzerine Etkisinin İncelenmesi. **Saime Turan**, Ayşegül Verim, Gurbet Korkmaz, Roya Mashadiyeva, Sinem Demirbağ, Özlem Timirci-Kahraman, Brunilda Mezani, İlhan Yaylım. VI.DETAE Günleri, 24-25 Kasım 2014, İstanbul.
7. p16 ve MDM2 Genlerine ait Kritik Polimorfizmlerin Mesane Kanseri Riski ve Progresyonuna Etkisi. Ezgi Nurdan Yenilmez, **Saime Turan**, Özlem Küçükhüseyin, Levent Verim, Canan Cacına, Burcu Kaya, Özge Özgen, İlhan Yaylım. VI.DETAE Günleri, 24-25 Kasım 2014, İstanbul.
8. Sepsis olgularında Antioksidan Enzim Düzeylerinin İncelenmesi. Nazan Atalan, Leyla Acar, **Saime Turan**, Türkan Kudsioğlu, Nihan Yapıcı, Murat Acarel, Turgay İsbir, İlhan Yaylım Arzu Ergen Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Derneği 48. Ulusal Kongresi (TARK 2014) 25-29 Ekim 2014, Ankara
9. CTLA4 ve CD28 polimorfizmi Ankilozan spondilit hastalarında akciğer tutulumunu etkiler mi? TÜSAD 36. Ulusal Kongresi-Solunum 2014, 15-19 Ekim 2014, Çeşme İzmir
10. Lomber Disk Hernisinde Kritik Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi. İlhan Yaylım, Bahar Toptas, Bedia Ağaçhan, Hidayet Sarı, E. Hakan Eraltan, H. Arzu Ergen, Ş. Ümit Zeybek, Canan Cacına, Özlem Küçükhüseyin, Özlem Timirci Kahraman, **Saime Turan**, Ezgi Nurdan Yenilmez, Hami Alsaadoni, Turgay İsbir (Sağlıkta İnnovasyon, Üniversiteden Sanayiye Çalıştayı 16-17 Mayıs 2013 İzmir)

11. NOS3 Glu298Asp Gen Variantları ve Akciger Kanseri Riski Arasında Olası Bir İlişkinin Araştırılması
Akif Turna, **Saime Turan**, Arzu Ergen, Gurbet Korkmaz, Nazlı Ezgi Ozkan, Canan Cacina, Ender Coskunpinar, Yasemin Müsteri Oltulu, Umit Zeybek, İlhan Yaylım
12. Larinks Skuamöz Hücre Karsinomlu Hastalarda miR-373 Ekspresyonu Özlem Timirci-Kahraman, Aysegül Verim, **Saime Turan**, Nazlı Ezgi Ozkan, Gurbet Korkmaz, İlhan Yaylım XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2013, Kuşadası-Aydın.
13. Akciğer Kanseri Riski ile p16 ve mdm2 Gen Varyantlarının İncelenmesi. **Saime Turan**, Ezgi Nurdan Yenilmez, Akif Turna, Nazlı Ezgi Özkan, Gurbet Korkmaz, Elvin Hekimoğlu, Ender Coşkunpinar, Yasemin Müsteri-Oltulu, Kamil Kaynak, İlhan Yaylım Uluslararası Katılımlı 1. Hücre Ölümü Araştırma Kongresi 30 Ekim-3 Kasım 2013, Çeşme.
14. sTRAIL Düzeyleri ve TRAIL 1595 Genotipi: Kolorektal Kanseri Oluşum ve İlerlemesi ile Bağlantısı İlhan Yaylım, Nazlı Ezgi Ozkan, **Saime Turan**, Gurbet Korkmaz, Yemliha Yıldız, Canan Cacina, Bahar Toptaş, Soykan Arıkan (IV. Multidisipliner Kanseri Araştırma Kongresi, Bursa, Aralık 2012).
15. İleri Glikozilasyon Son Ürün Reseptörü RAGE -374 T/A Gen Polimorfizminin Larinks Kanseri Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması Özlem Küçük hüseyin, Ayşegül Verim, **Saime Turan**, Gurbet Korkmaz, Nazlı Ezgi Özkan, İlhan Yaylım, Hülya Yılmaz-Aydoğan (IV. Multidisipliner Kanseri Araştırma Kongresi, Bursa, Aralık 2012).
16. Kolorektal Kanseri Hastalarda EGF A61G Gen Varyasyonunun Araştırılması Canan Cacina, Soykan Arıkan, **Saime Turan**, N. Ezgi Özkan, Gurbet Korkmaz, Nihal Yiğitbaşı Yozgatlı, Ş. Ümit Zeybek, İlhan Yaylım (IV. Multidisipliner Kanseri Araştırma Kongresi, Bursa, Aralık 2012).
17. Larinks Kanseri Riski ve Prognozu Üzerinde Fas Ligand -844 T/C Gen Varyantı Etkisinin İncelenmesi. Özlem Timirci-Kahraman, **Saime Turan**, Nazlı Ezgi Özkan, Gurbet Korkmaz, Ayşegül Verim, İlhan Yaylım. (IV. Multidisipliner Kanseri Kongresi, 13-16 Aralık 2012, Bursa-İstanbul).
18. Mesane Kanseri Riski ve Prognozu Üzerinde Apoptoz ilişkili Fas-1377 G/A ve Fas Ligand-844 T/C Gen Varyantlarının Kombine Etkisinin İncelenmesi. Özlem Timirci Kahraman, Gurbet Korkmaz, **Saime Turan**, Nazlı Ezgi Özkan, Ümit Zeybek, Levent Verim, İlhan Yaylım, Turgay İsbir (10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-19-23 Aralık 2012 BURSA).
19. TRAIL 1595 C/T Polimorfizminin Mesane Kanseri Gelişimine Etkisinin İncelenmesi. Özlem Küçük hüseyin, Bahar Toptaş, Canan Cacina, **Saime Turan**, Gurbet Korkmaz, Nazlı Ezgi Özkan, Levent Verim, İlhan Yaylım. (4.DETAE Günleri, İstanbul, Kasım 2012).
20. Mesane Kanseri Prognozu Üzerinde Fas Ligand -844 T/C Gen Varyantı Etkisinin İncelenmesi. Özlem Timirci-Kahraman, Nazlı Ezgi Özkan, Gurbet Korkmaz, **Saime Turan**, Canan Cacina, Özlem Küçük hüseyin, Bahar Toptaş, Güldal İnal Gültekin, Levent Verim, İlhan Yaylım, Turgay İsbir. (IV.DETAE Günleri, 14-15 Kasım 2012, İstanbul).

21. Larinks Kanseri Gelişiminde TRAIL C1595T Gen Varyantı ve Serum Düzeyi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. Özlem Timirci-Kahraman, **Saime Turan**, Nazlı Ezgi Özkan, Gurbet Korkmaz, Ayşegül Verim, İlhan Yaylım. (IV.DETAE Günleri, 14-15 Kasım 2012, İstanbul).
22. p27 gen varyasyonlarının meme kanserli hastalarda incelenmesi. Cacina C, **Turan S**, Arikan S, Yaylım İ. (3.DETAE Günleri, 17-18 Kasım, İstanbul, EP29).

ULUSLARARASI POSTERLER

23. Analysis of MAPK 7 in Colorectal Cancer Risk. Canan Cacina, Soykan Arikan, Esra Kaytan Sağlam, Ümit Zeybek, Saime Turan, İlhan Yaylım. VI. International Congress of Molecular Medicine, 22-25 May, 2017, Istanbul, Turkey.
24. The PDL-1 Gene Expression Levels and Histopathological Characteristics of Non-Small Lung Carcinomas With EGFR Gene Mutations. VI. International Congress of Molecular Medicine, 22-25 May, 2017, Istanbul, Turkey.
25. Weight loss with bariatric surgery improves ischaemia modified albumin levels and oxidative status in morbidly obese patients. Adnan Yay, Muzaffer İlhan, Saime Turan, Umit Zeybek, Ozcan Karaman, İlhan Yaylım & Ertugrul Tasan. 17th European Congress of Endocrinology, 16-20 May 2015, Dublin-Ireland.
26. Manganese Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Genotypes in Laryngeal Cancer Patients. Turan S, Mezani B, Kucukhuseyin O, Ergen A, Verim A, Yaylım I. Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Oxidative Stress July 2-4,2015, Italy.
27. The Individual And Common Effect Of Ctl4 Plasma Levels And Ctl4 -318C/T Variants On The Development Of Colorectal Cancer Saime Turan, Ozlem Kucukhuseyin, Ezgi Nurdan Yenilmez, Soykan Arikan, Yiğit Düzköylü, Canan Cacina, Arzu Ergen, İlhan Yaylım (EACR-sponsored 2nd Anticancer Agents Congress: 23rd-25th April 2014, Bodrum, Turkey, P38.).
28. Nos3 Glu298asp And Vdr Taq1 Genetic Varants: Associations With Risk And Progression Of Breast Carcinoma. Rukset Attar, Soykan Arikan, Saime Turan, Yemliha Yıldız, İlhan Yaylım (17th Vitamin D Workshop. June 17th-20th 2014, Chicago,IL, ABD. p19).
29. Is there any relation between CDKN2 p16 and MDM2 variants and the development of primary brain tumors? Ali Kafadar, Ozlem Kucukhuseyin, Canan Cacina, Ezgi Nurdan Yenilmez, Saime Turan, Didem Kafadar, İlhan Yaylım (FEBS-EMBO 2014).
30. The Individual and Combined Effects of CTLA4-Cd28 variants and oxidant-antioxidant status on the development of Colorectal Cancer Saime Turan, Karolin Yanar, Soykan Arikan, Seval Aydın, Özlem Küçüküseyin, Ufuk Çakatay, Arzu Ergen, Ümit Zeybek, Canan Cacina, Yemliha Yıldız, İlhan Yaylım (5. Uluslararası Cell Membranes and Oxidative Stress Congress).

31. The TRAIL C1595T polymorphism is potential genetic marker of susceptibility to bladder cancer: a case-control study. O. Timirci-Kahraman, I.Yaylim, S.Turan, N.E. Ozkan, L. Verim, T.Ozturk, C. Cakalir, E.N. Yenilmez, T.Isbir. 9th International Conference of Anticancer Research, 06-10 September 2014, Greece.
32. A Possible Association Between Manganese Superoxide Dismutase Genotypes And Antioxidants Markers In Acromegaly Patients İlhan Yaylım, Brunilda Mezani, M.Muzaffer İlhan, Bahar Toptas, Sema Demirci Çekiç, Saime Turan, Gurbet Korkmaz, Nazlı Ezgi Ozkan, Ayse İrem Yasin, Seda Yüce, Ertugrul Tasan, H.Arzu Ergen, Reşat Apak (Workshop on Determining Antioxidants as Reactive Species Scavengers 27-28 Ekim 2014).
33. MNSOD Serum Levels And Genetic Variants: Possible Associations Between The Risk Of Colorectal Cancer And Oxidant-Antioxidant Status. Brunilda Mezani, Saime Turan, Leyla Acar, Roya Mashadiyeva, Soykan Arıkan, Yiğit Düzköylü, Özlem Küçük hüseyin, Arzu Ergen, İlhan Yaylım (Workshop on Determining Antioxidants as Reactive Species Scavengers 27-28 Ekim 2014).
34. Is There Any Correlation Between CDKN2 p16 and MDM2 Variants and the Non-Small Cell Lung Cancer? Akif Turna, Elvin Hekimoglu, Ezgi Yenilmez, Saime Turan, Ozlem Kucukhuseyin, Kamil Kaynak, İlhan Yaylım Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery. 23rd European Conference on General Thoracic Surgery 31 May-3 June 2015, Lisbon, Portugal. 21. 10.1093/icvts/ivv204.63.
35. A Possible Relation Between Survivin Gene Polymorphism and Acromegaly. Muzaffer İlhan, Saime Turan, Seda Turgut, Gurbet Korkmaz, Nazlı Ezgi Ozkan, Ozcan, Karaman, İlhan Yaylım, Ertugrul Tasan, 16th. International Congress of Endocrinology (ICE-ENDO) 21-24 June 2014, Chicago.
36. Investigation of the Vitamin D Receptor Polymorphisms in Acromegaly Patients. Muzaffer İlhan, Bahar Toptas-Hekimoglu, İlhan Yaylım, Seda Turgut, Saime Turan, Ozcan Karaman, Ertugrul Tasan. 16th. International Congress of Endocrinology (ICE-ENDO) 21-24 June 2014, Chicago.
37. Investigation of EGF A61G gene variation and serum EGF level on gastric cancer susceptibility and clinicopathological parameters. C. Cacina, S. Arıkan, Y. Düzköylü, E. Okay, S. Turan, T. Isbir, I. Yaylım. FEBS/EMBO Conference-Paris-2014.
38. Is there any relation between CDKN2 p16 and MDM2 variants and the development of primary brain tumors? A. Kafadar, O. Kucukhuseyin, C. Cacina, E. N. Yenilmez, S. Turan, D. Kafadar, E. Ozkok, I. Yaylım. FEBS/EMBO Conference-Paris-2014.
39. MnSOD and GPX1 gene expressions in colorectal cancer. Ihsan Nalkıran, Saime Turan, Leyla Acar, Soykan Arıkan, Ozlem Timirci Kahraman, İlhan Yaylım, Arzu Ergen V. International Congress of Molecular Medicine 20-22 Mayıs 2015 pp009.

40. The Effects of p16 540 C>G, p16 580 C>T and MDM2 SNP309 gene variants in bladder cancer risk and progression. Ezgi Nurdan Yenilmez, Saime Turan, Ozlem Kucukhuseyin, Levent Verim, Ahmad Ammad Farroqi, İlhan Yaylım V. International Congress of Molecular Medicine 20-22 Mayıs 2015 pp137.
41. The Effects of CTLA4 -Cd28 Genetic Variants and Serum Levels on the Development of Breast Cancer. Gulbu Isitmangil, Güven Gürleyik, Fügen Vardar Aker, Soykan Arikan, Özlem Küçükhüseyin, Saime Turan, Roya Meshediyeva, Sinem Demirbağ, Canan Cacina, Arzu Ergen, Brunilda Mezani, Nazlı Caner Yanık, İlhan Yaylım V. International Congress of Molecular Medicine 20-22 Mayıs 2015, İzmir pp138.
42. The Impact of serum EGFR levels on survival of resected patients with non-small cell lung cancer. Elvin Hekimoğlu, Büge Öz, İlhan Yaylım, Saime Turan, Arzu Ergen, Ümit Zeybek, Ender Coşkunpınar, Canan Cacina, Yasemin Müşteri Oltulu, Kamil Kaynak, Akif Turna 3rd Anticancer Agent Development Congress (EACR) 18-19 Mayıs 2015, İzmir pp070.
43. The effects of Calcitriol on Cell Survival Ratios In Colorectal (HCT116), Gastric (AGS) and Urinary Bladder carcinoma (ECV) cell lines. İlhan Yaylım, Özlem Küçükhüseyin, Saime Turan, Onur Temoçin, Mediha Süleymanoğlu, Damla Çelik, Emine Bilge, Buse Cevatemre, Engin Ulukaya, Serap Kuruca. 3rd Anticancer Agent Development Congress (EACR) 18-19 Mayıs 2015, İzmir pp070.
44. Obezlerde Bariatrik Cerrahi Sonrası Kilo Vermenin Anti-Müllerian Hormon Düzeyi Üzerine Etkisi. Mitat Büyükkaba, Özcan Karaman, Muzaffer İlhan, Saime Turan, Adnan Yay, Ümit Zeybek, İlhan Yaylım, Ertuğrul Taşan 37. TÜRKİYE Endokrinoloji Ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi, 6-10 Mayıs, 2015, Antalya p242.
45. A Possible Association Between Manganese Superoxide Dismutase Genotypes and Antioxidants Markers in Acromegaly Patients İlhan Yaylım, Brunilda Mezani, M.Muzaffer İlhan, Bahar Toptas, Sema Demirci Çekiç, Saime Turan, Gurbet Korkmaz, Nazlı Ezgi Ozkan, Ayse İrem Yasin, Seda Yüce, Ertugrul Tasan, H.Arzu Ergen, Reşat Apak. (12th International Conference on Oxidative Stress, Redox States & Antioxidants.3-4 June 2013, Paris).
46. Alterations in Key Cellular Regulator Genes and Their Combined Effects on Colorectal Cancer. Nazlı Ezgi Ozkan, Saime Turan, Gurbet Korkmaz, Canan Cacina, Hande Karagedik, Soykan Arikan, Esra Kaytan Sağlam, Gülay Tuna, Arzu Ergen, İlhan Yaylım. (12-14 June 2013 Systems Biology of Human Disease, Heidelberg).
47. Haplotype effects of Galectin-3 gene variants on colorectal cancer. G.Korkmaz, N.E.Ozkan, S.Turan, O.Timirci Kahraman, A.Ergen, E.Kaytam Sağlam, Y.Duzkoğlu, E.N.Yenilmez, S.Arikan, I.Yaylım. (The 5th EMBO Meeting 2013, 21-24 September 2013, Amsterdam B130).

48. The effects of Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) Gly82Ser variants on the formation of FRAP oxidant parameteres in laryngeal cancer patients. O. Kucukhuseyin, K. Yanar, E. Aygun, A. Verim, S. Turan, N.E. Ozkan, E.H. Karagedik, M.F. Seyhan, A. Ergen, O. Ozturk, U. Cakatay, S. Aydin, I. Yaylim. (The 5th EMBO Meeting, Advancing the Life Sciences, 21-24 September 2013, Amsterdam, A171).
49. TRAIL Gene Polymorphism Is Associated With The Risk Of Non-Small Cell Lung Cancer in Stage IIB-IIIB Patients. Turna A. Cacina C, Turan S, Ozkan NE, Toptas B, Kucukhuseyin O, Hekimoglu E, Kaynak K, Yaylim I. 21st European Conference on General Thoracic Surgery. Lomber Birmingham, UK, 26–29 May 2013.
50. Casp-8 D302H gene polymorphism and susceptibility to primary brain tumors Pence S Cacina C, Turan S, Genc F, Kafadar A, Kaynar MK, Yaylim-Eraltan I. (The Faseb Journal 2012:26:614.2, Experimental Oncology, April 21-25 , San Diago, CA).
51. Is there any relationship Casp-8 D302H Gene Variation and Colorectal Cancer risk. Pence S, Cacina C, Arıkan S, Turan S, Pence E, Genc F, Yaylim I. (The Faseb Journal 2012:26:ib95, Experimental Oncology, April 21-25 , San Diago, CA).
52. Relation of eNOS/NOS3 genotypes and oxidative stress markers in larynx cancer patients. U. Cakatay, N. E. Ozkan, K. Yanar, S. Aydin, S. Turan, G. Korkmaz, C. Cacina, K. Karatoprak, A. Verim, I. Yaylim. (July 6th - 11th 2013, Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013 “Mechanisms in Biology” St. Petersburg, RUSSIA).
53. TRAIL Gene Polymorphism and the risk of Non-Small Cell Lung Cancer in Turkish patients. Canan Cacina, Saime Turan, Nazlı Ezgi Ozkan, Akif Turna, Bahar Toptas, Ozlem Kucukhuseyin, Kamil Kaynak, İlhan Yaylım. (4-9 Eylül 2012 IUBMB FEBS Seville, SPAIN).
54. Investigation of P16 Gene Variants In Patients With Colorectal Cancer Gulay Tuna, Soykan Arıkan, Ozge Oztop, Canan Cacina, Esra Kaytan-Sağlam, Erkan Guler, Umit Zeybek, Ender Coskunpinar, Saime Turan, Melis Yurdum, İlhan Yaylım-Eraltan (EACR-Anticancer Agents Research Congress.13-16 October 2011,p48.).

GÖREV ALDIĞI EĞİTİM FAALİYETLERİ

- 2015 III. Moleküler Tıpta Kullanılan Teknikler Kursu, **Yardımcı Eğitimci** (İstanbul, 25-29 Mayıs)
- 2014 II. Moleküler Tıpta Kullanılan Teknikler Kursu, **Yardımcı Eğitimci** (İstanbul, 18-27 Aralık)
- 2014 Hastalıkların Moleküler Mekanizmaları – Hücre Ölüm ve Yöntemleri Araştırmaları Kursu, **Yardımcı Eğitimci**, (Bursa-14 Temmuz)
- 2014 Moleküler Tıpta Kullanılan Teknikler Kursu, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, **Yardımcı Eğitimci**, İstanbul (İstanbul -14 Nisan)

2014 Hastalıkların Moleküler Mekanizmaları – Hücre Ölüm ve Yöntemleri Araştırmaları Kursu, **Yardımcı Eğitmen**, (Bursa-12 Şubat)

2014 Hastalıkların Moleküler Mekanizmaları – Hücre Ölüm Yöntemleri Kursu, **Yardımcı Eğitmen**, (Bursa-10 Aralık)

2013 Hastalıkların Moleküler Mekanizmaları – Hücre Ölüm ve Yöntemleri Araştırmaları Kursu, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, **Yardımcı Eğitmen**, (İstanbul-10 Ekim)

2013 Hastalıkların Moleküler Mekanizmaları Hücre Kültürü Ve Nükleik Asit Araştırmaları Kursu, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, **Yardımcı Eğitmen**, (İstanbul 27 Mayıs)

2013 Uygulamalı Moleküler Genetik Kursu, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İ.Ü Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, **Yardımcı Eğitmen** (İstanbul 21-23 Ocak)

2012 Klinisyenler İçin Uygulamalı Moleküler Genetik Kursu İ.Ü Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, **Yardımcı Eğitmen** (İstanbul 22-24 Kasım)

2011 Klinisyenler İçin Uygulamalı Moleküler Genetik Kursu İ.Ü Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, **Yardımcı Eğitmen** (İstanbul 11-12 Ekim)

KATILMIŞ OLDUĞU EĞİTİM FAALİYETLERİ

2019 Thermo Q-Exactive Plus Orbitrap NanoLC-MS/MS cihazı Kullanım Deneyimi (İstanbul, Şubat-Ağustos)

2019 Uygulamalı Thermo Q-Exactive Plus Orbitrap NanoLC-MS/MS cihazı Eğitimi (İstanbul, Şubat)

2018 Uygulamalı Thermo Q-Exactive Orbitrap NanoLC-MS/MS cihazı Eğitimi (Kocaeli, Mayıs-Haziran-Temmuz)

2017 Uygulamalı Proteomik Eğitimi: Label-Free LC-MS/MS ve MALDI Imaging MS, **Katılımcı** (İstanbul, 20-23 Kasım)

2016 ICLASS-Xevo TQ-S Sistemi Kullanıcı Eğitimi, **Katılımcı** (İstanbul, 12-13 Ocak)

2016 MCLASS-SYNAPT G2-Si Sistemi Kullanıcı Eğitimi, **Katılımcı** (İstanbul, 10-11 Şubat)

2015 Sıvı Kromatografisi Modern Kolon Kimyası ve Kolonların Uygun Kullanımı, **Katılımcı** (İstanbul, 10-12 Aralık)

2015 Empower Yazılımı ve PDA-QDa Dedektörlü Waters Alliance HPLC Sistemleri Temel Kullanıcı Eğitimi **Katılımcı** (İstanbul, 8-9 Aralık)

2014 DNA Hasarı ve Onarımı ve Proteomiks Kursu **Katılımcı**, (İzmir-21-23 Ekim)

2013 Deney Hayvanları Kullanım Kursu (**Sertifika Programı**), Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul

KONGRE, SEMPOZYUM

- 2017 2. Ulusal Proteomik Kongresi- TUPA 24-25 KASIM
- 2014 VI. DETAE Günleri, İstanbul, 24-25 Kasım
- 2014 Workshop on Determining Antioxidants as Reactive Species Scavengers 27-28 Ekim 2014
- 2014 Deneyisel Tasarım ve Ön Biyoistatistik Sempozyumu, İstanbul Üniversitesi 29-30 Eylül 2014
- 2014 EACR-Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress: 23rd-25th April 2014, Bodrum, Turkey
- 2014 V. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi: 25-27 Nisan 2014, Bodrum, Türkiye
- 2012 IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi Uludağ Üniversitesi-Bursa 13-16 Aralık 2012
- 2009 İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kış Okulu
- 2008 Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Kongresi

ÖDÜL-TEŞEKKÜR BELGELERİ

“2016 Yılı Uluslararası Bilime Yapılan Katkı” dan Dolayı Teşekkür Belgesi İ.Ü. BAP (İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi)

“Mide Kanseri Riski ve Progresyonu Üzerine CTLA-4, CD28 Gen Varyantları ve Düzeylerinin Etkisinin İncelenmesi” Türk Biyokimya Derneği “Sivas Biyokimya Günleri 2016” 2-5 Kasım 2016, Cumhuriyet Üniv. Sivas

“CTLA4 ve CD28 polimorfizmi Ankilozan spondilit hastalarında akciğer tutulumunu etkiler mi?” TÜSAD 36. Ulusal Kongresi-Solunum 2014, 15-19 Ekim 2014, Çeşme İzmir

“2014 Yılı Uluslararası Bilime Yapılan Katkı”dan Dolayı Teşekkür Belgesi İ.Ü. BAP (İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi)

Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Lisans I. Ve II. Dönem Yüksek Onur Belgeleri. 2005-2006 Akademik yılı, Güz-Bahar yarıyılı.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

