

← 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 KANSERLERİNDE
ADAY BİYOBELİRTEÇLERİN KEŞFİ AMACIYLA POST
TRANSLASYONEL MODİFİKASYONLARIN
ARAŞTIRILMASI**

MUSTAFA GANİ SÜRMEN

**DANIŞMAN
PROF. DR SADRETTİN PENÇE**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi **Mustafa Gani SÜRMEN** tarafından **Prof. Dr.Sadrettin PENCE**'in danışmanlığında hazırlanan “**Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserlerinde Aday Biyobelirteçlerin Keşfi Amacıyla Post Translasyonel Modifikasyonların Araştırılması**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 25/11/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan FAYLIM
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri (Danışman)

Prof. Dr.Sadrettin PENCE
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Arzu ERGEN
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ
İst. Medipol Üni. Tıp Fak. Tıbbi
Biyokimya A.D.

Jüri

Prof. Dr. Erdoğan ÇETİNKAYA
Sağlık Bil. Üni. Hamidiye Tıp
Fak. Göğüs Hastalıkları A.D.

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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Mustafa Gani Sürmen (İmza)



İTHAF

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

TEŞEKKÜR

Doktora tez danışmanım saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Sadrettin Pençe'ye, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a, eğitimimizde emeği olan tüm kıymetli hocalarıma ve arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Derya Büyükkayhan Hocama ayrıca emeği geçen bütün fakülte hocalarıma ve çalışanlarına, proje çalışmalarında katkı sağlayan arkadaşlarıma, İstanbul Medipol Üniversitesinin değerli yöneticilerine ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Kocaeli Üniversitesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Murat Kasap ve Doç. Dr. Gürler Akpınar'ın çalışmalarımıza gösterdiği samimi ilgi ve desteklerini hiç unutmayacağım. Saygıdeğer hocalarıma ve laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Bazı özelliklerin bu kadar coşkun bir şekilde artık sadece halk kahramanlarının hikayelerinde kaldığını düşünüyordum. Bilim insanlığının yanında kalbinde bunca yıl güçlü bir şekilde ayakta tuttuğu adalet, cesaret, azim ve şevkat için öncelikle onları kendisine çokça verene sonrasında Prof. Dr. Nesrin Emekli Hocama şükranlarımı 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	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	3
2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi.....	4
2.3. Akciğer Kanserin Patolojik Sınıflandırması ve KHDak Alt Grupları	6
2.3.1. Adenokarsinom	7
2.3.2. Skuamöz Hücreli Karsinom	7
2.3.3. Büyük Hücreli Karsinom	8
2.3.4. Adenoskuamöz Karsinom	8
2.3.5. Sarkomatoid Karsinom	8
2.3.6. Nöroendokrin Tümörler	9
2.4. Akciğer Kanseri Karsinogenezi ve Moleküler Genetiği	9
2.5. Post-Translasyonel Modifikasyonlar	15
2.5.1. Glikozilasyon	15
2.5.2. Ubikitinasyon.....	16
2.5.3. Metilasyon.....	16
2.5.4. Asetilasyon.....	17
2.5.5. Fosforilasyon.....	17
2.6. Zenginleştirme Yöntemleri	20
2.6.1. IMAC (İmmobilize Metal Afinit Kromatografisi)	21

2.6.2. MOAC (Metal-Oksit Afinite Kromatografisi).....	22
2.6.3. SIMAC (SIMAC: Sequential elution from IMAC)	23
2.6.4. Antikor Temelli Afinite (Immünoafinite) Zenginleştirme.....	23
2.6.5. Kimyasal Türevlendirme.....	24
2.7. Kütle Spektrometresi ve Çalışma Prensipleri	24
2.7.1. Kütle Spektrometresi Parçalanma Türleri.....	26
CID (Collision Induced Dissociation).....	26
HCD (Higher Energy Collisional Dissociation):	27
ECD (Electron Captured Dissociation):.....	27
ETD (Electron Transfer Dissociation):	28
2.7.2. Kütle Spektrometresi Tarama Modları	28
Ürün İyon Taraması (Product ion scan):	28
DIA (Data independent Analysis):.....	29
Nötr Kayıp Taraması (Neutral-Loss Scan):	29
SRM/MRM ve PRM (Selected Reaction Monitoring/Multiple Reaction Monitoring, Parallel Reaction Monitoring):.....	29
2.8. Kütle Spektrometresi Tabanlı Fosfoproteomik.....	30
2.9. Proteomik Çalışmalarda Kullanılan KHDAK Biyolojik Örneklerine ait Özellikler ve Tespit edilen Biyobelirteçler	31
2.10. Kanser Alanındaki Fosfoproteomik Çalışmalar.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. GEREÇ	37
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeler ve Cihazlar.....	37
3.2. YÖNTEM	39
3.2.1. Örneklerin Tanımı ve Toplanması	39
3.2.2. Deney Tasarımı	39
3.2.3. Doku Homojenizasyonu ve Protein Ekstraksiyonu	39
3.2.4. Protein Miktarının Hesaplanması.....	40
3.2.5. Triptik Peptit Eldesi	40
3.2.6. Fosfopeptitlerin Zenginleştirilmesi	41
3.2.7. Nano Akış Sıvı Kromatografisi - MS/MS (NanoLC-MS/MS) Analizleri	41
3.2.8. Ham Verilerin İşlenmesi, İstatistiksel ve Biyoinformatik Analizler.....	42
3.2.9. Proteome Discoverer İstatistik Programıyla Verilerin İşlenmesi	43

3.2.10. PRM (Parallel Reaction Monitoring) Yöntemi ile Protein Doğrulamalarının Yapılması	44
3.2.11. Farklı biyoinformatik Yazılımlarla Verilerin Değerlendirilmesi.....	44
4. BULGULAR.....	46
4.1. NanoLC-MS/MS Analizine ait Veriler	46
4.2. İnformatik Analiz Sonrası Büyük Hücreli Karsinom Fosfoproteomik Profiline ait Veriler	47
4.2.1. Gen Ontoloji Analizi ile Fosfoproteinlerin Sınıflandırılması	54
4.2.2. Fosfoprotein İfade Farklılıklarının Değerlendirmesi	56
4.2.3. Fosfoprotein Sınıflandırmalarına ait veriler.....	61
4.2.4. Protein-Protein Etkileşim (Protein-Protein Interaction-PPI) Analiz Sonuçları	63
4.2.5. PRM Analiz Sonuçları	65
4.2.6. Forforilasyon Bölgelerine ait Veriler	74
5. TARTIŞMA	83
KAYNAKLAR	101
HAM VERİLER	120
FORMLAR	155
ETİK KURUL KARARI	157
PATENT HAKKI İZNİ	160
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	161
ÖZGEÇMİŞ	162

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) Karşılaştırması (25)	6
Tablo 3-1: Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	37
Tablo 3-2: Kullanılan Cihazlar	38
Tablo 3-3: LC-MS/MS Analiz Parametreleri	42
Tablo 3-4: Proteome Discoverer 2.2 Parametreleri	43
Tablo 4-1: Tümör Ve Kontrol Gruplarında Tanımlanan Fosfoprotein-Fosfopeptit Sayıları	47
Tablo 4-2: Grup içi Tanımlanan Toplam Fosforile Bölge Sayıları (Phosphosites)	51
Tablo 4-3: Büyük Hücreli Karsinomda Anlamlı İfade Değişimi Olan Fosfoproteinler .	58

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Bazı Ülkelere ait Cinsiyete Göre Akciğer Kanseri İnsidans Oranları.....	3
Şekil 2-2: En sık Görülen 10 Kansere Türünün Toplam Kanser İçindeki Yüzde Dağılımı.....	4
Şekil 2-3: Akciğer Kanseri Patogenezi Sürecinde Oluşan Temel Moleküler Düzensizlikler	10
Şekil 2-4: RAS Sinyal Yolağı.....	12
Şekil 2-5: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Moleküler Değişiklikler	14
Şekil 2-6: Sıklıkla Bildirilen Translasyon Sonrası Protein Modifikasyonları	19
Şekil 4-1: Total İyon Kromatogram Görüntüsü.....	46
Şekil 4-2: PRM Modunda Gerçekleştirilen Analiz Sonrasında Elde Edilen Total İyon Kromatogram Görüntüsü	47
Şekil 4-3: Her Bir Örnek Grubunda Ortak Tanımlanan Fosfoprotein Ve Fosfopeptit Sayıları	48
Şekil 4-4: Her Bir Olgunun Tümör Ve Kontrol Dokularında Ortak Fosfoprotein Sayıları	48
Şekil 4-5: Her Bir Olgunun Tümör Ve Kontrol Dokusundaki Fosfopeptit Zenginleştirme Verimlilikleri	49
Şekil 4-6: Gruplardaki Fosforile Aminoasitlerin Dağılımı	50
Şekil 4-7: Tanımlanan Fosfoproteinlerin Fosforile Bölge Sayısına Göre Yüzde Dağılımı	52
Şekil 4-8: Fosforile Bölge Sayısına Göre Tanımlanan Fosfoproteinlerin Örneklerdeki Dağılımı	53
Şekil 4-9: Fosfoproteinlerin Gen Ontoloji Analizi Sonrası Sınıflanlandırmaları	55
Şekil 4-10: Kontrol ve tümör doku örneklerinin fosfoprotein içeriklerine göre dağılımı	56
Şekil 4-11: Kat Değişimini Gösteren Volcano Plot Grafiği	57
Şekil 4-12: Örnek Konsantrasyonlarını Gösteren Kutu-Bıyık Grafiği	59
Şekil 4-13: Protein Abundans Farkı -Bar Grafikleri.....	60
Şekil 4-14: İfade Değişimi olan Fosfoproteinlerin Sınıflanlandırması.....	61
Şekil 4-15: Protein-Protein Etkileşim Ağı.....	64
Şekil 4-16: PRM Analiziyle Elde Edilen Caveolae-associated protein 2'ye ait Görseller	66

Şekil 4-17: Caveolae-associated protein 2'ye ait Fragment İyon Kromatogramları	67
Şekil 4-18: PRM Analiziyle Elde Edilen İzofom-2 Synaptopodin 2'ye ait Görseller ..	68
Şekil 4-19: İzofom-2 Synaptopodin 2'ye ait Fragment İyon Kromatogramları.....	69
Şekil 4-20: PRM analiziyle elde edilen Glycophorin-A Proteinine Ait Görseller	70
Şekil 4-21: Glycophorin-A Proteinine ait Fragment İyon Kromatogramları	71
Şekil 4-22: Cavin-2 ve Glycophorin-A Proteinlerine ait Isı Haritaları.....	72
Şekil 4-23: İzofom-2 Synaptopodin 2 Proteinine ait Isı Haritası	73
Şekil 4-24: Serin Fosforilasyonlarına Ait Motifler ve Dizi Logoları	75
Şekil 4-25: Treonin Fosforilasyonlarına Ait Motifler ve Dizi Logoları	77
Şekil 4-26: İfade Farklılığı Bulunan 38 Proteinin İlişkili Olduğu Kinazlar	79
Şekil 4-27: Kinaz Zenginleştirme Analizi	80
Şekil 4-28: CSNK2A1 Kinaz Proteini Tarafından Fosforillenen Proteinler	81
Şekil 4-29: Fosforilasyon Bölgeleri ve İlişkili Kinazlar	82

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BAL	Bronkoalveoler Lavaj
BHK	Büyük Hücreli Karsinom
Cav1	Caveolin-1
Cavin2	Caveolae-Associated Protein 2
Cdc7	Cell Division Cycle 7
CDK1	Siklin Bağımlı Kinaz 1
CID	Collision-Induced Dissociation
CSNK2A1	Kazein Kinaz Alfa
DDA	Data Dependent Analysis-Veri Bağımlı Edinim
DHB	2,5-Dihidroksibenzoik Asit
DIA	Data independent Analysis
DTT	Dithiothreitol
ECD	Electron Capture Dissociation
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
ER	Östrojen Reseptörü
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
ETD	Electron Transfer Dissociation
ETS	Çevresel Tütün Dumanı
FASP	Filter-aided Sample Preparation
FFPE	Formalinle Sabitlenmiş-Parafine Gömülü
HCD	Higher Energy Collisional Dissociation
HMGA1	High-Mobility-Group Protein HMG-I/HMG-Y
IAA	İyodoasetamid

IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IDA	İminodiasetik Asit
IMAC	İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi
IMT	Ion Match Tolerance
KEA	Kinaz Zenginleştirme Analizi
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dış Akciğer Kanseri
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LC	Liquid Chromatography-Sıvı Kromatografi
LOH	Heterozigosite Kaybı
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MCM2	Minikromozom Bakım Kompleksi 2
MOAC	Metal-Oksit Afinite Kromatografisi
MS	Mass Spectrometry-Kütle Spektrometresi
NTA	Nitrilotriasetik Asit
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PCA	Temel Bileşenler Analizi
PD	Proteome Discoverer
PKC	Protein Kinaz C
PPI	Protein-Protein Etkileşim
PRM	Parallel Reaction Monitoring
PSM	Peptit-Spektrum Eşleşmesi
PTM	Post-translasyonel Modifikasyon
RGC-32	Regulator of cell cycle - RGCC
SCX	Strong Cation Exchange
SIMAC	Sequential elution from IMAC

SYNPO-2	Synaptopodin 2
TCGA	Kanser Genom Atlas
TFA	Trifloroasetik asit
TKİ	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TKR	Tirozin Kinaz Reseptörü
TOF	Time of Flight



ÖZET

Sürmen, M.G. (2019). Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserlerinde Aday Biyobelirteçlerin Keşfi Amacıyla Post Translasyonel Modifikasyonların Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Günümüzde, kütle spektrometresi tabanlı proteomik yaklaşımlar hücrenin fizyolojik ve patolojik süreçlerinde meydana gelen farklılıkların tespit edilmesinde ve hastalıkların moleküler gelişiminin ve seyrinin aydınlatılmasında güçlü araçlar haline gelmiştir. Bu bakımdan, MS-tabanlı fosfoproteomik, kanser gelişimindeki düzensiz yolların ve fonksiyonel proteinlerin daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasında önemli bir rol üstlenmektedir.

Çalışmamızda küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının (KHDAK) nadir görülen bir alt tipi olan büyük hücreli karsinom (BHK) hastalarının kontrol ve tümör dokularına ait fosfoproteomik profillerin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Literatürde de çok az çalışmanın olduğu bu alt gruba ait hasta dokuları, ilk olarak etiketsiz görece kantifikasyona uygun olacak şekilde hazırlanmış ve sonrasında keşif modunda kütle spektrometresi analizleri yapılmıştır. Elde edilen fosfoproteomik profiller güçlü informatik programlar yardımıyla incelenerek anlamlı ifade farklılıkları ortaya çıkarılmıştır.

Böylece toplamda 2314 fosfoprotein tanımlanmış ve bunların 2194'ü yüksek güvenilirlikte kantifiye edilmiştir. En az iki kat ifade değişimi olan 324 fosfoproteinden 156'sı anlamlı olarak artmış ve 168'i azalmıştır. Bu fosfoproteinlerin bir kısmı doğrulaması yapılmak üzere seçilmiş ve hedefli proteomik yaklaşımla yeniden analiz edilmiştir. Bu sayede geleneksel yöntemlerden farklı olarak 70'in üzerinde protein hem çok kısa bir sürede hem de çok daha az bir maliyetle hassas bir şekilde incelenmiş ve gruplar arasındaki ifade farklılıkları doğrulanmıştır.

Bu çalışmayla ülkemizde ilk defa KHDAK alt grubu olan BHK hakkında detaylı fosfoproteomik veriler elde edilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma, BHK tümör dokularının kendi sağlıklı dokularına karşı incelendiği, hastalık ile ilgili önemli farklılıkların ortaya çıkarıldığı ve ifade değişimlerinin yine MS tabanlı bir yöntemle doğrulandığı ilk büyük ölçekli fosfoproteomik çalışmadır.

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

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

ABSTRACT

Surmen, M.G. (2019). The investigation of Post-Translational Modifications for the Discovery of Candidate Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer, İstanbul University, Institute of Healthy Science, Department of Molecular Medicine. Phd Thesis. Istanbul.

Nowadays, mass spectrometer-based proteomic approaches have become powerful tools for detecting differences in the physiological and pathological processes of the cell and for clarifying the molecular development and course of disease. In this respect, MS-based phosphoproteomics plays an important role in the elucidation of irregular pathways and functional proteins in cancer development in more detail.

In this study, we aimed to determine phosphoproteomic profiles in control and tumor tissues of patients with large cell carcinoma (LCC), a rare subtype of non-small cell lung carcinomas (NSCLC). The patient tissues of this subtype, where there are very few studies in the literature, were first prepared in accordance with the label-free relative quantification, and then mass spectrometry analyzes were performed in discovery mode. The obtained phosphoproteomic profiles were examined with the help of powerful informatics programs and significant expression differences were revealed.

Thus, a total of 2314 phosphoproteins have been identified and 2194 of them have been quantified with high confidence. Of the 324 phosphoproteins with at least two-fold changes in expression, 156 were significantly up-regulated and 168 were down-regulated. A number of these phosphoproteins were selected for validation and re-analyzed by targeted proteomic approach. In this way, unlike traditional methods, over 70 proteins were examined more precisely in a very short time and at a much less cost and the expression differences between the groups were verified.

In this study, for the first time in our country, detailed phosphoproteomic data about the LCC (and NSCLC) was obtained. To our knowledge, this is the first large-scale phosphoproteomic study, in which LCC tumor tissues were examined against their own healthy tissues, significant differences were revealed related to the disease and expression differences were verified with a MS-based method again.

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

The present work was supported by TUBITAK ARDEB 1003 project. Project No. 115S113/215S091

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri, dünya geneli kanser istatistik verilerine göre en sık teşhis edilen kanser türü olup tüm kanser vakalarının %11,6'sını oluşturmaktadır. Ayrıca 2018 yılı için tahmin edilen 1,8 milyon ölüm vakasıyla kansere bağlı ölümlerin başında yer almaya devam etmektedir (1). Hastalığın görülme sıklığı sigara alışkanlıklarındaki farklılıklar, yaş, cinsiyet, sosyoekonomik durum ve coğrafyaya göre büyük ölçüde değişkenlik gösterebilmektedir. Sigara içimi hastalığın en büyük nedeni olmasına rağmen akciğer kanseri ülkemizde de teşhis konulan en sık kanser türleri arasında yer almaktadır (2, 3). Akciğer kanseri hastalarının sağkalım oranları, akciğer kanseri evresi ile oldukça ilişkilidir. Bu nedenle, akciğer kanserinin erken tespiti için tanısal stratejilerin geliştirilmesi hastanın sağkalımını artırabilir. Çok sayıda histopatolojik alt grubu olan akciğer kanseri küçük hücreli ve küçük hücreli dışı olmak üzere iki ana sınıf altında toplanmaktadır. “Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom” olarak başlıca üç alt gruba ayrılan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), %85'lere varan görülme sıklığına sahiptir (4, 5). Akciğer tümörlerinin heterojenliği göz önünde bulundurulursa KHDAK alt grupları arasındaki moleküler ve genetik değişiklikler akciğer kanseri hastaları için farklı tedaviler ve sonuçlar anlamına gelebilir (6).

Hücresel sistemlerdeki biyolojik süreçler, büyük ölçüde proteinler tarafından gerçekleştirilir. Protein fonksiyonunun düzenlenmesi hücresel işleyişin ve doku bütünlüğünün korunması için gereklidir. Fosforilasyon, protein fonksiyonunu değiştirebilen geri dönüşümlü ve yaygın bir modifikasyondur. Kinazlar ve fosfatazlar tarafından sıkı kontrolü sağlanan fosforilasyon ve defosforilasyon olayları; hücre farklılaşması, hücre ölümü, proliferasyon, enzimatik aktivite, kemoterapötik ilaçlara direnç gibi çok sayıda hücresel işlemin düzenlendiği sinyal iletimi sürecinde önemli rol oynarlar (7, 8). Bu nedenle anormal fosforilasyonlar kanser gibi hastalıkların bir nedeni ya da sonucu olarak kabul edilir. Örneğin, protein kinaz fonksiyonlarının deregülasyonu, tümör oluşumu ve kanser ilerlemesinin başlangıcında yer almaktadır.

Bu moleküler anormallikler, bu ölümcül hastalık için tanısal, prognostik ve öngörücü biyobelirteçler olarak hizmet edebilir. Bu nedenle, fosfoproteomun karakterizasyonu, kanser tanısı ve tedavisi için yeni hedeflerin ve biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda fikir verebilir (8).

Kütle spektrometresi, tek bir süreçte binlerce özgün fosforilasyon olayını global olarak tespit etmenin ve ölçmenin etkin bir yoludur. Kanser hücre hatları ve doku lizatlarında yapılan kütle spektrometresi bazlı fosfoproteomik araştırmalar, anormal olarak aktive olan sinyal yollarında potansiyel ilaç hedeflerine yönelik güçlü öngörüler sağlar. Buna bağlı olarak bireysel tedavilerde tümör biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve kinaz inhibitörlerinin seçilmesine yardımcı olacak fosfoproteomik çalışmalar daha da önem kazanmaktadır (9, 10).

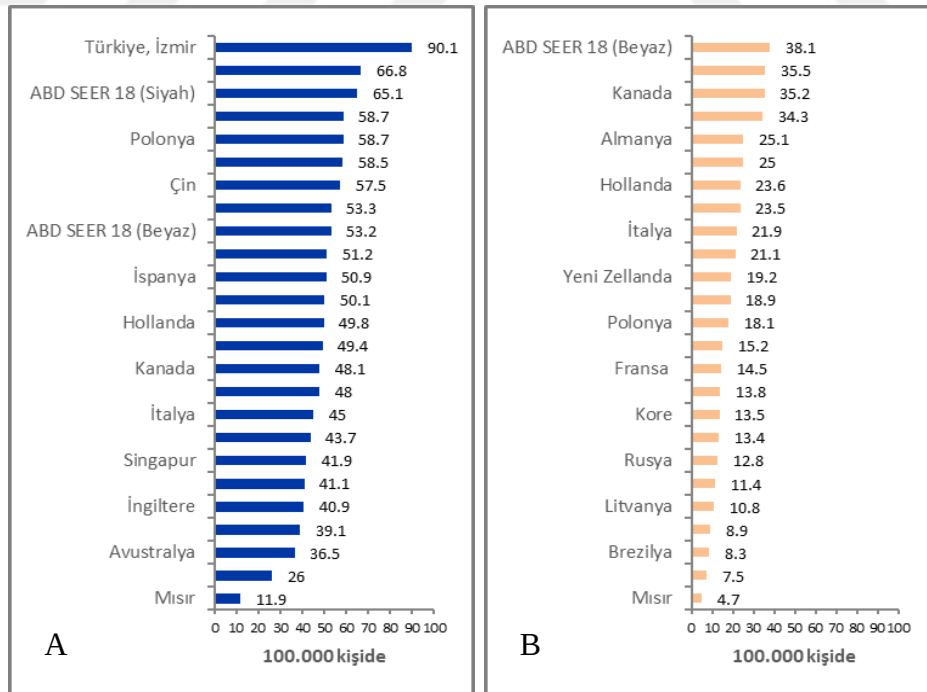
Güncel literatüre göre ülkemizde gerek KHDAK gerekse diğer hastalıklara dair insan dokularından büyük veri hacimli fosfoproteomik profiller ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dünya literatüründe ise büyük hücreli akciğer karsinomuna yönelik az sayıda moleküler çalışma bulunmakta ve bu çalışmaların önemli bir kısmı genetik tabanlı araştırmalardan oluşmaktadır. Gerek patolojik gerekse fizyolojik düzlemde hücresel faaliyetlerin daha kesin bir şekilde aydınlatılması için son ürün olarak protein profillerinin elde edilmesinin ayrı bir önemi bulunmaktadır. Bu nedenle yapılan genetik çalışmalarda proteomik ve özellikle de fosfoproteomik araştırmalara duyulan ihtiyaç vurgulanmaktadır (11, 12).

Bu bağlamda büyük hücreli karsinom teşhisi konmuş hastalardan alınan tümör ve aynı hastanın tümöral yapı içermeyen akciğer dokularında fosfoproteomik profil oluşturmak ve gruplar arasındaki farklılıkları tespit etmek çalışmamızın ana hedeflerinden birini oluşturmaktadır. Ayrıca anlamlı farklılığı tespit edilen proteinlerin yine MS tabanlı bir yöntemle doğrulamalarının yapılması ve fosforilasyon bölgeleri ile ilgili informatik analizlerinin yapılarak ilgili kinazların ve yolakların ortaya çıkarılması çalışmamızın diğer önemli hedefleri arasında yer almaktadır. Böylece elde edilen verilerin, protein kaynaklı biyobelirteçlerin tespit edilmesi sürecine önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

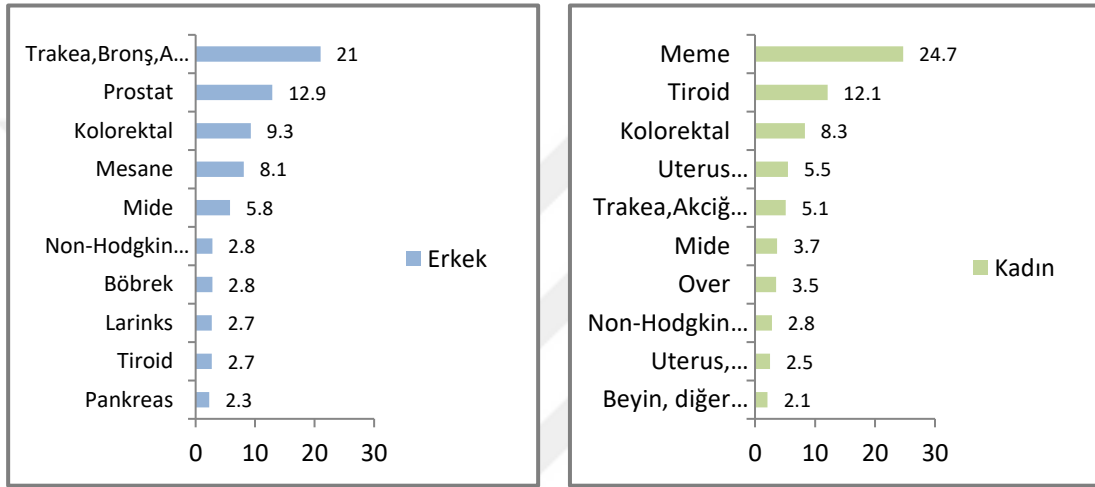
Akciğer kanseri; dünya genelinde ve ülkemizde en sık tanı alan kanser türleri arasında yer almaktadır. 184 ülkedeki başlıca kanser türlerine ait insidans ve ölüm oranlarının tahmin edildiği Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünya genelinde 2.1 milyon yeni akciğer kanseri vakası olduğu ve akciğer kanserinin tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %18.4'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir (1, 3). Hastalığın dünyadaki dağılımı, özellikle ülkelerin nüfus yaşı ve sosyoekonomik durumlarına göre değişkenlik gösterir. Orta-Doğu Avrupa, Doğu Asya, Avustralya-Yeni Zelanda ve Kuzey Amerika ülkeleri, akciğer kanserinin en fazla görüldüğü bölgelerdir. Avrupa ve Kuzey Amerika'daki yüksek insidans oranı, sigara kullanımıyla ilişkilendirilmektedir. Doğu Asya'da ise sigara ile birlikte kapalı hava kirliliği de akciğer kanserine yakalanma oranını etkilemektedir. Bununla birlikte tanısının genellikle geç evrelerde konduğu akciğer kanseri, her iki cinsiyette yüksek ölüm oranlarına sahiptir (2)



Şekil 2-1: Bazı Ülkelere ait Cinsiyete Göre Akciğer Kanseri İnsidans Oranları

(2003-2007) A. Erkek B. Kadın Şekilde En yüksek akciğer kanser insidans oranına sahip 25 ülkeden bazılarının isimleri yer almaktadır. Torre LA (2)'dan değiştirilerek.

2014 yılı kanser kayıt verileri ülkemizde yaklaşık 160 000 kişiye yeni kanser teşhisinin konulduğunu göstermektedir. Tüm kanser vakaları arasında akciğer kanserinin görülme oranı ise, ilk 10 kanser türü arasında erkeklerde birinci sıradadır. Kadınlarda, meme kanseri ilk sırayı alırken akciğer kanserinin görülme sıklığı ilk beş kanser türü arasında yerini almaktadır (Şekil 2-2). Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün verilerine göre trakea ve bronş yapıları da dahil edildiğinde akciğer kanseri insidansında 2002-2009 yılları arasında büyük bir artış gözlenirken, bu oran 2011 yılından itibaren nispeten azalmıştır (13).



Şekil 2-2: En sık Görülen 10 Kanser Türünün Toplam Kanser İçindeki Yüzde Dağılımı

Grafikler, 2015 yılı Türkiye'deki en sık görülen ilk 10 kanser türüne ait yüzde dağılımını göstermektedir (13).

2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Sigara, akciğer kanserinin ana etiyolojik faktörü olarak kabul edilir. Dünyada görülen akciğer kanseri vakalarının erkeklerde %80'i ve kadınlarda %50'si sigara ile ilişkilendirilmektedir (14). Sigara, akciğer kanseri gelişiminin temel nedeni olarak görülmesine rağmen her sigara içen akciğer kanseri olmadığı gibi hiç sigara içmeyen bireylerde de akciğer kanseri görülebilmektedir. Dünya genelinde akciğer kanserlerinin yaklaşık %10-25'i hiç sigara içmeyen, yani yaşamlarında 100'den az sigara içen bireylerde görülür. Hiç sigara içmeyen bireyler için, çevresel tütün dumanına (ETS) maruz kalma (özellikle kadınlarda) ve işyerlerinde kanserojen maddelere maruz kalma (özellikle erkeklerde) en önemli risk faktörleridir (15). Karsinojenler arasında en çok kanser ile ilişkilendirilenler; polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve sigara dumanına özgü N-nitrozaminlerdir (NNK: nicotine-derived nitrosamine ketone, NNN: N-nitrosornicotine) (16).

Akciğer kanseri gelişme riski cinsiyete bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin sigara içmeyen akciğer kanseri hastaları arasında kadınların baskın olması, hormonların rolü olduğunu düşündürmektedir. Östrojen reseptörleri (ER) α ve β , normal akciğer dokusuna kıyasla kanserli akciğer dokusunda daha sık eksprese edilirken, aksine progesteron reseptörleri kanserli dokuda daha az eksprese edilir (17, 18). Ailede akciğer kanseri öyküsünün olması özellikle kadınlarda ve sigara içmeyen bireylerde erken başlangıçlı akciğer kanseri için yüksek risk taşımaktadır (19).

Yapılan moleküler düzeydeki çalışmalar, sigara içme durumuna göre akciğer dokusunda görülen mutasyonların ve buna bağlı olarak histolojik tipin değiştiğini ortaya koymuştur. Mikroarray gen profillemesi çalışmaları, akciğer adenokarsinomlarının heterojen olduğunu ve sigara içenler ile hiç sigara içmeyenlerde kanser profillerinin farklı olduğunu göstermiştir (20, 21). PAH ilişkili olarak meydana gelen KRAS mutasyonları, genellikle sigara içenlerde yüksek oranda görülür. Benzer şekilde P53 mutasyon riski ile sigara içiminin lineer bir bağı olduğu söylenebilir. Bu gendeki mutasyonlar sürekli sigara içicilerine göre, hiç sigara içmeyen kişilerde oldukça nadirdir. Sigara kullanımıyla en sık ilişkili histolojik tipler küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve skuamöz hücreli akciğer kanseridir (21, 15).

Kişilerin önceden geçirmiş olduğu bazı akciğer hastalıklarının da akciğer kanserinin gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Akciğer dokusu üzerindeki inflamatuvar etkileri nedeniyle, olası risk faktörleri olarak kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), pnömoni, kronik bronşit ve tüberküloz gibi bazı akciğer hastalıkları araştırılmıştır. Amfizem ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı, sigara içimiyle ilişkili olarak yüksek risk artışına neden olur. Bununla birlikte astım ve kronik bronşit, sigaradan bağımsız olarak riski artırmaktadır. Akciğer parankimindeki idiyopatik pulmoner fibrozisin (IPF) yanı sıra sistemik otoimmün hastalıklara ve asbest maruziyetine bağlı fibrozis varlığı ya da fokal skarlaşma, risk artışına neden olabilmektedir. Mikobakterium tüberkülozis, insan papilloma virüsü (HPV) ve HIV'in neden olduğu birçok pulmoner ve sistemik enfeksiyon, akciğer kanseri riskinin artışı ile ilişkilendirilmiştir (22-24).

2.3. Akciğer Kanserinin Patolojik Sınıflandırması ve KHDAK Alt Grupları

Akciğer kanserinin çok sayıdaki alt grupları göz önüne alındığında, kapsamlı ve doğru bir tümör sınıflandırmasının geliştirilmesi, tedavi uygulamaları ve hastalığın seyri açısından büyük önem taşır.

Tablo 2-1: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) Karşılaştırması (25)

Özellik	KHAK (SCLC)	KHDAK (NSCLC)
Histoloji	Yetersiz sitoplazma, hiperkromatik nükleus, yaygın hücre tabakaları	Bol sitoplazma, belirgin nükleus, glandular ya da skuamöz yapı
Nöroendokrin Belirteçler Örn. elektron mikroskobu üzerinde yoğun çekirdek granüller; kromogranin, nöron spesifik enolaz ve sinaptofizin ekspresyonu	Genellikle var	Genellikle yok
Epitel Belirteçler Epitelyal membran antijeni, karsinoembriyonik antijen ve sitokeratin ara filamanları	Var	Var
Müsin	Yok	Adenokarsinomlarda var
Peptit hormon üretimi	Adrenokortikotropik hormon, antidiüretik hormon, gastrin-salgilayıcı peptit, kalsitonin	Skuamöz hücre karsinomunda Paratiroid hormon-ilişkili peptit (PTH-rp)
Tümör Baskılayıcı Gen Anormallikleri		
3p delesyonu	>%90	>%80
Rb mutasyonlar	≈%90	≈%20
P16/CDKN2A mutasyonlar	≈%10	>%50
P53 mutasyonlar	>%90	>%50
Baskın Onkogen Anormallikleri		
KRAS mutasyonlar	Nadir	≈%30 (Adenokarsinom)
EGFR mutasyonlar	Yok	≈%20 (Adenokarsinom sigara içicisi olmayan, kadın)
ALK Yeniden Düzenlenmeleri	Yok	%4-6 adenokarsinom, sigara içicisi olmayan, sıklıkla halka morfolojisine sahip olanlar
Kemoterapi ve Radyoterapiye Cevap	Genellikle tam cevap ancak tekrarlama olasılığı yüksek	Nadiren tam yanıt

Doğrulamalı histolojik tanı, hastalığın erken evresindeki patolojik dokunun cerrahi olarak çıkarılmasını öngörürken, patolojik sınıflandırma ve moleküler testler, ileri evre hastaların sağkalım sürelerini iyileştirmek üzere tümör tipine göre düzenlenmiş adjuvan tedavinin ve genotip temelli tedavi rejiminin belirlenebilmesini sağlar (5). Akciğer kanserinin iki ana grubunu oluşturan küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK) temel olarak histolojik, klinik ve nöroendokrin özelliklerine göre sınıflandırılırlar (Tablo 2-1) (25). KHAK, agresif davranışlı ve genellikle cerrahi müdahale dışındaki seçeneklerle tedavi edilmeye çalışılırken; KHDAK, cerrahi olarak tümör ve ilgili dokunun çıkarılmasıyla birlikte destek tedavi kombinasyonları uygulanarak tedavi edilmeye çalışılır. Prognostik önemi olan doku tiplerini tanımlamak için rezeksiyon örneklerinde daha ayrıntılı histolojik alt tiplere kullanılmaktadır. KHDAK vakalarındaki çeşitliliğin tanımlanabilmesi alt sınıflara ayrılarak incelenmesini sağlamıştır ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirli yıllarda mevcut sınıflandırmalar yayınlanmıştır. KHDAK; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere başlıca üç önemli histolojik tipte olabilmektedir (26, 27).

2.3.1. Adenokarsinom

Adenokarsinomlar, akciğer kanserlerinin %40'ından fazlasını, KHDAK vakalarının %60'ını ve cerrahi olarak rezeksiyon yapılan vakaların %70'inden fazlasını oluşturmaktadır. Diğer bir deyişle akciğer kanserinin en sık görülen türü adenokarsinomdur. Adenokarsinom tümörlerinde çoklu gen değişiklikleri meydana gelebilmektedir ve buna dayalı olarak sağkalım süresinin artırılmasında kabul görmüş moleküler hedefli tedaviler uygulanabilmektedir (5).

2.3.2. Skuamöz Hücreli Karsinom

Keratinize, nonkeratinize ve bazaloid alt tiplere ayrılan skuamöz hücreli karsinom, akciğer kanserlerinin %20'sini oluşturur. Alt tipler morfolojik olarak, keratinizasyon ve hücreler arası köprülerin varlığı ile tanınmaktadır. Aynı zamanda tümör kitlesinin merkezinde yerleşmiş inci benzeri keratinize odaklar görülebilir (26, 27). Tümörün morfolojik olarak ayrımının zor olduğu durumlarda p40, CK5 / 6, CK5 ve p63 gibi seçici skuamöz hücre biyobelirteçleri, skuamöz hücre diferansiyasyonunu göstermek için kullanılmaktadır (5).

2.3.3. Büyük Hücreli Karsinom

KHDAK vakalarının diğer alt gruplara kıyasla oldukça az bir kısmını oluşturan büyük hücreli karsinomlar, sadece cerrahi rezeksiyon ile belirlenir ve kötü prognoz gösterirler. Büyük hücreli karsinom, yıllar içerisinde görülme sıklığındaki düşüşlerle birlikte tüm akciğer kanserlerinin sadece %3'ünü teşkil eder duruma gelmiştir (26, 27). Son yıllarda büyük hücreli akciğer kanserlerinin insidansında gözlemlenen düşüşün nedeni olarak; henüz yeni sayılabilecek moleküler testlerin daha verimli bir şekilde uygulanmaya başlanması ve önceleri başka türler içinde sınıflandırılmadığından dolayı büyük hücreli olarak isimlendirilen kanserlerin artık farklı alt türler olarak değerlendirilmesi görülmektedir (5).

2.3.4. Adenoskuamöz Karsinom

Adenoskuamöz karsinom, skuamöz hücreli karsinom ile adenokarsinom hücrelerinin birlikte bulunduğu bir kanser türüdür. Tümörün adenoskuamöz karsinom olarak kabul edilmesi için histopatolojik olarak; hem ışık mikroskopisinde, hem de immünohistokimyasal olarak adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomdan kaynaklanan ikili bir popülasyonun varlığı gözlemlenmelidir. Genetik olarak da adenoskuamöz kanserler hem adenokarsinom hem de skuamöz hücreli karsinom özelliklerini yansıtmalıdır. Tüm akciğer kanseri türlerinin %0,4-4'ünü oluşturur (28).

2.3.5. Sarkomatoid Karsinom

Sarkomatoid karsinom morfolojik olarak farklılık gösteren pleomorfik karsinom, karsinosarkom ve pulmoner blastom, iğsi hücre ve dev hücre karsinom gruplarını içeren genel bir adlandırmadır. Tüm gruplar, akciğer kanserlerinin %1'den daha azını oluşturur. 2004 sınıflamasından bu yana bu tümörlerin terminolojisinde veya teşhis kriterlerinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Sarkomatoid karsinom tümörleri, sıklıkla tek tip hücrelerden oluşan bir tümör olmayıp heterojen akciğer tümörünün bir parçası olarak ortaya çıkar. Bir tümörün sarkomatoid olarak adlandırılabilmesi için histolojik görünümün ve tanıyı destekleyici belirteçlerin, tümörün belirli bir kısmının sarkomatoid bileşenleri içerdiğine işaret etmesi gerekir (27).

2.3.6. Nöroendokrin Tümörler

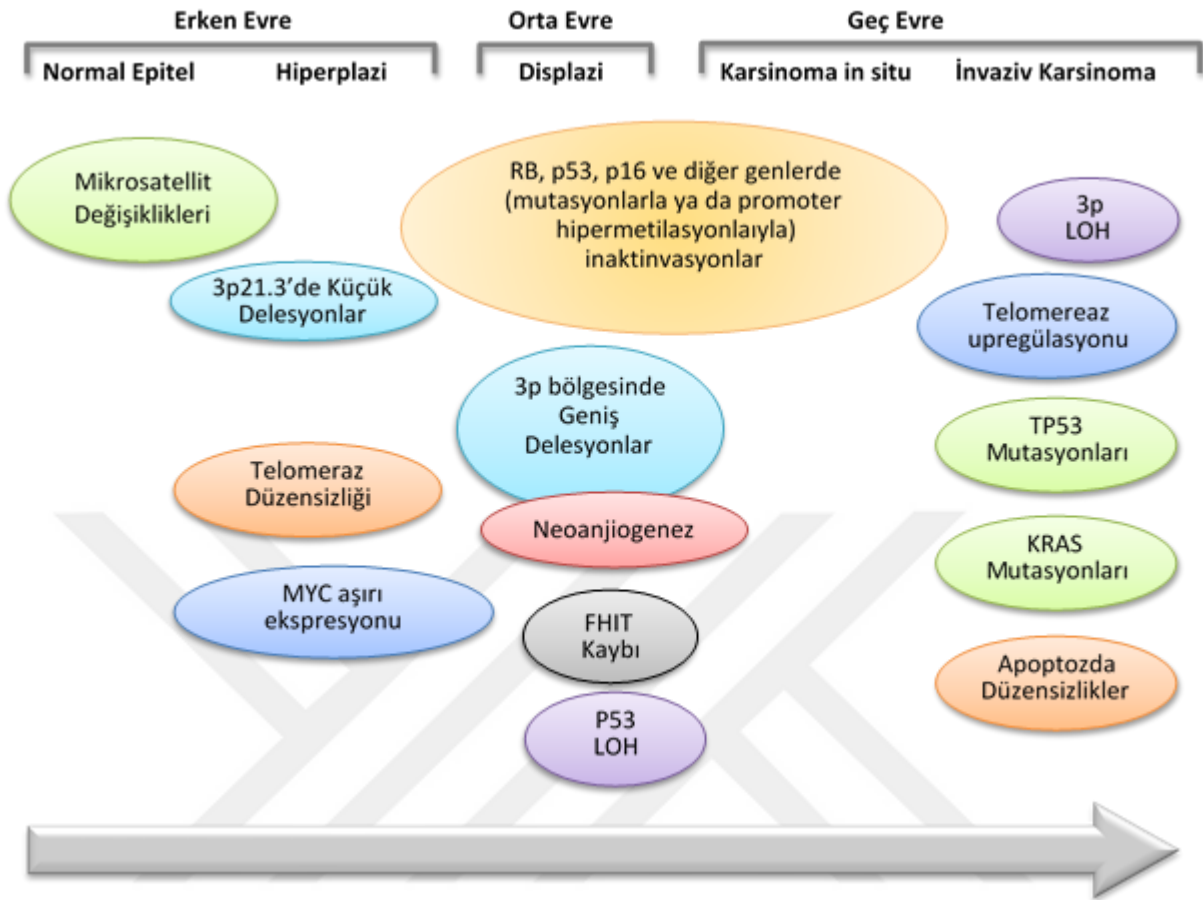
Nöroendokrin tümörler nispeten sık görülen akciğer tümörleridir. İyi diferansiye durumdaki nöroendokrin akciğer tümörleri bu gruba ait hemen hemen bütün karakteristik özellikleri üzerlerinde taşırlarken kötü diferansiye olanlar kısmen veya tamamen bu özelliklerden yoksundurlar. Bu gruba ait kanserlerde benzer olarak bulunan morfolojik ve immünohistokimyasal karakter diğer akciğer kanserlerinden belirgin farklılıklar göstermektedir. Nöroendokrin tümörlerin moleküler belirteçleri arasında sinaptofizin, CD56 ve kromogranin A öne çıkmaktadır. Akciğer nöroendokrin kanserleri, Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılına ait sınıflandırmasına göre küçük hücreli karsinom; büyük hücreli nöroendokrin karsinom ile tipik ve atipik karsinoidler şeklinde yeniden düzenlenmiştir (29, 5).

2.4. Akciğer Kanseri Karsinogenezi ve Moleküler Genetiği

Akciğer dokusunda tümör oluşumu, diğer malignitelerde olduğu gibi büyümeyi destekleyici proteinlerin aktivasyonu ile ilişkilidir. Malign epitelyal tümörler, solunum yolu epitel hücrelerinde bir dizi genetik ve epigenetik değişikliğin birikimiyle oluşur. Bu süreçte, tümör baskılayıcı genler, protoonkogenler ve DNA tamir genlerinde moleküler değişiklikler meydana gelir.

Bu moleküler değişiklikler doğrudan veya dolaylı olarak hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümü ile ilişkili sinyal iletim yollarında düzensizliklere yol açmaktadır. Alveollerde ve bronşlarda meydana gelen düzensizlikler özetle şu şekildedir:

- Proto-onkogenlerdeki mutasyonlara bağlı olarak büyüme sinyallerinde kendine yeterli olabilme
- Tümör baskılayıcı genleri etkileyen mutasyonların bir sonucu olarak antiproliferatif sinyallere duyarsızlaşma
- Antiapoptotik veya proapoptotik moleküllerin down-regülasyonu ya da up-regülasyonu ile apoptozdan kaçma
- Telomeraz aktivasyonu nedeniyle sınırsız replikatif bölünebilme,
- Anjiyogenez
- İnvazyon ve metastaz (30, 31)



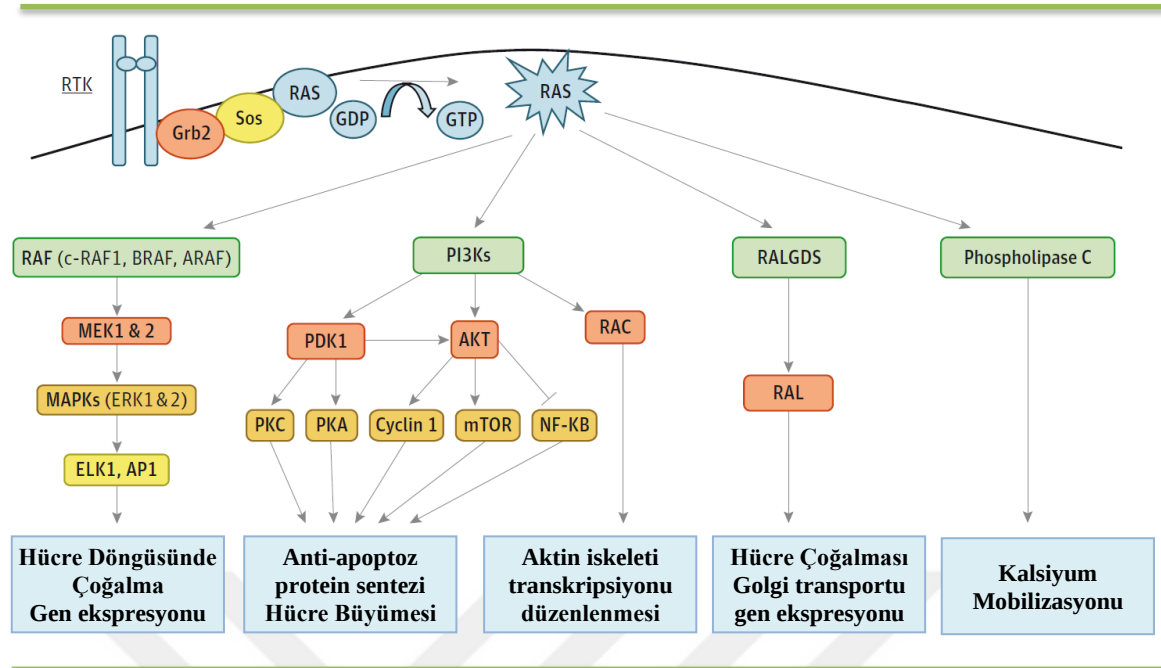
Şekil 2-3: Akciğer Kanseri Patogenezi Sürecinde Oluşan Temel Moleküler Düzensizlikler

Şekilde akciğer kanseri patogenezi tasvir edilmiştir. Çeşitli karsinojenler solunum epitelinin farklı bölgelerindeki hücrelerde 3p21.3 allelinin kaybına yol açar. Sonra 3p21.3 kromozom kolunda bulunan tümör baskılayıcı genler haplo-yetersiz hale gelir. Bir sonraki vuruş, mutasyonel inaktivasyon ya da promotör hipermetilasyonu ile RB, p53, p16 gibi hücre proliferasyonu için kritik role sahip genlerde meydana gelir. RB: Retinoblastoma, LOH: Heterozigosite kaybı. Panov S (31)'den değiştirilerek.

Akciğer kanseri, şimdiye kadar araştırılan birçok kanser türüne kıyasla yüksek sayıda mutasyon varlığı ile karakterizedir. Akciğer adenokarsinomlarının %50'sinden fazlasında normal hücrelerde transformasyona yol açarak hücrenin malign karakter kazanmasına neden olan sürücü mutasyonları (driver mutation) saptanmıştır. Mutant EGFR'nin bulunmasından bu yana, akciğer adenokarsinomlarında KRAS, BRAF, ALK, RET, NF1, HER2 (ERBB2), LKB1 (STK11), RIT1, ROS1, NTRK1 ve NRG genlerinde de sürücü mutasyonları saptanmıştır. Skuamöz hücreli akciğer kanserlerinde ise DDR2, PIK3CA, PTEN, AKT, FGFR, KEAP1 ve NFE2L2 mutasyonlarına daha sık rastlanmaktadır (32, 33, 34). KHDAK'nin tüm alt tiplerinde görülebilen sürücü mutasyonları kinaz genlerinde yaygındır.

Mutasyonlar, tirozin kinaz reseptörünün katalitik kinaz domainini kodlayan gen bölgesinde meydana gelir ve mutant proteinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu genlerin kodladığı tirozin kinaz reseptörleri (TKR), hücre içi ve hücreler arası sinyal iletim yollarının hayati düzenleyicileridir. Hücre dışında kalan kısımları ligand ile etkileşime girer ve reseptör konformasyonel değişikliğe uğrar. Reseptörlerin homo- veya heterodimerizasyonu sonrasında hücre içi kinaz bölgelerinde aktivasyon sağlanır. EGFR de hücre proliferasyonu, sağkalım, farklılaşma, invazyon ve metastaz gibi onkogenik fonksiyonların düzenlenmesinde yer alan tirozin kinaz reseptörlerindendir (35). EGFR hücre dışından gelen sinyalin iletimini PI3K/AKT/mTOR ve RAS/RAF/MAPK yolları aracılığıyla gerçekleştirir. Reseptörü kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar ve gen ekspresyon seviyesindeki artış, sinyal iletiminde düzensizliklere neden olur. Reseptörün tirozin-kinaz domainine etki ederek aktif formda kalmasına neden olan 18-21. ekzonlardaki mutasyonlar en yaygın EGFR mutasyonlarıdır. Ekzon 21'deki lösinin, arjinine dönüştüğü (L858R) nokta mutasyonu ve ekson 19'daki delesyonlar EGFR mutasyonlarının %90'ını oluşturur (36, 34).

RAS ailesinin bir üyesi olan KRAS ise (Kirsten rat sarkomu viral onkogen), akciğer adenokarsinomasında mutasyonların en sık görüldüğü proto-onkogendir. Mutasyonlar; çoğu durumda glisin, sitozin (G12R) veya valin (G12V) ile yer değiştirmesine neden olur ve KRAS'ın aktif durumda kalmasını sağlar. RAS protein sinyalleri, RAF'ı ve ardından MEK ailesi üyelerinin fosforilasyonunu sağlayarak EGFR de dahil olmak üzere birçok tirozin kinaz reseptörünün sinyal iletimine etki eder (37).

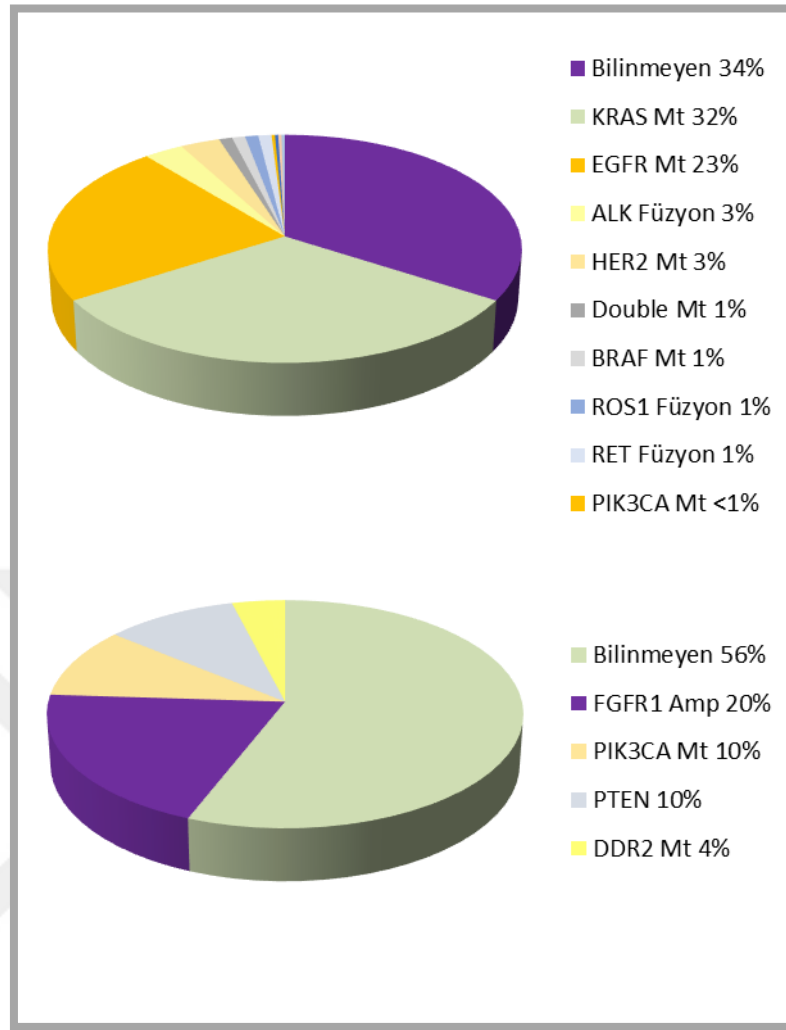


Şekil 2-4: RAS Sinyal Yolağı

Reseptör tirozin kinaz aktivasyonundan sonra, reseptör, adaptör protein GRB2'ye bağlanır. GRB2 daha sonra SOS1 ve 2'ye bağlanır. GDP'nin, GTP'ye dönüşmesiyle RAS aktif formunu alır. Aktif hale gelen RAS çok sayıda efektör aile ile etkileşime girer. MAPK: Mitojenle aktive edilen kinaz, PI3Ks: Fosfoinositid 3-kinaz, PDK1: Fosfoinositid-bağımlı kinaz-1, PKC: Protein Kinaz C. Wood K (37)'dan değiştirilerek.

EGF ve onkojenik KRAS'ın güçlü aktivatör olduğu PI3K/AKT/mTOR yolağı hücre sağkalımı, metabolik aktivite, adezyon ve anjiyogenez gibi büyüme ile ilgili hücresel olaylarda sinyal iletimini sağlayan başlıca yolaklardan biridir. Akciğer kansinogenezinde EGFR, KRAS, PI3K veya AKT'deki mutasyonların yanı sıra PIK3CA kopya sayısındaki artış da dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla PI3K/AKT/mTOR yolağının düzensiz aktivasyonu gerçekleşir. Aktive edici mutasyonlar ve PIK3 geninin amplifikasyonu liganttan bağımsız olarak yolağın aktivasyonuna sebep olur. EGFR reseptörünün hücre içinde yer alan kinaz domaini, PIP2'yi fosfatlayarak lipid mediyatör olan PIP3'e dönüşmesini sağlar. Tümör baskılayıcı protein ve aynı zamanda lipid fosfataz olan PTEN, PIP3'ü defosforile ederek yolağın sinyal iletiminde negatif düzenleyici olarak rol oynar (38, 39).

Büyümeği teşvik edici proteinlerdeki aktivasyon değişikliği ile birlikte tümör süpresör proteinlerdeki fonksiyon kayıpları da karsinogeneze katkı sağlamaktadır. PTEN'in tümör baskılayıcı fonksiyonunun inaktivasyonu, ligand bağlanmasından bağımsız olarak AKT/protein kinaz B'nin sürekli aktivasyonuna yol açar (39). Tümör baskılayıcı genin inaktivasyonuna iki allelin kaybı neden olur. İlk allelin kaybı “heterozigosite kaybı” (LOH: Loss of heterozygosity) ile, ikinci allelin kaybı ise mutasyonlar ya da epigenetik susturma nedeniyle olabilir. Akciğer kanserinde TP53, retinoblastom 1 (RB1), p16 (INK4A), serin/treonin kinaz 11 (STK11), CDKN2A, FHIT, RASSF1A ve PTEN genlerinin inaktive olduğu tespit edilmiştir. Bunlar arasında TP53 (17p13), RB (13q12), p16 (9p21), ve PTEN (10q22) allel kayıplarının yaşandığı tümör baskılayıcı genlerdir (40-42). Somatik yavru hücrelerde genetik hasarın birikimini önleyen p53, allel kaybına neden olan mutasyonların en sık rastlandığı, tümör baskılayıcı gendir. Bu gendeki mutasyonlara, skuamöz hücre karsinomunun metaplazi ve displazi kadar erken safhalarında rastlanırken, aynı mutasyonlar adenokarsinomun ileri safhalarında görülür ve invaziv gelişimin ortaya çıkması aşamasında belirgin olarak artar. P53 genindeki fonksiyon kaybı adenokarsinom KHDAK olgularının yarısında gözlenir. Bununla birlikte tümör baskılayıcı olarak nitelendirilen hücre döngüsü proteinlerinden p16 da skuamöz tip KHDAK olgularının %80'inde inaktivedir (43). Sürücü mutasyonları dışında ALK, ROS1, RET ve NTRK genlerinin yeniden düzenlenmeleri (rearrangements) ve buna dayalı bir şekilde oluşan füzyon proteinleri tümör gelişiminde önemlidir. Özetle, akciğer kanserinde meydana gelen genetik değişiklikler arasında KRAS ve EGFR'deki mutasyonlar en yüksek frekansa (%10-32) sahiptir. KRAS ve EGFR mutasyonlarını takiben ROS1, ALK ve RET translokasyonları ve HER2, MET amplifikasyonları %0.9-2.2 arasında değişen sıklıklara sahiptirler. Çok sayıda yapılan kapsamlı genomik çalışmalara rağmen KHDAK hastalığındaki moleküler değişikliklerin büyük bir kısmı hala bilinmemektedir (33).



Şekil 2-5: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Moleküler Değişiklikler

Memorial Sloan Kettering Cancer Merkezi'nde bir analiz kombinasyonu kullanılarak yapılan KHDAK'nin moleküler tanısal testlerinden elde edilmiştir. Akciğer adenokarsinomları (üstte) için Sanger dizilimi, IHC, FISH, multiplex hotspot mutasyon testi ve çoklu boyutlandırma deneyleri ve skuamöz hücreli karsinomlar (altta) için hedefli yeni nesil dizileme testleri kullanılmıştır. Mt: mutasyon, Amp: amplifikasyon. Naidoo J (44)'den değiştirilerek.

2.5. Post-Translasyonel Modifikasyonlar

Biyolojik sistemler, hücrel mekanizmalarda koordineli olarak fonksiyon gösteren proteinler sayesinde hızla değişen çevreye uyum sağlarlar. İnsan genomunda 20.000-25.000 arasında protein kodlayan gen ortaya çıkarılmıştır (45). Bununla birlikte insan proteomu, izoform varyasyonları ve translasyon sonrası değişiklikler (PTM'ler) nedeniyle çok daha karmaşık ve çeşitlidir. Memeli post-translasyonel modifikasyonları (PTM'ler) için hazırlanmış bir bilgi bankasında fosfo, asetil, ubikitil ve metil grupları da dahil olmak üzere, 330.000'in üzerinde PTM bölgesi rapor edilmiştir (46). Prasad TSK ve arkadaşlarının çalışmaları temel alınarak dizayn edilen bir veri tabanında (Human Protein Reference Database; http://hprd.org/index_html) 30000'den fazla protein ve 90000'den fazla PTM tespitine yer verilmiştir (47). Translasyon sonrasında proteinler, dizilerinin bir bölümü çıkarılıp uzaklaştırılarak ya da bir veya daha fazla amino aside modifiye edici grubun kovalent olarak eklenmesi/çıkarılması yoluyla modifiye edilirler. PTM'ler bir proteinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini, hücredeki lokalizasyonunu, katalitik aktivitesini, kararlılığını veya diğer moleküllerle kompleks oluşturma özelliğini değiştirebilmektedir. PTM'leri tanımlamak, hücre biyolojisinin anlaşılmasında ve hastalıkların altında yatan moleküler bozuklukların saptanması ve tanımlanması hakkında kapsamlı veriler elde etmek için önem taşır. PTM'ler kalıcı olabildiği gibi birçoğu da düzenlenebilir ya da geri dönüşümlüdür. Fosforilasyonlar geri çevrilebilir özellikleri sayesinde protein aktivitesini değiştirerek hücre içi ve hücre dışı sinyal iletiminde anahtar benzeri bir role sahiptirler. Fosforilasyon başta olmak üzere glikolizasyon, ubikitinasyon, asetilasyon ve metilasyon en yaygın görülen PTM türleridir (Şekil 2-6) (48).

2.5.1. Glikozilasyon

Kısa zincirli karbonhidrat yapılarının (oligasakkaritler ya da glikanlar) enzimatik ya da enzimatik olmayan yollarla proteinlere eklendiği kovalent modifikasyonlardır. Hücredeki tüm proteinlerin yaklaşık yarısı, plazma proteomunun ise yaklaşık %70'i glikolize olur (49). Heksozların; asparagin, arginin, serin, treonin, prolin, hidroksiprolin, triptofan ve tirozin kalıntılarıyla oluşturduğu kombinasyonlar protein çeşitliliğini muazzam ölçüde artırır.

Şeker-peptit bağının ve bağlı oligosakkaritin yapısına göre glikolizasyonlar; O-glikolizasyon, N-glikolizasyon, C-glikolizasyon gibi spesifik gruplara ayrılabilir. O-glikozile edilmiş proteinler serin ve treonin üzerinde modifiye edilirken N-glikozilasyonda asparagin, C-glikozilasyonda ise triptofan hedef alınır (50, 51).

O-glikolizasyon ve N-glikolizasyon yaygın modifikasyonlar olup proteinlerin uygun hücre konumuna yönlendirilmesinde, doğru katlanmalarında, proteolizden korunmasında, adezyon ve hücre-hücre etkileşimlerinde rol alırlar (51-53). Düzensiz glikozilasyon; nörodejeneratif hastalıklar, bağışıklık sistemi bozuklukları ve kanser türleri ile ilişkilendirilmektedir (54-56). Örneğin bir glikoprotein olan Prostat spesifik antijen (PSA), prostat kanseri taramalarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (57).

2.5.2. Ubikitinasyon

Ubikitinasyon, proteozom aracılı degradasyonda ve protein döngüsünde belirleyici rol oynayan tranlasyon sonrası modifikasyondur. Ubikitin, C-ucunda Arg-Leu-Arg-Gly-Gly dizisini içeren 76 amino aminoasitlik bir proteindir. Poliubikitin zincir oluşumunu sağlayan yedi lizin kalıntısı da, ubikitin dizisinin karakteristik özelliklerindendir. Ubikitin aktive edici (E1), ubikitin konjüge edici (E2) ve bağlayıcı (E3) enzimleri son glisin aracılığıyla ubikitinin, hedef proteinlerdeki lizin kalıntısının alfa-amino grubuna kovalent olarak bağlanmasını sağlar. Ubikitin ile modifiye olmuş bir proteinin triptik sindirimi sonrasında Gly-Gly (114Da) fragmenti oluşur. MS/MS analizi ile ubikitinasyon bölgesinin saptanmasında bu iki glisin kalıntısının neden olduğu kütle değişiminden faydalanılır (58, 59).

2.5.3. Metilasyon

Substrat olarak S-adenosilmetiyonini kullanan metil transferaz enzimlerinin kataliziyle gerçekleşen protein metilasyonları çoğunlukla lizin ve arginin kalıntılarında gerçekleşir. Lizin metilasyonu, S-adenozil-metiyoninden (SAM), lizin ϵ -amin yan zincirine bir ila üç metil grubunun aktarılmasıyla monometil, dimetil veya trimetillenmiş lizinler meydana gelmesi ile gerçekleşir. Arjinin metilasyonunda ise mono- veya dimetilasyona neden olan bir ya da iki metil grubu eklenir. Bununla birlikte histidin, sistein, aspartik asit, glutamik asit, serin ve treonin aminoasitlerinde metilasyon görülebilmektedir (60). Protein metilasyonları anti-metillizin ve anti-metilarjinin antikorları kullanılarak westernblot ile tespit edilebilmektedir.

Metilasyon bölgelerinin daha geniş ölçekli analizi için ise aminoasitlerin hücre kültüründe ağır metil stabil izotop ile etiketlendiği hmSILAC yöntemi geliştirilmiştir (61, 62).

2.5.4. Asetilasyon

Asetilasyon, hücre içerisindeki, protein seviyesinde olduğu kadar metabolom seviyesinde de çeşitli etkilere sahip olan translasyon sonrası protein modifikasyonlarından biridir. Asetil-koenzim A'dan alınan asetil grubu, proteinlerin N-terminal (Nt) ucunun α -amino grubuna ya da lizin kalıntısının ϵ -amino grubuna bağlanır. Bir asetil grubunun bu aminlere bağlanması, proteini deprotonize ederek karakteristik pozitif yüklerini nötr hale getirir ve Nt ucunun daha fazla modifikasyona uğramasını engeller. Asetilasyonlar, Nt-asetiltransferaz (NAT), Lizin asetiltransferazlar (KAT) ve deasetilaz enzimler (KDAT/NDAT) tarafından düzenlenir. Nt-asetilasyonları, proteinlerin özellikle DNA ile etkileşiminde önemli bir role sahiptirler ve kromatin yapısını değiştirerek gen ifadesini doğrudan düzenleyebilirler (63).

2.5.5. Fosforilasyon

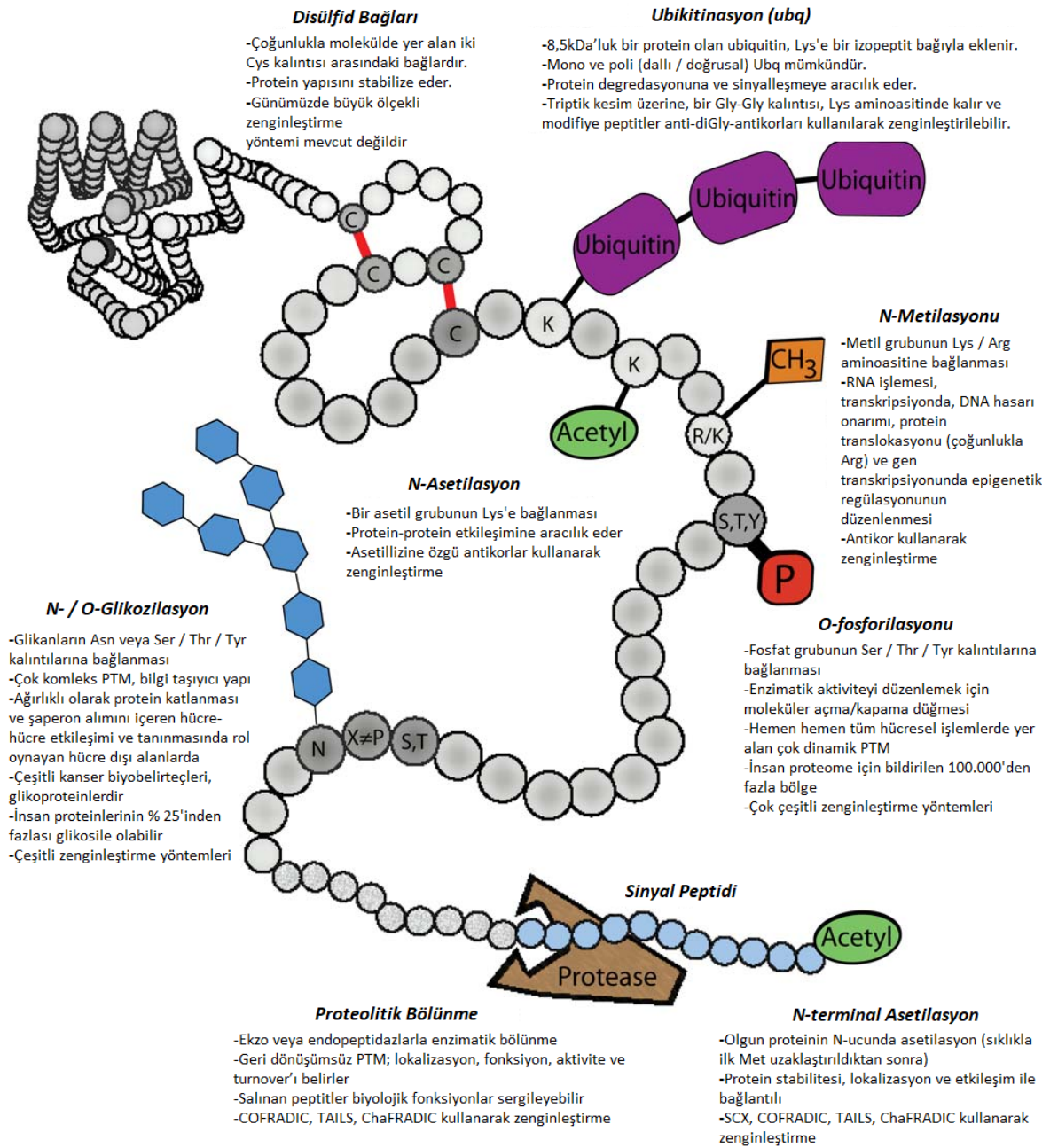
Proteinlerin yapısında geri dönüşümlü değişikliklere neden olan fosforilasyonlar, onları aktif veya aktif olmayan formlarına dönüştürerek sinyal iletimi, hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşması gibi temel hücresel süreçlerde düzenleyici roller alırlar. Global fosfoproteomik çalışmalar, fosforilasyonunun yaklaşık %86'sının serin kalıntılarında, %11'inin treonin kalıntılarında ve %2'den daha az bir kısmının tirozin kalıntılarında meydana geldiğini göstermiştir. Fosforilasyon histidin kalıntılarında da meydana gelir ancak fosfohistidin, asidik koşullar altında fosforil grubunun hızlı hidrolizi nedeniyle fosfoproteomik çalışmalarda nadiren tanımlanır (64, 65).

Bu modifikasyonlar, tersinir çalışan kinaz ve fosfataz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Proteinler, kinaz enziminin GTP (Güanozin trifosfat) veya ATP'den (Adenozin trifosfat) kopardığı terminal (γ) fosfat grubunun Ser, Thr ve Tyr kalıntılarındaki -OH grubuna transfer edilmesi ile fosforile olurlar. Fosfatazlar ise fosfoester bağının hidrolizi yoluyla fosfat grubunun ayrılmasını sağlar (8).

İnsan protein kinaz ailesi, pseudokinaz (katalitik amino asit kalıntısı içermeyen) proteinlerle birlikte yaklaşık 518 üyeden oluşur. Fosforile edilmiş -OH grubunun (alkol veya fenol) doğasına bağlı olarak, bu proteinler protein-serin/treonin kinazlar (385 üye), tirozin kinaz (90 üye) ve tirozin kinaz benzeri proteinler (43 üye) olarak sınıflandırılır. Tirozin kinaz proteinlerin 32'si ise reseptör olmayan proteinlerdir (66).

Bir proteinin fosforilasyon durumu, kinaz ve fosfataz aktivitesinin artış ya da azalışına bağlı olarak kontrollü bir şekilde gerçekleşir. Protein kinazlarda meydana gelen mutasyonlar ve düzensizlikler bu dengenin bozulmasına ve sinyal yollarının sürekli aktivasyonuna neden olabilmektedir. Fosfat gruplarının negatif yüklü olması, fosforilasyon sonunda protein yükünün değişmesine sebep olur. Bu durum ise proteinin konformasyonunda ve buna bağlı olarak işlevsel aktivitesinde değişiklik meydana getirir. Bu nedenle fosforilasyonlar kanser ve nörolojik bozukluklar da dahil olmak üzere birçok hastalıkların etiyolojisinde rol oynayabilmektedir (8, 67).

Modifikasyonlar genellikle proteinlerin pI değerlerini (izoelektronik nokta), şekil, yük, hidrofobiklik ya da molekül ağırlığı gibi kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirebilir. Bu değişikliklerden faydalanılarak fosfoproteinler, Pro-Q Diamond, Phostag gibi floresan boyalar kullanılarak 2D jellerde protein spotları halinde, radyoaktif ³²P ile etiketlenerek otoradyografik olarak ya da fosfoserin, fosfotreonin veya fosfotirozin kalıntılarına karşı geliştirilen antikorlar kullanarak Western blotlama ile görüntülenebilir. Ancak bu geleneksel yaklaşımlar protein konsantrasyonlarının geniş dinamik aralığı nedeniyle önemli zorlukları da beraberinde getirmektedir (68). Geliştirilen yeni enstrümanlar ve yöntemler sayesinde çok sayıda fosfoprotein ve fosforilasyon bölgesi düşük femtomol seviyelerinde ve yüksek hassasiyette tespit edilebilmektedir. Kütle spektrometrelerinin proteomik çalışmalarda kullanılmaya başlanması fosfoproteinler hakkında da önemli veriler elde edilmesini sağlamıştır. Fosforilasyon genellikle substoikiyometriktir ve fosfoproteinler, birlikte bulunduğu fosforile olmamış izoformlarına oranla hücre içinde çok düşük miktarlarda bulunurlar. Buna nedenle MS analizleri öncesinde uygulanmak üzere çeşitli zenginleştirme metotları geliştirilmiştir (69-73).



Şekil 2-6: Sıklıkla Bildirilen Translasyon Sonrası Protein Modifikasyonları

ChaFRADIC: Charge-based fractional diagonal chromatography; COFRADIC: Combined fractional diagonal chromatography; PTM: Posttranslational modification; SCX: Strong cation exchange chromatography; TAILS: Terminal amine isotopic labeling of substrates. Pagel O (48)'dan değiştirilerek.

2.6. Zenginleştirme Yöntemleri

Fosfoproteomik uygulamalardaki çalışılan örneğin kompleksliği, sınırlı numune miktarı ve numunedeki protein yoğunluklarının geniş dinamik aralığı sıklıkla bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle kompleks örneklerdeki fosfoproteinlerin ekstraksiyonu, çalışmanın başarısında kritik bir adımdır. Fosforile proteinler, modifiye olmamış eş değerlerine kıyasla hücre içinde oldukça düşük miktarda bulunurlar. Tanımlanacak fosfoprotein miktarının arttırılması için, fosforile edilmemiş protein veya peptitleri numuneden uzaklaştırarak MS öncesi fosforile edilmiş izoformları zenginleştirmek gereklidir. Çünkü analit konsantrasyonu ile sinyal yoğunluğu arasındaki ilişkinin doğrusal olması nedeniyle zenginleştirme yapılmadan gerçekleştirilen MS analizinde fosfoproteinleri tespit etmek oldukça güçtür (68). Zenginleştirme stratejileri ya intakt fosfoproteinler seviyesinde ya da fosfopeptit seviyesinde gerçekleştirebilir. Fosfopeptit zenginleştirme üzerine geliştirilen stratejilerde fosfat grubunun iyon yükü ya da polarite gibi kimyasal özelliklerinden faydalanılır. Temel alınan özelliklere göre bunlar metal afinite tabanlı, antikör tabanlı ve kimyasal türevlendirme olarak üç ana grupta toplanabilir. Kimyasal türevlendirme yoluyla zenginleştirme yöntemlerinin çok aşamalı reaksiyonlardan oluşması ve bu reaksiyonlar sırasında istenmeyen yan reaksiyonların gerçekleşmesi MS analizi aşamasında örnek karmaşıklığına neden olur. Bununla birlikte tirozin fosforilasyonları için uygun olmayışları nedeniyle kullanımları yaygın değildir (74). En genel kullanıma sahip olanlar Fe^{+3} ve TiO_2 'nin kullanıldığı afinite tabanlı yöntemlerdir. Ancak bu yöntemler de tek başlarına spesifik bir ayırım sağlayamamaktadır. Özellikle fosforile olmayan asidik peptitler, fosforile peptitler ile birlikte saflaştırılır. Bununla birlikte TiO_2 metal oksiti afinite yöntemi monofosforile peptitler için, Fe^{+3} IMAC ise multifosforile peptitler için yüksek seçicilik sunar (8). Yapılacak zenginleştirme yöntemi, çalışma amacına bağlı olarak dikkatli bir şekilde seçilmelidir.

2.6.1. IMAC (İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi)

IMAC, negatif yüklü fosfat gruplarının, pozitif yüklü geçiş metal iyonlarına olan afinitesi temel alınarak olgunlaştırılan en yaygın zenginleştirme yöntemlerinden biridir (75). Fe^{+3} , Al^{+3} , Ga^{+3} başta olmak üzere Cu^{+3} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+3} ve Zr^{+4} metal iyonlarından biri, nitrilotriasetik asit (NTA) ya da iminodiasetik asit (IDA) reçinelerine immobilize edilmiştir. Fosfopeptitler, ilgili metal iyonlarına sahip reçinelerden oluşan IMAC-materyaline (manyetik boncuk ya da kromatografik kolon) bağlanır. Fosfopeptitlerin bağlanma özgünlüğü kullanılan metal türüne göre değişir. Örneğin, Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Co^{+2} azot içeren fonksiyonel gruplara, Fe^{+3} , Ga^{+3} ve Al^{+3} ise fosfat gibi oksijenden zengin fonksiyonel gruplara daha fazla afinite gösterir. Bunlar arasında Fe^{+3} , fosfat gruplarına yüksek afinite gösterirken karboksil ve fenolik gruplar için nispeten düşük afiniteye sahiptir. Dolayısıyla Fe^{+3} bu yöntem için en sık tercih edilen metaldir (76, 77).

IMAC yönteminin en büyük sınırlamalarından biri, karboksil gruplarının da IMAC materyaline bağlanarak asidik peptitlerin fosfopeptitlerle birlikte saflaştırılmasına neden olmasıdır. Fosfopeptitlerin, IMAC materyaline bağlanma özgüllüğünü asidik peptitlere kıyasla daha da arttırmak için yöntem üzerinde çeşitli yenilikler denenmiştir. İnkübasyon ve elüsyon tamponlarının optimizasyonu IMAC verimliliğini artırabilmektedir. Tamponların düşük pH'lı organik asitlerle (pH 2-2.5) asidifikasyonu, asidik amino asit kalıntılarındaki karboksil gruplarını protonlar ve spesifik olmayan bağlanmayı azaltır. Böylece negatif yüklü fosfopeptitler IMAC reçineleri tarafından tutulurken, fosforile edilmemiş peptitler yıkanır. TFA (Trifloroasetik asit) veya asetik asit kullanımı spesifiteyi artırırken tüm asidik kalıntıların komple protonlanması ancak yüksek derecede asidik pH ($\text{pH} = 1-1.5$) aralığında gerçekleşebilir. Bununla birlikte fluoroasetik asit gibi TFA'dan daha kuvvetli asitler, bazı fosforile peptitlerin kaybına ya da metalik iyonların reçineden süzülerek fosfopeptitlerin kontaminasyonuna neden olabilmektedir (74, 75). IMAC verimliliğini artırmak için bir diğer yaklaşım da IMAC'den önce O-metil esterifikasyon yoluyla peptitler üzerindeki karboksilik asitleri türevlendirme işlemidir.

Karboksil gruplarının daha az asidik olan metil esterlere dönüştürülmesiyle peptitlerin asiditesi azaltılır. Ancak esterifikasyon tamamen gerçekleşmeyebilir ve yan reaksiyonlar oluşabilir. Glutaminden glutamik asit veya asparaginden aspartik asitin olduğu deaminasyon yan reaksiyonları örnek kaybına neden olurken örnek karmaşıklığını da artırır (68). IMAC, genellikle SCX (güçlü katyon değişim kromatografisi) ya da HILIC (Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi) ile birleştirilmiştir (75).

2.6.2. MOAC (Metal-Oksit Afinite Kromatografisi)

MOAC, negatif yüklü fosfatın metal oksitler ile kovalent etkileşimine dayanmaktadır. Fosfopeptitlerin zenginleştirilmesi, IMAC yöntemine benzer bir yaklaşımla gerçekleşir. IMAC'taki metal şelatlayıcı reçinenin yerine titanyum dioksit (TiO_2) gibi metal oksitleri kullanılır. TiO_2 fosfopeptit zenginleştirilmesi amacıyla kullanılan ilk metal oksit olmuştur, ancak son yıllarda kullanılan ZrO_2 , Ga_2O_3 ve Fe_3O_4 gibi çeşitli metal oksitler de fosfopeptitlere farklı afinite ve özgünlük sergilerler. Genel bir MOAC protokolü, kuvvetli asidik koşullar altında peptitlerin kolona bağlanmasını ve bunu takiben, spesifik olarak bağlanmamış olanları uzaklaştırmak için yıkama adımlarını ve alkaline koşullar altında bir elüsyon aşamasını içermektedir. Bu yöntemde asidik kalıntılar, yükleme tamponunun düşük pH'sı sayesinde protonlanarak nötralize olur. IMAC'da olduğu gibi fosforilasyona uğramamış asidik aminoasit kalıntılarının spesifik olmayan bağlanması, yöntemin verimliliğini düşürmektedir (74, 75). Seçiciliği artırmak amacıyla farklı bağlama ve yıkama koşulları olan çok sayıda protokol geliştirilmiştir. 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB), TFA, fitalik asit, laktik asit ya da sitrat gibi asitleri içeren düşük pH'lı yükleme tamponu, EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) veya gliserol gibi katkı maddelerinin tamponlarda kullanılması fosforile olmamış moleküllerin spesifik olmayan bağlanmasını azaltarak seçiciliği önemli ölçüde artırmaktadır. (70, 75).

Multifosforilepeptitlerin çok yüksek afinite ile bağlanması elüsyonu zorlaştırdığından TiO_2 afinite saflaştırması, monofosforile peptitleri daha büyük ölçüde zenginleştirir. Mono- ve multi fosforile edilmiş peptitlerin ön ayrımı (pre-separation), fosfopeptitlerin farklı ve yüksek pH koşullarında elüe edilmesiyle sağlanabilir. Örneğin sitrik asit mono ve multi fosforile peptitlerin TiO_2 'ye bağlanmasını büyük ölçüde etkilediğinden fosfopeptitlerin kademeli olarak ayrılması için kullanılabilir (78).

2.6.3. SIMAC (SIMAC: Sequential elution from IMAC)

IMAC ve MOAC yöntemlerinin geliştirilmesiyle oluşturulan çok sayıda protokole rağmen özellikle multi fosforile peptitlerin MS ile analizi, büyük ölçekli çalışmalarda halen büyük zorluklara neden olmaktadır. IMAC, multi fosforile peptitlerin zenginleştirilmesi için tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen sınırlı seçiciliğinden dolayı büyük ölçekli fosfoproteomik çalışmalarda verimi düşüktür. TiO_2 ile zenginleştirmenin yapıldığı büyük ölçekli çalışmalarda ise ağırlıklı olarak monofosforile peptitler tanımlanır ve multi fosforile peptit seviyesi oldukça azdır.

Fosfopeptitlerin tanımlanma oranını arttırmak için IMAC ve MOAC yöntemlerinin güçlü yönlerini birleştiren SIMAC yöntemi geliştirilmiştir. Bu iki yöntemin kombinasyonu ile kompleks örneklerdeki mono ve multi fosforile peptitlerin farklı havuzlara toplanarak etkin bir şekilde ayrımı sağlanır. Yöntemde multi ve mono fosforile peptitlerin IMAC materyaline olan bağlanma verimlilikleri esas alınır ve elüsyon için farklı pH'a sahip tamponlar kullanılır. İlk aşamada IMAC-boncuklarına bağlanan mono-fosforile peptitler ve fosforile olmayan diğer peptitler elüe edilir. Aynı IMAC-boncuklarından bu sefer alkalın bir tampon kullanılarak multi-fosforile peptitler elüe edilir. Elde edilen asidik elüsyon fraksiyonu, MS analizi öncesinde daha ileri zenginleştirme için TiO_2 kromatografisinden geçirilir (79, 80). İyon değişim kromatografisi veya HILIC gibi tekniklerle birleştirilerek örnek karmaşıklığı azaltılırsa bu yöntemin daha da güçlü olması beklenir (68, 71).

2.6.4. Antikor Temelli Afinite (İmmünoafinite) Zenginleştirme

Fosforile olmuş serin, treonin ve tirozin kalıntılarını içeren peptit veya proteinler spesifik antikorlar tarafından tanınarak seçici olarak zenginleştirilir. Yöntem ticari ürünler halinde bulunan antikorların özgüllüğü ile sınırlıdır. Tirozin fosforilasyonu, serin ve treonin fosforilasyonlarına kıyasla oldukça düşük seviyede gözlenir. Bu nedenle fosforile tirozin kalıntılarının zenginleştirilmesinde immünoafinite temelli yöntemler daha fazla başarı göstermiştir. Bununla birlikte bu yöntemler tüm fosfoproteomu kapsayan büyük ölçekli çalışmalar için uygun olmadıklarından daha çok hedefe yönelik fosfoproteom çalışmalarında ve western-blot analizlerinde tercih edilmektedirler (81, 82).

2.6.5. Kimyasal Türevlendirme

Fosforile serin ve treonin kalıntılarının, kimyasal bir grup eklenerek modifiye edildiği bir zenginleştirme stratejisidir. Bu yaklaşımda amaç fosfat veya fosforik asit nötr kaybının önlenmesiyle analiz hassasiyetini artırmaktır. Alkalin bir ortamda β -eliminasyon yoluyla serin ve treonin kalıntılarındaki fosfat grubu uzaklaştırılır ve yerine daha kararlı bağ oluşturabilen bir kimyasal etiket eklenir. Özel bir ekleme yöntemiyle (Beta elimination/Michael addition) eklenen ditiyol grubu biyotinlenir ve daha sonra avidin kolon kromatografisi kullanılarak zenginleştirilir. Bu sayede kantitatif analiz için yapılacak numune etiketlemesi, fosfopeptit zenginleştirme iş akışına eklenebilir. Ancak çok adımlı reaksiyonlardan oluşan bu stratejide numune kaybına ve karmaşıklığına neden olan yan reaksiyonların gerçekleşme ihtimali yüksektir (83).

2.7. Kütle Spektrometresi ve Çalışma Prensibi

Kütle spektrometreleri (MS), bileşiklerin molekül ağırlığını belirlemek, yapılarını karakterize etmek ve miktarlarını belirlemek amacıyla gaz fazındaki iyonize moleküllerin elektro/manyetik alan aracılığıyla belirlenen kütle-bağımlı davranışını ölçen analitik cihazlardır. PTM'lerin kütle spektrometresiyle saptanması, oluşan modifikasyona göre triptik peptitlerde meydana gelen kütle değişimine dayanır. Kütle spektrometresi tabanlı yöntemlerle fosfoproteinler de yüksek verimlilikle tanımlanabilmektedir (84-86).

Farklı kombinasyonlar halinde bulunabilen kütle spektrometreleri; gaz fazında analit iyonların olduğu bir iyonizasyon kaynağı, oluşan iyonize analitin kütle/yük oranına göre ayrımının gerçekleştiği bir kütle analizörü ve iyon sinyallerinin spektrum şeklinde okunmasını sağlayan bir kütle detektörü olmak üzere üç ana kısımdan oluşur. İyonizasyon kaynakları arasında MALDI ve ESI proteomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan teknolojilerdir. Her iki yöntemde peptitlerin yüksek hassasiyetle iyonize edilmesini sağlarken aralarında önemli farklılıklar vardır. ESI ile hidrofobik peptitleri, MALDI ise bazik ve aromatik peptitleri tespit etmek daha kolay olabilir. Bununla birlikte ESI kaynağı ile yapılan analizler daha iyi protein kapsama oranına sahiptir. Yine bu çalışmalarda, birbirinden bir parçalama hücresiyle ayrılan ardışık (tandem) kütle analizörleri kullanılmaktadır (87, 88).

İlk kütle analizörü iyonizasyon kaynağından çıkan tüm peptitleri m/z oranına göre ayırır ve MS1 spektrumunu ölçer. Daha sonra belirli bir m/z değerine sahip peptit türleri izole edilerek parçalama hücrelerinde peptit dizi bilgisini verecek fragment iyonlara parçalanır. Parçalanan bu peptit türlerine “öncü iyon (precursor)” denir. Öncü iyonlardan CID (Collision-Induced Dissociation), HCD (Higher Energy Collisional Dissociation), ECD (Electron Capture Dissociation) ve ETD (Electron Transfer Dissociation) gibi çeşitli fragmentasyon stratejileri kullanılarak elde edilen fragment iyonlarına ise “ürün iyonları (daughter ya da product)” denir. İkinci kütle analizöründen geçen fragment iyonlar, detektörde m/z 'ye karşı çizilen yoğunluk cinsinden, başka bir tanımla MS/MS (MS2) spektrumları olarak okunur. Elde edilen bu pikler peptit dizisinin belirlenmesi ve olası proteinlerin tespiti için kullanılır (89).

Bir tandem MS cihazıyla çok sayıda fosforile protein tanımlanabilmekte, tanımlanan fosfoproteinlerin fosforilasyon bölgeleri belirlenebilmekte ve miktar analizleri yapılabilmektedir. Bu analizler için ise her peptidin peptit kütlesi, iyon yoğunluğu ve fragment özelliklerini içeren bilgilere ihtiyaç vardır. Kütle ve fragmentler peptidi tanımlarken, yoğunluk bilgisi miktar analizinde kullanılır (90).

Kütle spektrometreleri, proteomik çalışmalarda kullanılan günümüzün en hassas cihazlarından olmakla birlikte fosfoproteomik çalışmalar için yüksek çözünürlük ve kütle doğruluğu dikkat edilmesi gereken önemli parametrelerdir. Belirli bir enstrümanın seçimi bu faktörlere bağlı olduğu kadar mevcut yazılım paketleriyle birlikte satın alma ve bakım maliyetlerine de bağlıdır.

Fosfoproteomik çalışmalar için orbitrap teknolojisini barındıran kütle spektrometrelerinin dışında yüksek çözünürlüklü MS/MS TOF cihazları da kullanılmaktadır (87). TOF analizörlerinde tüm iyonlar elektrik alan darbesi kullanılarak belli kinetik enerjiler ile hızlandırılır ve bunların detektörlere doğru uçuş süresi ve neden oldukları karakteristik enerji ölçümleri m/z değerlerine dönüştürülür. Burada düşük m/z değerine sahip olan iyonlar daha yüksek hızda yol alarak dedektöre önce ulaşır. Oldukça hassas olan bu cihazlar sürekli bakım ve ileri düzeyde kullanıcı bilgisi gerektirmektedir (91).

2.7.1. Kütle Spektrometresi Parçalanma Türleri

CID (Collision Induced Dissociation)

CID (collision induced dissociation), kütle spektrometresi temelli proteomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir ayrışma tekniğidir. Bu teknikte aminoasit dizisi ve kompozisyonu hakkında bilgi veren ürün iyonları, öncü iyonların nötr bir atom veya molekül ile çarpışması yoluyla oluşur. Peptitlere aktarılan düşük çarpışma enerjisi, peptit iskeletindeki kovalent bağlar olan amid bağları arasında dağılır ve peptit iskeleti boyunca parçalanma gerçekleşir. Parçalanma sürecinde peptit bağları, N-terminalinde b-tipi ve C-terminalinde y-tipi fragment iyon serilerini oluşturarak ayrışır. CID, genellikle düşük yüklü (+2) ve 15-20 aminoasit uzunluğundan daha kısa olan peptitlerde etkili olur (91). Çarpışma için genellikle nitrojen, helyum ya da argon gibi inert bir gaz kullanılır ve bazik amino asit kalıntıları protonlanarak pozitif yüklenmesi sağlanır (92). Bu açıdan gaz fazındaki protonlara kuvvetli afinitesi olan amino asitlerin sayısı ve pozisyonu önemli bir etkiye sahiptir. Örneğin dahili bazik kalıntılar ve prolin aminoasiti peptit iskeletinin rastgele protonlanmasını önleyerek amid bağı parçalanmasının belirli bölgelerde gerçekleşmesine neden olabilir. Hatta parçalanmayı inhibe ederek yeterli miktarda ürün iyonu oluşumunu engelleyebilir. Örnek hazırlığı aşamasında triptik peptit eldesi için tripsin kullanıldığında C-ucu terminalinde bazik kalıntıların oluşması ise bu olumsuzluğu bir miktar azaltır. Bununla birlikte fragmentasyon; çarpışma enerjisine, çarpışmada kullanılan gaza, aminoasit dizisine, peptitin uzunluğuna, pozitif yüklerin dağılımına ve PTM'lerin varlığına bağlıdır (91, 93).

Fosforilasyon serin ve treonin kalıntılarında genellikle kararsızdır ve CID süreci de kararsız olan fosfat gruplarının kaybını uyarabilir. Amid bağları kırılmadan önce fosfoester bağları β -eliminasyona uğrayarak dehidroalain ve dehidroaminobütirik asit üretilmesine neden olur. Böylece fosfoserin ve fosfotreonin kalıntılarında H_3PO_4 (98 Da) veya $H_2O + HPO_3$ (18+80 Da) fosforik grupların nötr kaybı gerçekleşir. Fosforilasyon gibi kararsız PTM'lerin varlığında CID'in kullanılması peptit iskeletinin yetersiz parçalanarak, ürün iyonlarının düşük sinyal yoğunluğuna neden olur. Sinyal/gürültü oranının düşük olduğu böyle bir durumda peptit dizileri yorumlanırken ve modifikasyon bölgeleri belirlenirken zorluklar yaşanır. Fosfotirozin kalıntılarında da kısmi nötr kayıplar gözlemlense dahi diğer iki fosforile aminoasitten çok daha karardır. Ayrıca fragment iyon spektrumunda 216 m/z değerindeki karakteristik bir fosfotirozin

immonium iyonu, fosfotirozin varlığının bir göstergesi olarak kabul edilir. Bazı fosforile aminoasit kalıntılarında nötr kayıpların gerçekleşmesi CID ile fosforile bölgelerin belirlenmesini daha da karmaşıktırmaktadır (94).

Fosforile proteinlerin tespitinde karşılaşılan bu problemler MS3 ve MSA (çok kademeli aktivasyon) modları kullanılarak aşılmaya çalışılmıştır. Bu çalışma modlarında fosforik asit kaynaklı kütle kayıpları izlenerek ardışık parçalanma gerçekleştirilir. MS3 çalışma modunda, nötr kayıp iyonu seçildikten sonra daha ileri parçalanma turu başlatılır. MS3 moduna alternatif olan MSA'da ise, iyon türleri taramaya müdahale edilmeden arka arkaya ayrılarak analiz süresi önemli ölçüde azaltılır (95).

HCD (Higher Energy Collisional Dissociation):

HCD, iyon kapalı kütle spektrometrelerinde uygulanan çarpışmaya dayalı alternatif bir parçalanma tekniğidir. CID'e kıyasla +2 yüklü öncü peptitlerde daha fazla peptit tanımlama imkanı sağlar. Parçalanma prensibi CID stratejisiyle benzer olmakla birlikte daha yüksek aktivasyon enerjisi gerektirir. HCD'nin daha yüksek fragmentasyon verimliliği sayesinde b-tipi iyonlara kıyasla çoğunlukla y-tipi fragment iyonları oluşur. Böylece daha az nötr kayıplar gözlenir (86, 96).

ECD (Electron Captured Dissociation):

ECD, peptit iyonu ayrışması için 90'ların sonunda geliştirilen alternatif tekniklerden biridir. Ayrışma prensibi, pozitif yüklü öncü iyonlar tarafından düşük enerjili elektronların ekzotermik yakalanması ve bunun sonucunda yükü indirgenmiş radikal peptit iyonlarının oluşması temeline dayanır. ECD, yüksek elektromanyetik alan gerekliliği nedeniyle hemen hemen sadece FT-ICR kütle spektrometrelerinde uygulanabilmektedir. FT-ICR'de multi protonlanmış peptitler, termal elektron demetine maruz bırakılır. Termal elektronlar peptit iskeletindeki protonasyon alanları tarafından yakalandığında indirgenmiş türler oluşur ve iyon-radikal parçalanma reaksiyonları başlar. N-C α bağında gerçekleşen parçalanma sonucu peptit öncü iyonlardan çoğunlukla c-tipi ve z-tipi fragment iyonları oluşur (97, 98). Peptit diziliminden (peptit uzunluğu, amino asit kompozisyonu) bağımsız olarak sadece peptit iskeletinde gerçekleşen parçalanma sayesinde fosfat grupları korunur, nötr kayıplar azalır ve O-GlcNAc eliminasyonu gerçekleşmez. Parçalanmanın amid bağı seviyesinde gerçekleştiği CID'in

aksine, ECD’de nonergodik parçalanmayla modifikasyon bölgelerinde kayıp olmaması yöntemin en önemli avantajlarından biridir (89).

ETD (Electron Transfer Dissociation):

PTM’leri dizi bilgisi kaybolmadan, iyon kapalı kütle spektrometreleri gibi yaygın olarak kullanılan enstrümanlarda tespit edebilmek amacıyla geliştirilmiş ECD benzeri bir tekniktir. Her iki teknikte de kararsız olan fosfat gruplarının korunduğu peptit iskeleti parçalanması gerçekleşir. ECD’de termal elektronlar, ETD ise radikal anyonlar omurga protonasyon alanlarının nötrleştirilmesi yoluyla peptit iskeletinin parçalanmasını sağlar. Bu teknikte ECD’deki elektronun yakalanması yerine elektronun transferi söz konusudur. Elektron vericisi olarak ise nispeten düşük elektron afinitelerine sahip aromatik hidrokarbonların (antrasene, fluoranthene veya azobenzene gibi) iyonlaşmış radikal anyonları kullanılır. Gaz fazındaki protonlanmış çok yüklü peptitlere tek yüklü radikal anyonlardan sağlanan elektronlar transfer edilerek peptit iskeletindeki N-C α bağının ayrılması sağlanır. ECD’de olduğu gibi peptit iskeletinin, aminoasit diziliminden bağımsız rastgele parçalanması c-tipi ve z-tipi iyonların oluşmasına neden olur. Böylece nötr kayıplar azalır ve peptit dizilimi için yeterli ürün iyonları oluşur. ETD özellikle +3, +4 gibi çok yüklü öncü peptit iyonlarının parçalanmasında daha iyi performans gösterir (98, 99, 68). Farklı yüklere sahip iyonların parçalanmalarına olan ilgileriyle CID ve ETD’nin birbirini tamamlayıcı yöntemler olarak kullanılması, fosfopeptitlerin analizinde daha iyi bir strateji olarak değerlendirilebilir (100).

2.7.2. Kütle Spektrometresi Tarama Modları

Ürün İyon Taraması (Product ion scan):

MS1, öncü iyon seçimi için belirli m/z oranına ayarlanır. Seçilen en bol iyon çarpışma hücreğine gönderilir ve fragment iyonlarına ayrılır. Oluşan tüm ürün iyonları, MS2 boyunca taranır. Bu süreç farklı öncü iyonları için tekrarlanır. Bu tarama modunun bir uygulaması “veri bağımlı edinim (DDA)” olarak bilinir. DDA analizinde, belirli bir m/z’deki bir peptit için ürün iyonu spektrumunun üretilmesi, belirli bir alıkonma zamanındaki diğer peptitlerin yoğunluğuna dayanır. Dolayısıyla parçalanma için bir öncü iyonunun seçimi, genellikle iyonun gerçek zamanlı yoğunluğuna dayandığından bu uygulama veri bağımlıdır. DDA, proteomikte yaygın olarak kullanılan bir MS/MS uygulamasıdır (101, 102).

DIA (Data independent Analysis):

DDA tekniğinden farklı olarak daha kapsamlı MS/MS bilgisi için “veri bağımsız edinim (DIA)” stratejileri geliştirilmiştir. DIA tabanlı taramalarda, öncü iyon taraması sonrası fragment iyonları elde etmek için gerçek zamanlı iyon seçimi yapılmaz ve tüm öncü iyonlar yoğunluğuna bakılmaksızın aynı anda parçalanır. MS^E, SWATH ve AIF (all-iyon parçalanması) DIA’nın en yaygın üç uygulamasıdır. Peptit iyonlarına, düşük ve yüksek çarpışma enerjileri verilerek sırasıyla peptitin bütünü ve peptiti oluşturan amino asitler hakkında bilgi toplanır. Yani düşük enerji sonrası taramada, öncü iyonun m/z ve yoğunluk bilgisi sağlanırken yüksek enerji sonrası tarama, ürün iyonları hakkında bilgi verir. Bu yaklaşımda tüm öncü iyonların aralıksız ve hızlı bir şekilde analiz edilmesi önemli avantaj sağlar (101, 103, 104).

Nötr Kayıp Taraması (Neutral-Loss Scan):

Nötr bir fragmentin seçilmesi ve bu nötr kayıp ile ilişkili tüm fragmentlerin tespit edilmesidir. Bazı peptit iyonları ($m/z=x$), CID koşulları altında nötr türler nedeniyle öncü iyonlardan daha düşük bir iyon ($m/z=x-a$) üretir ve buna nötr kayıp (a) denir. Kütle farkının tespit edilebilmesi için her iki analizör de MS1 ve MS2 boyunca geçen iyonları, senkronize şekilde talar. Kütle farkı, çarpışma hücrendeki bir peptit iyonundan kaybolan nötr parçaya (H₂O: 18Da, HPO₃: 80Da, H₃PO₄: 98Da veya NH₃: 17Da) karşılık gelir. Nötr kayıp taraması, bu nedenle, belirli bir fonksiyonel gruba içeren bir örnekteki peptitleri saptamak için kullanılır (105).

SRM/MRM ve PRM (Selected Reaction Monitoring/Multiple Reaction Monitoring, Parallel Reaction Monitoring):

Hem MS1 hem de MS2, parçalanma özellikleri önceden bilinen ilgili peptit kütesine ayarlanır. MS1’de seçilen öncü iyon, çarpışma hücrene gönderilir. Oluşan spesifik fragmentler daha sonra MS2’de tespit edilir. MRM ise bir veya daha fazla öncü iyonlardan çok sayıda ürün iyonunun izlenmesidir. Hassas ve seçici olması nedeniyle sinyal gürültüsü düşüktür. Dolayısıyla yüksek derecede tekrarlanabilir. Bu tarama modları hedefe yönelik proteomik çalışmalarda ve biyobeliteç çalışmalarında validasyon amacıyla kullanılabilir. Bununla birlikte hedefli çalışmaların ve özellikle de hedefli proteomik çalışmaların düşük çözünürlüklü üçlü kuadropol MS cihazlarından yüksek çözünürlüklü cihazlara geçişi ile birlikte PRM (Parallel Reaction Monitoring) metodu öne çıkmaya başlamıştır.

PRM özellikle yüksek çözünürlükte çalışma imkanı ve güçlü kütle doğruluğu ile diğer hedefli yöntemlere göre avantaj sağlamaktadır. Yine farklı olarak PRM’de, seçilen öncü iyonlardan elde edilen bütün ürün iyonları bir arada analiz edilebilmektedir (106).

2.8. Kütle Spektrometresi Tabanlı Fosfoproteomik

Kütle spektrometresi tabanlı fosfoproteomik bir çalışmanın temel adımları;

- 1- Homojenizasyon
- 2- Proteolitik sindirim
- 3- Kompleks peptit karışımının ayrımı (isteğe bağlı)
- 4- Fosfopeptitlerin zenginleştirilmesi
- 5- LC-MS/MS analizi ve ham verilerin işlenmesi
- 6- Biyoinformatik analiz

Çalışma öncesinde öncelikle dikkat edilmesi gereken nokta analiz örneklerinin uygun koşullarda alınıp saklanmasıdır. Örnek alımı esnasında proteazlar ve fosfatazlar hala aktif olduğundan proteinler degrade olabilir ve fosforile proteinlerdeki fosfat grupları kaybedilebilir. En başta yapılan dikkatsizlik tüm çalışmayı etkileyerek hatalı ya da anlamsız sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle örnekler alındıktan hemen sonra çalışma öncesine kadar -80°C ’de saklanmalıdır.

Örnek hazırlığı aşamasında proteaz ve fosfataz aktivitesini engellemek için inhibitör etkili ajanların kullanımı ayrıca dikkat edilmesi gereken bir noktadır. EDTA, EGTA (Etilen glikol tetra asetik asit) veya spesifik kinaz inhibitörleri kullanılarak kinaz aktivitelerinin engellenmesi, fosforilasyon bölgelerinin doğru şekilde belirlenmesine katkı sağlayacaktır. Homojenizasyon aşaması ise enzimatik aktivitenin azaldığı $+4^{\circ}\text{C}$ ’de gerçekleştirilmelidir. Ekstrakte edilen proteinler primer hale getirildikten sonra protein katlanmalarını önlemek amacıyla serbest kalan sistein uçlarında karboamidometil sistein modifikasyonu gerçekleştirilir. Elde edilen polipeptit zinciri MS analizlerinin daha kolay gerçekleştirilebilmesi için spesifik bir proteaz ile sindirilir. Polipeptit zincirini arjinin ve lizin kalıntılarından kesen tripsin, en sık kullanılan proteaz olmakla birlikte Glu-C, Lys-C, Asp-N gibi başka enzimler de kullanılabilir. Fosfoproteomik çalışmalar için farklı enzim kombinasyonlarının kullanılması daha yüksek sayıda protein tanımlaması için yararlı olabilir (75, 68).

Bir peptit karışımı içinde fosfopeptitlerin sayısının çok az olması başka bir deyişle hedeflenen moleküllerden çok farklı özelliklerde ve bolluklarda çeşitli moleküllerin varlığı, MS analizi sonuçlarında elde edilen profil içerisinde fosfoproteinlerin gerçeğe uygun bir şekilde temsil edilmesini zorlaştırır. Fosfopeptit zenginleştirmenin önemli bir avantajı, daha az karmaşık olan bir peptit içeriği sağlaması ve küçük, lipofilik, son derece asidik veya alkalik proteinlerin neden olabileceği olumsuzlukların uzaklaştırılmış olmasıdır (74).

Fosfoproteomik çalışmalarda çok önemli bir basamak olması nedeniyle en hassas yöntemin bulunmasına yönelik çeşitli zenginleştirme yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak tek bir yöntemle yeterli verimlilikte zenginleştirme yapılamadığından fosfat gruplarının metal oksitlere afinitisine dayanan MOAC ve IMAC yöntemlerinin kombinasyonu birçok çalışmada tercih edilmektedir. Zenginleştirme yöntemlerinin özgünlüğünün artırılması ve daha çok sayıda fosfoprotein tanımlaması yapabilmek için ön ayırma teknikleri de isteğe bağlı olarak kullanılmaktadır. Yeterli saflıkta elde edilen fosfopeptitler ters faz sıvı kromatografisinde ayrımlanarak ESI kaynağında gaz faz iyonlara dönüştürülürler. İlgili MS metodlarına göre analiz edilen örneklerden elde edilen ham veriler, informatik araçlar ile işlenerek biyolojik örnek içeriğindeki fosfoproteinlerin ortaya çıkarılmasında kullanılırlar (107).

2.9. Proteomik Çalışmalarda Kullanılan KHDAK Biyolojik Örneklerine ait Özellikler ve Tespit edilen Biyobelirteçler

Etkili biyobelirteç keşfi; biyolojik karmaşıklık ve değişkenlik, analitik platformların kararlılığı, veri analizinin etkinliği, genel popülasyondaki biyobelirteçlerin geçerliliği ve klinikte uygulanabilir bir test geliştirilmesi için gereken harcama ve zaman gibi birçok faktörle sınırlanmaktadır (108). Çeşitli avantajlarından dolayı kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılan hücre hatları, MS tabanlı proteomik çalışmalarda protein tanımlamaları ve etiketli miktar tayininde sağladığı avantajlar açısından da önemli bir biyolojik materyaldir. Özellikle hastalığın tedavisine ve prognozuna yönelik yapılan araştırmalarda kullanımı sıkça karşımıza çıkmaktadır (109, 110).

Hücre hatlarının dışında biyobelirteç çalışmaları için kullanılan KHDAK hastalarına ait tümör dokusu ve kan (serum veya plazma) örneklerinin yanı sıra tükürük, BAL ve plevral efüzyon gibi materyallerle gerçekleştirilen proteomik araştırmalar da mevcuttur (111-115). Tanı ve evrelemenin dokuda yapıldığı KHDAK'de invaziv olmayan yöntemlerle elde edilen biyolojik materyallerde biyobelirteç bulabilmek önemli bir ihtiyaçtır. Bundan dolayı proteomik araştırmalarda biyolojik sıvıların kullanımı önem kazanmış ve serum-plazma geleneksel olarak en tercih edilen biyolojik sıvı olmuştur. Akciğer kanserinin belirteçleri arasında hormonlar, fetoproteinler, hücre yüzey membran antijenleri, enzimler ve sitokinler bulunur. CEA, NSE, TPA, kromogranin, CA125, CA19-9, Cyfra 21-1 ve ProGRP gibi mevcut serum tümör biyobelirteçleri akciğer kanserinde erken tanı için sınırlı hassasiyet ve özgüllüğe sahiptir. Kütle spektrometresi zeminindeki proteomik çalışmalarla, serum ve plazma proteomunun belirlenmesi teknik açıdan güçtür. Serum ve plazmada tüm proteomun yaklaşık %99'unu albümin ve globülinin de içinde bulunduğu 22 protein oluşturur. Tümörle ilişkili olarak eksprese olan proteinler ise çok düşük miktarda bulunmaktadır (113, 116-118). Bu ve benzer tecrübelerle bağlı olarak MS çalışmalarında karşılaşılan zorluklar çeşitli tekniklerin geliştirilmesiyle aşılmaya çalışılmaktadır. Kan dokusu ile karşılaştırıldığında tükürük, idrar ve bronkoalveoler lavaj (BAL) gibi proksimal biyolojik sıvılar daha az karmaşıktır. Bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısı hem tümör hücrelerine yakındır hem de dokuya göre daha az invaziv yöntemlerle elde edilir. BAL sıvısı fosfolipidler, nükleik asitler, peptitler ve proteinler gibi çeşitli çözünür bileşenlerin yanı sıra farklı hücre tiplerinin bir karışımıdır. Bununla birlikte zengin bir içeriğe sahip olan BAL sıvısı makrofajlar ve nötrofiller gibi çeşitli hücrelerden, epitel ve inflamatuvar hücreler tarafından üretilen çok sayıda protein ve tümör hücrelerinden oluşabilir (118, 119). Son yıllarda biyobelirteç bulma amacıyla yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar KHDAK hastalarındaki BAL proteomunun, kontrollere kıyasla değiştiğini göstermektedir. Bununla birlikte adenokarsinom ve skuamöz arasındaki protein profilinde belirlenen önemli farklılıkların, akciğer kanseri alt tiplerinin ayırt edilmesine yardımcı belirteçler olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu gibi birçok nedenden dolayı BAL sıvısının proteomuna ilgi artmıştır. Yapılan bir çalışmada sistatin-C, TIMP-1 ve lipokalin moleküllerinin BAL sıvısı seviyelerindeki artışı, plazma ile benzer korelasyon göstermiştir (119).

İnvaziv olmayan bir şekilde yüksek hacimlerde toplanabilen idrar, insan hastalıklarının tanı ve prognozu için önemli bir vücut sıvısı kaynağıdır. İdrarın genel içeriğini tuzlar, çözülebilen ve çözülmeyen proteinler, hücre dışı veziküller, nükleik asitler, hücreler ve hücre döküntüleri oluşturur. Üriner proteom ise, doğrudan renal filtrasyonun bir ürünüdür ve proteomik analizler için elverişli olan ve hastalığa özgü çeşitli fonksiyonları temsil edebilen düşük moleküler ağırlıklı, çözünür peptitlerden oluşur. Kandan daha az karmaşık bir matris ve protein içeriği ile idrar, akciğer kanseri biyobelirteçlerinin alternatif bir kaynağını oluşturmaktadır (120, 108). 12 sağlıklı gönüllüden alınan numunelerle yapılan proteomik çalışmada yaklaşık 3500 protein tanımlanmasıyla idrarın derin bir profili ortaya çıkarılmıştır (121). Bununla birlikte, idrar içeriği cinsiyet, yaş, hormon ve egzersiz koşulları gibi çeşitli fizyolojik faktörlerden etkilenebilir. Bu nedenle, doğrulanabilir hastalık biyobelirteçlerini tanımlamak için çok sayıda klinik numune ile çalışmak gerekir (122). Akciğerleri çevreleyen boşluğu kaplayan plevra sıvısı proteomu ise doğrudan veya dolaylı olarak patofizyolojik durumu yansıtan akciğer hastalıkları hakkında bilgi içerir. KHDAK hastalarında malign plevral efüzyon semptomuna rastlanmasına karşın sınırlı sayıda yapılan çalışma vardır (115).

2.10. Kanser Alanındaki Fosfoproteomik Çalışmalar

Dinamik bir süreç olan fosforilasyon, hücre içerisindeki alt ünitelerde yer alan kinazlar ve fosfatazlar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir (123). Bu hassas dengenin bozulması ve bazı proteinlerin düzensiz fosforilasyonu; kanser, alzheimer ve kronik enflamatuar hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların moleküler patogenezi ile yakından ilgilidir (124-126).

Bu nedenle, özellikle kanserde kütle spektrometrisine dayanan global protein fosforilasyon profillerinin araştırılması, fosforile bölgelerin belirlenmesi ve aşırı aktiviteli kinazların aydınlatılması, hastaya özgü tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önem kazanmaktadır (127). Kinazları hedef alan inhibitörler; akciğer, mesane ve meme kanseri gibi farklı tümör tiplerinde etkili olan anti-kanser ilaçları olarak sunulmaya başlanmıştır (128-130).

Bununla birlikte, ilaç tedavisi sonrası hastalarda inhibitör direnci, HER2'yi hedef alan lapatinib tedavisine karşı gelişen dirençte olduğu gibi önemli bir klinik problemdir. Bu noktada fosfoproteomik çalışmalar büyük bir umut kaynağıdır. Chang ve diğ. SILAC bazlı fosfoproteomik çalışmalarında PAK2 sinyal yolunun inhibisyonunun, HER2 direncinin üstesinden gelmek için yeni bir tedavi seçeneği olabileceğini bildirmiştir (130). Bu bağlamda, kinaz inhibitörlerinden kanser önleyici ilaçların geliştirilmesinde fosfoproteomik çalışmaların mühim bir destek sağlaması beklenmektedir.

Tümör mikro-ortamından salınan büyüme faktörleri; tümör hücrelerinin, kinaz inhibitörlerinin etkilerinden kurtulmasıyla hayatta kalmasını sağlayabilir. Koch ve diğ. büyüme faktörü aracılı kinaz inhibitör direncinin moleküler mekanizmasını, 2016 yılında yaptığı fosforproteom profillemeye çalışmalarıyla açıklamaya çalışmıştır. A431 hücrelerinin proteomik ve fosfoproteomik seviyeleri, kütle spektrometresi bazlı kantifikasyon ile TMT etiketlemesinden sonra analiz edilmiştir. Araştırmacılar, MEK inhibitörlerinin kombinasyonunun (Trametinib ve Gefitinib), EGFR inhibitörüne dirençli hücrelerin FGF2 aracılı hayatta kalmasını inhibe ettiği sonucuna varmıştır. Ayrıca EGFR/FGFR, EGFR/MEK veya PI3K/mTOR'u hedef alan ilaç kombinasyonlarının, tümör mikro-ortamının etkisini azaltarak ve FGF2 büyüme faktörüne bağlı olarak EGFR inhibisyon direncini bozabileceğini de bildirmişlerdir (131). İlaç direncinin sinyal mekanizmasını anlamak, TKİ (tirozin kinaz inhibitörü) dirençli hastaların da tedavisini kolaylaştırmak için önemlidir (7). Lu ve diğ. küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde dasatinib direncinin IGFBP2/FAK yolu ile ilişkili olduğunu bildirmiş ve FAK'ın (fokal adezyon kinaz) IGFBP2 tarafından indüklenen dasatinib direncinde bir downstream aracı olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Böylece IGFBP2'nin aşırı eksprese edildiği durumlarda eşzamanlı Src ve FAK hedefli uygulamanın, dasatinibin akciğer kanseri tedavisinde terapötik etkinliğini artırabileceği sonucuna varılmıştır (132). Başka bir araştırma grubu ayrıca küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde erlotinib direncinin FAK yolu ile ilişkili olabileceğini; FAK ve EGFR'yi hedef alan kombine tedavinin sigara içenlerde daha etkili bir tedavi yaklaşımı olabileceğini önermiştir (128).

Meme kanseri hücre hattında SILAC bazlı kantitatif fosfoproteomik profillemenin yapıldığı bir başka çalışmada, 5600 özgün fosfopeptidin 1529'unun hiperfosforile edilmiş ve 409 peptidin hipofosforile edilmiş olduğu ve FAK'ın tamoksifen direncinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (133). Renal karsinom hücrelerinde sunitinib, kolorektal kanser hücrelerinde setuksimab, tiroid kanseri hücrelerinde selumetinib ve vemurafenib inhibitörleri üzerinde çeşitli fosfoproteomik çalışmalar bulunmaktadır (134-136). Klinik uygulamalar artan kinaz aktivitesini hedefleyerek kişiselleştirilmiş tedaviye geçiş yaparken, çalışmalarda ayrı bir çaba gerektiren aşırı eksprese edilmiş kinazların tespiti için farklı bilişim kaynaklarını tarayan entegre analiz yöntemleri kullanılmaya devam edilmektedir (127). 2016 yılından bir raporda Mertins ve ark. insan meme kanseri için genom ile bütünleşik bir fosfoproteomik çalışma sundu. Protein yıkımı nedeniyle, genomik olarak açıklanmış 105 tümör numunesinin sadece 77'sinde yüksek kaliteli fosfoproteomik analiz gerçekleştirdiler. Sonuçlar, klinik denemelerde fosfoproteomik çalışmaların geliştirilmesi için yeterli miktarda yüksek kaliteli tümör dokusunun gerekliliğini ortaya koymaktadır (137). Ek olarak, tanımlanan fosfoproteinlerin ve fosforilasyon alanlarının sayısı; numune miktarı ve kalitesinin yanında laboratuvar alt yapısının uygunluğu ve kapasitesine de bağlıdır (9, 137, 138). Ne yazık ki, iskemi, Zahari ve arkadaşları tarafından gösterildiği gibi eksizyondan iki dakika sonra fosforilasyon seviyelerinde değişikliklere yol açabilir. Ancak bir avantaj olarak kullanılabilirse, HSP27 üzerindeki Ser82'nin hiperfosforilasyonu, tümör dokularında iskemik değişikliklerin güvenilir bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. (139).

Gámez-Pozo ve diğ. KHDAK hastalarının taze donmuş ve formalinle sabitlenmiş-parafine gömülü (FFPE) tümör dokularındaki protein fosforilasyon düzeylerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonuçları, biyobelirteç araştırmaları ve validasyon çalışmaları için daha seçici analizler sağlayan hedefli metotların FFPE örneklerinde başarıyla uygulanabileceğini göstermektedir (140).

Klinik bir çalışmada, hastalardan kolayca toplanabilecek serum veya idrar gibi biyolojik sıvılarda doku biyobelirteç adaylarının tespiti, çalışmanın klinik değerini büyük ölçüde artırır. Bununla birlikte, önemli biyobelirteçler olabilen fosfoproteinler, tanısal biyobelirteç potansiyellerinin yanında ilaç yanıtlarının izlenmesinde ve terapinin etkinliğinin belirlenmesinde de önemli roller oynayabilir. Örneğin, saracatinib, imatinib ve temozolomidin ilaçlarının serum numunelerinde tespit edilen c-abl onkojen 1 ve reseptör olmayan tirozin kinaz (ABL1) fosfoproteinleri üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (141). Bildiğimiz serum üzerinde yapılan ilk global fosfoproteomik çalışma ile insan serum fosfoproteininin bilgi arşivinin oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışma için seçilen prostat kanseri olan bir hastanın örneği, farklı deneysel prosedürler kullanılarak analiz edilmiştir. Araştırmacılar, çevresindeki dokudan kana nüfuz eden bazı hücresel fosfopeptitler dahil olmak üzere yaklaşık 100 fosfopeptit tanımladılar. Bu fosfopeptitlerin bir kısmının, apolipoproteinler, alfa-2-HS-glikoprotein, kininojen 1, kompleman bileşenleri ve serin proteinaz inhibitörü gibi serumda bol miktarda bulunan fosfoproteinlere, bazılarının ise çevre dokudan kana geçtiği düşünülen osteopontin ve SPARC-like 1 proteine ait olduğu rapor edilmiştir. (142).

Fosfoproteom keşfi için hücre hatları ve plazma kullanılarak yapılan ilk büyük ölçekli sekretom çalışması, meme kanserinde Zawadzka ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. İlk önce lüminal ve bazal tip tümörlerden türetilmiş meme kanseri hücre hatlarında analizler gerçekleştirilmiştir. Toplamda, 1756 fosfoproteinden 5000'den fazla fosforylasyon bölgesi tespit etmiş ve her iki tümör alt tipinde 815 proteinden 1879 fosforile bölge tespit etmişlerdir. Daha sonra, plazmada, 14 fosfoproteinden türetilmiş ortak 8 fosforile bölgenin, hücre hatlarında da bulunmaları nedeniyle bu tespitin bir meme kanseri belirteci olduğu düşünülmüştür (143). Meme kanseri hastaları ile ilgili daha yakın tarihli bir çalışmada, plazma örneklerinden izole edilen ekzom ve mikrovезiküllerde sırasıyla 9225 ve 1014 fosfopeptit tanımlanmıştır (144). Araştırmacılar hastalıkları sağlıklı durumlardan ayırt etmek için kan örneklerinde fosfatazlardan korunmuş bir alan olarak hücre dışı vezikülleri çalışma ortamı olarak belirlemiştir. Meme kanseri üzerine yapılan bu çalışmada araştırmacılar; plazmadan elde edilen hücre dışı veziküllerde tanımlanmış fosfoproteinlerin, hastalık biyobelirteçleri olarak değerlendirilebileceğini ve oluşturdukları MS tabanlı strateji ile birlikte çalışmada kullandıkları yöntemlerin başka hastalıkların araştırılmasında da uygulanabileceğini vurgulamışlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Çalışmanın örnek hazırlığı ve MS analizi basamaklarında kullanılan enzim, solvent ve sarf malzemeler Tablo 3-1’de listelenmiştir. Çalışma süresince kullanılan cihazlar ise Tablo 3-2’de belirtilmiştir.

Tablo 3-1: Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Kimyasallar	Sarf Malzemeler
Protein ekstraksiyon kiti	Filtreli pipet ucu (10-200-1000µl)
Proteaz inhibitör kokteyli	Lobind tüp (0,5-1,5-2 ml)
FASP Protein digestion kit	Konik tabanlı santrifüj tüp (15-50 ml)
Dithiothreitol (DTT)	Çelik boncuk
Amonyum bikarbonat	pH ölçer strip
İyodoasetamid	Diyaliz kaseti
Tripsin	Şeffaf 500 µl qubit tüpü
Formik asit	Tüp standı (1,5-2ml’lik)
Trifloroasetik asit (TFA)	Büyük boy nitril eldiven
Asetonitril LiChrosolv	Kimyasal koruyucu eldiven
Water LiChrosolv	Maske
Metanol LiChrosolv	Toz bırakmayan temizleme mendili
Etanol	Micro union
Qubit deney kiti	Autosampler vial
TiO ₂ bulk	PM 100 C18 5µm 300 µm x5mm
HeLA protein digest standart	PM 100 C18 100Å, 2µm 75µmx250 mm
LTDQ Velos ESI pozitif iyon kalibrasyonu	Nanoviper capillary IDxL 75umx550mm

Tablo 3-2: 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
Microspin santrifüj	Biosan
Laminar flow	ESCO
Etüv	Nuve
Liyofilizatör	Christ
Manyetik karıştırıcı	Isolab
Vakum konsantratör (Speedvac)	Eppendorf
Vorteks	Biosan
Pipet takımı	Rainin
Elektronik termometre	Isolab
Masa tipi büyüteç	Isolab
Klipsli laboratuvar saati	Isolab
Q Exactive Plus Mass Spectrometry	Thermo Scientific
Dionex Ultimate 3000 RSLC	Thermo Scientific

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Örneklerin Tanımı ve Toplanması

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi cerrahi kliniğinde küçük hücreli dışı akciğer Kanseri (KHDAK) tanısı konulan 7 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Numune alımına başlamadan önce araştırma hakkında bilgilendirmek üzere çalışmaya katılmak isteyen kişilere aydınlatılmış onam formu verilerek imzalatılmıştır. Bu çalışmaya ait gruplar, histopatolojik olarak büyük hücreli karsinom olarak sınıflandırılan tümör dokularından ve kontrol olarak tümörlü olmayan normal akciğer dokularından oluşturulmuştur. Ameliyat sonrası belirli büyüklükte alınan tümör ve kontrol doku örnekleri sıvı azot yardımıyla dondurulmuş ve çalışma öncesine kadar -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.2. Deney Tasarımı

Tümör ve kontrol dokularından ekstrakte edilen total proteinler bir endopeptitaz ile sindirilerek triptik peptit haline getirildi ve elde edilen yüksek miktardaki peptit karışımından fosfopeptitler zenginleştirildi. Sonrasında nanoLC-ESI-MS/MS sistemi ile yüksek verimli fosfoproteomik analizler gerçekleştirildi. Her bir numunenin analizinden elde edilen ham veriler informatik programında işlenerek büyük hücreli karsinom hastalarına ait akciğer dokularının fosfoprotein profili oluşturuldu. Daha sonra ise etiketsiz kantifikasyon yöntemiyle yüksek güvenilirlikle tanımlanan fosfoproteinlere ait ifade farklılıkları ortaya çıkarıldı. Anlamlı farklılık tespit edilen fosfoproteinlerin ileri doğrulaması için PRM tarama modu kullanılarak tüm örneklerde hedefe yönelik analizler gerçekleştirildi. Fosfoprotein profili ve ifade farklılıklarına ait çalışma verileri farklı informatik programlarıyla değerlendirilerek analiz sonuçları görselleştirildi. Elde edilen bulgular ve literatürdeki bilgiler ışığında büyük hücreli karsinom için biyobelirteç adayı olarak değerlendirilebilecek aday fosfoproteinler belirlendi.

3.2.3. Doku Homojenizasyonu ve Protein Ekstraksiyonu

Homojenizasyona başlamadan önce doku örneklerindeki protein degradasyonunun ve fosfat gruplarının kaybının önlenmesi amacıyla homojenizasyon tamponuna proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli eklendi. Homojenizasyon sıcaklık koşulları dikkate alınarak TissueLyser LT (Qiagen) yardımıyla gerçekleştirildi.

Homojenata SDS ve DTT içeren ekstraksiyon tamponu eklendi ve 95°C’de, 10 dakika inkübe edilerek sistein disülfid bağlarının serbest sülfhidril gruplarına dönüşümü sağlandı. Protein dışı hücre artıklarının uzaklaştırılması için ekstrakt 14.000xg’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant toplam protein miktarının hesaplanması için yeni bir tüpe aktarıldı.

3.2.4. Protein Miktarının Hesaplanması

Örnek içerisindeki toplam protein miktarının hesaplanmasında Qubit 4.0 Fluorometre (Thermo Scientific) cihazı ve protein deney kiti (Thermo Scientific) kullanıldı. Protokole uygun olarak dikkatli bir şekilde hazırlanan üç standart 15 dakikalık inkübasyon sonrasında cihaza okutuldu ve standartlar için beklenen konsantrasyonlar başarılı bir şekilde tespit edildi. Protokole uygun olarak hazırlanan 200 kat sulandırılmış örnekler de aynı şekilde 15 dakikalık inkübasyondan sonra cihaza okutuldu ve protein konsantrasyonları ng/μl cinsinden ölçüldü.

3.2.5. Triptik Peptit Eldesi

Her bir doku numunesinden elde edilen yüksek konsantrasyondaki proteinler filtreli kolon yardımıyla triptik peptit haline getirildi. Sindirim işlemi, Wisniewski ve ark. tarafından geliştirilen yöntemi referans alan filtreli preperasyon kiti (FASP™ Protein Digestion Kit, Expedeon) kullanılarak gerçekleştirildi (145). Kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilen aşamalar özetle şu şekildedir:

200 μl üre eklenen filtreli kolona 30 μl örnek eklenerek 14 000xg’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Filtre yüzeyindeki protein örnekleri, IAA (Iodoasetamide) ile 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. Birkaç basamak üre yıkamasından sonra üre konsantrasyonunun azaltılması için tripsin enziminin çalışma pH aralığına (pH 7-9) uygun olan 50mM amonyum bikarbonat tamponu ile 3 defa yıkama işlemi yapıldı. Sonrasında örnekler; 50mM amonyum bikarbonat içerisinde çözündürülmüş tripsin enzimi ile muamele edildi ve 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kolonlar yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve filtre yüzeyindeki peptitlerin geri kazanılması için filtreler 50mM amonyum bikarbonat tamponu eklenerek 14 000xg’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Elüsyon sonrası elde edilen peptit karışımı bir sonraki basamağa kadar saklanmak üzere liyofilize edildi.

3.2.6. Fosfopeptitlerin Zenginleştirilmesi

Peptit karışımı içerisinde çok düşük miktarda bulunan fosfopeptitlerin, güvenilir bir MS analizinin yapılması amacıyla proteomik örnek hazırlığı basamaklarına ek olarak zenginleştirme basamağı uygulanır. Zenginleştirme işlemi, daha önce bildirilen TiO_2 materyalinin pipet ucuna yerleştirildiği yöntem temel alınarak gerçekleştirildi (146). Liyofilize peptitler asetonitril-TFA ve asidik tampon karışımı ile çözündürüldü. Peptit karışımı, TiO_2 materyali ile süspanse edildi. Bağlanma işleminin gerçekleşmesi için kısa bir süre beklendikten sonra bağlanmayan peptitlerin uzaklaştırılması için yıkama işlemi gerçekleştirildi. TiO_2 materyaline bağlanan peptitlerin elüsyonu için yüksek pH'a sahip tamponlar kullanıldı. MS öncesinde, her bir zenginleştirilmiş numunenin LC-MS analizi koşullarına uygun hale getirilmesine dikkat edildi.

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

Liyofilize peptitler analiz için %0,1'lik formik asit ile sulandırıldı. Derin fosfoproteomik profillemeye ve protein ifade değişimleri için fosfopeptit örneklerin analizleri UltiMate™ 3000 NanoLC kromatografisi ve orbitrap kütle analizörüne sahip Q-Exactive Plus kütle spektrometresi (MS) sistemi ile gerçekleştirildi. Analiz öncesinde laboratuvardaki sıcaklık ve nem gibi ortam koşulları stabil hale getirildi, cihaz temizliği ve bakımı yapıldı, hareketli fazların uygunluğu kontrol edildi ve sistem kalibrasyonu yapıldı. Daha öncesinde yapılan optimizasyon çalışmaları neticesinde fosfopeptitler için geliştirilmiş en uygun tune ve LC metotları seçildi. Kullanılan tune ve LC metotlarına ait çeşitli parametreler Tablo 3-3'de verilmiştir. Nano akış sağlayan ters faz sıvı kromatografi sisteminde %0,1'lik formik asit içeren asetonitril ve su hareketli fazları kullanılarak fosfopeptitlerin ayrımı sağlandı. Bütün analizler boyunca akış 300 nl/dk sabit hızla verildi. Analizler full MS tarama modunda genel olarak 400-2000 m/z aralığında gerçekleştirildi (147, 148).

Tablo 3-3: LC-MS/MS Analiz Parametreleri

Sıvı Kromatografi Koşulları	
Kromatografi Sistemi	Ultimate 3000 RSLC Nano Sistem
Trap Kolon	PM 100 C18 5 µm 300 µm x 5 mm
Analitik Kolon	PM 100 RSLC18 100 Å, 2 µm 75 µm IDx250 mm
Kolon Sıcaklığı	40°C
Enjeksiyon Hacmi (Değişken)	2 µl (Genel kullanım)
Akış Oranı	300 nl/dk
Hareketli Faz A	%0,1 Formik asit
Hareketli Faz B	%80 Asetonitril
MS Koşulları	
MS Sistemi	Thermo Q exactive Plus
İyonizasyon Modu	ESI (+) pozitif
Elektrosprey voltajı (Genel Kullanım)	2,0 kV
Kütle Tarama aralığı	50 - 2000 m/z , 400-2000m/z
Veri Kazanımı	Veri Bağımlı Kazanım (DDA)
İyon seçimi	+2 ≤
Parçalama tipi	HCD

3.2.8. Ham Verilerin İşlenmesi, İstatistiksel ve Biyoinformatik Analizler

MS analizi sonrası elde edilen ham veri dosyaları Proteome Discoverer (PD) 2.2 programı kullanılarak işlendi. Protein, peptit tanımlamaları ve göreceli ifade farklılıkları bu programda iş akışlarının oluşturulmasıyla gerçekleştirildi. Tümör ve kontrol grupları arasındaki istatistiksel değerlendirmelerde ANOVA testi kullanıldı. İki grup arasında en az 2 kat değişim gözlenen proteinlerin istatistiksel değerlendirmesi yapıldı. Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ kabul edildi.

3.2.9. Proteome Discoverer İformatik Programıyla Verilerin İşlenmesi

Fosforotein/fosfopeptit tanımlamaları ve ifade farklılıkları Proteome Discoverer (PD) 2.2 (Thermo Scientific) analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi. Referans olarak İnsan Protein Veri tabanından (UniProtKB/Swiss Prot and TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <http://ca.expasy.org/sprot/>) indirilen insan proteomuna (Taxonomy ID: 9606) özgü FASTA dosyası kullanıldı. PD’de fosfoproteinlerin, fosfopeptitlerin, peptit-spektrum eşleşmelerinin (PSMs), fosforilasyon bölgelerinin ve protein anotasyonlarının belirlenmesi için çalışmaya özgü iş akışları (Processing ve Concensus) oluşturuldu. Gruplar arası ifade farklılıkları da yine oluşturulan iş akışları sonrasında detaylı bir şekilde incelendi. Oluşturulan iş akışları ile ilgili parametreler Tablo-2.2’de verilmiştir.

Tablo 3-4: Proteome Discoverer 2.2 Parametreleri

Peptit ve Protein Filtresi Parametreleri	
Protein Veri tabanı	Homo sapiens (SwissProt TaxID=9606)
FDR (False Discovery rates)	0.01
Peptit Güvenilirliği	Yüksek (High Confidence)
Kat Değişim Oranları	2-10
Sequest HT Arama Motoru	
Protein Databank	Swissprot
Enzim Adı	Trypsin
Sabit Modifikasyonlar	Karbomidometil-C (+57.021 Da)
Dinamik Modifikasyonlar	N-ucu asetilasyon (+42.011 Da)
	Oksidasyon M (+15.995Da)
	Phospho S,T,Y (+79,966Da)

3.2.10. PRM (Parallel Reaction Monitoring) Yöntemi ile Protein Doğrulamalarının Yapılması

Keşif analizi sonrası ham veriler PD’de işlenerek ifade değişimi olan proteinler tespit edilmiştir. Yapılan filtreleme sonrasında proteinlerin tanımlanmasını sağlayan fragmentlere dair parametreler tespit edilmiş, bu parametrelere göre düzenlenen PRM modu ile örnekler tekrar analiz edilmiştir. Analizlerinde, 0.05 ve 0.01 olmak üzere iki IMT (ion match tolerance) değeri kullanılmıştır. PRM verileri; ifade değişimlerinin doğruluğunu incelemek üzere tam tarama modu ile elde edilen verilerden oluşturulan bir kütüphane ve kromatogram bilgileri ile karşılaştırılmıştır.

3.2.11. Farklı biyoinformatik Yazılımlarla Verilerin Değerlendirilmesi

PRM yöntemiyle validasyonu yapılan proteinlerin ifade farklılıkları Perseus (Perseus software platform v1.6.5) programı kullanılarak görselleştirilmiştir. Pik alanları tespit edilmiş peptitlere ait veriler Perseus programına uygun şekilde yeniden düzenlenip programın çalışma sayfasına yüklenmiştir. Programın ısı haritası (heatmap) aracının yardımıyla her bir protein için ayrı bir doküman oluşturulmuştur.

Anlamlılık tespit edilen proteinlerin listesi STRING Version 11.0 (https://string-db.org/cgi/input.pl?sessionId=NhM2VICvX8qw&input_page_show_search=off) sitesinde belirtilen formatta yüklenerek protein-protein etkileşim haritası oluşturulmuştur. Burada analiz ayarlarında etkileşim skoru en yüksek güvenilirlik (highest confidence) olarak 0,900 seçilmiştir. Sonrasında, yedi farklı renkle temsil edilen kümeler ve elde edilen ağ ile protein etkileşimleri ortaya çıkarılmıştır.

İfade farklılığı olan fosfoproteinlerin motif analizleri için Phosphosite Plus (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>) ve PHOSIDA (<http://141.61.102.18/phosida/index.aspx>) veritabanları kullanılmıştır. PHOSIDA veri tabanında gerçekleştirilen de novo motif analizlerindeki parametrelerde minimum skor: 15 ve eşleşen minimum bölge yüzdesi: 5 olarak seçilmiştir. 5 skoru, 10^{-5} ’e karşılık gelen bir p-değerini ifade eder. Yapılan analizlerle serin, treonin ve tirozin fosforilasyonları için ayrı ayrı motifler oluşturulmuştur. Bunun için tespit edilen fosforilasyon bölgelerine ait amino asit dizileri istenilen formata uygun hale getirilerek programa yüklenmiş ve insan proteomu üzerinden programa ait “Background data set” oluşturulmuştur. Daha sonra PHOSIDA’da kullanılan dizi listesi Phosphosite Plus veri

tabanına yüklenerek veri setimizdeki amino asit frekansı görselleştirilmiştir. Serin, treonin ve tirozin için ayrı ayrı logolar oluşturulmuştur.

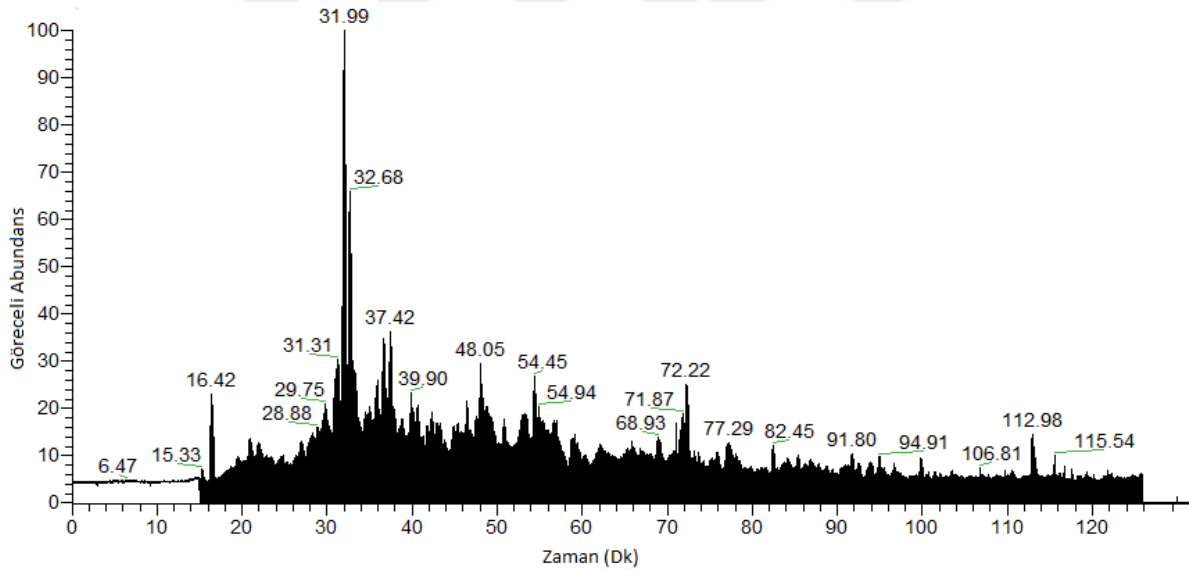
Zenginleştirilmiş kinaz-substrat analizleri için KEA2 (Kinase Enrichment Analysis; <https://www.maayanlab.net/KEA2/>) veri tabanı kullanılmıştır. Fosforilasyon bölgesi ve protein seviyesinde analizlerin yapılabildiği yazılım programına, ifade değişimi olan 324 proteinin gen ismi ve fosforilasyon bölgelerine ait bilgiler yüklenmiştir. p-değerleri Benjamini-Hochberg ve Bonferroni yöntemleri ile düzeltilmiştir. Ayrıca başka bir veri tabanına (<https://amp.pharm.mssm.edu/X2K/>) yine bu proteinlerin gen isimleri yüklenerek transkripsiyon faktörlerinin, ilgili protein kinazların ve iletişimi sağlayan ara proteinlerin bulunduğu bir etkileşim ağı oluşturulmuştur. Analiz programındaki p-değerleri $-\log_{10}$ tabanında (hipergeometrik p-değeri şeklinde) verilmiştir.

Proteinlere ait kinazları ve her bir kinazlar tarafından fosforile edilen bölgeleri bir arada sunmak amacıyla KEA verileri, Cytoscape 3.7.1 programına yüklenmiştir. Ağ yapısının oluşması için programa yüklenen veri giriş dosyasındaki ilgili sütunlar, programda sunulan parametrelere göre etiketlenmiştir. Meydana gelen ağ sistemi daha sonra program tarafından sunulan özellikler yardımıyla renklendirilmiş ve düzenlenmiştir.

4. BULGULAR

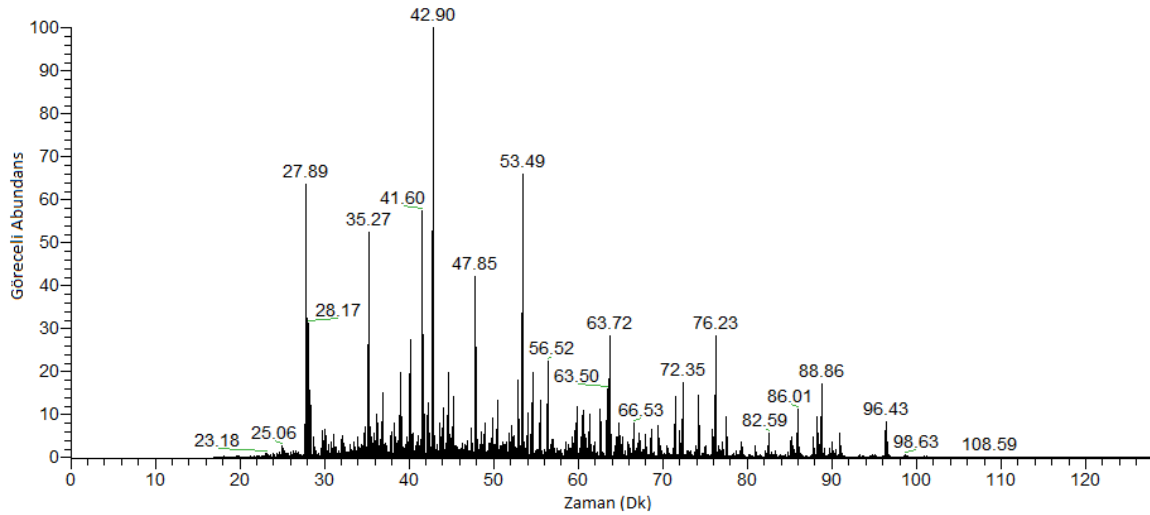
4.1. NanoLC-MS/MS Analizine ait Veriler

Büyük hücreli akciğer karsinomu tanısı konulan hastalara ait örneklerin MS tabanlı yöntemlerle incelendiği çalışmamızda öncelikle deneylerde kullanılacak numunelere ait alikotlarda biyolojik farklılığı en aza indirmek için şok dondurma yapılan örnekler sıvı azotla toz haline getirilerek mümkün olduğunca tüm alikotlarda homojen bir dağılım olması sağlanmıştır. Her bir örneğin, hazırlık aşamasından sonra keşif çalışması için (discovery) tam tarama modu ve validasyon çalışması için PRM tarama modu kullanılarak MS tabanlı analizleri yapılmıştır. Tam tarama modu ve PRM tarama modunda yapılan analizler sonrasında bir örneğe ait total iyon kromatogramlarını gösteren grafikler Şekil 4-1’de verilmiştir.



Şekil 4-1: Total İyon Kromatogram Görüntüsü

Görüntü, tam tarama modunda gerçekleştirilen analiz sonrasında elde edilmiştir. Kromatogram, analiz süresince sabit akışla gelen iyonların nispi abundanslarını göstermektedir.



Şekil 4-2: PRM Modunda Gerçekleştirilen Analiz Sonrasında Elde Edilen Total İyon Kromatogram Görüntüsü

Kromatogram, analiz süresince belli zaman aralıklarında tespit edilen iyonların nispi abundanslarını temsil etmektedir.

4.2. İstatistik Analiz Sonrası Büyük Hücreli Karsinom Fosfoproteomik Profiline ait Veriler

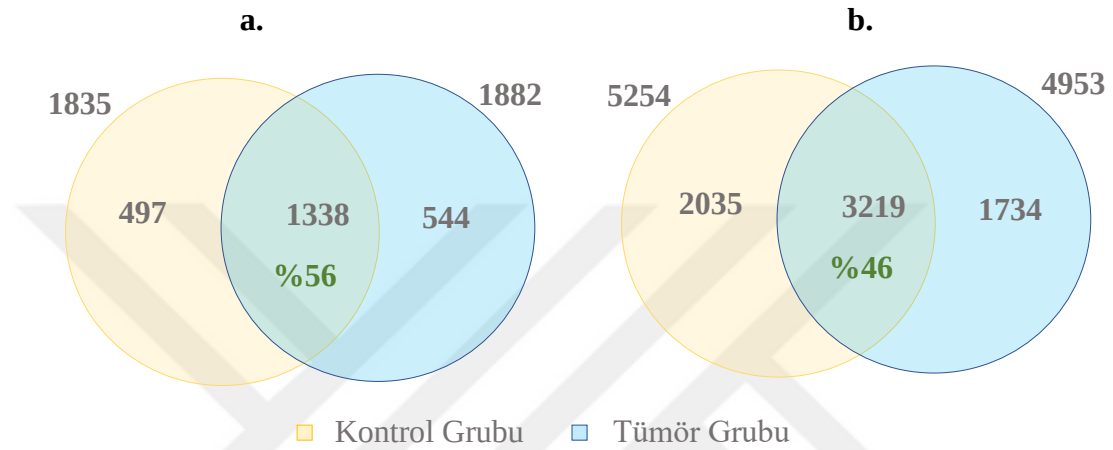
Tanımlamalar SwissProt insan proteom veri tabanı ve Sequest HT arama motoru kullanılarak Proteome Discoverer istatistik programında yapıldı. Yapılan filtrelemelerle yüksek güvenilirlikte (high confidence) toplam 2820 protein tanımlanırken bunların 2314'ü fosforilasyon modifikasyonuna sahipti. Örnek grupları kendi içerisinde değerlendirildiğinde tümör grubunda tanımlanan 2344 proteinden 1882'si fosfoprotein olarak tanımlanmıştır. Kontrol grubunda ise 2178 proteinden 1835'i fosfoprotein olarak tanımlanmıştır.

Tablo 4-1: Tümör Ve Kontrol Gruplarında Tanımlanan Fosfoprotein-Fosfopeptit Sayıları

	Protein	Peptit	Fosfoprotein	Fosfopeptit	PSMs
Tümör & Kontrol Grubu (total)	2820	11406	2314	8558/6863*	115491
Tümör Grubu	2344	8269	1882	6186/4953*	53925
Kontrol Grubu	2178	8187	1835	6332/5254*	61316

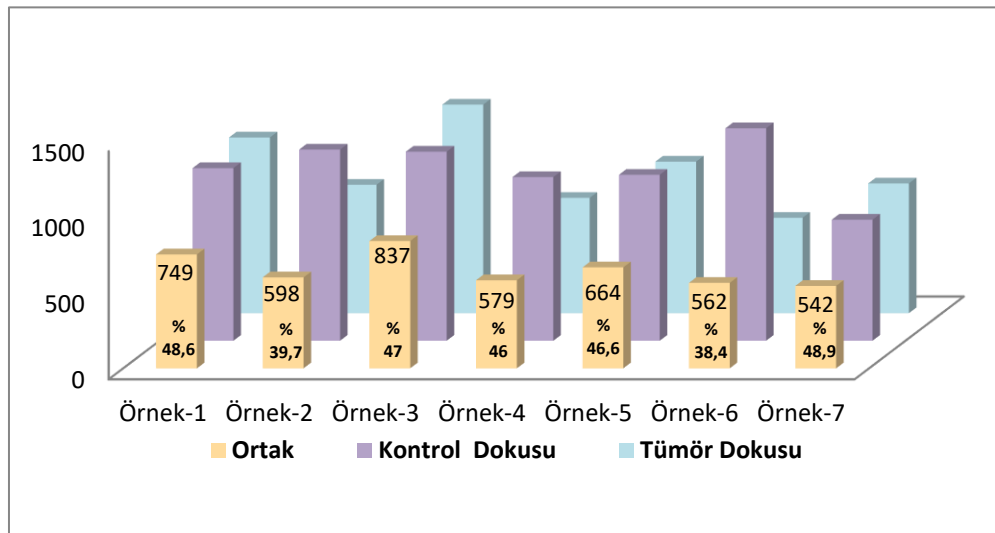
Tanımlamalar Proteome Discoverer 2.2 istatistik programında yüksek güvenilirlik filtresi seçilerek yapılmıştır. False Discovery Rate (FDR) %1. * Tanımlanan özgün fosfopeptitler.

Tüm gruplardaki tanımlamalara ait protein, fosfoprotein, peptit ve PSMs verileri Tablo 4-1’de gösterilmiştir. Tanımlanan 2314 fosfoprotein’in ismi ve tanımlamalara ait bilgiler ham veriler bölümünde verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmada tanımlanan 1338 fosfoprotein ve 3219 fosfopeptit her iki grupta ortak olarak bulunmuştur. Her iki örnek grubunda ortak bulunan fosfoprotein sayısı %50’nin üzerindedir (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: Her Bir Örnek Grubunda Ortak Tanımlanan Fosfoprotein Ve Fosfopeptit Sayıları

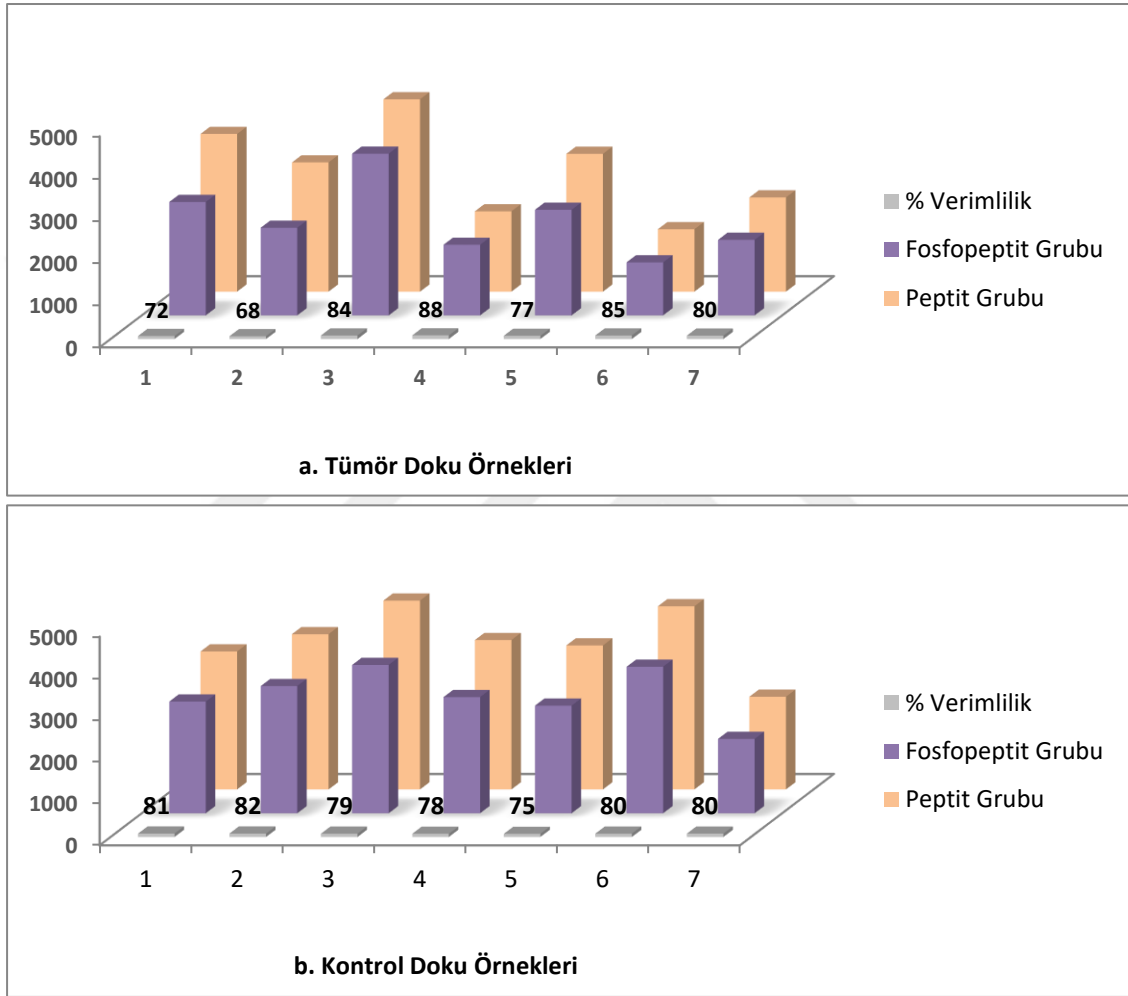
a. Tanımlanan fosfoprotein sayısı, b. Tanımlanan özgün fosfopeptit sayısı



Şekil 4-4: Her Bir Olgunun Tümör Ve Kontrol Dokularında Ortak Fosfoprotein Sayıları

Sarı renk ile temsil edilen sütunlar her bir olgunun tümör ve kontrol grubunda ortak olarak tanımlanmış fosforile protein sayılarını ve yüzdeliklerini ifade etmektedir.

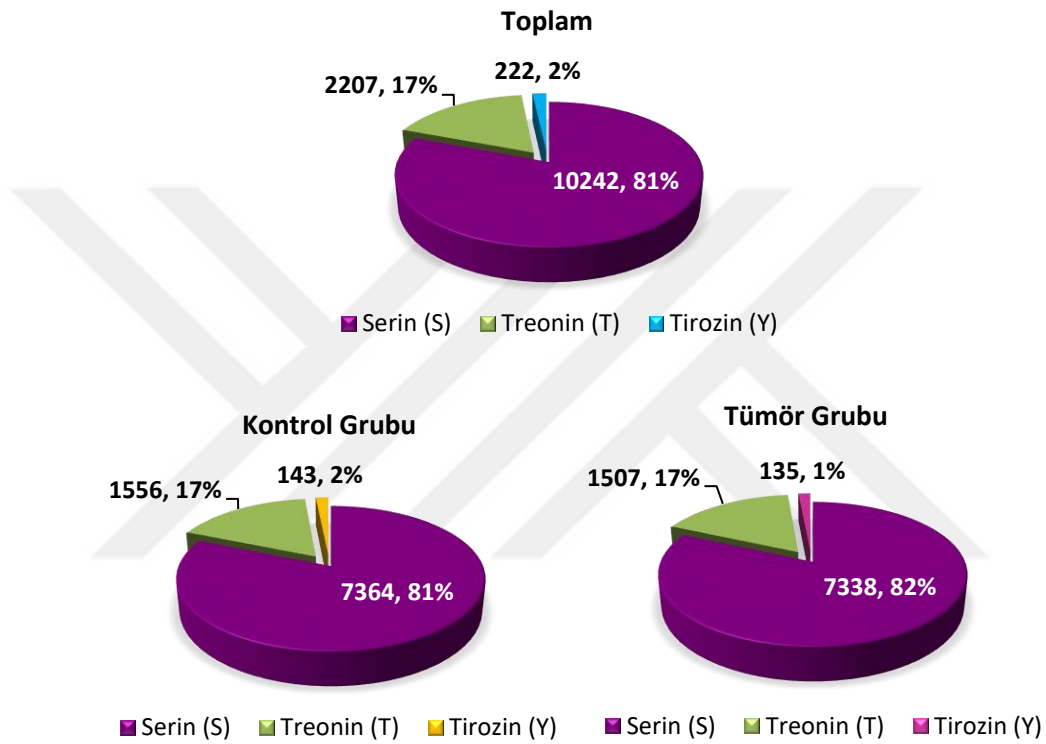
Her bir örneğin tümör ve kontrol dokusunda tanımlanan fosfoproteinlerde en yüksek çakışma oranı %48,9 ile Örnek-7'ye aittir. Örnek-3'de ortak tanımlanan fosfoproteinlerin sayısı 837 olup en yüksek fosfoprotein sayısına sahip olmasına rağmen çakışma oranı %47'dir. Diğer örneklerle ait ortak bulunan fosfoprotein sayıları ve yüzde oranları Şekil 4-4'te verilmiştir.



Şekil 4-5: Her Bir Olgunun Tümör Ve Kontrol Dokusundaki Fosfopeptit Zenginleştirme Verimlilikleri

Zenginleştirme yönteminin verimliliği değerlendirildiğinde her bir örnekte tanımlanan toplam peptit sayısının fosforile olan peptit sayısına olan oranı, hem kontrol grubunda hem de tümör grubunda ortalama %79 olarak saptanmıştır. Örnek-4'ün tümör dokusunda tanımlanan 1905 peptitten 1673'ü fosforile olup zenginleştirme yönteminin verimliliği %88'dir.

Kontrol grubunda ise Örnek-2’de tanımlanan 3721 peptitten 3047’si fosforile olup zenginleştirme verimliliği %82’dir. Ayrıca en yüksek peptit tanımlaması örnek-3’te görülmüştür. Bu örneğin tümör dokusunda tespit edilen 4560 peptitten 3833’ü fosfopeptittir. Aynı örneğin kontrol dokusunda ise 4526 peptitten 3554’ünde fosforilasyon modifikasyonu tespit edilmiştir. Her bir örnekteki zenginleştirme yönteminin verimliliği Şekil 4-5’de gösterilmektedir.



Şekil 4-6: Gruplardaki Fosforile Aminoasitlerin Dağılımı

Tanımlanan fosfoproteinler fosforilasyon bölgelerine göre değerlendirildiğinde toplamda 12671 fosforilasyon bölgesi tanımlanırken bunlardan %81’i serin fosforilasyonu, %17’si treonin ve %2’si tirozin fosforilasyonu idi. Gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde tümör grubunda toplam 8980 kontrol grubunda ise 9063 fosforilasyon bölgesi tanımlandı. Tümör ve kontrol gruplarında tanımlanan toplam fosforilasyon bölgelerinin yüzde dağılımı Şekil 4-6’da verilmiştir. Gruplara ait ayrıntılı fosforilasyon bilgileri Tablo 4-2’de verilmiştir.

Tablo 4-2: Grupiçi Tanımlanan Toplam Fosforile Bölge Sayıları (Phosphosites)

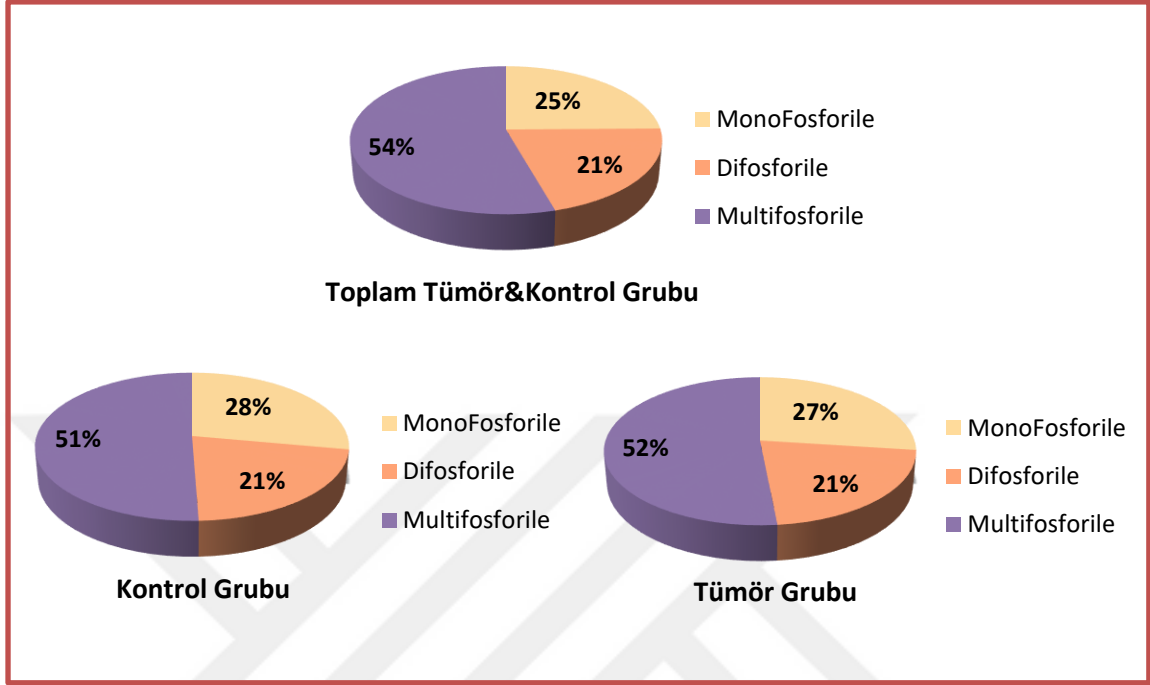
Grup	Toplam pSTY	pS	pT	pY
Tümör&Kontrol	12671	10242/2587*	2207/1102*	222/175*
Tümör	8980	7338/2111*	1507/823*	135/105*
Kontrol	9063	7364/2054*	1556/813*	143/122*

pS: FosfoSerin, pT: FosfoTreonin, pY: FosfoTirozin, ikinci sütun her bir grupta tanımlanan toplam fosforilasyon bölgelerini, son üç sütun ise fosforilasyon yerine göre tanımlanan toplam fosforile bölge (phosphosites) sayılarına ait bilgileri içermektedir. * pS, pT ve pY fosforilasyonuna sahip toplam fosfoprotein sayıları

Tümör ve kontrol örnekleri birlikte analiz edildiğinde serin fosforilasyonu görülen toplam 2587 fosfoprotein tanımlanırken, treonin fosforilasyonu görülen 1102 fosfoprotein ve tirozin fosforilasyonu görülen 175 fosfoprotein tanımlanmıştır. Tanımlanan fosfoproteinlerin 641'i tek bir fosforilasyon bölgesine (monofosforile) sahipken, 538'i iki fosforilasyon bölgesine (difosforile) ve 1408'i ikiden fazla fosforilasyon (multifosforile) bölgesine sahipti.

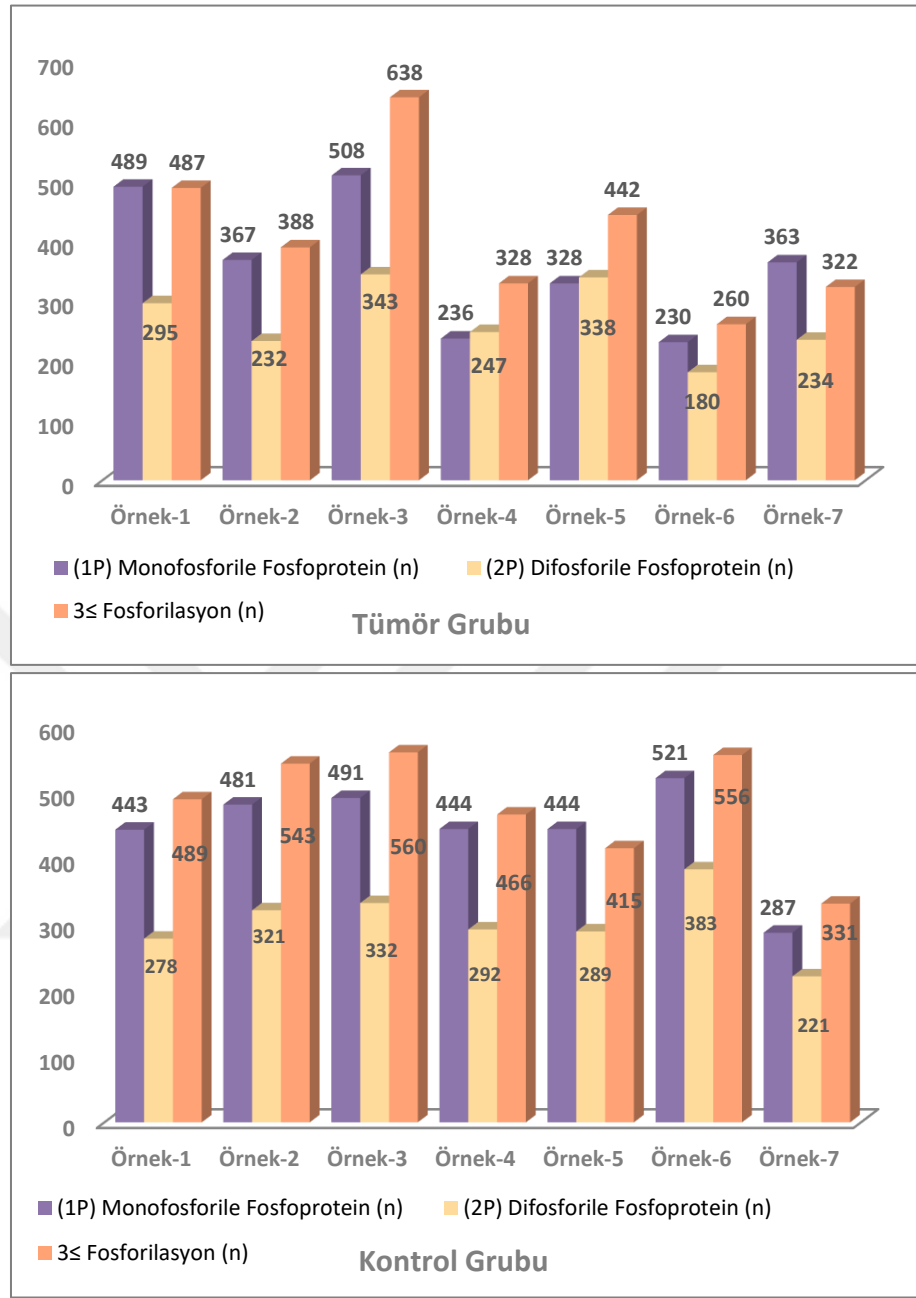
Tümör grubunda serin fosforilasyonu görülen toplam 2111 fosfoprotein tanımlanırken, treonin fosforilasyonu görülen 823 fosfoprotein ve tirozin fosforilasyonu görülen 105 fosfoprotein tanımlanmıştır. Tanımlanan fosfoproteinlerin 571'i tek bir fosforilasyon bölgesine (monofosforile) sahipken, 452'si iki fosforilasyon bölgesine (difosforile) ve 1088'i iki ve daha fazla (multifosforile) fosforilasyon bölgesine sahipti.

Kontrol grubunda serin fosforilasyonu görülen toplam 2054 fosfoprotein tanımlanırken, treonin fosforilasyonu görülen 813 fosfoprotein ve tirozin fosforilasyonu görülen 122 fosfoprotein tanımlanmıştır. Tanımlanan fosfoproteinlerin 573'ü tek bir fosforilasyon bölgesine (monofosforile) sahipken, 442'si iki fosforilasyon bölgesi (difosforile) ve 1039'u iki veya daha fazla (multifosforile) fosforilasyon bölgesine sahipti. Tüm gruplarda mono, di ve multi-fosforile fosfoproteinlerin yüzde dağılımları Şekil 4-7'de gösterilmiştir.



Şekil 4-7: Tanımlanan Fosfoproteinlerin Fosforile Bölge Sayısına Göre Yüzde Dağılımı

Her bir örnekte tanımlanan fosfoproteinlerin fosforile bölge sayısına göre gruplandırması ise Şekil 4-8’de verilmiştir. Tumor grubunda tek bir fosforile bölgesi olan ortalama 360 fosfoprotein tanımlanırken 2 ve daha fazla fosforile bölgesi olan fosfoproteinlerin sayısı sırasıyla ortalama 267 ve 409’dur. Kontrol grubuna bakıldığında tek bir fosforile bölgesi olan ortalama 444 fosfoprotein tanımlanırken sırasıyla 2 ve daha fazla fosforile bölgesi olan ortalama 302 ve 480 fosfoprotein tanımlanmıştır.



Şekil 4-8: Fosforile Bölge Sayısına Göre Tanımlanan Fosfoproteinlerin Örneklerdeki Dağılımı

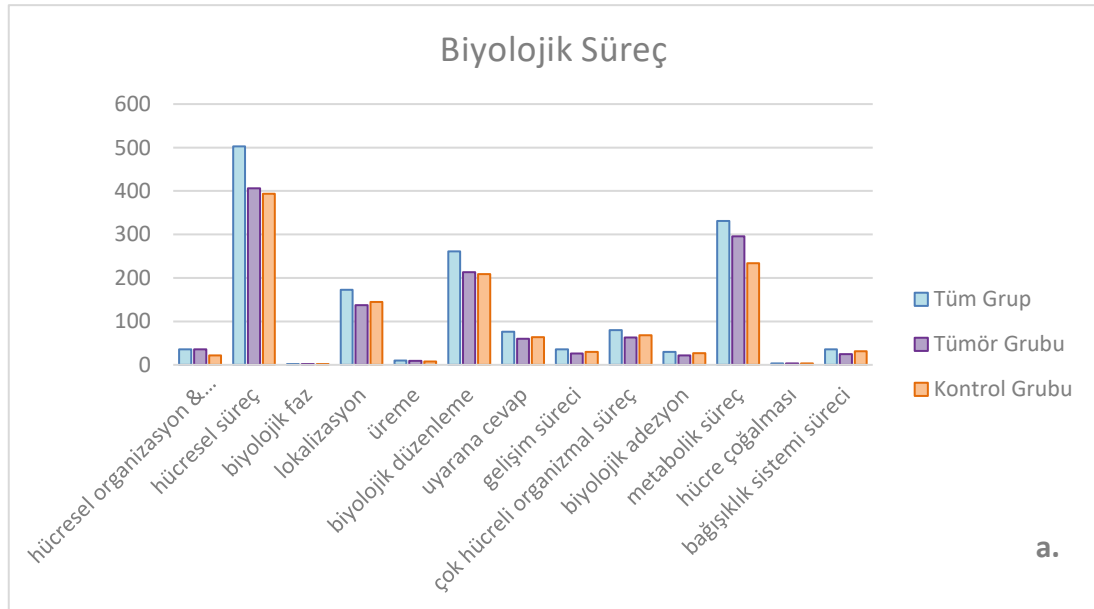
4.2.1. Gen Ontoloji Analizi ile Fosfoproteinlerin Sınıflandırılması

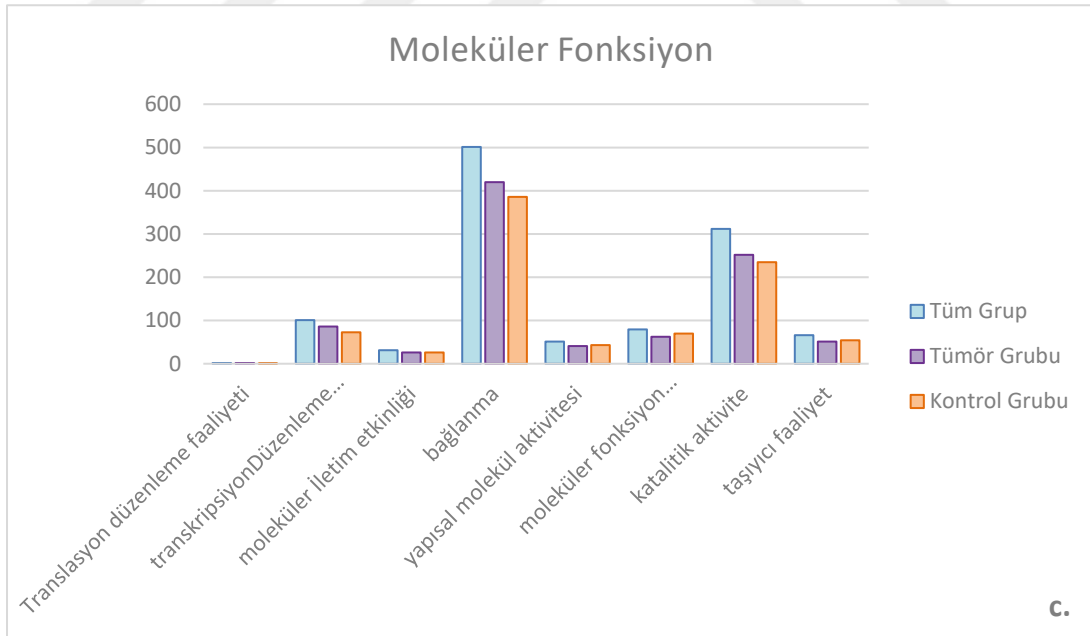
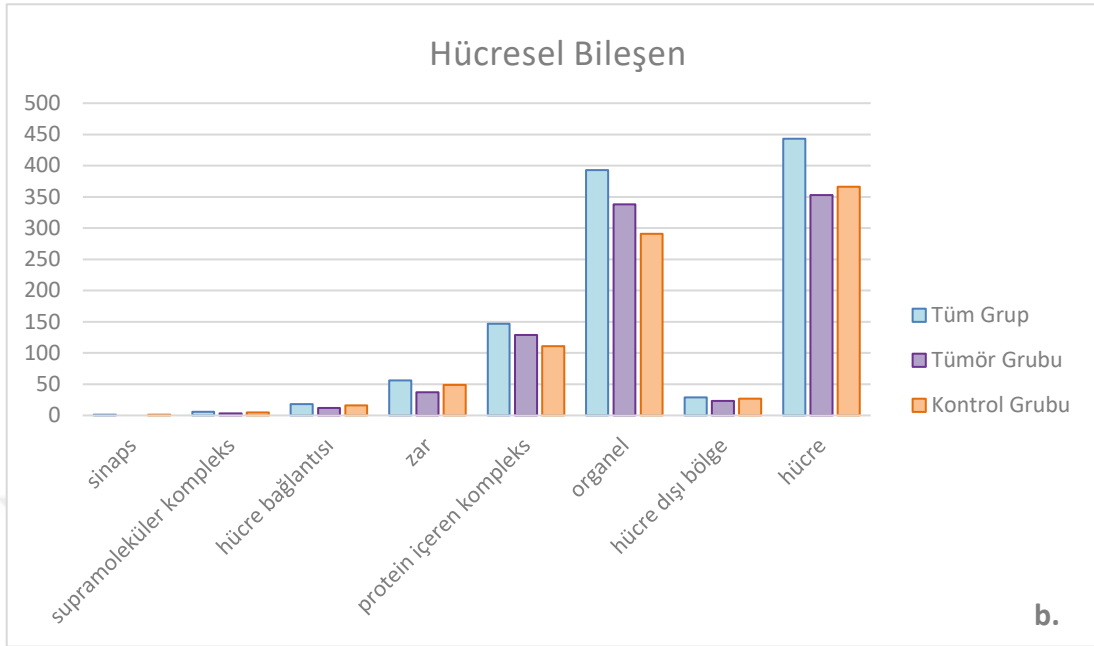
Çalışmamızda tümör ve kontrol gruplarında tanımlanmış olduğumuz 2000'in üzerindeki fosfoprotein, PANTHER 14.1 (<http://www.pantherdb.org/>) informatik aracı kullanılarak aşağıdaki şekillerde özetlenen bilgiler elde edilmiştir:

Şekil 4-9a'da görülen 13 farklı biyolojik sürece göre fosfoproteinlerin gruplar arası karşılaştırması yapılmıştır. Her iki grupta fosfoproteinlerin dağılım oranı genel olarak benzerlik gösterirken metabolik süreçte rol alan fosfoproteinlerin tümör grubunda daha yüksek olduğu görülmüştür.

Bulundukları hücresel bileşenlere göre incelendiğinde tanımlanan fosfoproteinler en çok hücre ve organellerde rol alırken sırasıyla tümör dokusunda 393 ve 443; kontrol dokusunda 291 ve 366'dır (Şekil 4-9b).

Fosfoproteinler moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırıldığında tümör grubunda tanımlanan fosfoproteinlerin yarıya yakını bağlanma aktivitesi gösterirken %26'sı katalitik aktiveye sahiptir. Tanımlanan diğer fosfoproteinler ise translayon ve transkripsiyon düzenleme faaliyeti, moleküler iletim, yapısal molekül aktivitesi, moleküler fonksiyon düzenleyicisi ve taşıyıcı faaliyetlerle ilgili olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 4-9c).



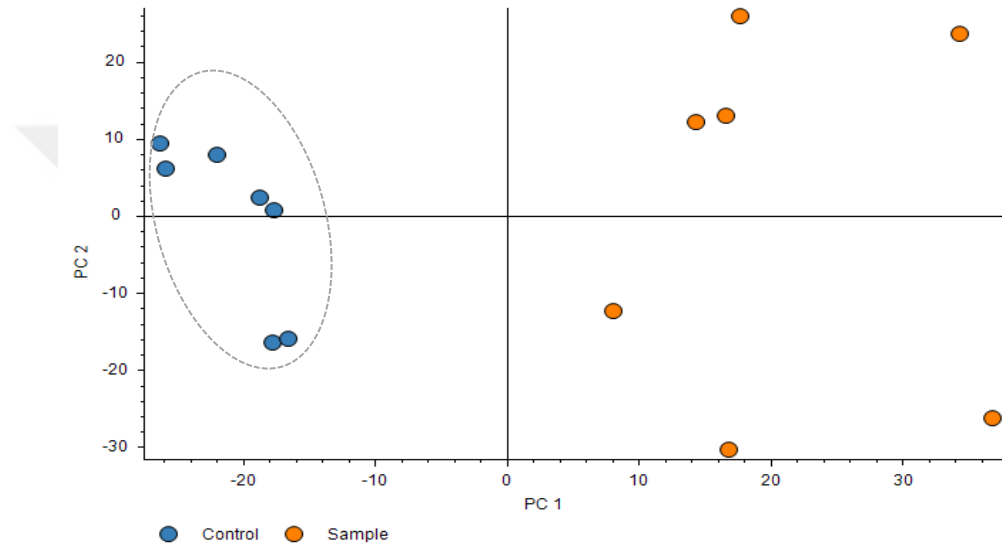


Şekil 4-9: Fosofproteinlerin Gen Ontoloji Analizi Sonrası Sınıflanlandırmaları

a. Biyolojik Süreç, b. Hücresel Bileşen, c. Moleküler Fonksiyon. X-ekseni fosfoproteinlerin hangi sınıfa ait olduğunu, Y-ekseni o sınıfa ait tanımlanan fosfoprotein sayılarını ifade etmektedir.

4.2.2. Fosfoprotein İfade Farklılıklarının Değerlendirmesi

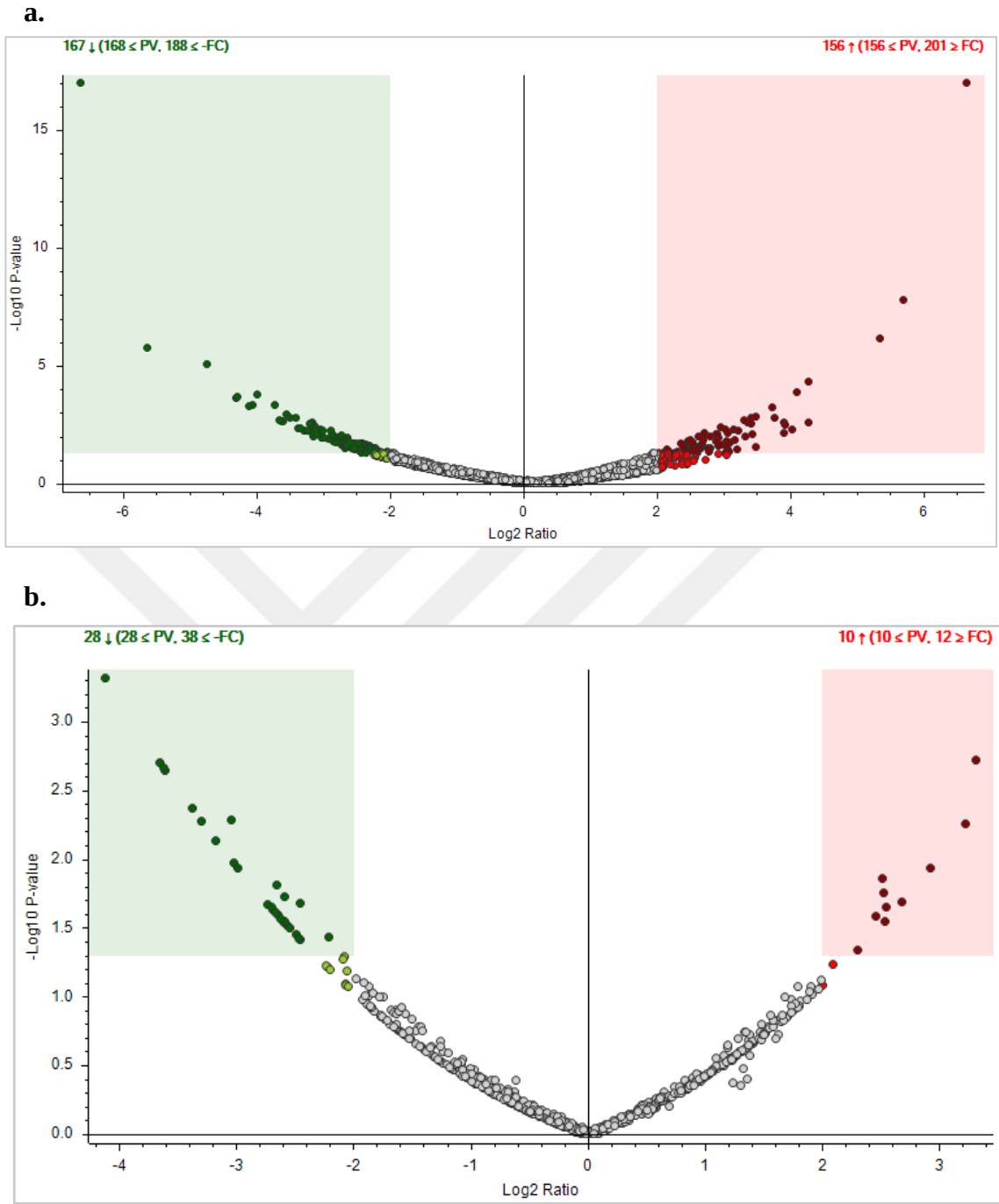
Çalışmamızda büyük hücreli karsinom (BHK) hastalarının tümör ve normal akciğer dokularında yüksek güvenilirlikte tanımlanan 2196 fosfoprotein kantifikasyonu yapılmıştır. Oluşturulan tümör ve kontrol grupları arasındaki grup ayrımı, temel bileşenler analizi (Principal component analysis-PCA) ile değerlendirilmiş ve kontrol grubunu oluşturan örnekler arasındaki benzerliğin tümör grubuna göre daha yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: Kontrol ve tümör doku örneklerinin fosfoprotein içeriklerine göre dağılımı

Scores Plot: Tümör&Kontrol Grupları için Temel Bileşen Analizi

Gruplar arası ifade değişimleri etiketsiz kantifikasyon yöntemi ile değerlendirildiğinde toplam 324 fosfoproteinde en az iki kat ifade değişimi olduğu bulunmuştur. Bunlardan 156'sının ifadesinin kontrol grubuna kıyasla tümör grubunda arttığı ve 167'sinin ise azaldığı görülmüştür (Şekil 4-11a). Hastalıkların karakterlerine dair daha belirgin işaretler görebilmek amacıyla çeşitli filtre kombinasyonları denenerek istenilen kat değişimini sergileyen farklı profiller elde edilebilir. Bu bağlamda tanımlanma değerleri göz önüne alınarak yapılan sıkı filtrelemelerle en az 2 kat ifade değişimi gösteren fosfoproteinlerden 10'u tümör dokusunda istatistiksel olarak anlamlı artış gösterirken 28'inin ifadesinde azalma olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4-11b). İstatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenen bu fosfoproteinlerin ayrıntılı listesi ise Tablo 4-4'te verilmiştir.



Şekil 4-11: Kat Değişimini Gösteren Volcano Plot Grafiği

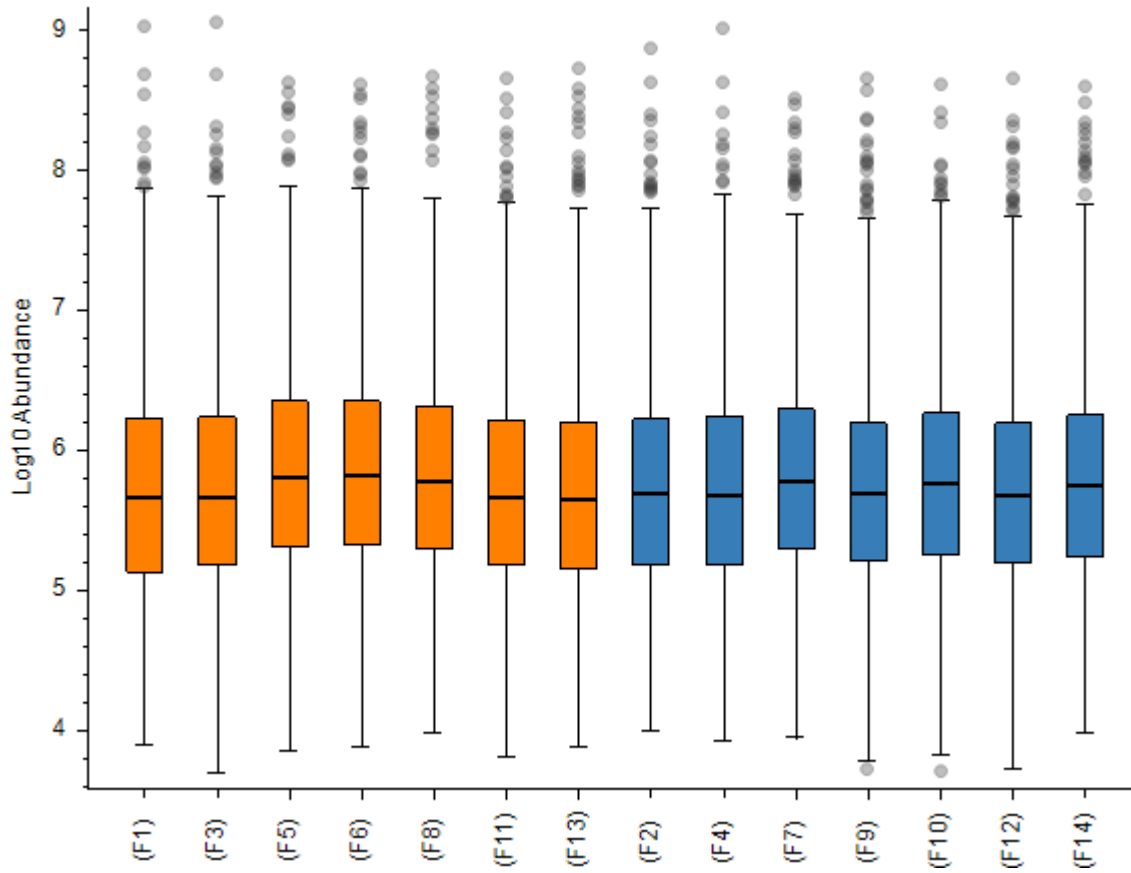
a-) İstatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat ifade değişimi olan fosfoproteinler, b-) Sıkı filtreleme sonrası istatistiksel olarak anlamlı bulunan en az 2 kat ifade değişimi olan fosfoproteinler. p değeri < 0.05 ; Log2 kat değişimi: 2; Yeşil ve pembe alanlarda istatistiksel olarak anlamlı en az iki kat ifade değişimi olan fosfoproteinler gösterilirken; azalan ifade değişimine sahip fosfoproteinler yeşil noktalarla, artan ifade değişimi olanlar kırmızı noktalarla ve ifade değişimi 2 katın altında kalan fosfoproteinler beyaz noktalarla temsil edilmektedir.

Tablo 4-3: Büyük Hücreli Karsinomda Anlamlı İfade Değişimi Olan Fosfoproteinler

Erişim Numarası	Kapsam [%]	Özgün Peptit Sayısı	Bolluk Oranı	p-değeri	Fosforile (S; T; Y) Bölge Sayısı	İfade Değişimi
Q9Y2D5-4	17	11	0,151	0,021	20	↘
Q9UPQ0-3	18	22	0,166	0,029	39	↘
Q9UMS6-2	20	18	0,178	0,036	27	↘
Q9NZN4	8	4	0,126	0,012	3	↘
Q9HBL0	34	42	0,166	0,029	93	↘
Q9H4X1	38	4	0,102	0,005	8	↘
Q9BYB0	9	11	0,160	0,026	16	↘
Q96MM6	6	3	0,123	0,011	7	↘
Q96A00	14	2	0,167	0,029	4	↘
Q92530	6	1	0,167	0,019	2	↘
Q6NZI2-1	42	17	0,156	0,023	11	↘
Q6NY19-1	8	5	0,158	0,025	8	↘
Q63HR2-4	10	13	0,169	0,030	23	↘
Q5U651	6	3	0,183	0,039	4	↘
Q53QV2	20	2	0,122	0,005	1	↘
Q15124-1	4	2	0,080	0,002	2	↘
Q14573	2	4	0,159	0,016	5	↘
Q0VF96	1	2	0,163	0,027	1	↘
Q03135	15	3	0,058	0,000	2	↘
Q01118	4	5	0,096	0,004	10	↘
P26678	23	2	0,172	0,032	2	↘
P26651	10	2	0,216	0,037	6	↘
P13224-2	4	2	0,182	0,021	2	↘
P02724	21	2	0,111	0,007	8	↘
O95810	25	9	0,082	0,002	21	↘
O94875-12	21	16	0,181	0,038	27	↘
O14639-1	13	9	0,154	0,022	18	↘
O14558	24	3	0,081	0,002	2	↘
Q9NR30-1	4	6	7,585	0,012	4	↗
Q96JC9	7	1	5,520	0,020	3	↗
Q92922	2	4	6,432	0,021	2	↗
Q15154-1	4	5	4,935	0,046	12	↗
Q14669-3	2	5	5,700	0,014	7	↗
P50479-1	12	2	5,787	0,018	4	↗
P49736	4	6	9,338	0,006	8	↗
P17096-1	51	3	5,796	0,029	10	↗
P15924-1	3	6	5,862	0,022	17	↗
O95684	7	2	9,924	0,002	3	↗

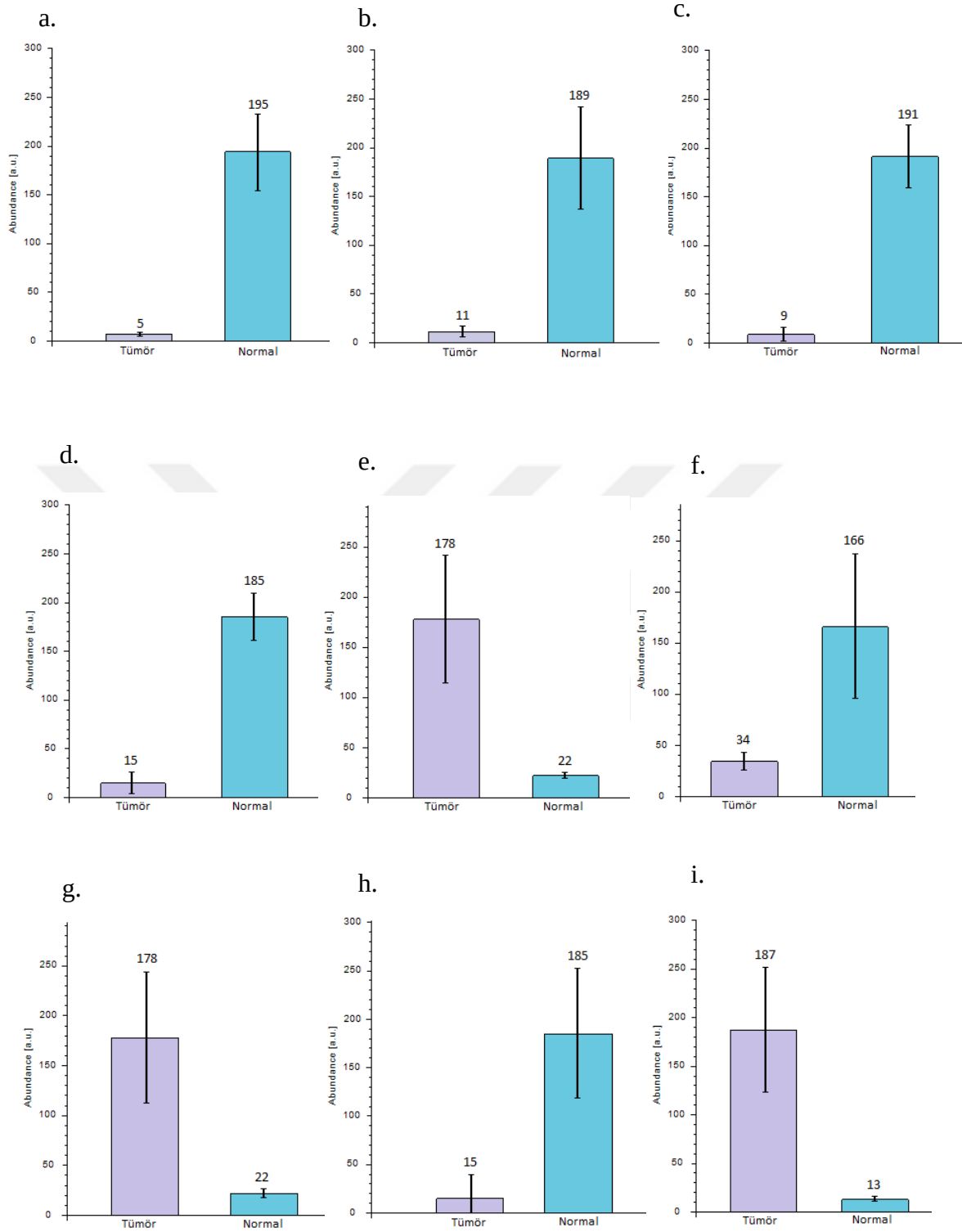
Sıkı filtreleme sonrası en az 2 kat değişim (2 veya 0.5) gözlenen fosfoproteinler, anlamlılık sınırı $p < 0.05$, ↗: artan ifade değişimi, ↘: azalan ifade değişimi. Erişim numaraları (Accession number) SwisProt veri tabanına aittir.

Deney koşullarının ve özellikle ifade farklılıklarının mümkün olduğunca doğru bir şekilde değerlendirilmesi amacıyla oluşturulan çalışma gruplarına ait örnek konsantrasyonlarının kutu bıyık grafiği Şekil 4-12’de gösterilmiştir. Şekil 4-13’te ise Caveolin-1, Cavin1, Cavin2, RGCC, SMARCC1, SYNPO2, HMGA1, Glycophorin A, MCM2 proteinlerinin gruplar arası görece abundans farklılıklarının ayrı ayrı değerlendirildiği bar grafiği görselleri bulunmaktadır.



Şekil 4-12: Örnek Konsantrasyonlarını Gösteren Kutu-Bıyık Grafiği

Kutu grafiği, fosforile edilmiş peptitler için normalizasyondan sonra log10 ölçeğine göre yoğunluk dağılımını göstermektedir. X-ekseni her bir örneği, Y-ekseni peptit yoğunluğunu bir log (log10) ölçeğinde göstermektedir. Tümör grubu turuncu ve kontrol grubu mavi ile temsil edilmiştir.



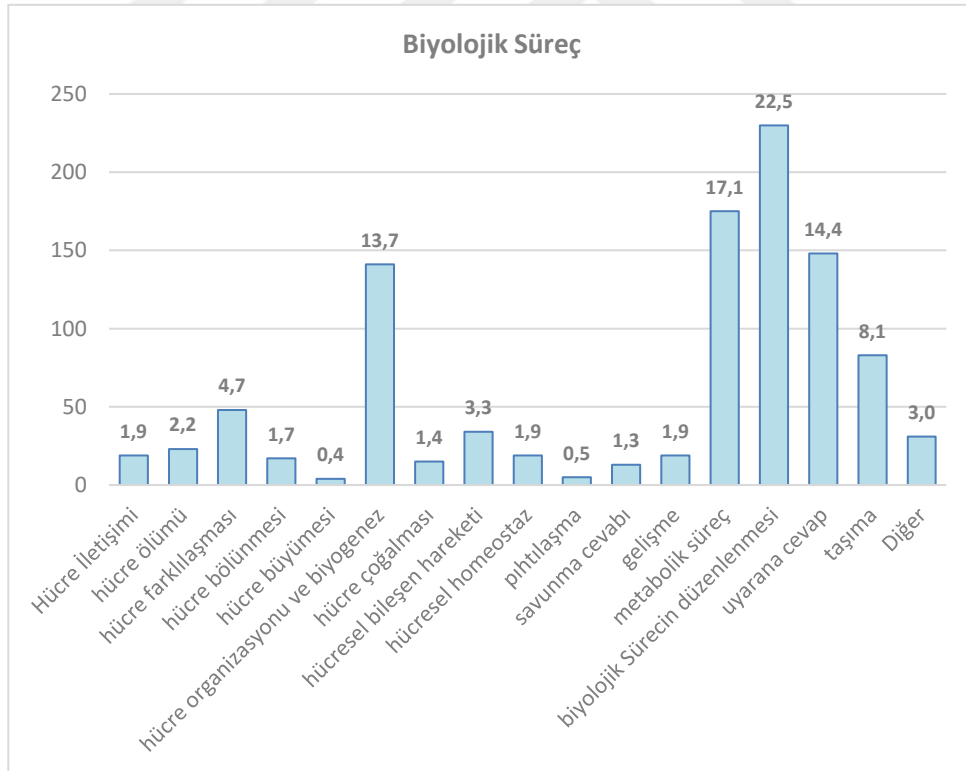
Şekil 4-13: Protein Abundans Farkı -Bar Grafikleri

a. Caveolin-1 (0,058) b. Cavin1 (0,156), c. Cavin2 (0,08), d. RGCC (0,102), e. SMARCC1 (6,432), f. SYNPO2 (0,178), g. HMGA1 (5,796), h. Glycophorin A (0,111), i. MCM2 (9,338) proteinlerinin tümör ve kontrol grupları arasındaki abundansı gösteren sütun grafikleri. Kat değişim oranları protein isimlerinin yanında, parantez içinde belirtilmiştir. p değeri <0,05.

4.2.3. Fosfoprotein Sınıflandırmalarına ait veriler

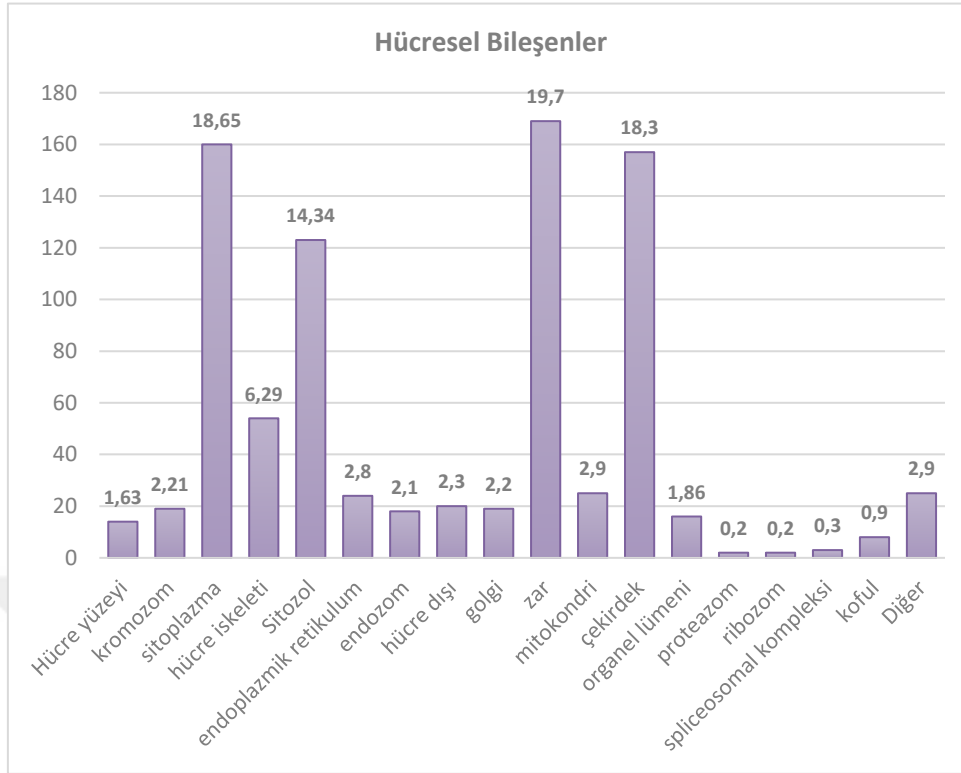
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tümör grubunda en az iki kat ifade değişimi olan ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan fosfoproteinler moleküler fonksiyonları, aktivite gösterdikleri biyolojik süreçler ve bulundukları hücresel yapılara göre sınıflandırılmıştır. İfade değişimi olan fosfoproteinlerin yarısı biyolojik süreç (%22), metabolik süreç (17,1), hücre organizasyonu ve biyogenezde (%13,7) rol alırken hücre çoğalması (%1,4), hücre büyümesi (0,4) ve hücre ölümü (%2,2) gibi kanser metabolizması için önemli biyolojik süreçlerde görev alan fosfoproteinlerin oranı %5'in altında kalmıştır (Şekil 4-14a). Görev aldıkları hücre alt yapılarına göre sınıflandırıldığında fosfoproteinler, en çok hücre zarı (%19,7) ve bunu takiben sitoplazma (%18,6), çekirdek, (%18,3) ve sitozolde (%14,3) yer almaktadırlar (Şekil 4-14b). Anlamlı ifade değişimi gözlenen fosfoproteinler moleküler fonksiyonları yönüyle değerlendirildiğinde protein bağlanması (%37) diğer kategorilere göre oldukça yüksek bir orana sahiptir (Şekil 4-14c).

a.

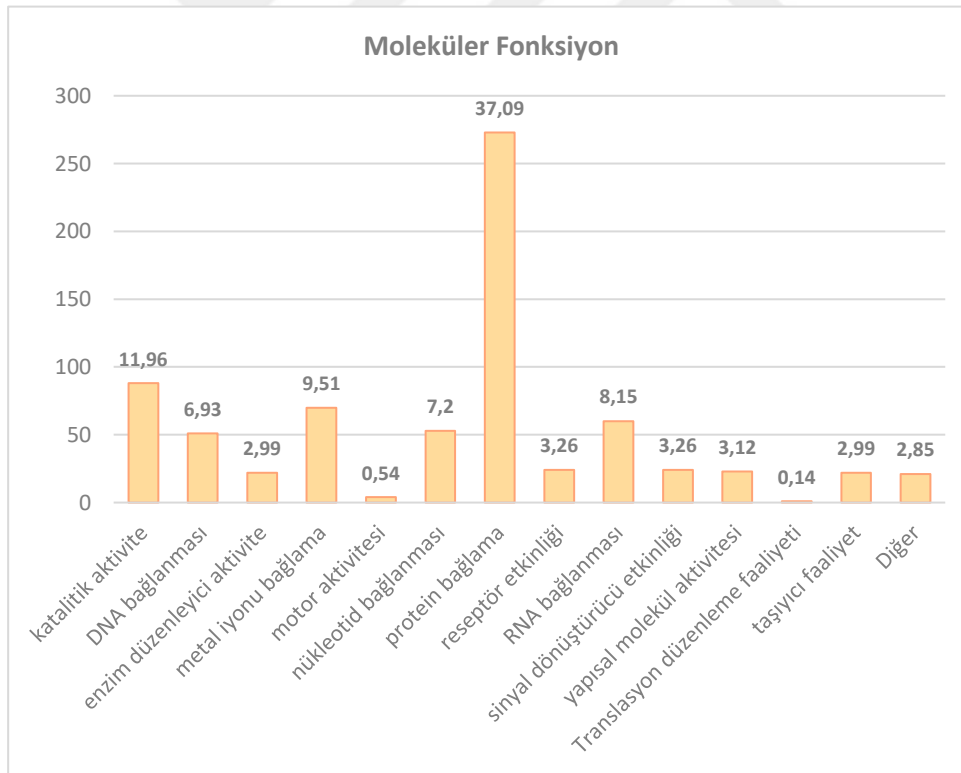


Şekil 4-14: İfade Değişimi olan Fosofproteinlerin Sınıflanlandırması

b.



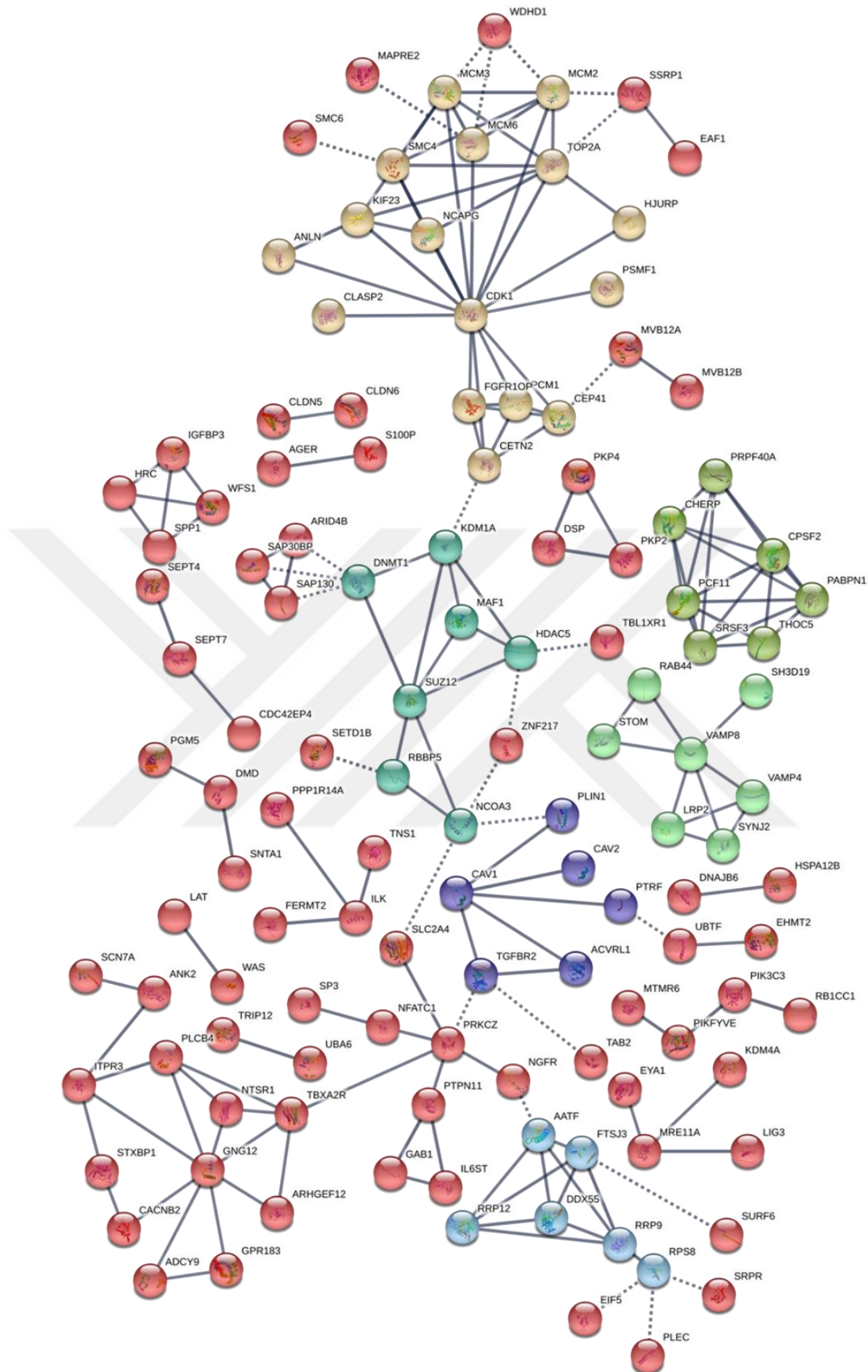
c.



A. Biyolojik Süreç, B. Hücresel Bileşenler, C. Moleküler Fonksiyon. Grafiklerin oluşturulmasında etiketsiz miktar tayini analizi yapıldıktan sonra en az 2 kat ifade değişimi ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan toplam 324 fosfoprotein değerlendirilmiştir. X-ekseni tanımlanan fosfoproteinlerin hangi sınıfa ait olduğunu, Y-ekseni o sınıfa ait tanımlanan fosfoprotein sayılarını ifade etmektedir. Fosfoproteinlerin dağılım yüzdeleri ise çubukların üzerinde yer almaktadır.

4.2.4. Protein-Protein Etkileşim (Protein-Protein Interaction-PPI) Analiz Sonuçları

Anlamalı ifade değişimi olan fosfoproteinler; protein-protein etkileşimlerinin fiziksel ve işlevsel olarak ilişkilerinin gösterildiği STRING Version 11 online veri tabanında analiz edilmiştir. Analiz ayarlarında gerekli minimum etkileşim puanı 0.900 (en yüksek güven) seçilmiştir. Analiz sonucu ortaya çıkan ağ sistemi, farklı renk tonlarında 7 küme ile temsil edilmiştir (Şekil 4-15). Veri tabanına yüklenen 324 fosfoproteinden elde edilen ağ sistemi analizinde 319 düğüm ve 179 protein etkileşim bağlantısı elde edilmiş ve PPI zenginleştirme p-değeri 0.001 bulunmuştur. Analiz ayarlarında en yüksek güven puanı seçildiği ve ağ sistemi ile ilişkili olmayan proteinler gizlendiği için yüksek etkileşimi olan 124 fosfoprotein ağ sisteminde gösterilmektedir.



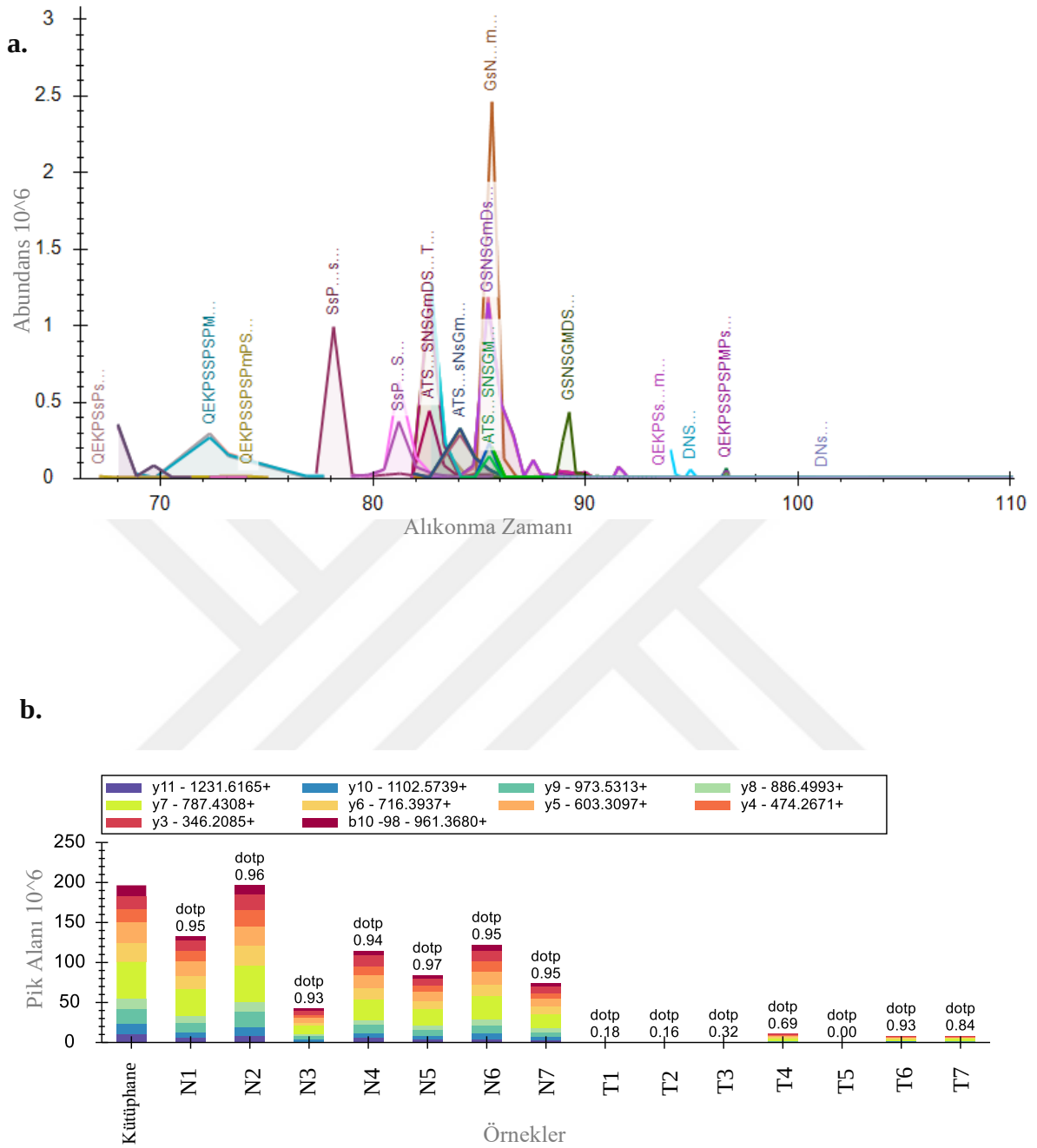
Şekil 4-15: Protein-Protein Etkileşim Ağı

324 protein girişinden 319'u veri tabanıyla eşleşmiştir. Etkileşim ağı oluşturma aşamasında minimum etkileşim değeri 0,900 (en yüksek güven) olarak seçilirken ağ ile bağlantılı olmayan nodlar gizlenmiştir. Buna bağlı olarak şekildeki ağ, 7 küme ve 124 düğümden oluşmuştur. Bağlantı çubuklarının kalınlığı veri desteğinin gücünü gösterir. Ort. yerel kümeleme katsayısı: 0,277. Ort. düğüm derecesi: 1,12. PPI zenginleştirme p-değeri: 0,00198.

4.2.5. PRM Analiz Sonuçları

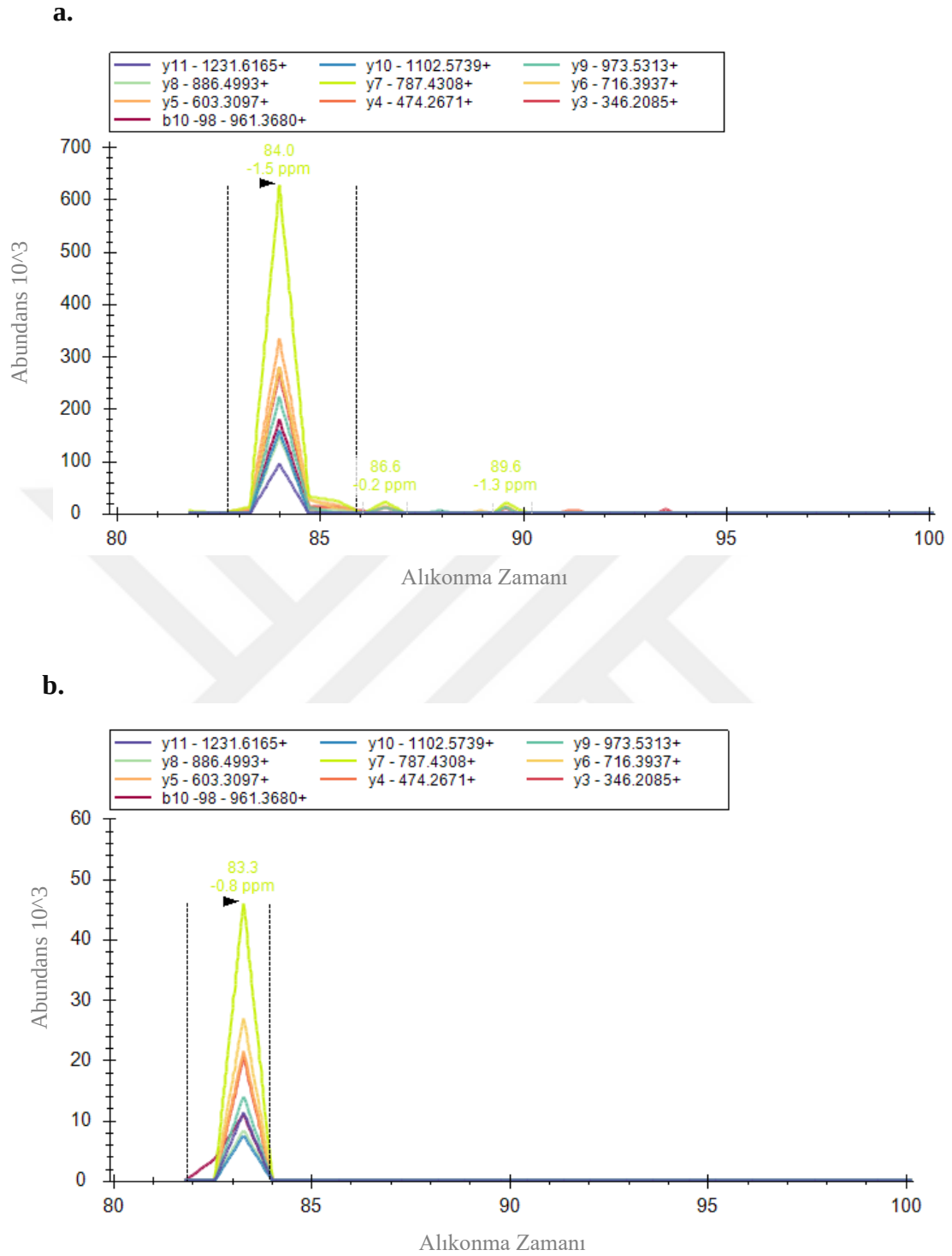
İfade değişimi tespit edilen 73 fosfoprotein PRM yöntemiyle doğrulaması yapılmıştır. Keşif analizi sonrası anlamlı ifade değişimi olan proteinlerden Caveolae-associated protein 2 (Cavin2) (Şekil 4-16, 4-17), Caveolin-1, Cavin1, RGCC, Isoform 2 Synaptopodin-2 (Şekil 4-18, 4-19), Glycophorin-A (Şekil 4-20, 4-21) dahil çok sayıda proteinin tümörde azaldığı doğrulanırken DNA replication licensing factor MCM6, SWI-SNF complex subunit SMARCC1, Isoform 4 of DNA topoisomerase 2-alpha, Plakophilin-4, Eukaryotic translation initiation factor 5 ve Isoform 3 of E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 gibi fosforile proteinlerin de tümör grubunda artış gösterdiği doğrulanmıştır. Her bir protein için elde edilen peptit/fragment bilgilerine ve pik alanlarına ait görseller çok fazla yer kapladığı için bulgular kısmında, az sayıda seçilen belirli proteinlerin görsellerine yer verilmiştir. PRM yöntemi ile elde edilen verilerin detaylı incelemesinden sonra grupların her bir protein ile ilişkili kantifikasyon değerleri, Perseus programına yüklenerek ısı haritalaması yapılmıştır (Şekil 4-22, 4-23).

PRM çalışmamızda IMT (ion match tolerance) değerleri 0.05 ve 0.01 olan iki farklı PRM değerlendirmesi yapılmış ve birbirine paralel sonuçlar gözlemlenmiştir. Çok fazla alan kaplamaması amacıyla pik integrasyonları ve abundans farklılıkları net bir şekilde anlaşılan 12 proteinin görsellerine ham veriler kısmında yer verilmiştir.



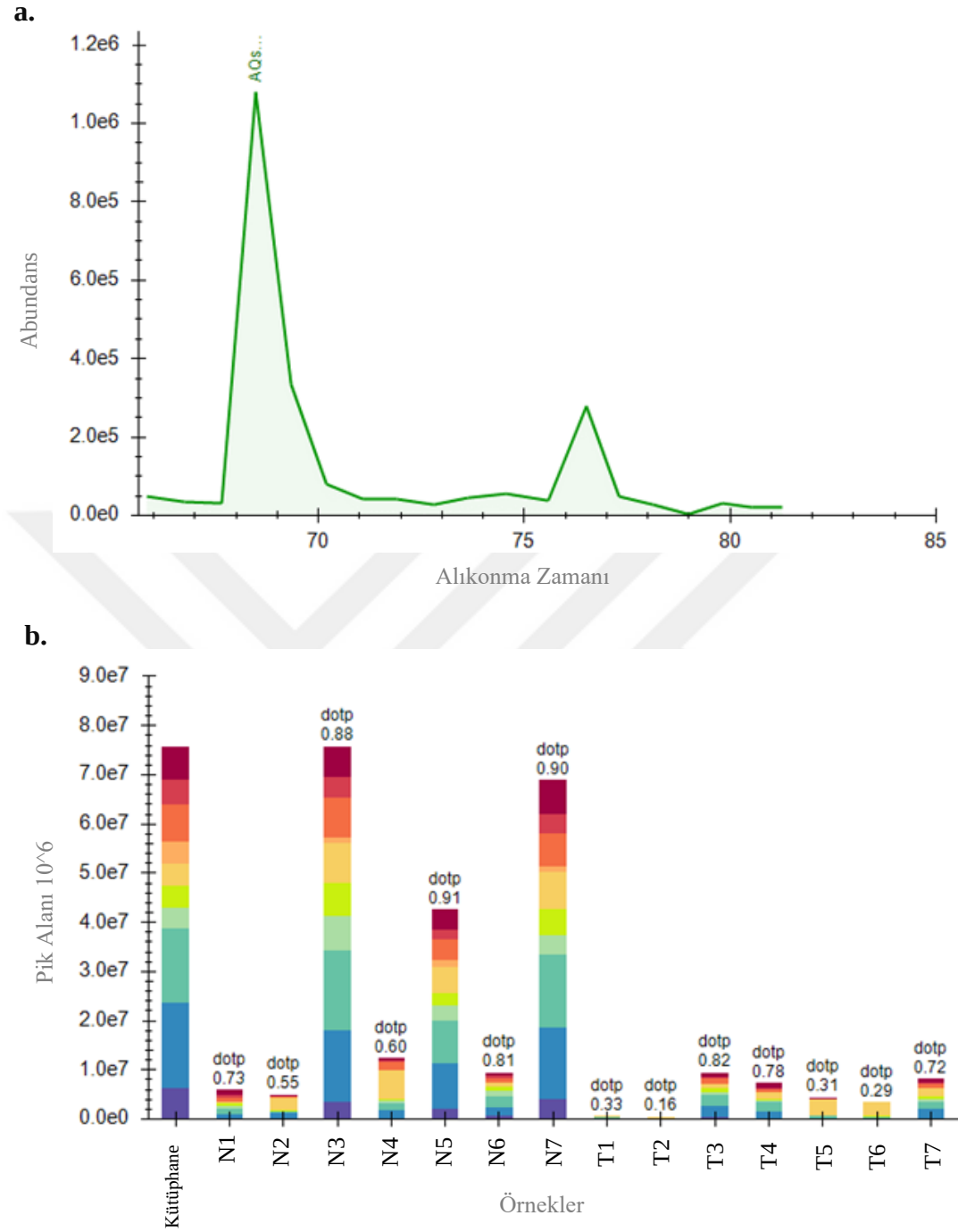
Şekil 4-16: PRM Analiziyle Elde Edilen Caveolae-associated protein 2'ye ait Görseller

a. Proteine ait genel kromatogram b. Her bir örneğin GSN**S**G**M**DSNIDLTIVEDEEEESVALEQAQK.V peptidine ait bollukları gösteren bar grafiği. Her bir renk farklı bir fragment iyonu temsil eder. “Dotp” değeri spektral kütüphane ile eşleşmenin derecesini gösterir.



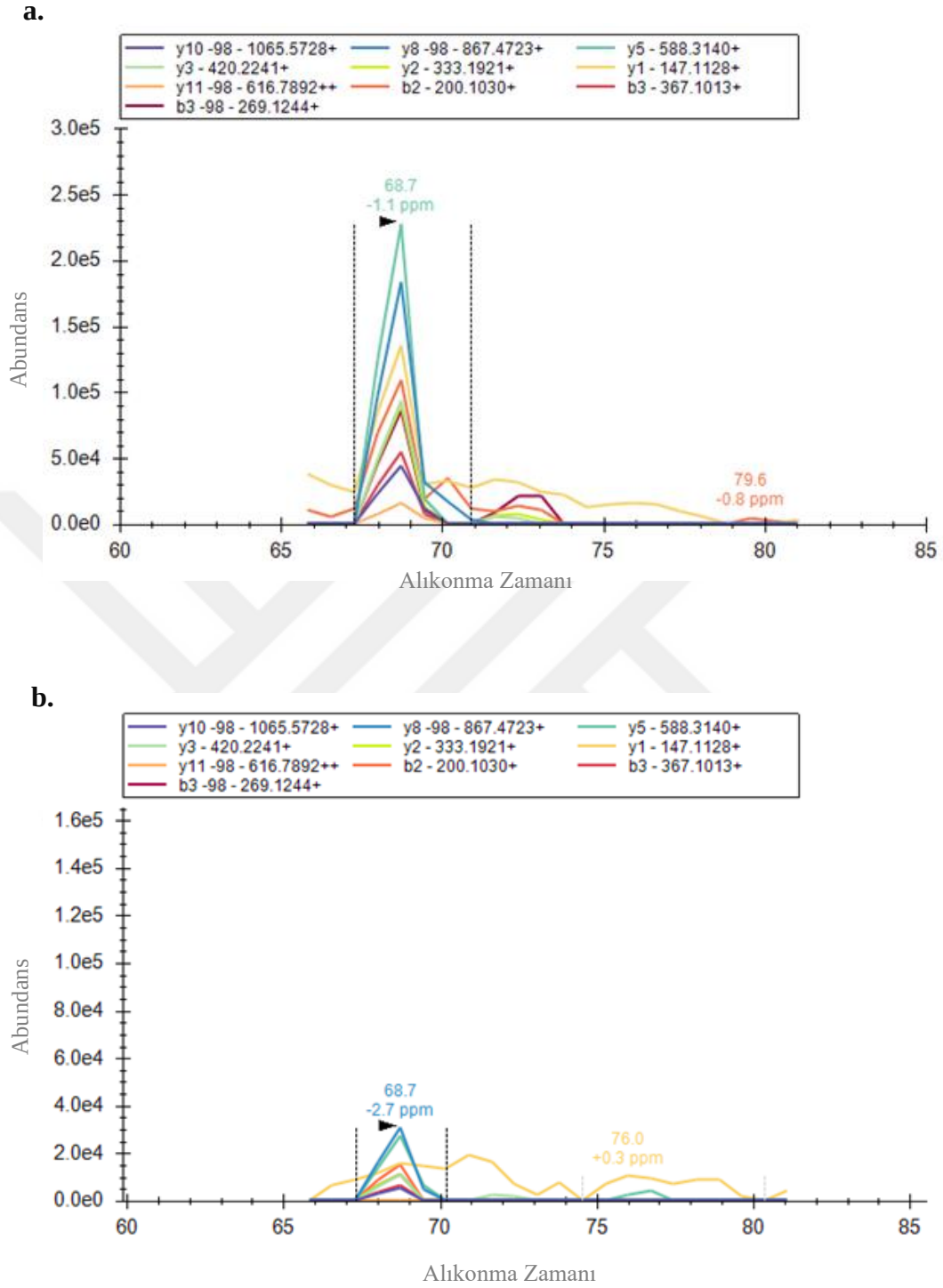
Şekil 4-17: Caveolae-associated protein 2'ye ait Fragment İyon Kromatogramları

Fragmentler aynı hastanın kontrol (N) ve tümör (T) örneklerinin GSNSGMDSNIDLTIVEDEEEESVALEQAQK.V peptidine aittir. a. N6 örneğine ait pik alanlarının entegrasyonunu b. T6 örneğine ait pik alanlarının entegrasyonunu göstermektedir.



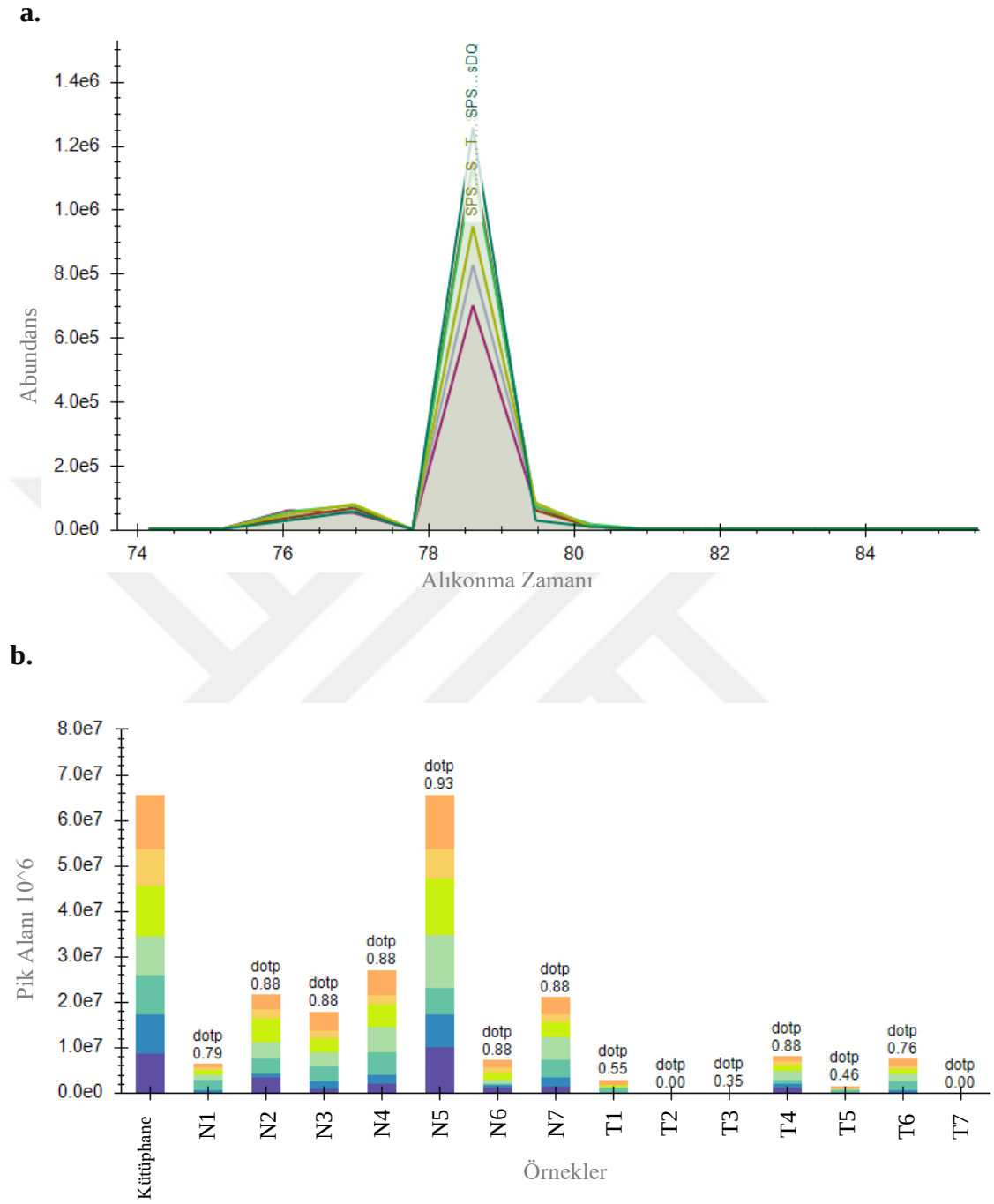
Şekil 4-18: PRM Analiziyle Elde Edilen İzofom-2 Synaptopodin 2'ye ait Görseller

a. Proteine ait genel kromatogram b. Her bir örneğin R.AQSPTPSLPASWK.Y peptidine ait bollukları gösteren bar grafiği. Her bir renk farklı bir fragment iyonu temsil eder. "Dotp" değeri spektral kütüphane ile eşleşmenin derecesini gösterir.



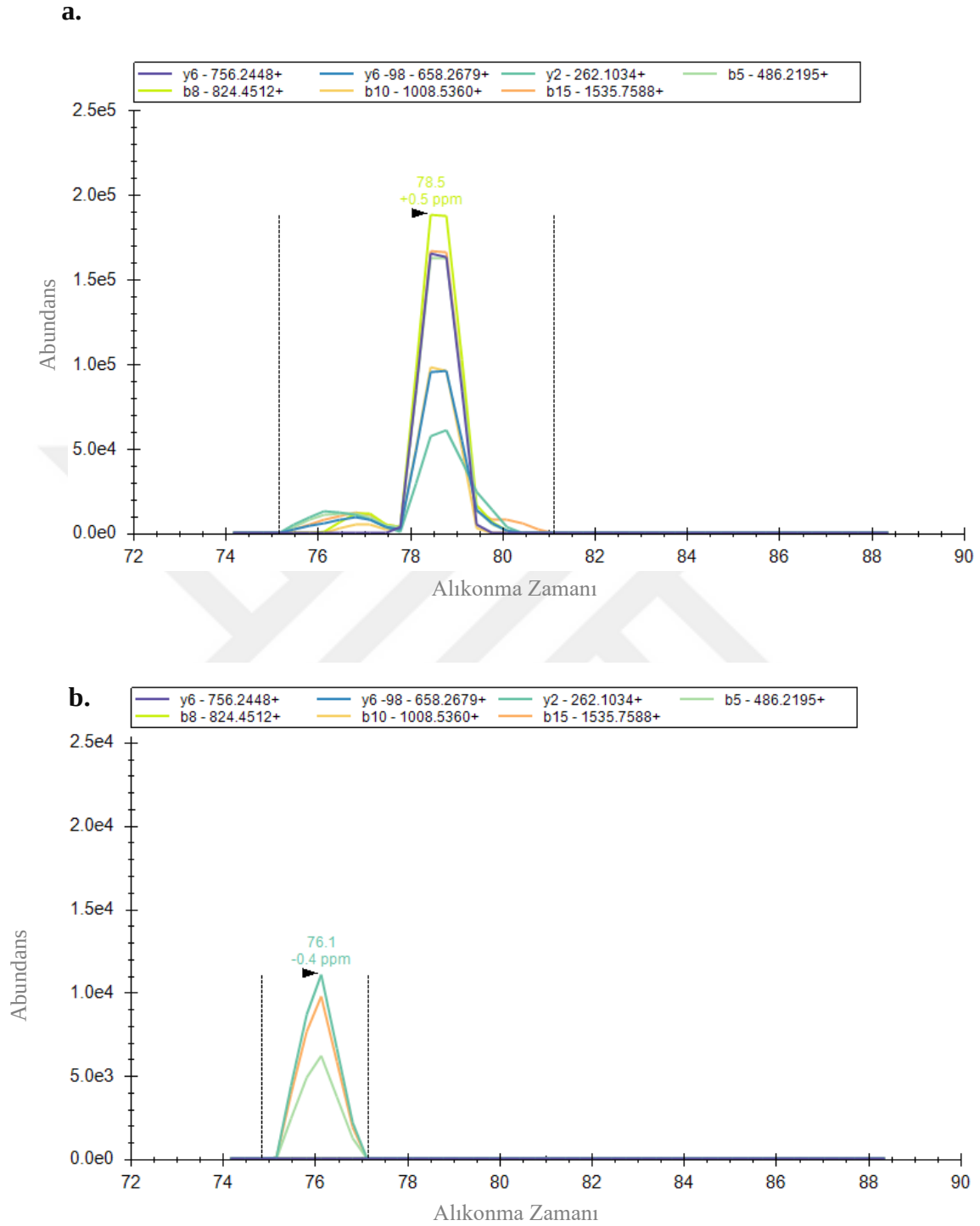
Şekil 4-19: İzofom-2 Synaptopodin 2'ye ait Fragment İyon Kromatogramları

Fragmentler aynı hastanın kontrol (N) ve tümör (T) örneklerinin R.AQSPTPSLPASWK.Y peptidine aittir. a. N3 örneğine ait pik alanlarının entegrasyonunu b. T3 örneğine ait pik alanlarının entegrasyonunu göstermektedir.



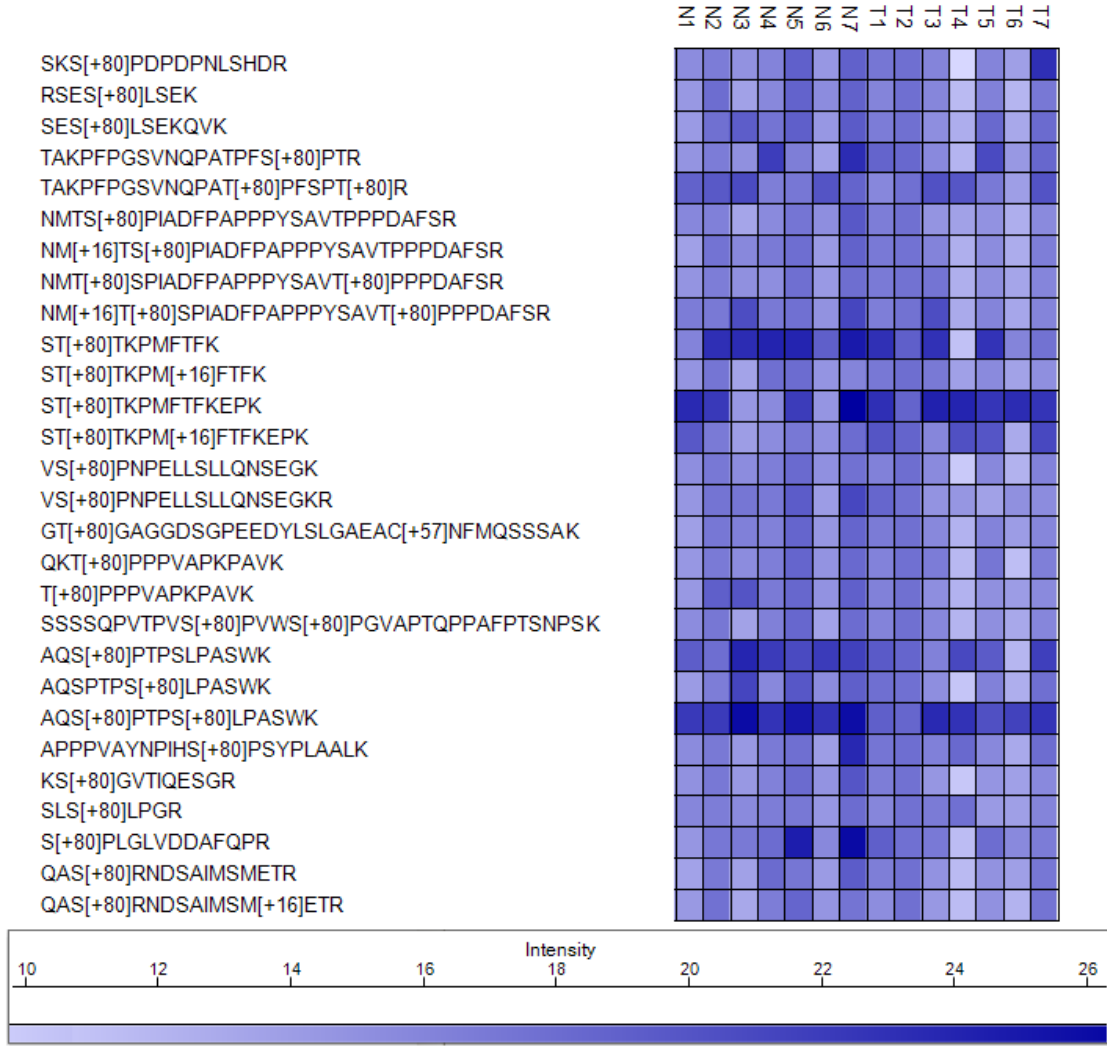
Şekil 4-20: PRM analiziyle elde edilen Glycophorin-A Proteinine Ait Görseller

a. Proteine ait genel kromatogram b. Her bir örneğin K.SPSPDKPLPSPDTPVPLSSVEIENPETSQ peptidine ait bollukları gösteren bar grafiği. Her bir renk farklı bir fragment iyonu temsil eder. “Dotp” değeri spektral kütüphane ile eşleşmenin derecesini gösterir.



Şekil 4-21: Glycophorin-A Proteinine ait Fragment İyon Kromatogramları

Fragmentler aynı hastanın kontrol (N) ve tümör (T) örneklerinin K.SPVDVKPLPSPD TDVPLSSVEIENPETS DQ peptidine aittir. a. N5 örneğine ait pik alanlarının entegrasyonunu b. T5 örneğine ait pik alanlarının entegrasyonunu göstermektedir.



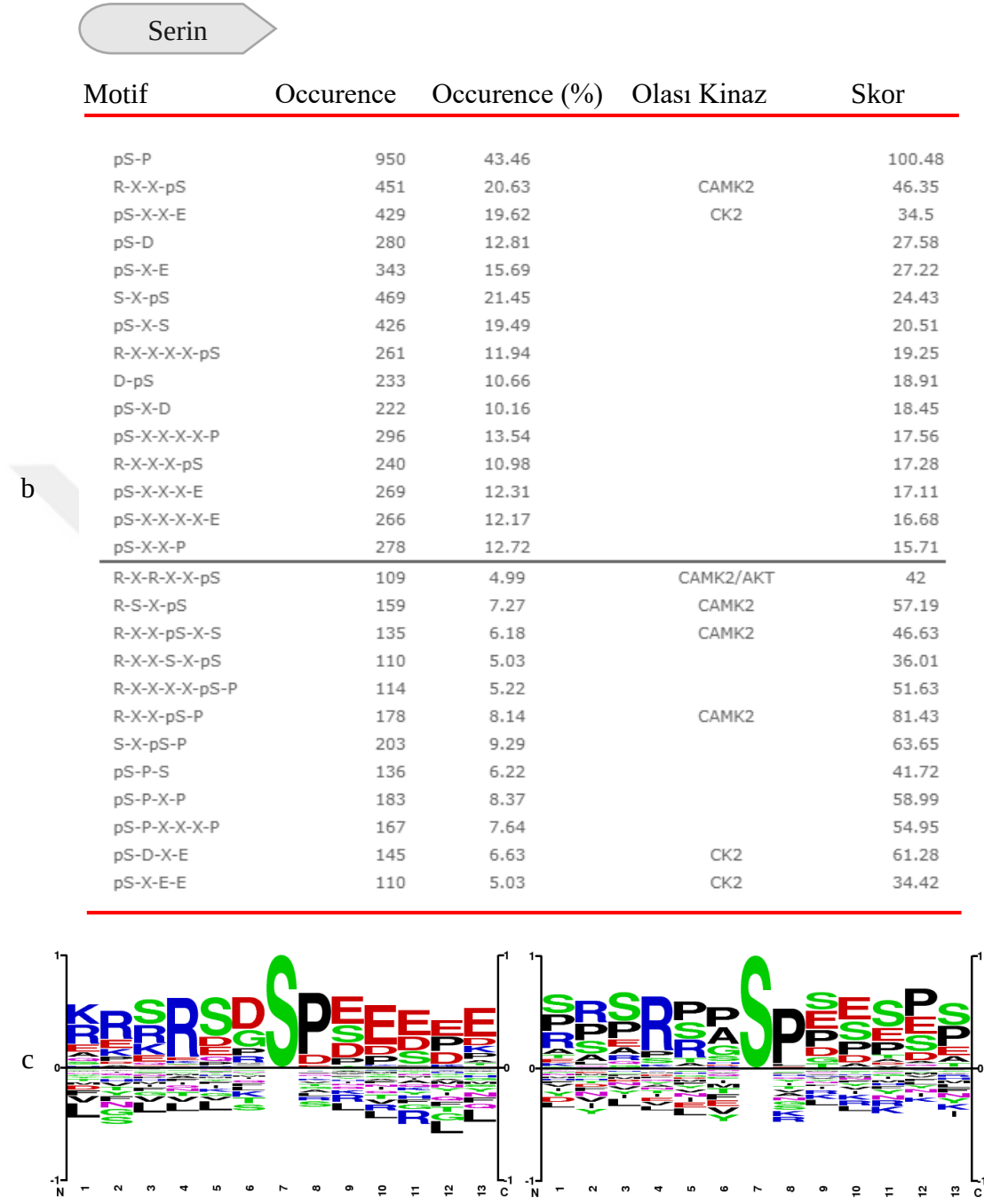
Görsel SYNPO-2 proteininin tümör dokularındaki ifadesinde azalış olduğunu göstermektedir. Renk skalası açık tondan koyu tona doğru gittikçe protein miktarı artmaktadır. Sütunlar her bir örneği gösterirken, satırlar tanımlanan peptit dizileridir.

Şekil 4-23: İzofom-2 Synaptopodin 2 Proteinine ait Isı Haritası

4.2.6. Forforilasyon Bölgelerine ait Veriler

İfade değişiminde en az iki kat artış olan 2183 özgün fosfopeptidin fosforilasyon bölgelerinden oluşturulan 2402 düzenlenmiş dizi, yöntem kısmında anlatıldığı gibi PHOSIDA ve Phosphosite Plus veri tabanlarına yüklenerek serin, treonin ve tirozin bölgelerinin dizi motifleri ve motif logoları oluşturulmuştur. Azalan ifade değişimi gözlenen 2192 özgün fosfopeptidin 2226 düzenlenmiş dizisi de benzer şekilde sisteme yüklenmiştir. Analiz sonrasında azalan ifade değişimi olan fosfopeptitlerde serin fosforilasyonu için 50 üzeri skora sahip pS-P ve R-XX-pS olmak üzere iki motif bulunurken artan ifade değişimi olan fosfopeptitlerde yine 50 üzeri skora sahip 8 motif (pS-P, RSX-pS, R-XXXX-pS-P, R-XX-pS-P, S-X-pS-P, pS-P-X-P, pS-P-XXX-P, pS-D-X-E) bulunmuştur (Şekil-24). Veri setindeki amino asit sıklığını yansıtan ve motiflerin tanımlanma skoruna göre oluşturulan dizi logoları Şekil 4-24c’de verilmiştir. Treonin için ise artan ifade değişimi olan fosfopeptit veri setinden 50 üzeri skora sahip 15 farklı motif elde edilmiştir. Azalan ifade değişimi olan fosfopeptit veri setinden elde edilen 50 üzeri skora sahip 7 farklı motif arasında R-X-X-pT motifi, CAMK2 ile ve P-X-pT-P motifi ERK ile ilişkili bulunmuştur (Şekil 4-25). Tirozin fosforilasyonu için ise her iki veri setinde anlamlı bir motif bulunamamıştır. Anlamlı bir motif bulunamadığı için oluşturulan dizi logosunun görseline bulgulara yer verilmemiştir.

Serin				
Motif	Occurence	Occurence (%)	Olası Kinaz	Skor
pS-P	700	34.55		75.65
R-X-X-pS	536	26.46	CAMK2	64.69
pS-X-E	295	14.56		23.86
a R-X-pS	260	12.83	PKA	23.54
pS-X-X-E	295	14.56	CK2	20.65
pS-X-D	193	9.53		16.29
R-X-X-X-X-pS	222	10.96		16.23

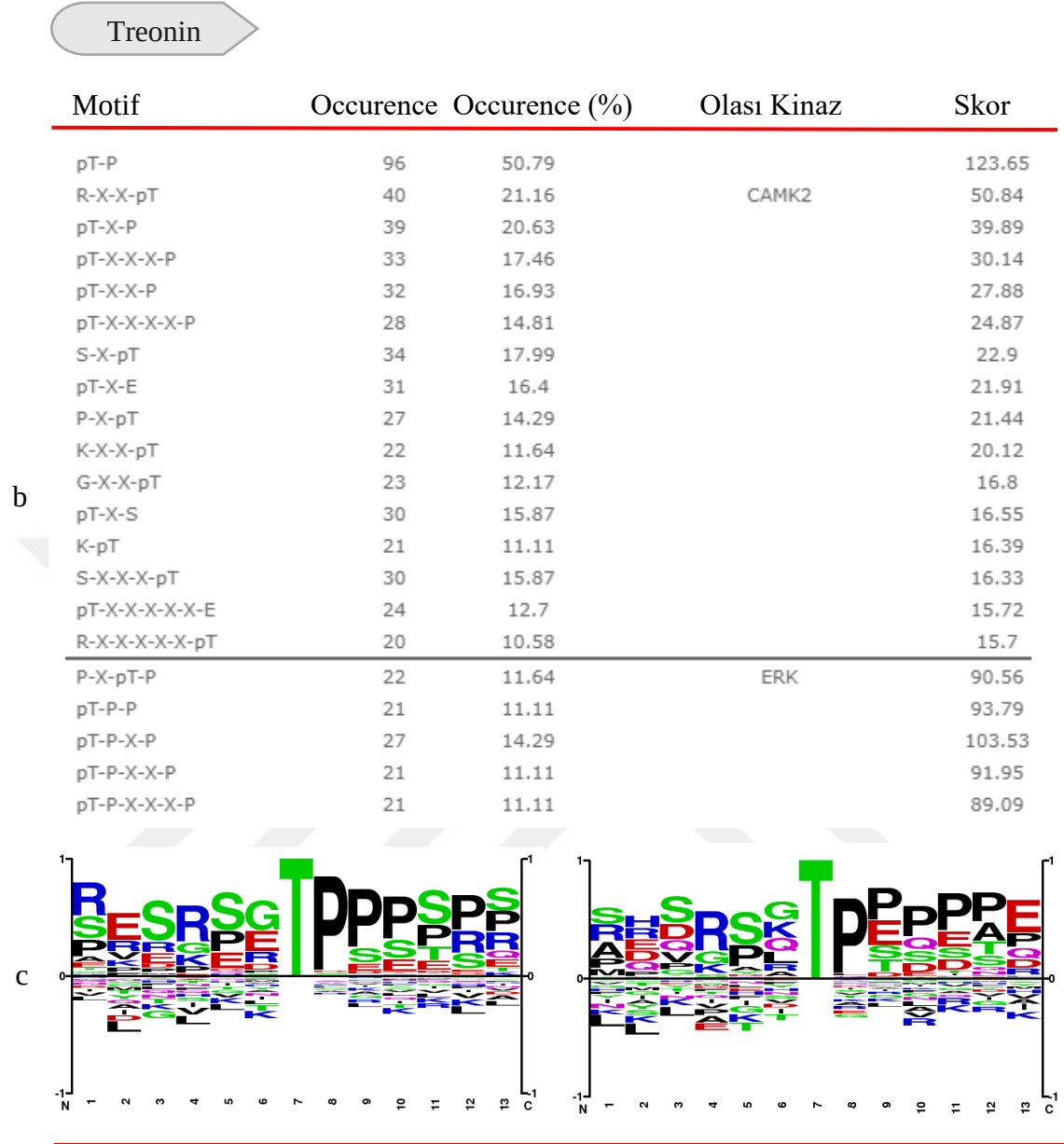


Şekil 4-24: Serin Fosforilasyonlarına Ait Motifler ve Dizi Logoları

Motif dizileri (a-b) için PHOSIDA ve motif logoları (c) için Phosphosite Plus veri tabanı kullanılmıştır. a. Azalan ifade değişimi olan fosfopeptitlere ait motifler b. Artan ifade değişimi olan fosfopeptitlere ait motifler. Motif dizileri aldıkları skora göre sıralanmıştır. Logolar tümör dokusundaki ifadesinde artma (soldaki) ve azalma (sağdaki) gözlenen fosfopeptit veri setlerinden elde edilmiştir.

Treonin

Motif	Occurence	Occurence (%)	Olası Kinaz	Skor
pT-P	124	58.22		144.56
pT-X-P	67	31.46		70.23
R-X-X-pT	38	17.84	CAMK2	40.14
pT-X-X-P	44	20.66		38.07
S-X-pT	49	23		35.59
pT-X-X-X-S	43	20.19		30.5
pT-X-X-X-X-P	35	16.43		29.67
S-X-X-X-pT	44	20.66		28.07
P-X-pT	35	16.43		27.66
R-X-X-X-X-X-pT	29	13.62		24.91
pT-X-X-X-P	33	15.49		24.55
pT-X-S	39	18.31		22.5
pT-X-X-X-X-R	26	12.21		21.69
G-pT	30	14.08		20.28
E-X-X-X-X-pT	28	13.15		19.59
E-X-pT	28	13.15		19.21
K-X-X-pT	24	11.27		18.91
pT-X-X-S	35	16.43		18.87
E-pT	27	12.68		18.62
P-X-X-X-X-X-pT	27	12.68		18.04
pT-X-X-X-X-X-P	28	13.15		17.52
pT-X-X-X-X-X-R	23	10.8		16.35
R-pT	22	10.33		15.87
R-X-X-X-pT	22	10.33		15.65
pT-X-X-X-X-X-S	32	15.02		15.06
S-X-X-X-pT-P	35	16.43		127.29
R-X-X-pT-P	30	14.08	CAMK2	164.08
P-X-pT-P	25	11.74	ERK	91.37
S-X-pT-P	28	13.15		107.91
G-pT-P	21	9.86		85.32
pT-P-P	49	23		199.85
pT-P-S	23	10.8		86.16
pT-P-X-P	40	18.78		138.01
pT-P-X-X-P	20	9.39		76.73
pT-P-X-X-S	28	13.15		106.99
pT-P-X-X-X-R	21	9.86		108.02
pT-P-X-X-X-P	28	13.15		106.54
pT-X-S-P	20	9.39		74.94

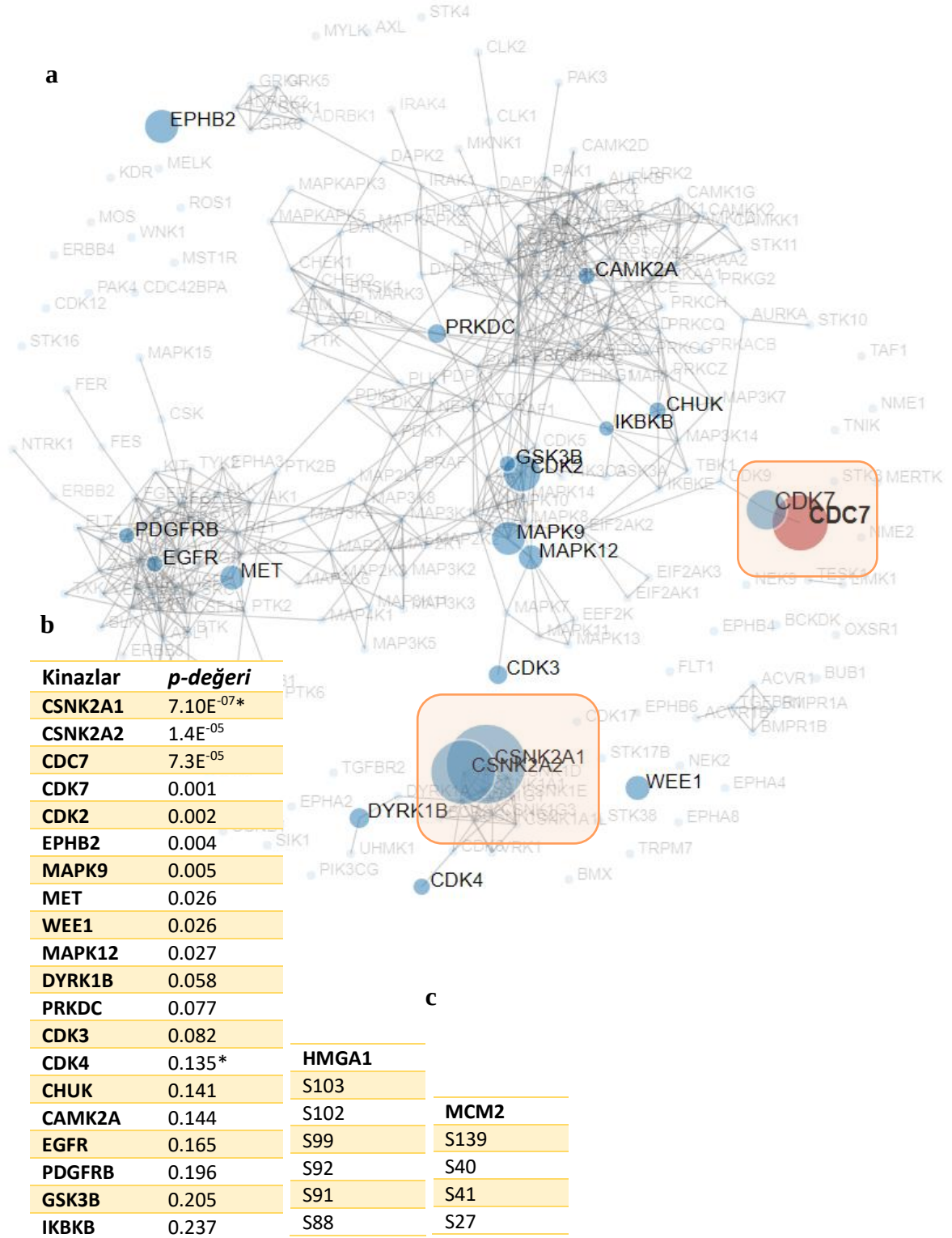


Şekil 4-25: Treonin Fosforilasyonlarına Ait Motifler ve Dizi Logoları

Motif dizileri (a-b) için PHOSIDA ve motif logoları (c) için Phosphosite Plus veri tabanı kullanılmıştır. a. Artan ifade değişimi olan fosfopeptitlere ait motifler b. Azalan ifade değişimi olan fosfopeptitlere ait motifler. Motif dizileri aldıkları skora göre sıralanmıştır. Logolar tümör dokusundaki ifadesinde artma (soldaki) ve azalma (sağdaki) gözlenen fosfopeptit veri setlerinden elde edilmiştir.

Fosfoproteinlere ait çeşitli bilgileri kullanarak olası kinaz tahmini yapan ve protein etkileşim ağı oluşturabilen çeşitli programlar bulunmaktadır. Çalışmamızda iki farklı kinaz zenginleştirme programı (KEA2 ve X2Kweb) kullanılmış; KEA2 programıyla 324 protein ve bu proteinlere ait 1364 fosforilasyon bölgesinin kinaz tahmini ve zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonrası 26 farklı proteine ait çok sayıda fosforilasyon bölgesini fosforilleyen 20 adet kinaz bulunmuştur (Şekil 4-26a). Bu kinazlar içerisinde CSNK2A1, CSNK2A2, CDC7, CDK7, CDK2, EPHB2, MAPK9, MET, WEE1 ve MAPK12 olmak üzere 10 kinaz istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4-26b). En yüksek anlamlılığa sahip ilk üç kinazın (CSNK2A1, CSNK2A2 ve CDC7) tümör grubunda anlamlı artış gösteren MCM2 proteinini 4 farklı ve HMGA1 proteinini 6 farklı fosforilasyon bölgesinden fosforillediği gösterilmiştir (Şekil 4-26c). Ayrıca analiz sonrasında 26 proteinin ilişkili olduğu kinazlar ve fosforilasyon bölgelerinin bir çıktısı liste şeklinde elde edilmiştir. Bir diğer program kullanılarak ise kinaz-protein-transkripsiyon faktörü ilişkilerini gösteren etkileşim ağı oluşturulmuştur. X2Kweb; kinaz zenginleştirme analizini, transkripsiyon faktörü zenginleştirme analiziyle birleştirerek bunu protein-protein etkileşim ağı şeklinde sunmaktadır. Bu programla yapılan analiz sonucunda HIPK2, MAPK1 ve CK2ALPHA, CDK4, CSNK2A1, MAPK14, ATM ve MAPK3 olmak üzere sekiz farklı kinazın fosforile ettiği 10 farklı transkripsiyon faktörü (ZBTB7A, GATA1, GATA2, E2F1, E2F4, RUNX1, POU5F1, MYC, ZNF384 ve SIN3A) bulunmuştur (Şekil 4-27). CDK4 ve CSNK2A1 kinazları, çok sayıda veri setinden oluşturulmuş kütüphaneye bizim veri setimizi karşılaştırarak analiz yapan iki farklı kinaz zenginleştirme programının oluşturduğu protein etkileşim ağlarının her ikisinde de görülmüştür.

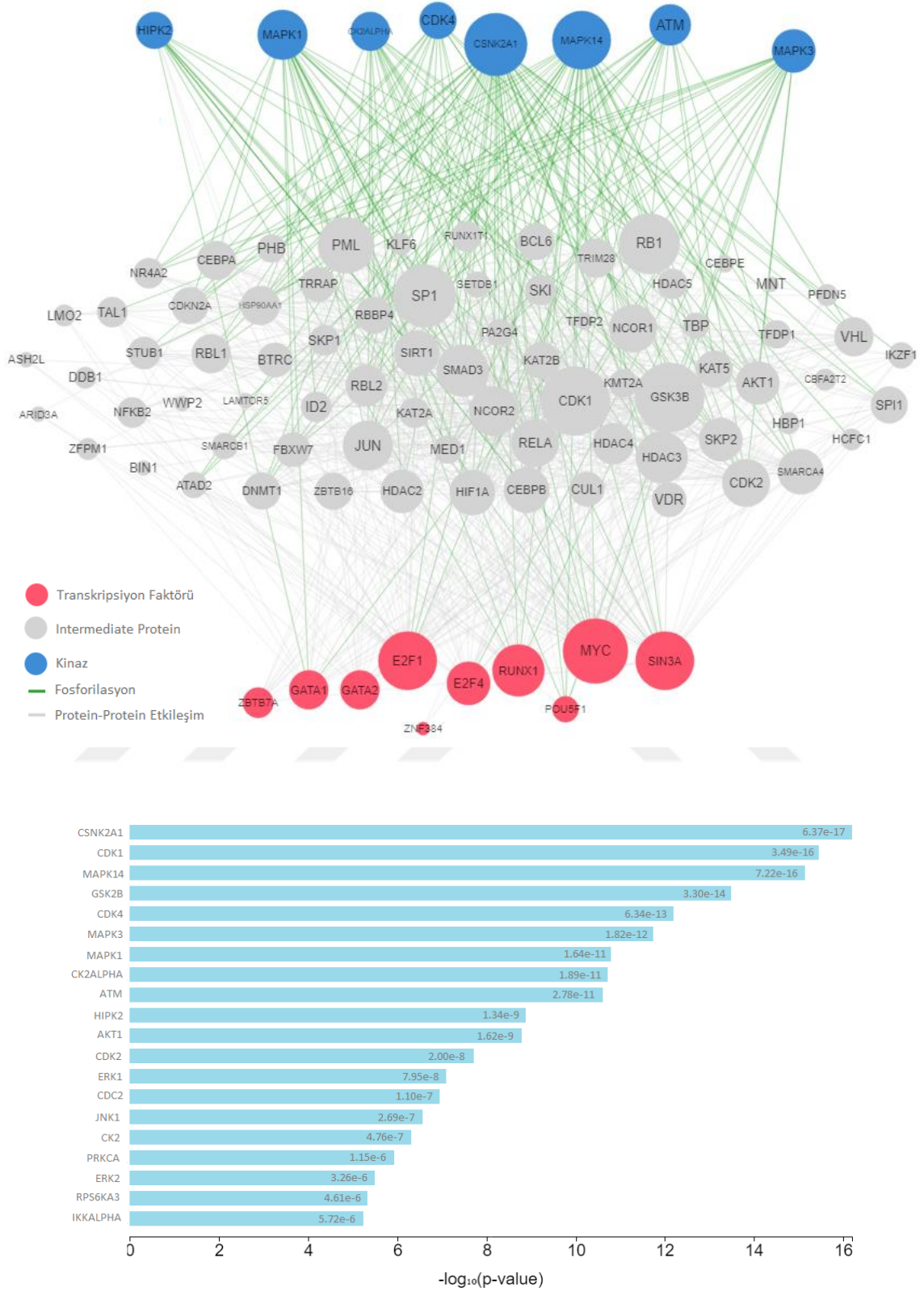
Kinaz zenginleştirme analizden elde edilen çıktı olası kinazları, proteinleri hangi fosforilasyon bölgesinden fosforillediği bilgisiyle birlikte vermektedir. Yeniden düzenlenen bu bilgi, Cytoscape programı kullanılarak görselleştirilmiştir. Bu program sayesinde kinaz-protein etkileşimi, fosforilasyon bölgeleriyle birlikte ayrıntılı olarak sunulmuştur (Şekil 4-29).



Şekil 4-26: İfade Farklılığı Bulunan 38 Proteinin İlişkili Olduğu Kinazlar

a. Kinaz ağ sistemini temsil eden şekil, sıkı filtreleme sonrası elde edilen 38 proteinin 430 fosforilasyon bölgesi kullanılarak elde edilmiştir. Renklendirilmiş dairelerin büyüklüğü anlamlılıkla doğru orantılıdır. b. Ağ sisteminde elde edilen kinazların bir listesi ve zenginleştirme testi sonrasında elde edilen *p*-değerleri. c. CSNK2A1 (Kazein kinaz alfa), CSNK2A2, Cdc7 (cell division cycle 7) ve MAPK9 kinazları tarafından fosforillenen MCM2 proteinini ile HMGA1 proteinine ait fosforilasyon bölgeleri.

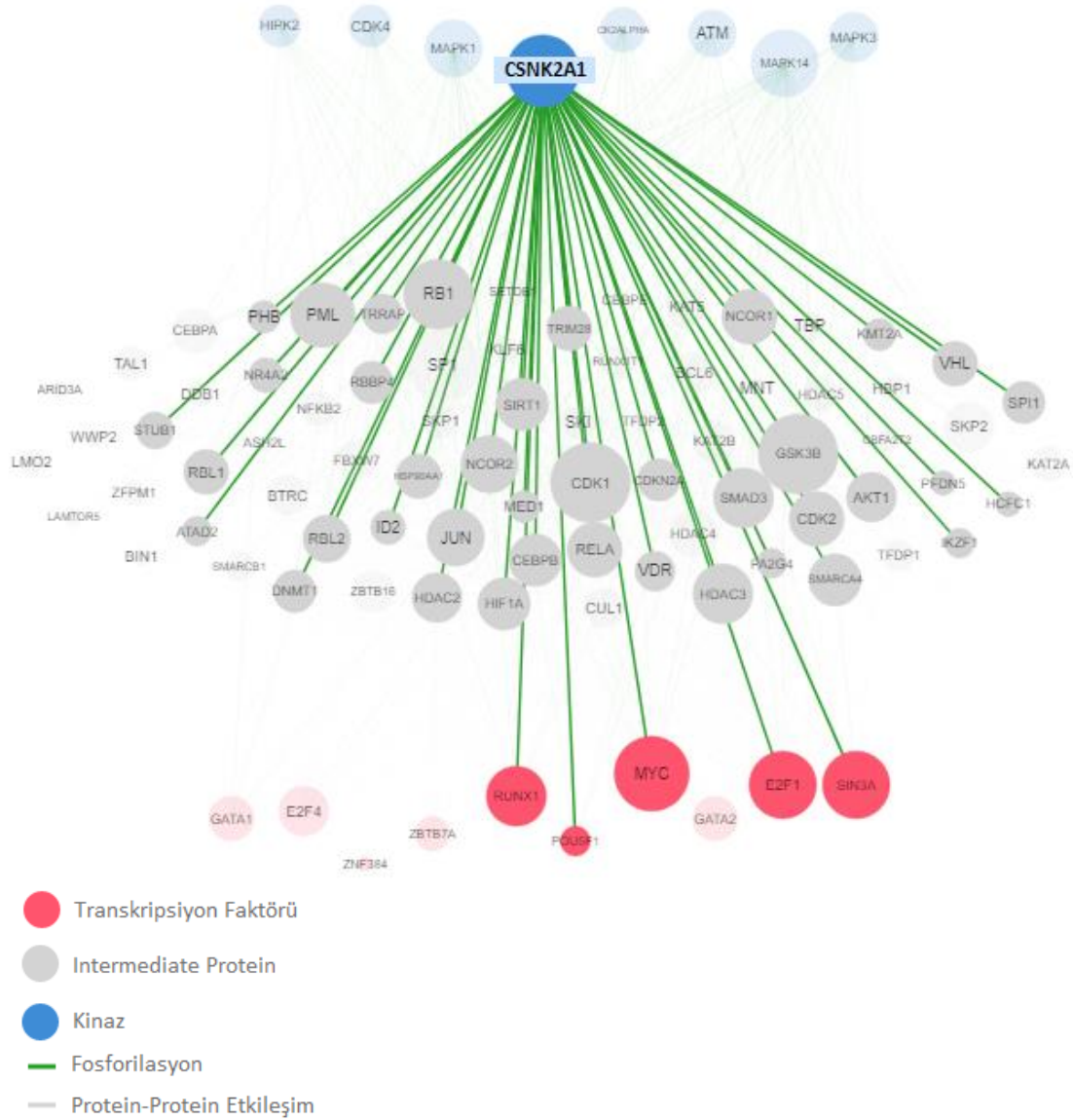
* İşareti ile belirtilen kinazlar, X2Kweb ile yapılan kinaz analizlerinde (Şekil 4-27) de tespit edilen ortak kinazlardır.



Şekil 4-27: Kinaz Zenginleştirme Analizi

Gen seviyesinde yapılan zenginleştirme analizine en az iki kat anlamlı ifade değişimi olan 324 protein dahil edilmiştir.

Şekil 4-26’da verilen kinaz-protein ağındaki 20 kinaz arasından kazein kinazın katalitik alt birimi olan kazein kinaz alfa 1 (CSNK2A1) ve siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4), X2KWeb programı kullanılarak elde edilen protein etkileşim ağında da tespit edilmiştir. Kinaz zenginleştirme analizinde CDK4’ün myc transkripsiyon faktörüyle, en yüksek anlamlılığa sahip CSNK2A1’in ise RUNX1, myc, E2F1 ve SIN3A transkripsiyon faktörleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4-28).



Şekil 4-28: CSNK2A1 Kinaz Proteini Tarafından Fosforillenen Proteinler

5. TARTIŞMA

Ülkemizde yaygın görülen ilk beş kanser türü içerisinde yer alan akciğer kanseri yüksek ölüm oranına sahiptir (13). Akciğer kanseri hastalarının sağkalım oranları hastalığın evresi ile oldukça ilişkilidir. Bu nedenle KHDAK'deki sağkalım oranlarının iyileştirilmesinde, erken tanının ve zamanında etkili bir tedavinin yapılması büyük önem taşımakta olup (149); hastalığın erken tanısı ve alt tip sınıflaması için invaziv olmayan yöntemlerle tespit edilebilen yüksek özgünlüğe sahip biyobelirteçlerin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır (150, 27).

Proteinler hücre içerisindeki biyolojik süreçlerin gerçekleştirilmesinden büyük ölçüde sorumlu makromoleküllerdir ve buna bağlı olarak proteinlerin moleküler fonksiyonlarının düzenlenmesindeki bozukluklar, hastalıkların gelişimine sebep olarak görülmektedir. Hücre tarafından proteinlerin fonksiyonel özelliklerini anlık olarak belirleyebilmek üzere sıklıkla kullanılan fosforilasyon gibi post translasyonel modifikasyonlar; sinyal iletimi, hücre döngüsü, DNA replikasyonu, büyüme, apoptoz ve farklılaşma olmak üzere temel hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli görevler üstlenirler. Proteinleri aktif ya da inaktif formlarına dönüştürmede çok etkin bir yol olan fosforilasyon mekanizmaları, kanser araştırmalarında yaygın olarak incelenen bir konudur. (8, 151, 152).

Bir hastalığa ait fosfoprotein profilinin ortaya çıkarılmasında ve fosforile proteinlerdeki ifade değişiminin belirlenmesinde günümüzün MS teknolojileri geniş ölçekli çalışma yapma imkanı sunmaktadır. Bununla birlikte insan dokusu gibi kompleks biyolojik örneklerdeki fosfoproteomik uygulamaları, fosfoproteinlerin düşük nispi bolluğu ve düşük fosforilasyon stokiyometrisinden dolayı zorlayıcı olmaktadır (9). Uygulama aşamalarındaki zorluklara rağmen global fosfoprotein profillerinin oluşturulması, fosforile bölgelerin belirlenmesi, aşırı aktiviteli kinazların ortaya çıkarılması, sinyal yollarının araştırılması, ilaç keşfi ve hastalıkların moleküler mekanizmasının aydınlatılması ve hastaya özgü tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gibi birçok alanda MS tabanlı geniş ölçekli fosfoproteomik çalışmalardan yararlanılmaktadır (153, 8).

Çalışmamızda büyük hücreli akciğer karsinomu hastalarına ait fosfoprotein profilinin oluşturulması, ifade değişimi olan fosfoproteinlerin belirlenmesi, sınıflandırılması, protein-protein etkileşimleri, ilişkili oldukları sinyal yolları ve akciğer kanserinde önemli olabilecek aday biyobelirteçlerin belirlenerek bu fosfoproteinlere ait motiflerin oluşturulması ve en önemlisi PRM yöntemiyle keşif modunda yapılan analizlerin doğrulamalarının yapılması hedeflenmiştir. Literatürde KHDAK'nin alt grubu olan büyük hücreli karsinomla (BHK) ilgili olarak tümörün gerçek kaynağı olan biyolojik materyallerle yapılmış herhangi bir fosfoproteomik çalışmaya rastlanmamış olması, tez projemiz için bu alt grubu ait dokuların seçilmesinde önemli bir etken olmuştur.

Projenin ilk bölümünü oluşturan profillemeye çalışmasında toplam 2820 adet protein tanımlanmış ve bu proteinlerin 2314'ünde fosforilasyon modifikasyonu tespit edilmiştir. 2314 fosfoproteine karşılık gelen toplam 12671 fosforilasyon bölgesi tanımlanırken bunun yaklaşık 10242'si serin, 2207'si treonin ve 222'si tirozin fosforilasyonlarıydı. Zhang ve ark. H3255 hücre hattında SCX ve ters faz fraksiyonlama yaparak tanımladıkları 2571 proteinde toplam 8759 fosforile bölgenin 7048'i serin, 1567'si treonin ve 129'u tirozin kalıntısında idi (154). Yakın bir tarihte, sigara dumanına cevaben aktive olmuş sinyal olaylarını incelemek için, kronik sigara dumanına maruz kalan H358 akciğer kanseri hücrelerinin SILAC-bazlı fosfoproteomik analizini yapan araştırmacılar 1086 proteine karşılık gelen 1812 fosforile bölge tanımlamışlardır (155). Sigara dumanına maruz bırakılan farelerden alınan akciğer dokusunda sigara dumanına bağlı aktive olan sinyal yollarını incelemeyi amaçlayan araştırmacılar yaptıkları nükleer fosfoprotein analizinde 253 fosfoprotein tespit etmişlerdir (156). Melanom fare modeli ya da insan meme kanseri gibi farklı tip dokularla yapılan fosfoproteomik çalışmalarda da ortalama 2000 fosfoprotein tanımlanmıştır (157).

Fosfopeptitlerin çok sayıda fraksiyona ayrılarak analiz edildiği çalışmalarda, profil derinliğinde belirgin değişiklikler görülmektedir. Ancak örnek hazırlığı aşamasına fazladan bir basamak eklenmesi örnek kaybına neden olmakla birlikte çalışma süresini ve sarf giderlerini de bir o kadar artırıp tekrarlanabilirliği azaltabilmektedir.

Örnek miktarının az olduğu hasta dokuları ile yapılan çalışmalarda bu büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır (159-161). Schweppe ve ark. farklı KHDAC hücre hatlarıyla (adeno ve skuamöz) yapmış olduğu çalışmada SCX yöntemi kullanarak 24 fraksiyon elde etmiş ve bu fraksiyonların analizlerinde sırasıyla 3212 ve 3323 fosfoprotein tanımlayabilmiştir (162). Aynı tarihlerde rapor edilen başka bir çalışmada IWAI ve ark. IMAC yöntemi kullanarak zenginleştirdikleri fosfopeptitleri fraksiyonlama yapmadan analiz ettiklerinde ancak 424 fosfoprotein tanımlayabilmişlerdir (163). NCI-H292 akciğer karsinom hücre hattıyla yapılan son çalışmalardan birinde ters faz fraksiyonlama yapılarak elde edilen 96 fraksiyonda 1436 proteine karşılık gelen 2615 özgün fosfopeptit ve 2472 özgün fosforilasyon bölgesinin tanımlandığı bildirilmiştir (164). Önceki çalışmalardan farklı olarak etiketsiz yöntemle analizlerini gerçekleştiren Wiredja ve diğ. KRAS mutasyonu taşıyan iki hücre hattında (A549 ve H358) toplamda 2000'e yakın fosfoprotein tanımlamıştır. A549 ve H358 KHDAC hücre hatlarında sırasıyla 1605 ve 1617 proteinle eşleşen 2999 ve 2895 özgün fosfopeptit tanımlamışlardır (165). Tez çalışmamızda ise toplamda 8558 fosfopeptit tanımlanırken tümör grubunda 6186 fosfopeptit, kontrol grubunda ise 6332 fosfopeptit tanımlanmıştır.

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalması ile ilişkili olarak gelişen bir hastalıktır ve farklılaşan tümör dokusunda meydana gelen protein ifade farklılıkları hastalığın invazyon, metastaz ve düşük sağkalım oranlarıyla ilişkili olabilir. Özellikle tümör dokusunda tespit edilecek ifade farklılıkları hastalık için erken tanı sağlayacak ya da hastalığın klinik seyrini izleyebilmeye imkan verecek biyobelirteçlerin bulunmasına ışık tutacaktır (166). Bu amaçla çalışmamızda yapılan etiketsiz kantifikasyon yöntemiyle 2314 fosfoproteinden 2196'sının tümör ve kontrol grubu arasındaki ifade farklılıkları incelenmiş ve toplamda 324 fosfoprotein ifadesinde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. İfade değişimi olan fosfoproteinlerin 156'sının tümör grubunda ifadesi azalırken 168'sinde artış olduğu görülmüştür. Yapılan sıkı filtrelemeler sonrasında anlamlı ifade farklılıkları olan fosfoproteinlerden 38 tanesi (Tablo 4-3) seçilerek detaylı bir şekilde incelenmiş ve veri analizlerine dair bazı sonuçlar gruplar arasındaki ifade farklılıklarının daha belirgin bir şekilde ortaya konması için görselleştirilmiştir.

Tümör grubunda, aralarında kromatin organizasyonunda rol alan MCM2, HMGA1 (yüksek mobilite grup proteini), HMGA2 ve SWI/SNF kompleks alt ünitesi SMARCC1, ayrıca perisentriolar materyal-1 proteini, PDZ ve LIM domain proteini, desmoplakin, nükleolar RNA helikaz 2 ve FGFR1 onkogen ortak proteini olmak üzere 10 tane proteinin ifadelerindeki artış ile kaveolin-1/2, fosfoglukomutaz-benzeri protein-5, hücre döngüsü düzenleyicisi RGCC, glycophorin-A, ısı-şok 70 kDa proteini 12B, inositol 1,4,5 trifosfat reseptör tip 3, Ras-interacting protein 1, sinaptopodin-2 (izoform-2) ve tensin-1'in dahil olduğu 28 proteinin ifadelerindeki azalış, bulgular kısmında çıktıları verilen informatik araçları ile detaylı bir şekilde incelenmiş ve bunların bir kısmı ise PRM yöntemi kullanılarak doğrulaması yapılan 73 protein içerisinde yer almıştır.

Kanser hücreleri, proteinleri fosforile eden kinazlardaki düzensizlik nedeniyle hücre döngüsünün sıkı kontrol mekanizmalarından kaçır ve kontrolsüz hücre büyümesine bağlı olarak hızla çoğalır. Bu bağlamda gelişen tümör hücreleri belirli derecelerde diferansiyasyonlarını kaybederler. Her hücre döngüsünde DNA replikasyonunun başlatılması, genomik bütünlüğün ve dengenin korunması için esastır. Hücre döngüsünün G1'den S'ye geçiş sürecinde sıkı bir şekilde düzenlenen DNA replikasyonunun doğru bir şekilde yürütülmesi, bu alanda yoğun aktiviteye sahip çok sayıda proteine bağlıdır. Bunların arasında minikromozom bakım proteinleri (MCM 2-7), DNA replikasyonu için vazgeçilmezdir ve S fazı sırasında kromatin üzerindeki varlıkları, kromatin "lisanslama" olarak adlandırılır. Lisanslama sürecinde, S fazında çoğaltılması gereken tüm kromatin, erken G1 fazında hücre döngüsünün başlangıcını takiben MCM proteinleri ile işaretlenir (167, 168). S fazını teşvik eden hücre döngüsü kinazlarıyla fosforile olan MCM (minikromozom bakım proteini) proteinlerinin, çeşitli habis transformasyonların erken aşamasındaki hücrelerde yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir. Temel DNA replikasyon lisans faktörleri olarak bilinen MCM 2-3-4-5-6-7 proteinlerinin yüksek oranda ekspresyonu meme, rahim ve akciğer olmak üzere farklı kanser türlerinde gösterilmiştir (169-171). Özellikle MCM protein ailesinin en çok çalışılan üyesi minikromozom bakım kompleksi 2 (MCM2), yakın zamanda çeşitli kanser tiplerinde prognostik etkileri olan yeni bir proliferasyon belirteci olarak tanımlanmıştır.

Kanser Genom Atlas (TCGA) kaynağından RNA sekansı veri setleri, MCM2 aşırı ekspresyonunun, akciğer kanseri hastalarında zayıf sağkalım oranı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda kısa süre önce yapılmış çalışmalarda, kanser hücrelerinin çoğalması ile ilişkili olan MCM proteinlerinin çeşitli kanser türleri için ümit verici bir prognostik belirteç olabileceği rapor edilmiştir. (171). Çalışmamızda MCM2, MCM3 ve MCM6 protein ifadelerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında tümör grubunda anlamlı artış göstermesi daha önceki yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

DNA replikasyonun ve hücre döngüsünün ilerlemesindeki bozulmalara MCM2 proteinindeki anormal fosforilasyonların neden olduğu düşünülmektedir. Tsuji ve diğ. HeLa hücrelerinde Cdc7 tarafından fosforillenen MCM2'ye ait 3 serin bölgesi olan S27, S41, S139'u tanımlamışlardır. Bu bölgelerden ise S139'un doğrulamasını yapabilmışlardır (172). Akciğer ve kolon karsinomu hücre hatlarıyla yapılan sonraki çalışmalarda Cdc7/Dbf4 kinaz kompleksi tarafından fosforillenen MCM2'ye ait S31, S40, S53, S108, S139, ve S220 olmak üzere altı fosforilasyon bölgesi tanımlanmıştır (173). Farklı araştırma gruplarının hem in vivo hem de in vitro olarak elde ettiği sonuçlar, MCM2'deki Ser-40 ve Ser-108'in, DNA replikasyonu için gerekli olan Cdc7'ye bağlı fosforile bölgeler olduğunu ortaya koymuştur (174). Çalışmamızda tümör dokusunda MCM2 proteinine ait sekiz farklı fosforilasyon bölgesi tanımlanırken bunlardan S26, S27, S40, S41 ve S139 hemen hemen tüm tümör dokusu örneklerinde saptanmıştır. İyi bilinen S27, S40, S41 ve S139 dört fosforilasyon bölgesi dışında MCM2 proteininde T25, T39 ve bildiğimiz kadarıyla daha önce akciğer dokusunda rapor edilmemiş Y137 fosforile bölgesi tanımlanmıştır. MCM3 proteininde ise altı fosforilasyon bölgesi S713, S717, S726, S773, T719, T776 tanımlanırken tümör grubunda çoğunlukla S713, S717, S726 tanımlanmıştır. MCM6 proteininin tümör grubunda iki fosforilasyon bölgesi (S762 ve S758) tanımlanabilmiştir. MCM2'nin Cdc7 aracılı S27, S41 ve S139 fosforilasyonu DNA replikasyonunun başlatılması ve MCM kompleksinin ATPaz aktivitesi ile ilişkilendirilirken S40 ve S108 bölgelerinin fonksiyonu ise belirsizdir (174).

Çalışmamızda yaptığımız kinaz zenginleştirme analizleri sonrasında MCM2'nin çok sayıda kinaz tarafından fosforillendiği gösterilmiştir (Şekil 4-26, 4-29). MCM2'ye ait S40, S41, S139 bölgelerinin hepsinin CSNK2A1, CDC7, CDK7 ve CDK2 kinazları tarafından fosforile edildiği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca GSK3B ve MAPK9 kinazlarının sadece S27 bölgesinin fosforilasyonu, CSNK2A2'nin ise sadece S139 bölgesinin fosforilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Şekil 4-29).

Li ve ark. S27 bölgesi defosforile olan MCM2'nin, over kanseri hücrelerinin metastaz ve invazyonunu baskıladığını ortaya koyan önemli veriler sunmuş ve pMCM2-Ser27'nin Wnt/ β -katenin yolu aracılı metastaz sürecinde rol aldığını rapor etmişlerdir. Elde edilen bulgular neticesinde araştırmacılar depMCM2-Ser27'nin, beta-katenin fosforilasyonunu artıran GSK3 β ve β -katenin etkileşimini artırdığı ve buna bağlı olarak β -kateninin azalan stabilizasyonunun Wnt/ β -katenin sinyal yolu iletiminde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (175). BHK kötü prognozlu ve sınırlı tedavi seçenekleri ile bilinmektedir (176). Li ve arkadaşlarının bulgularına paralel olarak çalışmamızda incelediğimiz BHK tümör dokularının hepsinde MCM2 proteininin Ser27 fosforilasyonunun tespit edilmesi dikkat çekici bir bulgudur.

MCM2 proteinini akciğer kanseri hücre hattında inceleyen Cheung ve ark. ise yüksek mobilite grubu proteini HMG-/HMG-Y (HMGA1) fosforilasyonunun düzenlenmesi yoluyla MCM2'nin hücre proliferasyonunu destekleyebileceğine dair bulgular ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca Cheung ve ark. 14 kanser tipinde MCM2'nin önemli ölçüde eksprese olduğunu bulmuşlardır. MCM2'nin aşırı eksprese edildiği akciğer kanseri A549 hücre hattında ve MCM2'nin susturulduğu H1299 hücrelerinde 753 fosfoprotein üzerinde 2361 fosforilasyon bölgesi tanımlamışlardır. Elde edilen bulgular neticesinde HMGA1'in DNA replikasyonu için gerekli olan ve sentezin yönlendirilmesinde görev alan orijin tanıma kompleksi (ORC) vasıtasıyla MCM kompleksi ile fonksiyonel bir ilişkiye sahip olduğu sonucuna varılmış ve MCM2'yi aşırı eksprese eden A549 hücrelerinde HMGA1 proteinin trifosforile (Ser99, Ser102 ve Ser103) olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca HMGA1 üzerindeki Ser99'un MCM2'nin aşırı eksprese durumunda diferansiyel olarak up regüle olduğunu ve MCM2'nin baskılandığı durumda diferansiyel olarak down regüle olduğunu bulmuşlardır.

Araştırmacılar elde ettikleri bulgular neticesinde MCM kompleksinin ATPaz aktivitesi ve DNA replikasyonunun başlatılması için gerekli olduğu ve HMGA1 fosforilasyonunun DNA bağlanma aktivitesini arttırdığı sonucuna varmışlardır (171). Yüksek HMGA1 ekspresyonunun, KHDAK vakalarında malign durum ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu ortaya koyan araştırmacıların bulgularıyla paralel olarak çalışmamızda HMGA1 proteinin ifadesinde anlamlı artış gözlemlenmiştir. Ancak Ser99 fosforilasyonu tespit edilemezken S8, S9, T42, S88, S91 ve S92 fosforilasyon bölgeleri tanımlanabilmiştir. Yapılan protein-protein etkileşim analizi sonrasında MCM2 proteininin HMGA1 ile ilişkisi gösterilemezken HMGA ailesinin diğer bir üyesi HMGA2 ile etkileşimi gösterilmiştir. MCM2'nin, yakın ilişkili olduğu MCM protein ailesinin diğer üyeleri MCM3 ve MCM6'nın yanı sıra CDK1, TOP2A, SSRP1, WDHD1 ve SMC4 proteinleriyle de ilişkisi olup bu proteinlerin ifadelerinde de anlamlı artışlar görülmüştür.

SMARCC1 (BAF155) proteini, ATP-bağımlı olarak kromatinin yeniden düzenlenmesini sağlar ve transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya erişmesini sağlayan SWI/SNF kompleksinin çekirdek bileşenidir. Kromatin yapısını değiştirerek gen ekspresyonunun düzenlenmesine katkıda bulunan bu faktörler BRCA1, siklin E, p21, p53 ve p16 gibi hücre döngüsü kontrol noktası genleriyle birleşerek hücresel proliferasyonu kontrol edebilirler (177). Tümör baskılayıcı olarak bilinen SWI/SNF kompleksinin, alt birimlerinde meydana gelen çok sayıda mutasyona bağlı olarak çeşitli kanser türlerinde inaktive edildiği bilinmektedir. Ancak SMARCC1 ve SMARCC2 gibi tümör oluşumunda rol oynadığı düşünülen bazı alt birimler ise primer tümörlerde nadiren mutasyona uğramıştır. Çeşitli çalışmalarla kanser dokularında up regüle olduğu tespit edilen SMARCC1 proteininin, hücre apoptozunun inhibisyonu yoluyla hücre proliferasyonunda, invaziv büyümede ve metastatik süreçte rol aldığı rapor edilmiştir (178, 179). Bununla birlikte, SWI/SNF kompleksinin ve SMARCC1'in tümör biyolojisindeki muhtemel önemine rağmen, literatürde bu kompleksin bileşenlerinin fosforilasyon durumu ile ilgili ayrıntılı bir bilgiye rastlanmamıştır. SWI/SNF kompleksinin çeşitli modifikasyon durumlarının, çekirdek alt birimleri (SMARCC1/2 ve SMARCB1) dahil olmak üzere bu kompleksi oluşturan bileşenlerin yeniden düzenlenmesi yoluyla proteinin fonksiyonunda dinamik değişikliklere neden olduğu tahmin edilmektedir (180).

Çalışmamızda SMARCC1 ve SMARCC2'nin ifadesinin akciğer tümör dokularında artmış olduğu ve sadece SMARCC1 ifadesindeki artışın anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. Yine literatürde SMARCC1 ve SMARCC2 proteinlerinin fosforilasyon bölgelerine dair geniş çaplı bir bilgi bulunamamıştır. Çalışmamız ile SMARCC1 proteinine ait literatürde bulunan 3 fosforilasyon bölgesinden (180) ikisi (S328 ve S330) tanımlanırken SMARCC2 proteinine ait daha önce rapor edilen S347 fosforilasyon bölgesi dışında 6 bölge (T278, S283, S286, S302, S304, S306, T308) tanımlanmış ancak fosforilasyon bölgeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Çalışmamızda ekspresyon farklılığı görülen bir diğer protein grubu ise kaveola adı verilen özel zar invaginasyonlarının; oluşumu ve idamesinde önemli rollere sahip kalveolin ve kavin proteinleridir. Endositoz ve hücre sinyalizasyonu gibi biyolojik fonksiyonlara sahip kaveolalar; adipositler, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve fibroblastlar dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinde ifadeleri olan integral membran proteinleridir. Kaveolin ailesinin Cav-1, Cav-2 ve Cav-3 olmak üzere üç, kavin ailesinin ise bilinen dört üyesi vardır. Diğer moleküller ile etkileşimini sağlayan iskele domaini sayesinde kaveoladaki ana yapısal protein olan Cav-1, kanser ilişkili büyüme sinyalleri başta olmak üzere çeşitli sinyal moleküllerini (MAPK'lar, EGFR, Ras ailesi GTPaz'lar, TGFβ, G-protein bağlı reseptörler, Src kinaz ailesi, eNOS, adenilil siklaz, protein kinaz A ve AKT) organize eden bir platform görevi görür. Kaveolinler ve kavinler, kanser oluşumu ve gelişiminde ikili role sahiptir. Bazı kanser türlerinde down regüle bazı kanser türlerinde ise upregüle oldukları gözlemlenmiştir (181, 182). Bu proteinlerin yüksek ekspresyonu, büyüme faktörü sinyal yolları gibi kansere bağlı yolların inhibisyonuna yol açar. İleri prostat kanserinde, stromal Cav-1 yokluğu metastatik gelişim ve epitelyal AKT aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (183). Başka bir raporda aşırı EGFR aktivasyonunun, transkripsiyonel olarak Cav-1 ekspresyonunu down regüle ettiği ve çeşitli karsinomlarda metastaz gelişimine yol açtığı gösterilmiştir. Bununla birlikte kaveolinleri ve kavinleri eksprese eden belirli kanser hücrelerinin yüzey bağımsız büyüme yeteneği sayesinde daha agresif ve metastatik olduğu gösterilmiştir (184, 182). Luan ve ark. akciğer karsinom hücre hattında (GLC-82) Cav-1'in aşırı ekspresyonunun; EGFR ve ERK fosforilasyonlarının yanı sıra hücre çoğalmasını, migrasyonunu ve invazyonunu artırdığını bildirmişlerdir (185).

EGFR mutasyonuna sahip KHDAK hücreleriyle (PC-9) yapılan başka bir çalışmada ise Cav-1'in knockdown edilmesinin; hücrenin çoğalması, göç ve invazyon aktivitelerini engellediği ve EGFR fosforilasyonunu down regüle ederek EGFR-TKI'lerine duyarlılığı önemli ölçüde artırdığı rapor edilmiştir (186). Ekspresyonundaki farklılık nedeniyle hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik fonksiyonlara sahip olabilen Cav1'in karsinogenezdeki bu ikili rolü tümörlerin tipi, derecesi, büyüklüğü ve evresi ile ilişkilendirilmektedir (182). Özellikle, Cav-1, kanserin erken evrelerinde tümör baskılayıcı olarak, ileri evrelerde ise metastaz destekçisi gibi rol aldığı rapor edilmiştir (187).

Gerstenberger ve ark. primer tümör ve lenf nodu metastazı örneklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında hem Cav-1 ve hem de Cav-2 ifadelerinin metastatik stromalarda kaybolduğunu gözlemlemişlerdir (188). Zhan ve diğ. Cav-1'in hem mRNA hem de protein ekspresyon seviyelerinin akciğer tümör dokusunda normal dokuya göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte akciğer adenokarsinomunda skuamöz hücre karsinomundan daha yüksek Cav-1 ekspresyonu bildirilmiştir (189). Dikkat çeken başka bir bulgu ise yüksek Cav-1 gözlenen akciğer adenokarsinom hastalarının daha kısa sağkalıma sahip olmalarıydı. Chen ve ark.ları immünfloresan boyama yöntemiyle tespit ettikleri Cav-1 ekspresyon seviyesini, KHDAK dokularında kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha düşük bulmuşlardır (190). Bizim çalışma gruplarımızda tümör dokularında Cav-1'in anlamlı olarak daha az ifade edildiği tespit edilmiştir.

Büyük hücreli akciğer karsinomu olan hastalarda Cav-1 kötü prognoz belirleyicisi olabilir. Han ve ark., Cav-1 ifadesini, inceledikleri normal akciğer dokularının hepsinde tespit ederken kanser hücrelerinde ise azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca Cav-1 ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle inceledikleri büyük hücreli karsinom tümör dokularının %50'sinden fazlasında negatif sonuç bulmuşlardır. Pozitif bulunan numunelerde ise hücre zarında lokalize olan Cav-1'in ileri evre ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu Cav-1 protein seviyelerinin tümör gelişimine paralel artışı şeklinde açıklamışlardır. Elde ettikleri bir diğer bulgu ise Cav-1'in büyük hücreli akciğer karsinomunda kısmen EGFR/MMP ile aktive edilen sinyal yolağı sayesinde hücrenin invazivliğini ve metastatik yeteneğini artırdığıdır (191).

Cav-1'in tümör baskılayıcı fonksiyonu; tirozin fosforilasyonuna, serin fosforilasyonuna ve dominant-negatif nokta mutasyonlarına bağlı olarak inaktive olur (181). Cav-1'in tirozin fosforilasyonu, v-Src gen ürününün zara yapışmasına bağlı olup farklı Src tirozin kinaz aileleriyle ilişkilidir. Src, Cav-1 proteinini Tyr14 kalıntısından fosforile edebilir. Tyr14'te Cav-1'in fosforilasyonu gibi translasyon sonrası modifikasyonlar, Cav-1'in bir tümör promotör geni olarak rol oynadığına işaret etmektedir.

Tyr fosforilasyonu hücre büyümesi, adezyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre iskeleti organizasyonu ve transkripsiyon değişikliğiyle de ilişkilendirilmiştir. Kaveolin iskele domainin karboksil terminal kısmındaki fosforilasyon bölgeleri sayesinde Cav-1; Src ailesi tirozin kinazları dışında büyüme faktörü reseptörleri, eNOS, integrinler ve G-protein bağlayıcı reseptörler dahil olmak üzere kaveola içinde lokalize edilmiş sayısız sinyal molekülü ile etkileşime girebilir (182). PhosphositePlus veri tabanına göre, Cav-1'in bilinen 10 tane fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır (192).

Çalışmamızda kontrol grubunda Cav-1'in S37 ve Tyr42 fosforilasyonları tanımlanırken tümör grubunda sadece Tyr42 fosforilasyonu tanımlanmıştır. Ancak bu fosforilasyon bölgelerinin moleküler fonksiyonu hakkında literatürde yeterli bir bilgiye ulaşılamamıştır. Çalışmamızda Cav-1 proteini dışında Cav-2 β izoformu ve kavin ailesi üyelerinden Cavin-1, Cavin-2 ve Cavin-4 proteinlerinin ifadelerinde de anlamlı olarak azalma görülmüştür. Çalışmamızın sadece kontrol grubunda tanımlanan Cav-2 β izoformunun Y6 bölgesi, proteinin hücreler arası lokalizasyonuna etkisi nedeniyle hücre adezyonuyla, S10 ise protein aktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir (193).

Kaveola biyogenezi ve morfolojisinden sorumlu bir diğer grubun iki üyesi ise Cavin-1 (PTRF) ve Cavin-2 (SDPR) proteinleridir. Çeşitli dokularda yaygın olarak eksprese edilen PTRF, kaveola formasyonu ve Cav-1'in oligomerizasyonu için gereklidir (182). Yapısal olarak %20 oranında PTRF proteinine benzeyen SDPR ise serum açlıktaki hücrelerde yükselen, kalsiyumdan bağımsız bir fosfolipid bağlayıcı proteindir. Bu protein, protein kinaz C (PKC) fosforilasyonu için bir substrattır. Aynı zamanda membran eğriliğini indükleyerek kaveola morfolofisini düzenler. SDPR'nin down regülasyonu, azalmış PTRF ve Cav-1 ekspresyonuna neden olur (194, 195). Nassar ve ark. prostat kanseri hücrelerinde PTRF yokluğunun, tümör progresyonuna ve metastazına yol açtığını bildirmişlerdir (196).

Önceki çalışmalar, SDPR seviyelerinin de prostat, böbrek ve meme kanserlerinde down regüle edildiğini göstermiştir. SDPR'nin meme kanserindeki azalan ifadesinin ise promoter hipermetilasyonuyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (197). Ayrıca, SDPR down regülasyonunun malign böbrek tümörlü hastalardan alınan serumda gözlenmesi, kötü huylu tümörlerin iyi huylu oluşumlardan ayırt edilmesinde SDPR'nin bir teşhis belirteci adayı olabileceğini düşündürmüştür (198).

Çalışmamızda anlamlı azalış olduğu görülen SDPR (Cavin-2) proteinin ekspresyonundaki farklılık, azalan fosforilasyonu ile ilişkili olabilir. Kontrol ve tümör grubunda ortak tanımlanan 10 fosforile bölgenin (S287, S288, S293, T360, S361, S364, S366, S370, T375, S384) dışında S24, S25, S27, S31, S32, T33, S35, S37, S51, S234, S235 bölge fosforilasyonları sadece kontrol grubunda tanımlanmıştır. Tez çalışmamızda ele alınan fosfoproteinlerden özellikle anlamlı ifade değişimi olan 324 proteinin fosforile bölgeleri, kinaz zenginleştirme analizleri ve Cytoscape programı göreselleri ile detaylı bir şekilde incelenmiş ve tespit edilen bölgelerin fosforilasyon mekanizmalarında görev almış olası kinazlar ortaya çıkarılmıştır. Kinaz zenginleştirme analizlerine göre en anlamlı bulunan kinazlardan dördü (CSNK2A1, CSNK2A2, Cdc7 ve MAPK9); KAE2 ve X2Kweb veri tabanlarına göre HMGA1 ve MCM2 ile ilişkilidir. Hücre farklılaşması, büyümesi, çoğalması ve apoptozun baskılanması gibi etkileri olan kazein kinaz 2'nin alt üniteleri (CSNK2A1, CSNK2A2) (199, 200), HMGA1 ve MCM2 proteinlerinin birçok bölgesinin fosforilasyonunda görev almaktadırlar. Kazein kinaz 2'nin apoptoz baskılayıcı bir faktör olarak hücre döngüsü regülasyonu ile olan yakın ilişkisi, uzun yıllar boyunca çeşitli hastalıkların tedavisinde, özellikle de anti kanser tedavilerde bir hedef molekül olarak değerlendirilmesini sağlamıştır. (201, 202). Bu bağlamda tespit ettiğimiz fosfoproteinlerin, çeşitli kanserlerde artış göstermesine ek olarak elde ettiğimiz fosforilasyon bölge bilgileri; BHK'da hastalık sürecinde aktif olan kinazların ve ilgili yolların ortaya çıkarılmasına da önemli katkı sağlayabilir.

Çalışmamızda ekspresyonunda anlamlı derecede düşüş tespit edilen Glycophorin-A, esasen kan dokusu kaynaklı bir protein olarak öne çıkmaktadır. Kan gruplarının antijenik olarak ayırımında kullanılmak üzere belirli yapıları barındıran bu protein, eritrosit membranının karakteristik bir sialoglikoproteindir.

Çeşitli hücre içi parazitik organizmaların invazyon kabiliyetlerinde de önemli rolü olan bu protein, hospitalize edilen kanser hastalarından yapılan analizlerde dikkat çekecek şekilde farklı ekspresyon seviyelerinde bulunabilir. Ancak bu değişikliğin, farklı tümör odaklarına karşı kullanılan bazı antikanser ilaçlarının bir yan etkisi olarak gelişebileceği göz ardı edilemeyecek bir faktördür. Bu bağlamda hematopoietik kök hücreleri ile yapılan bir çalışmada gelişmekte olan hücreler CDK inhibitörü olan bir anti kanser ilacına maruz bırakılmış ve sonuç olarak Glycophorin-A pozitif eritroidlerin hem farklılaşmasının bozulduğu hem de koloni olarak beklenen sayıya ulaşamadıkları gözlemlenmiştir. Ancak Palbociclib olarak adlandırılan ve siklin bağımlı kinazlar CDK4 ve CDK6'nın selektif inhibitörü bu ajan HR pozitif ve HER2 negatif meme kanserine karşı kullanılmak üzere sadece kısa süre önce geliştirilmiştir. Başka bir açıdan bakacak olursak birçok kanser hastası daha anti kanser tedavisi görmeye başlamadan önce anemik durumda olabilmektedir. Kanser ilişkili anemi olarak adlandırılan bu durum ileri seviyedeki kanserlerde ise kronik inflamasyonun sonucu olarak daha sık bir şekilde ortaya çıkabilir. Esasen immun sistemin yanı sıra tümör hücrelerinden de salınan IL6, kanser ilişkili aneminin gelişiminde rol alabilen eritroid progenitör proliferasyonu ve dolaşımdaki eritrositlerin sağkalımı da dahil birçok faktörü etkileyebilmektedir. Tümöre ve seviyesine özgü olan ya da olmayan sayısız moleküler etkileşimin rol aldığı bu multifaktöriyel kanser semptomlarının daha iyi açıklanabilmesinde, özellikle kan dolaşımındaki moleküler değişimlerin izlenmesinde önemli faydalar sağlayabilir (203-205). Bu nedenle Glycophorin-A gibi tümör odağının dışından kaynaklanan proteinlerin, tez projemizdeki gibi küçük örnek sayılarına sahip çalışmalarda tespit edilmesi, kesin bir etkileşim ağını ortaya çıkarmasa da daha büyük örnek sayılarıyla yapılacak projeler için binlerce fosfoproteinden oluşan içeriği ile önemli bir destek sunabilir.

CDC2'in (Cell Division Cycle 2) aktivasyonu ile bağlantılı olarak tümör gelişiminde rol alabileceği ifade edilen RGC-32'nin (Regulator of cell cycle; RGCC) çeşitli kanserlerdeki ekspresyonunu konu edinen bir araştırmada ekspresyon artışının, hücre döngüsü regülasyonunu bozarak tümör gelişimine katkı sağlayabileceği değerlendirilmiştir.

Özellikle kolon kanseri dokularının incelendiği araştırmada adenokarsinom örneklerin önemli bir kısmında RGC-32 ekspresyonunun artış gösterdiği bunun yanı sıra akciğer, meme, prostat ve mesane gibi farklı tümör örneklerinde de yine RGC-32 artışı görüldüğü bildirilmiştir (206). Bununla birlikte benzer araştırmacı grubunun kısa zaman sonra sunduğu, meme ve prostat dokuları da dahil farklı metastatik kanser doku çalışmalarının sonuçlarını kapsayan araştırmalarında RGC-32 ekspresyonları açısından birbirini ile paralel olmayan sonuçlar ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar 2004 yılındaki çalışmada ortaya çıkan kolon adenokarsinomundaki yüksek RGC-32 seviyelerinden bahsederken bazı tümör dokularında ise RGC-32'nin aşırı eksprese olmadığını kaydetmişlerdir. Çalışmada özellikle kolon kanserlerinde olmak üzere birçok tümör dokusunda RGC-32 artışı bir kesinlik ifade etse de farklı sonuçlara dayanılarak, bazı kanser türlerinde RGC-32'nin tümör supresör bir gen gibi davranabileceği belirtilmiş ve epigenetik faktörlerin rolünün de değerlendirilmesi gerektiğine işaret edilmiştir (207). RGC-32'nin kompleman sistemi elemanları ile birlikte tümör gelişimine etkilerini konu alan bir çalışmada inflamasyonun kanser gelişimindeki etkisi ile uyumlu olarak C5b-9 kompleksi ve RGC-32'nin bu gelişimi destekleyici bir role sahip oldukları açıklanmıştır. Yine bu çalışmada da önceki verilerin aksine RGC-32'nin tümör supresör bir gen olarak değerlendirilebileceği ve epigenetik faktörlere bağlı olarak bazı tümörlerde susturulmuş olabileceği ifade edilmiştir (208). Akciğer kanserlerinde de genlerin promotör dizisindeki DNA metilasyonunun, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasında rol alabildiği bilinmektedir. Bu epigenetik modifikasyon, histon kuyruğu modifikasyonlarıyla birlikte hareket ederek kromatinin yoğunlaşma durumunu etkileyebilmektedir. Açık bir kromatin formu aktif transkripsiyona izin verirken, kapalı ve yoğun bir form transkripsiyon için bir engeldir. Bu bağlamda kromozomal değişikliklerin veya tek nükleotid mutasyonlarının yanında anormal DNA metilasyonlarının da, tümör baskılayıcı genleri etkisizleştirebildiği kabul edilmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda farklı kanser türleriyle birlikte akciğer kanserlerinde de anormal biçimde metillenmiş genler tespit edilmiştir. Ayrıca, metilasyon akciğer tümörögenezinde erken evrelerde gerçekleşebilen bir olay olarak kaydedilmiştir (209, 210). 2008 yılında yayınlanan genetik tabanlı bir araştırmada akciğer kanserlerinin erken teşhisi için; aday genlerin tespit edilmesini ve bu genler üzerinde kantitatif DNA metilasyon analizlerini de içeren bir takım testlerin yapılmasını ve üçüncü bir aşama olarak klinik çalışmalara geçilmesini öngören bir planlama sunulmuştur (211).

Doğrudan KHDAK'i konu edinen bir çalışmada 173 hastanın akciğer dokusu örnekleri RGC-32 metilasyonu açısından incelenmiştir. Çalışmada hastaların 46'sında metilasyona rastlanmıştır. RGC-32'nin hücre döngüsündeki rolünün sadece CDK1 ile olan ilişkisine bağlı olmadığı başka etkileşimlerin de söz konusu olduğu ve RGC-32'nin tümör gelişimine olan etkisinin ne yönde olacağının bulunduğu hücre tipi ile alakalı olabileceği ifade edilmiştir. Çalışmada özgün olarak KHDAK hastalarındaki metilasyonun tek başına prognozla ilgili belirgin bir etkisinin gözlemlenmediği ancak TP53 mutasyonu ile birlikte RGC-32 metilasyonu görülen hastaların, TP53 mutasyonu taşımayanlara göre daha iyi sağkalım oranlarına sahip oldukları bildirilmiştir. Araştırmada sonuç olarak RGC-32 geninin promotör bölgesinin KHDAK hastalarının önemli bir kısmında metilasyona uğradığı ve RGC-32'nin KHDAK hastalarında sıklıkla downregüle olduğu gösterilmiştir. Kim ve ark., araştırmalarının KHDAK üzerinde RGC-32 metilasyonun tespit edildiği ilk çalışma olduğunu ancak bu bulgularını protein düzeyinde incelememiş olmalarının önemli bir eksiklik olduğunu vurgulamışlardır. Bu açıdan bakıldığında tez çalışmamızda RGC-32 proteininin, tümör grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak oldukça düşük bulunması Kim ve ark.'nın çalışmalarını tamamlayıcı ya da destekleyici bir bulgu olarak değerlendirilebilir (11).

Miyopodin olarak da bilinen ve podin ailesinin bir üyesi olan Synaptopodin-2, prolin bakımından zengin bir proteindir. Synaptopodin-2, aktinin polimerizasyonu ve hücre iskeletindeki aktin dinamiği üzerinde etkilidir. Bu bağlamda, Synaptopodin-2 invaziv tümör gelişimi ile ilişkilendirilmektedir. Ancak yine de synaptopodin-2 ve ailesinin hücresel yerleşimleri ve buna bağlı fonksiyonları değişkenlik gösterebilir. Kanserdeki rolleri düşünüldüğünde ise farklı kanser tipleri ve evreleri bu moleküllerin onkojenik ya da tümör baskılayıcı gibi zıt davranışlar sergilemesine neden olabilir (212, 213). Yakın tarihli bir çalışmanın sonuçları farklı kanser türlerinde synaptopodin-2'nin ifadesinin azaldığına işaret etmektedir. Synaptopodin-2'nin hem farklı meme kanseri hücre hatlarında hem de meme kanseri tümör dokularında mRNA ve protein seviyelerinin düşük ifade edildiğini gösterilmiştir. SYNPO2'nin knock down edildiği hücrelerde, hücre göçünü ve tümör invazyonunu indükleyebilecek PI3K, AKT fosforilasyon seviyelerinin ve mTOR ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (214). Çalışmamızda da MS-tabanlı keşif analizleri sonrası tümör dokusunda düşük ifade edildiği belirlenen Synaptopodin-2'nin, azalan ifade gösterdiği PRM yöntemiyle hedefli proteomik analizleri yapılarak doğrulanmıştır.

Çalışmamızın diğer kısmında keşif analizi sonrasında tespit edilen ekspresyon farklılıklarının doğrulama analizleri yer almıştır. Daha öncesinde Proteome Discoverer informatik programıyla tespit edilen fosfoproteinler, PRM yöntemiyle hedefli olarak analiz edilmiş ve ifade değişimleri değerlendirilmiştir. PRM modu taramasından elde edilen ham veriler, Full MS taramasından elde edilen ham verilerden oluşturulan kütüphane ile karşılaştırılmıştır. Keşif çalışmalarının doğrulamasında, 70'in üzerinde fosfoprotein aynı örnek seti üzerinden analiz edilmiştir. Doğrulama analizleri, kantifikasyonu değerlendirilecek proteinlerin ticari antikorlarından bağımsız bir şekilde ve geleneksel yöntemlere göre çok daha fazla analit üzerinden değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir. Bulgular kısmında yer alan kromatogramlar ve peptitleri oluşturan fragmentlerin dağılımını gösteren bar grafiği görselleri, proteinlere ait gruplar arası farklılıkları geleneksel yöntemlere göre daha detaylı bir şekilde değerlendirmeye ve daha güvenilir sonuçlar elde etmeye imkan vermiştir.

SONUÇ

Çalışmamızda yüksek hacimli veri sağlayan MS tabanlı fosfoproteom yaklaşımı, KHDAK alt tipi olan büyük hücreli karsinom hastalarından alınan tümör ve sağlıklı akciğer dokusu örneklerine uygulanmıştır. Bu çalışmayla 3 temel hedef gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki yüksek verimli MS sistemleri ve çeşitli informatik programları kullanılarak büyük hücre karsinom hastalarına ait fosfoprotein profilinin oluşturulması ve protein fosforilasyonlarının belirlenmesidir. İkincisi tümör ve kontrol grupları arasında ifade değişimi olan proteinlerin tespit edilmesidir. Son olarak ise ifade değişimi tespit edilen fosfoproteinlerin temsili bir kısmının PRM yöntemiyle doğrulamalarının yapılması hedeflenmiştir.

Çalışma sonuçları kısaca özetlendiğinde:

Orbitrap kütle spektrometresinin tam tarama modunda gerçekleştirilen analizlerle elde edilen ham veriler informatik programlarıyla işlenerek büyük hücre karsinom için profil oluşturulmuştur. Yüksek güvenilirlikte toplam 2820 protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerin 2314'ünde fosforilasyon modifikasyonu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda 1835 ve tümör grubunda 1882 fosforile protein tanımlanırken bunların 1338'inin ortak olduğu görülmüştür.

Etiketsiz miktar tayini analizi sonrasında en az iki kat değişim olan 995 tane fosfoprotein tespit edilmiş ve 324'ünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla tümör grubundaki 156 proteinin ifadesinde artış, 168 proteinin ifadesinde azalış görülmüştür. Daha detaylı incelemek üzere bu sayı informatik programında yapılan analizler sonrası 38'e düşürülmüştür. Bu proteinlerin genel olarak hücre döngüsünde (RGCC, MCM2-6, CDK1), DNA replikasyonunda (MCM2-6, HMGA1) protein bağlanmasında (Desmoplakin, Tensin-1, Glycophorin-A), hücre iskeletinin oluşumunda yer alan proteinlerin regülasyonunda (Synaptopodin-2, PDZ ve LIM domain protein 4, KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 3) ve en önemlisi sinyal iletiminde (Cav1-3, Cavin2-4, Inositol 1,4,5-trifosfat reseptör tip 3-ITPR3, A-kinaz ankor izoform 3-AKAP2) yer alan proteinler olduğu görülmüştür.

İfade farklılığı olan fosfoproteinler bulundukları hücresel yapılara ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılarak dağılımları incelenmiştir. Tanımlanan proteinlerin büyük bir kısmının protein bağlanmasında rol aldığı tespit edilmiştir. Bulundukları hücresel yapılara göre değerlendirildiğinde; proteinlerin çoğunluğunu sitoplazma, hücre zarı ve nükleusta rol alan proteinlerin oluşturduğu ve dağılımlarının birbirine çok yakın olduğu görülmüştür.

İfade farklılığı olan proteinlerin fonksiyon ve ilişkilerinin daha detaylı bir şekilde incelenmesi için farklı web tabanlı informatik programları kullanılmıştır. STRING 11.0 veri tabanında belirlenen etkileşimler ile 319 proteinin değerlendirildiği protein-protein etkileşim (PPI) haritasında 7 küme ve 179 bağlantı oluşturulmuştur. En çok bağlantıya sahip proteinlerin ise CDK1, TOP2A, MCM2, RRP9-12, KDM1A, GNG12 ve THOC5 olduğu gözlemlenmiştir.

Belirlenen hedef proteinlerden 73 tanesinin PRM yöntemiyle doğrulaması yapılmıştır. Bu sayı çok fazla olduğu için sadece 3 proteine ait görseller bulgular bölümünde sunulmuş ve bu proteinlerin gruplar arası kat değişimleri Perseus informatik programında istatistiksel olarak değerlendirilip oluşturulan ısı haritalarıyla görselleştirilmiştir: Caveolae-associated protein 2, Synaptopodin-2 (Isoform 2) ve Glycophorin-A bulgulara geri kalan 12 tanesi (Osteoclast-stimulating factor-1, Nuclease-sensitive element-binding protein 1, 60S acidic ribosomal protein P2, Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog, serine/arginine repetitive matrix protein 2, BTB/POZ domain-containing protein KCTD12, Spectrin beta chain non-erythrocytic-1, Vinculin, mRNA decay activator protein ZFP36, LIM domain only protein 7, Talin-1 ve Caveolin-1) ise ham veriler bölümünde yer almaktadır.

Binlerce proteinin analiz edildiği keşif çalışmalarının doğrulama analizleri için western blot gibi geleneksel yöntemler yerine hedefli proteomik yaklaşımını tercih ettik. Binlerce protein içinden ifade değişimi olan yüzlercesini değerlendirmede sadece birkaç tane protein üzerinden hareket etmek ya da filtrelenmiş çok sayıdaki proteinin antikorlarını sağlıklı bir şekilde kısa zamanda elde etmek pek mümkün görünmemektedir. Projemizdeki gibi yetmişin üzerinde proteinin doğrulama analizleri için geleneksel yöntemlerin kullanılacağı düşünülürse uygulama zorluğu, zaman kısıtlılığı, ek maliyetler ve analiz hassasiyeti gibi sorunlarla karşılaşılması kaçınılmazdır. Bununla birlikte PRM ile, belirlenen çok sayıda proteinin aynı örnek seti içinde hassas bir şekilde doğrulamasının yapılabiliyor olması önemli bir avantaj sağlamaktadır. Akademik çalışmalar açısından bakıldığında PRM metodu ülkemizde henüz pek bilinmeyen ve güncel literatüre göre Türkiye’de henüz uygulamaya başlanmamış bir doğrulama yöntemidir. Tez projemizde yüksek veri hacimli proteomik araştırmalar için geliştirilen bu analitik doğrulama yönteminin ülkemizde ilk defa uygulanmasının alanla ilgili önemli kazanımları ve kolaylıkları da beraberinde getirdiğini düşünmekteyiz.

Son zamanlarda gelişen omik teknolojileri ile analiz sonuçlarının çok yüksek veri hacimlerine ulaşması, kaçınılmaz olarak güçlü veri analizi araçlarına duyulan ihtiyacı da beraberinde getirdi. Bu bağlamda analiz cihazları ile birlikte sunulan informatik programları araştırmacıların önemli bir sorununu ortadan kaldırmış oldu. Ancak tez çalışmamızdaki gibi insan dokusu ile çalışıyor olmak ve özellikle de hem teşhisi zor hem de sayısı ve miktarı oldukça az bulunan hasta örnekleri ile çalışıyor olmak; sonuçlarla ilgili daha kesin hükümlere varabilmek için elde edilen sonuçların kuşkusuz farklı merkezlerde ve daha büyük hasta gruplarında yapılacak çalışmalar ile yeniden değerlendirilmesini ve geliştirilmesini gerektirmektedir. Bununla birlikte tez çalışması boyunca ülkemizdeki en güçlü analiz cihazları ile bu cihazların yüksek hacimli ham verilerine ait zor ve karmaşık istatistiksel hesaplamalarını güvenilir bir şekilde değerlendirebilen informatik programları kullanılmıştır. Böylece onlarca protein yerine binlerce proteini tek bir analiz sürecinde tespit edebilmemiz mümkün olmuştur. Üç yıl süren proje kapsamındaki çalışmalar boyunca doktora öğrencileri tarafından geliştirilen özgün metotlarla yine ülkemizde henüz pek karşılaşmadığımız MS tabanlı fosfoproteomik çalışmaları hasta dokuları ile gerçekleştirilmiş ve doğrulama analizleri yapılmıştır. Böylece Türkiye’de ilk defa KHDAK (BHK alt tipi) hastalığına ait binlerce fosfoproteinden oluşan geniş veri hacimli özgün bir kaynak elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol*. 2016;893:1-19.
3. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye Kanser İstatistikleri. Ankara (İnternette) 2017, Erişim 01.08.2019, https://hsqm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR._uzuuun.pdf
4. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH ve ark. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016 Jul;66(4):271-89.
5. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016 Jul;25(3):447-68.
6. 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.
7. Vyse S, McCarthy F, Broncel M, Paul A, Wong JP, Bhamra A ve ark. Quantitative phosphoproteomic analysis of acquired cancer drug resistance to pazopanib and dasatinib. *J Proteomics*. 2018 Jan 6;170:130-140.
8. López E, Cho WC. Phosphoproteomics and lung cancer research. *Int J Mol Sci*. 2012 Sep 26;13(10):12287-314.
9. von Stechow L, Francavilla C, Olsen JV. Recent findings and technological advances in phosphoproteomics for cells and tissues. *Expert Rev Proteomics*. 2015;12(5):469-87.
10. Deb B, Puttamalles V, Gondkar K, Thiery JP, Gowda H, Kumar P. Phosphoproteomic Profiling Identifies Aberrant Activation of Integrin Signaling in Aggressive Non-Type Bladder Carcinoma. *J Clin Med*. 2019 May 17;8(5).
11. Kim DS, Lee JY, Lee SM, Choi JE, Cho S, Park JY. Promoter methylation of the RGC32 gene in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2011 Feb 1;117(3):590-6.

12. Bhattacharya S, Mariani TJ. Systems biology approaches to identify developmental bases for lung diseases. *Pediatr Res*. 2013 Apr;73(4 Pt 2):514-22.
13. T.C. Sağlık Bakanlığı. Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2017. Ankara (İnternette) 2018 Erişim 02.08.2019, <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/31096,turkcesiydijiv1pdf.pdf?0>
14. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
15. Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F, Souquet PJ. Lung cancer in never smokers--a review. *Eur J Cancer*. 2012 Jun;48(9):1299-311.
16. Improgo MR, Scofield MD, Tapper AR, Gardner PD. From smoking to lung cancer: the CHRNA5/A3/B4 connection. *Oncogene*. 2010 Sep 2;29(35):4874-84.
17. Stabile LP, Dacic S, Land SR, Lenzner DE, Dhir R, Acquafondata M, ve ark. Combined analysis of estrogen receptor beta-1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome. *Clin Cancer Res*. 2011 Jan 1;17(1):154-64.
18. Patel JD. Lung cancer in women. *J Clin Oncol*. 2005 May 10;23(14):3212-8.
19. Lissowska J, Foretova L, Dabek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P ve ark. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control*. 2010 Jul;21(7):1091-104.
20. Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, Kelm O, Hung RJ, Tanière P ve ark. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res*. 2005 Jun 15;65(12):5076-83.
21. Lee YJ, Kim JH, Kim SK, Ha SJ, Mok TS, Mitsudomi T ve ark. Lung cancer in never smokers: change of a mindset in the molecular era. *Lung Cancer*. 2011 Apr;72(1):9-15.
22. de Groot P, Munden RF. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiol Clin North Am*. 2012 Sep;50(5):863-76.
23. 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.

24. Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, Bickeböller H, Rosenberger A, McCormack V ve ark. Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Am J Epidemiol.* 2012 Oct 1;176(7):573-85.
25. Kumar V, Abbas AK & Aster JC. Robbins & Cotran *Pathologic Basis of Disease*. USA: Elsevier Health Sciences; 2013.
26. 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.
27. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med.* 2011 Dec;32(4):669-92.
28. Travis WD, Brambilla E, Muller-hermelink HK, Harris CC. *World Health Organization classification of tumours: Pathology & genetics tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon: IARCPress; 2004.
29. Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfertheiner MV, Modlin IM. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer.* 2008 Jul 1;113(1):5-21.
30. Toyooka S, Mitsudomi T, Soh J, Aokage K, Yamane M, Oto T ve ark. Molecular oncology of lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Aug;59(8):527-37.
31. Panov Sasho Z. Molecular biology of the lung cancer. *Radiology and Oncology*, 2005, 39.3: 197.
32. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013 Oct;5 Suppl 5:S479-90. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03. Review.
33. Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R. Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *Lancet Oncol.* 2015 Jul;16(7):e342-51.
34. Sholl LM. Biomarkers in lung adenocarcinoma: a decade of progress. *Arch Pathol Lab Med.* 2015 Apr;139(4):469-80.
35. Wang Z. ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol.* 2017;1652:3-35.
36. Cortot AB, Jänne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev.* 2014 Sep;23(133):356-66.

37. Wood K, Hensing T, Malik R, Salgia R. Prognostic and Predictive Value in KRAS in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA Oncol.* 2016 Jun 1;2(6):805-12.
38. Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol.* 2014 Aug 1;90(3):197-207.
39. Pérez-Ramírez C, Cañadas-Garre M, Molina MÁ, Faus-Dáder MJ, Calleja-Hernández MÁ. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenomics.* 2015 Nov;16(16):1843-62.
40. Breuer RH, Postmus PE, Smit EF. Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration.* 2005 May-Jun;72(3):313-30.
41. Raso MG, Wistuba II. Molecular pathogenesis of early-stage non-small cell lung cancer and a proposal for tissue banking to facilitate identification of new biomarkers. *J Thorac Oncol.* 2007 Jul;2(7 Suppl 3):S128-35.
42. Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Esteller M, Nomoto S, Trink B, Engles JM ve ark. Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res.* 2002 Jul 1;62(13):3659-62.
43. Kitamura H, Yazawa T, Okudela K, Shimoyamada H, Sato H. (2008). Molecular and genetic pathogenesis of lung cancer: differences between small-cell and non-small-cell carcinomas. *The Open Pathology Journal*, 2(1).
44. Naidoo, Jarushka, and Alexander Drilon. Molecular diagnostic testing in non-small cell lung cancer. *American Journal of Hematology/Oncology.* 2014 (10.4).
45. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004 Oct 21;431(7011):931-45.
46. omicX. <https://omictools.com/phosphositeplus-tool>. Erişim, 07.08.2019
47. Keshava Prasad TS, Goel R, Kandasamy K, Keerthikumar S, Kumar S, Mathivanan S, ve ark. Human Protein Reference Database--2009 update. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D767-72.
48. Pagel O, Loroch S, Sickmann A, Zahedi RP. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2015 Jun;12(3):235-53.

49. Ruhaak LR, Miyamoto S, Lebrilla CB. Developments in the identification of glycan biomarkers for the detection of cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Apr;12(4):846-55.
50. Černý M, Skalák J, Cerna H, Brzobohatý B. Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *J Proteomics*. 2013 Oct 30;92:2-27.
51. Morelle W, Canis K, Chirat F, Faid V, Michalski JC. The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. *Proteomics*. 2006 Jul;6(14):3993-4015. Review.
52. Shental-Bechor D, Levy Y. Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 Oct;19(5):524-33.
53. Gu J, Isaji T, Xu Q, Kariya Y, Gu W, Fukuda T ve ark. Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. *Glycoconj J*. 2012 Dec;29(8-9):599-607.
54. Hwang H, Zhang J, Chung KA, Leverenz JB, Zabetian CP, Peskind ER ve ark. Glycoproteomics in neurodegenerative diseases. *Mass Spectrom Rev*. 2010 Jan-Feb;29(1):79-125.
55. Christiansen MN, Chik J, Lee L, Anugraham M, Abrahams JL, Packer NH. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*. 2014 Mar;14(4-5):525-46.
56. Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. Glycosylation and the immune system. *Science*. 2001 Mar 23;291(5512):2370-6. Review.
57. Madu CO, Lu Y. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J Cancer*. 2010 Oct 6;1:150-77.
58. Denis NJ, Vasilescu J, Lambert JP, Smith JC, Figeys D. Tryptic digestion of ubiquitin standards reveals an improved strategy for identifying ubiquitinated proteins by mass spectrometry. *Proteomics*. 2007 Mar;7(6):868-74.
59. Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res*. 2016 Apr;26(4):399-422.
60. Afjehi-Sadat L, Garcia BA. Comprehending dynamic protein methylation with mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*. 2013 Feb;17(1):12-9.
61. Ong SE, Mittler G, Mann M. Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat Methods*. 2004 Nov;1(2):119-26.

62. Bremang M, Cuomo A, Agresta AM, Stugiewicz M, Spadotto V, Bonaldi T. Mass spectrometry-based identification and characterisation of lysine and arginine methylation in the human proteome. *Mol Biosyst.* 2013 Sep;9(9):2231-47.
63. Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Oct;1864(10):1372-401.
64. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P ve ark. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 2006 Nov 3;127(3):635-48.
65. Puttick J, Baker EN, Delbaere LT. Histidine phosphorylation in biological systems. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jan;1784(1):100-5.
66. Roskoski R Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res.* 2015 Oct;100:1-23.
67. Baltussen LL, Rosianu F, Ultanir SK. Kinases in synaptic development and neurological diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018 Jun 8;84(Pt B):343-352.
68. Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics.* 2009 Mar;9(6):1451-68.
69. Leitner A. Enrichment Strategies in Phosphoproteomics. içinde: von Stechow L. (editör) *Phospho-Proteomics. Methods Mol Biol.* Springer, New York; 2016.1355:105-21.
70. Thingholm TE, Larsen MR. The Use of Titanium Dioxide for Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides. İçinde: von Stechow L. (editör) *Phospho-Proteomics. Methods Mol Biol.* Springer, New York; 2016.1355:135-46.
71. Engholm-Keller K, Larsen MR. Improving the Phosphoproteome Coverage for Limited Sample Amounts Using TiO₂-SIMAC-HILIC (TiSH) Phosphopeptide Enrichment and Fractionation. İçinde: von Stechow L. (editör) *Phospho-Proteomics. Methods Mol Biol.* Springer, New York; 2016.1355:161-77.
72. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jun;1854(6):601-8.

73. Iliuk A, Jayasundera K, Wang WH, Schluttenhofer R, Geahlen RL, Tao WA. In-Depth Analyses of B Cell Signaling Through Tandem Mass Spectrometry of Phosphopeptides Enriched by PolyMAC. *Int J Mass Spectrom.* 2015 Feb 1;377:744-753.
74. Fíla J, Honys D. Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids.* 2012 Sep;43(3):1025-47.
75. Yang C, Zhong X, Li L. Recent advances in enrichment and separation strategies for mass spectrometry-based phosphoproteomics. *Electrophoresis.* 2014 Dec;35(24):3418-29.
76. Beltran L, Cutillas PR. Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids.* 2012 Sep;43(3):1009-24.
77. Gaberc-Porekar V, Menart V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods.* 2001 Oct 30;49(1-3):335-60.
78. Zhao X, Wang Q, Wang S, Zou X, An M, Zhang X ve ark. Citric acid-assisted two-step enrichment with TiO₂ enhances the separation of multi- and monophosphorylated peptides and increases phosphoprotein profiling. *J Proteome Res.* 2013 Jun 7;12(6):2467-76.
79. Thingholm TE, Jensen ON, Robinson PJ, Larsen MR. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol Cell Proteomics.* 2008 Apr;7(4):661-71.
80. Thingholm TE, Larsen MR. Sequential Elution from IMAC (SIMAC): An Efficient Method for Enrichment and Separation of Mono- and Multi-phosphorylated Peptides. içinde: von Stechow L. (editör) *Phospho-Proteomics. Methods Mol Biol.* 2016;1355:147-60.
81. Grønborg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M ve ark. A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics.* 2002 Jul;1(7):517-27.
82. Whiteaker JR, Zhao L, Yan P, Ivey RG, Voytovich UJ, Moore HD ve ark. Peptide Immunoaffinity Enrichment and Targeted Mass Spectrometry Enables

- Multiplex, Quantitative Pharmacodynamic Studies of Phospho-Signaling. *Mol Cell Proteomics*. 2015 Aug;14(8):2261-73.
83. McLachlin DT, Chait BT. Improved beta-elimination-based affinity purification strategy for enrichment of phosphopeptides. *Anal Chem*. 2003 Dec 15;75(24):6826-36.
 84. Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006 Feb;4(4):295-320.
 85. Zubarev RA, Makarov A. Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem*. 2013 Jun 4;85(11):5288-96.
 86. Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods*. 2007 Sep;4(9):709-12.
 87. Silva AMN, Vitorino R, Domingues MRM, Spickett CM, Domingues P. Post-translational modifications and mass spectrometry detection. *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec;65:925-941.
 88. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):198-207. Review.
 89. Doll S, Burlingame AL. Mass spectrometry-based detection and assignment of protein posttranslational modifications. *ACS Chem Biol*. 2015 Jan 16;10(1):63-71.
 90. Choudhary C, Mann M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Jun;11(6):427-39.
 91. Scherl A. Clinical protein mass spectrometry. *Methods*. 2015 Jun 15;81:3-14.
 92. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Sep;5(9):699-711. Review.
 93. Farley AR, Link AJ. Identification and quantification of protein posttranslational modifications. *Methods Enzymol*. 2009;463:725-63.
 94. Palumbo AM, Smith SA, Kalcic CL, Dantus M, Stemmer PM, Reid GE. Tandem mass spectrometry strategies for phosphoproteome analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2011 Jul-Aug;30(4):600-25.

95. Macek B, Mann M, Olsen JV. Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:199-221.
96. Nagaraj N, D'Souza RC, Cox J, Olsen JV, Mann M. Feasibility of large-scale phosphoproteomics with higher energy collisional dissociation fragmentation. *J Proteome Res*. 2010 Dec 3;9(12):6786-94.
97. Udeshi ND, Shabanowitz J, Hunt DF, Rose KL. Analysis of proteins and peptides on a chromatographic timescale by electron-transfer dissociation MS. *FEBS J*. 2007 Dec;274(24):6269-76.
98. Kim MS, Pandey A. Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *Proteomics*. 2012 Feb;12(4-5):530-42.
99. Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Jun 29;101(26):9528-33.
100. Molina H, Horn DM, Tang N, Mathivanan S, Pandey A. Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Feb 13;104(7):2199-204.
101. Sajic T, Liu Y, Aebersold R. Using data-independent, high-resolution mass spectrometry in protein biomarker research: perspectives and clinical applications. *Proteomics Clin Appl*. 2015 Apr;9(3-4):307-21.
102. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006 Apr 14;312(5771):212-7.
103. Hu A, Noble WS, Wolf-Yadlin A. Technical advances in proteomics: new developments in data-independent acquisition. *F1000Res*. 2016 Mar 31;5.
104. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*. 2016 Sep 15;537(7620):347-55.
105. Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJ. Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2009 Jun;44(6):861-78.
106. Vidova V, Spacil Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Anal Chim Acta*. 2017 Apr 29;964:7-23.
107. Hernandez-Valladares M, Aasebø E, Selheim F, Berven FS, Bruserud Ø. Selecting Sample Preparation Workflows for Mass Spectrometry-Based

- Proteomic and Phosphoproteomic Analysis of Patient Samples with Acute Myeloid Leukemia. *Proteomes*. 2016 Aug 22;4(3).
108. Thomas S, Hao L, Ricke WA, Li L. Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics. *Proteomics Clin Appl*. 2016 Apr;10(4):358-70.
 109. 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.
 110. 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.
 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. 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.
 113. 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.
 114. Xiao H, Zhang L, Zhou H, Lee JM, Garon EB, Wong DT. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Feb;11(2):M111.012112.
 115. Li Y, Lian H, Jia Q, Wan Y. Proteome screening of pleural effusions identifies IL1A as a diagnostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Feb 6;457(2):177-82.
 116. Qu T, Zhang J, Xu N, Liu B, Li M, Liu A ve ark. Diagnostic value analysis of combined detection of Trx, CYFRA21-1 and SCCA in lung cancer. *Oncol Lett*. 2019 May;17(5):4293-4298.

117. 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.
118. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Nov;1(11):845-67.
119. 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.
120. Nolen BM, Lomakin A, Marrangoni A, Velikokhatnaya L, Prosser D, Lokshin AE. Urinary protein biomarkers in the early detection of lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015 Feb;8(2):111-9.
121. Santucci L, Candiano G, Petretto A, Bruschi M, Lavarello C, Inglese E ve ark. From hundreds to thousands: Widening the normal human Urinome (1). *J Proteomics*. 2015 Jan 1;112:53-62.
122. Wu J, Gao Y. Physiological conditions can be reflected in human urine proteome and metabolome. *Expert Rev Proteomics*. 2015;12(6):623-36.
123. Johnson SA, Hunter T. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods*. 2005 Jan;2(1):17-25.
124. Harsha HC, Pandey A. Phosphoproteomics in cancer. *Mol Oncol*. 2010 Dec;4(6):482-95.
125. Zahid S, Oellerich M, Asif AR, Ahmed N. Phosphoproteome profiling of substantia nigra and cortex regions of Alzheimer's disease patients. *J Neurochem*. 2012 Jun;121(6):954-63.
126. Cohen P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem*. 2001 Oct;268(19):5001-10.
127. Beekhof R, van Alphen C, Henneman AA, Knol JC, Pham TV, Rolfs F ve ark. INKA, an integrative data analysis pipeline for phosphoproteomic inference of active kinases. *Mol Syst Biol*. 2019 Apr 12;15(4):e8250.
128. Solanki HS, Raja R, Zhavoronkov A, Ozerov IV, Artemov AV, Advani J ve ark. Targeting focal adhesion kinase overcomes erlotinib resistance in smoke induced lung cancer by altering phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Oncoscience*. 2018 Feb 23;5(1-2):21-38.

129. Jung JH, You S, Oh JW, Yoon J, Yeon A, Shahid M ve ark. Integrated proteomic and phosphoproteomic analyses of cisplatin-sensitive and resistant bladder cancer cells reveal CDK2 network as a key therapeutic target. *Cancer Lett.* 2018 Nov 28;437:1-12.
130. Chang Y, Park KH, Lee JE, Han KC. Phosphoproteomic analysis reveals PAK2 as a therapeutic target for lapatinib resistance in HER2-positive breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Oct 20;505(1):187-193.
131. Koch H, Wilhelm M, Ruprecht B, Beck S, Frejno M, Klaeger S ve ark. Phosphoproteome Profiling Reveals Molecular Mechanisms of Growth-Factor-Mediated Kinase Inhibitor Resistance in EGFR-Overexpressing Cancer Cells. *J Proteome Res.* 2016 Dec 2;15(12):4490-4504.
132. Lu H, Wang L, Gao W, Meng J, Dai B, Wu S ve ark. IGFBP2/FAK pathway is causally associated with dasatinib resistance in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2013 Dec;12(12):2864-73.
133. Wu X, Zahari MS, Renuse S, Nirujogi RS, Kim MS, Manda SS ve ark. Phosphoproteomic Analysis Identifies Focal Adhesion Kinase 2 (FAK2) as a Potential Therapeutic Target for Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2015 Nov;14(11):2887-900.
134. van der Mijn JC, Broxterman HJ, Knol JC, Piersma SR, De Haas RR, Dekker H ve ark. Sunitinib activates Axl signaling in renal cell cancer. *Int J Cancer.* 2016 Jun 15;138(12):3002-10.
135. Abe Y, Nagano M, Kuga T, Tada A, Isoyama J, Adachi J ve ark. Deep Phospho- and Phosphotyrosine Proteomics Identified Active Kinases and Phosphorylation Networks in Colorectal Cancer Cell Lines Resistant to Cetuximab. *Sci Rep.* 2017 Sep 5;7(1):10463.
136. Parker R, Clifton-Bligh R, Molloy MP. Phosphoproteomics of MAPK inhibition in BRAF-mutated cells and a role for the lethal synergism of dual BRAF and CK2 inhibition. *Mol Cancer Ther.* 2014 Jul;13(7):1894-906.
137. Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, Gillette MA, Clauser KR, Wang P ve ark. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature.* 2016 Jun 2;534(7605):55-62.
138. Cheng LC, Li Z, Graeber TG, Graham NA, Drake JM. Phosphopeptide Enrichment Coupled with Label-free Quantitative Mass Spectrometry to

- Investigate the Phosphoproteome in Prostate Cancer. *J Vis Exp*. 2018 Aug 2;(138).
139. Zahari MS, Wu X, Pinto SM, Nirujogi RS, Kim MS, Fetisov B ve ark. Phosphoproteomic profiling of tumor tissues identifies HSP27 Ser82 phosphorylation as a robust marker of early ischemia. *Sci Rep*. 2015 Sep 2;5:13660.
 140. Gámez-Pozo A, Sánchez-Navarro I, Calvo E, Díaz E, Miguel-Martín M, López R ve ark. Protein phosphorylation analysis in archival clinical cancer samples by shotgun and targeted proteomics approaches. *Mol Biosyst*. 2011 Aug;7(8):2368-74.
 141. Jaros JA, Guest PC, Ramouné H, Rothermundt M, Leweke FM, Martins-de-Souza D ve ark. Clinical use of phosphorylated proteins in blood serum analysed by immobilised metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *J Proteomics*. 2012 Dec 5;76 Spec No.:36-42.
 142. Zhou W, Ross MM, Tessitore A, Ornstein D, Vanmeter A, Liotta LA ve ark. 3rd. An initial characterization of the serum phosphoproteome. *J Proteome Res*. 2009 Dec;8(12):5523-31.
 143. Zawadzka AM, Schilling B, Cusack MP, Sahu AK, Drake P, Fisher SJ ve ark. Phosphoprotein secretome of tumor cells as a source of candidates for breast cancer biomarkers in plasma. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Apr;13(4):1034-49.
 144. Chen IH, Xue L, Hsu CC, Paez JS, Pan L, Andaluz H ve ark. Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017 Mar 21;114(12):3175-3180.
 145. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009 May;6(5):359-62.
 146. Thingholm TE, Jørgensen TJ, Jensen ON, Larsen MR. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1929-35.
 147. Gaspari M, Cuda G. Nano LC-MS/MS: a robust setup for proteomic analysis. *Methods Mol Biol*. 2011;790:115-26.
 148. Sun L, Zhu G, Dovichi NJ. Comparison of the LTQ-Orbitrap Velos and the Q-Exactive for proteomic analysis of 1-1000 ng RAW 264.7 cell lysate digests. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2013 Jan 15;27(1):157-62.

149. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017 Jan;67(1):7-30.
150. I H, Cho JY. Lung Cancer Biomarkers. *Adv Clin Chem.* 2015;72:107-70.
151. Arshad OA, Danna V, Petyuk VA, Piehowski PD, Liu T, Rodland KD ve ark. An Integrative Analysis of Tumor Proteomic and Phosphoproteomic Profiles to Examine the Relationships Between Kinase Activity and Phosphorylation. *Mol Cell Proteomics.* 2019 Aug 9;18(8 suppl 1):S26-S36.
152. Tarrant MK, Cole PA. The chemical biology of protein phosphorylation. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:797-825.
153. Amit E, Obena R, Wang YT, Zhuravel R, Reyes AJF, Elbaz S ve ark. Integrating proteomics with electrochemistry for identifying kinase biomarkers. *Chem Sci.* 2015 Aug 1;6(8):4756-4766.
154. Zhang X, Belkina N, Jacob HK, Maity T, Biswas R, Venugopalan A ve ark. Identifying novel targets of oncogenic EGF receptor signaling in lung cancer through global phosphoproteomics. *Proteomics.* 2015 Jan;15(2-3):340-55.
155. Raja R, Sahasrabuddhe NA, Radhakrishnan A, Syed N, Solanki HS, Puttamalleswari VN ve ark. Chronic exposure to cigarette smoke leads to activation of p21 (RAC1)-activated kinase 6 (PAK6) in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget.* 2016 Sep 20;7(38):61229-61245.
156. Niimori-Kita K, Ogino K, Mikami S, Kudoh S, Koizumi D, Kudoh N ve ark. Identification of nuclear phosphoproteins as novel tobacco markers in mouse lung tissue following short-term exposure to tobacco smoke. *FEBS Open Bio.* 2014 Aug 23;4:746-54.
157. Zanivan S, Gnad F, Wickström SA, Geiger T, Macek B, Cox J ve ark. Solid tumor proteome and phosphoproteome analysis by high resolution mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2008 Dec;7(12):5314-26.
158. Narumi R, Murakami T, Kuga T, Adachi J, Shiromizu T, Muraoka S ve ark. A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J Proteome Res.* 2012 Nov 2;11(11):5311-22.
159. Dehghani A, Gödderz M, Winter D. Tip-Based Fractionation of Batch-Enriched Phosphopeptides Facilitates Easy and Robust Phosphoproteome Analysis. *J Proteome Res.* 2018 Jan 5;17(1):46-54.

160. Lee HJ, Kim HJ, Liebler DC. Efficient Microscale Basic Reverse Phase Peptide Fractionation for Global and Targeted Proteomics. *J Proteome Res.* 2016 Jul 1;15(7):2346-54.
161. Panizza E, Branca RMM, Olaviusson P, Orre LM, Lehtiö J. Isoelectric point-based fractionation by HiRIEF coupled to LC-MS allows for in-depth quantitative analysis of the phosphoproteome. *Sci Rep.* 2017 Jul 3;7(1):4513.
162. Schweppe DK, Rigas JR, Gerber SA. Quantitative phosphoproteomic profiling of human non-small cell lung cancer tumors. *J Proteomics.* 2013 Oct 8;91:286-96.
163. Iwai LK, Payne LS, Luczynski MT, Chang F, Xu H, Clinton RW ve ark. Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild-type DDR2 and its lung cancer mutants. *Biochem J.* 2013 Sep 15;454(3):501-13.
164. Solanki HS, Advani J, Khan AA, Radhakrishnan A, Sahasrabudhe NA, Pinto SM, Chang X ve ark. Chronic Cigarette Smoke Mediated Global Changes in Lung Mucoepidermoid Cells: A Phosphoproteomic Analysis. *OMICS.* 2017 Aug;21(8):474-487.
165. Wiredja DD, Ayati M, Mazhar S, Sangodkar J, Maxwell S, Schlatzer D ve ark. Phosphoproteomics Profiling of Nonsmall Cell Lung Cancer Cells Treated with a Novel Phosphatase Activator. *Proteomics.* 2017 Nov;17(22).
166. Cheung CHY, Juan HF. Quantitative proteomics in lung cancer. *J Biomed Sci.* 2017 Jun 14;24(1):37.
167. Lei M. The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005 Aug;5(5):365-80.
168. Tachibana KE, Gonzalez MA, Coleman N. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J Pathol.* 2005 Jan;205(2):123-9.
169. Kwok HF, Zhang SD, McCrudden CM, Yuen HF, Ting KP, Wen Q ve ark. Prognostic significance of minichromosome maintenance proteins in breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2014 Dec 15;5(1):52-71.
170. Güzel C, Govorukhina NI, Wisman GBA, Stingl C, Dekker LJM, Klip HG ve ark. Proteomic alterations in early stage cervical cancer. *Oncotarget.* 2018 Apr 6;9(26):18128-18147.

171. Cheung CHY, Hsu CL, Chen KP, Chong ST, Wu CH, Huang HC ve ark. MCM2-regulated functional networks in lung cancer by multi-dimensional proteomic approach. *Sci Rep*. 2017 Oct 16;7(1):13302.
172. Toshiya Tsuji, Scott B. Ficarro, Wei Jiang. Essential Role of Phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the Initiation of DNA Replication in Mammalian Cells. *Mol Biol Cell*. 2006 Oct; 17(10): 4459–4472.
173. Charych DH, Coyne M, Yabannavar A, Narberes J, Chow S, Wallroth M ve ark. Inhibition of Cdc7/Dbf4 kinase activity affects specific phosphorylation sites on MCM2 in cancer cells. *J Cell Biochem*. 2008 Jun 1;104(3):1075-86.
174. Fei L, Xu H. Role of MCM2-7 protein phosphorylation in human cancer cells. *Cell Biosci*. 2018 Jul 24;8:43.
175. Huimin L, Chi X, Chen L, Qi X, Bai Y, Peng F ve ark. The Dephosphorylation of MCM2 at Serine27 Site Attenuates Ovarian Cancer Metastasis via Regulating Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Lancet*. 2019 May 24.
176. Chan AW, Chau SL, Tong JH, Chow C, Kwan JSH, Chung LY ve ark. The Landscape of Actionable Molecular Alterations in Immunomarker-Defined Large-Cell Carcinoma of the Lung. *J Thorac Oncol*. 2019 Jul;14(7):1213-1222.
177. DelBove J, Rosson G, Strobeck M, Chen J, Archer TK, Wang W ve ark. Identification of a core member of the SWI/SNF complex, BAF155/SMARCC1, as a human tumor suppressor gene. *Epigenetics*. 2011 Dec;6(12):1444-53.
178. Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C, Elias L, Ho L, Ranish J ve ark. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat Genet*. 2013 Jun;45(6):592-601.
179. Ke SB, Qiu H, Chen JM, Shi W, Chen YS. MicroRNA-202-5p functions as a tumor suppressor in colorectal carcinoma by directly targeting SMARCC1. *Gene*. 2018 Nov 15;676:329-335.
180. Kimura A, Arakawa N, Hirano H. Mass spectrometric analysis of the phosphorylation levels of the SWI/SNF chromatin remodeling/tumor suppressor proteins ARID1A and Brg1 in ovarian clear cell adenocarcinoma cell lines. *J Proteome Res*. 2014 Nov 7;13(11):4959-69.
181. Wang S, Wang N, Zheng Y, Zhang J, Zhang F, Wang Z. Caveolin-1: An Oxidative Stress-Related Target for Cancer Prevention. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:7454031.

182. Gupta R, Toufaily C, Annabi B. Caveolin and cavin family members: dual roles in cancer. *Biochimie*. 2014 Dec;107 Pt B:188-202.
183. Di Vizio D, Morello M, Sotgia F, Pestell RG, Freeman MR, Lisanti MP. An absence of stromal caveolin-1 is associated with advanced prostate cancer, metastatic disease and epithelial Akt activation. *Cell Cycle*. 2009 Aug;8(15):2420-4.
184. Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Dec;27(4):715-35.
185. Luan TY, Zhu TN, Cui YJ, Zhang G, Song XJ, Gao DM ve ark. Expression of caveolin-1 is correlated with lung adenocarcinoma proliferation, migration, and invasion. *Med Oncol*. 2015 Jul;32(7):207.
186. Cui Y, Zhu T, Song X, Liu J, Liu S, Zhao R. Downregulation of caveolin-1 increased EGFR-TKIs sensitivity in lung adenocarcinoma cell line with EGFR mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):733-739.
187. Ortiz R, Díaz J, Díaz N, Lobos-Gonzalez L, Cárdenas A, Contreras P ve ark. Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. *Oncotarget*. 2016 Jun 28;7(26):40571-40593.
188. Gerstenberger W, Wrage M, Kettunen E, Pantel K, Anttila S, Steurer S ve ark. Stromal Caveolin-1 and Caveolin-2 Expression in Primary Tumors and Lymph Node Metastases. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2018 Apr 10;2018:8651790.
189. Zhan P, Shen XK, Qian Q, Wang Q, Zhu JP, Zhang Y ve ark. Expression of caveolin-1 is correlated with disease stage and survival in lung adenocarcinomas. *Oncol Rep*. 2012 Apr;27(4):1072-8.
190. Chen HL, Fan LF, Gao J, Ouyang JP, Zhang YX. Differential expression and function of the caveolin-1 gene in non-small cell lung carcinoma. *Oncol Rep*. 2011 Feb;25(2):359-66.
191. Han F, Zhang J, Shao J, Yi X. Caveolin-1 promotes an invasive phenotype and predicts poor prognosis in large cell lung carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2014 Aug;210(8):514-20.
192. PhosphoSitePlus. Erişim 15.08.2019, <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=935&showAllSites=true>.

193. PhosphoSitePlus. Erişim 15.08.2019, <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=3909&showAllSites=true>
194. Low JY, Nicholson HD. Epigenetic modifications of caveolae associated proteins in health and disease. *BMC Genet.* 2015 Jun 26;16:71.
195. UniProt. Erişim 17.08.2019, <https://www.uniprot.org/uniprot/O95810>.
196. Nassar ZD, Moon H, Duong T, Neo L, Hill MM, Francois M ve ark. PTRF/Cavin-1 decreases prostate cancer angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncotarget.* 2013 Oct;4(10):1844-55.
197. Bai L, Deng X, Li Q, Wang M, An W, Deli A ve ark. Down-regulation of the cavin family proteins in breast cancer. *J Cell Biochem.* 2012 Jan;113(1):322-8.
198. Gianazza E, Chinello C, Mainini V, Cazzaniga M, Squeo V, Albo G ve ark. Alterations of the serum peptidome in renal cell carcinoma discriminating benign and malignant kidney tumors. *J Proteomics.* 2012 Dec 5;76 Spec No.:125-40.
199. Rabjerg M, Bjerregaard H, Halekoh U, Jensen BL, Walter S, Marcussen N. Molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma identifies CSNK2A1, SPP1 and DEFB1 as promising novel prognostic markers. *APMIS.* 2016 May;124(5):372-83.
200. Ahmad KA, Wang G, Unger G, Slaton J, Ahmed K. Protein kinase CK2--a key suppressor of apoptosis. *Adv Enzyme Regul.* 2008;48:179-87.
201. Oshima T, Niwa Y, Kuwata K, Srivastava A, Hyoda T, Tsuchiya Y ve ark. Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth. *Sci Adv.* 2019 Jan 23;5(1):eaau9060.
202. Ruzzene M, Penzo D, Pinna LA. Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem J.* 2002 May 15;364(Pt 1):41-7.
203. Anampa J, Haque T, Murakhovskaya I, Wang Y, Bachiashvili K, Papazoglu C ve ark. Macrocytosis and dysplastic anemia is associated with the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in metastatic breast cancer. *Haematologica.* 2018 Mar;103(3):e98-e102.

204. Rocca A, Farolfi A, Bravaccini S, Schirone A, Amadori D. Palbociclib (PD 0332991) : targeting the cell cycle machinery in breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2014 Feb;15(3):407-20.
205. Madeddu C, Gramignano G, Astara G, Demontis R, Sanna E, Atzeni V ve ark. Pathogenesis and Treatment Options of Cancer Related Anemia: Perspective for a Targeted Mechanism-Based Approach. *Front Physiol*. 2018 Sep 20;9:1294.
206. Fosbrink M, Cudrici C, Niculescu F, Badea TC, David S, Shamsuddin A ve ark. Overexpression of RGC-32 in colon cancer and other tumors. *Exp Mol Pathol*. 2005 Apr;78(2):116-22.
207. Vlaicu SI, Cudrici C, Ito T, Fosbrink M, Tegla CA, Rus V ve ark. Role of response gene to complement 32 in diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008 Mar-Apr;56(2):115-22.
208. Vlaicu SI, Tegla CA, Cudrici CD, Danoff J, Madani H, Sugarman A ve ark. Role of C5b-9 complement complex and response gene to complement-32 (RGC-32) in cancer. *Immunol Res*. 2013 May;56(1):109-21.
209. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Nov 15;22(22):4632-42.
210. Bowman RV, Yang IA, Semmler AB, Fong KM. Epigenetics of lung cancer. *Respirology*. 2006 Jul;11(4):355-65.
211. Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):1-7.
212. Chalovich JM, Schroeter MM. Synaptopodin family of natively unfolded, actin binding proteins: physical properties and potential biological functions. *Biophys Rev*. 2010 Dec;2(4):181-189.
213. Kai F, Fawcett JP, Duncan R. Synaptopodin-2 induces assembly of peripheral actin bundles and immature focal adhesions to promote lamellipodia formation and prostate cancer cell migration. *Oncotarget*. 2015 May 10;6(13):11162-74.
214. Xia E, Zhou X, Bhandari A, Zhang X, Wang O. Synaptopodin-2 plays an important role in the metastasis of breast cancer via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Cancer Manag Res*. 2018 Jun 18;10:1575-1583.

HAM VERİLER

Accession	Description	MW [kDa]	Fosfo (S; T; Y)	Sayısı	Exp. value:	q-	# PSMs
A0AVT1-1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6	117.9	1		0		4
A0FGR8-6	Isoform 6 of Extended synaptotagmin-2	104.6	15		0		104
A0JNW5-1	UHRF1-binding protein 1-like	164.1	1		0.006		1
A0MZ66-3	Isoform 3 of Shootin-1	73.6	5		0		14
A1A4G5	Leukemia NUP98 fusion partner 1	21.3	2		0.006		2
A1L390	Pleckstrin homology domain-containing family G member 3	134.3	6		0.003		5
A1X283	SH3 and PX domain-containing protein 2B	101.5	3		0		27
A2RRP1-1	neuroblastoma-amplified sequence	268.4	2		0		21
A3KN83-1	protein strawberry notch homolog 1	154.2	1		0.004		6
A6NC98	Coiled-coil domain-containing protein 88B	164.7	3		0.001		17
A6NDB9	Paralemin-3	71.7	7		0		14
A6NFI3	Zinc finger protein 316	108.4	1		0.005		16
A6NI72	Putative neutrophil cytosol factor 1B	44.8	2		0		26
A6NKF1	SAC3 domain-containing protein 1	43.5	1		0.004		1
A7KAX9	rho GTPase-activating protein 32	230.4	3		0		11
A8CG34-1	Nuclear envelope pore membrane protein POM 121C	125	11		0		45
A8MWX3	Putative WAS protein family homolog 4	51.6	1		0.004		1
B2RUZ4	small integral membrane protein 1	8.7	2		0.004		11
B5ME19	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like protein	105.4	2		0		60
B7ZBB8	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3G	38	2		0.004		13
C9JLW8	Mapk-regulated corepressor-interacting protein 1	10.9	1		0.006		1
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	205.3	5		0.003		50
O00159-1	Unconventional myosin-1c	121.6	2		0		13
O00168	Phospholemmann	10.4	2		0.004		8
O00178	GTP-binding protein 1	72.4	4		0		15
O00192	armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome	104.6	3		0		3
O00193	Small acidic protein	20.3	3		0		25
O00203-1	AP-3 complex subunit beta-1	121.2	2		0.004		9
O00204	Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1	41.3	4		0.004		10
O00255-1	Menin	68	1		0		11
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1	21.7	5		0		536
O00267	Transcription elongation factor Spt5	120.9	1		0		14
O00273-1	DNA fragmentation factor subunit alpha	36.5	3		0.003		9
O00273-2	Isoform DFF35 of DNA fragmentation factor subunit alpha	29.4	2		0.005		2
O00299	chloride intracellular channel protein 1	26.9	1		0		22
O00418	Eukaryotic elongation factor 2 kinase	82.1	3		0.003		3
O00423-3	Isoform 3 of Echinoderm microtubule-associated protein-like 1	91.9	2		0		10
O00429-6	Isoform 6 of Dynamin-1-like protein	83.3	1		0.003		7
O00443	phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha	190.6	1		0.005		6
O00470-2	Isoform 2 of Homeobox protein Meis1	50.5	2		0.003		12
O00479	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 4	9.5	2		0		7
O00499	Myc box-dependent-interacting protein 1	64.7	6		0		216
O00499-9	Isoform BIN1-10-13 of Myc box-dependent-interacting protein 1	45.5	8		0		217
O00501	Claudin-5	23.1	3		0.004		9
O00505	Importin subunit alpha-4	57.8	2		0.003		23
O00515	Ladinin-1	57.1	8		0		33
O00559-2	Isoform 2 of Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells	29.4	1		0		46
O00567	Nucleolar protein 56	66	19		0		307
O00712-5	Isoform 5 of Nuclear factor 1 B-type	55.1	5		0		16
O00750	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit beta	184.7	1		0.007		10
O14497	AT-rich interactive domain-containing protein 1A	241.9	9		0		52
O14545	TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1	64.8	6		0		63
O14558	Heat shock protein beta-6	17.1	2		0		78
O14617-5	Isoform 5 of AP-3 complex subunit delta-1	136.6	5		0		31
O14618	copper chaperone for superoxide dismutase	29	1		0.007		3
O14639-1	Actin-binding LIM protein 1	87.6	18		0		180
O14647	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2	211.2	2		0.004		4
O14662-1	Syntaxin-16	37	1		0.004		2
O14681	Etoposide-induced protein 2.4 homolog	38.9	8		0.003		30
O14683	Tumor protein p53-inducible protein 11	21	2		0.003		94
O14686-3	Isoform 3 of Histone-lysine N-methyltransferase 2D	593.3	1		0.007		8
O14737	Programmed cell death protein 5	14.3	1		0.003		26
O14745	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	38.8	6		0		82
O14786-1	Neuropilin-1	103.1	1		0.004		3
O14791-2	Isoform 2 of Apolipoprotein L1	45.9	3		0		59
O14828	Secretory carrier-associated membrane protein 3	38.3	1		0.005		14
O14874	[3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (lipoamide)] kinase, mitochondrial	46.3	5		0		245
O14879	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	56	3		0.007		3
O14896-1	Interferon regulatory factor 6	53.1	2		0.004		2
O14936-4	Isoform 4 of Peripheral plasma membrane protein CASK	102.1	3		0		48
O14950	Myosin regulatory light chain 12B	19.8	2		0		57
O14967	calmegin	70	2		0.004		2
O14974	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	115.2	12		0		81
O14976	Cyclin-G-associated kinase	143.1	5		0		6
O15013	rho guanine nucleotide exchange factor 10	151.5	3		0.004		13
O15014	zinc finger protein 609	151.1	6		0		19
O15018	PDZ domain-containing protein 2	301.5	5		0		5
O15021	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4	284.2	11		0		14
O15027-5	Isoform 5 of Protein transport protein Sec16A	235.6	14		0		52
O15042	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	118.2	2		0.007		2
O15047	Histone-lysine N-methyltransferase SETD1A	185.9	5		0.003		12
O15056	Synaptojanin-2	165.4	1		0.005		1
O15061-1	Synemin	172.7	10		0		60
O15068	Guanine nucleotide exchange factor DBS	128	4		0		6
O15075-1	serine/threonine-protein kinase DCLK1	82.2	8		0		66
O15085-2	Isoform 2 of Rho guanine nucleotide exchange factor 11	172.1	14		0		37
O15117-3	Isoform 3 of FYN-binding protein 1	91.6	2		0.009		2
O15127	Secretory carrier-associated membrane protein 2	36.6	2		0.008		44
O15143	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	40.9	2		0.003		9
O15155	BET1 homolog	13.3	1		0.005		15
O15164	Transcription intermediary factor 1-alpha	116.8	3		0		9
O15173-2	Isoform 2 of Membrane-associated progesterone receptor component 2	26.2	5		0		198
O15230	Laminin subunit alpha-5	399.5	1		0		6
O15231-3	Isoform 3 of Zinc finger protein 185	73.6	22		0		95
O15234	Protein CASC3	76.2	9		0		121

O15258	Protein RER1	22.9	2	0	12
O15357	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2	138.5	1	0	76
O15400	Syntaxin-7	29.8	4	0	76
O15417-1	Trinucleotide repeat-containing gene 18 protein	314.3	4	0.004	4
O15427	Monocarboxylate transporter 4	49.4	1	0.004	2
O15439-1	multidrug resistance-associated protein 4	149.4	1	0.003	9
O15530-1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	63.1	1	0.003	20
O15550	Lysine-specific demethylase 6A	154.1	2	0.006	2
O15553	Pyrin	86.4	1	0.004	3
O43149	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1	330.9	10	0	30
O43150-1	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	111.6	4	0	27
O43164	E3 ubiquitin-protein ligase Praja-2	78.2	1	0.005	2
O43166-1	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1	199.9	14	0	27
O43182	Rho GTPase-activating protein 6	105.9	1	0.003	3
O43236-4	Isoform 4 of Septin-4	56.6	4	0	11
O43237	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	54.1	5	0.001	7
O43290	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	90.2	3	0	13
O43294-1	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	49.8	15	0	349
O43306	Adenylate cyclase type 6	130.5	1	0.008	14
O43314-1	inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2	140.3	1	0.004	2
O43318	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	67.2	4	0	18
O43353-1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2	61.2	2	0.003	3
O43379-4	Isoform 4 of WD repeat-containing protein 62	166.4	4	0.001	6
O43395	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3	77.5	1	0	18
O43399-7	Isoform 7 of Tumor protein D54	24.8	8	0	129
O43426	Synaptojanin-1	173	4	0.004	6
O43432-3	Isoform 3 of Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	177.2	3	0	24
O43491-1	band 4.1-like protein 2	112.5	26	0	243
O43491-4	Isoform 4 of Band 4.1-like protein 2	95.5	17	0	154
O43493-1	Trans-Golgi network integral membrane protein 2	51.1	13	0	212
O43516-3	Isoform 3 of WAS/WASL-interacting protein family member 1	51.9	1	0.004	19
O43524	Forkhead box protein O3	71.2	1	0.009	1
O43561-3	Isoform 3 of Linker for activation of T-cells family member 1	28.6	2	0.004	6
O43566	Regulator of G-protein signaling 14	61.4	2	0	7
O43572	A-kinase anchor protein 10, mitochondrial	73.8	1	0.009	1
O43586-1	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1	47.6	2	0.004	2
O43598-1	2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1	19.1	1	0.005	5
O43633	charged multivesicular body protein 2a	25.1	1	0.003	2
O43639	Cytoplasmic protein NCK2	42.9	3	0	9
O43665-3	Isoform 3 of Regulator of G-protein signaling 10	21.2	1	0.006	3
O43707	Alpha-actinin-4	104.8	1	0	43
O43719	HIV Tat-specific factor 1	85.8	10	0	68
O43741	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2	30.3	2	0.004	10
O43815	striatin	86.1	1	0	9
O43818	U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2	51.8	3	0	3
O43823	A-kinase anchor protein 8	76.1	3	0	6
O43847-2	Isoform 2 of Nardilysin	139.2	3	0.003	35
O43896	Kinesin-like protein KIF1C	122.9	6	0.004	5
O60231	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX16	119.2	4	0	26
O60237	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12b	110.3	1	0.004	2
O60238	Bcl2/adenovirus e1b 19 kDa protein-interacting protein 3-like	23.9	7	0	87
O60240	Perilipin-1	56	1	0.004	2
O60256-1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	40.9	2	0	17
O60264	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	121.8	1	0	5
O60269	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2	47.4	2	0.006	1
O60271	C-jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	146.1	5	0	154
O60284	suppression of tumorigenicity 18 protein	115.1	1	0.006	2
O60292	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 3	194.5	4	0	13
O60293	Zinc finger C3H1 domain-containing protein	226.2	4	0.003	4
O60303	Protein KIAA0556	180.8	2	0.004	2
O60315-1	zinc finger E-box-binding homeobox 2	136.4	8	0	14
O60333-4	Isoform 4 of Kinesin-like protein KIF1B	205	2	0.005	2
O60341	Lysine-specific histone demethylase 1A	92.8	1	0	10
O60343-1	TBC1 domain family member 4	146.5	5	0	23
O60437	periplakin	204.6	5	0	44
O60486	Plexin-C1	175.6	1	0	38
O60499	Syntaxin-10	28.1	1	0.004	1
O60502	protein O-GlcNAcase	102.8	2	0	6
O60503	Adenylate cyclase type 9	150.6	2	0.004	4
O60504-1	Vinexin	75.3	13	0	142
O60524	nuclear export mediator factor NEMF	122.9	1	0	7
O60565	Gremilin-1	20.7	3	0	16
O60664-1	Perilipin-3	47	1	0	7
O60675	Transcription factor Mafk	17.5	1	0.004	1
O60716-3	Isoform 1AC of Catenin delta-1	104.9	18	0	161
O60749	Sorting nexin-2	58.4	5	0.003	10
O60763-2	Isoform 2 of General vesicular transport factor p115	109.1	2	0	25
O60784-2	Isoform 2 of Target of Myb protein 1	53.8	4	0	64
O60825-1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2	58.4	3	0	20
O60829	P antigen family member 4	11.1	4	0	41
O60832-1	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	57.6	9	0	204
O60841	Eukaryotic translation initiation factor 5B	138.7	11	0	253
O60861-3	Growth arrest-specific protein 7	54.3	3	0	8
O60941-5	Isoform 5 of Dystrobrevin beta	63.7	4	0.004	6
O75022-2	Isoform 2 of Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 3	71	2	0.004	8
O75023-3	Isoform 3 of Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 5	64.2	1	0.003	3
O75044	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2	120.8	3	0.005	5
O75064	DENN domain-containing protein 4B	163.7	2	0.004	1
O75069	Transmembrane and coiled-coil domains protein 2	77.4	1	0.006	10
O75081	Protein CBFA2T3	71.1	3	0.004	3
O75113	NEDD4-binding protein 1	100.3	2	0	13
O75116	Rho-associated protein kinase 2	160.8	1	0	3
O75122	CLIP-associating protein 2	141	8	0	39
O75122-3	Isoform 3 of CLIP-associating protein 2	165.8	7	0	27
O75128-2	Isoform 2 of Protein cordon-bleu	143.8	2	0.003	4
O75151	lysine-specific demethylase phf2	120.7	9	0	48
O75152	Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A	89.1	7	0	26
O75153	Clustered mitochondria protein homolog	146.6	1	0.004	3
O75164-1	Lysine-specific demethylase 4A	120.6	1	0.004	1
O75167-4	Isoform 4 of Phosphatase and actin regulator 2	70.7	4	0.003	7
O75179-1	Ankyrin repeat domain-containing protein 17	274.1	7	0	14
O75182-1	paired amphipathic helix protein sin3b	133	2	0.004	20
O75190-3	Isoform C of DnaJ homolog subfamily B member 6	35.7	3	0.004	2
O75348	V-type proton ATPase subunit G 1	13.7	3	0	5
O75351	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	49.3	2	0	55

075362	zinc finger protein 217	115.2	2	0.005	2
075366-1	Advillin	92	5	0.005	5
075367-1	Core histone macro-H2A.1	39.6	5	0	74
075369-8	Isoform 8 of Filamin-B	281.5	4	0	42
075376-1	Nuclear receptor corepressor 1	270	8	0	14
075379-1	Vesicle-associated membrane protein 4	16.4	1	0.004	13
075382-1	Tripartite motif-containing protein 3	80.8	1	0.004	5
075385	Serine/threonine-protein kinase ULK1	112.6	2	0.005	2
075396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	24.6	3	0	72
075400	pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	108.7	5	0	11
075410-2	Isoform 2 of Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1	89.2	2	0.004	3
075420	GRB10-interacting GYF protein 1	114.5	2	0.003	14
075427	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 4	73.4	6	0.008	6
075439	mitochondrial-processing peptidase subunit beta	54.3	2	0.003	6
075448	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 24	110.2	3	0	13
075460	Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1	109.7	3	0.009	3
075475-1	PC4 and SFRS1-interacting protein	60.1	17	0	251
075494-1	Serine/arginine-rich splicing factor 10	31.3	2	0.004	5
075533-1	splicing factor 3B subunit 1	145.7	2	0	5
075563	src kinase-associated phosphoprotein 2	41.2	2	0.004	5
075569-1	Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A	34.4	3	0	72
075592-1	E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2	509.8	16	0	31
075643-1	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	244.4	1	0	67
075674	TOM1-like protein 1	53	1	0.005	1
075676	Ribosomal protein S6 kinase alpha-4	85.6	5	0.004	32
075683	Surfeit locus protein 6	41.4	1	0.006	1
075691	Small subunit processome component 20 homolog	318.2	1	0.004	3
075717	WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	125.9	2	0.002	3
075781	Paralemmin-1	42.1	4	0.003	2
075791	GRB2-related adapter protein 2	37.9	1	0.003	8
075821	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	35.6	3	0	251
075864-1	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 37	74.7	2	0.004	4
075909	Cyclin-K	64.2	2	0.002	13
075971	snRNA-activating protein complex subunit 5	11.3	2	0.006	10
075995	SAM and SH3 domain-containing protein 3	41.6	3	0.004	95
076021	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	54.9	6	0	163
076024	Wolframin	100.2	5	0.003	11
076041	Nebulette	116.4	1	0.004	22
076070	Gamma-synuclein	13.3	1	0	15
076074	cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase	99.9	2	0.005	9
076094	Signal recognition particle subunit SRP72	74.6	8	0	91
094763-1	Unconventional prefoldin RPB5 interactor 1	59.8	3	0.003	22
094768	Serine/threonine-protein kinase 17B	42.3	1	0.009	1
094769	Extracellular matrix protein 2	79.7	1	0.004	2
094804	Serine/threonine-protein kinase 10	112.1	6	0	39
094806	Serine/threonine-protein kinase D3	100.4	8	0	32
094808	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2	76.9	2	0.004	6
094811	Tubulin polymerization-promoting protein	23.7	3	0	19
094819	Kelch repeat and BTB domain-containing protein 11	65.7	3	0.001	9
094826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	67.4	2	0	51
094827-6	Isoform 6 of Pleckstrin homology domain-containing family G member 5	119.5	2	0.004	3
094842	TOX high mobility group box family member 4	66.2	6	0	8
094875-12	Isoform 12 of Sorbin and SH3 domain-containing protein 2	80.9	28	0	347
094876	Transmembrane and coiled-coil domains protein 1	72	1	0.004	9
094880	PHD finger protein 14	100	3	0.003	6
094885	SAM and SH3 domain-containing protein 1	136.6	8	0	30
094888	UBX domain-containing protein 7	54.8	4	0	35
094913	Pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11	172.9	4	0.003	5
094915-1	protein furry homolog-like	339.4	12	0	14
094921-1	Cyclin-dependent kinase 14	53	2	0.004	6
094923	D-glucuronyl C5-epimerase	70.1	1	0.008	5
094929-1	Actin-binding LIM protein 3	77.8	10	0	58
094956-1	Solute carrier organic anion transporter family member 2B1	76.7	2	0.003	6
094964-2	Isoform 2 of Protein SOGA1	183.7	1	0.006	1
094979-8	Isoform 8 of Protein transport protein Sec31A	134.4	7	0	104
095049-3	Isoform 3 of Tight junction protein ZO-3	103.4	11	0	44
095104	Splicing factor, arginine/serine-rich 15	125.8	4	0	57
095155-4	Isoform 4 of Ubiquitin conjugation factor E4 B	151.5	11	0	27
095171	Sciellin	77.5	9	0	52
095183	vesicle-associated membrane protein 5	12.8	3	0.005	4
095208-2	Isoform 2 of Epsin-2	62.3	7	0	19
095210	Starch-binding domain-containing protein 1	39	2	0.004	10
095218-2	Isoform 2 of Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	36.3	7	0	118
095232-1	Luc7-like protein 3	51.4	3	0.003	8
095251-1	Histone acetyltransferase KAT7	70.6	9	0	24
095292	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	27.2	4	0.004	45
095297-1	Myelin protein zero-like protein 1	29.1	6	0.004	16
095359	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	309.2	13	0	34
095361-1	Tripartite motif-containing protein 16	63.9	5	0.003	7
095365	Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A	61.4	5	0	47
095394-4	Isoform 3 of Phosphoacetylglucosamine mutase	62.9	2	0	32
095400	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	37.6	3	0.004	30
095425-2	Isoform 2 of Supervillin	200.7	17	0	111
095425-4	Isoform SV4 of Supervillin	244.4	20	0	137
095453	poly(A)-specific ribonuclease PARN	73.4	3	0	17
095466-2	Isoform 2 of Formin-like protein 1	122.3	4	0	86
095477	ATP-binding cassette sub-family A member 1	254.1	2	0.003	2
095487-3	Isoform 3 of Protein transport protein Sec24B	140.3	2	0	24
095490-6	Isoform 6 of Adhesion G protein-coupled receptor L2	165	1	0.005	2
095544-2	Isoform 2 of NAD kinase	63.4	3	0	27
095639	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 4	30.2	3	0.004	6
095644-1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1	101.2	1	0.005	1
095674-1	phosphatidate cytidyltransferase 2	51.4	7	0	54
095677-1	Eyes absent homolog 4	69.5	1	0.009	2
095684	FGFR1 oncogene partner	43	3	0	29
095685	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3D	32.5	3	0.003	5
095696-2	Isoform 2 of Bromodomain-containing protein 1	133.2	1	0.006	1
095785	Protein Wiz	178.6	2	0.003	6
095810	caveolae-associated protein 2	47.1	21	0	894
095817	BAG family molecular chaperone regulator 3	61.6	7	0	114
095819-3	Isoform 3 of Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	150.9	3	0	7
095831-1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	66.9	1	0.003	3
095835	Serine/threonine-protein kinase LAT51	126.8	2	0.003	4
095999	B-cell lymphoma/leukemia 10	26.2	3	0	19
096013-1	serine/threonine-protein kinase PAK 4	64	4	0	19

O96019-1	Actin-like protein 6A	47.4	1	0.004	4
P00519-2	Isoform IB of Tyrosine-protein kinase ABL1	124.9	2	0.003	3
P00533-1	epidermal growth factor receptor	134.2	3	0.003	5
P00558	phosphoglycerate kinase 1	44.6	1	0	71
P00915	carbonic anhydrase 1	28.9	1	0	58
P01008	Antithrombin-III	52.6	2	0	570
P01009-1	alpha-1-antitrypsin	46.7	3	0	156
P01024	Complement C3	187	1	0	163
P01042	kininogen-1	71.9	6	0	194
P01834	immunoglobulin kappa constant	11.8	2	0	523
P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain	40.4	6	0	114
P02042	Hemoglobin subunit delta	16	4	0	289
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	138.9	6	0	18
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	60	1	0.002	13
P02545	Prelamin-A/C	74.1	38	0	563
P02549-1	spectrin alpha chain, erythrocytic 1	279.8	1	0	14
P02649	Apolipoprotein E	36.1	2	0	139
P02652	Apolipoprotein A-II	11.2	2	0	20
P02656	Apolipoprotein C-III	10.8	1	0.002	29
P02671-1	Fibrinogen alpha chain	94.9	14	0	242
P02686-1	myelin basic protein	33.1	9	0	52
P02724	Glycophorin-A	16.3	8	0	267
P02730	Band 3 anion transport protein	101.7	9	0	138
P02751	fibronectin	262.5	1	0	112
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	39.3	6	0	161
P02768-1	Serum albumin	69.3	1	0	603
P02794	Ferritin heavy chain	21.2	5	0	129
P04040	catalase	59.7	2	0	14
P04049-2	Isoform 2 of RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	75.3	10	0	99
P04075-2	Isoform 2 of Fructose-bisphosphate aldolase A	45.2	10	0	126
P04083	annexin A1	38.7	2	0	100
P04114	apolipoprotein B-100	515.3	1	0	55
P04233-1	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	33.5	3	0	14
P04406-1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36	3	0	63
P04626-1	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2	137.8	1	0.003	3
P04792	Heat shock protein beta-1	22.8	6	0	232
P04920-1	Anion exchange protein 2	136.9	5	0	8
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	112.8	1	0	57
P05114	Non-histone chromosomal protein HMG-14	10.7	6	0	94
P05186-1	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	57.3	2	0.004	2
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	11.7	7	0	237
P05388	60S acidic ribosomal protein P0	34.3	2	0	47
P05412	transcription factor AP-1	35.7	3	0.003	24
P05455	Lupus La protein	46.8	3	0	44
P05534	HLA class I histocompatibility antigen, A-24 alpha chain	40.7	9	0	187
P05771-2	Isoform Beta-II of Protein kinase C beta type	77	1	0.004	18
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	48	4	0	117
P05787-2	Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 8	56.6	8	0	161
P06241-1	Tyrosine-protein kinase Fyn	60.7	3	0	22
P06493	Cyclin-dependent kinase 1	34.1	2	0	15
P06702	Protein S100-A9	13.2	1	0	116
P06703	protein S100-A6	10.2	2	0	24
P06733-1	alpha-enolase	47.1	3	0	224
P06748	Nucleophosmin	32.6	6	0	107
P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	32.9	1	0	102
P07197	Neurofilament medium polypeptide	102.4	6	0.004	16
P07355-2	Isoform 2 of Annexin A2	40.4	10	0	224
P07359	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	17.5	2	0	16
P07814	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	70.5	9	0	93
P07900-2	Isoform 2 of Heat shock protein HSP 90-alpha	98.1	3	0	482
P07910-1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	33.7	9	0	137
P07948-2	Isoform 2 of Tyrosine-protein kinase Lyn	56	4	0	48
P07951-2	Isoform 2 of Tropomyosin beta chain	33	1	0	129
P08047	Transcription factor Sp1	80.6	10	0.003	18
P08138	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	45.2	2	0.004	2
P08235-3	Isoform 3 of Mineralocorticoid receptor	107.5	3	0.004	3
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	83.2	3	0	618
P08240-1	signal recognition particle receptor subunit alpha	69.8	5	0	60
P08559-4	Isoform 4 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	47.5	3	0	16
P08567	pleckstrin	40.1	2	0	17
P08575-1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	147.2	12	0	73
P08621-1	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	51.5	3	0	12
P08648	Integrin alpha-5	114.5	5	0.004	30
P08651	Nuclear factor 1 C-type	55.6	4	0	14
P08670	Vimentin	53.6	21	0	1618
P08708	40S ribosomal protein S17	15.5	2	0	7
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19	44.1	5	0	45
P08729	Keratin, type II cytoskeletal 7	51.4	1	0	72
P08758	annexin A5	35.9	1	0	65
P08833	Insulin-like growth factor-binding protein 1	27.9	1	0.009	4
P08913	Alpha-2A adrenergic receptor	48.9	2	0.004	5
P09104	Gamma-enolase	47.2	2	0	31
P09496-1	clathrin light chain A	27.1	1	0.004	37
P09651-1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	38.7	2	0	382
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	113	2	0	11
P0C126	TCF3 fusion partner	28.3	1	0.005	7
P0DJ93	small integral membrane protein 13	10.3	5	0	20
P0DOX7	immunoglobulin kappa light chain	23.4	2	0	520
P10109	Adrenodoxin, mitochondrial	19.4	3	0.004	16
P10314	HLA class I histocompatibility antigen, A-32 alpha chain	41	5	0	77
P10398-1	serine/threonine-protein kinase A-Raf	67.5	10	0.004	42
P10451-1	Osteopontin	35.4	22	0	103
P10588	Nuclear receptor subfamily 2 group F member 6	43	2	0.004	1
P10636-9	Isoform Tau-G of Microtubule-associated protein tau	80.9	2	0.006	14
P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	43	4	0	238
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	61	1	0	88
P10909-2	Isoform 2 of Clusterin	57.8	4	0	21
P11137	microtubule-associated protein 2	199.4	13	0	59
P11166	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	54	1	0	7
P11171-1	protein 4.1	97	8	0	42
P11274-1	Breakpoint cluster region protein	142.7	2	0.004	2
P11277	Spectrin beta chain, erythrocytic	246.3	5	0	86
P11308-3	Transcriptional regulator ERG	54.6	1	0.004	4
P11387	DNA topoisomerase 1	90.7	1	0	6
P11388-4	Isoform 4 of DNA topoisomerase 2-alpha	182.6	11	0	35

P11532-1	Dystrophin	426.5	2	0.003	17
P11686	Pulmonary surfactant-associated protein C	21	1	0.005	3
P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	274.2	6	0	76
P11831	Serum response factor	51.6	4	0.004	12
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	343.5	2	0	247
P12111-4	Isoform 4 of Collagen alpha-3(VI) chain	278	1	0	249
P12270	Nucleoprotein TPR	267.1	12	0	54
P12429	annexin A3	36.4	2	0	21
P12694-2	Isoform 2 of 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	50.8	3	0.004	30
P12814-3	Isoform 3 of Alpha-actinin-1	105.5	1	0	45
P12931-2	Isoform 2 of Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	60.6	3	0	19
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	69.8	3	0	23
P13051	uracil-DNA glycosylase	34.6	1	0.004	1
P13224-2	Isoform 2 of Platelet glycoprotein Ib beta chain	43.1	2	0.002	32
P13498	Cytochrome b-245 light chain	21	2	0	17
P13611	Versican core protein	372.6	5	0	239
P13647	keratin, type II cytoskeletal 5	62.3	5	0.004	24
P13716-2	Isoform 2 of Delta-aminolevulinic acid dehydratase	39	2	0.004	12
P13746-2	Isoform 2 of HLA class I histocompatibility antigen, A-11 alpha chain	41.4	8	0	130
P13796	Plastin-2	70.2	3	0	282
P13797	Plastin-3	70.8	1	0.006	2
P13798	Acylamino-acid-releasing enzyme	81.2	2	0.004	6
P13807	glycogen [starch] synthase, muscle	83.7	12	0	22
P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	45.5	6	0	279
P14317	Hematopoietic lineage cell-specific protein	54	1	0	27
P14618	Pyruvate kinase PKM	57.9	1	0	80
P14672	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4	54.8	2	0.003	7
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	64.1	1	0.004	8
P14923	Junction plakoglobin	81.7	2	0	9
P15056	serine/threonine-protein kinase B-raf	84.4	7	0	86
P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1	43.9	2	0.004	4
P15311	Ezrin	69.4	1	0	13
P15336-1	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2	54.5	7	0.002	9
P15408-1	Fos-related antigen 2	35.2	11	0	29
P15531-2	Isoform 2 of Nucleoside diphosphate kinase A	19.6	1	0	4
P15884-3	Isoform SEF2-1D of Transcription factor 4	71.8	7	0	17
P15924-1	Desmoplakin	331.6	17	0	228
P16070	CD44 antigen	81.5	9	0	84
P16150	Leukosialin	40.3	5	0.004	14
P16157-14	Isoform Er13 of Ankyrin-1	217.3	13	0	128
P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule	82.5	5	0	14
P16333-1	Cytoplasmic protein NCK1	42.8	3	0	23
P16383-1	GC-rich sequence DNA-binding factor 2	89.3	5	0	15
P16402	Histone H1.3	22.3	2	0	183
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	114.7	1	0	28
P16949-1	Stathmin	17.3	7	0	152
P16989-1	Y-box-binding protein 3	40.1	3	0	14
P17026	zinc finger protein 22	25.9	1	0.003	29
P17029	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 1	63.6	4	0.003	5
P17096-1	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	11.7	10	0	563
P17096-2	Isoform HMG-Y of High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	10.7	6	0	423
P17275	transcription factor jun-B	35.9	3	0	27
P17302	Gap junction alpha-1 protein	43	5	0.004	4
P17480-1	Nucleolar transcription factor 1	89.4	1	0.004	3
P17544	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-7	52.9	2	0.006	4
P17661	desmin	53.5	6	0	236
P17676	CCAAT/enhancer-binding protein beta	36.1	12	0	53
P17812	CTP synthase 1	66.6	7	0	209
P17936-2	Isoform 2 of Insulin-like growth factor-binding protein 3	32.2	1	0.004	1
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	60.3	1	0	17
P18206-2	Isoform 1 of Vinculin	116.6	14	0	240
P18583-9	Isoform I of Protein SON	267.9	15	0	69
P18615-3	Isoform 2 of Negative elongation factor E	43.9	3	0	33
P18669	Phosphoglycerate mutase 1	28.8	1	0.003	3
P18754-2	Isoform 2 of Regulator of chromosome condensation	48.1	1	0	41
P18858	DNA ligase 1	101.7	7	0	8
P18887	DNA repair protein XRCC1	69.4	8	0	65
P19174-2	Isoform 2 of 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-1	148.6	1	0.005	2
P19338	Nucleolin	76.6	18	0	175
P19532	Transcription factor E3	61.5	2	0.004	4
P19634-1	Sodium/hydrogen exchanger 1	90.7	10	0	54
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	106.4	2	0	34
P19838-2	Isoform 2 of Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	105.4	5	0.002	12
P19878	Neutrophil cytosol factor 2	59.7	4	0.003	25
P20020	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	138.7	6	0	26
P20700	Lamin-B1	66.4	6	0	31
P20810-5	Isoform 5 of Calpastatin	81.1	12	0	117
P20810-6	Isoform 6 of Calpastatin	84.9	10	0	125
P20823-7	Isoform 7 of Hepatocyte nuclear factor 1-alpha	70.6	2	0.004	3
P21127-1	Cyclin-dependent kinase 11B	92.7	4	0	44
P21291	Cysteine and glycine-rich protein 1	20.6	4	0	44
P21333-2	Isoform 2 of Filamin-A	279.8	40	0	548
P21359-1	Neurofibromin	319.2	6	0	17
P21730	C5a anaphylatoxin chemotactic receptor 1	39.3	2	0.004	5
P21731	Thromboxane A2 receptor	37.4	2	0.004	9
P21757	Macrophage scavenger receptor types I and II	49.7	2	0.001	79
P21796	voltage-dependent anion-selective channel protein 1	30.8	1	0	20
P22059	Oxysterol-binding protein 1	89.4	10	0	152
P22105-4	Isoform 5 of Tenascin-X	458.2	3	0	45
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	117.8	6	0	21
P22392-2	Isoform 3 of Nucleoside diphosphate kinase B	30.1	4	0	4
P22626	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	37.4	2	0	31
P22670	MHC class II regulatory factor RFX1	104.7	8	0.004	10
P22694-2	Isoform 2 of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	46.2	3	0.004	6
P23193	Transcription elongation factor A protein 1	33.9	3	0	142
P23284	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	23.7	2	0	57
P23327	Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein	80.2	3	0	6
P23396-1	40S ribosomal protein S3	26.7	3	0	83
P23467-3	Isoform 3 of Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta	249	1	0.006	3
P23470	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	161.9	1	0.005	6
P23497	Nuclear autoantigen Sp-100	100.4	5	0	10
P23528	Cofilin-1	18.5	1	0	20
P23588	eukaryotic translation initiation factor 4B	69.1	12	0	41
P24534	Elongation factor 1-beta	24.7	1	0	51
P24821	Tenascin	240.7	2	0	23

P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	217	85	0	44
P25054-1	Adenomatous polyposis coli protein	311.5	1	0.006	2
P25098	Beta-adrenergic receptor kinase 1	79.5	1	0.003	15
P25205-2	Isoform 2 of DNA replication licensing factor MCM3	95.8	6	0	31
P25325-2	Isoform 2 of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	35.2	2	0	9
P25440-2	Isoform 2 of Bromodomain-containing protein 2	92	2	0.004	7
P25445-1	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6	37.7	4	0.002	22
P25490	Transcriptional repressor protein YY1	44.7	1	0.006	2
P25788-1	Proteasome subunit alpha type-3	28.4	2	0	153
P25815	Protein S100-P	10.4	2	0	12
P25940	Collagen alpha-3(V) chain	172	2	0.006	2
P26006	Integrin alpha-3	116.5	1	0.008	4
P26038	Moesin	67.8	2	0	46
P26358-1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	183.1	3	0	14
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	53.5	1	0	58
P26599-3	Isoform 3 of Polypyrimidine tract-binding protein 1	59.6	3	0.003	37
P26651	mRNA decay activator protein ZFP36	34	6	0	24
P26678	Cardiac phospholamban	6.1	2	0	54
P27105	erythrocyte band 7 integral membrane protein	31.7	3	0	28
P27348	14-3-3 protein theta	27.7	4	0	34
P27448-5	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	84.4	4	0	5
P27707	deoxycytidine kinase	30.5	1	0.004	3
P27708	CAD protein	242.8	1	0	24
P27816-1	Microtubule-associated protein 4	120.9	91	0	853
P27824-2	Isoform 2 of Calnexin	71.5	4	0	566
P28290	Sperm-specific antigen 2	138.3	8	0	64
P28715-1	DNA repair protein complementing XP-G cells	133	4	0	45
P29323	Ephrin type-B receptor 2	117.4	2	0.005	2
P29350-3	Isoform 2 of Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	67.7	7	0	21
P29353-6	Isoform 6 of SHC-transforming protein 1	62.9	2	0.003	3
P29375-1	Lysine-specific demethylase 5A	192	4	0.004	7
P29401-2	Isoform 2 of Transketolase	68.8	1	0	5
P29474	Nitric oxide synthase, endothelial	133.2	4	0	11
P29536-1	Leiomodin-1	67	16	0	210
P29590	Protein PML	97.5	16	0	237
P29590-13	Isoform PML-13 of Protein PML	85.7	13	0	201
P29590-2	Isoform PML-5 of Protein PML	67.4	14	0	236
P29692-2	Isoform 2 of Elongation factor 1-delta	71.4	7	0	54
P29692-3	Isoform 3 of Elongation factor 1-delta	28.5	7	0	56
P29728	2'-5'-oligoadenylate synthase 2	82.4	2	0.008	2
P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	31.5	18	0	231
P29972-1	aquaporin-1	28.5	1	0.006	2
P30041	Peroxiredoxin-6	25	1	0	47
P30043	flavin reductase (NADPH)	22.1	1	0	17
P30086	phosphatidylethanolamine-binding protein 1	21	3	0	53
P30273	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	9.7	7	0	43
P30414	NK-tumor recognition protein	165.6	2	0.003	4
P30419	glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	56.8	1	0.005	3
P30505	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-8 alpha chain	40.7	7	0	77
P30622-3	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	162.1	8	0	63
P30989	Neurotensin receptor type 1	46.2	2	0.004	1
P31321	cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit	43	2	0.008	1
P31323	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	46.3	1	0.003	7
P31327-3	Isoform 3 of Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	165.5	1	0	4
P31350-2	Isoform 2 of Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	51.1	1	0.007	2
P31689-1	DnaI homolog subfamily A member 1	44.8	1	0.006	1
P31749	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	55.7	4	0	89
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49.2	4	0	102
P32246	C-C chemokine receptor type 1	41.1	7	0.003	24
P32249	G-protein coupled receptor 183	41.2	1	0.006	2
P32519-1	ETS-related transcription factor Elf-1	67.5	5	0	26
P33241-3	Isoform 3 of Lymphocyte-specific protein 1	50.4	13	0	956
P33527-9	Isoform 9 of Multidrug resistance-associated protein 1	172.5	5	0	10
P34910-2	Isoform 2 of Protein EVI2B	50.6	4	0.004	6
P35221-2	Isoform 2 of Catenin alpha-1	102.6	7	0	196
P35222	Catenin beta-1	85.4	5	0	131
P35241-5	Isoform 5 of Radixin	71	1	0	18
P35251-1	Replication factor C subunit 1	128.2	4	0	17
P35269	General transcription factor iif subunit 1	58.2	11	0	13
P35555	Fibrillin-1	312	2	0	12
P35579-1	Myosin-9	226.4	6	0	1154
P35580-3	Isoform 3 of Myosin-10	231.2	10	0	531
P35606	Coatamer subunit beta'	102.4	4	0	248
P35611-3	Isoform 3 of Alpha-adducin	84.3	13	0	305
P35612-1	Beta-adducin	80.8	11	0	49
P35658-5	Isoform 5 of Nuclear pore complex protein Nup214	215.3	6	0	47
P35659-1	Protein DEK	42.6	11	0	73
P35749	Myosin-11	227.2	8	0	447
P36382	Gap junction alpha-5 protein	40.4	2	0.006	2
P36507	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	44.4	2	0	15
P36578	60S ribosomal protein L4	47.7	1	0.004	3
P36871-2	Isoform 2 of Phosphoglucosyltransferase-1	63.8	2	0	37
P36915-1	Guanine nucleotide-binding protein-like 1	68.6	4	0	44
P37023	Serine/threonine-protein kinase receptor R3	56.1	3	0.005	16
P37173-2	Isoform 2 of TGF-beta receptor type-2	67.4	2	0.004	7
P37802-2	Isoform 2 of Transgelin-2	24.4	2	0	89
P38159-1	RNA-binding motif protein, X chromosome	42.3	4	0	26
P39687	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	28.6	2	0	99
P40121	Macrophage-capping protein	38.5	3	0	10
P40123	Adenylyl cyclase-associated protein 2	52.8	3	0.002	7
P40189-1	Interleukin-6 receptor subunit beta	103.5	3	0.004	7
P40222	alpha-taxilin	61.9	2	0	37
P40306	Proteasome subunit beta type-10	28.9	2	0.008	7
P40818	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	127.4	4	0	41
P40855-1	Peroxisomal biogenesis factor 19	32.8	6	0	10
P41162	ETS translocation variant 3	57	1	0.006	1
P41208	centrin-2	19.7	1	0	7
P41212	Transcription factor ETV6	53	9	0.003	15
P41227-1	N-alpha-acetyltransferase 10	26.4	6	0	10
P41236	Protein phosphatase inhibitor 2	23	3	0	103
P41252	isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	144.4	2	0	8
P42166	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	75.4	17	0	284
P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	50.6	17	0	323
P42224-1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	87.3	4	0	13
P42229	Signal transducer and activator of transcription 5A	90.6	1	0.005	3

P42331-4	Isoform 4 of Rho GTPase-activating protein 25	73.5	4	0	12
P42356	phosphatidylinositol 4-kinase alpha	236.7	5	0	12
P42566-1	epidermal growth factor receptor substrate 15	98.6	6	0	48
P42677	40S ribosomal protein S27	9.5	1	0	13
P42694	Probable helicase with zinc finger domain	218.8	3	0.004	2
P42696	RNA-binding protein 34	48.5	1	0	21
P42768	Wiskott-Aldrich syndrome protein	52.9	1	0.004	1
P42858	huntingtin	347.4	7	0	37
P43121	Cell surface glycoprotein MUC18	71.6	1	0.006	4
P43243	Matrin-3	94.6	5	0	186
P45880-1	Isoform 1 of Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	33.4	1	0	10
P45973	chromobox protein homolog 5	22.2	5	0.004	14
P45974-1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	95.7	3	0.004	15
P45985-2	Isoform 2 of Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4	45.6	1	0.006	3
P46013	Proliferation marker protein Ki-67	358.5	7	0	10
P46019	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, liver isoform	138.3	1	0.004	12
P46060	Ran GTPase-activating protein 1	63.5	2	0.004	2
P46087-4	Isoform 4 of Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	92.8	11	0	16
P46100	transcriptional regulator ATRX	282.4	11	0	39
P46108-2	Isoform Crk-I of Adapter molecule crk	22.9	5	0	76
P46109	Crk-like protein	33.8	3	0.004	11
P46379-3	Isoform 3 of Large proline-rich protein BAG6	122.3	7	0	32
P46527	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	22.1	5	0	12
P46821	microtubule-associated protein 1B	270.5	60	0	499
P46934	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	149	1	0.009	3
P46937-9	Isoform 9 of Transcriptional coactivator YAP1	54.9	16	0	245
P46939-2	Isoform 2 of Utrrophin	394.7	11	0	47
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	189.1	4	0	57
P47712	Cytosolic phospholipase A2	85.2	7	0	30
P47736-4	Isoform 4 of Rap1 GTPase-activating protein 1	80.6	1	0.006	1
P48382	DNA-binding protein RFX5	65.3	2	0.004	4
P48553	Trafficking protein particle complex subunit 10	142.1	4	0	7
P48634-1	Protein PRRC2A	228.7	23	0	59
P48651	phosphatidylserine synthase 1	55.5	1	0.009	2
P48681	Nestin	177.3	22	0	200
P49006	MARCKS-related protein	19.5	19	0	159
P49019	Hydroxycarboxylic acid receptor 3	44.4	3	0.006	3
P49023	Paxillin	64.5	17	0	338
P49116-2	Isoform 2 of Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	67.3	2	0	23
P49321-3	Isoform 3 of Nuclear autoantigenic sperm protein	86.2	3	0	11
P49327	Fatty acid synthase	273.3	2	0	4
P49407-1	Beta-arrestin-1	47	2	0	56
P49450-1	Histone H3-like centromeric protein A	16	2	0	73
P49585	choline-phosphate cytidyltransferase A	41.7	9	0	70
P49590	probable histidine--tRNA ligase, mitochondrial	56.9	1	0.003	8
P49736	DNA replication licensing factor mcm2	101.8	8	0	87
P49756-1	RNA-binding protein 25	100.1	2	0	82
P49757	Protein numb homolog	70.8	7	0	16
P49768-1	Presenilin-1	52.6	2	0.002	5
P49790-3	Isoform 3 of Nuclear pore complex protein Nup153	157.2	6	0	25
P49792	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	358	25	0	85
P49815	Tuberin	200.5	12	0	134
P49841-2	Isoform 2 of Glycogen synthase kinase-3 beta	48	4	0	38
P49848-3	Isoform 3 of Transcription initiation factor TFIID subunit 6	76.9	2	0.004	4
P49908	Selenoprotein P	43.2	1	0.005	2
P49915	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	76.7	3	0.003	5
P49916-1	DNA ligase 3	112.8	3	0.006	6
P49959-3	Isoform 3 of Double-strand break repair protein MRE11	81	1	0.004	1
P50222	Homeobox protein MOX-2	33.6	1	0.006	2
P50395-1	Rab GDP dissociation inhibitor beta	50.6	1	0	5
P50402	Emerin	29	2	0.005	3
P50479-1	PDZ and LIM domain protein 4	35.4	4	0	37
P50502	Hsc70-interacting protein	41.3	3	0	10
P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	39.8	7	0	98
P50570-1	Dynamin-2	98	6	0.004	10
P50613	Cyclin-dependent kinase 7	39	2	0.007	8
P50851-1	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	318.9	7	0.003	8
P50895	Basal cell adhesion molecule	67.4	4	0	98
P50914	60S ribosomal protein L14	23.4	1	0.002	30
P51003	Poly(A) polymerase alpha	82.8	5	0.007	5
P51523	Zinc finger protein 84	85.4	1	0.005	1
P51531	Probable global transcription activator SNF2L2	181.2	7	0	53
P51532-1	Transcription activator BRG1	184.5	6	0	20
P51580	Thiopurine S-methyltransferase	28.2	1	0.004	2
P51608-2	Isoform B of Methyl-CpG-binding protein 2	53.3	2	0	42
P51610-1	Host cell factor 1	208.6	6	0	15
P51636-2	Isoform Beta of Caveolin-2	16.8	4	0	44
P51659-2	Isoform 2 of Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	83	3	0	11
P51812	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	83.7	5	0	63
P51813	cytoplasmic tyrosine-protein kinase BMX	78	1	0.002	3
P51825-2	Isoform 2 of AF4/FMR2 family member 1	132.3	2	0.009	1
P51858-3	Isoform 3 of Hepatoma-derived growth factor	28.2	4	0	788
P51991-1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	39.6	2	0	11
P52292	Importin subunit alpha-1	57.8	4	0.004	4
P52594-4	Isoform 4 of Arf-GAP domain and FG repeat-containing protein 1	60.7	7	0	27
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	45.6	1	0.004	6
P52701	DNA mismatch repair protein MSH6	152.7	4	0.004	10
P52735-3	Isoform 3 of Guanine nucleotide exchange factor VAV2	97	3	0.004	16
P52756	RNA-binding protein 5	92.1	1	0.003	8
P52895	Aldo-keto reductase family 1 member C2	36.7	1	0.002	4
P52926-1	high mobility group protein HMGI-C	11.8	5	0	93
P52943-2	Isoform 2 of Cysteine-rich protein 2	30.2	3	0.002	33
P52948-1	nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	197.5	5	0	50
P53396-1	ATP-citrate synthase	120.8	5	0	125
P53602	Diphosphomevalonate decarboxylase	43.4	1	0.003	5
P53621-2	Isoform 2 of Coatomer subunit alpha	139.2	2	0	29
P53671-3	Isoform 3 of LIM domain kinase 2	77.8	1	0.004	1
P53814-6	Isoform B3 of Smoothelin	101.7	10	0	43
P53985	Monocarboxylate transporter 1	53.9	4	0	90
P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	14.4	9	0	78
P54105	Methylosome subunit piCln	26.2	1	0	16
P54252	Ataxin-3	41.8	1	0	3
P54253	Ataxin-1	86.9	2	0.007	2
P54259	Atrophin-1	125.3	10	0	29
P54578	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	56	1	0	32

P54725-1	UV excision repair protein RAD23 homolog A	39.6	6	0	151
P54727	UV excision repair protein RAD23 homolog B	43.1	4	0	120
P55008-1	Allograft inflammatory factor 1	16.7	3	0.004	15
P55010	Eukaryotic translation initiation factor 5	49.2	2	0	17
P55011	Solute carrier family 12 member 2	131.4	3	0.003	3
P55042	GTP-binding protein RAD	33.2	1	0	10
P55081	microfibrillar-associated protein 1	51.9	2	0	6
P55087	Aquaporin-4	34.8	4	0	27
P55196-5	Isoform 5 of Afadin	207.7	13	0	112
P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1	45.3	1	0.004	1
P55265-4	Isoform 4 of Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	140.7	3	0	8
P55285-1	Cadherin-6	88.3	2	0.003	7
P55317	Hepatocyte nuclear factor 3-alpha	49.1	1	0.004	1
P55327	Tumor protein D52	24.3	9	0	135
P55884-2	Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	99	8	0	61
P56181-2	Isoform 2 of NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	51	10	0	15
P56192	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	101.1	3	0.003	23
P56524	Histone deacetylase 4	119	6	0	41
P56693	Transcription factor SOX-10	49.9	3	0.003	3
P56747	Claudin-6	23.3	1	0.006	4
P56749	claudin-12	27.1	2	0.004	10
P56856-1	Claudin-18	27.8	9	0	31
P57060	RWD domain-containing protein 2B	36.3	4	0.003	4
P57682	Krueppel-like factor 3	38.8	5	0.004	17
P57737-3	Isoform 3 of Coronin-7	114.1	1	0.009	1
P57740	Nuclear pore complex protein Nup107	106.3	2	0	6
P57764	Gasdermin-D	52.8	2	0.004	9
P58107	epiplakin	555.3	78	0	82
P58340-3	Isoform 3 of Myeloid leukemia factor 1	33.9	1	0.005	4
P58546	Myotrophin	12.9	1	0	7
P60174	Triosephosphate isomerase	30.8	3	0	214
P60660	Myosin light polypeptide 6	16.9	1	0	23
P60709	Actin, cytoplasmic 1	41.7	4	0	1038
P61006	Ras-related protein Rab-8A	23.7	1	0.004	12
P61247	40S ribosomal protein S3a	29.9	1	0	4
P61764-2	Isoform 2 of Syntaxin-binding protein 1	68.7	2	0.003	5
P61968	LIM domain transcription factor LMO4	18	2	0.004	1
P61978-2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	51	11	0	104
P62070-4	Isoform 4 of Ras-related protein R-Ras2	24.2	1	0	13
P62241	40S ribosomal protein S8	24.2	2	0.004	2
P62328	Thymosin beta-4	5.1	2	0	107
P62736	Actin, aortic smooth muscle	42	4	0	624
P62750	60S ribosomal protein L23a	17.7	2	0	13
P62753	40S RIBOSOMAL PROTEIN S6	28.7	8	0	41
P62805	histone H4	11.4	1	0	306
P62995	transformer-2 protein homolog beta	33.6	5	0	50
P63027	Vesicle-associated membrane protein 2	12.7	1	0	13
P63104-1	14-3-3 protein zeta/delta	27.7	3	0	94
P63208	s-phase kinase-associated protein 1	18.6	1	0	14
P63313	thymosin beta-10	5	3	0	9
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	35.9	8	0	99
P68363	Tubulin alpha-1B chain	50.1	4	0	108
P68431	Histone H3.1	15.4	1	0	41
P68871	Hemoglobin subunit beta	16	3	0	728
P69905	Hemoglobin subunit alpha	15.2	5	0	328
P78316	Nucleolar protein 14	97.6	2	0.005	1
P78324-2	Isoform 2 of Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	55.4	5	0.008	8
P78344-1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	102.3	1	0.004	9
P78346-2	Isoform 2 of Ribonuclease P protein subunit p30	35.5	1	0.004	2
P78347	General transcription factor II-I	112.3	8	0	49
P78362-2	Isoform 2 of SRSF protein kinase 2	79	5	0.003	18
P78524-1	Suppression of tumorigenicity 5 protein	126.4	4	0	5
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	468.8	2	0	6
P78536-1	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17	93	2	0.004	7
P78559-2	Isoform 2 of Microtubule-associated protein 1A	305.5	28	0	125
P78563-5	Isoform 5 of Double-stranded RNA-specific editase 1	86.6	2	0.004	2
P80723	Brain acid soluble protein 1	22.7	12	0	59
P82094-2	Isoform 2 of TATA element modulatory factor	123.1	9	0	24
P83916	Chromobox protein homolog 1	21.4	2	0	12
P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3	19.3	1	0.004	2
P84157-2	Isoform 2 of Matrix-remodeling-associated protein 7	17.5	4	0	15
P85037-1	Forkhead box protein K1	75.4	15	0	160
P98164	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	521.6	2	0.005	1
P98171-2	Isoform 2 of Rho GTPase-activating protein 4	109.3	2	0.003	2
P98175-1	RNA-binding protein 10	103.5	4	0	19
Q00341-1	Vigilin	141.4	5	0	21
Q00537	cyclin-dependent kinase 17	59.5	3	0.004	9
Q00577	Transcriptional activator protein Pur-alpha	34.9	3	0	24
Q00587-1	Cdc42 effector protein 1	40.3	3	0	33
Q00610-1	Clathrin heavy chain 1	191.5	4	0	24
Q00613	heat shock factor protein 1	57.2	10	0	72
Q00722	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-2	133.9	2	0	45
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	90.5	6	0	77
Q01082-1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	274.4	23	0	712
Q01105	Protein SET	33.5	2	0	83
Q01118	Sodium channel protein type 7 subunit alpha	193.4	10	0	45
Q01130	serine/arginine-rich splicing factor 2	25.5	12	0	132
Q01167	Forkhead box protein K2	69	2	0.003	9
Q01432-4	Isoform 2 of AMP deaminase 3	89.7	2	0.004	12
Q01433-1	AMP deaminase 2	100.6	7	0	32
Q01484	Ankyrin-2	433.4	16	0	42
Q01518-1	adenylyl cyclase-associated protein 1	51.9	3	0	357
Q01650	large neutral amino acids transporter small subunit 1	55	2	0.004	2
Q01804-1	OTU domain-containing protein 4	124	2	0.002	6
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	85.5	1	0.004	5
Q01831	DNA repair protein complementing XP-C cells	105.9	3	0	47
Q01850	Cerebellar degeneration-related protein 2	51.8	4	0.004	37
Q01995	transgelin	22.6	2	0	57
Q02040-1	A-kinase anchor protein 17A	80.7	1	0.008	16
Q02241-2	Isoform 2 of Kinesin-like protein KIF23	98	3	0.003	19
Q02447-1	transcription factor Sp3	81.9	1	0.004	1
Q02790	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	51.8	5	0	18
Q02818	Nucleobindin-1	53.8	3	0	23
Q02880	DNA topoisomerase 2-beta	183.2	8	0	114
Q02952-1	A-kinase anchor protein 12	191.4	31	0	512

Q03001-7	dystonin	860.1	3	0.002	6
Q03112-3	Isoform 2 of MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1	139.2	2	0.004	7
Q03135	Caveolin-1	20.5	2	0	129
Q03164-3	Isoform 3 of Histone-lysine N-methyltransferase 2A	431.8	21	0	62
Q03188	centromere protein C	106.8	3	0.003	5
Q03252	Lamin-B2	69.9	10	0	87
Q04323-2	Isoform 2 of UBX domain-containing protein 1	35.1	3	0.003	8
Q04637-9	Isoform 9 of Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	176.1	7	0	96
Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17	48.1	4	0.004	7
Q04726	Transducin-like enhancer protein 3	83.4	13	0	67
Q04727-3	Isoform 3 of Transducin-like enhancer protein 4	87.6	5	0.003	17
Q05209-1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12	88.1	16	0	42
Q05397-5	Isoform 5 of Focal adhesion kinase 1	120.8	1	0.005	4
Q05469-1	hormone-sensitive lipase	116.5	2	0.004	3
Q05513-1	Protein kinase C zeta type	67.6	2	0.004	2
Q05519	serine/arginine-rich splicing factor 11	53.5	8	0	56
Q05655-2	Isoform 2 of Protein kinase C delta type	80.9	9	0	44
Q05682-1	Caldesmon	93.2	12	0	245
Q05682-2	Isoform 2 of Caldesmon	65.7	9	0	140
Q05682-4	Isoform 4 of Caldesmon	62.6	9	0	334
Q06124	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	68.4	1	0.004	1
Q06190	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B'' subunit alpha	130.2	3	0.004	21
Q06210-1	glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	78.8	3	0	57
Q06265-2	Isoform 2 of Exosome complex component RRP45	50.8	1	0.005	2
Q06413-5	Isoform 5 of Myocyte-specific enhancer factor 2C	52.3	1	0.006	6
Q06455-3	Isoform 3 of Protein CBFA2T1	68.7	3	0.006	3
Q06587	E3 ubiquitin-protein ligase RING1	42.4	3	0.004	2
Q07002-2	Isoform 2 of Cyclin-dependent kinase 18	54.4	3	0.005	3
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	66	4	0	11
Q07092	collagen alpha-1(XVI) chain	157.7	2	0.004	14
Q07157	Tight junction protein ZO-1	195.3	18	0	163
Q07352	mRNA decay activator protein ZFP36L1	36.3	2	0.006	17
Q07617	Sperm-associated antigen 1	103.6	1	0.004	1
Q07666	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	48.2	6	0	110
Q07866-4	Isoform J of Kinesin light chain 1	72	9	0	109
Q07889	Son of sevenless homolog 1	152.4	5	0	11
Q07955-1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	27.7	3	0	63
Q07960	rho GTPase-activating protein 1	50.4	5	0	268
Q08170	Serine/arginine-rich splicing factor 4	56.6	7	0	20
Q08174-2	Isoform 2 of Protocadherin-1	133.6	7	0	50
Q08211	Atp-dependent rna helicase a	140.9	1	0	4
Q08289	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-2	73.5	2	0.004	3
Q08357	sodium-dependent phosphate transporter 2	70.3	5	0	9
Q08495-1	Dematin	45.5	16	0	164
Q08752	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	40.7	2	0	8
Q08945	FACT complex subunit SSRP1	81	5	0	29
Q08AD1	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 2	168	6	0	25
Q08AE8-1	Protein spire homolog 1	85.5	1	0.006	1
Q08J23	tRNA (Cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	86.4	3	0	47
Q09019	Dystrophia myotonica WD repeat-containing protein	70.4	2	0.005	1
Q09161	Nuclear cap-binding protein subunit 1	91.8	3	0.003	25
Q09472	Histone acetyltransferase p300	264	6	0	22
Q09666-1	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	628.7	167	0	1853
Q0JRZ9-1	F-BAR domain only protein 2	88.9	12	0	89
Q0VD83-4	Isoform 4 of Apolipoprotein B receptor	115.6	1	0.008	2
Q0VF96	Cingulin-like protein 1	149	1	0.003	18
Q0ZGT2	Nexilin	80.6	11	0	183
Q0ZGT2-4	Isoform 4 of Nexilin	72.7	11	0	226
Q10570	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	160.8	2	0.005	6
Q12756-2	Isoform 2 of Kinesin-like protein KIF1A	202.8	2	0.005	2
Q12774-1	Rho guanine nucleotide exchange factor 5	176.7	5	0.003	10
Q12789-2	General transcription factor 3C polypeptide 1	238.7	8	0	22
Q12792-3	Isoform 3 of Twinfilin-1	41	2	0.004	4
Q12802-2	Isoform 2 of A-kinase anchor protein 13	307.7	23	0	73
Q12830-1	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF	338.1	3	0.003	8
Q12846	Syntaxin-4	34.2	3	0.004	5
Q12872-2	Isoform 2 of Splicing factor, suppressor of white-apricot homolog	109.9	5	0	10
Q12873-3	Isoform 3 of Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3	232.9	4	0	16
Q12874	splicing factor 3a subunit 3	58.8	1	0.008	1
Q12888-2	Isoform 2 of TP53-binding protein 1	214	42	0	238
Q12906-1	Interleukin enhancer-binding factor 3	95.3	10	0	204
Q12906-7	Isoform 7 of Interleukin enhancer-binding factor 3	95.7	10	0	230
Q12912-1	Lymphoid-restricted membrane protein	62.1	9	0	33
Q12929	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	91.8	7	0	15
Q12959-2	Isoform 2 of Disks large homolog 1	103.3	1	0.004	1
Q12972-1	Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1	38.5	3	0.004	3
Q12982-2	Isoform 2 of BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 2	43.1	1	0	13
Q12983	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3	27.8	2	0.006	2
Q12996-1	Cleavage stimulation factor subunit 3	82.9	1	0.003	9
Q13017-1	Rho GTPase-activating protein 5	172.4	4	0	10
Q13029	PR domain zinc finger protein 2	188.8	7	0	19
Q13033	Striatin-3	87.2	1	0.006	1
Q13043-1	serine/threonine-protein kinase 4	55.6	1	0	27
Q13045-1	protein flightless-1 homolog	144.7	2	0	8
Q13085-4	Isoform 4 of Acetyl-CoA carboxylase 1	269.8	4	0	35
Q13098-7	Isoform 2 of COP9 signalosome complex subunit 1	59	2	0	13
Q13103	Secreted phosphoprotein 24	24.3	1	0.004	1
Q13112	Chromatin assembly factor 1 subunit B	61.5	2	0.004	6
Q13127-1	RE1-silencing transcription factor	121.8	1	0.009	2
Q13131-2	Isoform 2 of 5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	65.5	6	0	17
Q13136	Liprin-alpha-1	135.7	8	0	45
Q13144	Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon	80.3	1	0	22
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	30.8	1	0.003	5
Q13153-2	Isoform 2 of Serine/threonine-protein kinase PAK 1	61.6	10	0	50
Q13177	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	58	4	0	25
Q13185	chromobox protein homolog 3	20.8	4	0	19
Q13188-2	Isoform 2 of Serine/threonine-protein kinase 3	59.4	1	0	15
Q13191-1	E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B	109.4	5	0.003	4
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	100.1	3	0	44
Q13206	probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	100.8	2	0.004	9
Q13207	T-box transcription factor TBX2	75	8	0	20
Q13237	GMMP-dependent protein kinase 2	87.4	2	0.004	7
Q13242	serine/arginine-rich splicing factor 9	25.5	3	0.004	4
Q13243-1	Serine/arginine-rich splicing factor 5	31.2	3	0	21
Q13247	Serine/arginine-rich splicing factor 6	39.6	6	0	224

Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	88.5	26	0	459
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	52.1	3	0	361
Q13286-1	Battenin	47.6	2	0	21
Q13308-6	Isoform 6 of Inactive tyrosine-protein kinase 7	119.1	4	0	10
Q13330-1	Metastasis-associated protein MTA1	80.7	2	0.003	11
Q13371	Phosducin-like protein	34.3	3	0.004	14
Q13409-2	Isoform 2B of Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	70.6	10	0	294
Q13418	Integrin-linked protein kinase	51.4	1	0.005	6
Q13424	Alpha-1-syntrophin	53.9	4	0.004	3
Q13425-1	Beta-2-syntrophin	57.9	12	0	98
Q13426-1	DNA repair protein xrcc4	38.3	2	0.004	7
Q13427	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase g	88.6	8	0	64
Q13428-4	Isoform 4 of Treacle protein	155.8	19	0	159
Q13428-7	Isoform 7 of Treacle protein	148.3	18	0	157
Q13435	Splicing factor 3b subunit 2	100.2	9	0	140
Q13439-5	Isoform 5 of Golgin subfamily A member 4	262.2	5	0	28
Q13442	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	20.6	3	0	152
Q13451-1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	51.2	3	0	5
Q13459-1	Unconventional myosin-IXb	243.2	21	0	98
Q13464	Rho-associated protein kinase 1	158.1	6	0	17
Q13469	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2	100.1	7	0	19
Q13470-1	Non-receptor tyrosine-protein kinase TNK1	72.4	6	0.003	9
Q13480-2	Isoform 2 of GRB2-associated-binding protein 1	80	8	0	16
Q13501-1	sequestosome-1	47.7	8	0	80
Q13523	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	116.9	22	0	146
Q13541	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	12.6	17	0	38
Q13546	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1	75.9	1	0.005	1
Q13547	histone deacetylase 1	55.1	3	0	34
Q13555-4	Isoform 4 of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	59.6	3	0.003	8
Q13557	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	56.3	8	0	216
Q13563	polycystin-2	109.6	1	0.003	21
Q13573	SNW domain-containing protein 1	61.5	2	0	133
Q13576-1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	180.5	3	0.003	20
Q13586	stromal interaction molecule 1	77.4	10	0	71
Q13595-1	Transformer-2 protein homolog alpha	32.7	5	0	54
Q13596-3	Isoform 3 of Sorting nexin-1	63	4	0.003	6
Q13610	Periodic tryptophan protein 1 homolog	55.8	5	0	52
Q13615	myotubularin-related protein 3	133.5	2	0	17
Q13620	Cullin-4B	103.9	10	0.003	15
Q13625-3	Isoform 3 of Apoptosis-stimulating of p53 protein 2	126.2	2	0.003	7
Q13627-1	dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A	85.5	1	0.006	19
Q13671	ras and Rab interactor 1	84	2	0.004	4
Q13769	THO complex subunit 5 homolog	78.5	3	0	12
Q13796	Protein Shroom2	176.3	4	0	13
Q13813-2	Isoform 2 of Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	284.9	5	0	88
Q13884	Beta-1-syntrophin	58	8	0	47
Q13895	Bystin	49.6	1	0.004	4
Q13905-3	Isoform 3 of Rap guanine nucleotide exchange factor 1	122.7	7	0	21
Q13951-2	Isoform 2 of Core-binding factor subunit beta	22	2	0	14
Q13976-2	Isoform Beta of cGMP-dependent protein kinase 1	77.8	1	0.002	3
Q14004-1	Cyclin-dependent kinase 13	164.8	5	0	16
Q14005-1	Pro-interleukin-16	141.7	9	0	59
Q14008-3	Isoform 3 of Cytoskeleton-associated protein 5	226.1	4	0.004	8
Q14103	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	38.4	6	0	307
Q14118	Dystroglycan	97.4	4	0.003	24
Q14123-1	calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C	80.7	4	0	16
Q14126	Desmoglein-2	122.2	1	0.004	15
Q14137	Ribosome biogenesis protein BOP1	83.6	2	0.005	4
Q14147	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX34	128	2	0.004	1
Q14153	Protein FAM53B	45.7	3	0.007	17
Q14155	Rho guanine nucleotide exchange factor 7	90	5	0	143
Q14155-5	Isoform 5 of Rho guanine nucleotide exchange factor 7	82.5	5	0	172
Q14156-1	protein EFR3 homolog A	92.9	4	0.008	4
Q14157-5	Isoform 5 of Ubiquitin-associated protein 2-like	116.6	13	0	97
Q14160	protein scribble homolog	174.8	19	0	43
Q14162-1	Scavenger receptor class F member 1	87.3	1	0.005	4
Q14166	Tubulin-tyrosine ligase-like protein 12	74.4	3	0	41
Q14181	DNA polymerase alpha subunit B	65.9	1	0.006	1
Q14185	Dedicator of cytokinesis protein 1	215.2	2	0.004	13
Q14194-1	Dihydropyrimidinase-related protein 1	62.1	4	0.001	20
Q14195-2	Isoform LCRMP-4 of Dihydropyrimidinase-related protein 3	73.9	14	0	159
Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	532.1	3	0.002	13
Q14244-7	Isoform 7 of Enscosin	86.9	4	0.005	5
Q14247-2	Isoform 2 of Src substrate cortactin	70.9	8	0	316
Q14289-1	Protein-tyrosine kinase 2-beta	115.8	1	0.006	5
Q14315	Filamin-C	290.8	6	0	38
Q14498-1	RNA-binding protein 39	59.3	3	0	144
Q14511-1	Enhancer of filamentation 1	92.8	1	0.005	1
Q14515	SPARC-like protein 1	75.2	13	0	48
Q14526-1	Hypermethylated in cancer 1 protein	76.5	1	0.004	8
Q14527	Helicase-like transcription factor	113.9	2	0.004	4
Q14566	DNA replication licensing factor MCM6	92.8	2	0	15
Q14573	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	303.9	5	0	28
Q14643-1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	313.7	1	0.004	9
Q14644	Ras GTPase-activating protein 3	95.6	2	0.005	8
Q14653-4	Isoform 4 of Interferon regulatory factor 3	49.1	2	0	8
Q14669-3	Isoform 3 of E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	225.4	7	0	51
Q14671-3	Isoform 3 of Pumilio homolog 1	126.6	1	0.006	4
Q14676	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	226.5	18	0	52
Q14677-3	Isoform 3 of Clathrin interactor 1	70.3	2	0	3
Q14678-1	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	147.2	5	0	19
Q14683	structural maintenance of chromosomes protein 1a	143.1	1	0.006	1
Q14684	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	84.4	7	0	11
Q14687	Genetic suppressor element 1	136.1	2	0.003	18
Q14694-2	Isoform 2 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	92.5	11	0	22
Q14699	raftlin	63.1	6	0	62
Q14738-1	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform	69.9	1	0.004	19
Q14739	Lamin-B receptor	70.7	4	0	22
Q14764	major vault protein	99.3	6	0	87
Q14766-4	Isoform 4 of Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	186.7	3	0.005	7
Q14767	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	194.9	2	0.003	2
Q14789-2	Isoform 2 of Golgin subfamily B member 1	376.9	7	0	24
Q14802-3	Isoform 3 of FXD domain-containing ion transport regulator 3	15.1	1	0.009	2
Q14814-1	Myocyte-specific enhancer factor 2D	55.9	2	0.003	4
Q14839-2	Isoform 2 of Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	220.7	9	0	19

Q14847-2	Isoform 2 of LIM and SH3 domain protein 1	36	4	0	30
Q14865	AT-rich interactive domain-containing protein 5B	132.3	1	0.005	2
Q14934-2	Isoform 2 of Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4	101.6	3	0.003	4
Q14938-1	Nuclear factor 1 X-type	55.1	3	0.004	38
Q14966-1	Zinc finger protein 638	220.5	1	0.004	6
Q14978-2	Isoform Beta of Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	74.7	9	0	51
Q14980-1	nuclear mitotic apparatus protein 1	238.1	13	0	77
Q14C86-6	Isoform 6 of GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	166.1	8	0	51
Q14C50	UBX domain-containing protein 2B	37.1	3	0.004	3
Q14D04	Ventricular zone-expressed PH domain-containing protein homolog 1	94.7	2	0.004	9
Q15007	Pre-mRNA-splicing regulator WTAP	44.2	1	0.004	4
Q15019-2	Isoform 2 of Septin-2	45.4	1	0	113
Q15022	Polycomb protein suz12	83	1	0.005	1
Q15025	TNFAIP3-interacting protein 1	71.8	3	0.004	8
Q15032-3	Isoform 3 of R3H domain-containing protein 1	120.7	4	0.004	6
Q15036-1	Sorting nexin-17	52.9	8	0	13
Q15042-3	Isoform 2 of Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	111.2	4	0	20
Q15052	Rho guanine nucleotide exchange factor 6	87.4	9	0	233
Q15054	DNA polymerase delta subunit 3	51.4	2	0.003	14
Q15057	Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	88	5	0	42
Q15059	bromodomain-containing protein 3	79.5	10	0.003	41
Q15084-2	Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6	53.9	1	0	44
Q15109-6	Isoform 6 of Advanced glycosylation end product-specific receptor	44.7	4	0	97
Q15111-1	Inactive phospholipase C-like protein 1	122.6	2	0.009	7
Q15121-2	Isoform 2 of Astrocytic phosphoprotein PEA-15	17.3	2	0	170
Q15124-1	phosphoglucomutase-like protein 5	62.2	2	0	55
Q15139	Serine/threonine-protein kinase D1	101.6	17	0	59
Q15147-4	Isoform 3 of 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4	136	2	0.005	1
Q15149-1	plectin	531.5	27	0	433
Q15149-4	Isoform 4 of Plectin	515.9	29	0	527
Q15154-1	Pericentriolar material 1 protein	228.4	12	0	50
Q15170-2	Isoform 2 of Transcription elongation factor A protein-like 1	18.6	1	0.005	7
Q15172-1	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit alpha isoform	56.2	4	0.009	6
Q15185	Prostaglandin E synthase 3	18.7	5	0	23
Q15276	Rab GTPase-binding effector protein 1	99.2	5	0	39
Q15291-1	Retinoblastoma-binding protein 5	59.1	2	0.004	2
Q15311	RalA-binding protein 1	76	9	0	19
Q15345-2	Leucine-rich repeat-containing protein 41	88.6	2	0.004	2
Q15365	Poly(RC)-binding protein 1	37.5	3	0	56
Q15366-2	Isoform 2 of Poly(RC)-binding protein 2	38.6	7	0	17
Q15388	Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	16.3	2	0.004	9
Q15390	Mitochondrial fission regulator 1	37	1	0.004	5
Q15418-2	Isoform 2 of Ribosomal protein S6 kinase alpha-1	83.9	4	0	13
Q15424-3	Isoform 3 of Scaffold attachment factor B1	102.8	19	0	101
Q15435	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	41.5	3	0	12
Q15459	splicing factor 3A subunit 1	88.8	3	0	103
Q15477	Helicase SKI2W	137.7	2	0.004	33
Q15554-3	Telomeric repeat-binding factor 2	59.6	3	0.002	12
Q15555	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	37	5	0.005	11
Q15596	Nuclear receptor coactivator 2	159.1	1	0.003	3
Q15599-2	Isoform 2 of Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2	36.1	1	0.009	1
Q15599-3	Isoform 3 of Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2	24.7	2	0.004	6
Q15629	Translocating chain-associated membrane protein 1	43	1	0.004	1
Q15637-5	Isoform 5 of Splicing factor 1	71.7	2	0	297
Q15642	Cdc42-interacting protein 4	68.3	6	0	68
Q15648	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1	168.4	3	0.003	10
Q15651-1	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 3	10.7	2	0.004	4
Q15678	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 14	135.2	5	0.002	6
Q15691	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	30	2	0.004	8
Q15722	Leukotriene B4 receptor 1	37.5	3	0.004	6
Q15742-1	NGFI-A-binding protein 2	56.6	3	0.003	6
Q15746-1	Myosin light chain kinase, smooth muscle	210.6	15	0	248
Q15773	Myeloid leukemia factor 2	28.1	1	0.005	2
Q15785	Mitochondrial import receptor subunit TOM34	34.5	1	0	4
Q15788	Nuclear receptor coactivator 1	156.7	1	0.004	1
Q15811	Intersectin-1	195.3	7	0	67
Q15884-3	Protein Fam189a2	49.7	1	0.004	3
Q15942	Zyxin	61.2	14	0	299
Q16181	Septin-7	50.6	1	0	7
Q16204	coiled-coil domain-containing protein 6	53.3	5	0	93
Q16512-2	Isoform 2 of Serine/threonine-protein kinase N1	104.6	1	0.009	3
Q16513	Serine/threonine-protein kinase N2	112	2	0.004	21
Q16514	Transcription initiation factor TFIIID subunit 12	17.9	1	0.008	1
Q16539	Mitogen-activated protein kinase 14	41.3	2	0.004	10
Q16555-1	Dihydropyrimidinase-related protein 2	62.3	7	0	63
Q16581	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	53.8	1	0.006	1
Q16584	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	92.6	3	0.003	8
Q16602	Calcitonin gene-related peptide type 1 receptor	52.9	3	0.003	5
Q16625-1	Occludin	59.1	10	0	48
Q16637	Survival motor neuron protein	31.8	3	0.002	5
Q16643-3	Isoform 3 of Drebrin	76.3	11	0	147
Q16666-1	gamma-interferon-inducible protein 16	88.2	9	0	186
Q16799-1	Reticulon-1	83.6	2	0.002	11
Q16875-4	Isoform 4 of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	60.6	2	0.003	7
Q1KM03	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	85.1	7	0	296
Q27J81	Inverted formin-2	135.5	9	0	39
Q29RF7-1	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	150.7	1	0.004	4
Q2KHR2-1	DNA-binding protein RFX7	146.8	1	0.005	1
Q2KJY2-1	Kinesin-like protein KIF26B	223.7	6	0.004	6
Q2M123	Rho GTPase-activating protein 31	156.9	5	0	24
Q2M218-1	AP2-associated protein kinase 1	103.8	12	0	97
Q2M389	WASH complex subunit 4	136.3	3	0.005	9
Q2M3G4-1	Protein Shroom1	90.7	2	0.004	7
Q2PPJ7-1	Ral GTPase-activating protein subunit alpha-2	210.6	6	0	22
Q2TAL5	Smoothelin-like protein 2	50.2	1	0.004	7
Q31612	HLA class I histocompatibility antigen, B-73 alpha chain	40.4	4	0	94
Q32M24	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	89.2	8	0	35
Q32P44	Echinoderm microtubule-associated protein-like 3	95.1	9	0	40
Q3KQU3	MAP7 domain-containing protein 1	92.8	17	0	162
Q3MHD2-2	Isoform 2 of Protein LSM12 homolog	22	2	0.005	11
Q3MII6-1	TBC1 domain family member 25	76.3	1	0.007	1
Q3V6T2-1	Girdin	215.9	3	0.003	6
Q3VEC7-2	Isoform 2 of Rab-like protein 6	79.6	2	0	12
Q49A26-1	Putative oxidoreductase GLYR1	60.5	2	0.003	15
Q4ADV7	RAB6A-GEF complex partner protein 1	159.2	2	0.004	6

Q4G0F5	Vacuolar protein sorting-associated protein 26B	39.1	2	0	34
Q4G0J3-3	Isoform 3 of La-related protein 7	67.6	12	0	140
Q4KMP7	TBC1 domain family member 10B	87.1	11	0	26
Q4KMQ1	Taperin	75.5	4	0.004	4
Q4KMQ2-2	Isoform 2 of Anoctamin-6	108.4	1	0.009	3
Q4L180	Filamin A-interacting protein 1-like	130.3	14	0	56
Q4LE39-1	AT-rich interactive domain-containing protein 4B	147.7	6	0	10
Q4V3Z8	GRIP1-associated protein 1	95.9	4	0.004	22
Q4V9L6	Transmembrane protein 119	29.2	1	0.004	1
Q4VX76-1	Synaptotagmin-like protein 3	68.5	2	0	8
Q52LW3	Rho GTPase-activating protein 29	142	4	0	15
Q53EL6-1	Programmed cell death protein 4	51.7	8	0	64
Q53EP0	Fibronectin type III domain-containing protein 3B	132.8	3	0.003	4
Q53ET0	CREB-regulated transcription coactivator 2	73.3	17	0	29
Q53EU6	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	48.7	1	0.005	5
Q53GA4	pleckstrin homology-like domain family A member 2	17.1	2	0.006	1
Q53GG5-2	Isoform 2 of PDZ and LIM domain protein 3	34.3	4	0	90
Q53GS9	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	65.3	1	0	48
Q53QV2	Protein LBH	12.2	1	0	22
Q53SF7-1	Cordon-bleu protein-like 1	131.7	13	0	45
Q53T59	HCLS1-binding protein 3	42.8	3	0	22
Q53TN4	Cytochrome b reductase 1	31.6	7	0	181
Q58WW2-3	Isoform 3 of DDB1- and CUL4-associated factor 6	106.5	4	0	8
Q5BKX8	caveolae-associated protein 4	41.9	2	0.004	2
Q5BKZ1	DBIRD complex subunit ZNF326	65.6	1	0.003	10
Q5H9R7-5	Isoform 5 of Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	98.4	1	0.005	1
Q5HYJ3-1	Protein FAM76B	38.7	2	0.004	3
Q5HYK7	SH3 domain-containing protein 19	86.5	3	0.004	6
Q5HYW2	NHS-like protein 2	76.3	4	0	11
Q5JRA6-1	Transport and Golgi organization protein 1 homolog	213.6	2	0.004	5
Q5JSH3	WD repeat-containing protein 44	101.3	17	0	219
Q5JSL3	dedicator of cytokinesis protein 11	237.5	3	0	6
Q5JSP0-1	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 3	79.4	2	0	12
Q5JSZ5-1	Protein PRRC2B	242.8	11	0	24
Q5JTD0-1	Tight junction-associated protein 1	61.8	3	0.003	21
Q5JTH9-1	RRP12-like protein	143.6	1	0.004	3
Q5JTV8-3	Isoform 3 of Torsin-1A-interacting protein 1	66.3	8	0	141
Q5M775-1	Cytospin-B	118.5	5	0.004	10
Q5RHP9	glutamate-rich protein 3	168.4	4	0.004	4
Q5S007	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2	285.9	9	0	18
Q5SNT2-1	Transmembrane protein 201	72.2	2	0.004	3
Q5SRE5	Nucleoporin NUP188 homolog	195.9	3	0	40
Q5S5J5-1	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	61.2	9	0	49
Q5SW79-1	Centrosomal protein of 170 kDa	175.2	20	0	44
Q5S5E7	NHS-like protein 1	170.6	1	0.004	3
Q5T011	KICSTOR complex protein SZT2	377.8	2	0.004	3
Q5T0N5-1	Formin-binding protein 1-like	70	5	0	42
Q5T0W9	Protein FAM83B	114.7	1	0.005	1
Q5T1M5	FK506-binding protein 15	133.5	24	0	296
Q5T200-1	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	196.5	26	0	166
Q5T3F8	CSC1-like protein 2	94.9	5	0.003	14
Q5T457-2	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	575.6	16	0	68
Q5T5C0-1	Syntaxin-binding protein 5	127.5	6	0	35
Q5T5P2-1	Sickle tail protein homolog	214	7	0	12
Q5T5U3	rho GTPase-activating protein 21	217.2	1	0.004	2
Q5T5Y3-3	Isoform 3 of Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1	179.2	4	0	5
Q5T7N3	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 4	107.3	2	0.003	10
Q5T8D3-1	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5	60.1	2	0	2
Q5T8P6-3	Isoform 3 of RNA-binding protein 26	110.6	3	0	10
Q5TAQ9-1	DDB1- and CUL4-associated factor 8	66.8	1	0	5
Q5TCQ9-1	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 3	165.5	4	0.003	16
Q5TCZ1	SH3 and PX domain-containing protein 2A	125.2	14	0	48
Q5TD94-1	radial spoke head protein 4 homolog A	80.7	2	0.004	2
Q5TH69	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3	240.5	7	0	16
Q5THJ4	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D	491.6	4	0.009	4
Q5TZA2	Rootletin	228.4	5	0	19
Q5U651	ras-interacting protein 1	103.4	4	0	37
Q5UIP0	Telomere-associated protein RIF1	274.3	4	0	6
Q5VSL9-1	striatin-interacting protein 1	95.5	2	0	44
Q5VT06	Centrosome-associated protein 350	350.7	1	0.005	1
Q5VT25-6	Isoform 6 of Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha	202.7	1	0.006	3
Q5VT52	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2	155.9	15	0	47
Q5VTL8	Pre-mRNA-splicing factor 38B	64.4	3	0	16
Q5VTR2	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A	113.6	8	0	39
Q5VUA4	Zinc finger protein 318	251	6	0	12
Q5VUB5	Protein FAM171A1	97.8	4	0.002	14
Q5VVJ2	Histone H2A deubiquitinase MYSM1	95	2	0.006	3
Q5VWG9	Transcription initiation factor TFIIID subunit 3	103.5	3	0.006	2
Q5VWJ9	Sorting nexin-30	49.6	3	0.003	6
Q5VWN6-1	Protein FAM208B	268.7	5	0.003	13
Q5VWQ8-1	Disabled homolog 2-interacting protein	131.5	6	0	6
Q5VZ89-7	Isoform 2 of DENN domain-containing protein 4C	217.7	21	0	114
Q5VZK9	F-actin-uncapping protein LRRC16A	151.5	9	0	40
Q5VZL5	Zinc finger MYM-type protein 4	172.7	2	0	11
Q5VZM2	Ras-related GTP-binding protein B	43.2	1	0.004	1
Q5XUX1-1	F-box/WD repeat-containing protein 9	54.1	2	0.004	4
Q5XXA6-1	Anoctamin-1	114	1	0.004	7
Q5ZPR3	CD276 antigen	57.2	1	0.007	1
Q63HN8-4	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	596.1	5	0.004	8
Q63HR2-4	Isoform 4 of Tensin-2	153.5	23	0	129
Q63ZY3-1	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2	91.1	20	0	172
Q63ZY3-2	Isoform 2 of KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2	91.9	20	0	168
Q641Q2	WASH complex subunit 2A	147.1	20	0	117
Q658Y4	Protein FAM91A1	93.9	7	0.004	13
Q66K14-1	TBC1 domain family member 9B	140.4	10	0	35
Q66K74	Microtubule-associated protein 1S	112.1	14	0	137
Q66PJ3-1	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 4	44.9	1	0	27
Q684P5	Rap1 GTPase-activating protein 2	80	3	0.005	3
Q68BL7-1	Olfactomedin-like protein 2A	73	1	0.004	1
Q68CP9-1	AT-rich interactive domain-containing protein 2	197.3	3	0.004	15
Q68CZ2-1	Tensin-3	155.2	27	0	123
Q68DK2	Zinc finger FYVE domain-containing protein 26	284.4	5	0	15
Q68DQ2	very large A-kinase anchor protein	330.4	3	0.004	9
Q68E01	Integrator complex subunit 3	118	1	0.004	4
Q68EM7	Rho GTPase-activating protein 17	95.4	8	0	216

Q68EM7-2	Isoform 2 of Rho GTPase-activating protein 17	87.6	8	0	215
Q69YN4	protein virilizer homolog	201.9	5	0	57
Q69YQ0-1	Cytospin-A	124.5	10	0	36
Q69YW2	protein stum homolog	15	4	0.006	5
Q6BD52	UHRF1-binding protein 1	159.4	2	0.003	2
Q6DD88	Atlastin-3	60.5	1	0	15
Q6F5E8	capping protein, Arp2/3 and myosin-I linker protein 2	154.6	2	0.004	3
Q6FI81-1	Anamorsin	33.6	3	0.002	18
Q6GQQ9-1	OTU domain-containing protein 7B	92.5	6	0	31
Q6GYQ0-2	Isoform 2 of Ral GTPase-activating protein subunit alpha-1	234.6	9	0	96
Q6H8Q1-9	Isoform 9 of Actin-binding LIM protein 2	71.5	6	0.004	31
Q6IA17-1	Single Ig IL-1-related receptor	45.7	2	0.005	6
Q6IAA8	regulator complex protein LAMTOR1	17.7	3	0.003	16
Q6IB50	Twinfilin-2	39.5	1	0.003	3
Q6IBW4-4	Isoform 4 of Condensin-2 complex subunit H2	68.3	1	0.007	1
Q6IN85	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	95.3	14	0	32
Q6IQ22	Ras-related protein Rab-12	27.2	1	0.004	2
Q6IQ23-2	Isoform 2 of Pleckstrin homology domain-containing family A member 7	127.2	5	0	19
Q6JBY9	CapZ-interacting protein	44.5	19	0	209
Q6K79-2	Isoform 2 of Nipped-B-like protein	304.2	4	0	51
Q6NT16	MFS-type transporter SLC18B1	48.8	1	0.005	3
Q6NWY9	pre-mRNA-processing factor 40 homolog B	99.3	2	0.004	10
Q6NXT6	Transmembrane anterior posterior transformation protein 1 homolog	64.2	7	0.004	21
Q6NY19-1	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 3	88.4	8	0	114
Q6NYC8	Phostensin	67.9	6	0	17
Q6NZI2-1	caveolae-associated protein 1	43.5	11	0	558
Q6NZY4	Zinc finger CCHC domain-containing protein 8	78.5	3	0	10
Q6P0Q8	microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2	196.3	2	0	5
Q6P158-1	putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	155.5	1	0.006	3
Q6P1L5-1	Protein FAM117B	61.9	3	0.004	10
Q6P1M3-1	Lethal(2) giant larvae protein homolog 2	113.4	3	0	33
Q6P2E9-1	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	151.6	12	0	103
Q6P4R8-2	Isoform 2 of Nuclear factor related to kappa-B-binding protein	141.8	8	0	22
Q6P9H4	Connector enhancer of kinase suppressor of ras 3	61.9	2	0.004	2
Q6PCE3	glucose 1,6-bisphosphate synthase	70.4	1	0.003	41
Q6PD62	RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog	133.4	5	0	49
Q6PIJ6-1	F-box only protein 38	133.9	3	0.004	4
Q6PJF5-1	Inactive rhomboid protein 2	96.6	8	0	28
Q6PJG2	ELM2 and SANT domain-containing protein 1	114.9	9	0	54
Q6PJG6-1	BRCA1-associated ATM activator 1	88.1	1	0.004	2
Q6PJ7-1	Zinc finger CCCH domain-containing protein 14	82.8	7	0	75
Q6PKG0-1	La-related protein 1	123.4	19	0	97
Q6PL18-1	ATPase family AAA domain-containing protein 2	158.5	2	0.006	2
Q6QN0Y0	biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 3	21.2	2	0	52
Q6R327-3	Isoform 3 of Rapamycin-insensitive companion of mTOR	194.9	1	0	3
Q6ULP2	Aftiphilin	102.1	1	0.004	9
Q6UN15-1	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1	66.5	5	0	32
Q6UUV7-1	CREB-regulated transcription coactivator 3	66.9	2	0.003	1
Q6UX71-1	Plexin domain-containing protein 2	59.5	1	0	40
Q6UXY8	Transmembrane channel-like protein 5	114.7	1	0.004	2
Q6V0I7-1	Protocadherin Fat 4	542.4	1	0.004	3
Q6VMQ6-4	Isoform 3 of Activating transcription factor 7-interacting protein 1	137.4	3	0	18
Q6VN20	Ran-binding protein 10	67.2	4	0.003	14
Q6VY07-2	Isoform 2 of Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	109.3	7	0	24
Q6W2J9-1	BCL-6 corepressor	192.1	2	0.004	10
Q6WCQ1	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	116.5	23	0	220
Q6WCQ1-2	Isoform 2 of Myosin phosphatase Rho-interacting protein	118	23	0	225
Q6WKZ4-4	Rab11 family-interacting protein 1	137.1	16	0	128
Q6XQN6-2	Isoform 2 of Nicotinate phosphoribosyltransferase	60.3	1	0.003	4
Q6Y7W6-1	GRB10-interacting GYF protein 2	150	14	0	35
Q6ZNB6-1	nf-x1-type zinc finger protein nfx1	101.3	1	0.005	14
Q6ZNI1-1	Neurobeachin-like protein 2	302.3	3	0.004	13
Q6ZQN7	Solute carrier organic anion transporter family member 4C1	78.9	2	0.009	2
Q6ZRP7	Sulphydryl oxidase 2	77.5	1	0.003	6
Q6ZRS2	Helicase SRCAP	343.3	3	0	6
Q6ZRV2	Protein FAM83H	127	17	0	63
Q6ZS17-4	Isoform 4 of Rho family-interacting cell polarization regulator 1	134.1	2	0.003	3
Q6ZS57	Major facilitator superfamily domain-containing protein 6	88	2	0.004	6
Q6ZS25	Rho guanine nucleotide exchange factor 18	130.7	1	0.006	7
Q6ZU35	Uncharacterized protein KIAA1211	136.7	3	0.003	7
Q6ZUM4-1	Rho GTPase-activating protein 27	98.3	4	0.004	10
Q6ZV73-1	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 6	160.7	1	0.004	1
Q6ZVM7-5	Isoform 5 of TOM1-like protein 2	53.3	2	0.005	5
Q6ZVX7	F-box only protein 50	30.8	7	0	90
Q6ZWT7	Lysophospholipid acyltransferase 2	59.5	1	0.004	3
Q709C8	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	422.1	3	0.003	13
Q70E73	Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1	135.2	7	0	17
Q70Z35-1	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein	182.5	2	0.003	3
Q717R9	Cystin-1	16.4	1	0.004	1
Q719H9	BTB/POZ domain-containing protein KCTD1	29.4	2	0	7
Q71RC2-4	Isoform 4 of La-related protein 4	81.2	1	0	7
Q76FK4	nucleolar protein 8	131.5	7	0	8
Q76L83	Putative Polycomb group protein ASXL2	153.7	9	0.004	9
Q7KZ85	transcription elongation factor spt6	198.9	1	0.005	2
Q7KZ17-1	Serine/threonine-protein kinase MARK2	87.9	4	0.004	8
Q7L014	probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	117.3	1	0	21
Q7L1Q6-3	Isoform 3 of Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	51.2	2	0.004	17
Q7L1V2	Vacuolar fusion protein MON1 homolog B	59.2	2	0	12
Q7L2J0-1	7SK snRNA methylphosphate capping enzyme	74.3	7	0	40
Q7L4I2-1	Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2	50.5	8	0	65
Q7L591-1	Docking protein 3	53.3	2	0.004	37
Q7L8J4	SH3 domain-binding protein 5-like	43.5	1	0.004	4
Q7LBC6-1	Lysine-specific demethylase 3B	191.5	9	0.003	24
Q7RTP6	[F-actin]-monooxygenase MICAL3	224.2	6	0	12
Q7Z2T5-1	TRMT1-like protein	81.7	1	0.004	1
Q7Z2W4	zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	101.4	7	0	29
Q7Z2X4-1	PTB-containing, cubilin and LRP1-interacting protein	28.3	5	0.003	15
Q7Z2X7	P antigen family member 2	12.1	5	0	8
Q7Z309-3	Isoform 3 of Protein FAM122B	29.1	3	0.003	11
Q7Z3B3	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	121	1	0.009	1
Q7Z3C6	autophagy-related protein 9A	94.4	2	0	15
Q7Z3K3-1	Pogo transposable element with ZNF domain	155.2	5	0	28
Q7Z3T8	Zinc finger FYVE domain-containing protein 16	168.8	2	0.004	9
Q7Z3U7-1	Protein MON2 homolog	190.2	1	0.005	7
Q7Z401-2	Isoform 2 of C-myc promoter-binding protein	213.6	4	0	13

Q7Z404	Transmembrane channel-like protein 4	79.2	1	0.004	4
Q7Z406-2	Isoform 2 of Myosin-14	231.9	4	0	110
Q7Z417	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2	76.1	10	0	29
Q7Z422	SUZ domain-containing protein 1	17	4	0	77
Q7Z434	Mitochondrial antiviral-signaling protein	56.5	4	0	20
Q7Z460-1	CLIP-associating protein 1	169.3	17	0	66
Q7Z478	ATP-dependent RNA helicase Dhx29	155.1	3	0.005	6
Q7Z456-4	Isoform 4 of Kinesin-like protein KIF21A	187.2	4	0.002	6
Q7Z4V5-3	Isoform 3 of Hepatoma-derived growth factor-related protein 2	74.8	15	0	72
Q7Z589-7	Isoform 7 of BRCA2-interacting transcriptional repressor EMSY	143.1	2	0.006	5
Q7Z5H3-2	Isoform 2 of Rho GTPase-activating protein 22	78.4	3	0.006	3
Q7Z5J4	Retinoic acid-induced protein 1	203.2	1	0.004	2
Q7Z5K2-3	Isoform 3 of Wings apart-like protein homolog	142.4	4	0	36
Q7Z5L9-1	Interferon regulatory factor 2-binding protein 2	61	9	0	86
Q7Z5R6	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1-interacting protein	73.1	5	0	77
Q7Z6E9	E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6	201.4	4	0	12
Q7Z6I6-1	Rho GTPase-activating protein 30	118.5	3	0	16
Q7Z6J0-1	E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF1	93.1	2	0.004	5
Q7Z6P3	Ras-related protein Rab-44	77.6	1	0.004	2
Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	481.6	37	0	172
Q7Z739	YTH domain-containing family protein 3	63.8	1	0.006	1
Q7Z7G0	Target of Nesh-SH3	118.6	1	0.004	2
Q7Z7L8	Uncharacterized protein C11orf96	46.1	5	0	44
Q86SQ0-1	Pleckstrin homology-like domain family B member 2	142.1	11	0	25
Q86T13	C-type lectin domain family 14 member A	51.6	1	0.007	2
Q86T65	Disheveled-associated activator of morphogenesis 2	123.4	2	0.004	7
Q86TB9	Protein PAT1 homolog 1	86.8	3	0.004	28
Q86TI0	TBC1 domain family member 1	133	3	0.003	7
Q86TN4-4	Isoform 4 of tRNA 2'-phosphotransferase 1	27.9	3	0.006	8
Q86TV6-2	Isoform 2 of Tetratricopeptide repeat protein 7B	96	3	0.005	2
Q86U06-1	probable RNA-binding protein 23	48.7	1	0.008	2
Q86U42-1	polyadenylate-binding protein 2	32.7	1	0.003	1
Q86U86-1	Protein polybromo-1	192.8	5	0	5
Q86UE4	protein LYRIC	63.8	4	0	34
Q86UE8	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2	87.6	5	0.001	10
Q86UP2-1	Kinetin	156.2	3	0	29
Q86UU0	B-cell CLL/lymphoma 9-like protein	157	4	0	24
Q86UU1-1	pleckstrin homology-like domain family B member 1	151.1	9	0	49
Q86UW7	calcium-dependent secretion activator 2	147.6	4	0.003	6
Q86UX7	Fermitin family homolog 3	75.9	5	0.004	6
Q86V15-1	Zinc finger protein castor homolog 1	189.9	4	0.001	11
Q86V48-1	Leucine zipper protein 1	120.2	4	0	30
Q86VM9	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	106.3	14	0	74
Q86VP3-2	Isoform 2 of Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2	99.6	12	0	22
Q86VQ1	Glucocorticoid-induced transcript 1 protein	58	8	0	15
Q86VR2	Reticulophagy regulator 3	51.4	5	0	33
Q86VX9	Vacuolar fusion protein MON1 homolog A	62.1	2	0.003	14
Q86W56	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	111	2	0.004	1
Q86W92-1	Liprin-beta-1	114	11	0	105
Q86WB0	Nuclear-interacting partner of ALK	55.2	12	0	78
Q86WC4	Osteopetrosis-associated transmembrane protein 1	37.2	4	0.003	28
Q86WR7-1	Proline and serine-rich protein 2	45.8	3	0.002	19
Q86X10-1	Ral GTPase-activating protein subunit beta	166.7	4	0.004	3
Q86X27-1	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor RalGPS2	65.1	6	0	10
Q86X29	Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor	71.4	4	0	11
Q86X53	Glutamate-rich protein 1	49	2	0.004	2
Q86X95	Corepressor interacting with RBPJ 1	52.3	1	0.005	1
Q86XL3-1	ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2	104.1	1	0.005	5
Q86XR7-1	TIR domain-containing adapter molecule 2	26.9	1	0	3
Q86Y82	Syntaxin-12	31.6	2	0.004	17
Q86YP4-3	Isoform 3 of Transcriptional repressor p66-alpha	68.1	3	0	45
Q86YR5-1	G-protein-signaling modulator 1	74.5	3	0.003	16
Q86YS7-3	Isoform 3 of C2 domain-containing protein 5	116	19	0	76
Q86YV0	RAS protein activator like-3	111.8	9	0	32
Q86YV5	Tyrosine-protein kinase PRAG1	149.5	10	0	20
Q86Z02	Homeodomain-interacting protein kinase 1	130.8	3	0.006	3
Q8IU81	Interferon regulatory factor 2-binding protein 1	61.6	3	0	37
Q8IV36	protein HID1	88.7	4	0	12
Q8IV50	LysM and putative peptidoglycan-binding domain-containing protein 2	23.4	4	0.003	19
Q8IVE3-1	Pleckstrin homology domain-containing family H member 2	168.1	2	0.004	4
Q8IVF2-1	Protein AHNK2	616.2	15	0	43
Q8IVF7	Formin-like protein 3	117.1	1	0.004	5
Q8IVT2	Mitotic interactor and substrate of PLK1	75.3	12	0	43
Q8IVT5-1	kinase suppressor of Ras 1	102.1	2	0.005	2
Q8IVW8	Protein spinster homolog 2	58	2	0.009	4
Q8IWA0	WD repeat-containing protein 75	94.4	5	0	9
Q8IW89-2	Isoform 2 of Testis-expressed protein 2	125.9	11	0	22
Q8IWE2	Protein Noxp20	60.7	4	0	20
Q8IWI9-4	Isoform 4 of MAX gene-associated protein	336	2	0.004	3
Q8IWS0-1	PHD finger protein 6	41.3	1	0.006	2
Q8IWT6	volume-regulated anion channel subunit LRRC8A	94.1	3	0.005	2
Q8IWW6-1	Rho GTPase-activating protein 12	96.2	7	0	29
Q8IWX8	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	103.6	6	0	29
Q8IWX8-1	SURP and G-patch domain-containing protein 1	72.4	1	0.004	2
Q8IX01-1	SURP and G-patch domain-containing protein 2	120.1	3	0.004	5
Q8IXJ6	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	43.2	4	0	11
Q8IXM2-3	Isoform 3 of Chromatin complexes subunit BAP18	19.9	2	0	8
Q8IXQ3	Uncharacterized protein C9orf40	21.1	4	0.003	5
Q8IXQ4	GPALPP motifs-containing protein 1	38.1	1	0.004	22
Q8IXT5	RNA-binding protein 12B	118	4	0.003	9
Q8IY17-4	Isoform 4 of Neuropathy target esterase	150.9	1	0.004	1
Q8IY18	structural maintenance of chromosomes protein 5	128.7	1	0.004	5
Q8IY22-1	C-Maf-inducing protein	86.3	1	0.005	4
Q8IY33-1	MICAL-like protein 2	97.4	4	0.004	7
Q8IY67-2	Isoform 2 of Ribonucleoprotein PTB-binding 1	77.8	2	0.003	2
Q8IY81	pre-rRNA processing protein FTSJ3	96.5	3	0.003	10
Q8IYB1	Protein MB21D2	55.8	1	0.008	1
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	102.3	60	0	1835
Q8IYB7	DIS3-like exonuclease 2	99.2	3	0.003	26
Q8IYH5-1	ZZ-type zinc finger-containing protein 3	102	1	0.004	3
Q8IYJ3	Synaptotagmin-like protein 1	61.8	1	0.008	8
Q8IYU2-1	E3 ubiquitin-protein ligase HACE1	102.3	4	0.003	27
Q8IZ21-2	Isoform 2 of Phosphatase and actin regulator 4	79.1	12	0	120
Q8IZD4	mRNA-decapping enzyme 1B	67.7	3	0	12
Q8IZJ1	Netrin receptor UNC5B	103.6	2	0.004	4

Q8IZL8	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	119.6	6	0	61
Q8IZP0	abl interactor 1	55	1	0	25
Q8IZW8	tensin-4	76.7	5	0.003	5
Q8N0Z3	Spindle and centriole-associated protein 1	96.2	1	0.004	2
Q8N122	Regulatory-associated protein of mTOR	148.9	4	0	10
Q8N163-1	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	102.8	6	0	41
Q8N1F7-1	Nuclear pore complex protein Nup93	93.4	4	0.006	8
Q8N1F8	Serine/threonine-protein kinase 11-interacting protein	121.3	4	0	44
Q8N1G0	zinc finger protein 687	129.4	14	0	37
Q8N1G2	Cap-specific mRNA (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase 1	95.3	3	0.007	5
Q8N1G4	Leucine-rich repeat-containing protein 47	63.4	7	0	115
Q8N110-3	Isoform 3 of Dedicator of cytokinesis protein 4	226	4	0.004	10
Q8N201	integrator complex subunit 1	244.1	3	0	27
Q8N2F6-1	Armadillo repeat-containing protein 10	37.5	3	0	12
Q8N2F6-2	Isoform 2 of Armadillo repeat-containing protein 10	33.8	6	0	108
Q8N2M8	CLK4-associating serine/arginine rich protein	77.1	2	0.003	29
Q8N2U9	pq-loop repeat-containing protein 1	30.5	3	0	14
Q8N3D4	EH domain-binding protein 1-like protein 1	161.8	2	0	11
Q8N3F8	MICAL-like protein 1	93.4	10	0	17
Q8N3U4-2	Isoform 2 of Cohesin subunit SA-2	145.7	1	0.002	2
Q8N3V7-1	synaptopodin	99.4	20	0	92
Q8N3V7-2	Isoform 2 of Synaptopodin	96.3	30	0	150
Q8N3X1-2	Isoform 2 of Formin-binding protein 4	110.4	2	0	7
Q8N4C8-1	Misshapen-like kinase 1	149.7	2	0.003	8
Q8N4N3-1	kelch-like protein 36	69.9	1	0.009	2
Q8N4X5-4	Isoform 4 of Actin filament-associated protein 1-like 2	93.8	1	0.008	9
Q8N556-2	Isoform 2 of Actin filament-associated protein 1	89.7	4	0.003	29
Q8N573-1	Oxidation resistance protein 1	97.9	4	0	32
Q8N5C8	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 3	78.6	2	0.004	2
Q8N5F7	NF-kappa-B-activating protein	47.1	3	0	11
Q8N5H7-1	SH2 domain-containing protein 3C	94.4	2	0.005	3
Q8N5Y2-1	male-specific lethal 3 homolog	59.8	3	0.009	14
Q8N684-3	Isoform 3 of Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7	56.3	8	0	38
Q8N699	Myc target protein 1	26.6	10	0	44
Q8N6H7	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	56.7	1	0.006	1
Q8N6N3	UPF0690 protein C1orf52	20.6	2	0.004	12
Q8N7J2-1	APC membrane recruitment protein 2	69.5	3	0.005	2
Q8N7R7-1	Cyclin-Y-like protein 1	40.7	12	0	37
Q8N806	Putative E3 ubiquitin-protein ligase UBR7	48	5	0.004	6
Q8N8A6	ATP-dependent RNA helicase DDX51	72.4	1	0.004	5
Q8N8S7-2	Isoform 2 of Protein enabled homolog	63.9	8	0	21
Q8N9T8	Protein KRI1 homolog	82.5	2	0	29
Q8NA72	Centrosomal protein POC5	63.3	2	0.009	2
Q8NAF0	Zinc finger protein 579	60.5	1	0.005	1
Q8NAP3	Zinc finger and BTB domain-containing protein 38	134.2	1	0.004	1
Q8NAV1-1	Pre-mRNA-splicing factor 38A	37.5	4	0	12
Q8NB78-1	Lysine-specific histone demethylase 1B	92	2	0.004	6
Q8NBQ5	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	32.9	2	0.004	4
Q8NBR6-1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-2	67.1	2	0.004	4
Q8NBX0	saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	47.1	1	0.004	4
Q8NC44	Reticulophagy regulator 2	57.8	4	0	19
Q8NC51-1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	44.9	7	0	30
Q8NC56-1	LEM domain-containing protein 2	56.9	6	0.002	12
Q8NCD3-1	Holliday junction recognition protein	83.5	2	0.004	2
Q8NCF5-1	NFATC2-interacting protein	45.8	1	0.004	1
Q8ND04-2	Isoform 2 of Protein SMG8	113.3	2	0.004	2
Q8ND56	protein LSM14 homolog A	50.5	8	0	115
Q8ND76	cyclin-Y	39.3	16	0	74
Q8NDI1	EH domain-binding protein 1	139.9	6	0	50
Q8NDT2	Putative RNA-binding protein 15B	97.1	3	0.004	6
Q8NDX1	PH and SEC7 domain-containing protein 4	116.2	5	0	15
Q8NDX5-7	Isoform 7 of Polyhomeotic-like protein 3	107.4	4	0	31
Q8NE71-1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	95.9	5	0	230
Q8NEB9	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	101.5	2	0.005	2
Q8NEF9	serum response factor-binding protein 1	48.6	1	0.005	2
Q8NEJ9	neuroguidin	35.9	2	0	8
Q8NEN9	PDZ domain-containing protein 8	128.5	2	0.004	1
Q8NEY1	neuron navigator 1	202.3	5	0	5
Q8NEY8	Periphrin-1	52.7	8	0	56
Q8NEZ4-3	Isoform 3 of Histone-lysine N-methyltransferase 2C	547.3	1	0.004	4
Q8NFS0-1	Dedicator of cytokinesis protein 8	238.4	4	0.003	9
Q8NF91	Nesprin-1	1010.5	3	0	24
Q8NFC6	Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1	330.3	11	0	28
Q8NFG4-1	Folliculin	64.4	3	0.004	3
Q8NFW9	Rab effector MyRIP	95.6	2	0.006	2
Q8NFZ5-1	TNFAIP3-interacting protein 2	48.7	1	0.005	1
Q8NHG8	E3 ubiquitin-protein ligase ZNRF2	24.1	2	0	16
Q8NHJ6	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4	49.3	2	0	8
Q8NHJ6-3	Isoform 3 of Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4	49.4	2	0.003	2
Q8NHM5-1	Lysine-specific demethylase 2B	152.5	13	0	13
Q8NHQ9	ATP-dependent RNA helicase DDX55	68.5	1	0	3
Q8NI08	Nuclear receptor coactivator 7	106.1	10	0.002	21
Q8NI27-1	THO complex subunit 2	182.7	1	0.003	8
Q8NI35	InaD-like protein	196.2	5	0	13
Q8TAD8	Smad nuclear-interacting protein 1	45.8	7	0	79
Q8TAQ2	SWI/SNF complex subunit SMARCC2	132.8	8	0	155
Q8TB36	ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	41.3	1	0.006	8
Q8TB72-1	pumilio homolog 2	114.1	4	0	31
Q8TBA6	Golgin subfamily A member 5	83	1	0	5
Q8TBB5	kelch domain-containing protein 4	57.9	1	0.004	1
Q8TBE0	bromo adjacent homology domain-containing 1 protein	84.6	1	0.009	1
Q8TBZ3-7	Isoform 7 of WD repeat-containing protein 20	66.5	4	0.004	25
Q8TC07-3	Isoform 3 of TBC1 domain family member 15	78.5	9	0	35
Q8TC26	Transmembrane protein 163	31.4	7	0	31
Q8TC71	mitochondria-eating protein	61.1	3	0.004	6
Q8TCJ2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B	93.6	2	0	178
Q8TCT9-1	Minor histocompatibility antigen H13	41.5	1	0	4
Q8TD16-2	Isoform 2 of Protein bicaudal D homolog 2	96.7	4	0.007	8
Q8TD19	Serine/threonine-protein kinase Nek9	107.1	6	0	125
Q8TD55	pleckstrin homology domain-containing family O member 2	53.3	15	0	73
Q8TDB6-1	E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L	83.5	6	0	19
Q8TDD1-2	Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase DDX54	98.6	3	0	7
Q8TDH9	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 5	21.6	1	0.006	2
Q8TDJ6-3	Isoform 3 of DmX-like protein 2	339.5	10	0.004	21
Q8TDN4	CDK5 and ABL1 enzyme substrate 1	67.6	2	0.004	2

Q8TDY2-1	RB1-inducible coiled-coil protein 1	183	2	0.005	2
Q8TD22-4	Isoform 4 of [F-actin]-monooxygenase MICAL1	119.7	2	0.004	7
Q8TE68-1	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 1	80.2	2	0.004	4
Q8TE77	Protein phosphatase Slingshot homolog 3	73	2	0	6
Q8TEA8	D-aminoacyl-tRNA deacylase 1	23.4	4	0	33
Q8TED9	Actin filament-associated protein 1-like 1	86.4	4	0	8
Q8TEH3	DENN domain-containing protein 1A	110.5	6	0	28
Q8TEK3	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific	184.7	3	0.004	6
Q8TEQ0-1	Sorting nexin-29	91.2	2	0.004	1
Q8TEU7-4	Isoform 4 of Rap guanine nucleotide exchange factor 6	180.3	1	0.004	1
Q8TEV9	Guanine nucleotide exchange protein SMCR8	105	4	0	21
Q8TEW0-5	Isoform 5 of Partitioning defective 3 homolog	138.2	5	0	21
Q8TEW8	Partitioning defective 3 homolog B	132.4	7	0	49
Q8TF01	Arginine/serine-rich protein PNISR	92.5	3	0	42
Q8TF72	protein Shroom3	216.7	2	0	2
Q8WTP9	X antigen family member 3	12.3	2	0.005	3
Q8WTW3	conserved oligomeric Golgi complex subunit 1	108.9	6	0.004	17
Q8WU17	E3 ubiquitin-protein ligase RNF139	75.9	1	0.006	3
Q8WU79-1	Stromal membrane-associated protein 2	46.8	5	0	19
Q8WU90	Zinc finger CCH domain-containing protein 15	48.6	2	0.003	2
Q8WUA7	TBC1 domain family member 22A	59.1	10	0	43
Q8WUB8	PHD finger protein 10	56	8	0.003	10
Q8WUD4	Coiled-coil domain-containing protein 12	19.2	1	0	5
Q8WUF5	RelA-associated inhibitor	89	4	0.006	2
Q8WUI4-8	Isoform 8 of Histone deacetylase 7	108.9	12	0	64
Q8WUX9	Charged multivesicular body protein 7	50.9	1	0.004	3
Q8WUY3-3	Isoform 3 of Protein prune homolog 2	340.9	1	0.004	2
Q8WUZ0-2	Isoform 2 of B-cell CLL/lymphoma 7 protein family member C	26.4	7	0	104
Q8WV19	vesicle transport protein sft2a	17.8	1	0.004	2
Q8WVB6-2	Isoform 2 of Chromosome transmission fidelity protein 18 homolog	110.1	4	0	8
Q8WVC0-1	RNA polymerase-associated protein LEO1	75.4	13	0	112
Q8WVM8	Sec1 family domain-containing protein 1	72.3	1	0.004	3
Q8WVT3	Trafficking protein particle complex subunit 12	79.3	4	0	13
Q8WVV9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	60	1	0.005	3
Q8WW12	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	18.9	4	0	94
Q8WWA1	Transmembrane protein 40	25.5	1	0.001	5
Q8WWI1	LIM domain only protein 7	192.6	35	0	421
Q8WWW7-3	Isoform 3 of Ataxin-2-like protein	115.5	5	0	25
Q8WWN9-2	Isoform 2 of Interactor protein for cytohesin exchange factors 1	49.1	1	0.004	2
Q8WWQ0	PH-interacting protein	206.6	12	0	49
Q8WWY3	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	55.4	6	0	69
Q8WX92	Negative elongation factor B	65.7	3	0	207
Q8WX93-1	palladin	150.5	17	0	434
Q8WXE0-1	caskin-2	126.7	10	0	24
Q8WXF7	Atlastin-1	63.5	1	0.006	2
Q8WXG6-1	MAP kinase-activating death domain protein	183.2	4	0.003	9
Q8WXH0-2	Isoform 2 of Nesprin-2	798.4	1	0	3
Q8WXI9	Transcriptional repressor p66-beta	65.2	8	0	26
Q8WXX5	dnaJ homolog subfamily C member 9	29.9	1	0.004	10
Q8WY36	HMG box transcription factor BBX	105.1	1	0.006	1
Q8WYL5-1	Protein phosphatase Slingshot homolog 1	115.4	4	0.004	45
Q8WYP5-2	Isoform 2 of Protein ELYS	255.8	8	0	17
Q8WZ42-12	Isoform 12 of Titin	3992.1	1	0.003	5
Q8WZ73-1	E3 ubiquitin-protein ligase riflylin	40.5	4	0	15
Q92466	DNA damage-binding protein 2	47.8	2	0	57
Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1	82.4	1	0.004	3
Q92508	Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1	286.6	4	0	41
Q92522	Histone H1x	22.5	1	0	11
Q92530	proteasome inhibitor Pi31 subunit	29.8	2	0.004	73
Q92538	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1	206.3	12	0	57
Q92539	Phosphatidate phosphatase LPIN2	99.3	2	0.003	3
Q92541	RNA polymerase-associated protein RTF1 homolog	80.3	4	0.004	4
Q92575	UBX domain-containing protein 4	56.7	2	0.004	2
Q92597	Protein NDRG1	42.8	11	0	372
Q92598-4	Isoform 4 of Heat shock protein 105 kDa	97.4	1	0.006	24
Q92604	Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	43.1	1	0.007	1
Q92608-1	Dedicator of cytokinesis protein 2	211.8	7	0	29
Q92609-2	Isoform 2 of TBC1 domain family member 5	91.2	9	0	49
Q92610	Zinc finger protein 592	137.4	4	0.007	4
Q92613	protein jade-3	93.7	3	0	4
Q92614-1	Unconventional myosin-XVIIa	233	15	0	83
Q92615	la-related protein 4B	80.5	13	0	78
Q92619	Rho GTPase-activating protein 45	124.5	5	0	16
Q92625	Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A	123	4	0	18
Q92667	A-kinase anchor protein 1, mitochondrial	97.3	3	0	10
Q92685-1	Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase	50.1	2	0	28
Q92733	proline-rich protein PRCC	52.4	4	0	54
Q92734-1	Protein TFG	43.4	2	0	7
Q92766-2	Isoform 2 of Ras-responsive element-binding protein 1	187.4	3	0	4
Q92769	Histone deacetylase 2	55.3	3	0	39
Q92785	Zinc finger protein ubi-d4	44.1	3	0	15
Q92786	Prospero homeobox protein 1	83.2	3	0	19
Q92793-1	CREB-binding protein	265.2	5	0.003	13
Q92794	histone acetyltransferase KAT6A	224.9	4	0.003	4
Q92797-1	Symplekin	141.1	2	0.004	2
Q92835	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1	133.2	4	0	29
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	80.2	2	0.006	2
Q92844	TRAF family member-associated NF-kappa-B activator	47.8	2	0.004	2
Q92845	Kinesin-associated protein 3	91.1	1	0.004	2
Q92882	osteoclast-stimulating factor 1	23.8	3	0.003	67
Q92888-3	Isoform 3 of Rho guanine nucleotide exchange factor 1	104	1	0.007	3
Q92903	Phosphatidate cytidyltransferase 1	53.3	5	0	23
Q92922	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	122.8	2	0	73
Q92934	Bcl2-associated agonist of cell death	18.4	4	0	19
Q92945	Far upstream element-binding protein 2	73.1	5	0	22
Q92974	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	111.5	20	0	147
Q93008-3	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	292.1	3	0.004	17
Q93009	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	128.2	1	0	21
Q93100-1	phosphorylase b kinase regulatory subunit beta	124.8	4	0.004	7
Q969E4	transcription elongation factor A protein-like 3	22.5	5	0	69
Q969G5	Caveolae-associated protein 3	27.7	4	0	31
Q969H4	Connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1	79.7	3	0.004	4
Q969H6	Ribonuclease P/MRP protein subunit POP5	18.8	1	0.009	4
Q969R8	KICSTOR complex protein iTFG2	49.3	2	0.004	5
Q969T4	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E3	22.9	1	0.004	1

Q969V6	MKL/myocardin-like protein 1	98.9	5	0.005	11
Q969X0	RILP-like protein 2	24	1	0.009	4
Q96A00	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14A	16.7	4	0	134
Q96A57-2	Isoform 1 of Transmembrane protein 230	19.9	3	0	48
Q96A65	Exocyst complex component 4	110.4	2	0	14
Q96A73-1	Putative monooxygenase p33MONOX	33.2	5	0.005	17
Q96AC1-3	Isoform 3 of Fermitin family homolog 2	78.6	1	0.003	1
Q96AD5-1	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2	55.3	2	0.004	4
Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1	67.5	4	0	27
Q96AP7	Endothelial cell-selective adhesion molecule	41.2	11	0	9
Q96AQ6	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	80.6	2	0	45
Q96AT1	Uncharacterized protein KIAA1143	17.5	3	0	36
Q96AY2-2	Isoform 2 of Crossover junction endonuclease EME1	64.7	3	0.004	3
Q96AY4	Tetratricopeptide repeat protein 28	270.7	6	0	21
Q96B18	Dapper homolog 3	64.9	1	0.004	3
Q96B23-1	Uncharacterized protein C18orf25	43.3	3	0	51
Q96B33	claudin-23	31.9	4	0.003	5
Q96B36-3	Isoform 3 of Proline-rich AKT1 substrate 1	29.2	8	0	102
Q96B45	BLOC-1-related complex subunit 7	11.6	2	0.005	10
Q96B97-1	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	73.1	7	0	62
Q96BD5-3	Isoform 3 of PHD finger protein 21A	74.9	1	0.008	1
Q96BJ3-1	Axin interactor, dorsalization-associated protein	35	1	0.005	1
Q96BY6-1	Dedicator of cytokinesis protein 10	249.4	5	0	7
Q96BY7	autophagy-related protein 2 homolog B	232.6	2	0.004	2
Q96C24	Synaptotagmin-like protein 4	76	1	0.004	1
Q96C92	Serologically defined colon cancer antigen 3	47.9	3	0	12
Q96C88	integrator complex subunit 12	48.8	4	0.005	9
Q96CC6	Inactive rhomboid protein 1	97.3	2	0.004	7
Q96CP6-1	GRAM domain-containing protein 1A	80.6	3	0.004	8
Q96CV9-1	Optineurin	65.9	6	0	74
Q96CX2	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	35.7	14	0	352
Q96D46	60S ribosomal export protein NMD3	57.6	3	0.002	25
Q96D71	RalBP1-associated Eps domain-containing protein 1	86.6	18	0	62
Q96DR7	Rho guanine nucleotide exchange factor 26	97.3	3	0	18
Q96E09	Protein FAM122A	30.5	16	0	90
Q96ER3	protein saal1	53.5	4	0.003	4
Q96ET8-1	Golgi apparatus membrane protein TVP23 homolog C	31.1	1	0.004	1
Q96EV2	RNA-binding protein 33	129.9	2	0	34
Q96EV8-1	dysbindin	39.5	3	0	19
Q96EY5-1	Multivesicular body subunit 12A	28.8	1	0.005	1
Q96EZ8-2	Isoform 2 of Microspherule protein 1	53	1	0	12
Q96FF7	Uncharacterized protein MISP3	24	1	0.005	6
Q96FH0-1	BLOC-1-related complex subunit 8	13.4	2	0.003	4
Q96FS4	signal-induced proliferation-associated protein 1	112.1	6	0	25
Q96FT9	Intraflagellar transport protein 43 homolog	23.5	1	0.006	8
Q96FZ5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 7	18.8	5	0.004	10
Q96G03	Phosphoglucomutase-2	68.2	2	0	40
Q96G23	Ceramide synthase 2	44.8	4	0	17
Q96G46	tRNA-dihydrouridine(47) synthase [NAD(P)(+)]-like	72.5	4	0.003	5
Q96G74-1	OTU domain-containing protein 5	60.6	1	0.004	6
Q96GE4	Centrosomal protein of 95 kDa	95.2	2	0.006	3
Q96GP6-1	Scavenger receptor class F member 2	92.4	1	0	21
Q96HC4	PDZ and LIM domain protein 5	63.9	4	0	5
Q96HP0	Dedicator of cytokinesis protein 6	229.4	7	0	41
Q96HR8	H/ACA ribonucleoprotein complex non-core subunit NAF1	53.7	1	0.006	5
Q96I24-1	Far upstream element-binding protein 3	61.6	2	0.004	5
Q96I25	Splicing factor 45	44.9	6	0	31
Q96IG2-1	F-box/LRR-repeat protein 20	48.4	2	0.006	4
Q96IZ0	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	36.5	3	0	6
Q96JB2-1	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3	94	4	0.004	6
Q96JB3-1	hypermethylated in cancer 2 protein	66.1	1	0.003	2
Q96JC9	ELL-associated factor 1	29	3	0	75
Q96JG6	Syndetin	111.1	6	0	11
Q96JH7	Deubiquitinating protein VCIP135	134.2	5	0.004	7
Q96JM3	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	89	19	0	124
Q96JP5-1	E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91	63.4	4	0	52
Q96JY6-5	Isoform 5 of PDZ and LIM domain protein 2	62.7	25	0	238
Q96K21	Abscission/NoCut checkpoint regulator	51.5	2	0.003	29
Q96K76	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	157.2	1	0.006	4
Q96K83	Zinc finger protein 521	147.8	2	0.004	2
Q96KC8	DnaI homolog subfamily C member 1	63.8	6	0	32
Q96KN1	Protein FAM84B	34.5	4	0	64
Q96KQ7	Histone-lysine N-methyltransferase EHMT2	132.3	2	0.002	3
Q96KR1	Zinc finger RNA-binding protein	116.9	1	0	35
Q96L91	E1A-binding protein p400	343.3	4	0	5
Q96LD4	Tripartite motif-containing protein 47	69.5	1	0.003	11
Q96LW4	DNA-directed primase/polymerase protein	64.3	3	0.004	7
Q96MH2	Protein HEXIM2	32.4	1	0.004	1
Q96MM6	Heat shock 70 kDa protein 12B	75.6	7	0	68
Q96MU7-1	YTH domain-containing protein 1	84.6	1	0.005	23
Q96N64	PWWP domain-containing protein 2A	81.9	1	0.003	17
Q96N67	Dedicator of cytokinesis protein 7	242.4	16	0	65
Q96NY7-1	Chloride intracellular channel protein 6	73	8	0	36
Q96PC5	Melanoma inhibitory activity protein 2	159.7	3	0.002	10
Q96PE1-1	Adhesion G protein-coupled receptor A2	142.6	4	0	7
Q96PE2	Rho guanine nucleotide exchange factor 17	221.5	14	0	71
Q96PK6-1	RNA-binding protein 14	69.4	5	0.002	54
Q96PL5	erythroid membrane-associated protein	52.6	1	0.004	3
Q96PN7-5	Isoform 5 of Transcriptional-regulating factor 1	124.9	6	0	7
Q96PU4-1	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF2	89.9	1	0.004	2
Q96PU5	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like	111.9	8	0	32
Q96PY5-3	Isoform 2 of Formin-like protein 2	124	1	0.006	22
Q96Q15-1	Serine/threonine-protein kinase SMG1	410.2	4	0.004	10
Q96Q42-1	Alsin	183.5	7	0	43
Q96QB1-2	Rho GTPase-activating protein 7	170.5	3	0.004	8
Q96QC0	Serine/threonine-protein phosphatase 1 regulatory subunit 10	99	2	0.004	4
Q96QE2	proton myo-inositol cotransporter	70.3	3	0.003	2
Q96QH2-1	PML-RARA-regulated adapter molecule 1	79.2	9	0	27
Q96QR8	Transcriptional activator protein Pur-beta	33.2	2	0	57
Q96QT6-1	PHD finger protein 12	109.6	5	0.004	8
Q96QU8	Exportin-6	128.8	5	0.004	17
Q96RK0	Protein capicua homolog	163.7	29	0	169
Q96RL1	BRCA1-A complex subunit RAP80	79.7	4	0.005	4
Q96RR4-1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2	64.7	3	0.002	11
Q96RS0	Trimethylguanosine synthase	96.6	2	0.003	4

Q96RU3-1	Formin-binding protein 1	71.3	5	0	83
Q96S38	Ribosomal protein S6 kinase delta-1	118.6	4	0.003	2
Q96S55-1	ATPase WRNIP1	72.1	8	0	20
Q96S66	chloride channel CLIC-like protein 1	62	1	0.006	4
Q96S94	cyclin-L2	58.1	2	0.006	7
Q96S97	myeloid-associated differentiation marker	35.3	6	0	8
Q96S83	Neurabin-2	89.1	2	0.004	7
Q96S84-3	Isoform 1 of SRSF protein kinase 1	92.4	3	0.003	3
Q96S88-2	Isoform 2 of Structural maintenance of chromosomes protein 6	129.1	2	0.005	2
Q96S11-1	BTB/POZ domain-containing protein KCTD15	31.9	4	0.002	8
Q96ST2	protein IWS1 homolog	91.9	169	0	368
Q96ST3	Paired amphipathic helix protein Sin3a	145.1	3	0	53
Q96SU4-6	Isoform 6 of Oxysterol-binding protein-related protein 9	84.2	1	0.004	1
Q96T23	remodeling and spacing factor 1	163.7	20	0	48
Q96T37-1	Putative RNA-binding protein 15	107.1	8	0	63
Q96T58	Msx2-interacting protein	402	10	0	28
Q96T60	Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase	57	3	0	10
Q96T83	Sodium/hydrogen exchanger 7	80.1	2	0.003	3
Q96TA1	Niban-like protein 1	84.1	12	0	383
Q96TC7	Regulator of microtubule dynamics protein 3	52.1	6	0	51
Q99081-3	Isoform 3 of Transcription factor 12	75.8	7	0	22
Q99442	translocation protein sec62	45.8	1	0	24
Q99460	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	105.8	6	0	47
Q99502-1	Eyes absent homolog 1	64.6	1	0.004	2
Q99523	Sortilin	92	3	0.008	15
Q99541	perilipin-2	48	1	0.004	2
Q99543-1	dnaj homolog subfamily C member 2	72	2	0.004	3
Q99549-2	Isoform 2 of M-phase phosphoprotein 8	97.6	5	0	16
Q99567	Nuclear pore complex protein Nup88	83.5	7	0	89
Q99569	Plakophilin-4	131.8	1	0.006	1
Q99576-3	Isoform 2 of TSC22 domain family protein 3	22.2	4	0	7
Q99584	Protein S100-A13	11.5	1	0.006	2
Q99590-1	protein SCAF11	164.6	17	0	55
Q99594	Transcriptional enhancer factor TEF-5	48.6	1	0.006	3
Q99598	Translin-associated protein X	33.1	3	0.005	3
Q99607	ETS-related transcription factor Elf-4	70.7	6	0.003	30
Q99624	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3	55.7	2	0.004	4
Q99638	cell cycle checkpoint control protein rad9a	42.5	1	0.004	4
Q99698-1	Lysosomal-traffic regulator	428.9	1	0.001	4
Q99700-1	Ataxin-2	140.2	4	0.004	2
Q99759-2	Isoform 2 of Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	74	7	0	26
Q99788-1	Chemokine-like receptor 1	42.3	2	0.004	7
Q99829	Copine-1	59	2	0.004	3
Q99856	AT-rich interactive domain-containing protein 3A	62.9	4	0	27
Q99959	Plakophilin-2	97.4	6	0	33
Q99996-6	Isoform 6 of A-kinase anchor protein 9	455.1	2	0.004	6
Q9BXP3	Condensin complex subunit 3	114.3	3	0	12
Q9BQA1	Methylosome protein 50	36.7	1	0	50
Q9BQG0-2	Isoform 2 of Myb-binding protein 1A	149.3	9	0	29
Q9BQI5-3	Isoform 3 of SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1	92.6	3	0.004	7
Q9BQQ3-1	Golgi reassembly-stacking protein 1	46.5	4	0	19
Q9BR39-1	Junctophilin-2	74.2	7	0	35
Q9BRD0	BUD13 homolog	70.5	96	0	69
Q9BRG2	SH2 domain-containing protein 3A	63.1	2	0.003	5
Q9BRJ6	Uncharacterized protein C7orf50	22.1	1	0.005	13
Q9BRQ0	Pygopus homolog 2	41.2	1	0.004	7
Q9BRR9	Rho GTPase-activating protein 9	83.2	3	0.004	4
Q9BSJ8-2	Isoform 2 of Extended synaptotagmin-1	123.9	2	0.006	11
Q9BST9	Rhotekin	62.6	3	0.003	9
Q9BTA9-1	VW domain-containing adapter protein with coiled-coil	70.7	15	0	36
Q9BTC0	Death-inducer obliterator 1	243.7	19	0	95
Q9BTE3-1	Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	72.9	2	0.003	8
Q9BTK6	PAXIP1-associated glutamate-rich protein 1	27.7	1	0.004	14
Q9BTU6	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	54	10	0	124
Q9BTV6	Diphthine methyltransferase	50.5	1	0.006	2
Q9BU76-1	Multiple myeloma tumor-associated protein 2	29.4	5	0	52
Q9BUA3	Uncharacterized protein C11orf84	41	4	0	12
Q9BUH6	Protein PAXX	21.6	3	0	49
Q9BUJ2-1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	95.7	3	0.008	3
Q9BUR4	Telomerase Cajal body protein 1	59.3	5	0	29
Q9BV36	Melanophilin	65.9	7	0	14
Q9BV36-2	Isoform 2 of Melanophilin	62.8	6	0	22
Q9BV40	vesicle-associated membrane protein 8	11.4	3	0.004	5
Q9BVC5	Ashwin	25.8	4	0.004	7
Q9BVG4	Protein PBDC1	26	1	0	46
Q9BVG9	phosphatidylserine synthase 2	56.2	1	0.006	11
Q9BVJ6-1	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	87.9	5	0	6
Q9BW04	Specifically androgen-regulated gene protein	63.9	15	0	45
Q9BW71-1	HIRA-interacting protein 3	61.9	14	0	83
Q9BW85	Coiled-coil domain-containing protein 94	37.1	2	0.002	4
Q9BWH2	FUN14 domain-containing protein 2	20.7	1	0	31
Q9BWT3	Poly(A) polymerase gamma	82.8	1	0.009	1
Q9BWU0	kanadaplin	88.8	1	0	11
Q9BX40-2	Isoform 2 of Protein LSM14 homolog B	42	4	0.003	3
Q9BX66-10	Isoform 10 of Sorbin and SH3 domain-containing protein 1	90.2	47	0	263
Q9BX66-11	Isoform 11 of Sorbin and SH3 domain-containing protein 1	139.3	45	0	234
Q9BX95	Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	49.1	1	0.002	22
Q9BxB4	Oxysterol-binding protein-related protein 11	83.6	4	0	8
Q9BXF6	Rab11 family-interacting protein 5	70.4	9	0	30
Q9BXK1	krueppel-like factor 16	25.4	7	0.003	10
Q9BXX5-1	Bcl-2-like protein 13	52.7	4	0.002	12
Q9BXM0	Periaxin	154.8	10	0	36
Q9BXP5	serrate RNA effector molecule homolog	100.6	5	0	11
Q9BXW6-1	Oxysterol-binding protein-related protein 1	108.4	1	0.004	11
Q9BY44-1	Eukaryotic translation initiation factor 2A	64.9	4	0	36
Q9BY77	Polymerase delta-interacting protein 3	46.1	2	0.004	4
Q9BY89-1	Uncharacterized protein KIAA1671	196.6	3	0	23
Q9BYB0	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3	184.6	16	0	75
Q9BYV8	centrosomal protein of 41 kDa	41.3	2	0.005	1
Q9BYX2	TBC1 domain family member 2A	105.3	2	0	13
Q9BZZ3	Pantothenate kinase 2, mitochondrial	62.6	3	0	25
Q9BZZ9-4	Isoform 4 of Dedicator of cytokinesis protein 9	238.7	6	0	12
Q9BZZ9-5	Isoform 2 of Dedicator of cytokinesis protein 9	236.3	6	0	19
Q9BZ95	Histone-lysine N-methyltransferase NSD3	161.5	5	0	8
Q9BZC7-3	Isoform 3 of ATP-binding cassette sub-family A member 2	269.8	2	0.004	3

Q9BZE9-2	Isoform 2 of Tether containing UBX domain for GLUT4	69.9	2	0.004	7
Q9BZF1-1	Oxysterol-binding protein-related protein 8	101.1	6	0	44
Q9BZG1	Ras-related protein Rab-34	29	1	0.005	2
Q9BZH6	WD repeat-containing protein 11	136.6	1	0.006	1
Q9BZK7	F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1XR1	55.6	1	0.003	1
Q9BZL4	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C	84.8	3	0.003	5
Q9BZL6	Serine/threonine-protein kinase D2	96.7	3	0	16
Q9BZQ8	Protein Niban	103.1	12	0	83
Q9BZZ5-4	Apoptosis inhibitor 5	59	1	0.004	1
Q9C040-2	Isoform 2 of Tripartite motif-containing protein 2	84.5	2	0.003	6
Q9C073	Protein FAM117A	48.3	1	0.004	7
Q9C085	Palmitoyltransferase ZDHHC5	77.5	7	0	29
Q9C0C2	182 kDa tankyrase-1-binding protein	181.7	36	0	488
Q9C0C9	(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme	141.2	14	0	74
Q9C0E2	Exportin-4	130.1	2	0.004	6
Q9C0E8-4	Isoform 4 of Protein lunapark	50.8	3	0	5
Q9C0I1	Myotubularin-related protein 12	86.1	1	0.007	1
Q9C0K0-1	B-cell lymphoma/leukemia 118	95.5	11	0	9
Q9GZR7	ATP-dependent RNA helicase DDX24	96.3	4	0	37
Q9GZT3-1	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	12.3	2	0.009	14
Q9GZV5	VW domain-containing transcription regulator protein 1	44.1	3	0	23
Q9GZY6	Linker for activation of T-cells family member 2	26.5	2	0.004	4
Q9GZY8-2	Isoform 2 of Mitochondrial fission factor	33	3	0	25
Q9H019-1	Mitochondrial fission regulator 1-like	31.9	5	0	32
Q9H063	repressor of RNA polymerase III transcription MAF1 homolog	28.8	2	0.004	6
Q9H0C8	Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	42.9	2	0.004	2
Q9H0D6-1	5'-3' exoribonuclease 2	108.5	12	0	127
Q9H0E3-3	Isoform 3 of Histone deacetylase complex subunit SAP130	113.9	2	0.004	2
Q9H0E9-2	Isoform 2 of Bromodomain-containing protein 8	102.8	3	0	18
Q9H0F6-1	Sharpin	39.9	3	0.004	5
Q9H0H5	Rac GTPase-activating protein 1	71	1	0.004	1
Q9H0X9	Oxysterol-binding protein-related protein 5	98.6	1	0.004	2
Q9H165-1	B-cell lymphoma/leukemia 11A	91.1	2	0.004	2
Q9H1A4	anaphase-promoting complex subunit 1	216.4	2	0.005	24
Q9H1B7	interferon regulatory factor 2-binding protein-like	82.6	6	0	141
Q9H1C4	Protein unc-93 homolog B1	66.6	3	0.003	5
Q9H1E3	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	27.3	25	0	629
Q9H270	Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog	107.8	1	0.006	1
Q9H2G2-1	STE20-like serine/threonine-protein kinase	142.6	9	0	34
Q9H2G4	testis-specific Y-encoded-like protein 2	79.4	4	0.004	3
Q9H2H9	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	54	2	0.005	8
Q9H2I8	leucine-rich melanocyte differentiation-associated protein	22.6	1	0.007	1
Q9H2K8	Serine/threonine-protein kinase TAO3	105.3	1	0	14
Q9H2P0	Activity-dependent neuroprotector homeobox protein	123.5	2	0.003	3
Q9H2Y7	Zinc finger protein 106	208.8	5	0.003	6
Q9H307	Pinin	81.6	9	0	145
Q9H330	Transmembrane protein 245	100.9	8	0.002	28
Q9H3N1	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	31.8	3	0	119
Q9H3P7	Golgi resident protein GCP60	60.6	5	0	24
Q9H3Q1	Cdc42 effector protein 4	38	5	0	8
Q9H3S7	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	178.9	6	0.003	17
Q9H3Z4	DnaJ homolog subfamily C member 5	22.1	6	0	214
Q9H425	Uncharacterized protein C1orf198	36.3	4	0	19
Q9H4A3-7	Isoform 6 of Serine/threonine-protein kinase WNK1	299.5	11	0	119
Q9H4G0-1	Band 4.1-like protein 1	98.4	11	0	32
Q9H4L5	Oxysterol-binding protein-related protein 3	101.2	5	0.003	10
Q9H4L7-2	Isoform 2 of SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1	117.5	14	0	14
Q9H4X1	regulator of cell cycle RGCC	14.6	8	0	167
Q9H4Z3	Phosphorylated CTD-interacting factor 1	80.6	7	0	47
Q9H501	ESF1 homolog	98.7	2	0.003	4
Q9H5H4	Zinc finger protein 768	60.2	4	0	8
Q9H694-1	Protein bicaudal C homolog 1	104.8	1	0.003	3
Q9H6F5	Coiled-coil domain-containing protein 86	40.2	11	0	43
Q9H6K5	proline-rich protein 36	132.7	1	0.005	1
Q9H6S3-3	Isoform 3 of Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2	82.3	3	0.003	21
Q9H6U6-8	Isoform 4 of Breast carcinoma-amplified sequence 3	103.6	3	0.004	2
Q9H6X2	Anthrax toxin receptor 1	62.7	1	0	25
Q9H6Y2	WD repeat-containing protein 55	42	1	0	3
Q9H6Z4	Ran-binding protein 3	60.2	16	0	132
Q9H772	Gremlin-2	19.3	2	0.004	14
Q9H788	SH2 domain-containing protein 4A	52.7	2	0.004	9
Q9H792	Pseudopodium-enriched atypical kinase 1	193	15	0	61
Q9H7C9-1	Mth938 domain-containing protein	13.3	2	0.005	2
Q9H7D0-1	dedicator of cytokinesis protein 5	215.2	8	0	17
Q9H7D7	WD repeat-containing protein 26	72.1	2	0.005	6
Q9H7I9	Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3	38.1	7	0	98
Q9H7M9	V-type immunoglobulin domain-containing suppressor of T-cell activation	33.9	2	0	33
Q9H7N4	Splicing factor, arginine/serine-rich 19	139.2	17	0	59
Q9H7P6	Multivesicular body subunit 12B	35.6	5	0.004	3
Q9H7P9-1	Pleckstrin homology domain-containing family G member 2	147.9	2	0.004	9
Q9H8G2-1	Caspase activity and apoptosis inhibitor 1	38.3	5	0	48
Q9H8W4	Pleckstrin homology domain-containing family F member 2	27.8	3	0.004	4
Q9H8Y8-3	Isoform 3 of Golgi reassembly-stacking protein 2	48.6	7	0	34
Q9H910-3	Isoform 3 of Jupiter microtubule associated homolog 2	23	1	0.004	1
Q9H987	Synaptopodin 2-like protein	102.4	1	0.006	1
Q9H9C1-1	Spermatogenesis-defective protein 39 homolog	57	4	0.002	23
Q9H9J4-1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 42	145.3	1	0.004	2
Q9HA90-1	EF-hand and coiled-coil domain-containing protein 1	65.7	1	0.004	1
Q9HAP2-1	MLX-interacting protein	101.1	2	0.004	1
Q9HAU0-6	Isoform 6 of Pleckstrin homology domain-containing family A member 5	146.8	3	0	4
Q9HB19	Pleckstrin homology domain-containing family A member 2	47.2	1	0.007	9
Q9HB58-6	Isoform 6 of Sp110 nuclear body protein	81.1	16	0	64
Q9HBL0	Tensin-1	185.6	92	0	1162
Q9HBM6	Transcription initiation factor TFIID subunit 9B	27.6	5	0.009	3
Q9HBR0	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 10	119.7	1	0.003	3
Q9HC35	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	108.8	15	0	156
Q9HC52	chromobox protein homolog 8	43.4	1	0.007	5
Q9HC78	Zinc finger and BTB domain-containing protein 20	81	3	0	17
Q9HCD6-2	Isoform 2 of Protein TANC2	220.6	2	0.004	1
Q9HCE3	Zinc finger protein 532	141.6	2	0.004	3
Q9HCE5	N6-adenosine-methyltransferase subunit METTL14	52.1	1	0.005	24
Q9HCI7	E3 ubiquitin-protein ligase MSL2	62.5	3	0.005	5
Q9HCK8-1	Chromodomain-helicase-dna-binding protein 8	290.3	4	0.003	11
Q9HCL0	Protocadherin-18	126.1	3	0.004	3

Q9HCM4	Band 4.1-like protein 5	81.8	2	0	12
Q9HCN4-5	Isoform 5 of GPN-loop GTPase 1	43.3	5	0	52
Q9HCS7	Pre-mRNA-splicing factor SYF1	99.9	1	0.008	1
Q9HCU0	endosialin	80.8	2	0.003	4
Q9NP58	ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial	93.8	2	0.004	5
Q9NP66	High mobility group protein 20A	40.1	1	0.005	7
Q9NP74-1	palmdelphin	62.7	1	0.004	1
Q9NPF5	DNA methyltransferase 1-associated protein 1	53	1	0.005	7
Q9NPG4	Protocadherin-12	128.9	1	0.006	1
Q9NPH3	Interleukin-1 receptor accessory protein	65.4	3	0	13
Q9NPI6	mRNA-decapping enzyme 1A	63.3	7	0	19
Q9NPQ8-3	Isoform 3 of Synembryn-A	60.3	3	0	14
Q9NPQ5-3	Isoform 3 of Suppressor of SWI4 1 homolog	58.2	4	0	26
Q9NQ75-1	Cas scaffolding protein family member 4	87.1	1	0.004	1
Q9NQ84-2	Isoform 2 of G-protein coupled receptor family C group 5 member C	49.4	2	0.004	16
Q9NQC3	Reticulon-4	129.9	14	0	282
Q9NQG5	regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B	36.9	3	0	56
Q9NQL2-1	Ras-related GTP-binding protein D	45.6	2	0.003	8
Q9NQQ7-3	Isoform 3 of Solute carrier family 35 member C2	43.4	2	0.004	33
Q9NQ57	Inner centromere protein	105.4	2	0.003	2
Q9NQT8	Kinesin-like protein KIF13B	202.7	1	0.004	4
Q9NQW6	Anillin	124.1	2	0.006	2
Q9NQX3-2	Isoform 2 of Gephyrin	83.4	2	0	11
Q9NQZ2	Something about silencing protein 10	54.5	4	0	10
Q9NR12-1	PDZ and LIM domain protein 7	49.8	4	0	11
Q9NR12-2	Isoform 2 of PDZ and LIM domain protein 7	46.5	4	0	19
Q9NR19-2	Isoform 2 of Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic	80	3	0.003	17
Q9NR30-1	Nucleolar RNA helicase 2	87.3	4	0	86
Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	332.6	3	0.008	3
Q9NR99	Matrix-remodeling-associated protein 5	312	3	0.004	4
Q9NRA8-3	Isoform 3 of Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter	108.3	4	0	44
Q9NRF2	SH2B adapter protein 1	79.3	4	0.004	4
Q9NRF8	CTP synthase 2	65.6	3	0.003	8
Q9NRL2	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	178.6	1	0.003	5
Q9NRX5	Serine incorporator 1	50.5	2	0.004	22
Q9NRY4	Rho GTPase-activating protein 35	170.4	12	0	37
Q9NRY5	Protein FAM114A2	55.4	4	0	14
Q9NS37	CREB/ATF bZIP transcription factor	37.1	2	0.004	1
Q9NS62	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 1	94.5	1	0.009	1
Q9NSC5-1	homer protein homolog 3	39.8	5	0.001	14
Q9NSK0-3	Isoform 3 of Kinesin light chain 4	70.5	4	0.004	13
Q9NSY0-3	Nuclear receptor-binding protein 2	57.8	2	0.004	1
Q9NSY1	BMP-2-inducible protein kinase	129.1	6	0	29
Q9NTI5	Sister chromatid cohesion protein PDSS homolog B	164.6	19	0	114
Q9NTJ3-1	Structural maintenance of chromosomes protein 4	147.1	5	0	34
Q9NU19	TBC1 domain family member 22B	59	4	0.005	5
Q9NUQ6-3	Isoform 3 of SPATS2-like protein	65.1	6	0.003	5
Q9NUY8	TBC1 domain family member 23	78.3	2	0.005	6
Q9NV29	Transmembrane protein 100	14.4	1	0.003	7
Q9NV70-1	exocyst complex component 1	101.9	5	0.004	4
Q9NVD7	alpha-parvin	42.2	4	0	127
Q9NVM1	Protein eva-1 homolog B	18.4	6	0	84
Q9NVM6	DnaJ homolog subfamily C member 17	34.7	1	0.004	3
Q9NVU0	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5	79.8	2	0.001	4
Q9NVZ3-2	Isoform 2 of Adaptin ear-binding coat-associated protein 2	29.4	3	0.005	6
Q9NW07	Zinc finger protein 358	59.3	4	0.004	6
Q9NW97	transmembrane protein 51	27.7	1	0.004	1
Q9NWB6	Arginine and glutamate-rich protein 1	33.2	2	0.009	18
Q9NWH9-1	SAFB-like transcription modulator	117.1	4	0	54
Q9NWQ8	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1	47	5	0	16
Q9NWS9	Zinc finger protein 446	48.9	3	0.005	6
Q9NWW8	BRIS and BRCA1-A complex member 1	36.5	9	0	33
Q9NWW5-2	Isoform 2 of Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 6	39.5	1	0.004	14
Q9NX02	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 2	120.4	1	0.004	3
Q9NX40	OCIA domain-containing protein 1	27.6	2	0.006	10
Q9NX63	MICOS complex subunit MIC19	26.1	2	0	7
Q9NXG2	THUMP domain-containing protein 1	39.3	3	0	205
Q9NXR1-1	Nuclear distribution protein nudE homolog 1	38.8	5	0.004	21
Q9NXV6	CDKN2A-interacting protein	61.1	3	0	19
Q9NY27	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 2	46.9	1	0.005	2
Q9NY61	Protein AATF	63.1	1	0.004	1
Q9NYB0	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	44.2	1	0.007	2
Q9NYF3	protein FAM53C	43.1	4	0.004	7
Q9NYF8-1	Bcl-2-associated transcription factor 1	106.1	25	0	493
Q9NYI0-1	PH and SEC7 domain-containing protein 3	116	3	0	4
Q9NYJ8-1	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2	76.4	1	0.004	1
Q9NYL2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 20	91.1	3	0.005	10
Q9NYL9	tropomodulin-3	39.6	2	0	10
Q9NYM9	BET1-like protein	12.4	1	0.005	3
Q9NYN1	Ras-like protein family member 12	29.6	1	0.004	6
Q9NYV4-2	Isoform 2 of Cyclin-dependent kinase 12	163.1	21	0	100
Q9NZ09-4	Isoform 4 of Ubiquitin-associated protein 1	61.8	4	0	6
Q9NZ63	Telomere length and silencing protein 1 homolog	33.7	5	0	32
Q9NZB2-6	Isoform F of Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	125.2	2	0.004	5
Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	63.4	1	0	24
Q9NZJ4-1	Sacsin	520.8	5	0.004	16
Q9NZM1	Myoferlin	234.6	3	0	23
Q9NZM3	Intersectin-2	193.3	4	0	20
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2	61.1	3	0	87
Q9NZN5	Rho guanine nucleotide exchange factor 12	173.1	8	0	26
Q9NZN5-2	Isoform 2 of Rho guanine nucleotide exchange factor 12	171	8	0	27
Q9NZT2-1	opioid growth factor receptor	73.3	4	0	57
Q9NZU5	LIM and cysteine-rich domains protein 1	40.8	1	0	46
Q9NZV5-1	Selenoprotein N	65.8	1	0.004	2
Q9P035	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	43.1	1	0.003	5
Q9P0K7-2	Isoform 2 of Ankycorbin	110.4	12	0	115
Q9P0L0-2	Isoform 2 of Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	32.6	5	0	31
Q9P0M6	Core histone macro-H2A.2	40	5	0	11
Q9P0V3-1	SH3 domain-binding protein 4	107.4	5	0.003	16
Q9P107	GEM-interacting protein	106.6	5	0	23
Q9P1Y5-2	Isoform 2 of Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3	137.8	6	0	8
Q9P1Y6-1	PHD and RING finger domain-containing protein 1	178.6	7	0	35
Q9P206-2	Isoform 2 of Uncharacterized protein KIAA1522	113	7	0	75
Q9P227	Rho GTPase-activating protein 23	162.1	1	0.004	1
Q9P246-2	Isoform 2 of Stromal interaction molecule 2	93.9	4	0	7

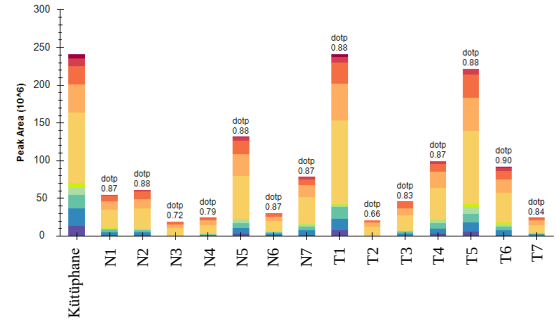
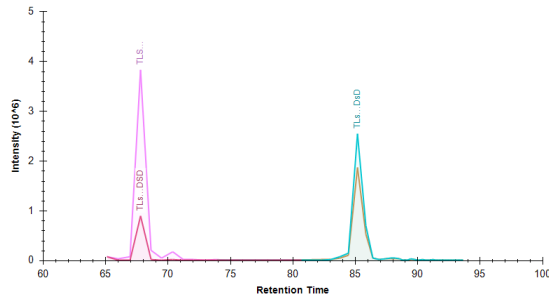
Q9P258	Protein RCC2	56	6	0	13
Q9P260-2	Isoform 2 of LisH domain and HEAT repeat-containing protein KIAA1468	138.7	4	0.002	12
Q9P266	Junctional protein associated with coronary artery disease	148.3	24	0	122
Q9P2B4	CTTNBP2 N-terminal-like protein	70.1	7	0	14
Q9P2D1-1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7	335.7	1	0.004	2
Q9P2E5-1	Chondroitin sulfate glucuronyltransferase	85.9	1	0.005	1
Q9P2E9-1	Ribosome-binding protein 1	152.4	4	0	66
Q9P2F8-1	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2	190.3	3	0	9
Q9P2G1	Ankyrin repeat and IBR domain-containing protein 1	121.9	1	0.004	11
Q9P2I0	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	88.4	3	0.004	3
Q9P2K5-1	Myelin expression factor 2	64.1	2	0.003	12
Q9P2M7-1	cingulin	136.3	8	0	72
Q9P2P5	E3 ubiquitin-protein ligase HECW2	175.7	1	0.004	4
Q9P2R6	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	172.3	4	0	25
Q9P2T1-2	Isoform 2 of GMP reductase 2	39.8	2	0.007	5
Q9P2Y4	Zinc finger protein 219	76.8	2	0.004	1
Q9UBB9-1	Tuftelin-interacting protein 11	96.8	1	0	10
Q9UBC2-2	Isoform 2 of Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1	99.5	6	0	44
Q9UBF8-2	Isoform 2 of Phosphatidylinositol 4-kinase beta	89.8	5	0	31
Q9UBG0	C-type mannose receptor 2	166.6	7	0.003	36
Q9UBI6	guanine nucleotide-binding protein g(i)/g(s)/g(o) subunit gamma-12	8	2	0.004	12
Q9UBM7	7-dehydrocholesterol reductase	54.5	1	0.003	7
Q9UBT7	Alpha-catulin	81.8	1	0.004	3
Q9UBW5-1	Bridging integrator 2	61.8	24	0	205
Q9UBW7	Zinc finger MYM-type protein 2	154.8	2	0.006	2
Q9UD71-1	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B	22.9	1	0.004	2
Q9UDY2-7	Isoform 7 of Tight junction protein ZO-2	137.3	29	0	331
Q9UER7-1	Death domain-associated protein 6	81.3	1	0.004	10
Q9UEY8-1	Gamma-adducin	79.1	10	0	319
Q9UFC0	Leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein 1	70.8	1	0.009	3
Q9UFW8	CGG triplet repeat-binding protein 1	18.8	1	0.009	1
Q9UGH3	Solute carrier family 23 member 2	70.3	3	0.003	7
Q9UGJ0	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2	63	5	0.004	2
Q9UGP4	LIM domain-containing protein 1	72.1	8	0	21
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog	87.9	1	0	6
Q9UGU0	Transcription factor 20	211.6	8	0	18
Q9UGU5	HMG domain-containing protein 4	65.7	1	0.003	2
Q9UGV2	protein NDRG3	41.4	5	0	11
Q9UH62	Armadiillo repeat-containing X-linked protein 3	42.5	2	0.004	2
Q9UHH9-2	Isoform 2 of SUN domain-containing protein 2	82.5	12	0	28
Q9UHB6-4	Isoform 4 of LIM domain and actin-binding protein 1	85.2	19	0	180
Q9UHB7-1	AF4/FMR2 family member 4	127.4	4	0	4
Q9UHD8-1	Septin-9	65.4	7	0	82
Q9UHF7-2	Isoform 2 of Zinc finger transcription factor Trps1	142.9	5	0.004	12
Q9UHR4	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	56.8	4	0.002	7
Q9UHR5-1	SAP30-binding protein	33.9	3	0	6
Q9UHW9	Solute carrier family 12 member 6	127.5	3	0	13
Q9UHY1	Nuclear receptor-binding protein	59.8	2	0.004	20
Q9UI08-2	Isoform 1 of Ena/VASP-like protein	44.8	12	0	148
Q9UID6	Zinc finger protein 639	56	2	0.004	2
Q9UIF9-1	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A	211.1	4	0.004	4
Q9UIG0	Tyrosine-protein kinase BAZ1B	170.8	6	0	33
Q9UIK4-1	Death-associated protein kinase 2	42.9	1	0.005	4
Q9UIS9-6	Isoform 6 of Methyl-CpG-binding domain protein 1	60.8	7	0	25
Q9UIJ1-1	Rab5 GDP/GTP exchange factor	79.3	1	0.004	3
Q9UIJ70-2	Isoform 2 of N-acetyl-D-glucosamine kinase	42	2	0	34
Q9UIM3	ERBB receptor feedback inhibitor 1	50.5	3	0	12
Q9UIJ6-3	Isoform 3 of Drebrin-like protein	49	7	0	41
Q9UIJ5-3	Isoform 3 of Anaphase-promoting complex subunit 4	92.2	2	0.004	18
Q9UIJ2	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	38.5	1	0.003	4
Q9UK55	Protein Z-dependent protease inhibitor	50.7	2	0	10
Q9UK58	Cyclin-L1	59.6	7	0	44
Q9UK59	lariat debranching enzyme	61.5	1	0.007	4
Q9UK61	Protein TASOR	188.9	4	0.003	15
Q9UK76-2	Isoform 2 of Jupiter microtubule associated homolog 1	19.9	4	0	90
Q9UKA4	A-kinase anchor protein 11	210.4	10	0	35
Q9UKES-1	Traf2 and NCK-interacting protein kinase	154.8	6	0	64
Q9UKF7	Cytoplasmic phosphatidylinositol transfer protein 1	38.4	5	0.005	6
Q9UKG1	DCC-interacting protein 13-alpha	79.6	1	0.004	1
Q9UKI2	Cdc42 effector protein 3	27.7	6	0	32
Q9UKJ3-1	G patch domain-containing protein 8	164.1	9	0	72
Q9UKK3	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	192.5	3	0.003	5
Q9UKK9	ADP-sugar pyrophosphatase	24.3	1	0.002	2
Q9UKL0	REST corepressor 1	53.3	1	0	7
Q9UKM9-1	RNA-binding protein Raly	32.4	6	0	169
Q9UKN8	General transcription factor 3C polypeptide 4	91.9	1	0.004	3
Q9UKS6	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 3	48.5	3	0	7
Q9UKT5	F-box only protein 4	44.1	3	0.009	6
Q9UKV3-1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	151.8	41	0	534
Q9UKX7	Nuclear pore complex protein Nup50	50.1	3	0.003	7
Q9ULC3	Ras-related protein Rab-23	26.6	3	0.003	11
Q9ULC5-3	Isoform 2 of Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	82.2	1	0.003	2
Q9ULD2-1	Microtubule-associated tumor suppressor 1	141.3	8	0	23
Q9ULE0	Protein WWC3	122.6	10	0	14
Q9ULH0-1	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	196.4	1	0.004	1
Q9ULH1-2	Isoform 1 of Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	125.8	10	0	87
Q9ULH7-5	Isoform 5 of MKL/myocardin-like protein 2	119.1	9	0.006	18
Q9ULI8-3	Isoform 3 of Neurabin-1	154	2	0.004	4
Q9ULL5-3	Isoform 3 of Proline-rich protein 12	210.9	6	0	8
Q9ULL8-1	Protein Shroom4	164.8	5	0	9
Q9ULQ0-1	Striatin-interacting protein 2	95.3	1	0.006	1
Q9ULT0-4	Isoform 3 of Tetra-trico-peptide repeat protein 7A	98.9	1	0.006	5
Q9ULT8	E3 ubiquitin-protein ligase hctd1	289.2	4	0.004	11
Q9ULU4-19	Isoform 19 of Protein kinase C-binding protein 1	137.9	16	0	63
Q9ULX3	RNA-binding protein NOB1	46.6	1	0.003	2
Q9UM54-3	Unconventional myosin-VI	149.6	1	0.005	2
Q9UMN6	Histone-lysine N-methyltransferase 2B	293.3	1	0.006	1
Q9UMS6-2	Isoform 2 of Synaptopodin-2	136.3	27	0	209
Q9UMX3	Bcl-2-related ovarian killer protein	23.3	2	0.004	4
Q9UMZ2-1	Synergism gamma	140.6	11	0	50
Q9UN36-1	Protein NDRG2	40.8	12	0	162
Q9UN79	Transcription factor SOX-13	69.2	3	0	64
Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	54.1	4	0	55
Q9UN86-2	Isoform B of Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	50.8	3	0	234
Q9UNE7-1	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP	34.8	2	0	29

Q9UNF1	Melanoma-associated antigen D2	64.9	5	0	20
Q9UNL2-2	Isoform 2 of Translocon-associated protein subunit gamma	22.6	2	0	8
Q9UNZ2-5	Isoform 3 of NSF1 cofactor p47	40.8	2	0	66
Q9UP95-7	Isoform 7 of Solute carrier family 12 member 4	119.7	2	0.004	2
Q9UPN3	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	837.8	12	0	106
Q9UPN4	centrosomal protein of 131 kDa	122.1	5	0	14
Q9UPN6-2	Isoform 2 of Protein SCAF8	147.3	4	0.004	15
Q9UPN9-1	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM33	122.5	1	0.004	10
Q9UPP1	Histone lysine demethylase PHF8	117.8	3	0.001	3
Q9UPQ0-3	Isoform 3 of LIM and calponin homology domains-containing protein 1	164.3	39	0	459
Q9UPR0-1	inactive phospholipase C-like protein 2	125.8	1	0.007	2
Q9UPS6-1	Histone-lysine N-methyltransferase SETD1B	212.7	2	0.005	2
Q9UPT8	Zinc finger CCCH domain-containing protein 4	140.2	9	0	54
Q9UPI5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24	294.2	8	0	71
Q9UPI7-1	TBC1 domain family member 2B	109.8	5	0	51
Q9UPI9-1	Protein Smaug homolog 1	79.4	3	0.005	5
Q9UPX8-3	Isoform 3 of SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2	201.1	2	0.003	4
Q9UQ35	serine/arginine repetitive matrix protein 2	299.4	218	0	2201
Q9UQ80	proliferation-associated protein 2G4	43.8	3	0.003	10
Q9UQB8	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	60.8	4	0.003	16
Q9UQC2-1	GRB2-associated-binding protein 2	74.4	3	0.003	9
Q9UQE7	Structural maintenance of chromosomes protein 3	141.5	4	0	30
Q9UQL6-3	Isoform 3 of Histone deacetylase 5	122	1	0.004	2
Q9UQN3-1	Charged multivesicular body protein 2b	23.9	2	0.004	15
Q9UQR0	Sex comb on midleg-like protein 2	77.2	2	0	6
Q9UQR1	Zinc finger protein 148	88.9	7	0.005	11
Q9Y210-1	Short transient receptor potential channel 6	106.3	1	0.004	9
Q9Y217-1	Myotubularin-related protein 6	71.9	1	0.005	2
Q9Y286	Sialic acid-binding Ig-like lectin 7	51.1	2	0.004	2
Q9Y2D5-4	Isoform 3 of A-kinase anchor protein 2	122	20	0	294
Q9Y2F5	Little elongation complex subunit 1	247.7	5	0.002	7
Q9Y2H5	Pleckstrin homology domain-containing family A member 6	117.1	3	0	23
Q9Y2I7-1	1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase	237	2	0.006	3
Q9Y2J2-4	Isoform 4 of Band 4.1-like protein 3	98.4	8	0	19
Q9Y2K1	Zinc finger and BTB domain-containing protein 1	82	4	0.008	6
Q9Y2K2-4	Isoform 4 of Serine/threonine-protein kinase SIK3	133.6	4	0.005	4
Q9Y2K5-1	R3H domain-containing protein 2	106.9	3	0	3
Q9Y2K6	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 20	101.9	4	0	7
Q9Y2K7	Lysine-specific demethylase 2A	132.7	3	0.003	5
Q9Y2I9-3	Isoform 3 of Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 1	84.6	2	0	3
Q9Y2Q0	Phospholipid-transporting ATPase 1A	131.3	4	0	15
Q9Y2R2-1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22	91.6	2	0.004	6
Q9Y2U5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	69.7	3	0	33
Q9Y2U8	inner nuclear membrane protein Man1	99.9	4	0	12
Q9Y2V2	Calcium-regulated heat-stable protein 1	15.9	3	0	185
Q9Y2W1	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	108.6	18	0	284
Q9Y2X3	Nucleolar protein 58	59.5	4	0	62
Q9Y2X7-3	Isoform 3 of ARF GTPase-activating protein GIT1	85.4	12	0	40
Q9Y343	Sorting nexin-24	19.8	2	0	8
Q9Y365	START domain-containing protein 10	33	4	0.003	68
Q9Y385	ubiquitin-conjugating enzyme e2 j1	35.2	4	0	73
Q9Y388	RNA-binding motif protein, X-linked 2	37.3	4	0.004	19
Q9Y3E1	Hepatoma-derived growth factor-related protein 3	22.6	2	0	4
Q9Y3E7-3	Isoform 3 of Charged multivesicular body protein 3	28.4	1	0	5
Q9Y3L3-1	SH3 domain-binding protein 1	75.7	5	0	113
Q9Y3M2	Protein chibby homolog 1	14.5	1	0.006	1
Q9Y3M8-1	StAR-related lipid transfer protein 13	124.9	1	0.004	2
Q9Y3P9	Rab GTPase-activating protein 1	121.7	2	0.004	13
Q9Y3T9	Nucleolar complex protein 2 homolog	84.9	3	0	29
Q9Y3X0	coiled-coil domain-containing protein 9	59.7	8	0	37
Q9Y3Z3	deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	72.2	1	0.006	1
Q9Y426	C2 domain-containing protein 2	75.5	6	0.003	6
Q9Y446-2	Isoform PKP3b of Plakophilin-3	88.6	2	0.003	25
Q9Y478	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1	30.4	1	0	19
Q9Y485	DmX-like protein 1	337.6	11	0	18
Q9Y490	Talin-1	269.6	19	0	252
Q9Y4A5	Transformation/transcription domain-associated protein	437.3	3	0	18
Q9Y4C1	Lysine-specific demethylase 3A	147.2	3	0.003	3
Q9Y4D8-1	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4	439.1	7	0	26
Q9Y4E1-4	Isoform 4 of WASH complex subunit 2C	144.8	15	0	104
Q9Y4E6-1	WD repeat-containing protein 7	163.7	3	0.003	7
Q9Y4E8	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	112.3	6	0	12
Q9Y4F1-2	Isoform 2 of FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1	122	13	0	66
Q9Y4F3-1	Meiosis regulator and mRNA stability factor 1	192.7	2	0.004	13
Q9Y4F5	Centrosomal protein of 170 kDa protein B	171.6	8	0.002	8
Q9Y4F9	RHO family-interacting cell polarization regulator 2	118.4	1	0.004	6
Q9Y4G6	Talin-2	271.4	1	0.003	6
Q9Y4G8	rap guanine nucleotide exchange factor 2	167.3	6	0.003	12
Q9Y4H2	Insulin receptor substrate 2	137.2	5	0	9
Q9Y4H4	G-protein-signaling modulator 3	17.9	2	0.003	67
Q9Y4I1-3	Isoform 3 of Unconventional myosin-Va	218.5	3	0.003	18
Q9Y4J8-1	Dystrobrevin alpha	83.8	9	0	23
Q9Y4K1	beta/gamma crystallin domain-containing protein 1	188.6	5	0.004	7
Q9Y4K4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	95	1	0.004	1
Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1	111.3	1	0	8
Q9Y4W2	Ribosomal biogenesis protein LAS1L	83	1	0.004	5
Q9Y520-7	Isoform 7 of Protein PRR2C	316.9	8	0	12
Q9Y572-1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3	56.9	2	0	12
Q9Y580	RNA-binding protein 7	30.5	2	0.005	20
Q9Y5B0	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase	104.3	1	0.006	1
Q9Y5J1	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog	62	6	0	72
Q9Y5K6	CD2-associated protein	71.4	9	0	73
Q9Y5Q9	General transcription factor 3C polypeptide 3	101.2	1	0	13
Q9Y5S2	Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	194.2	2	0	34
Q9Y5T5-1	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16	93.5	4	0	21
Q9Y5W3	Krueppel-like factor 2	37.4	2	0.004	12
Q9Y5X3	sorting nexin-5	46.8	2	0	16
Q9Y5Y0	Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1	59.8	1	0.006	1
Q9Y608	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	82.1	8	0	29
Q9Y608-5	Isoform 5 of Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	57.4	8	0	29
Q9Y613	FH1/FH2 domain-containing protein 1	126.5	4	0	17
Q9Y618-1	Nuclear receptor corepressor 2	274.6	18	0	51
Q9Y624	Junctional adhesion molecule A	32.6	1	0.005	4
Q9Y666	Solute carrier family 12 member 7	119	3	0.003	3
Q9Y6D5	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	201.9	4	0	37

Q9Y6D6	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1	208.6	3	0	6
Q9Y6F6-7	Isoform 7 of Protein MRVI1	98.8	7	0	22
Q9Y6G9	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	56.5	7	0.003	71
Q9Y6I3-1	Isoform 2 of Epsin-1	69	7	0	76
Q9Y6J0	Calcineurin-binding protein cabin-1	246.2	2	0.006	2
Q9Y6K1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A	101.8	1	0.003	5
Q9Y6M1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	66.1	3	0.005	10
Q9Y6M4-4	Isoform 4 of Casein kinase I isoform gamma-3	49	3	0.004	4
Q9Y6M7-13	Isoform 13 of Sodium bicarbonate cotransporter 3	127.7	4	0	8
Q9Y6N5	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	49.9	1	0.004	3
Q9Y6Q9-1	Nuclear receptor coactivator 3	155.2	2	0.004	3
Q9Y6R1-5	Isoform 5 of Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	123.1	4	0.002	6
Q9Y6R9	Coiled-coil domain-containing protein 61	57.3	3	0.003	6
Q9Y6X4-1	Soluble lamin-associated protein of 75 kDa	74.9	2	0.004	2
Q9Y6X9-1	MORC family CW-type zinc finger protein 2	117.8	8	0	57

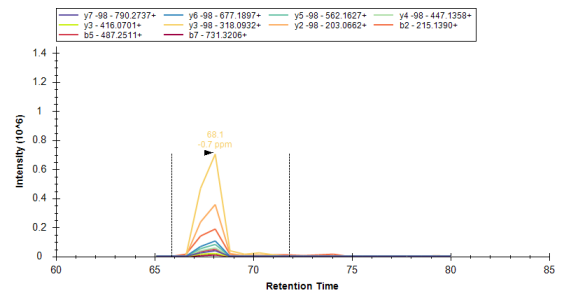
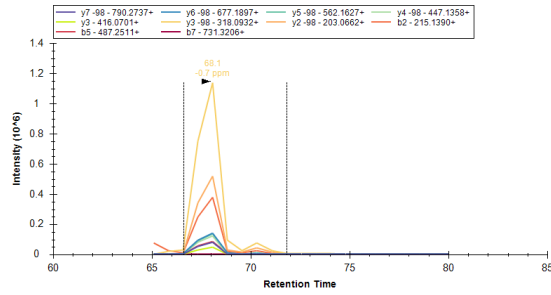
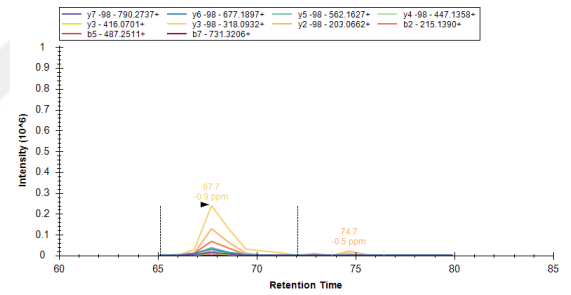
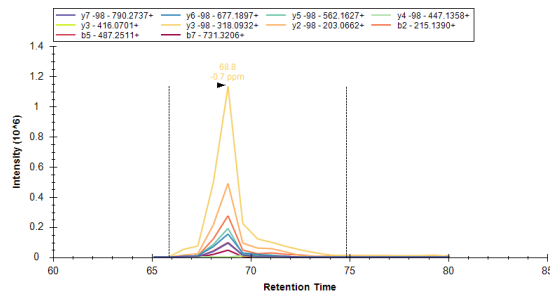


Osteoclast-Stimulating Factor- Q92882

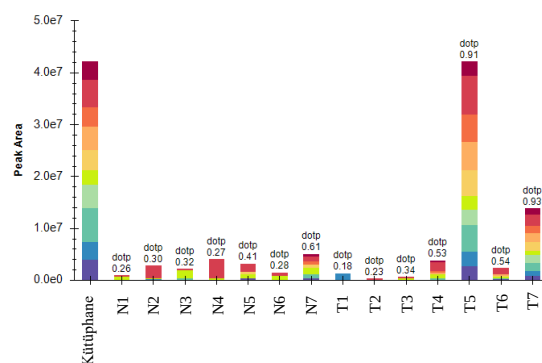
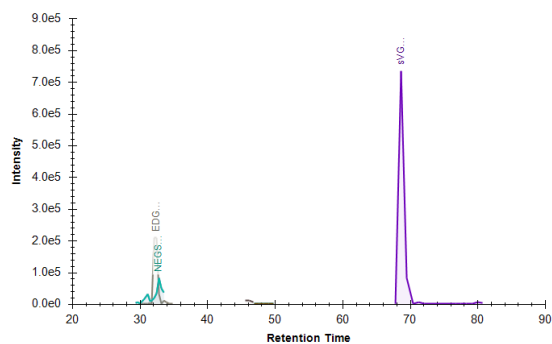


Peptit Dizisi -- R.TLSNAEDYLDDSD.

Örnek-1 ve Örnek-5

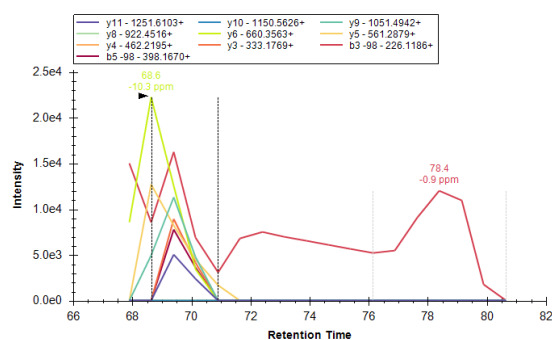
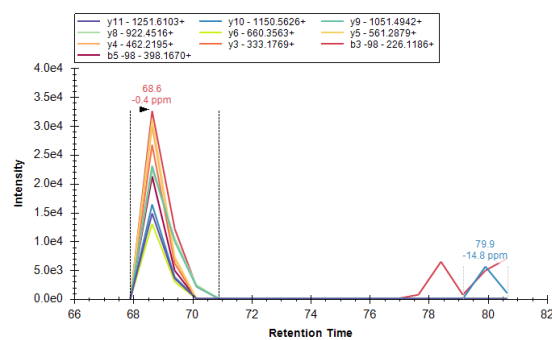
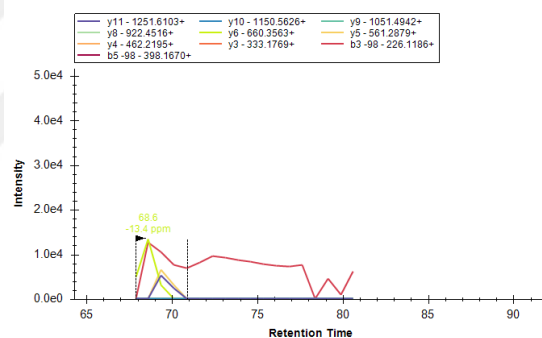
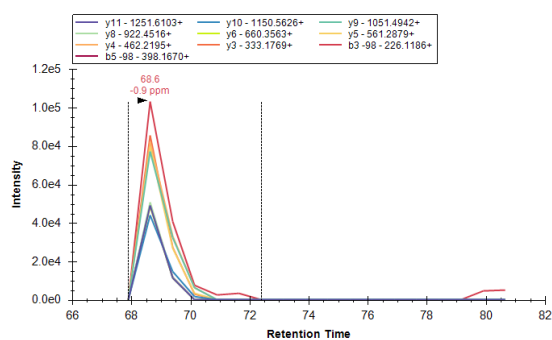


Nuclease-Sensitive Element-Binding Protein 1- P67809

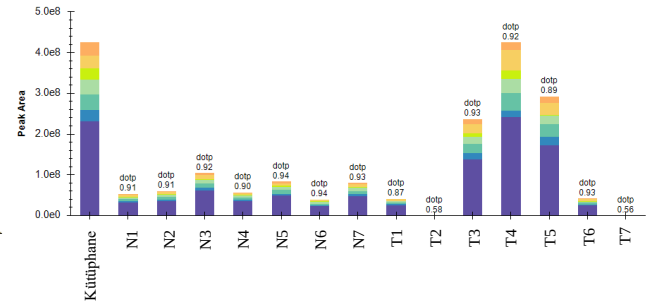
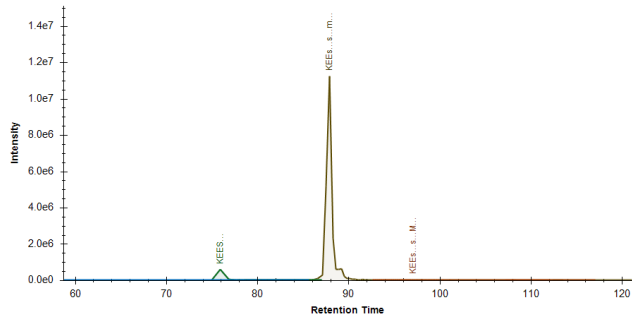


Peptit Dizisi -- R.SVG DGETVEFDVVEGEK.G

Örnek-5 ve Örnek-7

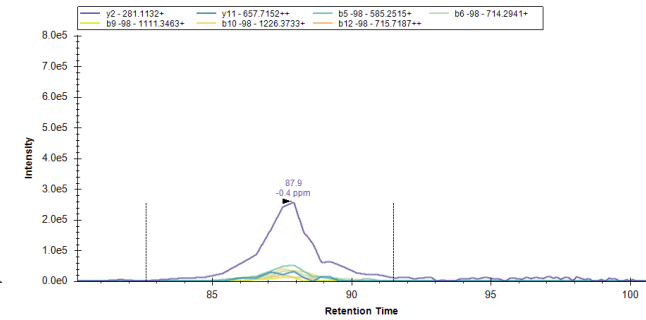
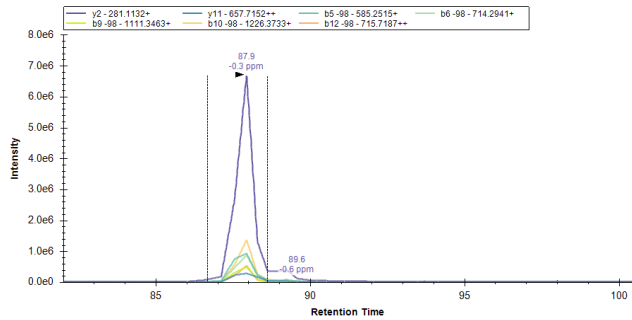
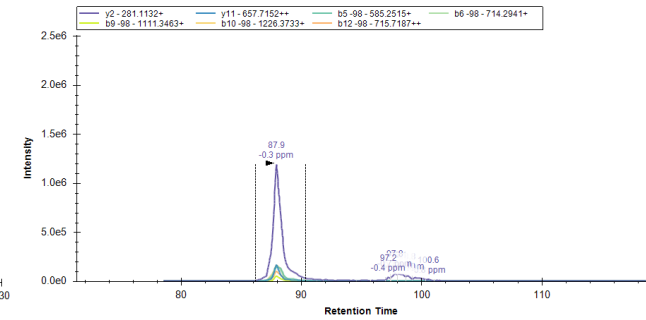
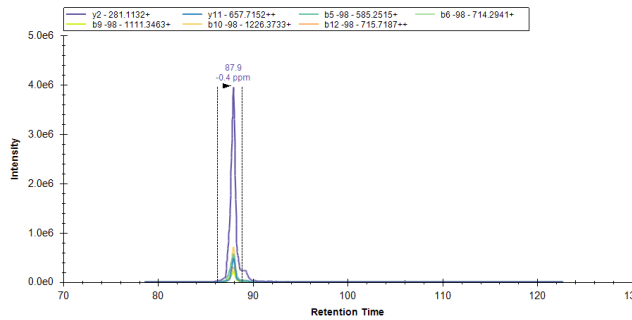


60S Acidic Ribosomal Protein P2- P05387

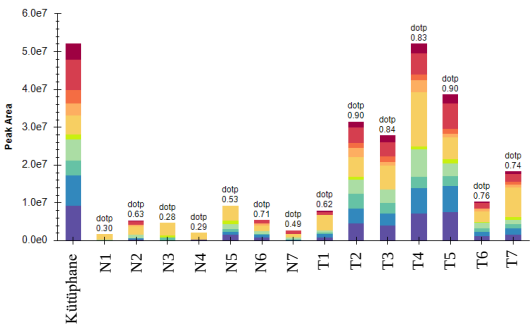
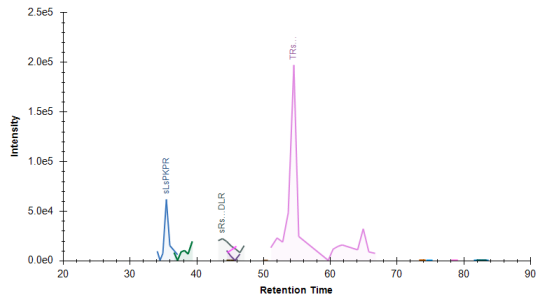


Peptit Dizisi -- K.KEESEESDDDMGFGLFD

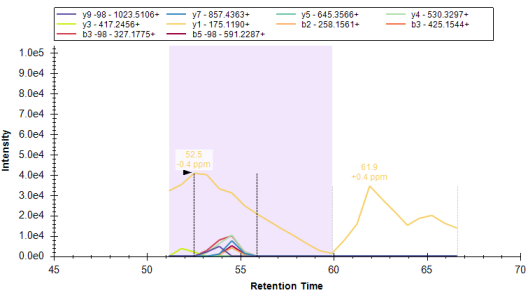
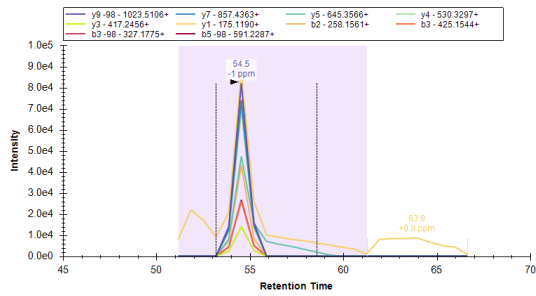
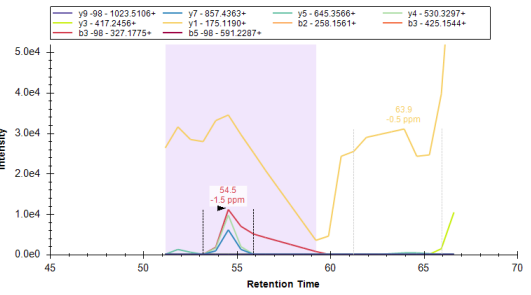
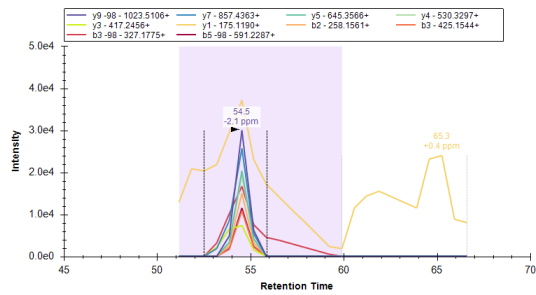
Örnek-3 ve Örnek-4



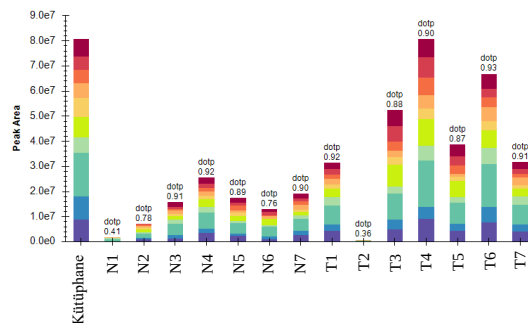
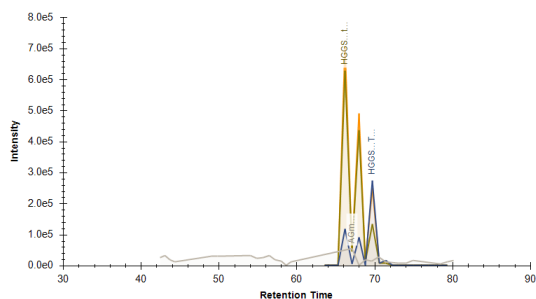
Serine/Threonine-Protein Kinase PRP4 Homolog- Q13523



Peptit Dizisi -- R.TRSPSPDDILER.V
Örnek-4 ve Örnek-7

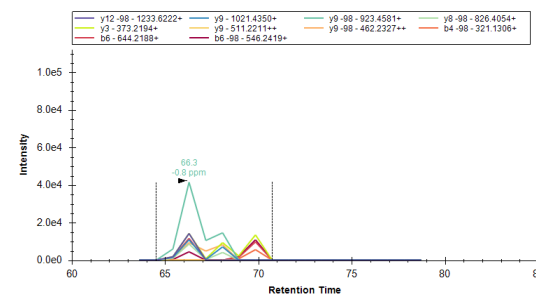
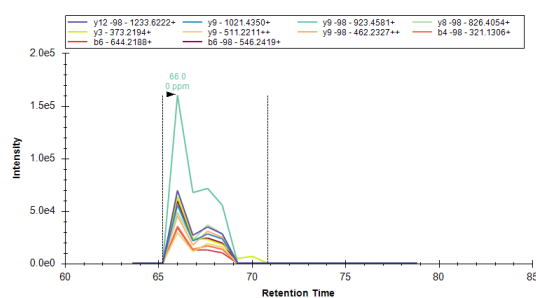
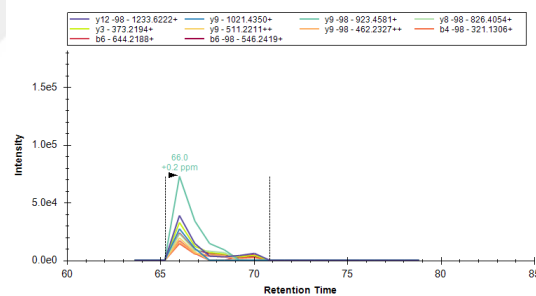
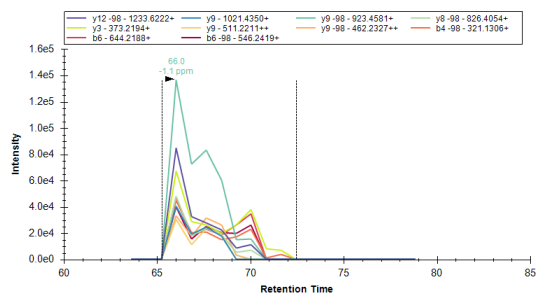


Serine/arginine repetitive matrix protein 2- Q9UQ35

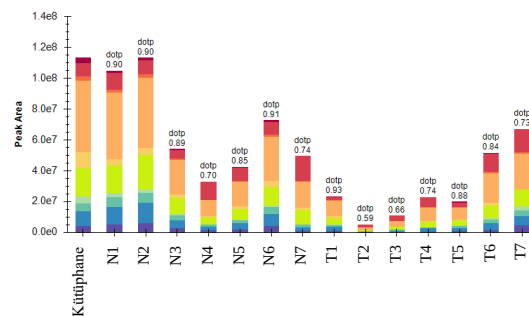
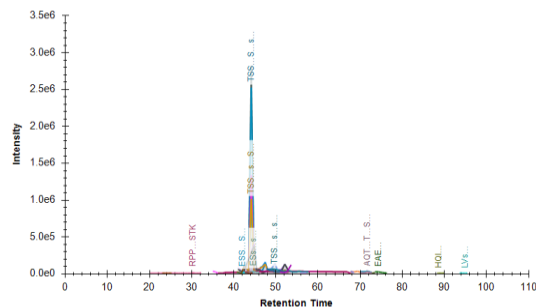


Peptit Dizisi -- R.HGGSPQPLATTPLSQEPVNPPEASPT

Örnek-4 ve Örnek-6

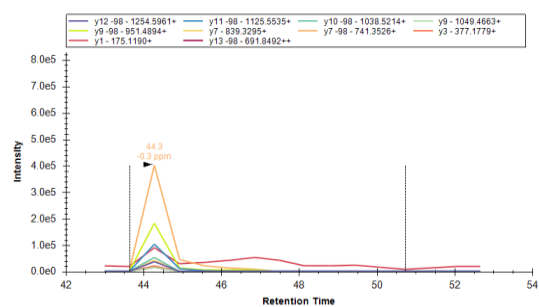
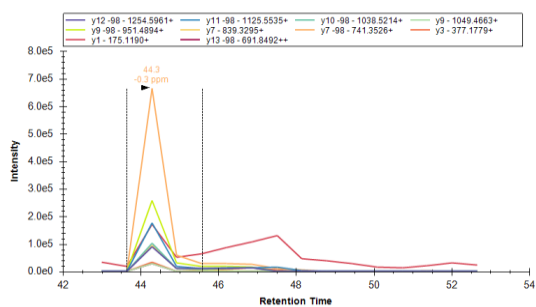
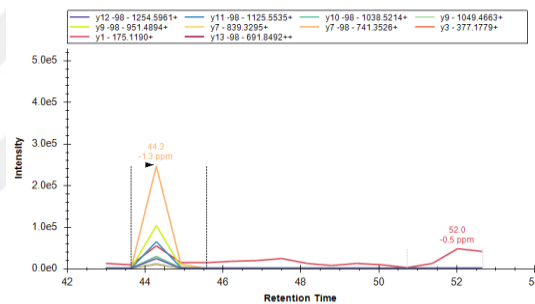
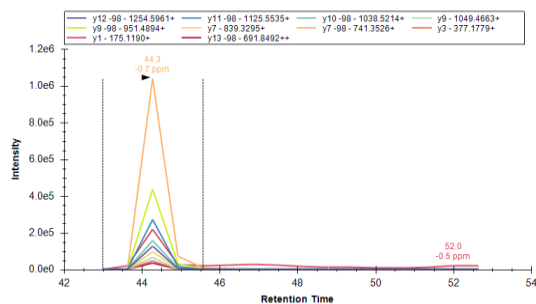


Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1- Q01082-1

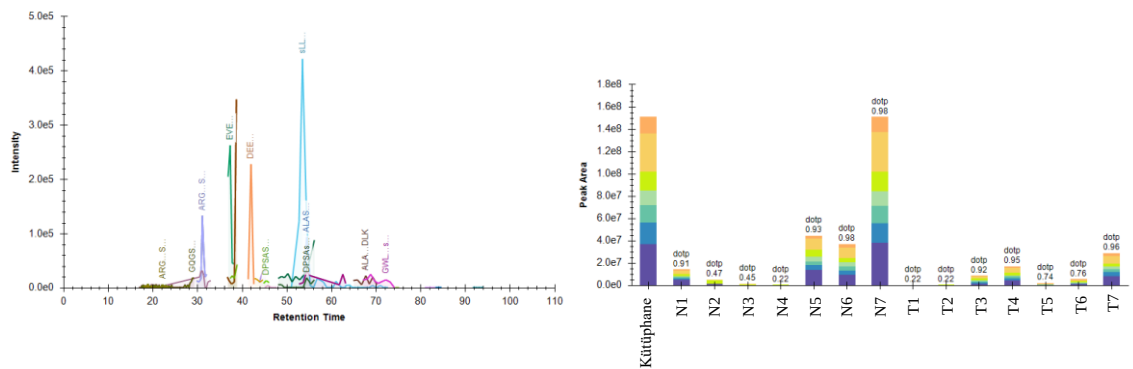


Peptit Dizisi – R.TSSKESSPIPSPTSDR.K

Örnek-2 ve Örnek-6

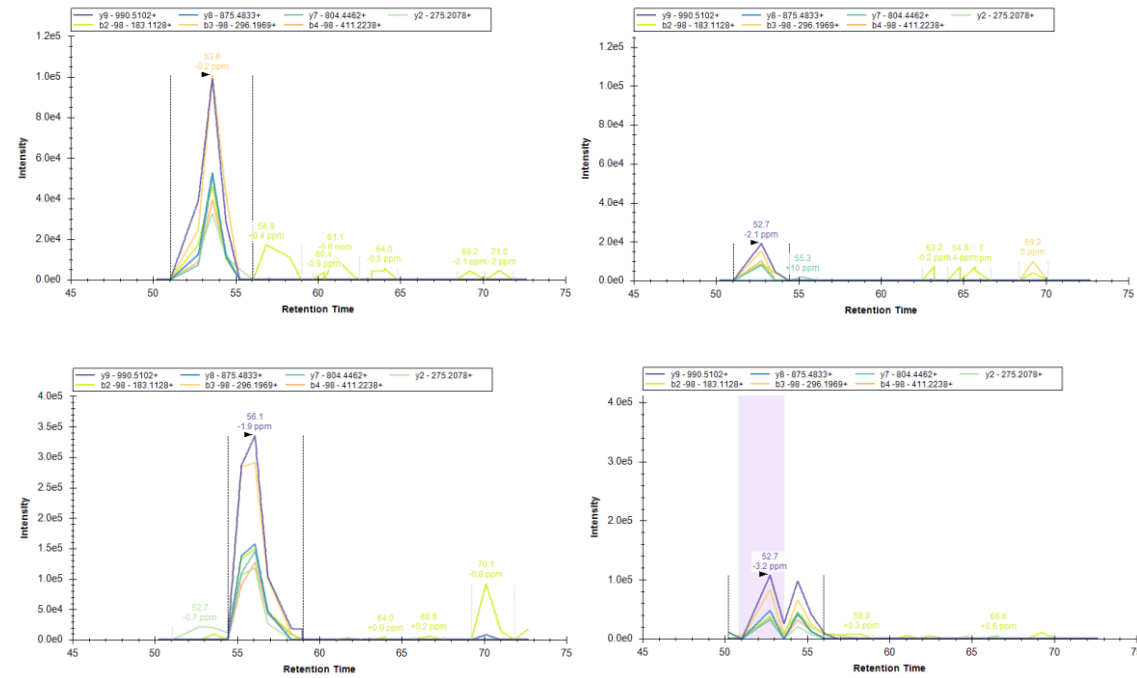


Isoform 1 of Vinculin- P18206-2

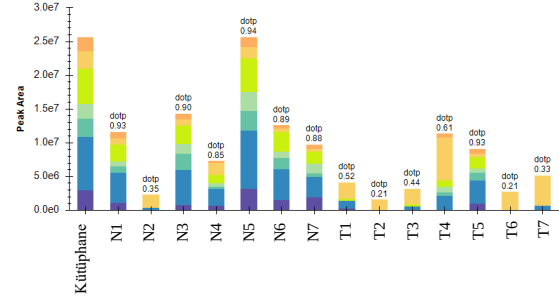
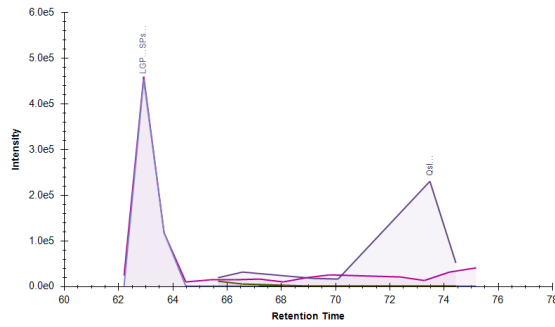


Peptit Dizisi – K.SLLDASEEAIKK.D

Örnek-6 ve Örnek-7

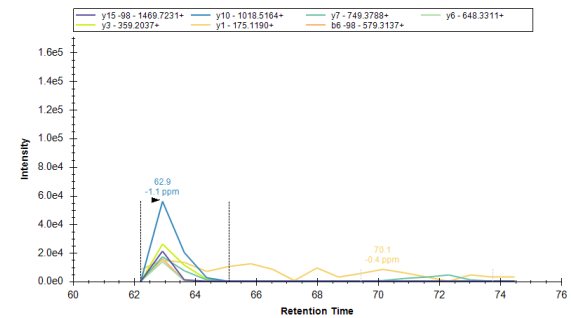
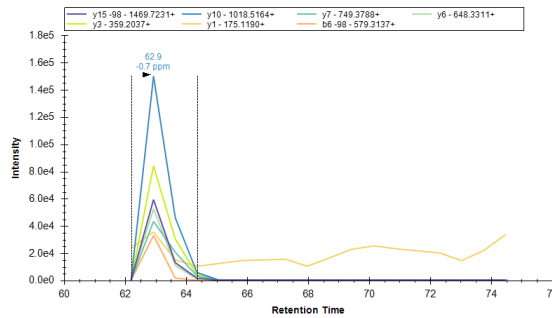
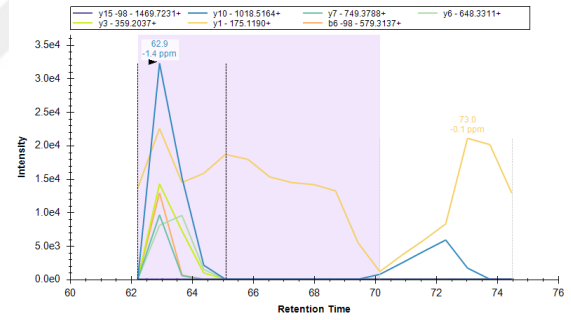
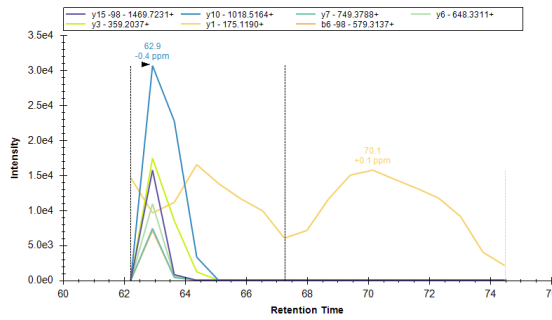


mRNA Decay Activator Protein ZFP36- P26651

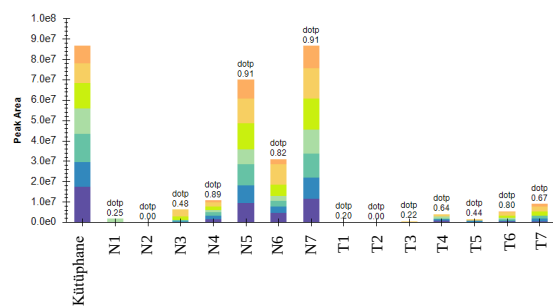
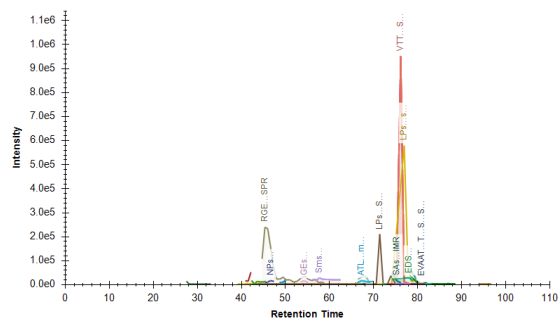


Peptit Dizisi – R.LGPELSPSPTSPTATSTTPSR.Y

Örnek-4 ve Örnek-5

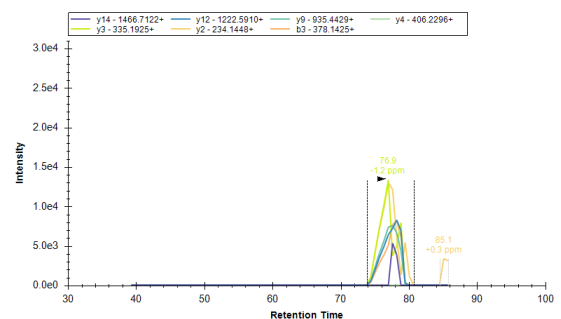
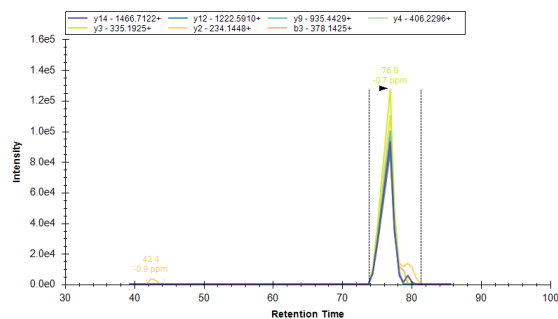
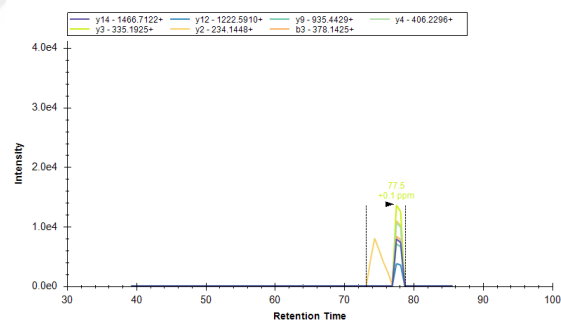
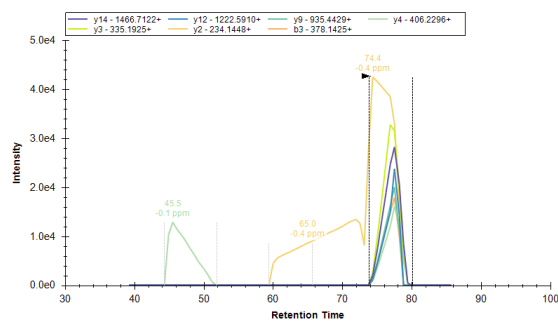


LIM domain only protein 7- Q8WWI1

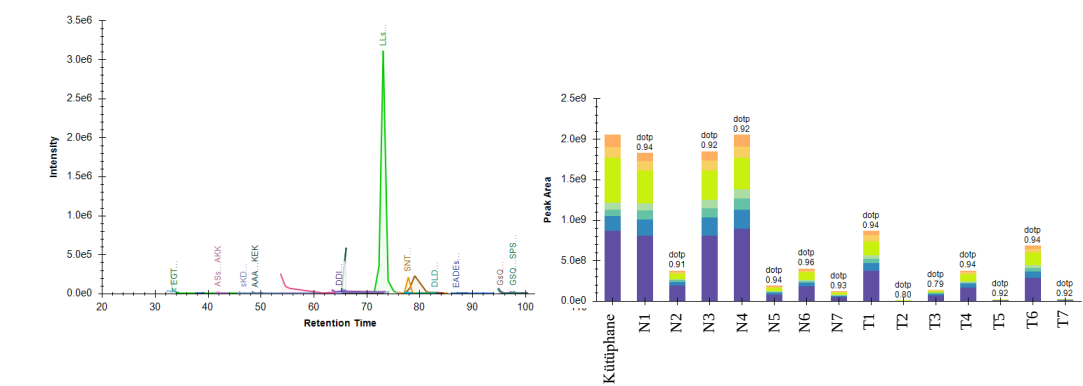


Peptit Dizisi – R.LPSPTSPFSSLSQDQAATSK.A

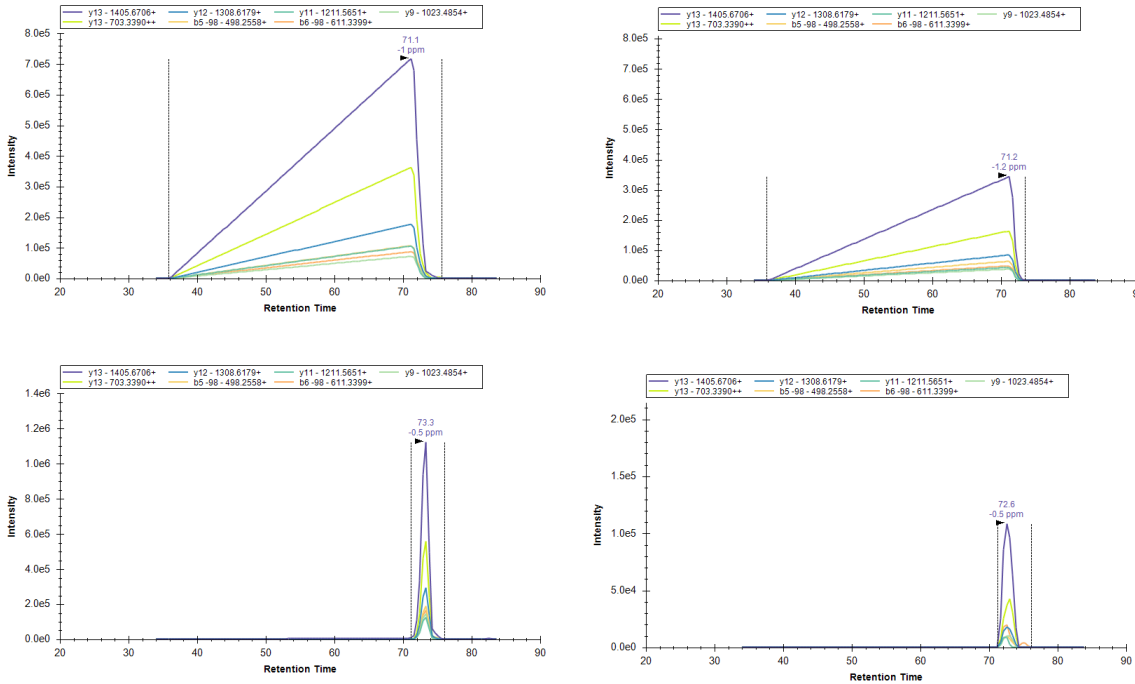
Örnek-5 ve Örnek-6



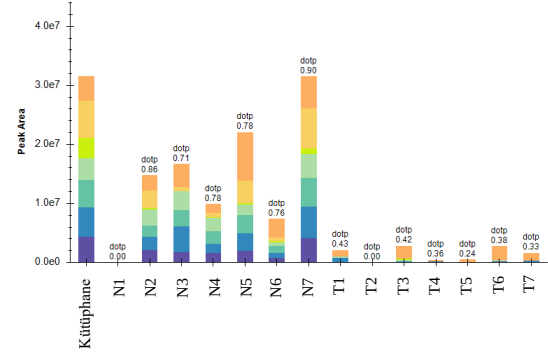
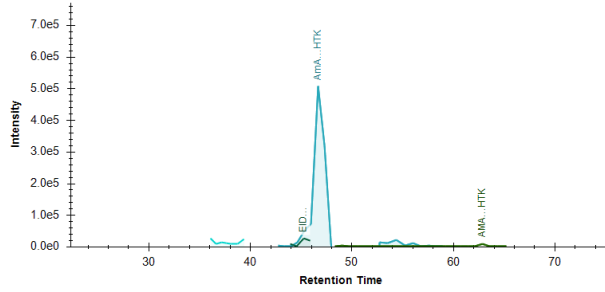
Talin-1 - Q9Y490



Peptit Dizisi – R.LLSDSLPPSTGTFQEAQSR.L
Örnek-1 ve Örnek-5

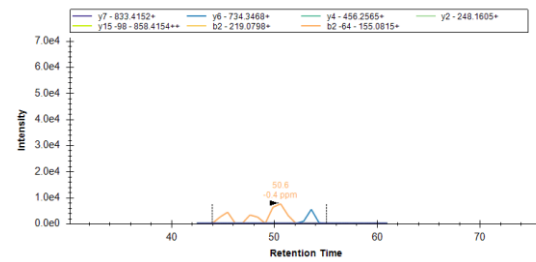
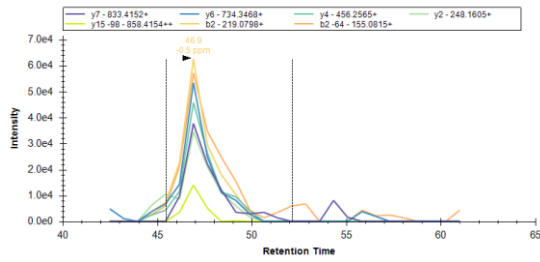
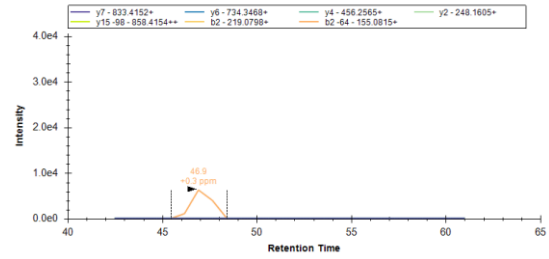
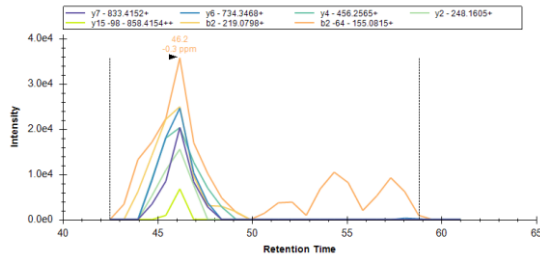


Caveolin-1 - Q03135



Peptit Dizisi – K.AMADELSEKQVYDAHTK.E

Örnek-5 ve Örnek-7



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 yürüttüğü TUBİTAK 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 bakıma 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

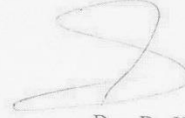
Sayı : 10840098 – 01
Konu: Etik Kurulu Kararı

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 İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERLERİNDE ADAY BİYOBELİRTEÇLERİN KEŞFİ AMACIYLA POST TRANSLASYONEL MODİFİKASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

ORIJİNALLIK RAPORU

% 1	% 1	% 0	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
2	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<% 1
3	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to Monash University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to University of Edinburgh Öğrenci Ödevi	<% 1
6	www.guncelghs.org İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Methods in Molecular Biology, 2015. Yayın	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mustafa G.	Soyadı	Sürmen
Doğ.Yeri	Karabük	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	DÜZCE Üniversitesi-Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	2012
Lisans	İstanbul Üniversitesi-Biyoloji	2005
Lise	Çapa Anadolu Öğretmen Lisesi-GAÖL	2000

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	Üsküdar Üniversitesi	2014-2015

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	65	78

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Proteome Discoverer (Thermo Scientific)	
Progenesis ve PLGS (Waters)	
Skyline (MacCoss Lab)	
Cytoscape (NIGMS; NRNB)	

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Thermo Q-Exactive Plus Orbitrap nanoLC-MSMS	Kullanıcı Eğitimi ve Deneyimi
MCLASS Synapt G2-Si nanoLC-MSMS	Kullanıcı Eğitimi ve Deneyimi
ICLAS-Xevo TQ-S LC-MSMS	Kullanıcı Eğitimi
Water Alliance HPLC	Kullanıcı Eğitimi
Shimadzu HPLC	Kullanıcı Deneyimi
Sıvı Kromatografisi Modern Kolon Kimyası ve Kolonların Uygun Kullanımı Eğitimi	
SELÇUKSEM AR-LAB Sertifikalı ve Uygulamalı HPLC & GC Eğitimi	

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

