

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA KARŞILAŞTIRMALI YÜZEY
PROTEOM ANALİZİ**

Mehmet SARIHAN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2023

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA KARŞILAŞTIRMALI YÜZEY
PROTEOM ANALİZİ**

Mehmet SARIHAN

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Murat KASAP

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 2019/091)
Taraından Desteklenmiştir

KOCAELİ

2023

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Meme Kanseri Hücre Hatlarında Karşılaştırmalı Yüzey Proteom Analizi

Tez Yazarı: Mehmet SARIHAN

Tez Savunma Tarihi: 17/01/2023

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KASAP

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		
UNVANI	ADI SOYADI	İMZA
BAŞKAN (ÜYE)		
DANIŞMAN (ÜYE)		
ÜYE		
ÜYE		
ÜYE		
ÜYE		

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /20...

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Meme Kanseri Hücre Hatlarında Karşılaştırmalı Yüzey Proteom Analizi

Amaç: Günümüzde yaygın olarak görülen kanser türlerinden meme kanseri (MK), dünya genelinde yüksek insidansa ve ölüm oranına sahiptir. Yıllardır süren çalışmalara ve kaydedilen önemli bilimsel gelişmelere rağmen, MK'nin teşhisi ve tedavisi için henüz özgün bir biyobelirteç bulunamamıştır. Tez çalışması kapsamında sağlıklı (MCF-10A) ve kanserli meme hücre hatlarının (MCF-7 ve MDA-MB-231), karşılaştırmalı hücre yüzey proteom analizleri yapılarak meme kanseri teşhis ve tedavisinde kullanılma potansiyeli olabilecek biyobelirteç adayları saptandı. Tez kapsamında analizler gerçekleştirilirken hücre proteomunun deneysel şartlardan etkilenmemesi ve hücre yüzey proteomundaki gerçek değişimlerin saptanabilmesi için literatürde sıkça kullanılan ancak problemlili bir yaklaşım olan kimyasal biyotininilasyon yerine tez kapsamında geliştirdiğimiz yeni bir yaklaşım olan enzimatik biyotininilasyon metodu kullanıldı.

Yöntem: Çalışma kapsamında hücre yüzey proteinlerini (HYP) biyotin ile etiketlemek için TurboID enzimi *Escherichia coli* (*E. coli*) hücrelerinde üretilip saflaştırıldı ve ardından saf enzim hücrelerin bulunduğu kültür ortamına eklenerek HYP'lerin biyotin ile etiketlenmesi sağlandı. Etiketlenen proteinler streptavidin kaplı manyetik boncuklar yardımıyla zenginleştirildi ve ve triptik kesim sonrası nLC-MS/MS sistemi üzerinden analizleri yapıldı. Elde edilen MS-MS sonuçları Proteom Discoverer 2.5, String ve g-Profiler araçları kullanılarak analiz edildi. Sonuçların doğrulanması için ifade düzeyi değişen 2 protein seçilerek (VDAC1 ve N-Cadherin) Western Blot (WB) analizleri yapıldı. WB analizlerinde gözlemlenen bant yoğunluklarındaki değişimler Quantity One yazılımı ile değerlendirildi.

Bulgular: Yapılan çalışmalar sonucunda toplamda 1112 adet protein tanımlanmış ve analiz edilmiştir. Bu proteinlerin 425 tanesi plazma membranı (PM) lokalize olurken, 217'sinin hücre dışı matriks, salgı proteinleri ve hücre-hücre bağlantı proteinlerinden oluştuğu görüldü. Kalan 470 adet protein analiz edildiğinde ise bu proteinlerin ağırlıklı olarak mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi ve diğer hücresel membranlarda lokalize olduğu belirlendi. nLC-MS/MS verileri kullanılarak yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda 194

plazma proteinin hücre grupları arasında anlamlı farklılıklar gösterdiği saptandı. VDAC1 ve N-Cadherin antikoru kullanılarak doğrulama amaçlı yapılan analizler, nHPLC LC-MS/MS analizleri ile benzer sonuç verdiği ve tasarlanan yaklaşımın güvenilir bir şekilde çalıştığı görüldü.

Sonuç: Tez kapsamında geliştirdiğimiz yeni ve özgün yaklaşımla yapılan HYP'lerin biyotin ile etiketlenmesi ve sonrasında streptavidin boncukları ile zenginleştirilmesi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar hücreler grupları arasında ifade farklılıklarının olduğunu gösteren 194 adet proteinin varlığını ortaya koydu ve bu proteinlerin potansiyel biyobelirteç aday olduğunu gösterdi. Aynı zamanda literatürde yapılmış olan çalışmaların sonuçlarımızı büyük çoğunlukta doğrulandığı görüldü. Tez kapsamında belirlediğimiz aday biyobelirteçlerin büyük bir çoğunluğu son 5 yıl içerisinde farklı kanser hastalıkları ile ilişkilendirilmiş olup, bunlar ile alakalı kısıtlı sayıda çalışmanın yapıldığı anlaşılmıştır. Bazı proteinlerin ifade düzeylerindeki değişim ise çalışmamız kapsamında ilk defa meme kanseri hücre hatlarında gösterilmiştir. Bu proteinlerin meme kanseri oluşumunda veya metastazındaki etkileri ve muhtemel ilaç hedefi olup olmayacakları gelecekte yapılacak çalışmalarla irdelenmelidir. Gelecekte elde edilecek veriler meme kanserinin erken tanısına dair ipuçlarını içerisinde barındıracaktır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri biyobelirteçleri, Membran proteom analizi, Enzimatik biyotininilasyon

ABSTRACT

Comparative Surface Proteome Analysis in Breast Cancer Cell Lines

Background: Breast cancer (BC) is one of the most common cancers with a high incidence and mortality rates worldwide. Despite years of research and development, no specific biomarker for the diagnosis and treatment of BC has yet to be found. In this study, we attempted to detect candidate cell surface biomarker proteins from cell lines of healthy and cancerous breast tissue. In our study, an enzymatic biotinylation method was used rather than the commonly-used chemical biotinylation method to prevent off-target effects on the cell metabolism.

Method: In this study a promiscuous biotin ligase enzyme, TurboID, was produced in *E. coli* and purified to homogeneity. The pure enzyme was then added to the cell culture medium and cell surface proteins (CSP's) were biotinylated. The cells were washed and protein isolation were carried out. The biotin-labelled proteins were enriched using streptavidin-coated magnetic beads and nLC-MS/MS analyses were performed after performing tryptic digestions. Results were analysed using Proteom Discoverer 2.5, String and g-Profiler tools and confirmed by Western blot analysis.

Result: A total of 1112 proteins were identified. 642 proteins of these proteins that constituted approximately 60%, belonged to plasma membrane and extracellular space. Of the 673 proteins, 425 localized the plasma membrane, while the rest 217 proteins were found to be localized in the extracellular matrix and cell-cell junction proteins. When the remaining 470 proteins were analysed, their localizations differed and they were found to be localized to the mitochondria, endoplasmic reticulum, golgi and other organelle membranes. Upon comparative analyses of the nLC-MS/MS data, 194 plasma proteins were determined to be differentially regulated among the cell lines. For confirmation of differential regulations determined by label-free comparative nLC-MS/MS analysis and effect of biotinylation, western blot experiments were performed with antibodies against VDAC1 and N-Cadherin proteins. The western blot results were in agreement with nLC-MS/MS results indicating that the designed approach was efficient and reliable.

Conclusion: We designed a novel approach in which the labelling of CSP's with biotin and their enrichment with streptavidin beads were successfully carried out. A total of 194, differentially regulated were identified which were potential biomarker candidates. Additionally, our results were highly supported and confirmed by previous studies and it has been observed that most of the candidate biomarkers have been associated with cancer in the last 5 years and It has been understood that a limited number of studies have been performed about these proteins. At the same time, some of the proteins have been comparatively analysed in breast cancer cell lines for the first time with this study. In the future, these proteins will be scrutinized to evaluate their potential biomarker properties.

Keywords: Breast cancer biomarkers, Membrane proteome analysis, Enzymatic biotinylation

TEŞEKKÜR

Bana kattığı değerler, deneyimler, bilgi ve birikimleri ve her türlü desteği için değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat KASAP'a minnet ve şükranlarımı sunarım. Kendisi benim için bir danışmandan çok öte her zaman desteğini, samimiyetini, arkamda gücünü hissettiğim ve bana aile olma hissini her zaman hissettiren bir büyüğüm olarak hayatımda yer aldığı için kendisine teşekkür ederim. Kendisi ile yollarımız keşismesi ve çalışmak benim için çok değerli ve özeldir ve öyle de kalacaktır. Değerli hocam ve büyüğüm, Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a hayatıma kattıkları, ilgisi, desteği, samimiyeti ve gösterdiği abiliği için teşekkür ederim.

Değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Aylin Kanlı'ya, desteklerine esirgemeyen kıymetli ve değerli arkadaşlarım Merve Gülsen BAL ALBAYRAK, Sevinç YANAR, Candan YILMAZ ÖZDOĞAN'a, laboratuvarındaki değerli kardeşlerim Elifcan KOÇYİĞİT, Elif İlknur ŞAHİN, Hümeysra Şeyma ÜNLÜ ve Elif AKINCI ile desteğini ve ilgisini eksik etmeyen, her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli kardeşim Asuman DEVECİ ÖZKAN'a

Verdikleri destekleri ve bıraktıkları güzel anılar için şuan bizlerle olmayan değerli arkadaşlarım Kübra KARAOSMANOĞLU YÖNTEN, Eylül Ece İŞLEK CAMADAN, Mehin ZÜLFİGAROVA, Abula AYIMUGU ve Sureyya Mert SELİMOĞLU'na

Değerli arkadaşlarım. Sema KURNAZ ÖZBEK, Özgür Doğa ÖZSOY, Selenay FURAT RENÇBER, Sabriye KARADENİZLİ TAŞKIN, Fazilet DEDE ve Sertan ARKAN'na

İlgisini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, dertleştiğim değerli dostum ve kardeşim Hüseyin UZUNER ve ailesine,

Emeklerini asla ödemeyeceğim, beni bugünlere getiren dualarını, sevgilerini, desteklerini ve güçlerini her zaman yanımda hissettiğim değerli annem Nagihan ve babam İhsan SARIHAN'a ve aileme minnet ve şükranlarımı sunarım. Her zaman ve her koşulda beni destekleyen, bana güç veren, düştüğümde yanımda olan, sevgisini ve sabrını benden esirgemeyen ve kendisine hak ettiği değeri veremeyeceğim sevgili eşim Kübra KAVRAM SARIHAN'a ve canım oğlum Ömer Yiğit SARIHAN'a

Teşekkür ederim.

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destek için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: 2019/091) teşekkür ederim.

ORİJİNALLIK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı / Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Meme Kanseri Hücre Hatlarında Karşılaştırmalı Yüzey Proteom Analizi” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

.../.../2023

Mehmet SARIHAN

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ORİJİNALLIK BİLDİRİMİ	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xviii
TABLOLAR	xxii
1. GİRİŞ	1
1.1. Meme Kanserinin Histopatolojisi ve Sınıflandırılması	1
1.2. Meme Kanserinin İnsidansı.....	3
1.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri	4
1.4. Meme Kanseri Tedavileri.....	5
1.5. Meme Kanserinde Kullanılan Biyobelirteç Adayları	6
1.6. Biyolojik Membranlar ve Membran Proteinleri.....	7
1.7. Biyotininilasyon	10
1.8. Membran Proteinlerinin Biyotininilasyonu.....	14
1.9. Sağlıklı ve Kanserli Meme Dokusu Hücre Hatları	15
2. AMAÇ	17
3. YÖNTEM	19
3.1. Kullanılan Plazmitler.....	20
3.2. Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması.....	20
3.3. Bakteri Hücrelerinde Transformasyonun Gerçekleştirilmesi.....	21
3.4. TurboID Enziminin Üretimi, Doğrulanması ve Saflaştırılması	22
3.4.1. TurboId Enzimin Üretilmesi.....	22
3.4.2. MALDI-TOF/TOF Analizi ile TurboID Üretiminin Doğrulanması	23

3.4.3. Western Blot (WB) Yöntemi ile TurboID Üretiminin Doğrulanması.....	23
3.4.4. TurboID Enziminin Saflaştırılması	23
3.5. MBP Etiketli TurboID Enzimin Faktör Xa Enzimi ile Kesimi.....	24
3.6. TurboID ve BirA Enzimlerinin His Etiketli Konumlarının Belirlenmesi	25
3.7. Biotinilasyon Reaksiyonunun Optimizasyonu	25
3.8. Saflaştırma ve Saklama Koşulları İçin Gerekli Gliserol Oranın Belirlenmesi.....	26
3.9. Saklama Koşullarının TurboID Enzim Aktivitesinin Üzerinde Zamana Bağlı Etkisinin İncelenmesi	26
3.10. Hücre Kültürleri	27
3.11. Hücrelerden Saklama Alınması.....	27
3.12. Stabil Hücre Hattı Oluşturmak İçin Gereken Antibiyotik Dozunun Belirlenmesi.	28
3.13. Ökaryotik Meme Hücre Hatlarına pDisplay-TurboID-TM Plazmit Transfeksiyonu	28
3.14. Transfeksiyon Sonrası MCF-7 Hücrelerine Ait Koloni Seçimi	28
3.15. Hücre Yüzey Proteinlerinin Biotinilasyonu	29
3.15.1. TurboID Enziminin Endojen Olarak Hücrelerce Üretimi ve Biotinilasyonda Kullanılması.....	29
3.15.2. Hücre Yüzey Proteinlerinin Dışarıdan Eklenen TurboID Enzimi ile Biotinlenmesi (Hücre Dışı Yöntem)	30
3.16. Protein Özütlelerinin Hazırlanması.....	31
3.17. Biotinlenen Proteinlerin Zenginleştirilmesi ve Doğrulanması.....	31
3.18. Zenginleştirilmiş Proteinlerin Tripsin ile Kesimi.....	32
3.19. Nano-Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (nLC-MS/MS) Analizi	33
3.20. nLC-MS/MS Veri Analizi.....	34
3.21. Biyoinformatik Analizler	34
3.22. nLC-MS/MS Sonuçlarının Doğrulanması.....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. Plazmitlerin Doğrulanması ve Çoğaltılması.	36

4.2. TurboID Enzimin <i>E.coli</i> 'de Üretimi	36
4.3. TurboID Enzimin Saflaştırılması	41
4.4. MBP-TurboID Enziminin Saflaştırılması	45
4.5. Saflaştırılan MBP-TurboID Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	46
4.6. TurboID Enzim Üretimi için En Uygun Lizis Tamponunun Belirlenmesi	47
4.7. MBP etiketli TurboID Enziminin Lizis Tamponlarındaki Aktivitelerinin Belirlenmesi	49
4.8. MBP Etiketinin TurboID Enziminden Kesilerek Uzaklaştırılması ve Kesim Sonrası Aktivitenin Kontrolü	49
4.9. Biotinilasyon Reaksiyonlarında Optimum Sürenin Belirlenmesi	51
4.10. Biotinilasyon Reaksiyonlarında Biotin ve ATP Konsantrasyonunun Belirlenmesi	52
4.11. His etiketli TurboID Enziminin Ni-NTA Kolonuna Bağlanma Sorununun Giderilmesi	53
4.12. TurboID Enziminin Farklı Miktarla Gliserol İçeren TPER Tamponu İçerisinde Hazırlanması ve Saflaştırılması	54
4.13. TurboID Enziminin Farklı Gliserol Ortamlarındaki Aktivitelerinin Belirlenmesi	55
4.14. TurboID Enziminin Saklanma Koşullarının (Zaman ve Sıcaklık) Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	56
4.15. Plazmit Transfeksiyonu İçin MCF-7 Hücre Hattında Genetisin (G418) Antibiyotikinin Seleksiyon Dozunun Belirlenmesi.	57
4.16. MCF-7 Hücre Hatlarına pDisplay-TurboID-TM Plazmitinin Transfeksiyonu ve Kolonilerinin Seçilimi	58
4.17. Seçilen MCF-7 Kolonilerinde TurboID Enzim Üretiminin Doğrulanması	59
4.18. TurboID-TM İfade Eden Monoklonal MCF-7 Hücre Hatlarının Eldesi	61
4.19. pDisplay-TurboID-TM Plazmitinin Geçici Transfeksiyonu ile Yapılan Biotinilasyon Çalışmaları	64
4.20. Biotinilasyonu Öncesi Gliserolün Uzaklaştırılması ve Aktivite Tayini	67

4.21. Hücrelerin Kültüre Edildiği Ortamda TurboID'nin Zaman İçerisindeki Aktivite Kaybının ve Yıkım Oranının Belirlenmesi	68
4.22. Hücre Yüzey Proteinlerinin TurboID Enzimi ile Biotinilasyonu.....	69
4.23. Biotinilasyonun IF Analizler ile Gösterilmesi	71
4.24. Biotin ile Etiketlenen Proteinlerin Zenginleştirilmesi.....	72
4.25. Biotinile Edilmiş Protein Özütlerinden HYP'lerinin Zenginleştirilmesi ve Doğrulanması	74
4.26. nLC-MS/MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi	76
4.27. nLC-MS/MS Sonuçlarının Doğrulanması.....	77
4.28. nLC MS/MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve STRING Analizleri.....	78
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	102
7. KAYNAKLAR	104
8. ÖZGEÇMİŞ	118
EKLER	122
EK-1. Western blot, gümüş boyama ve IF analizlerinde izlenen basamaklar.....	122
EK-2. IF ve WB analizlerinde kullanılan antikor ve proteinler	123
EK-3. Kullanılan Tampon içerikleri.....	124
EK-4. nLC-MS/MS analizleri sonucu elde edilen proteinler	119
EK-5. nLC-MS/MS analizleri sonucu hücre grupları arasında anlamlı farklılık gösteren proteinler	194
EK-6. nLC-MS/MS analizleri sonucu elde edilen ve gruplar arası farklılık gösteren proteinlerin STRING analizleri	209

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACN: Asetonitril

AmBic: Amonyum Bikarbonat

ATAD: AAA Domaini İçeren Protein 3

ATM: Ataksi Telenjektazi Mutated

ATP: Adenozin Trifosfat

BC: Breast Cancer

BPER: Bakteri Proteini Ekstraksiyon Reaktifi (Bacterial Protein Extraction Reagent)

BRCA: Breast Cancer Susceptibility

BSA: Bovin Serum Albümin

CD: Cluster of Differentiation

cGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

CHEK2: Checkpoint Kinaz 2

CSP: Cell Surface Proteins

Da: Dalton

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsülfoksit

DTT: Dithiothreitol

Escherichia coli: *E. coli*

ECM: Ekstrase Lüler Matriks

EDTA: Etilendiamintetraasetik Asit

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EMT: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

ER: Östrojen Reseptörü

FA: Formik Asit

FASP: Filtre Yardımlı Örnek Hazırlama

FBS: Fetal Bovin Serum

GFP: Yeşil Floresans Protein

GPI: glikosilfosfatidilinositol

GRIP2: Glutamat Reseptör Etkileşimli Protein 2

HA: Hemagglutin

HDAC3: Histon Deasetilaz 3

HER2: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

HYP: Hücre Yüzey Protein

IF: İmmünofloresan

IPTG: Isopropyl β - d-1-thiogalactopyranoside

KDa: Kilo Dalton

LB: Luria-Bertani

MALDI-TOF/TOF: Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu/Uçuş Zamanı-Uçuş Zamanı-Kütle Spektrometresi

MBP: Maltoz Bağlama Proteini

MEGM: Mammary Epithelial Cell Growth Medium

MK: Meme Kanseri

mL: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

MR: Manyetik Rezonans

MS: Kütle Spektrometresi

NCL: Nükleolin

NF- κ B: Nükleer Faktör Kappa B

Ni: Nikel

nLC-MS/MS: Nano Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi

nM: Nanomolar

OD: Optik Densite

PBS: Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi

PDAC: Pankreatik Duktal Adenokarsinom

PDGF: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

PDGF-TM: Platelet-Türevli Büyüme Faktörü transmembran domaini

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

PIP: Fosfatidilinositol fosforilasyonu

PL: Proximity Labeling

PM: Plazma Membranı

ppm: Milyonda Bir Partikül (parts per million),

PR: Progesteron Reseptörü

pTEN: Protein Tirozin Fosfataz ve Tensin Homoloğu

RE: Restriksiyon Endonükleaz

RIPA: Radyoimmünopresipitasyon Tahlil Tamponu (Radioimmunoprecipitation assay buffer)

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat –Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SOB: Süper Optimal Besiyer

TBS-T: Tris-Tamponlu Salin, 0.1%Tween 20

TFA: Trifloroasitik Asit

TM: Transmembran Domaini Etiketi

TNM: Tümör-Nod-Metastaz

TPER: Doku Proteini Ekstraksiyon Reaktifi (Tissue Protein Extraction Reagent)

TRPC4: Geçici Reseptör Potansiyel Kanalı-4

VDAC1: Voltaj-Bağımlı Anyon-Selektif Kanal Proteini-1

WB: Western Blot

ZnTs: Çinko Akış Taşıyıcı

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Meme anatomisi	2
Şekil 1.2. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması	3
Şekil 1.3. Membran proteinlerin gruplandırılması	9
Şekil 1.4. Biotinin kimyasal gösterimi.	11
Şekil 1.5. Kimyasal biyotinitilasyonda kullanılan ve farklı yan gruplar eklenen biyotinin yapısı.....	12
Şekil 3.1. Deneylerde kullanılan yöntemsel akış şeması.....	19
Şekil 3.2. pDisplay ve pET21a vektörü içerisinde bulunan TurboID gen bölgesini gösteren plazmit haritası (A) ve bu gen bölgesinin pMAL-c4X vektörüne alt-klonlanması (B).	20
Şekil 3.3. Biotinitilasyon reaksiyon koşullarının optimizasyonu için kullanılan deney tasarımı.	26
Şekil 3.4. Gliserol etkisinin enzim aktivitesi üzerine nasıl test edildiğini gösteren deneysel akış şeması.....	26
Şekil 3.5. TurboID enzimlerinin farklı sıcaklık ve gliserol koşullarında saklanması enzim aktivitelerinin üzerine etkisinin incelendiği deneysel yaklaşımın resimsel gösterimi.	27
Şekil 3.6. Meme dokusu hücre hatlarında yüzey proteinlerinin farklı iki yöntem kullanılarak yapılan biyotinitilasyonunun şematik gösterimi	30
Şekil 3.7. Hücre yüzey proteinlerinin dışarıdan eklenen TurboID enzimi ile işaretlenmesi.	31
Şekil 4.1. pET21a-TurboID ve pDisplay-TurboID-TM plazmitlerinin RE enzimleri ile kesilerek Etidyum Bromür içeren agaroz jellerde doğrulaması.	36
Şekil 4.2. pET21a-TurboID ve pQE2-BirA plazmitleri kullanılarak, TurboID ve BirA enzimlerinin <i>E.coli</i> W3110 hücre suşunda üretiminin SDS-PAGE analizi belirlenmesi. .	37
Şekil 4.3. <i>E. coli</i> BL21 DE3 suşunda yapılan TurboID protein üretimi.	38
Şekil 4.4. Bakteri hücrelerinde meydana gelen promotör kaçığının WB ile gösterimi.....	39
Şekil 4.5. Biotinitilasyondan kaynaklanan bakteriyel inhibisyonun önlenmesi için modifiye besiyeri kullanımı.	40
Şekil 4.6. IPTG konsantrasyonunun TurboID üretimi üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amaçlı yapılan SDS-PAGE analizi.....	41

Şekil 4.7. <i>E. coli</i> BL21 DE3 pLyss hücrelerinde üretilen BirA (A) ve TurboID (B) enzimlerinin Ni-NTA-kolon kromatografisi yoluyla saflaştırılması ve elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE analizleri.....	42
Şekil 4.8. His etiketli TurboID ve BirA proteinlerinde His etiketinin konumunu gösteren protein modelleri.	43
Şekil 4.9. TurboID gen bölgesinin pMAL C4X vektörüne klonlanması sürecinde elde edilen 3 adet koloninin restriksiyon enzimleri ile kesimi, doğrulanmasını için yapılan sanal restriksiyon haritası ve agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 4.10. MBP etiketli TurboID enziminin farklı <i>E. coli</i> suşlarında üretiminin SDS-PAGE analizleri.	45
Şekil 4.11. MBP-TurboID enziminin amiloz rezin yardımı ile saflaştırılması..	46
Şekil 4.12. MBP-TurboID rekombinant enziminin biyotininilasyon aktivitesinin SDS-PAGE analizi ile gösterilmesi.	47
Şekil 4.13. Farklı lizis tamponları ile gerçekleştirilen MBP-TurboID protein üretimini gösteren SDS-PAGE jeline ait görüntü.	48
Şekil 4.14. MBP-TurboID üretilen <i>E. coli</i> hücre hatlarında farklı lizis tamponları ile elde edilen protein özütü ve enzim miktarları.	48
Şekil 4.15. Kullanılan lizis tamponlarının enzim aktiviteleri üzerindeki etkisinin Streptavidin-HRP kullanılarak WB yöntemi ile incelenmesi.....	49
Şekil 4.16. MBP etiketinin Faktör Xa yardımıyla kesilerek uzaklaştırıldığını gösteren (A) deneysel yaklaşım ve (B) SDS-PAGE analiz sonucu.....	50
Şekil 4.17. Faktör Xa ile yapılan kesim işlemi sonrasında MBP etiketli ve etiketsiz TurboID enzim aktivitelerinin WB analizi ile incelenmesi.....	51
Şekil 4.18. Etiketsiz TurboID enziminin zamana bağlı aktivitesinin WB analizi ile incelenmesi.	52
Şekil 4.19. Biyotininilasyon karışımındaki ATP ve Biyotin miktarının artırılması ile enzimatik aktivitedeki değişimin WB analizi ile incelenmesi.	52
Şekil 4.20. His etiketli TurboID enziminin Ni-NTA Hiprep Histag kolon (GE, ABD) yardımıyla saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analiz sonucu.....	54
Şekil 4.21. TurboID enzimin farklı gliserol içeriğine sahip lizis tamponları kullanılarak elde edilmesi ve saflaştırılması.	55
Şekil 4.22. Gliserol etkisinin His ve MBP etiketli TurboID enzim aktiviteleri üzerindeki etkisinin WB yöntemi kullanılarak analizi.	56

Şekil 4.23. Farklı sıcaklıklarda saklanan TurboID enzim aktivitelerindeki değişimin WB analizi ile belirlenmesi.....	57
Şekil 4.24. MCF-7 hücre hatlarında genetisin (G418) seleksiyon dozunun belirlenmesi...	58
Şekil 4.25. pDisplay-TurboID-TM plazmiti ile transfekte edilen MCF-7 hücrelerinde transfeksiyon sonrası koloni seçimi ve kolonilerin çoğaltılması.....	59
Şekil 4.26. TurboID-TM enziminin membran yüzeyine lokalizasyonu.....	59
Şekil 4.27. Poliklonal MCF-7 stabil hücre hatlarında TurboID enzim üretiminin ve lokalizasyonunun IF analizi ile belirlenmesi.....	60
Şekil 4.28. Stabil olarak TurboID-TM üreten MCF-7 hücrelerinde TurboID-TM enzim üretiminin WB analizi ile belirlenmesi.....	61
Şekil 4.29. On yedi adet monoklonal MCF-7 hücre kolonisinin TurboID-TM enzim üretiminin belirlenmesi amacı ile yapılan WB analizi.	61
Şekil 4.30. TurboID-TM ifade ettiği düşünülen monoklonal MCF-7 hücrelerinde TurboID proteinin lokasyonunun ve biyotininilasyon düzeylerinin IF analizlerinde gösterimi.	62
Şekil 4.31. TurboID-TM ifade ettiği düşünülen monoklonal MCF-7 hücrelerinde TurboID proteinin lokasyonunun ve biyotininilasyon düzeylerinin IF analizlerinde gösterimi.	63
Şekil 4.32. Anti-BirA antikorunun tanıdığı TurboID protein bantlarını gösterenWB analiz sonucu.....	63
Şekil 4.33. TurboID-TM ifade ettiği düşünülen monoklonal ve poliklonal MCF-7 hücrelerinde Anti-BirA antikoruna kullanılarak TurboID ekspresyonunun WB yöntemi ile gösterilmesi.....	64
Şekil 4.34. pDisplay-TurboID-TM transfekte edilmiş MCF-7 hücrelerinde transfeksiyon sonrası TurboID-TM dağılımının. (A) IF analizleri (B) WB analizleri.....	65
Şekil 4.35. MCF-7 pDisplay-TurboID-TM hücrelerinde 50 mM biyotin eklenmesi sonrası sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde biyotininilasyon aktivitelerinin IF analizleri ile gösterilmesi.	66
Şekil 4.36. pDisplay-TurboID-KDEL plazmiti aktarılmış MCF-10A hücrelerinde üretilen TurboID enziminin endoplazmik retikulum ve hücre morfolojisi üzerindeki etkisi.	67
Şekil 4.37. Enzim saklama tamponunda bulunan gliserolün hücre kültüründe kullanımı öncesi uzaklaştırılması için yapılan diyaliz işleminin enzim aktivitesi üzerine olan etkisinin incelenmesinin WB analizi yapılarak incelenmesi.	68
Şekil 4.38. TurboID enziminin hücre kültürü ortamında zaman içerisindeki aktivitesinin ve yıkım oranının WB analizi ile incelenmesi.	69

Şekil 4.39. HYP'nin biyotinitilasyonunda kullanılan TurboID aktivitesinin kullanım öncesi WB analizi ile gösterilmesi	70
Şekil 4.40. Hücre hatlarında TurboID enziminin kültür ortamına eklenmesi ile yapılan hücre yüzey protein biyotinitilasyonunun WB analizi ile doğrulanması.....	70
Şekil 4.41. MCF-10A, MCF-7 ve MDA MB-231 hücre kültürlerine eklenen TurboID enzimi ile yapılan HYP biyotinitilasyonunun IF analizleri.	71
Şekil 4.42. MCF-7 hücreleri ile yapılan biyotinitilasyon deneylerinde görülen mitokondri dağılımı benzeri profilinin IF görüntüleri.....	72
Şekil 4.43. Streptavidin resinlere bağlı biyotinile proteinlerin elüsyon denemelerinin WB analizleri..	73
Şekil 4.44. Biyotinile proteinlerin streptavin kaplı manyetik boncuklardan SDS, biyotin ve ısı yardımıyla elüsyonunu gösteren western blot analizleri	74
Şekil 4.45. Hücre yüzey proteinleri biyotinile edilen sağlıklı ve kanser meme dokusu hücrelerinde streptavin kaplı manyetik boncuklar ile yapılan zenginleştirme sonrasında gerçekleştirilen doğrulama çalışmaları.	75
Şekil 4.46. nLC-MS/MS analizleri sonucunda tanımlanan biyotinile proteinlerin lokalizasyonlarının analizi	77
Şekil 4.47. VDAC1 ve N-Kadherin proteinine ait sonuçların WB analizi ile doğrulanması.	78
Şekil 4.48. Düzeylerinde farklılık tespit edilen proteinlerin gruplandırılması ve STRING analiz sonuçları.	79
Şekil 5.1. nLC-MS/MS analizleri sonucu elde edilen proteinlerin sayısal ve yoğunluk dağılımları.....	86

TABLÖLAR

Tablo 1.1. Meme kanserinde kullanılan bazı biyobelirteçler.....	6
Tablo 1.2. Meme kanserinde tanısında kullanılan bazı miRNA'lar.	7
Tablo 3.1 Elektrokompitetn hücre hazılanmasında izlenen adımlar.	21
Tablo 4.1. MBP-TurboID enziminin izolasyonu için kullanılan farklı lizis tamponları	47

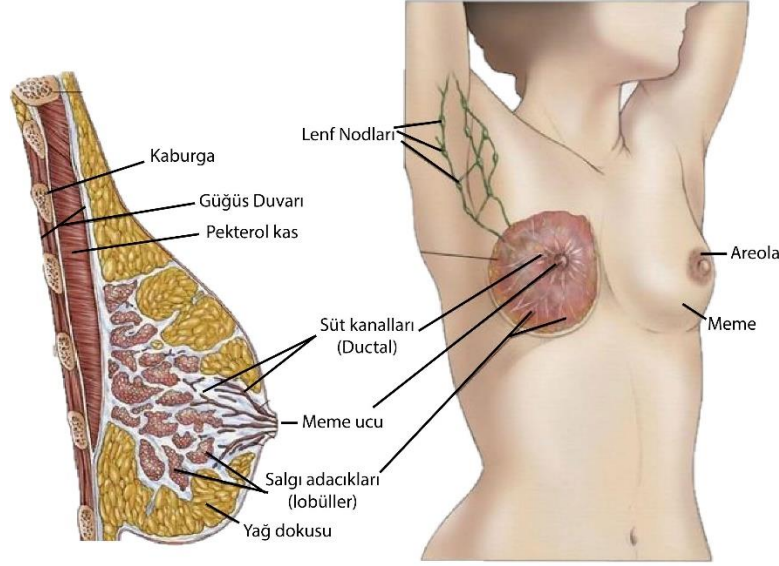


1. GİRİŞ

Günümüzde karşı karşıya olduğumuz en büyük sağlık sorunlarından birisi olan kanser, genetik ve çevresel risk faktörlerin bir araya gelmesiyle ortaya çıkar. Bu risk faktörlerinin birikimi sonucu; hasara uğramış ve/veya gen ifadesi değişmiş, hızlı çoğalan, hızlı bölünen, farklı bölgelere metastaz yapabilen, metabolik ihtiyaçları farklılaşmış kanser hücreleri meydana gelir. Kanserleşen hücreler, hücre ve doku regülasyonunu sağlayan kontrol mekanizmalarından bağımsız hale gelip hem bulundukları hem de metastaz yaptıkları bölgenin yapısını, fonksiyonunu ve metabolizmasını bozarak zaman içerisinde canlıları ölüme götüren süreçlere sebep olurlar. Her yıl milyonlarca insanı etkileyen kanserin nedenlerinin belirlenmesi, altında yatan mekanizmaların aydınlatılması ve tedavisi ile ilgili stratejilerin geliştirilmesi uzun yıllardan beri bilim dünyasının üzerinde en çok araştırma yaptığı ve çaba harcadığı alanların başında gelmektedir. Ancak karmaşık mekanizmalara sahip olması, bağışıklık sistemini etkisiz kılabilmesi, değişken ve dirençli özelliğinden dolayı tam anlamıyla kanserin tedavisi bulunamamıştır. Her ne kadar bilimsel ve teknolojik araçlar gelişse de hastalığın erken ve ayırıcı tanısının konulması, takip edilmesi ve terapötik anlamda hedeflenebilmesi için kullanılabilecek biyobelirteçler de oldukça sınırlıdır.

1.1. Meme Kanserinin Histopatolojisi ve Sınıflandırılması

Meme, göğüs duvarına bağlı gelişmiş modifiye tubülo alveolar apokrin ter bezi olarak adlandırılmaktadır. Meme dokusu yapısal olarak değişken sayıda loblara ayrılmış meme bezlerini sarmalayan yağ ve bağ dokusundan oluşmaktadır ve temel işlevi laktasyondur. Meme kanseri ise meme bezlerinden kökenlenen kanser türlerine verilen genel isimdir. Meme kanserlerinin büyük bir bölümü meme bezindeki epitel hücrelerinden oluşur. Meme bezi epitelleri incelendiğinde süt salgısının gerçekleştiği loblar ve üretilen sütün taşındığı duktal kanallar olmak temel olarak iki yapı bulunur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Meme anatomisi (American Society of Clinical Oncology, 2003)

Meme kanserlerinin hem morfolojik hem de moleküler düzeyde ciddi farklılıklar göstermesi sınıflandırılmasını oldukça zorlaştırmaktadır. Kanser gelişiminde oluşan tümör dokularının metastatik davranışları incelendiğinde, meme kanserleri adenom veya karsinomlar olarak ikiye ayrılırlar. Tümör yapılarının yaklaşık %10'unu metastatik özelliği olmayan adenomlar, geri kalan %90'lık kısmını ise karsinomlar oluşturur. Meme karsinomlarının histopatolojik sınıflandırılması yapılırken ilk olarak kanserin kaynak aldığı bölge kullanılmaktadır. Kanser hücreleri duktal kanal hücrelerinden köken almış duktal karsinomlar ve lobüler hücrelerden oluşan lobüler karsinomlar olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadırlar. Duktal karsinomlar meme kanserlerinin %80-90'lık kısmını oluştururken, lobüler karsinomlar ise %10-20'lik kısmını oluşturur. Bununla birlikte meme kanserleri invaziv karakterlerine göre de sınıflandırılmaktadır. Kanser hücreleri invazyon özelliği gösteriyorsa invaziv karsinoma, göstermiyor ise in situ karsinoma olarak sınıflandırılır. Ancak histopatolojik sınıflandırma adeno, medüler, tübüler, apokrin, kribriform, musinöz, papiller karsinomlar gibi pek çok farklı alt tiplere ayrılmaktadır (Sheikh ve ark., 2020). Bu nedenle histopatolojik olarak meme kanserinin sınıflandırılması oldukça zordur.

Histopatolojik olarak sınıflandırılmasının yanı sıra meme kanserinin sınıflandırılmasında kullanılan farklı yaklaşımlarda bulunmaktadır. TNM (Tümör-Nod-Metastaz) sınıflandırılması meme kanserinin büyüklüğüne, metastaz özelliğine ve lenf noduna invazyonu açısından değerlendirilen bir diğer yöntemdir (Cserni ve ark., 2018). Ancak bu yöntem de verimli olmadığından günümüzde etkinliğini yitirmiştir.

Günümüzde sadece nükleer tübüler, histolojik dereceler, mitotik indeks gibi morfolojik sınıflandırmalar ve tümör boyutu, lenf nodu tutulumu, metastaz gibi patolojik parametreler meme tümörü patofizyolojisinin gerçek davranışını anlamak ve tahmin etmek için tek başlarına yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden meme kanserinin sınıflandırılmasında daha güvenilir olan moleküler sınıflandırılmanın kullanımı gün geçtikçe artmakta ve meme kanserinin tanımlanması ve anlaşılması için daha çok tercih edilmektedir.

Meme kanserinin moleküler açıdan sınıflandırılmasında genel olarak; Östrojen reseptörü (ER), Progesteron reseptörü (PR), HER2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2) ve Ki67 ekspresyon düzeyleri kullanılmaktadır. Bu moleküller temel alınarak yapılan sınıflandırılmada meme kanserleri Lüminal A, Lüminal B HER2 negatif, Lüminal B HER2 pozitif, HER2 pozitif ve Triple negatif olmak üzere 5 farklı alt tipe ayrılmaktadır. Lüminal A'da Tripler negatif kanserlere gittikçe prognoz, sağ kalım ve tedaviye cevap verme oranları azalırken, invazyon, metastaz ve direnç özellikleri ise artmaktadır (Şekil 1.2).

Moleküler Sınıflandırma	Luminal A	Luminal B		HER2+	Triple Negatif
		(HER2-)	(HER2+)		
Biyobelirteç	ER+ PR+ HER2- Ki 67low	ER+ PR- HER2- Ki 67high	ER+ PR- HER2+ Ki 67high	ER- PR- HER2+ Ki 67high	ER- PR- HER2- Ki 67high
Vaka yoğunluğu	40-50	20-30		15-20	10-20
Histolojik safha					
Prognoz					
Terapi cevapları	Endokrin	Endokrin Kemoterapi	Endokrin Kemoterapi Hedeflenmiş terapiler	Kemoterapi Hedeflenmiş terapiler	Kemoterapi PARP inhibitörleri

Şekil 1.2. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması (Nascimento ve Otoni, 2020).

1.2. Meme Kanserinin İnsidansı

Dünyada 2022 yılı içerisinde kayıtlı verilere göre 19 milyondan fazla yeni kanser vakası teşhisi konulmuştur. Bu hastaların 2,26 milyonluk en büyük kesimini ise meme kanseri oluşturmaktadır (Wilkinson ve Gathani, 2022). Meme kanserini sırası ile akciğer, kolon ve prostat kanserleri izlemektedir. Yüksek görünme oranının yanında, meme kanserleri ölüm nedenleri açısından da %13,6 ile akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde 2020 yılı verileri değerlendirildiğinde bir yıl içerisinde yaklaşık 230 bin'den fazla insana kanser teşhisi konulduğu görülmektedir. Bunların 24 binden fazlasını ise meme

kanserleri oluşturmaktadır. Bununla birlikte ülkemizdeki ölüm vakaları incelendiğinde, 2020 yılında 11 binden fazla insanın meme kanseri nedeni ile kaybedildiği görülmektedir (GLOBOCAN, 2022).

1.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Multifaktöriyel bir hastalık olan meme kanserinde ön plana çıkan nedenler arasında; östrojen ve progesteron yollarındaki bozulmalar (Tian ve ark., 2018), bazı genlerdeki mutasyonlar ve düzenlenme kusurları, yaş, cinsiyet, çevresel faktörler ve alışkanlıklar yer almaktadır. Yaş, tüm kanserler de olduğu gibi meme kanseri riskini ciddi anlamda artıran önemli bir faktördür. Yaşlanma ile birlikte hücrelerde biriken mutasyon, azalan immün sistem aktivitesi ve hormonal değişiklikler kanser oluşumunun önünü açmaktadır. Meme kanserlerinde önemli faktörlerden biri olan hormonal değişimler ise yaş ile birlikte oluşan menopoz, hamilelik ve çocuk doğum sayısı, kullanılan doğum kontrol yöntemleri ve ilaçlardan doğrudan etkilenmektedir. Premenopozal ve postmenopozal dönemlerde artış gösteren östrodiol ve kolesterol seviyeleri, azalan östrojen ve progesteron hormon düzeyleri meme kanseri riskini önemli derecede artırmaktadır (Dunneam ve ark., 2019). Doğum sayısının ve ilk doğumun gerçekleştiği yaşın meme kanserinden korunma anlamda önemli olduğu yapılan araştırmalar ile gösterilmiş, aynı zamanda kullanılan doğum kontrol ilaçlarının ise meme kanseri riskini %20-30 oranında artırdığı belirlenmiştir. (Dunneam ve ark., 2019; Slepicka ve ark., 2019).

Genetik ve ailesel yatkınlık açısından meme kanserleri incelendiğinde ise özellikle; ATM, pTEN, HER2, BRCA1, BRCA2, p53, CHEK2 ve PALB2 gibi bazı genlerdeki mutasyonların ya da kusurların meme kanseri ile doğrudan ilişkili olduğu ve kanser riskini ciddi oranda artırdığı bilinmektedir (Shiovitz ve Korde, 2015). Genetik veya epigenetik olarak ailesinde meme kanseri öyküsü bulunan bireylerde kanser riski oldukça artmaktadır. Birinci derece yakınlarından birinde meme kanseri öyküsü bulunan bireylerde kanser oluşma riski yaklaşık iki kat artarken, bu sayının 2 veya üzeri olduğu kişilerde risk 3-4 katına çıkmaktadır.

Yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları meme kanseri ile ilişkili diğer etmenlerdir. Fiziksel aktivitenin düşük olması, gece çalışma veya düzensiz uyku kanser riskinin artmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte alkol ve sigara kullanımı, düzensiz beslenme ve vitamin D eksikliği, obezite ve meme kitlesinin büyüklüğü gibi pek çok faktör meme kanseri oluşumu ile ilişkili olan etmenlerdir (Momenimovahed, 2019).

1.4. Meme Kanseri Tedavileri

Meme kanserinde tedavi ve sağ kalım kanserin erken evrede belirlenmesi ile doğrudan ilişkilidir. Erken evrede belirlenen meme kanseri vakalarının ilk beş yıl sağ kalım süreçleri evre 0-1 arasında %99'a yakinken, bu oran ileri evrelerde %15-20'lere kadar düşmektedir. Aynı zamanda sağ kalım oranları Lüminal A ve B tiplerinde yüksek iken Triple negatif meme kanserlerinde daha düşüktür. Bu nedenle hem kanserin erken evrelerde belirlenmesi hem de karakteristiğinin doğru analiz edilmesi sağ kalım ve tedavi için oldukça önemlidir.

Özellikle belirli yaş üzerindeki bireyler ve ailesel meme kanseri öyküsü olan kişilerin rutin tarama testlerini yaptırmaları erken tanı için oldukça önemlidir. Meme kanserinde kişilerin kendilerini belirli aralıklarla el ve göz ile muayene etmeleri oldukça önemlidir. Meme dokusunda meydana gelebilecek ele gelen kitle oluşumu, meme akıntısı, meme uçundaki areolada meydana gelebilecek değişiklikler, meme de oluşabilecek çökme ve buruşukluklar, meydana gelebilecek kızarıklık ve cilt değişiklikleri meme kanserinde gözlenebilecek belirtilerdendir. Meme kanserinin teşhisi için yapılan görüntüleme ve patolojik analizler en sık başvuru tekniklerdendir. Teşhis için en çok kullanılan teknik mamografi olmakla birlikte, ultrasonografi, manyetik rezonans (MR) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi görüntüleme yöntemleri ve ER, PR, HER2 karakterizasyonu ve gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi meme kanseri teşhisi ve tiplendirilmesinde kullanılan araçların başında gelmektedir. Aynı zamanda patolojik olarak meme kanseri; tümör boyutuna, lenf nodüllerine geçiş durumuna ve metastaz yeteneklerine göre farklı evrelere ayrılmaktadır.

Meme kanseri tedavisinde cerrahi ya da terapötik yaklaşımlar kullanılmaktadır. Cerrahi yaklaşımlar özellikle erken evrede belirlenen meme kanserlerinde tedavi için yeterli olabilmektedir. Yapılacak olan cerrahi işlemler tümörün tipi ve karakteristiğine göre, memenin korunabildiği basit cerrahi girişimler, meme rekonstrüksiyonu ve mastektomi şeklinde uygulanabilmektedir. Basit mastektomide sadece meme dokusu alınırken, radikal mastektomide meme ile beraber meme altı dokuları ve çevresel lenf nodları birlikte çıkartılmaktadır. Meme kanserinin tedavisi için yapılan terapi uygulamaları ise endokrin terapiler, radyoterapiler, kemoterapiler ve immünterapiler olarak sıralanabilir (Waks, 2019). Endokrin terapilerde, östrojen ve progesteron hormon yolları hedef alınır. Letrozol, ve Anastrozol gibi aromataz inhibitörleri ve Tamoxifen gibi reseptör modölatörleri kullanılır. Meme kanserinde sıklıkla kullanılan kemoterapik ajanlar ise Adriamisin, Siklofosfamid, Paklitaksel, Trastuzumab, Dosetaksel ve Karboplatin'dir. İmmün terapilerde ise genellikle

HER2, programmed death-1 (PD-1) ve programmed death ligand-1 (PD-L1) için antikorlar ve hedeflenmiş T hücreleri, kanser aşıları, hücresel terapiler ve onkolitik virüsler gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır (Esteva ve ark., 2019).

1.5. Meme Kanserinde Kullanılan Biyobelirteç Adayları.

Meme kanserinin erken dönemde tanısı için kullanılabilecek ideal biyobelirteçlerin tespit edilememiş olması erken tanının koyulabilmesi, hastalığın tedavi ve takibinin şekillendirilmesi için aşılması gereken en önemli sorunlardan biridir. Yıllardır yapılan çalışmalar sonucunda meme kanseri için biyobelirteç özelliği gösteren çeşitli moleküller belirlenmiştir. Ancak bu belirteçler ideallikten uzaktır ve genellikle hastalığın; tanısı, tiplendirilmesi, tedavinin belirlenmesi ve sürecin izlenmesi amacı ile kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları kliniklerde rutin olarak kullanılırken, bazıları ise henüz klinik öncesi inceleme sürecindedir. Tablo 1.1 ve Tablo 1.2’de meme kanseri için kullanılan bazı biyobelirteçler gösterilmiştir. Ancak tüm teknolojik ve biyolojik gelişmelere rağmen meme kanserinin erken tanısında ve hedeflenmesi için, hücre dışı sıvılarda veya hücresel düzeyde ideal ve spesifik biyobelirteç özelliği gösteren moleküller belirlenememiştir.

Tablo 1.1. Meme kanserinde kullanılan bazı biyobelirteçler (Bhooma ve ark., 2018).

Biyobelirteç	Kaynak	Klinik Kullanım
CA 15-3	Serum	Hastalığı takibi
HER2/neu	Tümör	Hormonal terapinin seçimi
ER	Tümör	Hormonal terapinin seçimi
PR	Tümör	Hormonal terapinin seçimi
CEA	Tümör	Hormonal terapinin seçimi
Ki67	Serum	Prognoz ve Tahmin
Siklin D1	Tümör	Tahmin
Siklin E	Tümör	Tahmin
p53	Tümör	Tahmin
uPA	Tümör	Prognoz
PAI-1	Tümör	Prognoz
TPA	Serum	Prognoz
HSP60	Serum	Prognoz
RS/DJ-1	Serum	Prognoz
MUC-1	Serum	Prognoz
Vitamin D	Meme ucu aspiratı	Prognoz
Hempeksin	Meme ucu aspiratı	Prognoz
α -2-HS-glikoprotein	Meme ucu aspiratı	Prognoz

Tablo 1.2. Meme kanseri tanısında kullanılan bazı miRNA'lar (Bertoli ve ark., 2015).

miRNA	Kullanımı
miR-30c, miR-339-5p, miR187	Terapotik sonuçların tahmin edilmesi
miR-148a, miR-33a	Prognostik
miR-9, miR-10b ve miR-17-5p	Diagnostik
miR-155, miR-210	Diğer (vücut sıvılarında değişim)

Yukarıda bahsedilen biyobelirteçler meme kanseri için ideal özelliklerden yoksundur. Bu belirteçler genellikle ekspresyonu artmış veya azalmış protein veya nükleik asitlerdir ki, sadece meme kanseri dokusuna özgün moleküller değildir. Örneğin, meme kanserinde hedeflenmiş terapi çalışmaları için kullanılan HER2 onkogeni bir reseptör tirozin kinazdır ve meme kanseri vakalarının %10-30'unda artmış düzeyde bulunur. Ancak HER2 sadece meme kanserine özgül bir biyobelirteç değildir. HER2 aynı zamanda mide, özefagus, ovaryum ve endometriyal kanserler gibi farklı kanser türlerinde de benzer şekilde artmış anlatım gösterir. Ayrıca Trastuzumab ve Lapatinib gibi farklı HER2 inhibitörleri ile yapılan tedavilerde hücreler bu ilaçlara direnç geliştirebilmektedir (Iqbal ve Iqbal, 2014). Bu nedenler HER2'yi meme kanseri için ideal bir biyobelirteç olmaktan uzaklaştırmaktadır. Diğer moleküllerde de hemen hemen benzer durum söz konusudur. Bu nedenle meme kanserinin erken tanısında kullanılabilecek özgün biyomoleküllerin belirlenmesi, bu moleküllerin etkili bir şekilde hedeflenebilmesi ve tedavi verimliliğinin artırılması ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Biyobelirteç araştırmaları genellikle hücresel düzeyde veya serum, idrar ve lenf sıvısı gibi hücre dışı vücut sıvılarında yapılmaktadır. Hücresel düzeyde yapılan çalışmaların önemli bir bölümünü ise hücre membranı üzerinde yapılan araştırmalar oluşturmaktadır.

1.6. Biyolojik Membranlar ve Membran Proteinleri

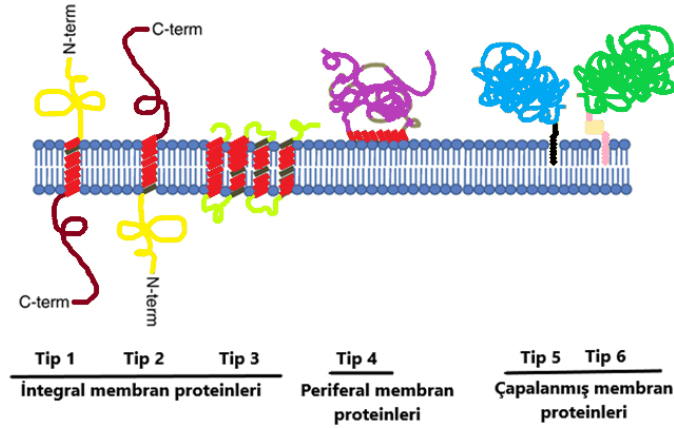
Biyolojik membranlar, hücreleri dış ortamdan ayıran bir bariyer görevi görmek yanı sıra, hücre içersini de kompartmanlara ayırarak işlevsel organellerin oluşumunu ve düzenlenmesini sağlar. Membran oluşumu hücresel yaşamın temel gerekliliğidir. Membran yapısı iki yüzey arasında farklı ortamların oluşabilmesini, bu ortamların kendi özelliklerinin özelliklerinin koruyabilmesini ve devamlılıklarını sağlar. Yapısal olarak membranlar, lipidlerin değişik kompozisyonlarının çift katlı bilayer yapısında organize olmasıyla oluşur. Membranları oluşturan lipid içeriği ise hücre tipine, membranın oluşturduğu organel tipine ve yüzeyine göre farklılık gösterir. Lipidal yapının değişkenliği ve akışkanlığı bir yandan

hücrelere ve organellere karakteristik özelliklerini, hareketlilik ve dinamizm yeteneği kazandırırken, diğer yandan ise moleküllerin hücre yüzeyinden salınımı ve hücre içine alınması gibi hayati görevler üstlenir.

Membranı oluşturan diğer ana moleküller olan proteinler, membran yapılarının kütesel olarak yaklaşık %50'sini oluşturur (Tan ve ark., 2008). Ancak bu oran hücreden hücreye değişebilmektedir. Örneğin, sinir hücrelerinde elektriksel izolasyon sağlayan miyelin kılıftan dolayı lipidlerin kütesel oranı %80'den fazla olabilmektedir (Rawlings ve ark., 2016). Hücresel protein kütesinin yaklaşık %30'unu, kodlama yapan bölgelerin ise %15-30'unu membran proteinleri oluşturmaktadır. Membranlara gömülü ya da demirlenmiş bu proteinler; hücresel transport, sinyal iletimi, hücrelerin birbirlerini ve çevredeki maddeleri tanınması, tutunması, gelişimin düzenlenmesi gibi fonksiyonları yerine getirir (Thierry ve ark., 2009). Sinyal iletimini sağlayan reseptörlerin büyük bir bölümü membranlar üzerinde yer alır. Hücreler sağ kalım ve çevresel uyarılara cevap için bu proteinlere gereksinim duyar. Membran proteinlerinden olan CD proteinleri (Cluster of Differentiation) yüzey farklılaşma antijenleri hücrelerin kimliklerinin oluşumunu sağlar ve bu proteinler de immün sistem ve hücresel iletişimde önemli roller oynarlar. Hücrelerin göç etmesi ve farklı dokulara tutunabilmesi, yerleşebilmesi membran yüzey proteinlerinin aracılığıyla olur. Membran proteinleri tüm bu özelliklerinden dolayı, biyobelirteç araştırmalarında hedef molekül gruplarından olmaktadır.

Günümüzde ilaç geliştirme çalışmaları genellikle HYP'leri hedeflenerek yapılmaktadır. Kullanılan ilaçların hücrelerden dışarı atılması ve ilaç direncinin oluşturulması yine yüzey proteinleri (ABC protein ailesi vb.) aracılığı ile olur. Günümüzde yapılan ilaçların %60'dan fazlasının membrana gömülü proteinleri hedeflemesi membran proteomlarının önemini yansıtmaktadır. Hücre içinde gerçekleşen değişimler ve biyokimyasal olaylar membranın protein ve lipid karakterini değiştirir. Hastalıkların tanısı, hedeflenmesi, gelişim ve hücresel hareketlerin araştırılması gibi çalışmalarda membran proteomu ve lipidomunda oluşan bu değişimlerin ve farklılıkların incelenmesi büyük yer tutmaktadır.

Membran proteinleri membrandan geçiş durumu, geçiş sayısına ve bağlanma özelliklerine göre farklı gruplara ayrılmıştır. Bunlar; tek geçişli ve C-terminal kısmı sitozolde bulunan tip 1, tek geçişli ve N-terminal kısmı sitozolde bulunan tip 2, zarın içerisinden birden fazla geçiş yapan tip 3, zarı geçmeyen ancak zar yüzeyine hidrofobik ve iyonik etkileşimlerle tutunan tip 4, membrana lipid çapalar ile bağlanan tip 5 ve membrana GPI (C-terminal glikosil fosfatidilinositol) ile çapalanmış tip 6'dır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Membran proteinlerin gruplandırılması (Helbig ve ark., 2010).

Oldukça değerli olan membran proteinlerinin analizi için yapılan izolasyon çalışmaları 1970’li yılların başlarına kadar uzanmaktadır. Ancak tüm teknolojik ilerleme ve geliştirilen tekniklere rağmen, protein çalışmalarını kısıtlayan sorunlar halen devam etmektedir. Bu sorunlar şöyle sıralanabilir;

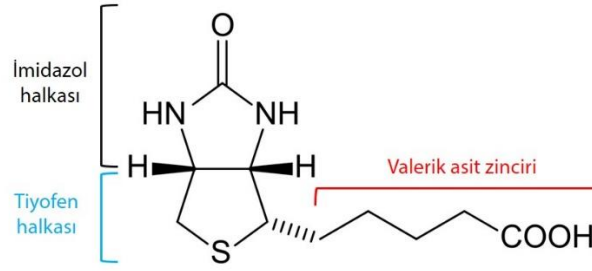
- 1) Membran proteinlerinin diğer proteinlere göre çok daha az miktarda ifade edilmesi.
- 2) Membran proteinlerinin lipit tabakadan ayrıştırılmasının zorluğu ve örneklerde lipit kirliliğinin oluşması.
- 3) Membran proteinlerde sıklıkla bulunan hidrofobik transmembran bölgelerin proteinlerin çözünürlüğünü azaltması ve agregasyon sonucu çökmesine neden olması.
- 4) Membran proteinlerini çözünmüş halde tutmak için kullanılan güçlü deterjanlar ve kaotropik ajanların ilerleyen analiz çalışmalarını olumsuz etkilemesi.
- 5) Transmembran domainlere sahip bölgelere ait proteaz enzimlerinin bulunması ve bu nedenle proteinlerin kesilmesi ve nLC-MS/MS gibi metotlarla analizin zorlaşması.

Bu sorunlar var olduğu tahmin edilen membran proteinlerinin yaklaşık yarısının analiz edilememesine neden olmaktadır. Problemlerin aşılabilmesi için farklı metotlar geliştirilmiştir. Bunlar arasında; densite gradyan santrifügasyon, iyon etkileşimleri, kromatografi temelli yaklaşımlar, kimyasal biyotinyasyon, manyetik boncukların kullanımı, deterjan uygulamaları ve protein içeriğini zenginleştirme için çeşitli firmaların geliştirdiği kitler bulunmaktadır. Ancak bu tekniklerin kullanımı membran protein izolasyonu çalışmalarındaki sorunları tam anlamıyla çözebilmiş değildir. Kullanılan santrifügasyon temelli çalışmalarda membran proteinlerinin yanı sıra sitoplazmik proteinlerde izole edilmekte, bu da zaten düşük miktarda olan membran proteinlerinin analizini

zorlaştırmaktadır. İzolasyonlarda kullanılan kimyasallar ise genellikle hücre zarının dış cephesinde bulunan proteinlerin amin ve glikozitlerin hidroksi gruplarını hedeflemektedir. Bu hedefleme yöntemlerinde kullanılan stratejik yaklaşımlarla bütün proteinler işaretlenememekte ve periferik proteinlerin büyük bir kısmı kaybedilmektedir. İşaretleme yönteminde kullanılan ajanların genellikle homojen bir işaretleme yapıp yapmadığı ise kesin olarak bilinmemektedir. Bu durum miktar tayini ve karşılaştırmalı analizler gibi çalışmalarda doğru sonuçların elde edilememesine yol açmaktadır. Gerek kimyasal gerekse mekanik olarak yapılan deneysel işlemlerin doğal sürece etkisi, elde edilen verilerin güvenilirliği açısından oldukça önemlidir. İzolasyon yöntemlerinde sıklıkla kullanılan kimyasalların hücrelerde hedef moleküller dışındaki komponentler üzerindeki etkilerinin net olarak bilinmemesi farklı riskler oluşturmaktadır. Bu nedenle biyobelirteçler gibi protein havuzunun içerisinde çok düşük miktarda bulunan hedef proteinlerin, daha verimli ve yüksek miktarda elde edilmesini sağlayacak yöntem ve tekniklere ihtiyaç vardır.

1.7. Biyotininilasyon

Biyotin, birbirine tiyofen halkası ile bağlanan imidazol grubu ve valerik asit zincirinden oluşan önemli bir moleküldür. Vitamin H veya vitamin B7 olarak da bilinen biyotin, çeşitli biyolojik süreçlerde görev alır. Biyotin molekülü bazı karboksilaz enzimleri için koenzim görevi yapar. Bu enzimler arasında; sitoplazmada yer alan ve yağ asit sentezinde kilit rol oynayan asetil-CoA karboksilaz-1, bazı yağ asitlerinin ve besinlerin yıkımında görevli propionil-CoA karboksilaz, lösin metabolizmasında görevli olan 3-metilkrotonil-CoA karboksilaz ve glikoneogenesisde yer alan pürivat karboksilaz sayılabilir (Donald ve ark., 2007). Koenzim fonksiyonunun yanı sıra biyotin, histon gibi bazı proteinlerin post-translasyonel düzenlenmesinde de kullanılır. Histon proteinlerinin biyotininilasyonu; gen ifadesi, DNA tamiri, kromatin modellenmesi, mitotik kondensasyon ve hücresel yaşam uzunluğu gibi kritik süreçlerde etkilidir. Aynı zamanda bazı önemli sinyal yollarının düzenlenmesi de biyotininilasyonla ilişkilidir. Bu sinyal molekülleri arasında cGMP, NF- κ B, Sp1 ve Sp3, nitrik oksit ve reseptör tirozin kinazlar sayılabilir (Boone-Villa ve ark., 2015; Rodriguez-Melendez ve ark., 2003; Zempleni, 2012). Biyotin aynı zamanda asialoglikoprotein reseptör mRNA'sı gibi bazı RNA moleküllerinin transkripsiyon sonrası aktivitelerinin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (Collins ve ark., 1988).

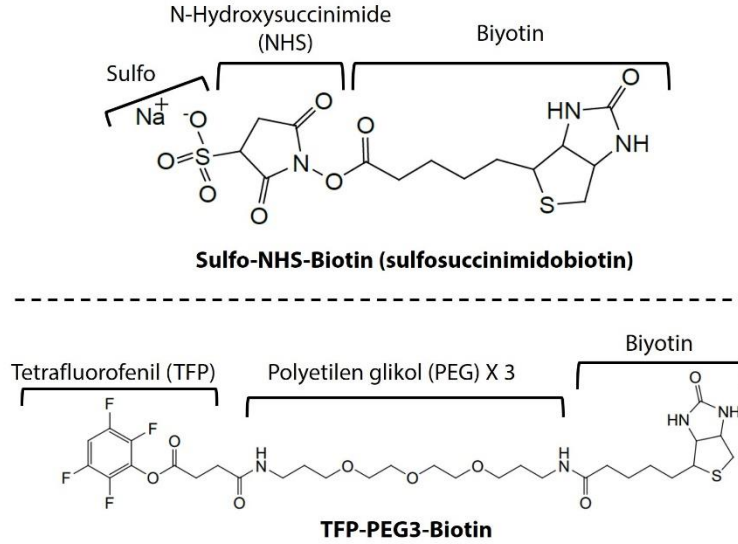


Şekil 1.4. Biotinin kimyasal olarak gösterimi

Biyotin günümüzde pek çok moleküler uygulamada ve sağlık sektöründe yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Biotin molekülünün tırnak, deri ve saç dokularının yenilenmesi ve güçlenmesine yardımcı olması, sindirim sisteminin düzenlemesi gibi özelliklerinden dolayı, kozmetik sektörü ve medikal uygulamalarda kendisine yaygın bir kullanım alanı bulmaktadır. Biyoteknolojik uygulamalarda biyotinin farklı bir özelliği kullanılmaktadır. Biotin; avidin, streptavidin ve neutravidin proteinleri arasında doğada bilinen en güçlü non-kovalent bağlardan birini oluşturur. Biotin bu özelliğinden dolayı, protein izolasyonu, moleküler işaretleme ve görüntüleme, immünohistokimyasal çalışmalar, protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesi, DNA ve RNA izolasyonu, moleküler etiketlerin hazırlanması ve dizi belirlemeleri gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Xie ve ark., 2017). Biotinin küçük bir molekül olması, bilinen bir toksik özelliğinin bulunmaması, kolay elde edilebilirliği, hedef moleküllerin yapısını bozmaması ve aktivitesini etkilememesi ve bağlanma reaksiyonunun geri dönüşebilir olması gibi pek çok özelliği kullanımında avantaj sağlamaktadır.

Moleküllerin biyotininasyonu enzimatik ve kimyasal olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. Kimyasal biyotininasyonda biyotinin türevleri sulfo-NH, TFP ester, PEG4-Alkalın gibi gruplar yardımıyla oluşturulduktan sonra, biyotinin proteinlere konjugasyonu yapılır. Genellikle biyotin grubu ile bağlanmayı yapan grup arasında farklı uzunluklara sahip aralayıcı bölgeler konulur (Thermofisher, 2018). Bu yolla yapılan biyotininasyonun bazı avantajları vardır. Bunlar;

- 1) Herhangi bir enzime gerek duyulmaz.
- 2) İsteğe göre biyotine eklenecek gruplar modifiye edilebilir.
- 3) Ilımlı koşullar altında yapılabilir.
- 4) Genellikle hedef proteinlerin yapısını bozmaz.
- 5) In vitro ya da in vivo olarak yapılabilir.



Şekil 1.5. Kimyasal biyotininilasyonda kullanılan ve farklı yan gruplar eklenen biyotinin yapısı.

Kimyasal biyotininilasyon yukarıda bahsedilen avantajlara sahip gibi görünse de yapılan çalışmalar kimyasal biyotininilasyon için kullanılan modifikasyonların bazı sorunlara neden olduğunu ortaya koymuştur. Bunların en önemlilerinden bir tanesi kimyasal biyotininilasyonun homojen olmayışıdır. Ayrıca, kimyasal biyotininilasyon oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Saniyeler içinde gerçekleşebilen kimyasal biyotininilasyonun kontrolü zordur ve durdurulması ise güçtür. Bu nedenle özellikle canlı sistemlerde yapılan biyotininilasyon etiketlenmelerinde sorunlar oluşabilmektedir (T. Kuhn ve ark., 2020). İkinci bir sorun da biyotini hedeflemek için eklenen kimyasal grubun biyotinin çözünürlüğü, bağlanmanın geriye döndürülebilirliği gibi parametreleri etkileyebilmesidir. Yine hedef molekülün aktivitesinin etkilenebilmesi bir diğer risk olarak ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda biyotinin kimyasal olarak modifiye edilmesi çalışma maliyetlerini ciddi oranda arttırmaktadır. Bu sorunlardan dolayı kimyasal biyotininilasyon çalışmalarının iyileştirilmesi gerekliliğinin olduğu görülmüştür.

Bir diğer biyotininilasyon mekanizması olan enzimatik biyotininilasyon, biyotin protein ligaz enzimleri kullanılarak gerçekleştirilir. Enzimatik biyotininilasyon tüm canlılar için esansiyel bir reaksiyondur. Canlıların çoğu biyotininilasyon için tek bir enzim kullanır ve bu enzimler içerisinde en çok bilineni *E. coli*'den elde edilen monomerik ve 35 kDa'lık büyüklüğe sahip BirA enzimidir (Smith ve Cronan, 1999). BirA enzimi $MgCl_2$ ve ATP varlığında hedef peptit dizilerine kovalent olarak biyotini bağlamaktadır. Bu hedef dizi AviTag olarak bilinen

15 amino asitlik bir bölgedir. Biotin, BirA enzimi aracılığı ile spesifik olarak bu bölge içerisindeki lizin amino asidine aktarılır.

Kimyasal biyotininilasyon ile karşılaştırıldığında enzimatik biyotininilasyonun önemli avantajları vardır. Enzimatik biyotininilasyon doğal sürecin bir parçası olduğundan biyolojik moleküllerin yapısını ve fonksiyonunu etkileme olasılığı çok daha düşüktür. Enzimatik biyotininilasyonun bu yönü; üç boyutlu yapı analizi, fonksiyon belirlenmesi, aktivite tayini ve olası etkileşimlerin belirlenmesi gibi çalışmalarda avantaj sağlamaktadır. Enzimatik biyotininilasyon, hedeflenen moleküllerin daha homojen şekilde biyotininilasyonu sağladığından; homojenitenin önemli olduğu miktar tayini ve karşılaştırmalı analizler gibi çalışmalarda kullanılabilirliği daha yüksektir. Enzimatik biyotininilasyon, hedeflenen moleküllerin daha spesifik olarak biyotininilasyonunu sağlar. Kimyasal biyotininilasyonda, hedef dışı biyotininilasyon riskleri daha yüksektir ve bu durum istenmeyen değişikliklere, toksisiteye, hedeflenen sonuçların etkilenmesine neden olabilir. Enzimatik biyotininilasyonun toksisitesinin az olması canlılığın devamlılığını gerektiren durumlarda kullanılabilme avantajı sağlar. Aynı zamanda basit bir sıcaklık değişimiyle bile durdurulabilmektedir. Bu daha kontrol edilebilir reaksiyon ortamı oluşturmaktadır.

Yukarıda sayılan avantajlara rağmen enzimatik biyotininilasyonun da aşılması gereken zorlukları bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi reaksiyonun belirli bir protein dizisine bağımlı olması ve bu dizi içerisindeki lizin amino asitlerini hedef almasıdır. Bu durum hedeflenebilen protein bölgesi sayısını oldukça sınırlamaktadır. Bu sorunu çözmek için farklı yaklaşımlar kullanılmıştır. Konu ile ilgili yapılan önemli çalışmalardan bir tanesi BirA enziminin dizi özgünlüğünü ortadan kaldırılarak hedef sayısının artırılması amacıyla enzim üzerinde yapılan mutasyon çalışmalarıdır. Bu mutasyon çalışmalarında BirA proteinin 118. pozisyonundaki arjinin aminoasidinin glisine dönüştürülmesiyle seçici olmayan BirA* (promiscuous biotin ligase) geliştirilmiştir. BirA* enziminin hedef özgünlüğü olmadığından proteinlerdeki tüm lizin aminoasitlerine biyotin bağlayabilme kapasitesine sahiptir (Kyle ve ark., 2012). Ancak BirA* enziminin reaksiyonu kataliz hızının düşük oluşu ve reaksiyonun gerçekleşmesi için hedef bölgenin biyotin ile belirli bir yakınlığa ulaşmasının gerekliliği (proximity labelling) bu enzimin pratikte kullanımını engellemektedir. Son dönemde yapılan çalışmalar bu sorunların aşılması konusunda ümit vadeden sonuçlar vermiştir.

Özellikle, Tess C. Branon, Alice T. Ting ve arkadaşları tarafından maya tabanlı yönlendirilmiş evrim metoduyla geliştirilen ve Miniturbo ve TurboID olarak isimlendirilen iki farklı BirA* enzim varyantı ön plana çıkmaktadır. Geliştirilen bu enzimlerden biri olan

TurboID enzimi, BirA* enzime kıyasla çok daha hızlı biyotininilasyon yapabilme gücüne sahiptir. Yaklaşık 35 kDa olan TurboID, BirA* enzime göre 22-26 kattan daha fazla aktiviteye sahiptir. BirA* enziminin 18 saat içerisinde ulaştığı biyotininilasyon oranına yaklaşık 10-15 dakika içerisinde ulaşabilmektedir. Yapılan çalışmalarla TurboID enziminin hücre membranı, endoplazmik retikulum, çekirdek ve mitokondri gibi farklı bölgelerdeki proteinleri etkili bir şekilde işaretleyebildiği ve işaretlenmiş bu proteinlerin Streptavidin kaplı rezinler yardımıyla izolasyonlarının ve zenginleştirme işlemlerinin yapılarak, nLC-MS/MS gibi duyarlı sistemlerde analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için kullanılabildiği gösterilmiştir. TurboID enziminin canlı sistemlere uygulanabilirliği ve toksik etkisini incelemek için *Drosophila* ve *C. Elegans* ile yapılan çalışmalarda, bu enzimin herhangi bir toksik etkisinin olmadığı, canlı gelişimini etkilemediği ve canlı sistemlerin takibi için uygun olduğu gösterilmiştir (Branon T.C. ve ark., 2018). Miniturbo ve TurboID enzimlerinin geliştirilmesi ile enzimatik biyotininilasyonun düşük reaksiyon hızından kaynaklanan verimlilik sorunları büyük ölçüde aşılmıştır.

1.8. Membran Proteinlerinin Biyotininilasyonu

Günümüzde kimyasal biyotininilasyon, yukarıda da bahsettiğimiz dezavantajlara rağmen membran proteinlerinin izolasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu konuda enzimatik biyotininilasyon, kimyasal biyotininilasyon yaklaşımının alternatifi olarak gözükmekte, aşağıda maddeler halinde belirtilen avantajları nedeni ile tercih edilmek istenmektedir. Enzimatik biyotininilasyonun güncel membran izolasyon yöntemlerine göre;

- Homojen bir işaretleme yapması
- Özgülüğünün yüksek olması
- Hücre canlılığına ve hedef proteinlerin yapısına zarar vermemesi
- Fizyolojik strese ve metabolik değişimlere neden olmaması
- Maliyetinin düşüklüğü
- İzolasyonun kolaylığı gibi önemli avantajları vardır.

Enzimatik biyotininilasyon günümüzde farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Bunlardan bir tanesi hücre içi belirli bölgelerdeki proteinlerin tanımlanmasıdır. Literatürde proximity labeling (PL) olarak da bilinen bu teknikte canlı hücrelerde belirli bir bölgede bulunan veya o bölgeye ya da belirli protein-protein grubuna hedeflenen biyotin ligazların bölgesel olarak biyotininilasyon işlemini gerçekleştirmesi hedeflenir. Böylelikle amaca yönelik istenilen

protein grubunun işaretlenmesi veya izolasyonu yapılabilmektedir. Ancak, pek çok avantajı olmasına rağmen enzimatik biyotinitilasyonun PL’de kullanılmasındaki en önemli sorun yavaş enzimatik aktivitedir. Biyotinitilasyon için gerekli olan süre yaklaşık 18-24 saat kadardır. Bu sorunu çözebilmek için BirA* enzimi yerine son dönemde geliştirilen ve yukarıda da bahsettiğimiz TurboID enzimi kullanılmaya başlanmıştır.

TurboID’nin geliştirildiği 2018 yılında bu yana geneli yüksek etki faktörlü dergilerde yayınlanmış 90’nın üzerinde çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda; mitokondri, endoplazmik retikulum, nükleus gibi farklı hücre organellerin proteomlarının incelenmesi, protein-protein etkileşimlerinin analizi, antikor ve protein etiketlenmesi, canlı sistemlerde protein işaretlenmesi ve izolasyonu, interaktom analizleri ve derin tek-hücreli-tip proteom profil analizleri gibi pek çok farklı amaç için TurboID enzimi kullanılmıştır (Branon ve ark.,2018; Larochelle e ark., 2019; Sun ve ark., 2022; Xiong ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2021). Bununla birlikte TurboID’nin hem kullanım alanları hem de yapılan çalışma sayıları her geçen gün artmaktadır. Ayrıca Ting, Branon ve arkadaşlarının geliştirdiği TurboID ve miniTurbo enzimleri, Split-TurboID, AirID ve MicroID₂ gibi farklı amaçlarda kullanılan biyotin ligaz enzimlerinin geliştirilebilmesine imkan tanımıştır (Cho ve ark., 2020; Kido ve ark., 2020; Johnson ve ark., 2022). Bu nedenle enzimatik biyotinitilasyon için önemli bir mihenk taşı olan TurboID’nin gelecek yıllarda daha yaygın kullanım alanları bulacağı ve geniş etkileri olacağın oldukça açıktır.

1.9. Sağlıklı ve Kanserli Meme Dokusu Hücre Hatları

Günümüzde meme kanseri hücrelerinin kültür ortamında çalışılması için farklı özelliklerde hücre hatları bulunmaktadır. Bunlardan biri MCF-10A hücreleridir. Bu hücreler 1984 yılında 36 yaşındaki beyaz ırk bir bayanın meme epitelinden alınmıştır. Tümörojenik olmayan, luminal duktal karakterizasyona sahip olduğu belirlenen bu hücreler meme dokusuna ait antijenleri taşımaktadır. MCF-10A kültür ortamlarında genellikle sağlıklı kontrol grubu olarak kullanılan normal meme hücre hatlarıdır (Qu Y ve ark., 2015). Bir diğer hücre hattı olan MCF-7 ise 1970 yılında 69 yaşında 4. evre’de invaziv duktal meme karsinomuna sahip bayan bir hastanın epitel dokusundan elde edilmiştir. Bu hücre hattı östrojen duyarlı bir hücre hattıdır ve lüminal A alt tipi olarak değerlendirilmektedir. MCF-7 hücrelerinde apoptoz mekanizmaları ve HER-2, p53 ile p21 gen ifadeleri ve bu genlerin düzenlenmeleri normaldir. Ancak DNA tamir mekanizmalarına ait proteinleri etkilenmiştir. Sitogenetik olarak bakıldığında kromozom sayılarında anormallikler görülür. TOP2A, MSH2 ve MLH1

genlerindeki mutasyon nedeni ile ilaç direncine sahiptir (Kaplan ve Gündüz, 2012). Oldukça agresif olan MDA-MB-231 hücreleri ise yüksek kansinorojenik karaktere sahiptir. MDA-MB-231, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonunun yanı sıra HER2'den yoksun olduğu için oldukça agresif, invaziv ve az farklılaşmış triple negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır. Bu hücre hatları metastatik meme adenokarsinomu olan 51 yaşındaki beyaz bir kadının plevral efüzyonundan elde edilmiştir.



2. AMAÇ

Meme kanserinin ülkemizde ve dünyada oldukça yaygın olması, neden olduğu kayıpların çokluğu, geniş kitleleri etkilemesi ve yol açtığı hasar göz önüne alındığında bu kanser türünün teşhisi ve tedavisi ile ilgili yapılan çalışmaların önemini daha da artırmaktadır. Meme kanserinde en iyi tedavi erken tanıdır. Erken tanı konulan hastaların neredeyse tamamına yakını tedavi edilebilmektedir. Bunun içinde kişilerin farkındalığı ve bilinçlilik düzeylerinin artırılması ve risk durumuna bağlı olarak rutin taramalarının yapılması erken tanı için oldukça önemlidir. Ancak meme kanseri vakalarının yüksek oluşu vakaların büyük bir kısmının evre 2 ve daha geç evrelerde belirlenmesi hastalığın tedavisini zorlaştırmaktadır. Kanserde tedaviyi zorlaştıran önemli nedenlerden bir diğeri ise kanserin tiplendirilmesi ve karakterizasyonunun doğru bir şekilde yapılamamasıdır. Kanser hücrelerinin karakteristik çeşitliliği ve sınıflandırılmasının keskin sınırlar ile yapılamaması, tedavinin şekillenmesini zorlaştırmakta, hatalı ya da etkisiz tedavilerin uygulanmasına neden olabilmektedir. Aynı zamanda tedaviyi zorlaştıran bir diğere etmen kanserin hedeflenmesidir. Kanser hücrelerinin hedeflenmesi uygun ve ideal biyobelirteçlerin olmamasından dolayı kısıtlanmaktadır. Bu nedenle kanser hücrelerinin tanısından, karakterinin anlaşılmasında ve hedeflenmesinde kullanılabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi diğere tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de hayati derecede önem taşımaktadır.

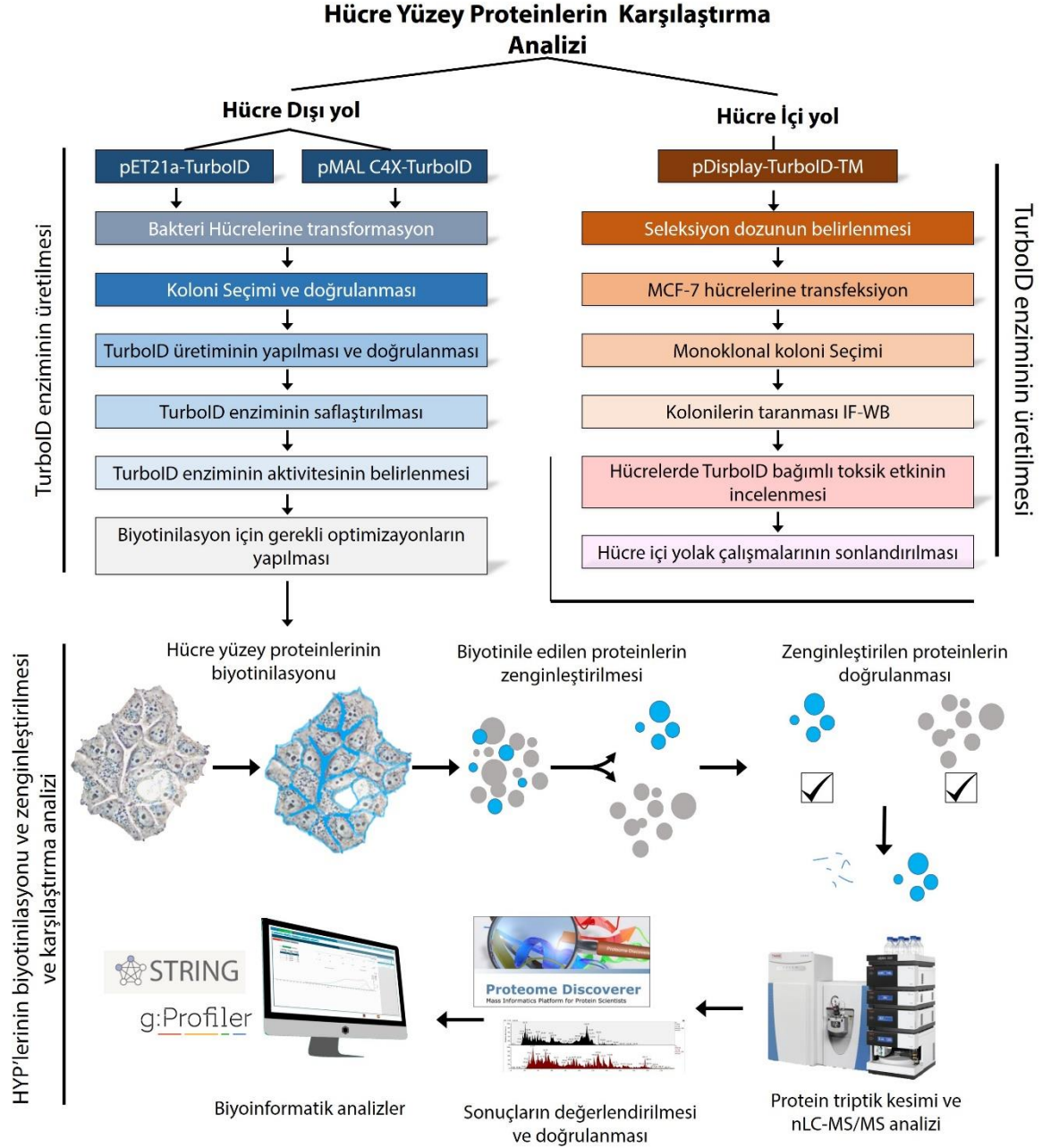
Biyobelirteç çalışmalarında en önemli hedeflerden birisi hücre membran proteinleridir. Hücre membran proteinleri hücrenin dış yüzeyinde bulunurlar ve kolay ulaşılabilirler. Benzer şekilde hücrelerin birbirleriyle ve dış ortam ile etkileşim kurmaları için gerekli olan ve hücrenin kimliğini yansıtan entiteler de membran proteinleridir. Membran protein içeriği o kadar önemlidir ki bize hücrenin iç dinamikleri ve metabolik süreçleri hakkında bilgiler vermektedir.

Günümüzde kullanılan ilaçların büyük bir çoğunluğu membran proteinlerini hedef almaktadır. Ancak bu değerli kaynağı elde etmek ve analiz etmek henüz aşılammış zorluklar içermektedir. Bu zorluklar arasında bu proteinlerin miktarlarının azlığı, çözünürlük sorunları, lipid tabakadan kaynaklı problemler ve zenginleştirme sayılabilir. Bu sorunların çözümüne yönelik pek çok çalışma ve yöntem geliştirilmiş olsa dahi, geliştirilen bu çözümler yeterli değildir ve halen bu konuda çalışmalar devam etmektedir.

Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında sağlıklı meme hücrelerini temsil eden MCF-10A, strojen duyarlı ve Lüminal A alt tipi meme kanseri hücrelerini temsil eden MCF-7 ve yüksek karsinojenik karaktere sahip, triple-negatif meme kanseri hücrelerini temsil eden MDA-MB-231 hücrelerinin membran proteinleri karşılaştırılarak meme kanseri teşhis ve tedavisinde kullanılabilecek ideal biyobelirteç adayları belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasını literatürdeki diğer çalışmalardan ayıran ve özgün kılan en önemli özellik çalışmada daha önce hiç kullanılmamış, doğal bir yöntem olan enzimatik biyotinitasyon yönteminin ilk kez kullanılması amaçlanmıştır. Bu yaklaşımda membran proteinlerinin zenginleştirilmesi için TurboID enziminin bakteri hücrelerinde aktif olarak üretilmesi ve gerekli saflaştırma ve optimizasyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Sonrasında elde edilecek olan aktif, saf TurboID enziminin hücrelerin büyütüldüğü kültür ortamına eklenmesi ve membran proteinlerinin hücre içersindeki hiçbir doğal metabolik aktiviteye zarar vermeden biyotin ile etiketlenmesi düşünülmüştür. Çalışmanın son aşamasında ise biyotin ile etiketlendiği düşünülen membran proteinlerinin straptavidin rezini yardımı ile zenginleştirilmesi ve LC-MS/MS analizleri yapılarak tanımlanması hedeflenmiştir.

3. YÖNTEM

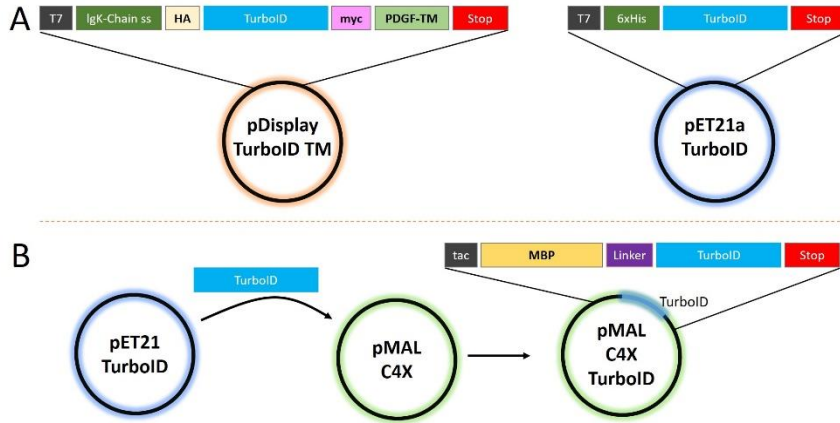
Tez çalışmamız kapsamında meme dokusu hücre hatlarının HYP'lerin karşılaştırmalı analizlerinde iki farklı yaklaşım kullanılması hedeflenmiştir. Yapılan işlemler ve izlenen basamaklar aşağıdaki gibi özetlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Deneylerin yöntemsel akış şeması olarak gösterimi.

3.1. Kullanılan Plazmitler

Tez kapsamında kullanılan pDisplay-TurboID-TM (EcoRI-Ig K-chain ss-HA-BglII-BirA-myc-TM-Stop-NotI) ve TurboID enziminin *E. coli*'de üretilmesi için gerekli olan pET21a-TurboID (EcoRI-6XHis-BirA-HindIII-Stop) plazmitleri Stanford Üniversitesi'nden Dr. Alice T. ve Tess C. Branon tarafından bizlere hediye edildi (Şekil 3.2 A). Hediye edilen plazmitler, laboratuvarımızda önce *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarıldı ve çoğaltıldı sonrasında uygun Restiksiyon Endonükleaz (RE) enzimleri ile kesilerek plazmit içeriği doğrulandı. TurboID'nin MBP etiketli formunu üretebilmek için TurboID'yi kodlayan gen bölgesi BamHI ve HindIII RE enzimleri ile kesilerek pET21a-TurboID rekombinant plazmit vektöründen yine aynı iki enzimle kesilerek açılmış pMAL-C4X vektörü aktarıldı (Şekil 3.2 B).



Şekil 3.2. pDisplay ve pET21a vektörü içerisinde bulunan; A) TurboID gen bölgesini gösteren plazmit haritası, B) Gen bölgesinin pMAL-c4X vektörüne alt-klonlanması.

3.2. Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması

Plazmit transfromasyonlarının gerçekleştirilebilmesi için bakteri hücrelerinin membran yapıları zayıflatılmalı ve plazmitin hücre içerisine geçişi için uygun bir yapıya sahip olmalıdır. Bu amaç için farklı yöntemler kullanılmaktadır. En sık kullanılan yöntemler CaCl_2 gibi kimyasalların kullanıldığı yaklaşımlar ve ısı şoku ile yapılan fiziksel işlemlerdir. Laboratuvarımızda daha çok ısı şoku ile yapılan yöntem kullanılmaktadır. Bu nedenle bizlerde çalışmamız kapsamında ısı şoku uygulayarak bakteriler elektroporasyon işlemine uygun hale getirildi. Bunun için gerekli adımlar aşağıda sıralanmıştır (Tablo 3.1.)

Tablo 3.1. Elektrokompotent hücre hazırlanmasında izlenen adımlar.

Gün	Yapılan işlem
1. Gün	Bakteriler antibiyotiksiz LB Agar plate'e ekildi ve bir gece boyunca 37°C'de büyümesi için inkübe edildi.
2. Gün	Gece boyunca büyüyen bakterilerden tek koloni seçimi yapılarak 2 ml LB (sıvı besiyeri)'ne ekildi ve bakteriler 37°C'de çalkalamalı etüvde bir gece boyunca inkübe edildi.
3. Gün	Gece boyu büyütülen ön kültürden 300 µl alınarak önceden hazırlanmış ve sterilize edilmiş olan 1 litrelik baffled (dalgakıranlı) flask içerisindeki 300 ml'lik LB Broth'a ekim yapıldı ve bakteriler 37°C'de çalkalamalı etüvde büyümeye bırakıldı.
	OD600 değeri 0,6-0,8 aralığına ulaşınca bakteriler alınarak buz ve su karışımında 10 dakika bekletildi.
	10 dakika sonunda hücreler 4.500 rpm'de, +4°C'de, 10 dakika santrifüj edilerek topladı ve süpernatant uzaklaştırıldı.
	Hücreler, daha önceden steril edilmiş %10'luk gliserol ile süspanse edilerek santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem 4 kez tekrarlandı.
	Elde edilen hücreler uygun miktarda %10'luk gliserol içinde süspanse edilerek daha önceden steril hale getirilmiş 0,2 mL'lik tüplere 50 µL/tüp olacak şekilde paylaştırıldı ve tüpler hızlı bir şekilde kurubuz üzerine aktarıldı. Elektrokompotent hale gelen hücreler kullanım zamanına kadar sıvı azot içerisinde saklandı.

3.3. Bakteri Hücrelerinde Transformasyonun Gerçekleştirilmesi

Tez çalışmamız kapsamında iki farklı amaçla transformasyon işlemleri yapılmıştır; (1) plazmitlerin çoğaltılması (2) protein ekspresyonu. Elektroporasyon için soğuk ortamda membran yapısı zayıflatılmış 50 µL elektrokompotent hücre uygun plazmit içeriği ile (3 µL'yi aşmayacak hacimde) karıştırılarak elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı. Daha sonra hücre-plazmit karışımı hızlıca elektroporator cihazına yerleştirilerek (Eppendorf, Electroporator 2510, USA) 2 ms ve 1780 volt elektrik uygulamasıyla transformasyon işlemleri gerçekleştirildi. Hücrelerin kendini toparlaması için bakterilerin üzerlerine 300 µL süper optimal besiyeri (SOB) eklenerek 1 saat kadar 37°C'de inkübasyona bırakıldı (Kasap, 2008). İnkübasyon sonrasında bakteriler koloni seçilimi için ampisilin içeren seçici besiyerlerine ekildi.

Plazmitlerin çoğaltılması ve yapılan klonlama işlemleri için *E. coli* XL1-blue hücre hatlarında transformasyon işlemleri gerçekleştirildi. Transformasyon sonrası doğrulama

işlemleri için RE enzimleri ile yapılan kesimler ve/veya koloni PCR yöntemleri kullanıldı. Doğrulan kolonilerden amaca göre; mini, midi veya endofree-maxi kitleri (Qiagen, USA) kullanılarak ve kit prosedürleri izlenerek plazmit izolasyonları gerçekleştirildi. Protein üretimi için ise *E. coli* K12, BL21 DE3 pLyss, W31110 ve BL21 DE3 ekspresyon suşları kullanıldı. Bakterilere ait gliserol stokların oluşturulması için, büyüme fazı içerisindeki bakterilerden 600 µL bakteri örneği alınarak 200 µL steril %60 gliserol ile karıştırıldı. Sonrasında sıvı azotta hızlı bir şekilde dondurulan bakteri hücreleri -80°C’de saklandı.

3.4. TurboID Enziminin Üretimi, Doğrulanması ve Saflaştırılması

3.4.1. TurboID Enzimin Üretilmesi

Transformasyon sonrası TurboID enziminin üretimi için farklı ekspresyon suşları test edildi. Bu amaçla seçilen *E. coli* W3110, *E. coli* BL21, *E. coli* BL21 DE3 pLyss ve K12 hücre hatlarına pET21a-TurboID ve pMAL C4X-TurboID transfeksiyonları yapıldı ve sonrasında elde edilen kolonilerden tek koloni seçimi gerçekleştirildi. Seçilen kolonilerden steril öze yardımıyla alınan bakteriler, önce gece boyu ampisilin içeren Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerine ekilerek ön kültür için büyütüldü. Gece boyu yapılan ön kültür sonrasında protein üretimi için 100 ml LB sıvı besiyerine %1 oranında ekimleri yapılan bakteri hücreleri uygun yoğunluğuna (OD₆₀₀=0,4-0,6) ulaşana kadar 37°C’de 250 rpm’de çalkalanarak büyütüldü. Protein üretiminin başlatılması için ortama son konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) eklendi. Protein üretiminin gerçekleşmesi için bakteriler 30°C’de 2 saat boyunca 250 rpm’de çalkalanarak inkübe edildi. Bu sürenin sonunda bakteriler 3500xg’de 20 dakika santrifüj edilerek toplandı. Çöken bakterilerin yıkanması ve kalan besiyerinin uzaklaştırılması için bakteriler 3 mL PBS tamponu süspanse edildi ve ardından tekrar santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısmı atılan bakteriler TPER lizis tamponu (Thermo Fisher Scientific) içerisinde çözülerek buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Protein özütlerinin elde edilmesi için bakteri hücrelerinin üzerine 0,2 mm’lik paslanmaz çelik boncuklar eklendi (Nextadvance). Örnekler homojenizatör cihazı yardımı ile (Next Advance Bullet Blender) homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 10.000xg’de 10 dakika santrifüj edildi ve protein özütlerini içeren süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde lizise uğramamış bakteri hücreleri ve hücresel parçalanma ürünlerinden temizlenerek yeni tüplere aktarıldı. Elde edilen protein özütlerinin konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendi ve SDS-PAGE analizleri yapılarak protein üretimi ve kalitesi kontrol edildi. TurboID enziminin üretiminden sonra yapılan SDS-PAGE

analizlerinde beklenen bölgede yoğun protein bandı gözlemlendikten sonra, üretilen proteinin TurboID olup olmadığının tanımlanması için iki farklı yöntem kullanıldı.

3.4.2. MALDI-TOF/TOF Analizi ile TurboID Üretiminin Doğrulanması

TurboID enzim üretiminin doğrulanması için kullanılan ilk yöntemde bakterilerde ifadesi yapılan ve TurboID enzimi olduğu düşünülen protein bandı SDS-PAGE jellerden kesilerek jel içi triptik kesim işlemine tabi tutuldu. Bu işlemde Thermo jel içi kesim kiti (Thermo scientific) kullanıldı ve kesim işlemleri, kitin önerdiği protokol izlenerek gerçekleştirildi. Triptik kesim işlemi sonrası elde edilen peptidler C18 ZipTip kolonlar (Millipore, Burlington, MA, USA) yardımıyla temizlendikten sonra matriks solüsyonu (%50 asetonitril (ACN), %0.1, trifloroasetik asit (TFA) ve 10 mg/ml alfa-siyano-4-hidroksisinamik asit) ile kolondan indirildi ve MALDI-TOF/TOF örnek tabakası üzerine damla şeklinde aktarıldı. Tabaka üzerinde kuruyan peptit-matriks karışımı AB SCIEX TOF/TOF 5800 (AB Sciex, Framingham, MA, ABD) cihazında analiz edildi. Elde edilen veriler MASCOT veritabanı (Matrix Science, Boston, MA, ABD) ve ProteinPilot yazılımı 4.0.8085 revizyon 148085 (AB Sciex, Framingham, MA, ABD) ile belirlenmiş parametrelere (atlanmış kesim bölgesi=1, sabit modifikasyon olarak karbamidometilin (C), değişken modifikasyonlar ise oksidasyon (M), peptit kütle toleransı= 50 ppm, kütle toleransı = ± 0.2 Da, peptit yükü = 1+) göre analiz edildi. Elde edilen sonuçlarda kesilen protein bandının TurboID enzimin geliştirildiği *E.coli*. BirA enzimi olduğu belirlendi.

3.4.3. Western Blot (WB) Yöntemi ile TurboID Üretiminin Doğrulanması

MALDI-TOF/TOF analizine ek olarak, TurboID enziminin doğrulanması için WB analizi yapıldı pET-21a vektörü üzerinden üretilen TurboID enzimi anti-His antikoru ile doğrulanırken MBP etiketli TurboID enzimlerinin doğrulanması deneyinde BirA antikoru (Novus firmasına NBP2-59939, USA) kullanıldı. Yapılan WB analizlerinde TurboID'nin üretimi her iki antikor ile de gösterildi. WB analizlerinde kullanılan antikorlar ve takip edilen deneysel basamaklar Tablo olarak EK-1'de verilmiştir (Bakınız EK-1).

3.4.4. TurboID Enziminin Saflaştırılması

Üretilen TurboID enziminin saflaştırılması için enzimde bulunan 6XHis etiketinden faydalanıldı. 6XHis etiketi, 6 adet histidin amino asidinin sıralı bir şekilde diziliminden meydana gelmektedir. Histidin amino asidinin yan zinciri olan imidazol halkasının Nikel atomuna olan afinitesinden yararlanılarak yapılan TurboID saflaştırma işlemi için 1 mL'lik

Ni-NTA kolonları (GE, GE17-5247-01) kullanıldı. Bu işlem için protein örnekleri kolon bağlama tamponu (20 mM sodyum fosfat, 0.5 M NaCl, 40 mM imidazol, pH 7.4) ile 1:5 oranında seyreltildi. Ardından örnekler bağlama tamponu ile şartlandırılmış kolona yüklenerek kolondan geçirildi. Kolon hacminin 10 katı (10 mL) kadar bağlama tamponu kolondan geçirilerek safsızlık oluşturacak proteinlerin uzaklaştırılması ve kolonun yıkanması sağlandı. His etiketli TurboID proteinlerin kolondan indirilerek saflaştırılması için kolondan 5 mL elüsyon tamponu geçirildi. Elüsyonlar 0.5 mL/tüp olacak şekilde toplandı ve elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE analizleri yapıldı. Böylece yapılan saflaştırma işleminin verimliliği belirlendi. Saflaştırılan TurboID enziminin konsantrasyonlarının belirlenmesi için SDS-PAGE jellerde birlikte yürütülen Bovin serum albümin (BSA) standartları ve TurboID enzim dilüsyonları kullanıldı. Yürütülen jeller koloidal Coomassie Mavisi ile boyanarak elde edilen bantların yoğunlukları QuantityOne (Bio-Rad, ABD) programı kullanılarak hesaplandı. BSA standartları ile oluşturulan grafik üzerinden saf TurboID enziminin konsantrasyonu belirlendi. TurboID enzimi hücre membran proteinlerinin biyotinyasyonunda kullanılmak üzere parçalara bölünerek -80°C'de saklandı.

3.5. MBP Etiketli TurboID Enzimin Faktör Xa Enzimi ile Kesimi

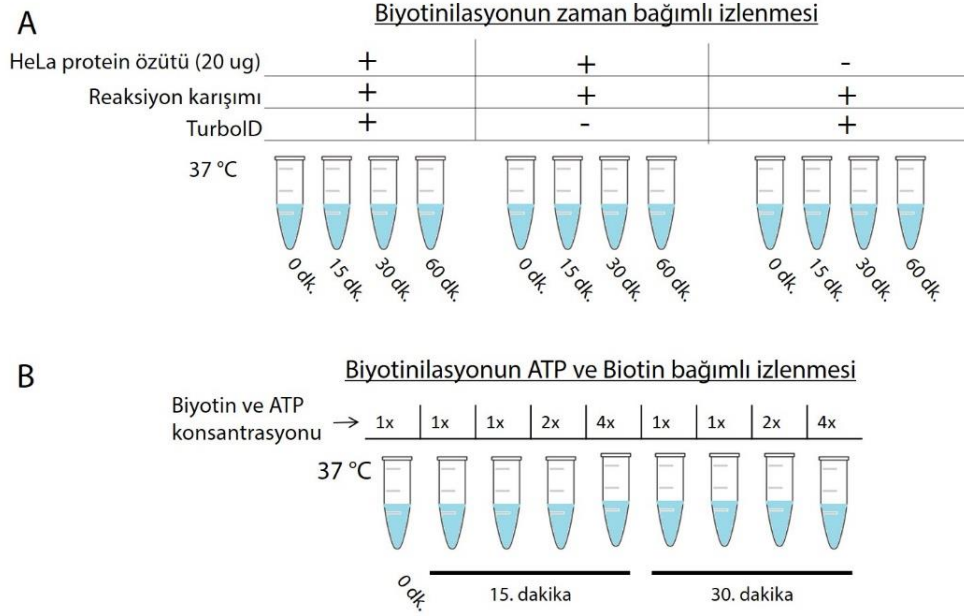
MBP etiketini büyük bir molekül olduğundan ve TurboID enzimi reaksiyon gösterebilmesi için hedef proteinlere yaklaşması gerektiğinden MBP etiketinin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Yapılan ilk çalışmaların His etiketi yapılmasının nedenlerinden biride küçük bir etiket olmasıdır. MBP etiketinin uzaklaştırılması için TurboID ile arasındaki bölgede bulunan Faktör Xa enzim kesim noktası kullanıldı. Normal koşullarda MBP etiketinin proteinlerden kesilerek uzaklaştırılması için yapılan Faktör Xa ile işlemi kolonlardan elüsyon sonrasında gerçekleştirilmektedir. Ancak çalışmamızda amiloz rezinden elde edilen saflaştırma örneklerinde çok fazla protein kirliliği olduğu görülmüştü. Elüsyonlardaki bu kirlilikten kurtulmak için kesim işlemleri yıkama işlemi sonrasında kolonda bağlı bulunan proteinler üzerinde yapıldı. Böylelikle amiloz rezinler bağlanan ve elüsyon örneklerinde safsızlıklara yol açan proteinler kolona bağlı kalırken sadece kesilen ve böylelikle serbest kalan TurboID enzimlerinin daha yüksek saflıkta elde edilmesi amaçlandı. Bunun için kolona bağlanan MBP etiketli TurboID enzimleri gece boyu Faktör Xa ile PBS içerisinde ve oda koşullarında kesime bırakıldı. Kesim için rezin içerisinde Faktör Xa enzim konsantrasyonu 20 ng/ μ L olacak şekilde uygulandı.

3.6. TurboID ve BirA Enzimlerinin His Etiketi Konumlarının Belirlenmesi

TurboID ve BirA enzimlerinin Ni-NTA kolonlara bağlanma düzeylerinin farklı olmasının nedenleri incelenirken her iki etiketin, enzimlerin 3 boyutlu yapılarında nasıl konumlandığı ve bağlanmaya engel bir durumun olup olmağının incelendi. Bunun için her iki enzime ait protein diziler Swissmodel aracı kullanılarak modellendi ve his etiketlerinin bulunduğu konumlar analiz edildi (<https://swissmodel.expasy.org>).

3.7. Biotinilasyon Reaksiyonunun Optimizasyonu

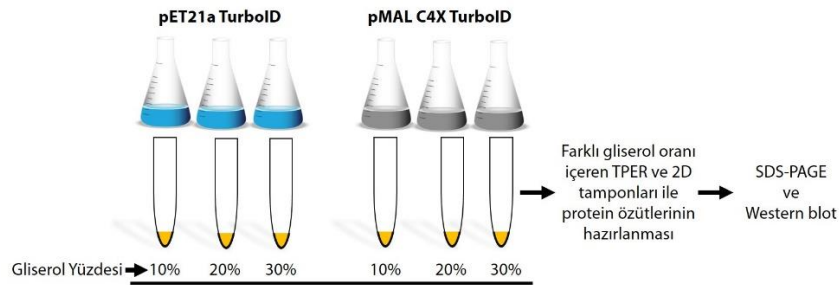
Gerçekleştirilecek biyotinilasyon reaksiyonu için gerekli sürenin, ATP ve biyotin konsantrasyonlarının reaksiyon üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için deneyler yapıldı. Biotinilasyon için gerekli sürenin belirlenmesi için saflaştırılmış 0.2 µg TurboID enzimi, 20 µg HeLA protein özütünü ile birlikte farklı zaman, ATP ve biyotin konsantrasyonlarında bir araya getirilerek biyotinilasyon etkinlikleri belirlendi. Zaman bağımlı biyotinilasyon aktivitesinin belirlenmesi için yapılan deneyde 0,5 mM biotin, 1 mM ATP ve 5 mM MgCl₂ kullanılarak dört farklı zaman diliminde (0, 15, 30 ve 60 dakika) enzimin sergilediği biyotinilasyon aktivitesi belirlendi ve aktivite düzeyleri Streptavidin-HRP'nin kullanıldığı WB analizleri ile incelendi (Şekil 3.3 A). Benzer şekilde reaksiyon ortamındaki ATP ve biyotin miktarlarının 2 ve 4 kat arttırıldığı durumlarda da enzimin sergilediği aktivite değişiklikleri benzer şekilde yapılan WB analizleri ile belirlendi (Şekil 3.3 B).



Şekil 3.3. Biyotinilasyon reaksiyon koşullarının optimizasyonu için kullanılan deney tasarımı. A) Farklı zaman dilimlerinde biyotinilasyon düzeylerinin belirlenmesi. B) Farklı ATP ve Biotin konsantrasyonlarının biyotinilasyon aktivitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi.

3.8. Saflaştırma ve Saklama Koşulları İçin Gerekli Gliserol Oranın Belirlenmesi

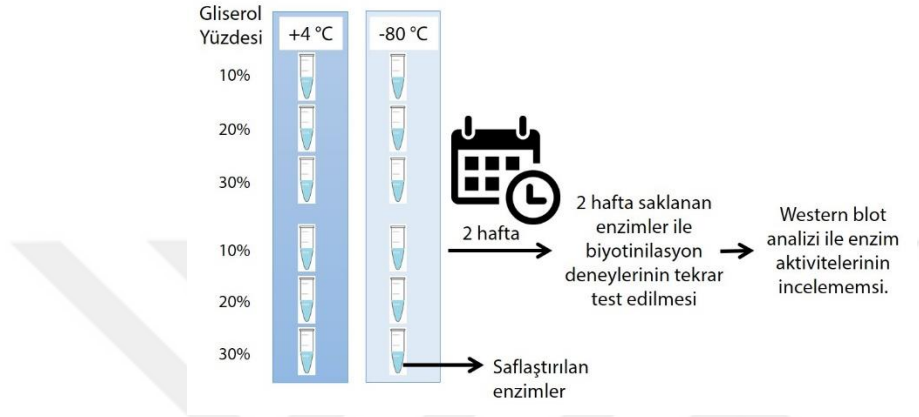
Optimizasyon çalışmaları esnasında saflaştırılan TurboID enziminin aktivitesinin zaman içerisinde ciddi olarak azaldığı gözlemlendiği için aktivitenin korunması amacıyla gliserol eklenmesine karar verildi. Bunun için hem pET21a-TurboID hem de pMAL C4X TurboID plazmitleri kullanılarak üretilen enzimler farklı gliserol konsantrasyonları içeren (%10, %20 ve %30) çözeltiler ile lizize uğratıldı, saflaştırıldı ve saklandı (Şekil 3.4). Saflaştırılan enzimlerin aktiviteleri incelenerek gliserolün enzim aktivitesi üzerindeki etkisi analiz edildi.



Şekil 3.4. Gliserol etkisinin enzim aktivitesi üzerine test edilmesini gösteren deneysel akış şeması.

3.9. Saklama Koşullarının TurboID Enzim Aktivitesinin Üzerinde Zamana Bağlı Etkisinin İncelenmesi

Üretilen TurboID enzimlerinin saklama sıcaklığı ve zamanı içerisinde gerçekleşen aktivite değişimleri belirlenmesi amacı ile enzimler +4°C ve -80°C’de 2 hafta boyunca saklandıktan sonra HeLa protein özütleri üzerindeki aktiviteleri analiz edildi (Şekil 3.5). Bunun için 20 µg HeLa protein özütü kullanılarak biyotinilasyon deneyleri yapıldı. Biyotinilasyon sonrasında enzim aktiviteleri streptavidin-HRP kullanılarak yapılan WB yöntemi ile analiz edildi.



Şekil 3.5. TurboID enzimlerinin farklı sıcaklık ve gliserol koşullarında saklanması enzim aktivitelerinin üzerine etkisinin incelendiği deneysel yaklaşımın resimsel gösterimi.

3.10. Hücre Kültürleri

Deneylerde kullanılacak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları; %10 Fetal Bovin Serum (FBS), ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium, Gibco) besiyerinde büyütüldü. MCF-10A hücreleri ise; MEGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium, Gibco) besiyeri içerisinde, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 MEGS (Mammary Epithelial Growth Supplement, Gibco) içeren besiyerinde büyütüldü. Kültür sırasında hücreler %5’lik CO₂ altında, 37°C’de inkübe edildi. Hücre besiyerleri ekim işlemi sonrasında hücre yoğunluğuna ve büyüme hızlarına bağlı olarak hücre yoğunluğu %75-90 Aralığında iken her 2-3 günde bir pasajlandı. Gerekli durumlarda ise hücrelerden saklamalar alındı ve sıvı azot içerisinde tutuldu.

3.11. Hücrelerden Saklama Alınması

Hücrelerden saklama alabilmek için; %70 DMEM, %20 FBS ve %10 DMSO içeren saklama besiyeri hazırlandı. Hücrelerin üzerine hücre miktarına bağlı olarak belirlenen miktarda saklama solüsyonu eklendi ve her bir karyotüpe 1 ml olacak şekilde dağıldı. Tüpler

-80°C’de kyro-freezer saklama kabında (Nalgene, ABD) bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına yerleştirilerek çözülüp kullanılıncaya kadar tank içerisinde tutuldu.

3.12. Stabil Hücre Hattı Oluşturmak İçin Gereken Antibiyotik Dozunun Belirlenmesi

Meme dokusu hücre hatlarına yapılan transfeksiyon işlemi sonrasında hücrelerin seçilmesi için pDisplay-TurboID-TM vektörü içerisinde bulunan Genetisin (G-418) direnç geni kullanıldı. Transfeksiyon işlemi öncesinde ilk olarak hücrelerde genetisin antibiyotiğinin öldürücü dozları belirlendi. Bunun için 12 kuyucuklu büyüme kaplarına 50.000 hücre /kuyu olacak şekilde ekim yapıldı. Bir gün sonra hücreler üzerindeki besiyeri çekilerek ortama farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren yeni besiyerleri eklendi. Dozun belirlenmesi için 0, 100, 200, 400, 800 ve 1200 µg/mL antibiyotik konsantrasyonları kullanıldı. Her bir konsantrasyon 2 tekrar olacak şekilde test edildi. Hücreler üzerindeki besi yerleri 2 gün aralıklarla değiştirildi. İnkübasyonun ardından sekizinci günde kontrol grubu %100 yoğunluğa ulaştığında hücreler tripsin ile kaldırılarak kuyulardaki toplam hücre sayısı tripan mavisi boyası ile boyanarak mikroskop altında sayıldı. Elde edilen veriler ile koloni seçimi için gerekli doz miktarı belirlendi.

3.13. Ökaryotik Meme Hücre Hatlarına pDisplay-TurboID-TM Plazmit Transfeksiyonu

Sağlıklı ve karsinojenik ökaryotik meme hücrelerinde TurboID enziminin hücre içi yollar üzerinden üretilmesi için ilk çalışmalarda MCF-7 hücre hattı kullanıldı. Bu amaçla hücre yoğunluğu yaklaşık %75’e ulaşana kadar beklenildi. Yeterli yoğunluğa ulaşmış olan hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve hücre ortamı yeni besiyeri ile yıkandı. Bir sonraki aşamada hücreler, büyüme kabı yüzeyinden uygun miktarda %0.25’lik Tripsin muamelesi ile kaldırıldı. Bu işlemin ardından tripsin enzimi %1 FBS ile nötralize edildi. Ardından sayılan hücrelerden 1×10^6 hücre alınarak yeni bir tüpe aktarıldı ve Neon-transfeksiyon sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile cihazın önerdiği protokol izlenerek transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi.

3.14. Transfeksiyon Sonrası MCF-7 Hücrelerine Ait Koloni Seçimi

Transfeksiyon işlemi sonrasında antibiyotiksiz besiyerlerine ekimleri gerçekleştirilen MCF-7 hücrelerine bir gün sonra penisilin/streptomisin (%1) ve genetisin (800 µg/mL) antibiyotikleri eklendi. Her iki gün aralıklar ile besiyerleri değiştirilen hücrelerde 10-11 gün

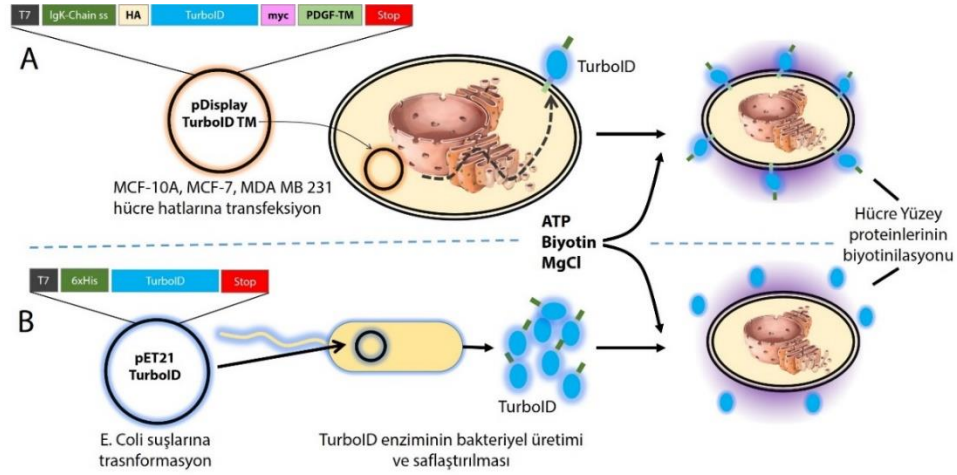
sonra antibiyotik direnci gösteren kolonilerin oluşumu gözlemlendi. Yeterli büyüklüğe ulaşan koloniler cam silindirler yardımı ile birbirilerine karışmayacak şekilde ayrıldı ve tripsin ile kaldırılarak 300 µL besiyeri içeren 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Hücre yoğunluğu %70'e ulaştıktan sonra büyüyen hücreler 3 mL besiyeri içeren kültür kaplarına aktarıldı. Ardından hücrelerin bir kısmı WB analizi için kazınarak toplanırken kalan kısmı ise tripsin ile kaldırılıp yeni kültür kaplarına ekimleri yapıldı. Kolonilerin TurboID ifade edip etmediklerinin doğrulanması için hücrelerden elde edilen protein özütleri ile yapılan ve Anti-BirA antikorumun kullanıldığı WB analizleri ile gerçekleştirildi.

3.15. Hücre Yüzey Proteinlerinin Biotinilasyonu

Hücre membran proteinlerinin biotinilasyonu için TurboID enzimi endojen olarak hücrelerce üretilerek ya da *E. coli*'de üretilip saflaştırdıktan sonra hücrelerin bulunduğu kültür ortamına eklenerek gerçekleştirildi.

3.15.1. TurboID Enziminin Endojen Olarak Hücrelerce Üretimi ve Biotinilasyonda Kullanılması

Bu yaklaşımda pDisplay–TurboID-TM plazmiti Neon transfer sistemi kullanılarak MCF-7 hücre hattına transfekte edildi ve koloni seçimi yukarıda anlaşıldığı şekilde gerçekleştirildi. Ardından hücre içerisinde üretimi gerçekleştirilen enzimin PDGF-TM (Platelet-Türevli Büyüme Faktörü transmembran domaini) bölgesi yardımıyla hücre PM'nin ekstrasellüler yüzeyine yerleşimi sağlandı. Daha sonra ortama eklenen biyotin, ATP ve MgCl₂ ile yüzey proteinlerinin biotinilasyonu gerçekleştirildi (Hücre içi yöntem Şekil 3.6 A).

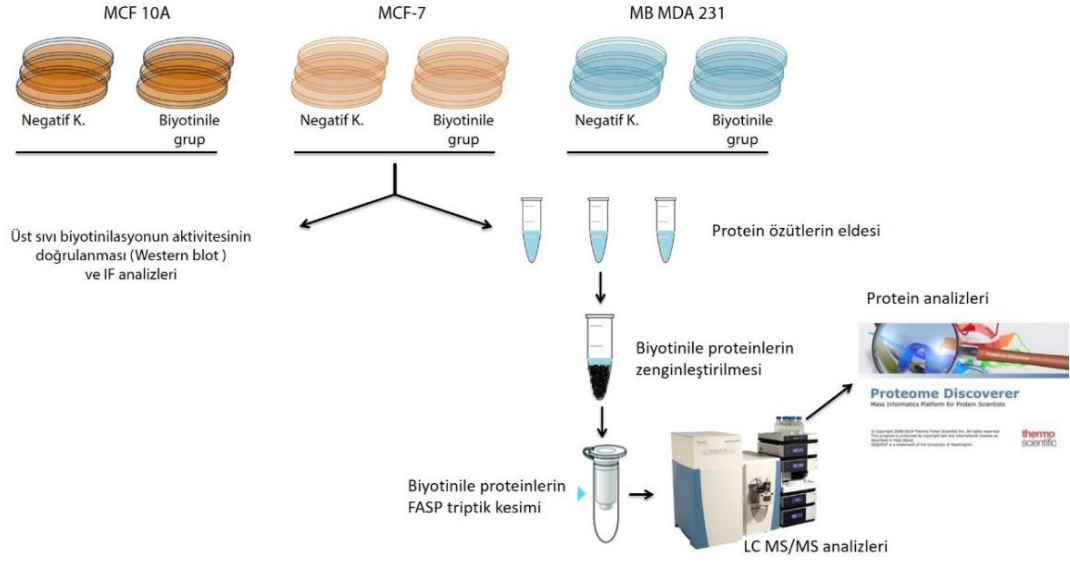


Şekil 3.6. Meme dokusu hücre hatlarında yüzey proteinlerinin farklı iki yöntem kullanılarak yapılan biyotininilasyonunun şematik gösterimi A) TurboID enziminin hücre içerisinde üretilip hücre yüzeyine lokalizasyonunun sağlanması amacı ile gerçekleştirilen biyotininilasyon yaklaşımı. B) TurboID enziminin *E. coli* içerisinde üretilerek saflaştırılması sonrasında bu enzimlerin hücre kültür ortamına eklenmesi sonucu HYP'lerinin biyotininilasyonu.

3.15.2. Hücre Yüzey Proteinlerinin Dışarıdan Eklenen TurboID Enzimi ile Biyotininlenmesi (Hücre Dışı Yöntem)

Bu yaklaşımda TurboID enzimi *E. coli* hücrelerinde uygun şartlar altında aktivitesini koruyacak şekilde üretilip saflaştırıldıktan ve saf enzim çözeltisinde bulunan gliserol diyaliz yöntemi ile uzaklaştırıldı. Bunun için cut-off limiti 2 kDa olan 3 mL'lik diyaliz kasetleri (Slide A lyzer, Thermo) içerisine yüklenen %10 gliserol içerisindeki saf TurboID enzimi 250 mL DMEM solüsyonuna karşı 2 saat boyunca manyetik çalkalayıcı üzerinde diyaliz edildi. İşlem bittikten sonra temiz tüplere alınan örnek hücre kültürü çalışmalarında kullanıldı. MCF-10A, MCF-7 ve MDA MD-231 hücrelerinde HYP'lerinin biyotininilasyonu için her hücre için 6 adet ve toplamda 18 adet 100 mm'lik kültür kaplarına yoğunluğu 2×10^6 hücre/kap olacak şekilde ekildi. Her hücre grubu için büyütülen 6 adet petriden 3 tanesi negatif kontrol olarak kullanıldı. Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaşınca kadar kültür kaplarında büyütüldü ve biyotininilasyon işlemi öncesi 5 kez PBS ile yıkanarak ortamdaki FBS uzaklaştırıldı ve negatif kontrol kültür kapları hariç üzerlerine 25 ng/ μ L TurboID içeren reaksiyon tamponu (DMEM veya MEGM içinde 0,5 mM Biotin, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂) eklendi. Negatif kontrol kaplarına ise TurboID enzimi içermeyen reaksiyon tamponu eklendi ve tüm kaplar 37°C'de 30 dakika biyotininilasyonun gerçekleşmesi için inkübe edildi.

(Hücre dışı yöntem, Şekil 3.6 B, Şekil 3.7). İnkübasyon sonrasında hücreler buz üzerine alınarak biyotinilasyon reaksiyonu durduruldu.



Şekil 3.7. Hücre yüzey proteinlerinin dışarıdan eklenen TurboID enzimi ile işaretlenmesi.

3.16. Protein Özütlerinin Hazırlanması

Biyotinilasyon reaksiyonlarının sonrasında hücrelerin üzerindeki üst sıvı alınarak temiz tüplere aktarıldı. Hücreler 5 kez PBS ile yıkanarak yüzeyde kalabilecek enzim ve diğer kirliliklerden temizlendi. Ardından üzerine 1 mL DPBS eklenen hücreler, hücre kazıyıcı (scraper) yardımıyla kazınarak toplandı. Santrifüj edilerek toplanan hücreler üzerindeki süpernatant atılarak kalan hücre pelleti RIPA tamponu (Thermo Fisher Scientific) ve proteaz karışımı (Merck,) süspanse edildi. Buz üzerinde 30 dakika bekletilen hücrelerinin üzerine 0,2 ve 0,5 mm'lik paslanmaz çelik boncuklar konuldu (NextAdvance, ABD) ve örnekler +4°C'de bulunan homojenizatör yardımı ile (Next Advance Bullet Blender, ABD) lize uğratıldı. Liziz sonrası örnekler 10.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve çözünür proteinleri içeren süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde yeni tüplere aktarıldı. Elde edilen protein özütlerinin konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendi ve örneklerin SDS-PAGE analizleri yapılarak protein üretimi ve kalitesi kontrol edildi.

3.17. Biyotinlenen Proteinlerin Zenginleştirilmesi ve Doğrulanması

Kontrol ve biyotinile edilen gruplara ait protein örneklerindeki, biyotin etiketi taşıyan proteinlerin zenginleştirilmesi için streptavidin kaplı manyetik boncuklar kullanıldı. 100 µL manyetik boncuk 1,5 mL'lik eppendorf tüplerin içerisine aktarıldı ve tüpler manyetik stant

üzerine oturtuldu. Manyetik boncukların içerisinde bulunduğu tampon uzaklaştırıldıktan sonra manyetik boncuklar 200 µL RIPA tamponu kullanılarak 2 kez yıkandı ve örneklerden eşit miktarda protein alınarak son hacim 300 µL olacak şekilde manyetik boncuklar ile karıştırıldı. Karışım +4°C’de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonunda manyetik stant kullanılarak boncuklara bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldı ve temiz bir tüpe aktarıldı. Manyetik boncukların temizlenmesi için; 2 kez 200 µL RIPA, bir kez 1 mL 1M KCl, bir kez 1 mL 0,1M Na₂CO₃, bir kez 1 mL 2M üre içeren 10 mM Tris·HCl (pH 8.0) içerisinde ve ardından tekrar iki kez 200 µL RIPA lizis tamponu ile yıkanarak kirlilikler ve bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldı. Manyetik boncuklara bağlı proteinlerin elüsyonu için boncukların üzerine 100 µL elüsyon tamponu (%2 SDS, 30 mM biyotin, 0.3 M NaCl, 25 mM TrisHCL, pH:7.4) eklendi ve örnekler 94°C’de 10 dakika bekletildi. Sonrasında manyetik stant kullanılarak biyotin etiketli proteinlerin bulunduğu süpernatant kısmı temiz eppendorf tüplere alındı.

Zenginleştirme işleminin doğrulanması için elde edilen protein özütleri, manyetik boncuklara bağlanmayan proteinler ve bağlanan manyetik boncuklara kullanılarak WB analizleri yapıldı. WB analizlerinde streptavidin-HRP ve anti-Na/K ATPase antikoru kullanılarak biyotin ile işaretli proteinlerin ve HYP proteinlerinin zenginleştirildiği doğrulandı.

3.18. Zenginleştirilmiş Proteinlerin Tripsin ile Kesimi

Zenginleştirilmiş proteinlerin nLC-MS/MS analizlerinde kullanmak için öncelikle solüsyon içi kesim yöntemi denendi (Thermo Fisher Scientific, ABD). Kesim işlemi için örneklerden alınan 20 µg protein üretici firma tarafından önerilen protokole uygun şekilde tripsin ile kesime tabi tutuldu. Elde edilen peptit örnekleri kullanılarak yapılan ilk nLC-MS/MS analizlerinde protein sayısının beklenilenden çok daha az olması ve tripsin ile kesimin etkili olmamasından dolayı kesim işlemleri için farklı bir yöntem olan Filtre yardımcı örnek hazırlama (FASP) (Abcam, USA) metodunun kullanılmasına karar verildi. FASP kesimi için 100 µg protein özütü (30 µl aşmayan hacim içerisinde) 200 µl 8 M üre solüsyonu ile karıştırılarak 30 kDa’lık membran filtre üzerine aktarıldı. Filtreler kit içerisindeki özel eppendorf tüplere yerleştirildikten sonra 10 dakika 15000xg’de santrifüj edildi. Filtrelerin üzerine 8 M üre solüsyonundan 100 µL daha eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı. Ardından filtre üzerindeki üre yardımıyla bozulan disülfid bağlarının tekrar oluşumunun engellenmesi için 8M üre tamponu ile hazırlanan iyodoasetamid tamponu

membran üzerine eklenerek örnekler tüpün kenarına hafifçe vurarak karıştırıldı ve karanlık ortamda 20 dakika bekletildi. Bu işlem sonrasında tekrar santrifüj işlemi yapıldı ve örneklerin yıkanması için filtre üzerine 2 kez 100 µL 50 mM AmBic (Amonyum bikarbonat) solüsyonu eklenerek santrifüj işlemleri tekrarlandı. Temizlenen örnekler üzerine 50 mM AmBic içinde hazırlanan tripsin çözeltisi (53 ng/µL tripsin) eklendi. Kesim işlemi için gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Kesim işleminden sonra peptitlerin elde edilmesi için filtre temiz bir tüpe alındı ve üzerindeki örnekler sırasıyla 40 µL AmBic (2 kez) ve 50 mM NaCl₂ eklenerek santrifüj edildi ve elde edilen peptit örnekleri eppendorf tüp içerisine toplandı. Toplanan peptit örnekleri. SpeedVac santrifüj cihazı kullanılarak (Eppendorf, ABD) kurutuldu ve kalan liyofilize peptitler nLC-MS/MS analizi için 20 µL %0,1’lik Formik Asit çözeltisi (FA) içerisinde yeniden süspanse edildi. Peptit konsantrasyonları, Qubit protein ölçüm kiti (Thermo Fisher) kullanılarak Qubit 4 Florometre (Thermo Fisher) cihazında belirlendi.

3.19. Nano-Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (nLC-MS/MS) Analizi

Peptitler, Q-Exactive kütle spektrometresine (Thermo Scientific, ABD) bağlı Ultimate 3000 RSLC nano sistemi (Dionex, Thermo Scientific, CA, ABD) kullanılarak nLC-MS/MS sistemi ile analiz edildi. Tüm sistem Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) aracılığıyla kontrol edildi. A (%0,1 FA) ve B (%80 Asetonitril + %0,1 Formik Asit) mobil fazları kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ayrımı yapıldı. Kesilmiş peptitler, bir tuzak (trap) kolonu üzerinden geçirilerek konsantre edildi ve tuzlardan arındırıldı. Daha sonra peptidler Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonuna (75 µm x 15 cm x 2 µm, 100 Å çap, Thermo Scientific, CA, ABD) aktararak kromatografik ayrılma işlemine tabi tutuldu. Bu süreçte aşağıda özetlenen ayırma gradyanı kullanıldı. On dakika için %6 B, 60 dakika için %6-10 B, 150 dakika için %10-30 B, 40 dakika için %30-50 B, 20 dakika için %50-90, 10 dakika için %90, 10 dakika için %90-6 B ve 5 dakika için %6 B olacak şekilde 300 dakikalık toplam çalışma süresinde 300 nL/dakika akış hızıyla analizler gerçekleştirildi. Tam tarama MS1 spektrumları aşağıdaki parametrelerle elde edildi: çözünürlük 70.000, tarama aralığı 400-2000 m/z, hedef otomatik kazanç kontrolü (AGC) 3×E6, maksimum enjeksiyon süresi 60 ms, püskürtme voltajı 2.3 kV. MS/MS analizi, ilk on öncü iyonun seçilmesiyle veriye bağlı edinim yoluyla gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki parametrelerle çarpışma kaynaklı ayrışmadan (yüksek enerjili çarpışmalı ayrışma (higher-energy collisional dissociation- HCD)) oluşan MS2 analizi; çözünürlük 17.500, AGC 1E6;

maksimum enjeksiyon süresi 100 ms, izolasyon penceresi 2.0 m/z normalleştirildi ve çarpışma enerjisi (NCE) 27 olacak şekilde gerçekleştirildi. Cihaz, her analizden önce standart bir pozitif kalibratör ile (LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution, Pierce, ABD) kalibre edildi.

3.20. nLC-MS/MS Veri Analizi

Ham verilerin analizi ve protein tanımlaması için Proteom Discoverer 2.5 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı ve analizler sırasında aşağıdaki parametreler uygulandı; Peptit kütle toleransı 10 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sabit değişiklikler sistein karbamidometilasyonu, kararsız değişiklikler metionin oksidasyonu ve asparajin deaminasyonu. Her protein için tanımlanan minimum özgün peptit sayısı 1 olarak alındı ve elde edilen veriler Uniprot veri tabanından elde edilen veri bankalarında tarandı.

3.21. Biyoinformatik Analizler

nLC-MS/MS analizi sonucu elde edilen proteinlerin karşılaştırmalı analizi etiketsiz miktar ölçümü (label-free quantification) yöntemi kullanılarak Proteom Discoverer 2.5 yazılımı ile gerçekleştirildi. Yapılan analizler ile her üç hücre hattına ait protein yoğunlukları birbirleri ile göreceli olarak karşılaştırıldı. Analizlerde iki farklı veri tabanı kullanıldı. Bu veri tabanları tüm proteinleri içeren insan referans veri tabanı (Proteome ID UP000005640, Ocak 2022) ve insan PM proteomu veri tabanıdır (Ocak, 2022). Yapılan etiketsiz miktar tayini analizleri ile elde edilen proteinlere ait sonuçlar değerlendirilerek farklılık gösteren proteinler karşılaştırıldı. Aynı zamanda elde edilen proteinlerin g-Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) ve STRING (<https://string-db.org>) analizleri yapılarak, lokasyonları, kütleli ve sayısal karşılaştırmaları, kontrol ve karsinogenik hücre hatları arasındaki farklılık gösteren yollar ve mekanizmaların belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. Tüm bunlara ek olarak proteinlerin sayısal ve kütleli oranları belirlenerek yapılan işlemin HYP'lerin işaretlenmesi ve saflaştırılması için verimli olup olmadığı değerlendirildi.

3.22. nLC-MS/MS Sonuçlarının Doğrulanması

nLC-MS/MS analizleri sonuçlarının doğrulanması için analiz edilen proteinlerden anlamlı farklılık gösteren N-Cadherin ve VDAC-1 proteinleri seçildi. Negatif kontrol ve

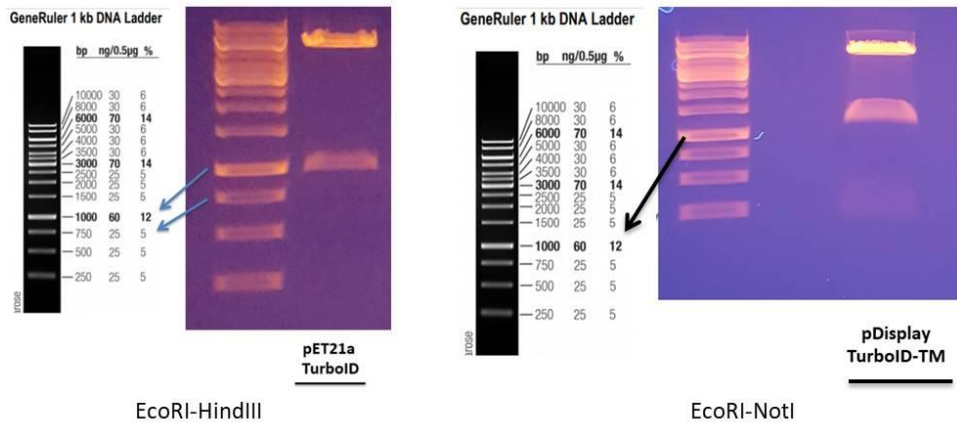
biyotinile örneklerden 20 µg protein örneği %10'luk SDS-PAGE jellerde yürütüldü ve ardından nitroselüloz membranlara transfer edilerek WB analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlarda bant yoğunlukları karşılaştırılarak protein seviyelerindeki değişimler hesaplandı. Western blot analizi ile elde edilen sonuçlar nLC-MS/MS analizleri ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak nLC-MS/MS analizlerinin doğrulanması gerçekleştirildi.



4. BULGULAR

4.1. Plazmitlerin Doğrulanması ve Çoğaltılması.

Tess Branon ve Alice Ting tarafından tarafımıza gönderilen plazmitlerin doğrulanması için gelen pET21a-TurboID ve pDisplay-TurboID-TM plazmitlerinin ilk olarak *E. coli*. XL1-Blue bakteri hücrelerine transformasyonları gerçekleştirildi. Seçici besiyerinde büyütülen bakteri hücrelerinden tek koloni seçimi yapıldı. Ardından miniprep plazmit (Qiagen, ABD) izolasyon kiti kullanılarak kolonilerden plazmit izolasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen plazmitlerin doğrulanması amacıyla pET21a-TurboID ve pDisplay-TurboID-TM sırasıyla EcoRI-HindIII ve EcoRI-NotI RE enzimleri ile kesilerek kesim ürünleri %0,8 agaroz jellerde yürütüldü ve yapılan analizler sonucu, plazmitlerdeki gen bölgelerinin doğru boyutlarda olduğu belirlendi (Şekil 4.1).



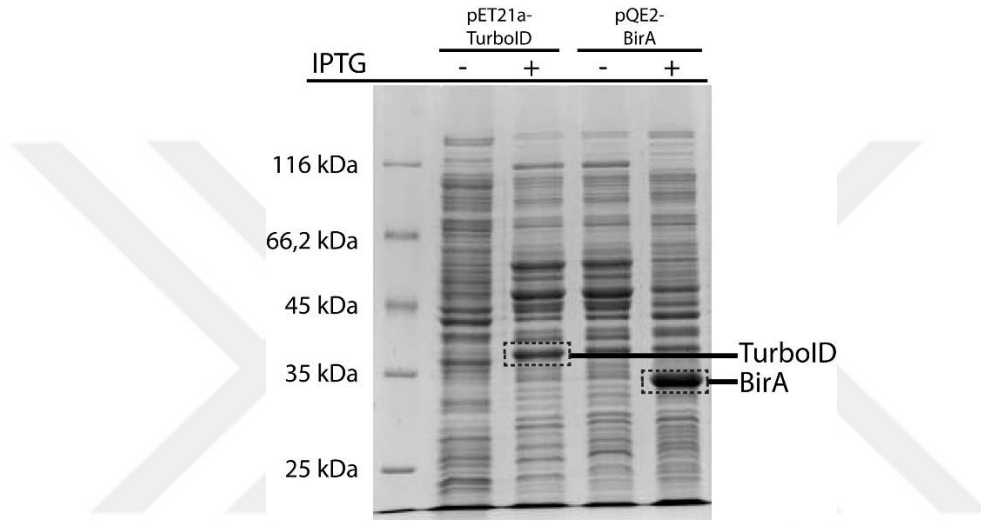
Şekil 4.1. pET21a-TurboID ve pDisplay-TurboID-TM plazmitlerinin RE enzimleri ile kesilerek Etidyum Bromür içeren agaroz jellerde doğrulanması.

Doğrulama işleminin sonrasında deneylerde kullanılmak üzere gerekli olan plazmit stokları, pET21a-TurboID için midiprep (Qiagen) ve pDisplay-TurboID-TM için maxiprep (Qiagen) kitleri kullanılarak hazırlandı.

4.2. TurboID Enzimin *E.coli*'de Üretimi

TurboID enziminin bakteri hücrelerinde üretimi için ilk aşamada *E. coli* W3110 suşu kullanıldı. TurboID enzimini kodlayan gen bölgesini içeren pET21a-TurboID ve laboratuvarımız envanterine daha önceki çalışmalarla kazandırılan ve *E. coli* BirA enzimini kodlayan pQE2-BirA plazmitleri elektroporasyon yöntemi ile elektrokompotent *E. coli*

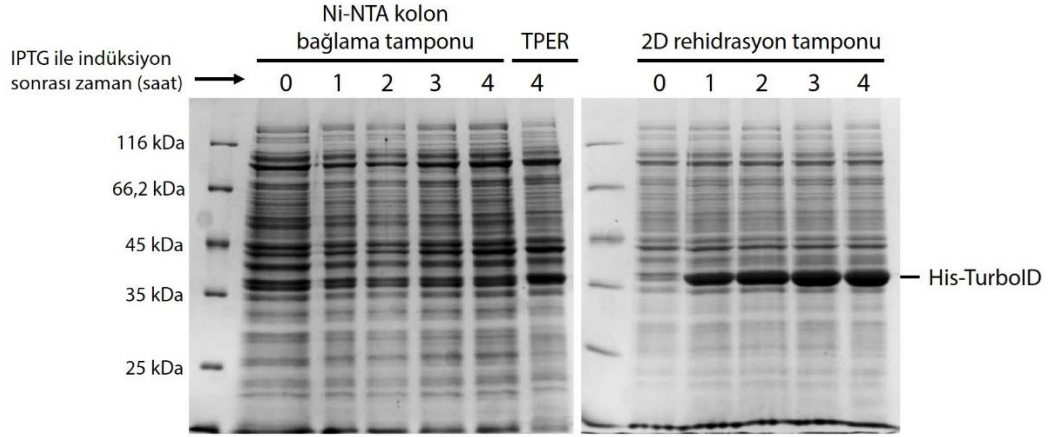
bakteri hücrelerine aktarıldı. Transformasyon sonrası koloni seçilimi ve ön kültür işlemleri yapılarak geniş hacimli büyüme ortamına alınan bakteri hücrelerinde protein üretimi için IPTG indüklemesi yapıldı. Üç saat boyunca ve 37°C'lik çalkalamalı etüv içerisinde inkübe edilen bakteri hücreleri sonrasında santrifüj yardımıyla toplanarak protein özütü elde etmek için Ni-NTA bağlama tamponu (20 mM sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol pH:7.4) ile lizize uğrattıldı. Elde edilen protein özütleri kullanılarak yapılan SDS-PAGE analizlerinde her iki enzimin de üretiminin gerçekleştiği belirlendi. Ancak çözünmüş haldeki TurboID enziminin üretim miktarının çok az olduğu görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. pET21a-TurboID ve pQE2-BirA plazmitleri kullanılarak, TurboID ve BirA enzimlerinin *E.coli* W3110 hücre suşunda üretiminin SDS-PAGE analizler belirlenmesi.

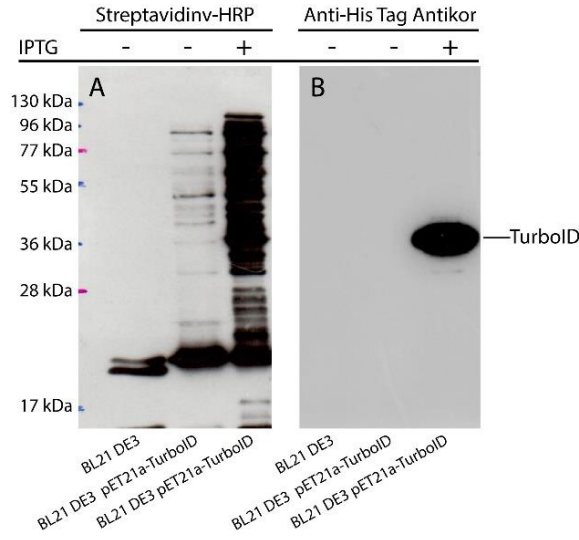
Elde edilen proteinin çözünür formda olmayışı ve istenilen miktarda sentezlenmemiş olması nedeni ile pET21a plazmiti protein ekspresyonu için farklı bir *E. coli* ekspresyon şusu olan BL21DE3 hücrelerin aktarıldı ve üretiminin iyileştirilmesi için zamana bağımlı üretim testleri yapıldı. Yapılan deneylerde IPTG ile protein üretiminin indüklenmesinin ardından 0., 1., 2., 3. ve 4. saatlerde bakterilerden örnekler alınarak 3 farklı tampon çözelti kullanılarak protein özütleri hazırlandı. Bu çözeltiler sırası ile Ni-NTA kolon bağlama tamponu, TPER ve 2D rehidrasyon tamponudur (8 M üre, 130 mM DTT, %4 w/v CHAPS). Buradaki amaç üretilen enzimin farklı solüsyondaki çözünürlüklerini belirlemektir. Sonuç olarak elde edilen protein özütleri ile yapılan SDS-PAGE analizlerinde enzimin TPER tamponu içerisinde çözünürlüğünün daha fazla olduğu belirlendi. Protein özütlerinin kalan hücre pelletleri yüksek denatürasyon ve çözücü gücüne sahip olan 2D-rehidrasyon tamponu

ile süspanse edildiğinde ise enzim üretiminin indüksiyon sonrası 1. saatte dahi yeterince düzeyde olduğu ancak büyük bir kısmının çöktüğü görüldü (Şekil 4.3).



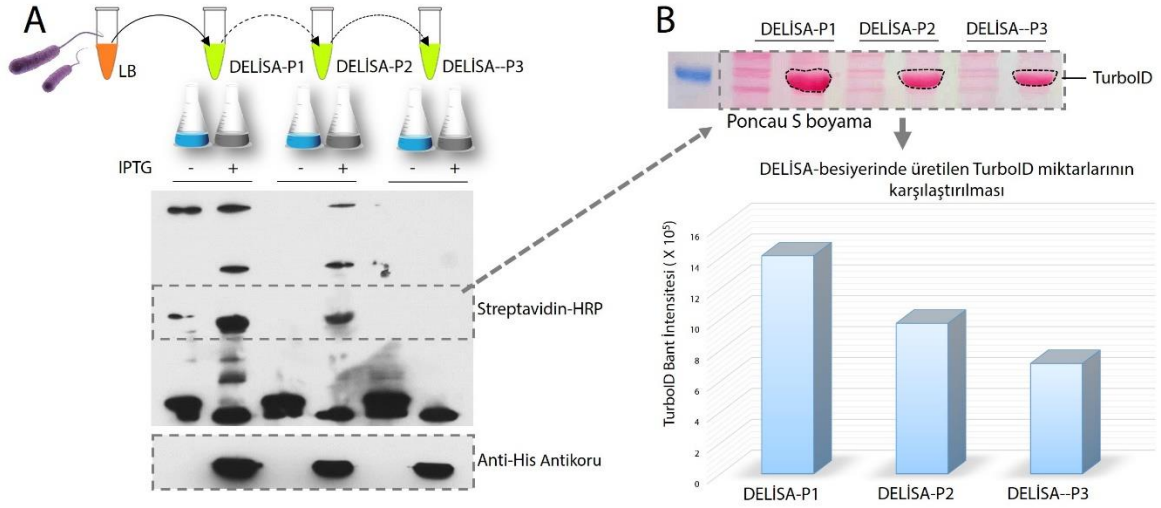
Şekil 4.3. *E. coli* BL21 DE3 suşunda yapılan TurboID protein üretimi. Yapılan üretimde indükleme sonrası 0., 1., 2., 3. ve 4. saat aralıklarında alınan örneklerden hazırlanan protein özütlerinin SDS-PAGE analizleri.

Protein üretim çalışmaları sırasında indükleme öncesinde bakterilerin normalden daha yavaş büyüdükleri gözlemlenmişti. Bu durumun nedenleri incelendiğinde olası bir promotör kaçağı olabileceği ve bunun sonucunda az da olsa üretilen yüksek aktiviteye sahip enzimin hücreler üzerinde strese ve büyüme inhibisyonunununa neden olabileceği düşünüldü. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda tahmin edildiği gibi promotör kaçağı olduğu ve indükleme öncesi bakteri özütlerinde biyotininilasyon düzeyinde artış yaşandığı gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Bakteri hücrelerinde meydana gelen promotör kaçağının WB ile gösterimi. A) İndüksiyon öncesi bakteri hücrelerinde biyotininilasyon seviyelerinde meydana gelen artış. B) Bakterilerdeki TurboID üretimi.

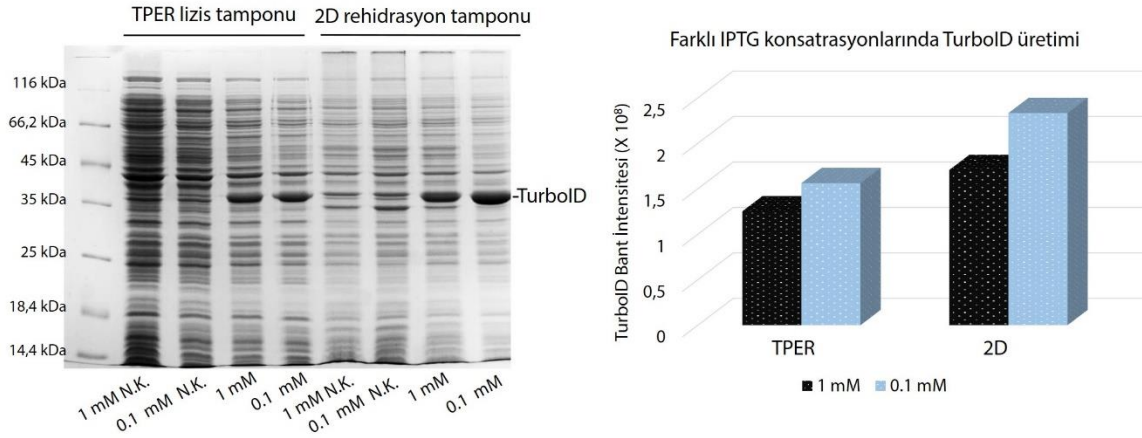
Ancak Anti-His antikor ile yapılan analizlerde pET21a-TurboID taşıyan bakteri hücrelerinde indüksiyon öncesi TurboID enzimi varlığı belirlenemedi. Bu durumun enzimin miktarının çok az olması ve indüksiyon sonrası üretilen TurboID miktarının çok fazla olmasından dolayı aşırı ışıma yapması ve sonuçta daha zayıf olan indüksiyon öncesi TurboID protein ekspresyonunun belirlenmesine neden olduğu düşünüldü. Bunun üzerine üretimin formülasyonunda biyotin olmayan, tanımlanmış modifiye DELISA besiyerinde yapılmasına karar verildi (Matthew, 1999). Bu besiyeri ile yapılan çalışmalarda biyotininilasyonun hem indüklenen hem de indüklenmeyen bakterilerde ciddi oranda azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.5 A).



Şekil 4.5. Biotinilasyondan kaynaklanan bakteriyel inhibisyonun önlenmesi için modifiye besiyeri kullanımı. (A) Besiyerindeki biyotinin etkisini azaltmak için LB besiyerinde büyütülen ve pET21a-TurboID plazmiti taşıyan *E. coli* bakterileri ardışık olarak 3 kez pasajlanarak (P1, P2 ve P3) zaman içinden hücrelerde meydana gelen biyotinilasyon düzeyleri WB analizi yapılarak incelendi. Biotinilasyonu belirlenmek için Streptavidin-HRP ve TurboID üretimini belirlemek için ise Anti-His tag antikoru kullanıldı. B) Enzim üretiminin modifiye besiyerinde zamanla azalması. Protein özütleri 2D rehidrasyon tamponu ile hazırlanmıştır.

Ancak yapılan analizlerde modifiye besiyerinde üretilen enzim miktarının LB besiyerlerine göre azaldığı ve pasaj ilerledikçe bu azalmanın devam ettiği görüldü (Şekil 4.5 B). Bu nedenle besiyeri modifiye besiyeri içerisinde üretimden vazgeçilerek LB besi yeri içerisinde üretime devam etme kararı alındı.

TurboID enziminin üretim sırasında çökmesini önlenmek için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Yapılan ilk optimizasyon denemelerinde üretimin yavaşlaması ve böylelikle protein katlanmasına yardımcı olmak amacıyla ilk olarak IPTG miktarı azaltılarak protein üretimi gerçekleştirildi. IPTG miktarı protein üretiminin yavaşlatılması için 1:10 oranında azaltılarak 1 mM'dan 0,1 mM düşürüldü ve yapılan SDS-PAGE analizlerinde 0,1 mM ile indüklenen bakterilerde protein üretiminin 1 mM ile indüklenen grupdakilere göre daha verimli bir şekilde gerçekleştiği görüldü (Şekil 4.6). Bu sonuçlar göz önüne alınarak ilerleyen tüm çalışmalarda protein sentezinin indüklenmesi işlemleri 0.1 mM IPTG ile yapıldı.



Şekil 4.6. IPTG konsantrasyonunun TurboID üretimi üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amaçlı yapılan SDS-PAGE analizi. NK: Negatif kontrol grubu.

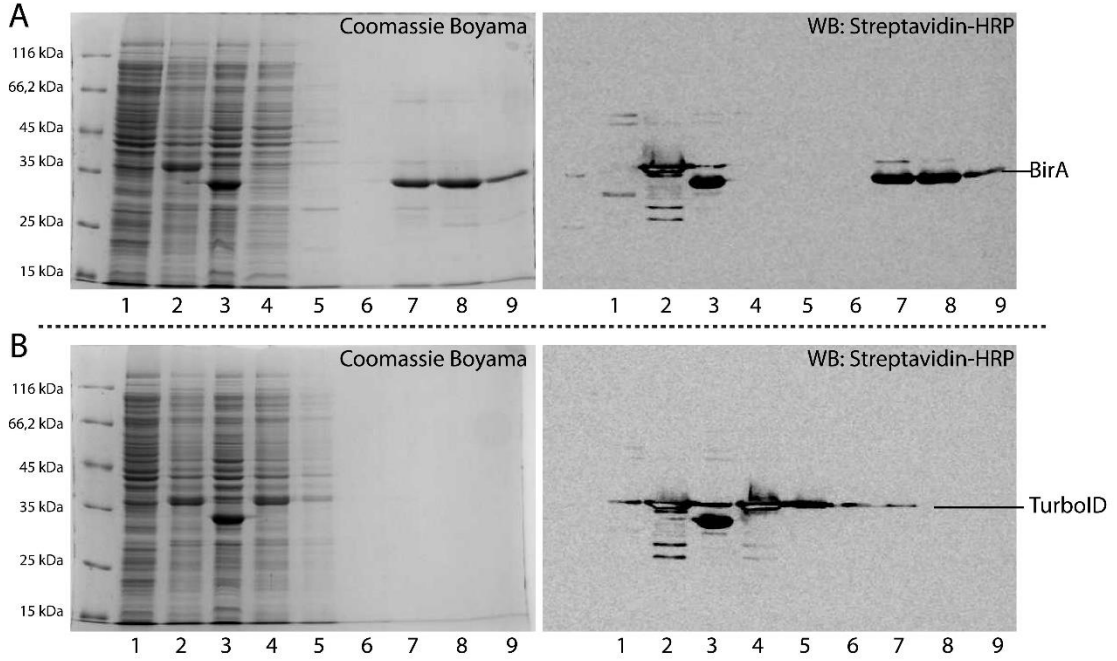
Sıcaklık etkisinin protein üretiminin üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle protein üretimini yavaşlatmak ve protein katlanmasına yardımcı olmak amacı ile düşük sıcaklıklarda protein üretim çalışmaları gerçekleştirildi. 37, 30 ve 22 °C’lerde yapılan TurboID üretimlerinde en fazla çözünür formda protein üretiminin 30°C’de olduğu belirlendi. Ancak bakteri üreme hızı 30°C yavaşladığından induksiyon öncesi hücreler OD600’de 0.2-0,4 aralığına ulaşana kadar 37°C’de büyütüldü (ekim sonrası yaklaşık 2.5 saat kadar). Ardından ortam sıcaklığı 30°C’ye düşürüldü ve hücrelerin protein üretim sıcaklığı olan 30°C’ye adapte olması sağlandı. Uygulanan bu yöntemsel yaklaşım ile bir yandan çözünür protein üretimi artırılırken diğer yandan da TurboID aktivitesinin azaltılarak bakterinin büyümesini yavaşlatması engellenmiş oldu. Yapılan tüm TurboID enzim üretim çalışmalarında bu adımlar takip edildi.

Öncül üretim çalışmalarında karşılaştığımız IPTG induksiyonu öncesi gerçekleşen ve promotör kaçağı nedeni sonucu olduğunu düşündüğümüz TurboID sentezi hem W3110 hem de BL21 DE3* suşlarında görüldü. Bu durumu önleyebilmek için T7 protomörleri üzerinde daha sıkı kontrol mekanizması olduğu bilinen ve pLyss plazmitini taşıyan *E. coli*. BL21 DE3 pLyss suşunun kullanılmasına karar verildi. BL21 DE3 pLyss laboratuvarımız envanterinde olmadığından Doç. Dr. Bekir ÇÖL tarafından bu bakteri suşu laboratuvarımıza hediye edildi ve sonraki çalışmalarda kullanıldı.

4.3. TurboID Enzimin Saflaştırılması

TurboID’nin aktif halde saflaştırılabilmesi için tüm protein özütleri %10 gliserol içeren TPER tamponunda hazırlanmıştır. TurboID ile birlikte daha önceden pQE2 vektörüne

klonlanmış olan yabancı tip BirA enzimi de üretilerek saflaştırma çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanıldı. Yapılan saflaştırma işlemlerinde her iki enzimin ifade edildiği protein özütleri kolon bağlanma tamponu ile 1:10 oranında seyreltilerek kolona yüklendi. Saflaştırma deneylerinde BirA enzimi Ni-NTA klonuna verimli bir şekilde bağlanıp saflaştırırken TurboID'nin kolonu bağlamadığı ve saflaşmadığı görüldü (Şekil 4.7 A ve 4.7 B).

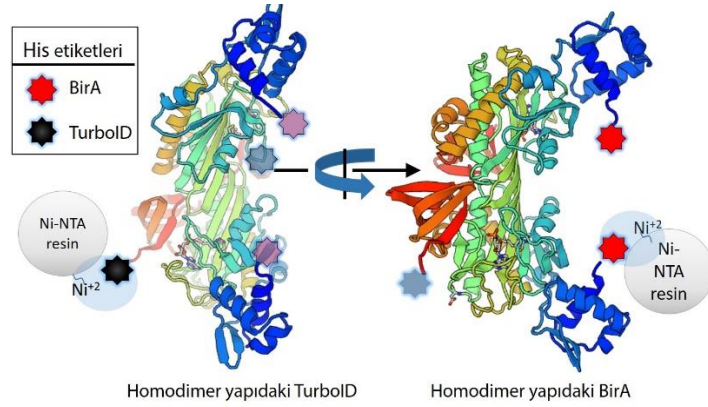


Şekil 4.7. *E. coli* BL21 DE3 pLyss hücrelerinde üretilen BirA (A) ve TurboID (B) enzimlerinin Ni-NTA-kolon kromatografisi yoluyla saflaştırılması ve elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE analizleri(1- Negatif Kontrol, 2- pET21a TurboID - protein özütü, 3- pQE2-BirA - protein özütü, 4- Ni-NTA kolona bağlanmayan protein özütü, 5- Kolon yıkama fraksiyonu, 6- Elüsyon Fraksiyon 1, 7- Elüsyon Fraksiyon 2, 8- Elüsyon Fraksiyon 3, 9- Elüsyon Fraksiyon 4)

TurboID'nin kolona bağlanmasını sağlayabilmek için örneğin kolona yüklenme hızı azaltıldı ve böylelikle kolon ile temas süresi artırılmış oldu. Ancak tüm çabalara rağmen başarılı olunamadı.

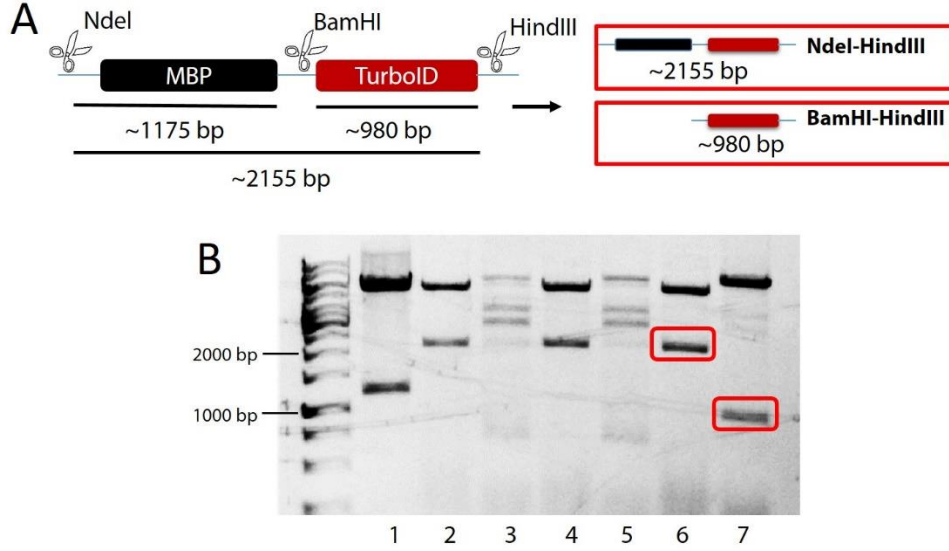
pQE2 vektörü, içerisine aktarılan proteinlerin N-ucuna histidin etiketi eklerken, pET21a vektörü C-terminal ucuna eklemektedir. Dolayısı ile iki enzimin His etiketi pozisyonundan kaynaklı bağlanma farklılıkları olması mümkündür. Bunun nedenle TurboID enziminin üzerindeki mutasyonların ve His etiketinin pozisyonunun bağlanmayı etkileyebilecek sterik bir engel olup oluşturmadığı belirlemek için 3-boyutlu modelleme analizleri yapıldı. Yapılan

analizlerde her iki His etiketinin de protein dış kısmına doğru yönlendiği ve açık pozisyonda bulunduğu gözlemlendi ve bağlanma için herhangi bir engel olmadığı anlaşıldı (Şekil 4.8).



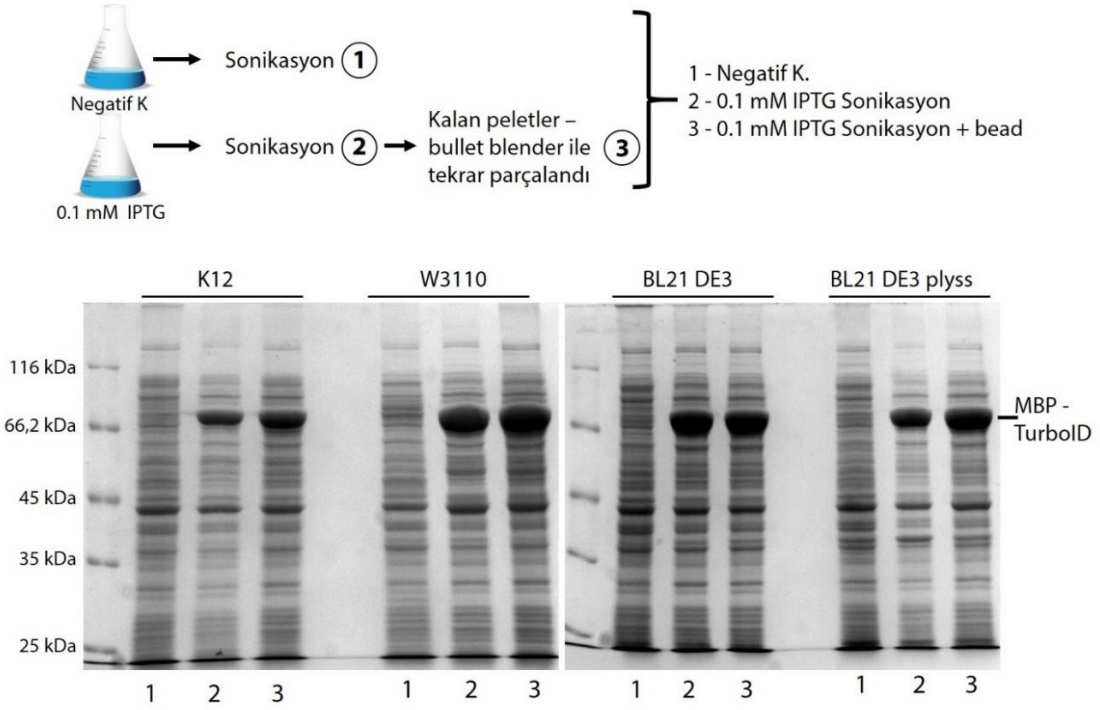
Şekil 4.8. His etiketli TurboID ve BirA proteinlerinde His etiketinin konumunu gösteren protein modelleri (swissmodel.expasy).

TurboID enziminin üretimi için sıcaklık, IPTG konsantrasyonu gibi parametreler değiştirilerek yapılan optimizasyon deneylerinde de enzim istenilen düzeyde çözünür halde elde edilemedi. Bu sorunların çözülmesi ve çözünürlüğün artırılması amacıyla Maltoz Bağlama Proteininin (MBP) kullanılmasına karar verildi. Bunun için hedef proteinlerin N-terminal kısmına MBP etiketi ekleyen pMAL-C4X plazmiti kullanıldı. TurboID gen bölgesi pET21a içerisinde BamHI ve HindIII restriksiyon enzimleri yardımıyla kesilerek pMAL-C4X plazmitine klonlandı. Klonlama işleminin ardından elde edilen kolonilerden 3 adet koloni seçilerek miniprep kiti ile plazmit izolasyonları yapıldı. Sonrasında NdeII, BamHI ve HindIII restriksiyon enzimleri kullanılarak plazmitlerin doğrulama işlemleri gerçekleştirildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. TurboID gen bölgesinin pMAL C4X vektörüne klonlanması sürecinde elde edilen 3 adet koloninin restriksiyon enzimleri ile kesimi, doğrulanmasını için yapılan A) sanal restriksiyon haritası ve B) agaroz jel görüntüsü (1- pMAL C4X (NdeI-HindIII), 2- Koloni 1 (NdeI-HindIII), 3- Koloni 1 (BamHI-HindIII), 4- Koloni 2 (NdeI-HindIII), 5- Koloni 2 (BamHI-HindIII), 6-Koloni 3 (NdeI-HindIII), 7- Koloni 3 (BamHI-HindIII)).

Yapılan doğrulama işleminde 3 numaralı koloninin doğru gen profiline sahip olduğu belirlendi ve protein ekspresyon çalışmalarında bu koloni kullanıldı. MBP etiketli TurboID (MBP-TurboID) enziminin üretimi için 4 farklı *E. coli* ekspresyon suşu test edildi. Bunlar; K12, W3110, BL21 DE3 ve BL21 DE3 pLyss suşlarıydı. Yapılan çalışmada protein özütü elde etmek için TPER tamponu kullanıldı. Aynı zamanda lizis işlemi hem sonikasyon hem de sonikasyondan sonra paslanmaz çeliklerin kullanıldığı bullet blender yöntemleri ile yapıldı. Elde edilen protein özütlerinden SDS-PAGE analizleri gerçekleştirildi. Yapılan analizlerde protein üretiminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği, çökme sorununun aşıldığı, tüm *E. coli* suşlarında enzim üretiminin gerçekleştiği ve her iki lizis yönteminin ardışık olarak uygulanmasının çözünür formdaki TurboID enzim miktarını artırdığı belirlendi (Şekil 4.10).

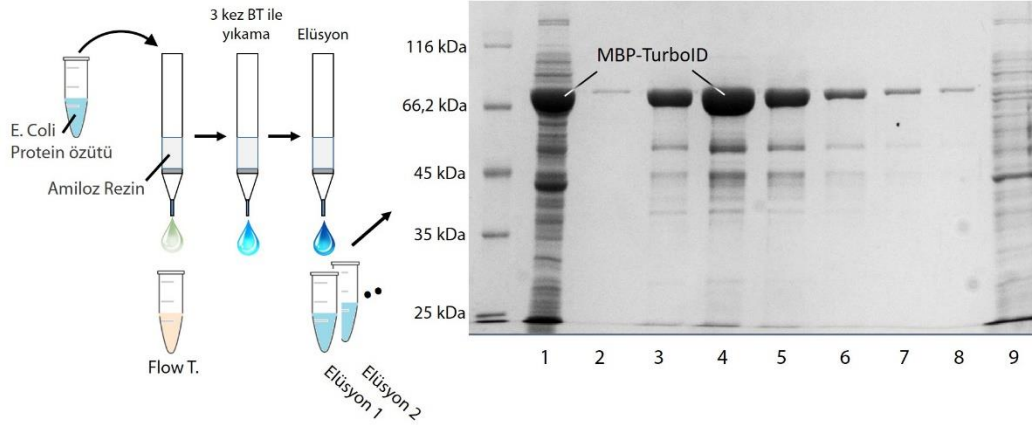


Şekil 4.10. MBP etiketli TurboID enziminin farklı *E. coli* suşlarında üretiminin SDS-PAGE analizleri.

Yapılan üretim çalışması sonucu K12 dışında tüm suşlarda protein üretiminin yüksek düzeyde olduğu görüldü. Bununla birlikte ileriki çalışmalar için daha sıkı promotör kontrolü sağladığından BL21 DE3 pLyss bakteri suşu protein üretimi için seçildi ve çalışmalara bu suş üzerinden devam edildi.

4.4. MBP-TurboID Enziminin Saflaştırılması

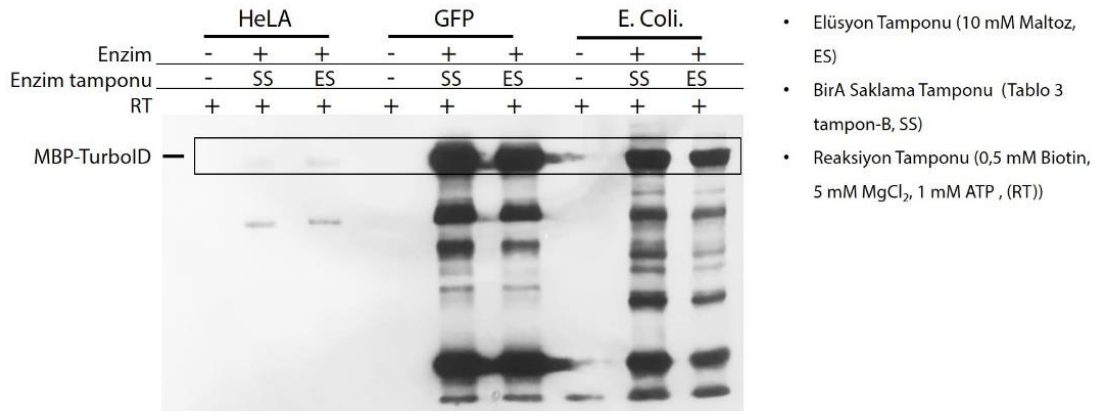
MBP-TurboID enziminin üretimi sonrasında enzim saflaştırılması için amiloz rezinler kullanıldı (NEB). Üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak yapılan saflaştırma işlemleri sonucu MBP-TurboID enziminin amiloz rezine güçlü ve etkili bir şekilde bağlandığı ve saflaştırıldığı gösterildi. Ancak saflaştırma işlemi esnasında safsızlık olarak nitelendirilen bazı proteinlerinde amiloz rezine bağlandığı ve bunların kirlilik oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. MBP-TurboID enziminin amiloz rezin yardımı ile saflaştırılması. Amiloz resin bağlanma tamponu (BT; 20 mM tris, 200mM NaCl 1mM EDTA 10 mM β -merkaptetanol) ve elüsyon tamponu (10 mM maltoz). 1- Kolona yüklenen protein özütü, 2- Elüsyon 1, 3- Elüsyon 2, 4- Elüsyon 3, 5- Elüsyon 4, 6- Elüsyon 5, 7- Elüsyon 6, 8- Elüsyon 7, 9- Kolona bağlanmayan (Flow T).

4.5. Saflaştırılan MBP-TurboID Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Amiloz rezinler yardımı ile gerçekleştirilen saflaştırma işlemi sonrası TurboID enziminin aktivitesinin belirlenmesi için enzim substratı olarak HeLa ve *E. coli* protein özütleri ile saf yeşil floresans proteini (GFP) kullanıldı. Saflaştırılan MBP-TurboID'nin hem amiloz rezin elüsyon tamponu (10 mM Maltoz) hem de BirA saklama tamponu (Taplo 3, Tampon B) ile yapılan diyaliz işlemleri sonrası aktiviteleri ölçüldü. Yapılan ölçümlerde, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında her iki tamponda da enzim aktivitesinin olduğu, ancak var olan aktivitenin beklenenin çok altında gerçekleştiği ve aktivitedeki bu düşüşe diyaliz işleminin neden olduğu belirlendi. Yapılan analizlerde saf GFP proteini ve *E. coli* ile yapılan deneyde düşük de olsa aktivite gözlemlenirken HeLa protein özütlerinin kullanıldığı reaksiyon ortamında enzim aktivitesi görülmedi. Bunun sebebini anlamak için yapılan incelemede sorunun HeLa özütleri hazırlanırken kullanılan ve denatüre edici bir tampon olan 2D rehidrasyon tamponundan kaynaklandığı ve bu tamponun enzim aktivitesini engellediği anlaşıldı (Şekil 4.12). Bu nedenle biyotinyasyon reaksiyonu ortamında üre gibi denatüre edici faktörlerin bulunmamasına dikkat edildi.



Şekil 4.12. MBP-TurboID rekombinant enziminin biyotinilasyon aktivitesinin SDS-PAGE analizi ile gösterilmesi.

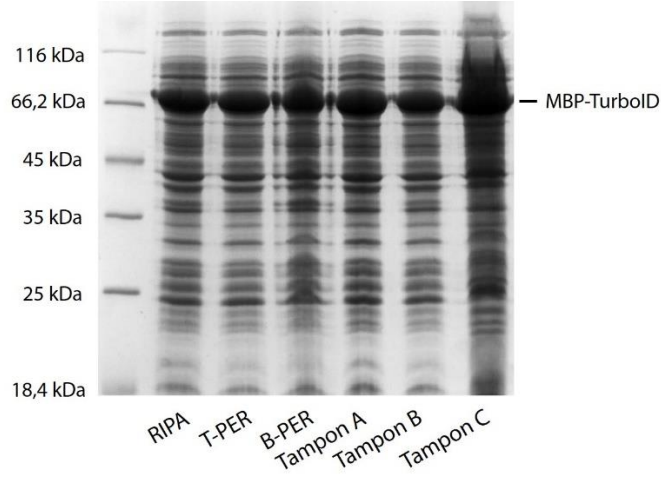
4.6. TurboID Enzim Üretimi için En Uygun Lizis Tamponunun Belirlenmesi

MBP-TurboID aktivitesinin en yüksek düzeyde elde edilebilmesi ve aktivite kaybının önüne geçilebilmesi için en uygun lizis ve saklama tamponlarının belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. Bu analizlerde 6 farklı lizis tamponu kullanıldı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. MBP-TurboID enziminin izolasyonu için kullanılan farklı lizis tamponları

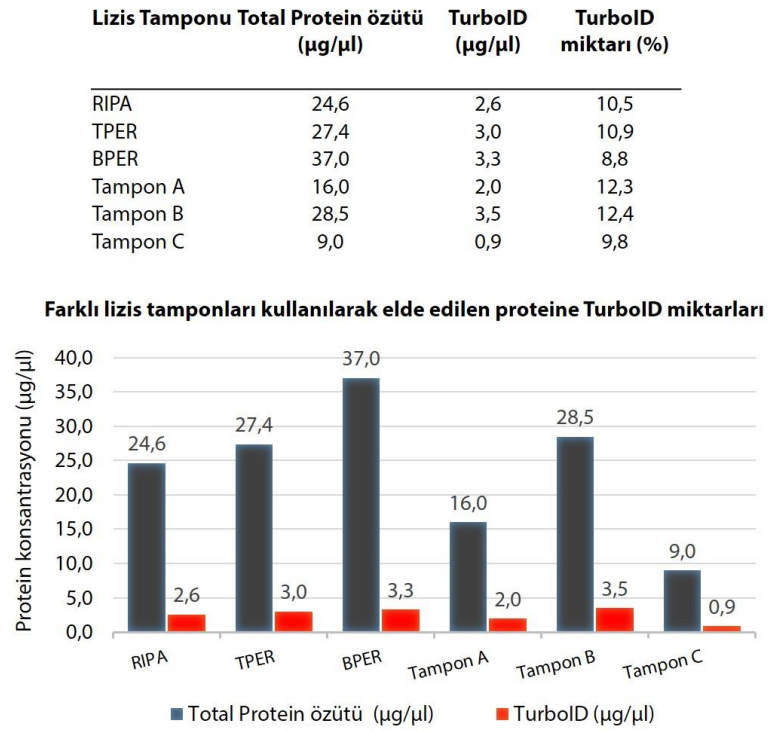
Lizis Tamponu	Katalog no/içerik
RIPA	Thermo Fisher Scientific, 89900
TPER	Thermo Fisher Scientific, 78510
BPER	Thermo Fisher Scientific 8243
Tampon A	50 mM Sodyum Fosfat, 300 mM NaCl, 0.1 mM DTT
Tampon B	25 mM Tris Cl, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, %10 Gliserol (pH:7.2)
Tampon C	40 mM Tris Cl pH:8.

Farklı lizis tamponları ile gerçekleştirilen protein özütü elde çalışmalarında MBP-TurboID enzimi, kullanılan tüm tamponlar ile çözünür formda elde edilebildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Farklı lizis tamponları ile gerçekleştirilen MBP-TurboID protein üretimini gösteren SDS-PAGE jeline ait görüntü.

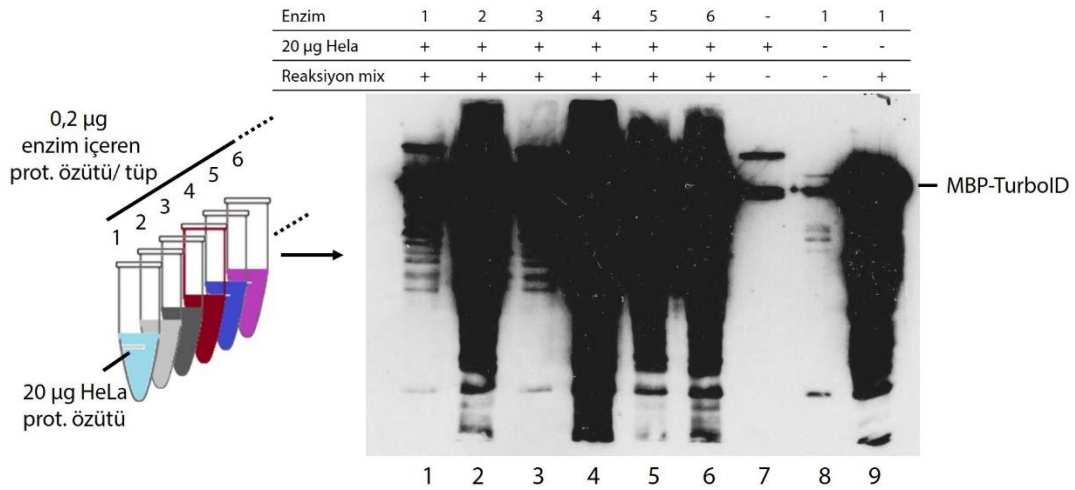
Eşit miktardaki hücreden elde edilen toplam protein özüt miktarları karşılaştırıldığında kullanılan tamponlardan en verimli lizisin gerçekleştiği ve en fazla proteinin elde edildiği tamponun BPER olduğu görüldü. En düşük protein özütü konsantrasyonu ise C Tamponu ile elde edildi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. MBP-TurboID üretilen *E. coli* hücre hatlarında farklı lizis tamponları ile elde edilen protein özütü ve enzim miktarları.

4.7. MBP etiketli TurboID Enziminin Lizis Tamponlarındaki Aktivitelerinin Belirlenmesi

Farklı lizis solüsyonları ile izole edilen MBP-TurboID enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi için TPER tamponu kullanılarak hazırlanan HeLa protein özütleri kullanıldı. HeLa protein özütleri 0.2 µg MBP-TurboID enzimi içeren protein özütleri ile karıştırılarak biyotinyasyon reaksiyonları 37°C’de 30 dakika boyunca gerçekleştirildi. Biyotinyasyon deneylerinin sonuçları WB yöntemi kullanılarak analiz edildi. Elde edilen sonuçlarda RIPA, BPER ve Tampon B’nin enzim aktivitesinin olumsuz yönde etkilediği görüldü. Bununla birlikte TPER, Tampon A ve Tampon C’de TurboID enziminin yüksek derecede aktivite gösterdiği belirlendi. (Şekil 4.15).

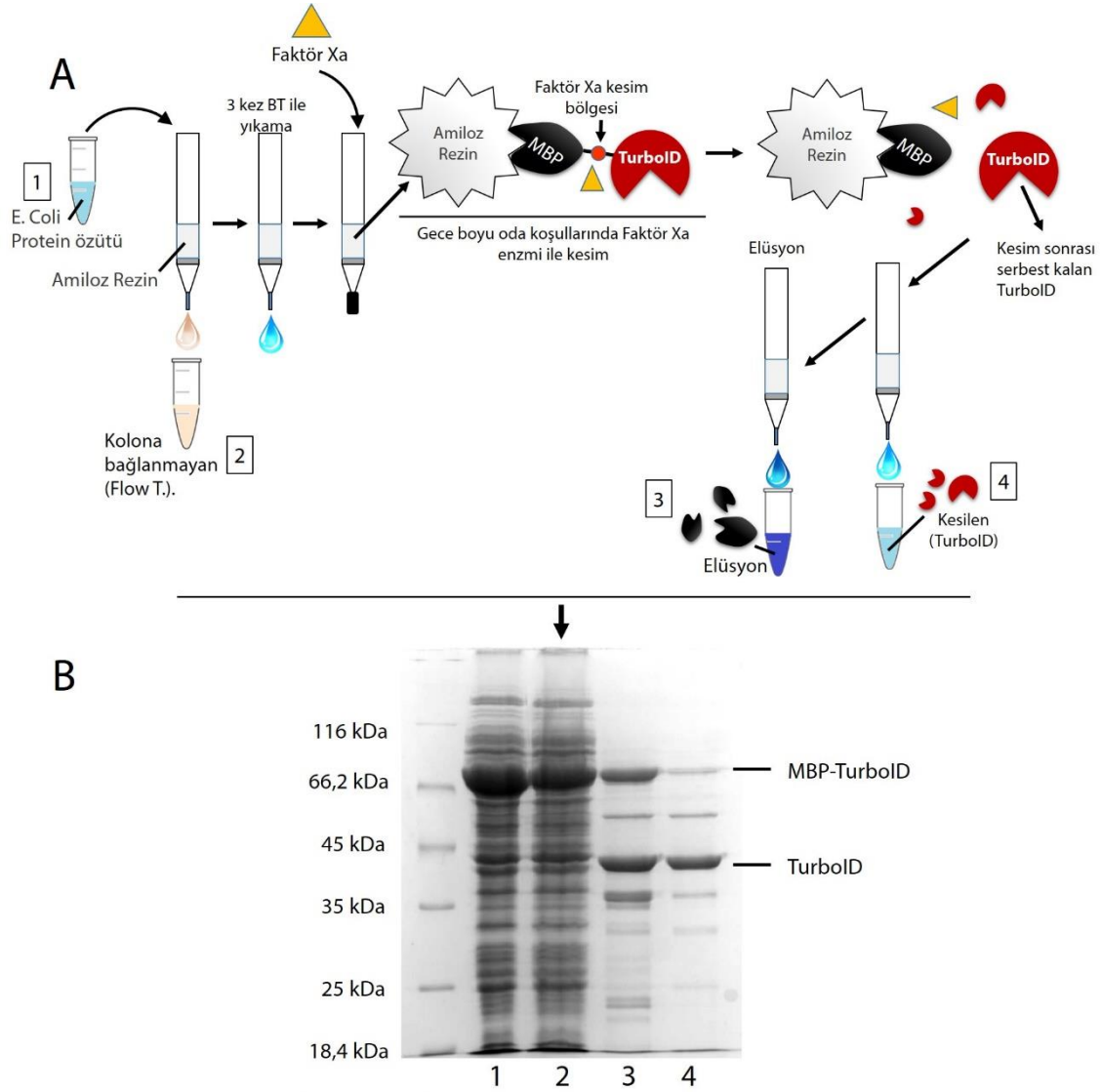


Şekil 4.15. Kullanılan lizis tamponlarının enzim aktiviteleri üzerindeki etkisinin Streptavidin-HRP kullanılarak WB yöntemi ile incelenmesi (Reaksiyon karışımı (RT): 0,5 mM biyotin, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂. Reaksiyon 30 dakika ve 37°C’de gerçekleştirilmiştir). (1- RIPA. 2- TPER, 3- BPER, 4- Tampon A, 5-Tampon B, 6- Tampon C, 7- HeLa protein özütü, 8- TPER MBP-TurboID protein özütü (Negatif Kontrol). 9- TPER MBP-TurboID protein özütü + Reaksiyon tanponu (Pozitif Kontrol)).

Yapılan deneyler ile elde edilen sonuçların enzim aktivitesi, protein özütü eldesi ve TurboID enzim üretimi açısından değerlendirilmesi sonrasında en uygun tamponun TPER tamponunun olduğu görüldü ve ilerleyen çalışmalarda TPER tamponunun kullanılmasına karar verildi.

4.8. MBP Etiketinin TurboID Enziminden Kesilerek Uzaklaştırılması ve Kesim Sonrası Aktivitenin Kontrolü

MBP etiketinin eklendiği enzim aktiviteleri üzerinde negatif bir etkisi olmadığı belirtilse de TurboID enzimi üzerindeki olası etkileri daha önce belirlenmemiştir. Bunun için TurboID ile MBP proteinin birbirlerinden ayrılmasına ve etiketsiz TurboID enziminin aktivitesinin belirlenerek, MBP etiketinden etkilenip etkilenmedi test edildi. MBP etiketini ayırmak için proteinlerin arasında bulunan bulunan Faktör Xa kesim bölgesi kullanıldı. Faktör Xa enzimi ile MBP etiketinin kesilmesi işlemi amiloz rezinler üzerinde gerçekleştirildi (Şekil 4.16 A).

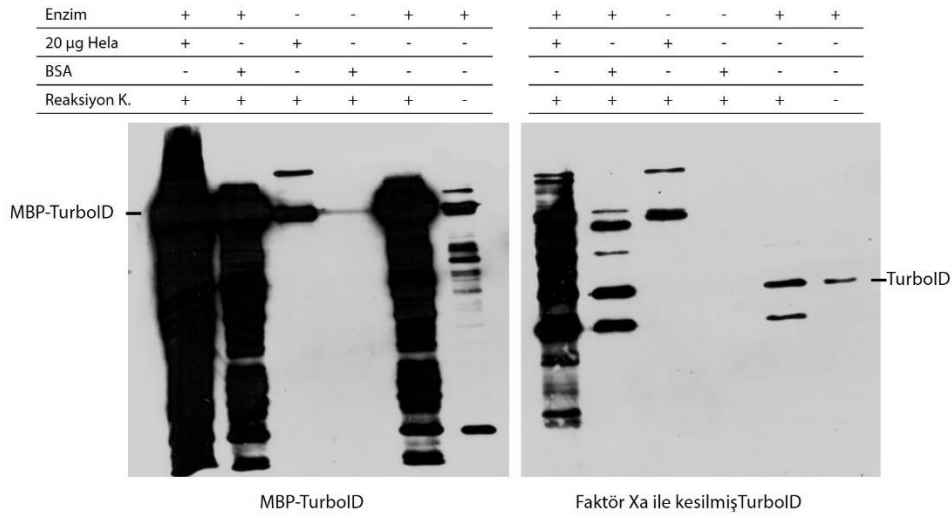


Şekil 4.16. MBP etiketinin Faktör Xa yardımıyla kesilerek uzaklaştırıldığını gösteren (A) deneysel yaklaşım ve (B) SDS-PAGE analiz sonucu (1- *E. coli* protein özütü, 2- Kolona bağlanmayan proteinler (Flow T.), 3- Elüsyon ürünleri, 4- Kolonda Faktör Xa ile kesilip ayrılan TurboID proteinleri).

Yapılan kesim işlemi sonucunda Faktör Xa enziminin TurboID'yi MBP proteininden ayırdığı belirlendi. Ancak MBP'den uzaklaştırılan TurboID enziminin yarısına yakın bir

kısmını amiloz rezin üzerinde kaldığı, bununla birlikte bazı safsızlıkların da ortamda varlığını devam ettirdiği gözlemlendi (Şekil 4.16 B).

Faktör Xa kullanılarak elde edilen etiketsiz TurboID ve MBP etiketli TurboID enzimlerinin aktivitelerinin karşılaştırılması ve kesim işleminin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini incelenmesi için HeLa protein özütü ve saflaştırılmış bovin serum albümin BSA kullanıldı. Kesim işleminin enzim aktivitesinde azalmaya yol açtığı belirlendi (Şekil 4.17)

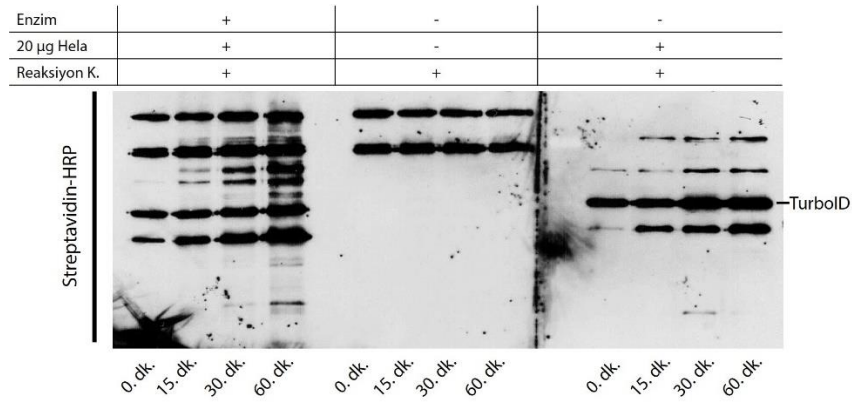


Şekil 4.17. Faktör Xa ile yapılan kesim işlemi sonrasında MBP etiketli ve etiketsiz TurboID enzim aktivitelerinin WB analizi ile incelenmesi.

4.9. Biotinilasyon Reaksiyonlarında Optimum Sürenin Belirlenmesi

Saflaştırma, MBP etiketinden uzaklaştırma ve aktivite analizlerden sonra biyotinilasyon reaksiyonları için gerekli zaman ile ATP ve biyotin miktarlarının belirlenmesi ile ilgili optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için Faktör Xa ile MBP etiketi uzaklaştırılan etiketsiz TurboID enzimi kullanıldı. Aktivitesi azalmış olsa da etiketsiz TurboID enzimini kullanmamızın temel sebebi daha az kirlilik içermesi ve WB analizlerinde daha düşük ama analize daha uygun bant ışımaları vermesiydi. MBP-TurboID enziminin yüksek aktivitesi western blot çalışmalarında çok fazla ışıma verdiğinden elde edilen sonuçlardaki farklılıkların ortaya konulması zor olmaktaydı. Bu nedenlerden dolayı optimizasyon çalışmaları etiketsiz TurboID enzimi ile gerçekleştirildi.

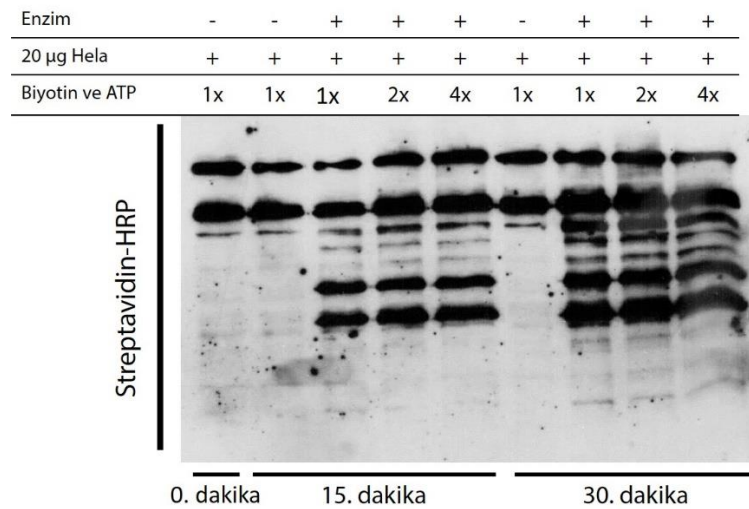
Biyotinilasyon için en uygun reaksiyon süresinin belirlenmesi için TurboID enziminin HeLa protein özütleri üzerindeki biyotinilasyon düzeyleri 0, 15, 30 ve 60 dakikalık sürelik zaman dilimlerinde test edildi. Elde edilen sonuçlarda zaman içerisinde biyotinilasyonun arttığı belirlendi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Etiketsiz TurboID enziminin zamana bağlı aktivitesinin WB analizi ile incelenmesi. Kendini biyotinile eden etiketsiz TurboID'nin aktivitesi “-” ile gösterilmiştir.

4.10. Biyotiniasyon Reaksiyonlarında Biyotin ve ATP Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Zamana bağlı yapılan biyotiniasyon deneyleri sonrasında verimliliği arttırmak için reaksiyon ortamındaki biyotin ve ATP içeriği ile ilgili optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda reaksiyon karışımında kullanılan biyotin (0,5 mM) ve ATP (1 mM) içeriği 2 ve 4 kat artırılarak 15 ve 30 dakikalık biyotiniasyon reaksiyonları kuruldu. Reaksiyon sonucu biyotin ve ATP miktarının artırılması ile belirgin bir aktivite artışının olmadığı görüldü (Şekil 4.19). Bu nedenle ATP'nin 1 mM ve biyotinin ise 0,5 mM olarak kullanılmasına karar verildi.

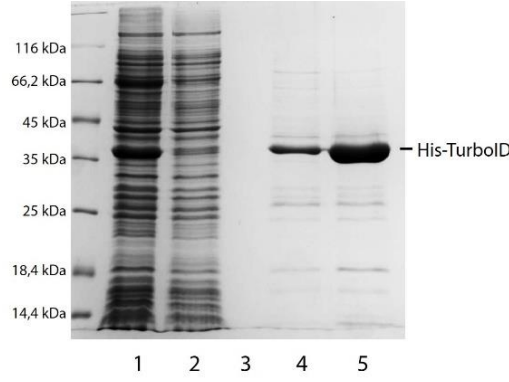


Şekil 4.19. Biyotiniasyon karışımındaki ATP ve Biyotin miktarının artırılması ile enzimatik aktivitedeki değişimin WB analizi ile incelenmesi.

4.11. His etiketli TurboID Enziminin Ni-NTA Kolonuna Bağlanma Sorununun Giderilmesi

MBP etiketli ve etiketsiz TurboID enzimlerinin üretimi, saflaştırılması ve aktiviteleri ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiş olsa da yapılan tüm denemelere ve optimizasyonlara rağmen saflaştırma süreçlerinde karşılaştığımız safsızlıklardan kurtulmak mümkün olmadı. Bununla birlikte kesim işleminin enzim aktivitesi üzerinde negatif etkisi olduğu görüldü. Bu profilde saflaştırılan enzimlerin hücre kültürü çalışmalarında kullanılmasının hem ortamın kirlenmesi hem de bakteri proteinlerinin olası olumsuz etkileri nedeni ile sorun oluşturacağı düşünüldü ve bu nedenle TurboID enziminin Ni-NTA kolonuna bağlanma sorununun tekrar irdelenmesine karar verildi.

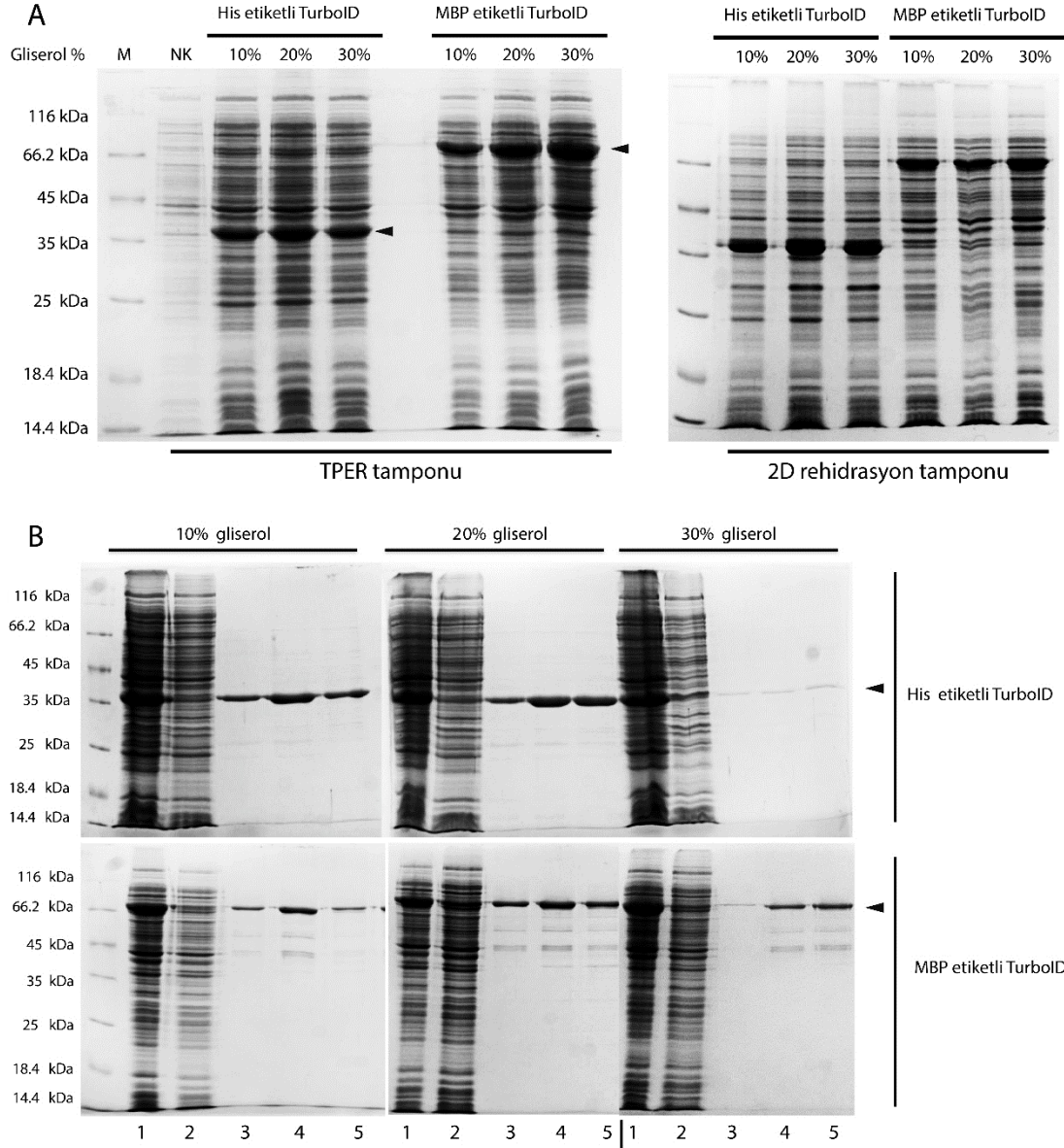
Öncül çalışmalarımızda His etiketli TurboID enziminin TPER tamponu içerisinde çözünür formda elde edilmesi gerçekleşmiş, ancak saflaştırma esnasında kontrol amaçlı kullandığımız yabanıl tip BirA enzimi kolona bağlanırken TurboID'nin kolona bağlanmadığı görülmüştü (Şekil 4.7). Saflaştırma süreçlerinde TurboID enziminin kolona etkin bir şekilde neden bağlanmadığını belirlemek için TurboID ile BirA yabanıl tip enzimleri ile yapılan 3 boyutlu model analizlerinde His etiketinin bağlanmaması için herhangi bir sterik engel olmadığı belirlendi (Şekil 4.8). Ni-NTA kolonlar ile yapılan öncül saflaştırma çalışmalarında lizis tamponu içerisinde yer alan protein özütleri hedef proteinlerin kolona bağlanması için Ni-NTA bağlama tamponu ile 1:10 oranında dilüsyona uğratarak kolondan geçirilmekteydi. Yapılan incelemelerde TPER tamponunun deterjan içerdiği ve bağlanma tamponu ile yapılan dilüsyon sonucu bu deterjanların etkisinin azaldığı ve bu nedenle His etiketinin, proteinin iç bölgesine doğru katlanmasına veya yüzey ile etkileşime girip protein yüzeyine kapanmasına neden olabileceği ve dolayısıyla histidinin imidazol gruplarının kolondaki Ni^{2+} atomlarına bağlanamayacağı düşünüldü. Bu duruma yol açmamak için protein özütlerinin Ni-NTA kolonuna yüklenmeden önce 1:10 değil 1:5 oranında seyreltilmesine karar verildi. Bu şartlar altında saflaştırma işlemi tekrarlandı. Yapılan bu değişim sonucunda TurboID enzimi Ni-NTA kolona güçlü bir şekilde bağlandı ve saf olarak elde edilebildi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. His etiketli TurboID enziminin Ni-NTA Hiprep Histag kolon (GE, ABD) yardımıyla saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analiz sonucu (1- Kolona yüklenen protein özütü, 2- Kolona bağlanmayan (Flow T.), 3- Yıkama, 4- Elüsyon 2, 5- Elüsyon 3).

4.12. TurboID Enziminin Farklı Miktarda Gliserol İçeren TPER Tamponu İçerisinde Hazırlanması ve Saflaştırılması

TPER içerisinde hazırlanan TurboID'nin zamanla aktivite kaybetmesini önleyebilmek için protein özütleri farklı miktarlarda (%10, %20 ve %30) gliserol içeren TPER tamponu ile hazırlandı. Elde edilen protein özütleri ile yapılan SDS-PAGE analizlerinde her üç gliserol içeriğinin de enzimin eldesinde olumsuz bir etkisinin olmadığı, hem His etiketli hem de MBP etiketli TurboID enzimlerinin etkin bir şekilde çözünür olarak elde edildiği gözlemlendi. Ancak yine de üretilen her iki varyantın bir kısmının çökme eğiliminin devam ettiği görüldü (Şekil 4.21 A). Ni-NTA kolon ve amiloz rezinler yardımıyla gerçekleştirilen saflaştırma çalışmalarında %10 ve %20'lik gliserol içeriğinin protein saflaştırma süreçlerinde herhangi bir soruna yol açmadığı belirlenirken, %30'luk gliserol varlığının saflaştırma işlemlerinde kolonun tıkanmasına neden olduğu ve bağlanma verimini düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.21 B).

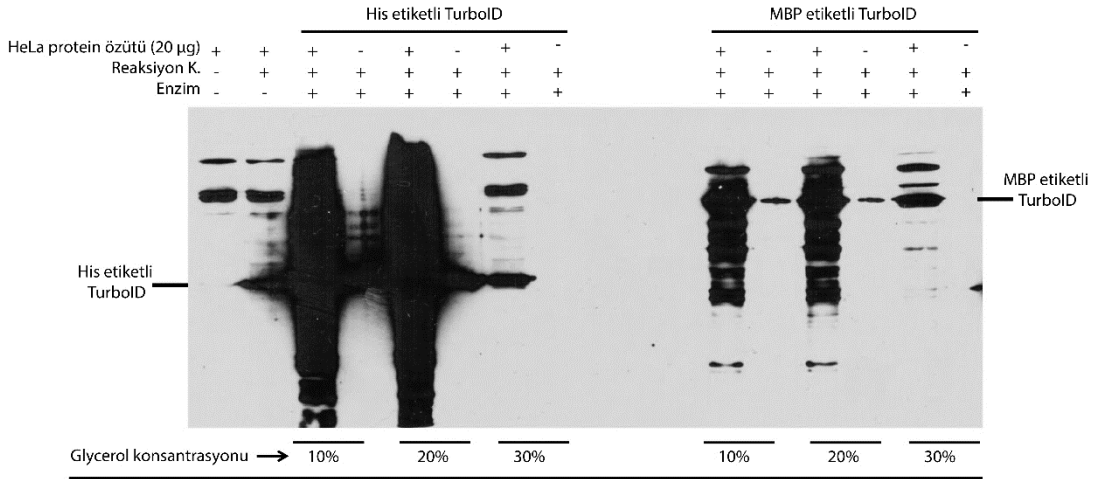


Şekil 4.21. TurboID enzimin farklı gliserol içeriğine sahip lizis tamponları kullanılarak elde edilmesi ve saflaştırılması. (A) *E. coli* BL21 DE3 pLys hücre hatlarında His ve MBP etiketli TurboID enzimlerinin üretimi sonrası farklı miktarlarda gliserol içeren TPER ve 2D rehidasyon tamponları ile elde edilen protein özütlerinin SDS-PAGE analizleri. (B) Ni-NTA kolon ve amiloz rezin yardımıyla His- ve MBP- etiketli TurboID enzimlerinin saflaştırılması ve elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE analizleri (1- Kolona yüklenen protein özütü, 2- Kolona bağlanmayan (Flow T.), 3- Elüsyon 2, 4- Elüsyon 3, 5- Elüsyon 4). *M:Protein standardı (Thermofisher, ABD), NK: Negatif kontrol.

4.13. TurboID Enziminin Farklı Gliserol Ortamlarındaki Aktivitelerinin Belirlenmesi

Gliserol içeren tamponlar kullanılarak elde edilen ve saflaştırılan enzimlerin aktivitelerinin analiz edilmesi için enzimlerden 0,2 µg alınarak 20 µg HeLa protein özütü ile

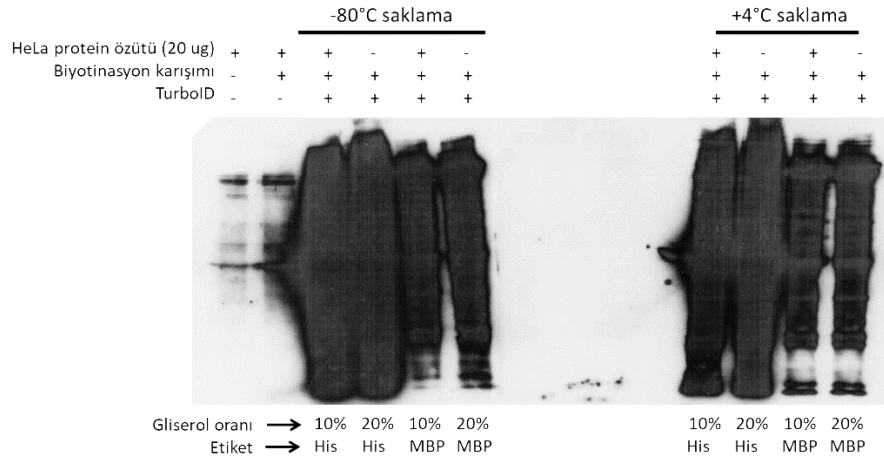
karıştırıldı ve 37°C'de 30 dakika boyunca biyotinilasyon reaksiyonları gerçekleştirildi. Biyotinilasyon işlemi sonrası enzim aktiviteleri WB analizleri ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar His etiketli TurboID enzimin MBP etiketine göre daha aktif olduğunu ortaya çıkardı. Bunun yanı sıra %10 ve %20'lik gliserol varlığında TurboID enzimin aktivitesini koruduğu %30'luk gliserol varlığının saflaştırılmayı etkilediği gibi aktivitede azalmaya neden olduğu görüldü (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Gliserol etkisinin His ve MBP etiketli TurboID enzim aktiviteleri üzerindeki etkisinin WB yöntemi kullanılarak analizi.

4.14. TurboID Enziminin Saklanma Koşullarının (Zaman ve Sıcaklık) Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Belirli oranlardaki gliserol varlığının enzim üretimi ve saflaştırması üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı belirlendikten sonra gliserolün zaman içinde enzim aktivitesinin korunmasında etkili olup olmadığı ile ilgili analizler gerçekleştirildi. Bunun için saflaştırılan enzim örnekleri farklı gliserol içeriklerindeki elüsyon tamponlarında +4°C ve -80°C'de iki hafta süre ile tutulduktan sonra aktiviteleri karşılaştırıldı. Yapılan incelemede gliserolün farklı saklama koşullarında iki hafta boyunca bekletilen enzim örneklerinin aktivitelerini koruduğu ve belirgin bir aktivite kaybının oluşmadığı belirlendi (Şekil 4.23).

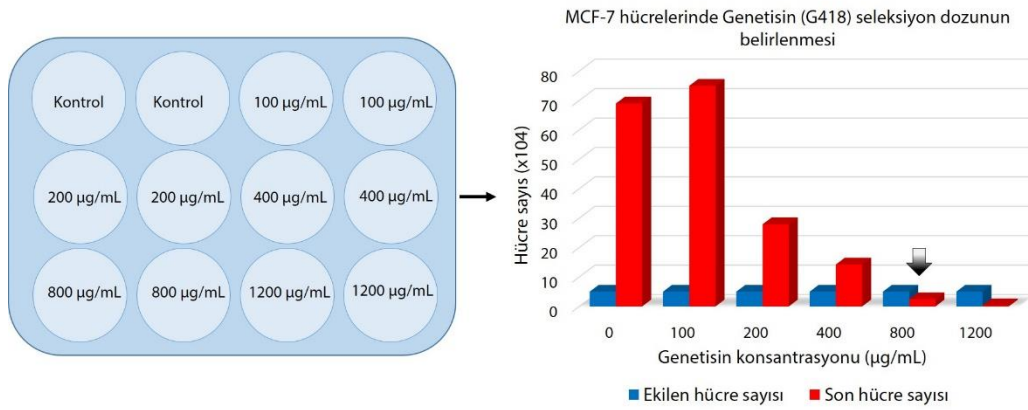


Şekil 4.23. Farklı sıcaklıklarda saklanan TurboID enzim aktivitelerindeki değişimin WB analizi ile belirlenmesi.

Yapılan çalışmalar sonucunda, yüksek aktiviteye sahip olması, daha az kirlilik içermesi, çok daha küçük bir etiket taşıması ve elüsyon tamponunda maltoz gibi hücre metabolizmasını etkileyebilecek moleküllerin bulunmamasından dolayı çalışmalarımızın bu aşamadan sonraki kısımlarında His etiketli TurboID enzimi kullanıldı.

4.15. Plazmit Transfeksiyonu İçin MCF-7 Hücre Hattında Genetisin (G418) Antibiyotiklerinin Seleksiyon Dozunun Belirlenmesi.

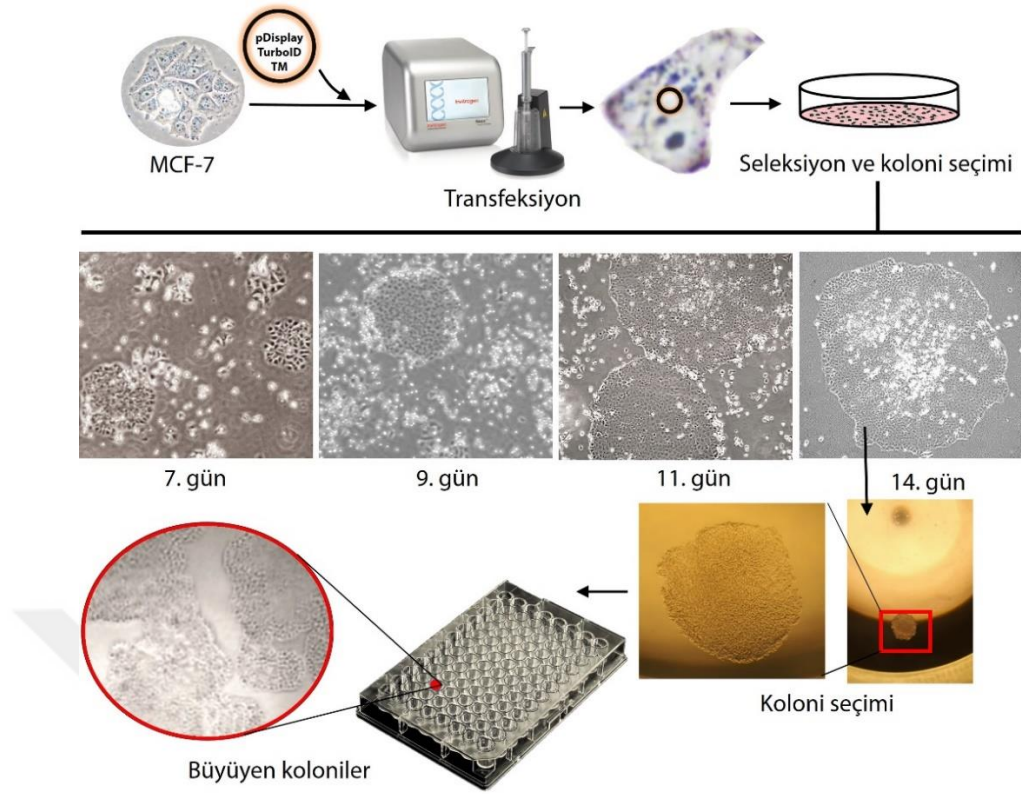
Meme hücre hatlarının hücre içi yöntem ile biyotinyasyonu için transfeksiyon sonrası plazmit içeren hücrelerin seçiminde kullanılması gereken antibiyotik (genetisin) miktarının belirlenmesi amacı ile ilk olarak MCF-7 hücreleri kullanıldı. Bu analiz için 12 kuyucuklu kültür kaplarına 50.000 hücre/kuyu olacak şekilde MCF-7 hücreleri ekildi. Bir gün sonra hücrelerin üzerindeki besiyerleri, belirlenen konsantrasyonlarda genetisin içeren taze besiyeri ile değiştirildi ve genetisin içeren besi yerleri iki günde bir yenilendi. Yapılan analizde koloni seçimi için uygun antibiyotik konsantrasyonunun 800 µg/mL genetisinin olduğu belirlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. MCF-7 hücre hatlarında Genetisin (G418) seleksiyon dozunun belirlenmesi.

4.16. MCF-7 Hücre Hatlarına pDisplay-TurboID-TM Plazmitinin Transfeksiyonu ve Kolonilerinin Seçilimi

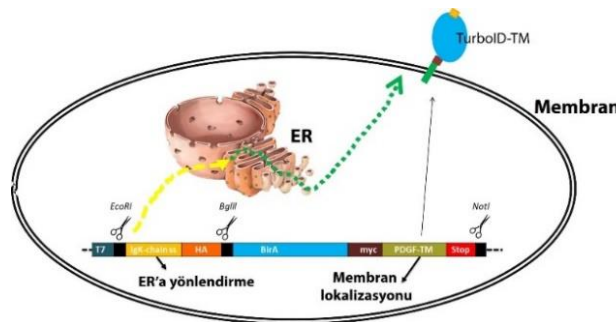
pDisplay-TurboID-TM plazmitinin MCF-7 hücrelerini transfeksiyonu için 20 µg plazmit 1×10^6 hücreye Neon transfeksiyon sistemi kullanılarak transfeke edildi. Yapılan transfeksiyon sonrası hücreler besiyeri kaplarına ekildi ve bir gün boyunca antibiyotiksiz besiyerinde büyütüldü. Bir gün sonra transfeke edilmiş MCF-7 hücrelerinin bulunduğu besiyeri ortamına genetisin eklenerek hücreler seçilime bırakıldı. Plazmiti taşıyan kolonilerin oluşumu 7. günden itibaren izlenmeye başlandı. On dört gün sonunda koloniler iyice belirginleşti ve oluşan koloniler cam yüzükler yardımıyla tripsinize edilerek kaldırılarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Toplamda 24 adet koloni seçildi ve bu kolonilerden 17 tanesi seçici besiyeri ortamında önce 12, sonra 6 kuyucuklu kültür kaplarına alınarak çoğaltıldı (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. pDisplay-TurboID-TM plazmiti ile transfekte edilen MCF-7 hücrelerinde transfeksiyon sonrası koloni seçimi ve kolonilerin çoğaltılması.

4.17. Seçilen MCF-7 Kolonilerinde TurboID Enzim Üretiminin Doğrulanması

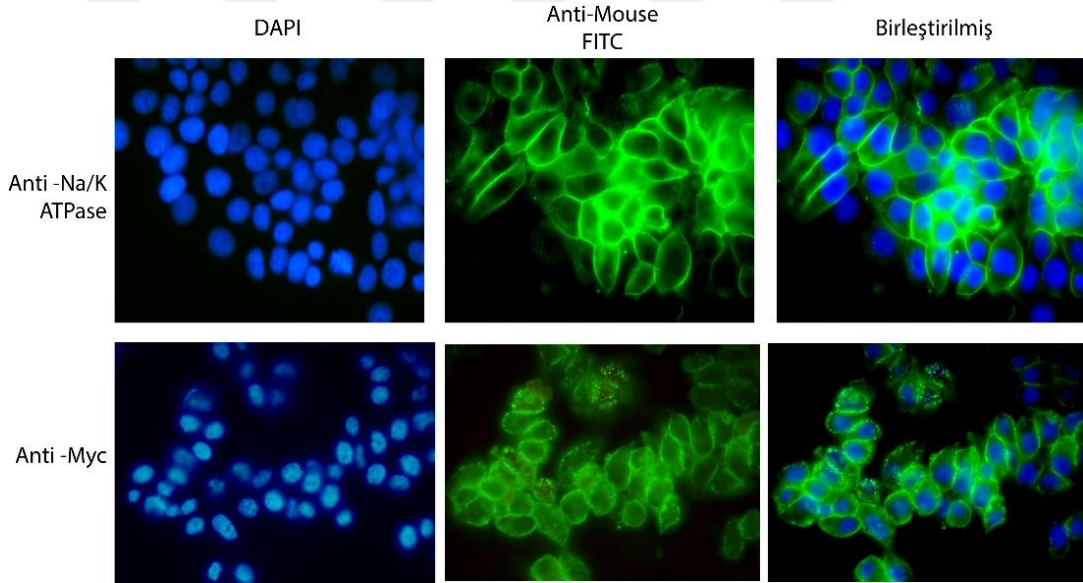
Transfeksiyon sonrası oluşan kolonilerde üretilecek olan TurboID enzimi üretim aşamasında üzerinde taşıdığı lider dizi (IgK light chain ss) sayesinde endoplazmik retikuluma yönlendirilmekte ve aynı zamanda PDGF'nin (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü) transmembran bölgesi (TM) sayesinde de hücre membranının dış bölgesinde lokalize olmaktadır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. TurboID-TM enziminin membran yüzeyine lokalizasyonu.

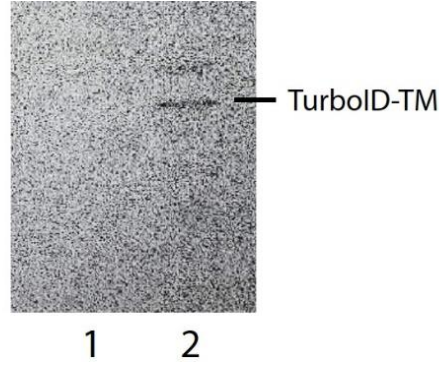
Bununla birlikte üretilen TurboID enziminde hemagglutinin (HA) ve Myc etiketleri de yer almaktadır. Çalışmanın ilk aşamalarında TurboID'ye karşı bilinen ticari bir antikor olmadığından, enzim üretiminin ve hücrelerdeki lokasyonunun belirlenmesi için yapılan WB ve immünflerasan (IF) analizlerinde elimizde bulunan Anti-Myc antikorunu kullandık.

Yapılan çalışmada TurboID-TM proteinini stabil olarak üreten ancak monoklonal olmayan hücreler coverslipler üzerinde büyütüldü. Hücreler %70 yoğunluğu ulaştıklarında IF analizleri için kullanıldı. IF çalışmalarında membran proteinlerin profilinin belirlenmesi amacıyla bir membran proteini olan Na/K-ATPase antikorunu kullanarak IF analizleri gerçekleştirildi. Na/K-ATPase'in membrana lokalize olduğu gösterildi. Ardından TurboID-TM üretimini ve lokasyonunu belirlemek amacıyla Anti-Myc antikorunu ile yapılan IF analizlerinde, MCF-7 hücrelerinde TurboID proteininin üretildiği ve membrana lokalize olduğu gösterildi (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Poliklonal MCF-7 stabil hücre hatlarında TurboID enzim üretiminin ve lokalizasyonunun IF analizi ile belirlenmesi.

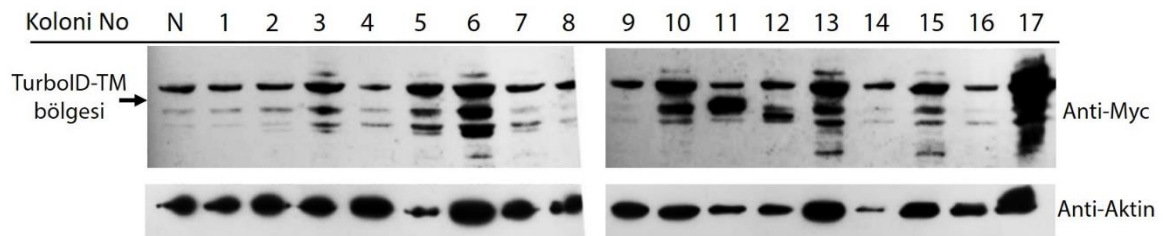
IF analizlerini takiben yapılan WB analizleri ile de MCF-7 hücrelerinde TurboID üretimi gerçekleştiği doğrulandı. Ancak proteine ait sinyal gücünün çok zayıf olduğu görüldü (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Stabil olarak TurboID-TM üreten MCF-7 hücrelerinde TurboID-TM enzim üretiminin WB analizi ile belirlenmesi (1- MCF-7 protein özütü (Negatif kontrol), 2- Poliklonal MCF-7 pDisplay-TurboID-TM protein özütü).

4.18. TurboID-TM İfade Eden Monoklonal MCF-7 Hücre Hatlarının Eldesi

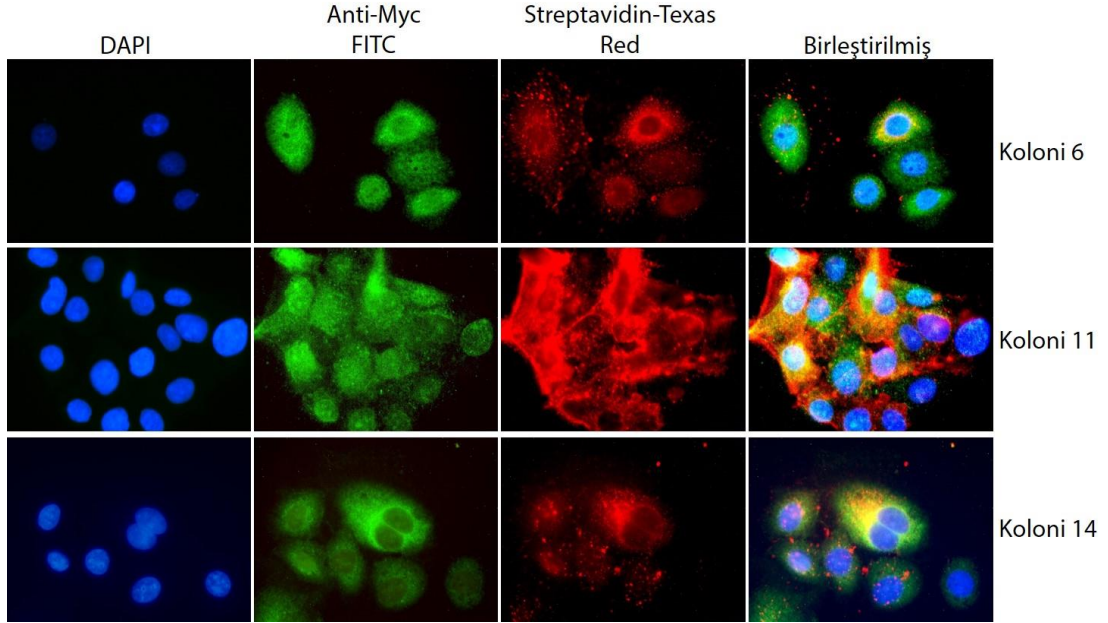
Monoklonal olmayan MCF-7 hücreleri ile yapılan IF ve WB çalışmalarında TurboID-TM enziminin üretimi gösterildikten sonra, monoklonal koloniler seçilerek her bir koloninin TurboID-TM üretimi için analizleri yapıldı. TurboID protein düzeylerinin belirlenmesi ve en efektif enzim üretimini gerçekleştiren koloninin seçilebilmesi amacıyla 17 adet koloniden protein özütleri hazırlandı ve Anti-Myc antikoru kullanılarak western blot analizi yapıldı. Yapılan western blot analizlerinden elde edilen sonuçlarda beklenen bölgede spesifik bir bant belirlenemediği gibi özgün olmayan bantların olduğu gözlemlendi. Bu nedenle kolonilerin TurboID enzimi ürettirip üretmediği, ürettiyorsa hangi koloninin en yüksek üretim kabiliyetine sahip olduğu belirlenemedi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. On yedi adet monoklonal MCF-7 hücre kolonisinin TurboID-TM enzim üretiminin belirlenmesi amacı ile yapılan WB analizi.

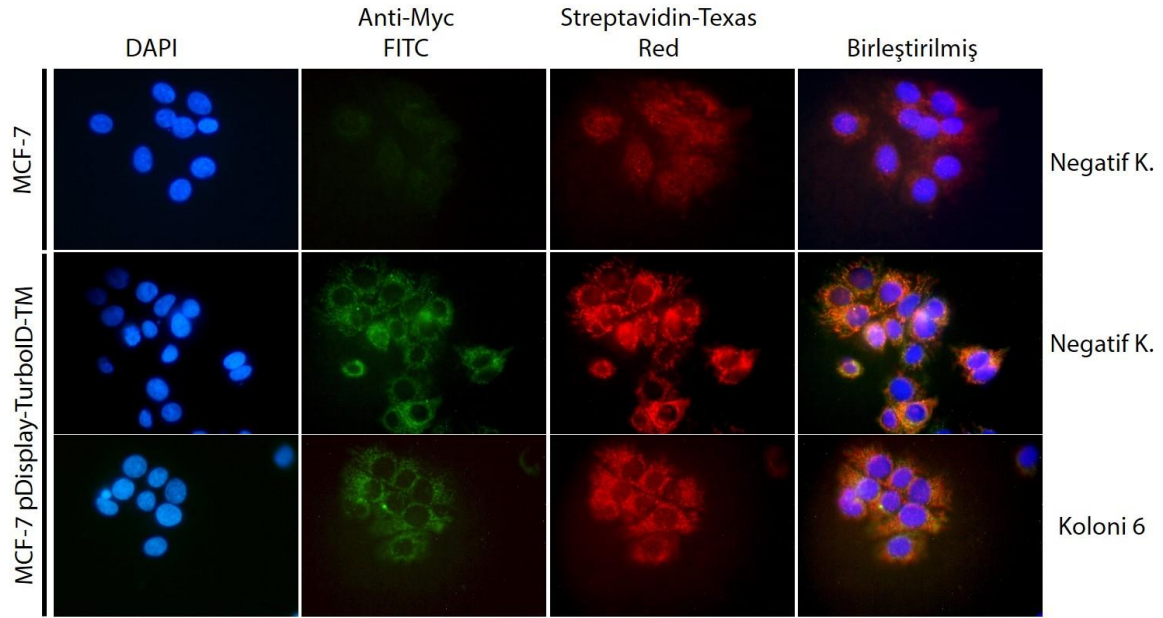
WB analizlerinde istenilen sonuçlar alınamadığından rastgele 3 adet koloni seçilerek (koloni 6, 11 ve 14) IF çalışmaları gerçekleştirildi. Aynı zamanda enzim üretimi ile birlikte, üretilen enzimlerin aktivitelerini de analiz etmek için hücreler üzerinde biyotinyasyon reaksiyonları gerçekleştirildi. Bunun için %60 yoğunluğuna ulaşan hücrelerin bulunduğu ortama biyotinyasyon için gerekli komponentler (0,5 mM biyotin, 1 mM ATP ve 5 mM

MgCl₂) eklendi ve hücreler 60 dakika boyunca 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonucu 5 kez PBS ile yıkanan hücreler IF analizlerde kullanıldı. Yapılan IF analizleri sonucu Şekil 4.27’de belirlenen TurboID protein profillerinin kaybolduğu görüldü. PM’de var olan protein varlığı görülmedi, aksine sitoplazmada dağınık halde bulunan TurboID-TM enzim profilleri gözlemlendi. Bununla birlikte biyotinile proteinlerin dağılımlarının ve lokasyonlarının da TurboID-TM enzimi ile benzer olduğu görüldü (Şekil 4.30).



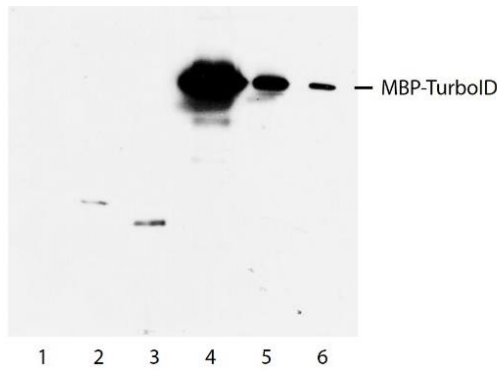
Şekil 4.30. TurboID-TM ifade ettiği düşünülen monoklonal MCF-7 hücrelerinde TurboID proteinin lokasyonunun ve biyotinyasyon düzeylerinin IF analizlerinde gösterimi.

Yapılan analizler sonucunda biyotinyasyonun ve TurboID üretiminin beklenildiği profilde olmaması nedeni ile çalışma tekrarlandı. Ancak bu sefer biyotinyasyon reaksiyonunun daha yavaş olması için biyotin miktarı azaltılarak reaksiyon süresi uzatıldı. İşlemlerin sonunda yapılan IF analizlerinde de benzer sonuçlar elde edildi. Elde edilen profillerde TurboID-TM’nin mitokondri ile endoplazmik retikulum benzeri dağılım gösterdiği görüldü. Ayrıca TurboID-TM içeren ancak ortama biyotin eklenmeyen negatif kontrol örneklerinde de biyotinyasyon varlığı belirlendi (Şekil 4.31).



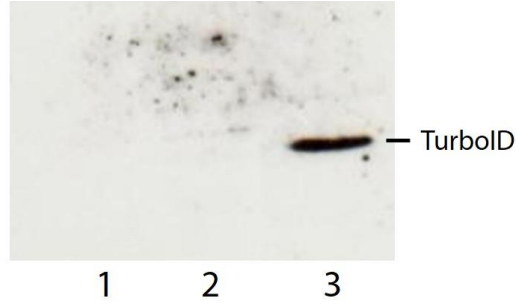
Şekil 4.31. TurboID-TM ifade ettiği düşünülen monoklonal MCF-7 hücrelerinde TurboID proteinin lokasyonunun ve biyotinyasyon düzeylerinin IF analizlerinde gösterimi.

IF analizlerinde Myc antikor ile TurboID arasından immünblotlama işlemi gerçekleşmesine rağmen western blot analizlerinde verimli bir sonuç alınamamasından dolayı öncelikli olarak analizlerde kullanılan Anti-Myc antikorunun değiştirilmesine karar verildi. Bu sebeple BirA enzimine karşı üretilen ve TurboID enzimini de tanıyan Anti-BirA antikoruna temin edilerek denenmesine karar verildi. Anti BirA antikoruna ile yapılan WB analizinde Anti BirA antikorunun TurboID proteinini spesifik olarak tanıdığı gösterildi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Anti-BirA antikorunun tanıdığı TurboID protein bantlarını gösteren WB analiz sonucu (1- HeLA protein özütü (20 µg), 2- GFP proteinin üretilmiş *E. coli* protein protein özütü (20 µg), 3- *E. coli* protein özütü 4- Safaştırılmış MBP etiketli TurboID (500 ng), 5- Safaştırılmış MBP etiketli TurboID (25 ng), 6- Safaştırılmış MBP etiketli TurboID (2,5 ng)).

Anti-BirA antikorunun TurboID enzimini spesifik olarak tanıdığı belirlendikten sonra koloni taraması için Anti-BirA antikoru kullanımlarına karar verildi. Bu amaçla yapılan deneme WB çalışmaları rastgele seçilen bir koloni (koloni-6) ile daha önce analizlerde kullanılan poliklonal kolonilere ait hücre kültüründen elde edilen protein özütleri kullanıldı. Yapılan analizlerde 6 numaralı kolonide TurboID proteinine ait bant gözlenmezken poliklonal kolonilerden elde edilen protein özütlerinde TurboID proteinin varlığı gözlemlendi (Şekil 4.33).

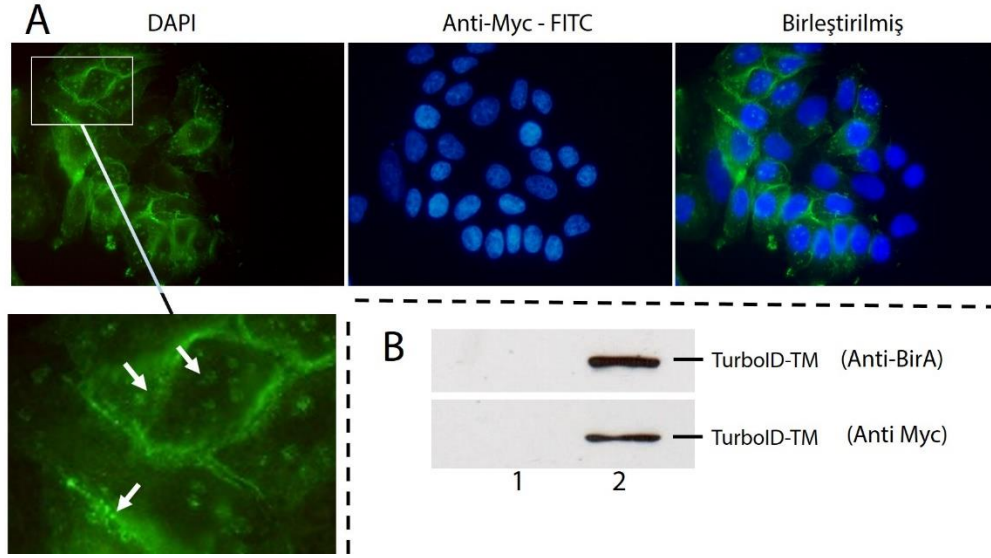


Şekil 4.33. TurboID-TM ifade ettiği düşünülen monoklonal ve poliklonal MCF-7 hücrelerinde Anti-BirA antikoru kullanılarak TurboID ekspresyonunun WB yöntemi ile gösterilmesi (1- MCF-7 protein özütü, 2- Monoklonal MCF-7 pDisplay TurboID koloni 6 protein özütü, 3- Poliklonal MCF-7 pDisplay TurboID protein özütü).

Poliklonal kolonilerde hem IF hem de WB analizlerinde beklenen profil ve bantların gözlenmesine rağmen, kolonilerde elde edilen IF ve WB sonuçlarının neden farklı oldukları anlaşılamamıştır.

4.19. pDisplay-TurboID-TM Plazmitinin Geçici Transfeksiyonu ile Yapılan Biotinilasyon Çalışmaları

MCF-7 hücrelerinde stabil hücre hatlarının oluşturulmasında başarı sağlanamayınca stabil hücre hatları oluşturmak yerine geçici transfeksiyonlar yapıp hücre yüzey proteinlerinin biyotinilasyonun bu hücrelerde çalışmasına karar verildi. Yapılan transfeksiyon ve kısa süreli inkübasyon (5 gün) sonrasında yapılan IF analizlerinde TurboID-TM proteininin hücrelerde üretildiği belirlendi. Ancak hücrelerdeki TurboID'nin PM görünümündeki dağılımının üniform olmadığı ve hücre yapılarında küçük bozulmaların olduğu gözlemlendi (Şekil 4.34 A). IF analizlerinde görülen protein varlığı WB analizi ile de doğrulandı (Şekil 4.34 B).

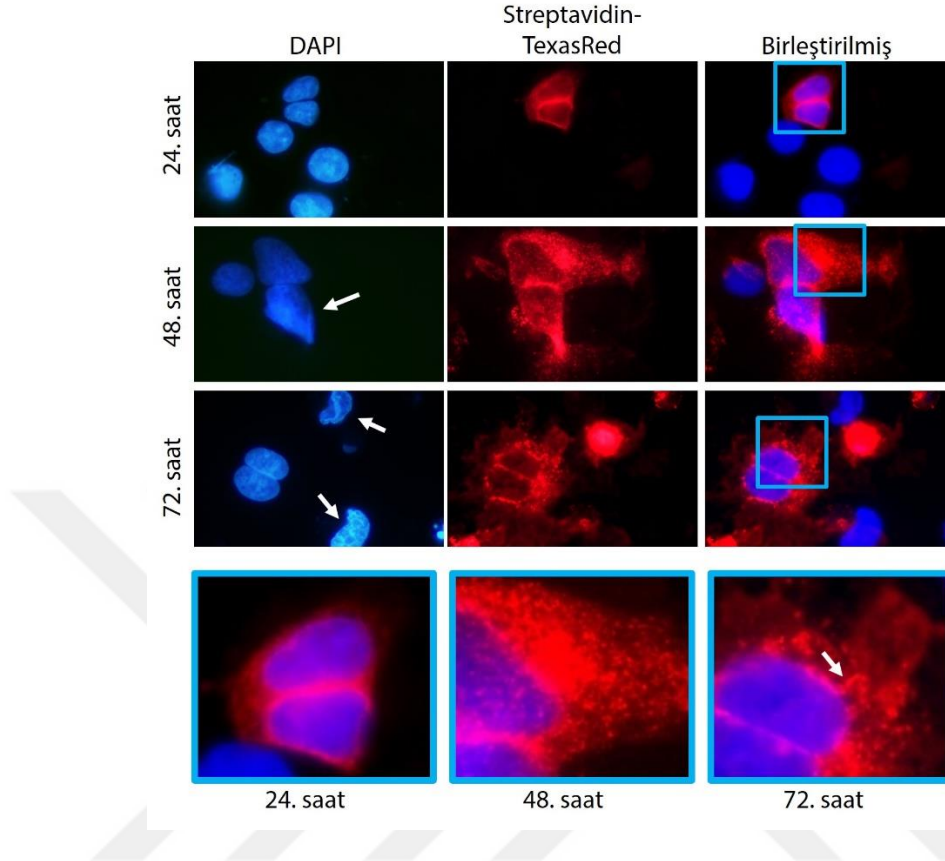


Şekil 4.34. pDisplay-TurboID-TM transfekte edilmiş MCF-7 hücrelerinde transfeksiyon sonrası TurboID-TM protein dağılımı. (A) IF analizleri (B) WB analizleri (1- MCF-7 protein özütü (Negatif Kontrol), 2- MCF-7 karışık koloniler).

Transfeksiyon sonrası yapılan analizlerde TurboID-TM enzim üretimi her ne kadar gözlemlense de, IF analizlerinde beklenildiği gibi bir profilin olmaması, hücresel defektlerin oluşması ve enzim üretiminin zamanla azalması, TurboID-TM enziminin hücreler üzerinde toksik etki oluşturup oluşturmadığı sorusunu akıllara getirmiştir.

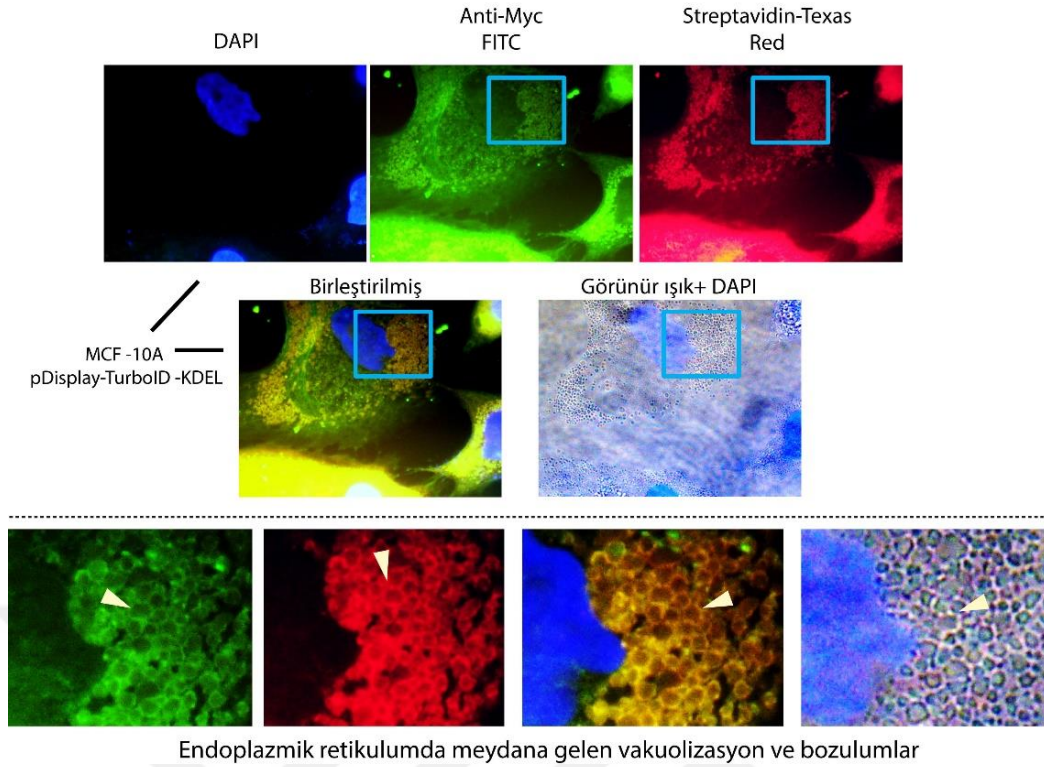
Bakterilerde yapılan TurboID üretim çalışmalarında TurboID enzim aktivitesinden ötürü hücrelerin büyümesi yavaşlamış ve bakteriyel proteomda kontrol dışı global bir biyotininasyon olmuştu. Benzer bir durumun MCF-7 hücre hatlarında da meydana gelebileceği olasılığı göz önüne alındı. Her ne kadar büyüme ortamına doğrudan biyotin konulmasa da endoplazmik retikulum, golgi ve PM'de yer alan aktif TurboID enziminin besiyerindeki minimal düzeydeki biyotini de kullanarak bu hücre kompartmanlarında proteinlerin kontrolsüz bir şekilde biyotininasyonuna neden olabileceği ve bu durumun hücre metabolizmasını etkileyerek hücresel toksisite oluşturabileceği düşünüldü. Biyotinin bu etkisinin olup olmadığının gözlenebilmesi için transfeksiyon sonrası yedinci günde MCF-7 (pDisplay-TurboID-TM) hücrelerin bulunduğu besiyeri ortamına 50 mM biyotin eklenerek 24., 48. ve 72. saatlerde biyotininasyon düzeyleri ve bu durumun hücre morfolojisi üzerindeki etkisi IF mikroskopi analizleri ile belirlendi. Yapılan analizler sonucu 48. saate kadar biyotininasyonda artış olduğu ve sonrasında kısmi bir azalmanın gerçekleştiği, bununla birlikte zaman ilerledikçe hücrelerde biyotininasyon profilinin değiştiği ve noktasal birikimler gösterdiği belirlendi. Aynı zamanda 48. saatten başlayıp 72. saate uzanan zaman

dilimi içerisinde morfolojik değişikliklerin ve çekirdek bozulmalarının olduğu gözlemlendi (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. MCF-7 pDisplay-TurboID-TM hücrelerinde 50 mM biyotin eklenmesi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde biyotinyasyon aktivitelerinin IF analizleri ile gösterilmesi.

Hücrelerde endojen olarak üretilen TurboID'nin etkisi tez kapsamının dışında yaptığımız başka bir çalışmada açık bir şekilde gösterildi. Çalışmada MCF-10A hücrelerinde TurboID enzimin endoplazmik retikulum üzerinden üretiminin sağlanabilmesi için pDisplay-TurboID-KDEL plazmiti kullanıldı. MCF-10A hücrelerine yapılan transfeksiyon ve seçilim süreçlerinde üretilen TurboID enziminin zaman içerisinde endoplazmik retikulum yapısında vakuolizasyona, hücrelerin büyümesinin yavaşlamasına ve hücre morfolojisinde genişlemeye neden olduğu görüldü. Aynı zamanda endoplazmik retikulum da meydana gelen yüksek biyotinyasyon enzimin biyotin olmadan da besiyerindeki biyotini kullanarak endoplazmik retikulum içerisindeki proteinleri etiketlediği gözlemlendi (Şekil 4.36).



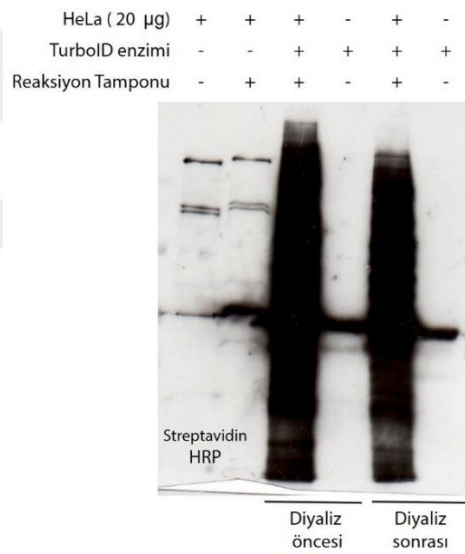
Şekil 4.36. pDisplay-TurboID-KDEL plazmiti aktarılmış MCF-10A hücrelerinde üretilen TurboID enziminin endoplazmik retikulum ve hücre morfolojisi üzerindeki etkisi.

Tez kapsamında yaptığımız çalışmada temel amacımız sağlıklı ve kanserli meme hücre hatlarının yüzey proteomlarının enzimatik biyotininasyon yöntemi kullanılarak karşılaştırılması ve biyobelriteç adaylarının analiz edilmesiydi. Ancak TurboID enziminin hücre içerisinde üretilip membran yüzeyine lokalizasyonunun sağlanması ve sonrasında hücre yüzey proteinlerinin biyotin ile işaretlenmesi süreçlerinde yukarıda da bahsedilen bazı sorunlar ile karşılaşıldı. Plazmitlerin meme hücre hatlarına transfeksiyonu ve koloni seçiminin uzun zaman alması, aktif enzimin istenmeyen biyotininasyonlara sebep olması ve hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkileri olması hücrelerin proteomunu ciddi anlamda etkileyeceği ve analizlerde yanıltıcı sonuçlara neden olacağı için TurboID'nin hücre içerisinde üretilerek yapılan biyotininasyon çalışmasından vazgeçildi ve hücre dışı biyotininasyon yöntemiyle HYP'lerinin biyotininasyon sürecinin gerçekleştirilmesine karar verildi.

4.20. Biyotininasyonu Öncesi Gliserolün Uzaklaştırılması ve Aktivite Tayini

HYP'leri biyotinitlemek için enzimin üretimi gerçekleştirilmiş, gerekli optimizasyonlar yapılmış ve enzim %10 gliserol içerisinde saklanmıştı. Ancak yaptığımız

ön çalışmalarda besiyeri ortamına %10 gliserollü tamponda saklanan TurboID enzimi eklendiğinde hücrelerin kısa bir zaman içerisinde ölmeye başladığı görüldü. Bu duruma kültür ortamına yayılan gliserolün neden olduğu ve hücreler üzerinde toksik etki oluşturduğu belirlendi. Yapılan literatür çalışmalarında MCF-7 hücreleri üzerindeki gliserolün inhibe edici dozunun %2-4 aralığında olduğu rapor edilmişti (Wiebe, J. ve Dinsdale, C. J., 1991). Yaptığımız biyotininilasyon çalışmalarında ortamda bulunan gliserol oranı %1'in altında olmasına rağmen toksik etki gösterdi. Bu nedenle enzimin hücre kültürlerinde kullanılmadan önce gliserolden arındırılması gerekmektedir. Bu amaçla cut-off limiti 2 kDa olan diyaliz kasetleri kullanılarak enzim DMEM besiyerine karşı diyaliz edildi. Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası TurboID aktivitesinde herhangi bir değişim meydana gelip gelmediğinin belirlenmesi için HeLa protein özütleri üzerinde analizler yapıldı. Yapılan analizlerde diyaliz işleminin enzim aktivitesini etkilemediği gösterildi (Şekil 4.37).

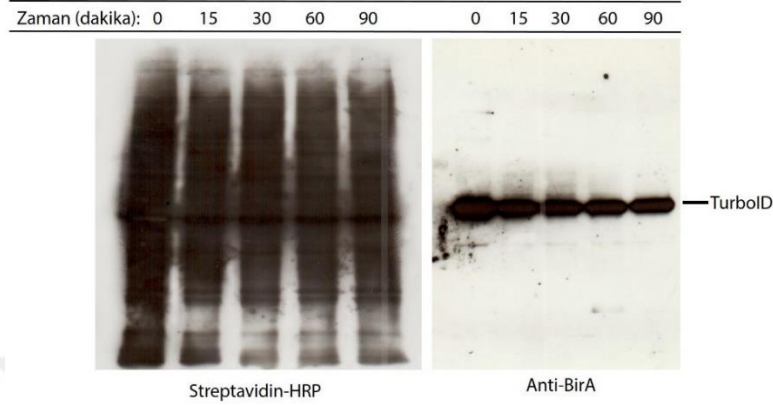


Şekil 4.37. Enzim saklama tamponunda bulunan gliserolün hücre kültüründe kullanımı öncesi uzaklaştırılması için yapılan diyaliz işleminin enzim aktivitesi üzerine olan etkisinin incelenmesinin WB analizi yapılarak incelenmesi.

4.21. Hücrelerin Kültüre Edildiği Ortamda TurboID'nin Zaman İçerisindeki Aktivite Kaybının ve Yıkım Oranının Belirlenmesi

Besiyerine eklenen TurboID enziminde zamanla oluşabilecek aktivite kayıpları ve enzim degradasyonunun incelenmesi amacıyla yapılan deneyde ortama eklenen enzimin farklı zaman sürelerindeki aktiviteleri ve yıkım dereceleri incelendi. Bu amaçla 0., 15., 30., 60. ve 90. dakika boyunca 37°C'de etüv içerisinde besiyeri ortamında bekletilen enzimler kullanılarak, bu enzimlerin HeLa protein özütlerinin üzerindeki biyotininilasyon aktiviteleri

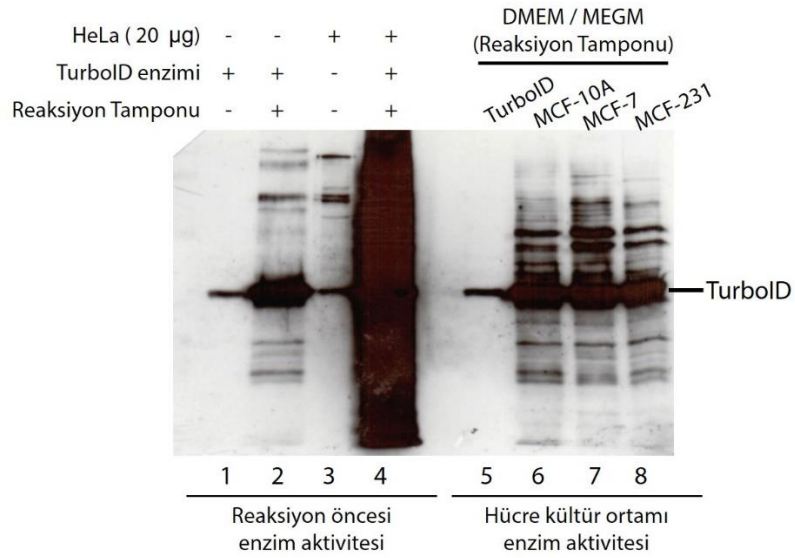
ölçüldü. Yapılan western blot analizlerinde enzim aktivitesinde herhangi bir azalma görülmeydi. Aynı zamanda enzim yıkımının belirlenmesi için alınan örneklerle yapılan WB analizlerinde protein seviyelerinde anlamlı bir azalma olmadığı ve protein yıkımına dair degradasyon ürünlerin oluşmadığı gözlemlendi (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. TurboID enziminin hücre kültürü ortamında zaman içerisindeki aktivitesinin ve yıkım oranının WB analizi ile incelenmesi.

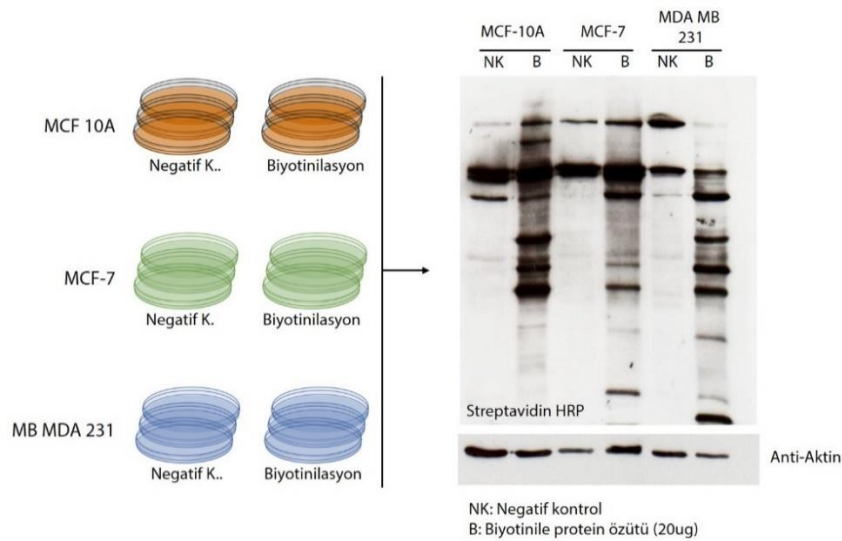
4.22. Hücre Yüzey Proteinlerinin TurboID Enzimi ile Biyotinilasyonu

Hücre yüzey biyotinilasyon deneyleri yapılmadan önce TurboID enziminin aktivitesi tekrar ölçülerek kontrol edildi. Bu amaçla HeLa protein özütü kullanıldı ve analizlerde enzimin aktif olduğu ve protein özütlerini yüksek oranda biyotine ettiği belirlendi (Şekil 4.39). Sonrasında hücrelerin yüzey proteinlerinin biyotinilasyonu için kültür ortamında bulunan hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildi, DMEM ve MEGM besiyerileri içerisinde biyotinilasyon reaksiyonları kuruldu ve hücreler etüv içerisinde 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzimin sergilediği aktiviteyi görebilmek için ilk olarak besiyeri örnekleri ile WB analizleri yapıldı. Yapılan analizler sonucunda her 3 hücre hattının bulunduğu reaksiyon ortamında enzimlerin aktif olduğu belirlendi (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. HYP'nin biyotininilasyonunda kullanılan TurboID aktivitesinin kullanım öncesi WB analizi ile gösterilmesi (1-TurboID, 2- TurboID + biyotin, 3- HeLa protein özütü (20 µg), 4- HeLa protein özütü (20 µg) + TurboID + Biyotin, 5- TurboID, 6- MCF10A biyotininilasyon reaksiyon üst sıvı (DMEM), 7- MCF7 biyotininilasyon reaksiyon üst sıvı (besiyeri) 8 - MDA MB 231 biyotininilasyon reaksiyon üst sıvı (besiyeri)).

Reaksiyon süresi sonunda hücreler PBS ile yıkanarak safsızlıklar ve reaksiyon karışımı uzaklaştırıldı. Ardından hücreler RIPA lizis tamponu ile patlatılıp protein özütleri elde edildi. Konsantrasyonları Bradford yöntemi ile ölçülen protein özütlerinden 20 µg alınarak biyotininilasyonun doğrulanması için WB analizleri gerçekleştirildi.

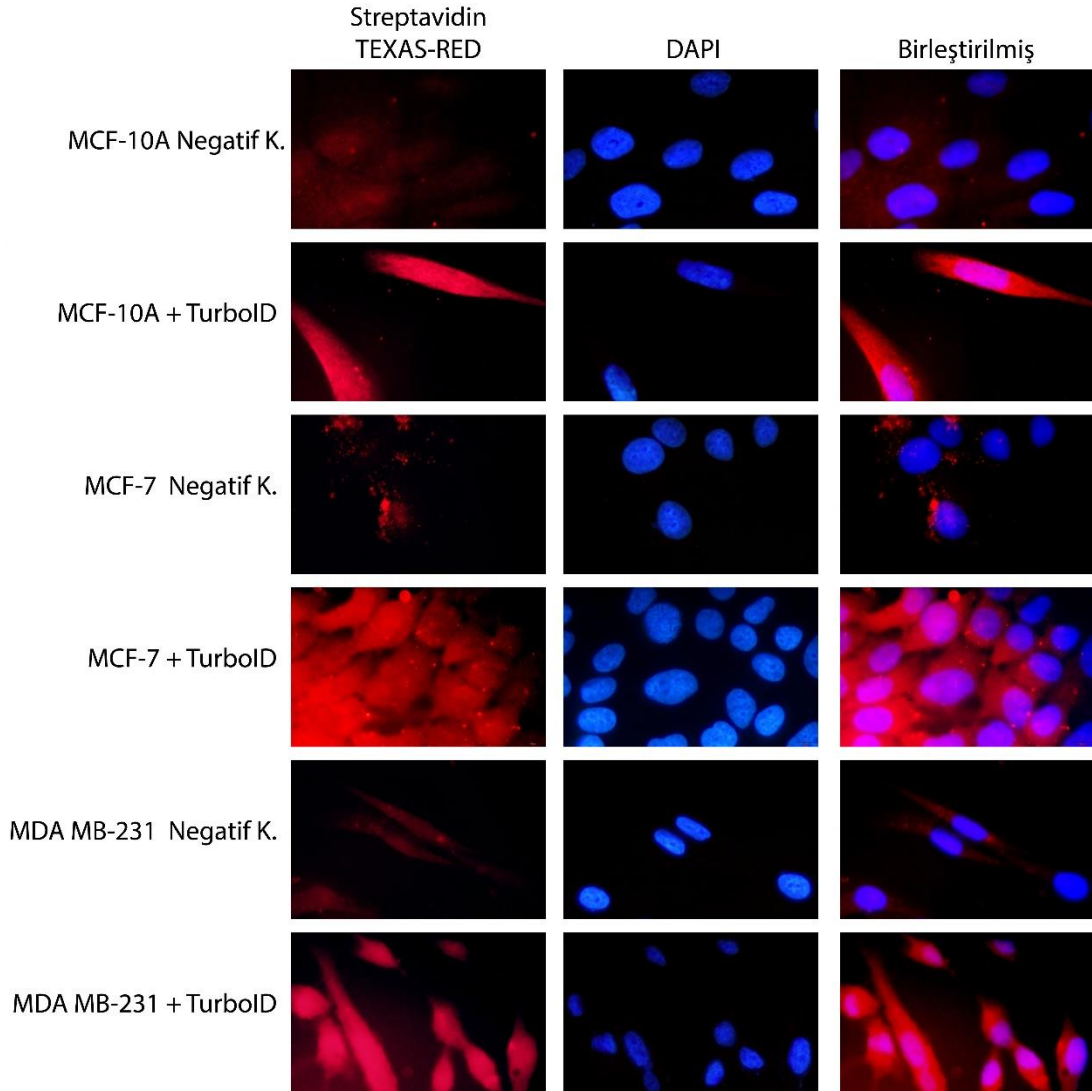


Şekil 4.40. Hücre hatlarında TurboID enziminin kültür ortamına eklenmesi ile yapılan hücre yüzey protein biyotininilasyonunun WB analizi ile doğrulanması.

Yapılan analizlerde negatif kontrollerde biyotinilasyon gerçekleşmezken enzim eklenen biyotinilasyon gruplarında her üç hücre hattında da biyotinilasyonun gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.40).

4.23. Biyotinilasyonun IF Analizler ile Gösterilmesi

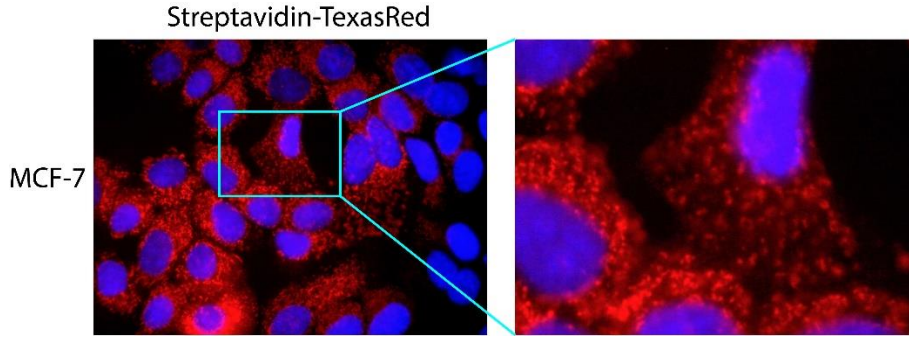
Yapılan IF analizlerinde TurboID eklenmiş deney gruplarında negatif kontrol gruplarına göre biyotinilasyon düzeyinde artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. MCF-10A, MCF-7 ve MDA MB-231 hücre kültürlerine eklenen TurboID enzimi ile yapılan HYP biyotinilasyonunun IF analizleri.

Bununla birlikte IF görüntülerinde membran protein profilinin andırmayan ve sitoplazmasa dağılmış ve mitokondri dağılımına benzeyen daha zayıf bir profil daha gözlemlendi. Bunun nedeninin mitokondride bulunan doğal biyotinilasyon reaksiyonunun olabileceği olarak düşünüldü. Bu durum daha önceki denemelerimizde yapılan uzun süreli

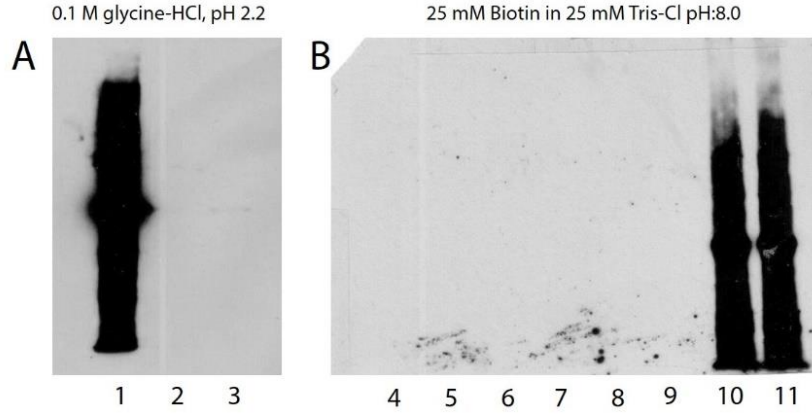
biyotininilasyon uygulamalarında (50 mM biyotin, 16 saat) de daha net bir şekilde görülmüştü. (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. MCF-7 hücreleri ile yapılan biyotininilasyon deneylerinde görülen mitokondri dağılımı benzeri profilinin IF görüntüleri. MCF-7 hücrelerinin uzun süreli biyotininilasyon reaksiyonuna tabi tutulması sonucu bu dağılım gözlemlenmiştir. Biyotininilasyon derecesinin belirlenmesi için streptavidin-TexasRed ile yapılan IF analizleri sonucu mitokondrielerde biyotininle protein miktarında artış görülmüştür.

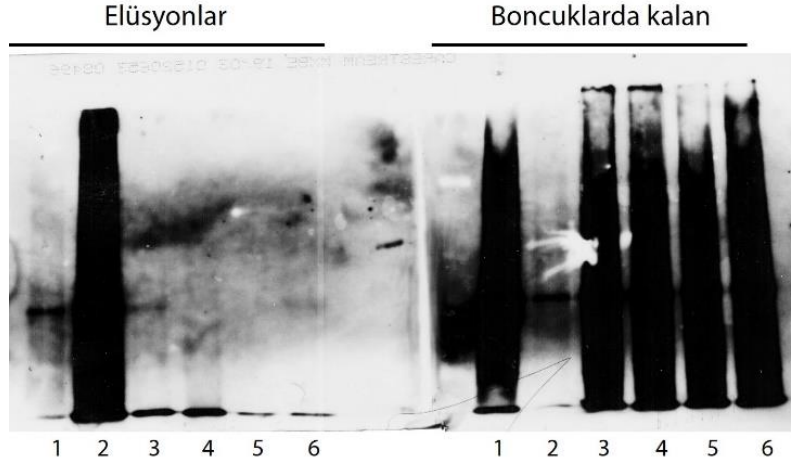
4.24. Biyotin ile Etiketlenen Proteinlerin Zenginleştirilmesi

Biyotininilasyon reaksiyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği IF ve WB analizleri ile doğrulandıktan sonra protein özütlerindeki biyotininle proteinlerin zenginleştirilmesi işlemi için gerekli koşulların optimizasyonu ile ilgili çalışmalar gerçekleştirildi. Zenginleştirme için gerekli optimizasyon çalışmaları meme kanseri hücre hatlarından elde edilen protein özütlerinin tüketilmemesi adına biyotininle edilmiş HeLa protein özütleri ile gerçekleştirildi. Yapılan ilk denemelerde streptavidin kaplı rezin kolonlar kullanıldı. Ancak analizlerde streptavidine bağlanan biyotinin kopartılması ve proteinlerin elüsyonu, gerek üretici firmanın tavsiye ettiği elüsyon tamponu (0,1 M glisin-HCL pH: 2.2) ile gerekse de literatür çalışmalarında belirtilen ve biyotin içeren tamponlar ile (25 mM biyotin, 25 mM Tris-Cl pH: 8.0) mümkün olmadı (Şekil 4.43). Yapılan tüm denemelerde streptavidin-biotin bağının çok güçlü olmasından dolayı biyotininlenmiş proteinler streptavidin rezinlere bağlı kaldı.



Şekil 4.43. Streptavidin resinlere bağlı biyotininle proteinlerin elüsyon denemelerinin WB analizleri. A) Üretici firmanın tavsiye ettiği elüsyon tamponu ile yapılan elüsyon B) Literatürde bulunan ve biyotin içeren elüsyon tamponu (EK-3, Cheah ve Yamada, 2017).) ile yapılan elüsyon (1- Hela Crude extract biyotininilasyon, 2- Flow T., 3-Elüsyon, 4-15 dk. 1. elüsyon, 5-15 dk. 2. elüsyon, 6- 30 dk. 1. elüsyon, 7- 30 dk. 2. elüsyon, 8- 15. dk. yıkama, 9- 30 dk. yıkama 10- 15. dk. rezin, 11- 30 dk. rezin).

Literatür çalışmaları incelendiğinde bu sorunun sıkça görüldüğü ve biyotinin streptavidin proteininden ayrılması için kolon elüsyon tamponuna eklenen serbest biyotin molekülünün yanı sıra yüksek sıcaklık ve SDS uygulamalarının gerekli olduğu belirlendi. Aynı zamanda biyotinlenmiş proteinlerin zenginleştirilmesi için sabit yüzey materyali olan rezin yerine manyetik boncukların tercih edildiği görüldü. Bunun en temel sebebi elüsyon için yüksek sıcaklık değerleri gerektiğinden rezinin bu sıcaklıklarda yapısının bozulmasıdır. Bu nedenlerden dolayı rezin yerine streptavidin kaplı manyetik boncuklar (Pierce, USA) kullanılarak zenginleştirme işlemi gerçekleştirildi. Bu doğrultuda yaptığımız çalışmada biyotinlenmiş proteinlerin manyetik boncuklardan elüsyonu için 30 mM biyotin, 300 mM NaCl, %2'lik SDS ve 25 mM TrisHCl (pH: 7.4) içeren elüsyon tamponu kullanıldı. Yapılan elüsyon işlemleri oda sıcaklığı ile 72 ve 95°C sıcaklıklarında test edildi. Gerçekleştirilen WB analizi sonucu elüsyonun sadece 30 mM biyotin, 300 mM NaCl ve %2 SDS içeren 25 mM TrisHCl (pH: 7,4) tamponunda, 95°C'de 10 dakika bekletildiğinde biyotinin streptavidin kolondan ayrılmasının gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.44).



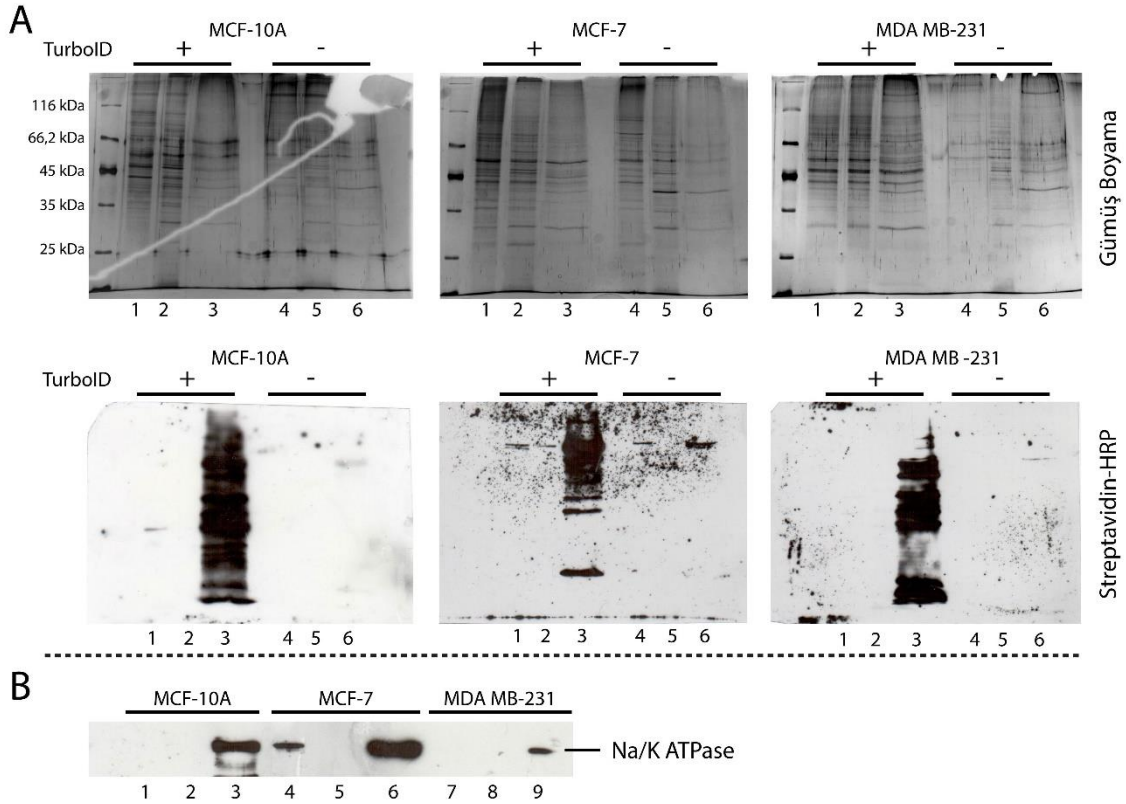
Şekil 4.44. Biotinile proteinlerin streptavin kaplı manyetik boncuklardan SDS, biyotin ve ısı yardımıyla elüsyonunu gösteren western blot analizleri (1- 30 mM biyotin +%2 SDS (oda sıcaklığı), 2-30 mM biyotin + %2 SDS 95°C-10 dk., 3-30 mM biyotin 72°C , 5 dk., 4- 30 mM biyotin 72°C , 15 dk., 5- 30 mM biyotin 95°C, 5 dk., 6- 30 mM biyotin 95°C , 15 dk).

4.25. Biotinile Edilmiş Protein Özütlerinden HYP'lerinin Zenginleştirilmesi ve Doğrulanması

Biyotin ile etiketlenen HeLa proteinlerinin streptavidin kaplı manyetik boncuklara bağlanma ve elüsyonları için gerekli koşulların belirlenmesinden sonra Şekil 4.40'da biyotininilasyonları doğrulanmış örneklerimizin zenginleştirme işlemleri gerçekleştirildi. Zenginleştirme işleminin doğrulanması için ise ilk olarak elde edilen örnekler kullanılarak gümüş boyama ve WB analizleri yapıldı. Yapılan gümüş boyama analizlerinde biyotinile protein özütleri ile yapılan zenginleştirmenin başarılı olduğu ve negatif kontrollere kıyasla biyotinile örneklerin streptavidin kolondan elde edilen elüsyon fraksiyonunda daha yoğun protein olduğu belirlendi. Negatif kontrollerde zayıfta olsa protein bantlarının görülme nedeninin streptavidin proteinlerinin biyotin molekülü dışında farklı proteinleri de bağlayabilmesinden ve manyetik boncukların yüklü protein grupları ile olan etkileşimlerinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Manyetik boncuklara bağlanan ve elüsyonu gerçekleştirilen proteinlerin gerçekten biyotin ile etiketlenmiş proteinler olup olmadıklarının anlaşılması için yapılan WB analizlerinde, biyotin etiketli proteinlerin zenginleştirildiği doğrulandı. Negatif kontrol örneklerinin gümüş boyama analizlerinde gözlemlenen proteinlerin biyotin işaretli olmadığı, manyetik boncukları veya streptavidine bağlanabilen hedef dışı proteinler oldukları belirlendi (Şekil 4.45 A).

Çalışmamız kapsamında temel hedefimiz membran proteinleri olduğundan zenginleştirilen örneklerde membran proteinlerinin varlığının belirlenmesi ve

zenginleştirmenin verimli bir şekilde gerçekleştiğinin gösterilmesi amacıyla membran proteinleri için bir markör özelliği taşıyan Na-K ATPase proteininin varlığını göstermek için WB analizleri yapıldı. Analizler sonucunda her grupta farklı olmakla birlikte membran proteinlerinin zenginleştirildiği fraksiyonlarda Na-K ATPase miktarının yüksek oranda arttığı gösterildi. (Şekil 4.45 B).



Şekil 4.45. Hücre yüzey proteinleri biyotinile edilen sağlıklı ve kanserli meme hücrelerinde streptavin kaplı manyetik boncuklar ile yapılan zenginleştirme sonrasında gerçekleştirilen doğrulama çalışmaları. (A) Zenginleştirilen proteinlere ait gümüş ile boyanmış SDS-PAGE jelleri ve ilgili WB analizleri (1-HYP'leri biyotinile edilen hücrelere ait protein özütleri, 2-Manyetik boncuklara bağlanmayan proteinler, 3- Zenginleştirilmiş proteinler, 4- Biyotinile olmayan hücrelere ait protein özütleri (Negatif Kontrol), 5- Manyetik boncuklara bağlanmayan proteinler (Negatif Kontrol), 6- Zenginleştirilmiş proteinler (Negatif Kontrol)). (B) Hücre yüzey proteinlerinin biyotiniasyon yolu ile zenginleştirildiğinin doğrulanması amaçlı yapılan Na-K ATPase protein miktarını gösteren western blot analiz sonucu (1- HYP'leri biyotinile edilen MCF-10A hücrelere ait protein özütleri, 2- MCF-10A manyetik boncuklara bağlanmayan proteinler, 3- MCF-10A zenginleştirilmiş proteinler, 4- HYP'leri biyotinile edilen MCF-7 hücrelere ait protein özütleri, 5- MCF-7 manyetik boncuklara bağlanmayan proteinler, 6- MCF-7 zenginleştirilmiş proteinler, 7- HYP'leri biyotinile edilen MDA MB 231 hücrelere ait protein özütleri, 8- MDA MB-231 manyetik boncuklara bağlanmayan proteinler, 9- MDA MB-231 zenginleştirilmiş proteinler).

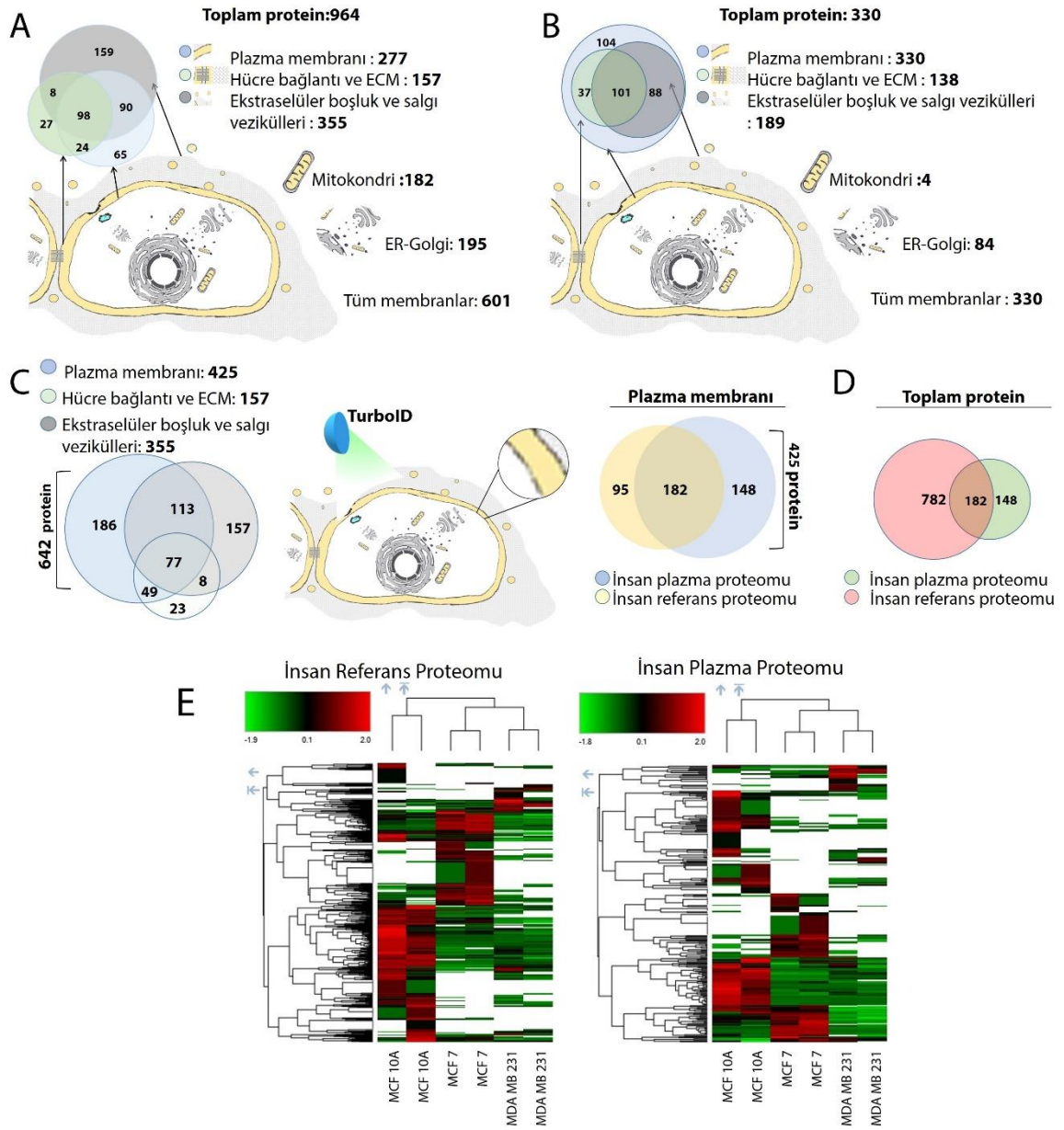
4.26. nLC-MS/MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Zenginleştirilen biyotinile protein örnekleri tripsin ile kesildikten ve peptit konsantrasyonları belirlendikten sonra, protein tanımlama ve kuantifikasyonlarının yapılabilmesi için LC-MS/MS analizlerine tabi tutuldu. Analiz sonucu elde edilen ham veriler Proteome Discoverer 2.5 programı kullanılarak değerlendirildi.

İnsan referans proteomu ile yapılan karşılaştırmalı analizlerden toplam 964 adet protein tanımlandı. Bu proteinlerin 277 tanesi PM proteinlerini, 157 adeti hücresel bağlantı ve ekstraselüler matriks proteinlerini ve 355 tanesi de ekstraselüler boşlukta yer alan proteinleri kapsamaktadır. Üç protein grubunun ortak kümesi oluşturulduğunda ise toplamda 964 proteinin 471 tanesinin biyotinyasyonu hedeflediğimiz hücre yüzeyi ve hücre dışında yer alan proteinler olduğu belirlendi (Şekil 4.46 A).

Sonuçların insan plazma protein bankasında taranması ile toplamda 330 adet protein tanımlandı. Bu proteinlerden 138 tanesinin hücresel bağlantı ve ekstraselüler matriks proteinleri olduğu ve 189 tanesinin de ekstraselüler boşlukta yer aldığı belirlendi (Şekil 4.46 B).

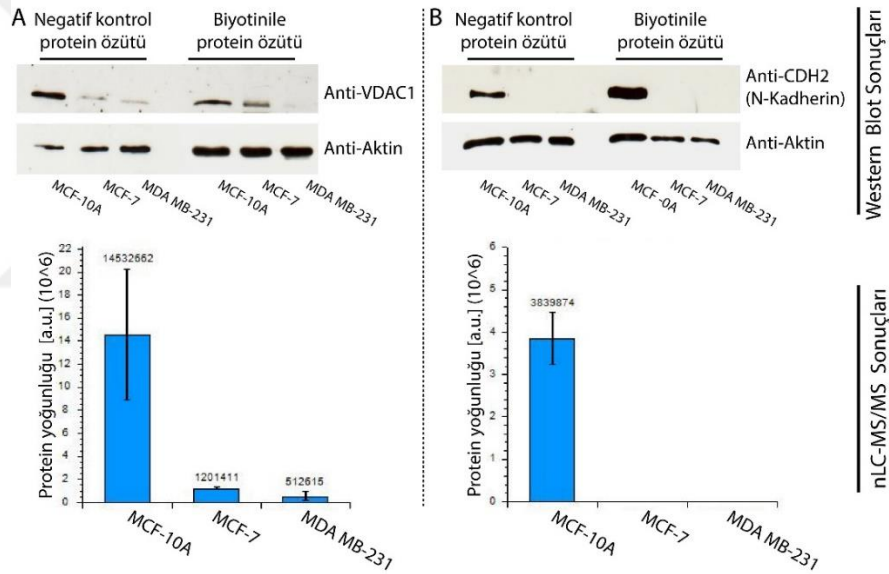
Her iki veri bankasından gelen veriler birleştirildiğinde toplamda 1112 adet proteinin tanımlandığı ve bunların yaklaşık %60'ını kapsayan 642 proteinin hedeflenen bölgede olduğu belirlendi. Belirlenen 642 proteinin 425 adetinin PM proteinleri olduğu görüldü (Şekil 4.46 C, D). Elde edilen karşılaştırmalı analizler sonucunda 194 adet plazma proteinin hücre grupları arasında anlamlı farklılıklar gösterdiği belirlendi. Protein analizlerinde geriye kalan %40'lık kesimde yer alan proteinlerin çoğunun ise Mitokondri, Endoplazmik Retikulum, Golgi ve Nükleus gibi diğer membranlarda bulunduğu görüldü. (Şekil 4.46 A, B). Bununla birlikte protein ekspresyon profillerinin hiyerarşik sınıflandırması ile yapılan ısı haritalarında MCF-10A ile kanser hücre hatları olan MCF-7 ve MDA MB-231 hücre hatlarının birbirlerinden ayrıştıkları görüldü (Şekil 4.46 E).



Şekil 4.46. nLC-MS/MS analizleri sonucunda tanımlanan biyotinitle proteinlerin lokalizasyonlarının analizi (A) İnsan referans veri tabanı kullanılarak yapılan analizler sonucu belirlenen proteinlerin dağılımı. (B) İnsan plazma veri tabanı kullanılarak yapılan analizler sonucu belirlenen proteinlerin dağılımı (C) İnsan referans ve plazma veri tabanları kullanılarak elde edilen hedef bölgelere ait proteinlerin karşılaştırılmalı analizi (D) Analizler sonucu elde edilen toplam protein sayılarının dağılımı (E) İnsan referans ve plazma veri tabanlarının analizleri sonucu tanımlanmış proteinlerin ifade düzeylerindeki farklılıklar kullanılarak oluşturulmuş ısı haritaları.

4.27. nLC-MS/MS Sonuçlarının Doğrulanması

nLC-MS/MS sonuçları ile elde edilen verilerin doğrulanması amacı ile ifade farklılığı gösteren 194 adet proteinden iki tanesi seçildi. Bu proteinler sırası ile VDAC1 (Voltaj-bağımlı anyon-selektif kanal proteini-1) ve N-Kaderin proteinleriydi. Bu proteinleri tanıyan antikolar kullanarak WB analizleri gerçekleştirildi. Elde ettiğimiz sonuçlar WB deneylerinde gözlemlenen protein ifade değişimlerinin nLC-MS/MS analizlerinde gözlemlenen değişimler ile benzer olduğunu gösterdi (Şekil 4.47 A). nLC-MS/MS analizlerinde MCF-10A'ya göre kanser hücrelerinde protein miktarında ciddi azalma görülen VDAC proteininin benzer azalmayı WB analizlerinde de sergilediği görüldü. Benzer şekilde kalsiyum bağımlı adezyon molekülü olan N-Kaderin proteini nLC-MS/MS analizlerinde sadece sağlıklı hücre hattı olan MCF-10A hücre protein özütlerinde tanımlanabilmişti. Yapılan WB çalışmalarında bu durumu doğrulayan sonuçlar elde edildi ve sadece MCF-10A hücre hatlarında protein bantları gözlemlendi (Şekil 4.47 B).



Şekil 4.47. VDAC1 ve N-Kadherin proteinine ait sonuçların WB analizi ile doğrulanması. Negatif kontrol: 4.22’de açıklanan ve HYP’lerinin zenginleştirilmesinde kullanılan ve enzim ile muamele edilmeyen hücre grupları.

4.28. nLC MS/MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve STRING Analizleri

Analiz edilen ve gruplar arasında anlamlı ekspresyon farklılığı gösteren çok fazla protein belirlendiğinden, proteinlerin daha doğru değerlendirilebilmesi için 9 farklı grup oluşturuldu. Oluşturulan gruplara ait proteinler STRING analizine tabi tutularak hangi biyolojik süreçlerde rol oynadıkları ve moleküler fonksiyonlarının neler oldukları değerlendirildi (Şekil 4.48).

Grup	Protein Profili	Biyolojik Proses	Moleküler Fonksiyon
Grup 1 (10 protein)		- Strese yanıt - Antijen işleme ve sunum - Bağışıklık sistemi süreci - Metal iyon homeostazı - Metal iyonuna yanıt - Endoplazmik retikulum stresine yanıt - Protein katlanması	- Protein bağlanması - Beta-2-mikroglobulin bağlanması - Katlanmamış protein bağlanması - Protein disülfid izomerez aktivitesi - Kalsiyum iyonu bağlanması - Araşidonik asit bağlanması
Grup 2 (15 protein)		- Mitokondriyal zar organizasyonu - ERBB2 sinyal yolu - Protein katlanması - Şaperon aracılı otofaji - Protein stabilitesinin düzenlenmesi - Cristae oluşumu - Mitokondriyal taşıma - Katyon taşıma - ATPase aktivitesinin düzenlenmesi	- Hsp90 protein bağlanması - Tau proteini - Refakatçi bağlama - Isı şoku protein bağlanması - Proton taşıyan atp sentaz aktivitesi - TPR alan bağlama - ATPaz aktivator aktivitesi - Kadherin bağlama
Grup 3 (48 protein)		- Lokalizasyon - Salgı - Hücre matrisi adezyonu - Protein translasyonu için tRNA aminoasilasyon - Dönüşen büyüme faktörü beta aktivasyonunun düzenlenmesi - İntegrin aracılı hücre adezyonu - Tamamlayıcı aktivasyon, alternatif yol	- Hücre adezyon molekül bağlanması - kollajen bağlama - İntegrin bağlama - SNARE bağlama - Aminoasil-tRNA ligaz aktivitesi - Hücre-matris yapışmasında yer alan kollajen bağlanması - SNAP reseptör aktivitesi
Grup 4 (34 protein)		- Lokalizasyonun kurulması - Vezikül aracılı taşıma - İndol-3-metanole hücresel yanıt - Epitel hücre-hücre adezyonu - Kavşak organizasyonuna uyar - MAPK kademesi	- Pürin ribonükleosit trifosfat bağlanması - Pürin ribonükleotid bağlanması
Grup 5 (12 protein)		- Vücut sıvı seviyelerinin düzenlenmesi - Trombosit aktivasyonu - Hücre yüzeyi reseptörü sinyal yolu - Trigliserid sekretrasyonunun negatif regülasyonu - Reseptör guanilil siklaz sinyal yolu - cGMP aracılı sinyalleme pozitif düzenlemesi - cGMP biyosentetik süreci - Yara iyileşmesi	- Protein bağlanması
Grup 6 (10 protein)		- Sitozolik transport - Vezikül hedefleme - Golgi ile vezikül transportu - rRNA işlenmesi - Fosfatidilinositol fosforilasyonu - Nitrojen transportu	- SNAP reseptör aktivitesi
Grup 7 (47 protein)		- Vezikül aracılı taşıma - Yara iyileşmesi - Yaralanmaya tepki düzenlemesi - Vücut sıvı seviyelerinin düzenlenmesi - Membran raft organizasyonu - Bakterinin konak hücreye girişinin düzenlenmesi - Membran radye montajı	- Kükürt bileşiği bağlama - Hücre adezyon molekül bağlanması - Kadherin bağlama - Lipoprotein parçacık reseptör bağlanması - Protein bağlama
Grup 8 (7 protein)		- Sitoliz - Tamamlayıcı aktivasyonun düzenlenmesi - Tamamlayıcı aktivasyon, alternatif yol - İntegrinin aracılık ettiği hücre adezyonu - Endodermal hücre farklılaşması - Tamamlayıcı aktivasyon, klasik yol	- İntegrin bağlama - Hücre dışı matris yapısal bileşeni - Peptidaz düzenleyici aktivite - Sinyal reseptör bağlanması
Grup 9 (10 protein)		- Aktin hücre iskeleti organizasyonunun düzenlenmesi - Hücre projeksiyon organizasyonunun pozitif düzenlemesi - Hücre protein lokalizasyonunun pozitif regülasyonu - Rho proteini sinyal iletimi - Postsinaptik yapının modifikasyonunun düzenlenmesi	- Rac GTPaz bağlama - Rho GTPaz bağlama - Ras GTPaz bağlama - Kadherin bağlama - GTPaz inhibitör aktivitesi - Ankirin bağlama - MAPKKK bağlama

Şekil 4.48. Düzeylerinde farklılık tespit edilen proteinlerin gruplandırılması ve STRING analiz sonuçları.

5. TARTIŞMA

Kadınlar arasında en yaygın kanser türü olan meme kanseri, kansere bağlı ölüm nedenleri açısından dünya genelinde ikinci sırada yer almaktadır ve her yıl milyonlarca insanın hayatına mal olmaktadır (GLOBOCAN, 2022). Erken dönemlerde cerrahi müdahaleler ile tedavisi gerçekleştirilebilen meme kanserleri, ilerleyen evrelerde ise kemoterapi, radyoterapi ve hormon temelli yaklaşımlar ve immünoterapi gibi yöntemler kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Erken evrelerde belirlenen meme kanserlerinin tedavi ve sağ kalım oranları neredeyse %100'e yakın iken geç dönemde bu oran oldukça azalmaktadır (Waks ve Winer, 2019). Kanserın erken tanısı genellikle takip durumunda olan bireylerde gerçekleşmektedir. Oysaki bu oran dünya genelinde yeteri kadar yüksek değildir. Özellikle orta ve düşük gelişmişlik düzeyine sahip toplumlarda olanakların kısıtlı oluşu ve bu konudaki bilinçlilik düzeyinin az olması meme kanserinin erken dönemde yakalanmasını güçleştirmekte, hastalara genellikle 2., 3. ve 4. evrelerde teşhis konulabilmektedir. Bu durum tedavi süreçlerini zorlaştırmakta ve sağ kalım oranlarını da ciddi anlamda düşürmektedir.

Günümüzde birçok kanser türünün teşhis ve tedavilerin de karşılaşılan en büyük sorunlardan birisi hastalığın erken tanısı ve hedeflenmesi için kullanılabilecek özgün biyobelirteçlerin ve moleküllerin bulunmamasıdır (Karaosmanoglu Yoneten ve ark, 2022). Bu durum kanser teşhisinin erken dönemde yapılabilmesi için ciddi sorun oluşturmakta, sürecin doğru bir şekilde takip edilememesine neden olmakta, kanser alt tiplerinin tam olarak ayrılmasını ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesini zorlaştırmakta ve kanserli hücrelerin hedeflenebilmesinin önüne geçmektedir. Biyobelirteçlerin belirlenmesi için kanser hücreleri üzerinde yapılan araştırmalar yıllardır artarak devam etmektedir. Ancak tüm teknolojik ilerlemelere ve araştırmalara rağmen verimli şekilde kullanılabilen biyobelirteç sayısı oldukça kısıtlıdır. Ayrıca bu biyobelirteçlerin özgünlükleri konusunda da ciddi sıkıntılar yaşanmaktadır (Karmakar ve ark., 2022). Benzer durum meme kanseri içinde geçerlidir. Özgün biyobelirteçlerin olmaması, meme kanseri alt tiplerine neden olan mekanizmalarının tam olarak anlaşılamamasına, karakteristik özelliklerin net bir şekilde ortaya konulamamasına ve tedavi stratejilerinin doğru bir şekilde geliştirilip uygulanamamasına yol açmaktadır.

Meme kanserleri için tam anlamıyla bir sınıflandırma sistemi mevcut değildir. Histopatolojik olarak bakıldığında meme kanserleri invaziv duktal ve invaziv lobular

karsinoma olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (Li ve ark., 2020). Ancak bu sınıflandırma kaynaklanma bölgeleri aynı olsa bile moleküler özellikleri oldukça farklı olabilen kanser türleri olduğundan dolayı yetersizdir. Dolayısıyla bu kanserlerin gelişim süreçleri, tedavi yanıtları ve hayat kalitesine olan etki düzeyleri farklı olmaktadır. Meme kanserinin moleküler düzeyde sınıflandırması daha güvenilir olmakla birlikte burada da kısıtlamalar mevcuttur (Tsang ve Tse, 2019). Genel olarak östrojen ve progesteron hormon reseptörleri temel alınarak yapılan sınıflandırmada; luminal A, luminal B, Luminal B-like HER2+, TNBC (triple-negative breast cancer) ve HER2-enriched olmak üzere 5 sınıf oluşturulmuştur. Ancak bu sınıflandırmada yeterli görülmediğinden bu gruplara ait alt sınıflandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. Tüm bu karmaşa, hem kanser hücrelerinin farklı genetik ve moleküler değişimleri taşımasından hem de sınıflandırma da kullanılan moleküllerin özgünlüğünün olmamasından kaynaklanmaktadır. Benzer durum tedavi süreçlerinde de karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde meme kanseri tedavilerinde genellikle ER ve PR, HER2, PD-L-1 ve fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa (PIK3CA) gibi reseptör proteinleri hedeflenmektedir (Padmanabhan ve ark., 2020). Ancak bu moleküller sadece meme kanserine özgün değildir. Dolayısıyla yapılan tedaviler sağlıklı dokuları da ciddi bir biçimde olumsuz etkileyebilmekte ve pek çok farklı yan etkiler oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu proteinleri hedef alan ilaçlar (tucatinib, sacituzumab ve pembrolizumab gibi) oldukça pahalıdır. Örneğin tucatanib, meme kanserinde kullanılan ilaçlardan biridir ve aylık tedavi masrafı yaklaşık 18.000 \$ düzeyindedir. Ayrıca bu ilaçlar kombine olarak kullanıldığından tedavi için oluşan maliyet katlanarak artmaktadır. Tüm durumlar birlikte değerlendirildiğinde özgün biyobelirteçlerin belirlenmesi ve bunların etki mekanizmalarının aydınlatılması daha özgün, kolay ulaşılabilir ve verimli teşhis ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve çok yüksek olan mali yükün azaltılması için oldukça önemlidir.

Biyobelirteç çalışmalarında daha önce de bahsettiğimiz gibi en çok hedeflenen protein gruplarının başında HYP'ler gelmektedir. HYP'ler biyobelirteç çalışmaları için her ne kadar değerli bir kaynak oluştursada, bu değerli kaynağa erişmek kolay değildir. Transmembran bölgelerinin hidrofobik olması, lipid içeriği ve miktarsal olarak hücrede az bulunmaları bu proteinlerin etkili bir şekilde zenginleştirilmelerini, tanımlanmalarını ve analiz edilmelerini zorlaştırmaktadır. Bu sorunların aşılması için hem akademik dünyada hem de özel firmalarca ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Yine de bu sorunlar tam anlamıyla çözülememiştir. Pratikte genellikle kullanılan; densite gradyan santrifügasyonu, kromatografi temelli yaklaşımlar,

kimyasal biyotininilasyon, deterjan uygulamaları gibi yöntemler kısmen başarılı olsa da, membran proteinlerinin izolasyonunda ve karşılaştırılmalı analizlerde ciddi eksiklikler barındıran yöntemlerdir. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında biyobelirteç araştırması yapılırken karşılaştırmalı analizlere uygun, hücre metabolizmasına etkisi minimal düzeyde olan ve membran proteinlerinin yüksek oranda zenginleştirilebileceği yeni bir yaklaşım geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geline nokta itibarı ile istenilen hedeflere ulaşılmış bulunmaktadır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sırasında HYP'lerin zenginleştirilmesi ve tanımlanması için kültür ortamına saf TurboID enziminin eklenmesi ve bu yolla HYP'lerin biyotin ile etiketlenmesi ve sonrasında streptavidin boncuklar aracılığı ile zenginleştirilmesi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Ayrıca biyotinlenen proteinlerin zenginleştirme sürecinde streptavidin ile hızlı ve güçlü bağ kurabilmesi zenginleştirme deneyleri sırasında hem safsızlıkların uzaklaştırılması hem de güçlü çözücülerin kullanılmasını mümkün kıldı. Aynı zamanda streptavin ile biyotin arasındaki bağın iyonik bir bağ olmamasından dolayı herhangi bir enzimatik ya da kimyasal sürece ve ek aşamalara da ihtiyaç duyulmadı. Bu ve benzeri aşamalardan kaynaklanabilecek safsızlıkların ve protein kayıplarının önüne geçilmesi bu tez çalışmasında geliştirilen yaklaşımın literatürdeki yaklaşımlara göre ciddi avantajları arasında sayılabilir.

Literatürde yapılan çalışmalarda kimyasal biyotininilasyonun tercih edilme sebebi hızlı ve basit oluşundan kaynaklanmaktadır. Ancak kimyasal olarak modifiye edilmiş biyotin, hücre içerisine girebildiğinden ve reaksiyonun durdurulması için belirli bir zaman gerektiğinden dolayı istenmeyen bölgelerde de proteinlerin biyotini ile edilmesi söz konusudur ve bu durum kimyasal biyotininilasyonun en büyük limitasyonlarından biridir. Bu tez çalışması sırasında özgün olarak membran proteinleri hedeflendiğinden dolayı kimyasal biyotininilasyon yerine daha yavaş ancak kontrol edilebilir ve kimyasal biyotininilasyona göre hücre metabolizması üzerindeki negatif etkinin çok daha az olduğu enzimatik biyotininilasyon metodu kullanıldı.

Çalışma tasarlanırken TurboID enzimi ile HYP'lerin biyotininilasyonunun yapılabilmesi için iki farklı yaklaşımın kullanılması kararlaştırıldı. İlk yaklaşımda Tess C. Branon ve Alice Ting'in 2018 yılındaki çalışmalarında yaptıkları gibi enzimin hücre içerisinde üretilerek hücre membranına yerleştirilmesi ve böylece yüzey proteinlerinin biyotin ile işaretlenmesi hedeflendi. Bu amaçla Tess C. Branon ve Alice Ting tarafından bizlere hediye olarak gönderilen ve TurboID enzimi pDisplay-TM-TurboID vektörü kullanıldı. Yapılan transfeksiyon işlemi sonrasında tek hücre koloni seçimi ve stabil hücre hatlarının üretim

alışmaları gerçekleştirildi. Ancak bu çalışmalarda ciddi sıkıntılar yaşandı. Koloni seçiminin başlangıcında poliklonal koloniler ile yapılan analizlerde hücre dış yüzeyinde TurboID retimi IF ve WB analizleri ile doğrulanmasına rağmen monoklonal stabil hücre hatları oluşturulamadı. Yapılan çalışmalarda plazmit transfeksiyonun hemen sonrasında TurboID'nin (ilk 5 gün) verimli bir şekilde üretilip hücre membranına yerleştiği ancak sonraki zamanlarda hücre içerisine dağıldığı, hücre büyümesini etkilediği ve endoplazmik retikulum üzerinde stres oluşturduğu görüldü. Bu durumun aktif enzimin ortamdaki minimal düzeydeki biyotini kullanarak endoplazmik retikulum, Golgi ve hücre membranı gibi bölgelerde protein biyotiniilasyonuna yol açtığı ve bu modifikasyonunda proteinlerin aktivite ve/veya yapılarında değişimlere neden olmasından kaynaklandığı düşünüldü. Hücre içi yolaların kullanıldığı bu yaklaşımın hücre metabolizmasını etkilediği görüldüğünden bu yöntemin karşılaştırma amaçlı kullanılmasının sonuçları hatalı yorumlamamıza yol açacağı kanısına varıldı. Ayrıca transfeksiyon sonrası kurulan biyotiniilasyon reaksiyonu sırasında endoplazmik retikulum ve Golgi gibi hücre içi kompartmanlarda membrana yollanmak üzere sentezlenen TurboID'nin halihazırda ortamda bulunmasından ötürü çok hızlı bir şekilde çevresindeki proteinleri de biyotiniile edeceği ve dolayısıyla zenginleştirilen membran proteomu için safsızlık oluşturabileceği düşünüldü. Bu nedenle çalışmamızda karşılaştırma yapma amaçlı gerçekleştirilmesi planlanan hücre içi yolakların kullanılarak membran proteinlerinin biyotiniile edilmesi yaklaşımının kullanılmasından vazgeçildi.

HYP'lerin zenginleştirmesinde kullanılan ikinci yaklaşımda ise TurboID enzimi bakterilerde üretilip saflaştırıldı ve enzim aktivitesi ölçüldükten sonra hücre kültürüne eklenerek biyotiniilasyon reaksiyonları gerçekleştirdi. Enzimin bakteri hücrelerinde üretilmesinde faklı sorunlar ile karşılaşıldı. Karşılaşılan ilk sorun bakteri hücrelerinde üretilen TurboID enziminin bakteriler için toksik etki oluşturmasıydı. Üretilen enzimin aktif olması ve ortamda bazal seviyede de olsa biyotin bulunmasından dolayı enzim, bakteri proteinlerini biyotiniile etmekte ve bunun sonucunda metobolizması etkilenen bakterilerin üreme hızları da yavaşlamaktaydı. Karşılaşılan bu sorunu çözmek için biyotin içermeyen modifiye besiyeri kullanıldı. Yapılan analizlerde modifiye besiyerinde biyotiniilasyon düzeyinin ciddi anlamda azaldığı görüldü. Ancak modifiye besiyeri ortamında üretim kapasitesinin de olumsuz anlamda etkilendiği belirlendi. Aynı zamanda modifiye besiyerinde bakteri pasaj sayısı ilerledikçe üretilen TurboID enzim miktarında azalmalar olduğu görüldü. Bakteriyel retimde karşılaşılan ikinci zorluk ise TurboID enziminin BirA proteinine kıyasla çökme eğilimi göstermesiydi. Yapılan analizler üretilen enzimlerin büyük

bir kısmının üretim esnasında hücre içerisinde çöktüğünü gösterdi. Bu durumun aşılması için farklı sıcaklıklarda üretim, IPTG konsantrasyonunun azaltılması ve daha sıkı promotör aktivitesi gösteren *E. coli* suşlarının kullanımı gibi farklı alternatifler denendi. Optimizasyon çalışmaları sonrası TurboID üretimi için en uygun sıcaklığın 25-30°C arasında olduğu, IPTG konsantrasyonunun ise 0,1 mM olması gerektiği görüldü. Ancak yapılan tüm optimizasyon çalışmalarına rağmen üretilen enzimin önemli bir kısmı üretim esnasında çökmeye devam etti. Elde edilen proteinler kullanılarak yapılan saflaştırma işlemlerinde ise beklenmedik bir şekilde BirA enzimi Ni-NTA kolonlara bağlanırken, TurboID enzimi kolona bağlanmadı. Hem çözünürlük sorununun hem de elüsyon problemlerinin aşılması için TurboID gen bölgesi pMAL C4X vektörü içerisine klonlarak, enzim MBP ile birlikte üretildi. Yapılan üretimde TurboID enziminin çözünürlüğü His etiketli TurboID'ye kıyasla artış gösterdi. Ancak MBP etiketli TurboID enziminin saflaştırılması esnasında elüsyon örneklerinde kirlilik sorunları yaşandı ve TurboID enzimi istenilen düzeyde saf olarak elde edilemedi. Bu sorunu aşabilmek için TurboID enziminin daha saf olarak elde edilebildiği His etiketli formda üretilmesine karar verildi ve saflaştırılma aşamalarında karşılaşılan problemlerin çözümüne yoğunlaşıldı. Öncül deneylerde kazandığımız tecrübeler Ni-NTA kolona bağlanmama sorunlarının genellikle His etiketinin proteinin 3 boyutlu yapısı içerisindeki konumundan kaynaklandığına işaret etmekteydi. His etiketli BirA enziminde protein N-terminal ucunda bulunurken, TurboID enziminde C-terminal bölgede konumlanmaktadır. Ancak yapılan 3 boyutlu yapı analizlerinde iki farklı uçta konumlanan His etiketlerinin proteinlerin yüzeye açık noktalarında konumlandığını ve sterik olarak bağlanmayı etkileyecek herhangi bir engelin olmadığı görüldü. Bağlanma sorununun çözümüne yönelik yapılan çalışmalarda bu durumun ilginç bir şekilde ortamdaki deterjan içeriğinden kaynaklandığı belirlendi. TPER içerisindeki deterjanının belirli bir seviyenin altına düşmesi ile C-terminaldeki His etiketinin proteinin yüzeyine yaklaştığı ve bu etkinin nikel atomlarına bağlanmayı engellediği düşünüldü. Yapılan çalışmada TPER/Bağlanma tamponu oranının ¼ 'ü geçmemesi gerektiği, aksi halde TurboID'de bulunan His etiketinin nikel atomları ile etkileşmediği belirlendi.

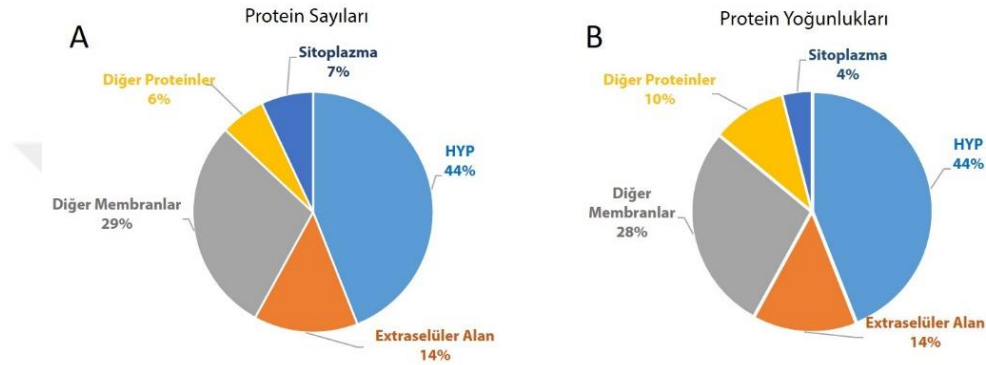
Üretimi ve saflaştırılması yapılan MBP ve His etiketli TurboID ve etiketsiz TurboID enzimleri ile yapılan öncül analizlerde, enzimin yüksek derecede biyotinyasyon aktivitesi sergilediği belirlenmişti. Ancak zaman içerisinde enzim aktivitesinde azalmalar meydana geldiği gözlemlendi. Enzim aktivitesinin korunması için öncelikle en uygun lizis tamponu belirlenmeye çalışıldı. Hem aktivitenin korunması hem de protein eldesi açısından yapılan

değerlendirmede en verimli tamponun TPER olduğu belirlendi. Protein özütü ve saflaştırma işlemlerinde enzim aktivitesinin korunması için ortama gliserol eklenmesi yapıldı ve ortama %10 gliserol varlığında enzimin aktivitesini uzun süre koruyabildiği gözlemlendi. Ancak gliserolün hücreler üzerinde toksik etkisi olduğu için enzim, kültür ortamına eklenmeden önce gliserol diyaliz yapılarak ortamdan uzaklaştırıldı. Gliserolün uzaklaştırılması için yapılan diyaliz işleminin enzim aktivitesinde herhangi bir azalmaya neden olmadığı yapılan aktivasyon analizi ile belirlendi.

Gliserolün uzaklaştırılmasının ardından TurboID enzimi kullanılarak hücre kültürlerinde biyotinilasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında TurboID enziminin hücre ortamına eklenmesi ile HYP'lerinin biyotinilasyonun gerçekleştiği hem IF hem de WB analizleri ile doğrulandı. Biyotinile proteinleri diğer proteinlerden ayırmak için yapılacak zenginleştirme işlemleri öncesi gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında biyotin-streptavidin etkileşiminin çok güçlü olduğu ve bu etkileşimi kırabilmek için yüksek sıcaklık ve SDS gerektiği belirlendi. Yüksek sıcaklıkların kullanılabilmesi için rezin tabanlı kolon sistemleri sorun oluşturacağından, zenginleştirme işlemi için streptavidin kaplı manyetik boncuklar kullanıldı. Optimizasyon sonrasında biyotinile ve kontrol gruplarına ait protein özütlerinin zenginleştirme işlemi yapıldı. Zenginleştirme sonrası yapılan analizlerde biyotinile proteinlerin verimli bir şekilde zenginleştirildiği gözlemlendi. Zenginleştirilen proteinlerin içerisinde membran proteinlerinin varlığının gösterilebilmesi için Anti-Na/K ATPase antikoruna kullanılarak yapılan WB analizinde membran proteinlerinin varlığı ve hücre yüzey proteinlerinin zenginleştirildiği doğrulandı. Doğrulama işlemlerinin ardından hem negatif hem de biyotinile edilen gruplara ait zenginleştirilmiş protein örnekleri tripsin ile proteolitik kesime tabi tutuldu ve elde edilen peptit örnekleri kullanılarak nLC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi.

nLC-MS/MS analizleri sonucunda elde edilen ham veriler iki farklı veri bankasında ayrı ayrı tarandı. Toplam 1112 protein karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Bu proteinlerin yaklaşık %60'ının hedeflenen bölgedeki membran ve hücre dışı proteinlerden oluştuğu belirlendi. Membran proteinleri açısından sonuçlar değerlendirildiğinde analiz edilen proteinlerin 425 tanesinin hücre yüzey proteinleri olduğu görüldü. Geriye kalan 217 adet hücre dışı protein incelendiğinde ise bunların ekstraselüler matriks (ECM), hücre-hücre bağlantı proteinleri ve salgı proteinleri olduğu belirlendi. TurboID proteini ECM ve hücreler arasındaki boşluklara girebildiğinden bu sonuç doğal olarak karşılandı. Bu proteinlerin dışında kalan 470 adet protein incelendiğinde ise bunların büyük bir kısmının mitokondri,

endoplazmik retikulum, Golgi ve diğer hücre içi membran kompartmanlarına ait proteinler olduğu belirlendi. Membranla çevrili organellerin dışında sadece sitoplazmada bulunabilen proteinler incelendiğinde toplamda 79 adet proteinin bu gruba dahil olduğu görüldü. Bu proteinler, analiz edilen tüm proteinlerin sayıca yaklaşık %7'sini oluştururken, miktarsal olarak %4'lük kısmını kapsamaktadır (Şekil 5.1). Sayısal anlamda oranının daha çok olmasının nedeni membran proteinlerinin sitoplazmik proteinlere kıyasla görece daha büyük olmasıdır.



Şekil 5.1. nLC-MS/MS analizleri sonucu elde edilen proteinlerin sayısal ve yoğunluk dağılımları.

Analizlerdeki biyotinile gruplarda fazlaca görülen, mitokondri, endoplazmik retikulum, Golgi ve nükleus gibi organellere ait membran proteinlerinin sayısal olarak fazlalığını açıklamak için farklı olasılıklar ön plana çıkmaktadır. Bilindiği kadarı ile hücresel biyotinyasyonlar genellikle mitokondri ve az da olsa sitozolde gerçekleşmektedir (Kohanski, 2016). Endoplazmik retikulum ve Golgi içerisinde biyotinyasyonu gerçekleşme olasılığı çok düşük olduğundan ve negatif kontrollerde çok az protein elde edildiğinden akla gelen ilk olasılık bu proteinlerin bir şekilde hücre dışına ya da PM'e geçiş durumlarının olmasıdır. Günümüzde protein lokasyonları her ne kadar belirlenmiş olsa da bunu keskin sınırlar ile ayırmak şu anki bilgilerimizle oldukça zordur ve her geçen gün proteinlerin yeni lokasyonlarda ortaya çıktığı görülmektedir.

Literatür çalışmaları, PM ile endoplazmik retikulum, çekirdek ve mitokondrinin dinamik bir etkileşim içinde olduğunu göstermiştir. PM ve endoplazmik retikulum arasında doğrudan temas noktaları olduğu ve proteinler gibi moleküllerin karşılıklı geçiş yaptığı mekik mekanizmalarının varlığı bilinmektedir (Li ve ark., 2021). Benzer bir durum mitokondride gözlenmektedir. Mitokondrinin, PM ile PM-mitokondri köprüleri, desmozomlar veya diğer

adezyon temasları ve doğrudan zar ilişkileri gibi farklı oluşumlarla etkileşime girdiği literatür çalışmalarında gösterilmiştir. Bu etkileşimler, mitokondriyal Somatostatin benzeri protein-2 (SLP-2) ve Cx43 gibi boşluk bağlantı proteinlerinin mitokondri ve PM arasında yer değiştirmesini sağlamaktadır (Balderas, 2021). PM ve çekirdek arasında da dinamik bir mekik mekanizması vardır. Spesifik endositoz veya kimyasal olarak değiştirilmiş mekanizmalar yoluyla CD38, Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve T-kadherin gibi PM proteinleri çekirdeğe göç edebilirken, Nükleolin (NCL) ve Histon deasetilaz 3 (HDAC3) gibi nükleer proteinler de PM'ye geçiş yapabilmektedir. (Zheng ve Jiang, 2022; Liu ve ark., 2018). Bu, dinamik protein hareketleri elde ettiğimiz sonuçlardaki PM proteinlerinin dışındaki yüksek miktardaki zar proteinlerinin varlığını açıklayabilecek durumlardan biridir. Başka bir olasılık, TurboID'nin zarla çevrili organellere endozomlar veya diğer yollarla girmesidir. Endozomların endoplazmik retikulum ve Golgi ile temas ettiği ve bu temas ile protein ve lipid geçişlerinin olduğu bilinmektedir (Raiborg ve ark., 2015). Elde ettiğimiz sonuçlarda yalnızca sitoplazmada bulunan proteinlerin yoğunluğunun %4 gibi düşük bir düzeyde olması, sitoplazmik proteinlerin diğer proteinlere kıyasla TurboID ile minimum temas halinde olduğunu ortaya koymaktadır. Membranla çevrili organellerden bu denli yüksek sayıda biyotinile protein gelmesi enzimin sitoplazmaya temas etmeden endomembran sistemde hareket edebileceğinin olasılığını düşündürmektedir.

Negatif kontrollerin streptavidin kaplı boncuklar ile zenginleştirilmesi sonucu elde edilen elüsyon örnekleri ile yapılan gümüş boyama analizlerinde proteinlerin varlığı gözlenmişti. Bu elüsyonlar ile yapılan nLC-MS/MS analizlerinde toplamda 71 adet protein belirlendi. Negatif kontrollerde elde edilen proteinler incelendiğinde bu proteinlerin ağırlıklı olarak keratin, ısı şoku proteinleri ve mitokondriyel proteinler oldukları anlaşıldı. Ancak bilindiği kadarıyla hücrelerde sınırlı sayıda protein doğal süreçlerde biyotinile edilmektedir. Sayısal anlamda bu kadar fazla proteinin ortamda olması bizim için beklenmedik bir durum olmakla birlikte, yapılan literatür incelemesinde bu durumun normal olduğu ve farklı çalışmalarda da benzer sonuçların gözlemlendiği belirlendi (Cheah ve Yamada, 2017). Streptavidin glikolize ve pozitif yüklü yapısından dolayı biyotin içermeyen farklı proteinleri bağladığı bilinmektedir (Luong ve Vashist., 2020). Benzer şekilde manyetik boncuklar, farklı protein moleküllerine özgün olmayan bağlanma eğilimi göstermektedir (Safarik ve Safarikova., 2004). Ancak ilginç bir durum mitokondrilerde yaşanmaktadır. Mitokondriyel proteinlerin hem zenginleştirilen örneklerde hem de negatif kontrollerde fazla sayıda olması ve negatif kontrollerde yapılan IF analizlerinde az da olsa mitokondriyel biyotinilasyon düzeylerinde

artış gözlenmesinin sebebi tam olarak anlaşılamamıştır. Bu durumun sebebi hücre içindeki enzimlerinin yüksek biyotin ve ATP konsantrasyonlarında özgün olmayan biyotinitilasyon gerçekleştirmesinden ve/veya biyotinile mitokondriyel protein sahip olduğu protein-protein etkileşimlerinden kaynaklanabileceğini düşünülmüştür. Ancak bu durum araştırılması gereken bir konudur.

Yaptığımız çalışmada 194 proteinin MCF-10A, MCF-7 ve MDA MB-231 hücreleri arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Kullandığımız yaklaşımla elde edilen nLC-MS/MS sonuçlarının doğrulanması ve değerlendirilmesi, yaptığımız biyotinitilasyon uygulamasının doğal durumunu değiştirip değiştirmediğinin belirlenmesi için anlamlı farklılık gösteren 194 adet proteinden 2 tanesi seçilerek (VDAC ve N-Kaderin) WB analizleri gerçekleştirildi. Yapılan WB analizleri ile nLC-MS/MS sonuçlarının birbirini desteklediği görüldü. Aynı zamanda kontrol grupları ile biyotinile gruplar arasında benzer WB sonuçlarının elde edilmesi uyguladığımız yaklaşımın doğal süreci etkilemediğini gösterdi. Bu durum özellikle hücrelerin doğal metabolizmasının etkilenmeden doğru bir şekilde analiz edilmesi için oldukça önemliydi.

Analizler sonucu elde edilen 1112 protein sayısı az gibi görünse de bu çalışmada daha fazla hücre kullanılarak protein miktarının artırılması, örneklerin fraksiyonlanması, kesim enzimlerinin kombine kullanımı ve daha yüksek duyarlılıkta kütle spektrometrelerini kullanımı gibi uygulamalar ile bu sayının çok daha yüksek düzeylere çekilmesi mümkündür. Ancak bu tez çalışması kapsamında süre ve bütçe kısıtlamalarından ötürü elde edilen 1112 protein üzerinden analizlere devam edildi. Bununla birlikte biyotinitilasyon için kullanılan TurboID enzim konsantrasyonunun artırılması ve/veya enzimin farklı yöntemler kullanılarak hücre yüzeyinde yoğunlaştırılması ile de biyotinitilasyon verimliliğinin artırılabilirliği düşünülmektedir. Verimliliğin artırılması, reaksiyon zamanının azaltılmasına imkân verebilir. Böylece hücre içerisinde istenmeyen biyotinitilasyon reaksiyonlarının önüne geçilebilir ve membran proteinlerinin daha saf olarak zenginleştirilmesi ve analizi gerçekleştirilebilir. Yine de gerçekleştirdiğimiz çalışma ile PM, hücre adezyon ve ECM proteinlerinin doğal durumunun korunarak yaklaşık %60 oranında zenginleştirilmenin gerçekleşmiş olması gelecek çalışmalar için iyi bir referans noktası oluşturmaktadır. Tez çalışması kapsamında geliştirilmiş özgün olan bu yaklaşımın geliştirilerek daha verimli hale getirilmesi mümkündür.

Gruplar arası anlamlı farklılık gösteren 194 adet membran proteinini analiz edebilmek için proteinler ekspresyon profillerine göre dokuz farklı gruba ayrıldı. Sonuçların daha iyi

değerlendirilmesi için grupların kendi içinde STRING analizleri yapıldı ve bu proteinler ile ilgili biyolojik süreçler ve moleküler fonksiyonlar belirlendi. Gruplarda fazla sayıda protein olduğundan her grup içerisinde bazı proteinler seçilerek bu proteinlerin kanser/meme kanseri açısından önemine dair bilgiler tartışıldı.

Grup 1: Tüm gruplarda bulunan ve sağlıklı hücrelerden agresif kanser hücrelerine doğru protein seviyesi artan proteinler.

Bu grupta protein katlanması, metal iyon homeostazı, endoplazmik retikulum stresi, gelişimin düzenlenmesi ve bağışıklık sistemi regülasyonu ile ilişkili proteinlerin yer aldığı belirlendi (Şekil 4.48; Bakınız. EK-5, Ek-Şekil 1). Kanser hücrelerinde artan transkripsiyonel ve metabolik aktiviteler, endoplazmik retikulum stresine ve katlanmamış protein yanıtına neden olur (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021). Bu durum kanser hücrelerinde endoplazmik retikulum stresine ve katlanmamış protein yanıt yollarına ait proteinlerin ekspresyonunun neden arttığını açıklamaktadır. Ayrıca kanser hücrelerinde bulunan demir ve çinko gibi metal iyonları, hücre migrasyonu, anjiyogenez, hücre yüzey moleküllerinin modüle edilmesi ve bağışıklık sistemi hücrelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Örneğin, metastatik meme kanseri hücreleri, ifade ettikleri çinko akış taşıyıcı (ZnTs) proteinleri sayesinde ortamdaki çinko iyonlarına karşı direnç kazanırlar ve bu özelliklerini kullanarak bulunduğu ortamdaki çinko seviyesini artırır. Böylece çinko direnci olmayan makrofajlar gibi bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçarak büyümeye ve hayatta kalmaya devam edebilirler. Tümör gelişimi, hayatta kalma süresinin artması, neoplastik hücrelerin proliferasyonu, hücre dışı matrisin yeniden modellenmesi ve metastatik kaskatın teşvik edilmesi için demir gereklidir (Serra ve ark., 2020; Stelling ve ark., 2019). Bu nedenle kanser hücrelerinde metal iyon homeostazı ile ilgili proteinlerdeki değişimin gözlenmesi doğaldır.

Kanser hücrelerinde seviyesi artış gösteren proteinlerden biri ASAP2'dir. ASAP2, hücre göçünü ve çoğalmasını destekleyen bir GTPaz aktivatör proteindir. Atsushi Fujii ve arkadaşları, pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) hücreleri üzerinde yaptıkları analizde ASAP2'yi potansiyel bir hedef molekül olarak tanımlamıştır (Fujii ve ark., 2021). Benzer şekilde, Bing Chen ve arkadaşları halkasal ASAP2-RNA (circRNA-ASAP2) seviyesinin mide kanserlerinde yükseldiğini ve hücre canlılığını, hücre göçünü ve istilasını, invazyonunu arttırdığını belirtmiştir (Chen ve ark., 2020). Bu tez kapsamında yapılan analizlerde benzer şekilde ASAP2'nin meme kanseri ile ilişkili olduğu ve metastatik karakterin artışına bağlı olarak ASAP2 protein düzeyinin de yükseldiği gözlemlendi.

Yapılan farklı korelasyon çalışmalarında, Carabin (TBC1D10C) proteini kanser prognozu için yeni bir biyobelirteç adayı olarak duyurulmuştur (Qiao ve ark., 2021). Bu tez çalışması kapsamında TBC1D10C'nin protein seviyesi ilk kez meme kanseri hücre hattında analiz edildi. Ayrıca son yıllarda ortaya çıkan ve halen araştırma aşamasında olan kanser biyobelirteç özelliklerine sahip proteinlerden olan NAMPT, SLC25A12, CNTN4, 4HB, DSG1, SLC2A1 ve TRFC proteinlerinin artan ekspresyon düzeyleri yine bu tez çalışması kapsamında meme hücre hatlarında grup 1 içerisinde analiz edildi.

Grup 2: Tüm gruplarda bulunan ve sağlıklı hücrelerden agresif kanser hücrelerine doğru protein seviyesi azalan proteinler.

Grup 2 kapsamında değerlendirilen proteinler incelendiğinde bu proteinlerin ATP sentezi, mitokondriyal organizasyon ve hücre yerleşimi ile ilgili proteinler oldukları belirlendi (Şekil 4.48; Bakınız. EK-5, Ek-Şekil 2). Elde edilen bu sonuçlar şaşırtıcı değildi. Çünkü kanser hücrelerinin oksijen solunum mekanizmalarını yavaşlattığı ve diğer enerji yollarını harekete geçirdiği bilinen bir durumdur. Aynı zamanda kanser hücrelerinde hücre-hücre bağlantıları ve ECM bileşimi, invazyon ve metastaz için yeniden düzenlenmelidir. Yapılan analizlerde hücre adezyon proteinlerinde azalma olduğu görüldü. Kanser hücrelerinden negatif etkilenen başka bir yol, anjiyostatin yolağıdır. Anjiyostatin, anjiyogenezin negatif düzenleyicisidir ve kanserli dokularda anjiyogenez uyardığı ve bunun kanser gelişimi için oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Wajih ve Sane, 2003; Madu ve ark., 2020). Benzer şekilde, anti-kanser özelliklere sahip olan heparin bağlanma yolu da metastatik meme hücre hatlarında azalmıştır (Ma ve ark., 2020).

Aminoasit taşıyıcı SLC7 ailesinden olan SLC3A2, hücre içi kalsiyum seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynar ve L-tipi amino asitleri taşır. Literatürde SLC3A2 proteininin meme kanserinin ER+, HER2+ ve TN alt tiplerinde indüklendiği gösterilmiştir (Ansari ev ark., 2018). Ancak bu çalışmada kontrol hücreleri kullanılmamış ve kanser hücreleri kendi içerisinde karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmanın aksine SLC3A2'nin tümöröenez ile azaldığını göstermiştir. Bu tez çalışmasında gösterildiği gibi, SLC3A2'nin ekspresyon seviyesinin MDA MD-231 hücrelerinde MCF-7'den daha düşük olduğunu son dönemde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Saito ve ark.,2022). Bu durum elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir. Ayrıca tez kapsamında kontrol hücreleri ile karşılaştırmalar

yapıldığı da dikkate alınırsa bu çalışma SLC3A2'nin meme kanserinde değerlendirilmesi açısından bir ilktir.

Glutamat reseptör etkileşimli protein 2 (GRIP2), in silico analizler dışında meme kanseri ile ilişkisine dair hiçbir kanıt bulunmayan diğer bir zar proteindir (Huang ve ark., 2020; Morra ve ark., 2021). Sağlıklı ve kanserli meme hücre hatlarında GRIP2 düzeylerindeki değişim yine ilk kez bu tez çalışması kapsamında gösterilmiştir.

ATPaz ailesi AAA domaini içeren protein 3 (ATAD), bir dizi hücresel süreçte yer alan ve genel olarak olarak mitokondride lokalize olan, ancak PM'de yer alabilen bir AAA-ATPaz üyesidir. ATAD3A, ATAD3B ve ATAD3C'yi içeren üç aile üyesinden oluşmaktadır. ATAD ailesi üyeleri, mitokondriyal fizyon, transkripsiyon, replikasyon, translasyon, proteoliz ile mitokondriyal organizasyonda önemli roller oynamaktadırlar (Liu ve ark., 2019). ATAD3A, mitokondriyal onkogenik sinyalleri harekete geçirerek tümörü indükleyici bir aktiviteye sahiptir ve bazı çalışmalarda kanser hücrelerinde artan ATAD3A seviyesi gösterilmiştir (Lang ve ark., 2020). ATAD3B, ATAD3A'nın negatif inhibitördür. ATAD3B ayrıca LC3'e bağlanır ve PINK1'den bağımsız oksidatif stres kaynaklı mitofajiyi destekler (Shu ve ark., 2021). Bu özellikleri kanser hücresinde ATAD3B protein düzeylerinin düşmesini açıklamaktadır. Bununla birlikte tez kapsamında yapılan analizlerde ATP sentaz alt birimlerinden olan ATP5F1B, ATP5F1A, ATP1B3 ve ATP5PO protein seviyelerinin kanser gelişimi sırasında arttığı gözlemlenmiştir. Bu artışların hangi fizyolojik değişimleri tetiklediği irdelenmelidir.

Seçici-olmayan kalsiyum geçirgen katyon kanalı olan kısa geçici reseptör potansiyel kanalı-4 (TRPC4), meme kanserinde protein seviyesini düşürdüğünü belirlediğimiz bir diğer proteindir. TRPC4'ün aktivasyonu, hücreye Na⁺ girişini arttırmaktadır. Bu durumu bazı kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluştururken normal hücrelerde bu etkiyi göstermez (Muraki ve ark., 2017). Bu özellik, TRPC4'ü meme kanseri ilaç tedavisinde potansiyel hedef haline getirmektedir. Bu açıdan bakıldığında TRPC4'ün daha fazla ilgiyi hak ettiği ve biyomarkör potansiyelinin daha detaylı araştırılması gerektiği söylenebilir.

Tez kapsamında belirlenen bazı protein düzeylerindeki değişimlerin literatürde rapor edilen değişimlerden farklı oldukları görüldü. Literatürden farklı olarak VDAC1, FAM120A CAVIN2 ve HSP90AA1 gibi bazı proteinlerin ekspresyon düzeylerinin düştüğünü belirledik. Ancak bu proteinler ile ilgili yapılan analizler incelendiğinde literatür çalışmalarının genellikle biyoinformatik ve/veya RNA düzeylerinde yapılan analizler olduğu görülmektedir (Cheng ve ark., 2019; Tang ve ark., 2016; Lui ve ark., 2021). Bu

analizler protein seviyelerini yansıtmak konusunda yanıltıcı olabilmektedir. Zira nLC-MS/MS analizlerini doğrulamak için Anti-VDAC1 kullanılarak yapılan WB analizlerinde VDAC1 proteini sadece MCF-10A protein özütlerinde belirlenebildi.

Grup 3: Yalnızca MCF-10A hücrelerinde ifade edilen proteinler

Sadece MCF-10A'da ifadesi görülen proteinler analiz edildiğinde, bu proteinlerin hücre-matriks bağlantıları, integrin ve kollajen gibi adezyon molekülleri ile ilişkili olduğunu belirlendi (Şekil 4.48; Bakınız. EK-5, Ek-Şekil 3). Yapılan analizlerde PON2, TJP1, PKD1, NDRG1, VEZT, GNG12 ve EHD2 gibi kanser hücrelerinde ekspresyon düzeylerinin azaldığı bilinen terapötik protein ve biyobelirteç adayları belirlendi. Ayrıca VSIG10L2, HMG1, MYPN, LCP2 ve SYT3 gibi son yıllarda araştırılan ancak meme kanseri ile ilişkisi kurulamayan ve/veya etkileri tam olarak anlaşılamayan proteinlerinde yine grup 3 kapsamına girdikleri görüldü (Devarajan ve ark. 2018.; Lee ve ark., 2015; Lee ve ark., 2018; Lee ve ark., 2022; Villodre ve ark., 2021; Villodre ve ark., 2020; Shen ve ark., 2020; Li ve ark., 2015; Xiang ve ark., 2020; Alausa ve ark., 2022; Huo ve ark., 2021). Bununla birlikte literatür çalışmalarının aksine RAB35, FLOT2, FURIN, ATP7B ve GSTP1 gibi daha önceki çalışmalarda kanser hücrelerinde yüksek protein ekspresyon seviyeleri belirlenen bazı proteinler sadece MCF-10A hücrelerinde belirlenebildi (Louie ve ark., 2016; Villagomez ve ark., 2020; Wang ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2017; He ve ark., 2022; Moinuddin ve ark., 2017).

Grup 4: Yalnızca MCF-7 hücrelerinde ifade edilen proteinler

Yalnızca MCF-7 hücrelerinde ifade edilen proteinler analiz edildiğinde bu proteinlerin hücre adezyonu, adherent bağlantılar ve veziküler taşıma ile ilişkili oldukları belirlendi (Şekil 4.48; Bakınız. EK-5, Ek-Şekil 4). Adezyon proteinlerinin genellikle kanser oluşumlarının erken dönemlerinde tümör baskılayıcı oldukları belirtilir ancak bazı adezyon moleküllerinin kanserleşme sürecinde fonksiyonel rol oynamakta ve ekspresyon düzeylerinde artmaktadır. Örneğin tez kapsamında elde edilen sonuçlar arasında CTNNA1'in (α -E-katenin) protein seviyesinin MCF-7 hücrelerinden diğer iki hücre hattına oranla arttığı belirlenmiştir. Literatür çalışmalarında da CTNNA1'in artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Clark ve ark., 2020).

Ayrıca COPB1 ve RAS onkogen ailesi proteinlerinden olan RAB3C ve ARF5 gibi proteinlerin MCF-7 hücrelerinin yüzeyinde arttığı belirlenmiştir. Bu proteinler membran füzyonu, membran trafiği ve veziküler taşıma ile ilişkili proteinlerdir. Aynı zamanda yapılan literatür çalışmalarında bu proteinlerin kanser hücrelerinde kontrolsüz hücre büyümesi ve metastazında önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Raffaniello ve ark., 2021; Chen ve ark., 2021; Casalou ve ark., 2020).

Semaforinler, salgılanan transmembran ve GPI bağlantılı sinyal moleküllerini içeren büyük bir protein ailesidir. Günümüzde 20'den fazla semaforin türü keşfedilmiştir ve bu proteinler kardiyogenez, anjiyogenez, vaskülogenez, osteoklastogenez, immün düzenleme ve nöroregenez patogenezinde içinde yer aldığı çok sayıda patofizyolojik süreçte önemli roller üstlenmektedirler. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda semaforinlerin tümörögenез ve tümör metastazında önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir (Takamatsu ve Kumanogoh, 2012). Kanser hücrelerinde yapılan araştırmalar SEMA3C'nin hücre proliferasyonunu, invazyonu, migrasyonu ve epitelial-mezenkimal geçişte (EMT) rol aldığını göstermiştir (Liu ve ark., 2019; Lee ve ark., 2018). Sunulan bu tez çalışması kapsamında semaforinlerin bir üyesi olan SEMA3C'nin, MCF-7 hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiğini belirlendi. Ayrıca SEMA3C'nin ilk kez meme kanserinde analizi bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

HDLBP (Vigilin) yüksek yoğunluklu lipoprotein bağlayıcı bir proteindir. Hücrelerde steroid metabolizmasıyla birlikte transmembran ve salgılanan proteinlerin sentezinde rol oynar ve stres granülü oluşumunu düzenler. HDLBP son dönemde yapılan bir çalışmada yeni kanser biyobelirteç adayları arasında tanımlanmıştır (Zinnall ve ark., 2022). HDLBP'nin küçük hücreli akciğer kanseri ve hepatoselüler karsinom hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı ve sorafenib gibi kemoterapötik ajanlara karşı direnç gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir (Yuan ve ark., 2022; Zhao ve ark., 2019).

EBP (3-β-hidroksisteroid-Δ8, Δ7-izomeraz) kolesterol biyosentezi ve otofajide rol oynayan ve çoğunlukla endoplazmik retikulumda yer alan bir izomerazdır. Ayrıca çoklu ilaç bağlama kapasitesine sahiptir ve antidepresanlar, antipsikotikler, opioid analjezikler, steroid biyosentez inhibitörleri ve meme kanseri ilacı tamoksifen gibi anti-tümör reaktifleri ve farmakolojik önemi olan aktif bileşikler bağlayabilme özelliği vardır (Long ve ark., 2019). Çalışmamız kapsamında EBP ifadesinin MCF-7 hücrelerinde arttığı gözlemlendi. EBP'nin kanserde ilaç direnci gelişimi ile doğrudan ilişkili olabilecek bir biyobelirteç ve hedef molekül olabileceği düşünülmektedir.

Grup 4 kapsamında LPCAT1, MFSD10, TENM4, PLK4, SLC16A9, CACNA2D2, WDFY3, DCXR, MYO1D, NBEA, USH2A, DNAJA3, GJE1, USH2A, TNIK LRRC32 ve XPC gibi MCF-7 hücrelerinin yüzeyinde bulunan proteinler incelendiğinde bunların da oldukça güncel ve yeni biyobelirteç ve terapötik hedef molekül adayları oldukları görülmüştür. Bu proteinlerin kanser ile olan ilişkisini gösteren çalışmaların son birkaç yılda gerçekleşmiş olması sonuçlarımızın güncelliği açısından önemlidir (Hang ve ark., 2016; Ji ve ark., 2021; Ko ve ark., 2019; Li ve ark., 2021; Ma ve ark., 2019; Malik ve ark., 2020; Nagoshi ve ark., 2012; Ruiu ve ark., 2021; Sun ve ark., 2021; Tao e ark., 2021; Wang ve ark., 2020; Warnier ve ark., 2015; Wu ve ark., 2021; Yamada ve Masuda, 2017; Zhao, ve Wang, 2019; Zhou e ark., 2022). Bu tez çalışması kapsamında belirlenen ve henüz meme kanseri veya herhangi bir kanser türü ile ilişkilendirilmemiş CMYA5, PHKA2, ERVK-6 ve MCF2L gibi proteinler de belirlenmiştir. Bu proteinler ile ilişkili daha detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Grup 5: Yalnızca MDA MB-231 hücrelerinde ifade edilen proteinler

Bu grup içerisinde bulunan proteinler değerlendirildiğinde, proteinlerin temelde trombosit aktivasyonu, yara iyileşmesi ve hücre yüzeyi reseptör sinyal yolları ile ilişkili oldukları görülmüştür (Şekil 4.48; Bakınız. EK-5, Ek-Şekil 5).

Trombositler kanda bulunan küçük çekirdekli hücrelerdir ve kan hemostazı, iltihaplanma ve trombüs oluşumunda önemli rol oynarlar. Bununla birlikte yeni elde edilen kanıtlar, trombositlerin kanser hücrelerinin gelişimi ve korunmasında önemli rollere sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar trombosit hücrelerinin, kanser dokusu etrafında bir kalkan görevi gördüğünü ve kanserli hücreleri bağışıklık sistemi hücrelerinden koruduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca trombositler TGF- β , VEGF ve PDGF gibi büyüme faktörleri salgırlar ve böylece kanser hücresi büyümesini ve anjiyogenezi indüklerler. Aynı zamanda kanser hücreleri metastaz sırasında P-selektin gibi adezyon molekülleri ile trombosit hücreleri bağlanarak kanda birlikte göç ederler. Bu durum hem kanser hücrelerinin kan dolaşımında hayatta kalabilmesini hem de bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçabilmesini sağlamaktadır (Palacios-Acedo ve ark., 2019). Tez kapsamında yapılan çalışmada trombosit aktivasyonu ile ilişkili olan GP1BA (CD42b) proteini tüm gruplar arasında yalnızca MDA MB-231'de tespit edildi. Literatürde karaciğer kanserinde GP1BA ile ilgili tek bir çalışma dışında kanserle ilişkili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Malehmir ve ark., 2019).

GP1BA meme kanseri ile ilişkilendirilmemiş ve bu anlamda araştırılmamıştır. GP1BA agresif meme kanserleri için yeni bir terapötik hedef olma potansiyeline sahiptir.

Bu grupta bulunan PNPLA2 (ATGL) ve NPR1 proteinleri trigliserid sekresyonunun ve cGMP sinyal yolunun negatif düzenlenmesi ile ilişkili proteinlerdir. Yağ asidi sentezinin ve oksidasyonunun kanser için önemli olduğu bilinmektedir. Yağ asidi oksidasyonu ile elde edilecek enerji kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve büyümesini sağlayan ve ATP sentezine alternatif oluşturan önemli bir yoldur. PNPLA2, trigliserid hidrolizinin hız sınırlayıcı basamağını katalize eder ve açlık veya karsinogenez sırasında enerji homeostazında önemli bir rol oynamaktadır (Iftikhar ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2022). cGMP sinyali, vazodilatasyon, natriürez, kas gevşemesi ve çoklu ilaç direnci gibi farklı süreçlerde yer alan önemli bir sinyal yolağıdır. NPR1, özellikle omurgalıların nöron hücrelerinde bulunan nöropilinlerden biridir ve yüksek düzeyde korunmuş, tek geçişli bir transmembran proteindir. NPR1, hücre şekillendirme, anjiyogenez, hücre migrasyonu, immün hücre regülasyonu, akson büyümesi gibi çeşitli hücresel süreçlerde önemli roller üstlenmektedir. Lee ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada bu tez çalışmasında belirlendiği gibi NPR1A ifadesi sadece metastatik MDA MB-231 hücre hattında arttığını gözlemlemiştir (Lee ve ark., 2013). Kanıtlar, NPRA1 seviyesinin kanserde tümör oluşumu, invazyon, metastaz, prognoz ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Chaudhary ve ark., 2013; Liu ve ark., 2020; Yang ve ark., 2018). Halihazırda umut verici bir biyobelirteç ve terapötik hedef olan NPR1A'yı hedef alan miRNA'lar ve ilaçlar kullanılarak yapılan kanserin tedavisi amaçlı çalışmalar devam etmektedir.

ITSN1, ATP2B1, SNTG2, BAIAP2L2, KMT2E, TGM2, EPB42, MACF1 ve DDX58 proteinleri yalnızca metastatik MDA MB-231 hücrelerinde gözlenen ve farklı kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda terapötik hedefler olarak belirtilen diğer önemli proteinlerdir (Guo ve ark., 2021; Herrero-Garcia ve O'Bryan, 2017; Meng ve ark., 2020; Miao ve ark., 2017; Miyoshi ve ark., 2009; Peters ve ark., 2016; Varga ve ark., 2018; Volovetz ve ark., 2020; Yu ve ark., 2022; Zhu ve ark., 2022). Bu proteinlerin meme kanseri ile olan ilişkileri, hangi yollar üzerinde etkili oldukları, birbirleri ile olan etkileşimleri detaylı olarak incelenmelidir.

Grup 6: Tüm gruplarda bulunan ve MCF-7'de protein ifadesi artan proteinler

Altıncı grup için yapılan STRING analizleri kapsamında bu gruba ait proteinlerin veziküler transport, rRNA sentezi, nitrojen transportu ve fosfatidilinositol fosforilasyonu

(PIP) ile ilişkili olduğu görüldü (Şekil 4.48; Bakınız. EK-5, Ek-Şekil 6). PIP, reseptör aracılı sinyalleşme, vesiküler taşıma, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, hücre kanallarının ve taşıyıcıların regülasyonu, hücre-hücre bağlantıları ve hücre polarizasyonu düzenlenmesi gibi pek çok önemli biyolojik süreçlerde görevler üstlenmektedir (Nakada-Tsukui ve ark., 2019; Sasaki ve ark., 20019). Hiperglisemi ve tip 2 diyabet ile ilişkilendirilen bu yolak meme kanseriyle de yakından ilişkilidir. PIP aktivasyonu, hem hücre zarı yapısının değişmesi hem de ER yolaklarının uyarılması yoluyla kanser gelişimine ve devamlılığına yardımcı olur (Devanathan ve ark., 2020). PIP sinyal yolağının karsinogenezde veziküler taşıma aktivitesini arttırdığı bilinmektedir.

Rab ve SNARE protein aileleri, meme kanseri ile yakından ilişkili olan önemli veziküller trafik düzenleyici proteinlerdir ve farklı Rab proteinlerinin ekspresyon düzeyleri, kanser hücrelerinin tipine ve derecesine bağlı olarak artış göstermektedir (Mughees ve ark., 2019). Tez kapsamında yapılan çalışmalarda Rab protein ailesinden olan RAB5A'nın MCF-7 hücrelerinde ifade düzeylerinin arttığı belirlendi. Son yıllarda yapılan çalışmalarda RAB5A'nın meme kanseri için aday bir biyobelirteç olabileceği ifade edilmektedir (Engbraaten ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2017). Aynı zamanda, MCF-7 hücrelerinde artış gösteren SCFD1 proteini veziküler transportla ilgili olan bir başka proteindir ve mesane kanseri üzerinde genom çapında yapılan meta-analizdeki bir çalışma dışında bu proteinin herhangi kanser türü ile olan ilişkisi bildirilmemiştir. SCFD1 araştırılmaya açık biyobelirteç adaylarından birisidir (Galesloot ve ark., 2022).

Artan protein üretimi ile birlikte kanser hücrelerinde rRNA üretim aktivitesi de yükselmektedir. Ayrıca kanser hücrelerinde rRNA üretiminin gerçekleştiği nükleol bölgeleri sayıca artmakta ve hacim olarak da genişlemektedir. Bu nedenle rRNA sentezi süreçleri kanser tedavilerinde önemli hedefler arasındadır. Cisplatin, Mitomisin C ve Aktinomisin D gibi birçok terapötik ilacın hedefi rRNA sentezinin kanser hücrelerinde baskılanmasıdır (Gaviraghi ve ark., 2019; Zisi ve ark., 2022). UTP20, rRNA sentezinde rol oynayan bir proteindir ve genom düzeyinde gen ekspresyon profillemesi amacıyla yapılan bir makale dışında, literatürde UTP20'nin kanserle ilişkili olduğunu öngören hiçbir kanıt bulunamamıştır (Sun ve Qian, 2018). Bu tez çalışması bu bilgiyi literatüre kazandırması açısından ilktir.

Azot, hücrelerin büyümesi ve canlılıklarının devamı için hayati öneme sahip bir elementtir ve hücrelerin iki temel moleküler grubu olan DNA ve proteinler için yapı taşları olan nükleik ve amino asitlerin yapısında yer alır. Yüksek anabolik aktiviteye sahip kanser

hücrelerinin azot gereksinimleri doğal olarak yüksektir. Bu nedenle kanser hücreleri bulundukları ortamdan yüksek miktarlarda azot almak için azot taşıma sistemlerinin aktivitelerini artırır. Bu durum aynı zamanda çevrede azot yoksunluğuna neden olur ve tümör ortamındaki immün sistem hücrelerinde azot yoksunluğuna yol açar. Kanser hücreleri ortamdaki azotu tüketerek hem kendileri için gerekli olan azot ihtiyacını karşılarlar hem de immün sistem hücrelerini baskılayarak immün yanıtın oluşumunu engellerler (Kurmi ve Haigis, 2020). Grup 6 içerisinde yapılan analizlerde azot metabolizması ile ilişkili SCFD1, RAB5A, TRPC4, AZGP1 ve SCL25A gibi proteinlerin özellikle MCF-7 hücrelerinde artış gösterdiği belirlendi. Bu durum azot ihtiyacının özellikle kanser oluşumunun ilk aşamalarında yüksek olduğunu doğrulamaktadır. Bu proteinlerin yanısıra grup 6 içerisinde analiz edilen KCTD3, KRAS ve RAP2C proteinleri de son yıllarda çalışılmış ve bu proteinlerin yeni biyobelirteç adayı olabilecekleri vurgulanmıştır (Angrisani ve ark., 2021; Cao ve ark., 2019; Mederos ve ark., 2018; Mustachio ve ark., 2021; Rochette ve ark., 2020; Wang ve ark., 2020; Wu ve ark., 2021).

Grup 7: Tüm gruplarda ifade edilen ancak MCF-7'de ifadesi azalmış olan proteinler.

Diğer iki hücre hattıyla karşılaştırıldığında, MCF-7 hücrelerinde azalma gösteren proteinlerin özellikle hücre adhezyonu, lokasyonu, membran raft düzenlenmesi ve kükürt bağlanması ile ilgili süreçlerde görev aldıkları görülmüştür (Şekil 4.48; Bakınız. EK-5, Ek-Şekil 7). Bu grup içerisinde değerlendirilen proteinlerden biri olan ANXA2, hücre adezyonu ile ilişkili bir proteindir. Tümör ile ilişkisi belirlenen ANXA2'nin kanser türüne göre değişken ekspresyon profilleri gösterdiği belirtilmektedir. ANXA2, hücre adezyonu, ısı stresi ve immünsupresyon gibi süreçlerde önemli roller oynamaktadır. Bu özelliklerinden dolayı kanser tedavilerinde potansiyel bir hedef molekül olarak gösterilmiştir. ANXA2 ifadesinin MCF-7 hücrelerinde azaldığı, MDA MB-231 hücrelerinde ise arttığı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Chen ve ark., 2018; Sharma ve ark., 2006). Bu tez kapsamında yapılan nLCMS/MS analiz sonuçları bu bulguları destekler niteliktedir. Bununla birlikte, literatürden farklı olarak, tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ANXA2'nin sağlıklı bir meme hücre hattı olan MCF-10A hücrelerinde MDA MB-231 hücre hattından daha fazla ifade edildiğini göstermiştir. Bu durumda ANXA2 sadece kanser hücre hatlarında değil sağlıklı hücre hatlarında da ifade edilmektedir.

Grup 7'da yer alan ve bir biyobelirteç adayı olan ENO1, glikoliz, DNA replikasyonu ve ekspresyonu, RNA regülasyonu, anjiyogenez, ilaç direnci ve oksidatif stres gibi birçok farklı

süreçte rol oynayan çok işlevli bir proteindir. Literatürde ENO1'in kontrol hücrelerine kıyasla ifadesinin MCF-7 hücrelerinde azaldığı ve MDA MB-231 hücrelerinde ise tekrar artış gösterdiği belirlenmiştir (Cancemi ve ark., 2019; Qiao ve ark., 2021; Tu ve ark., 2009). ANXA2'de olduğu gibi ENO1'de tez kapsamında elde edilen sonuçların literatürle uyduğu gözlemlenmiştir.

700 kDa'lık dev bir protein olan ANHAK, nükleus, sitoplazma ve PM gibi farklı hücre lokuslarında bulunabilen tümörsupresör bir proteindir. Yapılan çalışmalar karsinogenez sırasında AHNAK protein seviyeleri nükleus, sitoplazma ve PM arasında değişiklik gösterdiğini, proteinin miktarsal ve bölgesel olarak farklılaştığını göstermiştir (Lee ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2017). Tez kapsamında, AHNAK proteininin PM üzerindeki miktarının her iki kanser hücre hattında da azaldığı görülmüştür. Bir tümörsupresör proteini olan ANHAK'ın miktarının kanser hücrelerinde azalması beklendik bir durum iken MCF-7 hücrelerine göre MDA MB-231 hücrelerinde neden tekrar yükseldiği doğrulanmaya ve araştırılmaya açık bir konudur.

MSN, diagostik belirteç olarak gösterilen başka bir PM proteindir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, MSN'nin PM'den hücre çekirdeğine göç edebildiği göstermiştir. Aynı zamanda MSN'nin lüminal ve Her2+ hücre hatlarında protein seviyesinin azaldığı, TNBC hücre hatlarında ise arttığı gösterilmiştir (Qin ve ark., 2020). Tez kapsamında nLC-MS/MS analizleri ile elde edilen sonuçlar bu durumu doğrulamakla birlikte sağlıklı kontrol hücrelerinin de TNBC kanser hücreleri kadar MSN protein ifade ettiğini göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasında hücre adezyonu ve migrasyonunda önemli rol oynayan HYP'lerden biri olan CD44 antijeninin MCF-7 hücrelerinde önemli ölçüde azaldığı, ancak MDA MB-231 hücrelerinde arttığı, hatta kontrol hücrelerinden daha yüksek ifade düzeyine ulaştığı belirlendi. CD44'ün ifade düzeylerindeki bu karmaşık düzenlemenin nedeni derinlemesine incelenmeli, primer kanser dokularındaki davranışı incelenmelidir.

Organik kükürt alımı kanser hücreleri için toksiktir. Çalışmalar, diyetle veya gaz halinde belirli bir miktarda kükürt kullanımının kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini, radyoterapinin etkilerini azalttığını ve serbest radikal temizleyici görevi gördüğünü göstermiştir. Prostat ve meme kanseri hücreleri üzerine yapılan son çalışmalarda inorganik kükürt alımının AR, PSA, ErbB2, ErbB3 ve NKX3.1 genlerin protein sentezini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Duan ve ark., 2014; Ha ve ark., 2013). Tez kapsamında elde edilen sonuçlar, kalsiyum, demir ve kükürt metabolizmaları ve ferroptoz ile ilişkili RYR2 ve MGST1 proteinlerinin ifade düzeylerinin MCF-7 hücrelerinde önemli ölçüde azaldığını

ve MDA MB-231 hücrelerinde tekrar kontrol hücrelerindeki seviyeye yakın bir artış gösterdiğine işaret etmektedir (Dodson ve ark., 2021; Dong ve ark., 2019; Kuang ve ark., 2021).

GAPDH, C9, HSP90B1, GNAI2, CAVIN1, CLTC, VTN, NEO1, MYO1B, NIBAN2, EGFR, MYADM, PROM2, CORO1C, S100A10, C7, ESYT2, TLN1, ZAN, RAB19, HM13, EXOC7, EHDTP, EVPL, CLIC1, SERPINE1, SERPINC1, FLNA, MYH9, ANPEP, CAV1, NT5E, HTRA1, FLNB, CYB5R1, ACSL1 ve MYOF, grup 7 içerisinde sınıflandırılan ancak tez kapsamında tartışılmayan diğer önemli proteinlerdir.

Grup 8: Tüm gruplarda ifade edilen ancak MCF-10A'da ifadesi yüksek oranda artmış proteinler.

Diğer iki hücre hattıyla karşılaştırıldığında, MCF-10A hücrelerinde ifadesi yüksek oranda artmış proteinlerin özellikle sitoliz, kompleman sistem aktivasyonu, integrin aracılı hücre adezyonu ve endodermal hücre farklılaşmasında görev aldığı görüldü (Şekil 4.48; Bakınız. EK-5, Ek-Şekil 8). Bu gruba ait proteinlerden biri olan TGFBI, hücre dışı bir matriks proteini olup hücre adezyonu, göçü, çoğalması, apoptoz ve anjiyogenez gibi süreçlerde görev almaktadır. Çalışmalar, bu proteinin meme kanseri hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre azaldığını ve tümör baskılayıcı aktivite gösterdiğine işaret etmektedir (Li ve ark., 2012). Meme kanserinde TGFBI seviyeleri incelendiğinde, alt tiplerine bağlı olarak kanser ortamında miktarının değiştiği ve tümör ortamındaki hipoksinin düzenlenmesinde rol oynadığı, dolayısıyla kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçabilmesine imkân tanıdığı, aynı zamanda meme kanseri gelişmesine ve metastazına neden olduğu belirtilmiştir (Fico ve Santamaria-Martínez, 2020).

Bir glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlantılı protein olan CD109, gruptaki diğer bir önemli proteindir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, CD109'un kanser hücreleri üzerinde farklı etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Zhou ve ark. CD109'un, skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde TGF-beta sinyalini baskılayarak ve TGF-beta reseptörünün bozulmasını teşvik ederek tümörigenezi azalttığını göstermiştir (Zhou ve ark., 2019). Bununla birlikte, başka bir çalışma, kanser hücrelerinde CD109 protein seviyesinin arttığını ve CD109'un, EGFR ve STAT3 sinyal yolları yoluyla tümör oluşumunu indükleyebileceğini göstermiştir (Move ve ark., 2020). Grup 7'de yer alan EGFR proteininin CD109 gibi MCF-7 hücrelerinde önce azaldığını daha sonra MDA MB-231 hücrelerinde ise kontrol grubuna yakın bir artış göstererek normal düzeyine geri döndüğü belirlenmiştir. Bu

benzerlik CD109 ile EGFR'nin meme kanserinde etkileştikleri veya beraber fonksiyon gösterdiklerini düşündürmektedir. Meme kanseri hücreleri ile daha önce böyle bir çalışma olmadığı için bu konuda kesin bir kanıt yoktur ve meme kanserlerinde bu etkileşimin aydınlatılması için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. FN1, C6, C5, F2, SLC16A3 proteinleri grup 8 içerisinde yer alan diğer önemli proteinlerdir.

Grup 9: Tüm gruplarda ifade edilen ancak MDA MB-231'de ifadesi yüksek oranda artmış proteinler.

Dokuzuncu gruptaki proteinler Rho, Rac ve Ras gibi GTPaz aktivitesi ve hücre içi aktin organizasyon yollarıyla ilgili görevleri olan proteinlerdir (Şekil 4.48; Bakınız. EK-5, Ek-Şekil 9). Bu grup içerisinde belirlediğimiz HLA-B, HLA sınıfı proteinlerden biridir. HLA sınıf I tipi moleküller, T hücrelerine antijenik peptitler sunarak bir bağışıklık yanıtının ve antitümör immün cevabın oluşturmaya yardımcı olurlar. HLA protein ailesinin tümör gelişimi üzerindeki etkileri tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. HLA-B protein ekspresyonu ile ilgili pankreas kanseri hücreleriyle yapılan çalışmalar, ekspresyon seviyesinin ve etkisinin tümör tipine bağlı olarak değişebileceğini göstermiştir (Sliker ve ark., 2020). Ayrıca meme kanseri ve sağlıklı bireylerin kanlarından alınan örneklerde farklı HLA mRNA seviyeleri karşılaştırılmış ve HLA-B alellerinin ekspresyon seviyelerinde gruplar arasında değişiklikler olduğu belirlenmiştir. Ancak yapılan bu çalışmada meme kanserinin alt tiplenmesi ve karakterizasyonu yapılmadan sonuçlar analiz edilmiş ve alt tip karşılaştırılması yapılmamıştır (Liang ve ark., 2021). Tez kapsamında yapılan çalışmalarda HLA-B seviyesinin MCF-10A'ya göre MCF-7 hücrelerinde önemli ölçüde azaldığını ve daha sonra MDA MB-231 hücrelerinde önemli ölçüde arttığı görülmüştür. HLA-B protein seviyesinin kontrol gruplarına göre öncelikle azaltıldığı, sonrasında ise metastatik karakterin artışıyla ciddi bir yükselme eğilimi gösterdiği görülmüştür.

MDA MB-231 hücrelerinde arttığını belirlediğimiz bir diğer protein ise GTPaz ailesinden CDC42 proteindir. CDC42'nin meme kanserinde seviyesinin arttırdığı ve epitelyalden mezenkimal geçiş, migrasyon, invazyon, tümör büyümesi, anjiyogenez ve onkojenik transformasyon gibi karsinogenez süreçlerinde rol oynadığı bilinmektedir. Tez kapsamında CDC42 protein düzeylerinde belirlenen ifade değişimi literatür çalışmaları ile benzerlik göstermektedir (Zhang e ark., 2018; Maldonado ve Dharmawardhane, 2019).

Cisplatin direnci ile ilişkili bir protein olan VN1R5, G protein reseptör ailesindendir ve feromon reseptörü aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir. Kapsamlı bir şekilde

incelenmemiş olan VN1R5 yeni biyobelirteç adaylarından biridir. Literatürde kanser ve VN1R5 ile ilgili Wu ve arkadaşlarının 2019 yılında, mide kanseri ve Jiang ve arkadaşlarının 2022 yılında skuamöz hücreli karsinom ile yaptıkları deneyler dışında herhangi bir çalışma yoktur (Wu ve ark., 2019; Jiang ve ark., 2022). Tez kapsamında ilk kez meme kanserinde analiz edilen VN1R5, MCF10-A ve MCF-7 hücrelerinde ifade düzeyi benzerlik gösterirken, MDA MB-231 hücrelerinde yaklaşık 13 katlık artış göstermiştir.

Bir E3 ubiquitin ligaz proteini olan TRIM23, güçlü bir prognostik faktör ve kanser çalışmaları için potansiyel bir hedeftir. TRIM23, kolorektal kanserlerde bir onkogen olarak gösterilmiştir (Fan ve ark., 2019). Bununla birlikte, literatürde meme kanserinde TRIM23 ile alakalı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

THBS1, meme kanseri dokularında hücre tipine göre hem pro-metastatik hem de anti-metastatik özellik gösteren bir proteindir. THBS1 erken metastatik olmayan hücre hatlarında anjiyogenezi ve tümör büyümesini inhibe ederken, ilerlemiş metastatik hücrelerde metastazı ve migrasyonu teşvik eder (Yee ve ark., 2008). nLC-MS/MS analizleri ile elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki sonuçlarla benzerlik göstermiştir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının özgün değeri iki açıdan analiz edilebilir. Bunlardan birincisi çalışmanın yöntemsel olarak özgünlüğüdür. Literatürde hücre yüzey proteinlerinin zenginleştirilerek tanımlanması üzerine onlarca makale bulmak mümkündür. Bu makalelerde tezin giriş kısmında da belirtildiği gibi çok sayıda farklı yöntemsel yaklaşımlar kullanılmıştır. Ancak bu yaklaşımların hiçbirisi istenilen düzeyde sonuç vermemiştir. Bu yaklaşımlar arasında en sık kullanılanı ve çokça tercih edileni hücre yüzey proteinlerinin kimyasal biyotinyasyon yaklaşımı kullanılarak etiketlenmesi, streptavidin resin yardımıyla zenginleştirilmesi ve LC-MS/MS ile tanımlanmasıdır. Bu yaklaşım diğer yaklaşımlardan avantajlı olmasına rağmen limitasyonları çokça olan bir yaklaşımdır. Sunulan bu tez kapsamında yeni bir yöntem geliştirilmiş ve kimyasal biyotinyasyonun tüm limitasyonları aşılmıştır. Geliştirilen yöntemde hücre proteinleri verimli bir şekilde biyotin ile etiketlenmiş ve zenginleştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin literatürdeki diğer yöntemlere kıyasla aşağıdaki avantajlara sahip olduğu söylenebilir.

1. Kısa sürede reaksiyonun tamamlanması: 30 dakika içerisinde tüm biyotin işaretleme süreci tamamlanmaktadır.
2. Uygulamanın kolaylığı: işlemde saf protein ve reaksiyon komponentlerinin hücrelerin büyüdüğü ortama reaksiyon için yeterlidir.
3. Etiketleme maliyetinin düşük olması: Sadece TurboID enziminin sentezi ve saflaştırması için masraf yapılması gerekmektedir.
4. Geniş kullanım alanına imkân tanınması: Hücre kültürünün yapılabildiği tüm canlı sistemlerine uygulanabilir. Hatta bakteri ve maya kültürlerinde de etkili olabilecek bir yaklaşımdır.
5. Çok fazla sayıda hücre yüzey proteini tanımlanmasına izin vermesi: Kimyasal biyotinyasyona ve diğer hücre yüzey protein zenginleştirme yaklaşımlarına göre çok daha etkin bir zenginleştirme sunduğu için, çok daha fazla sayıda protein tanımlanmasına izin vermektedir.
6. Hücre dışına salgılanan proteinlerin zenginleştirilerek tanımlanmasına izin vermesi: sadece hücre yüzey proteinlerinin değil aynı zamanda hücre dışına salgılanan proteinlerin ve hücreler arası matriks proteinlerinin de tanımlanmasına izin vermektedir.

7. Hücrede toksik etki yaratmıyor olması: Doğal bir protein olan TurboID nin kullanılıyor olması ve canlı hücreler üzerinde kısa sürede etiketlenmenin yapılması nedeni ile hücre ölümüne neden olmamaktadır.
8. Hücre içi metabolik yolları etkilemiyor olması: Diğer yöntemlerin aksine hücre içine penetre olmayan bir sistemin kullanılıyor olması nedeni ile hücre içi metabolik yollar geliştirilen yöntemsel yaklaşımdan etkilenmemektedir.
9. Biyolojik bir molekül aracılığı ile zenginleştirmenin doğal yoldan gerçekleşiyor olması: Bakterilerde bulunan bir enzim varyantının kullanılıyor olması zenginleştirmeyi doğal yoldan gerçekleştirmeye izin vermektedir.
10. Kitleştirilebilir uniform bir yaklaşım olması: Geliştirilen yöntem ticarileşebilir bir yaklaşımdır ve her laboratuarda kolaylıkla kullanılabilir.
11. Güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi.

Tezin özgünlüğüne katkı yapan ikinci etmen meme kanseri hücreleri ile yapılan analizlerde tanı ve tedaviye izin verebilecek çok sayıda yeni biyobelirteç adaylarının belirlenmiş olmasıdır. Tanımlanan hücre yüzey proteinlerin önemli bir kısmı son birkaç yıldır gündemde olan, haklarında kısıtlı sayıda araştırma yapılmış ve kanser çalışmalarında önemli biyobelirteç adayları olarak gösterilen proteinlerdir. Bununla birlikte tez kapsamında analiz edilen proteinlerin önemli bir bölümü henüz meme kanseri açısından incelenmemiştir. Bu tez çalışmasında bu proteinlerin meme kanserinde ilk kez araştırılmış olması tezin özgünlüğünü ve değerini artırmaktadır. Protein ifadelerindeki değişim trendlerine göre oluşturulan gruplar özelinde yapılan analizler sonucunda belirlenen biyolojik süreç ve moleküler yollar literatür çalışmalarını büyük oranda doğrulamıştır. Bu durum tez kapsamında elde edilen sonuçların güvenilirliği açısından oldukça önemlidir. Tez kapsamında analiz edilen biyobelirteç adaylarının doğrulanması, proteinlerin ileri analizler ile daha ayrıntılı olarak irdelenmesi ve ideal biyobelirteç adayları olup olmadıklarının belirlenmesi çalışmalarının hem zaman hem de mali yük açısından daha sonraki çalışmalarda yapılması planlanmıştır.

7. KAYNAKLAR

- Alausa, A., Victor, U. C., Fadahunsi, O. S., Owolabi, N., Adeniji, A., Olatinwo, M., Ogunlana, A. T., Olaleke, B., Balogun, T. A., Ogundepo, S., & Adegbola, P. I. (2022). Checkpoints and immunity in cancers: Role of GNG12. *Pharmacological research*, 180, 106242. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106242>
- Angrisani, A., Di Fiore, A., De Smaele, E., & Moretti, M. (2021). The emerging role of the KCTD proteins in cancer. *Cell Communication and Signaling*, 19(1). doi:10.1186/s12964-021-00737-8
- Bertoli, G., Cava, C., & Castiglioni, I. (2015). MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*, 5(10), 1122–1143. <https://doi.org/10.7150/thno.11543>
- Bhooma Venkatraman. (2016). Identifying Gaps and Relative Opportunities for Discovering Membrane Proteomic Biomarkers of Triple Negative Breast Cancer as a Translational Priority. *Cancer Transl Med*. doi: 10.4103/2395-3977.192931.
- Binbin Zheng, Haijun Guo, Dr. Nan Ma, Yun Ni, Jiaqian Xu, Prof. Lin Li, Prof. Piliang Hao, Prof. Ke Ding, Prof. Zhengqiu Li, (2018). Cell- and Tissue-Based Proteome Profiling and Bioimaging with Probes Derived from a Potent AXL Kinase Inhibitor, *Chem. Asian J*. <https://doi.org/10.1002/asia.201800605>.
- Boone-Villa, D., Aguilera-Méndez, A., Miranda-Cervantes, A., & Fernandez-Mejia, C. (2015). Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Adipose Tissue cGMP Concentrations, AMPK Activation, Lipolysis, and Serum-Free Fatty Acid Levels. *Journal of medicinal food*, 18(10), 1150–1156. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0170>
- Branon T.C, Ting A. Y. ve diğ. (2017). Directed evolution of TurboID for efficient proximity labeling in living cells and organisms. *Nature Biotechnology*. doi:10.1101/196980.
- Branon T.C, Ting A.Y ve diğ.(2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*. 36: 880–887. doi: 10.1038/nbt.4201.
- Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., ... Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, 36(9), 880-887. doi:10.1038/nbt.4201
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I ve diğ.(2018). GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancersin 185 countries. *Global cancer statistics*; ilk basım: 12 September 201, <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Cancemi, P., Buttacavoli, M., Roz, E., & Feo, S. (2019). Expression of Alpha-enolase (ENO1), Myc promoter-binding protein-1 (MBP-1) and matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) reflect the nature and aggressiveness of breast tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3952. doi:10.3390/ijms20163952
- Cao, R., Ke, M., Wu, Q., Tian, Q., Liu, L., Dai, Z., ... Liu, P. (2019). AZGP1 is androgen responsive and involved in AR-induced prostate cancer cell proliferation and metastasis. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 17444-17458. doi:10.1002/jcp.28366
- Casalou, C., Ferreira, A., & Barral, D. C. (2020). The Role of ARF Family Proteins and Their Regulators and Effectors in Cancer Progression: A Therapeutic

- Perspective. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 217. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00217>
- Chaudhary, B., Khaled, Y. S., Ammori, B. J., & Elkord, E. (2013). Neuropilin 1: Function and therapeutic potential in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(2), 81-99. doi:10.1007/s00262-013-1500-0
- Cheah, J. S., & Yamada, S. (2017). A simple elution strategy for biotinylated proteins bound to streptavidin conjugated beads using excess biotin and heat. *Biochemical and biophysical research communications*, 493(4), 1522–1527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.168>
- Chen, B., Ji, F., Wen, X., & Jin, Z. (2020). Circular RNA circ_ASAP2 promotes cell viability, migration, and invasion of gastric cancer cells by regulating the miR-770-5p/CDK6 axis. *International journal of clinical and experimental pathology*, 13(11), 2806–2819.
- Chen, H., Li, K., Li, Y., Xie, P., He, J., & Zhang, H. (2021). An integrative pan-cancer analysis of COPB1 based on data mining. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 30(1), 13–27. <https://doi.org/10.3233/CBM-200398>
- Chen, C., Lin, Y., Chen, C., & Chen, Y. (2018). Annexin A2-mediated cancer progression and therapeutic resistance in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Biomedical Science*, 25(1). doi:10.1186/s12929-018-0430-8
- Cheng, X., Qiu, J., Wang, S., Yang, Y., Guo, M., Wang, D., ... Xu, L. (2019). Comprehensive circular RNA profiling identifies CircFAM120A as a new biomarker of hypoxic lung adenocarcinoma. *Annals of Translational Medicine*, 7(18), 442-442. doi:10.21037/atm.2019.08.79
- Cho, K. F., Branon, T. C., Rajeev, S., Svinkina, T., Udeshi, N. D., Thoudam, T., ... Ting, A. Y. (2020). Split-turboid enables contact-dependent proximity labeling in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(22), 12143-12154. doi:10.1073/pnas.1919528117
- Clark, D. F., Michalski, S. T., Tondon, R., Nehoray, B., Ebrahimzadeh, J., Hughes, S. K., Soper, E. R., Domchek, S. M., Rustgi, A. K., Pineda-Alvarez, D., Anderson, M. J., & Katona, B. W. (2020). Loss-of-function variants in CTNNA1 detected on multigene panel testing in individuals with gastric or breast cancer. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 22(5), 840–846. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0753-1>
- Collins JC, Paietta E, Green R ve diğ. (1988). Biotin dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *J Biol Chem*. 263:11280 – 3.
- Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B., & Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 472(5), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2301-9>
- Devanathan, N., Jones, S., Kaur, G., & Kimble-Hill, A. C. (2020). Using Phosphatidylinositol phosphorylation as markers for Hyperglycemic related breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2320. doi:10.3390/ijms21072320
- Devarajan, A., Su, F., Grijalva, V., Yalamanchi, M., Yalamanchi, A., Gao, F., Trost, H., Nwokedi, J., Farias-Eisner, G., Farias-Eisner, R., Fogelman, A. M., & Reddy, S. T. (2018). Paraoxonase 2 overexpression inhibits tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *Cell death & disease*, 9(3), 392. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0395-2>

- Dodson, M., Anandhan, A., & Zhang, D. D. (2021). MGST1, a new soldier of NRF2 in the battle against ferroptotic death. *Cell Chemical Biology*, 28(6), 741-742. doi:10.1016/j.chembiol.2021.05.013
- Donald M.M. The handbook of vitamins. Biotin. 2007; fourth edition, 361-337.
- Dong, D., Hao, Q., Zhang, P., Wang, T., Han, F., Liang, X., & Fei, Z. (2019). Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ release causes Rieske iron–sulfur protein-mediated mitochondrial ROS generation in pulmonary artery smooth muscle cells. *Bioscience Reports*, 39(12). doi:10.1042/bsr20192414
- Duan, F., Li, Y., Chen, L., Zhou, X., Chen, J., Chen, H., & Li, R. (2014). Sulfur inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer in vivo. *Oncology Letters*, 9(1), 437-441. doi:10.3892/ol.2014.2700
- Dunneram, Y., Greenwood, D. C., & Cade, J. E. (2019). Diet, menopause and the risk of ovarian, endometrial and breast cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 78(3), 438–448. <http://doi.org/10.1017/S0029665118002884>
- El Ansari, R., Craze, M. L., Diez-Rodriguez, M., Nolan, C. C., Ellis, I. O., Rakha, E. A., & Green, A. R. (2018). The multifunctional solute carrier 3a2 (SLC3A2) confers a poor prognosis in the highly proliferative breast cancer subtypes. *British Journal of Cancer*, 118(8), 1115-1122. doi:10.1038/s41416-018-0038-5
- Engebraaten, O., Yau, C., Berg, K., Borgen, E., Garred, Ø., Berstad, M. E., ... Weyergang, A. (2021). RAB5A expression is a predictive biomarker for trastuzumab emtansine in breast cancer. *Nature Communications*, 12(1). doi:10.1038/s41467-021-26018-z
- Esteva, F. J., Hubbard-Lucey, V. M., Tang, J., ve Pusztai, L. (2019). Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer. *The Lancet Oncology*, 20(3), e175–e186. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(19\)30026-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(19)30026-9)
- Fairhead M. ve Howarth M. (2015). Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. *Methods. Mol Bio.* doi:10.1007/978-1-4939-2272-7_12.
- Fan, L., Chen, Z., Wu, X., Cai, X., Feng, S., Lu, J., ... Liu, N. (2019). Ubiquitin-specific protease 3 promotes glioblastoma cell invasion and epithelial–mesenchymal transition via stabilizing snail. *Molecular Cancer Research*, 17(10), 1975-1984. doi:10.1158/1541-7786.mcr-19-0197
- Fico, F., & Santamaria-Martínez, A. (2020). TGFBI modulates tumour hypoxia and promotes breast cancer metastasis. *Molecular Oncology*, 14(12), 3198-3210. doi:10.1002/1878-0261.12828
- Fujii, A., Masuda, T., Iwata, M., Tobo, T., Wakiyama, H., Koike, K., ... Mimori, K. (2021). The novel driver gene ASAP2 is a potential druggable target in pancreatic cancer. *Cancer Science*, 112(4), 1655-1668. doi:10.1111/cas.14858
- Galesloot, T. E., Grotenhuis, A. J., Kolev, D., Aben, K. K., Bryan, R. T., Catto, J. W., ... Vermeulen, S. H. (2022). Genome-wide meta-analysis identifies novel genes associated with recurrence and progression in non–muscle-invasive bladder cancer. *European Urology Oncology*, 5(1), 70-83. doi:10.1016/j.euo.2021.07.001
- Gaviraghi, Vivori, & Tonon. (2019). How cancer exploits Ribosomal RNA biogenesis: A journey beyond the boundaries of rRNA transcription. *Cells*, 8(9), 1098. doi:10.3390/cells8091098
- g-profiler: <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>
- Guo, H., Peng, J., Hu, J., Chang, S., Liu, H., Luo, H., ... Chen, Y. (2021). BAIAP2L2 promotes the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma associated with the Wnt/β-catenin pathway. *Journal of Bone Oncology*, 31, 100393. doi:10.1016/j.jbo.2021.100393

- H.-C. Zheng and H.-M. Jiang, Shuttling of cellular proteins between the plasma membrane and nucleus, *Mol Med Rep.* 25 (2022), 14.
- H.T. Luong and S.K. Vashist, Chemistry of Biotin–Streptavidin and the Growing Concern of an Emerging Biotin Interference in Clinical Immunoassays, *Acs Omega.* 5 (2020), 10–18.
- Ha, A. W., Hong, K. H., Kim, H. S., & Kim, W. K. (2013). Inorganic sulfur reduces cell proliferation by inhibiting of ErbB₂ and ErbB₃ protein and mRNA expression in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutrition Research and Practice*, 7(2), 89. doi:10.4162/nrp.2013.7.2.89
- Hang, X., Wu, Z., Chu, K., Yu, G., Peng, H., Xin, H., ... Xu, W. (2016). Low expression of DCXR protein indicates a poor prognosis for hepatocellular carcinoma patients. *Tumor Biology*, 37(11), 15079-15085. doi:10.1007/s13277-016-5302-9
- He, Z., Khatib, A. M., & Creemers, J. W. M. (2022). The proprotein convertase furin in cancer: more than an oncogene. *Oncogene*, 41(9), 1252–1262. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02175-9>
- Helbig A. O, Albert J.R. and Slijper Heck M. (2010). Exploring the membrane proteome—Challenges and analytical strategies. *Journal of Proteomic.* 73: 868-878. doi:10.1016/j.jprot.2010.01.005.
- Herrero-Garcia, E., & O'Bryan, J. P. (2017). Intersectin scaffold proteins and their role in cell signaling and endocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(1), 23-30. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.10.005
- <https://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/prognosis>. Breastcancer 2017. Erişim: 18 Eylül 2018.
- <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/treatment-options>. Cancer.net 2017. Erişim: 12 Ekim 2018.
- <https://www.saglik.gov.tr/.../8635,kanser-istatistikleridocx.docx?0>. T.C. Sağlık Bakanlığı. Erişim: 2 Kasım 2018.
- <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-labeling-crosslinking/protein-labeling/biotinylation/amine-biotinylation-reagents.html>. Thermofisher 2018. Erişim: 28 Eylül 2018.
- <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>. GLOBOCAN 2018. Erişim: 2 Kasım 2018.
- Huang, S., Li, G., Zhou, X., Chen, X., Yao, Y., Zhang, X., ... Rong, M. (2020). Identification of an immune score-based gene panel with prognostic power for oral squamous cell carcinoma. *Medical Science Monitor*, 26. doi:10.12659/msm.922854
- Huo, Y., Zhang, K., Han, S., Feng, Y., & Bao, Y. (2021). Lymphocyte cytosolic protein 2 is a novel prognostic marker in lung adenocarcinoma. *The Journal of international medical research*, 49(11), 3000605211059681. <https://doi.org/10.1177/03000605211059681>
- I. Safarik and M. Safarikova, Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, *Biomagn Res Technology.* 2 (2004), 7.
- Iftikhar, R., Penrose, H. M., King, A. N., Samudre, J. S., Collins, M. E., Hartono, A. B., ... Savkovic, S. D. (2022). Correction: Elevated ATGL in colon cancer cells and cancer stem cells promotes metabolic and tumorigenic reprogramming reinforced by obesity. *Oncogenesis*, 11(1). doi:10.1038/s41389-022-00388-5
- Iqbal N and Iqbal N. (2014). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Over expression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International.* 852748:9. <https://doi.org/10.1155/2014/852748>.

- J.S. Cheah and S. Yamada, A simple elution strategy for biotinylated proteins bound to streptavidin conjugated beads using excess biotin and heat, *Biochem Bioph Res Co.* 493 (2017), 1522–1527.
- Ji, W., Peng, Z., Sun, B., Chen, L., Zhang, Q., Guo, M., & Su, C. (2021). LpCat1 promotes malignant transformation of hepatocellular carcinoma cells by directly suppressing STAT1. *Frontiers in Oncology*, 11. doi:10.3389/fonc.2021.678714
- Jiang, Y., Guo, H., Tong, T., Xie, F., Qin, X., Wang, X., ... Zhang, J. (2022). LncRNA lnc-POP1-1 upregulated by VN1R5 promotes cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma through interaction with MCM5. *Molecular Therapy*, 30(1), 448-467. doi:10.1016/j.ymthe.2021.06.006
- Johnson, B. S., Chafin, L., Farkas, D., Adair, J., Elhance, A., Farkas, L., ... Londino, J. D. (2022). MicroID2: A novel biotin ligase enables rapid proximity-dependent Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 21(7), 100256. doi:10.1016/j.mcpro.2022.100256
- Kaplan E ve Gündüz U. (2012). Expression analysis of TOP2A, MSH2 and MLH1 genes in MCF-7 cells at different levels of etoposide resistance. *Biomed Pharmacother.* doi: 10.1016/j.biopha.2011.09.002.
- Karaosmanoglu Yoneten, K., Kasap, M., Arga, K. Y., Akpınar, G., & Utkan, N. Z. (2022). Decreased serum levels of glycerol-3- phosphate dehydrogenase 1 and monoacylglycerol lipase act as diagnostic biomarkers for breast cancer. *Cancer Biomarkers*, 34(1), 67-76. doi:10.3233/cbm-203093
- Karmakar, S., Purkayastha, K., Dhar, R., Pethusamy, K., Srivastava, T., Shankar, A., & Rath, G. (2022). The issues and challenges with cancer biomarkers. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 0(0), 0. doi:10.4103/jcrt.jcrt_384_22
- Kido, K., Yamanaka, S., Nakano, S., Motani, K., Shinohara, S., Nozawa, A., ... Sawasaki, T. (2020). AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein–protein interactions. *eLife*, 9. doi:10.7554/elife.54983
- Ko, Y., Bae, J. A., Kim, K. Y., Kim, S. J., Sun, E. G., Lee, K. H., ... Kim, K. K. (2019). MYO1D binds with kinase domain of the EGFR family to anchor them to plasma membrane before their activation and contributes carcinogenesis. *Oncogene*, 38(49), 7416-7432. doi:10.1038/s41388-019-0954-8
- Kohanski R.A. (2013). Biotinylation of Proteins, Editor(s): William J. Lennarz, M. Daniel Lane, *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Second Edition), Academic Press. Pages 226-228, ISBN 9780123786319, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00168-7>.
- Kuang, F., Liu, J., Xie, Y., Tang, D., & Kang, R. (2021). MGST1 is a redox-sensitive repressor of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Cell Chemical Biology*, 28(6), 765-775.e5. doi:10.1016/j.chembiol.2021.01.006
- Kurmi, K., & Haigis, M. C. (2020). Nitrogen metabolism in cancer and immunity. *Trends in Cell Biology*, 30(5), 408-424. doi:10.1016/j.tcb.2020.02.005
- Lang, L., Loveless, R., & Teng, Y. (2020). Emerging links between control of mitochondrial protein ATAD3A and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7917. doi:10.3390/ijms21217917
- Larochelle, M., Bergeron, D., Arcand, B., & Bachand, F. (2019). Proximity-dependent biotinylation by TurboID to identify protein-protein interaction networks in yeast. *Journal of Cell Science*. doi:10.1242/jcs.232249
- Lee, C. C. W., Munuganti, R. S. N., Peacock, J. W., Dalal, K., Jiao, I. Z. F., Shepherd, A., Liu, L., Tam, K. J., Sedgwick, C. G., Bhasin, S., Lee, K. C. K., Gooding, L., Vanderkruk, B., Tombe, T., Gong, Y., Gleave, M. E., Cherkasov, A., & Ong, C. J.

- (2018). Targeting Semaphorin 3C in Prostate Cancer With Small Molecules. *Journal of the Endocrine Society*, 2(12), 1381–1394. <https://doi.org/10.1210/js.2018-00170>
- Lee, S. H., Paek, A. R., Yoon, K., Kim, S. H., Lee, S. Y., & You, H. J. (2015). Tight junction protein 1 is regulated by transforming growth factor- β and contributes to cell motility in NSCLC cells. *BMB reports*, 48(2), 115–120. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.2.035>
- Lee, Y. C., Tsai, K. W., Liao, J. B., Kuo, W. T., Chang, Y. C., & Yang, Y. F. (2022). High expression of tight junction protein 1 as a predictive biomarker for bladder cancer grade and staging. *Scientific reports*, 12(1), 1496. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05631-y>
- Lee, E., Koskimaki, J. E., Pandey, N. B., & Popel, A. S. (2013). Inhibition of Lymphangiogenesis and angiogenesis in breast tumor xenografts and lymph nodes by a peptide derived from Transmembrane protein 45a. *Neoplasia*, 15(2), 112-IN6. doi:10.1593/neo.121638
- Lee, H., Kim, K., Woo, J., Park, J., Kim, H., Lee, K. E., ... Ryu, H. S. (2018). Quantitative Proteomic analysis identifies AHNAK (Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK) as a novel candidate biomarker for bladder Urothelial carcinoma diagnosis by liquid-based cytology. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(9), 1788–1802. doi:10.1074/mcp.ra118.000562
- Li, J., Guan, X., Fan, Z., Ching, L. M., Li, Y., Wang, X., Cao, W. M., & Liu, D. X. (2020). Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Breast Cancer. *Cancers*, 12(10), 2767. <https://doi.org/10.3390/cancers12102767>
- Li, Y. S., Chen, Y. Z., Guo, X. B., Liu, X., & Li, L. P. (2015). VEZT as a novel independent prognostic factor in gastric cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 15(4), 375–380. <https://doi.org/10.3233/CBM-150476>
- Li, B., Wen, G., Zhao, Y., Tong, J., & Hei, T. K. (2012). The role of TGFBI in mesothelioma and breast cancer: Association with tumor suppression. *BMC Cancer*, 12(1). doi:10.1186/1471-2407-12-239
- Li, C., Qian, T., He, R., Wan, C., Liu, Y., & Yu, H. (2021). Endoplasmic Reticulum–plasma membrane contact sites: Regulators, mechanisms, and physiological functions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. doi:10.3389/fcell.2021.627700
- Li, J., Xie, J., Wu, D., Chen, L., Gong, Z., Wu, R., ... Xu, Y. (2021). A pan-cancer analysis revealed the role of the SLC16 family in cancer. *Channels*, 15(1), 528–540. doi:10.1080/19336950.2021.1965422
- Liang, H., Lu, T., Liu, H., & Tan, L. (2021). The relationships between HLA-A and HLA-B genes and the genetic susceptibility to breast cancer in Guangxi. *Russian Journal of Genetics*, 57(10), 1206–1213. doi:10.1134/s1022795421100069
- Lin, G., Wang, S., Zhang, X., & Wang, D. (2020). Circular RNA circPLK1 promotes breast cancer cell proliferation, migration and invasion by regulating Mir-4500/IGF1 axis. *Cancer Cell International*, 20(1). doi:10.1186/s12935-020-01694-x
- Liu, H., Zhang, Z., Huang, Y., Wei, W., Ning, S., Li, J., ... Zhang, L. (2021). Plasma HSP90AA1 predicts the risk of breast cancer onset and distant metastasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. doi:10.3389/fcell.2021.639596
- Liu, R., Shuai, Y., Luo, J., & Zhang, Z. (2019). SEMA3C promotes cervical cancer growth and is associated with poor prognosis. *Frontiers in Oncology*, 9. doi:10.3389/fonc.2019.01035

- Liu, S., Zhong, L., He, J., & Zhao, Y. (2020). Targeting neuropilin-1 interactions is a promising anti-tumor strategy. *Chinese Medical Journal*, 134(5), 508-517. doi:10.1097/cm9.0000000000001200
- Liu, X., Li, G., Ai, L., Ye, Q., Yu, T., & Yang, B. (2019). Prognostic value of ATAD3 gene cluster expression in hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*. doi:10.3892/ol.2019.10454
- Long, T., Hassan, A., Thompson, B. M., McDonald, J. G., Wang, J., & Li, X. (2019). Structural basis for human sterol isomerase in cholesterol biosynthesis and multidrug recognition. *Nature Communications*, 10(1). doi:10.1038/s41467-019-10279-w
- Louie, S. M., Grossman, E. A., Crawford, L. A., Ding, L., Camarda, R., Huffman, T. R., Miyamoto, D. K., Goga, A., Weerapana, E., & Nomura, D. K. (2016). GSTP1 Is a Driver of Triple-Negative Breast Cancer Cell Metabolism and Pathogenicity. *Cell chemical biology*, 23(5), 567–578. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.03.017>
- M. Serra, A. Columbano, U. Ammarah, M. Mazzone and A. Menga, Understanding Metal Dynamics Between Cancer Cells and Macrophages: Competition or Synergism?, *Frontiers Oncol.* 10 (2020), 646.
- M.P. Stelling, J.M. Motta, M. Mashid, W.E. Johnson, M.S. Pavão and N.P. Farrell, Metal ions and the extracellular matrix in tumor migration, *Febs J.* 286 (2019), 2950–2964.
- Ma, S., Mao, Z., Wu, Y., Liang, M., Wang, D., Chen, X., ... Tang, J. (2020). The anti-cancer properties of heparin and its derivatives: A review and prospect. *Cell Adhesion & Migration*, 14(1), 118-128. doi:10.1080/19336918.2020.1767489
- Ma, W., Qin, Y., Chapuy, B., & Lu, C. (2019). LRRC33 is a novel binding and potential regulating protein of TGF- β 1 function in human acute myeloid leukemia cells. *PLOS ONE*, 14(10), e0213482. doi:10.1371/journal.pone.0213482
- Madu, C. O., Wang, S., Madu, C. O., & Lu, Y. (2020). Angiogenesis in breast cancer progression, diagnosis, and treatment. *Journal of Cancer*, 11(15), 4474-4494. doi:10.7150/jca.44313
- Maldonado, M. D., & Dharmawardhane, S. (2018). Targeting rac and Cdc42 GTPases in cancer. *Cancer Research*, 78(12), 3101-3111. doi:10.1158/0008-5472.can-18-0619
- Malehmir, M., Pfister, D., Gallage, S., Szydłowska, M., Inverso, D., Kotsiliti, E., ... Heikenwalder, M. (2019). Platelet GPIIb α is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nature Medicine*, 25(4), 641-655. doi:10.1038/s41591-019-0379-5
- Malik, S. S., Zia, A., Rashid, S., Mubarik, S., Masood, N., Hussain, M., ... Bano, R. (2020). XPC as breast cancer susceptibility gene: Evidence from genetic profiling, statistical inferences and protein structural analysis. *Breast Cancer*, 27(6), 1168-1176. doi:10.1007/s12282-020-01121-z
- Matthew P. DeLisa, Jincai Li, Govind Rao, William A. Weigand, & William E. Bentley. (1999). Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(1), 54–64. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19991005\)6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19991005)6)
- Mederos y Schnitzler, M., Gudermann, T., & Storch, U. (2018). Emerging roles of diacylglycerol-sensitive TRPC4/5 channels. *Cells*, 7(11), 218. doi:10.3390/cells7110218
- Meng, M., Liu, S., Wang, C., Gu, X., Linghu, E., & Xue, X. (2020). Mass spectrum analysis of membrane proteins reveals that CASK, CD36 and EPB42 are differentially expressed in pancreatic adenocarcinoma. *Oncology Letters*, 20(6), 1-1. doi:10.3892/ol.2020.12239

- Miao, Z., Ali, A., Hu, L., Zhao, F., Yin, C., Chen, C., ... Qian, A. (2017). Microtubule actin cross-linking factor 1, a novel potential target in cancer. *Cancer Science*, 108(10), 1953-1958. doi:10.1111/cas.13344
- Miyoshi, N., Ishii, H., Mimori, K., Tanaka, F., Hitora, T., Tei, M., ... Mori, M. (2009). TGM2 is a novel marker for prognosis and therapeutic target in colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 17(4), 967-972. doi:10.1245/s10434-009-0865-y
- Mo, X., Leung, T. H., Tang, H. W., Siu, M. K., Wan, P. K., Chan, K. K., ... Ngan, H. Y. (2020). CD109 mediates tumorigenicity and cancer aggressiveness via regulation of EGFR and STAT3 signalling in cervical squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 123(5), 833-843. doi:10.1038/s41416-020-0922-7
- Moinuddin, F. M., Hirano, H., Shinsato, Y., Higa, N., Arita, K., & Furukawa, T. (2017). ATP7B expression in human glioblastoma is related to temozolomide resistance. *Oncology letters*, 14(6), 7777-7782. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7249>
- Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, 11, 151-164. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070>
- Morra, A., Escala-Garcia, M., Beesley, J., Keeman, R., Canisius, S., & Ahearn, T. U. (2021). Association of germline genetic variants with breast cancer-specific survival in patient subgroups defined by clinic-pathological variables related to tumor biology and type of systemic treatment. *Breast Cancer Research*, 23(1). doi:10.1186/s13058-021-01450-7
- Mughees, M., Chugh, H., & Wajid, S. (2019). Vesicular trafficking-related proteins as the potential therapeutic target for breast cancer. *Protoplasma*, 257(2), 345-352. doi:10.1007/s00709-019-01462-3
- Muraki, K., Ohnishi, K., Takezawa, A., Suzuki, H., Hatano, N., Muraki, Y., ... Beech, D. J. (2017). Na⁺ entry through heteromeric TRPC4/C1 channels mediates (-)Englerin A-induced cytotoxicity in synovial sarcoma cells. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-17303-3
- Mustachio, L. M., Chelariu-Raicu, A., Szekvolgyi, L., & Roszik, J. (2021). Targeting KRAS in cancer: Promising therapeutic strategies. *Cancers*, 13(6), 1204. doi:10.3390/cancers13061204
- Nagoshi, H., Taki, T., Hanamura, I., Nitta, M., Otsuki, T., Nishida, K., ... Taniwaki, M. (2012). Frequent PVT1 rearrangement and novel chimeric genes *pvt1-nbea* and *pvt1-wwox* occur in multiple myeloma with 8q24 abnormality. *Cancer Research*, 72(19), 4954-4962. doi:10.1158/0008-5472.can-12-0213
- Nakada-Tsukui, K., Watanabe, N., Maehama, T., & Nozaki, T. (2019). Phosphatidylinositol kinases and Phosphatases in entamoeba histolytica. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. doi:10.3389/fcimb.2019.00150
- Nascimento, R. G., & Otoni, K. M. (2020). Histological and molecular classification of breast cancer: What do we know? *Mastology*, 30. doi:10.29289/2594539420202000024
- Norton, R., Heuzenroeder, M., & Manning, P. A. (1996). Non-specific serum binding to streptavidin in a biotinylated peptide based enzyme immunoassay. *Journal of immunoassay*, 17(3), 195-204. <https://doi.org/10.1080/01971529608005788>
- P.M. de O. Balderas, Mitochondria-plasma membrane interactions and communication, *J Biol Chem*. 297 (2021), 101164

- Padmanabhan, R., Kheraldine, H. S., Meskin, N., Vranic, S., & Al Moustafa, A. E. (2020). Crosstalk between HER2 and PD-1/PD-L1 in Breast Cancer: From Clinical Applications to Mathematical Models. *Cancers*, 12(3), 636. <https://doi.org/10.3390/cancers12030636>
- Palacios-Acedo, A. L., Mège, D., Crescence, L., Dignat-George, F., Dubois, C., & Panicot-Dubois, L. (2019). Platelets, thrombo-inflammation, and cancer: Collaborating with the enemy. *Frontiers in Immunology*, 10. doi:10.3389/fimmu.2019.01805
- Peters, A. A., Milevskiy, M. J., Lee, W. C., Curry, M. C., Smart, C. E., Saunus, J. M., ... Monteith, G. R. (2016). The calcium pump plasma membrane ca²⁺-atpase 2 (PMCA2) regulates breast cancer cell proliferation and sensitivity to doxorubicin. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep25505
- Qiao, G., Wu, A., Chen, X., Tian, Y., & Lin, X. (2021). Enolase 1, a moonlighting protein, as a potential target for cancer treatment. *International Journal of Biological Sciences*, 17(14), 3981-3992. doi:10.7150/ijbs.63556
- Qiao, H., Lv, R., Pang, Y., Yao, Z., Zhou, X., Zhu, W., & Zhou, W. (2021). Weighted gene Co-expression network analysis identifies TBC1D10C as a new prognostic biomarker for breast cancer. doi:10.21203/rs.3.rs-314139/v1
- Qin, Y., Chen, W., Jiang, G., Zhou, L., Yang, X., Li, H., ... Liu, S. (2020). Interfering MSN-NONO complex-activated CREB signaling serves as a therapeutic strategy for triple-negative breast cancer. *Science Advances*, 6(8). doi:10.1126/sciadv.aaw9960
- Qu Y, Han B, Yu Y ve diğ. (2015). Evaluation of MCF-10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PLoS ONE*. 10(7): e0131285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131285>.
- Raffaniello R. D. (2021). Rab3 proteins and cancer: Exit strategies. *Journal of cellular biochemistry*, 122(10), 1295–1301. <https://doi.org/10.1002/jcb.29948>
- Raiborg, C., Wenzel, E. M., & Stenmark, H. (2015). ER-endosome contact sites: molecular compositions and functions. *The EMBO journal*, 34(14), 1848–1858. <https://doi.org/10.15252/emj.201591481>
- Rawlings AE. (2016). Membrane proteins: always an insoluble problem? *Biochemical Society Transactions*. 44(3): 790-795. doi: 10.1042/BST2016002.
- Rochette, L., Meloux, A., Zeller, M., Malka, G., Cottin, Y., & Vergely, C. (2020). Mitochondrial SLC25 carriers: Novel targets for cancer therapy. *Molecules*, 25(10), 2417. doi:10.3390/molecules25102417
- Rodriguez-Melendez R, Zemleni J. (2003). Regulation of gene expression by biotin (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 14(12): 680–690. doi:10.1016/j.jnutbio.2003.07.00.
- Roux K.J, Kim D.I, Raida M ve diğ. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol Mar*. 196 (6) 801-810. doi: 10.1083/jcb.201112098.
- Ruiu, R., Barutello, G., Arigoni, M., Riccardo, F., Conti, L., Peppino, G., ... Quagliano, E. (2021). Identification of TENM4 as a novel cancer stem cell-associated molecule and potential target in triple negative breast cancer. *Cancers*, 13(4), 894. doi:10.3390/cancers13040894
- Saito, Y., Matsuda, S., Ohnishi, N., Endo, K., Ashitani, S., Ohishi, M., ... Muthuswamy, S. K. (2022). Polarity protein SCRIB interacts with SLC3A2 to regulate proliferation and tamoxifen resistance in ER⁺ breast cancer. *Communications Biology*, 5(1). doi:10.1038/s42003-022-03363-3

- Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J., Kofuji, S., Eguchi, S., Yamazaki, M., & Suzuki, A. (2009). Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Progress in Lipid Research*, 48(6), 307-343. doi:10.1016/j.plipres.2009.06.001
- Sharma, M. R., Koltowski, L., Ownbey, R. T., Tuszyński, G. P., & Sharma, M. C. (2006). Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: Selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Experimental and Molecular Pathology*, 81(2), 146-156. doi:10.1016/j.yexmp.2006.03.003
- Sheikh, T. S., Lee, Y., & Cho, M. (2020). Histopathological Classification of Breast Cancer Images Using a Multi-Scale Input and Multi-Feature Network. *Cancers*, 12(8), 2031. <https://doi.org/10.3390/cancers12082031>
- Shen, W. W., Bièche, I., Fuhrmann, L., Vacher, S., Vincent-Salomon, A., Torrino, S., & Lamaze, C. (2020). EHD2 is a Predictive Biomarker of Chemotherapy Efficacy in Triple Negative Breast Carcinoma. *Scientific reports*, 10(1), 7998. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65054-5>
- Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(7), 1291–1299. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>
- Shu, L., Hu, C., Xu, M., Yu, J., He, H., Lin, J., ... Song, Z. (2021). ATAD3B is a mitophagy receptor mediating clearance of oxidative stress-induced damaged mitochondrial DNA. *The EMBO Journal*, 40(8). doi:10.15252/emboj.2020106283
- Sliker, B. H., Goetz, B. T., Barnes, R., King, H., Maurer, H. C., Olive, K. P., & Solheim, J. C. (2020). HLA-B influences integrin beta-1 expression and pancreatic cancer cell migration. *Experimental Cell Research*, 390(2), 111960. doi:10.1016/j.yexcr.2020.111960
- Smith A.C. ve Cronan J.E. (1999). The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends in Biochemical Sciences*. doi:10.1016/S0968-0004(99)01438-3.
- STRING:https://stringdb.org/cgi/input?sessionId=bLbInlOHnkhN&input_page_show_search=on
- Sun, L., & Qian, H. (2018). Screening for implicated genes in colorectal cancer using whole-genome gene expression profiling. *Molecular Medicine Reports*. doi:10.3892/mmr.2018.8862
- Sun, X., Sun, H., Han, X., Chen, P., Jiao, Y., Wu, Z., ... Peng, J. (2022). Deep single-cell-Type Proteome profiling of mouse brain by Nonsurgical AAV-mediated proximity labeling. *Analytical Chemistry*, 94(13), 5325-5334. doi:10.1021/acs.analchem.1c05212
- Sun, Y., Li, L., Yao, W., Liu, X., Yang, Y., Ma, B., & Xue, D. (2021). USH2A mutation is associated with tumor mutation burden and antitumor immunity in patients with colon adenocarcinoma. *Frontiers in Genetics*, 12. doi:10.3389/fgene.2021.762160
- swissmodel : <https://swissmodel.expasy.org>
- T. Kuhn, B., Zimmermann, I., Egloff, P., M. Hürliemann, L., A.J. Hutter, C., Miscenic, C., ... R. Geertsma, E. (2020). Biotinylation of membrane proteins for binder selections v1. doi:10.17504/protocols.io.bpinmkde
- Takamatsu, H., & Kumanogoh, A. (2012). Diverse roles for semaphorin–plexin signaling in the immune system. *Trends in Immunology*, 33(3), 127-135. doi:10.1016/j.it.2012.01.008
- Tan S, Tan HT, Chung MC ve diğ. (2008). Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*. 8: 3924-3932. doi:10.1002/pmic.200800597.

- Tang, B., Tang, F., Wang, Z., Qi, G., Liang, X., Li, B., ... He, S. (2016). Overexpression of CTNND1 in hepatocellular carcinoma promotes carcinous characters through activation of Wnt/ β -catenin signaling. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1). doi:10.1186/s13046-016-0344-9
- Tao, M., Luo, J., Gu, T., Yu, X., Song, Z., Jun, Y., ... Wang, Q. (2021). LPCAT1 reprogramming cholesterol metabolism promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Death & Disease*, 12(9). doi:10.1038/s41419-021-04132-6
- Thierry Rabil loud. (2009). Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult. *Electrophoresis* 30 (1): 174 S180. doi:10.1002/elps.200900050.
- Tian JM, Ran B, Zhang CL ve diğ.(2018). Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Med Biol Res*. 51(3):e5612. doi: [10.1590/1414431X20175612]PMCID: PMC5912097PMID: 29513878.
- Tsang, J. Y., & Tse, G. M. (2019). Molecular classification of breast cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27-35. doi:10.1097/pap.0000000000000232
- Tu, S., Chang, C., Chen, C., Tam, K., Wang, Y., Lee, C., ... Wu, C. (2009). Increased expression of enolase α in human breast cancer confers tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121(3), 539-553. doi:10.1007/s10549-009-0492-0
- Varga, K., Hollósi, A., Pászty, K., Hegedűs, L., Szakács, G., Tímár, J., ... Padányi, R. (2018). Expression of calcium pumps is differentially regulated by histone deacetylase inhibitors and estrogen receptor Alpha in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 18(1). doi:10.1186/s12885-018-4945-x
- Villagomez, F. R., Medina-Contreras, O., Cerna-Cortes, J. F., & Patino-Lopez, G. (2020). The role of the oncogenic Rab35 in cancer invasion, metastasis, and immune evasion, especially in leukemia. *Small GTPases*, 11(5), 334–345. <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1463895>
- Villodre, E. S., Gong, Y., Hu, X., Huo, L., Yoon, E. C., Ueno, N. T., Woodward, W. A., Tripathy, D., Song, J., & Debeb, B. G. (2020). NDRG1 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Inflammatory Breast Cancer. *Cancers*, 12(12), 3711. <https://doi.org/10.3390/cancers12123711>
- Villodre, E. S., Hu, X., Eckhardt, B. L., Larson, R., Huo, L., Yoon, E. C., Gong, Y., Song, J., Liu, S., Ueno, N. T., Krishnamurthy, S., Pusch, S., Tripathy, D., Woodward, W. A., & Debeb, B. G. (2022). NDRG1 in Aggressive Breast Cancer Progression and Brain Metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, 114(4), 579–591. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab222>
- Volovetz, J., Berezovsky, A. D., Alban, T., Chen, Y., Lauko, A., Aranjuez, G. F., ... Lathia, J. D. (2020). Identifying conserved molecular targets required for cell migration of glioblastoma cancer stem cells. *Cell Death & Disease*, 11(2). doi:10.1038/s41419-020-2342-2
- Wajih, N., & Sane, D. C. (2003). Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells. *Blood*, 101(5), 1857-1863. doi:10.1182/blood-2002-02-0582
- Waks, A. G., veWiner, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA*, 321(3), 288. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment. *JAMA*, 321(3), 288. doi:10.1001/jama.2018.19323
- Wang, X., Yang, Q., Guo, L., Li, X. H., Zhao, X. H., Song, L. B., & Lin, H. X. (2013). Flotillin-2 is associated with breast cancer progression and poor survival

- outcomes. *Journal of translational medicine*, 11, 190. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-190>
- Wang, S., Huang, K., Tseng, W., Lo, J., Li, A. F., Fang, W., ... Lee, H. (2020). DNAJA3/Tid1 is required for mitochondrial DNA maintenance and regulates migration and invasion of human gastric cancer cells. *Cancers*, 12(11), 3463. doi:10.3390/cancers12113463
- Wang, X., Wang, C., Xi, L., & Yu, Z. (2020). <p>Rap2c as a novel biomarker for predicting poor prognosis in Glioma</p>. *OncoTargets and Therapy*, 13, 3073-3083. doi:10.2147/ott.s247731
- Warnier, M., Roudbaraki, M., Derouiche, S., Delcourt, P., Bokhobza, A., Prevarskaya, N., & Mariot, P. (2015). CACNA2D2 promotes tumorigenesis by stimulating cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene*, 34(42), 5383-5394. doi:10.1038/onc.2014.467
- Wiebe, J. P., & Dinsdale, C. J. (1991). Inhibition of cell proliferation by glycerol. *Life sciences*, 48(16), 1511–1517. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90275-g](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90275-g)
- Wilkinson, L., & Gathani, T. (2022). Understanding breast cancer as a global health concern. *The British Journal of Radiology*, 95(1130). doi:10.1259/bjr.20211033
- Wu, X., Liu, M., Zhu, H., Wang, J., Dai, W., Li, J., Zhu, D., Tang, W., Xiao, Y., Lin, J., Zhang, W., Sun, Y., Zhang, Y., Chen, Y., Li, G., Li, A., Xiang, L., Liu, S., & Wang, J. (2019). Ubiquitin-specific protease 3 promotes cell migration and invasion by interacting with and deubiquitinating SUZ12 in gastric cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR, 38(1), 277. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1270-4>
- Wu, J., Du, W., Wang, X., Wei, L., Pan, Y., Wu, X., ... Pei, D. (2021). [Corrigendum] Ras-related protein Rap2c promotes the migration and invasion of human osteosarcoma cells. *Oncology Letters*, 21(6). doi:10.3892/ol.2021.12723
- Wu, Y., Wang, T., Xia, L., & Zhang, M. (2021). LncRNA WDFY3-AS2 promotes cisplatin resistance and the cancer stem cell in ovarian cancer by regulating hsa-Mir-139-5p/SDC4 axis. *Cancer Cell International*, 21(1). doi:10.1186/s12935-021-01993-x
- Wu, Y., Zhang, J., Hou, C., Wang, H., Zhu, M., & Yao, X. (2022). A Pancancer study of PIEZO1 as a prognosis and immune biomarker of human tumors. *Journal of Oncology*, 2022, 1-15. doi:10.1155/2022/6725570
- X. Chen and J.R. Cubillos-Ruiz, Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment, *Nat Rev Cancer*. 21 (2021), 71–88.
- Xiang, Z., Lv, Q., Chen, X., Zhu, X., Liu, S., Li, D., & Peng, X. (2020). Lnc GNG12-AS1 knockdown suppresses glioma progression through the AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway. *Bioscience reports*, 40(8), BSR20201578. <https://doi.org/10.1042/BSR20201578>
- Xie Z, Jia Y, Li H ve diğ. (2017). Studying protein-protein interactions by biotin AP-tagged pulldown and LTQ-orbitrap mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 1647:129-138. doi: 10.1007/978-1-4939-7201-2_8.
- Xiong, Z., Lo, H., McMahon, K., Parton, R., & Hall, T. (2021). Proximity dependent biotin labelling in Zebrafish for Proteome and interactome profiling. *BIO-PROTOCOL*, 11(19). doi:10.21769/bioprotoc.4178
- Y. Liu, P. Li, L. Fan and M. Wu, The nuclear transportation routes of membrane-bound transcription factors, *Cell Commun Signal Ccs*. 16 (2018), 12.
- Yamada, T., & Masuda, M. (2017). Emergence of TNIK inhibitors in cancer therapeutics. *Cancer Science*, 108(5), 818-823. doi:10.1111/cas.13203

- Yang, Z., Wen, R., Qi, K., Li, J., Zheng, G., Wang, Y., ... Zhang, Y. (2018). The neuropilin-1 ligand, Sema3A, acts as a tumor suppressor in the pathogenesis of acute leukemia. *The Anatomical Record*, 302(7), 1127-1135. doi:10.1002/ar.24016
- Yee, K. O., Connolly, C. M., Duquette, M., Kazerounian, S., Washington, R., & Lawler, J. (2008). The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 114(1), 85-96. doi:10.1007/s10549-008-9992-6
- Yu, P., Liang, P., Pang, S., Yuan, W., Zhao, Y., & Huang, Q. (2022). The function, role and process of DDX58 in heart failure and human cancers. *Frontiers in Oncology*, 12. doi:10.3389/fonc.2022.911309
- Yuan, J., Lv, T., Yang, J., Wu, Z., Yan, L., Yang, J., ... Jiang, L. (2022). HDLBP promotes hepatocellular carcinoma proliferation and Sorafenib resistance by suppressing trim71-dependent RAF1 degradation. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. doi:10.1016/j.jcmgh.2022.10.005
- Zempleni J, Wijeratne SSK, Kuroishi T ve diğ. (2012). *Advances in nutrition* an international review journal. Biotin. 3(2): 213–214.
- Zhang, B., Zhang, Y., & Liu, J. (2021). Highly effective proximate labeling in *Drosophila*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 11(5). doi:10.1093/g3journal/jkab077
- Zhang, D., Lu, C., & Ai, H. (2017). Rab5a is overexpressed in oral cancer and promotes invasion through ERK/MMP signaling. *Molecular Medicine Reports*, 16(4), 4569-4576. doi:10.3892/mmr.2017.7214
- Zhang, R., Meng, J., Yang, S., Liu, W., Shi, L., Zeng, J., ... Xing, D. (2022). Recent advances on the role of ATGL in cancer. *Frontiers in Oncology*, 12. doi:10.3389/fonc.2022.944025
- Zhang, Y., Li, J., Lai, X., Jiao, X., Xiong, J., & Xiong, L. (2019). Focus on Cdc42 in breast cancer: New insights, target therapy development and non-coding RNAs. *Cells*, 8(2), 146. doi:10.3390/cells8020146
- Zhao, Y., & Wang, X. (2019). PLK4: A promising target for cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145(10), 2413-2422. doi:10.1007/s00432-019-02994-0
- Zhao, Z., Xiao, S., Yuan, X., Yuan, J., Zhang, C., Li, H., ... Liu, Q. (2017). AHNK as a prognosis factor suppresses the tumor progression in glioma. *Journal of Cancer*, 8(15), 2924-2932. doi:10.7150/jca.20277
- Zhou, X., Wang, W., Zhang, S., Wang, X., Tang, Z., Gu, J., Li, J., & Huang, J. (2017). CACNA1B (Ca_v2.2) Overexpression and Its Association with Clinicopathologic Characteristics and Unfavorable Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Disease markers*, 2017, 6136401. <https://doi.org/10.1155/2017/6136401>
- Zhou, G., Yuan, C., Mou, J., Chen, J., Wu, Y., & He, Y. (2022). WDFY3-AS2: A potential prognostic factor and therapeutic target related to cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 29. doi:10.2174/0929867329666220909114416
- Zhou, S., Da Silva, S. D., Siegel, P. M., & Philip, A. (2019). CD109 acts as a gatekeeper of the epithelial trait by suppressing epithelial to mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cells in vitro. *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-50694-z
- Zhou, W., Zhao, L., Yuan, H., Xu, L., Tan, W., Song, Y., & Fang, X. (2019). A new small cell lung cancer biomarker identified by Cell-SELEX generated aptamers. *Experimental Cell Research*, 382(2), 111478. doi:10.1016/j.yexcr.2019.06.023

- Zhu, J., Liu, Z., Liang, X., Wang, L., Wu, D., Mao, W., & Shen, D. (2022). A pan-cancer study of KMT2 family as therapeutic targets in cancer. *Journal of Oncology*, 2022, 1-10. doi:10.1155/2022/3982226
- Zinnall, U., Milek, M., Minia, I., Vieira-Vieira, C. H., Müller, S., Mastrobuoni, G., ... Landthaler, M. (2022). HDLBP binds ER-targeted mRNAs by multivalent interactions to promote protein synthesis of transmembrane and secreted proteins. *Nature Communications*, 13(1). doi:10.1038/s41467-022-30322-7
- Zisi, A., Bartek, J., & Lindström, M. S. (2022). Targeting ribosome biogenesis in cancer: Lessons learned and way forward. *Cancers*, 14(9), 2126. doi:10.3390/cancers14092126

8. ÖZGEÇMİŞ

<u>Kişisel Bilgiler</u>	
Adı Soyadı	Mehmet SARIHAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Akyazı, 10/06/1987
İletişim Adresi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD. Umuttepe 41000 İzmit
E-posta	mbgsarihan@hotmail.com
Eğitim Bilgileri (Tarih Sırasına Göre)	2002-2006: Akyazı Anadolu Lisesi 2006-2010: İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü. 2010-2013 Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Ve Genetik (YI) (Tezli). 2016-2023: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Doktora)
Mesleki Deneyim/ İşyeri Bilgileri	2015-2020: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Araştırma Görevlisi)
Yabancı Dil Bilgileri	İngilizce : YDS:72,5
Bilimsel Etkinlikler	
Makaleler	1. Deveci Ozkan, A., Kaleli, S., Onen, H. I., Sarihan, M., Guney Eskiler, G., Kalayci Yigin, A., & Akdogan, M. (2020). Anti- inflammatory effects of nobiletin on TLR4/TRIF/IRF3 and TLR9/IRF7 signaling pathways in prostate cancer cells. Immunopharmacology and immunotoxicology, 42(2), 93–100. https://doi.org/10.1080/08923973.2020.1725040 2. Cerit, C., Sarihan, M., Nart, Ö., Kasap, M., Yaşar, H., & Akpınar, G. (2021). Are Mannan-binding Lectine Serin Protease-2 and Alpha-1-microglobulin and Bukinin Precursor the Potential Biomarkers of Manic Episode? A Study via Urinary Proetomic Analysis. Clinical psychopharmacology and

	neuroscience: the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology, 19(2), 269–281. https://doi.org/10.9758/cpn.2021.19.2.269 3. Ozkan, A. D., Sarihan, M., & Kaleli, S. (2021). Evaluation of the Effects of Nobiletin on Toll-Like Receptor 3 Signaling Pathways in Prostate Cancer In Vitro. <i>Nutrition and cancer</i>, 73(7), 1138–1144. https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1841247 4. Ayimugu, A., Sarihan, M., Kasap, M., & Akpınar, G. (2020). Investigation of the Involvement of Parkin in Parkinson's Disease and Cancer by Monitoring the Changes in SH-SY5Y Cells at the Nuclear Proteome Level. <i>Anticancer research</i>, 40(6), 3169–3190. https://doi.org/10.21873/anticancer.14299 5. Ozkan, A.D., Eskiler, G.G., Sarihan, M. et al. Anticancer Properties of Eisenia Foetida Proteins in Prostate Cancer Cells In Vitro. <i>Int J Pept Res Ther</i> 28, 119 (2022). https://doi.org/10.1007/s10989-022-10428-8
Bildiriler	1. Serum-Tabanlı Biyobelirteç Keşfinde Yeni Bir Metodolojik Yaklaşım, Sarihan M., Bal M. G. , Kasap M., Akpınar G. 3. Ulusal Proteomik Kongresi, İstanbul, Turkey, 27 - 29 February, Türkiye 2. The effect of moderate ER stress induced by Thapsigargin on SWD activity and GRP78, TNF-α, NF-κB levels in cortex and thalamus tissue of WAG/Rij rats; Karadenizli S., Şahin D., Dede F., Özsoy Ö. D. , Sarihan M., Kasap M., Et Al.; EMBO Endoplasmic Reticulumfunction İn Healthand Disease; 21 – 26 October 2018, Il Ciocco – Lucca, Il Coco 3. 2D Jel Elektforez Tabanlı Zenginleştirilmiş Nükleer Proteom Analizi; Abula A., İşlek E. E. , Bal M. G. , Sarihan M., Karaosmanoğlu K., 2. Ulusal Proteomiks Kongresi, İstanbul, Türkiye, 24 - 25 Kasım 2017 4. Smilarities and differences in proteomic profiles between the platelet rich fibrin and blood serum. Yaprak E., Sarihan M., Kasap M., Akpınar G., Kömürlü G.; World Dental Congress - FDI2017, Madrid, İspanya; 29 Ağustos - 01 Eylül 2017

	5. Experiments Leading to a False Sense in Interpretation of Actin Production in Escherichia coli. İşlek E. E. , Sarihan M., Akpınar G., Kanlı A., Kasap M. VI. International Congress of Molecular Medicine, İstanbul, Türkiye, 22 - 25 Mayıs 2017 6. S. Furat Rencber, Z.E. Utkan Korun, A. Ozturk, Z. Sezer, M. Sarihan, G. Duruksu, G. Akpınar, M. Kasap, A. Corakci, E. Guzel Meydanli, Y. Yazir. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress of Endometrial Stem Cells in Endometriosis. Oral presentation. 16th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 28-31 August 2022, Prague, Czech Republic.
Projeler	1. İsoflavonların İnsulin-benzeri Büyüme Faktörü-1 Reseptör Ekspresyonuna Etkisinin Prostat Kanseri Hücrelerinde Araştırılması; TUBİTAK-1001. Proje no: 108S097; Proje yürütücüsü Dr.Öğretim Üyesi Can Murathan ERİŞTİ. Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.06.2008 - 01.12.2011 2. In vitro Koşullarda Hücre Yüzey Proteinlerinin Saflaştırılmış Rekombinant Turboid Enzimleri Aracılığı ile Biyotininasyonu, Zenginleştirilmesi ve Tanımlanması, 1001 – Proje no: 120Z560, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Murat KASAP. Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.01.2021 - 15.04.2023. 3. Hibridoma Teknolojisi İle Gfp Ve Beta-Aktin Proteinlerine Karşı Monoklonal Antikor Üretilmesi.Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Proje no: 2019/077 Proje yürütücüsü: Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 18.06.2019 - 31.12.2021 4. Juvenile idiopatik artrit hastalarında gözyaşının proteomik değerlendirilmesi; Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Proje no: TSA-2022-2999; Proje yürütücüsü: Dr.Öğr. Üyesi BÜŞRA YILMAZ TUĞAN Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 13.06.2022 - 07.10.2024 5. Lansoprazolün ve esomeprazolün Helicobacter pylori proteomuna etkisinin araştırılması. Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Proje no: TOA-2022-2897; Proje yürütücüsü: Prof. Dr. FETİYE KOLAYLI Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 10.11.2022 - 11.11.2024

	6. N-nitrozomorfolin maruziyeti sonrası sıçan serum proteomik profilinde meydana gelen değişiklikler.; Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Proje no: TCD-2021-2597 Proje yütürücüsü: Prof.Dr. ZEYNEP CANTÜRK Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 02.11.2021 - 02.08.2022
--	--



EKLER

EK-1. Western blot, gümüş boyama ve IF analizlerinde izlenen basamaklar

Western Blotlama (WB) deneyleri için ilk olarak SDS-PAGE (%12 ve %8) jellerde yürütülen proteinler Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanılarak jellerden nitroselüloz membranlara (GE Healthcare, Chicago, IL, ABD) aktarıldı. Trasnfer işleminin ardından aşağıdaki basamaklar izlendi.

Basamak	Zaman ve sıcaklık
TBS-T ile yıkama	3 kez 10 dakika – oda koşulu.
TBS-T iel hazılanaa %5’lik Blotting-Grade Blocker ile bloklama (Biorad #1706404)	60 dakika – oda koşulu
TBS-T ile yıkama	10 dakika – oda koşulu
Primer antikör (TBS-T içerisinde)	Gece boyu +4°C inküasyon ve ardından oda koşullarında 30 dakika.
TBS-T ile yıkama	3 kez 10 dakika – oda koşulu
Sekonser antikör (TBS-T içerisinde) Goat anti mouse Ab. 1:10000 diluitor	60 dakika – oda koşulu
TBS-T ile yıkama	3 kez 10 dakika – oda koşulu.
Görüntüleme	

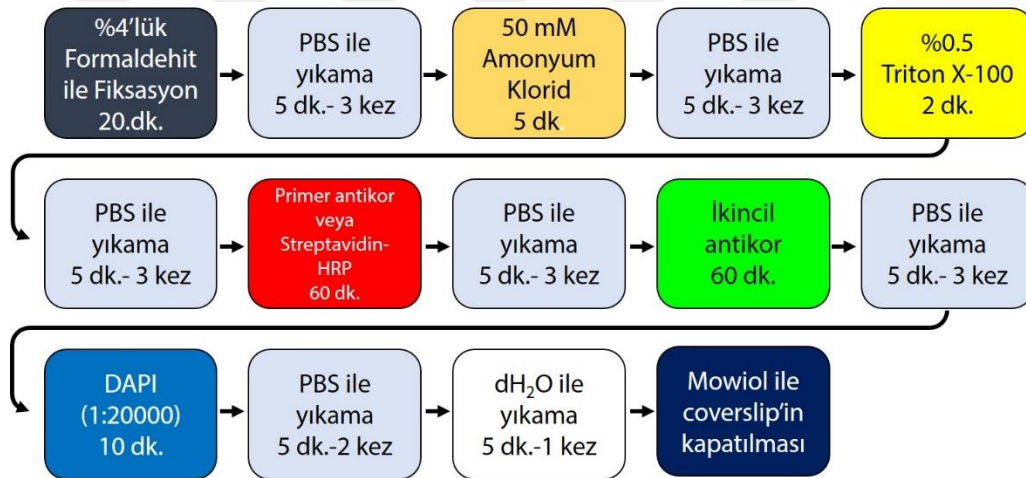
Tez çalışmamız kapsamında streptavidin kaplı manyetik boncuklardan elde edilen biyotinile proteinlerin miktarının az olması ve konsatrayonlarının düşüklüğü nedeni ile zenginleştirilen proteinlerin analiz edilmesi için yapılan SDS-PAGE analizlerinde duyarlı yüksek olan gümüş boyama tekniği kullanılmıştır. Bu analizler ile ilgili tamponlar e izlenen basamaklar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Gümüş Boyama	
Kullanılan Tampon	İçeriği
Jel fiksasyon tamponu	%12 Asitik asit, %35 Etanol %0,05 formaldehit
Yıkama tamponu	%15 Etanol
Duyarlılaştırma tamponu (100 mL için)	31,4 mg Sodyum tiyosülfat pentahidrat $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Gümüş nitrat çözeltisi (100 mL için)	0,2 g Gümüş Nitrat, 75 μL formaldehit
Geliştirme tamponu (100 mL için)	0,63 mg Sodyum tiyosülfat pentahidrat $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Sodyum karbonat (Na_2CO_3), 50 μL formaldehit
Durdurma tamponu (100 mL için)	12 mL Asetik asit,

Boyama işlemi basamakları

1. SDS-PAGE sonrası jeller fiksasyon tamponu ile en az 2 saat fiksasyona bırakıldı.
2. Fiksasyon sonrası tampon uzaklaştırılarak jeller yıkama tamponuna alınarak 20 dakika yıkandı.
3. 20 dakika sonrasında yıkama tamponu uzaklaştırılarak jel duyarlılaştırma tamponu içerisine aktarıldı ve 2 dakika boyunca hafif çalkalanarak bekletildi.
4. Duyarlılaştırma tamponu uzaklaştırılan jeller 2 kez HPLC saflığında su ile yıkandı.
5. Yıkama işlemi ardından jeller gümüş nitrat çözeltisine konularak 20 dakika hafif çalkalanarak şekilde bekletildi.
6. Bu işlem sonrasında gümüş nitrat tamponu uzaklaştırılan jeller 2 kez HPLC saflığında su ile yıkandı.
7. Protein bantlarının belirlenmesi için jeller geliştirme tamponuna alınarak hafif çalkalanacak şekilde bekletildi.
8. Bantlar belirginleştikten sonra reaksiyonun durdurulması için jeller durdurma solüsyonu içerisine aktarıldı.

IF analizlerinden izlenen basamakları aşağıda gösterilmiştir.



EK-2. IF ve WB analizlerinde kullanılan antikor ve proteinler

Deneylerde Kullanılan Antikorlar	Katalog Numarası (Katalog No.)	Uygulama
Anti-Myc -Mouse	Cell signaling, 2276S	WB: 1/1000 IF: 1/250
Anti-BirA-Mouse	Novus NBP2-59939	WB: 1/1000
Anti-Na/K ATPase -Mouse	Santa Cruz sc-71638	WB: 1/200, IF:1/200
Anti-VDAC1/Porin-Mouse	Santa Cruz sc-390996	WB: 1/1000
Anti-N-cadherin-Mouse	Santa Cruz sc-8424	WB: 1/1000
Beta-Aktin	Santa Cruz sc-69879	WB: 1/2000
Anti-6X-His-Mouse	İnvitrogen, R930-25	WB: 1/1000
Goat IgG Anti-Mouse HRP	Bio-Rad, 170-5047	WB: 1/10000
Anti Mouse TexasRed	Thermo Scientific, T-6390	IF: 1/1000

Anti-Mouse IgG H&L (FITC)	Abcam, ab6785	IF: 1/1000
Streptavidin-HRP	Thermo Scientific, N100	IF: 1/4000
Streptavidin-TexasRed	Vector, SA-5006-1	WB: 1/1000

EK-3. Kullanılan Tampon içerikleri

Kullanılan Tampon	İçeriği
PBS tamponu	0,01 M fosfat tamponu, 0,0027 M potasyum klorür ve 0,137 M sodyum klorür, pH 7,4
LB sıvı besiyeri	10 g/L Tripton 10 g/L NaCl 5 g/L Maya Ekstresi
SOB (süper optimal besiyeri)	0,1 mL için: 2 g Tripton, 0,5 g Maya Ekstresi, 0,05 NaCl, 0,02 g KCl
25mM bisine ve 150mM sodyum klorür (pH 7.6) içinde tescilli deterjan	25mM bisine ve 150mM sodyum klorür (pH 7.6) içinde tescilli deterjan
RIPA tamponu	50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, %1,0 (v/v) NP-40, %0,5 (a/h) Sodyum Deoksikolat, 1,0 mM EDTA, %0,1 (a/h) SDS ve %0,01 (a/h) pH 7.4'te sodyum azid. (Thermo Fisher Scientific)
Ni-NTA kolon bağlama tamponu	20 mM sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol pH:7.4
Ni-NTA kolon elüsyon tamponu	20 mM sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 500 mM imidazol pH:7.4
Amiloz resin bağlama tamponu	20 mM tris, 200mM NaCl 1mM EDTA 10 mM β-merkaptoetanol
Amiloz resin elüsyon tamponu	10 mM maltoz
2D rehidrasyon tamponu	8 M üre, 130 mM DTT, %4 w/v CHAPS
BirA enzimi saklama tamponu	25 mM Tris Cl, 50 mM NaCl, 1mM DTT, %10 gliserol (pH:7.2)
Biyotinilasyon için kullanılan reaksiyon tamponu	DMEM ve MEGM içerisinde; 0,5 mM biyotin, 1 mM ATP, 5 mM MgCl ₂
Biyotin kaplı manyetik boncuklar – firmanın önerdiği elüsyon tamponu	0,1 M Glisin-HCL pH:2.2
Biyotin kaplı manyetik boncuklar-literatür çalışmalarında belirtilen ve biyotin içeren elüsyon tamponu (Cheah ve Yamada, 2017)	25mM biyotin, 25 mM Tris-Cl pH: 8.0
Biyotin kaplı manyetik boncuklar - elüsyon tamponu	2%SDS, 30 mM biyotin, 0.3 M NaCl, 25 mM TrisHCL, pH:7.4
SDS-PAGE Ayırıcı Jel bileşimi (%12)	375 mM Tris-HCl (pH 8,8), %12 (a/h) Akrilamid/bis-akrilamid solüsyonu, %0,1 (a/h) SDS, %0,1 APS, %0,05 (h/h) tetrametiletildiamin (TEMED).

SDS-PAGE üst jel bileşimi (%4)	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), %4 (a/h) Akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, %0,1 (a/h) SDS, %0,1 APS, %0,05 (v/v) TEMED
Akrilamid/bisakrilamid solüsyonu	%30 (ağırlık/hacim) akrilamid, %0,8 (ağırlık/hacim) bisakrilamid(37,5:1 (ağırlık/ağırlık))
6 X Yükleme Boyası	0,5M Tris-HCl pH 6.8, Gliserol (%99.7), %10 SDS, β - Merkaptoetanol, %0.5 (a/h) Bromfenol mavisi
Jel fiksasyon tamponu	%40 (v/v) Etanol (%99), %10 (v/v) asetik asit (%85)
Comassie brilland blue G-250 için boyama solüsyonu	757 mM amonyum sülfat, 1,45 mM Coomassie Brilliant Blue, %10 fosforik asit (v/v), %20 (v/v) metanol
Western Transfer Tamponu	25 mM Tris-HCl, 192 mM glisin, %20 metanol (v/v), 1,3 mM SDS
TBS-T	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,2, %0,1 Tween20
Membran bloklama solüsyonu	TBS-T içinde %5 yağsız süt tozu
Ponceau S boyama tamponu	1,5 mM Ponceau S, 0,5 mL Asetik asit (v/v)
TAE tamponu (50x-1L)	242 g Tris, 57,1 ml glacial asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA solüsyonu (pH 8,0)

EK-4. nLC-MS/MS analizleri sonucu elde edilen proteinler

EK-Tablo 3.1: nLC-MS/MS analizleri sonucu elde edilen membran protienleri

Accession no	Protein Tanımı	# Peptiler	# Unique Peptides	MW [kDa]	Score Sequest HT: Sequest HT	Protein yoğunluk oranı (mcf7) / (mcf10A)	Protein yoğunluk oranı 231) / (mcf10A)
Q15149	Plectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEC PE=1 SV=3	140	135	531,5	957,25	0,044	0,218
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT16 PE=1 SV=4	23	12	51,2	683,81	0,409	1,022
A0A087WVQ9	Elongation factor 1-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A1 PE=1 SV=2	12	4	49,8	543,26	0,839	1,988
P07355	Annexin A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=2	20	20	38,6	527,72	0,033	0,428
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1	17	14	70,9	179,05	1,261	1,5
P12235	ADP/ATP translocase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A4 PE=1 SV=4	9	2	33	167,69	9,778	0,232
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TGFB1 PE=1 SV=1	22	22	74,6	153,94	0,01	0,016
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=3	8	8	36	123,29	0,067	0,847
P35232	Prohibitin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHB PE=1 SV=1	12	12	29,8	105,55	0,309	0,38
P21333	Filamin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNA PE=1 SV=4	42	40	280,6	102,16	0,043	0,306
P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=2	10	10	47,1	97,71	0,305	1,549
A0A0G2JIW1	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1B PE=1 SV=1	12	10	70,1	95,7	1,349	0,306

P0DMV9	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1B PE=1 SV=1	11	9	70	93,48	1,296	0,336
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=2	15	15	61	85,4	1,871	1,049
P58107	Epiplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPPK1 PE=1 SV=3	13	8	555,3	82,92	21,939	0,01
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	13	4	84,6	82,79	0,041	0,01
P02748	Complement component C9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C9 PE=1 SV=2	4	4	63,1	81,08	0,01	0,331
P14625	Endoplasmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	18	16	92,4	78,8	0,294	0,833
A0A7P0TAE1	Endoplasmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	17	15	90,7	78,8	0,526	0,253
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A3 PE=1 SV=2	9	9	40,1	77,26	2,264	0,749
P23528	Cofilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFL1 PE=1 SV=3	6	6	18,5	72,78	0,709	2,011
Q15286	Ras-related protein Rab-35 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB35 PE=1 SV=1	3	1	23	66,93	0,01	0,01
F5H157	Ras-related protein Rab-35 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB35 PE=1 SV=1	3	1	21,2	66,93	0,01	0,01
P51153	Ras-related protein Rab-13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB13 PE=1 SV=1	3	1	22,8	64,78	0,01	0,01
Q99623	Prohibitin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHB2 PE=1 SV=2	13	13	33,3	62,46	0,504	0,755
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHNAK PE=1 SV=2	36	36	628,7	61,77	0,102	0,459
P35579	Myosin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH9 PE=1 SV=4	22	22	226,4	58,07	0,025	0,387
F5GZS6	4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC3A2 PE=1 SV=1	10	10	64,8	47,47	0,698	0,426

O00159	Unconventional myosin-Ic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1C PE=1 SV=4	16	16	121,6	38,95	2,106	0,916
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPF PE=1 SV=3	3	3	45,6	37,52	0,269	1,133
Q02978	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A11 PE=1 SV=3	7	7	34	34,33	2,581	1,587
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDOST PE=1 SV=4	7	7	50,8	31,77	0,528	1,038
P51148	Ras-related protein Rab-5C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB5C PE=1 SV=2	4	3	23,5	31,14	1,538	1,259
P61204	ADP-ribosylation factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARF3 PE=1 SV=2	6	2	20,6	31,05	0,389	1,535
F5H423	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=3 SV=1	6	2	23,3	31,05	0,43	0,75
O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX3X PE=1 SV=3	10	10	73,2	30,95	0,588	1,892
P51149	Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB7A PE=1 SV=1	6	6	23,5	30,76	3,854	1,108
P84085	ADP-ribosylation factor 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARF5 PE=1 SV=2	5	1	20,5	29,45	100	
P15144	Aminopeptidase N OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANPEP PE=1 SV=4	12	12	109,5	28,87	0,01	0,569
Q03135	Caveolin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAV1 PE=1 SV=4	4	4	20,5	26,79	0,012	0,362
P27824	Calnexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CANX PE=1 SV=2	4	4	67,5	25,8	0,262	0,848
A0A7P0TAE9	Calnexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CANX PE=1 SV=1	4	4	71,3	25,8	0,286	0,672
P04899	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNAI2 PE=1 SV=3	4	3	40,4	25,73	0,015	0,318
P21589	5'-nucleotidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NT5E PE=1 SV=1	11	11	63,3	25,67	0,01	0,281

P20339	Ras-related protein Rab-5A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB5A PE=1 SV=2	3	2	23,6	23,78	26,228	1,463
Q92743	Serine protease HTRA1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HTRA1 PE=1 SV=1	6	6	51,3	23	0,01	0,343
Q5JWE9	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNAS PE=1 SV=3	4	3	109,5	22,52	0,119	0,268
O75369	Filamin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNB PE=1 SV=2	15	13	278	22,49	0,034	0,683
Q92736	Ryanodine receptor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RYP2 PE=1 SV=3	2	2	564,2	22,38	0,02	0,686
Q6NZI2	Caveolae-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAVIN1 PE=1 SV=1	4	4	43,5	22,21	0,056	1,591
P02751	Fibronectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FN1 PE=1 SV=5	13	13	272,2	20,82	0,019	0,119
Q5JWF2	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNAS PE=1 SV=2	4	3	111	20,7	0,106	0,399
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2A2 PE=1 SV=1	9	9	114,7	19,97	1,946	3,861
O94905	Erlin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERLIN2 PE=1 SV=1	7	7	37,8	19,58	1,007	0,978
P61224	Ras-related protein Rap-1b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAP1B PE=1 SV=1	5	5	20,8	17,56	0,589	1,46
A0A087WVQ6	Clathrin heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLTC PE=1 SV=1	16	16	191,9	16,52	0,098	0,797
Q8WUD1	Ras-related protein Rab-2B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB2B PE=1 SV=1	3	3	24,2	16,26	0,231	0,357
P26038	Moesin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MSN PE=1 SV=3	6	6	67,8	15,59	0,01	0,838
P13671	Complement component C6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C6 PE=1 SV=3	1	1	104,7	15,05	0,028	0,156
Q9UJS0	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A13 PE=1 SV=2	14	14	74,1	14,23	1,23	

P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5PO PE=1 SV=1	3	3	23,3	13,56	0,857	0,01
P62491	Ras-related protein Rab-11A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB11A PE=1 SV=3	3	3	24,4	13,39		2,821
P13639	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF2 PE=1 SV=4	5	5	95,3	12,77	0,885	2,145
H0YCV9	CD44 antigen (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD44 PE=1 SV=2	1	1	30,6	12,16	0,01	1,756
P02786	Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TFRC PE=1 SV=2	10	10	84,8	11,83	3,72	6,989
P01008	Antithrombin-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	2	2	52,6	11,62	0,01	0,273
J3QQV2	Monocarboxylate transporter 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC16A3 PE=1 SV=9	2	2	44,4	11,2	0,01	0,112
E7EUI6	Integrin beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGB1 PE=1 SV=2	5	5	88,7	11,19	0,01	0,01
Q9UHQ9	NADH-cytochrome b5 reductase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5R1 PE=1 SV=1	4	4	34,1	11,05	0,106	0,219
Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT17 PE=1 SV=2	5	2	48,1	10,64	0,001	0,001
O43150	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ASAP2 PE=1 SV=3	1	1	111,6	10,49	14,501	17,996
D9J307	HLA class I antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HLA-B PE=1 SV=1	2	2	40,4	10,35	0,01	18,871
A0A140T953	HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HLA-B PE=1 SV=1	2	1	27,7	10,35		100
A0A1W2PSE7	HLA class I histocompatibility antigen, A alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HLA-A PE=1 SV=1	2	1	40,7	10,35	0,01	13,447
P61106	Ras-related protein Rab-14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB14 PE=1 SV=4	5	4	23,9	10,25		0,07

X6RFL8	Ras-related protein Rab-14 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB14 PE=1 SV=1	4	3	20,4	10,25	0,128	0,055
P04004	Vitronectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VTN PE=1 SV=1	1	1	54,3	10,09	0,01	0,746
F5GY37	Prohibitin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHB2 PE=1 SV=1	5	5	29,7	9,92	0,001	2,078
P01031	Complement C5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C5 PE=1 SV=4	4	4	188,2	9,85	0,01	0,175
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA6 PE=1 SV=1	4	4	48,1	9,76	3,087	0,085
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IQGAP1 PE=1 SV=1	9	9	189,1	9,64	1,506	1,751
P33121	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSL1 PE=1 SV=1	5	5	77,9	9,35	0,01	0,216
B7Z3Z9	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSL1 PE=1 SV=1	3	3	58,5	9,35	0,01	0,01
P16144	Integrin beta-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGB4 PE=1 SV=5	8	8	202	9,17	0,112	0,471
P27105	Stomatin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STOM PE=1 SV=3	5	5	31,7	9,04	0,27	0,656
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VDAC1 PE=1 SV=2	5	5	30,8	8,34	0,329	0,288
Q9UJZ1	Stomatin-like protein 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STOML2 PE=1 SV=1	2	2	38,5	8,26	1,351	1,75
P10620	Microsomal glutathione S-transferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MGST1 PE=1 SV=1	1	1	17,6	8,12	0,01	0,271
Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ESYT1 PE=1 SV=1	4	4	122,8	7,8	0,099	1,998
A0A804HI25	7-dehydrocholesterol reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHCR7 PE=4 SV=1	2	2	56,3	7,25	28,919	1,434
Q59FP8	Neogenin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NEO1 PE=1 SV=1	1	1	123,9	7,22	0,01	0,727

P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AZGP1 PE=1 SV=2	2	2	34,2	6,89	5,791	1,753
P14923	Junction plakoglobin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=JUP PE=1 SV=3	3	3	81,7	6,62	1,484	10,105
P19012	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT15 PE=1 SV=3	4	1	49,2	6,62	0,001	0,001
P12814	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=1 SV=2	5	5	103	6,41	0,01	0,01
A0A7I2V4Y4	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=1 SV=1	4	4	103,5	6,41	0,01	0,01
Q8WVM8	Sec1 family domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCFD1 PE=1 SV=4	2	2	72,3	6,29	4,96	0,681
A0A7I2V3Y3	Sec1 family domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCFD1 PE=1 SV=1	1	1	12,1	6,29	6,037	0,472
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CKAP4 PE=1 SV=2	6	6	66	5,96	0,119	0,582
Q14315	Filamin-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNC PE=1 SV=3	3	2	290,8	5,89	0,01	26,587
P04083	Annexin A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA1 PE=1 SV=2	2	2	38,7	5,71	0,01	0,533
O15260	Surfeit locus protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SURF4 PE=1 SV=3	2	2	30,4	5,63	1,037	0,01
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSD17B10 PE=1 SV=3	8	8	26,9	5,42	3,274	1,465
E9PDF6	Unconventional myosin-Ib OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1B PE=1 SV=1	6	6	128,4	5,11	0,01	1,727
P07357	Complement component C8 alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C8A PE=1 SV=2	1	1	65,1	5,07	0,01	0,01
Q96TA1	Protein Niban 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NIBAN2 PE=1 SV=3	1	1	84,1	4,76	0,01	1,688
Q9NQC3	Reticulon-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTN4 PE=1 SV=2	3	3	129,9	4,71	0,602	0,085

P63010	AP-2 complex subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AP2B1 PE=1 SV=1	2	2	104,5	4,67	1,921	0,01
A0A087WYD1	AP-2 complex subunit beta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AP2B1 PE=1 SV=1	3	3	70,9	4,67	2,328	0,01
Q16658	Fascin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FSCN1 PE=1 SV=3	1	1	54,5	4,55	1000	
P08865	40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPSA PE=1 SV=4	3	3	32,8	4,44		0,759
Q8NF37	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LPCAT1 PE=1 SV=2	1	1	59,1	4,36	100	
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EHD2 PE=1 SV=2	3	2	61,1	4,36	0,01	0,01
M0R1V7	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBA52 PE=1 SV=1	2	2	7,1	4,26	0,152	0,369
Q9Y3L5	Ras-related protein Rap-2c OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAP2C PE=1 SV=1	3	3	20,7	4,25	13,389	2,052
Q9NP72	Ras-related protein Rab-18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB18 PE=1 SV=1	4	4	23	4,1	4,27	1,028
Q5D862	Filaggrin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLG2 PE=1 SV=1	1	1	247,9	4,08	0,698	3,438
M0R019	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=8	1	1	37,6	4,06	0,001	0,001
Q14728	Major facilitator superfamily domain-containing protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MFSD10 PE=1 SV=1	1	1	48,3	3,97	100	
D6RIZ4	Major facilitator superfamily domain-containing protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MFSD10 PE=1 SV=1	1	1	38,2	3,97	100	
P00533	Epidermal growth factor receptor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EGFR PE=1 SV=2	3	2	134,2	3,89	0,01	0,775
Q96E17	Ras-related protein Rab-3C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB3C PE=1 SV=1	4	1	25,9	3,84	100	
P20340	Ras-related protein Rab-6A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB6A PE=1 SV=3	4	3	23,6	3,84	1,051	0,179

O95716	Ras-related protein Rab-3D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB3D PE=1 SV=1	5	2	24,3	3,84	0,455	0,378
P60953	Cell division control protein 42 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDC42 PE=1 SV=2	2	2	21,2	3,83	0,365	5,124
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNG12 PE=1 SV=3	1	1	8	3,82	0,01	0,01
Q15019	Septin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN2 PE=1 SV=1	5	5	41,5	3,76	0,01	0,01
M0QXM4	Amino acid transporter OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC1A5 PE=1 SV=1	3	3	39,4	3,72	0,111	1,632
Q96S97	Myeloid-associated differentiation marker OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYADM PE=1 SV=2	2	2	35,3	3,69	0,01	1,084
P00734	Prothrombin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F2 PE=1 SV=2	1	1	70	3,69	0,01	0,064
C9JJV6	Myeloid-associated differentiation marker (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYADM PE=1 SV=8	1	1	15,9	3,69	0,01	0,914
Q9NZM1	Myoferlin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYOF PE=1 SV=1	4	4	234,6	3,66	0,01	0,41
Q8N271	Prominin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROM2 PE=1 SV=1	1	1	91,8	3,65	0,01	1,342
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC5 PE=1 SV=3	3	3	82,7	3,62	0,39	0,694
Q6YHK3	CD109 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD109 PE=1 SV=2	4	4	161,6	3,59	0,01	0,187
A0A2R8Y738	Ribosomal protein L15 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL15 PE=1 SV=1	1	1	16,3	3,43	0,001	0,001
P55290	Cadherin-13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDH13 PE=1 SV=1	2	2	78,2	3,37	0,01	0,01
Q8WU76	Sec1 family domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCFD2 PE=1 SV=2	1	1	75,1	3,35	0,01	0,01
Q7Z5H4	Vomeroneasal type-1 receptor 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VN1R5 PE=2 SV=2	2	2	40,8	3,22	1,007	12,749

Q9ULV4	Coronin-1C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CORO1C PE=1 SV=1	3	3	53,2	3,08	0,01	2,012
B4E3S0	Coronin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CORO1C PE=1 SV=1	3	3	41,6	3,08	0,01	0,745
Q96BM9	ADP-ribosylation factor-like protein 8A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARL8A PE=1 SV=1	3	3	21,4	2,59	0,404	0,402
P60903	Protein S100-A10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A10 PE=1 SV=2	1	1	11,2	2,38	0,01	0,438
F8W7U0	Intersectin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITSN1 PE=1 SV=1	1	1	129,9	2,35		100
Q9C037	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM4 PE=1 SV=2	1	1	57,4	2,23	0,01	0,297
P10643	Complement component C7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C7 PE=1 SV=2	1	1	93,5	2,19	0,01	0,23
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ASPH PE=1 SV=3	1	1	85,8	2,19	0,01	0,01
P05121	Plasminogen activator inhibitor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINE1 PE=1 SV=1	3	3	45	2,15	0,01	0,893
P01024	Complement C3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C3 PE=1 SV=2	1	1	187	2,15	0,01	0,01
C9JLM5	Serpin B5 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINB5 PE=1 SV=1	2	2	14,3	2,15	0,01	0,01
A0A1B0GU58	Propanoyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit alpha (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCCA PE=1 SV=1	3	3	67,3	2,03	0,001	0,033
P36406	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM23 PE=1 SV=1	1	1	64	1,99	0,01	7,476
B4DSN5	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTPN1 PE=1 SV=1	1	1	41,2	1,92	0,215	4,35
G3V1Q4	Septin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN7 PE=1 SV=2	3	3	46,5	1,91	0,01	0,01
A0A0U1RRH9	Septin-7 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN7 PE=1 SV=1	2	2	16,5	1,91	0,01	1,675

A0A499FIX8	Extended synaptotagmin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ESYT2 PE=1 SV=1	2	2	93,9	1,86	0,01	1,038
Q14573	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITPR3 PE=1 SV=2	1	1	303,9	1,84	0,01	0,01
Q5T8U3	60S ribosomal protein L7a (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL7A PE=1 SV=1	1	1	21,5	1,84	0,001	0,001
Q5T9A4	ATPase family AAA domain-containing protein 3B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD3B PE=1 SV=1	2	2	72,5	1,79	0,482	0,116
P07996	Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=THBS1 PE=1 SV=2	2	2	129,3	1,78		20,697
P07814	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPRS1 PE=1 SV=5	3	3	170,5	1,77	0,01	0,01
A0A7I2YQG2	Ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL19 PE=1 SV=1	1	1	25,7	1,77	0,001	0,001
H0YFD6	Enoyl-CoA hydratase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HADHA PE=1 SV=2	1	1	86,3	1,75	0,001	0,001
P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAMPT PE=1 SV=1	6	6	55,5	1,74		47,692
A0A0C4DH29	Immunoglobulin heavy variable 1-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHV1-3 PE=3 SV=1	1	1	13	1,73	0,01	0,01
A0A2R8Y5S7	Radixin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RDY PE=1 SV=1	1	1	69,3	1,69	0,001	0,343
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LDHA PE=1 SV=2	1	1	36,7	1,66	0,001	0,001
E9PQM1	Cathepsin B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSB PE=1 SV=2	1	1	31,3	1,65	0,01	0,01
Q9Y490	Talin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TLN1 PE=1 SV=3	4	4	269,6	1,63	0,055	4,729
P20020	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2B1 PE=1 SV=4	1	1	134,6	1,62		100
P10301	Ras-related protein R-Ras OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRAS PE=1 SV=1	1	1	23,5	1,6	0,01	0,01

P15924	Desmoplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSP PE=1 SV=3	1	1	331,6	0	100	
Q86UQ4	ATP-binding cassette sub-family A member 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCA13 PE=2 SV=3	1	1	575,8	0	100	
P07237	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=3	1	1	57,1	0	100	100
Q99985	Semaphorin-3C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEMA3C PE=2 SV=2	1	1	85,2	0	100	
Q96DR8	Mucin-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MUCL1 PE=1 SV=1	1	1	9	0	100	100
Q6N022	Teneurin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TENM4 PE=1 SV=2	1	1	307,8	0	100	
J3KR82	Polo-like kinase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLK4 PE=1 SV=1	1	1	100	0	100	
P05109	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A8 PE=1 SV=1	1	1	10,8	0	100	100
P35221	Catenin alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTNNA1 PE=1 SV=1	1	1	100	0	100	
P01834	Immunoglobulin kappa constant OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGKC PE=1 SV=2	1	1	11,8	0	100	100
O14924	Regulator of G-protein signaling 12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RGS12 PE=1 SV=1	1	1	156,3	0	100	100
Q9Y5I0	Protocadherin alpha-13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCDHA13 PE=2 SV=1	1	1	102,4	0	100	
Q7RTY1	Monocarboxylate transporter 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC16A9 PE=1 SV=1	1	1	55,8	0	100	
Q8N3K9	Cardiomyopathy-associated protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CMYA5 PE=1 SV=3	2	2	448,9	0	100	
Q02413	Desmoglein-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSG1 PE=1 SV=2	3	3	113,7	0	100	100
P53618	Coatomer subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPB1 PE=1 SV=3	2	2	107,1	0	100	

Q9NY47	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CACNA2D2 PE=1 SV=2	1	1	129,7	0	100	
P46019	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, liver isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHKA2 PE=1 SV=1	1	1	138,3	0	100	
Q8IZQ1	WD repeat and FYVE domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDFY3 PE=1 SV=2	1	1	395	0	100	
Q08554	Desmocollin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSC1 PE=1 SV=2	1	1	99,9	0	100	
Q7Z4W1	L-xylulose reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCXR PE=1 SV=2	1	1	25,9	0	100	
Q15125	3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EBP PE=1 SV=3	1	1	26,3	0	100	
O94832	Unconventional myosin-Id OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1D PE=1 SV=2	1	1	116,1	0	100	
Q8WWY8	Lipase member H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LIPH PE=1 SV=1	1	1	50,8	0	100	100
Q5T321	Neurobeachin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NBEA PE=1 SV=2	1	1	330,2	0	100	
O95197	Reticulon-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTN3 PE=1 SV=2	1	1	112,5	0	100	
O14920	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IKBKB PE=1 SV=1	1	1	86,5	0	100	
A6NN92	Putative gap junction epsilon-1 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GJE1 PE=5 SV=1	1	1	23,7	0	100	
Q69384	Endogenous retrovirus group K member 6 Env polyprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERVK-6 PE=1 SV=1	1	1	79,2	0	100	
Q92851	Caspase-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CASP10 PE=1 SV=3	1	1	58,9	0	100	
O75445	Usherin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USH2A PE=1 SV=3	1	1	575,2	0	100	
Q96EY1	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAJA3 PE=1 SV=2	1	1	52,5	0	100	

Q9UKE5	TRAF2 and NCK-interacting protein kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNIK PE=1 SV=1	1	1	154,8	0	100		
O15068	Guanine nucleotide exchange factor DBS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCF2L PE=1 SV=2	1	1	128	0	100		
Q14392	Transforming growth factor beta activator LRRC32 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRC32 PE=1 SV=1	1	1	71,9	0	100		
Q00341	Vigilin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDLBP PE=1 SV=2	1	1	141,4	0	100		
E7EUB5	DNA repair protein-complementing XP-C cells (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XPC PE=1 SV=1	1	1	18,6	0	100		
Q9Y597	BTB/POZ domain-containing protein KCTD3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KCTD3 PE=1 SV=2	1	1	88,9	0	94,4	2,686	
Q9UBN4	Short transient receptor potential channel 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPC4 PE=1 SV=1	1	1	112	0	47,219	0,01	
P01116	GTPase KRas OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRAS PE=1 SV=1	2	2	21,6	0	31,763	0,01	
O75691	Small subunit processome component 20 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UTP20 PE=1 SV=3	1	1	318,2	0	29,929	7,842	
Q04917	14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAH PE=1 SV=4	1	1	28,2	0	15,424	0,01	
Q15517	Corneodesmosin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDSN PE=1 SV=3	1	1	51,5	0	14,959	0,01	
O76062	Delta(14)-sterol reductase TM7SF2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TM7SF2 PE=1 SV=3	1	1	46,4	0	14,927	0,01	
Q5BJF2	Sigma intracellular receptor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM97 PE=1 SV=1	1	1	20,8	0	11,815	0,01	
Q8IV04	Carabin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBC1D10C PE=1 SV=1	1	1	49,7	0	10,274	25,752	
P51157	Ras-related protein Rab-28 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB28 PE=1 SV=2	1	1	24,8	0	6,711	4,311	
P49327	Fatty acid synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FASN PE=1 SV=3	14	14	273,3	0	4,36	0,01	

P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP1A1 PE=1 SV=1	6	6	112,8	0	3,023	0,572
Q9BQ39	ATP-dependent RNA helicase DDX50 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX50 PE=1 SV=1	2	2	82,5	0	3,015	1,736
Q9UL25	Ras-related protein Rab-21 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB21 PE=1 SV=3	1	1	24,3	0	2,52	0,585
P06702	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A9 PE=1 SV=1	3	3	13,2	0	1,763	1,159
O60641	Clathrin coat assembly protein AP180 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNAP91 PE=1 SV=2	1	1	92,4	0	1,16	4,13
P10586	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTPRF PE=1 SV=2	1	1	212,7	0	1,105	0,048
Q14160	Protein scribble homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCRIB PE=1 SV=4	1	1	174,8	0	0,957	0,01
Q8I WV2	Contactin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNTN4 PE=1 SV=1	1	1	113,4	0	0,874	46,508
P51172	Amiloride-sensitive sodium channel subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCNN1D PE=1 SV=3	1	1	87,8	0	0,852	0,637
Q9C0E4	Glutamate receptor-interacting protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GRIP2 PE=1 SV=4	1	1	112,5	0	0,529	0,118
C9JZR2	Catenin delta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTNND1 PE=1 SV=2	2	2	104,8	0	0,416	0,01
F8WBY4	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP1B3 PE=1 SV=1	1	1	5	0	0,208	0,166
Q9NZB2	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM120A PE=1 SV=2	1	1	121,8	0	0,058	0,01
Q9Y493	Zonadhesin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZAN PE=2 SV=5	1	1	305,4	0	0,015	0,212
J3QLU9	Receptor protein-tyrosine kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERBB2 PE=1 SV=1	2	1	117	0	0,012	0,01
Q15165	Serum paraoxonase/arylesterase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PON2 PE=1 SV=4	1	1	39,4	0	0,01	0,01

G3V1L9	Tight junction protein ZO-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TJP1 PE=1 SV=2	1	1	208,2	0	0,01	0,01
P98161	Polycystin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKD1 PE=1 SV=3	1	1	462,2	0	0,01	0,01
Q9Y5E8	Protocadherin beta-15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCDHB15 PE=2 SV=1	1	1	86,3	0	0,01	13,399
O95810	Caveolae-associated protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAVIN2 PE=1 SV=3	1	1	47,1	0	0,01	0,01
Q92597	Protein NDRG1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDRG1 PE=1 SV=1	1	1	42,8	0	0,01	0,01
Q14254	Flotillin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLOT2 PE=1 SV=2	1	1	47	0	0,01	0,01
A4D1S5	Ras-related protein Rab-19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB19 PE=1 SV=2	1	1	24,4	0	0,01	2,78
P09211	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSTP1 PE=1 SV=2	1	1	23,3	0	0,01	0,01
P0DP72	V-set and immunoglobulin domain-containing protein 10-like 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VSIG10L2 PE=3 SV=1	1	1	81,6	0	0,01	0,01
Q16552	Interleukin-17A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL17A PE=1 SV=1	1	1	17,5	0	0,01	0,01
P09429	High mobility group protein B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGB1 PE=1 SV=3	1	1	24,9	0	0,01	0,01
P06703	Protein S100-A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A6 PE=1 SV=1	1	1	10,2	0	0,01	0,01
Q86TC9	Myopalladin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYPN PE=1 SV=2	1	1	145,2	0	0,01	0,01
Q8TCT9	Minor histocompatibility antigen H13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HM13 PE=1 SV=1	2	2	41,5	0	0,01	1,576
Q9BQG1	Synaptotagmin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYT3 PE=1 SV=1	1	1	63,3	0	0,01	0,01
Q8N1I0	Dedicator of cytokinesis protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DOCK4 PE=1 SV=3	1	1	225,1	0	0,01	0,01

Q14126	Desmoglein-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSG2 PE=1 SV=2	2	2	122,2	0	0,01	0,01
Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAP1 PE=1 SV=5	2	2	51,9	0	0,01	0,01
P26006	Integrin alpha-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGA3 PE=1 SV=5	2	2	116,5	0	0,01	0,01
P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMED10 PE=1 SV=2	1	1	25	0	0,01	0,01
B1AQK7	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CACNA1B PE=1 SV=1	1	1	262,2	0	0,01	0,01
Q9UPT5	Exocyst complex component 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EXOC7 PE=1 SV=3	1	1	83,3	0	0,01	4,367
H0YI78	Kinesin-like protein KIF21A (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF21A PE=1 SV=1	1	1	71,4	0	0,01	15,348
Q9HBM0	Vezatin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VEZT PE=1 SV=3	1	1	88,6	0	0,01	0,01
P19022	Cadherin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDH2 PE=1 SV=4	2	2	99,7	0	0,01	0,01
A0A024R571	EH domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EHD1 PE=1 SV=1	4	3	61,9	0	0,01	
P24723	Protein kinase C eta type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKCH PE=1 SV=4	1	1	77,8	0	0,01	0,01
P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGDIA PE=1 SV=3	1	1	23,2	0	0,01	0,01
A0A140T9R1	Flotillin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLOT1 PE=1 SV=1	2	2	39,8	0	0,01	48,144
P09958	Furin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FURIN PE=1 SV=2	1	1	86,6	0	0,01	0,01
P35670	Copper-transporting ATPase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP7B PE=1 SV=4	1	1	157,2	0	0,01	0,01
P62070	Ras-related protein R-Ras2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRAS2 PE=1 SV=1	1	1	23,4	0	0,01	7,61

Q8NBX0	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCCPDH PE=1 SV=1	1	1	47,1	0	0,01	0,01
Q9GZP1	Neurensin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NRSN2 PE=1 SV=1	1	1	22	0	0,01	0,01
Q969N4	Trace amine-associated receptor 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAAR8 PE=2 SV=1	1	1	38	0	0,01	0,01
P98160	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPG2 PE=1 SV=4	1	1	468,5	0	0,01	0,01
K7EKI0	Envoplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EVPL PE=1 SV=1	1	1	233,7	0	0,01	0,416
Q13094	Lymphocyte cytosolic protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LCP2 PE=1 SV=1	1	1	60,2	0	0,01	0,01
P12259	Coagulation factor V OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F5 PE=1 SV=4	2	2	251,5	0	0,01	0,319
Q16720	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2B3 PE=1 SV=3	1	1	134,1	0	0,01	1,84
P21579	Synaptotagmin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYT1 PE=1 SV=1	1	1	47,5	0	0,01	0,01
O00299	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLIC1 PE=1 SV=4	2	2	26,9	0	0,01	0,724
Q3V6T2	Girdin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC88A PE=1 SV=2	1	1	215,9	0		
Q96AD5	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PNPLA2 PE=1 SV=1	1	1	55,3	0		100
P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1CB PE=1 SV=3	3	3	37,2	0		0,01
Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPYSL2 PE=1 SV=1	1	1	62,3	0		
P20702	Integrin alpha-X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGAX PE=1 SV=3	1	1	127,7	0		
Q05901	Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHRNA3 PE=2 SV=2	1	1	52,7	0		

B8ZZB3	Coiled-coil domain-containing protein 141 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC141 PE=1 SV=1	1	1	74,6	0	
Q9NY99	Gamma-2-syntrophin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNTG2 PE=1 SV=2	1	1	60,2	0	100
Q8TE67	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPS8L3 PE=1 SV=2	1	1	66,8	0	
Q9H9J2	39S ribosomal protein L44, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRPL44 PE=1 SV=1	1	1	37,5	0	
A6NJW9	T-cell surface glycoprotein CD8 beta-2 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD8B2 PE=3 SV=3	1	1	23,7	0	
Q6UXY1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BAIAP2L2 PE=1 SV=1	1	1	59	0	100
Q01469	Fatty acid-binding protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FABP5 PE=1 SV=3	1	1	15,2	0	
O75915	PRA1 family protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARL6IP5 PE=1 SV=1	1	1	21,6	0	
Q9NZP5	Olfactory receptor 5AC2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OR5AC2 PE=3 SV=2	1	1	35,3	0	
Q8IZD2	Inactive histone-lysine N-methyltransferase 2E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KMT2E PE=1 SV=1	1	1	204,8	0	100
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TGM2 PE=1 SV=2	1	1	77,3	0	100
O60469	Down syndrome cell adhesion molecule OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSCAM PE=1 SV=2	1	1	222,1	0	
Q06481	Amyloid beta precursor like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APLP2 PE=1 SV=2	1	1	86,9	0	
P17655	Calpain-2 catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPN2 PE=1 SV=6	1	1	79,9	0	
P16452	Protein 4.2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPB42 PE=1 SV=3	1	1	77	0	100

Q96LB4	V-type proton ATPase subunit G 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP6V1G3 PE=1 SV=1	1	1	13,9	0	
P35968	Vascular endothelial growth factor receptor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KDR PE=1 SV=2	1	1	151,4	0	
Q9UPN3	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MACF1 PE=1 SV=4	1	1	837,8	0	100
A2A376	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX58 PE=1 SV=1	1	1	82,6	0	100
P51159	Ras-related protein Rab-27A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB27A PE=1 SV=3	1	1	24,9	0	
O43448	Voltage-gated potassium channel subunit beta-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNAB3 PE=1 SV=2	1	1	43,6	0	
Q96PJ5	Fc receptor-like protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FCRL4 PE=1 SV=1	1	1	57,2	0	
P49619	Diacylglycerol kinase gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DGKG PE=1 SV=3	1	1	89,1	0	
A6NGQ3	Non-specific serine/threonine protein kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OBSCN PE=1 SV=5	1	1	972,4	0	
P07359	Platelet glycoprotein Ib alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GP1BA PE=1 SV=2	1	1	71,5	0	100
Q96CW1	AP-2 complex subunit mu OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AP2M1 PE=1 SV=2	1	1	49,6	0	
P16066	Atrial natriuretic peptide receptor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPR1 PE=1 SV=1	1	1	118,8	0	100
Q8NG84	Olfactory receptor 2AK2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OR2AK2 PE=2 SV=2	1	1	37,7	0	
Q9NYQ7	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CELSR3 PE=1 SV=2	1	1	358	0	
Q07343	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDE4B PE=1 SV=1	1	1	83,3	0	1000

P35580	Myosin-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH10 PE=1 SV=3	1	1	228,9	0	1000	
A0A0A0MRB5	MAP kinase-activating death domain protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MADD PE=1 SV=1	1	1	176,4	0	1000	
P19878	Neutrophil cytosol factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCF2 PE=1 SV=2	1	1	59,7	0	1000	1000
Q92637	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor IB OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FCGR1B PE=2 SV=1	1	1	32,2	0	1000	
Q9P0L2	Serine/threonine-protein kinase MARK1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MARK1 PE=1 SV=2	1	1	88,9	0	1000	
Q8WZA2	Rap guanine nucleotide exchange factor 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAPGEF4 PE=1 SV=1	1	1	115,4	0	1000	
P35414	Apelin receptor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APLNR PE=1 SV=1	1	1	42,6	0	1000	
P04437	T cell receptor alpha variable 29/delta variable 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRAV29DV5 PE=1 SV=2	1	1	13,4	0	1000	
Q9NR96	Toll-like receptor 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TLR9 PE=1 SV=2	1	1	115,8	0	1000	
Q9Y4G6	Talin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TLN2 PE=1 SV=4	1	1	271,4	0	1000	
P16885	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLCG2 PE=1 SV=4	1	1	147,8	0	1000	
P04629	High affinity nerve growth factor receptor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NTRK1 PE=1 SV=4	1	1	87,4	0	1000	
Q8TEH3	DENN domain-containing protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DENND1A PE=1 SV=2	1	1	110,5	0	1000	
Q8N4T4	Rho guanine nucleotide exchange factor 39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGEF39 PE=1 SV=1	1	1	38,3	0	1000	
Q14008	Cytoskeleton-associated protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CKAP5 PE=1 SV=3	1	1	225,4	0	1000	
P35125	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP6 PE=1 SV=2	1	1	158,6	0	1000	

Q14141	Septin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN6 PE=1 SV=4	1	1	49,7	0	1000	
P08134	Rho-related GTP-binding protein RhoC OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RHOC PE=1 SV=1	1	1	22	0	0,001	0,001
Q4KWH8	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLCH1 PE=1 SV=1	1	1	189,1	0	0,001	0,001
Q9NRJ7	Protocadherin beta-16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCDHB16 PE=1 SV=4	1	1	84,9	0	0,001	0,001
J3KS13	Clathrin heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLTC PE=1 SV=1	1	1	70,6	0	0,001	0,001
C9JD32	60S ribosomal protein L23 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23 PE=1 SV=1	1	1	9,7	0	0,001	0,001
Q14244	Ensconsin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP7 PE=1 SV=1	1	1	84	0	0,001	0,001
E9PKZ0	60S ribosomal protein L8 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL8 PE=1 SV=1	1	1	22,4	0	0,001	0,001
Q9HAV0	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNB4 PE=1 SV=3	1	1	37,5	0	0,001	0,001
A0A3B3ITX4	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=3 SV=1	1	1	10,4	0	0,001	0,001
J3QQQ9	KOW domain-containing protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=3 SV=1	1	1	12,7	0	0,001	0,001
P18085	ADP-ribosylation factor 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARF4 PE=1 SV=3	2	2	20,5	0	0,001	0,746
O60488	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSL4 PE=1 SV=2	1	1	79,1	0	0,001	0,001
O60279	Sushi domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUSD5 PE=1 SV=3	1	1	68	0	0,001	0,001
F5GZQ3	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HADHB PE=1 SV=1	1	1	49,6	0	0,001	0,001
Q96QB1	Rho GTPase-activating protein 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLC1 PE=1 SV=4	1	1	170,5	0		

Q9HBY0	NADPH oxidase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOX3 PE=1 SV=1	1	1	64,9	0		
Q8NB49	Phospholipid-transporting ATPase IG OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP11C PE=1 SV=3	1	1	129,4	0		
Q6IE81	Protein Jade-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=JADE1 PE=1 SV=1	1	1	95,5	0		
Q5VZE5	N-alpha-acetyltransferase 35, NatC auxiliary subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAA35 PE=1 SV=1	1	1	83,6	0		
Q8TCU6	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PREX1 PE=1 SV=3	1	1	186,1	0		
P07911	Uromodulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UMOD PE=1 SV=1	1	1	69,7	0		
Q86YZ3	Hornerin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HRNR PE=1 SV=2	1	1	282,2	0		
A0AVI2	Fer-1-like protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FER1L5 PE=2 SV=3	1	1	237,8	0		
A0A087WUD2	Enhancer of filamentation 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NEDD9 PE=1 SV=1	1	1	76,5	0		
Q13237	cGMP-dependent protein kinase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKG2 PE=1 SV=1	1	1	87,4	0	0,01	0,01
H3BUX1	Mesothelin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MSLN PE=1 SV=1	1	1	43,8	0	0,01	0,01
Q3KR16	Pleckstrin homology domain-containing family G member 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEKHG6 PE=1 SV=3	1	1	88,9	0		100
Q3MHB9	Short transient receptor potential channel 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPC4 PE=1 SV=1	1	1	53,1	0	54,385	0,01
P57735	Ras-related protein Rab-25 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB25 PE=1 SV=2	1	1	23,5	0	100	
A0A0C4DG79	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM120A PE=1 SV=1	1	1	54,2	0	0,456	0,01
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL6A3 PE=1 SV=5	1	1	343,5	0	100	

E7ESF6	Lymphocyte cytosolic protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LCP2 PE=1 SV=1	1	1	36,8	0	0,01	0,01
H0YDG2	Guanine nucleotide exchange factor VAV3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VAV3 PE=1 SV=1	1	1	71,5	0	0,01	6,225
A0A0A0MSB8	Exocyst complex component 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EXOC7 PE=1 SV=1	1	1	78,8	0	0,127	1,373
A0A0D9SF54	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTAN1 PE=1 SV=1	1	1	282,7	0	0,01	0,01
Q16513	Serine/threonine-protein kinase N2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKN2 PE=1 SV=1	1	1	112	0	0,01	3,39
E9PP73	Coatomer subunit beta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPB1 PE=1 SV=8	1	1	55,4	0	100	
C9J9S3	Serine/threonine-protein phosphatase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1CB PE=1 SV=1	2	2	14,3	0		0,01
O00526	Uroplakin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UPK2 PE=1 SV=2	1	1	19,4	0	0,01	0,01
O14975	Very long-chain acyl-CoA synthetase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC27A2 PE=1 SV=2	1	1	70,3	0	100	
E5RGM8	Sodium-dependent phosphate transporter 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC20A2 PE=1 SV=1	1	1	11,1	0	0,01	0,01
Q5JWQ6	Neuropilin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NRP1 PE=1 SV=1	1	1	81,9	0	0,01	0,01
A0A7I2ST14	N-myc downstream-regulated gene 1 protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDRG1 PE=1 SV=1	1	1	42	0	0,01	0,01
B3KWW1	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX58 PE=2 SV=1	1	1	98	0	0,01	13,667
H3BVH7	Ras-related protein Rab-27A (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB27A PE=1 SV=1	1	1	16,7	0		
Q5T7C4	High mobility group protein B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGB1 PE=1 SV=1	2	2	18,3	0	0,01	0,01
P36269	Glutathione hydrolase 5 proenzyme OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GGT5 PE=1 SV=2	1	1	62,2	0	100	

F5H385	Zinc transporter ZIP3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC39A3 PE=1 SV=1	1	1	34,5	0		
A0A087WX15	Glutamate receptor-interacting protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GRIP2 PE=1 SV=1	1	1	122,7	0	0,584	0,087
E5RHK9	Clathrin coat assembly protein AP180 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNAP91 PE=1 SV=1	1	1	13,2	0	0,01	7,678
I3L4I8	Voltage-gated potassium channel subunit beta-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNAB3 PE=1 SV=1	1	1	10	0		100
A0A2R8Y7B1	Girdin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC88A PE=1 SV=1	1	1	185,4	0	0,01	0,578
F5H7B7	ATP-binding cassette sub-family A member 13 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCA13 PE=1 SV=2	1	1	266,8	0	100	
A0A669KB89	Protein scribble homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCRIB PE=1 SV=1	1	1	177,7	0	1,139	0,01
H0Y566	BTB/POZ domain-containing protein KCTD3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KCTD3 PE=1 SV=1	1	1	23,5	0	94,329	0,01
A0A7I2V3Z3	Importin subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNA2 PE=1 SV=1	1	1	43,5	0	0,01	1,956
J3KS22	L-xylulose reductase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCXR PE=1 SV=8	1	1	23,8	0	100	
A0A0G2JS82	AP-2 complex subunit alpha-2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AP2A2 PE=1 SV=1	1	1	101,6	0	1,961	7,26
Q86X91	Inactive tyrosine-protein kinase 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTK7 PE=1 SV=1	1	1	50,4	0		
A0A0S2Z6F0	Histocompatibility 13 isoform 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HM13 PE=1 SV=1	2	2	38	0	0,195	1,371
A0A0C4DGV8	Semaphorin-3B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEMA3B PE=1 SV=1	1	1	83,6	0		100
H0Y380	Protein-tyrosine-phosphatase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTPRF PE=1 SV=1	1	1	111,1	0	9,37	0,267

A6NMN0	Phosphorylase b kinase regulatory subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHKA1 PE=1 SV=1	1	1	139	0		
I3L3M4	Claudin OS=Homo sapiens OX=9606 PE=3 SV=1	1	1	8,8	0		
A0A7I2V4A6	Citron Rho-interacting kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CIT PE=1 SV=1	1	1	179,5	0	0,01	0,01
Q5T0R1	Adenylyl cyclase-associated protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAP1 PE=1 SV=1	1	1	23,9	0		
J3KRL0	Unconventional myosin-Id OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1D PE=1 SV=1	1	1	49,7	0	100	
H0YEN6	Delta(14)-sterol reductase TM7SF2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TM7SF2 PE=1 SV=1	1	1	23,3	0	17,431	0,01
Q5T5M1	Aquaporin-7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AQP7 PE=1 SV=1	1	1	37	0		
P19526	Galactoside alpha-(1,2)-fucosyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUT1 PE=1 SV=1	1	1	41,2	0	100	
G3V4H0	Protein kinase C eta type (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKCH PE=1 SV=1	1	1	5,6	0	0,01	0,01
Q02846	Retinal guanylyl cyclase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GUCY2D PE=1 SV=2	1	1	120	0		
P08758	Annexin A5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA5 PE=1 SV=2	2	2	35,9	0		100
A2IBA6	Lipase member H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LIPH PE=1 SV=1	1	1	47,2	0	100	
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHA1 PE=1 SV=2	1	1	37,6	0	5,108	0,624
P00747	Plasminogen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLG PE=1 SV=2	1	1	90,5	0		
Q8WZ42	Titin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTN PE=1 SV=4	2	2	3813,7	0		
A0A0J9YXF2	Paraoxonase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PON2 PE=1 SV=1	1	1	41,5	0	0,01	0,01
Q9UQC2	GRB2-associated-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAB2 PE=1 SV=1	1	1	74,4	0	100	

Q9BWV1	Brother of CDO OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BOC PE=1 SV=1	1	1	121	0	0,01	0,01
A0A7I2YQV1	Transforming protein RhoA OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RHOA PE=1 SV=1	1	1	12	0	0,01	0,01
C9J2Q4	Septin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN2 PE=1 SV=1	1	1	21,1	0	0,01	0,01
P21964	Catechol O-methyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COMT PE=1 SV=2	1	1	30	0	0,01	0,01
F5H0S8	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNB3 PE=1 SV=8	1	1	29,2	0	0,01	0,01
E7EN95	Filamin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNB PE=1 SV=1	2	2	256,1	0	0,01	0,01
A2IDD5	Coiled-coil domain-containing protein 78 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC78 PE=1 SV=1	1	1	48,5	0		
Q9Y6R7	IgG Fc-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FCGBP PE=1 SV=3	1	1	571,6	0		
A0A804HKG9	Vacuolar protein sorting-associated protein 13B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS13B PE=4 SV=1	1	1	410,3	0		
A0A804HI36	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSL4 PE=4 SV=1	1	1	72,9	0	0,01	0,01
A0A804HIM2	Ras-related protein Rab-18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB18 PE=4 SV=1	1	1	5,3	0	0,01	0,276
P0C7P4	Putative cytochrome b-c1 complex subunit Rieske-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UQCRFS1P1 PE=5 SV=1	2	2	30,8	0		0,01
A0A7P0T9B9	ADAMTS-like protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADAMTSL1 PE=1 SV=1	1	1	198,6	0		
A0A7I2V5M5	Nucleolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCL PE=1 SV=1	1	1	73,6	0	0,01	0,01
A0A7P0TA97	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=1	1	1	53,5	0	100	100
A0A7P0Z453	Sphingomyelin phosphodiesterase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMPD4 PE=1 SV=1	1	1	54,5	0	100	

EK-Tablo 3.2 : nLC-MS/MS analizleri sonucu elde edilen membran protienleri

Accession No	Protein tanımı	# Peptides	# Unique Peptides	MW [kDa]	Score Sequest HT: Sequest HT	Protein yoğunluk oranı (MCF7) / (MCF10A)	Protein yoğunluk oranı (MDA MB 231) / (MCF10A)
A0A7I2V2Q0	Probable E3 ubiquitin-protein ligase makorin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MKRN3 PE=1 SV=1	1	1	33,6	0	100	
P32969	60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL9 PE=1 SV=1	7	7	21,9	46,49	0,233	1,384
P24390	ER lumen protein-retaining receptor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KDELRL1 PE=1 SV=1	3	2	24,5	19,97	0,852	2,71
Q14566	DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM6 PE=1 SV=1	2	2	92,8	0		
D6RCT5	DNA transposase THAP9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=THAP9 PE=1 SV=1	1	1	11,6	0		
Q9NX20	39S ribosomal protein L16, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRPL16 PE=1 SV=1	1	1	28,4	0	1,487	1,93
Q9NSB2	Keratin, type II cuticular Hb4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT84 PE=2 SV=2	4	1	64,8	91,76	0,01	0,01
P33993	DNA replication licensing factor MCM7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM7 PE=1 SV=4	3	3	81,3	0	13,864	0,01
Q9NVJ2	ADP-ribosylation factor-like protein 8B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARL8B PE=1 SV=1	4	4	21,5	4,22	0,431	0,01
V9GY93	GDT1 family protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM165 PE=1 SV=1	1	1	17,3	4,21	1,866	2,937

I3L3D5	Profilin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFN1 PE=1 SV=1	1	1	17,5	1,83		100
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=6	12	12	90,5	120,4	0,688	0,459
Q9HCC0	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCCC2 PE=1 SV=1	4	4	61,3	3,87		0,429
A0A096LP10	N-acetylglucosaminylidiphosphodolichol N-acetylglucosaminyltransferase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALG13 PE=1 SV=1	1	1	17,8	0		
Q14966	Zinc finger protein 638 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF638 PE=1 SV=2	1	1	220,5	13,55	0,139	0,01
P19623	Spermidine synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRM PE=1 SV=1	1	1	33,8	0	0,01	0,01
Q9Y512	Sorting and assembly machinery component 50 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAMM50 PE=1 SV=3	1	1	51,9	0	0,01	0,01
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC22B PE=1 SV=5	5	5	24,7	0	1,925	0,879
Q7Z4H7	HAUS augmin-like complex subunit 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HAUS6 PE=1 SV=2	1	1	108,6	0	100	
Q01459	Di-N-acetylchitobiase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTBS PE=1 SV=1	1	1	43,7	0		
O75746	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A12 PE=1 SV=2	5	1	74,7	10,2		
O43837	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IDH3B PE=1 SV=2	2	2	42,2	0	100	
Q9HD20	Endoplasmic reticulum transmembrane helix translocase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP13A1 PE=1 SV=2	1	1	132,9	0	100	
O76021	Ribosomal L1 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RSL1D1 PE=1 SV=3	5	5	54,9	11,05	0,682	2,402

P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH1 PE=1 SV=4	8	3	49,2	64,41	0,312	1,118
Q14767	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LTBP2 PE=1 SV=3	2	2	194,9	0	1,331	5,107
P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX3 PE=1 SV=3	1	1	27,7	2,03	0,212	9,33
Q6IQ42	FUSIP1 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF10 PE=1 SV=1	1	1	8,3	2,05	0,01	1,697
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PARP1 PE=1 SV=4	5	5	113	7,13	0,01	0,685
B7Z7P8	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ETF1 PE=1 SV=1	1	1	47,4	0	0,01	0,01
P47897	Glutamine--tRNA ligase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=QARS1 PE=1 SV=1	2	2	87,7	0	100	100
A0A804HI24	Fumarate hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FH PE=4 SV=1	6	6	51,3	7,9	0,175	0,186
A0A075B6T1	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AMBRA1 PE=1 SV=1	1	1	129,5	0	100	
P46013	Proliferation marker protein Ki-67 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MKI67 PE=1 SV=2	1	1	358,5	0	0,01	2,259
A0A0A0MSK5	Torsin-1A-interacting protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOR1AIP1 PE=1 SV=1	2	2	52,4	3,51		0,01
M0QY80	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ETHE1 PE=1 SV=1	1	1	10,6	3,65	0,242	1,459
P49761	Dual specificity protein kinase CLK3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLK3 PE=1 SV=3	1	1	73,5	0	100	
P62081	40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS7 PE=1 SV=1	6	6	22,1	25,31	0,749	1,117
J3QQV5	Serine/arginine-rich-splicing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF1 PE=1 SV=1	1	1	7,3	0	0,01	0,01

Q6N039	Transmembrane and coiled-coil domains protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMCC1 PE=1 SV=1	1	1	36,5	0		
Q8IWF6	Protein DENND6A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DENND6A PE=1 SV=1	1	1	69,5	0	0,01	38,283
P00352	Aldehyde dehydrogenase 1A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1A1 PE=1 SV=2	1	1	54,8	2,27	0,01	0,01
H0Y368	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPM1 PE=1 SV=2	2	2	33,3	3,98	0,667	2,939
P48444	Coatomer subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARCN1 PE=1 SV=1	2	2	57,2	0	0,01	2,934
E7EQV9	Ribosomal protein L15 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL15 PE=1 SV=1	4	4	20,5	44,05	1,044	1,893
H3BS44	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSD17B2 PE=1 SV=1	1	1	24,3	0		
P62913	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL11 PE=1 SV=2	3	3	20,2	25,34	0,202	0,451
Q8TB61	Adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC35B2 PE=1 SV=1	1	1	47,5	0	15,752	1,397
P62266	40S ribosomal protein S23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS23 PE=1 SV=3	3	3	15,8	32,55	0,213	3,249
P41091	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF2S3 PE=1 SV=3	2	2	51,1	0	2,126	0,409
I3L3H2	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A3 PE=1 SV=2	3	2	44,5	4,51	0,01	0,01
Q92604	Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LPGAT1 PE=1 SV=1	1	1	43,1	0		
P63173	60S ribosomal protein L38 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL38 PE=1 SV=2	4	4	8,2	15,54	0,634	1,4
Q8NFV4	Protein ABHD11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABHD11 PE=1 SV=1	2	2	34,7	0	100	100

F5GXW1	Dedicator of cytokinesis protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DOCK4 PE=1 SV=3	1	1	126	0	0,01	0,01
A0A2R8Y811	40S ribosomal protein S14 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS14 PE=1 SV=1	4	4	16,1	14,18	0,47	1,678
P57740	Nuclear pore complex protein Nup107 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP107 PE=1 SV=1	1	1	106,3	0	100	
O43264	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZW10 PE=1 SV=3	1	1	88,8	0	1,875	5,575
P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UQCRC2 PE=1 SV=3	10	10	48,4	53,49	0,366	0,17
B4DWH1	Peroxisomal membrane protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PXMP4 PE=1 SV=1	1	1	15,7	0	100	
Q8TC12	Retinol dehydrogenase 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RDH11 PE=1 SV=2	1	1	35,4	1,77	100	
H3BQZ7	HCG2044799 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPUL2-BSCL2 PE=4 SV=1	1	1	84,6	0	100	100
Q08945	FACT complex subunit SSRP1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSRP1 PE=1 SV=1	1	1	81	0	0,01	2,83
F8W8A6	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIBCH PE=1 SV=1	1	1	14,6	0	0,01	0,01
P0DME0	Protein SETSIP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SETSIP PE=1 SV=1	1	1	34,9	0	0,01	0,01
H7C062	V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VSIG4 PE=1 SV=1	1	1	30,2	0	100	
H0YLV0	Signal recognition particle 14 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRP14 PE=1 SV=1	1	1	5,5	0	0,01	1,407
Q6ZNG2	Homeobox protein DBX2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DBX2 PE=2 SV=2	1	1	36,5	0	0,01	0,01

P53007	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A1 PE=1 SV=2	5	5	34	6,11	0,097	0,14
A0A7P0TBA9	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF2AK2 PE=1 SV=1	1	1	61	0	2,182	0,803
Q9P0I2	ER membrane protein complex subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EMC3 PE=1 SV=3	2	2	29,9	0	0,677	0,01
O94906	Pre-mRNA-processing factor 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF6 PE=1 SV=1	1	1	106,9	0	100	
Q9BV81	ER membrane protein complex subunit 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EMC6 PE=1 SV=1	1	1	12	0	16,244	0,01
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP1 PE=1 SV=2	4	4	37,5	4,27	0,876	0,873
Q9H3M7	Thioredoxin-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TXNIP PE=1 SV=1	1	1	43,6	0	100	
K7EKE6	Lon protease homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LONP1 PE=1 SV=1	1	1	95,1	0	100	
Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB6 PE=1 SV=1	8	2	49,8	70,14	0,01	0,436
O60832	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit DKC1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DKC1 PE=1 SV=3	2	2	57,6	0	0,01	0,01
P42765	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAA2 PE=1 SV=2	2	2	41,9	1,97	0,01	0,01
Q8IWA4	Mitofusin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MFN1 PE=1 SV=3	1	1	84,1	0		
Q96GQ7	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX27 PE=1 SV=2	1	1	89,8	0		
P62753	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS6 PE=1 SV=1	2	2	28,7	19,21	3,262	0,941

P11387	DNA topoisomerase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOP1 PE=1 SV=2	5	5	90,7	1,65	0,513	1,138
P61009	Signal peptidase complex subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPCS3 PE=1 SV=1	1	1	20,3	0	5,521	0,01
Q70UQ0	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IKBIP PE=1 SV=1	1	1	39,3	0	0,01	0,01
Q8TDN6	Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BRX1 PE=1 SV=2	3	3	41,4	0		0,484
P61163	Alpha-centractin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTR1A PE=1 SV=1	3	3	42,6	0	0,01	1,98
Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GANAB PE=1 SV=3	4	4	106,8	8,42	0,01	2,231
Q53GQ0	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSD17B12 PE=1 SV=2	3	3	34,3	0		1,852
C9JY59	Protein FAM131A (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM131A PE=1 SV=1	1	1	13,2	0	0,01	0,01
A0A1B0GUW6	Uncharacterized protein SPEM3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPEM3 PE=3 SV=1	1	1	128,6	0		
P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GART PE=1 SV=1	1	1	107,7	3,49	0,01	0,082
F8VZX2	Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP2 PE=1 SV=1	2	2	33,8	5,02	4,112	2,142
H7BXY3	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX30 PE=1 SV=1	1	1	130,5	0	100	
O00148	ATP-dependent RNA helicase DDX39A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39A PE=1 SV=2	6	2	49,1	11,75	0,969	1,042
A0A0B4J239	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DAD1 PE=1 SV=1	1	1	8,5	4,77	1,171	0,01

A0A7I2V3F1	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACO2 PE=1 SV=1	1	1	86,1	0	100	
P62269	40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS18 PE=1 SV=3	2	2	17,7	1,73	5,545	1,008
A0A7P0T8L3	Nicotinamide phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAMPT PE=1 SV=1	5	5	52,5	1,74	0,414	19,599
P16401	Histone H1.5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-5 PE=1 SV=3	3	3	22,6	2,02	0,01	0,05
P43155	Carnitine O-acetyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CRAT PE=1 SV=5	1	1	70,8	0	100	
H0Y8C3	Mitochondrial carrier homolog 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTCH1 PE=1 SV=1	1	1	43,1	0		100
Q9Y4W6	AFG3-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AFG3L2 PE=1 SV=2	2	2	88,5	0	100	
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUFM PE=1 SV=2	16	16	49,5	139,82	4,651	0,779
A0A7I2V535	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=1	5	4	57,6	32,86	41,34	0,514
Q9UM00	Calcium load-activated calcium channel OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMCO1 PE=1 SV=2	1	1	27,1	0	100	
P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLUD1 PE=1 SV=2	3	3	61,4	7,07	0,155	0,078
I3L2C6	Mitochondrial Rho GTPase 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RHOT2 PE=1 SV=1	2	1	23,7	0	100	
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT6A PE=1 SV=3	23	10	60	656	0,043	1,118
F8VQX7	Oxysterol-binding protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OSBPL8 PE=1 SV=1	1	1	81,6	0	0,385	1,611
A0A0C4DG26	Carbohydrate-responsive element-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MLXIPL PE=1 SV=1	1	1	78,2	0	0,01	1,1

H0YJG7	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHSA1 PE=1 SV=1	1	1	23,8	0	100	100
H7BZJ3	Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA3 PE=1 SV=1	2	1	13,5	0	0,01	0,01
Q9NQV7	Histone-lysine N-methyltransferase PRDM9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDM9 PE=1 SV=2	1	1	103,3	0		
H7C5Q2	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACOT9 PE=1 SV=1	1	1	30	1,72	100	100
D3YTB1	60S ribosomal protein L32 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL32 PE=1 SV=1	2	2	15,6	0	0,01	1,49
H0YMW2	A-kinase anchor protein 13 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKAP13 PE=1 SV=1	1	1	186	0		
Q709F0	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAD11 PE=1 SV=3	1	1	87,2	0	0,01	0,01
H0Y339	E3 ubiquitin-protein ligase COP1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COP1 PE=1 SV=1	1	1	64,5	0		100
P55060	Exportin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSE1L PE=1 SV=3	1	1	110,3	0	0,01	5,764
H7C4R5	FAST kinase domain-containing protein 4 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBG4 PE=1 SV=1	1	1	29,6	0	100	
A0A5F9ZHJ7	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAT1 PE=1 SV=1	2	2	33,5	8,3	0,366	1,848
B0QZK4	Heterochromatin protein 1-binding protein 3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HP1BP3 PE=1 SV=1	2	2	28,5	2,25	0,01	0,728
E5RGC1	F-box/WD repeat-containing protein 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FBXW11 PE=1 SV=9	1	1	64,5	0	0,01	0,01
P62280	40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS11 PE=1 SV=3	3	3	18,4	3,78	12,115	1,362

A0A2R8Y6B6	Glutathione peroxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPX1 PE=1 SV=1	1	1	16,9	0	0,01	0,01
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A1 PE=1 SV=1	10	9	46,1	50,88	0,373	2,188
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRAP1 PE=1 SV=3	12	11	80,1	74,65	11,972	0,638
Q92882	Osteoclast-stimulating factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OSTF1 PE=1 SV=2	1	1	23,8	0	100	
Q9Y678	Coatmer subunit gamma-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPG1 PE=1 SV=1	1	1	97,7	0	2,115	2,808
P62829	60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23 PE=1 SV=1	2	2	14,9	5,75	0,483	1,363
I3L0J9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF8 PE=1 SV=8	1	1	119,6	0	100	
Q5JNZ3	Zinc finger protein 311 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF311 PE=2 SV=2	1	1	76,3	0	2,017	6,399
Q14533	Keratin, type II cuticular Hb1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT81 PE=1 SV=3	2	1	54,9	8,42	22,08	0,264
O75417	DNA polymerase theta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POLQ PE=1 SV=2	1	1	289,4	0	100	
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPN2 PE=1 SV=3	15	15	69,2	48,75	1,615	0,919
A0A7I2V2G2	75 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=1	11	11	66,6	9,54	1,407	0,241
A0A6Q8PHG1	DNA-binding protein SMUBP-2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHMBP2 PE=1 SV=1	1	1	12,9	0		
Q9NSE4	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IARS2 PE=1 SV=2	3	3	113,7	5,55	0,01	0,01

Q13547	Histone deacetylase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDAC1 PE=1 SV=1	1	1	55,1	0	100	
K7ERE3	Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT13 PE=1 SV=1	11	3	45,2	465,83	0,01	0,076
Q8NBQ5	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSD17B11 PE=1 SV=3	1	1	32,9	0		100
Q96K37	Solute carrier family 35 member E1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC35E1 PE=1 SV=2	2	2	44,7	0	7,707	0,01
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDH2 PE=1 SV=3	1	1	35,5	0	0,01	0,01
Q96M29	Tektin-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TEKT5 PE=1 SV=1	1	1	56,3	0	100	
P61353	60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL27 PE=1 SV=2	3	3	15,8	7,6	1,039	0,119
A0A7P0TAY5	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AASS PE=1 SV=1	1	1	45,1	0	0,01	0,01
E7ENZ3	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT5 PE=1 SV=1	2	2	53,8	4	0,01	2,033
Q8N8V2	Guanylate-binding protein 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GBP7 PE=1 SV=2	1	1	72,5	0	0,01	0,01
Q6ZV80	Putative uncharacterized protein LINC02898 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LINC02898 PE=5 SV=1	1	1	14,8	0	0,01	0,01
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRNP200 PE=1 SV=2	3	3	244,4	2,35	0,01	0,01
H7C531	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD6 PE=1 SV=1	1	1	16	0		100
Q8N488	RING1 and YY1-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RYPB PE=1 SV=2	1	1	24,8	0		100
O00154	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACOT7 PE=1 SV=3	3	3	41,8	1,62	0,077	0,282

Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3A PE=1 SV=1	1	1	166,5	3,65	0,01	1,266
Q9Y6V0	Protein piccolo OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCLO PE=1 SV=5	1	1	560,4	0	0,01	0,442
Q16795	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFA9 PE=1 SV=2	3	3	42,5	5,96	0,917	0,01
D6RC81	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PARP8 PE=1 SV=1	1	1	14,9	0		
A0A075B6F3	Dynein axonemal heavy chain 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH8 PE=1 SV=2	1	1	538,3	0	0,01	0,01
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX9 PE=1 SV=4	21	21	140,9	82,84	0,832	0,727
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB1B PE=1 SV=1	8	3	22,2	94,51	0,778	1,049
Q9Y2I7	1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIKFYVE PE=1 SV=3	1	1	237	0	100	
Q8N103	T-cell activation Rho GTPase-activating protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAGAP PE=1 SV=1	1	1	80,7	0	100	100
P55795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH2 PE=1 SV=1	5	1	49,2	43,36	0,01	0,01
Q8N1N4	Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT78 PE=1 SV=2	1	1	56,8	0	0,01	3,47
Q13838	Spliceosome RNA helicase DDX39B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=1	5	1	49	13,89	0,01	0,766
M0R210	40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS16 PE=1 SV=1	5	5	14,4	44,58	0,369	1,234
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKDC PE=1 SV=3	33	33	468,8	46,51	3,878	1,231

P31949	Protein S100-A11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A11 PE=1 SV=2	1	1	11,7	0	0,01	14,009
Q68CJ6	Nuclear GTPase SLIP-GC OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUGGC PE=2 SV=3	1	1	91,1	0	100	
B9A067	MICOS complex subunit MIC60 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMMT PE=1 SV=2	6	6	78,9	0	0,611	0,209
K7EJ57	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOMM40 PE=1 SV=8	1	1	21,9	0	100	
Q969S9	Ribosome-releasing factor 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GFM2 PE=1 SV=1	1	1	86,5	0	100	
O43143	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX15 PE=1 SV=2	2	2	90,9	0	0,01	1,988
P18124	60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL7 PE=1 SV=1	11	11	29,2	97,55	0,607	0,53
Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCK2 PE=1 SV=4	8	8	70,7	13,42	3,362	1,999
Q3LI76	Keratin-associated protein 15-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRTAP15-1 PE=1 SV=2	1	1	15	0	6,336	2,761
A2A3L6	Tetratricopeptide repeat protein 24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTC24 PE=4 SV=1	1	1	63,4	0	0,01	0,446
O43809	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUDT21 PE=1 SV=1	1	1	26,2	0		
Q01081	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=U2AF1 PE=1 SV=3	2	2	27,9	4,14	2,359	1,326
Q96HS1	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGAM5 PE=1 SV=2	2	2	32	0	3,637	0,01
Q96P70	Importin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IPO9 PE=1 SV=3	1	1	115,9	0		

A0A494BZW6	Ciliogenesis and planar polarity effector 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPLANE1 PE=1 SV=2	2	2	367,3	0	0,01	0,01
Q9HB55	Cytochrome P450 3A43 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYP3A43 PE=1 SV=1	1	1	57,6	0	18,681	0,01
P25398	40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS12 PE=1 SV=3	1	1	14,5	0	0,01	0,01
P61019	Ras-related protein Rab-2A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB2A PE=1 SV=1	4	4	23,5	16,26	0,912	0,372
Q9NZ01	Very-long-chain enoyl-CoA reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TECR PE=1 SV=1	3	3	36	10,82	0,011	1,132
P22087	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FBL PE=1 SV=2	6	6	33,8	19,64	0,307	0,991
P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OAT PE=1 SV=1	5	5	48,5	7,79	1,639	6,9
Q96PC5	Melanoma inhibitory activity protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MIA2 PE=1 SV=4	1	1	159,7	0	100	100
Q15717	ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELAVL1 PE=1 SV=2	4	4	36,1	1,67	2,715	1,371
P35610	Sterol O-acyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SOAT1 PE=1 SV=3	2	2	64,7	0		100
P62857	40S ribosomal protein S28 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS28 PE=1 SV=1	1	1	7,8	1,75	0,01	2,075
P62995	Transformer-2 protein homolog beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRA2B PE=1 SV=1	2	2	33,6	9,6	0,01	0,049
Q9NXF1	Testis-expressed protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TEX10 PE=1 SV=2	3	3	105,6	3,93	100	
P30837	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1B1 PE=1 SV=3	1	1	57,2	3,75	0,01	0,01
Q9BZE1	39S ribosomal protein L37, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRPL37 PE=1 SV=2	3	3	48,1	0		1,632

Q5T160	Probable arginine--tRNA ligase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RARS2 PE=1 SV=1	1	1	65,5	0	0,994	0,01
F8W914	Reticulon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTN4 PE=1 SV=1	4	4	37,1	4,71	0,958	0,284
Q9NPJ3	Acyl-coenzyme A thioesterase 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACOT13 PE=1 SV=1	2	2	15	2,36		0,01
P62244	40S ribosomal protein S15a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS15A PE=1 SV=2	4	4	14,8	19,07	0,252	0,792
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD3A PE=1 SV=2	4	4	71,3	12,01	0,653	0,01
O14684	Prostaglandin E synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTGES PE=1 SV=2	2	2	17,1	0	0,079	0,272
Q9Y5B9	FACT complex subunit SPT16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUPT16H PE=1 SV=1	1	1	119,8	0		100
Q8TD26	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD6 PE=1 SV=4	1	1	305,2	0	0,01	0,415
Q8TBP6	Solute carrier family 25 member 40 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A40 PE=1 SV=1	1	1	38,1	3,99	100	
Q9H4S2	GS homeobox 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSX1 PE=1 SV=1	1	1	27,9	0	100	
H0Y614	Ubiquitin-fold modifier 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UFM1 PE=1 SV=1	1	1	8,7	1,85		
Q92526	T-complex protein 1 subunit zeta-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT6B PE=1 SV=5	1	1	57,8	0		100
O00767	Stearoyl-CoA desaturase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCD PE=1 SV=2	1	1	41,5	5,6	100	100
P50416	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPT1A PE=1 SV=2	5	5	88,3	0	7,355	0,918

Q96PX9	Pleckstrin homology domain-containing family G member 4B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEKHG4B PE=1 SV=4	1	1	139,6	0	24,679	2,445
Q6NUP7	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP4R4 PE=1 SV=1	1	1	99,4	0		100
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SND1 PE=1 SV=1	3	3	101,9	4,11	0,019	0,337
P05165	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCCA PE=1 SV=4	26	26	80	213,21	1,031	0,112
A0A0A0MTQ0	Mitochondrial ribonuclease P catalytic subunit (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRORP PE=1 SV=1	1	1	21,7	0	100	
P21397	Amine oxidase [flavin-containing] A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAOA PE=1 SV=1	4	4	59,6	10,83	0,01	0,195
X6R3N0	Solute carrier family 27 (Fatty acid transporter), member 3, isoform CRA_d OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC27A3 PE=1 SV=1	1	1	87,3	1,88	100	
P32119	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX2 PE=1 SV=5	2	1	21,9	6,29	100	100
P17735	Tyrosine aminotransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAT PE=1 SV=1	1	1	50,4	0	1,423	3,116
Q6UY01	Leucine-rich repeat-containing protein 31 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRC31 PE=2 SV=1	1	1	61,5	0		100
A0A1B0GTF4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP3K19 PE=4 SV=1	1	1	103,5	0	0,01	13,934
R4GMQ1	Lysine-specific histone demethylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KDM1A PE=1 SV=2	1	1	93,5	0	100	
C9JJ19	28S ribosomal protein S34, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRPS34 PE=1 SV=2	1	1	26,3	0	6,491	3,269

P78347	General transcription factor II-I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GTF2I PE=1 SV=2	2	2	112,3	0	100	
Q6YN16	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSDL2 PE=1 SV=1	1	1	45,4	0		
P16402	Histone H1.3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-3 PE=1 SV=2	4	1	22,3	7,39	0,691	0,537
J3KNV1	Zinc finger protein 292 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF292 PE=1 SV=1	1	1	304	0	0,01	0,01
Q9UBX3	Mitochondrial dicarboxylate carrier OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A10 PE=1 SV=2	5	5	31,3	11,49	100	100
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPN1 PE=1 SV=1	16	16	68,5	65,79	0,258	0,733
P48651	Phosphatidylserine synthase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTDSS1 PE=1 SV=1	1	1	55,5	4,24	0,01	0,183
A0A804HK76	Filamin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNB PE=4 SV=1	15	13	273,9	22,49	0,01	0,543
O75367	Core histone macro-H2A.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MACROH2A1 PE=1 SV=4	8	6	39,6	44,19	0,079	0,353
C9JA28	Signal sequence receptor subunit gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSR3 PE=1 SV=1	1	1	20,1	5,05	0,01	0,89
Q6ZXV5	Protein O-mannosyl-transferase TMTC3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMTC3 PE=1 SV=2	1	1	103,9	0	100	
O00469	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLOD2 PE=1 SV=2	2	2	84,6	1,74	0,01	0,01
X6RJP6	Transgelin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAGLN2 PE=1 SV=1	2	2	21,1	1,74	0,056	0,119
Q8N766	ER membrane protein complex subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EMC1 PE=1 SV=1	1	1	111,7	3,85	100	100

A0A3B3ITT5	60S ribosomal protein L29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL29 PE=1 SV=1	1	1	18,5	5,33	1,39	0,342
B4DUR8	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT3 PE=1 SV=1	3	3	55,6	15,61	0,014	1,338
P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFPQ PE=1 SV=2	6	5	76,1	28,77	6,675	0,069
Q8NBJ5	Procollagen galactosyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COLGALT1 PE=1 SV=1	1	1	71,6	0	0,078	2,051
Q8WVX9	Fatty acyl-CoA reductase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAR1 PE=1 SV=1	2	2	59,3	0	100	
E7EWF9	Arylamine N-acetyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAT2 PE=1 SV=1	1	1	18,8	0	100	
P49748	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACADVL PE=1 SV=1	3	3	70,3	5,21	0,01	0,01
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC63 PE=1 SV=2	1	1	87,9	0	0,01	0,01
P62424	60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL7A PE=1 SV=2	10	10	30	58,89	0,719	0,815
A0A087WWU8	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM3 PE=1 SV=1	1	1	26,4	0	0,01	0,094
Q9H2Z4	Homeobox protein Nkx-2.4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NKX2-4 PE=1 SV=3	1	1	36,2	0	0,01	0,01
J3KTA4	DEAD box protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX5 PE=1 SV=1	9	6	69	61,36	10,66	0,768
J3KPH2	Arachidonate lipoxygenase 3, isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALOXE3 PE=1 SV=1	1	1	97,7	0	0,01	0,01
P40261	Nicotinamide N-methyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NNMT PE=1 SV=1	2	2	29,6	1,62	0,01	0,01

P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH3 PE=1 SV=2	4	4	36,9	14,57	0,868	0,34
Q13155	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AIMP2 PE=1 SV=2	1	1	35,3	0		
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1	6	6	50,9	8,4	1,137	0,755
Q6NUK1	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCA _{MC} -1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A24 PE=1 SV=2	7	7	53,3	21,15	9,133	5,046
Q8TEM1	Nuclear pore membrane glycoprotein 210 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP210 PE=1 SV=3	3	3	205	4,22	3,005	0,788
Q8WXX0	Dynein axonemal heavy chain 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH7 PE=1 SV=2	1	1	460,9	3,63	0,01	0,01
Q6ZUX3	TOG array regulator of axonemal microtubules protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOGARAM2 PE=2 SV=2	2	2	111,1	0		
P10412	Histone H1.4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-4 PE=1 SV=2	4	1	21,9	7,39	0,051	0,413
P15880	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS2 PE=1 SV=2	7	7	31,3	35,16	1,5	1,054
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRBP1 PE=1 SV=5	8	8	152,4	12,74	0,01	0,123
Q06830	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX1 PE=1 SV=1	3	2	22,1	11,51	0,938	0,846
I3L1L3	Myb-binding protein 1A (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYBBP1A PE=1 SV=1	4	4	140,2	2,23		0,854
P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDHB PE=1 SV=3	2	2	39,2	2,49	0,291	1,311
P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HADHB PE=1 SV=3	14	14	51,3	81,26	0,642	0,102

P46781	40S ribosomal protein S9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS9 PE=1 SV=3	9	9	22,6	37,1	0,311	1,239
Q9BTZ2	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHRS4 PE=1 SV=3	1	1	29,5	0	4,354	0,01
A0A087X1X7	Elongation factor 1-delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1D PE=1 SV=1	1	1	69,2	0	1,467	100
Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VDAC3 PE=1 SV=1	5	4	30,6	13,59	0,211	0,029
B0QY60	SUN domain-containing protein 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUN2 PE=1 SV=1	1	1	21,8	0	0,01	0,589
O15269	Serine palmitoyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTLC1 PE=1 SV=1	1	1	52,7	0	0,01	0,01
A0A0U1RQC7	Cilia- and flagella-associated protein 99 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFAP99 PE=1 SV=1	1	1	81,8	7,1	0,01	0,01
P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UQCRC1 PE=1 SV=3	2	2	52,6	2,15	0,831	2,581
P14868	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DARS1 PE=1 SV=2	2	2	57,1	1,66	0,01	0,444
Q96CN7	Isochorismatase domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ISOC1 PE=1 SV=3	1	1	32,2	0	1,202	0,01
P62854	40S ribosomal protein S26 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS26 PE=1 SV=3	3	3	13	4,39	0,236	1,438
P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1C PE=1 SV=1	6	6	33	29,51	0,51	0,142
E9PDW2	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OXCT1 PE=1 SV=1	1	1	36,7	0		100
P16403	Histone H1.2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-2 PE=1 SV=2	4	1	21,4	9,23	0,076	0,067

P30536	Translocator protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSPO PE=1 SV=3	2	2	18,8	5,04	0,801	0,01
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4X PE=1 SV=2	9	9	29,6	14,11	0,505	1,149
Q02809	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLOD1 PE=1 SV=2	3	3	83,5	3,74	0,102	0,01
O76031	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLPX PE=1 SV=2	1	1	69,2	0		
Q96RQ3	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCCC1 PE=1 SV=3	23	23	80,4	520,09	1,9	2,056
P68133	Actin, alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTA1 PE=1 SV=1	9	2	42	601,24	0,01	0,747
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT6A PE=1 SV=3	5	5	58	9,29		0,113
Q9H9B4	Sideroflexin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFXN1 PE=1 SV=4	9	9	35,6	15,59	3,442	0,38
P62851	40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS25 PE=1 SV=1	2	2	13,7	1,76	0,01	0,01
P83731	60S ribosomal protein L24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL24 PE=1 SV=1	2	2	17,8	10,48	0,01	0,604
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IDH2 PE=1 SV=2	6	6	50,9	3,71	43,15	0,521
Q9H6T0	Epithelial splicing regulatory protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ESRP2 PE=1 SV=1	1	1	78,4	0		
E9PG15	14-3-3 protein theta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAQ PE=1 SV=1	1	1	17	0	0,01	0,152
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=U2AF2 PE=1 SV=4	2	2	53,5	2,2	0,176	0,01

P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH18A1 PE=1 SV=2	8	8	87,2	17,28	5,13	3,214
O75533	Splicing factor 3B subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B1 PE=1 SV=3	1	1	145,7	0	100	
Q96JN8	Neuralized-like protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NEURL4 PE=1 SV=2	1	1	166,8	0	4,911	3,705
Q9Y6N5	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SQOR PE=1 SV=1	6	6	49,9	5,73	0,657	0,01
Q7KZ85	Transcription elongation factor SPT6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUPT6H PE=1 SV=2	1	1	198,9	30,18	0,01	0,023
E7EQS8	Methylcytosine dioxygenase TET OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TET2 PE=1 SV=1	1	1	225,9	0	0,105	0,01
A0A3B3ITJ4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPL PE=1 SV=1	3	3	59,2	0	0,01	0,01
A0A6Q8PFJ0	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNA PE=1 SV=1	14	14	80,9	72,66	0,234	0,203
A0A7I2V2S3	Exportin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XPO1 PE=1 SV=1	1	1	109,3	0	100	
Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX21 PE=1 SV=5	8	8	87,3	24,08	3,084	3,411
E9PC15	Acylglycerol kinase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AGK PE=1 SV=1	1	1	43,8	0	100	
Q2XQZ0	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADAMTS16 PE=1 SV=1	1	1	63,6	0	100	
G3V279	Enhancer of rudimentary homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERH PE=1 SV=1	1	1	8,2	0	2,745	0,01
A0A7P0TB58	Complex I assembly factor ACAD9, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAD9 PE=1 SV=1	2	2	52,3	1,84		

B7Z6Z4	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=1	1	1	26,7	2,28	0,01	0,058
H3BS02	Protein-serine/threonine kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BCKDK PE=1 SV=1	1	1	24,4	0		
O60264	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMARCA5 PE=1 SV=1	3	3	121,8	0	4,894	0,01
A0A2R8Y553	Mitochondrial glycine transporter OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A38 PE=1 SV=1	1	1	31,8	0	0,01	0,356
Q5TB53	Transmembrane 9 superfamily member (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TM9SF3 PE=1 SV=8	2	2	29,9	0	100	100
P14406	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX7A2 PE=1 SV=1	1	1	9,4	0	100	
Q5SVQ8	Zinc finger and BTB domain-containing protein 41 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZBTB41 PE=1 SV=1	1	1	105,1	0		
A0A6I8PL42	Leucyl-tRNA synthetase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LARS1 PE=1 SV=1	2	2	129,1	0	0,21	0,01
Q96C36	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PYCR2 PE=1 SV=1	1	1	33,6	1,78	0,01	0,01
K7EMH1	60S ribosomal protein L22 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL22 PE=1 SV=1	2	2	10,4	14,62	5,782	0,279
E9PKQ3	CHK1 checkpoint homolog (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHK1 PE=1 SV=2	1	1	23,5	0	9,093	0,01
Q8IWB4	Spermatogenesis-associated protein 31A7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPATA31A7 PE=1 SV=4	1	1	148,6	0		
Q99832	T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT7 PE=1 SV=2	3	3	59,3	4,02	0,026	0,183
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2	8	8	39,6	20,8	0,616	0,236

A0A804HL40	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRPPRC PE=4 SV=1	3	3	157,7	0	100	
H0YL12	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ETFA PE=1 SV=8	1	1	24,9	2,31	0,01	0,01
A0A087X243	Glutathione S-transferase P (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSTP1 PE=1 SV=1	1	1	7,4	0	0,01	0,01
Q6ZNA1	Zinc finger protein 836 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF836 PE=2 SV=2	1	1	107,6	0	0,01	0,33
Q9Y6M1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP2 PE=1 SV=2	1	1	66,1	0	0,01	0,01
A2ABF4	Valine--tRNA ligase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VAR51 PE=1 SV=1	1	1	18,1	0		
Q96HY7	Probable 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHTKD1 PE=1 SV=2	1	1	103	3,71	100	
K7EQ34	Transmembrane protein 161A (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM161A PE=1 SV=1	1	1	35,9	0	100	
A0A0C4DGN4	Zymogen granule protein 16 homolog B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZG16B PE=1 SV=1	2	2	19,6	2	0,01	3,179
A0A0A0MR02	Outer mitochondrial membrane protein porin 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VDAC2 PE=1 SV=1	8	8	30,3	49,37	1,376	0,272
Q5VXN0	Ribosome production factor 2 homolog (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPF2 PE=1 SV=1	1	1	24,6	0	0,01	0,01
H7C123	60S ribosomal protein L10 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL10 PE=1 SV=1	2	2	10	3,4	0,01	1,635
A0A494C1M4	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1L2 PE=1 SV=1	1	1	102,8	0	0,01	0,01
B4DT28	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPR PE=1 SV=1	1	1	55,7	0	0,01	0,01

O75054	Immunoglobulin superfamily member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGSF3 PE=2 SV=3	1	1	135,1	0	100	
M0R3D6	60S ribosomal protein L18a (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL18A PE=1 SV=1	1	1	16,7	0		100
Q8NFC6	Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BOD1L1 PE=1 SV=2	1	1	330,3	0		100
J3KQ48	Aminoacyl-tRNA hydrolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTRH2 PE=1 SV=1	1	1	19,3	0	100	
E9PFN5	Glutathione S-transferase kappa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSTK1 PE=1 SV=1	1	1	21,7	0	0,751	0,095
D6RAA6	Transmembrane protein 33 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM33 PE=1 SV=1	1	1	25,2	10,96	0,074	1,538
Q9Y2X3	Nucleolar protein 58 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOP58 PE=1 SV=1	2	2	59,5	0	0,01	0,01
Q5T0Z8	Uncharacterized protein C6orf132 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C6orf132 PE=1 SV=4	1	1	124	0		
Q96N66	Lysophospholipid acyltransferase 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MBOAT7 PE=1 SV=2	5	5	52,7	3,13		6,162
Q9NVP1	ATP-dependent RNA helicase DDX18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX18 PE=1 SV=2	2	2	75,4	0	2,455	0,01
Q9C0I1	Myotubularin-related protein 12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTMR12 PE=1 SV=2	1	1	86,1	0	100	100
H3BQI7	Inactive hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSDL1 PE=1 SV=1	2	2	12,1	0	100	
A0A0D9SG23	Methyl-CpG-binding domain protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MBD5 PE=1 SV=1	1	1	114,7	0	100	100
G3V1B3	60S ribosomal protein L21 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL21 PE=1 SV=1	3	3	9,9	13,27	0,037	0,678

Q71UM5	40S ribosomal protein S27-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS27L PE=1 SV=3	1	1	9,5	0	0,01	0,01
A0A6Q8PHH9	Diadenosine tetraphosphate synthetase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GARS1 PE=1 SV=1	2	2	79,3	0		100
C9JQS9	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCCB PE=1 SV=1	11	11	60,7	29,31	0,239	0,053
A0A2R8Y849	40S ribosomal protein S24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS24 PE=1 SV=1	3	3	15,2	21,59	0,381	3,362
A6NLN1	Polypyrimidine tract-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTBP1 PE=1 SV=4	3	3	56,5	5,98	0,281	1,762
A0A2R8Y4Q3	Dynamin-like 120 kDa protein, form S1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OPA1 PE=1 SV=1	3	3	46,6	0	100	100
H0Y8G5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPD PE=1 SV=8	2	2	29,6	1,79	0,526	2,13
Q00532	Cyclin-dependent kinase-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDKL1 PE=1 SV=6	1	1	41,8	0		
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TCP1 PE=1 SV=1	5	5	60,3	11,55	0,118	0,871
O75477	Erlin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERLIN1 PE=1 SV=2	6	4	39,1	21,23	0,303	0,1
H7C183	Ubiquitinyl hydrolase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP34 PE=1 SV=1	1	1	140,2	0	100	
H0YH15	Aquarius homolog (Mouse), isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AQR PE=1 SV=1	1	1	75,8	0	0,01	9,472
O14830	Serine/threonine-protein phosphatase with EF-hands 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPEF2 PE=1 SV=2	1	1	86,5	0		
H0YHX9	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NACA PE=1 SV=2	1	1	25,3	3,34	0,01	0,01
P19367	Hexokinase-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HK1 PE=1 SV=3	5	5	102,4	0	17,47	0,01

P50991	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT4 PE=1 SV=4	3	3	57,9	0	11,37	0,725
P12236	ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A6 PE=1 SV=4	12	2	32,8	304,53	1,231	0,756
Q9H0A0	RNA cytidine acetyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAT10 PE=1 SV=2	3	3	115,7	0	14,506	1,797
P09382	Galectin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS1 PE=1 SV=2	1	1	14,7	1,76	0,01	0,01
K7ERE1	TMEM256-PLSCR3 readthrough (NMD candidate) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM256-PLSCR3 PE=3 SV=1	1	1	7,1	0		100
Q9P035	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HACD3 PE=1 SV=2	5	5	43,1	6,24	2,802	1,865
Q9UBU9	Nuclear RNA export factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NXF1 PE=1 SV=1	1	1	70,1	0	100	100
H7C2W9	60S ribosomal protein L31 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL31 PE=1 SV=1	2	2	12,8	28,07	0,515	1,237
K7EJV9	60S ribosomal protein L23a (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23A PE=1 SV=1	3	3	19,4	2,37	11,645	1,232
D6RBQ6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 17-like protein 17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP17L17 PE=3 SV=1	1	1	59,6	0	0,01	0,01
A6NLM8	Signal sequence receptor subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSR4 PE=1 SV=1	1	1	16,2	2,03	0,98	5,119
A0A087WWR3	Hydroxysteroid 11-beta-dehydrogenase 1-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSD11B1L PE=1 SV=1	1	1	35,9	1,77	0,01	0,659
F8W6I7	Helix-destabilizing protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=2	1	1	33,1	2,45	0,01	0,01
P46977	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STT3A PE=1 SV=2	5	5	80,5	1,72		0,273

F8VQX6	Methyltransferase-like protein 7A (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=METTTL7A PE=1 SV=1	1	1	20,6	2,22	0,056	0,01
Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HADH PE=1 SV=3	1	1	34,3	0	0,01	0,01
P39023	60S ribosomal protein L3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL3 PE=1 SV=2	9	9	46,1	19,3	0,097	1,12
H0YHJ8	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERGIC2 PE=1 SV=1	1	1	6,4	0	0,04	0,013
Q6ZMG9	Ceramide synthase 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CERS6 PE=1 SV=1	1	1	44,9	0		
A0A2R8Y6J3	60S ribosomal protein L5 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL5 PE=1 SV=1	1	1	27	1,9	0,421	0,01
Q92621	Nuclear pore complex protein Nup205 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP205 PE=1 SV=3	3	3	227,8	2,04	100	
Q71UI9	Histone H2A.V OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2AZ2 PE=1 SV=3	4	2	13,5	50,82	0,257	0,142
E7ESZ1	Importin-5 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IPO5 PE=1 SV=2	1	1	9,7	0	100	
A0A0A0MSA0	Laminin subunit alpha-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMA3 PE=1 SV=1	5	5	360	6,3	0,01	0,01
Q13423	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NNT PE=1 SV=3	4	4	113,8	3,31	0,01	0,01
Q9UIJ7	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AK3 PE=1 SV=4	3	3	25,6	0	5,05	1,656
O60942	mRNA-capping enzyme OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RNMT PE=1 SV=1	1	1	68,5	4,02	0,01	0,984
E7EUC7	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UGP2 PE=1 SV=1	6	6	57,8	4,26	0,01	0,01

Q5JWZ0	PHD finger protein 20 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHF20 PE=1 SV=1	1	1	62	0	100	
H3BQZ9	Adenine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APRT PE=1 SV=1	2	2	16,6	0	100	100
P53597	Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUCLG1 PE=1 SV=4	2	2	36,2	4,06		0,063
Q12979	Active breakpoint cluster region-related protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABR PE=1 SV=2	1	1	97,5	0	0,01	0,01
H7BXQ8	Armadillo repeat-containing protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARMC10 PE=1 SV=1	1	1	20,9	0	100	
P26641	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1G PE=1 SV=3	5	5	50,1	4,07	2,472	2,131
A0A2U3TZM0	DNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD4 PE=1 SV=1	1	1	216,7	1,67	100	
A0A804HHW9	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IARS1 PE=4 SV=1	1	1	139,8	0	100	
G3V1R5	Nardilysin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NRDC PE=1 SV=1	1	1	125	0	0,01	0,01
F5H0M1	RNA binding protein fox-1 homolog 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBFOX1 PE=1 SV=1	1	1	40,8	0	0,01	0,433
A0A0C4DGH5	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAND1 PE=1 SV=1	4	4	85,4	3,91	100	100
Q7L7L0	Histone H2A type 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2AW PE=1 SV=3	4	1	14,1	56,88	0,045	0,01
A8MXP9	Matrin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MATR3 PE=1 SV=1	10	10	99,9	2,15	15,225	0,402
A0A7P0T9X2	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALG5 PE=1 SV=1	1	1	23	0	0,79	0,01

P24539	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5PB PE=1 SV=2	3	3	28,9	0	1,135	0,134
A0A0M3HER0	Coiled-coil and C2 domain-containing protein 2A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CC2D2A PE=1 SV=1	1	1	8,3	0	100	
G3XAC6	RNA-binding protein 39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM39 PE=1 SV=1	1	1	48	1,79	0,01	1,2
F5H6I7	Atlastin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATL3 PE=1 SV=1	3	3	58,7	15,96	0,321	1,06
A0A1B0GTG2	Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH7A1 PE=1 SV=1	1	1	58,1	0	0,01	0,01
P02100	Hemoglobin subunit epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBE1 PE=1 SV=2	2	1	16,2	15,57	0,01	0,228
Q53S48	STON1-GTF2A1L readthrough OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STON1-GTF2A1L PE=3 SV=1	1	1	132	0		
P05388	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPLP0 PE=1 SV=1	5	5	34,3	24,77	0,075	0,629
H3BT71	RNA-binding motif protein, X chromosome OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMX PE=1 SV=1	1	1	32,2	4,03	0,04	0,01
H0YHS6	Tyrosine--tRNA ligase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YARS2 PE=1 SV=1	1	1	32,2	0		
A0A7I2V3J6	Complex I-49kD OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFS2 PE=1 SV=1	1	1	48,1	0		
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMC1A PE=1 SV=2	1	1	143,1	0		
Q9BVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNL3 PE=1 SV=2	1	1	62	0	100	
O76015	Keratin, type I cuticular Ha8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT38 PE=1 SV=3	2	1	50,4	162,33	100	100
P30050	60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL12 PE=1 SV=1	3	3	17,8	12,35	29,135	0,688

F8VPA7	Elongation factor Ts, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSFM PE=1 SV=1	1	1	22,1	0	1,631	0,309
P43304	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPD2 PE=1 SV=3	3	3	80,8	0	0,01	0,01
O00116	Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AGPS PE=1 SV=1	1	1	72,9	0	0,01	0,01
Q8WVV9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPLL PE=1 SV=1	1	1	60	0		
H7C5K7	Poly [ADP-ribose] polymerase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TIPARP PE=1 SV=1	1	1	42,4	0	0,01	0,104
A0A0A0MT64	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FDXR PE=1 SV=1	1	1	58,2	0	0,01	0,01
A0A7P0TBJ7	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYNC1H1 PE=1 SV=1	3	3	478,5	0		0,01
P08133	Annexin A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA6 PE=1 SV=3	2	2	75,8	0	100	100
P26373	60S ribosomal protein L13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL13 PE=1 SV=4	3	3	24,2	33,51	0,705	0,944
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF3 PE=1 SV=3	1	1	95,3	0	0,01	0,01
A0A7I2V5B2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFA10 PE=1 SV=1	1	1	41,5	6	0,957	0,01
P33947	ER lumen protein-retaining receptor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KDEL2 PE=1 SV=1	3	2	24,4	0	100	100
P08729	Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT7 PE=1 SV=5	21	16	51,4	564,64	0,232	0,919
P08621	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRNP70 PE=1 SV=2	1	1	51,5	0	0,01	0,01

E9PFT6	Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBD PE=1 SV=1	2	1	15,4	19,85	0,01	0,121
K7ER16	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FARSA PE=1 SV=1	1	1	26	0		
Q9P003	Protein cornichon homolog 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNIH4 PE=1 SV=1	1	1	16,1	0	0,01	0,01
A0A590UJ53	KAT8 regulatory NSL complex subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KANSL3 PE=1 SV=1	1	1	95,8	0		
P62820	Ras-related protein Rab-1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB1A PE=1 SV=3	6	1	22,7	90,37	0,01	0,01
P11388	DNA topoisomerase 2-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOP2A PE=1 SV=3	1	1	174,3	0	100	
B4DR61	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC61A1 PE=1 SV=1	3	3	52,9	3,37	3,682	0,01
A0A3B3IS54	Aspartate--tRNA ligase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DARS2 PE=1 SV=1	2	2	55,1	1,89	0,01	0,01
Q68J44	Dual specificity phosphatase 29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DUSP29 PE=1 SV=1	1	1	25,3	0	0,088	0,01
Q5SZE1	Ceramide synthase 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CERS2 PE=1 SV=2	2	2	36,4	1,65	0,01	0,01
P42766	60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL35 PE=1 SV=2	1	1	14,5	0	5,225	2,63
Q16629	Serine/arginine-rich splicing factor 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF7 PE=1 SV=1	3	2	27,4	0	0,291	0,01
Q86YN1	Dolichyldiphosphatase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DOLPP1 PE=2 SV=1	1	1	27	0	100	
P60866	40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS20 PE=1 SV=1	2	2	13,4	4,29	0,182	0,721
A0A0J9YYF7	Disheveled-associated activator of morphogenesis 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DAAM2 PE=1 SV=1	1	1	124,4	0		100

P00966	Argininosuccinate synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ASS1 PE=1 SV=2	3	3	46,5	1,69	19,182	1,75
O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AIFM1 PE=1 SV=1	2	2	66,9	0	100	
A0A3B3ITD8	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP98 PE=1 SV=1	1	1	143,4	0	0,078	0,01
Q96PK6	RNA-binding protein 14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM14 PE=1 SV=2	10	10	69,4	15,06	15,619	0,01
Q9HAQ2	Kinesin-like protein KIF9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF9 PE=1 SV=4	1	1	89,9	0	0,01	0,01
Q5TEC6	Histone HIST2H3PS2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-2 PE=1 SV=1	3	1	15,4	279,42	0,01	0,141
Q02338	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BDH1 PE=1 SV=3	1	1	38,1	0	100	
H3BPU1	Transcription factor 25 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TCF25 PE=4 SV=1	1	1	12,9	0	0,01	0,01
Q9P0M6	Core histone macro-H2A.2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MACROH2A2 PE=1 SV=3	3	1	40	14,59	0,01	0,01
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHGDH PE=1 SV=4	6	6	56,6	13,31	16,621	0,627
H0Y653	Nucleolar protein 56 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOP56 PE=1 SV=1	3	3	24,2	1,9	0,01	0,01
D6RBZ0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPAB PE=1 SV=1	2	2	35,7	0	0,127	0,01
F8VRI7	Ubiquitinyl hydrolase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP44 PE=1 SV=1	1	1	56,5	0	0,102	1,139
D6R9M6	Zinc transporter 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC30A9 PE=1 SV=1	1	1	13,1	0		
P46783	40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS10 PE=1 SV=1	1	1	18,9	6,87	100	100

Q02878	60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL6 PE=1 SV=3	10	10	32,7	46,94	0,963	1,177
Q8N201	Integrator complex subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=INTS1 PE=1 SV=2	1	1	244,1	0	100	
P36957	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLST PE=1 SV=4	1	1	48,7	0	0,01	0,01
Q86UP3	Zinc finger homeobox protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZFHX4 PE=1 SV=1	1	1	393,5	0	0,01	0,01
A0A0C4DGA7	Actin-binding LIM protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABLIM3 PE=1 SV=1	2	2	74,1	3,93	0,124	0,313
Q9C0D9	Ethanolaminephosphotransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SELENOI PE=1 SV=3	1	1	45,2	0	100	
Q8WXE9	Stonin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STON2 PE=1 SV=1	1	1	101,1	3,07	0,01	0,01
A0A7I2V5X0	Importin subunit alpha-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNA4 PE=1 SV=1	1	1	6,4	0	100	
P51589	Cytochrome P450 2J2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYP2J2 PE=1 SV=2	1	1	57,6	0	100	100
V9GZ78	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTHFD1 PE=1 SV=2	1	1	92,5	0		
E9PLX7	60S ribosomal protein L27a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL27A PE=1 SV=1	1	1	12,5	28,64	0,197	0,732
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRRM1 PE=1 SV=2	1	1	102,3	11,62	0,01	1,226
F8VRJ5	Protein FAM186B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM186B PE=1 SV=1	1	1	27,5	0	100	
Q14739	Delta(14)-sterol reductase LBR OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LBR PE=1 SV=2	1	1	70,7	3,85	0,01	0,63

G5E9D8	Inter-alpha (Globulin) inhibitor H5, isoform CRA_e OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITIH5 PE=1 SV=1	1	1	78,4	0	5,448	100
C9IYS1	LIM and cysteine-rich domains protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMCD1 PE=1 SV=8	1	1	26,1	0	0,01	0,01
Q9UHL9	General transcription factor II-I repeat domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GTF2IRD1 PE=1 SV=1	1	1	106	0		100
Q9NS69	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOMM22 PE=1 SV=3	2	2	15,5	5,84	1,926	0,295
P25205	DNA replication licensing factor MCM3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM3 PE=1 SV=3	1	1	90,9	0	0,24	0,01
P32322	Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PYCR1 PE=1 SV=2	3	3	33,3	3,61	100	100
H3BP95	Nuclear pore complex protein Nup93 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP93 PE=1 SV=1	1	1	17,8	0	100	
P62304	Small nuclear ribonucleoprotein E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPE PE=1 SV=1	1	1	10,8	1,93	0,01	0,01
A0A5H1ZRQ2	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX17 PE=1 SV=2	4	1	80,4	41,19	0,01	0,01
H0YHA7	60S ribosomal protein L18 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL18 PE=1 SV=1	3	3	19	65,1	0,476	0,903
A0A087X2D0	Serine/arginine-rich-splicing factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF3 PE=1 SV=1	3	2	10,3	7,23	0,317	0,065
M0QXN5	Nuclear pore glycoprotein p62 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP62 PE=1 SV=1	1	1	45,6	0		
Q9BTV4	Transmembrane protein 43 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM43 PE=1 SV=1	2	2	44,8	0	0,01	0,01
S4R468	Calcium uniporter protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCU PE=1 SV=1	1	1	19	0		

Q14690	Protein RRP5 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDCD11 PE=1 SV=3	1	1	208,6	0		
B0QY90	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3L PE=1 SV=1	1	1	55,1	4,8	0,771	1,477
O15371	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3D PE=1 SV=1	1	1	63,9	0		100
K7EJE1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFA13 PE=3 SV=1	1	1	17,1	0	0,824	0,01
Q8IZL8	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PELP1 PE=1 SV=2	1	1	119,6	0	100	
P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPD1 PE=1 SV=1	2	2	13,3	9,65	0,96	1,389
H0YNX5	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC11A PE=1 SV=1	2	2	12	12,41	0,363	3,13
Q5R3B4	Mitochondrial pyruvate carrier (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MPC2 PE=1 SV=1	1	1	11,7	0	0,01	0,01
H0YKD8	60S ribosomal protein L28 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL28 PE=1 SV=1	3	3	19,1	0		10,081
P62277	40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS13 PE=1 SV=2	3	3	17,2	3,81	0,664	0,073
F8VYN9	ADP-ribosylation factor-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARL1 PE=1 SV=1	3	3	21,8	4,03	0,462	
P06493	Cyclin-dependent kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDK1 PE=1 SV=3	1	1	34,1	0	0,01	1,04
Q8N393	Zinc finger protein 786 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF786 PE=1 SV=2	1	1	89,8	0	100	
Q9HCJ0	Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNRC6C PE=1 SV=3	1	1	175,9	0	0,01	0,01

P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MT-CO2 PE=1 SV=1	2	2	25,5	12,08	0,537	0,334
P50402	Emerin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EMD PE=1 SV=1	2	2	29	0	0,198	0,112
B4DY08	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=1	5	5	32	19,49	0,395	0,465
H0YGF3	Pre-mRNA-processing factor 19 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF19 PE=1 SV=1	1	1	5,3	0	0,01	0,01
P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECHS1 PE=1 SV=4	1	1	31,4	1,63		
A0A087X1I3	Flavoprotein subunit of complex II OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SDHA PE=1 SV=1	1	1	56,6	0	0,01	0,355
Q96PU9	Outer dense fiber protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ODF3 PE=1 SV=1	1	1	27,7	4,41	0,01	0,01
Q9Y5M8	Signal recognition particle receptor subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRPRB PE=1 SV=3	2	2	29,7	0	43,158	0,01
A0A0A0MTC1	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RNF213 PE=1 SV=1	1	1	596,1	0	0,497	0,01
Q9BXW7	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDHD5 PE=1 SV=1	3	3	46,3	1,75	3,749	0,01
A0A087X0X3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=1	9	9	77,5	125,07	0,297	0,946
F5H5A1	Malonate--CoA ligase ACSF3, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSF3 PE=1 SV=1	1	1	35,1	0	100	
K7ELF5	RING finger protein unkempt homolog (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UNK PE=1 SV=1	1	1	7,6	0		
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC18 PE=1 SV=3	4	4	13,9	98,54	0,078	0,364
E9PIE4	Mitochondrial carrier homolog 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTCH2 PE=1 SV=8	3	3	28,5	6,55	0,129	0,418

H7BZW6	Histone deacetylase complex subunit SAP18 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAP18 PE=1 SV=2	1	1	16	0		100
B4DY09	Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF2 PE=1 SV=1	3	3	38,9	2,63	0,032	0,01
K7ENV7	Isochorismatase domain-containing protein 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ISOC2 PE=1 SV=8	1	1	18,9	0	100	
A0A804HK65	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSD17B4 PE=4 SV=1	5	5	77,2	8,64	1,306	0,217
Q6DN03	Putative histone H2B type 2-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC20P PE=5 SV=3	2	2	21,5	2,45	0,01	0,474
P62906	60S ribosomal protein L10a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL10A PE=1 SV=2	1	1	24,8	0	0,01	0,01
Q9NR31	GTP-binding protein SAR1a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAR1A PE=1 SV=1	3	3	22,4	1,92	0,146	1,219
A0A140TA84	MICOS complex subunit MIC13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MICOS13 PE=1 SV=1	1	1	12	0		
A0A7N4I390	NTPase KAP family P-loop domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NKPD1 PE=1 SV=1	1	1	91,8	0	0,01	16,018
O94874	E3 UFM1-protein ligase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UFL1 PE=1 SV=2	2	2	89,5	2,02		
B1AHC9	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC6 PE=1 SV=1	3	3	64,2	1,65	0,01	0,01
M0R0C3	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TIMM50 PE=1 SV=1	2	2	12	0	100	
O94829	Importin-13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IPO13 PE=1 SV=3	1	1	108,1	0	100	
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1	4	4	30,8	9,08	0,72	0,566

A0A0A0MSJ7	Tissue-resident T-cell transcription regulator protein ZNF683 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF683 PE=4 SV=1	1	1	20,8	0		100
Q9H8M2	Bromodomain-containing protein 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BRD9 PE=1 SV=2	1	1	67	0		
A0A7I2V3U2	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=1	4	4	21,6	39,55	0,181	0,436
Q13637	Ras-related protein Rab-32 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB32 PE=1 SV=3	1	1	25	3,74	0,01	0,01
A0A087WYN9	ATP-dependent RNA helicase DHX29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX29 PE=1 SV=1	1	1	155,2	3,77	100	
A0A7P0T997	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLAT PE=1 SV=1	1	1	67,8	1,7	0,01	0,01
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDHA1 PE=1 SV=3	2	2	43,3	0	0,952	0,922
G3V325	ATP5MF-PTCD1 readthrough OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5MF-PTCD1 PE=4 SV=1	2	2	84,1	3,45	0,414	0,495
Q9H078	Caseinolytic peptidase B protein homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLPB PE=1 SV=1	1	1	78,7	0	0,457	0,01
A0A3B3ITW3	ATP-binding cassette sub-family D member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCD3 PE=1 SV=2	1	1	75,4	0		100
H7C3E0	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTDSP1 PE=1 SV=8	1	1	21,1	0	0,01	0,01
D6RG13	40S ribosomal protein S3a (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS3A PE=1 SV=1	2	2	25,6	1,74	0,251	1,003
Q8N163	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCAR2 PE=1 SV=2	1	1	102,8	0		

B0QY21	Nuclear pore complex protein Nup50 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP50 PE=1 SV=1	1	1	19,2	1,65	0,01	0,01
Q15629	Translocating chain-associated membrane protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRAM1 PE=1 SV=3	2	2	43	1,64	0,01	0,01
J3KRX5	60S ribosomal protein L17 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL17 PE=1 SV=1	5	5	20,2	11,88	0,394	2,588
E5RGY0	Derlin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DERL1 PE=1 SV=1	2	2	17,2	1,65	0,395	
H7C4C8	T-complex protein 1 subunit theta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT8 PE=1 SV=1	1	1	35,5	0	0,01	0,181
F5H6G4	RING-type E3 ubiquitin transferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RMND5B PE=1 SV=1	1	1	42,7	0		100
P68366	Tubulin alpha-4A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA4A PE=1 SV=1	11	1	49,9	147,42	0,016	0,239
Q8WUY1	Protein THEM6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=THEM6 PE=1 SV=2	1	1	23,9	0	100	
Q13751	Laminin subunit beta-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMB3 PE=1 SV=1	7	7	129,5	17,49	0,01	0,066
Q9BYX7	Putative beta-actin-like protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POTEKP PE=5 SV=1	4	1	42	367,51	0,01	0,035
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDOA PE=1 SV=2	1	1	39,4	0	1,551	16,852
P0DUB6	Alpha-amylase 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AMY1A PE=1 SV=1	1	1	57,7	0	11,382	0,01
Q8TE73	Dynein axonemal heavy chain 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH5 PE=1 SV=3	1	1	528,7	0	0,01	0,113
P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	1	1	32,9	0	0,01	0,01
Q08380	Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS3BP PE=1 SV=1	2	2	65,3	0	8,649	0,01

P02768	Albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2	7	7	69,3	48,06	2,719	0,842
P30041	Peroxisredoxin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX6 PE=1 SV=3	2	2	25	0	0,641	1,596
Q96CS3	FAS-associated factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAF2 PE=1 SV=2	2	2	52,6	0	3,488	0,01
P69905	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA1 PE=1 SV=2	5	5	15,2	135,46	0,012	0,089
Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HYOU1 PE=1 SV=1	7	7	111,3	5,75	0,694	2,413
P50454	Serpin H1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINH1 PE=1 SV=2	15	15	46,4	64,67	1,243	1,792
P81605	Dermcidin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCD PE=1 SV=2	3	3	11,3	38,46	18,534	10,247
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PYGB PE=1 SV=5	5	5	96,6	5,22	0,01	0,153
G8JLG2	Corneodesmosin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDSN PE=1 SV=1	1	1	51,6	0	17,797	0,01
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD11 PE=1 SV=3	1	1	47,4	0	0,01	0,01
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMR3B PE=1 SV=2	1	1	8,2	0		
Q02742	Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GCNT1 PE=1 SV=2	1	1	49,8	0	1,362	0,303
O43242	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD3 PE=1 SV=2	2	2	60,9	0	1,154	0,227
P78371	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT2 PE=1 SV=4	6	6	57,5	3,55	0,171	0,048

P47929	Galectin-7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS7 PE=1 SV=2	1	1	15,1	0		100
O00487	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD14 PE=1 SV=1	1	1	34,6	0	6,4	0,01
K7EPJ4	Cartilage intermediate layer protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CILP2 PE=1 SV=1	1	1	126,8	0	0,01	0,48
C9JH19	Cathepsin D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSD PE=1 SV=2	1	1	48,6	0		
P30101	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA3 PE=1 SV=4	6	5	56,7	7,73	0,389	0,752
P68371	Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB4B PE=1 SV=1	15	3	49,8	164,21	0,428	1,463
P53621	Coatomer subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPA PE=1 SV=2	3	3	138,3	0		
P84243	Histone H3.3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-3A PE=1 SV=2	4	2	15,3	287,33	0,265	0,89
P14618	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=4	17	17	57,9	263,69	0,191	1,4
P07437	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB PE=1 SV=2	16	4	49,6	193,74	0,453	1,884
A0A7I2V323	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=1	3	3	35,2	8,29	0,072	0,057
P62891	60S ribosomal protein L39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL39 PE=1 SV=2	1	1	6,4	0		100
P62861	40S ribosomal protein S30 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAU PE=1 SV=1	1	1	6,6	0	0,01	0,01
P17858	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFKL PE=1 SV=6	1	1	85	0	0,01	1,578
P12273	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIP PE=1 SV=1	2	2	16,6	12,6	0,08	4,833

P13667	Protein disulfide-isomerase A4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA4 PE=1 SV=2	4	4	72,9	8,09	0,01	0,489
Q13753	Laminin subunit gamma-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMC2 PE=1 SV=2	1	1	130,9	2,96	0,01	0,01
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIA PE=1 SV=2	2	2	18	1,79	0,01	0,01
O00622	CCN family member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCN1 PE=1 SV=1	3	3	42	3,5	0,01	1,365
Q9NZT1	Calmodulin-like protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALML5 PE=1 SV=2	2	2	15,9	4,19	100	100
P01242	Growth hormone variant OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GH2 PE=1 SV=3	1	1	25	21,52	0,01	0,01
P00387	NADH-cytochrome b5 reductase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5R3 PE=1 SV=3	6	6	34,2	21,5	0,575	0,3
Q16674	Melanoma-derived growth regulatory protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MIA PE=1 SV=1	1	1	14,5	0	0,01	0,01
P00558	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGK1 PE=1 SV=3	5	5	44,6	5,45	0,01	2,217
Q86YA3	Protein ZGRF1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZGRF1 PE=1 SV=3	1	1	236,5	0	100	
K7EQL6	Ubiquitinyl hydrolase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP32 PE=1 SV=1	1	1	143,8	0	100	
E9PK47	Alpha-1,4 glucan phosphorylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PYGL PE=1 SV=1	1	1	94	0	100	
A0A0D9SFM0	E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SHPRH PE=1 SV=1	1	1	193,3	0	100	
M0QYK5	Splicing factor U2AF 26 kDa subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=U2AF1L4 PE=4 SV=1	1	1	7,5	0	100	
E9PCY7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH1 PE=1 SV=1	1	1	47,1	0	100	

Q9P0N9	TBC1 domain family member 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBC1D7 PE=1 SV=1	1	1	34	0	100
G3V2L5	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COQ6 PE=1 SV=1	1	1	9,4	0	100
A0A5F9UQ55	F-box/WD repeat-containing protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FBXW4 PE=1 SV=1	1	1	61,8	3,72	100
O95905	Protein ecdysoneless homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECD PE=1 SV=1	1	1	72,7	0	100
A2RRP1	Neuroblastoma-amplified sequence OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NBAS PE=1 SV=2	1	1	268,4	0	100
Q96GP6	Scavenger receptor class F member 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCARF2 PE=1 SV=5	1	1	92,3	0	100
E7ENJ7	Translin-associated factor X-interacting protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSNAXIP1 PE=1 SV=1	1	1	74	0	100
F6S232	Stabilizer of axonemal microtubules 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAXO1 PE=1 SV=2	1	1	46,8	0	100
P55198	Protein AF-17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MLLT6 PE=1 SV=3	1	1	112	0	100
Q8NEV4	Myosin-IIIa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO3A PE=1 SV=2	1	1	186,1	0	100
P12035	Keratin, type II cytoskeletal 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT3 PE=1 SV=3	6	1	64,4	84,47	100
Q8WXE0	Caskin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CASKIN2 PE=1 SV=2	1	1	126,7	0	100
Q96IR2	Zinc finger protein 845 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF845 PE=1 SV=3	1	1	113,1	3,41	100
Q6YHU6	Thyroid adenoma-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=THADA PE=1 SV=1	1	1	219,5	0	100

A0A669KAW1	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUT8 PE=1 SV=1	1	1	53,4	0	100	
Q5XKE5	Keratin, type II cytoskeletal 79 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT79 PE=1 SV=2	6	1	57,8	97,38	100	
Q9Y6S9	Ribosomal protein S6 kinase-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS6KL1 PE=2 SV=1	1	1	60	0	100	
Q5JP53	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB PE=1 SV=1	8	8	47,7	12,49	2,738	0,81
Q9P0M9	39S ribosomal protein L27, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRPL27 PE=1 SV=1	1	1	16,1	0	0,204	0,043
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT6B PE=1 SV=5	18	2	60	400,04	0,134	0,01
P35637	RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUS PE=1 SV=1	1	1	53,4	0	0,048	0,01
H3BN98	40S ribosomal protein S15a (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 PE=3 SV=2	1	1	27,2	3,66	0,029	0,01
F5H760	Glutathione transferase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MGST1 PE=1 SV=1	2	2	11,9	0	0,028	0,01
M0QX76	40S ribosomal protein S16 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS16 PE=1 SV=1	2	2	5,6	1,84	0,01	0,01
F5H1M8	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCMTD1 PE=1 SV=1	1	1	32,1	0	0,01	0,388
A0A7P0TAI0	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA5 PE=1 SV=1	5	4	68,1	8,25	0,01	0,32
Q16851	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UGP2 PE=1 SV=5	2	2	56,9	0	0,01	0,01
Q9UQ35	Serine/arginine repetitive matrix protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRRM2 PE=1 SV=2	1	1	299,4	0	0,01	0,01

Q14CN4	Keratin, type II cytoskeletal 72 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT72 PE=1 SV=2	3	1	55,8	52,04	0,01	0,01
P10599	Thioredoxin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TXN PE=1 SV=3	1	1	11,7	0	0,01	0,106
Q6IE36	Ovostatin homolog 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OVOS2 PE=2 SV=2	1	1	161,1	0	0,01	0,01
P23526	Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHCY PE=1 SV=4	1	1	47,7	0	0,01	0,01
H7C125	Ras-related protein Rab-2A (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB2A PE=1 SV=1	1	1	12,1	3,04	0,01	0,01
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A3 PE=1 SV=4	1	1	46,8	0	0,01	0,01
O14880	Microsomal glutathione S-transferase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MGST3 PE=1 SV=1	1	1	16,5	0	0,01	0,01
F8W7S5	Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRBP1 PE=1 SV=1	1	1	84,3	1,68	0,01	0,01
E9PQD7	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS2 PE=1 SV=1	1	1	25,2	1,94	0,01	0,292
B4DNK4	Pyruvate kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=1	7	7	49,9	12,82	0,01	0,053
H7C463	MICOS complex subunit MIC60 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMMT PE=1 SV=1	4	4	68,1	0	0,01	0,01
D6RAT0	40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS3A PE=1 SV=1	3	3	25,9	3,72	0,01	0,01
Q14117	Dihydropyrimidinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPYS PE=1 SV=1	1	1	56,6	0	0,01	0,01
Q92610	Zinc finger protein 592 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF592 PE=1 SV=2	1	1	137,4	0	0,01	11,738
Q16778	Histone H2B type 2-E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC21 PE=1 SV=3	2	2	13,9	3,66	0,01	3,704

Q5VVC8	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL11 PE=1 SV=2	1	1	19	4,83	0,01	0,135
M0QZM1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=1	2	1	40	0	0,01	0,01
A0A590UK80	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 PE=3 SV=1	2	2	121	0	0,01	0,01
A0A140T973	Spliceosome RNA helicase DDX39B (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=2	1	1	15,6	0	0,01	0,01
A0A7P0T9F1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYNC1H1 PE=1 SV=1	1	1	431,5	0	0,01	0,613
Q5T4U5	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACADM PE=1 SV=1	1	1	50,2	0	0,01	0,01
E7ETU9	Procollagen-lysine 5-dioxygenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLOD2 PE=1 SV=1	1	1	81,1	0	0,01	0,01
F8WBC0	Ras-related protein Rap-1b (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAP1B PE=4 SV=1	1	1	3,5	1,99	0,01	0,157
A0A024RA28	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, isoform CRA_d OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=1	1	1	31,1	0	0,01	0,01
B4DSU6	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=1	1	1	15,7	0	0,01	0,01
P49207	60S ribosomal protein L34 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL34 PE=1 SV=3	1	1	13,3	1,75	0,01	0,164
A0A7I2V5S2	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=1	1	1	33,9	1,77	0,01	0,01
C9J4S4	Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB7A PE=1 SV=1	1	1	11	0	0,01	0,01
H3BRG4	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UQCRC2 PE=1 SV=1	2	2	44,6	2,61	0,01	0,01

B5MCT8	40S ribosomal protein S9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS9 PE=1 SV=1	1	1	16,6	1,94	0,01	0,01
A0A7I2V464	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=1	1	1	42	0	0,01	0,01
Q8TD47	40S ribosomal protein S4, Y isoform 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4Y2 PE=2 SV=3	1	1	29,3	1,78	0,01	0,01
Q9ULV5	Heat shock factor protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSF4 PE=1 SV=2	1	1	53	0	0,01	0,01
A0A0J9YXZ5	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IQGAP1 PE=1 SV=1	1	1	135,9	0	0,01	0,01
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRC59 PE=1 SV=1	1	1	34,9	0	0,01	0,01
Q5QPL9	RNA-binding protein Raly (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RALY PE=1 SV=1	1	1	24,7	0	0,01	0,01
E9PK86	Serpin H1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINH1 PE=1 SV=1	1	1	26,9	0	0,01	0,01
A0A5F9ZHJ0	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAT1 PE=1 SV=1	1	1	35,5	0	0,01	0,01
H0YJF9	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLST PE=1 SV=1	1	1	8,4	0	0,01	0,01
P53367	Arfaptin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARFIP1 PE=1 SV=2	1	1	41,7	0	0,01	0,01
E9PS50	40S ribosomal protein S13 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS13 PE=1 SV=1	1	1	12,5	1,83	0,01	0,01
A2A3R5	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS6 PE=1 SV=1	1	1	25	2,31	0,01	0,01
F5H282	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TCP1 PE=1 SV=1	2	2	36,4	2,02	0,01	0,01

D6RFI0	Sideroflexin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFXN1 PE=1 SV=8	1	1	21,4	0	0,01	0,01
Q9Y4G2	Pleckstrin homology domain-containing family M member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEKHM1 PE=1 SV=3	1	1	117,4	0		
H0Y8K0	Heat shock 70kDa protein 9B (Mortalin-2), isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=2	4	4	50	1,74		0,01
A0A7I2V599	60 kDa chaperonin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=1	4	4	57,8	5,13		0,01
O43692	Peptidase inhibitor 15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PI15 PE=1 SV=1	1	1	29	0		
Q92614	Unconventional myosin-XVIIIa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO18A PE=1 SV=3	1	1	233	0		
Q68CR7	Leucine-rich repeat-containing protein 66 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRC66 PE=2 SV=1	1	1	97,7	0		
P61026	Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB10 PE=1 SV=1	2	2	22,5	0	0,32	7,206

EK-5. nLC-MS/MS analizleri sonucu hücre grupları arasında anlamlı farklılık gösteren proteinler

Grup- 1				
Accession no	Protein Tanımı	Gen senbolü	Protein yoğunluk oranı : (mcf7) / (mcf10A)	Protein yoğunluk oranı: (mda mb 231) / (mcf10A)
P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAMPT PE=1 SV=1	NAMPT	8,31	47,692

Q9UJS0	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A13 PE=1 SV=2	SLC25A13	>100	>100
P02786	Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TFRC PE=1 SV=2	TFRC	3,72	6,989
O43150	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ASAP2 PE=1 SV=3	ASAP2	14,501	17,996
P07237	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=3	P4HB	>100	>100
P05109	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN= PE=1 SV=1	S100A8	>100	>100
P01834	Immunoglobulin kappa constant OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGKC PE=1 SV=2	IGKC	>100	>100
Q02413	Desmoglein-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSG1 PE=1 SV=2	DSG1	>100	>100
Q8IV04	Carabin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBC1D10C PE=1 SV=1	TBC1D10C	10,274	25,752
Q8I WV2	Contactin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNTN4 PE=1 SV=1	CNTN4	0,874	46,508

Grup- 2

Accession no	Protein Tanımı	Gen senbolü	Protein yoğunluk oranı : (mcf7) / (mcf10A)	Protein yoğunluk oranı: (mda mb 231) / (mcf10A)
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	HSP90AA1	0,041	0,01
F5GZS6	4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC3A2 PE=1 SV=1	SLC3A2	0,698	0,426
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5PO PE=1 SV=1	ATP5PO	0,857	0,01
P27105	Stomatin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STOM PE=1 SV=3	STOM	0,27	0,656

P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VDAC1 PE=1 SV=2	VDAC1	0,329	0,288
Q9NQC3	Reticulon-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTN4 PE=1 SV=2	RTN4	0,602	0,085
O95716	Ras-related protein Rab-3D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB3D PE=1 SV=1	RAB3D	0,455	0,378
Q5T9A4	ATPase family AAA domain-containing protein 3B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD3B PE=1 SV=1	ATAD3B	0,482	0,116
Q9UBN4	Short transient receptor potential channel 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPC4 PE=1 SV=1	TRPC4	47,219	0,01
Q9C0E4	Glutamate receptor-interacting protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GRIP2 PE=1 SV=4	GRIP2	0,529	0,118
C9JZR2	Catenin delta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTNND1 PE=1 SV=2	CTNND1	0,416	0,01
F8WBY4	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP1B3 PE=1 SV=1	ATP1B3	0,208	0,166
Q9NZB2	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM120A PE=1 SV=2	FAM120A	0,058	< 0,01
J3QLU9	Receptor protein-tyrosine kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERBB2 PE=1 SV=1	ERBB2	0,012	< 0,01
O95810	Caveolae-associated protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAVIN2 PE=1 SV=3	CAVIN2	< 0,01	< 0,01

Grup- 3

Accession no	Protein Tanımı	Gen senbolü	Protein yoğunluk oranı : (mcf7) / (mcf10A)	Protein yoğunluk oranı: (mda mb 231) / (mcf10A)
Q15286	Ras-related protein Rab-35 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB35 PE=1 SV=1	RAB35	< 0,01	< 0,01

P51153	Ras-related protein Rab-13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB13 PE=1 SV=1	RAB13	< 0,01	< 0,01
E7EUI6	Integrin beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGB1 PE=1 SV=2	ITGB1	< 0,01	< 0,01
P12814	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=1 SV=2	ACTN1	< 0,01	< 0,01
P07357	Complement component C8 alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C8A PE=1 SV=2	C8A	< 0,01	< 0,01
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EHD2 PE=1 SV=2	EHD2	< 0,01	< 0,01
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNG12 PE=1 SV=3	GNG12	< 0,01	< 0,01
Q15019	Septin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN2 PE=1 SV=1	SEPTIN2	< 0,01	< 0,01
P55290	Cadherin-13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDH13 PE=1 SV=1	CDH13	< 0,01	< 0,01
Q8WU76	Sec1 family domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCFD2 PE=1 SV=2	SCFD2	< 0,01	< 0,01
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ASPH PE=1 SV=3	ASPH	< 0,01	< 0,01
P01024	Complement C3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C3 PE=1 SV=2	C3	< 0,01	< 0,01
G3V1Q4	Septin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN7 PE=1 SV=2	SEPTIN7	< 0,01	< 0,01
Q14573	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITPR3 PE=1 SV=2	ITPR3	< 0,01	< 0,01
P07814	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPRS1 PE=1 SV=5	EPRS1	< 0,01	< 0,01
A0A0C4DH29	Immunoglobulin heavy variable 1-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHV1-3 PE=3 SV=1	IGHV1-3	< 0,01	< 0,01
E9PQM1	Cathepsin B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSB PE=1 SV=2	CTSB	< 0,01	< 0,01
P10301	Ras-related protein R-Ras OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRAS PE=1 SV=1	RRAS	< 0,01	< 0,01
Q15165	Serum paraoxonase/arylesterase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PON2 PE=1 SV=4	PON2	< 0,01	< 0,01

G3V1L9	Tight junction protein ZO-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TJP1 PE=1 SV=2	TJP1	< 0,01	< 0,01
P98161	Polycystin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKD1 PE=1 SV=3	PKD1	< 0,01	< 0,01
Q92597	Protein NDRG1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDRG1 PE=1 SV=1	NDRG1	< 0,01	< 0,01
Q14254	Flotillin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLOT2 PE=1 SV=2	FLOT2	< 0,01	< 0,01
P09211	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSTP1 PE=1 SV=2	GSTP1	< 0,01	< 0,01
P0DP72	V-set and immunoglobulin domain-containing protein 10-like 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VSIG10L2 PE=3 SV=1	VSIG10L2	< 0,01	< 0,01
Q16552	Interleukin-17A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL17A PE=1 SV=1	IL17A	< 0,01	< 0,01
P09429	High mobility group protein B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGB1 PE=1 SV=3	HMGB1	< 0,01	< 0,01
P06703	Protein S100-A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A6 PE=1 SV=1	S100A6	< 0,01	< 0,01
Q86TC9	Myopalladin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYPN PE=1 SV=2	MYPN	< 0,01	< 0,01
Q9BQG1	Synaptotagmin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYT3 PE=1 SV=1	SYT3	< 0,01	< 0,01
Q8N1I0	Dedicator of cytokinesis protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DOCK4 PE=1 SV=3	DOCK4	< 0,01	< 0,01
Q14126	Desmoglein-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSG2 PE=1 SV=2	DSG2	< 0,01	< 0,01
Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAP1 PE=1 SV=5	CAP1	< 0,01	< 0,01
P26006	Integrin alpha-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGA3 PE=1 SV=5	ITGA3	< 0,01	< 0,01
P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMED10 PE=1 SV=2	TMED10	< 0,01	< 0,01
B1AQK7	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CACNA1B PE=1 SV=1	CACNA1B	< 0,01	< 0,01
Q9HBM0	Vezatin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VEZT PE=1 SV=3	VEZT	< 0,01	< 0,01
P19022	Cadherin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDH2 PE=1 SV=4	CDH2	< 0,01	< 0,01
P24723	Protein kinase C eta type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKCH PE=1 SV=4	PRKCH	< 0,01	< 0,01

P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGDIA PE=1 SV=3	ARHGDIA	< 0,01	< 0,01
P09958	Furin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FURIN PE=1 SV=2	FURIN	< 0,01	< 0,01
P35670	Copper-transporting ATPase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP7B PE=1 SV=4	ATP7B	< 0,01	< 0,01
Q8NBX0	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCCPDH PE=1 SV=1	SCCPDH	< 0,01	< 0,01
Q9GZP1	Neurensin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NRSN2 PE=1 SV=1	NRSN2	< 0,01	< 0,01
Q969N4	Trace amine-associated receptor 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAAR8 PE=2 SV=1	TAAR8	< 0,01	< 0,01
P98160	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPG2 PE=1 SV=4	HSPG2	< 0,01	< 0,01
Q13094	Lymphocyte cytosolic protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LCP2 PE=1 SV=1	LCP2	< 0,01	< 0,01
P21579	Synaptotagmin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYT1 PE=1 SV=1	SYT1	< 0,01	< 0,01

Grup- 4				
Accession no	Protein Tanımı	Gen senbolü	Protein yoğunluk oranı : (mcf7) / (mcf10A)	Protein yoğunluk oranı: (mda mb 231) / (mcf10A)
P84085	ADP-ribosylation factor 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARF5 PE=1 SV=2	ARF5	>100	
Q8NF37	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LPCAT1 PE=1 SV=2	LPCAT1	>100	
Q14728	Major facilitator superfamily domain-containing protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MFSD10 PE=1 SV=1	MFSD10	>100	

Q96E17	Ras-related protein Rab-3C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB3C PE=1 SV=1	RAB3C	>100
P15924	Desmoplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSP PE=1 SV=3	DSP	>100
Q86UQ4	ATP-binding cassette sub-family A member 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCA13 PE=2 SV=3	ABCA13	>100
Q99985	Semaphorin-3C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEMA3C PE=2 SV=2	SEMA3C	>100
Q6N022	Teneurin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TENM4 PE=1 SV=2	TENM4	>100
J3KR82	Polo-like kinase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLK4 PE=1 SV=1	PLK4	>100
P35221	Catenin alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTNNA1 PE=1 SV=1	CTNNA1	>100
Q9Y5I0	Protocadherin alpha-13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCDHA13 PE=2 SV=1	PCDHA13	>100
Q7RTY1	Monocarboxylate transporter 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC16A9 PE=1 SV=1	SLC16A9	>100
Q8N3K9	Cardiomyopathy-associated protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CMYA5 PE=1 SV=3	CMYA5	>100
P53618	Coatomer subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPB1 PE=1 SV=3	COPB1	>100
Q9NY47	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CACNA2D2 PE=1 SV=2	CACNA2D2	>100
P46019	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, liver isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHKA2 PE=1 SV=1	PHKA2	>100
Q8IZQ1	WD repeat and FYVE domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDFY3 PE=1 SV=2	WDFY3	>100
Q08554	Desmocollin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSC1 PE=1 SV=2	DSC1	>100
Q7Z4W1	L-xylulose reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCXR PE=1 SV=2	DCXR	>100

Q15125	3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EBP PE=1 SV=3	EBP	>100
O94832	Unconventional myosin-Id OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1D PE=1 SV=2	MYO1D	>100
Q5T321	Neurobeachin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NBEA PE=1 SV=2	NBEA	>100
O95197	Reticulon-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTN3 PE=1 SV=2	RTN3	>100
O14920	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IKBKB PE=1 SV=1	IKBKB	>100
A6NN92	Putative gap junction epsilon-1 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GJE1 PE=5 SV=1	GJE1	>100
Q69384	Endogenous retrovirus group K member 6 Env polyprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERVK-6 PE=1 SV=1	ERVK-6	>100
Q92851	Caspase-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CASP10 PE=1 SV=3	CASP10	>100
O75445	Usherin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USH2A PE=1 SV=3	USH2A	>100
Q96EY1	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAJA3 PE=1 SV=2	DNAJA3	>100
Q9UKE5	TRAF2 and NCK-interacting protein kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNIK PE=1 SV=1	TNIK	>100
O15068	Guanine nucleotide exchange factor DBS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCF2L PE=1 SV=2	MCF2L	>100
Q14392	Transforming growth factor beta activator LRRC32 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRC32 PE=1 SV=1	LRRC32	>100
Q00341	Vigilin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDLBP PE=1 SV=2	HDLBP	>100
E7EUB5	DNA repair protein-complementing XP-C cells (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XPC PE=1 SV=1	XPC	>100

Grup- 5				
Accession no	Protein Tanımı	Gen senbolü	Protein yoğunluk	Protein yoğunluk

			oranı : (mcf7) / (mcf10A)	oranı: (mda mb 231) / (mcf10A)
F8W7U0	Intersectin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITSN1 PE=1 SV=1	ITSN1		>100
P20020	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2B1 PE=1 SV=4	ATP2B1		>100
Q96AD5	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PNPLA2 PE=1 SV=1	PNPLA2		>100
Q9NY99	Gamma-2-syntrophin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNTG2 PE=1 SV=2	SNTG2		>100
Q6UXY1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BAIAP2L2 PE=1 SV=1	BAIAP2L2		>100
Q8IZD2	Inactive histone-lysine N-methyltransferase 2E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KMT2E PE=1 SV=1	KMT2E		>100
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TGM2 PE=1 SV=2	TGM2		>100
P16452	Protein 4.2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPB42 PE=1 SV=3	EPB42		>100
Q9UPN3	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MACF1 PE=1 SV=4	MACF1		>100
A2A376	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX58 PE=1 SV=1	DDX58		>100
P07359	Platelet glycoprotein Ib alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GP1BA PE=1 SV=2	GP1BA		>100
P16066	Atrial natriuretic peptide receptor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPR1 PE=1 SV=1	NPR1		>100

Grup- 6

Accession no	Protein Tanımı	Gen senbolü	Protein yoğunluk	Protein yoğunluk oranı: (mda mb
-----------------	----------------	-------------	---------------------	---------------------------------------

			oranı : (mcf7) / (mcf10A)	231) / (mcf10A)
Q9UBN4	Short transient receptor potential channel 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPC4 PE=1 SV=1	TRPC4	47,219	0,01
P12235	ADP/ATP translocase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A4 PE=1 SV=4	SLC25A4	9,778	0,232
P20339	Ras-related protein Rab-5A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB5A PE=1 SV=2	RAB5A	26,228	1,463
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AZGP1 PE=1 SV=2	AZGP1	5,791	1,753
Q8WVM8	Sec1 family domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCFD1 PE=1 SV=4	SCFD1	4,96	0,681
Q9Y3L5	Ras-related protein Rap-2c OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAP2C PE=1 SV=1	RAP2C	13,389	2,052
Q9Y597	BTB/POZ domain-containing protein KCTD3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KCTD3 PE=1 SV=2	KCTD3	94,4	2,686
P01116	GTPase KRas OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRAS PE=1 SV=1	KRAS	31,763	0,01
O75691	Small subunit processome component 20 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UTP20 PE=1 SV=3	UTP20	29,929	7,842
Q9BQ39	ATP-dependent RNA helicase DDX50 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX50 PE=1 SV=1	DDX50	3,015	1,736

Grup- 7				
Accession no	Protein Tanımı	Gen senbolü	Protein yoğunluk oranı : (mcf7) / (mcf10A)	Protein yoğunluk oranı: (mda mb 231) / (mcf10A)
P07355	Annexin A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=2	ANXA2	0,033	0,428

P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=3	GAPDH	0,067	0,847
P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=2	ENO1	0,305	1,549
P02748	Complement component C9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C9 PE=1 SV=2	C9	0,01	0,331
P14625	Endoplasmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	HSP90B1	0,294	0,833
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHNAK PE=1 SV=2	AHNAK	0,102	0,459
P04899	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNAI2 PE=1 SV=3	GNAI2	0,015	0,318
Q92736	Ryanodine receptor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RYSR2 PE=1 SV=3	RYSR2	0,02	0,686
Q6NZI2	Caveolae-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAVIN1 PE=1 SV=1	CAVIN1	0,056	1,591
A0A087WVQ6	Clathrin heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLTC PE=1 SV=1	CLTC	0,098	0,797
P26038	Moesin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MSN PE=1 SV=3	MSN	0,01	0,838
H0YCV9	CD44 antigen (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD44 PE=1 SV=2	CD44	0,01	1,756
P04004	Vitronectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VTN PE=1 SV=1	VTN	0,01	0,746
P10620	Microsomal glutathione S-transferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MGST1 PE=1 SV=1	MGST1	0,01	0,271
Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ESYT1 PE=1 SV=1	ESYT1	0,099	1,998
Q59FP8	Neogenin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NEO1 PE=1 SV=1	NEO1	0,01	0,727
E9PDF6	Unconventional myosin-Ib OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1B PE=1 SV=1	MYO1B	0,01	1,727
Q96TA1	Protein Niban 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NIBAN2 PE=1 SV=3	NIBAN2	0,01	1,688

P00533	Epidermal growth factor receptor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EGFR PE=1 SV=2	EGFR	0,01	0,775
Q96S97	Myeloid-associated differentiation marker OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYADM PE=1 SV=2	MYADM	0,01	1,084
Q8N271	Prominin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROM2 PE=1 SV=1	PROM2	0,01	1,342
Q9ULV4	Coronin-1C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CORO1C PE=1 SV=1	CORO1C	0,01	2,012
P60903	Protein S100-A10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A10 PE=1 SV=2	S100A10	0,01	0,438
P10643	Complement component C7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C7 PE=1 SV=2	C7	0,01	0,23
A0A499FIX8	Extended synaptotagmin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ESYT2 PE=1 SV=1	ESYT2	0,01	1,038
Q9Y490	Talin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TLN1 PE=1 SV=3	TLN1	0,055	4,729
Q9Y493	Zonadhesin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZAN PE=2 SV=5	ZAN	0,015	0,212
A4D1S5	Ras-related protein Rab-19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB19 PE=1 SV=2	RAB19	0,01	2,78
Q8TCT9	Minor histocompatibility antigen H13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HM13 PE=1 SV=1	HM13	0,01	1,576
Q9UPT5	Exocyst complex component 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EXOC7 PE=1 SV=3	EXOC7	0,01	4,367
A0A024R571	EH domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EHD1 PE=1 SV=1	EHD1	0,01	4,44
K7EKI0	Envoplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EVPL PE=1 SV=1	EVPL	0,01	0,416
P12259	Coagulation factor V OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F5 PE=1 SV=4	F5	0,01	0,319
Q16720	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2B3 PE=1 SV=3	ATP2B3	0,01	1,84
O00299	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLIC1 PE=1 SV=4	CLIC1	0,01	0,724

P05121	Plasminogen activator inhibitor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINE1 PE=1 SV=1	SERPINE1	0,01	0,893
P01008	Antithrombin-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	SERPINC1	0,01	0,273
P21333	Filamin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNA PE=1 SV=4	FLNA	0,043	0,306
P35579	Myosin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH9 PE=1 SV=4	MYH9	0,025	0,387
P15144	Aminopeptidase N OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANPEP PE=1 SV=4	ANPEP	0,01	0,569
Q03135	Caveolin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAV1 PE=1 SV=4	CAV1	0,012	0,362
P21589	5'-nucleotidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NT5E PE=1 SV=1	NT5E	0,01	0,281
Q92743	Serine protease HTRA1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HTRA1 PE=1 SV=1	HTRA1	0,01	0,343
O75369	Filamin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNB PE=1 SV=2	FLNB	0,034	0,683
Q9UHQ9	NADH-cytochrome b5 reductase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5R1 PE=1 SV=1	CYB5R1	0,106	0,219
P33121	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSL1 PE=1 SV=1	ACSL1	0,01	0,216
Q9NZM1	Myoferlin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYOF PE=1 SV=1	MYOF	0,01	0,41

Grup- 8

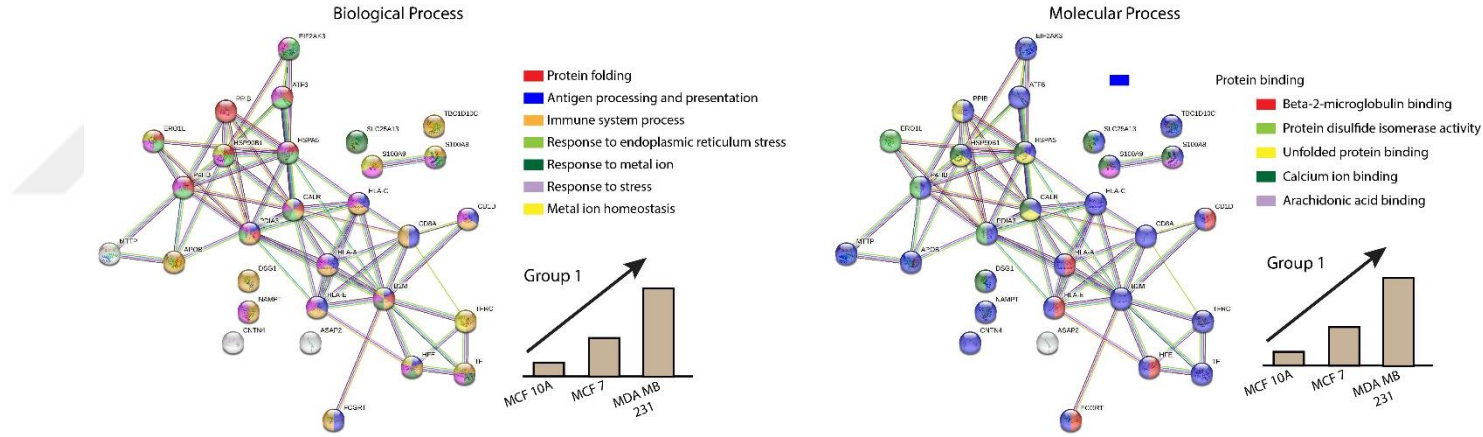
Accession no	Protein Tanımı	Gen senbolü	Protein yoğunluk oranı : (mcf7) / (mcf10A)	Protein yoğunluk oranı: (mda mb 231) / (mcf10A)
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TGFBI PE=1 SV=1	TGFBI	0,01	0,016
P02751	Fibronectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FN1 PE=1 SV=5	FN1	0,019	0,119

P13671	Complement component C6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C6 PE=1 SV=3	C6	0,028	0,156
P01031	Complement C5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C5 PE=1 SV=4	C5	0,01	0,175
P00734	Prothrombin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F2 PE=1 SV=2	F2	0,01	0,064
Q6YHK3	CD109 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD109 PE=1 SV=2	CD109	0,01	0,187
J3QQV2	Monocarboxylate transporter 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC16A3 PE=1 SV=9	SLC16A3	0,01	0,112

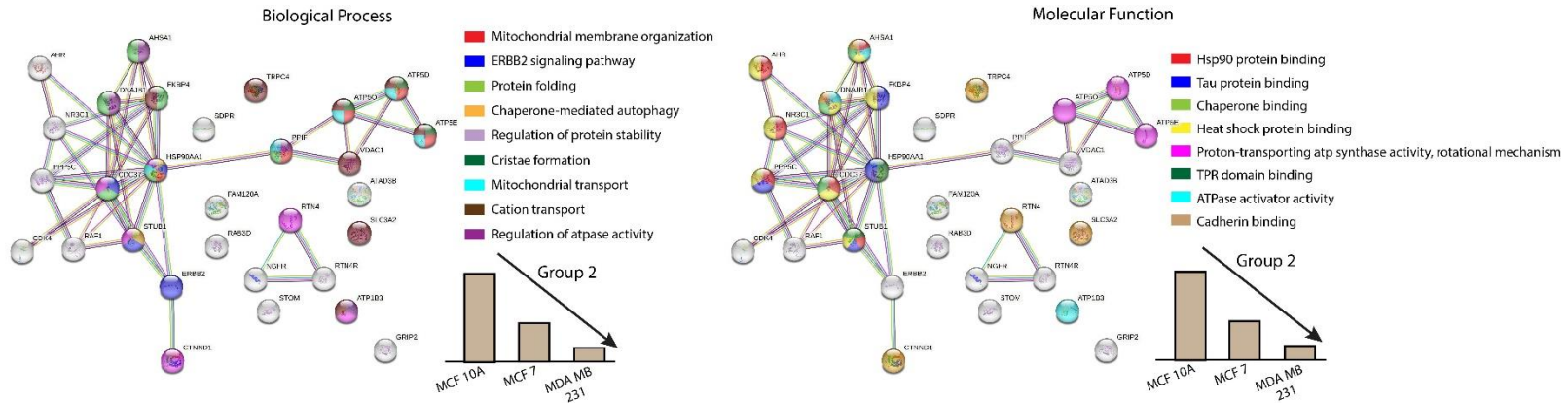
Grup- 9				
Accession no	Protein Tanımı	Gen senbolü	Protein yoğunluk oranı : (mcf7) / (mcf10A)	Protein yoğunluk oranı: (mda mb 231) / (mcf10A)
D9J307	HLA class I antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HLA-B PE=1 SV=1	HLA-B	0,01	18,871
Q14315	Filamin-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNC PE=1 SV=3	FLNC	0,01	26,587
P60953	Cell division control protein 42 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDC42 PE=1 SV=2	CDC42	0,365	5,124
Q7Z5H4	Vomeroneasal type-1 receptor 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VN1R5 PE=2 SV=2	VN1R5	1,007	12,749
P36406	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM23 PE=1 SV=1	TRIM23	0,01	7,476
P07996	Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=THBS1 PE=1 SV=2	THBS1		20,697
Q9Y5E8	Protocadherin beta-15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCDHB15 PE=2 SV=1	PCDHB15	0,01	13,399
H0YI78	Kinesin-like protein KIF21A (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF21A PE=1 SV=1	KIF21A	0,01	15,348

A0A140T9R1	Flotillin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLOT1 PE=1 SV=1	FLOT1	0,01	48,144
P62070	Ras-related protein R-Ras2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRAS2 PE=1 SV=1	RRAS2	0,01	7,61
Grupsuz				
Accession no	Protein Tanımı	Gen senbolü	Protein yoğunluk oranı : (mcf7) / (mcf10A)	Protein yoğunluk oranı: (mda mb 231) / (mcf10A)
P10586	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTPRF PE=1 SV=2	PTPRF	1,105	0,048

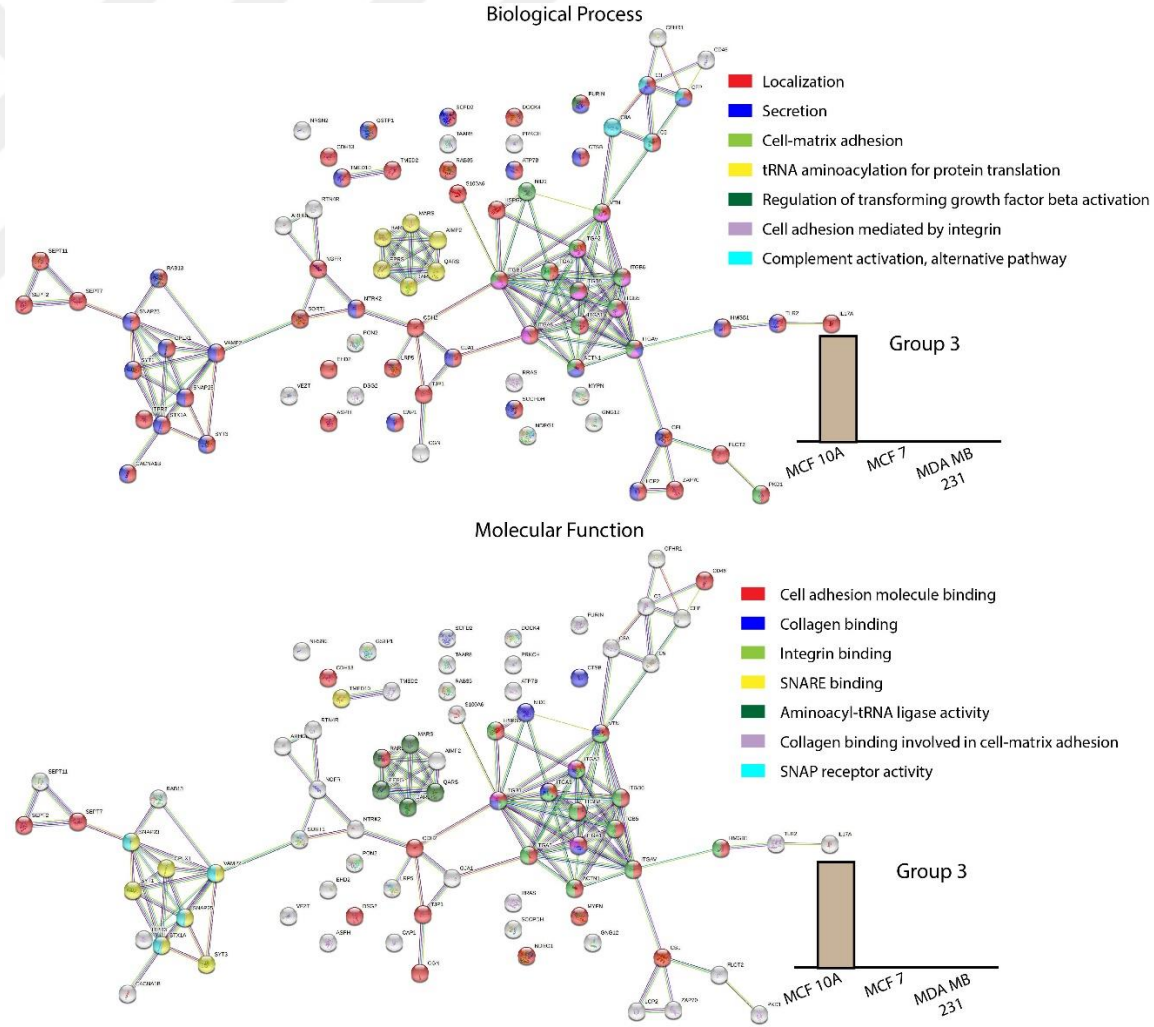
EK-6. nLC-MS/MS analizleri sonucu elde edilen ve gruplar arası farklılık gösteren proteinlerin STRING analizleri



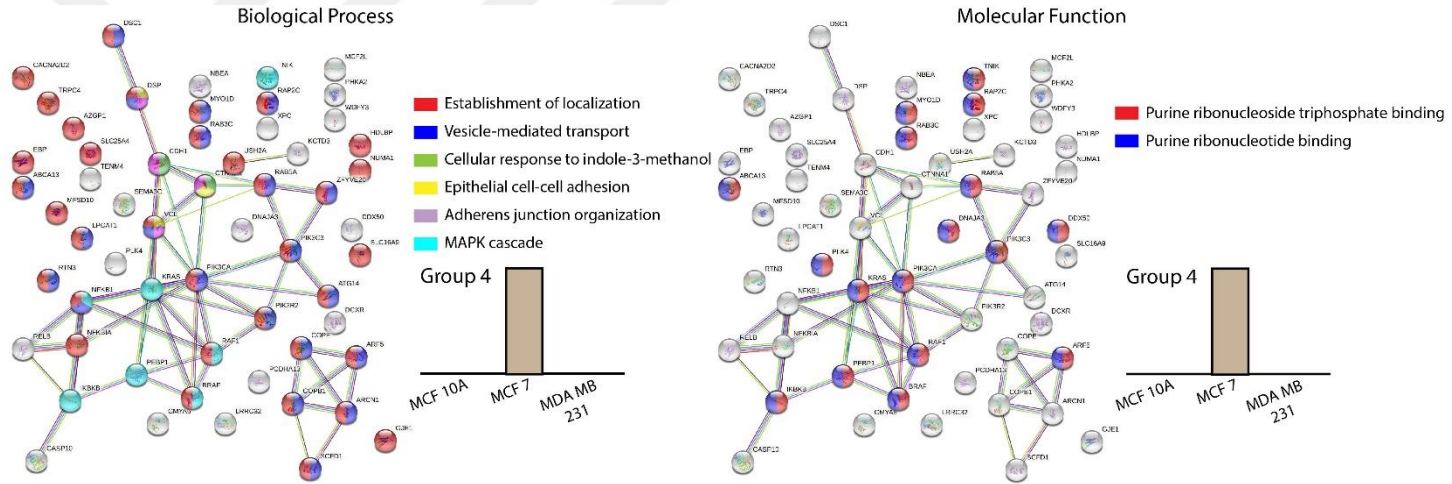
Ek-Şekil 1. Grup 1 proteinleri ait STRING analizleri.



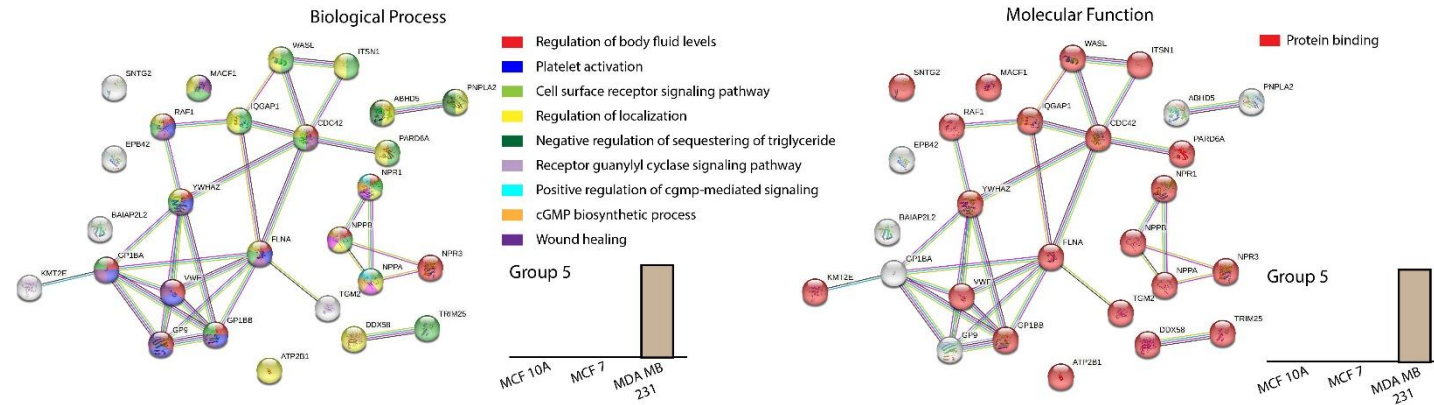
Ek-Şekil 2. Grup 2 proteinleri ait STRING analizleri.



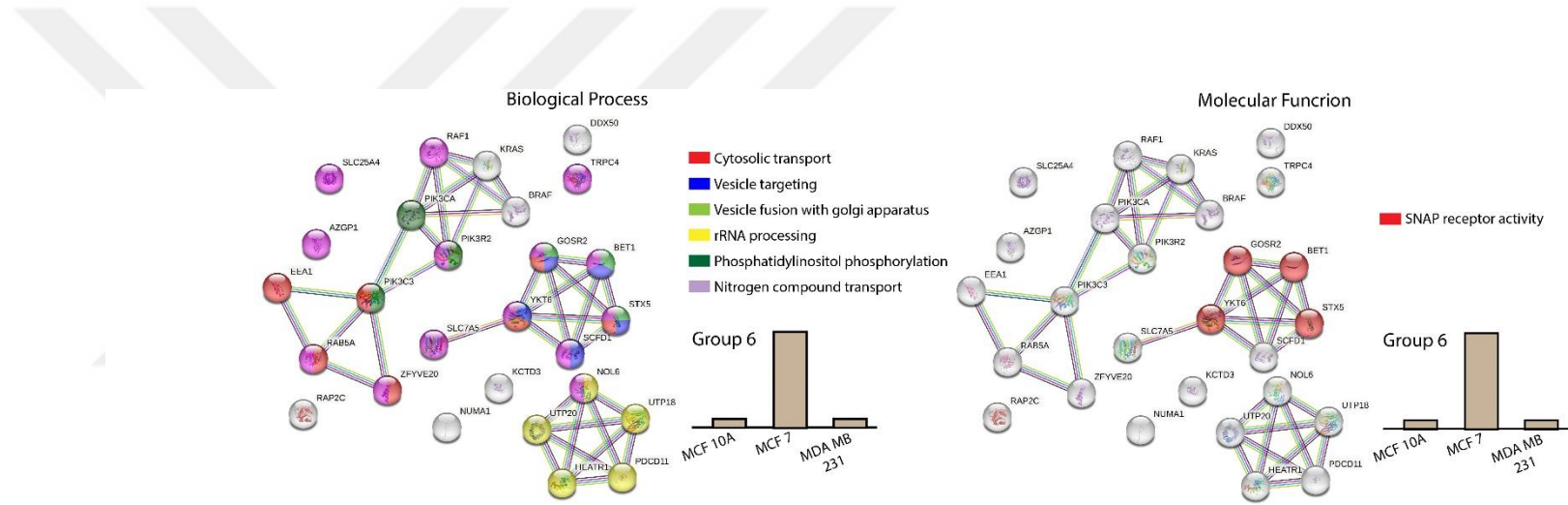
Ek-Şekil 3. Grup 3 proteinleri ait STRING analizleri.



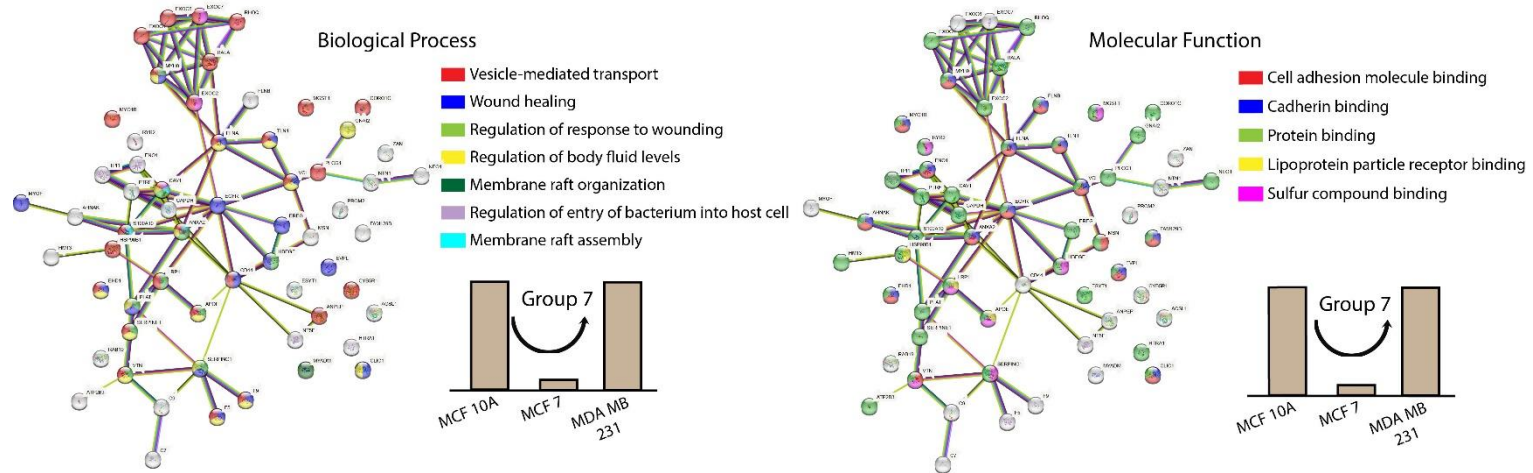
Ek-Şekil 4. Grup 4 proteinleri ait STRING analizleri.



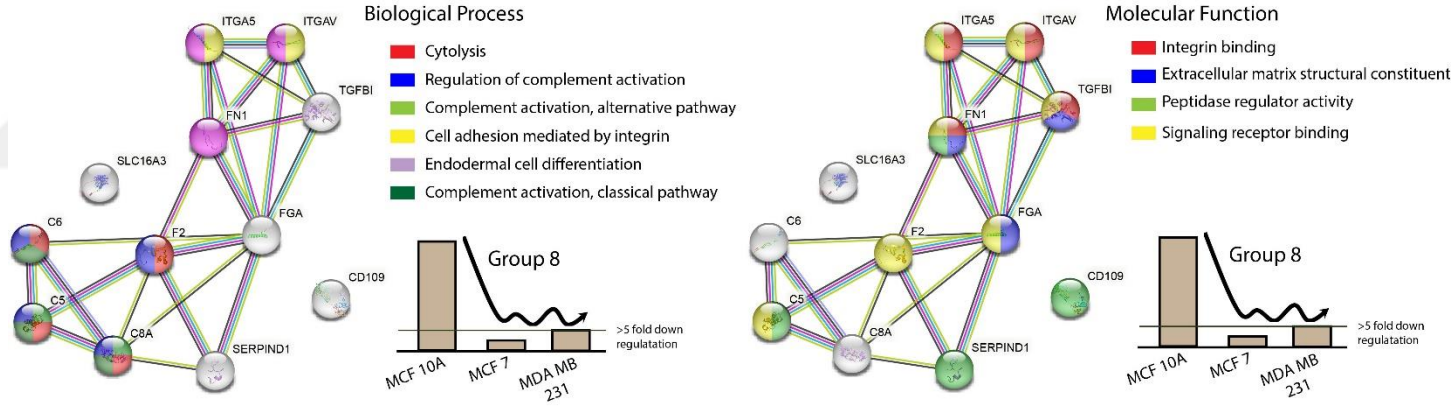
Ek-Şekil 5. Grup 5 proteinleri ait STRING analizleri.



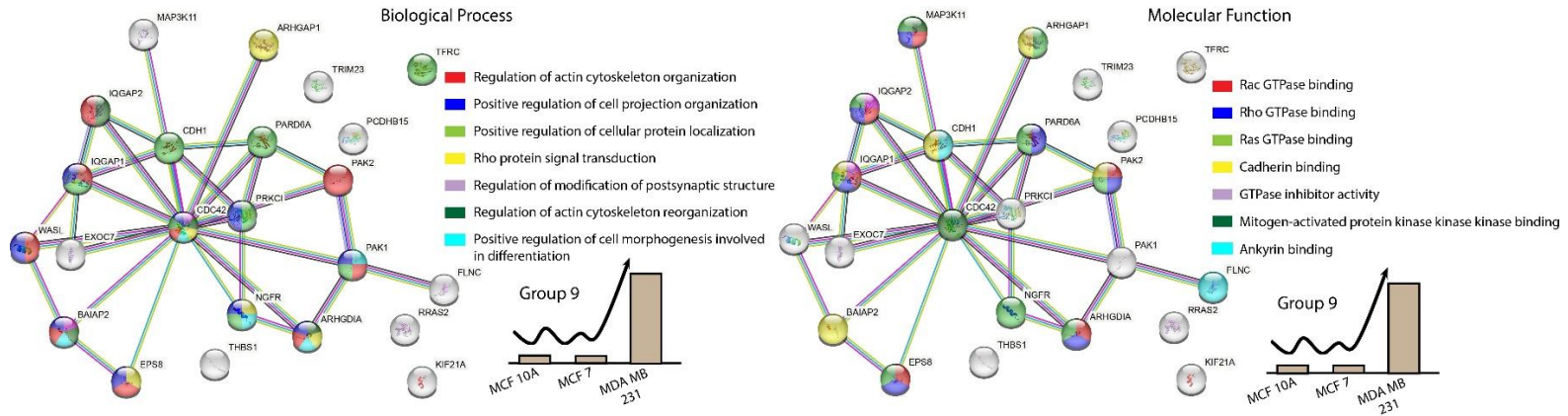
Ek-Şekil 6. Grup 6 proteinleri ait STRING analizleri.



Ek-Şekil 7. Grup 7 proteinleri ait STRING analizleri.



Ek-Şekil 8. Grup 8 proteinleri ait STRING analizleri.



Ek-Şekil 9. . Grup 9 proteinleri ait STRING analizleri.