

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEKLOFENAMİK ASİTİN KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER  
KANSERİNİN PROGRESYONU VE HÜCRE PROTEOMU ÜZERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sevinç YANAR

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

KOCAELİ  
2021



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEKLOFENAMİK ASİTİN KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER  
KANSERİNİN PROGRESYONU VE HÜCRE PROTEOMU ÜZERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Sevinç YANAR**

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

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aylin KANLI

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 2019/035)  
Tarafından Desteklenmiştir

KOCAELİ  
2021

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Meklofenamik Asitin Küçük Hücreli Akciğer Kanserinin Progresyonu Ve Hücre Proteomu Üzerine Etkisinin Araştırılması

Tez Yazarı: Sevinç YANAR

Tez Savunma Tarihi: 29.06.2021

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Aylin KANLI

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

### **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

### **Meklofenamik Asitin Küçük Hücreli Akciğer Kanserinin Progresyonu ve Hücre Proteomu Üzerine Etkisinin Araştırılması**

**Amaç:** Tüm akciğer kanseri olgularının yaklaşık %15'ini oluşturan küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) yüksek metastaz potansiyeli ve düşük sağ kalım oranı ile oldukça saldırgan bir kanser türüdür. KHAK başlangıçta uygulanan kimyasal tedaviye yüksek oranda yanıt verebilmesine rağmen, hastalığın nüksetmesinden sonra uygulanan tedavilerde başarı sağlanamamaktadır. Tedaviye direncin çok yüksek olması bu başarısızlığın en büyük sebebi olarak kabul edilmektedir. Bu sebepten KHAK için yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç vardır. Bu çalışma ile anti-kanserojen etkileri çeşitli kanser türlerinde gösterilmiş olan meklofenamik asitin (MA) KHAK hücre hattı olan DMS114 hücrelerinin proteomunda meydana getireceği değişikliklerin araştırılması ve KHAK patogenezinde ve ilaç direncinde rol alan mekanizmalar/metabolik yollar ile ilgili veriler elde edilmesi amaçlanmıştır. MA'nın bir kemoterapi ilacı olan topotekan (TPT) ile kombinasyonun hücre progresyonu üzerine etkilerinin araştırılması bu çalışmanın bir diğer amacıdır.

**Yöntem:** Çalışmanın ilk kısmında, MA'nın tek başına ve TPT ile kombine kullanımının sitotoksik ve apoptotik etkilerini belirlemek için tripan mavisi testi, Annexin V ve hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında, ilaç uygulamasının DMS114 hücre proteomunda meydana getirdiği değişiklikler iki ayrı kütle spektrometre tekniği (MALDI-TOF/TOF ve LC-MS/MS) ile analiz edilmiştir. Her iki yöntem ile tanımlanan proteinlerden ifade düzeyi anlamlı şekilde değişenler biyoinformatik analiz veritabanı PANTHER ve STRING kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler western blotlama yöntemi ile doğrulanmıştır.

**Bulgular:** MA ve TPT kombinasyonunun, TPT'nin tek başına kullanımına kıyasla, daha fazla apoptotik hücre ölümüne neden olarak ( $P < 0.01$ ) güçlü bir sinerjetik etkiye neden olduğu görülmüştür ( $CI < 1$ ). MA uygulaması sonucu ifade düzeyi değişen proteinlerin biyoinformatik analizi; enerji metabolizması, RNA uçbirleştirme ve işlenmesi, protein düzenlenmesi ve yıkımı süreçlerinde regülyasyon olduğunu göstermiştir. Enerji metabolizması ile ilgili proteinler detaylıca incelendiğinde glikolizin baskılandığı, ancak mitokondriyel aktivite, oksidatif fosforilasyon ve glutaminolizin arttığı görülmüştür. Bu

veriler, hücrelerin ilaçlı yeni ortama uyum sağlayarak hayatta kalmak için metabolik yeniden programlama sürecine girdiğini göstermiştir.

Sonuç: MA ve TPT kombinasyonu, KHAK tedavisi için terapötik potansiyeldedir. Proteomik çalışmamız ile bazı kanser türlerinin tedavisinde ilaç direncine neden olduğu bilinen metabolik yeniden programlamanın KHAK ile ilişkisi ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Enerji metabolizması ve ilaç direnci ile ilgili tanımlanan proteinler, KHAK tedavisinde ilaç direncinin üstesinden gelmek adına geliştirilecek yenilikçi yaklaşımlar için hedef niteliğindedir.

Anahtar kelimeler: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK), Meklofenamik Asit (MA), Proteomik, MALDI-TOF/TOF, nLC-MS/MS



## ABSTRACT

### **Investigation of the Effect of Meclofenamic Acid on the Progression and Cell Proteome of Small Cell Lung Cancer**

Objective: Small cell lung cancer (SCLC), which accounts for approximately 15% of all lung cancer cases, is a highly aggressive cancer with high metastatic potential and low survival rate. Although SCLC initially respond to chemotherapy at a high rate, the treatments applied after the disease relapses are not successful. Drug resistance is accepted to be one of the main reasons for this failure. Therefore, there is an urgent need for new treatment strategies for SCLC. The aim of this study was to investigate the changes that meclofenamic acid (MA), a drug that has been shown to have anti-tumorigenic effects in various cancer types, would cause on DMS144 cell proteome which is an established SCLC cell line. Therefore, the findings were expected to shed some light onto the molecular mechanisms/metabolic pathways that may have a role in SCLC. The other aim of the study was to investigate the effects of MA and the chemotherapy agent topotecan (TPT) combinations on SCLC cell progression.

Method: During the initial part of the study, trypan blue exclusion assay, Annexin V and cell cycle analysis were performed to determine the cytotoxic and apoptotic effects of MA alone or in combination with TPT. The changes caused by MA on DMS114 cell proteome were then analyzed by two different mass spectrometry techniques (MALDI-TOF/TOF and LC-MS/MS). Among the proteins identified by both methods, those showing significantly altered expression levels were evaluated using bioinformatics approaches databases PANTHER and STRING. The data were verified by western blotting.

Results: The combination of MA and TPT was found to have a strong synergetic effect, causing more apoptotic cell death ( $P < 0.01$ ) compared to the use of TPT alone ( $CI < 1$ ). Bioinformatics analysis with the differentially regulated proteins demonstrated regulation of energy metabolism, RNA splicing and processing, protein processing and degradation. When the proteins related to energy metabolism were examined in detail, it was observed that glycolysis was suppressed, whereas mitochondrial activity, oxidative phosphorylation and glutaminolysis were increased. The presented data indicated that cells underwent metabolic reprogramming to adapt their new environment and survive.

**Conclusions:** The combined application of MA and TPT had therapeutic potential for the treatment of SCLC. In the present study, the relationship between metabolic reprogramming, which is known to cause drug resistance in several cancer types, and SCLC was revealed for the first time. The identified proteins related to energy metabolism and drug resistance could be targets for innovative approaches to overcome drug resistance in SCLC treatment.

**Keywords:** Small Cell Lung Cancer (SCLC), Meclofenamic Acid (MA), Proteomics, MALDI-TOF/TOF, nLC-MS/MS





## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca göstermiş olduğu ilgi ve destek için değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Aylin Kanlı'ya, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak ve her türlü konuda yardımcı olarak bana her daim yol gösteren kıymetli hocam, sayın bölüm başkanımız Prof. Dr. Murat Kasap'a, tecrübesiyle yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Gürler Akpınar'a, lisans eğitimimden bu yana desteğini her zaman hissettiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Fikrettin Şahin'e ve tezime sağladığı değerli katkıları için Tez İzleme Komitesi'ndeki hocalarım Prof. Dr. Doğan Gülkaç ve Doç. Dr. Naci Çine'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım süresince bana her aşamada destek olan, dostluklarıyla beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan kıymetli arkadaşlarım Merve Gülsen Bal Albayrak ve Mehmet Sarıhan'a, aynı laboratuvarı paylaşmaktan mutluluk duyduğum tüm çalışma arkadaşlarıma, içten desteği ve dostluğu için Dr. Candan Yılmaz Özdoğan'a, kıymetli katkıları için Doç. Dr. Gamze Güney Eskiler ve Dr. Asuman Deveci Özkan'a, bir tez çalışmamda daha yardıma yetişen sevgili arkadaşım Burçin Asutay'a gönülden teşekkür ederim.

Eğitimimin her aşamasında ve hayatımın her alanında desteklerini benden esirgemeyen kıymetli aileme, sevgili eşim Meriç Yanar'a ve canım oğullarım Aras ve Batu'ya en derin duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destek için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: 2019/035) teşekkür ederim.

## ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı / Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Meklofenamik Asitin Küçük Hücreli Akciğer Kanserinin Progresyonu Ve Hücre Proteomu Üzerine Etkisinin Araştırılması” 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.

09/06/2020

Sevinç YANAR

İmza

# İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xix
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Akciğer Kanseri	1
1.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	3
1.2.1. KHDAK'ın Teşhis ve Evrenmesi	4
1.2.2. KHDAK'da Genetik ve Moleküler Değişiklikler	4
1.2.3. KHDAK'da Epigenetik Değişiklikler	6
1.2.4. KHDAK Tedavisi	7
1.3. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	8
1.3.1. KHAK'ın Teşhis ve Evrenmesi	8
1.3.2. KHAK'da Genetik ve Moleküler Değişiklikler	9
1.3.2.1. TP53 ve RB1 inaktivasyonu	10
1.3.2.2. Kromozom 3p üzerindeki tümör baskılayıcı genler	10
1.3.2.3. MYC ailesinin rolü	11
1.3.2.4. NOTCH sinyal yolağı	11
1.3.2.5. Kinaz sinyal yolları	12
1.3.3. KHAK'da Epigenetik Değişiklikler	13
1.3.4. KHAK Tedavisi	14
1.3.5. KHAK Tedavisinde Kemoterapi İlaç Toksisitesinin Diğer Bazı İlaçlarla Arttırılması	16
1.4. Meklofenamik Asit	16
1.4.1. Gap Bağlantı Bloklayıcısı Olarak MA	17
1.4.2. Antikanserojen Ajan Olarak MA	18
1.4.3. FTO İnhibitörü Olarak MA	19

1.5. FTO ve m6A Metilasyonu İlişkisi	20
1.5.1. FTO Geni ve Proteini	20
1.5.2. m6A Modifikasyonları	21
1.5.3. m6A Modifikasyonlarının Kanser ile İlişkisi	22
1.6. KHAK ile İlgili Yapılan Proteomik Çalışmalar	24
<b>2. AMAÇ</b>	<b>26</b>
<b>3. YÖNTEM</b>	<b>28</b>
3.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi	28
3.1.1. Hücrelerinin Çözülmesi	29
3.1.2. Hücrelerinin Pasajlanması	29
3.1.3. Hücrelerinin Dondurulması	30
3.2. İlaçların Hazırlanması	30
3.3. MA ve TPT'nin Hücre Canlılıklarına Etkisinin Belirlenmesi	31
3.4. MA-TPT Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi	34
3.5. İlaç Uygulamasının Hücre Apoptozuna Etkisinin Belirlenmesi	34
3.5.1. Akış Sitometrisi İle Apoptozun Değerlendirilmesi	35
3.5.2. AO/PI boyama ile Apoptozun Değerlendirilmesi	36
3.6. İlaç Uygulamasının Hücre Döngüsüne Etkisinin Belirlenmesi	36
3.7. İlaç Uygulamasının Hücre İnvazyonuna Etkisinin Belirlenmesi	37
3.7.1. Hücrelerin İnsertlere Ekimi	37
3.7.2. Hücrelerin Boyanması ve Sayımı	38
3.7.3. Hücre İnvazyon Oranlarının Hesaplanması	39
3.8. MA Uygulamasının m6A Miktarına Etkisinin Belirlenmesi	39
3.8.1. RNA İzolasyonu	40
3.8.2. Kantitatif m6A Analizi	41
3.9. Hücrelerden Protein İzolasyonu ve Örnek Havuzlarının Oluşturulması	41
3.9.1. Hücrelerden Protein Özütü Hazırlanması	42
3.9.2. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	42
3.9.3. Örnek Havuzlarının Oluşturulması	43
3.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	43
3.11. House Keeping Protein Kullanılarak Proteinlerin Normalizasyonu	45
3.12. İki Boyutlu Jel Elektrofrezisi (2DE)	46
3.12.1. İzoelektrik Fokuslama ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	47

3.12.2. 2DE Görüntü Analizi	47
3.13. Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS) Analizleri	48
3.13.1. MALDI-TOF/TOF Analizi	48
3.13.2. nLC-MS/MS Analizi	49
3.14. Western Blotlama Yöntemi ile MS/MS Verilerinin Doğrulanması	51
3.15. MS/MS Verilerinin Biyoinformatik Analizi	52
3.15.1. MALDI-TOF/TOF veri analizi	52
3.15.2. nLC-MS/MS veri analizi	53
3.16. <i>in vitro</i> Test Verilerinin Biyoistatistiksel Analizi	53
<b>4. BULGULAR</b>	<b>54</b>
4.1. MA ve TPT'nin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	54
4.1.1. MA'nın DMS114 ve MRC5 Hücrelerine Sitotoksik Etkisi	54
4.2. MA ve TPT Kombinasyon Uygulamasının Sitotoksik Etkisi	58
4.2.1. Kombinasyonların Hücre Canlılığına Etkisinin İncelenmesi	58
4.2.2. Kombinasyon İndeksleri ve Doz Azaltma İndekslerinin Belirlenmesi	61
4.3. MA ve TPT'nin Hücre Apoptozu Üzerine Etkisi	63
4.3.1. Akış Sitometrisi ile Apoptozun Değerlendirilmesi	63
4.3.2. AO/PI Boyaması ile Apoptozun Değerlendirilmesi	66
4.4. MA ve TPT'nin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi	68
4.5. İlaç Uygulamalarının Hücre İnvazyonu Üzerine Etkisi	69
4.6. MA'nın m6A Seviyelerine Etkisi	70
4.7. Hücrelerden Elde Edilen Protein Özütlerinin Değerlendirilmesi	72
4.7.1. SDS-PAGE Analizi	72
4.7.2. House Keeping Protein Aktin ile Örnek Normalizasyonu	73
4.7.3. Protein Profiline 7 cm Striplerle Değerlendirilmesi	73
4.8. MA'nın DMS114 Hücre Proteomunda Neden Olduğu Değişikliklerin Analizi	74
4.8.1. Karşılaştırmalı 2DE analizi ve MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinler	74
4.8.2. nLC-MS/MS ile Tanımlanan Proteinler	80
4.9. MS/MS Verilerinin Western Blotlama ile Doğrulanması	85
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>88</b>
5.1. Meklofenamik Asit ve Topotekanın Tek ve Kombinasyon Tedavisinin DMS114 Hücre Progresyonu Üzerine Etkileri	88
5.2. Meklofenamik Asitin DMS114 Hücre Proteomu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	91

<b>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER</b>	<b>105</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>108</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>121</b>
<b>EKLER</b>	<b>125</b>
EK-1: nLC-MS/MS Analizi ile Tanımlanan Proteinler	125



## SİMGELER VE KISALTMALAR

ADK: Adenokarsinom  
AKR: Aldo-Keto Redüktaz  
ALDOA: Aldolaz A  
ALKBH5: AlkB Homolog 5  
AML: Akut Miyeloid Lösemi  
AO: Akridin Oranj  
ATP5A: ATP Sentaz Alfa Alt Ünitesi  
BCLAF1: Bcl-2-ilişkili Transkripsiyon Faktörü 1  
BHK: Büyük Hücreli Karsinom  
BSA: Sığır Serum Albumin  
C1QBP: Komplement Komponent 1Q Alt Komponent Bağlayıcı Proteini  
CAD: Karbamoil-Fosfat Sentetaz  
CDK6: Siklin-Bağımlı Kinaz 6  
CDKN2A: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A  
cGMP: Guanozin 3', 5' Monofosfat  
CI: Kombinasyon İndeksi  
COX5: Sitokrom c Oksidaz Alt Birim 5B  
DHAP: Dihidroksiaseton Fosfat  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
DMSO: Dimetil Sülfoksit  
DRI: Doz Azaltma İndeksi  
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü  
ENO1: Enolaz1  
ER: Endoplazmik Retikulum  
ESD: S-formilglutasyon Hidrolaz  
FBP: Fruktoz-1, 6-Bifosfat  
FBS: Fetal Sığır Serumu  
FDA: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi  
FTO: Fat Mass and Obesity Associated Protein  
G3P: Gliseraldehit-3 Fosfat  
GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz

Gln: Glutamin  
GLS2: Glutaminaz 2  
Glu: Glutamat  
GLUD1: Glutamat Dehidrojenaz 1  
GOT: Glutamat Oksaloasetat Transaminaz  
HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi  
HRP: Horseradish Peroksidaz  
HSK: Hepatoselüler Karsinoma  
HYAL1: Hyaluronik Glukozaminidaz 1  
IAA: İyodoasetamit  
IDH2: İzositrat Dehidrojenaz 2  
IEF: İzoelektrik Fokuslama  
KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri  
KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri  
LDHA: Laktat Dehidrojenaz A  
lncRNA: Uzun Kodlamayan RNA  
m6A: N6-metil Adenozin  
MA: Meklofenamik Asit  
MALDI-TOF/TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/İonization Time-Of-Flight/Time-Of-Flight  
NE: Nöroendokrin  
NSAİİ: Nonsteroid Antienflamatuar İlaç  
OAT: Ornitin Aminotransferaz  
OKSFOZ: Oksidatif Fosforilasyon  
PANTHER: Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships  
PBS: Fosfat Tamponlu Salin  
PDIA3: Protein Disülfit İzomeraz A3  
PD-L1: Programlanmış Ölüm Ligand 1 Reseptörü  
PI: Propidyum İyodür  
PKG: Protein Kinaz G  
PKM2: Pirüvat Kinaz İzoenzim M2  
PMF: Peptit-Kütle Parmak İzleri  
PPAT: Fosforibozil Pirofosfat Amidotransferaz  
PSMA6: Proteazom Alt Ünite Alpha Tip 6



RB: Retinoblastoma  
ROBO1: Roundabout Guidance Receptor 1  
ROVA-T: Rovalpituzumab Tesirin  
RPS13: 40S Ribozomal Protein S13  
RPS4X: 40S Ribozomal Protein S4, X izoformu  
RPS5: 40S Ribozomal Protein S5  
SDC1: Syndecan-1  
SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi  
SE: Sınırlı Evre  
SHK: Skuamöz Hücreli Karsinom  
SNRPD1: Small Nuclear Ribonucleoprotein Sm D1  
SNRPD2: Small Nuclear Ribonucleoprotein Sm D2  
TBP: Tribütilfosfin  
TCA: Sitrik Asit Döngüsü  
TCA: Triklorasetik Asit  
TFA: Trifluoroasetik Asit  
TIMM13: Mitokondriyal İmport İç Membran Translokaz Alt Birimi Tim13  
TMT: Tripan Mavisı Testi  
TNM: Tümör, nod, metastaz  
TP53: Tümör Protein P53  
TPT: Topotekan  
UPS: Ubikitin Proteazom Sistemi  
UQCRC2: Sitokrom b-c1 Kompleks Alt Birim 2  
VHL: von Hippel–Lindau Tümör Baskılayıcı  
WB: Western Blotlama  
YE: Yaygın Evre  
 $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -Ketoglutarat

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	2020'de dünya çapında yaşa göre standartlaştırılmış kanser insidans oranları..	2
Şekil 1.2.	Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırması.....	3
Şekil 1.3.	KHDAK evreleri .....	4
Şekil 1.4.	KHAK'da iki temel evre.....	9
Şekil 1.5.	KHAK'da meydana gelen moleküler değişiklikler .....	10
Şekil 1.6.	m6A modifikasyonunda yer alan düzenleyici proteinler.....	22
Şekil 3.1.	Thoma lamı ile hücre sayımı .....	33
Şekil 3.2.	Muse® Cell analyzer cihazı.....	35
Şekil 3.3.	Matrijel invazyon odacık sistemi.....	37
Şekil 3.4.	İnvazyon odacıklarındaki invazif ve invazif olmayan hücreler.....	39
Şekil 3.5.	m6A kantifikasyonunun temel basamakları .....	40
Şekil 3.6.	ABSCIEX MALDI-TOF/TOF 5800 cihazı .....	49
Şekil 3.7.	nLC-MS/MS sistemi.....	51
Şekil 4.1.	MA'nın DMS114 hücre canlılığı üzerine etkisi .....	54
Şekil 4.2.	24 saat MA uygulanan DMS114 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....	55
Şekil 4.3.	MA'nın MRC5 hücre canlılığı üzerine etkisi .....	55
Şekil 4.4.	TPT'nin DMS114 hücre canlılığı üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.5.	48 saat TPT uygulanan DMS114 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....	57
Şekil 4.6.	TPT'nin MRC5 hücre canlılığı üzerine etkisi .....	57
Şekil 4.7.	MA ve TPT kombinasyonlarının DMS114 hücre canlılığı üzerine etkileri....	59
Şekil 4.8.	Tek başına ve TPT ile kombine MA uygulanan DMS114 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....	60
Şekil 4.9.	MA ve TPT kombinasyonlarının MRC5 hücre canlılığı üzerine etkileri.....	61
Şekil 4.10.	MA ve TPT kombinasyonlarının CI grafikleri.....	62
Şekil 4.11.	MA ve TPT kombinasyonlarının DRI grafikleri .....	63
Şekil 4.12.	24 saat 90 µM MA uygulanan DMS114 hücrelerinin Annexin V analizi ve erken- geç- ve toplam apoptotik hücrelerin istatistiksel analizleri.....	64
Şekil 4.13.	Tek başına ve TPT ile kombine MA uygulanan DMS114 hücrelerinin Annexin V analizi.....	65
Şekil 4.14.	Erken-, geç- ve toplam apoptotik hücrelerin istatistiksel analizleri .....	66
Şekil 4.15.	İlaç uygulanan DMS114 hücrelerinin morfolojik değerlendirmesi.....	67

<b>Şekil 4.16.</b> Tek başına ve TPT ile kombine MA uygulamasının DMS114 hücre döngüsüne etkisi. ....	68
<b>Şekil 4.17.</b> MA ve TPT'nin DMS114 hücre invazyonuna etkisinin mikroskopik görüntüsü.....	70
<b>Şekil 4.18.</b> MA ve TPT'nin DMS114 hücre invazyonuna etkisinin istatistiksel analizi ....	70
<b>Şekil 4.19.</b> RNA örneklerine ait jel görüntüsü.....	71
<b>Şekil 4.20.</b> MA'nın DMS114 hücrelerinde m6A seviyesine etkisi.....	72
<b>Şekil 4.21.</b> Kontrol ve MA grubu proteinlerin SDS-PAGE analizi .....	72
<b>Şekil 4.22.</b> $\beta$ -aktin ile örnek normalizasyonu.....	73
<b>Şekil 4.23.</b> 7 cm'lik stripler ile iki boyutlu jel elektroforezi .....	74
<b>Şekil 4.24.</b> İki gruba ait biyolojik tekrar jellerine ve master jele ait görüntü.....	75
<b>Şekil 4.25.</b> Jeller arasında protein dağılımı .....	75
<b>Şekil 4.26.</b> Kesilen spotlar.....	76
<b>Şekil 4.27.</b> MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin yakın çekim görüntüleri .....	78
<b>Şekil 4.28.</b> MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin STRING analizi.....	79
<b>Şekil 4.29.</b> MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyon ve protein sınıfını gösteren PANTHER analizi.....	80
<b>Şekil 4.30.</b> nLC-MS/MS verilerinin PCA analizi .....	80
<b>Şekil 4.31.</b> Normalize edilmiş örnek miktar grafiği.....	81
<b>Şekil 4.32.</b> nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlere ait Venn şeması.....	81
<b>Şekil 4.33.</b> nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin Heatmap analizi.....	83
<b>Şekil 4.34.</b> nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin STRING analizi.....	84
<b>Şekil 4.35.</b> nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyon ve protein sınıfını gösteren PANTHER analizi .....	85
<b>Şekil 4.36.</b> Kontrol ve MA uygulanan hücrelerde IDH2 ve GAPDH ifade düzeyi .....	86
<b>Şekil 4.37.</b> Kontrol ve MA uygulanan hücrelerde OKSFOZ proteinlerinin ifade düzeyi ..	87
<b>Şekil 5.1.</b> Enerji metabolizması .....	95

## TABLÖLAR

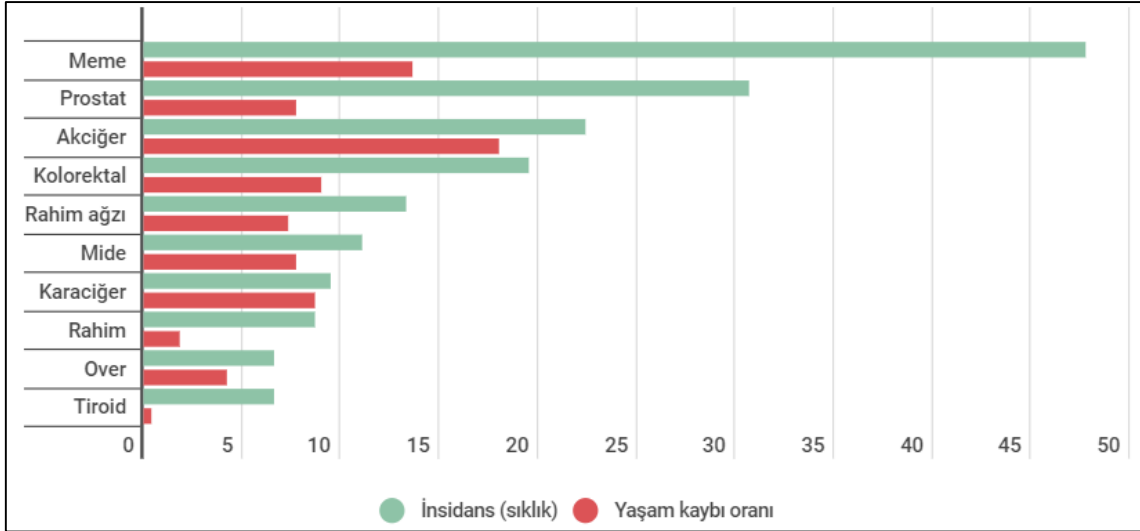
<b>Tablo 1.1.</b> Akciğer adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomlarda görülen temel moleküler değişiklikler .....	6
<b>Tablo 1.2.</b> m6A düzenleyici proteinlerin çeşitli kanser türlerinde rolü .....	23
<b>Tablo 3.1.</b> Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler .....	28
<b>Tablo 3.2.</b> Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kitler .....	29
<b>Tablo 3.3.</b> Canlılık analizlerinde kullanılan MA ve TPT konsantrasyonları .....	33
<b>Tablo 3.4.</b> MA ve TPT kombinasyon konsantrasyonları .....	34
<b>Tablo 3.5.</b> SDS-PAGE jel solüsyonu içerikleri .....	44
<b>Tablo 3.6.</b> Örneklerin jelde yürütülmesi ve jelin boyanması sırasında kullanılan solüsyon içerikleri.....	45
<b>Tablo 3.7.</b> Western blotlamada kullanılan solüsyonların içerikleri .....	46
<b>Tablo 3.8.</b> Dengeleme tamponu içerikleri.....	47
<b>Tablo 3.9.</b> Görüntülenmek istenen proteinin büyüklüğüne göre kullanılan jel yüzdeleri..	52
<b>Tablo 3.10.</b> Western blotlama deneylerinde kullanılan antikorlar.....	52
<b>Tablo 4.1.</b> Tek başına uygulanan TPT ve MA konsantrasyonlarının DMS114 hücre canlılığına etkisi.....	58
<b>Tablo 4.2.</b> MA ve TPT kombinasyonlarının CI değerleri.....	61
<b>Tablo 4.3.</b> MA ve TPT kombinasyonlarının DRI değerleri .....	62
<b>Tablo 4.4.</b> MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinler .....	77
<b>Tablo 4.5.</b> nLC-MS/MS analizine göre regülasyonu en çok artan ve en çok azalan proteinler.....	82
<b>Tablo 4.6.</b> OKSFOZ antikor kokteyli içeriği .....	86

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Akciğer Kanseri

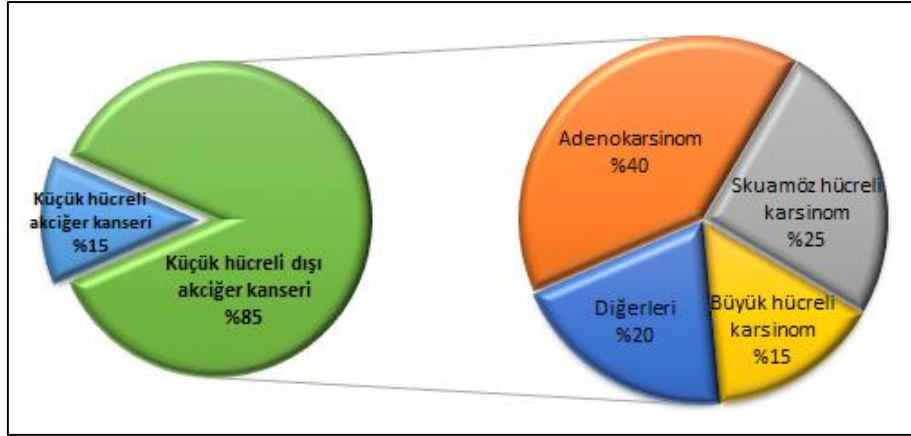
Akciğer kanseri, dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir ve küresel olarak, vaka oranları artış göstermektedir (Bade ve Cruz, 2020). 2020 yılı GLOBOCAN (Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence) verilerine göre dünya çapında akciğer kanseri, erkeklerde toplam kanser vakalarının %14,3'ünü oluşturarak birinci, kadınlarda ise %8,4'ünü oluşturarak üçüncü sırada en çok görülen kanser türü olmuştur. Her iki cinsiyette kansere bağlı ölüm oranı %18.04'e yükselerek kanser nedeni ölümlerin başta gelen sebebi haline gelmiştir (Şekil 1.1). Türkiye'de akciğer kanseri, en çok görülen kanser türleri arasında erkeklerde %25.8 ile ilk sırada, kadınlarda %7 ile dördüncü sırada yer almaktadır (GLOBOCAN, 2020). Akciğer kanseri hastalarında gözlenen yüksek mortalite, tanının genellikle ileri aşamada konulması sonucu tedavideki başarının düşüklüğüne dayandırılmaktadır. Hastaların yalnızca yaklaşık %15'i erken dönemde teşhis edilebilmektedir (Duruiseaux ve Esteller, 2018). Bu nedenle, düşük doz bilgisayarlı tomografi taraması ve etkili biyobelirteçler kullanarak yüksek riskli popülasyonların taranmasının erken teşhis sağlayarak akciğer kanseri hastalarının hayatta kalmasını artırabileceği düşünülmektedir (Eberth, 2015; Guldbandt ve ark., 2015).

Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık yüzde sekseni sigara içenlerde görülür ve sigara, bu hastalığın ana risk faktörünü temsil eder (Couraud, Zalcmann, Milleron, Morin ve Souquet, 2012). Ülkeler arasında, akciğer kanseri görülme oranı ve demografik dağılımında önemli farklılıklar kaydedilmiş ve sigara içme oranları ve ekonomik gelişme durumunun bu farklılıkları etkilediği görülmüştür. Çin, Endonezya, Doğu Avrupa ve Afrika'nın Kuzey ve Güney bölgeleri gibi gelişmekte olan bölgelerde son zamanlarda sigara içme prevalansındaki artışla birlikte akciğer kanseri insidansının artması beklenmektedir (Bray ve ark., 2020). Hali hazırda sigara içenlerin %80 kadarı düşük veya orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır ve akciğer kanseri ölümlerinin yarısından fazlasının bu ülkelerde meydana geldiği görülmektedir (Torre, Lindsey ve Rebecca, 2016). Aksine, şimdilerde başarılı bir şekilde sigarayı bırakma ve kaçınma kampanyalarını uygulayan ve genellikle Amerika Birleşik Devletleri, Birleşik Krallık ve İskandinav ülkeleri gibi yüksek gelirli olan ülkelerde ise akciğer kanseri görülme oranı azalmakta veya azalması beklenmektedir (Torre, Lindsey ve Rebecca, 2016; Bray ve ark., 2020).



**Şekil 1.1.** 2020'de dünya çapında yaşa göre standartlaştırılmış kanser insidans oranları (GLOBOCAN, 2020'den uyarlanmıştır)

Sigara kullanımının akciğer kanserindeki en büyük etmen olmasının yanı sıra, son yıllarda yapılan çalışmalar birçok risk faktörünün daha akciğer kanserinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Hava kirliliği, radon gazı, asbest gibi zararlı mesleki maruziyet, genetik yatkınlık, radyasyona maruz kalma, dengesiz beslenme, kronik akciğer rahatsızlıkları ve human papillomavirus ve Chlamydia (Chlamydothyla) pneumonia gibi bazı enfeksiyonların da akciğer kanserinin olası sebepleri arasında yer alabileceği bildirilmiştir (Jackson ve Vaughan, 2005; Littman, Turner ve ark., 2007; Yokota, Shiraishi ve Kohno, 2010). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), akciğer kanserini iki geniş histolojik alt tipte sınıflandırmaktadır: Vakaların yaklaşık %85'inin nedeni olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve kalan %15'i oluşturan küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK). KHDAK'nın yaklaşık %40'ını adenokarsinomlar, %25'ini skuamöz hücreli karsinomlar ve %15'ini büyük hücreli karsinomlar oluşturur (Şekil 1.2). Farklı kıtalardan elde edilen epidemiyolojik verilere göre, kadınlarda kimi ülkelerde azalmakla birlikte her iki cinstede akciğer adenokarsinomu en sık görülen akciğer kanseri türüdür (Travis, Brambilla, Burke, Marx ve Nicholson, 2015).



**Şekil 1.2.** Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırması. (Schabath ve Cote, 2019'dan uyarlanmıştır)

Akciğer kanserinin KHDAK ve KHAK olarak iki sınıfa ayrılması hala yaygın olarak uygulanmasına rağmen genomik profillemadaki ilerlemeler, akciğer kanserlerinin aynı zamanda tümör biyobelirteçleri ve gen ekspresyonu, mutasyonlar, amplifikasyonlar ve yeniden düzenlemeler gibi genetik değişikliklerle karakterize edildiği ve sınıflandırıldığı bir paradigma değişimi ile sonuçlanmıştır (Zhu ve ark., 2017).

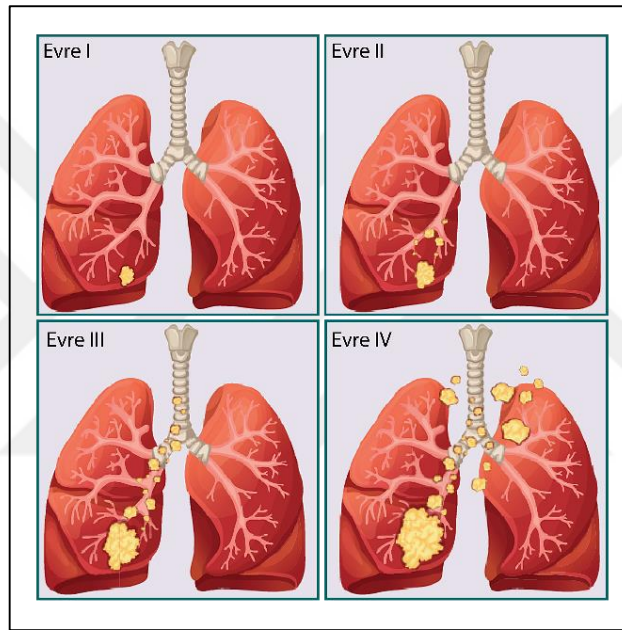
## 1.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

DSÖ, KHDAK'yı üç ana gruba ayırmaktadır: Adenokarsinom (ADK), skuamöz hücreli karsinom (SHK) ve büyük hücreli karsinom (BHK). Klinik alt grupların ayrıca başka varyantları ve kombinasyonları da bulunmaktadır (Travis ve ark., 2015).

ADK, KHDAK'nın en yaygın tipidir ve akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur. ADK'lar, daha küçük hava yolu epitelinde bulunan alveolar hücrelerden kaynaklanır ve Transkripsiyon Terminasyon Faktörü 1 ve napsin A gibi immünohistokimyasal belirteçleri ifade ederler (Travis ve ark. 2015). SHK'lar, akciğer kanserlerinin %25 ila %30'unu temsil eder ve hava yolu epitelinde bulunan hücrelerden ortaya çıkarlar. Genellikle; CK5, CK6, p40 ve desmoglein-3 gibi immünohistokimyasal belirteçler ifade ederler (Takamochi ve ark., 2016). BHK'lar, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %5 ila %10'unu oluşturur ve görülme sıklığı yeni immünofenotipleme teknikleri nedeniyle azalmaktadır. Bu tümörler tipik olarak zayıf bir şekilde farklılaşır ve bol sitoplazma ve büyük çekirdeklere sahip büyük hücrelerden oluşur (Duma, Santana-Davila ve Molina, 2019).

### 1.2.1. KHDAK'ın Teşhis ve Evrelenmesi

KHDAK evrelemesi için birkaç faktörün birleşimi göz önüne alınır ve temel olarak 4 evreye ayrılır. Tümörün boyutu ve yeri, lenf düğümlerine ve/veya vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmadığına göre 1'den 4'e kadar evreleme yapılır (Şekil 1.3). Evre I'de tümör 1-4 cm boyutlarındadır ve metastaz yapmamıştır. Evre II'de tümör 3-7 cm boyutlarındadır. Vücudun uzak bölümlerine değil ama lenf nodlarına metastaz başlamıştır. Evre III'de tümör boyutu 7 cm'yi aşabilmektedir. Hastalık lenf nodlarına yayılmaya devam etmektedir. Evre IV'de hastalık artık vücudun diğer bölümlerine de yayılmış durumdadır (American Cancer Society, 2017).



Şekil 1.3. KHDAK evreleri (American Cancer Society, 2017'den uyarlanmıştır)

Akciğer kanserinin doğru histolojik teşhisi ne kadar önemli ise moleküler biyolojisinin aydınlatılmasındaki ilerlemeler sayesinde potansiyel biyobelirteçlerin tanımlanması da bir o kadar önem taşımaktadır (Villalobos ve Wistuba, 2017).

### 1.2.2. KHDAK'da Genetik ve Moleküler Değişiklikler

Tüm ekzom dizileme ve yeni nesil dizileme gibi moleküler tanı tekniklerindeki gelişmeler akciğer kanserinin moleküler yapısı hakkında paha biçilmez bilgilere ulaşılmasını mümkün kılmıştır (Yohe ve Thyagarajan, 2017). KHDAK alanında son yıllarda yapılan genomik çalışmalar sayesinde, özellikle ADK'larda, çeşitli moleküler mutasyonlar keşfedilmiştir. Genetik değişikliklerin belirlenmesi spesifik mutasyonları hedefleyen moleküler terapilerin gelişmesini sağlayarak özellikle ilerlemiş akciğer kanseri olan bazı



hastalar için önemli sağkalım yararı sağlamışlardır. Bununla birlikte, bu çalışmalar sonucunda, hedeflenebilir mutasyonların türünde ve dolayısıyla kullanılan moleküler terapilerde ADK'lar ve SHK'lar arasında farklılıklar olduğu da belirlenmiştir (Lindeman, 2018).

ADK'lar, birden fazla mutasyon türü tarafından tanımlanan karmaşık bir genomik düzenlenme ile karakterizedirler. Substitüsyon, insersiyon, delesyon ve ek yeri mutasyonları dâhil olmak üzere çeşitli türlerdeki somatik değişikliklerin hepsinin ADK'nın karsinogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Suster ve Mino-Kenudson, 2020). Tümör protein P53 (TP53) ve LDL reseptör ilişkili protein 1B (LRP1B) mutasyonları KHDAK'nın tüm alt tiplerinde yaygın olsa da ADK, SHK'ya kıyasla KRAS, EGFR, KEAP1, STK11, MET ve BRAF'ta daha yüksek somatik mutasyon oranlarına sahip gibi görünmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar, öncelikle RAS-MEK-ERK ve PIK3CA-MTOR yolaklarını bozma eğilimindedir. Çok sayıda farklı tipte somatik değişiklik tanımlanmış olsa da, ADK'lar, EGFR, ALK, ROS1, BRAF, HER2, RET, MET ve NTRK'daki değişiklikler dâhil olmak üzere klinik olarak hedeflenebilir mutasyonlar ve yeniden düzenlemeler grubunu barındırır (Suster ve Mino-Kenudson, 2020). Bunlardan ALK, ROS1, RET ve NTRK, mevcut tedavilerde kullanıma sahip yeniden düzenlemeler arasında yer alır. ADK ayrıca, SHK ile karşılaştırıldığında daha düşük bir oranda da olsa (ADK'da yaklaşık %10 ve SHK'da yaklaşık %40), çok sayıda kromozomal kazanç ve kayıp gösterebilir. En yaygın olarak 9p21.3 kromozomunda siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A) ve CDKN2B genlerini içeren bölgede delesyonlar gösterir. Bu bölgedeki delesyonlar ise hücre döngüsü düzensizliğine yol açarlar (Kashima, Kitadai ve Okuma, 2019).

SHK, ADK ile benzer moleküler özellikler gösterse de ADK'dan farklı moleküler değişiklikleri de bulundurmaktadır (Tablo 1.1). The Cancer Genome Atlas tarafından yapılan kapsamlı çalışmalardan biri, daha önceden yapılan çalışmalarını da destekler nitelikte olup; TP53, LRP1B, CDKN2A, PTEN, PIK3CA, KEAP1, MLL2, HLA-A, NFE2L2, NOTCH1, RB1 ve PDYN'yi içeren çok sayıda tekrarlayan somatik mutasyonu tanımlamıştır (Heist, Sequist ve Engelman, 2012). SHK'lar genellikle hedeflenebilir mutasyonları barındırmazlar, bu nedenle, tekrarlayan DDR2 mutasyonları ve FGFR1 amplifikasyonu potansiyel terapötik hedefler olarak bildirilmesine rağmen, tedavi algoritmalarını birincil olarak immünoterapi ve kemoterapiye yönlendirir. ADK ile karşılaştırıldığında, tekrarlayan gen yeniden düzenlemeleri SHK'larda daha az görülür. Ayrıca, SHK özellikle kromozom 3q26-3q29 bölgesinde daha sık amplifikasyon olayları gösterir. Sık kopya sayısı kazanımları veya amplifikasyonu olan bu bölgedeki genler arasında SOX2, PIK3-CA, TP63, MAP3K13

ve KLH6 ve diğerleri yer alır. SHK, ADK'ya kıyasla, CDKN2A ve CDKN2B genlerini içeren 9p21.3 kromozomunda daha yüksek bir kopya sayısı kaybı oranı gösterir (%27'ye karşı %11). Oksidatif stres tepkisi ve skuamöz farklılaşma ile ilişkili genlerdeki somatik mutasyonlar ve kopya sayısı değişiklikleri (sırasıyla; KEAP1 ve NFE2L2 mutasyonları, SOX2 ve TP63 kopya sayısı kazanımları), SHK'da sıklıkla görülmektedir. PI3K-RTK-RAS sinyal yolunda, SHK vakalarının %70'i kadarında düzensizliğe yol açan mutasyonlar (PTEN ve PIK3CA gibi) ve kopya sayısı değişiklikleri dâhil olmak üzere çeşitli değişiklikler görülebilir (Cancer Genome Atlas Research Network, 2012; Suster ve Mino-Kenudson, 2020).

**Tablo 1.1.** Akciğer adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomlarda görülen temel moleküler değişiklikler (Suster ve Mino-Kenudson, 2020'den uyarlanmıştır)

Adenokarsinom		Skuamöz hücreli karsinom	
Mutasyonlar	Kopya numarası değişiklikleri	Mutasyonlar	Kopya numarası değişiklikleri
TP53 LRP1B KRAS EGFR KEAP1 STK11 PTPRD SMARCA4 KMT2C NF1 ATM ARID1A RELN ERBB4 SETD2 BRAF MET CTNNB1 HER2	CDKN2A CDKN2B NKX2-1 TERT EGFR NFKBIA FOXA1 MYC SDHA MET HER2	TP53 LRP1B KMT2D KMT2C CDKN2A NFE2L2 RELN FAT4 FAT1 PDE4DIP PIK3CQ LRRK2 CPS1 NF1 KEAP1 PTEN RASA1 FGFR1 DDR2	SOX2 DCUN1D1 KLH6 PIK3CA TBL1XR1 MAP3K13 PRKCI MECOM TERC ETV5 EIF4A2 TP63 LPP BCL6 FGF12 TFRC CDKN2A CDKN2B
	<b>Yeniden Düzenlemeler</b>		
	ALK ROS1 RET NTRK NRG1		

### 1.2.3. KHDAK'da Epigenetik Değişiklikler

Karsinogenezde epigenetik düzenlemenin önemli rolü göz önüne alındığında, doku veya vücut sıvılarında saptanan epigenomik biyobelirteçler, tarama veya tanı prosedürlerinin performansını iyileştirmek veya alternatif stratejiler sunmak için oldukça değerli olabilir. Epigenetik bozulmalar, akciğer kanseri hücrelerinde agresif davranışın yanı sıra tedaviye

karşı birincil veya edinilmiş direncin kazanılmasını teşvik eder, epigenetik tedavi için yeni bir yol sunar ve yeni terapötik hedeflerin keşfini sağlar (Duruiseaux ve Esteller, 2018).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, genlerdeki fonksiyon kaybı değişiklikleri ve ardından kromatinin yeniden modellenmesinde yer alan SMARCA4 gibi ilişkili proteinlerin ifade kaybının KHDAK karsinogenезinde kritik bir rol oynadığı ortaya konmuştur. Epigenetik düzenleme, ayrıca, ADK'nın DNA metilasyon profiline bağlı olarak farklı alt tipler sergilemesinde rol oynar. Transkriptomik seviyede, mRNA profilleme çalışmaları, bazıları spesifik mutasyon profilleri ile ilişkilendirilebilen farklı transkripsiyonel ADK alt tiplerini göstermiştir. Ancak şimdilik, epigenetik hedefleri baz alarak yapılacak olası tedavi yöntemleri, spesifik tedavilerle hedeflenebilecek mutasyonlara ağırlık verilmesi nedeniyle arka planda kalmaktadır (Suster ve Mino-Kenudson, 2020).

#### **1.2.4. KHDAK Tedavisi**

KHDAK tedavisi aşamaya özeldir. Evre I veya II olan hastalar kontrendike olmadığında tam cerrahi rezeksiyon ile tedavi edilmektedir. Cerrahi olamayan hastalarda, konvansiyonel veya stereotaktik radyoterapi düşünülür. Kriyoablasyon, mikrodalga ve radyofrekans ablasyon gibi perkütan termal ablasyon prosedürlerinin, cerrahi, radyoterapi veya kemoterapi sonrası kurtarma tedavisi veya ilerlemiş KHDAK'da palyasyon için yararlı tedavi seçenekleri olduğu bulunmuştur (Duma, Santana-Davila ve Molin, 2019).

Son yıllarda, hedefe yönelik tedavi, akciğer kanserinin tedavi yöntemlerine dikkate değer katkılar sağlamıştır. Ek olarak, genetik ve biyobelirteç testleri, KHDAK türlerinin kişiselleştirilmiş yönetimine yardımcı olmaktadır. Kişiye özel tedavi, sağkalımı uzatmak amacıyla spesifik mutasyonları daha yüksek hassasiyetle hedefleyebilmektedir (Duma ve ark., 2019).

İmmünoterapi, kanser hücrelerini hedeflemek için vücudun kendi bağışıklık savunmasını güçlendirme ve yönlendirme temeline dayanmaktadır. Tarihsel olarak, akciğer kanseri, sitokinler ve aşılarda yapılan birkaç başarısız girişim nedeniyle immünojenik olarak kabul edilmemiştir. Bununla birlikte, son birkaç yılda, immünoterapi, KHDAK'ya yönelik kontrol noktası inhibitörlerinin geliştirilmesi ile güçlü bir şekilde yeniden ortaya çıkmıştır. Bağışıklık kontrol noktaları, kendi kendine toleransı sürdürme ve bağışıklık tepkilerini düzenleme işlevlerine sahip inhibitör yolaklardır (Pardoll, 2012). Akciğer kanseri de dâhil olmak üzere birçok kanser türünde daha kapsamlı olarak incelenen bağışıklık kontrol noktası proteinleri, sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen 4 ve programlanmış ölüm ligand 1

reseptörüdür (PD-L1). Bunlar, tümör hücreleri üzerinde ve makrofajlar, dendritik hücreler ve T hücreleri dâhil olmak üzere tümör enflamatuar sızıntılarda eksprese edilirler. T hücresi immünoglobulin ve müsin domaini içeren protein 3, B- ve T- lenfosit ilişkili protein ve lenfosit aktivasyon geni 3 gibi diğer birçok kontrol noktası molekülü daha tanımlanmıştır ve şu anda kanser immünoterapisi için potansiyel hedefler olarak değerlendirilmektedir (Seetharamu, Budman ve Sullivan, 2016).

### **1.3. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri**

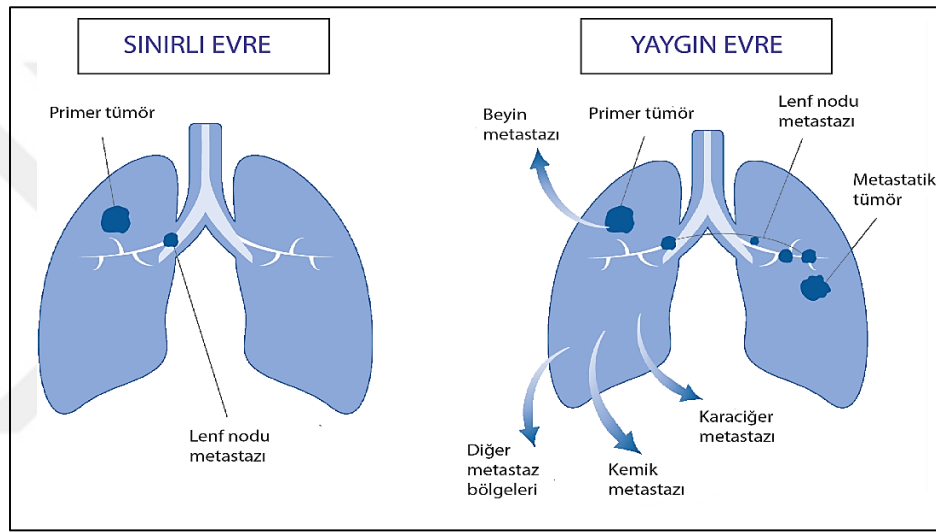
KHAK, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur. Hızlı büyüme oranına sahip olması ve hastaların %70'inden fazlasına tanı sırasında metastatik hastalık tanısı konmasıyla KHAK'den klinik olarak ayrılır. KHAK hücreleri, sinaptofiz ve kromogranin gibi nöroendokrin (NE) belirteçlerini ifade eder ve bunların akciğer epitelindeki NE hücrelerinden kaynak aldığı düşünülmektedir (Govindan ve ark., 2006). İlk olarak, akciğer kökenli bir tümör olarak nitelendirilmiş ve 1926'da "yulaf hücreli sarkom" olarak tanımlanmıştır (Barnard, 1926). Aslında bir karsinoma olduğu çok daha sonra farkedilmiştir. KHAK, başlangıçta sitotoksik kemoterapiye son derece hassas olan bir kanser olarak tanınmıştır. Hatta yeterince sitotoksik tedavi ile metastatik kanserin iyileştirilebileceği düşünülmüştür. Ancak, etkin tedaviler geliştirebilmek adına otuz yılı aşkın süredir devam eden klinik çalışmalara rağmen KHAK'ların büyük çoğunluğu tedavi edilememektedir. Standart kemoterapi alan metastatik KHAK hastalarında, yirmi yılı aşkın süredir, ortalama genel sağkalım, son zamanlardaki randomize klinik çalışmalarda bile dokuz-onbir aylık bir aralıkla sınırlı kalmıştır (Farago ve Keane, 2018).

KHAK'ın birincil nedeni, tütün sigarasıdır, hastaların %95'inden fazlası mevcut veya eski sigara içenlerdir (Pesch ve ark., 2012). Sadece birkaç başka mesleki veya çevresel karsinojenin KHAK insidansında etkili olduğu belirtilmiştir. Bunlar, kimyasal üretimde kullanılan klorometil etere maruziyet ve uranyum madencilerinde rapor edildiği üzere yüksek düzeyde radon gazına maruziyet olarak belirtilmiştir (Churg, 1994).

#### **1.3.1. KHAK'ın Teşhis ve Evrenmesi**

KHAK, 1958 yılında Veteran's Administration Lung Cancer Study Grup (VALSG) tarafından yapılan evreleme sistemine göre sınırlı evre (SE) ve yaygın evre (YE) olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 1.4) (Kalemkerian, 2011). SE, tümör hemitoraks ve bölgesel lenf düğümleri ile sınırlı olup ekstratorasik tutulumun olmadığı hastalık olarak tanımlanır.

Tümörün bir hemitoraksa sınırlı olmayıp uzak metastaz yaptığı durumlar ise yaygın hastalık olarak nitelendirilmiştir (Nosaki ve Seto, 2015). Yakın geçmişte Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) tarafından SE ve YE evreleme sisteminde sınırlı evre tanımını genişleten değişiklik önerilmiştir. Tümör bir hemitoraksa sınırlı; aynı ya da karşı tarafa hiler, mediastinal ve supraklavikular lenf bezi metastazı yapmış ise sınırlı hastalık TNM'ye göre Evre I, II, III olarak değerlendirilmiştir. Sınırlı hastalık kapsamına girmeyen yaygın hastalık evresindeki tümör ise TNM'ye göre Evre IV olarak nitelendirilmiştir (T:tümör, N:lenf nodu, M:metastaz). Güncel olarak, klinikte, her iki evreleme sisteminden de yararlanılmakta ve genellikle kişiye özel tolere edilebilir radyoterapi alanına göre tedavi süreci değerlendirilmektedir (Vallieres ve ark., 2009).



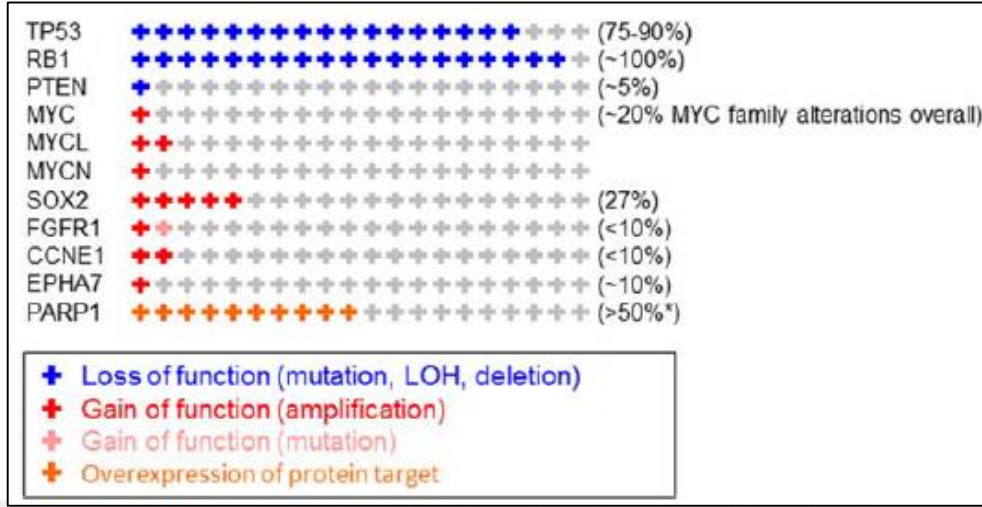
Şekil 1.4. KHAK'da iki temel evre (Tencentriq, 2021'den uyarlanmıştır)

### 1.3.2. KHAK'da Genetik ve Moleküler Değişiklikler

Yakın zamanda yapılan genom çapında çalışmalar, KHAK'nın moleküler patogeneziyle ilişkin bilgileri büyük ölçüde artırmış ve en büyük karsinojeni olan tütün dumanının etiolojisindeki rolünü gözler önüne sermiştir (Alexandrov ve ark., 2016). KHAK hastalarının çoğunda, yoğun tütün kullanımına bağlı diğer akciğer kanser hastalarında olduğu gibi, tütün kullanımı sonucu en çok görülen baz substitüsyonlarından C:G>A:T transversiyonu sıklıkla görülmektedir (Govindan ve ark., 2012). Bu hastalarda, ayrıca tütün maruziyetiyle ilgili başka bir değişiklik olan APO-B/E/C değişikliği de ifade edilmektedir (Roberts ve ark., 2013).

Cerrahi rezeksiyonların nadirliği ve tümör biyopsilerinin veya sitolojisinin küçük boyutu ve kalitesizliği nedeniyle, KHAK'nın genomik yapısı diğer birçok kanserinkinden daha az çalışılmıştır. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan bazı önemli çalışmalarda,

KHAK'da meydana gelen genetik değişikliklerle ilgili önemli bilgiler ortaya çıkarılmıştır (Şekil 1.5) (Byers ve Rudin, 2015).



Şekil 1.5. KHAK'da meydana gelen moleküler değişiklikler (Byers ve Rudin, 2015)

### 1.3.2.1. TP53 ve RB1 inaktivasyonu

KHAK, neredeyse evrensel olarak, TP53 ve retinoblastoma 1 (RB1) inaktivasyonu ile karakterizedir (sırasıyla; hastaların %75-90'ı ve %100'e yakını) (George ve ark., 2015). Bu inaktivasyon olaylarının, çoğunlukla daha büyük hava yollarında bulunan ASCL1 ifade eden normal NE hücrelerini hedefleyen moleküler olayları başlattığı düşünülmektedir (Semenova, Nagel ve Berns, 2015). Fare modelleri ile yapılan çalışmalar, bu iki olayın, fare akciğerindeki uygun hücrelere verildiğinde yüksek oranda KHAK tümörü geliştirmede etkin rol oynadığını doğrulamıştır. Ayrıca, bu süreçte, Pten, Nfib ve diğer bazı genleri içeren başka değişikliklere de neden olduğunu göstermiştir (McFadden ve ark., 2014). Şu anda mevcut olan tüm KHAK hayvan modelleri, genellikle bir veya daha fazla ek genetik değişiklik ile birlikte bu iki genin inaktivasyonunu kullanmaktadır (Kwon ve Berns, 2013).

### 1.3.2.2. Kromozom 3p üzerindeki tümör baskılayıcı genler

1982'de Whang-Peng ve meslektaşları tarafından yapılan sitogenetik çalışmalar, KHAK tümörlerinde ve hücre dizilerinde sık görülen, rastgele olmayan, edinilmiş bir kromozomal anormalliği (delesyon 3p) tanımlamıştır (Whang-Peng ve ark., 1982). Kromozom 3p bölgelerinde bir parental allel kaybının neredeyse tüm KHAK'larda olduğu ve patogenezin çok erken safhalarında, hatta histolojik olarak, yaygın kanser alanı etkilerini yansıtarak, normal akciğer epitelinde de meydana geldiği gösterilmiştir (Wistuba ve ark., 2000). Bu bulgular, 3p bölgesinde bulunan tümör baskılayıcı genler için yoğun bir araştırma

sürecini başlatmıştır. Bu süreçte, sekans veya ifadesinde anormalliklere sahip birden çok gen ve tümör baskılayıcı işlevi olan proteinler RASSF1A, hyaluronik glukozaminidaz 1 (HYAL1), HYAL2, semaforin 3B (SEMA3B), SEMA3F, fragile histidine triad (FHIT), roundabout guidance receptor 1 (ROBO1) ve von Hippel–Lindau tümör baskılayıcı (VHL) tanımlanmış ve çalışılmıştır. Bununla birlikte, onlarca yıllık çalışmalara rağmen, bu varsayılan tümör baskılayıcı genlerin KHAK patogenezindeki kesin rollerine ilişkin bilgiler halen daha orta düzeyde kalmaktadır (Gazdar, Bunn ve Minna, 2017).

### **1.3.2.3. MYC ailesinin rolü**

MYC ailesinin (MYC, MYCL ve MYCN) üç üyesi de, KHAK tümörlerinde ve hücre hatlarında sıklıkla aşırı eksprese edilmektedir. MYC, KHAK tümörlerinin %20'sinde amplifiye olmakta ve kısalmış hayatta kalma süresi ile ilişkilendirilmektedir. Rb1, Trp53 ve p130 genleri silinmiş pulmoner NE hücreleri, kültür ortamında normal şartlarda büyür ve NE markör genlerinin tam setini korur, ancak tümörijenik değildir. MYC ailesi üyelerinin, özellikle *Myc*'nin, bir Rb1, Trp53 ve p130 silinmiş fareden izole edilmiş preneoplastik NE hücrelerinde ektoptik ekspresyonunun ise, birkaç hafta içinde tümör oluşturma kapasitesi sağladığı bildirilmiştir. Rb1, Trp53 ve p130 silinmiş fareden *Myc*'nin silinmesinin tümör büyümesinin baskılanmasıyla sonuçlanması, *Myc* amplifikasyonu olan hasta gruplarında *Myc*'nin terapötik hedef olabileceğini göstermektedir (Gazdar ve ark., 2017).

Aurora kinazlar, MYC ailesi amplifikasyonu olan KHAK hücrelerinde kritik kinazlar olarak tanımlanmıştır. AURKB, RB'yi fosforile eder, postmitotik kontrol noktalarını düzenler ve anormal mitozdan sonra poliploidiyi önler. AURKA ve AURKB'nin inhibisyonunun, MYC ailesi amplifikasyonu olan KHAK hücrelerinin büyümesini seçici olarak önlediği ve poliploidiye neden olduğu gösterilmiştir (Helfrich ve ark., 2016).

### **1.3.2.4. NOTCH sinyal yolağı**

KHAK'da Notch, NE farklılaşmasını negatif olarak düzenleyen ve KHAK'ların çoğunda baskılanan bir tümör baskılayıcıdır (Meder ve ark., 2016). Notch sinyal yolağı, KHAK tümörlerinin çoğunda, özellikle de NE hücre markör genlerinin tam setini ifade edenlerde, ya delta-benzeri kanonik olmayan Notch ligand 1 (DLK1) ve DLL3 gibi Notch inhibitörleri ile ya da Notch sinyal yolu genlerindeki mutasyonları devre dışı bırakarak inaktive edilir (George ve ark., 2015). Bunun aksine, KHDAK'da, Notch sinyal yolu genleri onkogen olarak işlev görmektedirler (Ntziachristos, Sage ve Aifantis, 2014).

NE farklılaşmasının kaybıyla birlikte Notch sinyal yolağının aktivasyonuna, kısmen de olsa, nöronal ve NE farklılaşmasının transkripsiyonel bir baskılayıcısını kodlayan REST 28'in (RE1 susturucu transkripsiyon faktörü 28) aktivasyonu aracılık eder. Çoğu KHDAK hücresinde ifade edilen REST, çoğu KHAK hücresinde ifade edilmemektedir. Sonuç olarak, Notch sinyal yolağı ve dolayısıyla REST ekspresyonu, çoğu KHDAK'da, özellikle de NE hücre markör genlerinin tam setini eksprese edenlerde inhibe edilmektedir (Meder ve ark., 2016).

Aktif olarak Notch eksprese eden KHAK hücreleri, Notch'un tümör baskılayıcı rolü ile tutarlı olarak yavaş büyür, ancak aynı zamanda, Notch'un pro-tümörjenik rolü ile tutarlı olarak kemoterapi dirençlidir (Lim ve ark., 2017). DLL3, Notch sinyal yolağının baskın-negatif bir inhibitörü olarak işlev görür. Bazı DLL3'ler, KHAK hücrelerinin hücre yüzeyinde bir neoantijen olarak ifade edilir. Faz I çalışma aşamasında olan DLL3 hedefli bir antikör-ilaç konjugatı olan Rovalpituzumab Tesirin'in (ROVA-T), DLL3 eksprese eden akciğer NE karsinomunda oldukça iyi derecede antitümör aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, KHDAK'da Notch sinyal yolağının rolünün oldukça karmaşık olduğunu ve birden fazla terapötik hedef sunabileceğine işaret etmektedir (Saunders ve ark., 2015; Dylla, 2016).

### **1.3.2.5. Kinaz sinyal yolları**

Akciğer adenokarsinomlarında mutant EGFR ve EML4-ALK füzyon proteinlerini hedeflemedeki büyük klinik başarı nedeniyle, KHDAK'da kinaz genlerinde mutasyonlar veya translokasyonlar bulmaya yönelik büyük çaba harcanmıştır. KHDAK'da kinaz genlerinde görülen mutasyonların sayısı, KHDAK ile karşılaştırıldığında daha azdır. PI3K'nın katalitik alt birimini kodlayan PIK3CA'daki mutasyonların KHDAK hücrelerinde görülebildiğinin bildirilmesi, PI3K-AKT-mTOR yolağını hedefleyen klinik çalışmalara yön vermiştir (Shibata ve ark., 2009). PI3K-AKT-mTOR yolağının bir inhibitörü olan PTEN'in, fare modelinde inaktive edilmesi, KHAK hücrelerinin büyümesini hızlandırmış ve metastazların artmasına yol açmıştır (Cui ve ark., 2014). KHAK'ların bir alt kümesi, FGF2, FGF9 veya FGFR1 proteini aracılığıyla, fibroblast büyüme faktörü (FGF)-FGF reseptör 1 (FGFR1) yolağının aktivasyonu ile karakterize edilmektedir (Wynes ve ark., 2014). FGFR1 protein ekspresyonu, FGFR1 mRNA seviyeleri ve FGFR1 gen kopya sayısı ile ilişkilendirilmiştir. FGFR1 ve ligand ekspresyonunun birleşik analizinin, FGFR1 inhibitör tedavisi için KHAK'lı hastaların seçimine izin verebileceği düşünülmektedir (Schultheis ve



ark., 2014). KHDAK'nın aksine, EGFR veya KRAS mutasyonları ya da RAF-MEK-ERK yolu dâhil olmak üzere EGFR ve KRAS sinyal yollarının diğer pertürbasyonları KHDAK'da oldukça nadir görülmektedir. Özellikle, KRAS mutasyonları neredeyse hiç görülmemekte ve bu yolağın aktivitesinin olmamasının KHDAK tümörleri için avantaj olabileceği düşünülmektedir (Cristea ve Sage, 2016).

### 1.3.3. KHAK'da Epigenetik Değişiklikler

KHAK hücrelerinde görülen çok sayıda DNA dizisi değişikliklerine ek olarak, diğer kanser türlerinde de olduğu gibi, epigenetik değişiklikler de hastalığın patogenezinde önemli roller oynamaktadır. Kanserde küresel epigenetik değişiklikleri hedeflemeye yönelik birden fazla yaklaşım klinik denemelere girmiştir, ancak epigenetik değişiklikler, tümör büyümesi için hem yararlı hem de zararlı olan çok sayıda geni etkilediğinden, belirli değişiklikleri hedeflemenin daha büyük ve daha tutarlı faydalar sağlayacağı düşünülmektedir (Jones, Issa ve Baylin, 2016).

KHAK için çeşitli DNA metilasyon çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen verilere göre, RASSF1A'nın promoter hipermetilasyonu ve ardından ekspresyonunun baskılanmasının, hemen hemen tüm KHAK tümörlerinde bulunduğu gözlemlenmiştir (Burbee ve ark., 2001). DAPK, KHAK tümörlerinin üçte birinde metilasyona uğramaktadır (Toyooka ve ark., 2003). Ölüm reseptörünün aracılık ettiği apoptozla ilgili sinyal ağları, KHDAK'da promoter hipermetilasyonu yoluyla bozulmaktadır (Hopkins ve ark., 2003). KHDAK'nın son kapsamlı genetik analizleri ile histon deşitricilerde (CREBBP, EP300) ve epigenetik okuyucularda (MLL, MLL2) sıcak nokta mutasyonlarını tanımlanmıştır (Rudin ve ark., 2012; Boettger ve ark., 2012; Augert ve ark., 2017). Ayrıca, genom çapında bir metilasyon analizi, KHAK'ların % 77'sinden fazlasında yetmişüç gen hedefinin metillendiğini ve bunun KHAK'a özgü olabileceğini göstermiştir (Kalari ve ark., 2013).

KHDAK'nın nöroendokrin orijini ile tutarlı olarak, NEUROD1, HAND1, ZNF423 ve REST dâhil olmak üzere nöral hücreye özgü birkaç transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışma, kromatin erişilebilirliğinin artması yoluyla epigenetik yeniden programlamanın, nöronal gen ekspresyon programlarını ve prometastatik davranışı teşvik eden transkripsiyon faktörü Nkib'in mutasyonu tarafından yönlendirildiğini doğrulamıştır (Denny ve ark., 2016). Başka bir analiz, KHDAK'nın DNA metilasyonu ve gen ekspresyon profillerinin kümelenmesinin, benzer genetik değişikliklere

sahip histolojik olarak ayırt edilemeyen hasta örnekleri arasında farklı hastalık alt tiplerini ortaya çıkardığını göstermiştir (Poirier ve ark., 2015).

KHAK'da yüksek seviyede metillenmiş CpG adalarının yoğun kümelenmesi, bu kanser türünü diğer akciğer kanserlerinden farklı kılmaktadır ve bu durum E2F hedefi ve histon metiltransferaz geni EZH2'nin yüksek seviyede ifadesi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Reguart ve ark., 2014). Pek çok rapor, EZH2'nin, KHAK'da aşırı ifade edildiğini ve E2F'nin yol açtığı tümör oluşumunu desteklediğini doğrulamıştır (Hubaux ve ark., 2013; Poirier ve ark., 2015). Ayrıca, lncRNA TUG1'in, EZH2'nin düzenlenmesini etkileyerek hücre büyümesine ve kemorezistansa da katıldığı gösterilmiştir (Niu ve ark., 2017). Bu klinik öncesi veriler ve ilaç keşfindeki son gelişmeler, EZH2'nin KHAK'da hedeflenen tedaviye uygun olduğunu göstermektedir (Wee ve ark., 2014).

KHAK'da gözlemlenen bir diğer epigenetik değişikliğin, KHAK gelişiminde rol oynadığı düşünülen MiR-17-92 kümesinin yüksek oranda ifadesi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Hayashita ve ark., 2005). miR-886-3p'nin ise, KHAK'ların %66'sında metilasyon ile susturulduğu ve azalmış ifadesinin, daha kısa hayatta kalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. MiR-886-3p'nin yeniden ifadesinin, hücre proliferasyonunu, göçünü ve istila kapasitelerini güçlü bir şekilde bastırdığı ve hedef genleri PLK1 ve TGFβ1'in ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (Cao ve ark., 2013).

Epigenetik faktörleri hedeflemek, akciğer kanseri tedavisinde kemorezistansı ele almak ve bağımsızlık kaçışını tersine çevirmek için oldukça yeni bir yaklaşımdır. Epi-ilaçların geleneksel kemoterapi veya immünoterapi ile kombinasyonu şu anda ileriye dönük klinik çalışmalarda yoğun bir şekilde test edilmektedir. Epigenetik düzenlemelerin ve hassasiyetlerin anlaşılmasındaki ilerlemenin, akciğer kanserli hastalarda sağkalım sonuçlarının iyileştirilmesi için yeni yollar sağlayabileceği düşünülmektedir (Jones, Issa ve Baylin, 2016).

#### **1.3.4. KHAK Tedavisi**

KHAK'nın ilk basamak kemoterapi ve radyasyon tedavisine karşı güçlü tepkisi (kabaca %60-%70 yanıt oranları), hastalığın tekrarlamasından sonra ikinci basamak tedavilere karşı gösterdiği direnç ile kesin bir şekilde tezat oluşturmaktadır. Genel olarak, SE-KHAK eşzamanlı kemoradyasyon ile tedavi edilirken, YE-KHAK tek başına kemoterapi ile tedavi edilir. SE-KHAK için mevcut son teknoloji tedavi tipik olarak, radyasyon terapisi ile kombinasyon halinde cisplatin etoposid kemoterapisini içerir. SE-KHAK için yapılan

klirik deneyler hiperfraksiyone radyasyon terapisinin üstünlüğünü ve radyasyon terapisine mümkün olduğunca erken süreçte başlamanın önemini ortaya koymuştur (Fried ve ark., 2004; Spiro ve ark., 2006). Bu multimodalite tedavileri ile hastaların %20'ye kadarı uzun vadede hastalık kontrolüne sahip olabilmektedir. Bununla birlikte, kesin kemoradyasyona rağmen, çoğunlukla hastalık tekrarlamaktadır (Demedts ve ark., 2010). KHAK tedavisinde ek ilerleme, başlangıçtaki platin bazlı kemoterapilerine yanıt veren SE-KHAK ve YE-KHAK hastalarında profilaktik kraniyal ışınlamanın kullanımını içermektedir (Slotman ve ark., 2007)

YE-KHAK hastaları için, ilk basamak tedavi platin bazlı kemoterapidir. Çoğu hastaya platin etoposid kemoterapisi (karboplatin veya cisplatin) verilirken ve bazı hastalara alternatif olarak platin-irinotekan tedavisi verilmektedir. Hastalığın nüksetmesinden sonra, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan tek ikinci basamak ilaç topotekandır (TPT). Bir kamptotesin analogu olan TPT, DNA topoizomeraz I inhibitörüdür. En çok KHAK ve yumurtalık kanserine karşı etkili olsa da hematolojik maligniteleri, özellikle kronik miyelomonositik lösemi ve miyelodisplastik sendromu tedavi etmek için de kullanılmaktadır (Byers ve Rudin, 2015).

Diğer ikinci basamak tedavilerde olduğu gibi, ilk basamaktaki platin bazlı tedaviden sonra, daha uzun hastalık kontrolü yaşayan hastalarda yanıtlar tipik olarak daha yüksektir. Örneğin, etoposid tedavisinin tamamlanmasından üç aydan fazla süre sonra nükseden hastalarda yanıt oranları % 25 kadar yüksek olabilir, ancak etoposid tedavisi tamamlandıktan sonra üç aydan kısa bir süre içinde hastalık nüksedirse oranlar yalnızca %3 ila %6 arasında sınırlı kalmaktadır (Simos ve ark., 2014). İlk basamak tedaviden sonraki diğer seçenekler arasında taksanlar, irinotekan, vinorelbin ve gemsitabin bulunur. Merkezi sinir sistemi lezyonlarında oral dozlama ve aktivitesi açısından çekici olan temozolomid ikinci basamak tedavisinde daha yeni bir gelişmedir. Üçüncü basamak durumda ise kemoterapiye yanıtlar oldukça nadir görülmektedir (Pietanza ve ark., 2012).

Yakın zamanda, KHAK'ın moleküler biyolojisine ilişkin yeni verilerin elde edilmesi yeni ilaçların geliştirilmesine yol açmıştır. Bunlardan en umut verici olanların, immün kontrol noktası inhibitörleri ve antikör ilaç konjugatı ROVA-T olduğu düşünülmektedir (Waqar ve Morgensztern, 2017).

### **1.3.5. KHAK Tedavisinde Kemoterapi İlaç Toksisitesinin Diğer Bazı İlaçlarla Arttırılması**

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların farmakokinetik kısıtlamaları ve istenmeyen yan etkileri nedeniyle daha farklı antikanser ajanların geliştirilmesi her zaman dikkat çekici olmuştur. Steroidler, nonsteroid anti-enflamatuar ilaçlar, flavonoidler, doğal polifenoller gibi tıbbi ajanlar kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanıldığında kanser hücrelerinde toksisiteyi arttırarak tedaviye destek sağlayabilirler (Waqar ve Morgensztern, 2017).

Çeşitli çalışmalar, hem tek bir ajan olarak hem de kemoterapi ile kombinasyon halinde KHAK'da moleküler olarak hedeflenen tedavilerin rolünü incelemiştir. Ne yazık ki, bu çalışmaların çoğu, sınırlı hasta popülasyonlarında gerçekleştirildiğinden, tam bir başarıya ulaşamamıştır. Test edilen hedefe yönelik tedaviler arasında bevacizumab (Pujol ve ark., 2015), vandetanib (Arnold ve ark., 2007) ve aflibercept (Allen ve ark., 2014) gibi anti-anjiyogenez ilaçlar, panobinostat (de Marinis ve ark., 2013), oblimersen (Rudin ve ark., 2008) ve obatoclastax (Langer ve ark., 2014) gibi apoptozu hedefleyen maddeler ve cixutumumab ve vismodegib dâhil olmak üzere hücre sinyal yollarını hedefleyen maddeler (Belani ve ark., 2016) yer almaktadır. Ümit verici sonuçları olan iki hedefli ilaç, sunitinib ve alisertib olarak değerlendirilmektedir (Waqar ve Morgensztern, 2017).

### **1.4. Meklofenamik Asit**

Fenamat, aspirin, asetaminofen ve ibuprofen gibi nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar (NSAİİ) postoperatif ve travmatik inflamasyon tedavisinde kullanılan ateş düşürücü ve analjezik maddelerdir. Meklofenamik asit; flufenamik, mefenamik ve niflumik asitler gibi N-fenilantranilik asit türevi olan bir fenamat NSAİİ'dir. NSAİİ'lerin, Alzheimer hastalığında nöro-koruma gibi merkezi sinir sistemi üzerindeki potansiyel etkilerinin gösterilmesi bu ilaçlarla yapılacak klinik araştırmaları teşvik edici nitelikte olmuştur (Lee ve Wang, 1999).

Meklofenamik asit (MA) ve diğer NSAİİ'lerin antiinflamatuar etkilerine aracılık eden ana mekanizmanın, hem periferik hem de merkezi dokularda araşidonik asitten prostaglandinlerin (örn., Prostaglandin E2) biyosentezini katalize eden siklooksijenaz enzim sistemi Cox, Cox-1 ve Cox-2'nin inhibisyonu olduğu bilinmektedir (Wu, 1998). Cox-2 sisteminin inhibisyonu antiinflamatuar etkiye neden olurken, Cox-1 enziminin inhibisyonu antiinflamatuar etkiyle birlikte gastrik iritasyona neden olmaktadır (Kalgutkar ve ark., 2000).

Yapılan çeşitli çalışmalarla, fenamatların ve MA'nın ayrıca siklooksijenaz-prostaglandin mekanizmasından bağımsız olabilecek bir yolla çeşitli iyon kanallarını modüle ettiği gösterilmiştir. Örneğin, meklofenamik asidin ATP'ye duyarlı bir potasyum kanalının güçlü bir engelleyicisi olduğu bildirilmiştir. Daha sonraları ise MA'nın nöronal voltaj kapılı potasyum kanallarını da bloke ettiği gösterilmiştir (Lee ve Wang, 1999). Ayrıca, MA'nın, insan aortik düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve göç etmesini engellediğini gösterilmesi, yeterli ve doğru bir doz uygulandığı takdirde anjiyoplasti sonrası restenozu önlemek için değerli bir madde olabileceğine işaret etmiştir (Schober ve ark., 2002).

İşitme kaybı, insanlarda en sık görülen duyu bozukluğudur ve cisplatin gibi ilaçların iç kulaktaki tüylü hücrelerde neden olduğu ototoksisiteden kaynaklanmaktadır. Bu hücreleri ilaçların toksik etkisinden koruyabilecek ajanlar ve mekanizmalar bulmaya büyük bir ilgi vardır. Yakın zamanda, koklear tüylü hücrelere benzeyen bir hücre hattı olan HEI-OC1 kullanarak yapılan bir araştırmada meklofenamik asitin koruyucu bir etkiye sahip olduğu ve cisplatin tedavisinden sonra HEI-OC1 hücrelerinin canlılığını artırdığı bildirilmiştir. Bu durum, MA'nın, cisplatin kaynaklı ototoksisitenin iyileştirilmesi için potansiyel terapötik hedeflere yeni bakış açıları sağladığını göstermektedir (Li ve ark., 2018).

Tüm bu çalışmalara ek olarak, meklofenamik asitin farklı mekanizmalar üzerinden çeşitli kanser türlerinde tümör oluşumu ve büyümesi üzerinde koruyucu etkiye sahip olabileceğini gösteren çalışmalar da literatürde yerini almıştır (Delgado-Enciso ve ark., 2015; Soriano Hernandez ve ark., 2015; Cui ve ark., 2017). MA'nın, ayrıca, bir N6-metil adenzin (m6A) demetilaz olan fat mass and obesity associated proteinin (FTO) spesifik bir inhibitörü olduğunun tespit edilmesi (Huang ve ark., 2015) bu proteinin rolünü anlamaya ışık tutacak olan çalışmalara yön vermiştir.

#### **1.4.1. Gap Bağlantı Bloklayıcısı Olarak MA**

Çeşitli hücrelerde ve dokularda bulunan gap bağlantıları, ana yapısal elemanların connexin olarak adlandırılan transmembran proteinler tarafından oluşturulduğu hücreler arası bağlantı çeşididir. Gap bağlantıları üzerinde etkili olduğu bilinen bir dizi molekül bu alandaki çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu moleküllerden fenamatların, gap bağlantıları bloke edici özellikte olduğu ve connexin 43 aracılı hücreler arası iletişimde rolünü incelemek için kullanılabilirliği belirtilmiştir. Bir gap bağlantı antagonisti olduğu gösterilen MA, yüksek inhibisyon potansiyeli, suda çözünürlük ve nispeten hızlı tersinirlik avantajlarına sahiptir. Bu özellikleriyle, MA'nın retinadaki gap bağlantıları ve elektriksel

sinapsların işlevsel özelliklerini ve rollerini araştırmak için yararlı bir ilaç olabileceği öne sürülmüştür (Veruki ve Hartveit, 2009; Jin ve ark., 2013).

Gap bağlantılarının, ayrıca, epileptogenez sürecinde yer alabileceğini ortaya koyan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Epileptogenez; spontan nöbetlerin oluşmasına neden olan moleküler ve hücrel değişikliklerinin kaskadının tetiklenmesi ile sonuçlanan beyin hasarı sürecini ifade etmektedir. MA'nın, antiepileptojenik veya hastalık modifiye edici özelliklere sahip olup olmadığının test edildiği çalışma, bu ilacın limbik epileptogenezi yavaşlattığını doğrulamış ve potansiyel bir ilaç olabileceğini göstermiştir (Jin ve ark., 2013).

#### **1.4.2. Antikanserojen Ajan Olarak MA**

Enflamasyon, tümör proliferasyonu, progresyonu ve yayılması sırasında kritik bir olay olarak tanımlanmıştır. Enflamasyonun, esas olarak siklooksijenaz 2 (COX-2) enziminin aktivitesiyle indüklendiğinin ve korunduğunun gösterilmesi, COX-2 inhibisyonunun kanser tedavileri için kullanılmasının önünü açmıştır (Soriano Hernandez ve ark., 2015). MA gibi fenamatlar, yüksek COX-2 inhibisyon kapasitesi sayesinde güçlü anti-enflamatuar özellikleri ile öne çıkan NSAİİ'lerdir. Aynı zamanda, aldo-keto redüktazların (AKR), özellikle AKR1C alt ailesinin çok etkili inhibitörleridirler. Hem COX-2 hem de AKR1C'nin inhibisyon süreçleri bu ilaçların antitümör etkisinde rol oynamakta ve bu sebeple de fenamatların kanser tedavisinde büyük potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (Škarydová ve ark., 2009; Kovala-Demertzi ve ark., 2009). Bir dizi NSAİİ'nin rahim ağzı kanser hücreleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, önemli derecede antitümör etkisiyle, en fazla MA'nın sitotoksik özellik sergilediği gösterilmiştir (Soriano Hernandez ve ark., 2015). MA'nın prostat kanserine antineoplastik etkisini *in vitro* ve *in vivo* olarak araştıran bir çalışmada bu ilacın, tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığı, hayatta kalma süresini uzattığı gözlemlenmiştir (Soriano-Hernández ve ark., 2012). Androjenden bağımsız prostat kanserinde MA'nın neden olduğu histolojik değişiklikleri analiz eden bir diğer çalışma da bu sonucu desteklemiş ve daha az hipersellülerite, daha az atipik mitoz ve daha az nükleer polimorfizm sağlanmasıyla MA'nın hücre büyümesini yavaşlattığı bildirilmiştir (Delgado-Enciso ve ark., 2015).

MA'nın kanserde rolünün araştırıldığı çalışmalar bu ilacın metal komplekslerinin de antiproliferatif etkilerinin araştırılmasıyla genişletilmiştir. Ligand olarak aktif ilaçların metal komplekslerinin kullanılması artmış farmasötik veya biyolojik aktiviteye sahip olması nedeniyle inorganik ve tıbbi kimya için popüleritesi artan bir ilgi alanıdır ve yeni ilaç

geliştirme yaklaşımı olarak dikkat çekmektedir. MA'nın farklı metal komplekslerinin üç farklı insan kanser hücre hattında etkilerinin incelendiği bir çalışmada bu komplekslerin meme ve mesane gibi bazı kanser türlerinde antiproliferatif etkiyi artırabileceği bildirilmiştir (Kovala-Demertzi ve ark., 2011).

NSAİİ'lerin antitümör etkilerinin COX-2 inhibisyonundan kaynaklandığı sıklıkla varsayılsa da, COX-2 bağımsız mekanizmaların da önemli bir rol oynayabileceğine dair kanıtlar mevcuttur. Bir NSAİİ olan sulindac'ın metaboliti olan sulindac sülfon (Aptosin) ile yapılan çalışmalar, yeni bir antitümör aktivite mekanizmasını ortaya çıkarmıştır. Bu bileşik, COX-1 veya -2 aktivitesini inhibe etmeyip, bunun yerine spesifik guanozin 3', 5' monofosfat (cGMP) fosfodiesterazları inhibe etmektedir. Bu da, cGMP'nin hücre içi seviyelerinde bir artışa neden olarak cGMP'ye bağımlı enzim protein kinaz G'nin (PKG) aktivasyonuna yol açmaktadır. PKG'nin aktivasyonu ise büyümenin yavaşlatılması ve apoptozla sonuçlanan bir dizi olaya yol açmaktadır (Thompson ve ark., 2000). Aptosin türevleri ve diğer bazı NSAİİ'lerde de cGMP'nin hücresele seviyelerinin artmasına ve PKG'nin aktivasyonuna yol açan benzer moleküler etkiler görülmüştür (Soh ve ark., 2003, Soh ve ark., 2001). SW480 insan kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe eden dozlardaki MA'nın cGMP fosfodiesteraz PDE enzimatik aktivitesini inhibe ettiği ve sağlam hücrelerde de hücre içi cGMP seviyelerinde 2-3 kat artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu durum, bir PKG markörü olan VASP proteininin fosforilasyonu, JNK1'in aktivasyonu ve siklin D1'in hücresele seviyelerindeki azalma ile ilişkili olup, PKG'nin aktivasyonuna neden olan diğer ajanlarda görülen etkiler ile benzerlik taşımaktadır (Soh ve ark., 2008).

NSAİİ'lerin antitümör etkilerinin COX-2 bağımsız mekanizmalarla da gerçekleştirebileceğine dair kanıtlar, MA'nın aynı zamanda bir FTO inhibitörü olduğunun (Huang ve ark., 2015) ve FTO'nun kanser gelişiminde rol oynayabileceğinin gösterilmesiyle genişlemiştir. Bir m6A demetilaz olan FTO'nun MA ile inhibisyonunun, glioblastoma kök hücrelerinde m6A seviyelerini artırarak bu hücrelerin büyümesini ve kendini yenilemesini engellediği bildirilmiştir (Cui ve ark., 2017). Ayrıca, meme kanseri hücrelerinde de MA'nın etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonuçları, MA uygulaması ile artan m6A seviyesinin meme kanserinde pro-tümör aktivitesi sağladığını göstermiştir (Xu ve ark., 2020).

### **1.4.3.FTO İnhibitörü Olarak MA**

NSAİİ ve gap bağlantı bloklayıcısı olmasının yanısıra MA'nın bir FTO inhibitörü olduğu da gösterilmiştir (Huang ve ark., 2015). FTO ve AlkB Homolog 5 (ALKBH5)

proteinlerinin, özellikle mRNA’da bol olarak bulunan N6-metiladenozin (m6A) kalıntılarını oksidatif olarak demetile ettiğinin bulunması üzerine, bu iki protein epitranskriptomik çalışmaların odak noktaları arasında yerlerini almıştır. m6A metilasyonunun kanser mekanizmalarında da rol oynayabileceğinin bildirilmesi üzerine bu proteinleri kodlayan genleri susturma çalışmalarının yanı sıra, proteinleri inhibe edecek biyolojik moleküllerin arayışı da başlamıştır. Her ikisi de alfa-ketoglutarat bağımlı hidroksilaz ailesinin birer üyesi olan proteinlerden ALKBH5 değil de sadece FTO’nun inhibisyonunu hedefleyen moleküllerin tespit edilmesinde yakın zamana kadar zorluklar yaşanmıştır. 2014 yılında MA’nın, ALKHB5’i değil sadece FTO’yu baskıladığının bulunması m6A demetilasyonu ve ilişkili mekanizmalarında FTO’nun tek başına oynayacağı rollerin araştırılmasına katkıda bulunmuştur (Huang ve ark., 2015, Cui ve ark., 2017, Xu ve ark., 2020)

## **1.5. FTO ve m6A Metilasyonu İlişkisi**

### **1.5.1.FTO Geni ve Proteini**

İnsanlarda 16q12.2 kromozomal bölgede lokalize olan 9 ekzonlu Fto (fat mass and obesity associated) geni 400 kb’lik bir alan kaplar ve 505 amino asitlik FTO proteinini kodlar. FTO, Hem-içermeyen demir içeren proteinler (non-heme iron-containing proteins) olan alfa-ketoglutarat bağımlı hidroksilaz ailesinin bir üyesidir (Gerken ve ark., 2007). En yüksek beyinde olmak üzere insan, fare ve sıçan fetal ve ergin dokularında ifade edildiği gösterilen bu proteinin DNA tamiri, yağ asidi metabolizması ve post-transkripsiyonel modifikasyonlar gibi hücresel süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (Sanchez ve Andrade, 2007). 2007 yılından bu yana yapılan Genom ölçeğinde ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), Fto genindeki intron bölgelerine ait polimorfizmlerin obezite ve artmış vücut kitle indeksi ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Frayling ve ark., 2007). Büyük çaplı genotipleme çalışmalarının yürütülmesi sırasında, insan hastalıklarında FTO’nun rolü merkezi sinir sistemini kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Fto genindeki varyantların depresyon (Rivera ve ark., 2012), Alzheimer hastalığı (Keller ve ark., 2011; Reitz ve ark., 2012) ve sporadik amyotrofik lateral skleroz (Mitropoulos ve ark., 2017) gibi nörolojik hastalık durumları ile de ilişkili olduğu bulunmuştur. Birçok araştırmacı tarafından yapılan Fto geni fonksiyon kaybı (loss-of-function) çalışmalarında FTO’nun postnatal büyüme geriliği, mikrosefali, psikomotor gelişim geriliği ve düşük kemik mineral yoğunluğu ile de ilişkili olduğu bulunmuştur (Boissel ve ark., 2009; Gao ve ark., 2010). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar FTO’nun kanserdeki olası rolüne dikkat çekmiş ve Fto gen polimorfizmlerinin akut miyeloid



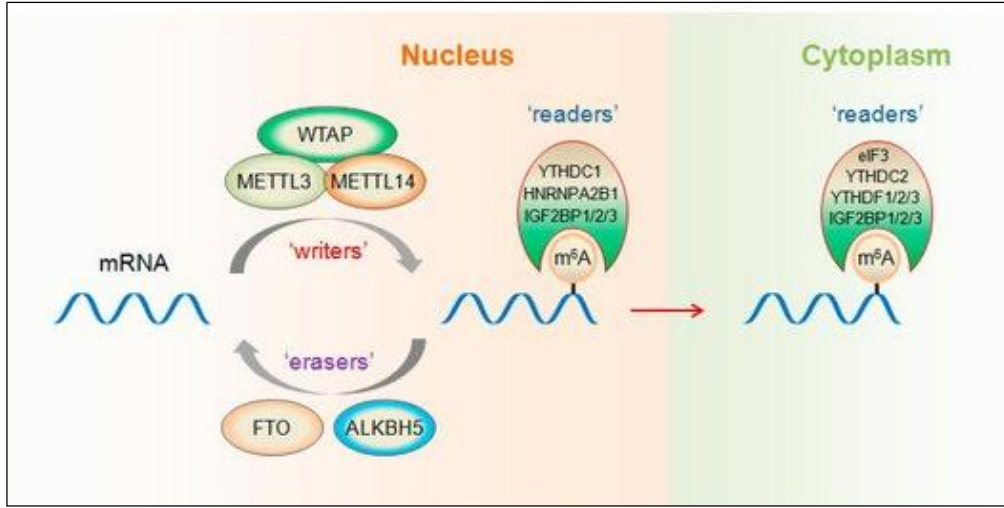
Lösemi (AML), meme, servikal ve gastrik kanser gibi pek çok kanser türüyle yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmalar bu kanser tiplerinde FTO'nun yüksek miktarda ifade edilerek kanser hücrelerinin büyüme, kendini yenileme ve metastazına katkı sağladığını göstermektedir (Chen ve Du, 2019).

FTO'nun fonksiyonu ile ilgili çalışmalarda başlangıçta DNA'daki 3-meT'in demetilasyonunu (Gerken ve ark., 2007) gerçekleştirdiği, ancak daha sonra başlıca substratının DNA'ya kıyasla RNA olduğu gösterilmiştir. FTO'nun enzimatik aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar, 2011 yılında Jia ve arkadaşlarının, FTO'nun tek iplikli RNA'da N6-metil adenzini (m6A) demetile etmeyi güçlü bir şekilde tercih ettiğini göstermesiyle yeni bir boyut kazanmıştır (Jia ve ark., 2008).

### **1.5.2. m6A Modifikasyonları**

m6A modifikasyonları, memeli mRNA'larında diğer RNA modifikasyon tiplerine kıyasla en çok görülen modifikasyon çeşididir ve doku gelişimi, hücre yenilenmesi ve farklılaşması, DNA hasar tepkisi ve kanser gelişiminde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir (Xiang ve ark., 2017, Chen ve Du, 2019). mRNA ya da uzun kodlamayan RNA (lncRNA) gibi bazı kodlamayan RNA'lardaki m6A modifikasyonlarının, ayrıca, spermatogenez, T-hücre homeostazı, ısı şoku cevabı (heat shock response), pluripotensi ve yeniden programlama gibi pek çok hücre sel süreçte de önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. RNA'larda m6A genellikle stop kodonlarında, 3'UTR bölgelerinde ve internal uzun ekzonların içinde bulunur. m6A'nın dinamik ve geri dönüşümlü bir şekilde FTO'nun ana substratı olduğu bildirildikten sonra m6A modifikasyonu büyük dikkat çekmiştir (Lin ve ark., 2017; Aguilo ve ark., 2015).

m6A modifikasyonları memelilerde bir grup düzenleyici protein tarafından düzenlenmektedir. m6A, metiltransferaz olan METTL3 ve METTL14 ile RNA'ya eklenirken (writers), FTO ya da ALKBH5 ile RNA'dan kaldırılır/silinir (erasers). m6A çekirdekte YTHDC1, HNRNPA2B1 ve IGF2BP1/2/3 ile, sitoplazmada da YTHDF1/2/3, YTHDC2, eIF3 ve IGF2BP1/2/3 ile okunur (readers) (Şekil 1.6) (Wang ve ark., 2018; Luo ve ark., 2018).



Şekil 1.6. m<sup>6</sup>A modifikasyonunda yer alan düzenleyici proteinler (Luo ve ark., 2018)

### 1.5.3. m<sup>6</sup>A Modifikasyonlarının Kanser ile İlişkisi

Bazı m<sup>6</sup>A yazıcıların (writers), okuyucuların (readers) ve silicilerin (erasers), gelişimde ve kök hücre farklılaşmasında kilit rol oynadığı gösterilmiştir. Bu yollardaki değişiklikler veya epitranskriptomik regülatörlerin düzensizliği, tümör oluşumunun tetiklenmesiyle ilişkilendirilmiştir (Fitzsimmons ve Batista, 2019). Hepatosellüler karsinomada METTL14'ün, m<sup>6</sup>A'ya bağımlı primer MicroRNA işlemlerini modüle ederek kanser hücrelerinin metastatik potansiyelini baskılayabildiği gösterilmiştir (Ma ve ark., 2017).

FTO'nun m<sup>6</sup>A demetilaz aktivitesine sahip olduğunun gösterilmesi bu proteinin de kanser ile olabilecek ilişkisine dikkatleri çekmiştir. m<sup>6</sup>A modifikasyonunun, glioblastoma kök hücrelerinde (GKH) kendi kendini yenileme ve tümörjenez için kritik olduğunun gösterildiği bir çalışmada FTO inhibisyonun GKH büyümesini ve kendini yenilemesini baskıladığı görülmüştür. Yapılan çalışmada METTL3 veya METTL14'ün baskılanmasının da GKH'nin büyümesini ve tümörjenezisini büyük ölçüde desteklediği bildirilmiştir (Cui ve ark., 2017). Li ve arkadaşları (2017), FTO'nun demetilaz aktivitesinin AML'deki fonksiyonunu araştırdıkları bir çalışmada, FTO'nun ASB2 ve RARA gibi hedeflerin ekspresyonunu, bu genlerin mRNA transkriptlerindeki m<sup>6</sup>A seviyelerini azaltarak etkilediklerini göstermişler ve FTO'nun tümör supresör genler ve onkogenlerin ekspresyonlarına etki ederek onkojenik fonksiyonu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bir başka çalışmada ise skuamöz hücreli akciğer kanserinde diğer m<sup>6</sup>A modifikasyon proteinlerinin değil de sadece FTO'nun anormal m<sup>6</sup>A modifikasyonundan sorumlu faktör

olduğu gösterilmiş ve tümör gelişimine katkıda bulunup onkojenik özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Li ve ark., 2017).

**Tablo 1.2.** m6A düzenleyici proteinlerin çeşitli kanser türlerinde rolü

Protein Tipi	Molekül	Kanser	Kanserdeki Rolü	Fonksiyon	Refereans
m6A yazıcı	METTL3	Hepatoselüler karsinoma	Onkojenik	SOCS2 mRNA kararlılığının zayıflatılması	Chen ve ark., 2018
	METTL3	Glioma	Onkojenik	SOX2 mRNA metilasyonu ve kararlılığı	Visvanathan ve ark., 2018
	METTL3	Akut miyeloid lösemi	Onkojenik	c-Myc, Bcl-2 ve PTEN ifadesinin kontrolü	Vu ve ark., 2017
	METTL14	Akut miyeloid lösemi	Onkojenik	MYB ve MYC'nin mRNA kararlılığını ve translasyonunu düzenler	Weng ve ark., 2018
	METTL14	Hepatoselüler karsinoma	Tümör baskılayıcı	MiR-126'nın DGCR8 tarafından işlenmesini düzenler	Ma ve ark., 2017
m6A silici	FTO	Akut miyeloid lösemi	Onkojenik	ASB2 ve RARA dahil olmak üzere bir dizi kritik geni hedefler	Li ve ark., 2017
	FTO	Lösemi	Onkojenik	Myc/CEBPA transkriptlerinin kararlılığını artırır	Su ve ark., 2018
	FTO	Servikal skuamöz hücreli karsinom	Onkojenik	$\beta$ -katenin/ERCC1 eksenini pozitif olarak düzenler	Zhou ve ark., 2018
	FTO	Akciğer kanseri	Onkojenik	MZF1 mRNA'yı demetilasyonu ve kararlılığı	Liu ve ark., 2018
	ALKBH5	Meme kanseri	Onkojenik	NANOG'un demetilasyonu ve mRNA seviyesini artırılması	Zhang ve ark., 2016
	ALKBH5	Glioblastoma	Onkojenik	FOXM1'in demetilasyonu	Zhang ve ark., 2017
m6A okuyucu	YTHDF1	Hepatoselüler karsinoma	Onkojenik	Hastaların kötü prognozu ile ilişkili	Zhao ve ark., 2018
	YTHDF2	Hepatoselüler karsinoma	Onkojenik	Kanser malignitesi ile ilişkili	Yang ve ark., 2017
	IGF2BP1/2/3	Serviks kanseri Karaciğer kanseri	Onkojenik	MYC gibi hedeflerin metillenmiş mRNA'larının kararlılığı	Huang ve ark., 2018

## 1.6. KHAK ile İlgili Yapılan Proteomik Çalışmalar

Proteomik, bir hücre, doku veya organizmada bulunan proteinlerin yapılarının, işlevlerinin ve miktarlarının çeşitli yöntemlerle incelenmesidir. Proteomik tabanlı teknolojiler, çeşitli diagnostik belirteçlerinin tespiti, hastalık mekanizmalarının anlaşılması, farklı sinyallere yanıt olarak gen ifadelerinin değiştirilmesi ve farklı hastalıklarda fonksiyonel protein yolaklarının yorumlanması gibi farklı araştırma alanlarına ışık tutmaktadır. Proteinler biyolojik fonksiyonun efektörleridir ve seviyeleri sadece karşılık gelen mRNA seviyelerine değil, aynı zamanda translasyon mekanizmalarının düzenlenmesine de bağlıdır. Bu nedenle, proteomik yöntemler, bir biyolojik sistemi karakterize etmek için en uygun veri seti olarak kabul görmektedir (Cox ve Mann, 2007).

LC-MS-MS ve MALDI-TOF/TOF ile kütle spektrometrisi proteomik çalışmalarda en sık kullanılan yöntemlerdendir. Çalışılacak örneklerden protein özütlerinin hazırlanmasını takiben, protein ya da peptitler öncelikle ayırma tabii tutulurlar. Kütle spektrometresinde elde edilen veriler biyoinformatik ve biyoistatistik yöntemlerden yararlanılarak analiz edilip değerlendirilirler (Aslam ve ark., 2017).

Proteomik, çeşitli kanser türleri için biyobelirteçlerin ve terapötik hedeflerin tanımlanmasında önemli bir araç haline gelmiştir. KHAK hastalarında mortalitenin yüksek olması sadece tanının çoğunlukla geç konulmasından değil aynı zamanda etkili tedavilerin eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, erken teşhis ve prognoz için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin yolunu açabilecek yeni belirteçlerin belirlenmesine büyük ihtiyaç vardır. KHAK, genellikle hastalık yayılmaya başladıktan sonra teşhis edildiği için cerrahi örnek nadiren alınır. Bu yüzden, proteomik analizlerin yapıldığı çeşitli çalışmalarda protein kaynağı olarak kanser dokusunun kullanımının yanı sıra, bronkoalveolar lavaj sıvısı, plevral efüzyon, doku interstisyel sıvısı, balgam, nazal lavaj sıvısı ve kan dâhil diğer vücut sıvıları gibi pek çok klinik örnek kullanılmıştır (Pastor ve ark., 2013; Indovina ve ark., 2013; Kisluk ve ark., 2014; Teran, Montes-Vizuet, Li ve Franz, 2015). Maalesef, bu çalışmalardan sadece birkaçı klinik olarak yararlı olmuştur. Kan ya da interstisyel ve vasküler endotel hücreleri gibi farklı hücrelerle kontamine olan tümör nodül örneklerinin heterojenliği ve diğer tip örneklerin tümör mikroçevresini birebir yansıtmıyor oluşu klinik olarak yararlı çalışma sayısının azlığını açıklamaktadır (Fujii ve ark., 2018). KHAK hücre hatları kullanılarak yapılan proteomik çalışmalar bazı potansiyel belirteçlerin saptanmasında rol oynamış olmakla beraber bu *in vitro* çalışmalar oldukça kısıtlı kalmıştır. Ayrıca, çalışmalarda belirlenen biyobelirteç adayları proteinlerin tanısal ve terapötik değerlerinin

belirlenebilmesi için diğer biyokimyasal yaklaşımlara dayanan prelinik çalışmalarla da değerlendirilmesi ve takip edilmesi gerekmektedir (Ziv ve ark., 2006; Jeong ve ark., 2011; Byers ve ark., 2012).

Sonuç olarak, KHAK hücre hatlarıyla ya da hastalardan alınan klinik örneklerle yapılan proteomik çalışmaların, potansiyel biyobelirteçlerin ve terapötik hedeflerin belirlenmesi açısından oldukça önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçların kliniğe yansımaları oldukça kısıtlı olduğundan farklı bakış açıları geliştirilerek yapılacak yeni proteomik çalışmaların yüksek ilaç direnci geliştirme kapasitesindeki bu kanserin halen tam olarak aydınlatılmamış mekanizmalarına ışık tutabilmede yardımcı olacağı düşünülmektedir (Ziv ve ark., 2006; Byers ve ark., 2012; Fujii ve ark., 2018).



## 2. AMAÇ

Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturan KHAK, yüksek metastaz potansiyeli ve düşük sağ kalım oranı ile oldukça agresif bir kanser türüdür. KHAK tedavisinde kemoterapi başlangıçta etkili olsa da, vakaların büyük çoğunluğunda hastalık kısa süre içinde nükseder ve genellikle sadece birkaç ay içinde hastanın hayatını kaybetmesine yol açar. Tedaviye direncin çok yüksek olması bu üzücü tablonun en büyük sebebi olarak görülmektedir (Govindan ve ark., 2006). KHAK'da rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması için yapılan çalışmalarda en büyük sınırlılık klinik örnek eksikliği konusundadır. Cerrahi rezeksiyonların nadirliği ve tümör biyopsilerinin küçük olması nedeniyle, KHAK'nın genomik yapısına dair çalışmalar diğer kanser türlerine kıyasla daha azdır. Her ne kadar son on yılda yapılan bazı çalışmalarla KHAK'da meydana gelen genetik değişikliklerle ilgili önemli bilgiler ortaya çıkarılmış olsa da elde edilen veriler tedaviye katkı anlamında yetersiz kalmıştır (Pastor ve ark., 2013; Indovina ve ark., 2013). Bu nedenle, ilaç direncinin üstesinden gelen ve hastalar için önemli sağkalım faydaları sağlayan umut verici stratejiler geliştirmek için KHAK'da karmaşık ilaç direnci mekanizmalarını netleştirmeye acil bir ihtiyaç vardır. Bu heterojen kanserin farklı yaklaşımlarla daha detaylıca incelenmesi, hedef alınabilecek yolların ve mutasyonların keşfinin önünü açarak bireyselleştirilmiş tedavide yeni umutlar sağlayacaktır.

Örnek eldesi konusunda yaşanan sıkıntılar hücre kültürü/*in vitro* ve *in vivo* çalışma modellerinin bu kanser türünde öne çıkmasına neden olmuştur. Hücre kültürü çalışmaları; hücre biyolojisinin ve hastalık mekanizmalarının anlaşılmasında kritik öneme sahiptir. Birçok ilacın klinik öncesi araştırmalarında, kanser araştırmalarında ve gen işleviyle ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Byers ve Rudin, 2015). KHAK araştırmalarında kullanılacak uygun hücre kültürü yöntemleri, tümör biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve dolayısıyla tedavi yöntemlerinin optimize edilmesine olanak verecektir. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların farmakokinetik kısıtlamaları ve istenmeyen yan etkileri nedeniyle daha farklı antikanserojen ajanların geliştirilmesi her zaman gündemde olmuştur. Çeşitli çalışmalar, hem tek bir ajan olarak hem de kemoterapi ile kombinasyon halinde KHAK'da moleküler olarak hedeflenen tedavilerin rolünü incelemiş, ancak yeterince etkin tedavilere ulaşılamamıştır (Langer ve ark., 2014; Pujol ve ark., 2015; Belani ve ark., 2016). Bu kapsamda, planlanan çalışmada, DMS114 hücreleri kullanılarak MA'nın tek başına ve

bir kemoterapi ilacı olan TPT ile kombinasyonunun terapötik potansiyeli ve KHAK hücre progresyonuna etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bir NSAİİ olan MA'nın çeşitli kanser türlerinde farklı mekanizmalar aracılığıyla tümör oluşumu ve büyümesini baskılayarak antikanserojen etkiye sahip olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Delgado-Enciso ve ark., 2015; Cui ve ark., 2017). MA'nın, ayrıca, m6A demetilaz olan FTO proteinin spesifik bir inhibitörü olduğunun tespit edilmesi (Huang ve ark., 2015) bu ilaca olan ilgiyi artırmıştır. En çok görülen RNA modifikasyonu olan m6A modifikasyonlarının, son yıllarda, kanser gelişiminde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. m6A modifikasyonlarında yer alan FTO'nun; glioblastoma, ve AML gibi çeşitli kanser türlerinde anormal m6A modifikasyonlarına neden olarak tümör gelişimine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2018). KHAK'da ise m6A modifikasyonlarıyla ilgili herhangi bir çalışma olmadığı görülmüştür. Mevcut çalışmada, gerek FTO inhibisyonu ile m6a seviyesinde değişikliğe neden olması gerekse antikanserojen etkisi gösterilmiş olması sebebiyle bu ilacın kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde KHAK'da m6A modifikasyonlarıyla ilgili veri bulunmamasına ek olarak, MA'nın bu kanser hücrelerinin proteomuna etkisiyle ilgili de çalışma olmadığı görülmüştür. Ayrıca KHAK proteomu ile ilgili çalışmaların kısıtlı olması ve bu çalışmaların klinik olarak pek yararlı olamamış olması böyle bir tez çalışmasının planlanmasında yönlendirici olmuştur.

Belirtilen hususlar doğrultusunda bu projenin amaçları aşağıda belirtildiği şekilde üç ana başlık altında özetlenebilir:

1. MA'nın TPT ile kombinasyonun hücre progresyonu üzerine etkilerinin incelenerek olası yeni bir tedavi kombinasyonu ile ilgili veriler sunmak.
2. MA'nın, m6a modifikasyonu aracılığı ile ya da bu mekanizmadan bağımsız olarak, DMS114 hücre proteomunda meydana getireceği değişikliklerden yola çıkarak, KHAK'daki moleküler mekanizmalar/metabolik yollar ile ilgili veriler elde etmek.
3. Regülasyonunu değişen proteinlerin kanser ile olan ilişkilerine dayanarak KHAK ilaç direnci mekanizmaları ile ilgili bulgulara ulaşmak.

Çalışmamız kapsamında elde edilecek verilerin, KHAK'da yeni terapötik stratejiler geliştirilmesine katkıda bulunmasının yanı sıra akademik düzeyde uluslararası literatüre önemli kazanımlar sağlaması da hedeflenmektedir.

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Bu çalışmada, KHAK hücre hattı olarak DMS114, sağlıklı (normal) akciğer hücre hattı olarak ise MRC5 hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Moleküler Tanı Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

Hücre kültürü deneylerinde kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3.1'de verilmiştir. Kültüre edilen hücrelerden; hücre apoptozu, döngüsü, invazyonu ve m6A kantifikasyonu gibi çeşitli fonksiyonel analizler yapılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılan ticari kitler Tablo 3.2'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler

<b>Kimyasallar</b>	<b>Katalog Numarası</b>
DMEM	Multicell, Katalog No: 319-015-CL
Penisilin/Streptomisin	Biochrome, Katalog No: A2212
L-Glutamin	Biochrome, Katalog No: K0282
FBS	Capricorn Scientific, Katalog No: FBS-11B
Tripsin/ EDTA	GIBCO, Invitrogen, Katalog No: 25200-072
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Biochorome, Katalog No: L1825
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Applichem, Katalog No: A1584
Meklofenamic Asit	Sigma-Aldrich, Katalog No: M4531
Topotekan (Topotekan hidroklorür hidrat)	Sigma-Aldrich, Katalog No: T2705
Tripan Mavisi	GIBCO, Invitrogen, Katalog No: 15250061
Paraformaldehit	Sigma-Aldrich, Katalog No: 158127
Propidyum iyodür	Sigma-Aldrich, Katalog No: P4170
Akridin oranj	eBioscience, Katalog No: BMS500PI



**Tablo 3.2.** Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kitler

<b>Kit</b>	<b>Katalog Numarası</b>
Annexin V	Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit, Merck, Katalog No: MCH100105
Hücre döngüsü	Muse® Cell Cycle Assay, Merck, Katalog No: MCH100106
Matrigel invazyon odacık sistemi	Corning® BioCoat, Katalog No: 354480
Diff Quick boyama	Polysciences, Katalog No: 26419-8
RNA izolasyonu	Qiagen, RNeasy Mini Kit, Katalog No: 74104
m6A RNA metilasyon kantifikasyon	EpiQuik, Katalog No: P-9005

Çalışmalarda kullanılan DMS114 hücreleri, küçük hücreli akciğer karsinomlu 68 yaşındaki erkek bir hastanın mediastinal biyopsisinden alınan hücrelerden oluşturulmuştur. Hasta daha önceden herhangi bir tedavi almamıştır. Hücreler HLA sınıf I ve sınıf II antijen ekspresine etmektedir. MRC5 hücreleri ise, 14 haftalık bir erkek fetüsün normal akciğer dokusundan türetilmiştir. Bu hücreler senesense girmeden önce yaklaşık 42-45 pasaja kadar çoğalabilmektedir (ATCC, 2021). Her iki hücre de akciğer kanseri çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir.

### **3.1.1. Hücrelerinin Çözülmesi**

Sıvı azot tankından çıkarılan hücreler 37°C'deki su banyosu içerisinde biraz çözdürüldükten sonra falkon tüpte bulunan, %20 FBS içeren, yüksek glukozlu DMEM besiyerinin üzerine eklendi. Hücreler 1500 rpm'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı atıldıktan sonra elde edilen pelletler, önceden hazırlanmış olan besiyeri (%10 FBS, 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin, 2 mM L-Glutamin içeren DMEM) ile çözümlenerek T25 hücre kültür kaplarına aktarıldı. Kültür kapları, 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona alındı.

### **3.1.2. Hücrelerinin Pasajlanması**

Kültür kaplarında büyüyen hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştığında pasajlandı. Hücrelerin kültüre edilmesi sırasında her zaman; %10 FBS, 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin, 2 mM L-Glutamin içeren yüksek glukozlu DMEM besiyeri

kullanıldı. Hücreler yoğunluk miktarlarına göre, T25 ya da T75 boyutlarındaki steril hücre kaplarında büyütüldü. Pasajlama yapılırken aşağıdaki basamaklar izlendi:

- Kültür kaplarının içerisindeki besiyeri pipetle çekilerek hücreler yeteri kadar PBS ile yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldı ve hücreleri kaldırmak için 1-3 ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyonu eklenerek 37°C etüvde 3 dakika kadar bekletildi. Hücreler kaldırıldıktan sonra 10 ml kadar PBS solüsyonu ile toplanan tüm içerik 15 ml'lik bir falkon tüpe alındı.
- Falkon tüp 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve pellet taze besiyeri ile süspanse edilerek çözüldü. Çözülen hücreler taze besiyeri içeren yeni kültür kaplarına aktararak 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona alındı.

### **3.1.3. Hücrelerinin Dondurulması**

Pasajlamalar sırasında elde kalan fazla hücreler, daha sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi için, yeterli stok oluşturmak üzere donduruldu. Dondurma işlemi, hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştıklarında gerçekleştirildi. Hücrelerin dondurulma protokolüne başlamadan önce %20 FBS, %70 hücrelerin içerisinde büyüdükleri ve filtreden geçirilmiş besiyeri ve %10 steril DMSO içeren dondurma besiyeri hazırlandı. Kriyovialler dondurulacak hücrenin bilgileri yazılarak etiketlendikten sonra aşağıdaki basamaklar izlenerek hücreler donduruldu:

- Yeteri kadar PBS ile yıkanan hücrelerin üzerine 1-3 ml kadar Tripsin/EDTA (%0,05) eklenerek kültür kabı 37°C etüvde 3 dakika kadar bekletildi.
- Hücreler kaldırıldıktan sonra 10 ml kadar PBS solüsyonu ile toplanan tüm içerik 15 ml'lik bir falkon tüpe alındı ve tüp, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı ve pellet, dondurma besiyeri ile çözümlenerek süspanسیون elde edildi. Kriyo tüplere, 1 ml olacak şekilde hücre süspanسیونu konuldu.
- Hücrelerin ideal koşulda dondurulması için tüpler, Mr. Frosty dondurma kabına (Thermoscientific, ABD) konarak bir gece boyunca -80°C'de donmaya bırakıldı. Ertesi gün tüpler, gerektiğinde kullanılmak üzere sıvı azot tankına aktarıldı.

### **3.2. İlaçların Hazırlanması**

Deneylerde kullanılacak olan iki ilaç, meklofenamik asit (MA) ve topotekan (TPT), DMSO kullanılarak çözüldü. MA, m6A seviyesindeki değişikliklerin KHAK hücrelerinin proteomunda meydana getireceği değişiklikleri incelemek ve ayrıca, anti-kanserojen

etkilerini araştırmak için kullanıldı. KHAK'nin ikinci basamak tedavisinde kullanılan kemoterapi ilacı TPT ise, MA ile birlikte kullanıldığında etkinliğinin nasıl değişeceğini, bir diğer deyişle sinerjetik etki oluşturarak etkinliğinin artıp artmayacağını incelemek amacıyla kullanıldı. DMSO içerisinde özölen ilaçlar ileride kullanılmak üzere porsiyonlandı. Buna göre ilaçlar, aşağıdaki basamaklar izlenerek hazırlandı:

Meklofenamik asit:

- 200 mg MA tartılarak 1000 µl DMSO içerisinde özöldü.
- özölen ana stok, DMEM besiyeri kullanılarak 100 kat seyreltildi.

Topotekan:

- Toplamda 10 mg olan ilacın hepsi 2000 µl DMSO içerisinde özöldü.
- özölen ana stok, DMEM besiyeri kullanılarak 100 kat ve 500 kat seyreltildi.

İlaçlar daha sonra, dondur-öz yapılarak aktivite kaybına sebep olmaması için küçük hacimler halinde porsiyonlanarak mikrosantrifüj tüplere konuldu. Porsiyonlanan ilaçlar, gerektiğinde kullanılmak üzere -20° C'deki dondurucuda saklandı.

### **3.3. MA ve TPT'nin Hücre Canlılıklarına Etkisinin Belirlenmesi**

MA ve TPT'nin hücre canlılığına etkisi, Tripan Mavisi Testi (TMT) kullanılarak gerçekleştirildi. Bir hücre süspansiyonunda bulunan canlı hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılan bu test, canlı hücrelerin sağlam hücre zarına sahip olması sebebiyle boyayı içerisine almaması, ölü hücrelerin ise zar bütönlüğü bozulduğu için boyayı içerisine alması ilkesine dayanmaktadır (Strober, 2015). Test protokolüne göre, bir hücre süspansiyonu tripan mavisi boyası ile karıştırılır ve ardından hücrelerin boyayı alıp almadığını ve hücre sayılarını belirlemek için görsel olarak incelenir. Kullanılan ilaçların artan konsantrasyonlarının MRC5 ve DMS114 hücre canlılıklarına etkilerinin incelenmesi için aşağıdaki basamaklar izlendi:

#### ***Hücrelerin 24 kuyucuklu plaklara ekimi:***

TMT ile canlılık analizlerinin yapılmasında hücreler toma lamı kullanılarak mikroskop altında manuel olarak sayıldı. İlaç uygulamasının hücreleri öldüreceği ve sayılabilecek hücre miktarının azalacağı da göz önünde bulundurularak hücre ekimleri yüzey alanı 1,9 cm<sup>2</sup> olan 24 kuyucuklu plaklar kullanılarak gerçekleştirildi. Ekilecek hücre miktarı, yapılan ön çalışmalardan sonra optimize edildi ve ardından aşağıdaki protokol takip edildi.

- Yeteri kadar PBS ile yıkanan hücrelerin üzerine 1-3 ml kadar Tripsin/EDTA (%0,05) eklenerek kültür kabı 37°C etüvde 3 dakika kadar bekletildi. Hücreler kaldırıldıktan

sonra PBS solüsyonu ile toplanan tüm içerik bir falkon tüpüne alınarak 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrası çöken hücreler besiyerinde çözüldü ve 50 µl örnek, mikrosantrifüj tüpü içerisine alınarak uygun dilüsyon oranında tripan mavisi ile karıştırıldı.
- Boyalı karışımdan 10 µl alınarak Thoma lamına konuldu ve Şekil 3.1'de A-D olarak gösterilen alanlardaki canlı hücreler sayıldı. Sayım sonucunda, toplam hücre sayılarının hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$1\text{ml'deki Hücre Sayısı} = \frac{4 \text{ karede sayılan toplam hücre sayısı}}{4} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10000$$

(Hücre sayımlarında sıklıkla 1:5 oranında dilüsyonlar uygulanmıştır)

- Hücre miktarları hesaplandıktan sonra her bir kuyucuğa 50000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plaklara hücre ekimi yapıldı. (İlaçların 24, 48 ve 72 saat süreli etkilerinin incelenmesi için üç ayrı plağa hücre ekimi yapıldı).
- Plaklar, ertesi gün ilaç uygulaması yapılmak üzere 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona alındı.

#### ***İlaçların hücrelere uygulanması:***

MA ve TPT'nin kanser hücre hattı DMS114 ve sağlıklı hücre hattı MRC5 canlılığına etkilerinin belirlenmesi için ilaçlar, literatürde benzer çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar göz önünde bulundurularak artan konsantrasyonlarda hazırlanarak hücrelere uygulandı. Yapılan ön çalışmalardan sonra kullanılacak optimum konsantrasyonlar belirlendi. Buna göre aşağıdaki basamaklar takip edildi:

- Daha önceden porsiyonlanarak -20°C'deki dondurucuda saklanan ilaçlardan aşağıdaki tabloda belirtilen konsantrasyonlar, taze besiyeri kullanılarak hazırlandı (Tablo 3.3). Artan ilaç konsantrasyonları, stok ilaç konsantrasyonu göz önünde bulundurularak aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

(*C<sub>1</sub>*=Stok ilaç konsantrasyonu, *V<sub>1</sub>*=alınacak hacim, *C<sub>2</sub>*=elde edilmek istenen konsantrasyon, *V<sub>2</sub>* = nihai hacim)

- Bir gün önce 24 kuyucuklu plaklara ekilmiş olan hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildikten sonra ilaçlı besiyerleri eklendi. Hücreler; 24, 48 ve 72 saat sonunda canlılık analizi yapılmak üzere tekrar etüvde inkübasyona alındı.

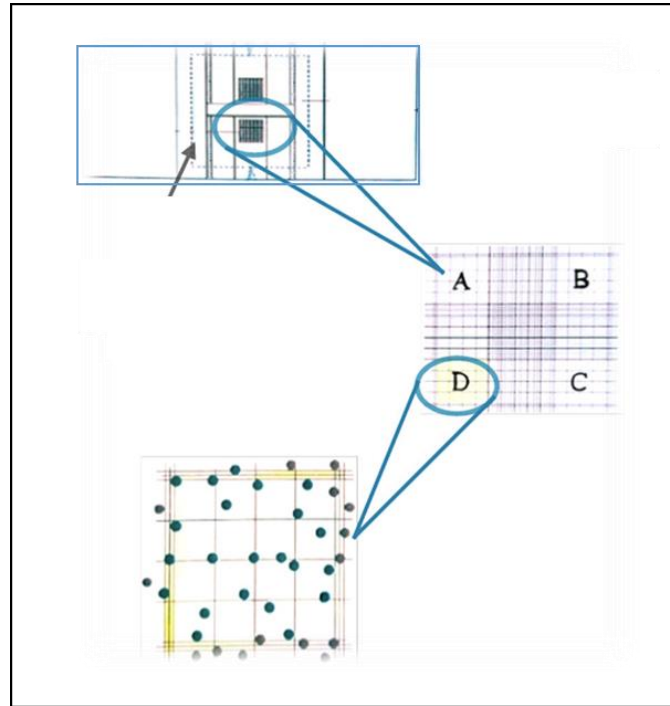
**Tablo 3.3.** Canlılık analizlerinde kullanılan MA ve TPT konsantrasyonları

<b>MA</b> ( $\mu$ M)	15	30	60	90	120	150
<b>TPT</b> (nM)	5	10	20	40	80	160

***Hücre canlılıklarının belirlenmesi:***

24, 48 ve 72 saat olan inkübasyon süresi dolan hücrelerin TMT ile aşağıdaki basamaklar takip edilerek canlılıkları analiz edildi:

- Hücrelerin üzerindeki besiyeri steril mikrosantrifüj tüplere alındı ve hücrelerin üzerine 200  $\mu$ l kadar tripsin konarak etüvde 3 dakika bekletildi. Süre sonunda kaldırılan hücreler daha önceden tüplere alınmış kendi besiyeri ile toplandı ve tekrar tüplere konuldu.
- 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve hücreler uygun miktarda tripan mavisi ile çözüldü. Hücre-boya karışımından 10  $\mu$ l Thoma lamına konarak mikroskop altında, Şekil 3.1'de A-D olarak gösterilen alanlardaki canlı hücreler sayıldı.
- Her bir gruptaki hücre sayısı hesaplanarak canlılığın ilaç uygulamasıyla nasıl değiştiğini analiz etmek üzere not edildi.



**Şekil 3.1.** Thoma lamı ile hücre sayımı

### 3.4. MA-TPT Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi

MA ve TPT'nin birlikte kullanımının olası bir sinerjetik etkisinin araştırılması için, hücre canlılıklarının belirlenmesi kısmında anlatılan TMT yöntemi kullanıldı. İlaçların hücrelere tek başına uygulanması sonucu elde edilen canlılık verilerinin değerlendirilmesiyle uygun ilaç kombinasyonları belirlendi (Tablo 3.4). MA ve TPT kombinasyonlarının olası sinerjetik etkisi, Chou-Talalay kombinasyon indeksi (CI) yöntemi kullanılarak TMT sonuçlarına göre hesaplandı (Chou ve TaLaLay, 1981). Bu analiz sonucunda elde edilen veriler,  $CI < 1$ ,  $CI = 1$  ve  $CI > 1$  sırasıyla; sinejik, aditif ve antagonistik olarak yorumlanmaktadır.

Chou-Talalay kombinasyon indeksi yönteminin uygulanabilmesi için aşağıdaki basamaklar takip edildi:

- Öncelikle, "MA ve TPT'nin Hücre Canlılıklarına Etkisinin Belirlenmesi" kısmında anlatıldığı şekilde hücreler 24 kuyucuklu plaklara ekildi.
- Belirlenen konsantrasyonlara göre yapılan hesaplamalar neticesinde taze besiyeri kullanılarak ilaç kombinasyonları hazırlandı ve hücrelere uygulandı.
- İnkübasyon süresi sonunda, "Hücre canlılıklarının belirlenmesi" kısmında anlatıldığı şekilde TMT analizi yapılarak hücre canlılıkları hesaplandı.
- Chou-Talalay kombinasyon indeksine göre CI değerleri belirlenerek sonuçlar analiz edildi.

**Tablo 3.4.** MA ve TPT kombinasyon konsantrasyonları

MA ( $\mu$ M)	TPT (nM)
30	5
	10
	20
60	5
	10
	20

### 3.5. İlaç Uygulamasının Hücre Apoptozuna Etkisinin Belirlenmesi

MA, TPT ve iki ilacın kombinasyonunun DMS114 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin araştırılması için iki farklı yöntem kullanıldı. Annexin V boyaması yapılarak akış

sitometrisi ile analizin yanı sıra Akridin Oranj/ Propidyum iyodür (AO/PI) boyaması yapılarak da apoptotik hücrelerin morfolojik değişiklikleri gözlemlendi.

### 3.5.1. Akış Sitometrisi İle Apoptozun Değerlendirilmesi

Annexin V ile apoptoz analizi, bir akış sitometri cihazı olan Muse® Cell Analyzer (Millipore, Almanya) ile yapılmıştır (Şekil 3.2). Kapalı sistem olan bu cihaz optimize edilmiş kendi kitleri ile çalışmaktadır. Hücre bölünmesi, ölümü ve otofaji gibi pek çok hücre biyolojisi konularının analizini sağlayan kitleri mevcuttur. Çalışmalarımızın apoptoz analizi kısmında kullanılmasının yanı sıra, ileride anlatılacağı gibi hücre döngüsü analizleri için de kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Muse® Cell analyzer cihazı

“Muse Annexin V & Dead Cell Assay Kit” (Millipore, Almanya) kullanılarak yapılan apoptoz deneyleri için aşağıdaki basamaklar takip edildi:

- Hücreler daha önce anlatıldığı şekilde tripsin/EDTA ile kaldırılarak 12 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 100000 hücre olacak şekilde ekildi ve 37°C’deki etüvde gece boyu inkübasyona alındı.
- Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra uygun konsantrasyonlardaki ilaçlı besiyeri eklendi. Hücreler; 24 ve 48 saat boyunca etüvde inkübe edildiler.
- İnkübasyon süresi sonunda hücreler tripsin/EDTA ile kaldırılarak 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildiler. Üst sıvı atıldıktan sonra pellet PBS ile yıkanarak tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası hücreler Muse Annexin V & Dead Cell Kit ile boyanarak 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Muse® Cell Analyzer ile analiz edildi.

### 3.5.2. AO/PI boyama ile Apoptozun Değerlendirilmesi

İlaç uygulamasının hücre morfolojisinde neden olduğu değişikliklerin gözlemlenmesi için AO/PI boyaması yapıldı. AO, hem canlı hem de ölü hücrelerin nükleuslarını boyarak yeşil floresan ışımaya yapar. PI, membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelere girerek nükleuslarını boyar ve kırmızı floresan ışımaya yapar. Hem AO hem de PI tarafından boyanan çekirdekler, yani ölü hücre çekirdekleri, Förster rezonans enerji aktarımı (FRET) nedeniyle kırmızı floresan ışımaya yaparken canlı hücrelerin çekirdekleri yeşil ışımaya yapar. Hücreleri AO/PI ile boyamak için aşağıdaki protokol takip edildi:

- Hücreler, “Akış sitometrisi ile apoptozun değerlendirilmesi” kısmında anlatıldığı şekilde 12 kuyucuklu plakalara ekildi ve ilaç uygulaması yapıldı.
- İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama yapıldı. Hücrelerin üzerine %4 paraformaldehit eklendi ve 30 dakika süreyle inkübasyona bırakılarak fikse olmaları sağlandı.
- Süre sonunda üç kez PBS ile yıkama yapıldıktan sonra AO/PI (100 mg/ml) boya karışımı uygulandı ve hücreler, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
- Boyama sonrası hücreler tekrar üç kez PBS ile yıkandı ve EVOS FL hücre görüntüleme sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile hücreler analiz edilerek görüntüleri çekildi.

### 3.6. İlaç Uygulamasının Hücre Döngüsüne Etkisinin Belirlenmesi

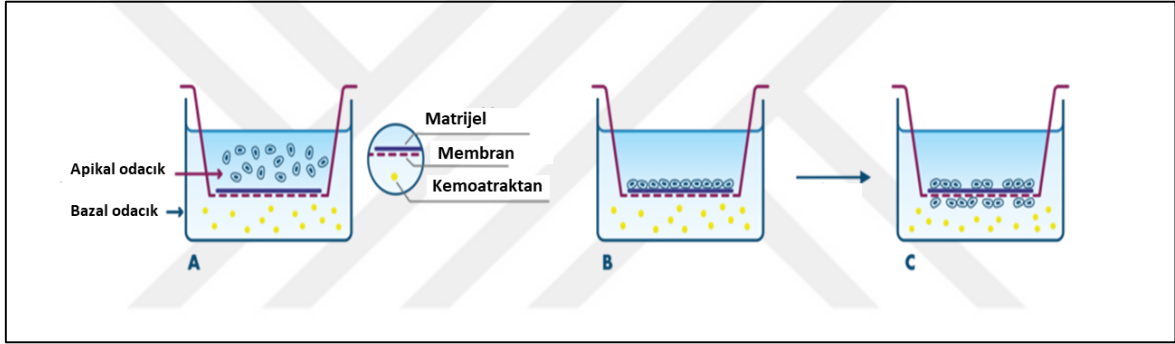
DMS114 hücrelerine uygulanan ilaçların hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin analizi “Muse Cell Cycle Kit” kullanılarak, Muse® Cell Analyzer cihazı ile yapılmıştır. Analiz edilen örneklerin hücre döngüsü dağılımı hakkında bilgi veren kit, G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücrelerin yüzdesinin nicel ölçümüne olanak sağlamaktadır. “Muse Cell Cycle Kit” ile hücre döngüsündeki değişikliklerin analiz edilmesi için aşağıdaki basamaklar takip edildi:

- Hücreler, “Akış sitometrisi ile apoptozun değerlendirilmesi” kısmında anlatıldığı şekilde 12 kuyucuklu plakalara ekildi ve ilaç uygulaması yapıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücreler %70 etil alkol ile fikse edilerek -20°C dondurucuda yaklaşık 3 saat bekletildi.
- Fikse olan hücreler soğuk PBS ile yıkanarak 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve “Muse Cell Cycle Kit” ile boyanarak 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda hücreler Muse® Cell Analyzer ile analiz edildi.



### 3.7. İlaç Uygulamasının Hücre İnvazyonuna Etkisinin Belirlenmesi

Tümör hücrelerinin invazif özelliklerini *in vitro* değerlendirmek için bazal membran yoluyla invazyon kapasitelerini değerlendiren çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Amniyon, lens kapsülü ya da mesane duvarı gibi dokulardan hazırlanan ancak tekrar edilebilirliği düşük olan membranlara alternatif olarak geliştirilen ekstraselüler matrisler invazyon çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda, bunlara bir örnek olan BioCoat Matrigel İnvazyon Odacık Sistemi (BD Biosciences, ABD) kullanılarak ilaç uygulamasının invazyon kapasitesine olan etkisi araştırıldı. Bu sistemdeki invazyon odacıkları 8 mikron çaplı porlar içeren bir membran ile örtülüdür. Porlu membranın matrijel matris ile kaplanmasıyla da bazal membranın *in vitro* koşullarda oluşumu sağlanır. İnvazif özelliği olan hücreler membranın alt yüzeyine geçerken, invazif olmayanlar membrandan geçemezler (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Matrijel invazyon odacık sistemi (Reactionbiology, 2021'den uyarlanmıştır)

Bu bilgiler doğrultusunda, deneyin gerçekleştirilmesinde aşağıdaki başlıklar takip edildi.

#### 3.7.1. Hücrelerin İnsertlere Ekimi

##### *İnsertlerin Rehidrasyonu:*

İnsertler, muhafaza edildiği  $-20^{\circ}\text{C}$ 'deki dondurucudan çıkarılarak oda ısısına getirildi. İnvazyon odacıklarına ve 24 kuyucuklu plakanın kullanılacak olan kuyucuklarına  $37^{\circ}\text{C}$  sıcaklıktaki DMEM besiyeri 500  $\mu\text{l}$  olacak şekilde konuldu. 2 saat süreyle,  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki nemlendirilmiş %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde rehidrasyon için bırakıldı.

##### *İlaçların Hazırlanması:*

İnsertlerin rehidrasyon süresinin dolması beklenirken, DMS114 hücrelerinin ekiminde kullanılacak olan besiyeri ve ilaçlar hazırlandı. Hücrelerin büyüyeceği invazyon odacıklarına konulmak üzere, uygun konsantrasyonda MA içeren serumsuz (FBS'siz)

besiyeri (kontrol grubu için MA içermeyen serumsuz besiyeri) hazırlandı. İnvazyon odacığının dışında kalan kuyucuk kısmına konulmak üzere FBS içeren besiyeri hazırlanarak kemoatraktan olması sağlandı.

#### ***Hücrelerin Ekilmesi:***

Hücrelerin invazyon odacıklarına ekilmesinde dikkat edilmesi gereken nokta, hücrelerin bulunduğu odacıklara serumsuz besiyeri, odacığın yerleştirileceği kuyucuklara ise serumlu besiyeri konmasıdır. Böylelikle serumlu besiyeri hücreler için kemoatraktan oluşturacak ve invazif özelliği olan hücrelerin membranın alt kısmına geçmesi sağlanacaktır. Bu husus dikkate alınarak hücrelerin ekimi aşağıda belirtilen maddelere göre gerçekleştirildi:

- Rehidrasyon süresi bitiminde, invazyon odacıkları ve kuyucuklara konulmuş olan besiyeri dikkatlice uzaklaştırıldı. 750 µl serumlu besiyeri rehidrasyon yapılmış olan kuyucuklara yerleştirildi. İnvazyon odacıkları, hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat edilerek, bu kuyucukların üzerine yerleştirildi.
- Kültür kaplarında büyümüş olan DMS114 hücreleri, daha önce anlatıldığı şekilde PBS ile yıkandıktan sonra tripsin/EDTA ile kaldırılarak toplandı ve santrifüjde çöktürüldü. Elde edilen pellet, serumsuz besiyeri ile süspansiyon edildi ve daha önce anlatıldığı şekilde, Thoma lamı kullanılarak hücre miktarı belirlendi.
- Her bir invazyon odacığına 300000 hücre olacak şekilde, serumsuz besiyeri kullanılarak hücreler ekildi. Kontrol grubu hücreleri için ilaçsız serumsuz besiyeri kullanılırken diğerleri için MA içeren serumsuz besiyeri kullanıldı.
- Hücreler, inkübasyon süresi sonunda analiz edilmek üzere, 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırıldı.

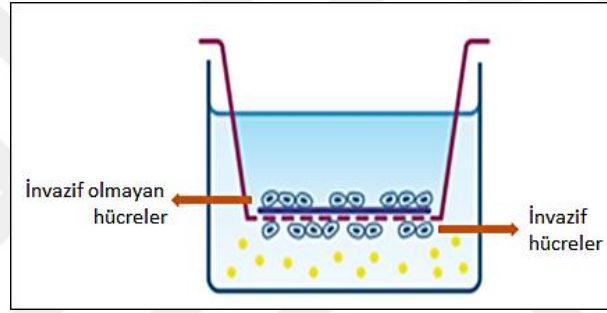
Tüm bu aşamalar, kontrol odacıkları (BD Biosciences, ABD) için de tekrar edildi. Kontrol odacıkları matrijelle kaplanmamış membrandan oluşurlar. İnvazif özellikli hücre yüzdesinin tespit edilebilmesi için kontrol odacıklarından geçen yani migrasyon yapan hücre sayısının da belirlenmesi gerekmektedir.

#### **3.7.2. Hücrelerin Boyanması ve Sayımı**

BioCoat Matrigel İnvazyon kiti, boyama protokolünde kullanılması için Diff-Quik boyama kiti ya da hematoksilin ve eozin gibi uygun başka bir boyama yönteminin kullanılabilmesini belirtmektedir. Yapılan çalışmada, bir fiksatif ve iki boyama solüsyonu içeren Diff-Quik boyama kiti kullanılmıştır. Boyama, temel olarak, invazyon odacıklarının

üç solüsyondan geçirilmesini takiben iki kez steril saf suyla durulanması ile gerçekleştirilir. Görünüm, Wright-Giemsa boyama ile elde edilene benzer. Hücre çekirdeği mor renkte ve sitoplazma pembe renkte boyanır. Bu protokole göre hücrelerin boyanabilmesi için aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

- İnkübasyon süresi bitiminde invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığının membranının dış yüzeyine geçeceklerinden, invazyon odacığının içindeki besiyeri uzaklaştırıldı (Şekil 3.4).
- İnvazyon odacığının içindeki hücreler steril pamuklu çubuk kullanılarak temizlendi.
- Dış yüzeye geçmiş olan invazif hücreler Diff Quick boyama kiti protokolüne göre önce fiksatif solüsyonu ile fikse edildi. Ardından, sırasıyla, I ve II numaralı solüsyonlarda beşer dakika tutularak boyandı.



Şekil 3.4. İnvazyon odacıklarındaki invazif ve invazif olmayan hücreler

### 3.7.3. Hücre İnvazyon Oranlarının Hesaplanması

Boyama işlemi bittikten sonra bistirü ile kesilen matrijel membran, lamel üzerine konarak entellant ile kapatıldı. Örnekler kuruduktan sonra mikroskop altında hücreler sayıldı. Tüm bu aşamalar matrijel içermeyen kontrol membranı için de tekrarlandı.

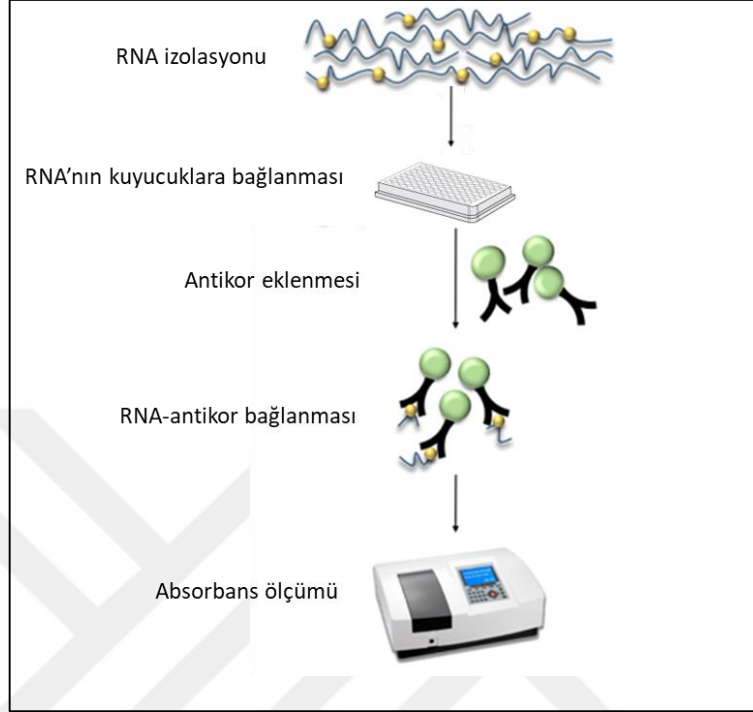
% İnvazyon hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\% \text{ İnvazyon} = \frac{\text{matrijel matris membranındaki hücre sayısı}}{\text{kontrol membranındaki hücre sayısı}} \times 100$$

### 3.8. MA Uygulamasının m6A Miktarına Etkisinin Belirlenmesi

Dokularda ve hücrelerde m6A miktarını saptamak için HPLC-ECD ve LC-MS gibi çeşitli kromatografi tabanlı teknikler kullanılır. Bu yöntemler çoğu zaman yüksek maliyetli, zaman alıcı ve düşük verimli olduğu için hücrelerden ya da dokulardan izole edilmiş toplam RNA kullanılarak m6A RNA metilasyon durumunu doğrudan ölçen ticari kitler

geliştirilmiştir. Bu çalışmada, MA uygulamasının DMS114 hücre RNA'larındaki m6A seviyesine etkisi, EpiQuik™ m6A RNA Metilasyon Kantifikasyon Kiti kullanılarak Şekil 3.5'de belirtilen aşamalara göre araştırılmıştır.



Şekil 3.5. m6A kantifikasyonunun temel basamakları

### 3.8.1. RNA İzolasyonu

m6A miktarının tespit edilmesi için ilk önce hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu öncesi hücrelerin hazırlanması için daha önce anlatıldığı şekilde, kültür kaplarındaki DMS114 hücreleri, PBS ile yıkandıktan sonra tripsin/EDTA ile kaldırılarak toplandı ve santrifüjde çöktürüldü. Elde edilen pellet süspansiyon olarak hücreler sayıldı. 5 ml'lik steril kültür kaplarına 800000 hücre olacak şekilde hücreler ekildi ve etüve konuldu. Hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek, uygun konsantrasyonlarda hazırlanan ilaçlı besiyeri konuldu. Kültür kapları, inkübasyon süresi tamamlanmak üzere etüve alındı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin dolmasının ardından, RNA izolasyonu için kültür kaplarındaki hücreler PBS ile yıkandıktan sonra hücre kazıyıcı ile kazılarak mikrosantrifüj tüpü içerisinde toplandı.

RNA izolasyonu, RNeasy Mini Kit kullanılarak, üretici firma talimatları doğrultusunda yapıldı. Kısaca, toplanan hücreler santrifüjde çöktürüldükten sonra sırasıyla kit içeriğindeki tampon çözeltilerle muamele edildi. Kolondan geçirilen örnekler deoksiribonükleaz I ile muamele edildi. Son olarak, uygun tampon çözeltilerle yıkandıktan

sonra elüsyon çözeltisi ile RNA'lar steril mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. İzole edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonları Nanodrop (Thermo Scientific, USA) ile belirlendi. Elde edilen RNA örneklerinin kalitesini görmek için, örnekler %1'lik formaldehitli agaroz jelde yürütüldü. 18S ve 28S bantları gözlemlenerek RNA kalitesi kontrol edildi.

### 3.8.2. Kantitatif m6A Analizi

Kalitesi kontrol edilen ve konsantrasyonu ölçülen RNA örneklerinden, EpiQuik™ m6A RNA Metilasyon Kantifikasyon Kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda m6A analizi yapıldı. Kitin önerisi doğrultusunda örnekler 2 µl içerisinde 200 ng olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra, kısaca, 200 ug RNA örnekleri plaka kuyucuklarına eklendi ve 37° C'de 90 dakika inkübe edildi. Tüm kuyucuklar yıkandıktan sonra 50 µl antikor eklenerek oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi. Antikor uzaklaştırıldıktan sonra yıkanan kuyucuklara deteksiyon antikorü eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Aynı şekilde, kuyucuklar tekrar yıkandıktan sonra, hızlandırıcı (enhancer) solüsyon ile muamele edildi ve ardından developman solüsyonu ile renk değişikliği sağlandı. Son olarak, durdurma solüsyonu eklendikten sonra 450 nm'de Thermo Multiscan FC ELISA okuyucu (Thermoscientific, ABD) ile optik yoğunluk ölçüldü. m6A yüzdesindeki değişiklik aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$m6A\% = \frac{(\text{örnek OY} - \text{NK OY})/S}{(\text{PK OY} - \text{NK OY})/P} \times 100\%$$

[OY: optik yoğunluk, NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, S: yüklenen RNA miktarı (ng), P: Pozitif kontrol miktarı (ng)]

### 3.9. Hücrelerden Protein İzolasyonu ve Örnek Havuzlarının Oluşturulması

KHAK hücre hattı olan DMS114 hücrelerine MA uygulanmasının proteomda meydana getireceği değişikliklerin incelenmesi için ilk önce hücrelerden protein özütü hazırlandı. Bu deney için eşit sayıdan ekilen hücreler ( $5.0 \times 10^6$ ), biyolojik tekrar sağlanabilmesi için üç ayrı T175 ebatında kültür kabında büyütüldü. Protein izolasyonu sonrası konsantrasyonu ölçülen örnekler, dondur-çöz işlemleri sırasında zarar görmemesi için posiyonlanarak -80°C soğutucuda saklandı.

### **3.9.1.Hücrelerden Protein Özütü Hazırlanması**

Hücre kültürü deneyleri neticesinde belirlenen ilaç konsantrasyonu hücrelere uygulandıktan sonra inkübasyon süresinin bitiminde besiyeri uzaklaştırılarak, hücreler, iki kez soğuk yıkama tamponu ile yıkandı.

- Yıkama tamponu: 10mM Tris, 250 mM sükröz, pH 7.2

Hücre kazıyıcısı kullanılarak hücreler kültür kabı yüzeyinden kazındı ve 15 ml'lik falcon tüplere alınarak 4°C, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, üst sıvı atıldıktan sonra, çöken hücre pelleti 2DE örnek tamponunda süspanse edildi ve protein yıkımını engellemek için proteaz inhibitör karışımı (Roche) eklendi.

- 2DE Örnek Tamponu: 8 M Üre, 50 mM DTT, %2 CHAPS, %0,2 Bio-Lyte 3/10 amfolit, %0.002 Bromofenol mavisi

Hücreler, 0,2 mm çelik boncuklar kullanılarak, bullet blender doku homojenizatör cihazı (Next Advance, ABD) ile patlatılarak homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler 4°C'de 20.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve proteinleri içeren üst sıvı kısım temiz yeni bir tüpe aktarıldı. 4°C, 20.000 rpm'de 40 dakika tekrar santrifüj edilerek daha temiz bir örnek elde edilmesi sağlandı.

### **3.9.2.Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Hazırlanan örneklerin protein konsantrasyonunun belirlenmesi için spektroskopik bir metot olan Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, ölçülen proteinlerin amino asit bileşimine bağlıdır. Yöntemde kullanılan boya, başta arjinin olmak üzere affinite gösterdiği diğer amino asitler ile etkileşime girerek renk değişimine sebep olmaktadır. Oluşan renk değişikliği, bir spektrofotometrik okuyucuda 595 nm dalga boyunda okunarak örneğin protein konsantrasyonu tayin edilmektedir. Protein konsantrasyonu, standart bir protein olan sığır serum albumin protein (BSA) çözeltisinin farklı konsantrasyonlarının absorbans değerleri baz alınarak hesaplanmaktadır. Laboratuvarımızda ticari olarak satın alınan Bradford protein konsantrasyon ölçüm kiti kullanılmaktadır (Bio-Rad, ABD). Kullanılan boya, 1:5 oranında seyreltilerek filtre kağından geçirilmektedir. Konsantrasyon ölçümü için, kısaca, protein örnekleri 1:20 oranında 2DE örnek tamponu ile seyretildi ve 1'er ml Bradford boyası eklendi. Kör solüsyon olarak protein örneği içermeyen 2DE örnek tamponu ve boya karışımı kullanıldı. 5 dakika kadar karanlıkta ve oda ısısında bekletilen örneklerin absorbansı 595 nm'de Nanodrop (Thermoscientific, ABD) ile üç tekrar olacak şekilde okundu ve BSA standart eğrisine göre konsantrasyonlar belirlendi.

### 3.9.3. Örnek Havuzlarının Oluşturulması

3 ayrı kültür kabında büyütülen hücrelerden protein izolasyonu ayrı ayrı yapıldıktan sonra konsantrasyonlarının ölçülmesini takiben, her bir örnekten 4000 µg alınarak 12 mg'lık protein havuzları oluşturuldu. Hazırlanan havuzlar, ilaç uygulanan grup için "MA", uygulanmayan grup için "Kontrol" olarak isimlendirildi. Protein konsantrasyonundan emin olunması için tekrar Bradford yöntemi ile konsantrasyonları ölçüldü. Daha sonra küçük porsiyonlar halinde mikrosantrifüj tüplerine bölünen örnekler sıvı azotta hızlı dondurulduktan sonra -80°C'deki dondurucuda muhafaza edildi.

### 3.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi

İki boyutlu jel elektroforezi (2DE) ve MS/MS deneyleri öncesi, kullanılacak protein özütlerinin genel profilini ve örnek kalitesini görmek için proteinlerin moleküler büyüklüklerine göre ayırımını sağlayan Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı. %12'lik SDS-PAGE jelinin hazırlanması ve örneklerin jelde yürütülerek boyanması için aşağıda yer alan protokoller takip edildi.

#### ***SDS-PAGE jelinin hazırlanması:***

Jel için kullanılacak camlar %70'lik etanol ve saf su ile temizlenerek kurutuldu. Tablo 3.5'e göre hazırlanan ayırıcı jel solüsyonu pipet yardımı ile cam tabakalar arasına üst kısımda 2 cm kadar boşluk kalacak şekilde döküldü. Hemen akabinde, jelin üst kısmının düzgün bir şekilde polimerleşmesi için izopropanol döküldü ve oda ısısında polimerleşmesi için bekletildi. Ayırıcı jel solüsyonu polimerleştikten sonra izopropanol uzaklaştırıldı. Boş kalan kısma Tablo 3.5'e göre hazırlanan istifleme jeli döküldü ve kuyucukların oluşumu için tarak yerleştirildikten sonra polimerleşmesi için bekletildi.

**Tablo 3.5.** SDS-PAGE jel solüsyonu içerikleri

<b>%12'lik Ayrıcı Jel Solüsyonu</b>	
<b>Distile H<sub>2</sub>O</b>	3,3 ml
<b>1,5 M Tris-HCl, pH 8.8</b>	2,5 ml
<b>%30 Akrilamit-Bis Akrilamit</b>	4 ml
<b>%10 SDS</b>	100 µl
<b>%10 APS</b>	100 µl
<b>TEMED</b>	5 µl
<b>% 4'lük İstifleme Jeli Solüsyonu</b>	
<b>Distile H<sub>2</sub>O</b>	3,0 ml
<b>0,5 M Tris-HCl, pH 6.8</b>	1,25 ml
<b>%30 Akrilamit-BisAkrilamit</b>	670 µl
<b>%10 SDS</b>	50 µl
<b>%10 APS</b>	50 µl
<b>TEMED</b>	5 µl

#### ***Örneklerin Jelde Yürütülmesi ve Jelin boyanması***

Bu aşamada kullanılan solüsyonların içerikleri Tablo 3.6'da verilmiştir.

Jellerin döküldüğü camlar elektroforez tankı içerisine yerleştirildi. Örnekler jelle yüklenmek üzere hazırlandı. Bunun için, her bir örnek 20 µg olacak şekilde alınarak 6x protein yükleme tamponu ve distile su ile karıştırıldı. 95°C'de 5 dakika kadar kaynatılarak denatüre edildi. İlk olarak renksiz marker protein (Thermo Scientific, ABD) ve ardından denatüre edilen örnekler kuyucuklara yüklendi. Elektroforez tankına 1x SDS-PAGE jel yürütme tamponu doldurulduktan sonra sistem çalıştırıldı ve örnekler 180 Voltta yaklaşık 60 dakika boyunca yürütüldü. Süre sonunda, jeller cam tabakalar arasından dikkatle çıkarılarak üst kısımdaki istifleme jeli kısmı kesilerek uzaklaştırıldı. Yürütülen proteinlerin boyama öncesi jelle düzgünce sabitlenmesi için jeller fiksasyon solüsyonu içerisine konuldu ve gece boyu çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Ertesi gün, fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılarak jeller distile su ile yıkandı. Ardından, Coomassie Parlak Mavisi boya solüsyonu içerisine konularak yine gece boyu çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Jeller boyandıktan sonra distile su ile yıkanarak fazla boyadan arındırıldı. Son olarak, VersaDoc 4000 MP (Bio-Rad, ABD) görüntüleme cihazı kullanılarak jellerin görüntüleri alındı.



**Tablo 3.6.** Örneklerin jelde yürütülmesi ve jelin boyanması sırasında kullanılan solüsyon içerikleri

Solüsyon	İçerik
<b>6x Protein Yükleme Tamponu</b>	0,5 M Tris-HCl, %10 SDS, Gliserol, $\beta$ -merkaptoetanol, bromofenol mavisi
<b>Jel Yürütme Tamponu</b>	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glisin, % 0,1 SDS
<b>Fiksasyon Solüsyonu</b>	%40 metanol, % 10 asetik asit, %50 ultra saf su
<b>Coomassie Parlak Mavisi</b>	757 mM amonyum sülfat, 1.45 mM Coomassie parlak mavisi, % 20 metanol, % 10 fosforik asit

### 3.11. House Keeping Protein Kullanılarak Proteinlerin Normalizasyonu

İki boyutlu jel elektroforezi ve MS/MS deneylerine geçilmeden önce, protein örneklerinin eşit olarak kullanıldığından emin olunması için Western Blotlama (WB) yöntemi ile bir house keeping protein,  $\beta$ -aktin, kullanılarak örneklerin normalizasyonu yapıldı. Bunun için, “SDS-PAGE jel elektroforezi” kısmında anlatıldığı şekilde jel hazırlandı ve denatüre edilen 20  $\mu$ g protein örnekleri jelde yürütüldü. Bu sefer, renksiz marker protein yerine renkli (önceden boyanmış) marker kullanıldı (Thermo Scientific, ABD). Deneyler sırasında kullanılan solüsyonların içerikleri Tablo 3.7’de gösterilmiştir. Jelde yürütülen proteinler aşağıdaki aşamalar takip edilerek membrana transfer edildi:

- Proteinler, Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, ABD) yarı-kuru transfer sistemi kullanılarak membrana transfer edildi. Bunun için, filtre kâğıtları ve nitroselüloz membran transfer tamponu ile ıslatıldı.
- Transfer kaseti içerisinde sırası ile filtre kâğıdı, membran, jel ve filtre kâğıdı konularak hazırlanan sandviç üzerinden rulo ile geçilerek hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.
- Transfer kaseti cihaza yerleştirilerek 25 voltta 30 dakika süre ile transfer gerçekleştirildi. Transfer süresi sonunda, membrana transfer edilen proteinler Ponceau S boyası ile boyanarak kontrol edildi.

Proteinler membrana transfer edildikten sonra blotlama ve görüntüleme için aşağıdaki basamaklar takip edildi:

- Distile su ile Ponceau S boyası uzaklaştırıldıktan sonra membran, bloklama için hazırlanan %5’lik yağsız süttozu içeren TBST tamponu içerisine konuldu ve oda ısısında bir saat süresince çalkalamaya bırakıldı.

- Bloklama süresi sonunda membran 3 kez 10'ar dakika süreyle TBST tamponu ile yıkandı. Yıkamalar bittikten sonra membran, TBST ile 1:1000 oranında seyreltilerek hazırlanan birincil antikor anti- $\beta$ -aktin ile oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edildi.
- Membran, 3 kez 10'ar dakika süreyle TBST tamponu ile yıkandıktan sonra, 1:10000 oranında hazırlanmış, horseradish peroksidaz (HRP) bağlı ikincil antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Membran 3 kez aynı şekilde yıkandıktan sonra görüntüleme aşamasına geçildi.
- HRP enziminin ışımaya yapması için Clarity western ECL (Bio-Rad, ABD) kiti kullanıldı. ECL solüsyonu içinde bulunan Lumigen PS-3 substratının katalizlenmesi sonucu açığa çıkan luminol ışımaya yaparak X-ray filmi yakmakta ve bu sayede görüntü alımı gerçekleşmektedir.

Görüntü sonrası elde edilen  $\beta$ -aktin bantları, Image-J programı kullanılarak (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) yoğunluklarının hesaplanması için analiz edildi. 2DE deneylerinde kullanılacak olan protein örneklerinin konsantrasyonları, bu şekilde, bant yoğunluk oranlarına göre tekrar hesaplandı.

**Tablo 3.7.** Western blotlamada kullanılan solüsyonların içerikleri

Solüsyon	İçerik
<b>Transfer Tamponu</b>	25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 1,3 mM SDS, %20 metanol
<b>Ponceau S boyası</b>	1,5 mM Ponceau S, 0.5 mL Acetic acid
<b>TBS Çözeltisi (10X)</b>	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6,
<b>TBST tamponu</b>	1X TBS Çözeltisi, % 0.1 Tween 20

### 3.12. İki Boyutlu Jel Elektroforezi (2DE)

İki boyutta ayırım için proteinler öncelikle birinci boyutta izoelektrik noktalarına göre ayrıldılar. Sonrasında, SDS-PAGE yapılarak proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ikinci boyutta ayırımı sağlandı.

### 3.12.1. İzoelektrik Fokuslama ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi

1500 µg protein örnekleri, her bir örnekten 3 adet olacak şekilde, 2DE örnek tamponu, %1 Tribütilfosfin (TBP) ve %1 Amfolit ile son hacim 280 µl olacak şekilde karıştırıldı. Hazırlanan örnekler, 17 cm, non-linear, pH 3-10 IPG striplerine (BioRad, ABD) yüklenerek gece boyu 20°C’de pasif rehidrasyona bırakıldı. Buharlaştırma ve üre kristalleşmesini engellemek için striplerin üzeri 1 ml kadar mineral yağı ile kapatıldı. Rehidrasyon sonunda, proteinlerin ilk boyutta ayrımı, Protean izoelektrik fokuslama (IEF) cihazı (Bio-Rad, ABD) ile izoelektrik noktalarına göre ayrılmasıyla sağlandı. Fokuslama, 20°C’de adım adım akımı yükselen üç aşamalı bir program ile gerçekleştirildi. Buna göre, stripler önce 250V’de 20 dakika hızlı rampada, 4000V’de 2 saat yavaş rampada, son olarak 40000V/saate ulaşana kadar 4000V hızlı rampada izoelektrik noktalarına göre odaklandılar.

Fokuslama bittikten sonra stipler, sırasıyla, dengeleme tamponu I ve II’ de (Tablo 3.8.) 30’ar dakika çalkalayıcıda yıkandılar. Proteinlerin ikinci boyutta ayrımı, striplerin %12’lik SDS-PAGE jellerine yerleştirilerek Protean Plus Dodeca Cell jel yürütme sisteminde (Bio-Rad, ABD) moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasıyla gerçekleştirildi. Sonrasında jeller fiksasyon solüsyona alınarak gece boyu çalkalayıcıda bırakıldı. Fiksasyonun ardından jeller Coomassie Parlak Mavisi boya solüsyonu ile gece boyu çalkalayıcıda boyanmaya bırakıldı. Distile su ile yıkanarak fazla boyadan arındırıldı ve görüntü analizi için hazır hale getirildi.

**Tablo 3.8.** Dengeleme tamponu içerikleri

Solüsyon	İçerik
<b>Dengeleme tamponu I</b>	6M üre, 0.375M tris-HCl pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) DTT
<b>Dengeleme tamponu II</b>	6M üre, 0.375M tris-HCl pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2.5% (w/v) iodoasetamid

### 3.12.2. 2DE Görüntü Analizi

Jellerin görüntüleri VersaDoc MP4000 sistemi (BioRad, ABD) kullanılarak QuantityOne programı (Versiyon 4.6.7, Bio-Rad, USA) ile alındı. Protein spotlarının analizi PDQuest Advance programı (BioRad, ABD) kullanılarak yapıldı. Bunun için, tüm jellerden analiz edilecek bölgeler standardize edilerek eşleştirildi. Kontrol grubu ile ilaç verilen grup arasında farklı ekspresyon seviyesine sahip olan spotlar tespit edildi. İstatiksel olarak önemli

olan spotlar Student's t-test ile değerlendirildi ( $P < 0.05$  için). Ekspresyon seviyesinde 2 kattan fazla değişiklik gösteren spotlar kütle spektrometresi ile tanımlanmak üzere seçildi. Seçilen spotlar EX-Quest Spot-cutter robotu (BioRad, ABD) kullanılarak jelden kesildi ve MALDI-TOF/TOF ile tanımlanmak üzere 96 kuyucuklu plakalara alındı.

### 3.13. Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS) Analizleri

m6A seviye değişikliğine neden olan MA uygulamasının DMS114 hücre proteomunda meydana getirdiği değişiklikler, proteomik çalışmalarda sıklıkla kullanılan iki kütle spektrometresi yöntemi, LC-MS-MS ve MALDI-TOF/TOF ile analiz edilmiştir. Elde edilen veriler biyoinformatik yöntemlerden faydalanılarak değerlendirilmiştir.

#### 3.13.1. MALDI-TOF/TOF Analizi

##### *Jel içi Kesim*

EX-Quest Spot-cutter robotu ile üç ayrı jelden kesilen protein spotları mikrosantrifüj tüpleri içerisinde birleştirildi. Ticari kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak jel içi triptik kesim üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Kısaca, aşağıdaki basamaklar takip edildi:

- Protein spotları, %40 asetonitril ve 50 mM amonyum bikarbonattan oluşan solüsyon ile boyadan arındırıldıktan sonra, 50 mM TCEP solüsyonu ile 10 dakika boyunca 60°C'de indirgendi.
- 10 mM iyodoasetamid (IAA) solüsyonu ile karanlıkta bir saat süre boyunca alkilendikten sonra yaklaşık 10 dakika yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Spotlar %100 asetonitril ile dehidre edildi. Sonrasında, 10 ng modifiye edilmiş aktif tripsin eklenerek, triptik kesim için, gece boyu 37°C'de bırakılarak inkübe edildi.
- Proteinlerin triptik kesim işlemi bittikten sonra peptitleri içeren üst sıvı, SpeedVac (Eppendorf, ABD) ile buharlaştırılarak peptitler konsantre edildi.
- Kesilen peptitler %0,1 trifluoroasetik asit (TFA) içerisinde çözüldükten sonra C18 ZipTip pipet uçları (Millipore, Burlington, MA, ABD) kullanılarak tuzlarından uzaklaştırıldı ve konsantre edildi.
- C18 ZipTip pipet uçları kullanılmadan önce 50% asetonitril ile dengelendi ve TFA ile yıkandı.
- Konsantre peptitler matris solüsyonu ile kolondan ayrılarak çelik MALDI-TOF/TOF örnek plakası üzerine konuldu.

- *Matris solüsyonu:* %50 asetonitril, %0,1 trifloroasetik asit içinde hazırlanmış 10 mg/ml  $\alpha$ -siyano-4-hidroksisinnamik asit

MALDI-TOF/TOF ile proteinlerin tanımlanması

MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight) peptitlerin sekanslaması için kullanılan kütle spektrometresidir. Bu sistemde, peptitler lazer ışığı ile iyonize edildikten sonra vakumlu bir tüp içerisinde ayrıştırılarak kütle/yük oranlarına ve peptitlerin aminoasit dizilimlerine göre proteinlerin tanımlanması sağlanır. C18 ZipTip pipet uçları ile tuzlarından arındırılıp konsantre edilerek MALDI plakasına konulan peptitler ABSCIEX MALDI-TOF/TOF 5800 cihazı (Şekil 3.6) ile Peptit-kütle parmak izleri (PMF) toplanarak tanımlandı. Bunun için;

- 400 ile 2000 Da kütle aralığında olan TOF spektrumları pozitif iyon reflektör modunda kaydedildi.
- Her örnek için, TOF spektrumundaki en güçlü piklerden on tanesi MS/MS analizleri için seçildi. Spektrumlar, tripsin iyon piklerinin iç standart olarak alınması ile kalibre edildi.
- Toplanan tüm PMF'ler, ProteinPilot yazılımı (4.0.8085 revizyonu 148085, AB Sciex, Framingham, ABD) kullanılarak MASCOT veritabanında (Matrix Science, Boston, MA, ABD) analiz edildi.



Şekil 3.6. ABSCIEX MALDI-TOF/TOF 5800 cihazı

### 3.13.2. nLC-MS/MS Analizi

Proteinlerin nLC-MS/MS ile analizine başlamadan önce örnekler, triklorasetik asit (TCA)/Sodyum deoksikolat (DOC)/Aseton ile protein çöktürme prosedürü takip edilerek tuz, lipid ya da deterjan gibi unsurların olabildiğince uzaklaştırılması için temizlendi. Bu

aşamayı takiben, örnekler solüsyon-içi triptik kesim ile peptitlere ayrılarak nLC-MS/MS cihazında analiz edilmek üzere hazırlandı.

#### ***Protein özütlerinin çöktürülerek temizlenmesi***

Protein örneklerinin çöktürülmesi protokolünde birinci çöktürme ajanı olarak DOC, ikinci çöktürme ajanı olarak TCA, yıkama solüsyonu olarak da aseton kullanılmıştır. Buna göre aşağıdaki basamaklar takip edildi:

- Steril mikrosantrifüj tüplerine 400 µg protein örnekleri konarak hacimce 1:1 oranında %0.2'lik DOC eklendi. Yavaşça alt-üst edilen tüpler 15 dakika buz üzerinde bekletildi.
- Hacimce 1:1 oranında %72'lik TCA ilave edildikten sonra yavaşça alt-üst edilen tüpler 20 dakika kadar buz üzerinde bekletildi.
- 4°C ve 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve pellet üzerine soğuk aseton eklendi. Tüpler vortekslenerek pelletlerin çözülmesi sağlandı ve sonrasında gece boyu -20°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Tekrar vortekslenen tüpler 4°C ve 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra pelletler 10 dakika kadar oda ısısında kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan pelletler 50 mM amonyum bikarbonat ile çözüldükten sonra Qubit 4 Florometre cihazı (Thermo Scientific, ABD) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda protein konsantrasyonları ölçüldü.

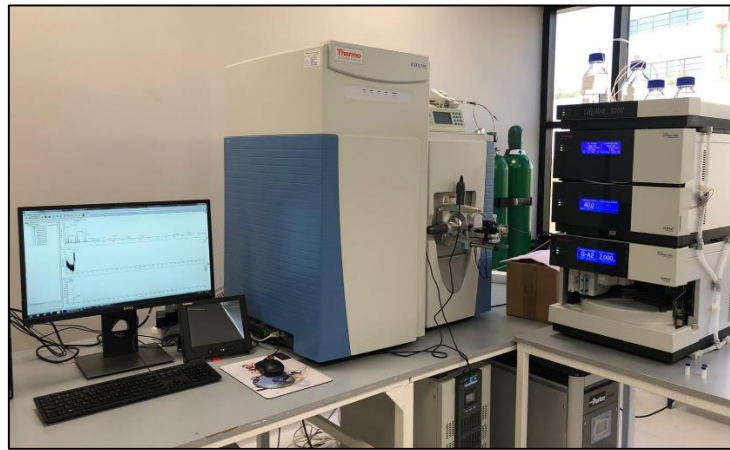
#### ***Solüsyon-İçi Triptik Kesim***

Çöktürülerek temizlenen protein örnekleri, nLC-MS/MS ile analiz edilebilmeleri için, solüsyon-içi triptik kesime (Thermo Fisher Scientific, ABD) tabi tutuldu. Proteinler, üretici firmanın önerdiği şekilde triptik kesim ile peptitlerine parçalandı. Kısaca, aşağıdaki basamaklar takip edildi:

- 10 µg protein örneği, 100 mM DTT ve ultra saf su ile 27 µl'ye tamamlanarak 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. Ardından, son konsantrasyon 10mM olacak şekilde alkilasyon ajanı olarak IAA eklendi ve 20 dakika karanlıkta ve oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Alkilasyon aşamasından sonra enzimatik parçalamaya geçildi. Bunun için örneklerin üzerine 100ng/µl tripsin eklendi ve 30°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- Enzimatik parçalamadan sonra vortekslenen örnekler SpeedVac (Eppendorf, ABD) ile buharlaştırılarak peptitler konsantre edildi.
- Peptitler, nLC-MS/MS analizi yapılmak üzere %0,1 formik asit içerisinde çözüldü.

### ***nLC-MS/MS ile Proteinlerin Tanımlanması***

nLC-MS/MS cihazı (Şekil 3.7) ile analize başlamadan önce sistem standart bir calibrant kullanılarak (LTQ Velos ESI Pozitif İyon Kalibrasyon Çözeltisi, Pierce, ABD) kalibre edildi. Solüsyon içi triptik kesim yöntemiyle elde edilen peptitler Dionex Ultimate 3000 RSLC nanosistem kullanılarak analiz edildi. Q-exactive kütle spektrometresi (Thermo Scientific, ABD) ile birlikte çalışan ve Ultimate 3000 Series TCC-3000RS (Thermo Scientific, ABD) kolon kompartmanları ile donatılmış sistem, Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) ile kontrol edilmektedir. Örnekler, %0,05 TFA ve %2 asetonitril içeren solüsyon ile yakalama kolonundan geçirilerek tuzlarından uzaklaştırıldı ve konsantre edildi. %0,1'lik formik asit içeren mobil faz A ve %0,1'lik TFA içeren mobil faz B kullanılarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile peptitlerin ayrımı sağlandı. Peptitler daha sonra uygun gradient şartları ile Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonuna (75µm x 15cm x 2µm, 100 Å çap, Thermo Scientific, ABD) aktarıldı. Ayrıştırılan peptitler Q-exactive kütle spektrometresine gönderildi. Peptitlerin pozitif yük okuma modunda iyonizasyonu için Nanospray Flex™ (Thermo Scientific, ABD) iyon kaynağı kullanıldı. Parametreler; sprey voltajı 2.3 kV, maksimum enjeksiyon süresi 60 ms, kapiler sıcaklık 320°C, rezolüsyon 70.000 ve tarama aralığı 400-2000 m/z olacak şekilde ayarlanarak MS spektrumları alındı. MS/MS analizleri, spektrumlardaki en yüksek skorlu on iyon seçilerek gerçekleştirildi.



**Şekil 3.7.** nLC-MS/MS sistemi

### **3.14. Western Blotlama Yöntemi ile MS/MS Verilerinin Doğrulanması**

MS/MS deneyleri sonucunda elde edilen verilerin doğruluğunun gösterilmesi için verilerde tanımlanmış olan proteinlerden bazıları seçilerek WB yöntemiyle, deney grupları

arasındaki protein miktarları karşılaştırılırdı. Bunun için, “House-Keeping protein kullanılarak proteinlerin normalizasyonu” kısmında anlatılan WB protokolü takip edildi. Analiz edilen proteinin büyüklüğüne göre, aşağıdaki tablo göz önünde bulundurularak farklı yüzdelerde SDS-PAGE jelleri kullanıldı.

**Tablo 3.9.** Görüntülenmek istenen proteinin büyüklüğüne göre kullanılan jel yüzdeleri

Protein büyüklüğü	Akrilamit Jel Yüzdesi
4–40 kDa	20%
12–45 kDa	15%
10–70 kDa	12.5%
15–100 kDa	10%
25–200 kDa	8%

MALDI-TOF/TOF verilerinin doğrulaması için anti-IDH2, nLC-MS/MS verilerinin doğrulaması için anti-GAPDH antikorları kullanıldı. Ayrıca, elde edilen verilerle yapılan biyoinformatik analiz sonuçlarını desteklemek için Total OKSFOZ İnsan WB Antikor Kokteyli ile WB yapıldı. House keeping protein olarak  $\beta$ -aktin kullanıldı. Kullanılan antikorlar, katalog numaraları ve dilüsyon oranları ile Tablo 3.10’da verilmiştir.

**Tablo 3.10.** Western Blotlama deneylerinde kullanılan antikorlar

Antikor	Dilüsyon Oranı	Marka ve Katalog Numarası
IDH2	1:500	Abcam, ab55271
GAPDH	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, sc-365062
OKSFOZ, kokteyl antikor	1:500	Abcam, ab110411
$\beta$ -aktin	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, sc-69879
Sekonder antikor: Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate	1:10000	Bio-Rad, 170-5047

### 3.15. MS/MS Verilerinin Biyoinformatik Analizi

#### 3.15.1. MALDI-TOF/TOF veri analizi

MALDI-TOF/TOF analizi sonucu elde edilen veriler ProteinPilot yazılımı (4.0.8085 revizyonu 148085, AB Sciex, Framingham, ABD) kullanılarak MASCOT veritabanında



(Matrix Science, Boston, MA, ABD) analiz edildi. Analizde sadece  $p < 0.05$  olarak tanımlanan değerler kabul edildi. Regülasyon oranları ikiden büyük olan proteinler için UniProt erişim numaraları kullanılarak STRING (<https://string-db.org>) analizi yapıldı. “Çoklu protein” analiz seçeneği tercih edildi ve organizma “Homo sapiens” olarak seçildi. Analiz parametreleri; orta düzeyde güven etkileşimi (interaction score of medium confidence) seçilerek, 1. ve 2. kabuklar için seçilen maksimum etkileşim sayısı 5’ten fazla olmayacak şekilde belirlendi. “Hatalı keşif oranı” (False Discovery Rates, FDR) 10-4’ten küçük olan veriler dikkate alındı. Regülasyon oranları değişen proteinlerin PANTHER analizi (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, <http://PANTHERdb.org/>) UniProt erişim numaraları kullanılarak gerçekleştirildi. Organizma Homo sapiens olarak belirlendi ve fonksiyonel sınıflandırmalar bar grafikleri şeklinde oluşturuldu. Ontoloji olarak; moleküler işlev, biyolojik süreç, hücresel işlev, hücresel bileşen, protein sınıfı ve hücresel yolak seçildi. Ontolojilerin her biri için, seçilen proteinler listelenerek ve verilen özellikleri UniProt numaralarıyla kontrol edilerek manuel bir analiz gerçekleştirildi.

### **3.15.2. nLC-MS/MS veri analizi**

MS/MS analizleri, spektrumlardaki en yüksek skorlu on iyon seçilerek gerçekleştirildi. Proteinlerin tanımlanması için veriler, Proteom Discoverer 2.2 (Thermo Scientific, ABD) yazılımı ile analiz edildi. Peptit kütle toleransı 10 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit olacak şekilde seçilen parametrelerle proteinler tanımlandıktan sonra, “MALDI-TOF/TOF Veri Analizi” kısmında anlatıldığı şekilde STRING ve PANTHER analizleri yapıldı

### **3.16. *in vitro* Test Verilerinin Biyoistatistiksel Analizi**

TMT, Annexin V, hücre döngüsü ve invazyon testleri ile m6A kantifikasyonu verilerinin biyoistatistiksel analizi GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, ABD) programı kullanılarak, tüm deneyler üç kez analiz edilecek şekilde yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar, örnek dağılımı göz önünde bulundurularak, student-t test, one-way analysis of variance (ANOVA) ya da two-way ANOVA kullanılarak analiz edildi. MA ve TPT’nin kombinasyon indexleri (CI) CompuSyn yazılımı (ComboSyn Inc, Paramus, ABD) kullanılarak belirlendi.

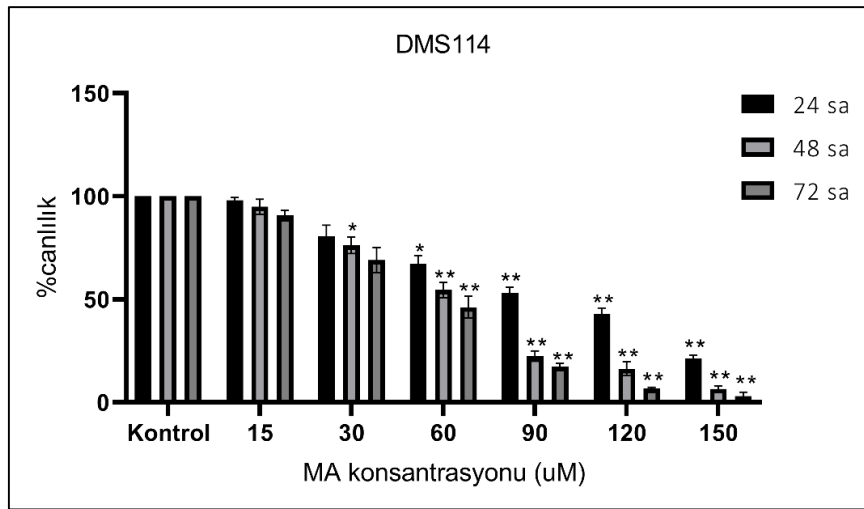
## 4. BULGULAR

### 4.1. MA ve TPT'nin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

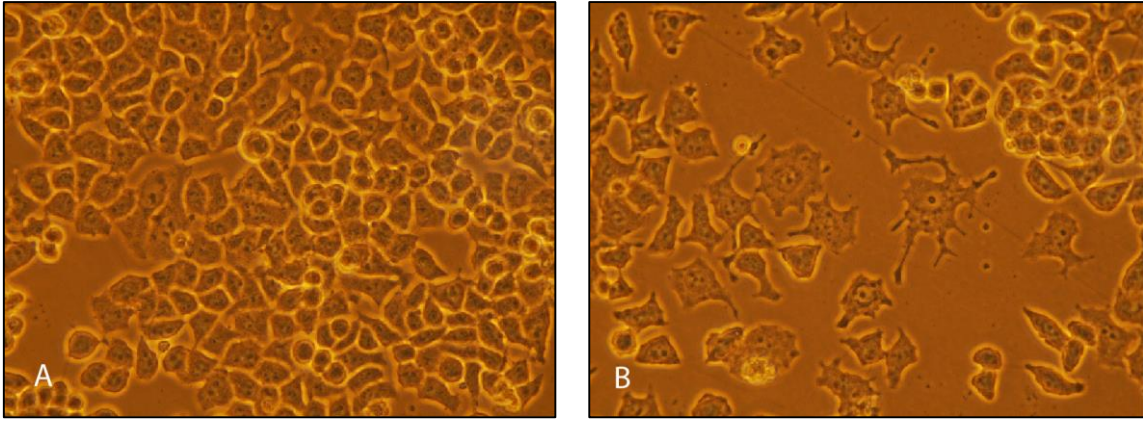
Çalışmalarda kullanılan iki ayrı ilaç MA ve TPT'nin önce kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri TMT ile belirlendi. Belirlenen konsantrasyonlar daha sonra sağlıklı akciğer hücre hattı olan MRC5 hücrelerine uygulanarak ilaçların sağlıklı hücrelerdeki toksik etkisi incelendi.

#### 4.1.1. MA'nın DMS114 ve MRC5 Hücrelerine Sitotoksik Etkisi

MA'nın DMS 114 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi için 15-30-60-90-120 ve 150 µM MA 24,48 ve 72 saat süreyle hücrelere uygulandı. İnkübasyon süreleri sonunda hücre canlılıkları TMT ile analiz edildiğinde MA'nın konsantrasyona ve zamana bağlı olarak DMS114 hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı görüldü. 24 saat sonunda, 90 µM ve üzeri konsantrasyonlar canlılığı istatistiksel olarak önemli ölçüde azaltmıştır ( $P<0,01$ ). 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise 60 µM ve üzeri konsantrasyonlar canlılığı istatistiksel olarak önemli ölçüde azaltmıştır ( $P<0,01$ ). 24 saatte 90 µM MA uygulamasında hücre canlılığı ortalama %53,4'e düşmüşken, 48 saatte 60 µM ilaç uygulamasında canlılık ortalama %54,9'a düşmüştür (Şekil 4.1). TMT analizlerinin yanı sıra, MA'nın DMS114 hücre canlılığına etkisi mikroskopik olarak da incelenmiş ve hücre canlılığının kontrol grubuna göre azaldığı görüntülenmiştir (Şekil 4.2).

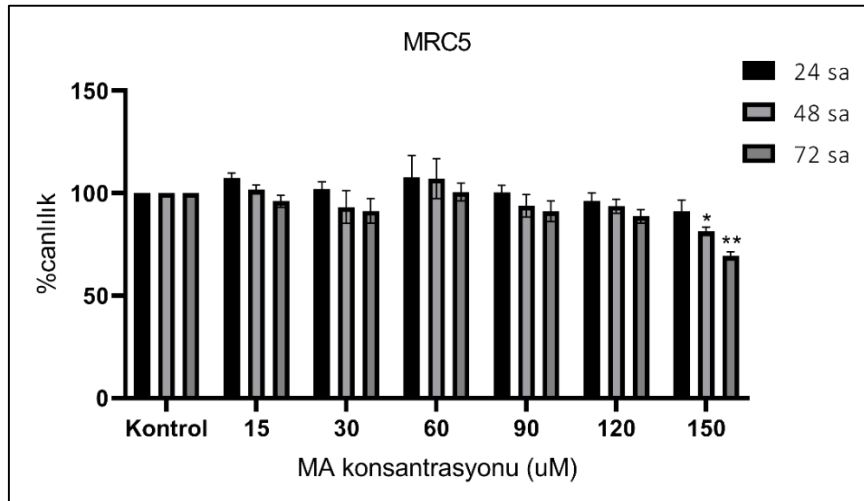


Şekil 4.1. MA'nın DMS114 hücre canlılığı üzerine etkisi. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )



**Şekil 4.2.** 24 saat MA uygulanan DMS114 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü A) Kontrol, B) 90 µM MA (40X objektif)

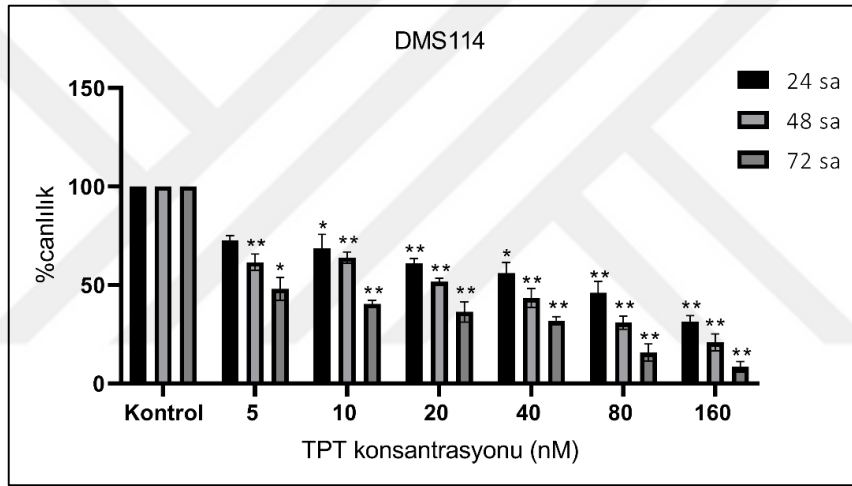
MA'nın kanser hücre canlılığına etkisi belirlendikten sonra aynı konsantrasyonların sağlıklı hücreler üzerine etkisi araştırıldı. MRC5 hücreleri ile yapılan TMT analizi sonucunda 150 µM hariç tüm diğer MA konsantrasyonlarında hücre canlılığının %90'ın üzerinde olduğu ve istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.3). Sadece, 48 ve 72 saat 150 µM MA uygulanan hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $P < 0,01$ ). Elde edilen bu veriler, MA'nın sağlıklı hücrelere toksik etki göstermeden kanser hücrelerinin canlılığında önemli bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.3.** MA'nın MRC5 hücre canlılığı üzerine etkisi. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

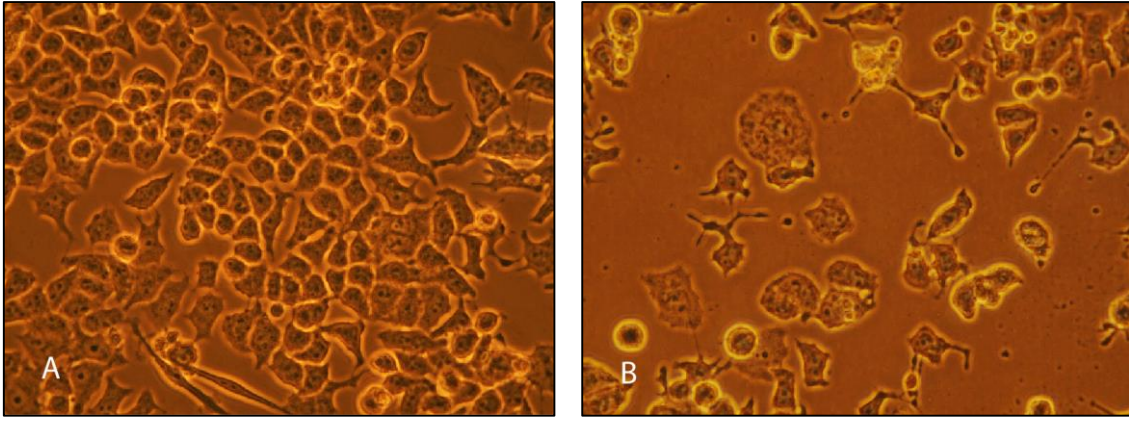
### ***TPT'nin DMS114 ve MRC5 hücrelerine sitotoksik etkisi***

TPT'nin DMS 114 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi için 5, 10, 20, 40, 80, 160 nM TPT 24,48 ve 72 saat süreyle hücrelere uygulandı. İnkübasyon süreleri sonunda hücre canlılıkları TMT ile analiz edildiğinde TPT'nin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak DMS114 hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlendi. 24 saat inkübasyon süresi sonunda 10 nM ve üzeri, 48 ve 72 saat sonunda ise 5 nM ve üzeri konsantrasyonların hücre canlılığını istatistiksel olarak önemli ölçüde azalttığı görüldü ( $P<0,05$  ve  $P<0,01$ ). 24 saatte 40 nM TPT uygulamasında hücre canlılığı ortalama %57,1'e düşmüşken, 48 saatte 20 nM ilaç uygulamasında canlılık ortalama %51,3'e düşmüştür (Şekil 4.4). 72 saat ilaç uygulanan hücre gruplarında ise canlılığının tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak önemli derecede ( $P<0,01$ ) azaldığı ve %50'nin altında olduğu görüldü.



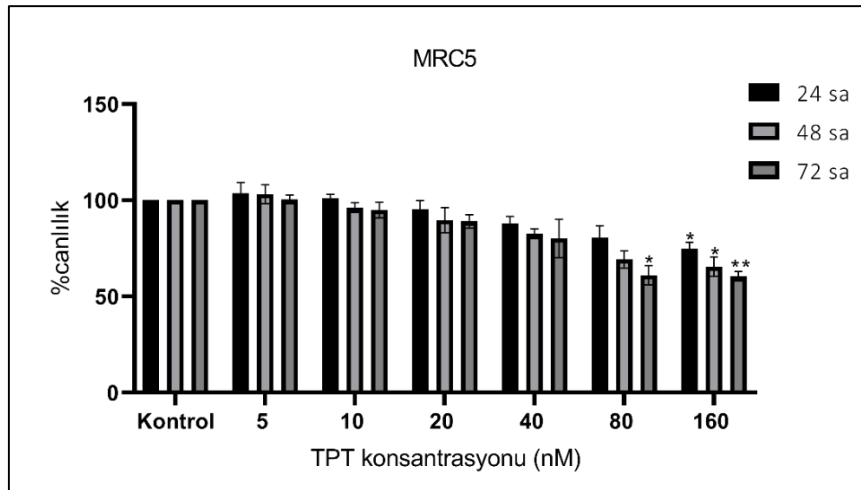
**Şekil 4.4.** TPT'nin DMS114 hücre canlılığı üzerine etkisi (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

Hücre canlılıklarının TMT ile anazinin yanı sıra ilacın DMS114 hücre canlılığına etkisi mikroskopik olarak da incelenmiş ve hücre canlılığının kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı görüntülenmiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** 48 saat TPT uygulanan DMS114 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü A) Kontrol, B) 10 nM TPT (40X objektif)

TPT konsantrasyonlarının DMS114 hücrelerine sitotoksik etkisi belirlendikten sonra aynı ilaç konsantrasyonları sağlıklı akciğer MRC5 hücrelerine uygulandı ve bu hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin bulunup bulunmadığı araştırıldı. TMT analizi sonucunda, TPT'nin kanser hücrelerine toksik olan konsantrasyonlarında, 80 ve 160  $\mu$ M hariç, MRC5 hücre canlılığının %80'in üzerinde olduğu ve istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlendi. Ayrıca, kombinasyon çalışmalarında kullanılması kararlaştırılan 5,10 ve 20 nM TPT'nin MRC5 hücrelerindeki canlılıklarının %90'ın üzerinde olduğu görüldü (Şekil 4.6). 80 nM ilaç uygulaması hücre canlılığında sadece 72 saatte anlamlı bir azalmaya neden olurken ( $P < 0,05$ ), 160 nM ilaç uygulaması tüm saatlerde istatistiksel olarak önemli derecede azalmaya neden olmuştur ( $P < 0,05$  ve  $P < 0,01$ ).



**Şekil 4.6.** TPT'nin MRC5 hücre canlılığı üzerine etkisi (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

## 4.2. MA ve TPT Kombinasyon Uygulamasının Sitotoksik Etkisi

MA ve TPT'nin kombinasyon çalışmalarında kullanılacak konsantrasyonları, ilaçların tek olarak uygulandığı TMT ile canlılık analizleri sonucu elde edilen verilere göre belirlendi. Buna göre, 24 ve 48 saat inkübasyon süresi ile, MA'nın 30 ve 60 uM, TPT'nin ise 5, 10 ve 20 nM konsantrasyonlarından oluşan kombinasyonların DMS114 hücrelerine etkisi önce TMT ile araştırıldı. Kullanılan ilaçların belirtilen saat ve konsantrasyondaki DMS114 hücre canlılık oranları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Aynı kombinasyonlar MRC5 hücrelerine de uygulanarak sağlıklı hücrelere herhangi bir toksik etki olup olmadığı gözlemlendi. Daha sonra elde edilen verilere göre, Compusyn yazılımı (ComboSyn Inc, Paramus, ABD) kullanılarak kombinasyon indeksleri (CI) ve doz azaltma indeksleri (DRI) belirlendi.

**Tablo 4.1.** Tek başına uygulanan TPT ve MA konsantrasyonlarının DMS114 hücre canlılığına etkisi

Süre (saat)	Canlılık (%)				
	TPT (nM)			MA (uM)	
	5	10	20	30	60
24	72,5 ± 2,7	68,6 ± 7,1	61,2 ± 2,2	80,5 ± 5,4	67,2 ± 4,0
48	61,6 ± 4,1	63,9 ± 2,9	51,6 ± 1,8	76,2 ± 4,0	54,6 ± 3,7

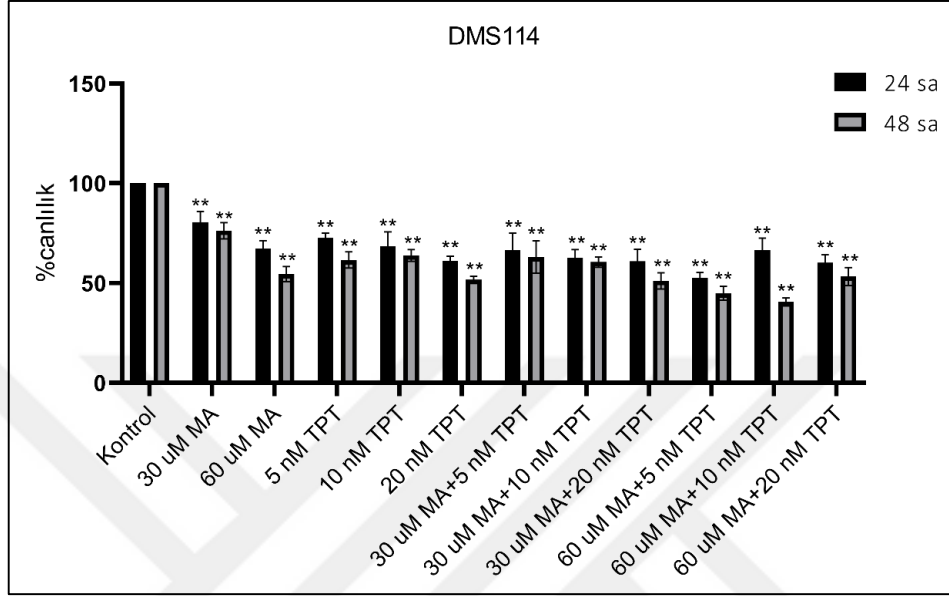
### 4.2.1. Kombinasyonların Hücre Canlılığına Etkisinin İncelenmesi

Belirlenen MA ve TPT konsantrasyonları DMS114 hücrelerine aşağıda belirtildiği şekilde kombine edilerek 24 ve 48 saat süreyle uygulandı:

- 30 µM MA + 5 nM TPT
- 30 µM MA + 10 nM TPT
- 30 µM MA + 20 nM TPT
- 60 µM MA + 5 nM TPT
- 60 µM MA + 10 nM TPT
- 60 µM MA + 20 nM TPT

İnkübasyon süresinin bitiminde hücre canlılıkları TMT ile analiz edildi (Şekil 4.7). Buna göre, tüm saat ve konsantrasyonlarda ilaç kombinasyonlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi ( $P<0,01$ ). Hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü grupların 48 saat süreyle 60 µM MA + 5 nM TPT ve 60 µM MA + 10 nM TPT uygulanan hücreler olduğu görüldü. Belirtilen gruplardaki hücrelerin

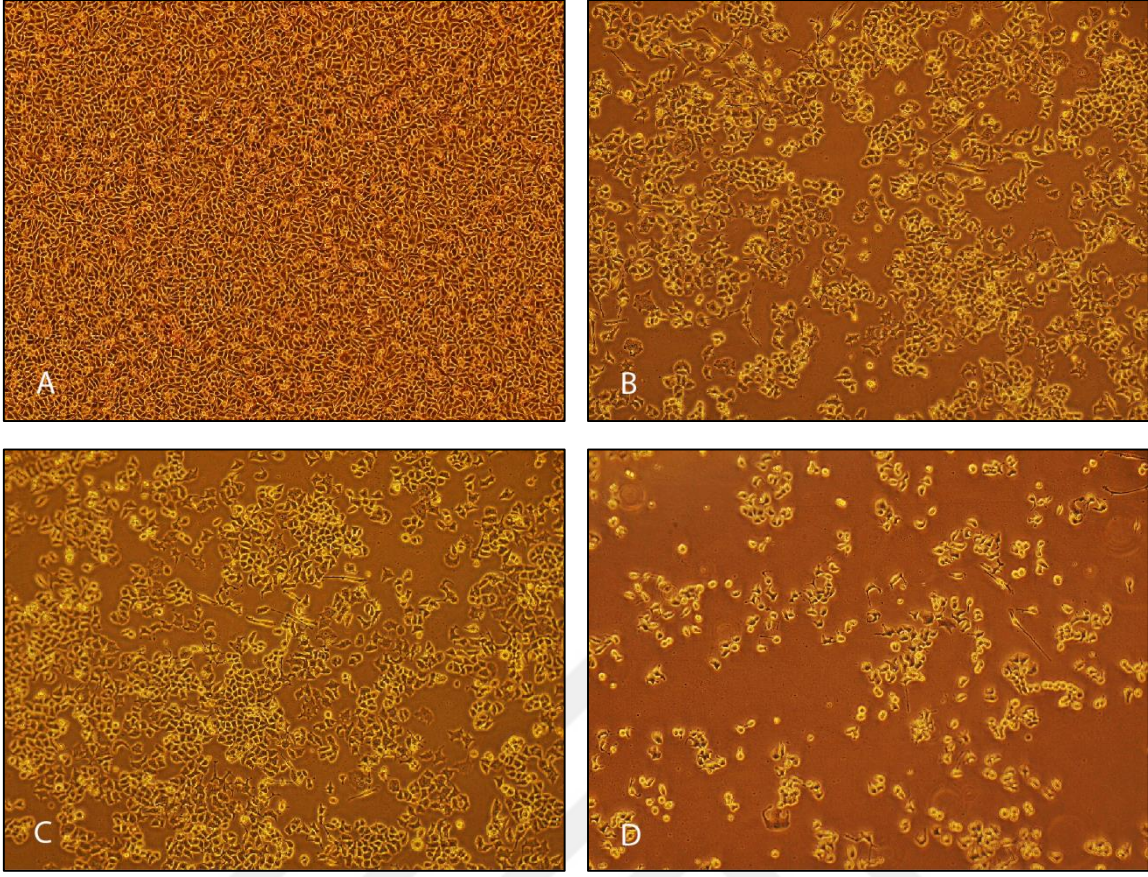
canlılıkları, sırasıyla,  $44,9 \pm 4,2$  ve  $40,5 \pm 2,8$  olarak belirlendi. Ayrıca, kombinasyon uygulamasında  $60 \mu\text{M}$  MA kullanılmasının,  $30 \mu\text{M}$  MA kullanılmasına kıyasla, özellikle 48 saatlik uygulamada ( $60 \mu\text{M}$  MA +  $5 \text{ nM}$  TPT ve  $60 \mu\text{M}$  MA +  $10 \text{ nM}$  TPT için) hücre canlılığını daha çok azalttığı gözlemlendi.



**Şekil 4.7.** MA ve TPT kombinasyonlarının DMS114 hücre canlılığı üzerine etkileri (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ )

MA ve TPT kombinasyonlarının kanser hücreleri üzerine etkisi, ayrıca, mikroskobik olarak da incelenmiştir. CI değeri en yüksek olan, 48 saat süreyle  $60 \mu\text{M}$  MA +  $10 \text{ nM}$  TPT uygulanan hücrelerin görüntüsüne şekil 4.8’de yer verilmiştir. Kombinasyon ilaç uygulanan grubun kontrol grubuna ve ilaçların tek başına uygulandığı gruplara göre hücre canlılık seviyesinde önemli bir azalma olduğu görülmektedir.

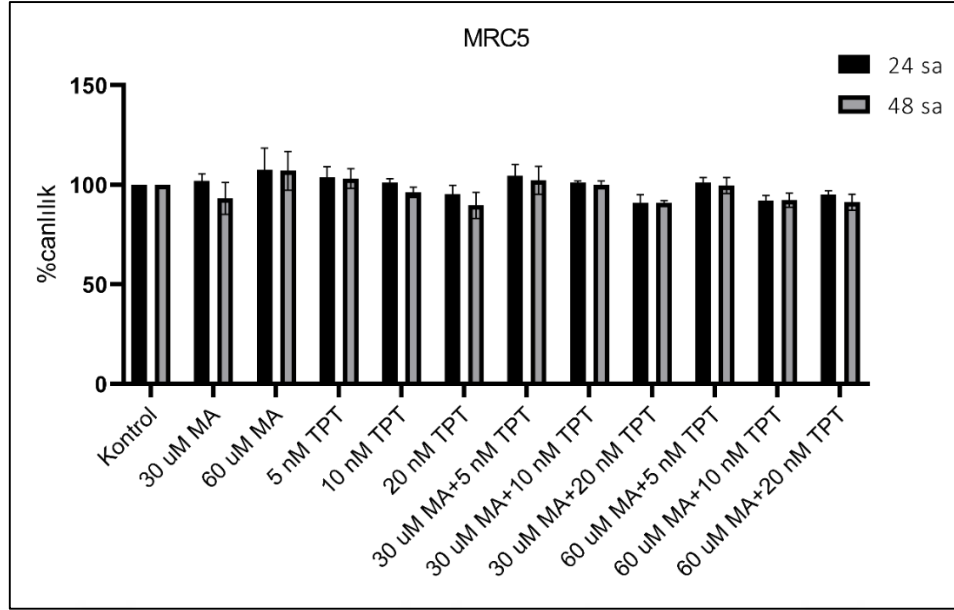




**Şekil 4.8.** Tek başına ve TPT ile kombine MA uygulanan DMS114 hücrelerinin mikroskobik görüntüsü. A) Kontrol, B) 10 nM TPT, C) 60 µM MA, D) 60 µM MA + 10 nM TPT (10X objektif)

MA ve TPT kombinasyonlarının DMS114 hücre canlılığına etkisi belirlendikten sonra aynı ilaç kombinasyonları, sağlıklı akciğer MRC5 hücrelerine uygulandı ve bu hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin bulunup bulunmadığı araştırıldı. Yapılan TMT analizine göre ilaç kombinasyonlarının hiç biri MRC5 hücre canlılığına istatistiksel olarak önemli bir etki göstermemiştir. Hücre canlılıklarının, tüm kombinasyonlarda %90'ın üzerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.9). Elde edilen bu veriler, MA ve TPT kombinasyonlarının sağlıklı hücrelere toksik etki göstermeden kanser hücrelerinin canlılığında önemli bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir.





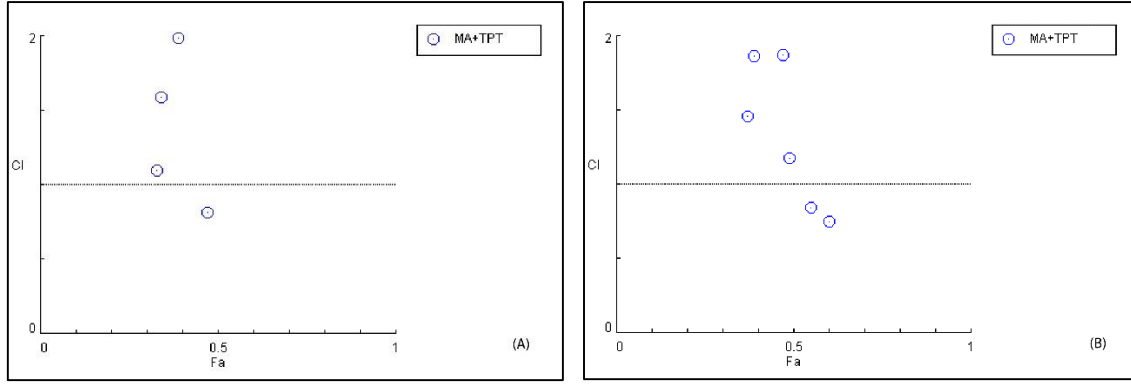
Şekil 4.9. MA ve TPT kombinasyonlarının MRC5 hücre canlılığı üzerine etkileri

#### 4.2.2. Kombinasyon İndeksleri ve Doz Azaltma İndekslerinin Belirlenmesi

MA ve TPT kombinasyonlarının olası sinerjetik etkisinin araştırılması için hücre canlılıkları TMT ile belirlendikten sonra Chou-Talalay kombinasyon indeksi (CI) yöntemi kullanıldı. Bu analiz sonucunda elde edilen veriler,  $CI < 1$ ,  $CI = 1$  ve  $CI > 1$  sırasıyla; sinerjetik, aditif ve antagonistik olarak yorumlanmaktadır. Compusyn yazılımı ile elde edilen CI verileri tablo 4.2’de, ilgili grafikler ise şekil 4.10’da gösterilmiştir. Buna göre; 24 saat süreyle 60 µM MA + 5 nM TPT, 48 saat süreyle 60 µM MA + 5 nM TPT ve 60 µM MA + 10 nM TPT kombinasyonlarının sinerjetik etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.2. MA ve TPT kombinasyonlarının CI değerleri

Süre (saat)	MA (µM)	CI		
		5 nM TPT	10 nM TPT	20 nM TPT
24	30	1,094	1,590	1,987
	60	0,819	2,069	2,249
48	30	1,456	1,868	1,174
	60	0,845	0,751	1,876

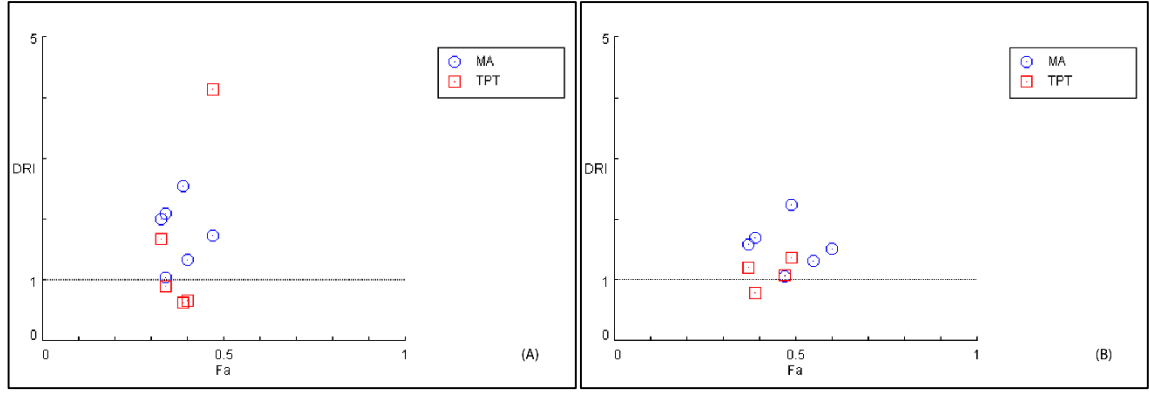


**Şekil 4.10.** MA ve TPT kombinasyonlarının CI grafikleri. A) 24 saat-, B) 48 saat kombine ilaç uygulamaları

Compusyn yazılımı ile kombinasyon uygulamalarının CI değerlerinin yanı sıra doz azaltma indeksleri ('dose reduction index', DRI) de belirlenmiştir (Tablo 4.3). DRI değerleri her bir ilacın tek başına dozu ile karşılaştırıldığında sinerjiye bağlı olarak her ilaç için kaç kat doz azaltma sağlandığını gösterir. Bu analiz sonucunda elde edilen veriler,  $DRI < 1$ ,  $DRI = 1$  ve  $DRI > 1$  sırasıyla; avantajlı olmayan (non-favorable) doz azaltma, doz azaltma olmaması, avantajlı (favorable) doz azaltma olarak yorumlanmaktadır. Analiz sonucuna göre, sinerjetik etkinin olduğu, 24 saat süreyle 60  $\mu\text{M}$  MA + 5 nM TPT uygulamasında MA'nın DRI değeri 1.732, TPT'nin DRI değeri 4.140 olarak bulunmuştur. 48 saat süreyle 60  $\mu\text{M}$  MA + 5 nM TPT uygulamasında MA'nın DRI değeri 1.317, TPT'nin DRI değeri 11.562; 60  $\mu\text{M}$  MA + 10 nM TPT uygulamasında MA'nın DRI değeri 1.517, TPT'nin DRI değeri 10.871 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11). Elde edilen veriler, kemoterapi ilacı TPT'nin MA ile kombine kullanımında bu ilacın etkisinin anlamlı bir şekilde arttığını göstermektedir.

**Tablo 4.3.** MA ve TPT kombinasyonlarının DRI değerleri

Süre (saat)	MA ( $\mu\text{M}$ )	5 nM TPT		10 nM TPT		20 nM TPT	
		DRI MA	DRI TPT	DRI MA	DRI TPT	DRI MA	DRI TPT
24	30	2.000	1.681	2.085	0.900	2.552	0.626
	60	1.732	4.140	1.042	0.900	1.326	0.668
48	30	1.592	1.206	1.687	0.783	2.233	1.376
	60	1.317	11.562	1.517	10.871	1.056	1.074



**Şekil 4.11.** MA ve TPT kombinasyonlarının DRI grafikleri. A) 24 saat-, B) 48 saat kombine ilaç uygulamaları

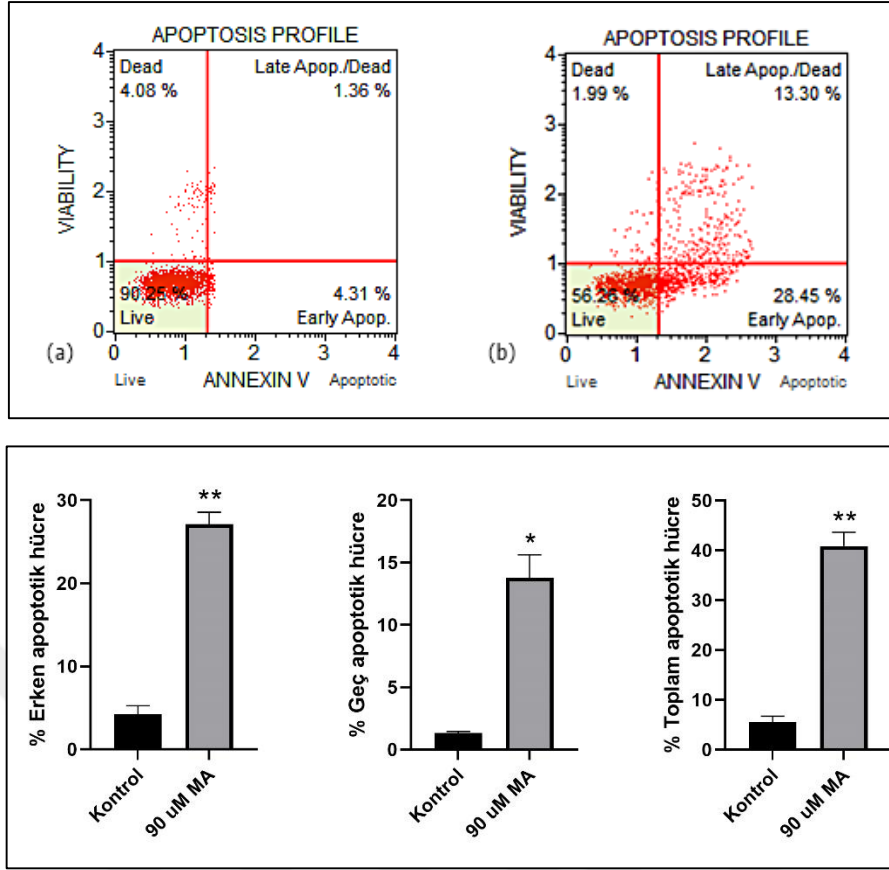
### 4.3. MA ve TPT'nin Hücre Apoptozu Üzerine Etkisi

MA, TPT ve MA+TPT kombinasyonlarının, DMS114 hücrelerinde, apoptotik hücre ölümüne etkisi ilk önce Annexin V boyaması yapılarak akış sitometrisi yöntemiyle değerlendirildi. Daha sonra, Annexin V analizinden elde edilen veriler doğrultusunda, AO/PI boyaması ile hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler gözlemlendi. Hücre canlılık analizleri sonucu her iki ilacın gerek tek tek, gerekse kombinasyon halinde uygulamasının MRC5 hücrelerinde toksik etki oluşturmadığı görüldüğünden bu hücreler için apoptoz analizi yapılmadı.

#### 4.3.1. Akış Sitometrisi ile Apoptozun Değerlendirilmesi

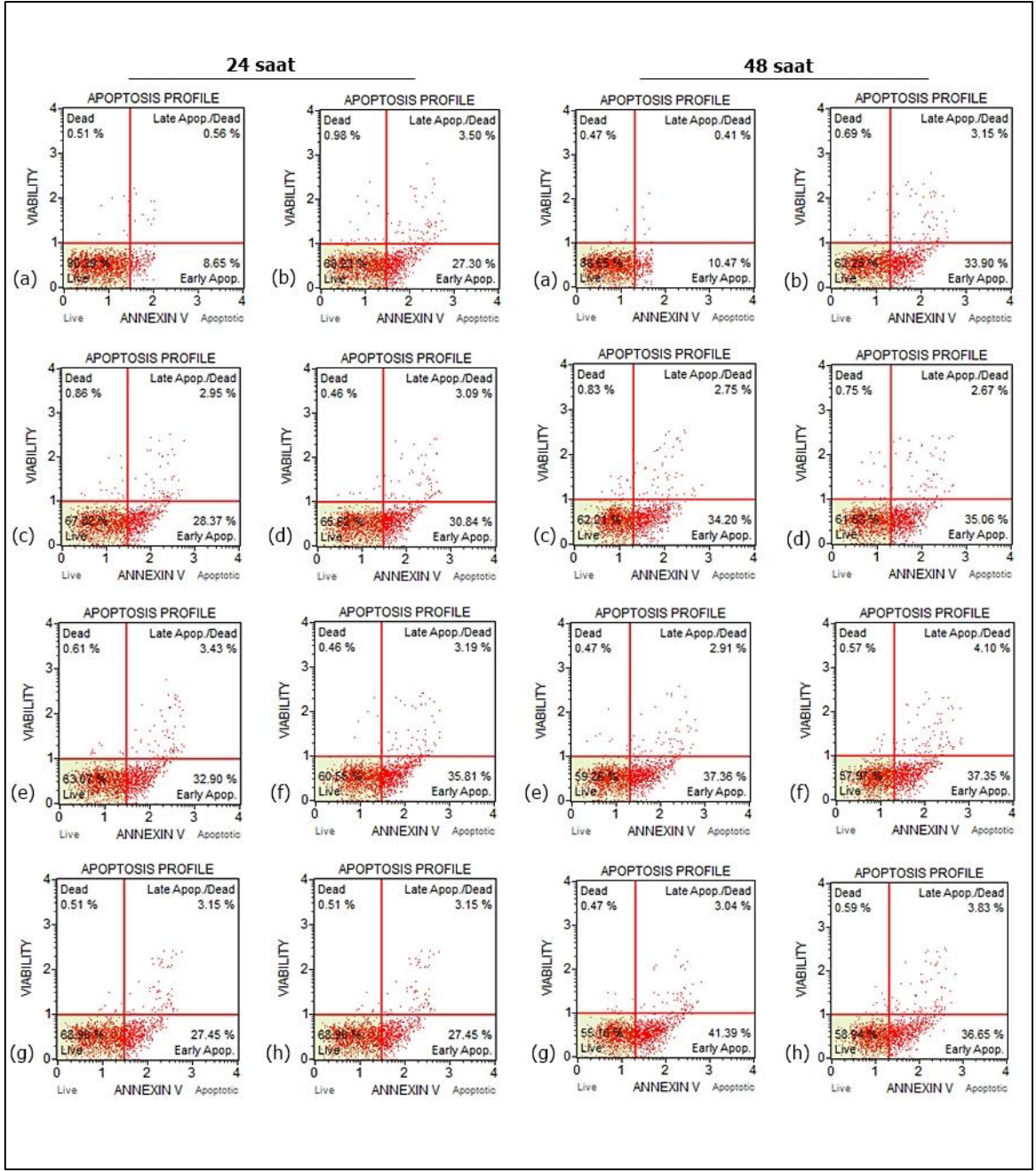
Bölüm 4.6'da anlatıldığı üzere m6A seviyesinde değişikliğin sadece 24 saat 90  $\mu$ M MA uygulaması sonucu meydana geldiği görüldüğünden proteomik çalışmaların bu konsantrasyon ile yapılmasına karar verilmiştir. Apoptoz analizi ilk önce bu grup için gerçekleştirildi. Ardından kombinasyon çalışmasında kullanılan ve daha etkin olduğu görülen 60  $\mu$ M MA ile 5, 10, 20 nM TPT ve bu iki ilaç konsantrasyonlarının kombine uygulamaları için apoptoz analizi yapıldı.

24 saat 90  $\mu$ M MA uygulamasının Annexin V verileri analiz edildiğinde ilaç verilen gruptaki apoptotik hücre ölümünün kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli miktarda arttığı görülmüştür. Ayrıca, erken apoptotik hücre yüzdesinin, geç apoptotik hücre yüzdesine göre önemli miktarda fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).

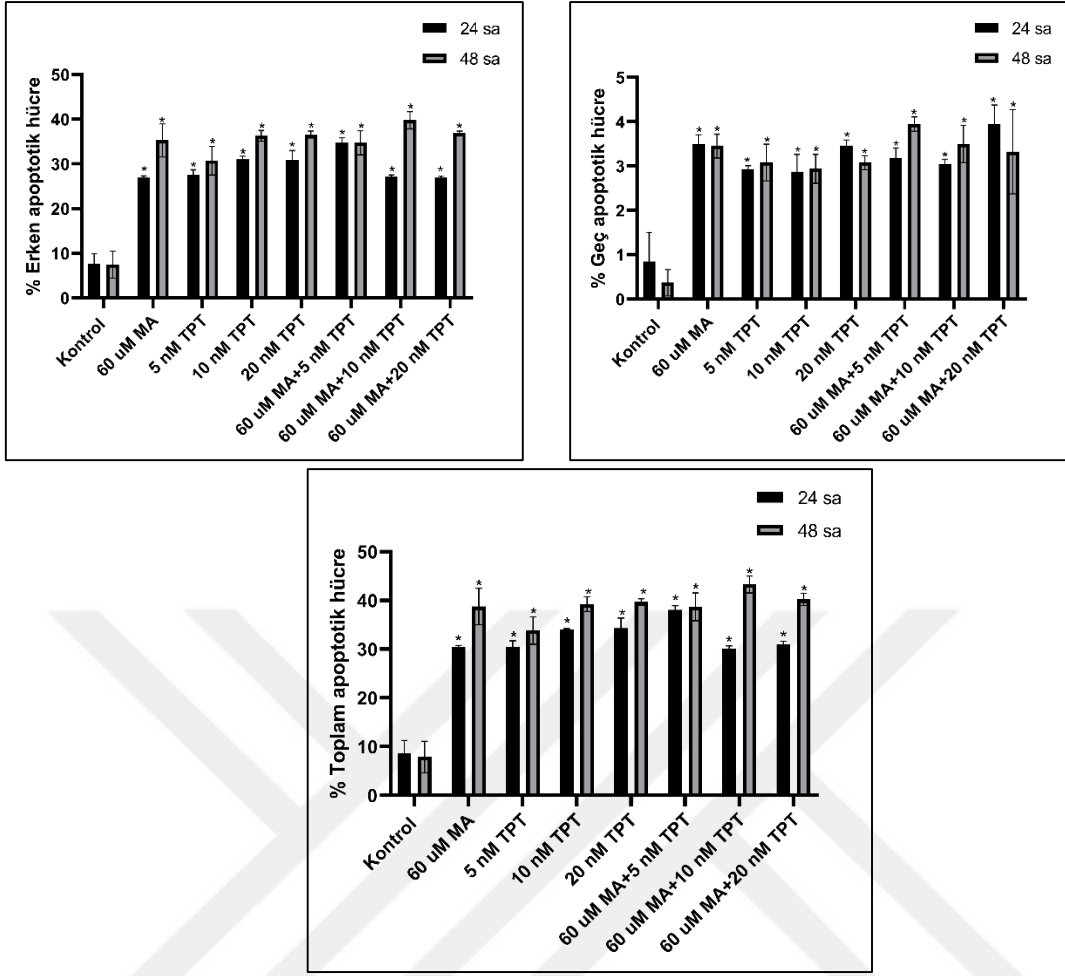


**Şekil 4.12.** 24 saat 90 μM MA uygulanan DMS114 hücrelerinin Annexin V analizi ve erken-geç- ve toplam apoptotik hücrelerin istatistiksel analizleri. a) Kontrol, b) 90μM MA (\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.0001$ )

MA'nın TPT ile kombine uygulamasının DMS114 hücre apoptozuna etkisinin belirlenmesi için 24 saat ve 48 saat süreli ilaç uygulamaları sonrası yapılan Annexin V analizinin bulguları Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Kombine ilaç uygulamalarının bir kısmı, kontrol grubuna kıyasla, hücre apoptozunu istatistiksel olarak önemli derecede artırmıştır. Ayrıca, erken apoptotik hücre yüzdesinin, geç apoptotik hücre yüzdesine göre önemli miktarda fazla olduğu görülmüştür. 60 μM MA; 24 saat uygulandığında %30,5±0,24, 48 saat uygulandığında %38,8±3,77 apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur. MA ile kombine uygulanan TPT'nin, 24 saatte, tek başına uygulanmasına kıyasla sadece 60+5 grubunda, 48 saatte ise 60 μM MA +5 nM TPT ve 60 μM MA +10 nM TPT grubunda apoptozu önemli miktarda artırdığı görüldü. Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak apoptotik hücre ölümünde en fazla artışın 48 saat süreli 60 μM MA+10 nM TPT uygulanan grupta (43,3±1,74) olduğu gözlemlendi (Şekil 4.14). Annexin V analizi ile elde edilen sonuçların TMT verileri ile tutarlı olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.13.** Tek başına ve TPT ile kombine MA uygulanan DMS114 hücrelerinin Annexin V analizi. (a) Kontrol, (b) 60  $\mu$ M MA, (c) 5 nM TPT, (d) 10 nM TPT, (e) 20 nM TPT, (f) 60  $\mu$ M MA+5 nM TPT, (g) 60  $\mu$ M MA+10 nM TPT, (h) 60  $\mu$ M MA+20 nM TPT

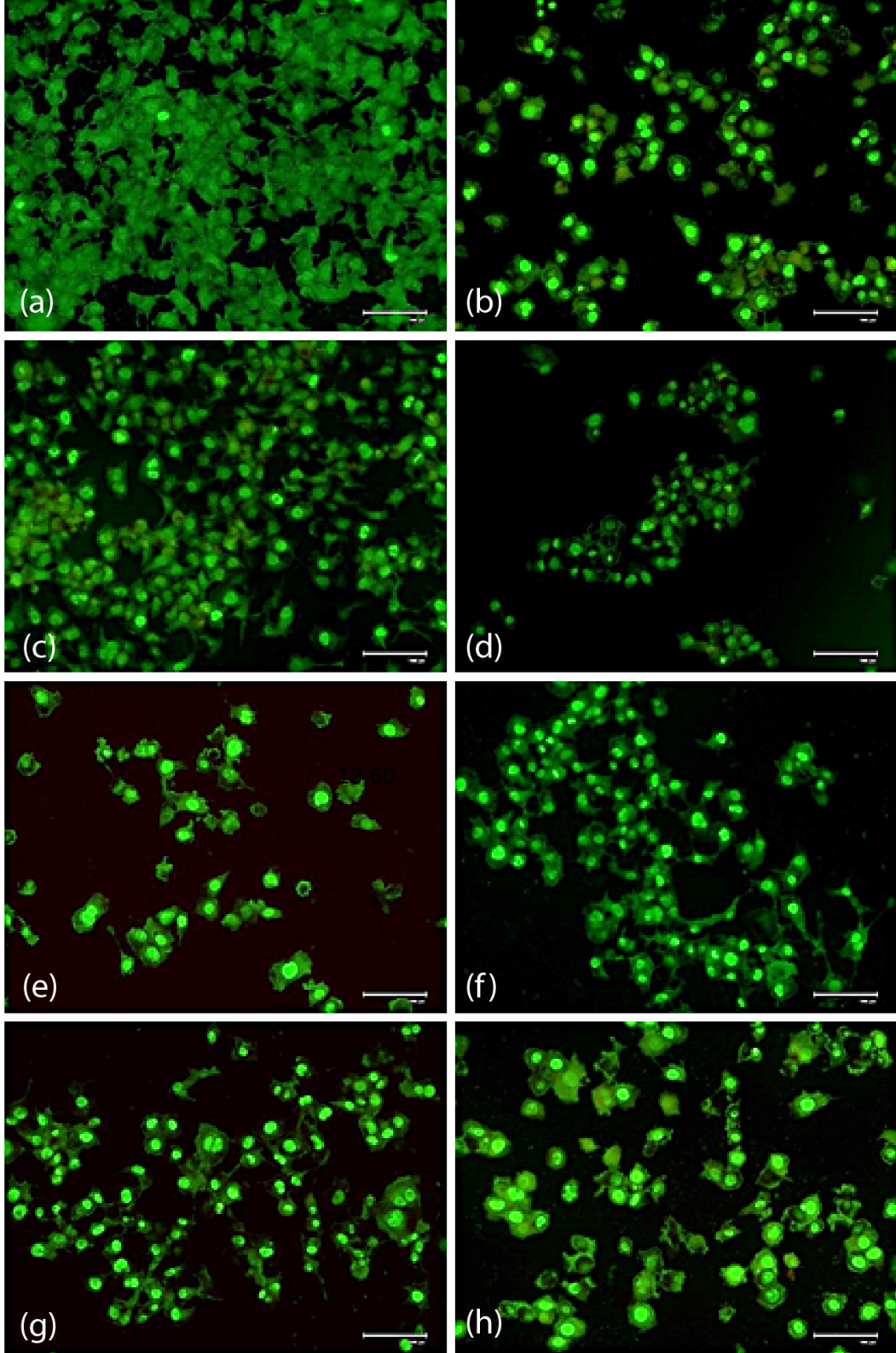


Şekil 4.14. Erken-, geç- ve toplam apoptotik hücrelerin istatistiksel analizleri (\* $P < 0.005$ )

### 4.3.2. AO/PI Boyaması ile Apoptozun Değerlendirilmesi

Apoptotik hücre ölümünü daha detaylı inceleyebilmek için MA'nın tek başına ve TPT ile kombine uygulamasının DMS114 hücre morfolojisinde meydana getirdiği değişiklikler AO/PI boyaması yapılarak gözlemlendi (Şekil 4.15). Her iki ilacın; nükleer parçalanma, apoptotik veziküller ve hücre büzüşmesi gibi apoptozla ilişkili tipik morfolojik değişikliklere neden olduğu görüldü. Ancak, MA'nın TPT ile kombine uygulanmasının, tek başına uygulamaya göre, hücre apoptozunu daha çok tetiklediği gözlemlendi. Özellikle, hücre büzüşmesi, vakuoler sitoplazma ve nükleer parçalanmanın kombine ilaç verilen gruplarda daha fazla olduğu görüldü. Bu gruplarda genel morfolojinin ve sitoplazma-çekirdek oranının daha çok bozulmuş olduğu görüldü. Nekrotik morfoloji pek görülmemiş olmakla birlikte, 60  $\mu$ M MA ve 20 nM TPT kombini uygulanan grupta az miktarda nekrotik hücreye rastlandı. AO/PI boyamasından elde edilen veriler Annexin V verilerini desteklemiş, kombinasyon ilaç uygulamasının apoptotik hücre ölümünü daha çok tetiklediğini doğrulamıştır.

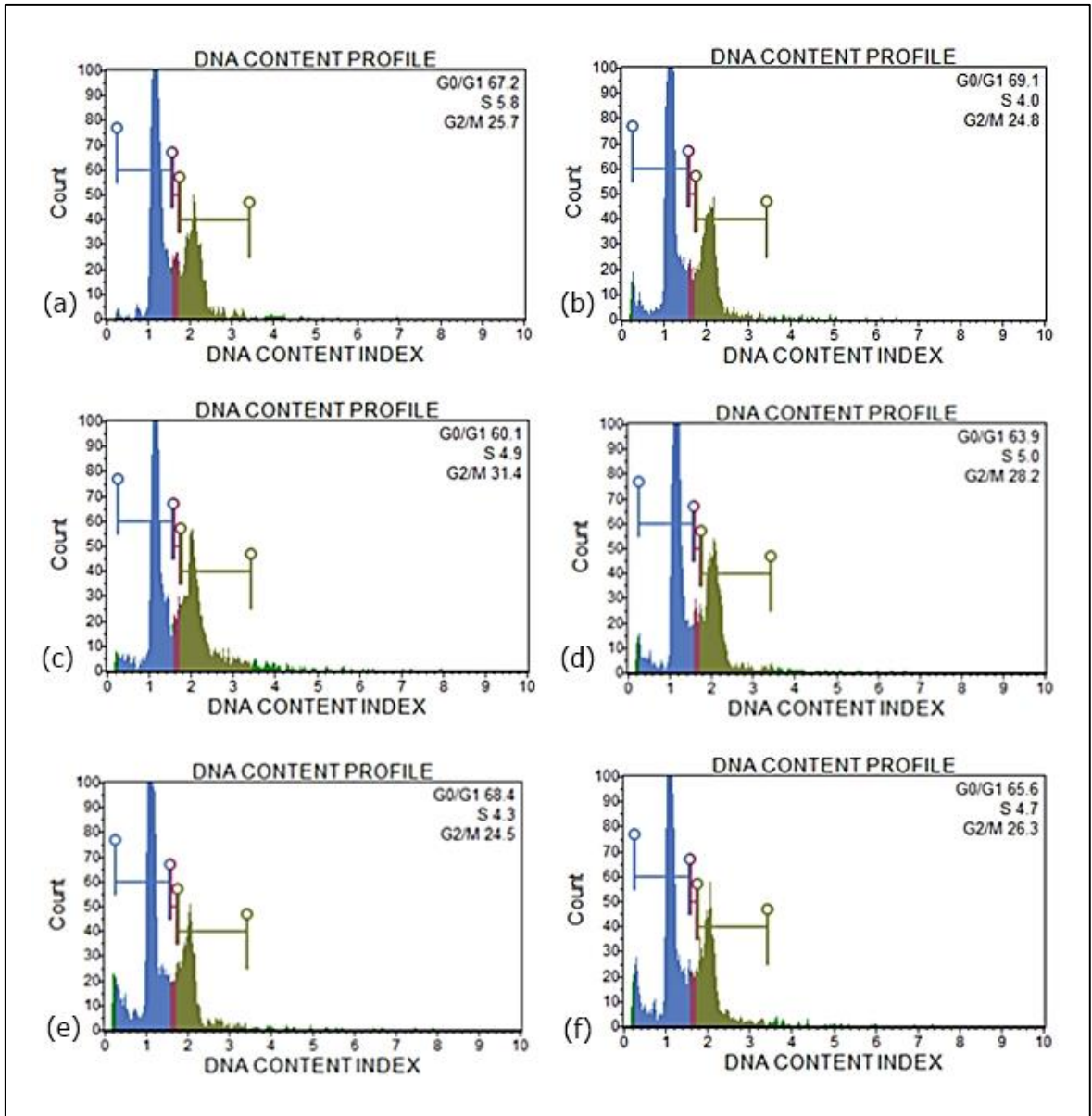




**Şekil 4.15.** İlaç uygulanan DMS114 hücrelerinin morfolojik değerlendirmesi (a) Kontrol, (b) 60  $\mu\text{M}$  MA, (c) 5 nM TPT, (d) 10 nM TPT, (e) 20 nM TPT, (f) 60  $\mu\text{M}$  MA+5 nM TPT, (g) 60  $\mu\text{M}$  MA+10 nM TPT, (h) 60  $\mu\text{M}$  MA +20 nM TPT

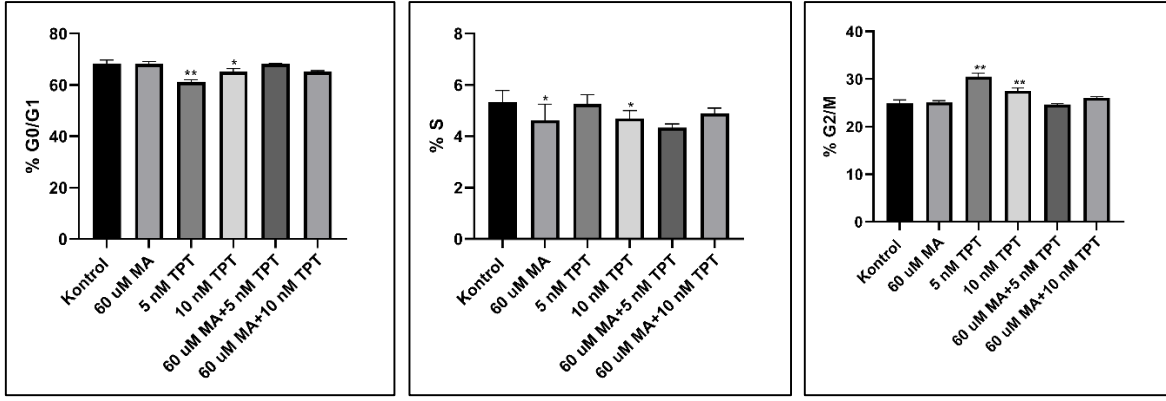
#### 4.4. MA ve TPT'nin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi

MA'nın tek başına ve TPT ile kombine uygulamasının DMS114 hücre döngüsüne etkisi "Muse Cell Cycle Kit" kullanılarak, Muse® Cell Analyzer cihazı ile yapılmıştır. Analiz edilen örneklerin hücre döngüsü dağılımı hakkında bilgi veren kit, G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücrelerin yüzdesinin nicel ölçümüne olanak sağlamaktadır. Yapılan analiz sonucu, MA'nın hem tek başına ve hem de TPT ile birlikte uygulandığında, hücrelerin önemli ölçüde G0/G1 fazında yoğunlaştıkları görülmüştür (Şekil 4.16). İstatistiksel analizler, bu yoğunlaşmanın kontrole göre anlamlı derecede farklı olmadığını göstermiştir.



**Şekil 4.16.** Tek başına ve TPT ile kombine MA uygulamasının DMS114 hücre döngüsüne etkisi. (a) Kontrol, (b) 60 µM MA, (c) 5 nM TPT, (d) 10 nM TPT, (e) 60 µM MA+5 nM TPT, (f) 60 µM MA+10 nM TPT. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )



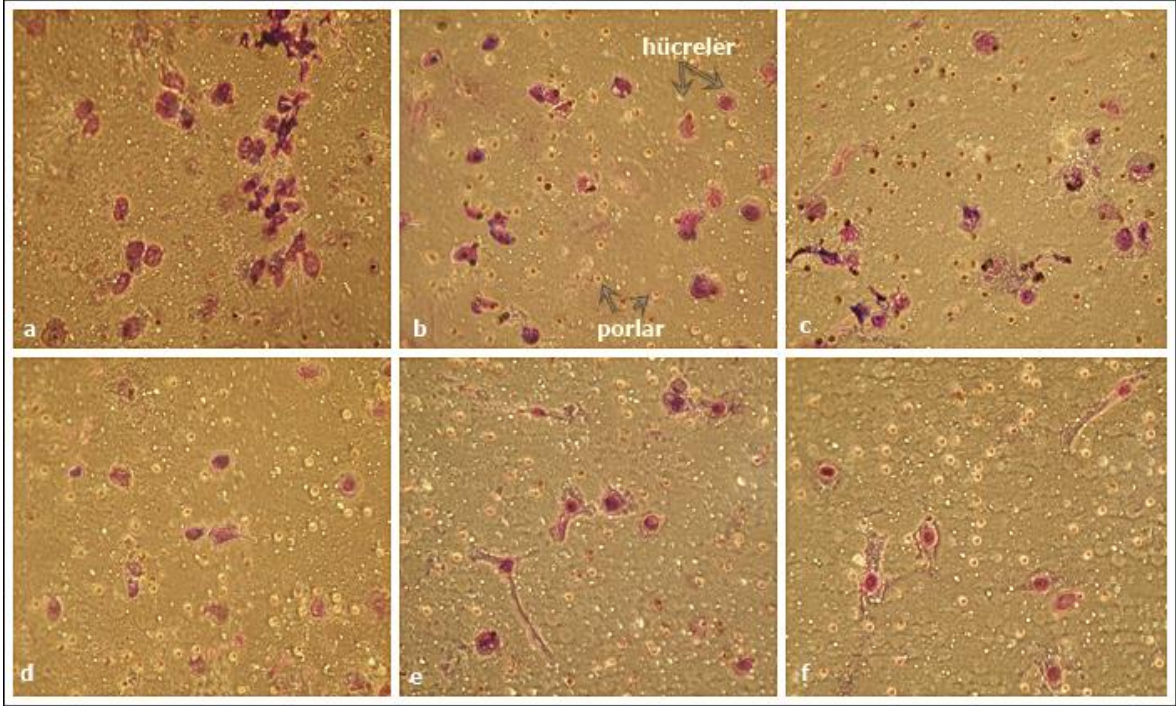


Şekil 4.16. Devamı

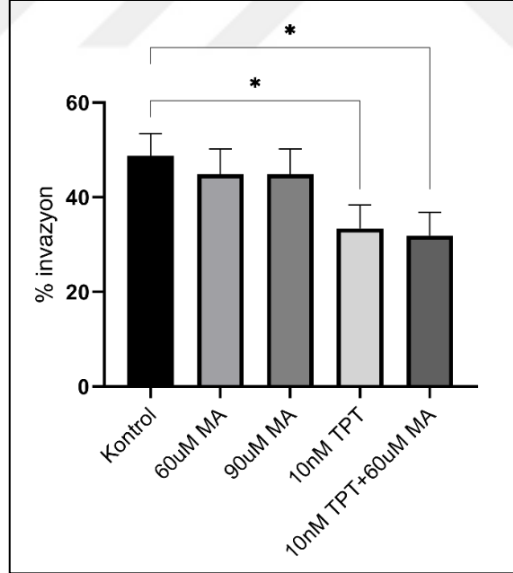
#### 4.5. İlaç Uygulamalarının Hücre İnvazyonu Üzerine Etkisi

MA ve TPT'nin hücre canlılığı ve apoptozuna etkilerinin araştırıldığı analizlerin sonuçları göz önünde bulundurularak bu ilaçların hücre invazyonuna etkilerinin hangi ilaç konsantrasyonları kullanılarak yapılacağı belirlendi. Buna göre, 24 saat süreli uygulanan 90 µM MA ile 48 saat süreli uygulanan 60 µM MA, 10 nM TPT ve 60 µM MA + 10 nM TPT'nin DMS114 hücre invazyonuna etkisi Matrigel İnvazyon Odacık Sistemi kullanılarak belirlendi. Bunun için hücrelerin ekildiği odacıklar içine serum içermeyen besiyeri konarken odacığın yerleştirildiği kuyucukların içine serumlu besiyeri konarak kemoatraktan olması sağlandı. İnkubasyon süresi sonunda invazif olmayan hücreler steril pamuk çubuklar kullanılarak uzaklaştırıldı ve matrijelden geçen invazif hücreler Diff Quick boyama kiti ile boyanarak mikroskop altında sayıldı (Şekil 4.17). İnvazyonun belirlenebilmesi için hücre migrasyonunun saptanması gerekmektedir. Migrasyon, matrijel ile kaplı olmayan kontrol odacıklarına ekilen hücrelerin aynı şekilde sayılması ile belirlendi ve buna göre % invazyon değerleri hesaplandı.

% invazyon değerlerinin hesaplanmasının ardından yapılan istatistiksel analizler MA'nın kanser hücre invazyonuna önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir (Şekil 4.18). 10 nM TPT ve 60 µM MA+10 nM TPT uygulamasının hücreler üzerindeki % invazyon değeri, sırasıyla, %32±4,1 ve 31,1±4,0 olarak belirlenmiştir. Belirtilen ilaç uygulamaları, hücre invazyonunu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli miktarda azaltmıştır ( $P<0,05$ ). Ancak, TPT'nin MA ile kombine uygulamasının tek başına uygulanmasına göre invazyonu istatistiksel olarak önemli derecede azaltmadığı görülmüştür. Elde edilen veriler, MA'nın akciğer kanseri hücrelerinin invazyonunu azaltmada önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir.



**Şekil 4.17.** MA ve TPT'nin DMS114 hücre invazyonuna etkisinin mikroskopik görüntüsü. a) İlaç uygulanmayan kontrol odacığı b) İlaç uygulanmayan matrijel odacığı (kontrol) c) 24 saat 90 µM MA ve d-f) 48 saat, sırayla, 60 µM MA, 10 nM TPT, 60 µM MA +10 nM TPT uygulanan matrijel odacıkları.

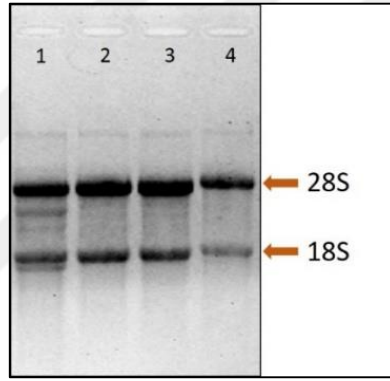


**Şekil 4.18.** MA ve TPT'nin DMS114 hücre invazyonuna etkisinin istatistiksel analizi (\* $P < 0.05$ )

#### 4.6. MA'nın m6A Seviyelerine Etkisi

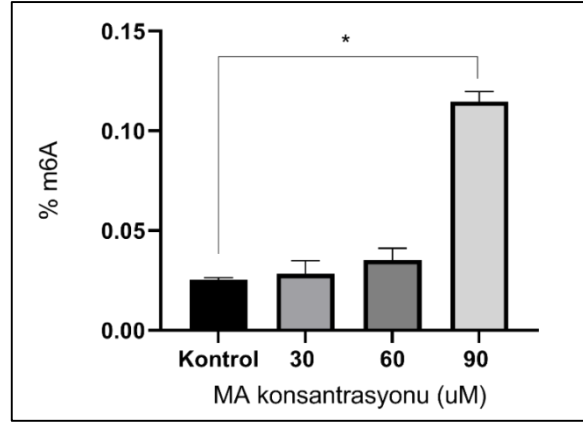
MA'nın bir m6A demetilaz olan FTO'yu spesifik olarak inhibe etme özelliğine sahip olması sebebiyle bu ilacın DMS114 m6A seviyesinde meydana getireceği değişiklik analiz

edildi. Çalışılacak örnek grupları; 24, 48 ve 72 saat MA uygulaması sonunda hücre canlılığının %50 civarına düştüğü konsantrasyonlar olan, sırasıyla, 90  $\mu$ M, 60  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M MA olarak belirlendi. Belirtilen konsantrasyondaki ilaçların verilmesinin ardından, inkübasyon süresi tamamlanan hücrelerden önce RNA izolasyonu yapıldı, ardından, ticari olarak satın alınmış olan m6A RNA Metilasyon Kantifikasyon Kiti kullanılarak %m6A oranları belirlendi. Kantifikasyon öncesi izole edilen RNA'ların kalitesini değerlendirmek için örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülerek 18S ve 28S bantları gözlemlendi ve RNA'ların çalışma için uygun olduğu görüldü (Şekil 4.19). RNA örneklerinin konsantrasyonu belirlendikten sonra her bir kuyucuğa 200 ng olacak şekilde örnek konarak m6A RNA Metilasyon Kantifikasyon Kitinin önerdiği protokol takip edildi. Deney sonunda, optik yoğunluklar belirlendikten sonra %m6A değerleri hesaplandı.



**Şekil 4.19.** RNA örneklerine ait jel görüntüsü. 1) 72 saat 30  $\mu$ M MA- 2) 48 saat 60  $\mu$ M MA- 3) 24 saat 90  $\mu$ M MA uygulanan DMS114 hücreleri, 4) Kontrol

% m6A değerleri için yapılan istatistiksel analizler, m6A seviyesininin 24 saat süreyle 90  $\mu$ M MA uygulanan hücrelerde anlamlı derecede arttığını göstermiştir ( $P<0,005$ ). Kontrol grubunda  $0,025\pm 0,001$  olan m6A seviyesi 90  $\mu$ M MA uygulanan grupta  $0,11\pm 0,01$ 'e yükselerek yaklaşık 5 katlık bir artış göstermiştir (Şekil 4.20). Diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir m6A artışı olmaması sebebiyle proteomik çalışmaların 24 saat 90  $\mu$ M MA konsantrasyonunun kullanıldığı hücreler ile yapılmasına karar verilmiştir.

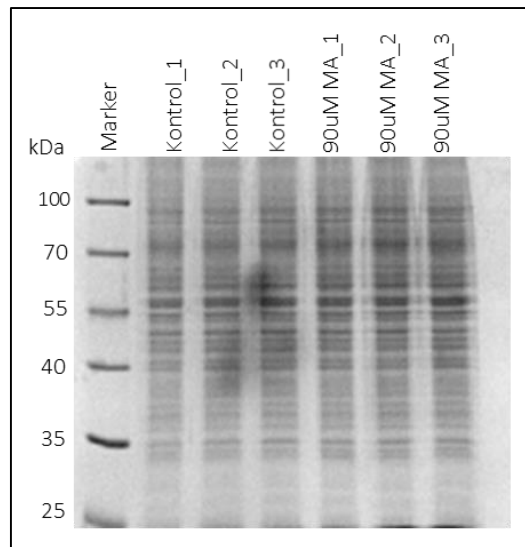


Şekil 4.20. MA'nın DMS114 hücrelerinde m6A seviyesine etkisi. (\* $P < 0,005$ ).

## 4.7. Hücrelerden Elde Edilen Protein Özütlerinin Değerlendirilmesi

### 4.7.1. SDS-PAGE Analizi

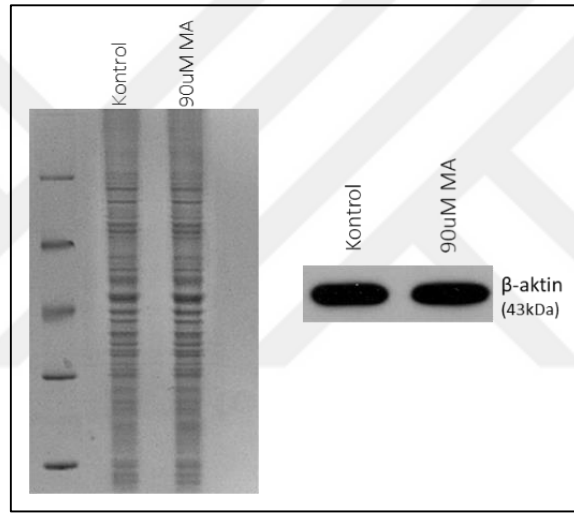
MA'nın DMS114 hücrelerinin proteomunda neden olduğu değişikliklerin analiz edilebilmesi için üç ayrı flaskta 24 saat süreyle 90  $\mu$ M MA uygulanan hücrelerden ve ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerinden protein izolasyonu yapıldı. Bradford yöntemi ile konsantrasyonları belirlendikten sonra, elde edilen protein özütlerinin kalitesinin değerlendirilmesi için örnekler önce 20  $\mu$ g olacak şekilde SDS-PAGE jelinde yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırıldılar. Ardından Coomassie Parlak Mavisi ile boyandıktan sonra jelin görüntüsü alındı (Şekil 4.21). Her üç gruba ait protein bantlarının net ve keskin şekilde gözüküyor oluşu örnek kalitesinin proteomik deneyleri için uygun olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.21. Kontrol ve MA grubu proteinlerin SDS-PAGE analizi

#### 4.7.2. House Keeping Protein Aktin ile Örnek Normalizasyonu

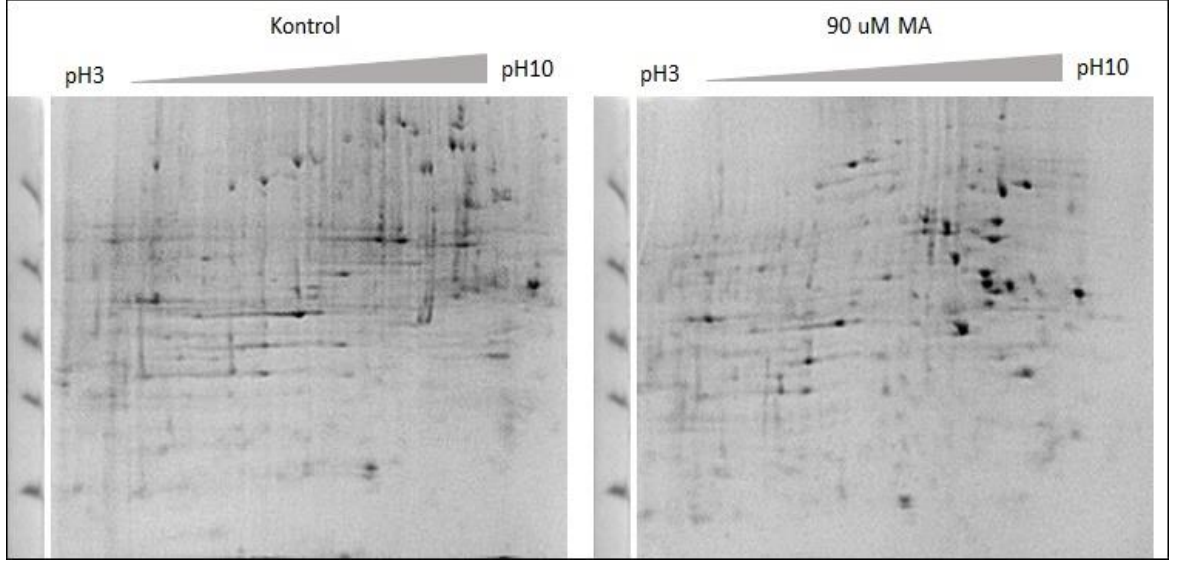
Protein kalitelerinden emin olunduktan sonra her üç tekrar grubu aynı miktarda olacak şekilde birleştirilerek örnek havuzları oluşturuldu (Kontrol ve 90  $\mu$ M MA). Proteomik çalışmalarına başlamadan önce, havuz oluşturulan protein örneklerinin eşit olarak kullanıldığından emin olunması için Western Blotlama (WB) yöntemi ile bir house keeping protein olan  $\beta$ -aktin kullanılarak örneklerin normalizasyonu yapıldı. Bunun için, SDS-PAGE jeline her iki gruptan 20  $\mu$ g protein yüklenerek anti-  $\beta$ -aktin antikoruna ile WB yapıldı. Image-J programı ile analiz edilen bantların intensiteleri ölçülerek örnekler normalize edildi. Örnek havuzları, ayrıca, SDS-PAGE analizini takiben Coomassie Parlak Mavisi ile boyandı ve protein bantları gözlemlenerek kaliteleri kontrol edildi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22.  $\beta$ -aktin ile örnek normalizasyonu

#### 4.7.3. Protein Profilinin 7 cm Striplerle Değerlendirilmesi

Örnek havuzları  $\beta$ -aktin antikoruyla yapılan WB ile normalize edildikten sonra 7 cm'lik stripler kullanılarak iki boyutlu jel elektroforezi yapılarak protein dağılımı incelendi. İki grup arasındaki farkların daha iyi analiz edilebilmesi için spotların birbirinden daha iyi ayrılması gerektiği görüldü (Şekil 4.23). Bu sebeple, MALDI-TOF/TOF ile tanımlanacak örneklerin 17 cm'lik stripler kullanılarak ayrıştırılmasının uygun olduğuna karar verildi.



Şekil 4.23. 7 cm'lik stripler ile iki boyutlu jel elektroforezi

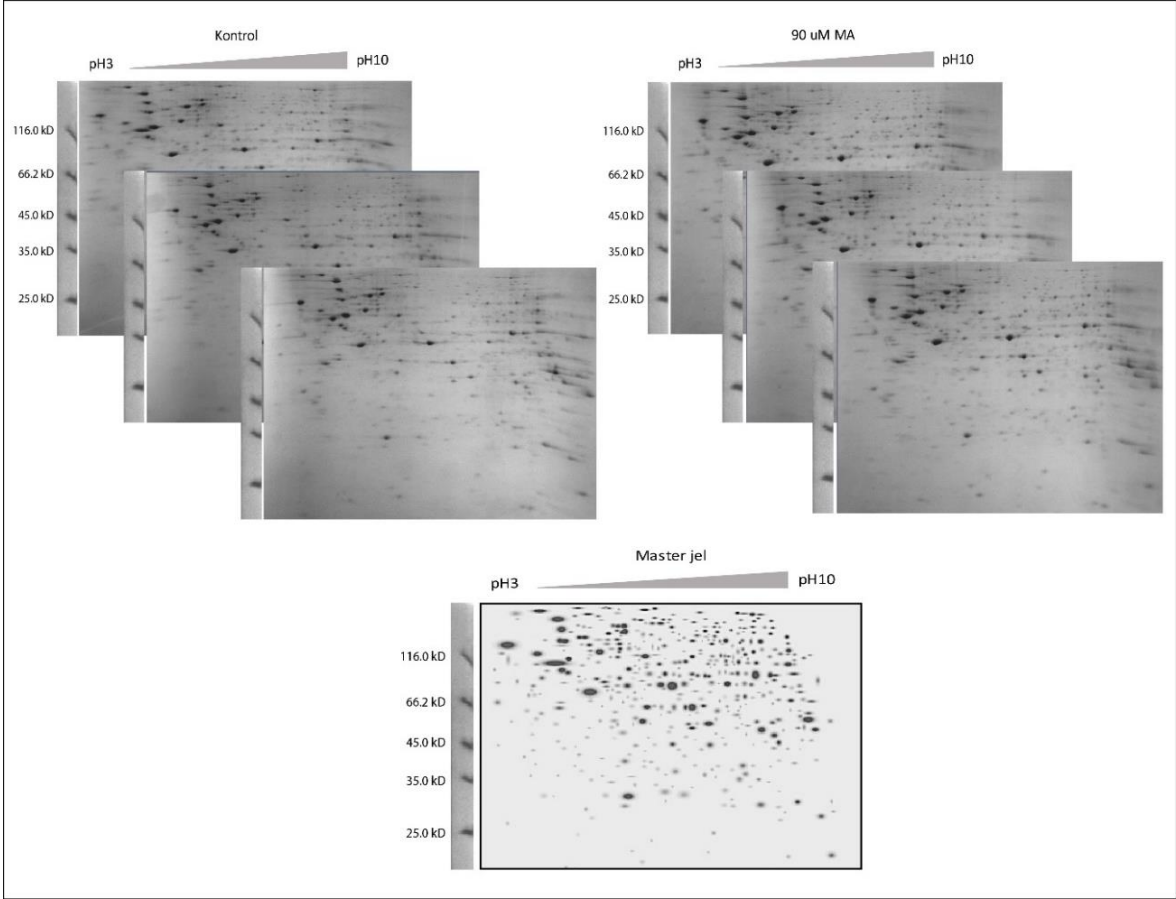
#### 4.8. MA'nın DMS114 Hücre Proteomunda Neden Olduğu Değişikliklerin Analizi

##### 4.8.1. Karşılaştırmalı 2DE analizi ve MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinler

MA'nın DMS114 proteomunda yol açtığı değişikliklerin analizi ilk önce MALDI-TOF/TOF ile gerçekleştirildi. Protein örnekleri 17 cm'lik stripler kullanılarak, birinci boyutta, izoelektrik noktalarına göre, ardından SDS-PAGE ile ikinci boyutta moleküler ağırlıklarına göre ayrıldılar. Fikse edildikten sonra Coomassie parlak mavisi ile boyanan jellerin görüntüleri VersaDoc MP4000 sistemi (BioRad, ABD) kullanılarak QuantityOne programı (Versiyon 4.6.7, Bio-Rad, USA) ile alındı (Şekil 4.24).

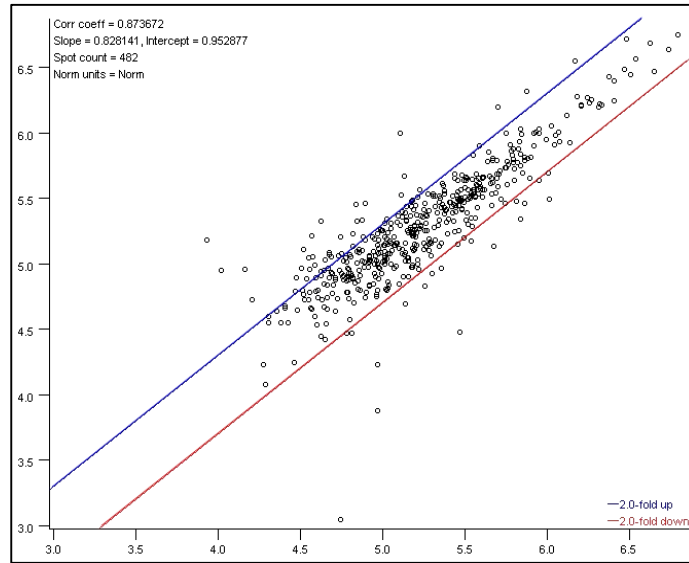
Protein spotlarının analizi için PDQuest Advance programı kullanıldı. Bunun için, tüm jellerden analiz edilecek bölgeler standardize edilerek eşleştirildi. Kontrol grubu ile ilaç verilen grup arasında farklı ekspresyon seviyesine sahip olan spotlar tespit edildi. Ekspresyon seviyesinde 2 kattan fazla değişiklik gösteren spotlar tanımlanmak üzere seçildi. Jel içi triptik kesimi yapılan örnekler MALDI-TOF/TOF ile tanımlandı





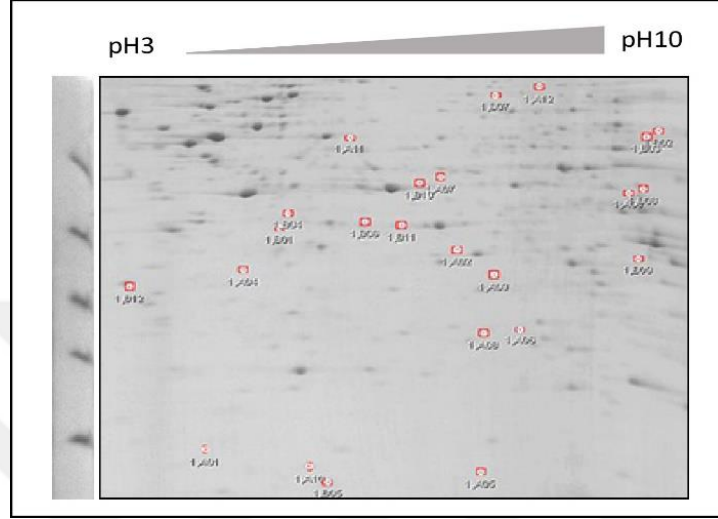
Şekil 4.24. İki gruba ait biyolojik tekrar jellerine ve master jele ait görüntü

Jeller arası ortalama varyasyon katsayısı (CV) 28,01 olarak tespit edildi ve protein dağılım paterninin jeller arasında benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 4.25). Her bir jelde ortalama 483 spot eşleştirildi.



Şekil 4.25. Jeller arasında protein dağılımı

Gruplar arasında regülasyon katı ikiden fazla olan spotlar belirlenerek jel içi triptik kesim yöntemi ile kesildi ve MALDI-TOF/TOF analizi ile tanımlandı. Şekil 4.26'da pozisyonları gösterilen 24 spottan 13 tanesi yüksek skor ile tanımlanabildi. Tanımlanan proteinler, jel görüntüsü üzerinden moleküler ağırlıklarına ve izoelektrik noktalarına bakılarak teyit edildi. Skorları düşük olan spotlar değerlendirmeye alınmadı.



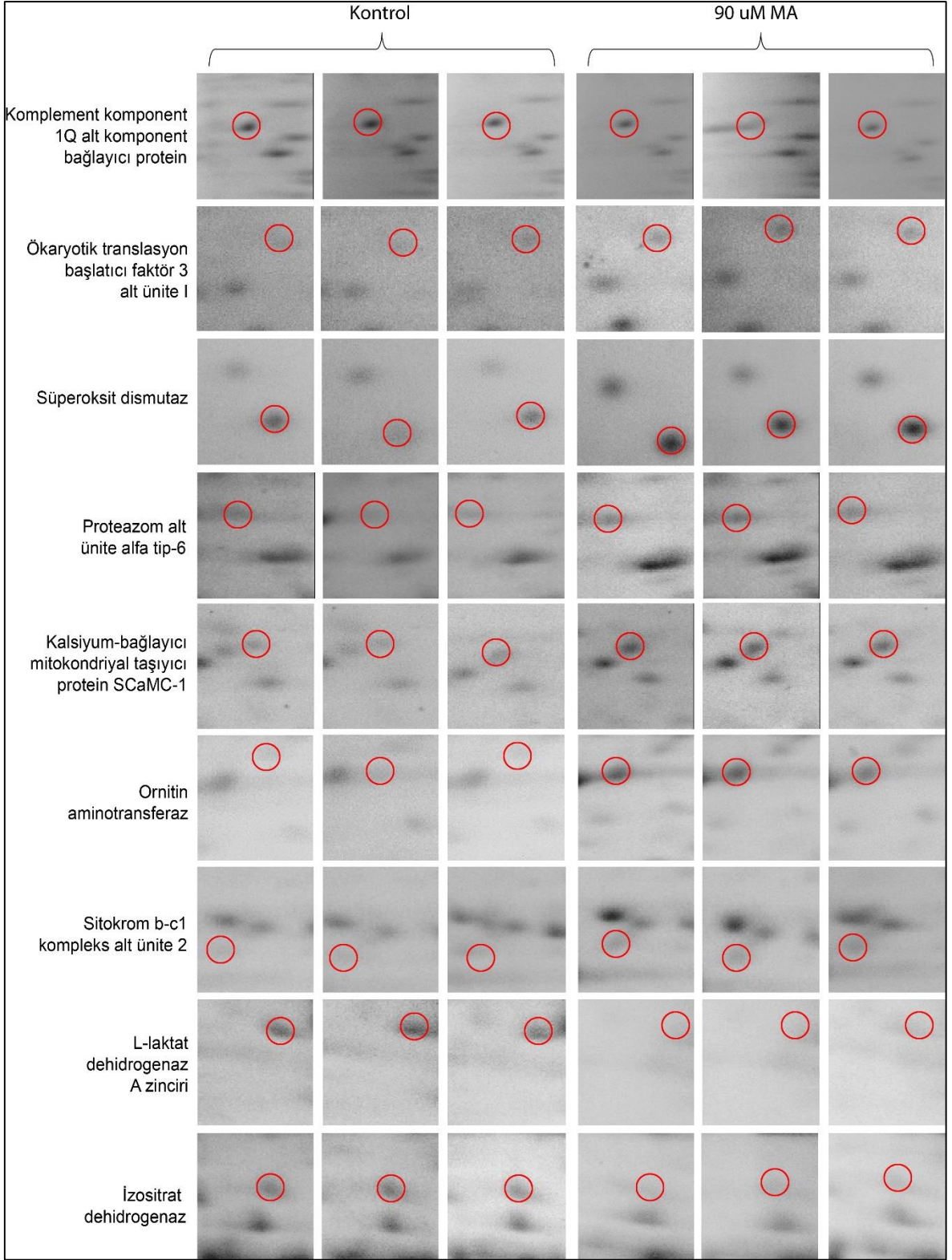
Şekil 4.26. Kesilen spotlar

Tanımlanan proteinler; erişim numaraları, MALDI skorları ve regülasyon paternleriyle birlikte Tablo 4.4'de verilmiştir. Şekil 4.27'da bu proteinlerin yakın çekim görüntülerine yer verilmiştir.



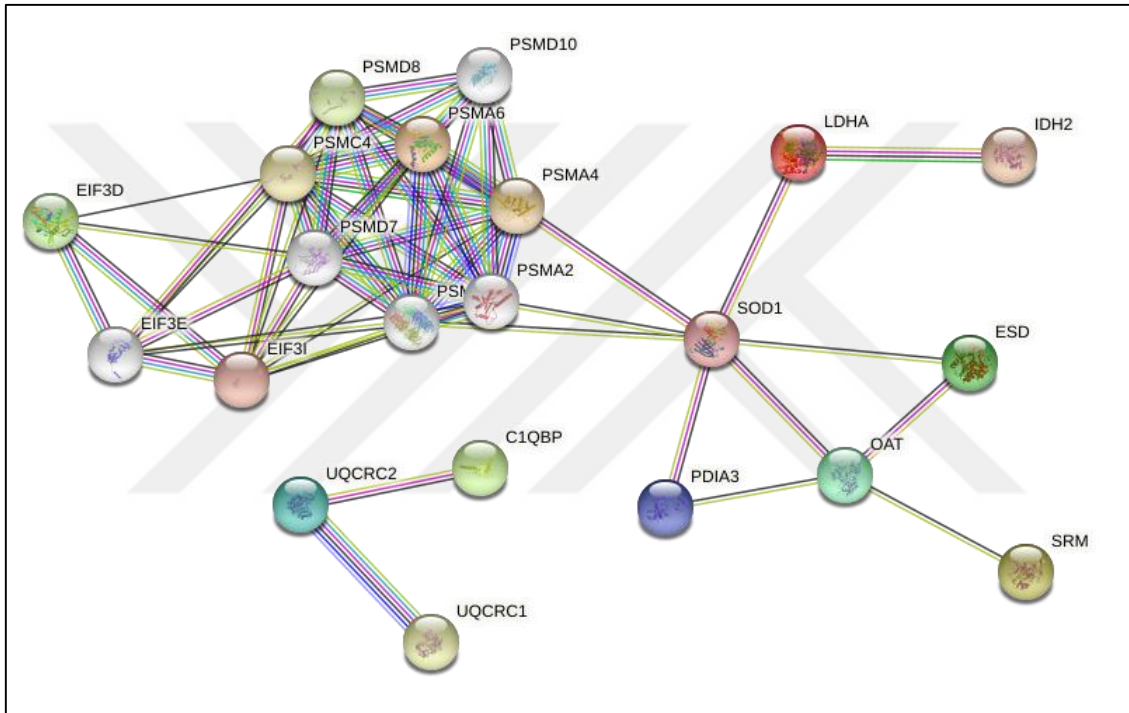
**Tablo 4.4.** MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinler

Erişim no.	Protein Tanımı	Protein kütlesi	Protein skoru	Beklenen	Uyum	Teoretik pI	Sekans kapsama (%)	Regülasyon MA/kontrol
Q07021	Komplement komponent 1Q alt komponent bağlayıcıprotein, mitokondriyal	31343	461	1.6e-042	13	4,74	40	↑
P19623	Spermidin sentaz	33803	71	0.0015	11	5,3	18	↑
Q13347	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 3 alt ünite I	36479	275	6.4e-024	18	5,38	33	↑
P00441	Süperoksit dismutaz [Cu- Zn]	15926	24	84	3	5,7	8	↑
P16949	Statmin	17292	216	5.1e-018	21	5,76	64	↑
P30101	Protein disulfit- izomeraz A3	56747	141	1.6e-010	20	5,98	24	↑
P60900	Proteazom altünite alpha tip6	27382	207	4e-017	16	6,34	44	↑
P10768	S- formilglutasyon hidrolaz	31442	137	4e-010	11	6,54	15	↑
Q6NUK1	Kalsiyum- bağlayıcı mitokondriyal taşıyıcı protein SCaMC-1	53320	80	0.00018	8	6	14	↑
P04181	Ornitin aminotransferaz mitokondriyal	48504	80	0.00022	11	6,57	19	↑
P00338	L-laktat dehidrogenaz A zinciri	36665	350	2,00e-31	22	8,44	34	↓
P22695	Sitokrom b-c1 kompleks alt ünite 2 mitokondriyal	48413	261	1,60e-22	10	8,74	15	↑
P48735	İzositrat dehidrogenaz [NADP], mitokondriyal	50877	273	1,00-23	25	8,88	32	↓



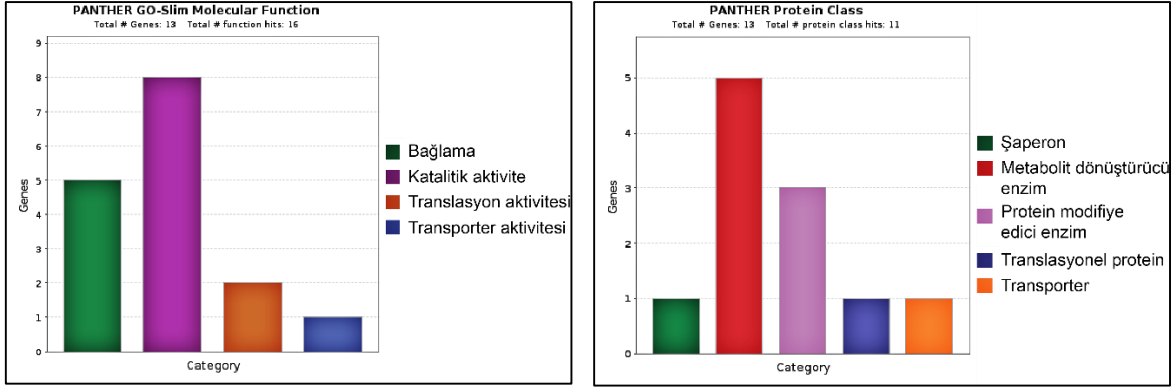
Şekil 4.27. MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin yakın çekim görüntüleri

MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinler, UniProt erişim numaraları kullanılarak STRING (<https://string-db.org>) analizine tabi tutuldu (Şekil 4.28). Analiz parametreleri; orta düzeyde güven etkileşimi (interaction score of medium confidence) seçilerek, 1. ve 2. kabuklar için seçilen maksimum etkileşim sayısı 5'ten fazla olmayacak şekilde belirlendi. "Hatalı keşif oranı" (False Discovery Rates, FDR)  $10^{-4}$ 'ten küçük olan veriler dikkate alındığında, özellikle, proteazom (FDR:3,79e-12), protein deubikitinasyonu (FDR:3,85e-07), proteoliz (FDR:7,38e-06) ve endopeptidaz aktivite (FDR:1,49e-05) ve ayrıca apoptoz ile ilişkili yolların ön plana çıktığı görüldü.



Şekil 4.28. MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin STRING analizi

MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinler, STRING'in yanı sıra, PANTHER analizine tabi tutuldu. Regülasyon oranları değişen proteinlerin PANTHER analizi ile elde edilen bazı fonksiyonel sınıflandırmalara ait bar grafikleri Şekil 4.29'da verilmiştir. Analiz sonuçları, regülasyonu değişen proteinlerden beş tanesinin (P04181, P00441, Q13347, P16949, Q07021) protein bağlanması ve iyon bağlanması gibi bağlanma aktivitesine sahip, 8 tanesinin (P04181, P00338, P10768, P30101, P48735, P60900, P19623, P00441) hidrolaz, izomeraz ve oksidoredüktaz gibi çeşitli metabolik olaylarda katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

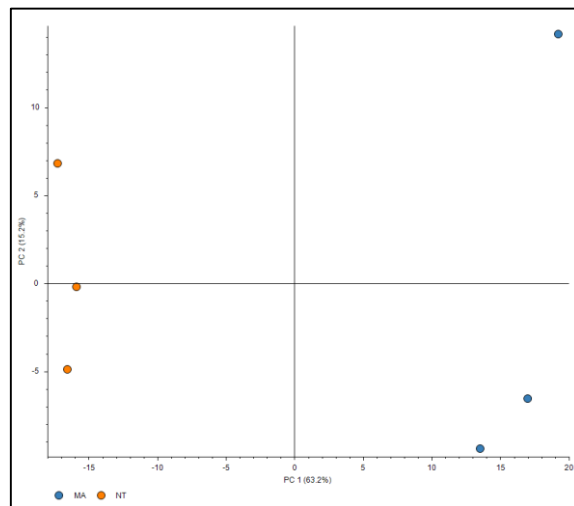


**Şekil 4.29.** MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyon ve protein sınıfını gösteren PANTHER analizi

Protein sınıflarının belirlenmesi için yapılan PANTHER analizi; şaperon (P30101), metabolit dönüştürücü enzim (P04181 P00338, P48735, P19623, P00441), protein modifiye edici enzim (P10768, P60900, P22695), translasyonel protein (Q13347) ve transporter protein (Q6NUK1) olmak üzere beş çeşit protein tipini ortaya çıkarmıştır.

#### 4.8.2. nLC-MS/MS ile Tanımlanan Proteinler

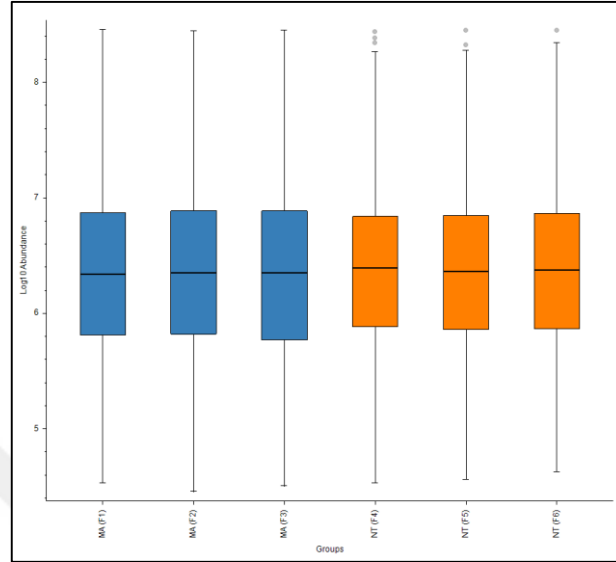
2DE ve MALDI-TOF/TOF ile proteinlerin tanımlanmasını takiben MA uygulamasının DMS114 hücre proteomunda meydana getirdiği değişikliklerin daha detaylı analiz edilebilmesi için bir diğer kütle spektrometresi olan nLC-MS/MS yöntemi kullanıldı. Solüsyon içi triptik kesim ile kesilen proteinler, nLC-MS/MS ile analiz edildikten sonra etiketsiz (Label-free) kantifikasyon yapılarak regülasyonu değişen proteinler tespit edildi.



**Şekil 4.30.** nLC-MS/MS verilerinin PCA analizi

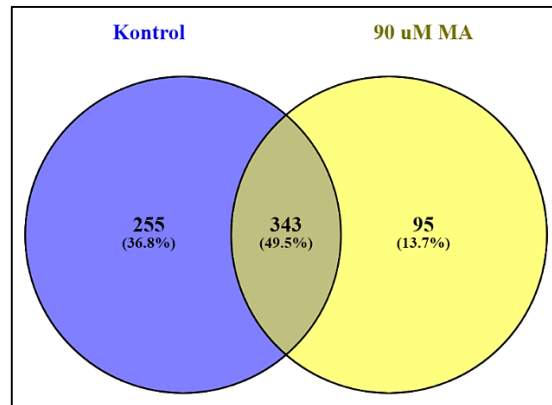
Örnek kümelerini benzerliklerine göre ayıran Temel Bileşen Analizi “PCA” (Principal Component Analysis), ilaç verilen ve verilmeyen iki grup arasında ciddi farklar olduğunu

göstermiştir (Şekil 4.30). Normalize edilmiş örnek miktarının iki grup arasında dağılımını logaritmik olarak gösteren örnek miktar (sample abundances) grafiği, eksprese edilen protein miktarının gruplar arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.31).



**Şekil 4.31.** Normalize edilmiş örnek miktar grafiği

nLC-MS/MS analizi sonucunda kontrol grubunda 598 master protein tanımlanırken ilaç verilen grupta 438 protein tanımlanmıştır (Ek 1). Venn şeması, tanımlanan proteinlerden 255 tanesinin sadece kontrol grubunda, 95 tanesinin ise sadece ilaç verilen grupta ifade edildiğini göstermiştir. Her iki grupta ortak olarak ifade edilen 343 protein olduğu görülmüştür (Şekil 4.32). Tanımlanan proteinlerden ifadesi en çok artan ve en çok azalan proteinlerin listesi tablo 4.5’te verilmiştir.

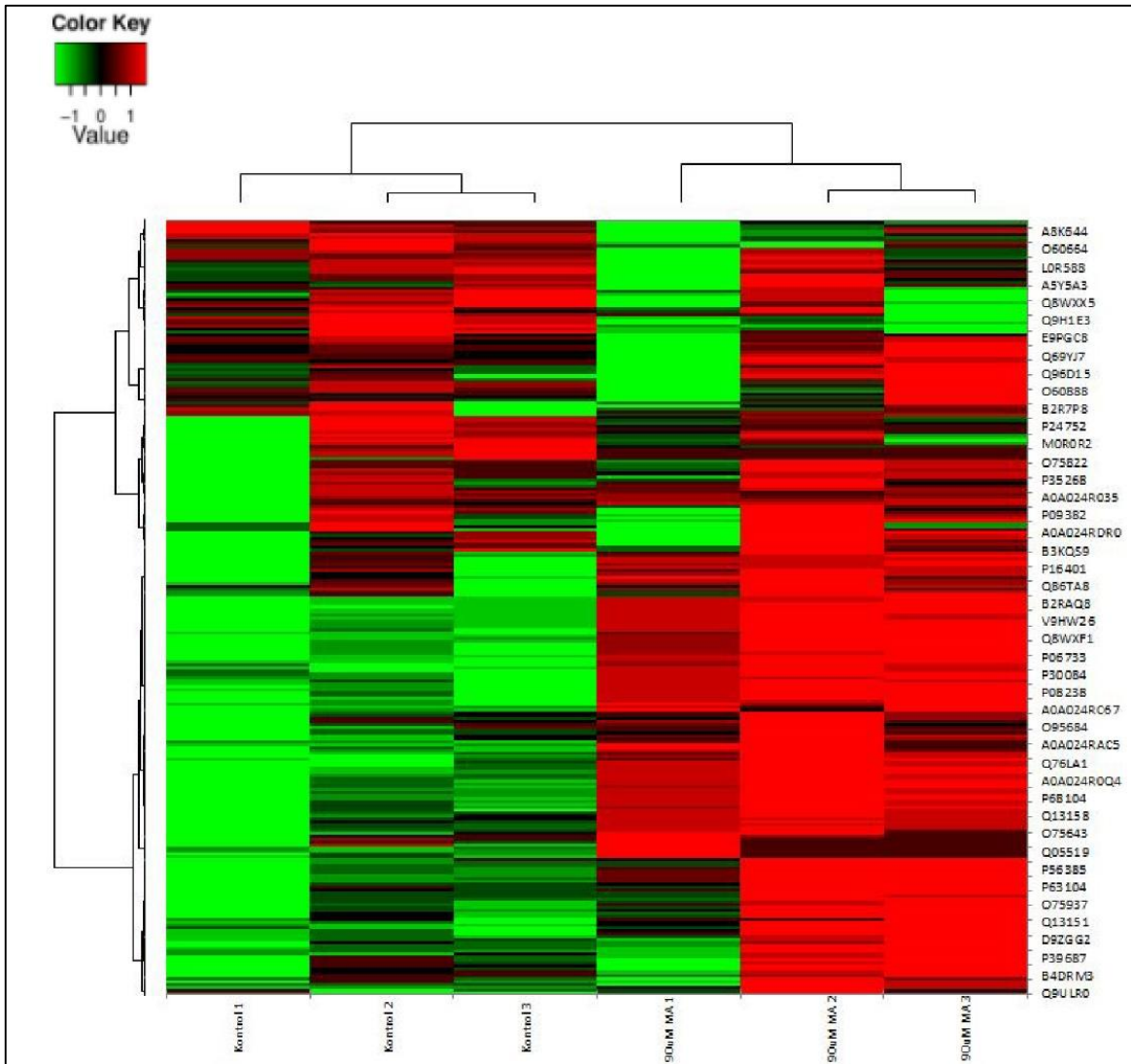


**Şekil 4.32.** nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlere ait Venn şeması

**Tablo 4.5.** nLC-MS/MS analizine göre regülasyonu en çok artan ve en çok azalan proteinler

Erişim no.	Protein Tanımı	Kapsama (%)	# Eşsiz peptit	Kütle kDa	Hesaplanan pI	Regülasyon MA/kontrol
Q9Y5L4	Mitokondriyal import iç membran translokaz alt birim Tim13	15	1	10,5	8,18	↑
P10606	Sitokrom c oksidaz alt birim 5B, Mitokondriyal	9	1	13,7	8,81	↑
P51991	Heterojen nükleer ribonükleoprotein A3	4	1	39,6	9,01	↑
J3KR35	Coiled-coil bölge içeren 12, izoform CRA_a	14	1	20,5	8,47	↑
P62314	Küçük nükleer ribonükleoprotein Sm D1	11	1	13,3	11,56	↓
P49327	Yağ asidi sentazı	1	1	273,3	6,44	↓
P51571	Translokon ilişkili protein alt birim delta	11	1	19	6,15	↓
P24752	Asetil-CoA asetiltransferaz, mitokondriyal	4	1	45,2	8,85	↓
P62701	40S ribozomal protein S4, X izoformu	3	1	29,6	10,15	↓
P17987	T kompleks protein 1 alt birim alfa	1	1	60,3	6,11	↓
Q96G42	Kelch domain-içeren protein 7B	5	1	63,3	9	↓
M0R0R2	40S ribozomal protein S5	4	1	25,3	9,76	↓
P62316	Küçük nükleer ribonükleoprotein Sm D2	8	1	13,5	9,91	↓
P62277	40S ribozomal protein S13	9	1	17,2	10,54	↓
Q9NVM6	DNAJ homolog alt ailesi C üye 17	7	1	34,7	8,53	↓
V9HW77	Epididim lümen proteini 211	4	1	42,6	5,59	↓
Q16864	V-tipi proton ATPaz alt birim F	20	1	13,4	5,52	↓
Q92499	ATP bağımlı RNA helikaz DDX1	3	1	82,4	7,23	↓
M0QXB4	Coatomer protein kompleksi, alt birim epsilon, izoform CRA_	6	1	36,9	5,16	↓

nLC-MS/MS analizi sonucu regülasyonunda farklılık gözlemlenen proteinler için yapılan Heatmap analizi şekil 4.33’de verilmiştir. Sol tarafta gösterilen dendrogram iki kola ayrılarak proteinlerin “regülasyonu artan” ve “regülasyonu azalan” olarak iki sınıfa ayrıldığını göstermektedir. Üst tarafta gösterilen dendrogram, verileri önce iki gruba ayırmıştır. Bunlar, kontrol ve ilaç verilen grupları temsil etmektedir. Bu kolların her iki grupta da tekrar ikiye ayrılması üçer tekrar halinde olan alt gruplardan ikisinin daha çok benzerlik gösterirken üçüncüsünün biraz sapma gösterdiğini ifade etmektedir.

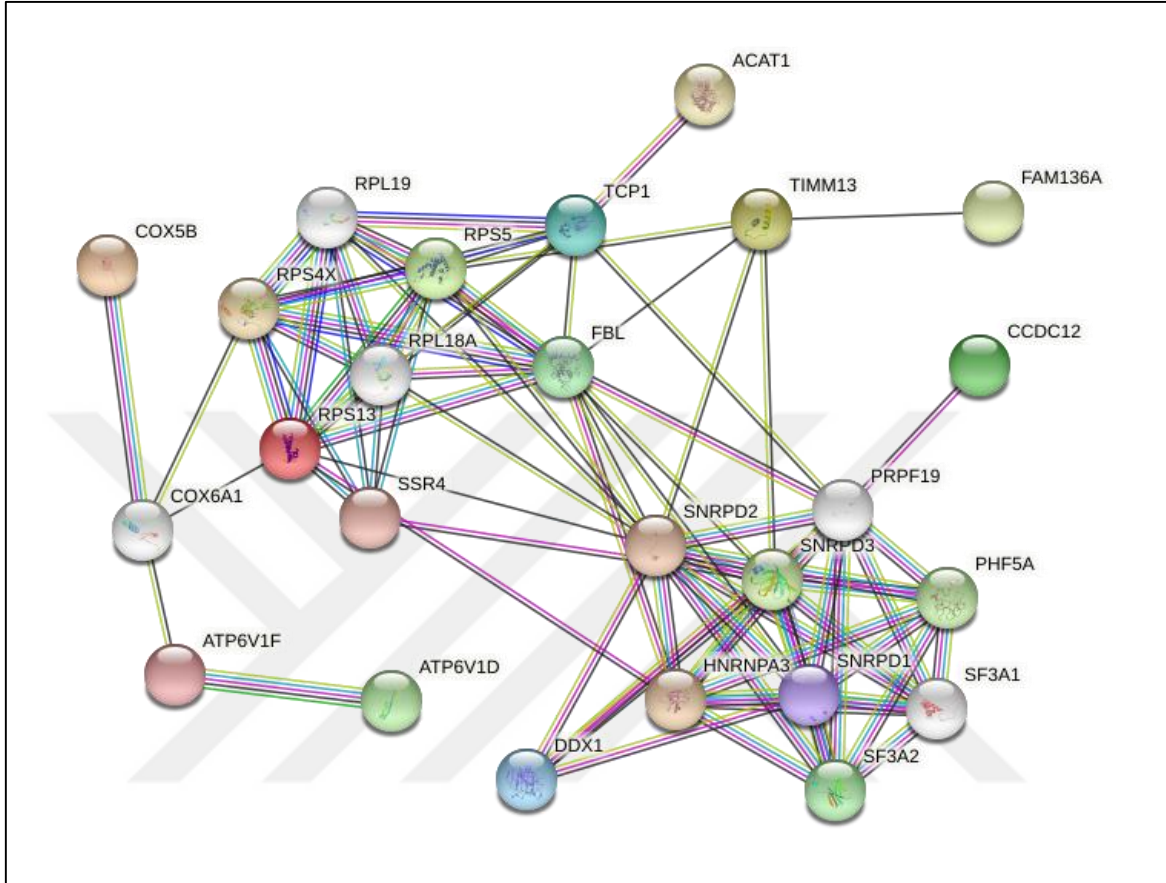


Şekil 4.33. nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin Heatmap analizi

nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerden regülasyon oranı en çok artan ve en çok azalanlar, UniProt erişim numaraları kullanılarak STRING analizine tabi tutuldu. Analiz parametreleri; orta düzeyde güven etkileşimi (interaction score of medium confidence) seçilerek, 1. ve 2. kabuklar için seçilen maksimum etkileşim sayısı 5’den fazla olmayacak şekilde belirlendi. “Hatalı keşif oranı” (False Discovery Rates, FDR)  $10^{-4}$ ’ten küçük olan



veriler dikkate alındığında, özellikle, mRNA metabolik prosesleri (FDR: 2,63e-13), splayozom (FDR: 4,25e-12), mRNA işlenmesi (splicing) (FDR: 2,02e-12) ve oksidatif fosforilasyon (FDR: 3,47e-05) ile ilgili yolların ön plana çıktığı görüldü (Şekil 4.34).



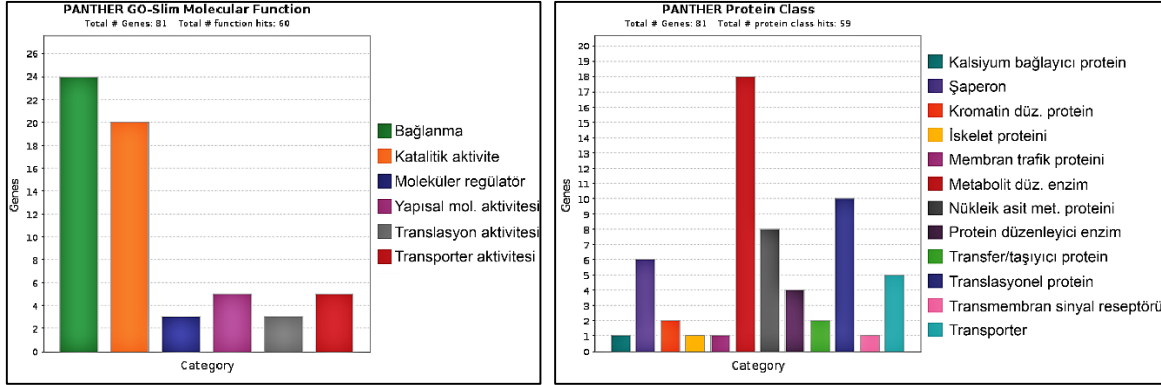
Şekil 4.34. nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin STRING analizi

nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerden regülasyon oranı değişenler PANTHER analizine tabi tutularak farklı fonksiyonel sınıflandırmalara göre değerlendirildiler. Analiz sonuçları, regülasyonu değişen proteinlerden yirmidört tanesinin protein bağlanması ve iyon bağlanması gibi bağlanma aktivitesine, yirmi tanesinin hidrolaz, izomeraz ve oksidoredüktaz gibi çeşitli metabolik olaylarda katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, regülasyonu değişen proteinlerin bir kısmının moleküler regülatör, translyasyon ve transporter aktivitelere sahip olduğu görülmüştür. Protein sınıflarının belirlenmesi için yapılan PANTHER analizi sonucu; kromatin düzenleyici protein, translyasyonel protein, metabolit düzenleyici enzim şaperon başta olmak üzere on iki ayrı protein tipinin regülasyonunun değiştiği görülmüştür (Şekil 4.35).

İki ayrı kütle spektrometrisi yöntemi olan MALDI-TOF/TOF ve nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin farklı veri tabanları kullanılarak yapılan biyoinformatik analizleri



karşılaştırıldığında iki yöntem sonucunda da benzer veriler elde edildiği görülmektedir. nLC-MS/MS ile daha geniş kapsamda protein tanımlanmış olması gruplar arasında daha detaylı bir karşılaştırma yapılabilmesini sağlamıştır.

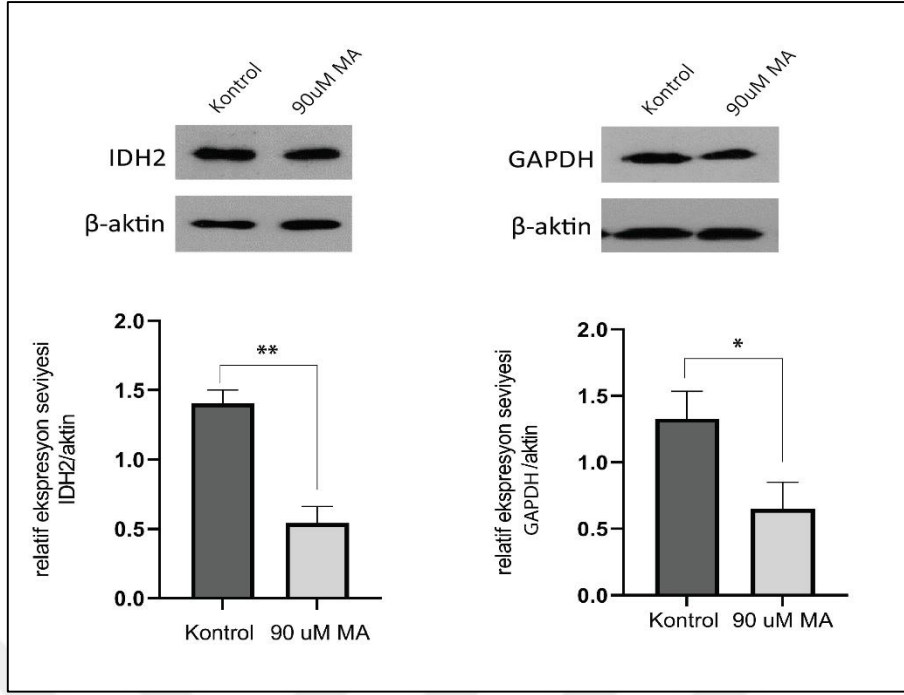


**Şekil 4.35.** nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyon ve protein sınıfını gösteren PANTHER analizi

#### 4.9. MS/MS Verilerinin Western Blotlama ile Doğrulanması

MALDI-TOF/TOF ve nLC-MS/MS verilerinin doğrulanması için tanımlanan proteinlerden bazıları seçilerek WB ile analiz edildi. MALDI-TOF/TOF için Anti-IDH2 (izositrat dehidrogenaz 2) monoklonal antikoru, nLC-MS/MS için anti-GAPDH (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) monoklonal antikoru kullanılarak iki gruba ait proteinlerin seviyeleri karşılaştırıldı. Her iki antikor için housekeeping protein olarak  $\beta$ -aktin kullanılarak normalizasyon yapıldı.

WB ile elde edilen bant intensiteleri ImageJ yazılımı kullanılarak densitometrik analiz ile ölçüldü ve  $\beta$ -aktine göre normalize edildi. Analiz sonuçları her iki proteinin ekspresyon düzeyinin ilaç verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığını göstermiştir ( $P < 0.01$  ve  $P < 0.001$ ). Elde edilen sonuç, MALDI-TOF/TOF ve nLC-MS/MS verilerini doğrulamıştır (Şekil 4.36).



**Şekil 4.36.** Kontrol ve MA uygulanan hücrelerde IDH2 ve GAPDH ifade düzeyi (\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ ).

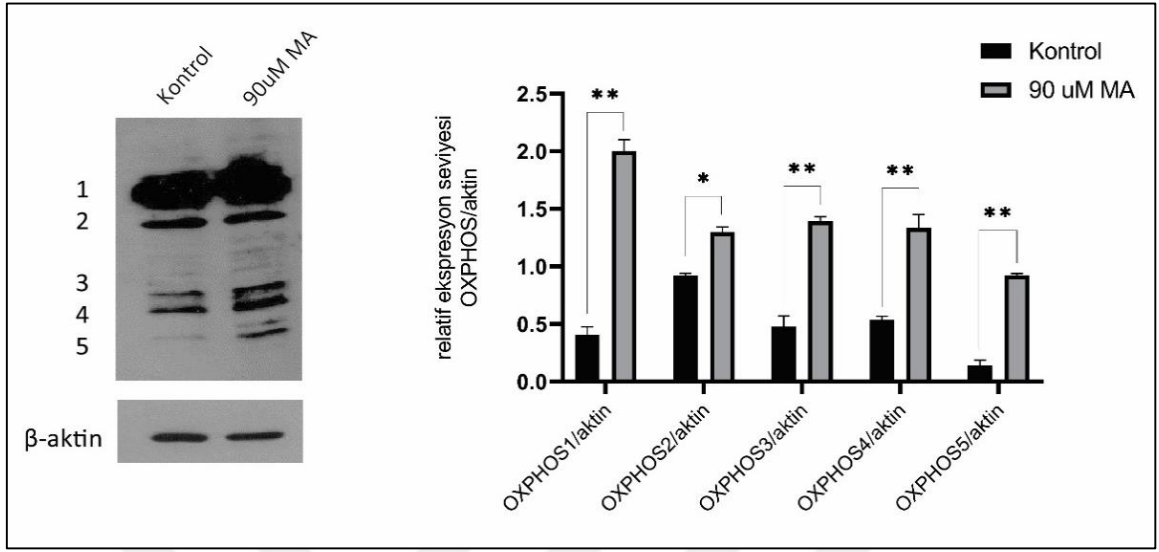
Biyoinformatik analizler sonucu oksidatif fosforilasyon ile ilgili yollarda regülasyon olduğunun görülmesi üzerine oksidatif fosforilasyonda görevli beş proteinin karışımından oluşan anti-OKSFOZ antikoru ile WB analizi yapıldı. Kokteyl antikorun içeriğine dair bilgiler tablo 4.6'da verilmiştir.

**Tablo 4.6.** OKSFOZ antikor kokteyli içeriği

Antikor/protein adı	Moleküler Ağırlık (kDa)
Kompleks I altünite (NDUFB8)	22
Kompleks II altünite (SDHB)	28
Kompleks III altünite Kor 2 (UQCRC2)	48
Kompleks IV altünite II (CoxII)	26
ATP sentaz altünite alfa (ATP5A)	53

ImageJ yazılımı ile bant intensiteleri normalize edilerek karşılaştırıldığında oksidatif fosforilasyonda görevli proteinlerin, istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde ilaç verilen grupta daha yüksek düzeyde eksprese edildiği görüldü. Ayrıca, MALDI-TOF/TOF analiz sonuçlarına bakıldığında antikor kokteyli içerisinde de bulunan UQCRC2'nin ifadesinde

artış olduğu görülmektedir. WB sonucunda da bu proteinin seviyesinde artış görülmesi MALDI-TOF/TOF analizlerimizi bir kez daha doğrular niteliktedir.



Şekil 4.37. Kontrol ve MA uygulanan hücrelerde OKSFOZ proteinlerinin ifade düzeyi (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Meklofenamik Asit ve Topotekanın Tek ve Kombinasyon Tedavisinin DMS114 Hücre Progresyonu Üzerine Etkileri

En ölümcül akciğer kanseri alt tipi olan KHAK, yüksek metastatik potansiyeli nedeniyle çoğu durumda cerrahiye uygun olmayan oldukça proliferatif bir kanser türüdür. KHAK hücreleri geniş çapta moleküler değişikliklerle karakterizedir. Mevcut analiz teknikleri ancak belirli bir tümör örneğindeki en sık görülen mutasyonları tespit edebilmektedir. İntra- ve intertümoral heterojenite, neoplazmaların çeşitli mikro ortamlara ve tedavilere uyum sağlayarak direnç kazanmasını sağlamaktadır (Denninghoff ve ark., 2021). Bu heterojen kanserin farklı yaklaşımlarla daha detaylıca incelenmesi, hedef alınabilecek yolların ve mutasyonların keşfinin önünü açarak bireyselleştirilmiş tedavide yeni umutlar sağlayacaktır.

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların farmakokinetik kısıtlamaları ve istenmeyen yan etkileri nedeniyle daha farklı anti-kanser ajanların geliştirilmesi her zaman dikkat çekici olmuştur. Steroidler, nonsteroid anti-enflamatuar ilaçlar, flavonoidler, doğal polifenoller gibi tıbbi ajanlar kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanıldığında kanser hücrelerinde toksisiteyi arttırarak tedaviye destek sağlayabilirler (Mokhtari ve ark., 2017; Saputra ve ark., 2018). Çeşitli çalışmalar, hem tek bir ajan olarak hem de kemoterapi ile kombinasyon halinde KHAK'da moleküler olarak hedeflenen tedavilerin rolünü incelemiştir. Ne yazık ki, bu çalışmaların çoğu, moleküler olarak seçilmiş hasta popülasyonlarında gerçekleştirilmediğinden, tam bir başarıya ulaşamamıştır. Test edilen hedefe yönelik tedaviler arasında anti-anjiyogenez ilaçlar, apoptozu ve hücre sinyal yollarını hedefleyen maddeler yer almaktadır (Langer ve ark., 2014; Pujol ve ark., 2015; Belani ve ark., 2016 )

En çok görülen RNA modifikasyonu olan m6A modifikasyonlarının, son yıllarda, kanser gelişiminde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. m6A modifikasyonlarında yer alan ve demetilaz aktivitesine sahip FTO'nun; glioblastoma, AML ve skuamöz hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde anormal miktarda m6A modifikasyonlarına neden olarak tümör gelişimine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2018). KHAK'da ise m6A modifikasyonlarıyla ilgili herhangi bir çalışma olmadığı görülmüştür. FTO'yu seçici olarak inhibe etme özelliğine sahip MA, m6A modifikasyonlarıyla ilgili

yapılan bazı çalışmalarda kullanılmaktadır. Bir NSAİİ olan MA ile FTO inhibisyonundan bağımsız olarak yapılan kanser çalışmaları da bu ilacın anti-kanser etkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca, MA'nın cisplatin ve simvastatin gibi bazı diğer ilaçlar ile kombine kullanımının farklı kanser türlerinde etkisi araştırılmış ve kombinasyon tedavisinin daha yüksek toksisiteye neden olduğu gösterilmiştir (Sekine ve ark., 2018; Wen ve ark., 2020). MA'nın; gerek FTO'yu baskılama yoluyla, gerekse bu mekanizmadan bağımsız olarak çeşitli kanser türlerinde anti-kanser etkisi olduğunun belirtilmesi, mevcut çalışmamız için bu ilacı seçmemize neden olmuştur. MA'nın tek başına ve bir kemoterapi ilacı olan topotekan ile birlikte kullanılmasının KHAK hücre hattı olan DMS114 hücrelerinin canlılığına, apoptozuna, hücre döngüsüne ve invazyonuna olan etkileri farklı teknikler kullanılarak araştırılmıştır.

TMT yöntemi ile yapılan canlılık analizleri, MA ve TPT'nin artan konsantrasyonlarının doza ve zamana bağlı olarak DMS114 hücrelerinde artan toksisiteye neden olduğunu göstermiştir. Kullanılan konsantrasyonların, sağlıklı akciğer hücre hattı olan MRC5 hücrelerine ise toksik etkisi olmadığı görülmüştür. Bu veri, her iki ilacın belirlenen konsantrasyonlarının *in vitro* çalışmalarda güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Her iki ilacın canlılık analizleri sonucu elde edilen veriler doğrultusunda kombinasyon çalışmalarında kullanılacak konsantrasyonlar belirlenmiştir. Compusyn yazılımı ile elde edilen CI değerlerine göre 24 saat süreyle 60 µM MA + 5 nM TPT, 48 saat süreyle 60 µM MA + 5 nM TPT ve 60 µM MA + 10 nM TPT kombinasyonlarının sinerjetik etkiye sahip olduğu görülmüştür. DRI değerleri de göz önünde bulundurulduğunda 48 saat kombinasyon tedavisinin daha etkin olduğu görülmüştür. Ayrıca, TMT analizi ile kombinasyon uygulamalarının da sağlıklı hücrelere toksik olmadığı gösterilmiştir.

İlaçların tek tek ve kombinasyon uygulamalarının hücre apoptozuna etkisi Annexin V analizi ve AO/PI boyama teknikleri ile araştırılmıştır. Sinerjetik etki görülen gruplar arasından 60 µM MA + 10 nM TPT kombinasyonunun apoptotik hücre ölümünü diğer gruplara kıyasla daha fazla artırdığı görülmüştür. AO/PI boyaması her iki ilacın; nükleer parçalanma, apoptotik veziküller ve hücre büzüşmesi gibi apoptozla ilişkili tipik morfolojik değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Kombinasyon tedavisi uygulanan gruplarda, özellikle; hücre büzüşmesi, vakuoler sitoplazma ve nükleer parçalanmanın daha fazla olduğu ve genel morfolojinin ve sitoplazma-çekirdek oranının daha çok bozulmuş olduğu görülmüştür. Yapılan hücre apoptoz deneyleri, kombinasyon ilaç uygulamasının tek başına ilaç uygulamaya göre apoptotik hücre ölümünü daha çok tetiklediği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

MA'nın tek başına ve TPT ile kombinasyonunun hücre döngüsüne etkisi analiz edildiğinde hücrelerin büyük çoğunluğunun G0/G1 fazında yoğunlaştığı görülmüştür. Ancak, bu yoğunlaşmanın kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede farklı olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, kullanılan ilaçların hücre döngüsüne çok fazla etki etmeden başka bir mekanizma yoluyla hücreleri apoptoza götürdüğünü ima ediyor olabilir. Hücre döngüsü kontrolünde önemli role sahip olan p53, p73 ve RB'nin KHAK'da çoğunlukla mutasyona uğradığı bildirilmiştir (George ve ark., 2015). Kullandığımız hücre hattı olan DMS114 ile ilgili veriler kontrol edildiğinde bu hücre hattında p53'ün mutant olduğu görülmüştür. Bu durum apoptotik hücre ölümlerinin başka bir mekanizma üzerinden olabileceği hipotezini kuvvetlendirmiştir. “5.2. Meklofenamik asitin DMS114 hücre proteomu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi” kısmında detaylıca anlatıldığı üzere MA uygulaması neticesinde hücrelerin apoptozdan kaçmaya ve yeni ortama uyum sağlamaya çalıştığına dair bulgular elde edilmiştir. KHAK'da heterojenitenin, hücrelerin tedavilere uyum sağlayarak direnç kazanmasını sağladığından ise bu bölümün başında bahsedilmişti. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, hayatta kalarak çoğalmaya devam eden hücrelerin olması, bu hücrelerin popülasyonda baskın hale gelerek G0/G1 fazında yoğunlaşmanın kontrole kıyasla çok farklı gözükmemesine neden olmuş olabilir. Bu varsayım, KHAK'da tedaviye direncin küçük bir göstergesi olarak dikkatleri üzerine çekmektedir.

MA'nın tek başına ve TPT ile birlikte kullanımının DMS114 hücre invazyonuna etkisi Matrigel İnvazyon Odacık Sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler MA'nın kanser hücre invazyonuna önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir. TPT ise tek başına ve MA ile birlikte uygulandığında invazyonu anlamlı derecede azaltmıştır. KHAK'da metastaz ve invazyon kapasitesinin ne kadar yüksek olduğu ve tedavinin ise ne kadar başarısız kaldığı göz önünde bulundurulduğunda (Tjong ve ark., 2020) invazyon kapasitesinde neden anlamlı bir azalma olmadığı anlaşılır hale gelmektedir. Genetik olarak tasarlanmış yeni fare modelleri ve hasta kanından toplanan “dolaşan tümör hücreleri” (circulating tumor cells) gibi yöntemlerden faydalanılarak yapılacak ileri çalışmalarla bu mekanizmaların aydınlatılması KHAK tedavisinde olası yeni hedeflerin bulunmasına katkı sağlayacaktır.

MA ve TPT kombinasyonu ile ilgili yapılan *in vitro* fonksiyonel analizler, iki ilacın birlikte kullanımının sinerjetik etki oluşturarak toksisiteyi artırdığını göstermiş ve ileri çalışmalarla desteklendikten sonra olası bir tedavi yöntemi olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir.

## 5.2. Meklofenamik Asitin DMS114 Hücre Proteomu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamız kapsamında, MA uygulanan DMS114 hücrelerinde proteomik analiz tekniklerinden faydalanarak ifadeleri farklı şekilde düzenlenen proteinler tanımlanmış ve biyoinformatik araçlar kullanılarak bu proteinlerin KHAK mekanizmasında sahip olabileceği etkiler araştırılmıştır.

Proteomik çalışmalarına başlamadan önce, MA'nın hücre canlılığını 24, 48 ve 72 saat sonunda, %50 civarına düşürdüğü konsantrasyonları kullanılarak DMS114 hücrelerinin m6A miktarındaki değişiklikler belirlenmiştir. MA'nın demetilaz olan FTO'yu inhibe ettiği bilindiğinden ilaç uygulamasının m6A seviyesinde artışa neden olması beklenmekteydi. En çok artışın 24 saat boyunca 90 µM MA uygulaması sonucunda olduğu görülmüş ve bunun üzerine proteomik çalışmalarda bu inkübasyon süresi ve konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir. Çalışmalar iki ayrı kütle spektrometri tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir: MALDI-TOF/TOF ve LC-MS/MS. MALDI-TOF/TOF analizi için proteinler 2DE yöntemi ile izolektirik noktalarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırıldıktan sonra regülasyonu değişen protein spotları belirlenmiş ve jel içi triptik kesim ile kesilen proteinler tanımlanmıştır. LC-MS/MS analizi için ise proteinler solüsyon içi triptik kesime tabi tutularak peptitlerine ayrıldıktan sonra bu sistem kullanılarak tanımlanmışlardır. Her iki yöntem ile tanımlanan proteinlerden ifade düzeyleri anlamlı şekilde değişenler biyoinformatik analiz veritabanları kullanılarak analiz edilmişlerdir.

Regülasyonu değişen proteinlerin PANTHER analizi bu proteinlerin büyük kısmının; protein/iyon bağlanması gibi bağlanma aktivitesine ve hidrolaz, izomeraz ve oksidoredüktaz gibi çeşitli metabolik olaylarda katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, regülasyonu değişen proteinlerin bir kısmının ise moleküler regülatör, translasyon ve transporter aktivitelere sahip olduğu görülmüştür. Protein sınıflarının belirlenmesi için yapılan PANTHER analizi sonucu; kromatin düzenleyici protein, translasyonel protein, metabolit düzenleyici enzim şaperon başta olmak üzere oniki ayrı protein tipinin regülasyonunun değiştiği görülmüştür. Bu tür bir protein çeşitliliği, MA uygulamasının hücreleri bir bütün olarak etkilediğini ima etmektedir. Ayrıca bu çeşitlilik, KHAK'da tedaviye direncin çok fazla olmasının koordineli hücresel olayların neticesinde meydana geldiğini de gösteriyor olabilir.

STRING analizi sonucu farklı yollar ile ilgili regülasyonlar olduğu görülmüştür. Enerji metabolizması, RNA uçbirleştirme ve işlenmesi, protein düzenlenmesi ve yıkımı ile

ilgili düzenlemelerin hem MALDI-TOF/TOF, hem de LC-MS/MS verilerinin analizi sonucu en çok öne çıkan regülasyonlar olduğu görülmüş ve aşağıda her biri tek tek detaylıca ele alınmıştır.

***Enerji metabolizması ile ilgili regülasyonlar:***

Proteomik verilerin STRING analizi sonucu glikoliz, TCA döngüsü ve oksidatif fosforilasyonun (OKSFOS) regülasyonu ile ilişkili bulgular olduğu görülmüştür. Glikolitik yollarda rol alan aldolaz A (ALDOA), gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), enolaz 1 (ENO1), pirüvat kinaz izoenzim M2 (PKM2) ve laktat dehidrogenaz A (LDHA) ifadelerindeki azalma glikoliz ile ilgili bir düzenlemeye işaret etmektedir. Bu proteinlerin çeşitli kanser türlerinde tümör oluşumu, hücre proliferasyonu, migrasyonu ya da apoptozu üzerinde etkileri olduğuna dair çalışmalar mevcuttur.

Glikolitik yolda anahtar bir enzim olan ALDOA, fruktoz-1, 6-bifosfatın (FBP) gliseraldehit-3 fosfata (G3P) ve dihidroksiaseton fosfata (DHAP) tersine çevrilebilir dönüşümünü katalize etmektedir. ALDOA'nın KHDAK, pankreas kanseri ve gastrik kanserde yüksek derecede ifade edildiği ve bir onkogen rolüne sahip olabileceği bildirilmiştir (Ji ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2018). ALDOA'nın hepatoselüler karsinomada (HSK), transkripsiyon sonrası düzenleme yoluyla, FTO aracılı m6A modifikasyonu ile indüklendiğinin belirtildiği bir çalışmada, m6a metilasyon mekanizmasında rol alan METTL3, METTL14, FTO ve ALKBH5 genleri susturulmuştur. FTO susturulmasının ALDOA'nın ifadesini önemli derecede azalttığı ve m6A modifikasyonunun FTO aracılı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada, HSK'da ALDOA susturulmasının hipoksi altında hücre büyümesini inhibe ettiği ve tümör büyümesinin gecikmesine ve *in vivo* ve *in vitro* olarak migrasyonun baskılanmasına yol açtığını göstermiştir (Niu ve ark., 2021). Bu verilerden yola çıkarak, çalışmamızda, MA'nın FTO inhibisyonu yaparak ALDOA ifadesinde azalmaya neden olduğu ve böylelikle hücre büyümesinde yavaşlamaya neden olduğu varsayılabilir.

GAPDH, NAD<sup>+</sup> 'nın NADH'ye indirgenmesiyle gliseraldehit-3-fosfatı 1,3 bifosfogliseraata dönüştürerek glikolitik yoldaki redoks reaksiyonunu katalize eden anahtar bir enzimdir. Bir house-keeping protein olarak kabul edilen GAPDH, yaygın olarak western blotlama ve RT-PCR analizlerinde referans protein olarak kullanılmaktadır. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar, GAPDH'nin enzimatik olmayan rollerle çeşitli fonksiyonlara sahip olabileceği ve hücresel dağılımının sitoplazma, hücre zarı ve nükleusta farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir (Liu ve ark., 2017). Bu proteinin yüksek oranda ifadesinin adenokarsinoma, kolon kanseri ve kolorektal kanserde, kanser progresyonu ile



ilişkili olduğu düşünülmektedir (Epner ve ark., 1993; Tang ve ark., 2012; Tarrado-Castellarnau ve ark., 2017). Kolon kanserinde GAPDH'nin susturulması hücrelerin EMT (epitel mezenkimal tranzisyonu) fenotipini önemli ölçüde ortadan kaldırmış, *in vitro* hücre göçünü ve invazyonunu, *in vivo* tümör metastazını inhibe etmiştir. Araştırmacılar, GAPDH'nin, en azından kolon kanserinde, metastazı tetiklemede önemli bir rol oynayabileceğini savunmuşlardır (Liu ve ark., 2017). Bu veriler, MA uygulaması sonucu DMS114 invazyon kapasitesindeki azalmada GAPDH seviyesindeki düşüşün rolü olabileceğini düşündürmektedir.

ENO, glikolitik yolda 2-fosfo-D-gliseratın fosfoenolpiruvata dehidrasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir. ENO izoformlarından biri olan ve memelilerde neredeyse her tür dokuda ifade edilen ENO1, fizyolojik ve patolojik süreçlerde çok çeşitli rollere sahiptir. ENO1'in retionoblastoma, HSK ve pankreas kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde yüksek düzeyde ifade edildiği ve kötü prognoz ve düşük sağkalım süresi ile ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir. ENO1'in akciğer kanser hastalarından alınan doku örneklerinde de yüksek düzeyde ifade edildiği ve kanser hücrelerinin proliferasyonunda ve hayatta kalmasında rolü olduğu belirtilmiştir. Yapılan mekanik analizler, ENO1'in G1 hücre fazına geçişi hızlandırarak ve siklin-bağımlı kinaz 6'nın (CDK6) ifadesini artırarak proliferasyonu tetiklediğini göstermiştir. MAPK kaskadındaki p38'i ve AKT kaskadındaki p-AKT'yi yüksek düzeyde ifade ederek ise hayatta kalımı artırdığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2020). Bu bilgiler, MA uygulamasının ENO1 düzeyinde azalmaya neden olarak proliferasyonun yavaşlaması ve hücre ölümleriyle ilişkisi olabileceğini ima etmektedir.

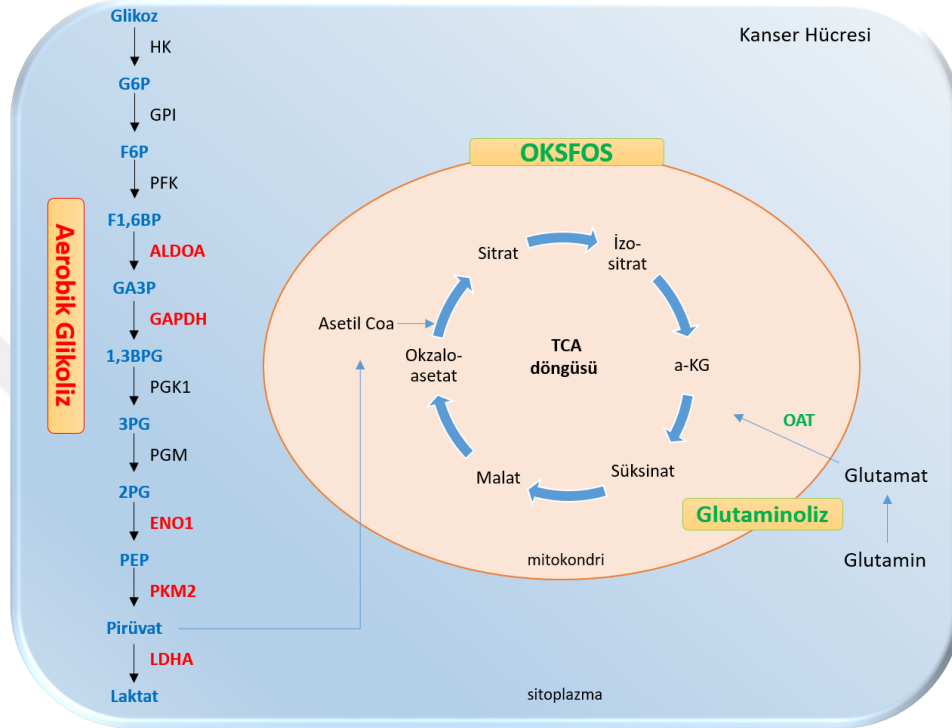
Hız-sınırlayıcı glikolitik enzim olarak kabul edilen pirüvat kinaz (PKM), fosfoenolpiruvatın pirüvata dönüşümünü katalize etmektedir. PKM, farklı biyolojik fonksiyonlar ve sonuçlar sergileyen çeşitli izoformlarda bulunur. PKM2, anahtar sinyal yollarının düzenlenmesi yoluyla hücre büyümesini ve hayatta kalmayı kontrol eder. PKM2'nin metabolik düzenleyici rolünün yanı sıra protein tirozin kinaz görevi görerek ve metabolik yeniden programlama yoluyla tümör oluşumuna ve büyümesine katkıda bulunduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Çok sayıda protein, PKM2 için bir substrat olarak tanımlanmıştır ve bunların çoğu, kanser hücresi büyümesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. PKM2'nin kanser hücrelerinin apoptotik ölümünde rol oynadığına dair çalışmalar bu proteinin yüksek miktarda ifadesinin apoptozu azalttığını göstermiştir. Bu çalışmalarda, PKM2 susturulduğunda apoptozun indüklendiği belirtilmiştir (Zahra ve ark., 2020). Li ve ark. HSK'da m6A demetilaz FTO'nun, PKM2 demetilasyonuna aracılık ederek tümör oluşumunu desteklediğini öne sürmüşlerdir. Çalışmada, HSK'da yüksek düzeyde

ifade edilen FTO'nun, PKM2 demetilasyonunu artırarak mRNA ve protein seviyesinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda, HSK hastalarında artmış FTO seviyesinin PKM2 seviyesinin artmasına neden olarak tümörünezi hızlandırdığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2019). Çalışmamızda, Annexin V analizi ve AO/PI boyaması ile MA'nın hücrelerde apoptotik ölüm meydana getirdiği tespit edilmişti. MA'nın bir FTO inhibitörü olduğu düşünüldüğünde, PKM2 protein düzeyinin m6A metilasyonunun artması sonucu azaldığı ve bu azalmanın apoptozu tetikleyen faktörlerden biri olduğu varsayımı çıkarılabilir.

Glikoliz sürecindeki kritik enzimlerden biri olan LDHA, NADH yardımıyla piruvatın laktata dönüştürülmesinden sorumludur. Hipoksik koşullar altında esas olarak iskelet kası, karaciğer ve lenfatik dokuda ifade edilir ve normoksi ortamında çok az ekspresyonu vardır. LDHA'nın, hipoksik ortam ve mitokondriyal gen mutasyonunun bir sonucu olarak çeşitli kanser hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2012; Di ve ark., 2018). Artmış LDHA, kanser hücresinin çoğalması için ATP üretimini hızlandırmakla kalmaz, aynı zamanda glikolizin devamı için NAD<sup>+</sup>'yi de yeniden oluşturur. Artmış LDHA ifadesi, hücre dışı matriks degradasyonu ve anjiyogenez için önemli olan laktat üretiminin artmasına neden olarak kanser metastazına katkıda bulunmaktadır (Wang ve ark., 2012). Hou'nun 2019'daki çalışmasında, oral skuamöz hücreli karsinomda, FTO'nun LDHA ifadesinde artışa neden olduğu ve böylelikle glikoliz ve invazyonu desteklediğini bildirilmesi (Hou, 2019) çalışmamızda LDHA seviyesinin, MA ile FTO baskılanması sonucu azalmış olduğunu destekler nitelikte gözükmektedir. LDHA'nın, ayrıca, meme kanseri ve glioma gibi bazı kanser türlerinde apoptoz ile de ilişkili olduğu belirtilmiştir. Meme kanserinde LDHA susturulmasının mitokondriyal apoptotik hücre ölüm yolacağını indüklediği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2012). Glioma hücrelerinde ise LDHA susturulmasının, azalmış siklin D1 ve artmış PARP kesimine neden olarak apoptozu desteklediği gösterilmiştir (Di ve ark., 2018). Bu veriler ışığında, çalışmamızda, MA'nın FTO'yu baskılayarak LDHA düzeyinde azalmaya neden olduğu ve böylelikle apoptotik hücre ölümlerinde ve invazyon kapasitesindeki azalışta payı olabileceği düşünülebilir.

Glikolitik yolaktaki regülasyonu değişen proteinleri (Şekil 5.1) bir bütün olarak ele aldığımızda, literatürdeki verilerden yola çıkarak, bazı proteinlerin (ALDOA, PKM2, LDHA) ifadesindeki azalmanın MA uygulamasına bağlı olarak m6A metilasyonlarındaki regülasyonlarla ilgili olabileceği görülmektedir. GAPDH ve ENO1'da m6A metilasyonu ile ilgili literatür verisi bulunmamasına karşın bu proteinlerin kanserdeki rolü ile ilgili pek çok yayın olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, m6A metilasyon mekanizmasına bağlı ya da bu

mekanizmadan bağımsız olarak da olsa bahsi geçen proteinlerin düzeyinde azalma olması MA uygulaması sonucu glikolizin azalmış olabileceğine işaret etmektedir. Bu proteinlerin kanser hücrelerinde proliferasyon, migrasyon, invazyon ve apoptozla ilgili düzenlemelerde rolleri olduğunun belirtilmesi de deney sonuçlarımızda görülen apoptotik hücre ölümlerini ve invazyon kapasitesindeki azalmayı dolaylı da olsa açıklar niteliktedir.



**Şekil 5.1.** Enerji metabolizması Kırmızı ve yeşil renkler, sırasıyla, aktivitesi azalan ve artan proteinleri/prosesleri göstermektedir. (HK: Hekzokinaz, GPI: Fosfoglukozomeraz, PFK: Fosfofruktokinaz, ALDOA: Aldolaz A, GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, PGK1: Fosfogliserit kinaz1, PGM: Fosfogliserat mutaz, ENO1: Enolaz1, PKM2: Piruvat kinaz2, LDHA: Laktat Dehidrogenaz A, OAT: Ornitin aminotransferaz)

Kanser hücrelerinin, benzersiz biyolojileri için metabolik ihtiyaçlarla nasıl başa çıktığını anlamak, uzun yıllardır kanser araştırmalarının odak noktası olmuştur. Bu araştırmaların dönüm noktası Otto Warburg'un çalışması olarak kabul edilmektedir. Kanser hücrelerinin oksijen seviyesinin iyi olduğu ortamda bile daha fazla glikoz tükettiği ve yüksek miktarda laktat ürettiği bildirilmiş ve bu durum, aerobik glikoliz ya da Warburg etkisi olarak isimlendirilmiştir (Warburg, Wind ve Negelein, 1927; Warburg, 1956). Normal farklılaşmış hücreler, glikozun mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu ile ATP üretimini maksimize ederken, kanser hücreleri aerobik glikoliz yoluyla glikozdan çok daha az ATP üretir. Aerobik glikolizdeki artış ile glikolitik ara ürünlerin hücresel yapı bloklarının (nükleotit, amino asit, lipid) biosentezi için kullanılmasını sağlarken aynı zamanda ATP üretilmiş

olur. Bir diğ er deyiş le aerobik glikoliz/ Warburg etkisi ile kanser hücrelerinin enerji talebi karşılanırken, proliferasyonun ve büyümenin hızlanması için artan makromolekül ihtiyacı karşılanmış olur. Sonuç olarak kanser hücrelerinde glikoz alımı ve laktat üretimi artmış olur (Vander Heiden, Cantley ve Thompson, 2009).

Glikolizin kanser hücrelerinde böylesi bir öneme sahip olduğunun bilinmesi, glikoliz baskılanmasının kanser tedavisinde hedef olarak kullanılabilceğ i düşüncesini beraberinde getirmiştir. Birçok prelinik ve klinik çalışmada glikolitik enzim inhibitörleri tek başına veya kemoterapi ilaçları ile kombine olarak test edilmiş ve edilmeye devam etmektedir. Glikolizin farklı ajanlar kullanılarak baskılandığı çeşitli çalışmalarda, baskılanmanın tümör progresyonunu yavaşlattığı ve apoptozu indüklediğ i belirtilmiştir. Bu ajanların kombine kullanımının ise kemoterapi etkinliğini artırdığı bildirilmiştir (Samec ve ark., 2020). Ancak, ne yazık ki, son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda glikoliz baskılanmasının her kanser türünde aynı etkiyi göstermeyebileceğ i, baskılanma sonucu metabolizmanın mitokondriyal solunuma/enerji üretimine doğru yeniden programlanabileceğ i bildirilmiştir. Kanser hücrelerinin, değ iş en çevre koşullarında hayatta kalabilmek için gereken enerji ve metabolit üretimini mitokondriyal fonksiyonların regülasyonunu artırarak karşılayabilecekleri bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Pusapati ve ark., 2016; Boudreau ve ark., 2016; de Padua ve ark., 2017; Shiratori ve ark., 2019).

Yakın zamanda araştırmacılar, heterojen popülasyona sahip tümörlerde, glikolitik ve oksidatif tümör hücrelerinin arasında metabolik bir simbiyoz olduğ unu ve karşılıklı olarak enerji metabolizmalarını düzenlediklerini bildirmişlerdir. Hipoksik kanser hücrelerinin glikolitik metabolizma için glikoz kullandığı ve oksijenli ortamdaki kanser hücreleri tarafından kullanılan laktatı oluşturduğ u ö ne sürülmüştür (Faubert ve ark., 2017). Bu çalışma, Warburg etkisine meydan okur niteliktedir, çünkü Warburg, fermantasyonun mitokondrinin geri dönüşü olmayan hasarı neticesinde kanserin temel bir nedeni olduğ unu iddia etmiştir. Bununla birlikte, son çalışmalar, kanser hücresindeki mitokondrilerin, oksidatif fosforilasyon yaparak aktif fonksiyona sahip olduğ unu ortaya koymuştur (Weinberg ve Chandel, 2015; Vyas, Zaganjor ve Haigis, 2016; Kim, 2018). Bu durum, glikolizin baskılanması neticesinde mitokondriyal regülasyonların nasıl değ iş ebildiğ ini ve OKSFOS'un nasıl artabildiğ ini açıklamaktadır. Yani, Warburg'un hipotezinin aksine kanser hücrelerinde mitokondriyal fonksiyonlar aktivitesini korumaya devam edebildiğ i ve ihtiyaç durumunda bu aktiviteleri artırabildiğ i düşünölmektedir. Bu hipotez, mevcut çalışmamızın sonuçlarını aydınlatmakta bize yardımcı olmaktadır. Zira biyoinformatik analizler, MA

uygulanması sonucunda OKSFOS yolları ile de ilgili regülasyonlar olduğuna işaret etmiştir.

STRING analizimiz sonucunda OKSFOS yolları/mitokondriyal aktivite ile ilgili regülasyonlarda öne çıkan proteinlerin Sitokrom b-c1 kompleks alt birim 2 (UQCRC2) ve sitokrom c oksidaz alt birim 5B (COX5) olduğu görülmüştür. Her iki proteinin de, ifadesi artan proteinlerden olduğu bulgular kısmında gösterilmiştir. Ayrıca, mitokondriyal importta görevli olan mitokondriyal import iç membran translokaz alt birimi Tim13 (TIMM13) düzeyindeki artış, belirtilen düzenlemeler için mitokondriye gerekli proteinlerin taşındığını işaret ediyor olabilir. Mitokondriyal zarlar arası şaperon görevi gören TIMM13, bazı çok-geçişli transmembran proteinlerin mitokondriyal iç zara aktarılması ve eklenmesinde önemli role sahiptir (Roesch ve ark., 2004). Tüm bulgular bir bütün olarak değerlendirildiğinde, biyoinformatik analiz sonuçları, bahsedilen regülasyonlar ile mitokondriyal aktivitenin arttığına işaret etmektedir. Bu veriler, MA uygulaması sonucu DMS114 hücrelerinin metabolik yeniden programlamaya gittiği hipotezini düşündürmüştür.

Mitokondrilerdeki OKSFOS mekanizması, beş farklı enzim kompleksinden oluşur: Kompleks I (NADH: ubikinon oksidoredüktaz), kompleks II (süksinat dehidrojenaz), kompleks III (sitokrom b-c1 kompleksi), kompleks IV (sitokrom c oksidaz, COX) ve kompleks V (ATP sentaz). UQCRC2, kompleks III'ün alt birimlerinden biridir ve kritik role sahiptir. UQCRC2'nin bir onkogen veya bir tümör baskılayıcı gen olarak birçok tümörde yer aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Anormal UQCRC2 ekspresyonu, kolorektal kanser (Shang ve ark., 2018), meme kanseri (Putignani ve ark., 2012) ve testis kanseri (Panner, Agarwal ve Pushparaj, 2019) gibi çeşitli kanserlerin invazyonu ve metastazı ile ilişkilendirilmiştir. Enzim kompleksleri arasında, dördüncü kompleksi oluşturan sitokrom c oksidazın (COX) ana düzenleyici protein olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda COX'taki alt birimlerin kusurları veya anormal ifadeleri, kolorektal kanser, glioma, meme ve hepatom dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde klinik prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Chu ve ark., 2020). UQCRC2 ve COX5B'nin, bir m6A yazıcı protein olan Mettl3'ün baskılanması sonucu ifadesi azalan proteinlerden olduğu bildirilmiştir (Yue ve ark., 2018). Bu bulgu, UQCRC2 ve COX5B protein aktivitelerinin düzenlenmesinde m6a modifikasyonlarının rolü olduğuna işaret etmektedir. Daha önce anlatıldığı üzere FTO ve Mettl3 birbirine zıt fonksiyonlara sahiptir (m6A silici-yazıcı). Her ne kadar FTO'nun bu proteinler ile ilişkisini inceleyen çalışma bulunmasa da, UQCRC2 ve COX5B protein ifadelerinin artmasının FTO baskılanması ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Bu varsayımın desteklenmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir, ancak, sonuç olarak MA uygulaması sonucu, direkt ya da dolaylı

da olsa her iki proteinin seviyesinde artış olduğu net bir şekilde görülmüştür. Belirtilen artışların, OKSFOS düzeyinde bir artışa neden olabileceği düşünüldüğü için WB yöntemi ile ileri araştırmalar yapılmıştır. OKSFOS mekanizmasında yer alan kompleksleri içeren “Total OKSFOZ İnsan WB Antikor Kokteyli” ile yapılan WB deneyi neticesinde beş proteinin düzeyinde de anlamlı derecede artış olduğu görülmüştür. Elde ettiğimiz veriler, OKSFOS’un arttığı yönündeki bulgularımızı doğrular nitelikte olmuş ve ilaç uygulaması neticesinde hücrelerin enerji metabolizmasında değişiklik/yeniden programlama olduğuna dair görüşümüzü kuvvetlendirmiştir.

Glikolitik yolak aktivitesinde azalma olurken OKSFOS aktivitesinde artış olduğu hipotezi, dikkatimizi metabolit ve OKSFOS için NADH akışını sağlayan sitrik asit döngüsüne yöneltmemize neden olmuştur. Kanser hücrelerinde sitrik asit döngüsüne (TCA) metabolit akışı iki ana mekanizma üzerinden gerçekleşir: piruvattan oksaloasetat üreten pirüvat karboksilasyonu ve glutaminden a-ketoglutarat (a-KG) üreten glutaminoliz (Şekil 5.1). Kanser hücrelerinin; glikolitik yolak baskılandığı zaman, üretilen pirüvat miktarında azalma olduğu göz önünde bulundurulduğunda, sitrik asit döngüsünü sürdürebilmek için glutamin metabolizmasını daha aktif hale getirebildiği bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Bu sebeple, glutamin (Gln) ve glutamat (Glu), metabolik yeniden programlamalarda kritik bir role sahiptir (Akins, Nielson ve Le, 2018; Shiratori ve ark., 2019). Glutaminoliz mekanizmasında Gln Glu’ya, Glu da a-KG’a dönüştürülerek TCA’nın devamlılığı sağlanır. Gln Glu’ya dönüşümü glutamin-fruktoz-6-fosfat transaminaz 1 (Gfpt1), karbamoil-fosfat sentetaz (CAD), fosforibozil pirofosfat amidotransferaz (PPAT) ve glutaminaz 2 (GLS2) tarafından kontrol edilirken, Glu’nun a-KG’ye dönüşümü, glutamat dehidrojenaz 1 (GLUD1), glutamat oksaloasetat transaminaz (GOT) ve ornitin aminotransferaz (OAT) tarafından kontrol edilir (Şekil 5.1) (Wang ve ark., 2011). Çalışmamızın proteomik sonuçları incelendiğinde, ifadesi artan proteinlerden birinin OAT olduğu görülmektedir. Bu durum, OAT düzeyindeki artışın glutaminoliz ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. MA uygulaması sonucunda glikolizin baskılanırken OKSFOS aktivasyonunun arttığı göz önünde bulundurulduğunda, OAT’ın TCA’nın devamlılığını koruyabilmek/artırabilmek için regülasyonunun değiştiği kuvvetli bir varsayım olarak gözükmektedir.

Proteomik çalışmamızın enerji metabolizması ile ilgili olan tüm verileri bir bütün olarak değerlendirildiğinde, MA uygulamasını takiben DMS114 hücrelerinde metabolik yeniden programlama meydana geldiği düşünülmektedir. KHAK’nin son derece heterojen bir popülasyona sahip tümör hücrelerinden oluştuğu düşünüldüğünde, ilaç uygulamasına yanıt olarak, glikolitik yolağı kullanan kanser hücreleri apoptoza giderken, oksidatif tümör

hücrelerinin popülasyonda baskın hale geldiğini ve hayatta kalımı artırmak için OKSFOS ve glutaminoliz mekanizmalarını daha aktif hale getirdiğini düşünebiliriz. Bir diğer deyişle, apoptoza gitmeyerek hayatta kalabilen hücreler yeni ortama uyum sağlayabilmek için uygun stratejiler geliştirmeye çalışmaktadırlar. Karşılaşılan bu manzara, KHAK'da tedaviye direncin çok yüksek olduğunu mevcut çalışmamız ile de göz önüne sermektedir. Zira, 24 saatlik ilaç uygulaması neticesinde bile hücrelerin yeni ortama adapte olmaya başladığı görülmektedir.

Farklı kanser türlerinde tedaviye direnç farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleşmektedir. Metabolik yeniden programlamanın çeşitli kanser türlerinde tedaviye dirençte rol oynayan olası mekanizmalardan olduğu düşünülmektedir (Zhao, Butler ve Tan, 2013). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, artmış OKSFOS aktivitesinin kanser kök hücrelerini ve kemoterapiye karşı birincil veya edinilmiş direnci karakterize ettiği öne sürülmüştür (Birsoy, Sabatini ve Possemato, 2012; Ganapathy-Kanniappan ve Geschwind; 2013). Üçlü-negatif meme kanserinde ortaya çıkan kemoterapiye dirençli kanser kök hücrelerinde, MYC ve MLC1 genlerinin ortak amplifikasyonu ile birlikte OKSFOS aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Dang, 2012). KHDAK'da, SMARCA4 ve ARID1A dâhil SWI/SNF kromatin yeniden modelleme kompleksi bileşenlerinin inaktivasyonunun OKSFOS düzeyinde artışa neden olduğu belirtilmiştir (Granchi ve Minutolo, 2012). Kemoterapiye direncin, çoğu zaman, OKSFOS'daki artışla bağlantılı olduğu görülmüştür. Bu durum, OKSFOS inhibisyonunun prostat kanserinde dosetaksel, akut miyeloid lösemide (AML) sitarabin, Kolorektal ve MYC/PGC-1- $\alpha$  kaynaklı pankreas kanserinde 5-florourasil, EGFR kaynaklı akciğer adenokarsinomunda EGFRi ve Melanomda MAPKi direncinin neden üstesinden geldiğini açıklamaktadır (Zhang ve Yang; 2013; Ganapathy-Kanniappan ve Geschwind; 2013). Kanser tedavilerinde, mitokondriyal biyogeneze müdahale etmek, solunum zinciri komplekslerini doğrudan inhibe etmek veya mitokondriyal işlevi başka şekillerde bozmak yeni bir hedef haline gelmiştir. OKSFOS inhibitörlerinin tirozin kinaz inhibitörleri ile ve ayrıca glikolizi inhibe etmek için diğer stratejilerle birleştirilebileceği ve böylelikle ölümcül bir enerji krizine neden olabileceği düşünülmektedir (Ganapathy-Kanniappan ve Geschwind; 2013).

Literatür incelendiğinde, KHAK'da ilaç direnciyle ilgili mekanizmaların detaylı bir şekilde aydınlatılamamış olduğu görülmektedir. Chen ve arkadaşlarının 2020 yılında KHAK'da ilaç direnciyle ilgili yayınladığı derlemede, direnç mekanizmaları dört ana başlık altında ele alınmıştır: DNA ile ilgili prosesler, RNA ile ilgili prosesler, apoptozla ilgili mekanizmalar, ilaç birikimi ve metabolizma prosesleri (Chen ve ark., 2020). KHAK

hastalarının tedavisinde uygulanan ilaçların büyük çoğunluğu, DNA'nın yapısına ve işlevine zarar verme dâhil olmak üzere DNA hasarı yoluyla etki etmektedir. Bununla birlikte, bugüne kadar, bir dizi çalışma, ilaç direncinin ortaya çıkmasının ana nedenlerinden birinin, hücrel DNA hasarının onarımını teşvik etmek, anti-tümör ilaçlarının DNA ile etkileşimini önlemek ve anormal DNA metilasyonu dâhil olmak üzere DNA ile ilgili süreçler olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bir tür tiol içeren molekül olan glutatyonun, DNA hasarının onarımını arttırmada ve apoptozu önlemede rolü olduğu bildirilmiş, ayrıca cisplatin direncine aracılık ettiği öne sürülmüştür (Chen ve ark., 2020). Proteomik çalışma bulgularımızda, S-formilglutatyonun glutatyonu dönüşümünü katalize eden enzim olan S-formilglutatyon hidrolazın (ESD) ilaç uygulanması sonucu ifadesinin arttığı görülmüştür. Bu artış, KHAK hücrelerinin DNA hasar onarımını arttırarak apoptozdan kaçmaya çalıştığını gösteriyor olabilir. Enerji metabolizmasını OKSFOS yönünde değiştirmesinin yanı sıra bu yolla da yeni ortamına uyum sağlamaya çalışarak direnç gösterdiği sonucuna varılabilir.

Proteomik analizlerimiz sonucunda regülasyonunda değişiklik olan proteinler detaylıca incelendiğinde ilaç direnciyle ilişkili olabileceğini düşündüğümüz bazı diğer proteinler dikkat çekmiştir. Komplement komponent 1Q alt komponent bağlayıcı proteinin (C1QBP) koryokarsinom ve over kanseri gibi bazı kanser türlerinde ifadesinin arttığı, bu yönüyle tümör proliferasyonunu arttırmaya ve apoptozu azaltmaya yönelik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu kanser türlerinde ifadesi artan C1QBP'nin, ilaç direnci ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Yu ve Wang, 2013; Shen ve ark., 2014). Benzer bulgular, 4 farklı insan meme kanseri hücre hattında ve ayrıca meme kanseri hastalarından alınan duktal ve adenokarsinom tümörlerinde yapılan bir başka çalışmada da elde edilmiştir (McGee ve ark., 2011). DMS114 hücrelerinde ilaç direnciyle ilişkili olabileceğini düşündüğümüz bir diğer protein Syndecan-1'dir (SDC1). Birçok çalışma SDC1'in çeşitli insan malignitelerinde ilaç direncindeki önemli katkılarına değinmiştir. Szarvas vd. prostat kanserinde dolaşımdaki SDC1'in kemoterapiye ilaç direnci ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür (Szarvas ve ark., 2018). Wang vd. SDC1'in kolorektal karsinomda EGFR yolunu düzenleyerek kemoterapiye direnç oluşumunda rol oynadığını tespit etmişlerdir (Wang ve ark., 2014). Hassan vd. SDC1'in meme kanserinde radyo-terapi direncinde  $\beta$ -integrin- ve IL-6'ya bağımlı fonksiyonları düzenlediğini öne sürmüştür (Hassan ve ark., 2013). Yu vd. hepatik karsinomada SDC1'in PI3K-AKT yolağı aracılığıyla cisplatin direncini (Yu ve ark., 2020) tetiklediğini bildirmiştir.

İlaç direnci ile ilişkilendirilmiş bir diğer protein olan Bcl-2-associated transcription factor 1'in (BCLAF1) ifadesinde de artış olduğu çalışmamız sonucunda görülmüştür.



BCLAF1'in KHDAK'da, DNA hasarının onarımını ve p21'in aracılık ettiği G1 fazı durmasını (arrest) düzenleyerek cisplatin direncine aracılık ettiği (Jiang, Liu, Wu ve Zhang, 2020) bildirilmiştir. Hepatoselüler karsinomada ise BCLAF1'in, lncRNA NEAT1'i hedefleyerek hücre proliferasyonunu, invazyonunu ve ilaç direncini desteklediği belirtilmiştir (Mou ve ark., 2020). Çeşitli kanser türlerinde ilaç direnci ile ilişkilendirilmiş olan bu proteinlerin (ESD, C1QBP, SDC1, BCLAF1) ifadesindeki artışın MA uygulaması sonucu m6A modifikasyonları ile mi değiştiğinden net bir şekilde emin olamayız. Ama sonuç olarak bu proteinlerin ilaç uygulaması neticesinde ifadelerinin artmış olduğunu görmekteyiz. Bu durum, KHAK'da ilaç direncinde bu proteinlerin olası rolünü düşündürmektedir. Her ne kadar bu veriyi mevcut çalışmamızla ispatlayamıyor olsak da, bu proteinler KHAK'da ilaç direncine neden olan potansiyel proteinler olarak değerlendirilebilir ve ileri çalışmalarla bu mekanizmalar aydınlatılabilir.

#### ***RNA işlenmesi ve uçbirleştirme ile ilgili regülasyonlar:***

Proteomik verilerimizden kat azalışının en çok olduğu proteinler analiz edildiğinde RNA uçbirleştirme (splicing) ve işleme mekanizmaları ile ilişkili yollarda regülasyonlar olduğu görülmüştür. Tanımlanan proteinlerden 40S ribosomal protein S4, X isoform (RPS4X), 40S ribosomal protein S5 (RPS5) ve 40S ribosomal protein S13 (RPS13) RNA işleme mekanizmalarda rol oynamaktadır. ATP-dependent RNA helicase DDX1 (DDX1), Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 (SNRPD1) ve Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 (SNRPD2) ise hem RNA uçbirleştirme hem de işleme mekanizmalarında role sahip proteinlerdir.

mRNA öncüllerinin uçbirleştirme ve işleme süreci ile olgun mRNA'lara dönüştürülmesi, gen ekspresyonu düzenlemesinin önemli bir adımıdır ve ökaryotlardaki çoğu biyolojik işlevi etkileyen oldukça dinamik ve karmaşık bir süreçtir. Tek bir genden farklı RNA izoformlarının üretilmesini sağlayarak proteomik ve fonksiyonel çeşitliliğe katkıda bulunur ve transkripsiyonel plastisite sağlar. Kanser hücreleri, hücre çoğalmasına, göçüne veya apoptozdan kaçmasına fayda sağlayacak izoformlar üretmek adına bu mekanizmada değişiklikler meydana getirebilir. RNA işlenmesi/uçbirlestirmesi süreçlerinde yer alan proteinlerin seviyelerindeki değişiklikler ileri hedeflerindeki (downstream) RNA'ların düzenlenmesinde değişikliklere yol açar (Urbanski, Leclair ve Anczuków, 2018). Bu yönleriyle; RNA işlenmesi/uçbirlestirmesi, mekanizmada yer alan proteinlerin seviyesinin ya da aktivitesinin düzenlenmesi/baskılanması yoluyla kanser tedavisinde yeni bir terapötik hedef haline gelmiştir (Kole, Krainer ve Altman, 2012; Urbanski ve ark., 2018).

RNA modifikasyonları arasında en sık görülen m6A modifikasyonlarının RNA işleme süreçlerinde aktif role sahip olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2014). Değişen m6A seviyelerinin, RNA işlenmesini, mRNA bozunmasını ve mRNA'ların proteinlere dönüştürülmesini etkileyerek gen ekspresyonlarını değiştirdiği ve bu yolla tümör oluşumunu ve gelişimini tetiklediği bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, m6A düzenleyici proteinlerin anormal ifadesinin m6A düzeylerini etkilediğini ve sonuç olarak MYC, SOCS2, ADAM19 ve PTEN dâhil olmak üzere tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin ifadesini düzensizleştirdiğini bildirmiştir (Pinello, Sun ve Wong, 2018). m6A demetilaz aktivitesine sahip FTO ve ALKBH5'in susturulması ve aşırı ifade edilmesi çalışmalarında RNA uçbirleştirme, stabilite ve translasyon dâhil olmak üzere m6A metilasyonu tarafından düzenlenen fonksiyonların etkilendiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017). Her iki protein de m6A demetilaz olmasına rağmen, farklı doku ve hücre bölümlerinde yoğunlaşmaları ile tutarlılık gösterecek şekilde, farklı mRNA hedefleri üzerinde etki gösterdikleri bildirilmiştir (Li ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017).

Çalışmamızda, MA ile FTO baskılanması yoluyla m6A düzeyinde beş kata yakın artış meydana geldiği bulgular kısmında gösterilmiştir. Gerek FTO'nun gerekse m6A modifikasyonunun RNA işleme/düzenleme süreçlerinde rol oynadığı düşünüldüğünde, bu mekanizmalarda yer alan diğer proteinlerin regülasyonunun değişmesi sürpriz bir durum oluşturmamıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda, FTO'nun bahsi geçen proteinlerle etkileşerek ya da bu proteinlerin metilasyonunu düzenleyerek ifade düzeylerinde regülasyona yol açtığı çıkarımı yapılabilir. RNA işleme/düzenleme mekanizmalarında değişiklikler meydana geldiği açıkça görülmektedir ve bu değişikliklerin çalışma verilerinde ifadesinde değişiklik gözükken diğer bazı proteinlere işaret ettiği düşünülebilir. Örneğin, glikolizde yer alan ve ifadesi azalan PKM2 ya da ALDOA gibi proteinlerin hedefteki proteinlerden bazıları olduğu düşünülebilir. Hedefte yer alan proteinlerin hangi proteinler olduğunun net bir şekilde anlaşılması mevcut çalışmamız ile mümkün değildir. Transkriptom çapında m6A sekansı ve RNA sekansı yöntemleri ile yapılacak ileri çalışmalar, bu verilerin etraflıca aydınlatılmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca, yukarıda bahsedilen ve ifadesinde azalma görülen proteinlerin, MA uygulaması neticesinde FTO üzerinden değil de başka bir yoldan düzenleniyor olabileceği bir diğer ihtimal olarak göz önünde bulundurulmalıdır. FTO susturulması ve aşırı ifade ettirilmesi yöntemleri ile gerçekleştirilecek çalışmalar bu mekanizmaların daha detaylı bir şekilde anlaşılmasını sağlayacaktır. Sonuç olarak, ilişkili mekanizma her ne olursa olsun, KHAK hücrelerine ilaç uygulaması neticesinde, RNA işlenmesiyle ilgili regülasyonlar olduğu net bir sonuç olarak

karşımıza çıkmıştır. Bu da, MA'nın KHAK'da RNA uçbirleştirme/düzenleme süreçlerinde inhibitör rolüne sahip olabileceğini düşündürmektedir.

***Protein yıkımı ve düzenlenmesi ile ilgili regülasyonlar:***

Proteomik verilerin biyoinformatik analizi sonucu protein yıkımı ve düzenlenmesi ile ilişkili yolaklarda da regülasyon olduğu görülmüştür. İlaç uygulaması neticesinde ifadeleri artan proteazom alt ünite alpha tip 6 (PSMA6) ve protein disülfid-izomeraz A3 (PDIA3) bu regülasyonların odağındaki proteinler olarak karşımıza çıkmıştır.

PSMA6, çoğu proteinin proteolitik yıkımında rol oynayan 20S kor proteazom kompleksinin bir bileşenidir. İki 19S düzenleyici partikül ile birlikte 26S proteazomunu oluşturur ve böylelikle, ubiquitin proteazom sisteminin (UPS) elemanı olarak ubiquitin proteinlerin yıkımına katılır. UPS'nin, hücre döngüsünü, apoptozu, hücre farklılaşmasını ve anjiyogenezi düzenlediği bildirilmiştir (Narayanan ve ark., 2020). Çok sayıda çalışma, UPS'nin bu süreçlerde görevli hücre proteinlerinin çoğunu modüle ederek veya yıkımını sağlayarak protein homeostazının korunmasında kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Hücre büyümesi ve hayatta kalması için UPS kritik öneme sahiptir, ancak apoptozun oluşması için UPS'nin inhibisyonu gerekmektedir (Narayanan ve ark., 2020). UPS'nin inhibisyonu protein homeostazının bozulmasına ve hücrenin apoptoza gitmesini neden olur. Bu bilgiyle tutarlı olacak şekilde, proteozom alt ünitelerinden olan PSMA6'nın, akciğer kanseri, glioblastoma ve mezotelyoma gibi çeşitli kanser türlerinde onkojenik bir role sahip olduğu ve susturulduğu takdirde apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (Bakke ve ark., 2019). Proteazom inhibisyonu son yıllarda kanser tedavisinde olası terapötik hedeflerden biri haline gelmiştir. Bortezomib, carfilzomib, delanzomib ve oprozomib gibi proteozom inhibitörleri çeşitli kanserlerin tedavisinde tek başına veya başka ajanlarla birlikte kullanılmaktadır (Narayanan ve ark., 2020). Ayrıca, bortezomib ve carfilzomib'in KHAK'da kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanıldığında apoptozu artırarak kemoterapinin etkisini artırdığı bildirilmiştir (Taromi ve ark., 2017; Yin ve ark., 2020). Mevcut çalışmamızda, PSMA6'nın ifadesinin artmış olması, regülasyonu değişen proteinlerin yıkımıyla ilgili olabileceği gibi, ilaç uygulaması sonucu hücrelerin bozulan protein homeostazını düzenlemeye çalışarak apoptozun önüne geçmeye çalışması ile de ilişkili olabilir. Her iki durum da hücrelerin hayatta kalmaya çalışıyor olması şeklinde özetlenebilir.

Protein düzenlenmesi ile ilişkili yolaklarda önümüze çıkan bir diğer protein PDIA3, endoplazmik retikulumda (ER) yeni sentezlenen glikoproteinlerin ve yanlış katlanmış proteinlerin katlanmasını düzenleyen bir şaperon proteindir. Bu proteinin, aynı zamanda, hücreleri ER stresinin neden olduğu apoptozdan koruduğu bildirilmiştir. Çeşitli kanser

türlerinde, PDIA3'ün susturulduğu/baskılandığı takdirde hücre büyümesinin yavaşlayıp apoptozun arttığı belirtilmiş ve olası mekanizmanın STAT3 sinyal yolağı aracılığıyla olduğu öne sürülmüştür (Kondo ve ark., 2019). Çalışma sonucunda ifadesinde artış görülmesi, ifadesinde artış görülen diğer proteinlerin katlanmasında rol oynaması ile açıklanabilir. Bu artışın, hücreleri, ilaç uygulaması neticesinde ER stresinin neden olduğu apoptozdan korumaya yönelik olduğu da düşünülebilir.

Protein yıkımı ve düzenlenmesi ile ilişkili yolların merkezinde olan bu proteinlerin m6A modifikasyonları ile ilişkisine dair literatür bilgisi bulunmadığı görülmüştür. Bu durumda meydana gelen regülasyonların FTO'nun baskılanmasıyla direkt ya da dolaylı olarak mı ilgili olduğu konusunda fikir yürütülemez. Ancak, regülasyonu artan ve azalan başka proteinler olduğu düşünüldüğünde, bunların düzenlenmesi için protein düzenleme/işleme ile ilişkili proteinlerin ifadesinin artması da kaçınılmaz bir sonuç olarak görülmektedir. Ayrıca, bu proteinlerin çeşitli kanser türlerinde apoptozla yakından ilişkili olabileceğinin gösterilmesi, meydana gelen regülasyonların dolaylı olarak da olsa apoptozdan kaçmaya yönelik olduğu ihtimalini düşündürmüştür.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

KHAK hücreleri geniş çapta moleküler değişikliklerle karakterizedir. Mevcut analiz teknikleri ancak belirli bir tümör örneğindeki en sık görülen mutasyonları tespit edebilmektedir. İntra- ve intertümoral heterojenite, neoplazmaların çeşitli mikro ortamlara ve tedavilere uyum sağlayarak direnç kazanmasını sağlamaktadır. Direnç problemi, hastalığın tedavisini başarısız kılan en önemli faktörlerin başında gelmektedir (Denninghoff ve ark., 2021). Çeşitli çalışmalarla, hem tek bir ajan olarak hem de kemoterapi ile kombinasyon halinde farklı anti-kanser ajanların KHAK'da rolü araştırılmış, ancak etkin bir tedaviye ulaşılamamıştır. Çalışmamızın ilk bölümünde; FTO proteinini seçici olarak inhibe etme potansiyeline sahip ve anti-kanser etkisi çeşitli kanserlerde gösterilmiş MA'nın, kemoterapi ilacı TPT ile kombine kullanımının KHAK hücrelerine etkisi çeşitli *in vitro* çalışmalarla incelenmiştir. İki ilacın birlikte kullanımının sinerjetik etki gösterdiği ve apoptotik hücre ölümlerini artırdığı sonucuna varılmıştır. Ancak, her ne kadar sinerjetik etki görülse de bazı sınırlılıkların mevcut olduğu görülmüştür. Artan ilaç konsantrasyonlarına rağmen kombinasyon etkisinin belirli bir dozdan sonra kısıtlandığının görülmesi, hücre döngüsünde yaşanan G0/G1 fazındaki duruşun kontrole göre anlamlı derecede fazla olmaması ve invazyon kapasitesinde çok anlamlı bir azalma görülmemesi ileri çalışmaların gerekliliğine işaret etmektedir. Karşılaşılan bu durumların, KHAK'da tedaviye direncin küçük bir göstergesi olarak karşımıza çıktığı düşünülmüştür. Bu mekanizmalarda yer alan sinyal yollarının aydınlatılması, belirtilen ilaç kombinasyonunun en etkin kullanımı hakkında bilgi verebileceği gibi, KHAK'da ilaç direnci ile ilgili bulgulara da ulaşılmasına katkıda bulunacaktır. Ayrıca, elde edilen veriler ışığında yapılacak *in vivo* çalışmalarla da bu ilaçların etkinliğinin doğrulanması gerekmektedir.

Çalışmamızın ikinci bölümünü oluşturan proteomik deneyleri sonucu elde edilen veriler, MA uygulaması sonucu, KHAK hücre hattı olan DMS114 hücrelerinde enerji metabolizması, RNA uçbirleştirme ve işlenmesi, protein düzenlenmesi ve yıkımı ile ilgili regülasyonlar olduğunu göstermiştir. Enerji metabolizmasında yer alan glikoliz mekanizmasında azalma olmasına karşın, OKSFOZ ve glutaminoliz mekanizmalarında artış olduğu görülmüştür. Bu durum MA'nın glikolizi baskıladığını ve bu yolla apoptotik hücre ölümlerine neden olduğunu düşündürmüştür. Ancak, OKSFOZ ve glutaminoliz mekanizmalarında görülen artış, hücrelerin metabolik yeniden programlama gerçekleştirerek yeni ortamına uyum sağlamaya çalıştığı hipotezini geliştirmemize neden

olmuştur. Bu durum, çalışmamızın bu bölümünde de ilaç direnci ile ilgili bir manzara ile karşılaştığımızı düşündürmüştür. Zira, kanser hücrelerinin glikoliz inhibisyonu sonucu enerji metabolizmasını yeniden programlayarak ilaç direnci geliştirdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Zhao, Butler ve Tan, 2013). KHAK hücrelerinin olumsuz koşullar altında hücre içi metabolizmalarını nasıl modüle ettiği ile ilişkili mekanizmaların ve sinyal yollarının aydınlatılması yeni hedeflerin ortaya çıkarak potansiyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin önünü açacaktır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, tek başına glikoliz baskılamasının sadece büyümeyi baskıladığını, ancak kanserin yok edilmesi için yetersiz kaldığını ima etmektedir. Ancak, şu da unutulmamalıdır ki, glikoliz baskılandığında hücreler OKSFOZ-bağımlı hale gelecekler ve böylelikle, mitotoksikantlar ya da OKSFOZ inhibitörlerine karşı daha hassas durumda olacaklardır. Böyle bir durumda, hem glikolizi hem mitokondriyi hedef alacak ilaç kombinasyonları hücrede ölümcül bir enerji krizine neden olarak tedavide başarı sağlayabilir. Ancak bu tedavi yönteminin sistematik etki göstermeyerek hedefe-yönelik olması gerektiğinden, detaylıca araştırılması, *in vitro* çalışmaları takiben zenografik modellerle etraflıca test edilmesi gerekmektedir. Tedavi rejimlerinde, KHAK'ın son derece heterojen bir kanser türü olduğu unutulmamalıdır. İntra- ve intertümoral heterojenite tedavide direnç mekanizmalarının gelişmesine katkıda bulunarak, genetik taramalarla tedavi öncesinde tespit edilen mutasyonlar dışında yeni mutasyonların gelişmesine neden olmaktadır. Bu direnç mekanizmalarından birinin metabolik yeniden programlama olabileceği mevcut çalışmamız ile gösterilmiştir, ancak bu hastadan hastaya değişebilecek bir durumdur. Rutin olarak yapılan KHAK genetik taramalarına enerji metabolizması ile ilgili biyobelirteçlerin eklenmesi tedaviyi şekillendirmeye yardımcı olacaktır. Örneğin, OKSFOZ aktivitesinin çok yüksek olduğu durumda tedaviye eklenecek OKSFOZ inhibitörleri kemoterapinin toksisitesini artırabilecektir.

Proteom verilerimiz, MA uygulaması sonucu, RNA uçbirleştirme/işlenmesi ile de ilgili regülasyonlar olduğunu göstermiştir. Bu mekanizmalarda yer alan bazı proteinlerin aktivitesinin azalması, MA'nın RNA uçbirleştirme/düzenleme süreçlerinde inhibitör rolüne sahip olabileceğini düşündürmüştür. Protein yıkımı ve düzenlenmesi ile ilişkili yollarda görülen düzenlemelerin ise ifadesi artan/azalan diğer proteinlerle ya da apoptotik hücre ölümleriyle alakalı olduğu düşünülmüştür. Elde edilen verilerin, MA uygulaması sonucu gerçekleşen m6A modifikasyonu ile mi ilişkili yoksa başka bir mekanizma üzerinden mi olduğunu mevcut çalışmamız neticesinde net olarak söyleyemeyiz. Ancak, bu mekanizmalar ile ilişki olsun ya da olmasın, MA uygulamasının KHAK hücrelerinde metabolik yeniden

programlamaya, RNA ve protein düzenleme süreçlerinde regülasyonlara neden olduğu açıkça görülmüştür. Elde edilen verilerin etraflıca aydınlatılması ve m6A modifikasyonları ya da FTO ile ilişkisinin doğrulanması için FTO susturulması ve aşırı ifade ettirilmesi yöntemleri ile ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir. Ayrıca, transkriptom çapında m6A sekansı ve RNA sekansı yöntemleri ile yapılacak ileri çalışmalar hedef RNA'ların belirlenmesine yardımcı olarak, tedavide hedef alınabilecek genlerin açığa çıkarılmasına katkıda bulunacaktır.



## 7. KAYNAKLAR

Aguilo, F., Zhang, F., Sancho, A., Fidalgo, M., Di Cecilia, S., Vashisht, A., ... & Walsh, M. J. (2015). Coordination of m6A mRNA methylation and gene transcription by ZFP217 regulates pluripotency and reprogramming. *Cell stem cell*, 17(6), 689-704.

Akins, N. S., Nielson, T. C., & Le, H. V. (2018). Inhibition of glycolysis and glutaminolysis: an emerging drug discovery approach to combat cancer. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(6), 494-504.

Alexandrov, L. B., Ju, Y. S., Haase, K., Van Loo, P., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., ... & Stratton, M. R. (2016). Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*, 354(6312), 618-622.

Allen, J. W., Moon, J., Redman, M., Gadgeel, S. M., Kelly, K., Mack, P. C., ... & Gandara, D. R. (2014). Southwest Oncology Group S0802: a randomized, phase II trial of weekly topotecan with and without ziv-aflibercept in patients with platinum-treated small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology*, 32(23), 2463.

American Cancer Society. <http://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>. Erişim: 25 Nisan 2021.

Arnold, A. M., Seymour, L., Smylie, M., Ding, K., Ung, Y., Findlay, B., ... & Shepherd, F. (2007). Phase II study of vandetanib or placebo in small-cell lung cancer patients after complete or partial response to induction chemotherapy with or without radiation therapy: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR. 20. *Journal of Clinical Oncology*, 25(27), 4278-4284

Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: technologies and their applications. *Journal of chromatographic science*, 55(2), 182-196.

ATCC. <https://www.atcc.org>. Erişim: 17 Nisan 2021

Augert, A., Zhang, Q., Bates, B., Cui, M., Wang, X., Wildey, G., ... & MacPherson, D. (2017). Small cell lung cancer exhibits frequent inactivating mutations in the histone methyltransferase KMT2D/MLL2: CALGB 151111 (Alliance). *Journal of Thoracic Oncology*, 12(4), 704-713.

Bade, B.C., & Cruz, C.S.D. (2020). Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, 41(1), 1-24.

Bakke, J., Wright, W. C., Zamora, A. E., Oladimeji, P., Crawford, J. C., Brewer, C. T., ... & Chen, T. (2019). Genome-wide CRISPR screen reveals PSMA6 to be an essential gene in pancreatic cancer cells. *BMC cancer*, 19(1), 1-12.

Barnard, W. G. (1926). The nature of the "oat-celled sarcoma" of the mediastinum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(3), 241-244.

Belani, C. P., Dahlberg, S. E., Rudin, C. M., Fleisher, M., Chen, H. X., Takebe, N., ... & Schiller, J. H. (2016). Vismodegib or cixutumumab in combination with standard chemotherapy for patients with extensive-stage small cell lung cancer: a trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E1508). *Cancer*, 122(15), 2371-2378.

Belani, C. P., Dahlberg, S. E., Rudin, C. M., Fleisher, M., Chen, H. X., Takebe, N., ... & Schiller, J. H. (2016). Vismodegib or cixutumumab in combination with standard chemotherapy for patients with extensive-stage small cell lung cancer: a trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E1508). *Cancer*, 122(15), 2371-2378.

Birsoy, K., Sabatini, D. M., & Possemato, R. (2012). Untuning the tumor metabolic machine: Targeting cancer metabolism: a bedside lesson. *Nature medicine*, 18(7), 1022-1023.

Boettger, L. M., Handsaker, R. E., Zody, M. C., & McCarroll, S. A. (2012). Structural haplotypes and recent evolution of the human 17q21. 31 region. *Nature genetics*, 44(8), 881-885.



- Boissel, S., Reish, O., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Sedgwick, B., Yeo, G. S., ... & Colleaux, L. (2009). Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *The American Journal of Human Genetics*, 85(1), 106-111.
- Boudreau, A., Purkey, H. E., Hitz, A., Robarge, K., Peterson, D., Labadie, S., ... & O'Brien, T. (2016). Metabolic plasticity underpins innate and acquired resistance to LDHA inhibition. *Nature chemical biology*, 12(10), 779-786.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2020). Erratum: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 70(4), 313.
- Burbee, D. G., Forgacs, E., Zöchbauer-Müller, S., Shivakumar, L., Fong, K., Gao, B., ... & Minna, J. D. (2001). Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(9), 691-699.
- Byers, L. A., & Rudin, C. M. (2015). Small cell lung cancer: where do we go from here?. *Cancer*, 121(5), 664-672.
- Byers, L. A., Wang, J., Nilsson, M. B., Fujimoto, J., Saintigny, P., Yordy, J., ... & Heymach, J. V. (2012). Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1. *Cancer discovery*, 2(9), 798-811.
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489(7417), 519.
- Cao, J., Song, Y., Bi, N., Shen, J., Liu, W., Fan, J., ... & Zhan, Q. (2013). DNA methylation-mediated repression of miR-886-3p predicts poor outcome of human small cell lung cancer. *Cancer research*, 73(11), 3326-3335.
- Chen, J. M. M., Chiu, S. C., Chen, K. C., Huang, Y. R. J., Liao, Y. T. A., & Yu, C. T. R. (2020). Enolase 1 differentially contributes to cell transformation in lung cancer but not in esophageal cancer. *Oncology letters*, 19(4), 3189-3196.
- Chen, J., & Du, B. (2019). Novel positioning from obesity to cancer: FTO, an m6A RNA demethylase, regulates tumour progression. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 145(1), 19-29.
- Chen, M., Wei, L., Law, C. T., Tsang, F. H. C., Shen, J., Cheng, C. L. H., ... & Wong, C. M. (2018). RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2. *Hepatology*, 67(6), 2254-2270.
- Chen, P., Kuang, P., Wang, L., Li, W., Chen, B., Liu, Y., ... & Zhou, C. (2020). Mechanisms of drugs-resistance in small cell lung cancer: DNA-related, RNA-related, apoptosis-related, drug accumulation and metabolism procedure. *Translational Lung Cancer Research*, 9(3), 768.
- Chou, T. C., & TaLaLay, P. (1981). Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. *European journal of biochemistry*, 115(1), 207-216.
- Chu, Y. D., Lin, W. R., Lin, Y. H., Kuo, W. H., Tseng, C. J., Lim, S. N., ... & Yeh, C. T. (2020). COX5B-Mediated Bioenergetic Alteration Regulates Tumor Growth and Migration by Modulating AMPK-UHMK1-ERK Cascade in Hepatoma. *Cancers*, 12(6), 1646.
- Churg, A. (1994). Lung cancer cell type and occupational exposure. *Lung biology in health and disease*, 74, 413-436.
- Couraud, S., Zalcman, G., Milleron, B., Morin, F., & Souquet, P. J. (2012). Lung cancer in never smokers—a review. *European journal of cancer*, 48(9), 1299-1311.
- Cox, J., & Mann, M. (2007). Is proteomics the new genomics?. *Cell*, 130(3), 395-398.

- Cristea, S., & Sage, J. (2016). Is the canonical RAF/MEK/ERK signaling pathway a therapeutic target in SCLC?. *Journal of Thoracic Oncology*, *11*(8), 1233-1241.
- Cui, M., Augert, A., Rongione, M., Conkrite, K., Parazzoli, S., Nikitin, A. Y., ... & MacPherson, D. (2014). PTEN is a potent suppressor of small cell lung cancer. *Molecular Cancer Research*, *12*(5), 654-659.
- Cui, Q. I., Shi, H., Ye, P., Li, L., Qu, Q., Sun, G., ... & Shi, Y. (2017). m6A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells. *Cell reports*, *18*(11), 2622-2634.
- Dang, C. V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes & development*, *26*(9), 877-890.
- De Marinis, F., Atmaca, A., Tiseo, M., Giuffreda, L., Rossi, A., Gebbia, V., ... & Wolf, M. (2013). A phase II study of the histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in pretreated patients with small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, *8*(8), 1091-1094.
- de Padua, M. C., Delodi, G., Vučetić, M., Durivault, J., Vial, V., Bayer, P., ... & Pouysségur, J. (2017). Disrupting glucose-6-phosphate isomerase fully suppresses the “Warburg effect” and activates OXPHOS with minimal impact on tumor growth except in hypoxia. *Oncotarget*, *8*(50), 87623.
- Delgado-Enciso, I., Soriano-Hernández, A. D., Rodriguez-Hernandez, A., Galvan-Salazar, H. R., Montes-Galindo, D. A., Martinez-Martinez, R., ... & Guzman-Esquivel, J. (2015). Histological changes caused by meclofenamic acid in androgen independent prostate cancer tumors: evaluation in a mouse model. *International braz j urol*, *41*(5), 1002-1007.
- Demedts, I. K., Vermaelen, K. Y., & Van Meerbeeck, J. P. (2010). Treatment of extensive-stage small cell lung carcinoma: current status and future prospects. *European Respiratory Journal*, *35*(1), 202-215.
- Denninghoff, V., Russo, A., de Miguel-Pérez, D., Malapelle, U., Benyounes, A., Gittens, A., ... & Rolfo, C. (2021). Small cell lung cancer: State of the art of the molecular and genetic landscape and novel perspective. *Cancers*, *13*(7), 1723.
- Denny, S. K., Yang, D., Chuang, C. H., Brady, J. J., Lim, J. S., Grüner, B. M., ... & Winslow, M. M. (2016). Nfib promotes metastasis through a widespread increase in chromatin accessibility. *Cell*, *166*(2), 328-342.
- Di, H., Zhang, X., Guo, Y., Shi, Y., Fang, C., Yuan, Y., ... & Li, C. (2018). Silencing LDHA inhibits proliferation, induces apoptosis and increases chemosensitivity to temozolomide in glioma cells. *Oncology letters*, *15*(4), 5131-5136.
- Duma, N., Santana-Davila, R., & Molina, J. R. (2019). Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 94, No. 8, pp. 1623-1640). Elsevier.
- Duruissieux, M., & Esteller, M. (2018). Lung cancer epigenetics: from knowledge to applications. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 51, pp. 116-128). Academic Press.
- Dylla, S. J. (2016). Toppling high-grade pulmonary neuroendocrine tumors with a DLL3-targeted trojan horse. *Molecular & cellular oncology*, *3*(2), e1101515.
- Eberth, J. M. (2015). Lung cancer screening with low-dose CT in the United States. *Journal of the American College of Radiology*, *12*(12), 1395-1402.
- Epner, D. E., Partin, A. W., Schalken, J. A., Isaacs, J. T., & Coffey, D. S. (1993). Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression with cell motility and metastatic potential of rat prostatic adenocarcinoma. *Cancer research*, *53*(9), 1995-1997.
- Farago, A. F., & Keane, F. K. (2018). Current standards for clinical management of small cell lung cancer. *Translational lung cancer research*, *7*(1), 69.
- Faubert, B., Li, K. Y., Cai, L., Hensley, C. T., Kim, J., Zacharias, L. G., ... & DeBerardinis, R. J. (2017). Lactate metabolism in human lung tumors. *Cell*, *171*(2), 358-371.

Fitzsimmons, C. M., & Batista, P. J. (2019). It's complicated... m6A-dependent regulation of gene expression in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(3), 382-393.

Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., ... & McCarthy, M. I. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 316(5826), 889-894.

Fried, D. B., Morris, D. E., Poole, C., Rosenman, J. G., Halle, J. S., Detterbeck, F. C., ... & Socinski, M. A. (2004). Systematic review evaluating the timing of thoracic radiation therapy in combined modality therapy for limited-stage small-cell lung cancer. *Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE): Quality-assessed Reviews [Internet]*.

Fujii, K., Miyata, Y., Takahashi, I., Koizumi, H., Saji, H., Hoshikawa, M., ... & Nakamura, H. (2018). Differential proteomic analysis between small cell lung carcinoma (SCLC) and pulmonary carcinoid tumors reveals molecular signatures for malignancy in lung cancer. *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 12(6), 1800015.

Ganapathy-Kanniappan, S., & Geschwind, J. F. H. (2013). Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Molecular cancer*, 12(1), 1-11.

Gao, X., Shin, Y. H., Li, M., Wang, F., Tong, Q., & Zhang, P. (2010). The fat mass and obesity associated gene FTO functions in the brain to regulate postnatal growth in mice. *PloS one*, 5(11), e14005.

Gazdar, A. F., Bunn, P. A., & Minna, J. D. (2017). Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nature Reviews Cancer*, 17(12), 725-737.

George, J., Lim, J. S., Jang, S. J., Cun, Y., Ozretić, L., Kong, G., ... & Thomas, R. K. (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 524(7563), 47-53.

Gerken, T., Girard, C. A., Tung, Y. C. L., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K. S., ... & Schofield, C. J. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*, 318(5855), 1469-1472.

GLOBOCAN. <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>. Erişim: 18 Nisan 2021.

Govindan, R., Ding, L., Griffith, M., Subramanian, J., Dees, N. D., Kanchi, K. L., ... & Wilson, R. K. (2012). Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell*, 150(6), 1121-1134.

Govindan, R., Page, N., Morgensztern, D., Read, W., Tierney, R., Vlahiotis, A., ... & Piccirillo, J. (2006). Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *Journal of clinical oncology*, 24(28), 4539-4544.

Granchi, C., & Minutolo, F. (2012). Anticancer agents that counteract tumor glycolysis. *ChemMedChem*, 7(8), 1318-1350.

Guldbrandt, L. M., Fenger-Grøn, M., Rasmussen, T. R., Rasmussen, F., Meldgaard, P., & Vedsted, P. (2015). The effect of direct access to CT scan in early lung cancer detection: an unblinded, cluster-randomised trial. *BMC cancer*, 15(1), 1-11.

Hassan, H., Greve, B., Pavao, M. S., Kiesel, L., Ibrahim, S. A., & Götte, M. (2013). Syndecan-1 modulates  $\beta$ -integrin-dependent and interleukin-6-dependent functions in breast cancer cell adhesion, migration, and resistance to irradiation. *The FEBS journal*, 280(10), 2216-2227.

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., ... & Takahashi, T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer research*, 65(21), 9628-9632

Heist, R. S., Sequist, L. V., & Engelman, J. A. (2012). Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(5), 924-933.

- Helfrich, B. A., Kim, J., Gao, D., Chan, D. C., Zhang, Z., Tan, A. C., & Bunn, P. A. (2016). Barasertib (AZD1152), a small molecule Aurora B inhibitor, inhibits the growth of SCLC cell lines in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics*, *15*(10), 2314-2322.
- Hopkins-Donaldson, S., Ziegler, A., Kurtz, S., Bigosch, C., Kandioler, D., Ludwig, C., ... & Stahel, R. (2003). Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death & Differentiation*, *10*(3), 356-364.
- Hou, J. (2019). M6A demethylation enzyme FTO upregulates LDHA and promotes glycolysis and invasion and migration in oral squamous cell carcinoma.
- Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., ... & Chen, J. (2018). Recognition of RNA N 6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nature cell biology*, *20*(3), 285-295.
- Huang, Y., Yan, J., Li, Q., Li, J., Gong, S., Zhou, H., ... & Yang, C. G. (2015). Meclofenamic acid selectively inhibits FTO demethylation of m6A over ALKBH5. *Nucleic acids research*, *43*(1), 373-384.
- Hubaux, R., Thu, K. L., Coe, B. P., MacAulay, C., Lam, S., & Lam, W. L. (2013). EZH2 promotes E2F-driven SCLC tumorigenesis through modulation of apoptosis and cell-cycle regulation. *Journal of Thoracic Oncology*, *8*(8), 1102-1106.
- Indovina, P., Marcelli, E., Pentimalli, F., Tanganelli, P., Tarro, G., & Giordano, A. (2013). Mass spectrometry-based proteomics: The road to lung cancer biomarker discovery. *Mass spectrometry reviews*, *32*(2), 129-142.
- Jeong, H. C., Kim, G. I., Cho, S. H., Lee, K. H., Ko, J. J., Yang, J. H., & Chung, K. H. (2011). Proteomic analysis of human small cell lung cancer tissues: up-regulation of coactosin-like protein-1. *Journal of proteome research*, *10*(1), 269-276.
- Ji, S., Zhang, B., Liu, J., Qin, Y., Liang, C., Shi, S., ... & Yu, X. (2016). ALDOA functions as an oncogene in the highly metastatic pancreatic cancer. *Cancer letters*, *374*(1), 127-135.
- Jia, G., Yang, C. G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z., & He, C. (2008). Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS letters*, *582*(23-24), 3313-3319.
- Jiang, T., Liu, B., Wu, D., & Zhang, F. (2020). BCLAF1 induces cisplatin resistance in lung cancer cells. *Oncology letters*, *20*(5), 1-1.
- Jin, M., Dai, Y., Xu, C., Wang, Y., Wang, S., & Chen, Z. (2013). Effects of meclofenamic acid on limbic epileptogenesis in mice kindling models. *Neuroscience letters*, *543*, 110-114.
- Jones, P. A., Issa, J. P. J., & Baylin, S. (2016). Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature Reviews Genetics*, *17*(10), 630.
- Kalari, S., Jung, M., Kernstine, K. H., Takahashi, T., & Pfeifer, G. P. (2013). The DNA methylation landscape of small cell lung cancer suggests a differentiation defect of neuroendocrine cells. *Oncogene*, *32*(30), 3559-3568.
- Kalemkerian, G. P. (2011). Staging and imaging of small cell lung cancer. *Cancer Imaging*, *11*(1), 253.
- Kalgutkar, A. S., Crews, B. C., Rowlinson, S. W., Marnett, A. B., Kozak, K. R., Remmel, R. P., & Marnett, L. J. (2000). Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(2), 925-930.
- Kashima, J., Kitadai, R., & Okuma, Y. (2019). Molecular and morphological profiling of lung cancer: a foundation for "next-generation" pathologists and oncologists. *Cancers*, *11*(5), 599.

- Keller, L., Xu, W., Wang, H. X., Winblad, B., Fratiglioni, L., & Graff, C. (2011). The obesity related gene, FTO, interacts with APOE, and is associated with Alzheimer's disease risk: a prospective cohort study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 23(3), 461-469.
- Kim, S. Y. (2018). Cancer energy metabolism: shutting power off cancer factory. *Biomolecules & Therapeutics*, 26(1), 39.
- Kisluk, J., Ciborowski, M., Niemira, M., Kretowski, A., & Niklinski, J. (2014). Proteomics biomarkers for non-small cell lung cancer. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 101, 40-49.
- Kole, R., Krainer, A. R., & Altman, S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature reviews Drug discovery*, 11(2), 125-140.
- Kondo, R., Ishino, K., Wada, R., Takata, H., Peng, W. X., Kudo, M., ... & Naito, Z. (2019). Downregulation of protein disulfide-isomerase A3 expression inhibits cell proliferation and induces apoptosis through STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*, 54(4), 1409-1421.
- Kovala-Demertzi, D., Dokorou, V., Primikiri, A., Vargas, R., Silvestru, C., Russo, U., & Demertzis, M. A. (2009). Organotin meclofenamic complexes: synthesis, crystal structures and antiproliferative activity of the first complexes of meclofenamic acid—novel anti-tuberculosis agents. *Journal of inorganic biochemistry*, 103(5), 738-744.
- Kovala-Demertzi, D., Staninska, M., Garcia-Santos, I., Castineiras, A., & Demertzis, M. A. (2011). Synthesis, crystal structures and spectroscopy of meclofenamic acid and its metal complexes with manganese (II), copper (II), zinc (II) and cadmium (II). Antiproliferative and superoxide dismutase activity. *Journal of inorganic biochemistry*, 105(9), 1187-1195.
- Kwon, M. C., & Berns, A. (2013). Mouse models for lung cancer. *Molecular oncology*, 7(2), 165-177.
- Langer, C. J., Albert, I., Ross, H. J., Kovacs, P., Blakely, L. J., Pajkos, G., ... & GEM017 Investigators. (2014). Randomized phase II study of carboplatin and etoposide with or without obatoclox mesylate in extensive-stage small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 85(3), 420-428.
- Lee, Y. T., & Wang, Q. (1999). Inhibition of hKv2. 1, a major human neuronal voltage-gated K<sup>+</sup> channel, by meclofenamic acid. *European journal of pharmacology*, 378(3), 349-356.
- Li, H., Song, Y., He, Z., Chen, X., Wu, X., Li, X., ... & Fan, Z. (2018). Meclofenamic acid reduces reactive oxygen species accumulation and apoptosis, inhibits excessive autophagy, and protects hair cell-like HEI-OC1 cells from cisplatin-induced damage. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 139.
- Li, J., Zhu, L., Shi, Y., Liu, J., Lin, L., & Chen, X. (2019). m6A demethylase FTO promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis via mediating PKM2 demethylation. *American journal of translational research*, 11(9), 6084.
- Li, Z., Weng, H., Su, R., Weng, X., Zuo, Z., Li, C., ... & Chen, J. (2017). FTO plays an oncogenic role in acute myeloid leukemia as a N6-methyladenosine RNA demethylase. *Cancer cell*, 31(1), 127-141.
- Lim, J. S., Ibaseta, A., Fischer, M. M., Cancilla, B., O'Young, G., Cristea, S., ... & Sage, J. (2017). Intratumoural heterogeneity generated by Notch signalling promotes small-cell lung cancer. *Nature*, 545(7654), 360-364.
- Lin, Z., Hsu, P. J., Xing, X., Fang, J., Lu, Z., Zou, Q., ... & Tong, M. H. (2017). Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N 6-methyladenosine modulates murine spermatogenesis. *Cell research*, 27(10), 1216-1230.
- Lindeman, N. I., Cagle, P. T., Aisner, D. L., Arcila, M. E., Beasley, M. B., Bernicker, E. H., ... & Yatabe, Y. (2018). Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 142(3), 321-346.

- Littman, A. J., Jackson, L. A., & Vaughan, T. L. (2005). Chlamydia pneumoniae and lung cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 14(4), 773-778.
- Liu, J., Ren, D., Du, Z., Wang, H., Zhang, H., & Jin, Y. (2018). m6A demethylase FTO facilitates tumor progression in lung squamous cell carcinoma by regulating MZF1 expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 502(4), 456-464.
- Liu, K., Tang, Z., Huang, A., Chen, P., Liu, P., Yang, J., ... & Huang, P. (2017). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes cancer growth and metastasis through upregulation of SNAIL expression. *International journal of oncology*, 50(1), 252-262.
- Luo, J., Liu, H., Luan, S., He, C., & Li, Z. (2018). Aberrant regulation of mRNA m6A modification in cancer development. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2515.
- Ma, J. Z., Yang, F., Zhou, C. C., Liu, F., Yuan, J. H., Wang, F., ... & Sun, S. H. (2017). METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N6-methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing. *Hepatology*, 65(2), 529-543.
- McFadden, D. G., Papagiannakopoulos, T., Taylor-Weiner, A., Stewart, C., Carter, S. L., Cibulskis, K., ... & Jacks, T. (2014). Genetic and clonal dissection of murine small cell lung carcinoma progression by genome sequencing. *Cell*, 156(6), 1298-1311.
- McGee, A. M., Douglas, D. L., Liang, Y., Hyder, S. M., & Baines, C. P. (2011). The mitochondrial protein Clqbp promotes cell proliferation, migration and resistance to cell death. *Cell Cycle*, 10(23), 4119-4127.
- Meder, L., König, K., Ozretić, L., Schultheis, A. M., Ueckerth, F., Ade, C. P., ... & Buettner, R. (2016). NOTCH, ASCL1, p53 and RB alterations define an alternative pathway driving neuroendocrine and small cell lung carcinomas. *International journal of cancer*, 138(4), 927-938.
- Mitropoulos, K., Papadima, E. M., Xiromerisiou, G., Balasopoulou, A., Charalampidou, K., Galani, V., ... & Patrinos, G. P. (2017). Genomic variants in the FTO gene are associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Greek patients. *Human genomics*, 11(1), 1-10.
- Mokhtari, R. B., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022.
- Mou, S. J., Yang, P. F., Liu, Y. P., Xu, N., Jiang, W. W., & Yue, W. J. (2020). BCLAF1 promotes cell proliferation, invasion and drug-resistance through targeting lncRNA NEAT1 in hepatocellular carcinoma. *Life sciences*, 242, 117177.
- Narayanan, S., Cai, C. Y., Assaraf, Y. G., Guo, H. Q., Cui, Q., Wei, L., ... & Chen, Z. S. (2020). Targeting the ubiquitin-proteasome pathway to overcome anti-cancer drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 48, 100663.
- Niu, Y., Lin, Z., Wan, A., Sun, L., Yan, S., Liang, H., ... & Wan, G. (2021). Loss-of-function genetic screening identifies ALDOA as an essential driver for liver cancer cell growth under hypoxia. *Hepatology*.
- Niu, Y., Ma, F., Huang, W., Fang, S., Li, M., Wei, T., & Guo, L. (2017). Long non-coding RNA TUG1 is involved in cell growth and chemoresistance of small cell lung cancer by regulating LIMK2b via EZH2. *Molecular cancer*, 16(1), 1-13.
- Nosaki, K., & Seto, T. (2015). The role of radiotherapy in the treatment of small-cell lung cancer. *Current treatment options in oncology*, 16(12), 1-9.
- Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J., & Aifantis, I. (2014). From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer cell*, 25(3), 318-334.
- Panner Selvam, M. K., Agarwal, A., & Pushparaj, P. N. (2019). A quantitative global proteomics approach to understanding the functional pathways dysregulated in the spermatozoa of asthenozoospermic testicular cancer patients. *Andrology*, 7(4), 454-462.

- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *12*(4), 252-264.
- Pastor, M. D., Nogal, A., Molina-Pinelo, S., Carnero, A., & Paz-Ares, L. (2013). Proteomic biomarkers in lung cancer. *Clinical and Translational Oncology*, *15*(9), 671-682.
- Pesch, B., Kendzia, B., Gustavsson, P., Jöckel, K. H., Johnen, G., Pohlabein, H., ... & Brüning, T. (2012). Cigarette smoking and lung cancer—relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case–control studies. *International journal of cancer*, *131*(5), 1210-1219.
- Pietanza, M. C., Kadota, K., Huberman, K., Sima, C. S., Fiore, J. J., Sumner, D. K., ... & Krug, L. M. (2012). Phase II trial of temozolomide in patients with relapsed sensitive or refractory small cell lung cancer, with assessment of methylguanine-DNA methyltransferase as a potential biomarker. *Clinical Cancer Research*, *18*(4), 1138-1145.
- Pinello, N., Sun, S., & Wong, J. J. L. (2018). Aberrant expression of enzymes regulating m6A mRNA methylation: implication in cancer. *Cancer biology & medicine*, *15*(4), 323.
- Poirier, J. T., Gardner, E. E., Connis, N., Moreira, A. L., De Stanchina, E., Hann, C. L., & Rudin, C. M. (2015). DNA methylation in small cell lung cancer defines distinct disease subtypes and correlates with high expression of EZH2. *Oncogene*, *34*(48), 5869-5878.
- Pujol, J. L., Lavole, A., Quoi, E., Molinier, O., Souquet, P. J., Barlesi, F., ... & Raspaud, C. (2015). Randomized phase II–III study of bevacizumab in combination with chemotherapy in previously untreated extensive small-cell lung cancer: results from the IFCT-0802 trial. *Annals of Oncology*, *26*(5), 908-914.
- Pusapati, R. V., Daemen, A., Wilson, C., Sandoval, W., Gao, M., Haley, B., ... & Settleman, J. (2016). mTORC1-dependent metabolic reprogramming underlies escape from glycolysis addiction in cancer cells. *Cancer cell*, *29*(4), 548-562.
- Putignani, L., Raffa, S., Pescosolido, R., Rizza, T., Del Chierico, F., Leone, L., ... & Grammatico, P. (2012). Preliminary evidences on mitochondrial injury and impaired oxidative metabolism in breast cancer. *Mitochondrion*, *12*(3), 363-369.
- Reactionbiology. <https://www.reactionbiology.com/services/cell-based-assays/invasion-assay> Erişim: 19 Nisan 2021.
- Reguart, N., Rosell, R., Cardenal, F., Cardona, A. F., Isla, D., Palmero, R., ... & Taron, M. (2014). Phase I/II trial of vorinostat (SAHA) and erlotinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations after erlotinib progression. *Lung cancer*, *84*(2), 161-167.
- Reitz, C., Tosto, G., Mayeux, R., & Luchsinger, J. A. (2012). Genetic variants in the Fat and Obesity Associated (FTO) gene and risk of Alzheimer's disease. *PloS one*, *7*(12), e50354.
- Rivera, M., Cohen-Woods, S., Kapur, K., Breen, G., Ng, M. Y., Butler, A. W., ... & McGuffin, P. (2012). Depressive disorder moderates the effect of the FTO gene on body mass index. *Molecular psychiatry*, *17*(6), 604-611.
- Roberts, S. A., Lawrence, M. S., Klimczak, L. J., Grimm, S. A., Fargo, D., Stojanov, P., ... & Gordenin, D. A. (2013). An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nature genetics*, *45*(9), 970-976.
- Roesch, K., Hynds, P. J., Varga, R., Tranebjaerg, L., & Koehler, C. M. (2004). The calcium-binding aspartate/glutamate carriers, citrin and aralar1, are new substrates for the DDP1/TIMM8a–TIMM13 complex. *Human molecular genetics*, *13*(18), 2101-2111.
- Rudin, C. M., Durinck, S., Stawiski, E. W., Poirier, J. T., Modrusan, Z., Shames, D. S., ... & Seshagiri, S. (2012). Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nature genetics*, *44*(10), 1111-1116.

- Rudin, C. M., Salgia, R., Wang, X., Hodgson, L. D., Masters, G. A., Green, M., & Vokes, E. E. (2008). Randomized phase II Study of carboplatin and etoposide with or without the bcl-2 antisense oligonucleotide oblimersen for extensive-stage small-cell lung cancer: CALGB 30103. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(6), 870.
- Samec, M., Liskova, A., Koklesova, L., Samuel, S. M., Zhai, K., Buhrmann, C., ... & Kubatka, P. (2020). Flavonoids against the Warburg phenotype—Concepts of predictive, preventive and personalised medicine to cut the Gordian knot of cancer cell metabolism. *EPMA Journal*, 1-22.
- Sanchez-Pulido, L., & Andrade-Navarro, M. A. (2007). The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC biochemistry*, 8(1), 1-6.
- Saputra, E. C., Huang, L., Chen, Y., & Tucker-Kellogg, L. (2018). Combination therapy and the evolution of resistance: the theoretical merits of synergism and antagonism in cancer. *Cancer research*, 78(9), 2419-2431.
- Saunders, L. R., Bankovich, A. J., Anderson, W. C., Aujay, M. A., Bheddah, S., Black, K., ... & Dylla, S. J. (2015). A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Science translational medicine*, 7(302), 302ra136-302ra136.
- Schabath, M. B., & Cote, M. L. (2019). Cancer progress and priorities: lung cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 28(10), 1563-1579.
- Schober, W., Kehlbach, R., Gebert, R., Wiskirchen, J., Rodegerdts, E., Claussen, C. D., & Duda, S. H. (2002). Meclofenamic acid for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation and migration: an in vitro study. *Cardiovascular and interventional radiology*, 25(1), 57-63.
- Schultheis, A. M., Bos, M., Schmitz, K., Wilsberg, L., Binot, E., Wolf, J., ... & Schildhaus, H. U. (2014). Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) amplification is a potential therapeutic target in small-cell lung cancer. *Modern pathology*, 27(2), 214-221.
- Seetharamu, N., Budman, D. R., & Sullivan, K. M. (2016). Immune checkpoint inhibitors in lung cancer: past, present and future. *Future Oncology*, 12(9), 1151-1163.
- Sekine, Y., Nakayama, H., Miyazawa, Y., Kato, H., Furuya, Y., Arai, S., ... & Suzuki, K. (2018). Simvastatin in combination with meclufenamic acid inhibits the proliferation and migration of human prostate cancer PC-3 cells via an AKR1C3 mechanism. *Oncology letters*, 15(3), 3167-3172.
- Semenova, E. A., Nagel, R., & Berns, A. (2015). Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes & development*, 29(14), 1447-1462.
- Shang, Y., Zhang, F., Li, D., Li, C., Li, H., Jiang, Y., & Zhang, D. (2018). Overexpression of UQCRC2 is correlated with tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Pathology-Research and Practice*, 214(10), 1613-1620.
- Shen, X., Han, B., Shen, Y., Yang, J., Ren, T., Sha, G., & Xiang, Y. (2014). Expression of C1QBP gene and its correlation with drug resistance in human resistance choriocarcinoma cell line. *Zhonghua fu Chan ke za zhi*, 49(8), 616-620.
- Shibata, T., Kokubu, A., Tsuta, K., & Hirohashi, S. (2009). Oncogenic mutation of PIK3CA in small cell lung carcinoma: a potential therapeutic target pathway for chemotherapy-resistant lung cancer. *Cancer letters*, 283(2), 203-211.
- Shiratori, R., Furuichi, K., Yamaguchi, M., Miyazaki, N., Aoki, H., Chibana, H., ... & Aoki, S. (2019). Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Scientific reports*, 9(1), 1-15.
- Simos, D., Sajjady, G., Sergi, M., Liew, M. S., Califano, R., Ho, C., ... & Wheatley-Price, P. (2014). Third-line chemotherapy in small-cell lung cancer: an international analysis. *Clinical lung cancer*, 15(2), 110-118.



- Škarydová, L., Živná, L., Xiong, G., Maser, E., & Wsól, V. (2009). AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. *Chemico-biological interactions*, 178(1-3), 138-144.
- Slotman, B., Faivre-Finn, C., Kramer, G., Rankin, E., Snee, M., Hatton, M., ... & Senan, S. (2007). Prophylactic cranial irradiation in extensive small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 357(7), 664-672.
- Soh, J. W., & Weinstein, I. B. (2003). Role of COX-independent targets of NSAIDs and related compounds in cancer prevention and treatment. *Progress in experimental tumor research*, 37, 261-283.
- Soh, J. W., Kazi, J. U., Li, H., Thompson, W. J., & Weinstein, I. B. (2008). Celecoxib-induced growth inhibition in SW480 colon cancer cells is associated with activation of protein kinase G. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 47(7), 519-525.
- Soh, J. W., Mao, Y., Liu, L., Thompson, W. J., Pamukcu, R., & Weinstein, I. B. (2001). Protein kinase G activates the JNK1 pathway via phosphorylation of MEKK1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16406-16410.
- Soriano-Hernández, A. D., Galvan-Salazar, H. R., Montes-Galindo, D. A., Rodriguez-Hernandez, A., Martinez-Martinez, R., Guzman-Esquivel, J., ... & Delgado-Enciso, I. (2012). Antitumor effect of meclufenamic acid on human androgen-independent prostate cancer: a preclinical evaluation. *International urology and nephrology*, 44(2), 471-477.
- Soriano-Hernandez, A. D., Madrigal-Pérez, D., Galvan-Salazar, H. R., Martinez-Fierro, M. L., Valdez-Velazquez, L. L., Espinoza-Gómez, F., ... & Delgado-Enciso, I. (2015). Anti-inflammatory drugs and uterine cervical cancer cells: Antineoplastic effect of meclufenamic acid. *Oncology letters*, 10(4), 2574-2578.
- Spiro, S. G., James, L. E., Rudd, R. M., Trask, C. W., Tobias, J. S., Snee, M., ... & Hackshaw, A. K. (2006). Early compared with late radiotherapy in combined modality treatment for limited disease small-cell lung cancer: a London Lung Cancer Group multicenter randomized clinical trial and meta-analysis. *Journal of clinical oncology*, 24(24), 3823-3830.
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 111(1), A3-B.
- Su, R., Dong, L., Li, C., Nachtergaele, S., Wunderlich, M., Qing, Y., ... & Chen, J. (2018). R-2HG exhibits anti-tumor activity by targeting FTO/m6A/MYC/CEBPA signaling. *Cell*, 172(1-2), 90-105.
- Suster, D. I., & Mino-Kenudson, M. (2020). Molecular Pathology of Primary Non-small Cell Lung Cancer. *Archives of Medical Research*.
- Szarvas, T., Sevcenco, S., Módos, O., Keresztes, D., Nyirády, P., Kubik, A., ... & Kramer, G. (2018, June). Circulating syndecan-1 is associated with chemotherapy-resistance in castration-resistant prostate cancer. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 36, No. 6, pp. 312-e9). Elsevier.
- Takamochi, K., Ohmiya, H., Itoh, M., Mogushi, K., Saito, T., Hara, K., ... & Kawaji, H. (2016). Novel biomarkers that assist in accurate discrimination of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *BMC cancer*, 16(1), 1-10.
- Tang, Z., Yuan, S., Hu, Y., Zhang, H., Wu, W., Zeng, Z., ... & Huang, P. (2012). Over-expression of GAPDH in human colorectal carcinoma as a preferred target of 3-bromopyruvate propyl ester. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 44(1), 117-125.
- Taromi, S., Lewens, F., Arsenic, R., Sedding, D., Sängler, J., Kunze, A., ... & Grabowski, P. (2017). Proteasome inhibitor bortezomib enhances the effect of standard chemotherapy in small cell lung cancer. *Oncotarget*, 8(57), 97061.
- Tarrado-Castellarnau, M., Diaz-Moralli, S., Polat, I. H., Sanz-Pamplona, R., Alenda, C., Moreno, V., ... & Cascante, M. (2017). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is overexpressed in colorectal cancer onset. *Translational Medicine Communications*, 2(1), 1-9.

Tecentriq. <https://www.tecentriq.com/sclc/about.html>. Erişim: 20 Nisan 2021.

Teran, L. M., Montes-Vizuet, R., Li, X., & Franz, T. (2015). Respiratory proteomics: from descriptive studies to personalized medicine. *Journal of proteome research*, *14*(1), 38-50.

Thompson, W. J., Piazza, G. A., Li, H., Liu, L., Fetter, J., Zhu, B., ... & Pamukcu, R. (2000). Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated  $\beta$ -catenin. *Cancer research*, *60*(13), 3338-3342.

Tjong, M. C., Mak, D. Y., Shahi, J., Li, G. J., Chen, H., & Louie, A. V. (2020). Current Management and Progress in Radiotherapy for Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, *10*, 1146.

Torre, L. A., Lindsey, A., & Rebecca, L. (2016). Siegel rL, JemAL A. *Lung cancer statistics. Adv Exp Med Biol*, *893*, 1-19.

Toyooka, S., Toyooka, K. O., Miyajima, K., Reddy, J. L., Toyota, M., Sathyanarayana, U. G., ... & Gazdar, A. F. (2003). Epigenetic down-regulation of death-associated protein kinase in lung cancers. *Clinical Cancer Research*, *9*(8), 3034-3041.

Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A. P., Marx, A., & Nicholson, A. G. (2015). Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *Journal of Thoracic Oncology*, *10*(9), 1240-1242.

Turner, M. C., Chen, Y., Krewski, D., Calle, E. E., & Thun, M. J. (2007). Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *176*(3), 285-290.

Urbanski, L. M., Leclair, N., & Anczuków, O. (2018). Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *9*(4), e1476.

Vallieres, E., Shepherd, F. A., Crowley, J., Van Houtte, P., Postmus, P. E., Carney, D., ... & Goldstraw, P. (2009). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals regarding the relevance of TNM in the pathologic staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of thoracic oncology*, *4*(9), 1049-1059.

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, *324*(5930), 1029-1033.

Veruki, M. L., & Hartveit, E. (2009). Meclofenamic acid blocks electrical synapses of retinal AII amacrine and on-cone bipolar cells. *Journal of neurophysiology*, *101*(5), 2339-2347.

Villalobos, P., & Wistuba, I. I. (2017). Lung cancer biomarkers. *Hematology/Oncology Clinics*, *31*(1), 13-29.

Visvanathan, A., Patil, V., Arora, A., Hegde, A. S., Arivazhagan, A., Santosh, V., & Somasundaram, K. (2018). Essential role of METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance. *Oncogene*, *37*(4), 522-533.

Vu, L. P., Pickering, B. F., Cheng, Y., Zaccara, S., Nguyen, D., Minuesa, G., ... & Kharas, M. G. (2017). The N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells. *Nature medicine*, *23*(11), 1369.

Vyas, S., Zaganjor, E., & Haigis, M. C. (2016). Mitochondria and cancer. *Cell*, *166*(3), 555-566.

Wang, R., Dillon, C. P., Shi, L. Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., ... & Green, D. R. (2011). The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*, *35*(6), 871-882.

Wang, R., Han, Z., Liu, B., Zhou, B., Wang, N., Jiang, Q., ... & Chang, J. (2018). Identification of natural compound radicicol as a potent FTO inhibitor. *Molecular pharmaceuticals*, *15*(9), 4092-4098.

- Wang, X., Zuo, D., Chen, Y., Li, W., Liu, R., He, Y., ... & Ba, Y. (2014). Shed Syndecan-1 is involved in chemotherapy resistance via the EGFR pathway in colorectal cancer. *British journal of cancer*, *111*(10), 1965-1976.
- Wang, Z. Y., Loo, T. Y., Shen, J. G., Wang, N., Wang, D. M., Yang, D. P., ... & Chen, J. P. (2012). LDH-A silencing suppresses breast cancer tumorigenicity through induction of oxidative stress mediated mitochondrial pathway apoptosis. *Breast cancer research and treatment*, *131*(3), 791-800.
- Waqar, S. N., & Morgensztern, D. (2017). Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). *Pharmacology & therapeutics*, *180*, 16-23.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, *123*(3191), 309-314.
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*, *8*(6), 519-530.
- Wee, Z. N., Li, Z., Lee, P. L., Lee, S. T., Lim, Y. P., & Yu, Q. (2014). EZH2-mediated inactivation of IFN- $\gamma$ -JAK-STAT1 signaling is an effective therapeutic target in MYC-driven prostate cancer. *Cell reports*, *8*(1), 204-216.
- Weinberg, S. E., & Chandel, N. S. (2015). Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature chemical biology*, *11*(1), 9.
- Wen, L., Pan, X., Yu, Y., & Yang, B. (2020). Down-regulation of FTO promotes proliferation and migration, and protects bladder cancer cells from cisplatin-induced cytotoxicity. *BMC urology*, *20*(1), 1-8.
- Weng, H., Huang, H., Wu, H., Qin, X., Zhao, B. S., Dong, L., ... & Chen, J. (2018). METTL14 inhibits hematopoietic stem/progenitor differentiation and promotes leukemogenesis via mRNA m6A modification. *Cell stem cell*, *22*(2), 191-205.
- Whang-Peng, J., Kao-Shan, C. S., Lee, E. C., Bunn, P. A., Carney, D. N., Gazdar, A. F., & Minna, J. D. (1982). Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer; deletion 3p (14-23). *Science*, *215*(4529), 181-182.
- Wistuba, I. I., Behrens, C., Virmani, A. K., Mele, G., Milchgrub, S., Girard, L., ... & Minna, J. D. (2000). High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Research*, *60*(7), 1949-1960.
- Wu, K. K. Y. (1998). Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical pharmacology*, *55*(5), 543-547.
- Wynes, M. W., Hinz, T. K., Gao, D., Martini, M., Marek, L. A., Ware, K. E., ... & Heasley, L. E. (2014). FGFR1 mRNA and protein expression, not gene copy number, predict FGFR TKI sensitivity across all lung cancer histologies. *Clinical cancer research*, *20*(12), 3299-3309.
- Xiang, Y., Laurent, B., Hsu, C. H., Nachtergaele, S., Lu, Z., Sheng, W., ... & Shi, Y. (2017). Correction: Corrigendum: RNA m6A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response. *Nature*, *552*(7685), 430-430.
- Xu, Y., Ye, S., Zhang, N., Zheng, S., Liu, H., Zhou, K., ... & Wang, T. (2020). The FTO/miR-181b-3p/ARL5B signaling pathway regulates cell migration and invasion in breast cancer. *Cancer Communications*, *40*(10), 484-500.
- Yang, Z., Li, J., Feng, G., Gao, S., Wang, Y., Zhang, S., ... & Zhang, X. (2017). MicroRNA-145 modulates N6-methyladenosine levels by targeting the 3'-untranslated mRNA region of the N6-methyladenosine binding YTH domain family 2 protein. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(9), 3614-3623.

- Yin, Y. P., Shi, W. H., Deng, K., Liu, X. L., Li, H., Lv, X. T., ... & Lin, W. C. (2020). Combinations of proteasome inhibitors with obatoclox are effective for small cell lung cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1-13.
- Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of clinical next-generation sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(11), 1544-1557.
- Yokota, J., Shiraishi, K., & Kohno, T. (2010). Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions. *Advances in cancer research*, 109, 51-72.
- Yu, G., & Wang, J. (2013). Significance of hyaluronan binding protein (HABP1/P32/gC1qR) expression in advanced serous ovarian cancer patients. *Experimental and molecular pathology*, 94(1), 210-215.
- Yu, L., Xu, H., Zhang, S., Chen, J., & Yu, Z. (2020). SDC1 promotes cisplatin resistance in hepatic carcinoma cells via PI3K-AKT pathway. *Human cell*, 33(3), 721-729.
- Yue, Y., Liu, J., Cui, X., Cao, J., Luo, G., Zhang, Z., ... & Liu, J. (2018). VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3' UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell discovery*, 4(1), 1-17.
- Zahra, K., Dey, T., Ashish, A., Pandey, U., & Mishra, S. P. (2020). Pyruvate kinase M2 and cancer: the role of PKM2 in promoting tumorigenesis. *Frontiers in oncology*, 10, 159.
- Zhang, C., Samanta, D., Lu, H., Bullen, J. W., Zhang, H., Chen, I., ... & Semenza, G. L. (2016). Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m6A-demethylation of NANOG mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(14), E2047-E2056.
- Zhang, C., Zhao, L. M., Wu, H., Tian, G., Dai, S. L., Zhao, R. Y., & Shan, B. E. (2018). C/d-box snord105b promotes tumorigenesis in gastric cancer via aldo/a-c-myc pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(6), 2471-2482.
- Zhang, S., Zhao, B. S., Zhou, A., Lin, K., Zheng, S., Lu, Z., ... & Huang, S. (2017). m6A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program. *Cancer cell*, 31(4), 591-606.
- Zhang, Y., & Yang, J. M. (2013). Altered energy metabolism in cancer: a unique opportunity for therapeutic intervention. *Cancer biology & therapy*, 14(2), 81-89.
- Zhao, X., Chen, Y., Mao, Q., Jiang, X., Jiang, W., Chen, J., ... & Sun, X. (2018). Overexpression of YTHDF1 is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomarkers*, 21(4), 859-868.
- Zhao, X., Yang, Y., Sun, B. F., Shi, Y., Yang, X., Xiao, W., ... & Yang, Y. G. (2014). FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell research*, 24(12), 1403-1419.
- Zhao, Y., Butler, E. B., & Tan, M. (2013). Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell death & disease*, 4(3), e532-e532.
- Zhou, S., Bai, Z. L., Xia, D., Zhao, Z. J., Zhao, R., Wang, Y. Y., & Zhe, H. (2018). FTO regulates the chemo-radiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting  $\beta$ -catenin through mRNA demethylation. *Molecular carcinogenesis*, 57(5), 590-597.
- Zhu, Q. G., Zhang, S. M., Ding, X. X., He, B., & Zhang, H. Q. (2017). Driver genes in non-small cell lung cancer: Characteristics, detection methods, and targeted therapies. *Oncotarget*, 8(34), 57680.
- Ziv, T., Barnea, E., Segal, H., Sharon, R., Beer, I., & Admon, A. (2006). Comparative proteomics of small cell lung carcinoma. *Cancer Biomarkers*, 2(6), 219-234.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

<b><u>Kişisel Bilgiler</u></b>	
Adı Soyadı	Sevinç Yanar
Doğum Yeri ve Tarihi	
İletişim Adresi	
Telefon	
E-posta	
Eğitim Bilgileri	<ul style="list-style-type: none"><li>• Doktora: Tıbbi Biyoloji, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli Üniversitesi (2016- )</li><li>• Yüksek lisans: Histoloji ve Embriyoloji, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sakarya Üniversitesi (2013-2015)</li><li>• Yüksek lisans: Biyoteknoloji, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yeditepe Üniversitesi (2009-2012)</li><li>• Lisans: Genetik ve Biyomühendislik, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Yeditepe Üniversitesi (2004-2009)</li></ul>
Mesleki Deneyim/ İşyeri Bilgileri	<ul style="list-style-type: none"><li>• Araştırma görevlisi, Kocaeli Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (2016- )</li><li>• Araştırmacı, Oxford Üniversitesi, Fizyoloji, Anatomi ve Genetik Bölümü (2015)</li><li>• Araştırma görevlisi, Sakarya Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (2013-2016)</li><li>• Araştırma görevlisi, Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü (2010-2012)</li></ul>
Yabancı Dil Bilgileri	İngilizce (İleri Seviye), Almanca (İleri Seviye)
Üye Olduğu Mesleki / Sosyal Kuruluşlar	Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, Türkiye Proteomik Derneği, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği
<b><u>Bilimsel Etkinlikler</u></b>	
Makaleler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Guney Eskiler, G., <b>Yanar, S.</b>, Akpınar, G., &amp; Kasap, M. (2021). Proteomic analysis of talazoparib</li></ul>

	<p>resistance in triple-negative breast cancer cells. <i>Journal of Biochemical and Molecular Toxicology</i>, 35(3), e22678.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• KANLI, A., Kasap, M., AKPINAR, G., &amp; <b>Yanar, S.</b> (2020). Changes Occurring in the Proteome of SH-SY5Y Cells Caused by Fat Mass and Obesity Associated (FTO) Protein Expression Reveals Multifaceted Properties of the FTO Protein. <i>Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi</i>, 6(2), 101-112.</li><li>• Yilmaz, M. S., Sahin, E., Kaymaz, R., Altunkaynak, B. Z., Akidil, A. O., <b>Yanar, S.</b>, ... &amp; Guven, M. (2019). Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after Vivosorb and Epifilm application. <i>Ear, Nose &amp; Throat Journal</i>, 0145561319854320.</li><li>• <b>Yanar, S.</b>, AÇIKGÖZ, Ş., Şahin, E., &amp; SARIKAYA, A. (2017). Spermatogonial Kök Hücre/Spermatogonial Stem Cell. <i>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi</i>, 4(1), 37-44.</li><li>• Kayabasoglu, G., Ozbek, E., <b>Yanar, S.</b>, Sahin, F., Keles, O. N., Yilmaz, M. S., &amp; Guven, M. (2015). The comparison of the viability of crushed, morselized and diced cartilage grafts: a confocal microscopic study. <i>European Archives of Oto-Rhino-Laryngology</i>, 272(5), 1135-1142.</li><li>• Özbek, E., Cengiz, N., &amp; <b>Yanar, S.</b> (2013). Embriyo implantasyonunu destekleyen ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan immunosupresif bir protein: Erken Gebelik Faktörü. <i>Sakarya Tıp Dergisi</i>, 3(3), 157-164.</li><li>• <b>Seçer (Yanar), S.</b>, Özden, A., Güllüoğlu, Ş., &amp; Ekinci, F. Y. (2011). Diyetle ilişkili hastalıkların</li></ul>
--	---

	<p>önlenmesi ve hayat kalitesinin iyileştirilmesi için genotiplemeyle dayalı kişiye özel beslenme.</p>
Projeler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kocaeli Üniversitesi BAP Birimi “Hızlı Destek Projesi” (No: 2583); Mikoplazma ile kontamine olmuş hücrelerin uygun doz ve süre ile tedavilerinin belirlenmesi</li> <li>• Kocaeli Üniversitesi BAP Birimi “Lisansüstü, Doktora ve Tıpta/Dış Hekimliğinde Uzmanlık Tezlerini Destekleme Projeleri” (No: 2019/035); Meklofenamik Asit ile FTO (fat-mass and obesity associated gene) Baskılanmasının Küçük Hücreli Akciğer Kanserinin Progresyonu ve Hücre Proteomu Üzerine Etkisinin Araştırılması</li> </ul>
Bildiriler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kanlı, A., &amp; Yanar, S. Assessment of FTO Protein Expression Levels in Various Cancer Cell Lines by Western Blotting. TUPA 2020, İstanbul, Türkiye.</li> <li>• Yanar, S., Kasap, M., &amp; Kanlı, A. WST-1 Canlılık Testinin Limitasyonları: Topotekanın Sitotoksik Etkisinin Ölçülmesinde Yanlış-Pozitif Sonuçlar. 3. Ulusal Proteomik Kongresi 2020, İstanbul, Türkiye.</li> <li>• Kayabaşoğlu G, Özbek E, <b>Yanar S</b>, Şahin F, Keleş ON, Yılmaz MS, Güven M. Konfokal mikroskopik bir çalışma: Farklı yöntemlerle elde edilen kıkırdak greftlerinin canlılıklarının değerlendirilmesi. II. Ulusal Tıp Kongresi-Geleceğin Tıbbı II, 2015 Sakarya, Türkiye.</li> <li>• Özbek E, Ozbek A, Gedikli S, Kara A, Tatar A, <b>Yanar S</b>. Apoptotic Pathway Activation and Cytotoxicity of Melatonin in Cultured MCF-7 Cells. 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 2014, Izmir, Turkey.</li> <li>• Özbek E, <b>Yanar S</b>, Özbek A, Sahin F. Potential Effect of Traditional Preparation from Some Medical</li> </ul>

	<p>Plants on Wound Healing. 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 2014, Izmir, Turkey.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Özbek E, <b>Yanar S</b>, Özbek A, Asutay B, Canikyan S, Sahin F. Investigation of the cytotoxicity of a special essential oil combination that has a prominent antimicrobial activity. 5th European Workshop on Lipid Mediators, 2014, İstanbul, Turkey.</li> <li>• Ozbek E, Ozbek A, Demirci T, <b>Yanar S</b>. High fat diet-induced obesity causes deleterious alterations in myocardium: An electron microscopic study using a rat model. 5th European Workshop on Lipid Mediators, 2014, Istanbul, Turkey.</li> <li>• <b>Yanar S</b>, Özbek E. İkiz gebeliklerde risk değerlendirmesi: Merkezi sinir sistemi malformasyonları. 8. Hücrel Sinir Bilim Günleri, 2014, Sakarya, Türkiye.</li> <li>• <b>Yanar S</b>, Özbek E, Cengiz N. Demans hastalıklarının tedavisinde yeni umut: lipit salları. 1.Ulusal Tıp Kongresi: Geleceğin Tıbbı, 2014, Sakarya, Türkiye.</li> <li>• Ozbek E, Demirci T, Ozbek A, <b>Yanar S</b>. Morphometric Changes of Sperm Samples From Obese Rats. The Second Women &amp; Health Congress with International Participation, 2013, Sakarya, Turkey .</li> <li>• Ozbek E, Ozbek A, Demirci T, <b>Yanar S</b>. Morphological Changes of Rat Testes Caused by Obesity. The Second Women &amp; Health Congress with International Participation, 2013, Sakarya, Turkey.</li> </ul>
Ödüller	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lisansüstü Eğitim, Enstitü Birinciliği, Yeditepe Üniversitesi 2012</li> <li>• Lisansüstü Eğitim, Enstitü Birinciliği, Sakarya Üniversitesi 2015</li> </ul>



**EKLER****EK-1: nLC-MS/MS Analizi ile Tanımlanan Proteinler**

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
Q9Y5L4	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13 OS=Homo sapiens GN=TIMM13 PE=1 SV=1	15	1	10,5	8,18	1000
P10606	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX5B PE=1 SV=2	9	1	13,7	8,81	1000
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2	4	1	39,6	9,01	1000
J3KR35	Coiled-coil domain containing 12, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CCDC12 PE=4 SV=1	14	1	20,5	8,47	1000
E7EQY1	Protein FAM136A OS=Homo sapiens GN=FAM136A PE=1 SV=1	7	2	26,8	8,24	1000
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Homo sapiens GN=NME1 PE=1 SV=1	17	1	17,1	6,19	61,083
P18827	Syndecan-1 OS=Homo sapiens GN=SDC1 PE=1 SV=3	5	1	32,4	4,63	24,487
Q13185	Chromobox protein homolog 3 OS=Homo sapiens GN=CBX3 PE=1 SV=4	8	2	20,8	5,33	6,25
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	3	1	58,8	5,21	5,236
H6VRG1	Keratin 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=3 SV=1	12	7	66,1	8,12	2,783
A0A024RDR0	High-mobility group box 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HMGB1 PE=4 SV=1	13	2	24,9	5,74	2,741
Q9Y3X0	Coiled-coil domain-containing protein 9 OS=Homo sapiens GN=CCDC9 PE=1 SV=1	2	1	59,7	5,4	2,39
D3DQ70	SERPINE1 mRNA binding protein 1, isoform CRA_d OS=Homo sapiens GN=SERBP1 PE=4 SV=1	8	3	50,9	9,33	2,299
P40222	Alpha-taxilin OS=Homo sapiens GN=TXLNA PE=1 SV=3	3	1	61,9	6,52	2,235
Q9P013	Spliceosome-associated protein CWC15 homolog	5	1	26,6	5,71	2,104

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
	OS=Homo sapiens GN=CWC15 PE=1 SV=2					
Q00688	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3 OS=Homo sapiens GN=FKBP3 PE=1 SV=1	5	1	25,2	9,28	2,095
Q9NYF8	Bcl-2-associated transcription factor 1 OS=Homo sapiens GN=BCLAF1 PE=1 SV=2	1	1	106,1	9,98	2,032
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	1	1	62	5,24	1,995
F5H7W8	Uncharacterized protein C12orf43 OS=Homo sapiens GN=C12orf43 PE=1 SV=1	4	1	28,6	9,73	1,976
H9ZYJ2	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=2 SV=1	21	2	11,7	4,92	1,95
B7Z596	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=2 SV=1	11	2	31,7	4,89	1,944
P54105	Methylosome subunit pICln OS=Homo sapiens GN=CLNS1A PE=1 SV=1	5	1	26,2	4,11	1,882
Q5W0H4	Translationally-controlled tumor protein OS=Homo sapiens GN=TPT1 PE=1 SV=1	5	1	21,5	5,49	1,868
P81605	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	10	1	11,3	6,54	1,848
Q9H1E3	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1 OS=Homo sapiens GN=NUCKS1 PE=1 SV=1	4	1	27,3	5,08	1,846
A0A0A0MRM9	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NOLC1 PE=4 SV=1	9	4	74,6	9,47	1,83
P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein OS=Homo sapiens GN=SRP14 PE=1 SV=2	6	1	14,6	10,04	1,81
Q53F64	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein AB isoform a variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	2	36	7,42	1,807
O60828	Polyglutamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PQBP1 PE=1 SV=1	19	2	30,5	6,33	1,803
Q9UEE9	Craniofacial development protein 1 OS=Homo sapiens GN=CFDP1 PE=1 SV=1	3	1	33,6	4,81	1,797
B3KUJ0	cDNA FLJ39996 fis, clone STOMA2002166, highly similar to Splicing factor 3B subunit 4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	44,5	8,24	1,791
P49006	MARCKS-related protein OS=Homo sapiens GN=MARCKSL1 PE=1 SV=2	14	2	19,5	4,67	1,722

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
Q8WXX5	DnaJ homolog subfamily C member 9 OS=Homo sapiens GN=DNAJC9 PE=1 SV=1	5	1	29,9	5,73	1,7
Q14498	RNA-binding protein 39 OS=Homo sapiens GN=RBM39 PE=1 SV=2	3	1	59,3	10,1	1,695
A0A024R284	Ubiquilin 1, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=UBQLN1 PE=4 SV=1	9	2	62,5	5,11	1,688
Q86SX6	Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLRX5 PE=1 SV=2	9	1	16,6	6,79	1,685
Q14157	Ubiquitin-associated protein 2-like OS=Homo sapiens GN=UBAP2L PE=1 SV=2	2	2	114,5	7,11	1,678
A0A024RBB7	Nucleosome assembly protein 1-like 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=NAP1L1 PE=3 SV=1	7	1	45,3	4,46	1,673
Q5U0J5	cAMP responsive element binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=CREB1 PE=2 SV=1	4	1	36,7	5,57	1,669
H0YJ60	DDB1- and CUL4-associated factor 8 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DCAF8 PE=4 SV=1	3	1	33,6	4,36	1,666
Q5T1J5	Putative coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein CHCHD2P9, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CHCHD2P9 PE=5 SV=1	19	1	15,5	9,89	1,663
Q9UBC2	Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1 OS=Homo sapiens GN=EPS15L1 PE=1 SV=1	2	1	94,2	5,11	1,663
B2R802	cDNA, FLJ93681, highly similar to Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A (SNRPA), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	20	3	31,3	9,86	1,656
Q9UK76	Hematological and neurological expressed 1 protein OS=Homo sapiens GN=HN1 PE=1 SV=3	53	4	16	5,6	1,655
Q9NX24	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=NHP2 PE=1 SV=1	12	1	17,2	8,22	1,653
Q92733	Proline-rich protein PRCC OS=Homo sapiens GN=PRCC PE=1 SV=1	4	1	52,4	5,1	1,65

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
O60925	Prefoldin subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PFDN1 PE=1 SV=2	9	1	14,2	6,81	1,646
M0R1T5	Charged multivesicular body protein 2a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CHMP2A PE=1 SV=1	8	1	24,9	5,27	1,634
A0A024R6N2	Non-specific serine/threonine protein kinase OS=Homo sapiens GN=CDC42BPB PE=4 SV=1	1	1	194,2	6,37	1,633
Q9BTT0	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E OS=Homo sapiens GN=ANP32E PE=1 SV=1	5	2	30,7	3,85	1,633
P33316	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DUT PE=1 SV=4	17	3	26,5	9,36	1,625
A8K644	Splicing factor, arginine/serine-rich 4, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=SFRS4 PE=2 SV=1	11	1	56,7	11,52	1,619
Q96K17	Transcription factor BTF3 homolog 4 OS=Homo sapiens GN=BTF3L4 PE=1 SV=1	21	2	17,3	6,35	1,617
V9HW44	Epididymis secretory protein Li 303 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-303 PE=2 SV=1	4	1	25,6	5,92	1,615
Q5T089	MORN repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=MORN1 PE=2 SV=2	3	1	53,8	7,12	1,601
Q9Y2W2	WW domain-binding protein 11 OS=Homo sapiens GN=WBP11 PE=1 SV=1	2	1	70	8,38	1,594
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=3	43	4	35,9	9,88	1,593
P55036	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens GN=PSMD4 PE=1 SV=1	7	1	40,7	4,79	1,583
H0YHG0	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	4	2	59,1	8,59	1,582
E9PGC8	Microtubule-associated protein 1A OS=Homo sapiens GN=MAP1A PE=1 SV=1	0	1	331,1	4,93	1,581
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=1 SV=1	14	4	38,4	7,81	1,566
Q53F47	Down-regulator of transcription 1 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	1	19,5	4,75	1,55

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
Q9UII2	ATPase inhibitor, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATPIF1 PE=1 SV=1	11	1	12,2	9,35	1,542
A8K878	cDNA FLJ77177, highly similar to Homo sapiens arginine-rich, mutated in early stage tumors (ARMET), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	15	2	21,1	8,92	1,538
Q9BRJ6	Uncharacterized protein C7orf50 OS=Homo sapiens GN=C7orf50 PE=1 SV=1	11	1	22,1	9,64	1,531
J7MDF2	CCDC6-RET fusion protein variant a OS=Homo sapiens GN=CCDC6-RETA PE=2 SV=1	2	1	55,5	6,14	1,528
A0A075B716	40S ribosomal protein S17 OS=Homo sapiens GN=RPS17 PE=1 SV=1	17	2	21,6	8,92	1,526
M0QXZ5	Zinc finger protein 428 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ZNF428 PE=1 SV=1	5	1	23,6	4,25	1,522
P06454	Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2	23	2	12,2	3,78	1,517
Q5IRN2	DAZAP1/MEF2D fusion protein OS=Homo sapiens GN=DAZAP1/MEF2D fusion PE=2 SV=1	4	1	48,9	8,78	1,507
Q9Y6I3	Epsin-1 OS=Homo sapiens GN=EPN1 PE=1 SV=2	4	1	60,3	4,83	1,499
Q53FE8	cDNA FLJ36526 fis, clone TRACH2003347, highly similar to NSFL1 cofactor p47 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	38	11	40,5	5,14	1,499
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2 OS=Homo sapiens GN=PFDN2 PE=1 SV=1	32	4	16,6	6,58	1,497
P35659	Protein DEK OS=Homo sapiens GN=DEK PE=1 SV=1	3	1	42,6	8,56	1,495
L0R588	Alternative protein C11orf48 OS=Homo sapiens GN=C11orf48 PE=4 SV=1	8	1	18,4	11,3	1,495
V9HW41	Epididymis secretory protein Li 71 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-71 PE=2 SV=1	20	2	17,1	6,57	1,493
Q9BRA2	Thioredoxin domain-containing protein 17 OS=Homo sapiens GN=TXNDC17 PE=1 SV=1	8	1	13,9	5,52	1,492
A8MUH2	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5J PE=1 SV=1	16	1	13,9	9,41	1,49

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
A8K5K5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G OS=Homo sapiens GN=EIF3G PE=2 SV=1	12	3	35,6	6,13	1,488
C9JCC6	Dr1-associated corepressor OS=Homo sapiens GN=DRAP1 PE=1 SV=1	5	1	23,2	5,27	1,487
B5BU24	14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB PE=2 SV=1	21	2	28,1	4,83	1,487
Q01844	RNA-binding protein EWS OS=Homo sapiens GN=EWSR1 PE=1 SV=1	4	2	68,4	9,33	1,47
Q86U42	Polyadenylate-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=PABPN1 PE=1 SV=3	24	3	32,7	5,06	1,465
Q7Z4V5	Hepatoma-derived growth factor-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=HDGFRP2 PE=1 SV=1	3	2	74,3	7,49	1,462
A0A024R1S7	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=SMARCE1 PE=4 SV=1	7	2	46,6	4,88	1,461
P11940	Polyadenylate-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PABPC1 PE=1 SV=2	15	8	70,6	9,5	1,46
P06748	Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	35	8	32,6	4,78	1,456
A0A024R7S3	Clathrin, light polypeptide (Lcb), isoform CRA_c OS=Homo sapiens GN=CLTB PE=4 SV=1	15	4	23,2	4,69	1,454
B3KML1	cDNA FLJ11308 fis, clone PLACE1010074, highly similar to Sorting nexin-2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	58,4	5,06	1,453
O60888	Protein CutA OS=Homo sapiens GN=CUTA PE=1 SV=2	8	1	19,1	5,5	1,45
A0A024R1S8	LIM and SH3 protein 1, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=LASP1 PE=4 SV=1	4	1	29,7	7,05	1,443
P29692	Elongation factor 1-delta OS=Homo sapiens GN=EEF1D PE=1 SV=5	23	6	31,1	5,01	1,44
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome OS=Homo sapiens GN=RBMX PE=1 SV=3	16	5	42,3	10,05	1,434
B4DL85	cDNA FLJ60660, highly similar to Hematological and	13	2	22,1	9,31	1,433

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
	neurological expressed1-like protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1					
Q9Y2V2	Calcium-regulated heat stable protein 1 OS=Homo sapiens GN=CARHSP1 PE=1 SV=2	28	2	15,9	8,21	1,43
Q13442	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein OS=Homo sapiens GN=PDAP1 PE=1 SV=1	23	4	20,6	8,87	1,428
Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Homo sapiens GN=EIF4H PE=1 SV=5	19	3	27,4	7,23	1,428
Q13344	Fus-like protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5	1	53,3	9,42	1,424
A0A024R3W7	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=EEF1B2 PE=3 SV=1	12	2	24,7	4,67	1,42
D3DPK5	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3, isoform CRA_a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SH3BGRL3 PE=4 SV=1	10	2	26,8	8,38	1,418
Q16186	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 OS=Homo sapiens GN=ADRM1 PE=1 SV=2	4	1	42,1	5,07	1,413
J3QQX2	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=ARHGDI1 PE=1 SV=1	20	2	25,8	7,44	1,411
A0A024R4Z9	SET binding factor 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=SBF1 PE=4 SV=1	0	1	210,9	7,11	1,405
P26583	High mobility group protein B2 OS=Homo sapiens GN=HMGB2 PE=1 SV=2	6	1	24	7,81	1,403
Q86U28	Iron-sulfur cluster assembly 2 homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ISCA2 PE=1 SV=2	8	1	16,5	5,25	1,403
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=TXNDC5 PE=1 SV=2	2	1	47,6	5,97	1,401
E7EVA0	Microtubule-associated protein OS=Homo sapiens GN=MAP4 PE=1 SV=1	2	3	245,3	6,23	1,4
A8KAQ5	cDNA FLJ77404, highly similar to Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein 70kDa polypeptide (RNP antigen) (SNRP70), transcript variant 1, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	4	51,5	10,01	1,399

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
Q9NZB2	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=FAM120A PE=1 SV=2	1	1	121,8	8,88	1,396
O60664	Perilipin-3 OS=Homo sapiens GN=PLIN3 PE=1 SV=3	12	4	47	5,44	1,394
L7N2F9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	14	1	13,1	7,96	1,393
P50502	Hsc70-interacting protein OS=Homo sapiens GN=ST13 PE=1 SV=2	10	3	41,3	5,27	1,393
Q5STK2	Prefoldin subunit 6, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=PFDN6 PE=2 SV=1	9	1	14,6	8,88	1,393
A0A024RDF6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HNRPDL PE=4 SV=1	4	1	46,4	9,57	1,392
E7EPT4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NDUFV2 PE=1 SV=1	9	2	27,9	8	1,389
S4R341	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=NOLC1 PE=1 SV=1	47	1	8	5,26	1,388
O60220	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A OS=Homo sapiens GN=TIMM8A PE=1 SV=1	11	1	11	5,16	1,378
B5BU83	Stathmin OS=Homo sapiens GN=STMN1 PE=2 SV=1	38	7	17,3	5,97	1,373
A0A024R9M9	Calcium binding protein P22, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CHP PE=4 SV=1	24	4	22,4	5,1	1,372
B2R6F3	Splicing factor arginine/serine-rich 3 OS=Homo sapiens GN=SFRS3 PE=2 SV=1	35	5	19,3	11,6 5	1,37
Q96C19	EF-hand domain-containing protein D2 OS=Homo sapiens GN=EFHD2 PE=1 SV=1	4	1	26,7	5,2	1,363
A0A024QYW3	Proteolipid protein 2 (Colonic epithelium-enriched), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=PLP2 PE=4 SV=1	9	1	16,7	7,24	1,362
Q9HD42	Charged multivesicular body protein 1a OS=Homo sapiens GN=CHMP1A PE=1 SV=1	4	1	21,7	8,06	1,361
E9PEB5	Far upstream element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=FUBP1 PE=1 SV=1	23	12	68,9	7,93	1,36
O14618	Copper chaperone for superoxide dismutase	8	2	29	5,58	1,36



Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
	OS=Homo sapiens GN=CCS PE=1 SV=1					
Q59EK7	CS0DF038Y005 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	15	3	37,2	10,96	1,355
Q02952	A-kinase anchor protein 12 OS=Homo sapiens GN=AKAP12 PE=1 SV=4	1	1	191,4	4,41	1,353
D6R956	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Homo sapiens GN=UCHL1 PE=1 SV=1	7	2	26,8	5,81	1,352
Q6IBN6	CBX1 protein OS=Homo sapiens GN=CBX1 PE=2 SV=1	6	1	21,4	4,93	1,351
Q9ULR0	Pre-mRNA-splicing factor ISY1 homolog OS=Homo sapiens GN=ISY1 PE=1 SV=3	11	2	33	5,17	1,351
Q9UHD9	Ubiquilin-2 OS=Homo sapiens GN=UBQLN2 PE=1 SV=2	3	1	65,7	5,22	1,346
B3KM36	cDNA FLJ10153 fis, clone HEMBA1003417, highly similar to BAG family molecular chaperone regulator 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5	1	23,7	6,7	1,343
P52655	Transcription initiation factor IIA subunit 1 OS=Homo sapiens GN=GTF2A1 PE=1 SV=1	3	1	41,5	4,55	1,339
Q01970	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3 OS=Homo sapiens GN=PLCB3 PE=1 SV=2	1	1	138,7	5,9	1,337
F8WF69	Clathrin light chain A OS=Homo sapiens GN=CLTA PE=1 SV=1	7	2	27,8	4,91	1,336
O14737	Programmed cell death protein 5 OS=Homo sapiens GN=PDCD5 PE=1 SV=3	27	3	14,3	6,04	1,335
Q92804	TATA-binding protein-associated factor 2N OS=Homo sapiens GN=TAF15 PE=1 SV=1	10	1	61,8	8,02	1,329
A0A024R8S5	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=3 SV=1	42	19	57,1	4,87	1,328
B4DRM3	cDNA FLJ54492, highly similar to Eukaryotic translation initiation factor 4B OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	4	69,7	5,67	1,326
B2R5B3	Histone H2A OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	49	2	14,1	11,06	1,326
A0A024RAZ7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=HNRPA1 PE=4 SV=1	30	7	38,7	9,13	1,325

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
P05387	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1	77	7	11,7	4,54	1,321
O95817	BAG family molecular chaperone regulator 3 OS=Homo sapiens GN=BAG3 PE=1 SV=3	4	2	61,6	6,95	1,309
A0A0A0MTS2	Glucose-6-phosphate isomerase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=GPI PE=4 SV=1	2	1	64,8	9,04	1,305
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Homo sapiens GN=ERP29 PE=1 SV=4	26	6	29	7,31	1,305
D9IAI1	Epididymis secretory protein Li 34 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-34 PE=2 SV=1	30	4	21	7,53	1,304
Q9UQ35	Serine/arginine repetitive matrix protein 2 OS=Homo sapiens GN=SRRM2 PE=1 SV=2	3	5	299,4	12,06	1,295
P62310	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3 OS=Homo sapiens GN=LSM3 PE=1 SV=2	33	2	11,8	4,7	1,294
B2RDE8	cDNA, FLJ96580, highly similar to Homo sapiens hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein 1-like) (HDGF), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	26	5	26,8	4,67	1,293
Q13595	Transformer-2 protein homolog alpha OS=Homo sapiens GN=TRA2A PE=1 SV=1	5	1	32,7	11,27	1,292
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	44	11	37,4	8,95	1,285
Q9Y3B9	RRP15-like protein OS=Homo sapiens GN=RRP15 PE=1 SV=2	4	1	31,5	5,52	1,279
B3KQS9	cDNA PSEC0141 fis, clone PLACE1005913, highly similar to Deoxyribonuclease-2-alpha (EC 3.1.22.1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	39,5	8,05	1,275
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=U2AF2 PE=1 SV=4	7	3	53,5	9,09	1,271
Q99622	Protein C10 OS=Homo sapiens GN=C12orf57 PE=1 SV=1	12	1	13,2	5,14	1,27

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
O15347	High mobility group protein B3 OS=Homo sapiens GN=HMGB3 PE=1 SV=4	14	2	23	8,37	1,267
A0A024R7Y5	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=TCEB1 PE=4 SV=1	9	1	12,5	4,78	1,266
A5Y5A3	PC1/MRPS28 fusion protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5	1	31,2	6,19	1,265
Q8IVM0	Coiled-coil domain-containing protein 50 OS=Homo sapiens GN=CCDC50 PE=1 SV=1	4	1	35,8	6,65	1,26
P39687	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN=ANP32A PE=1 SV=1	16	4	28,6	4,09	1,26
P09382	Galectin-1 OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2	13	2	14,7	5,5	1,26
E9PQY2	Prefoldin subunit 4 OS=Homo sapiens GN=PFDN4 PE=1 SV=1	20	2	15,6	4,58	1,258
V9HW43	Epididymis secretory protein Li 102 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-102 PE=2 SV=1	5	1	22,8	6,4	1,257
V9HWK2	Epididymis luminal protein 114 OS=Homo sapiens GN=HEL114 PE=2 SV=1	5	3	123,7	5,66	1,254
P55081	Microfibrillar-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=MFAP1 PE=1 SV=2	11	3	51,9	4,98	1,253
Q14151	Scaffold attachment factor B2 OS=Homo sapiens GN=SAFB2 PE=1 SV=1	6	2	107,4	6,16	1,253
G9K388	YWHAE/FAM22A fusion protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=YWHAE/FAM22A fusion PE=2 SV=1	19	5	41,2	4,97	1,25
A8MUS3	60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens GN=RPL23A PE=3 SV=1	16	3	21,9	10,48	1,25
Q9UMX5	Neudesin OS=Homo sapiens GN=NENF PE=1 SV=1	17	3	18,8	5,69	1,24
P08579	U2 small nuclear ribonucleoprotein B" OS=Homo sapiens GN=SNRPB2 PE=1 SV=1	8	1	25,5	9,72	1,239
B4E0X1	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	1	13,9	7,44	1,238
O00233	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9 OS=Homo sapiens GN=PSMD9 PE=1 SV=3	15	3	24,7	6,95	1,235
Q16643	Drebrin OS=Homo sapiens GN=DBN1 PE=1 SV=4	20	9	71,4	4,45	1,229

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=PCBP2 PE=1 SV=1	7	2	38,6	6,79	1,228
A0A090N8Y2	Protein disulfide isomerase related protein (Calcium-binding protein, intestinal-related) OS=Homo sapiens GN=ERP70 PE=4 SV=1	19	10	72,9	5,07	1,225
Q8WW12	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein OS=Homo sapiens GN=PCNP PE=1 SV=2	15	2	18,9	7,49	1,225
P46108	Adapter molecule crk OS=Homo sapiens GN=CRK PE=1 SV=2	9	2	33,8	5,55	1,224
O95881	Thioredoxin domain-containing protein 12 OS=Homo sapiens GN=TXNDC12 PE=1 SV=1	5	1	19,2	5,4	1,217
A8K588	cDNA FLJ76823, highly similar to Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 6 (SFRS6), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	18	2	39,5	11,4	1,215
H7BZJ3	Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=1	30	1	13,5	7,3	1,213
P27348	14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1	29	3	27,7	4,78	1,212
Q14257	Reticulocalbin-2 OS=Homo sapiens GN=RCN2 PE=1 SV=1	35	8	36,9	4,4	1,207
O75822	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J OS=Homo sapiens GN=EIF3J PE=1 SV=2	18	4	29	4,83	1,204
A0A024RBF6	HCG26523, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=hCG_26523 PE=4 SV=1	6	1	17,3	10,2	1,202
O75940	Survival of motor neuron-related-splicing factor 30 OS=Homo sapiens GN=SMNDC1 PE=1 SV=1	5	1	26,7	7,24	1,199
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal OS=Homo sapiens GN=FABP5 PE=1 SV=3	14	2	15,2	7,01	1,186
V9HWC9	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Homo sapiens GN=HEL-S-44 PE=2 SV=1	17	2	15,9	6,13	1,186
J3QRS3	Myosin regulatory light chain 12A OS=Homo sapiens GN=MYL12A PE=4 SV=1	6	1	20,4	4,75	1,185
Q15691	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS=Homo sapiens GN=MAPRE1 PE=1 SV=3	17	4	30	5,14	1,184

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
Q6ZQN2	cDNA FLJ46846 fis, clone UTERU3004635, moderately similar to Neuroblast differentiation associated protein AHNAK (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	180,6	6,15	1,183
A8K329	cDNA FLJ76656, highly similar to Homo sapiens scaffold attachment factor B (SAFB), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	2	102,7	5,44	1,182
Q14473	Beta-globin gene from a thalassemia patient OS=Homo sapiens PE=3 SV=1	6	1	18,9	6,79	1,181
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens GN=SNRNP200 PE=1 SV=2	1	1	244,4	6,06	1,181
O75494	Serine/arginine-rich splicing factor 10 OS=Homo sapiens GN=SRSF10 PE=1 SV=1	13	3	31,3	11,27	1,181
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form OS=Homo sapiens GN=NACA PE=1 SV=1	3	4	205,3	9,58	1,18
Q99426	Tubulin-folding cofactor B OS=Homo sapiens GN=TBCB PE=1 SV=2	13	3	27,3	5,15	1,18
J3KTL2	Serine/arginine-rich-splicing factor 1 OS=Homo sapiens GN=SRSF1 PE=4 SV=1	35	9	28,3	10,08	1,175
B4E3P1	cDNA FLJ57036, highly similar to Homo sapiens tropomyosin 2 (beta) (TPM2), transcript variant 2, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	12	3	34,1	5,05	1,171
Q69YJ7	Putative uncharacterized protein DKFZp667H197 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DKFZp667H197 PE=2 SV=1	2	1	100,1	8,91	1,169
Q53SS8	Epididymis secretory protein Li 85 OS=Homo sapiens GN=PCBP1 PE=2 SV=1	15	4	37,5	7,09	1,167
Q9UK45	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7 OS=Homo sapiens GN=LSM7 PE=1 SV=1	8	1	11,6	5,27	1,167
Q14247	Src substrate cortactin OS=Homo sapiens GN=CTTN PE=1 SV=2	29	12	61,5	5,4	1,166
Q86TA8	Putative uncharacterized protein DKFZp451M091 OS=Homo sapiens GN=DKFZp451M091 PE=2 SV=1	1	1	131,6	5,91	1,162

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
Q9BRL6	Serine/arginine-rich splicing factor 8 OS=Homo sapiens GN=SRSF8 PE=1 SV=1	5	2	32,3	11,72	1,159
P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=HINT1 PE=1 SV=2	11	1	13,8	6,95	1,158
A0A087WV05	Protein GJA9-MYCBP OS=Homo sapiens GN=GJA9-MYCBP PE=4 SV=1	34	3	12,7	6,02	1,155
B2R4R9	HCG26477 OS=Homo sapiens GN=RPS28 PE=2 SV=1	17	1	7,8	10,7	1,155
A0A087WTP3	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=KHSRP PE=1 SV=1	25	11	73	7,71	1,145
A8K964	cDNA FLJ75071, highly similar to Homo sapiens pinin, desmosome associated protein (PNN), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	81,5	7,37	1,141
P35268	60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=2	19	2	14,8	9,19	1,14
Q53HB7	Diablo isoform 1 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	18	4	27,1	6,4	1,132
B2R6A3	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	2	38,9	5,77	1,129
Q15717	ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=ELAVL1 PE=1 SV=2	12	4	36,1	9,17	1,127
I3L0A0	HCG2044781 OS=Homo sapiens GN=TMEM189-UBE2V1 PE=4 SV=1	5	2	42,2	6,71	1,124
A0A023T787	RNA-binding protein 8A OS=Homo sapiens GN=RBM8 PE=2 SV=1	11	2	19,9	5,72	1,122
P49321	Nuclear autoantigenic sperm protein OS=Homo sapiens GN=NASP PE=1 SV=2	9	5	85,2	4,3	1,115
Q658U4	Putative uncharacterized protein DKFZp666D193 OS=Homo sapiens GN=DKFZp666D193 PE=2 SV=1	12	5	64,1	5,55	1,113
A0A024RBR3	Density-regulated protein OS=Homo sapiens GN=DENR PE=3 SV=1	4	1	22,1	5,3	1,113
Q5VXV3	SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=2 SV=1	23	5	33,5	4,32	1,11
Q16629	Serine/arginine-rich splicing factor 7 OS=Homo sapiens GN=SRSF7 PE=1 SV=1	18	3	27,4	11,82	1,108
E9PB61	THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=ALYREF PE=1 SV=1	11	2	27,5	11,05	1,104

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
P52815	39S ribosomal protein L12, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPL12 PE=1 SV=2	18	4	21,3	8,87	1,099
Q6NS36	Ferritin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=FTH1 PE=2 SV=1	6	1	26,2	6,52	1,099
A0A024R4I7	Leucine zipper and CTNNBIP1 domain containing, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=LZIC PE=4 SV=1	16	2	21,5	4,94	1,098
Q99497	Protein DJ-1 OS=Homo sapiens GN=PARK7 PE=1 SV=2	23	3	19,9	6,79	1,096
P61956	Small ubiquitin-related modifier 2 OS=Homo sapiens GN=SUMO2 PE=1 SV=3	23	1	10,9	5,5	1,096
V9HW12	Epididymis secretory sperm binding protein Li 2a OS=Homo sapiens GN=HEL-S-2a PE=2 SV=1	32	6	21,9	5,97	1,094
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2 OS=Homo sapiens GN=SF3B2 PE=1 SV=2	6	4	100,2	5,67	1,093
P99999	Cytochrome c OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=1 SV=2	21	2	11,7	9,57	1,081
D9ZGG2	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=4 SV=1	3	1	54,3	5,8	1,081
P50402	Emerin OS=Homo sapiens GN=EMD PE=1 SV=1	5	1	29	5,5	1,08
Q14444	Caprin-1 OS=Homo sapiens GN=CAPRIN1 PE=1 SV=2	2	1	78,3	5,25	1,08
A0A024R608	Ribosomal protein, large, P1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=RPLP1 PE=3 SV=1	14	1	11,5	4,32	1,074
A0A087WYR3	Tumor protein D54 OS=Homo sapiens GN=TPD52L2 PE=1 SV=1	21	4	23,8	6,55	1,07
A8K690	cDNA FLJ76863, highly similar to Homo sapiens stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein) (STIP1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	16	9	62,6	6,8	1,065
P19338	Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3	26	16	76,6	4,7	1,063
P63104	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1	47	6	27,7	4,79	1,062
O75937	DnaJ homolog subfamily C member 8 OS=Homo sapiens GN=DNAJC8 PE=1 SV=2	21	4	29,8	9,06	1,06

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
Q6UN15	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1 OS=Homo sapiens GN=FIP1L1 PE=1 SV=1	5	2	66,5	5,59	1,056
A0A087WSV8	Nucleobindin 2, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=NUCB2 PE=4 SV=1	2	1	50,2	5,12	1,054
P07737	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	40	4	15	8,27	1,053
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 SV=1	3	1	52,1	5,52	1,052
A8K3M9	cDNA FLJ76387, highly similar to Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 9 (SFRS9), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	18	4	25,5	8,65	1,049
B3V096	BetaCstF-64 variant 2 OS=Homo sapiens GN=CSTF2 PE=2 SV=1	6	3	62,9	6,87	1,048
K7ELJ7	Calpain small subunit 1 OS=Homo sapiens GN=CAPNS1 PE=1 SV=1	5	1	29,4	5,31	1,048
V9HW63	Epididymis secretory sperm binding protein Li 97n OS=Homo sapiens GN=HEL-S-97n PE=2 SV=1	7	1	30,5	6,29	1,042
Q8N1C8	HSPA9 protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=2 SV=1	22	11	73,8	6,37	1,04
P54727	UV excision repair protein RAD23 homolog B OS=Homo sapiens GN=RAD23B PE=1 SV=1	25	4	43,1	4,84	1,036
Q76LA1	CSTB protein OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=2 SV=1	24	2	11,1	7,56	1,033
Q16630	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 OS=Homo sapiens GN=CPSF6 PE=1 SV=2	5	2	59,2	7,15	1,032
F8W031	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	17	3	29,2	7,01	1,031
P25398	40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens GN=RPS12 PE=1 SV=3	31	3	14,5	7,21	1,03
P42166	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha OS=Homo sapiens GN=TMPO PE=1 SV=2	6	3	75,4	7,66	1,029
Q96D15	Reticulocalbin-3 OS=Homo sapiens GN=RCN3 PE=1 SV=1	20	4	37,5	4,89	1,024
B4DJQ5	cDNA FLJ59211, highly similar to Glucosidase 2	13	6	60,1	4,42	1,022



Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
	subunit beta OS=Homo sapiens PE=2 SV=1					
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1	12	2	30,8	9,29	1,022
S4R3H4	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus OS=Homo sapiens GN=ACIN1 PE=1 SV=1	3	3	145,4	6	1,021
E7ETY2	Treacle protein OS=Homo sapiens GN=TCOF1 PE=1 SV=1	4	5	152,2	8,85	1,016
O00273	DNA fragmentation factor subunit alpha OS=Homo sapiens GN=DFFA PE=1 SV=1	15	4	36,5	4,79	1,014
P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5D PE=1 SV=2	14	2	17,5	5,49	1,013
Q53H88	Dynactin 2 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	12	4	44,8	5,12	1,013
P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=LAMP1 PE=1 SV=3	5	2	44,9	8,75	1,013
Q99471	Prefoldin subunit 5 OS=Homo sapiens GN=PFDN5 PE=1 SV=2	34	3	17,3	6,33	1,01
A8K7Q1	cDNA FLJ77770, highly similar to Homo sapiens nucleobindin 1 (NUCB1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	14	6	53,9	5,25	1,007
E5RJR5	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=SKP1 PE=1 SV=1	16	2	18,7	4,7	1,004
Q9NWQ8	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1 OS=Homo sapiens GN=PAG1 PE=1 SV=2	5	2	47	4,65	1,001
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=2	30	4	18	9,64	0,993
Q9H444	Charged multivesicular body protein 4b OS=Homo sapiens GN=CHMP4B PE=1 SV=1	6	1	24,9	4,82	0,993
B3KNB4	cDNA FLJ14168 fis, clone NT2RP2001440, highly similar to 14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	20	2	28,2	4,89	0,99

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
P84098	60S ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens GN=RPL19 PE=1 SV=1	5	1	23,5	11,47	0,989
A0A024R035	Complement component 9, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=C9 PE=4 SV=1	2	1	63,2	5,52	0,989
Q8WUW1	Protein BRICK1 OS=Homo sapiens GN=BRK1 PE=1 SV=1	15	1	8,7	5,45	0,988
B2R6J2	cDNA, FLJ92973, highly similar to Homo sapiens villin 2 (ezrin) (VIL2), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	2	69,4	6,27	0,986
B2R761	cDNA, FLJ93299, highly similar to Homo sapiens sterol carrier protein 2 (SCP2), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5	3	59	7,05	0,984
B2RDE1	cDNA, FLJ96568, highly similar to Homo sapiens tropomyosin 3 (TPM3), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	25	8	29	4,75	0,973
P27824	Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2	6	3	67,5	4,6	0,972
P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX5A PE=1 SV=2	31	3	16,8	6,79	0,971
V9HWC7	Epididymis secretory sperm binding protein Li 128m OS=Homo sapiens GN=HELS-128m PE=2 SV=1	9	2	25	6,38	0,969
Q9H3K6	Bola-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=BOLA2 PE=1 SV=1	10	1	10,1	6,52	0,968
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens GN=TPM4 PE=1 SV=3	25	4	28,5	4,69	0,967
Q9Y5J9	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 B OS=Homo sapiens GN=TIMM8B PE=1 SV=1	30	2	9,3	5,12	0,961
B1AVU8	Saposin-D OS=Homo sapiens GN=PSAP PE=1 SV=1	8	4	61,7	5,22	0,95
B2R4P2	cDNA, FLJ92164, highly similar to Homo sapiens peroxiredoxin 1 (PRDX1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	24	3	22,2	8,38	0,95
V9HWB4	Epididymis secretory sperm binding protein Li 89n OS=Homo sapiens GN=HELS-89n PE=2 SV=1	33	15	72,3	5,16	0,948
Q8WVX7	Ribosomal protein S19 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	26	4	17,3	10,52	0,948

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
P54725	UV excision repair protein RAD23 homolog A OS=Homo sapiens GN=RAD23A PE=1 SV=1	11	2	39,6	4,58	0,947
B2R665	cDNA, FLJ92810, highly similar to Homo sapiens protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform (PPM1G), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	2	59,2	4,36	0,945
A8K9A4	cDNA FLJ75154, highly similar to Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	23	8	33,6	5,14	0,941
B2RDQ3	cDNA, FLJ96718, highly similar to Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 10 (transformer 2 homolog, Drosophila) (SFRS10), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	11	3	33,7	11,25	0,937
P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX3 PE=1 SV=3	21	5	27,7	7,78	0,936
A8K9U0	cDNA FLJ78260, highly similar to Homo sapiens RNA binding motif protein 4, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	2	40,3	7,08	0,934
A0A024R7T3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HNRPF PE=4 SV=1	25	4	45,6	5,58	0,928
B4DTE6	cDNA FLJ56243, highly similar to Melanoma-associated antigen 4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	12	4	37,8	4,73	0,925
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1	23	6	48,1	5,08	0,922
I3L504	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Homo sapiens GN=EIF5A PE=1 SV=1	28	6	20,5	5,25	0,921
Q06323	Proteasome activator complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PSME1 PE=1 SV=1	9	2	28,7	6,02	0,92
B2RDW0	cDNA, FLJ96792, highly similar to Homo sapiens calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta) (CALM2),	40	6	16,8	4,22	0,917

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
	mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1					
Q15293	Reticulocalbin-1 OS=Homo sapiens GN=RCN1 PE=1 SV=1	23	7	38,9	5	0,917
B1AHD1	NHP2-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=NHP2L1 PE=1 SV=1	9	1	14,6	8,46	0,917
Q99674	Cell growth regulator with EF hand domain protein 1 OS=Homo sapiens GN=CGREF1 PE=2 SV=2	3	1	31,9	4,42	0,915
B7Z6Z4	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=1	19	5	26,7	5,08	0,912
E5RJD8	Tubulin-specific chaperone A OS=Homo sapiens GN=TBCA PE=1 SV=1	32	4	14,3	5,12	0,91
Q8N129	Protein canopy homolog 4 OS=Homo sapiens GN=CNPY4 PE=2 SV=1	15	3	28,3	4,64	0,909
B0LPF3	Growth factor receptor-bound protein 2 OS=Homo sapiens GN=GRB2 PE=2 SV=1	18	2	25,2	6,32	0,908
Q9UMS0	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NFU1 PE=1 SV=2	10	2	28,4	5,07	0,907
V9HWE1	Epididymis luminal protein 113 OS=Homo sapiens GN=HEL113 PE=2 SV=1	42	19	53,6	5,12	0,904
Q5EC54	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K transcript variant OS=Homo sapiens GN=HNRPK PE=2 SV=1	21	7	51	5,33	0,895
B3KN49	cDNA FLJ13562 fis, clone PLACE1008080, highly similar to Homo sapiens hexamethylene bis-acetamide inducible 1 (HEXIM1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	40,6	4,89	0,881
B3KQF5	cDNA FLJ90381 fis, clone NT2RP2005035, highly similar to Calumenin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	38	10	37	4,67	0,88
P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2	59	6	10,9	8,92	0,879
A0A024RBH2	Cytoskeleton-associated protein 4, isoform CRA_c OS=Homo sapiens GN=CKAP4 PE=4 SV=1	12	5	66	5,92	0,878
Q6IPI1	Ribosomal protein L29 OS=Homo sapiens GN=RPL29 PE=2 SV=1	14	2	17,9	11,6 6	0,877

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
Q9C005	Protein dpy-30 homolog OS=Homo sapiens GN=DPY30 PE=1 SV=1	27	3	11,2	4,88	0,876
G8JLB6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=1	21	4	51,2	6,8	0,87
A0A0A0MRI0	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3 OS=Homo sapiens GN=CDKN2A PE=4 SV=1	7	1	18,5	11,68	0,87
B7Z6L7	cDNA FLJ61737, moderately similar to Adrenodoxin-like protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	6	1	19,9	5,54	0,87
A0A024R1A4	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=UBE2L3 PE=3 SV=1	36	3	17,9	8,51	0,867
V9HWE0	Annexin OS=Homo sapiens GN=HEL-S-7 PE=2 SV=1	3	1	35,9	5,05	0,849
A0A024R0L6	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, gamma subunit 29kDa, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=PAFAH1B3 PE=4 SV=1	8	2	25,7	6,84	0,849
P60174	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 PE=1 SV=3	34	6	30,8	5,92	0,847
Q9BRK5	45 kDa calcium-binding protein OS=Homo sapiens GN=SDF4 PE=1 SV=1	2	1	41,8	4,86	0,845
Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C1QBP PE=1 SV=1	26	5	31,3	4,84	0,844
A0A024QZK8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HNRPH3 PE=4 SV=1	14	4	36,9	6,87	0,843
P62851	40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25 PE=1 SV=1	22	3	13,7	10,11	0,834
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	27	11	61	5,87	0,831
P13473	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=LAMP2 PE=1 SV=2	2	1	44,9	5,63	0,824
B4DS05	cDNA FLJ59403, highly similar to Nucleosome	5	1	44,1	4,7	0,815

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
	assembly protein 1-like 4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1					
B2R8Z8	cDNA, FLJ94136, highly similar to Homo sapiens synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein (SYNCRIP), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	4	69,6	8,76	0,814
P30101	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4	20	6	56,7	6,35	0,812
P20700	Lamin-B1 OS=Homo sapiens GN=LMNB1 PE=1 SV=2	11	6	66,4	5,16	0,809
J3QQ67	60S ribosomal protein L18 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL18 PE=1 SV=1	7	1	21,8	11,72	0,807
B2R6S9	cDNA, FLJ93097, highly similar to Homo sapiens low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1 (LRPAP1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	2	41,5	8,92	0,796
X6R4W8	BUB3-interacting and GLEBS motif-containing protein ZNF207 OS=Homo sapiens GN=ZNF207 PE=1 SV=1	3	1	52,6	8,47	0,795
B2RD79	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	56	5,3	0,788
P60866	40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens GN=RPS20 PE=1 SV=1	19	2	13,4	9,94	0,769
Q15637	Splicing factor 1 OS=Homo sapiens GN=SF1 PE=1 SV=4	10	5	68,3	8,98	0,762
P30050	60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 PE=1 SV=1	15	2	17,8	9,42	0,762
B7Z2R2	Cytochrome b-c1 complex subunit 7 OS=Homo sapiens GN=UQCRB PE=2 SV=1	16	2	18,7	8,95	0,761
Q13813	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens GN=SPTAN1 PE=1 SV=3	5	8	284,4	5,35	0,754
P14625	Endoplasmin OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	20	14	92,4	4,84	0,753
O15511	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 OS=Homo sapiens GN=ARPC5 PE=1 SV=3	8	1	16,3	5,67	0,742
P56385	ATP synthase subunit e, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5I PE=1 SV=2	25	2	7,9	9,35	0,735
Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	5	1	38,4	5,12	0,735

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
	OS=Homo sapiens GN=STRAP PE=1 SV=1					
P16401	Histone H1.5 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1B PE=1 SV=3	5	1	22,6	10,92	0,727
Q8WXD5	Gem-associated protein 6 OS=Homo sapiens GN=GEMIN6 PE=1 SV=1	8	1	18,8	5,12	0,726
Q9P287	BRCA2 and CDKN1A-interacting protein OS=Homo sapiens GN=BCCIP PE=1 SV=1	5	1	36	4,61	0,725
P12270	Nucleoprotein TPR OS=Homo sapiens GN=TPR PE=1 SV=3	3	5	267,1	5,02	0,717
P30044	Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX5 PE=1 SV=4	23	4	22,1	8,7	0,713
Q9Y2U8	Inner nuclear membrane protein Man1 OS=Homo sapiens GN=LEMD3 PE=1 SV=2	4	1	99,9	7,55	0,707
P23528	Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=3	40	4	18,5	8,09	0,699
O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5H PE=1 SV=3	22	3	18,5	5,3	0,689
Q549M8	CLE7 OS=Homo sapiens GN=C14orf166 PE=2 SV=1	24	4	28,1	6,65	0,681
P05556	Integrin beta-1 OS=Homo sapiens GN=ITGB1 PE=1 SV=2	1	1	88,4	5,39	0,68
Q59GY2	Ribosomal protein L4 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	49	11,02	0,68
V9HW88	Calreticulin, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=HELS-99n PE=2 SV=1	33	10	48,1	4,44	0,672
A8K486	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	11	2	18	6,9	0,672
P46937	Transcriptional coactivator YAP1 OS=Homo sapiens GN=YAP1 PE=1 SV=2	4	1	54,4	5,17	0,669
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PPIB PE=1 SV=2	16	3	23,7	9,41	0,666
P16402	Histone H1.3 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1D PE=1 SV=2	15	3	22,3	11,02	0,664
Q9NZ23	Drug-sensitive protein 1 OS=Homo sapiens GN=YA61 PE=2 SV=1	20	2	14,9	7,5	0,663
A2A3R6	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens GN=RPS6 PE=2 SV=1	5	1	28,7	10,84	0,661

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
Q32P28	Prolyl 3-hydroxylase 1 OS=Homo sapiens GN=LEPRE1 PE=1 SV=2	1	1	83,3	5,14	0,659
P26373	60S ribosomal protein L13 OS=Homo sapiens GN=RPL13 PE=1 SV=4	5	1	24,2	11,6 5	0,653
A4D1W8	Ependymin related protein 1 (Zebrafish), isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=UCC1 PE=4 SV=1	3	1	38,1	9,58	0,639
A8K2N3	cDNA FLJ76080, highly similar to Homo sapiens calpain 13 (CAPN13), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	76,7	7,37	0,635
A0A087X0X3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM PE=1 SV=1	7	3	77,5	8,78	0,631
B7Z4C8	60S ribosomal protein L31 OS=Homo sapiens GN=RPL31 PE=2 SV=1	7	1	15,1	10,3 7	0,628
Q6IB11	PGRMC1 protein OS=Homo sapiens GN=PGRMC1 PE=2 SV=1	24	2	21,7	4,7	0,628
V9HW31	ATP synthase subunit beta OS=Homo sapiens GN=HEL- S-271 PE=2 SV=1	17	7	56,5	5,4	0,617
A0A024R2P0	40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=3 SV=1	19	4	32,8	4,87	0,615
V9HWI3	Cathepsin D (Lysosomal aspartyl peptidase), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HEL-S-130P PE=2 SV=1	2	1	44,5	6,54	0,61
P62917	60S ribosomal protein L8 OS=Homo sapiens GN=RPL8 PE=1 SV=2	4	1	28	11,0 3	0,608
A0A087X1Z3	Proteasome activator complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=PSME2 PE=1 SV=1	9	1	29,1	6,71	0,598
Q05519	Serine/arginine-rich splicing factor 11 OS=Homo sapiens GN=SRSF11 PE=1 SV=1	7	2	53,5	10,5 2	0,598
F5GXR3	Parathyrosin OS=Homo sapiens GN=PTMS PE=1 SV=1	11	1	12,1	11	0,595
P07900	Heat shock protein HSP 90- alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	9	1	84,6	5,02	0,573
A0A087WVQ 6	Clathrin heavy chain OS=Homo sapiens GN=CLTC PE=3 SV=1	3	3	191,9	5,69	0,57
P62269	40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3	13	2	17,7	10,9 9	0,563



Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
P63261	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1	24	6	41,8	5,48	0,562
F5H5D3	Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=1 SV=1	26	9	57,7	5,07	0,56
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	19	6	83,2	5,03	0,553
Q8TE01	DERP12 (Dermal papilla derived protein 12) OS=Homo sapiens GN=derp12 PE=2 SV=1	7	2	38,2	6,58	0,553
P50990	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=4	4	2	59,6	5,6	0,551
V9HW22	Epididymis luminal protein 33 OS=Homo sapiens GN=HELS-72p PE=2 SV=1	25	8	70,9	5,52	0,55
Q96PK6	RNA-binding protein 14 OS=Homo sapiens GN=RBM14 PE=1 SV=2	1	1	69,4	9,67	0,54
B7Z7U0	cDNA FLJ61739, highly similar to Serine/arginine repetitive matrix protein 1 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	1	103,7	11,82	0,534
P54819	Adenylate kinase 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AK2 PE=1 SV=2	9	2	26,5	7,81	0,534
A0A024R6W0	Aspartate aminotransferase OS=Homo sapiens GN=GOT2 PE=3 SV=1	3	1	47,4	9,01	0,534
K7ERQ8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=3 SV=1	4	1	31,4	7,42	0,533
Q6IPH7	RPL14 protein OS=Homo sapiens GN=RPL14 PE=2 SV=1	5	1	23,8	10,93	0,529
B4E284	cDNA FLJ51188, highly similar to N-acetylglucosamine-6-sulfatase (EC3.1.6.14) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	65,8	8,07	0,524
P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ECHS1 PE=1 SV=4	7	1	31,4	8,07	0,515
B2R5W3	cDNA, FLJ92658, highly similar to Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 (PARP1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	2	113	8,88	0,514
P06899	Histone H2B type 1-J OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BJ PE=1 SV=3	26	1	13,9	10,32	0,512

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
J3KPF3	4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=4 SV=1	3	1	68,1	5,05	0,512
P62424	60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens GN=RPL7A PE=1 SV=2	5	1	30	10,61	0,511
P23396	40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2	7	2	26,7	9,66	0,505
B2RAQ8	cDNA, FLJ95058, highly similar to Homo sapiens carnitine palmitoyltransferase 1A (liver) (CPT1A), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	3	88,3	8,59	0,505
A0A024R5Z7	Annexin OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=3 SV=1	7	2	38,6	7,75	0,495
A8K401	Prohibitin, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=PHB PE=2 SV=1	19	4	29,8	5,76	0,494
A0A024R5Z9	Pyruvate kinase OS=Homo sapiens GN=PKM2 PE=3 SV=1	12	5	58	7,71	0,489
P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	43	6	11,4	11,36	0,487
P02545	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1	3	2	74,1	7,02	0,485
P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 OS=Homo sapiens GN=IMPDH2 PE=1 SV=2	2	1	55,8	6,9	0,48
P28072	Proteasome subunit beta type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMB6 PE=1 SV=4	5	1	25,3	4,92	0,478
P0C0S5	Histone H2A.Z OS=Homo sapiens GN=H2AFZ PE=1 SV=2	31	2	13,5	10,58	0,475
A0A024R7I3	RAB8A, member RAS oncogene family, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=RAB8A PE=3 SV=1	11	2	23,7	9,07	0,474
I3L0M9	Transcription elongation factor B polypeptide 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TCEB2 PE=1 SV=1	6	1	15,6	5,17	0,472
P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2	8	4	76,1	9,44	0,469
A0A024QZF1	HCG19665, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=hCG_19665 PE=4 SV=1	5	2	53,2	5,31	0,468
Q5SU16	Beta 5-tubulin OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=2 SV=1	25	7	49,6	4,89	0,466

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
V9HW26	ATP synthase subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HEL-S-123m PE=2 SV=1	27	11	59,7	9,13	0,465
H3BN98	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=2	3	1	27,2	9,55	0,464
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A' OS=Homo sapiens GN=SNRPA1 PE=1 SV=2	19	3	28,4	8,62	0,462
P25788	Proteasome subunit alpha type-3 OS=Homo sapiens GN=PSMA3 PE=1 SV=2	5	1	28,4	5,33	0,461
P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Homo sapiens GN=SNRPD3 PE=1 SV=1	8	1	13,9	10,32	0,458
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	18	5	36	8,46	0,456
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens GN=ATAD3A PE=1 SV=2	5	2	71,3	8,98	0,455
B4DR52	Histone H2B OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	20	2	18	10,32	0,45
O14828	Secretory carrier-associated membrane protein 3 OS=Homo sapiens GN=SCAMP3 PE=1 SV=3	5	1	38,3	7,64	0,445
J3KPS3	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=3 SV=1	7	3	39,8	8,09	0,444
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHA1 PE=1 SV=3	2	1	43,3	8,06	0,444
Q32Q12	Nucleoside diphosphate kinase OS=Homo sapiens GN=NME1-NME2 PE=2 SV=1	12	1	32,6	8,48	0,442
A2A274	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACO2 PE=1 SV=1	2	1	87,8	7,37	0,442
P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	12	4	47,1	7,39	0,438
P30626	Sorcin OS=Homo sapiens GN=SRI PE=1 SV=1	11	2	21,7	5,59	0,431
O95684	FGFR1 oncogene partner OS=Homo sapiens GN=FGFR1OP PE=1 SV=1	5	1	43	4,81	0,43
P13639	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4	3	3	95,3	6,83	0,426

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
P62891	60S ribosomal protein L39 OS=Homo sapiens GN=RPL39 PE=1 SV=2	20	1	6,4	12,56	0,426
A0A024RC67	Protein regulator of cytokinesis 1, isoform CRA_e OS=Homo sapiens GN=PRC1 PE=4 SV=1	1	1	71,6	6,57	0,42
P62263	40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens GN=RPS14 PE=1 SV=3	9	1	16,3	10,05	0,415
A8K761	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10, 22kDa, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=NDUFB10 PE=2 SV=1	8	1	20,8	8,48	0,415
Q5U077	L-lactate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=2 SV=1	18	5	36,6	6,05	0,414
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD PE=1 SV=3	4	1	53,1	7,23	0,413
A0A024R1A3	Ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=UBE1 PE=3 SV=1	4	3	117,8	5,76	0,412
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU PE=1 SV=6	9	5	90,5	6	0,408
A0A024R8W0	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 48, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=DDX48 PE=3 SV=1	3	1	46,8	6,73	0,408
Q13405	39S ribosomal protein L49, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPL49 PE=1 SV=1	16	2	19,2	9,45	0,406
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens GN=DHX9 PE=1 SV=4	4	4	140,9	6,84	0,396
Q13158	FAS-associated death domain protein OS=Homo sapiens GN=FADD PE=1 SV=1	8	1	23,3	5,69	0,396
V9HWE9	Epididymis secretory protein Li 22 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-22 PE=2 SV=1	42	6	23,3	5,64	0,391
Q9UBS4	DnaJ homolog subfamily B member 11 OS=Homo sapiens GN=DNAJB11 PE=1 SV=1	3	1	40,5	6,18	0,391
Q59GX6	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	74,5	7,75	0,388

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
P68104	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	15	7	50,1	9,01	0,387
B4DMN1	cDNA FLJ61136, highly similar to Ras-related protein Rab-11A OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	1	28,8	8,38	0,386
P26641	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3	9	3	50,1	6,67	0,386
J3KNF8	Cytochrome b5 type B OS=Homo sapiens GN=CYB5B PE=3 SV=1	8	1	16,7	4,97	0,384
B4E290	cDNA FLJ50039, highly similar to Homo sapiens solute carrier family 25, member 24, transcript variant 1, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	53,3	6,61	0,378
P46776	60S ribosomal protein L27a OS=Homo sapiens GN=RPL27A PE=1 SV=2	7	1	16,6	11	0,377
P55060	Exportin-2 OS=Homo sapiens GN=CSE1L PE=1 SV=3	1	1	110,3	5,77	0,375
P21333	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4	1	2	280,6	6,06	0,373
P05141	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7	6	2	32,8	9,69	0,371
A8K7F6	cDNA FLJ78244, highly similar to Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1 (EIF4A1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	3	46,1	5,48	0,37
Q59F66	DEAD box polypeptide 17 isoform p82 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	2	81	7,93	0,369
Q59H77	T-complex protein 1 subunit gamma (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	63,5	6,43	0,367
A0A024R0Q4	Phospholipase D family, member 3, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=PLD3 PE=4 SV=1	4	2	54,7	6,47	0,361
A8K4Z4	cDNA FLJ75549, highly similar to Homo sapiens ribosomal protein, large, P0 (RPLP0), transcript variant 1, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	9	3	34,2	5,97	0,36
A8K6A2	cDNA FLJ77317, highly similar to Homo sapiens retinoblastoma binding protein 7 (RBBP7), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	3	47,8	5,08	0,36

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
B5MDF5	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Homo sapiens GN=RAN PE=4 SV=1	14	3	26,2	7,01	0,358
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4	4	2	56,6	6,71	0,356
A8MT02	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B' OS=Homo sapiens GN=SNRPB PE=1 SV=3	5	2	30	10,18	0,355
E9KL35	Epididymis tissue sperm binding protein Li 3a OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	2	35,1	7,69	0,355
P23526	Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY PE=1 SV=4	3	1	47,7	6,34	0,352
B4DX78	cDNA FLJ55484, highly similar to ATP-dependent RNA helicase DDX39 (EC 3.6.1.-) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5	2	53,7	5,9	0,341
A2IRN0	Raichu404X OS=Homo sapiens GN=Raichu404X PE=2 SV=1	1	1	85	6,92	0,339
Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Homo sapiens GN=VDAC3 PE=1 SV=1	9	2	30,6	8,66	0,339
B4DI54	cDNA FLJ56386, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1L OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	1	77,5	8,06	0,336
O60936	Nucleolar protein 3 OS=Homo sapiens GN=NOL3 PE=1 SV=1	9	1	24,3	11,33	0,334
P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC1 PE=1 SV=3	2	1	52,6	6,37	0,325
O75390	Citrate synthase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CS PE=1 SV=2	2	1	51,7	8,32	0,324
P49419	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=ALDH7A1 PE=1 SV=5	8	3	58,5	7,99	0,319
A0A024QYX3	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3, isoform CRA_c OS=Homo sapiens GN=RBM3 PE=4 SV=1	20	1	17,2	8,91	0,318
B4DWA7	Serine hydroxymethyltransferase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	56,3	9,42	0,315
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo	21	8	49,5	7,61	0,306

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
	sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2					
A8K3C3	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1	1	57,9	7,83	0,304
P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ETFA PE=1 SV=1	4	1	35,1	8,38	0,294
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 PE=1 SV=3	8	2	80,1	8,21	0,293
Q9UJU6	Drebrin-like protein OS=Homo sapiens GN=DBNL PE=1 SV=1	5	2	48,2	5,05	0,29
P29401	Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=3	4	2	67,8	7,66	0,29
Q8WXF1	Paraspeckle component 1 OS=Homo sapiens GN=PSPC1 PE=1 SV=1	4	1	58,7	6,67	0,28
E5KKNY5	Leucine-rich PPR-motif containing OS=Homo sapiens GN=LRPPRC PE=4 SV=1	1	1	157,8	6,13	0,27
A0A024R713	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=DLD PE=3 SV=1	3	1	54,1	7,85	0,268
Q99623	Prohibitin-2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=1 SV=2	10	3	33,3	9,83	0,265
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ECH1 PE=1 SV=2	2	1	35,8	8	0,262
A0A024R056	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=GNB1 PE=4 SV=1	3	1	37,4	6	0,26
B4DH02	cDNA FLJ50510, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	2	94,3	5,19	0,259
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3	12	3	35,5	8,68	0,259
A8K4W0	40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=2 SV=1	6	1	29,9	9,73	0,257
A0A024QZN9	Voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=VDAC2 PE=4 SV=1	10	2	34,5	7,99	0,256
F4ZW62	NF45 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	43	5,26	0,255
P62136	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha	3	1	37,5	6,33	0,252

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
	catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PPP1CA PE=1 SV=1					
A0A024RAC5	Regulator of chromosome condensation 2, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=RCC2 PE=4 SV=1	1	1	56	8,78	0,248
Q5JR94	40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=2 SV=1	11	2	24,2	10,32	0,241
Q9H9B4	Sideroflexin-1 OS=Homo sapiens GN=SFXN1 PE=1 SV=4	3	1	35,6	9,07	0,241
B4DJ30	cDNA FLJ61290, highly similar to Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	6	5	112,9	6,06	0,24
Q5H9N4	Putative uncharacterized protein DKFZp686L20222 OS=Homo sapiens GN=DKFZp686L20222 PE=4 SV=1	3	1	34,8	8,95	0,24
Q92769	Histone deacetylase 2 OS=Homo sapiens GN=HDAC2 PE=1 SV=2	2	1	55,3	5,91	0,236
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PTBP1 PE=1 SV=1	11	3	57,2	9,17	0,235
P62081	40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens GN=RPS7 PE=1 SV=1	6	1	22,1	10,1	0,222
B4DLJ3	cDNA FLJ51495, highly similar to ADP-ribosylation factor 5 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	1	25,4	7,66	0,221
B7Z8W8	Reticulon OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1	1	112,5	4,96	0,22
B4DPP6	cDNA FLJ54371, highly similar to Serum albumin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	70,3	6,09	0,201
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens GN=RPN1 PE=1 SV=1	2	1	68,5	6,38	0,194
P78371	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=4	4	2	57,5	6,46	0,172
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2	5	1	36,7	8,27	0,135
V9HW80	Epididymis luminal protein 220 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-70 PE=2 SV=1	2	1	89,3	5,26	0,123
A8K0G3	cDNA FLJ78733, highly similar to Homo sapiens adaptor-related protein	2	1	105,6	5,34	0,118



Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
	complex 2, beta 1 subunit (AP2B1), transcript variant 1, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1					
A8K259	cDNA FLJ78501, highly similar to Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1) (SERPINH1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	46,5	8,69	0,104
Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GRPEL1 PE=1 SV=2	5	1	24,3	8,12	0,09
B2R659	cDNA, FLJ92803, highly similar to Homo sapiens hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4 (HSD17B4), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	2	79,6	8,9	0,088
P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Homo sapiens GN=SNRPD1 PE=1 SV=1	11	1	13,3	11,56	0,001
P49327	Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=3	1	1	273,3	6,44	0,001
P51571	Translocon-associated protein subunit delta OS=Homo sapiens GN=SSR4 PE=1 SV=1	11	1	19	6,15	0,001
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACAT1 PE=1 SV=1	4	1	45,2	8,85	0,001
A8K566	cDNA FLJ78246, highly similar to Homo sapiens splicing factor 3a, subunit 3, 60kDa (SF3A3), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	58,8	5,43	0,001
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2	3	1	29,6	10,15	0,001
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCP1 PE=1 SV=1	1	1	60,3	6,11	0,001
Q96G42	Kelch domain-containing protein 7B OS=Homo sapiens GN=KLHDC7B PE=2 SV=2	5	1	63,3	9	0,001
M0R0R2	40S ribosomal protein S5 OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=1 SV=1	4	1	25,3	9,76	0,001
Q9BUA3	Uncharacterized protein C11orf84 OS=Homo sapiens GN=C11orf84 PE=1 SV=3	5	1	41	5,01	0,001

Accession	Description	Coverage [%]	# Unique Peptide	MW kDa	calc. pI	Abundance Ratio: (MA/NT)
B2R7P8	cDNA, FLJ93545, highly similar to Homo sapiens 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase (ATIC), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	1	64,6	6,8	0,001
P62316	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS=Homo sapiens GN=SNRPD2 PE=1 SV=1	8	1	13,5	9,91	0,001
P62277	40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens GN=RPS13 PE=1 SV=2	9	1	17,2	10,54	0,001
Q9NVM6	DnaJ homolog subfamily C member 17 OS=Homo sapiens GN=DNAJC17 PE=1 SV=1	7	1	34,7	8,53	0,001
V9HW77	Epididymis luminal protein 211 OS=Homo sapiens GN=HEL-211 PE=2 SV=1	4	1	42,6	5,59	0,001
Q16864	V-type proton ATPase subunit F OS=Homo sapiens GN=ATP6V1F PE=1 SV=2	20	1	13,4	5,52	0,001
Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Homo sapiens GN=DDX1 PE=1 SV=2	3	1	82,4	7,23	0,001
M0QXB4	Coatomer protein complex, subunit epsilon, isoform CRA_g OS=Homo sapiens GN=COPE PE=4 SV=1	6	1	36,9	5,16	0,001