



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Expresión diferencial de proteínas, asociadas a la expresión de insulina,
en células β -pancreáticas humanas transfectadas con REST”**

TESIS

Que presenta

I.B.T. KEVIN ALEXEY SOUZA BECERRIL

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis:

Dr. JOSÉ TAPIA RAMÍREZ

Ciudad de México

AGOSTO, 2022

Dedicatoria:

A mis padres por todo el apoyo incondicional, no solo durante el desarrollo de este trabajo, sino durante toda mi formación académica hasta el momento, gracias a la cual se pudo concretar esta tesis.

A mis hermanos y a Millie por distraerme un poco cuando regresaba a la casa, casi siempre agobiado.

A mis amigos que, a pesar de la distancia y el aislamiento supieron conservar la amistad y estar para mí cuando los necesité.

A mis familiares difuntos quienes, inadvertidamente me motivaron a dedicarme al área científica.

Agradecimientos:

A mis compañeros de generación por brindarme gratos recuerdos, amistad y la certeza de considerarlos como contactos importantes a futuro.

Al Dr. José Tapia, a la Dra. Dulce Delgadillo, al M. Carlos Cruz, al M. Humberto Santana, al M. Emmanuel Ríos, al Sr. Víctor Tapia porque gracias a la interacción con todos ustedes fue posible obtener conocimiento de alto valor.

A mis asesores el Dr. Jaime García y el Dr. Luis Kameyama, por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Al la M. Rocío Villalobos y al Sr. José Luis por preguntarme siempre como estaba, escucharme y aconsejarme.

Agradecimientos especiales al CINVESTAV por la oportunidad de pertenecer a este programa de posgrado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado con la beca número 1077389.

Índice

Índice de Figuras.....	6
Índice de Tablas.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	11
Introducción.....	13
Marco Teórico	16
Islotes de Langerhans	16
Células β -pancreáticas y diabetes.....	21
Transcripción, traducción y secreción de insulina	22
REST	29
REST en células β -pancreáticas	31
Espectrometría de Masas (MS).....	34
Proteómica	39
Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS)	41
Proteómica cuantitativa dirigida	43
Métodos cuantitativos a nivel proteómico	44
Métodos cuantitativos de MS con marcaje	45
Métodos cuantitativos de MS sin marcaje “Label-free”	47
Antecedentes	50
Justificación.....	55
Pregunta de investigación	55
Hipótesis	55
Objetivo General	56
Objetivos Específicos.....	56

Estrategia experimental	57
Metodología experimental	58
Cultivo, extracción y cuantificación de proteínas de las líneas celulares: 1.1E7, 1.1E7-REST Pvul y 1.1E7-REST Scal	58
Digestión de proteínas en gel	59
Análisis por MS.....	61
Análisis de datos obtenidos por MS	62
Análisis a nivel de péptidos	63
Análisis a nivel de proteína.....	63
Análisis de las interacciones de las proteínas detectadas.....	64
Cultivo, extracción y cuantificación de proteínas de las líneas celulares: 1.4E7 y Vero.....	65
Ensayo de Western Blot para expresión de REST, PDX-1 e insulina en 1.4E7 y Vero.....	66
Análisis y datos obtenidos por MS de 1.4E7	67
Análisis a nivel de péptidos y proteínas de 1.4E7	69
Análisis de las interacciones de proteínas detectadas en 1.4E7	70
Viabilidad celular de 1.4E7 con G418.....	70
Transfección estable en 1.4E7	71
Resultados y Discusión.....	74
Análisis por MS de 1.1E7, 1.1E7-REST Pvul y 1.1E7-REST Scal	74
Detección de REST, PDX-1 e Insulina por Western-blot en 1.4E7 y Vero	85
Análisis por MS de 1.4E7	88
Viabilidad celular de 1.4E7	92
Construcción de transfectantes estables 1.4E7-REST Pvul y 1.4E7-REST Scal	93

Conclusiones.....	100
Perspectivas.....	101
Referencias.....	102
Anexo A	127
Anexo B	162
Anexo C	169

Índice de Figuras

Figura 1. Conformación de los islotes en humano y ratón.	21
Figura 2. Regulación de la transcripción de insulina.	25
Figura 3. Remodelamiento epigenético mediado por REST.	30
Figura 4. Niveles de REST e interacción con NEUROG3.	34
Figura 5. Estudio proteómico por espectrometría de masas.	40
Figura 6. Tipos de enfoques en un estudio proteómico por MS.	41
Figura 7. Tipos de MS-MS.	42
Figura 8. Métodos de proteómica cuantitativa dirigida.	44
Figura 9. Ejemplo de un método cuantitativo con y sin marcaje.	49
Figura 10. Retardamiento de secuencias RE-1 like 51	51
Figura 11. Súper retardamiento de secuencias RE-1 like 52	52
Figura 12. CHIP de secuencias RE-1 like..... 53	53
Figura 13. Expresión de GFP en transfectantes estables 1.1E7-REST 54	54
Figura 14. Western blot de REST, PDX-1 e Insulina en 1.1E7-REST..... 54	54
Figura 15. Histograma de frecuencias absolutas de péptidos 75	75
Figura 16. Gráfico de pastel de clasificación de péptidos 75	75
Figura 17. Rango dinámico en 1.1E7 y sus transfectantes estables..... 76	76
Figura 18. Gráfico de volcán para proteínas sobre-expresadas, sin cambios y sub-expresadas en las transfectantes estables respecto al control 77	77
Figura 19. Interactoma de proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST Pvul..... 79	79

Figura 20. Interactoma de proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST Scal.....	80
Figura 21. Interacción de proteínas asociadas a insulina	81
Figura 22. Tranferencia en membrana de nitrocelulosa.....	85
Figura 23. Detección de REST, PDX-1 e Insulina en extractos de 1.4E7 y Vero..	86
Figura 24. Histograma de frecuencias absolutas de péptidos en 1.4E7	88
Figura 25. Gráfico de pastel de clasificación de péptidos en 1.4E7	89
Figura 26. Rango dinámico en 1.4E7.....	89
Figura 27. Interacción de proteínas asociadas a insulina en 1.4E7	90
Figura 28. Confluencia de 1.4E7 a diferentes concentraciones de G418	92
Figura 29. Restricciones en pQBI	94
Figura 30. Restricciones en pQBI-REST.....	94
Figura 31. Restricciones en pQBI y pQBI-REST para transfección estable.....	95
Figura 32. Visualización de 1.4E7 al 90% de confluencia.....	96
Figura 33. Expresión de GFP en transfectantes estables 1.4E7.....	97
Figura 34. Distribución de células GFP +	98

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias RE-1 like obtenidas en Genomatix MatInspector.....	50
Tabla 2. Cuantificación de proteína total en triplicados biológicos de 1.1E7 y sus transfectantes estables	74
Tabla 3. Área bajo la curva de 1.1E7 y sus transfectantes estables	74
Tabla 4. Proteínas asociadas a insulina en 1.1E7-REST Pvul	81
Tabla 5. Proteínas asociadas a insulina en 1.1E7-REST Scal	82
Tabla 6. Cuantificación de proteína total en 1.4E7 y Vero	85
Tabla 7. Cuantificación de proteína total en 1.4E7.....	88
Tabla 8. Proteínas asociadas a insulina en 1.4E7	91
Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular en 1.4E7 tratada con G418.....	92
Tabla 10. Cuantificación de pQBI y pQBI-REST	93
Tabla 11. Restricciones enzimáticas para transfección estable.....	95
Tabla 12. Cuantificación de pQBI y pQBI-REST para transfección estable	96
Tabla 13. Relación de Lipofectamina LTX, reactivo plus, OptiMEM y DNA para transfección estable en 1.4E7	96
Tabla 14. Proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST Pvul	127
Tabla 15. Proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST Scal	149
Tabla 16. Proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST Pvul y representadas en el interactoma.....	162
Tabla 17. Proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST Scal y representadas en el interactoma.....	166
Tabla 18. Expresión absoluta de proteínas en 1.4E7.....	169

Resumen

Considerando que REST se expresa en células progenitoras del páncreas que dan origen a los islotes pancreáticos, se han realizado estudios en células β -pancreáticas, los cuales indican que cuando se induce la expresión de REST en ratones (durante la etapa embrionaria), estos desarrollan diabetes (en la etapa adulta) como consecuencia de la represión de genes antiapoptóticos asociados a la supervivencia de células β -pancreáticas; no obstante, a pesar de las diferencias en la regulación genética entre ratones y humanos, hasta el momento no se ha determinado el efecto de la expresión de REST en el contexto β -pancreático humano.

El objetivo de este trabajo fue estudiar en una primera fase, 2 líneas celulares β -pancreáticas humanas 1.1E7 transfectadas de manera estable con REST, mediante espectrometría de masas para identificación y cuantificación relativa, con el objetivo de analizar la expresión diferencial de proteínas en las transfectantes que expresan de manera constitutiva a REST. Recientemente se ha documentado que la línea celular 1.1E7 posee secuencias genómicas de rata, y los resultados obtenidos de esta línea celular deben analizarse con precaución. Con este antecedente se decidió desarrollar transfectantes estables, con una segunda línea celular de características similares.

En una segunda fase, se desarrollaron 2 líneas celulares β -pancreáticas humanas 1.4E7 transfectadas con REST; adicionalmente, se analizaron los marcadores de REST, PDX-1 e insulina y se analizaron las redes de proteínas asociadas a la expresión de insulina en la línea celular sin transfectar. En un análisis a futuro, será posible comparar como afecta la expresión exógena del factor de transcripción REST en ambas líneas celulares transfectadas (1.1E7 vs 1.4E7).

Los datos de proteínas obtenidos del espectrómetro de masas pasaron por múltiples filtros estadísticos, con el propósito de seleccionar solamente aquellas

proteínas que se consideran altamente confiables y que se asocian con mecanismos relacionados a la síntesis, procesamiento, excreción o degradación de la insulina, mismas que fueron representadas a modo de interactoma. Algunas de las proteínas diferencialmente expresadas están implicadas en el procesamiento, translocación y secreción de insulina, principalmente.

Abstract

Considering that REST is expressed in progenitor cells of the pancreas that give rise to pancreatic islets, studies have been carried out in β -pancreatic cells, which indicate that when REST expression is induced in mice (during the embryonic stage), they develop diabetes (in the adult stage) as a consequence of the repression of antiapoptotic genes associated with the survival of pancreatic β -cells; however, despite differences in gene regulation between mice and humans, the effect of REST expression in the human pancreatic β -context has not been determined yet.

The objective of this work was to study in a first phase, 2 human β -pancreatic cell lines 1.1E7 stably transfected with REST, by means of mass spectrometry for identification and relative quantification, with the objective of analyzing differential protein expression in transfectants constitutively expressing REST. The 1.1E7 cell line has recently been documented to possess rat genomic sequences, and the results obtained from this cell line should be viewed with caution. With this background, it was decided to develop stable transfectants, with a second cell line with similar characteristics.

In a second phase, 2 human β -pancreatic cell lines 1.4E7 transfected with REST were developed; additionally, REST, PDX-1 and insulin markers were analyzed as well as protein networks associated with insulin expression in the untransfected cell line. In a future analysis, it will be possible to compare how the exogenous expression of the REST transcription factor affects in both transfected cell lines (1.1E7 vs 1.4E7).

The protein data obtained from the mass spectrometer passed through multiple statistical filters, in order to select only those proteins that are considered highly reliable and that are associated with mechanisms related to the synthesis, processing, excretion or degradation of insulin, which were represented as an

interactome. Some of the differentially expressed proteins are involved in the processing, translocation and secretion of insulin, mainly.

Introducción

Los islotes de Langerhans son pequeñas subunidades celulares localizadas dentro del páncreas que representan aproximadamente el 2% de la masa pancreática total (Sakula, 1988) y se conforman de diversos linajes celulares, de entre ellos, las células β -pancreáticas son de gran importancia, ya que, además de ser predominantes (aproximadamente un 60% de las células que conforman los islotes en humanos), son las encargadas de producir insulina, una hormona que permite la absorción celular de glucosa con la finalidad de estabilizar su concentración en la sangre e inhibir la producción de glucosa hepática (Edgerton, 2017), de manera que, la cantidad total de insulina liberada depende del número absoluto (masa) de células β -pancreáticas y de la producción (función) de cada una de estas células (Chen C. C., 2017). Durante décadas, se ha debatido la contribución relativa de la masa y función de las células β -pancreáticas al desarrollo de niveles insuficientes de insulina y diabetes mellitus, un trastorno metabólico en el cual los pacientes sufren niveles altos de glucosa en la sangre debido a que sus cuerpos no responden a la insulina o la producen de manera inadecuada; cabe señalar que, de forma general, existen 3 tipos de diabetes: tipo I, II y diabetes gestacional, pero se pone más énfasis en los primeros 2 tipos de diabetes (Khan, 2019). La diabetes tipo I es una forma de enfermedad autoinmune en la cual las células que producen insulina son destruidas por su propio sistema inmunológico, mientras que la diabetes tipo II, que es más común que la tipo I, ocurre cuando el cuerpo no responde a la insulina producida, además, ambos tipos de diabetes pueden provocar daños a largo plazo, disfunción y fallo de diferentes órganos, especialmente los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos (Marciano, 2019), así como ceguera (retinopatía), insuficiencia renal, trastornos del pie diabético (infecciones graves en las piernas, que eventualmente conducirán a la amputación) y enfermedades cardiovasculares (Pantalone, 2015).

Ahora bien, la mayor parte de la información disponible sobre la masa y función de las células β -pancreáticas en la diabetes se deriva de experimentos

realizados en modelos de ratón, debido a la limitada disponibilidad de muestras humanas (Chen C. C., 2017); no obstante, diversos estudios han demostrado que las células β -pancreáticas humanas y de ratón muestran características muy diferentes, en particular cuando se trata de su distribución y masa en los islotes pancreáticos (Dolenšek, 2015). Sin embargo, en los últimos años se han logrado grandes avances en la adquisición organizada de tejidos humanos y el desarrollo de nuevas tecnologías, al punto de que hoy en día existen 3 líneas celulares híbridas denominadas “1.1B4, 1.1E7 y 1.4E7”, formadas por electrofusión de un cultivo primario de células β -pancreáticas humanas con la línea celular PANC-1 (carcinoma ductal pancreático humano), mismas que son capaces de producir y secretar insulina tras un estímulo de glucosa (McCluskey, 2011).

Por otro lado, el factor de transcripción REST se expresa en gran parte de las células del cuerpo, excluyendo la mayoría de las poblaciones de neuronas, así como las células α y β -pancreáticas, este factor se une a regiones reguladores de genes que codifican factores de transcripción activadores, proteínas implicadas en transmisión sináptica, canales iónicos y exocitosis, así como RNA no codificantes (Martin D. A., 2012). Aunado a lo anterior, cabe mencionar que REST se expresa en los progenitores de neuronas y células β -pancreáticas durante el desarrollo, pero su expresión disminuye conforme las células se diferencian; asimismo, en ratones se ha comprobado que la expresión sostenida de REST en células β -pancreáticas (durante el desarrollo o la etapa adulta) provoca diabetes, debido a que existe una pérdida progresiva (por apoptosis) de masa celular β -pancreática que, a su vez, disminuye la cantidad de insulina producida (Martin D. &.B., 2017).

Por otra parte, la proteómica (la cual es una rama de la biología molecular) analiza globalmente las proteínas celulares y utiliza como principal herramienta la espectrometría de masas (MS), una técnica analítica que ha contribuido en numerosos descubrimientos de química, física y bioquímica, al permitir la identificación directa de moléculas con base en las relaciones masa/carga (m/z) y los patrones de fragmentación (Urban, 2016); así, en comparación con otras

técnicas utilizadas en el área de la proteómica, la MS es mucho más fácil de automatizar, más sensible, fácil de dividir con diferentes técnicas de separación y se puede utilizar para mezclas complejas, de manera que, uno de los principales objetivos de la proteómica basada en MS es identificar y cuantificar (de manera relativa o absoluta) proteínas (Matthiesen, 2013).

De esta manera, el uso de herramientas proteómicas basadas en MS será necesario para estudiar el perfil proteínico de las líneas celulares 1.1E7 y 1.4E7 (células β -pancreáticas humanas) transfectadas y no transfectadas con REST, con la finalidad de conocer el efecto que tiene este factor de transcripción en la producción y secreción de insulina.

Marco Teórico

Islotes de Langerhans

Los islotes de Langerhans son pequeñas subunidades celulares localizadas dentro del páncreas que representan aproximadamente el 2% de la masa pancreática total, actualmente hay un estimado de 3.2-14.8 millones de estos conjuntos (en humanos) distribuidos en todo el órgano (Ionescu-Tirgoviste, 2015). Estos islotes, con un diámetro promedio de 0.2 mm, están encapsulados en una capa delgada de tejido conectivo que, a su vez, está rodeada e infiltrada por una densa red vascular porosa que permite a los islotes responder (de forma rápida) al estímulo que provoca el flujo de nutrientes en sangre; cada islote está conformado de fibroblastos, nervios, células endoteliales y cinco tipos diferentes de células endócrinas (Hardikar, 2016) que se describen a continuación:

-Células ϵ (<1%): Productoras de grelina, hormona peptídica de 28 aminoácidos (producida principalmente por el intestino (Rindi, 2002)) que estimula la ingesta de alimentos (función por la cual es comúnmente conocida como la hormona hambrienta), favorece la liberación de la hormona del crecimiento, adipogénesis, consumo de glucosa e inhibe la lipólisis (Granata, 2013). Asimismo, se ha demostrado que la grelina: i) aumenta en ayunas (Toshinai, 2001), ii) es un inhibidor de la secreción de insulina en humanos (Broglia, 2003) y roedores (Reimer, 2003), iii) puede ser un regulador de la liberación de polipéptido pancreático (PP), somatostatina (Arosio, 2003) y glucagón (Salehi, 2004) y iv) su contenido plasmático tiene una relación recíproca con el contenido de insulina plasmática (Dezaki, 2008).

Además, datos recientes en roedores indican que la expresión de grelina define un linaje progenitor multipotente que da lugar a células α , PP y β -pancreáticas raras (Arnes, 2012). Cabe señalar que estas células son más abundantes en la etapa de desarrollo fetal del páncreas que en la etapa adulta, aproximadamente el 10% y el 1% del contenido de células de los islotes respectivamente (Wierup, 2013),

por lo cual, es probable que desempeñen un papel importante en el desarrollo del páncreas, así como en la apoptosis y supervivencia de las células β -pancreáticas (Hardikar, 2016).

-Células γ (5%): Productoras de polipéptido pancreático, hormona peptídica de 36 aminoácidos también producida por células acinares, cuya principal función parece ser la de una hormona de la saciedad, ya que inhibe la secreción pancreática después de la ingesta de alimentos (Tan, 2013); además, su liberación posprandial está regulada por la estimulación nerviosa entérica y vagal (Holzer, 2012).

Aunado a lo anterior, se ha demostrado que el polipéptido pancreático es un inhibidor de la liberación de glucagón a niveles bajos de glucosa (Aragón, 2015) y que este tipo de células están más concentradas en la cabeza del páncreas, donde ocupan el manto exterior de los islotes de roedores o recubren los capilares en los islotes humanos (Brereton, 2015).

-Células δ (5%): Secretoras de somatostatina, hormona peptídica de 14 aminoácidos que también es secretada por el hipotálamo, el sistema nervioso central, las neuronas periféricas y el tracto gastrointestinal (Brereton, 2015). En el páncreas, esta hormona actúa como un regulador negativo de la secreción de insulina, glucagón y polipéptido pancreático, de manera dependiente de Ca^{+2} (Zhang Q. B., 2007) y bajo condiciones estimulantes de nutrientes (Hauge-Evans, 2009), mientras que, en el cerebro disminuye la liberación de la hormona del crecimiento, tirotropina y prolactina (Hardikar, 2016).

Actualmente, de las células δ se sabe que, al igual que las células α y β -pancreáticas, estas son eléctricamente excitables (Kanno, 2002), además, la urocrotina (van der Meulen, 2015) y la grelina (Adriaenssens, 2016) conducen a la liberación de somatostatina al actuar sobre estas. Asimismo, cabe mencionar que las células δ se transdiferencian a células β -pancreáticas, como resultado del agotamiento agudo de la masa celular de estas últimas (Chera, 2014); no obstante,

como las células δ también regulan a las células α , la pérdida de masa celular δ (como resultado de la transdiferenciación) puede conducir a una secreción de glucagón desregulada, por ello, la evidencia actual no apoya la transdiferenciación de δ células a células β como un medio viable para reponer la masa β celular (Da Silva Xavier, 2018).

-Células α (~30%): Productoras de glucagón, hormona peptídica de 29 aminoácidos que tiene un efecto contrario a la insulina, es decir, es importante para prevenir la hipoglicemia, de manera que actúa principalmente en el hígado, favoreciendo la glucogenólisis, gluconeogénesis y cetogénesis (Silva V. P., 2015); no obstante, esta hormona también actúa en el cerebro para aumentar la saciedad y, por lo tanto, reducir el apetito y la ingesta de alimentos (Campbell, 2015). Aunado a lo anterior, es preciso señalar que la secreción de glucagón está regulada por mecanismos tanto intrínsecos como parácrinos de las células α ; en este ámbito, se ha propuesto que la hiperglucagonemia puede ser el resultado de: i) la activación de la regulación extrínseca mediada por insulina y zinc (Zhou H. Z., 2007) y ii) por la pérdida del mecanismo regulador intrínseco, regulado por glucosa y aminoácidos (Gylfe, 2016).

Asimismo, se ha propuesto que la hormona intestinal péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) tiene un efecto inhibitor indirecto sobre la secreción de glucagón (de Heer, 2008), debido a que este favorece la secreción de somatostatina y, como ya se mencionó anteriormente, esta última suprime la secreción de glucagón; de manera interesante, se ha sugerido que durante el desarrollo de la diabetes las células α pueden liberar GLP-1 (Chen Y. C., 2018), muy probablemente como un medio para aumentar la secreción de insulina. Por otra parte, los islotes de Langerhans están inervados y sujetos a la regulación del sistema simpático y parasimpático, de modo que la secreción de glucagón se estimula en la hipoglucemia (Thorens, 2014). En resumen, la evidencia actual indica que la

regulación intrínseca, parácrina y nerviosa de la secreción de glucagón no son mutuamente excluyentes y probablemente actúen en conjunto (Briant, 2016).

-Células β (~60%): Producen insulina y amilina, hormonas peptídicas de 51 y 37 aminoácidos respectivamente (Hardikar, 2016). La insulina sirve como regulador primario de homeostasis de la glucosa en sangre, es decir, esta hormona promueve la recepción de glucosa en tejidos periféricos para mantener la concentración de glucosa en niveles normales (Zhou J. D., 2011). Los principales tejidos a los que se dirigen los efectos de la insulina sobre el metabolismo incluyen: i) músculo, donde la insulina promueve la captación de glucosa y la síntesis de proteínas, ii) tejido adiposo, donde la insulina promueve la captación de glucosa y ácidos grasos e inhibe la lipólisis, iii) hígado, donde la insulina promueve la utilización de glucosa, suprime la producción de glucosa y promueve la síntesis de triglicéridos y iv) neuronas, donde promueve señales anorexigénicas y locomotoras (Haeusler, 2018).

Por su parte, la amilina se secreta junto con la insulina en una proporción aproximada de 1:25 (Westermarck, 2011) y su función es regular la cantidad de glucosa en sangre (trabaja de forma sinérgica con la insulina), a través de las siguientes funciones que realiza de forma coordinada: i) disminuye la velocidad de vaciamiento gástrico, ii) incrementa la producción de ácido gástrico, bilis (por parte del hígado) y enzimas pancreáticas e iii) incrementa la sensación de saciedad derivada de la ingesta de alimentos (Westwell-Roper, 2014).

Ahora bien, la mayor parte del conocimiento actual acerca de las células β -pancreáticas (así como la secreción de insulina) proviene de estudios en ratones, a pesar de que el objetivo es comprender su funcionamiento en humanos; a su vez, mucha información de gran importancia ha sido obtenida de ratones modificados genéticamente, ya sea de forma global o específicamente en células β -pancreáticas, sin embargo, las respuestas a niveles moleculares y/o fenotípicos pueden variar considerablemente (Rorsman P. &, 2018). En este ámbito, se sabe que los ratones

son nocturnos mientras que los humanos son diurnos y que, durante este periodo de actividad, los ratones se alimentan continuamente en comparación con los humanos que se alimentan de 3 a 4 veces por día, además, es evidente que la dieta entre ambas especies es distinta; de manera que, estas diferencias tienen un impacto en la secreción y acción de la insulina (Rorsman P. &, 2018).

Por consiguiente, en los islotes humanos la secreción de insulina se detecta en concentraciones de glucosa tan bajas como 3mM (Henquin, 2006), un valor considerablemente bajo en comparación con la secreción de insulina en los islotes de ratones, que se promueve a partir de una concentración similar a 5mM (Rozzo, 2009); asimismo, estos valores se correlacionan con la baja concentración de glucosa en sangre, en ayunas de 4-5mM y 7-10mM en humanos y ratones respectivamente (Li D. Q., 2009). No obstante, en los islotes de ambas especies la secreción promedio de insulina actúa en concentraciones de 10-12mM de glucosa, alcanzando el nivel de saturación a una concentración mayor de 20mM de glucosa (Rorsman P. &, 2018).

Aunado a esto, diversos estudios indican que los islotes de ratones se ordenan de manera uniforme en todo el páncreas, en comparación con los islotes humanos que poseen una distribución similar en la cabeza y cuerpo del páncreas pero su distribución aumenta en la cola del páncreas, región donde se concentran casi el doble de islotes (Wang X, 2013), además de que, se ha reportado que los islotes ubicados en la cabeza del páncreas son de menor tamaño en comparación con los situados en la cola (Ionescu-Tirgoviste, 2015). Además, la conformación del islote es otra variable, ya que, como se muestra en la fig.1, los islotes de ratón se forman con una capa periférica de células α y un núcleo predominante de células β -pancreáticas, mientras que los islotes de humanos contienen una distribución variada de células α y β -pancreáticas (Dolenšek, 2015).

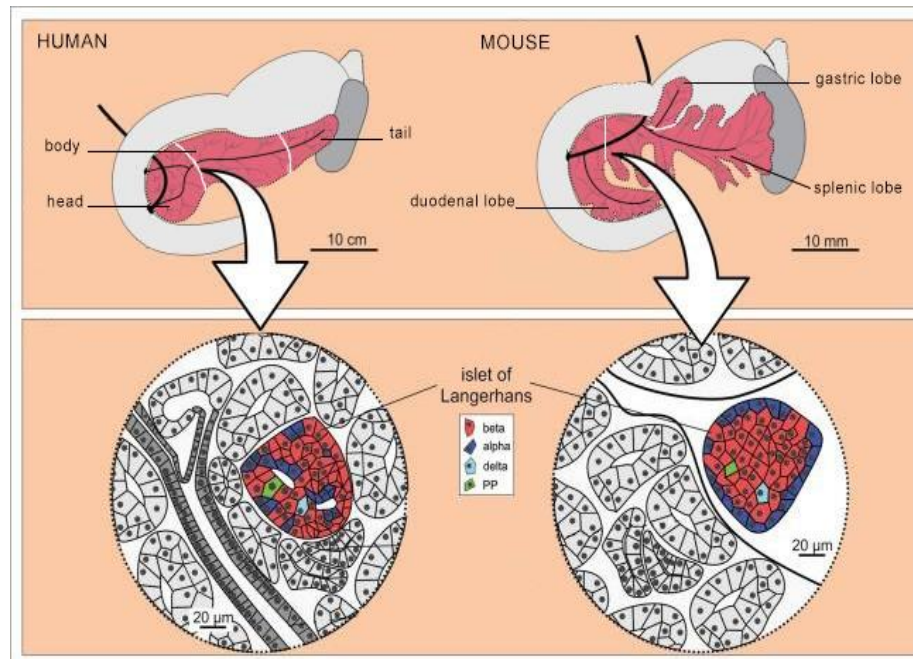


Figura 1. Conformación de los islotes en humano y ratón. Modificada de (Dolenšek, 2015)

Células β -pancreáticas y diabetes

Como se mencionó en la introducción, la cantidad de insulina producida está en función del número en masa de células β -pancreáticas y la producción de cada una de éstas (Chen C. C., 2017), de manera que la secreción alterada de insulina (debido a la disfunción de las células β -pancreáticas) es uno de los mayores factores relacionados a la diabetes mellitus (Eizirik, 2020), una enfermedad del sistema endócrino que se diagnostica por niveles anormalmente altos de glucosa en sangre, asociada con diversas enfermedades cardiovasculares que conducen a un aumento en la mortalidad, ceguera, insuficiencia renal y disminución de la calidad de vida (Cole, 2020). Es importante mencionar que en el año 2018, alrededor de 8.6 millones de personas padecían diabetes en México, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición publicada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en ese año; asimismo, la diabetes fue la tercera causa de muerte a nivel nacional del año 2020 ya que, de acuerdo con el documento Características de las defunciones registradas en México, esta enfermedad cobró la vida de 151 mil 19

personas, de las cuales 47.75% eran mujeres y 52.25% eran hombres (Zepeda, 2021).

Ahora bien, la diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad crónica que se asocia con una falta absoluta de insulina, debido a que el sistema inmune destruye a las células β -pancreáticas de manera progresiva, lo que resulta en un estado de nivel bajo de insulina, hiperglicemia y diversas complicaciones (Chen C. C., 2017); por su parte, la diabetes mellitus tipo 2 suele asociarse a una falta relativa de insulina, ya que es producto de un desorden metabólico progresivo, provocado inicialmente por una condición de sobreproducción de insulina (derivado de un alto nivel de glucosa), mismo que, al mantenerse por largos periodos (hiperinsulinemia), hace que las células generen resistencia a la insulina, es decir, que no cumplen su función de metabolizar eficientemente la glucosa (Cersosimo, 2014).

Por consiguiente, las células β -pancreáticas son de gran importancia, ya que, además de ser predominantes (aproximadamente un 60% de las células que conforman los islotes en humanos), son las encargadas de producir la hormona reguladora primaria de la homeóstasis de glucosa, mejor conocida como insulina (Hardikar, 2016). En ratones, estas células son de forma poligonal con diámetro promedio de 13 a 18 μm (Göpel, 1999) y poseen alrededor de 10,000 gránulos secretorios (Olofsson, 2002), cada uno con alrededor de 8 a 9 fg de insulina (Huang L. S., 1995), correspondiente a una concentración intragranular aproximada de 100mM que se almacena (en forma cristalina) en las vesículas secretoras, misma que representa alrededor de 5-10% (más que cualquier otra proteína) del total de proteína en la célula y se libera por exocitosis regulada (Rorsman P. &., 2003).

Transcripción, traducción y secreción de insulina

La biosíntesis de insulina está regulada tanto a nivel transcripcional como traduccional, sin embargo, el contenido de insulina en las células β -pancreáticas es muy dinámico, ya que la insulina se acumula en presencia de nutrientes y disminuye como respuesta a la falta de nutrientes; no obstante, la capacidad de las células β -

pancreáticas para responder rápidamente a las señales celulares se debe generalmente a la regulación transcripcional (Fu, 2013). En éste ámbito, los elementos A, C, E, Z y CRE ubicados dentro de la región promotora del gen de la insulina, determinan la localización de la insulina en las células β -pancreáticas y sirven como sitios de unión para diversos factores de transcripción que regulan la expresión de esta hormona; cabe mencionar que los sitios de unión a factores de transcripción que se encuentran dentro de una región que abarca ~-400 pares de bases (pb), en relación con el sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés), son determinantes en la expresión específica de insulina en las células β -pancreáticas (Hay C. W., 2006); cada uno de los elementos mencionados anteriormente se describen a continuación:

-Elementos A: Estos son múltiples elementos ricos en A / T ubicados en la región de control conservada del gen de la insulina (German M. A., 1995); de manera interesante, hay un núcleo TAAT en cada uno de estos elementos que sirve como motivo central de reconocimiento de la unión al DNA para las proteínas del homeodominio (Gehring, 1994), como Isl-1 (Karlsson, 1990), Cdx2/3 (German M. S., 1992) y PDX-1 (Miller, 1994).

-Elementos C: Hay dos elementos C en el promotor del gen de la insulina. El elemento C1 se encuentra entre 118 y 107 pb corriente arriba del TSS de la insulina de rata (Shieh, 1991); a este elemento se unen las proteínas RIPE3b1 (o MafA) y RIPE3b2 (Zhao, 2000). Por su parte, el elemento C2 (que se encuentra en -317/-311 pb en el gen de la insulina de rata) es un sitio de unión para PAX6 (Sander M. N., 1997) y PAX4 (Sosa-Pineda, 2004).

-Elementos E: Son dos unidades de “mini-enhancer” (con secuencia 5'-GCCATCTG-3') separadas dentro del enhancer de insulina (German M. S., 1992); además, los roedores tienen dos elementos E (-241/-233 y -112/104 pb) en el gen de la insulina I, mientras que otros mamíferos tienen sólo uno (aproximadamente de -100/-91 pb) (Steiner, 1985). Los factores que se unen al

elemento E incluyen BETA2/NeuroD1 (Naya, 1995), E2/5, E12 y E47 (Robinson, 1994).

-Elemento Z: Está ubicado corriente arriba del elemento A (-292/-243 pb) y es exclusivo de la insulina humana; en este ámbito, Zal se une a la región de -287/-271 pb (dentro de este elemento) en células β -pancreáticas de cultivos primarios (Sander M. G., 1998). Aunado a lo anterior, estudios recientes muestran que PDX-1 y MafA regulan la transcripción del gen de la insulina mediante la activación del elemento Z (Pino, 2005); por su parte, la activación del elemento A depende de la presencia del elemento Z (Le Lay, 2006).

-Elementos de respuesta de AMP cíclico (CRE): Existen cuatro de estos elementos en el promotor del gen de la insulina humana i) CRE1 a -210 pb, ii) CRE2 a -183 pb, iii) CRE3 a +18 pb y iv) CRE4 a +61 pb (Inagaki, 1992); además, dentro del núcleo de cada uno de estos sitios hay una secuencia similar a la secuencia consenso CRE (5'-TGACGTCA-3'), a la cual se unen factores de transcripción miembros de la familia de proteínas de unión a CRE (CREB)/ATF que regulan la transcripción del gen de la insulina (Hay C. W., 2005).

Hasta este punto, cabe mencionar que los modos de regulación genética pueden ser específicos de la especie y, por lo tanto, la interpretación de datos de modelos animales y la extrapolación a humanos deben realizarse con precaución (Fu, 2013). Por ejemplo, en la fig. 2 se ilustra que el factor nuclear de hepatocitos HNF-1 (Emens, 1992) e Isl-1 (Peng, 2005) pueden unirse a los elementos A para estimular la transcripción del gen de insulina I de rata; asimismo, Cdx-3 (German M. S., 1992) y HMGI(Y) (Ohneda, 2000) se unen específicamente al elemento A3 / A4, que es exclusivo de la insulina I de rata.

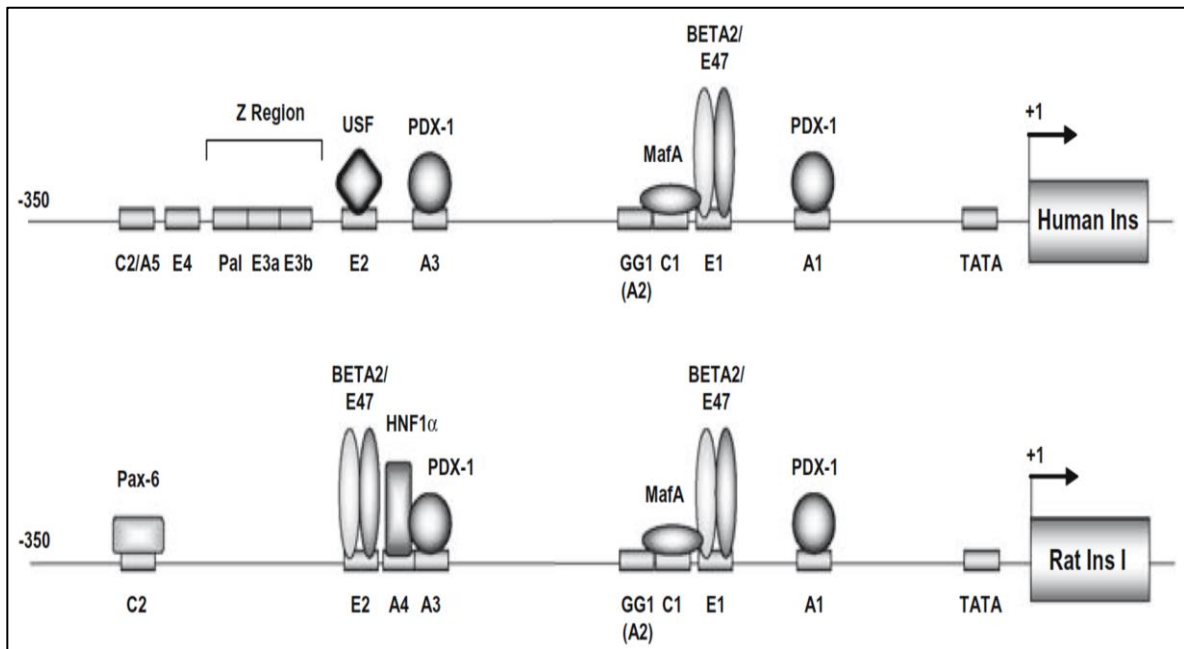


Figura 2. Regulación de la transcripción de insulina. Tomada de (Artner, 2008)

Por otra parte, haciendo énfasis en la regulación de la traducción de la insulina, actualmente se sabe que la ER quinasa pancreática (PERK) juega un papel importante en este proceso, debido a que fosforila al factor de iniciación eucariota 2a (eIF2a), regulando así la traducción de esta hormona (Harding, 2000); no obstante, dicha fosforilación puede compensarse parcialmente con otras quinasas (Scheuner, 2001). De manera interesante, la expresión de insulina inducida por glucosa está regulada al inicio por la unión de la proteína IRE1 al gen WSF1, mientras que una exposición prolongada de este carbohidrato induce el splicing alternativo en el mRNA del factor de transcripción XBP1 (mediado por la actividad endonucleasa de IRE1), de manera que la producción de insulina disminuye (Ortsäter, 2007).

Aunado a lo anterior, cabe mencionar que las células β -pancreáticas han desarrollado un mecanismo para detectar la cantidad de insulina almacenada/secretada y, en consecuencia, ajustan la síntesis de esta hormona; dicho mecanismo consta de las siguientes fases: i) los gránulos de insulina se anclan a la corteza de actina a través de ICA512 y β 2-sintrofina, ii) la membrana

granular se fusiona transitoriamente con la membrana celular para liberar insulina, iii) los niveles elevados de Ca^{+2} activan la proteasa μ -calpaína para escindir un fragmento citosólico de ICA512, iv) este último se desplaza hacia el núcleo y se une a la tirosina fosforilada del factor de transcripción STAT5, con la finalidad de evitar la desfosforilación de este último que, a su vez, regula de forma positiva la transcripción de insulina; además, los fragmentos citosólicos de ICA512 (que se encuentran libres en el núcleo) también se unen a la enzima sumoilante PIAS, de manera que se revierte la unión de ICA512 a STAT5 (Mziaut, 2006). De forma resumida, la liberación de insulina de los gránulos secretores se comunica al núcleo, de manera que sirve como un mecanismo de retroalimentación positiva para iniciar la traducción de la insulina, con la finalidad de mantener una cantidad adecuada almacenada.

Además, la estabilidad del mRNA de la insulina (que depende del estado de nutrientes) es un factor importante que influye en la síntesis proteica de la insulina (Giddings, 1982). En este ámbito, resultados de estudios *in vitro* mostraron que la estabilidad del mRNA de la insulina disminuye con concentraciones de glucosa más bajas y aumenta en condiciones de glucosa alta (Welsh, 1985); de manera similar, en ausencia de glucosa, los niveles de mRNA de insulina en las células β -pancreáticas disminuyen drásticamente y esto se revierte con la elevación de los niveles intracelulares de cAMP (Knoch, 2006). Asimismo, las proteínas de unión al tracto de polipirimidina (PTBP) regulan la traducción del mRNA, ya que están involucradas en la represión de exones (mientras que el mRNA se empalma en los núcleos), así como en la estabilización y el reclutamiento de ribosomas en el citosol (Wollerton, 2004). Estas proteínas también regulan positivamente la traducción, al extender la viabilidad del mRNA y estimular el inicio de la traducción; como ejemplos, se tiene que PTBP1 citosólico: i) se une a una secuencia rica en CU en el 3' UTR de la proinsulina, de manera que estabiliza el mRNA de la proinsulina (Spellman, 2006), ii) regula al alza la traducción de varias proteínas granulares de insulina y iii) cuando se une al mRNA de ICA512 disminuye la desintegración de 3' UTR (Fu, 2013).

Ahora bien, el gen de la insulina de mamíferos codifica una proteína precursora de cadena única, la preproinsulina, que madura en insulina activa a través de una serie de reacciones proteolíticas; en este ámbito, a medida que se traduce el mRNA de la preproinsulina, el péptido señal N-terminal es reconocido por partículas de reconocimiento de señales que dirigen el ribosoma al retículo endoplasmático (ER) y facilitan la translocación de la preproinsulina a través de la membrana del ER, donde se elimina el péptido señal (Greenman, 2005). Después, las moléculas de proinsulina resultantes se pliegan con la ayuda de chaperonas, incluida la proteína 94 regulada por glucosa GRP94 (Ghiasi, 2019), y forman hexámeros estables a través de interacciones con iones de zinc (Huang X. F., 1995). Posteriormente, la proinsulina se transporta a la cara cis del aparato de Golgi (a través del compartimento de la interfaz ER-Golgi) y, tras las modificaciones de las enzimas residentes en Golgi, las moléculas de proinsulina alcanzan la red trans-Golgi (TGN), donde se empaquetan en gránulos junto a diversas moléculas, entre las cuales se encuentran las enzimas PC1/3 y PC2, que cortan el péptido C para formar la insulina (Omar-Hmeadi, 2021).

Por otra parte, la liberación de insulina puede ser representada como un proceso de 8 pasos: i) la entrada de glucosa en las células β -pancreáticas se facilita a través de GLUT2, un transportador de glucosa localizado en la membrana plasmática que tiene una afinidad relativamente baja (K_m 30 mM) por la glucosa, ii) después de la captación facilitada por GLUT2, la glucosa es fosforilada por la glucocinasa para generar glucosa-6-fosfato, que posteriormente se metaboliza mediante la fosforilación oxidativa mitocondrial para producir un aumento en la proporción intracelular de ATP: ADP, iii) los niveles elevados de ATP en las células β -pancreáticas inducen el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP; lo anterior da como resultado: iv) la despolarización celular, iv) entrada de iones de Ca^{+2} a través de los canales de calcio dependientes del voltaje y vi) se produce un aumento neto en la concentración de calcio intracelular. Finalmente, el aumento de calcio intracelular señala: vii) la formación del complejo SNARE, para facilitar la viii) liberación de insulina de los gránulos (Jewell, 2010).

Conviene distinguir que, todo el proceso secretor es bifásico y la primera fase alcanza su punto máximo alrededor de 5 min después del estímulo de glucosa; la mayor cantidad de insulina es liberada durante esta primera fase, mientras que, en la segunda fase (algo más lenta) se secreta la insulina restante (Porte, 1969). A propósito, las moléculas que median la fusión de los gránulos (que contienen insulina) son la proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25), la syntaxina-1 y la sinaptobrevina 2 (o proteína de membrana asociada a vesículas VAMP2), mismas que pertenecen a la superfamilia de las proteínas SNAP y, junto con las proteínas SM (Sec1/Munc18-like) forman el complejo SNARE (Thurmond, 2000). De manera interesante, numerosas isoformas de SNARE, incluidas la syntaxina-3 y -4, SNAP-23, así como la sinaptobrevina 3 (VAMP3), han demostrado estar involucradas en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Foster, 1998; Leung, 2007; Ravichandran, 1996; Regazzi, 1995; Zhu, 2013), mientras que VAMP8, una proteína SNARE no esencial para la secreción de insulina estimulada por glucosa, tiene un papel en la regulación de la secreción de insulina potenciada por el péptido 1 similar al glucagón (Zhu D. Z., 2012). Además, se demostró que las sinaptotagminas (que se expresan en gran medida en neuronas y células endocrinas) participan en los procesos de exocitosis dependientes de calcio; entre la familia de las sinaptotagminas, Syt-3, -5, -7, -8 y -9 están implicadas en la exocitosis de insulina (Gustavsson, 2009; Gut, 2001; Iezzi, 2004; Mizuta, 1997).

Como se ha visto, la mayoría del conocimiento generado hasta ahora (sobre la regulación y secreción de insulina) proviene de estudios en ratón, esto se debe principalmente a la limitada disponibilidad de muestras humanas y la escasez de tecnologías para investigar exhaustivamente la biología de las células β -pancreáticas humanas (Chen C. C., 2017). No obstante, en los últimos años se han logrado grandes avances en la adquisición organizada de tejidos humanos y el desarrollo de nuevas tecnologías, al punto de que hoy en día existen 3 líneas celulares híbridas denominadas “1.1B4, 1.1E7 y 1.4E7”, formadas por electrofusión de un cultivo primario de células β -pancreáticas humanas con la línea celular

PANC-1 (carcinoma ductal pancreático humano), mismas que son capaces de producir y secretar insulina tras un estímulo de glucosa (McCluskey, 2011).

REST

En 1995 un par de equipos de investigación descubrieron que la expresión de un conjunto de genes neuronales estaba restringida en tejidos no-neuronales, como consecuencia del acoplamiento de represores de transcripción (con estructura de dedos de zinc) con un fragmento de DNA de 21 pb; este represor (que actúa en trans) fue denominado factor de transcripción silenciador del elemento represor 1 “REST”, ya que se une al elemento-1 represor “RE-1” (que actúa en cis) ubicado en el gen *Scn2a2* de ratas (Chong, 1995); no obstante, en el contexto del gen *Stmn2* de la misma especie, REST fue denominado factor silenciador restrictivo neuronal “NRSF” y su sitio objetivo fue denominado elemento silenciador restrictivo neuronal “NRSE” (Schoenherr, 1995).

En los años siguientes, se descubrió que REST estaba implicado en la regulación transcripcional de más de 2000 genes específicos de neuronas que codifican proteínas involucradas en la plasticidad sináptica, receptores de neurotransmisores, proteínas de canales iónicos y moléculas de adhesión que participan en la guía de axones durante las etapas de desarrollo (Kuwabara, 2004). Asimismo, se descubrió que REST era fundamental para la neurogénesis y la formación del fenotipo neuronal, ya que su expresión se limita a progenitores neuronales indiferenciados y células no neuronales (Johnson, 2008).

Por añadidura, REST es un regulador transcripcional maestro de varios genes específicos de neuronas que codifican proteínas cruciales para la plasticidad sináptica y la remodelación estructural durante el desarrollo (Hwang, 2018). Adicionalmente, REST también participa en la plasticidad de la cromatina a través de la modificación epigenética (Zheng, 2009) y, más recientemente, este factor transcripcional ha sido sugerido como un neuroprotector que reprime genes

involucrados en la apoptosis (Guida, 2017) y activa proteínas involucradas en la supervivencia celular (Pajarillo, 2020).

Ahora bien, la proteína REST (de 121 kDa) contiene tres dominios funcionales, un dominio de unión al DNA (que contiene ocho dedos de zinc) que permite la unión de la proteína al motivo consenso RE-1 (5'-TTCAGCACACGGACAGCGCC-3') (Ooi L. &, 2007) y dos dominios represores en los extremos N y C terminales (Mampay, 2019).

En este ámbito, como se representa en la fig. 3, el extremo N recluta al correpresor Sin3a, que luego sirve como sitio de unión para las histonas deacetilasas 1 y 2 (HDAC1/2) (Huang Y. M., 1999); por su parte, el extremo C es responsable de unirse con un segundo correpresor CoREST, que a su vez puede reclutar una variedad de proteínas remodeladoras de cromatina, como HDAC1/2, histona metiltransferasa (G9A), demetilasa 1 específica de lisina (LSD1), proteína de unión a metil-CpG (MeCP2), proteína de unión carboxi-terminal 1 (CTBP1) y/o diversas proteínas (como Brg1, Braf35, Baf170, Baf57) remodeladoras de cromatina (Ooi L. B., 2006).

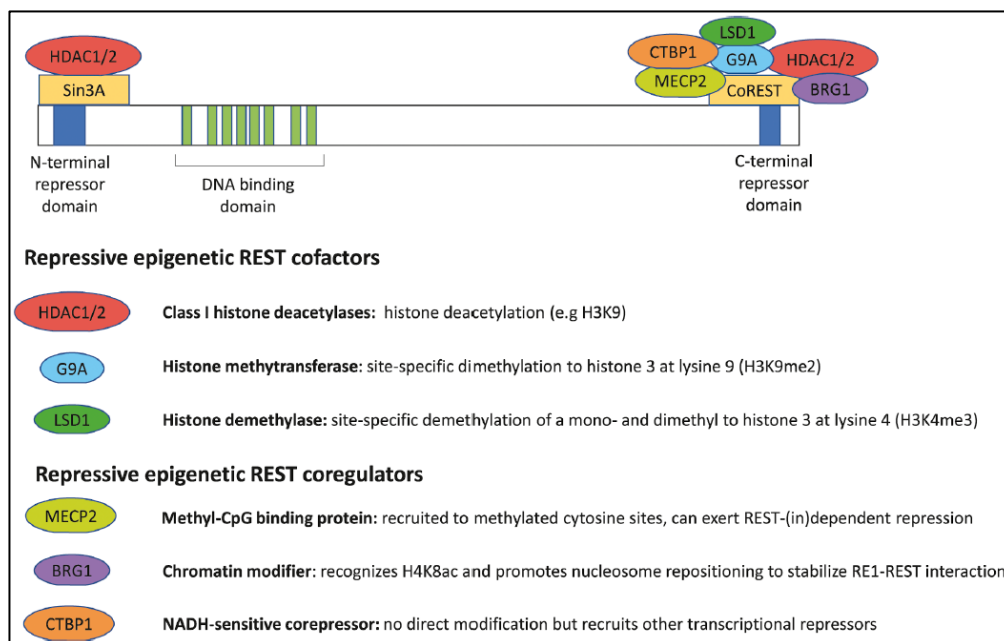


Figura 3. Remodelamiento epigenético mediado por REST. Tomada de (Mampay, 2019)

Hasta aquí, es conveniente mencionar que: i) de manera interesante, los cofactores de REST pueden mantener su posición en el DNA de sus genes diana, incluso después de la disociación de la proteína (Ballas, 2005), ii) las modificaciones de la cromatina mediadas por REST dependen en gran medida del reclutamiento de sus cofactores epigenéticos, es decir, REST por sí solo no puede ejercer la represión génica (Yu, 2011) y iii) se han revelado muchos otros motivos de unión a REST, además de la secuencia RE-1, que aumentaron notablemente el acervo genético dependiente de REST (Sato, 2013).

Por otra parte, REST no solo silencia, sino que también recluta otras proteínas y, en conjunto, activan los genes diana de REST; por ejemplo, REST4 (la variante de splicing de REST) que carece del dominio represor C-terminal, puede activar genes diana REST, al coordinarse con el receptor de glucocorticoides (un factor de transcripción dependiente de ligando) para reclutar a Brahma (Brm), una proteína remodeladora de la cromatina que también activa la transcripción de genes (Abramovitz, 2008). Además, estudios recientes indican que REST puede activar la transcripción de genes al reclutar las proteínas TET3 hidroxilasa y NSD3, ya que ambas son proteínas remodeladoras de la cromatina que normalmente activan la transcripción de genes (Perera, 2015).

REST en células β -pancreáticas

Las células β -pancreáticas y las neuronas se originan de diferentes capas germinales (del endodermo y ectodermo respectivamente) pero, a pesar de ello, ambas células comparten un gran número de similitudes funcionales, entre las que destacan: i) ser excitables eléctricamente y ii) responder a estímulos hormonales y glucosa, a través de despolarización y exocitosis en un proceso similar a la liberación de neurotransmisores (Martin D. & B., 2017). Asimismo, a nivel molecular existen muchos patrones de expresión génica presentes entre los dos tipos celulares (van Arensbergen, 2010), entre ellos, las proteínas compartidas incluyen: i) diversos factores de transcripción, como NEUROD/BETA2 (Naya, 1995), ii)

enzimas implicadas en la síntesis de neurotransmisores, receptores para factores de crecimiento y aminoácidos, neurofilamentos, hormonas (Atouf, 1997), así como proteínas involucradas en el proceso de exocitosis en vesículas sinápticas (Burgoyne, 2003).

Aunado a lo anterior, en el año de 1997 se descubrió que, además de compartir diversas proteínas transactivadoras, las células β -pancreáticas y las neuronas no expresan REST, de manera que se permite la expresión de diversos genes funcionales que contienen el motivo RE-1, incluyendo el receptor N-metil-D-aspartato (NDMA), la dopamina β -hidroxilasa, Scg10, sinapsina, y la subunidad β 2 del receptor nicotínico de acetilcolina (Atouf, 1997). No obstante, se identificaron más genes regulados por REST en células β -pancreáticas, conforme se asociaron motivos RE-1 a Mapk8ip1/Ib1 (Abderrahmani, 2001) y Gjd2/Cx36 (Martin D. T., 2003); el primero es un factor genético asociado con diabetes tipo 2 (Waeber, 2000), tiene estructura de proteína de andamio, cuya función es proteger a las células β -pancreáticas contra apoptosis, a través de la interacción con la vía de señalización JNK (Haefliger, 2003), el segundo es una proteína formadora de uniones gap que controla la secreción de la insulina a través de comunicación celular (Head, 2012).

Más aún, se realizaron estudios en ratones transgénicos que expresan REST de forma ectópica en células β -pancreáticas (RIP-REST), como resultado general se obtuvo que se indujo una alteración de la homeóstasis de glucosa, debido a una disminución en ambas fases de la secreción de insulina; lo anterior, a su vez, ocurrió como consecuencia de que: i) la cantidad de insulina en páncreas fue disminuida a la mitad, ii) las células β -pancreáticas fueron 30% menos abundantes y iii) diversos genes involucrados en la exocitosis de vesículas, como lo son Snap25, Syt4, Syt7, Syt9 y Cplx2 estaban bajo el control del motivo RE-1 y fueron reprimidos (Martin D. A., 2008). Además, en análisis posteriores, realizados en ratones que expresaban altos niveles de REST, se obtuvo que estos desarrollaron diabetes debido a una alta pérdida progresiva por apoptosis de masa celular β -pancreática, a causa de que los

genes Gjd2, IB1, Ptpn y Cdk5r2 (relacionados con la supervivencia de células β -pancreáticas) fueron reprimidos por REST (Martin D. A., 2012).

Ahora bien, considerando que REST se expresa en células progenitoras del páncreas, pero dicha expresión disminuye conforme estas se diferencian en células β -pancreáticas, (Martin D. K.-B., 2015) y colaboradores produjeron ratones transgénicos con un casete regulador “Tet-off” que regula la expresión de REST de forma negativa en presencia de tratamiento con doxiciclina, con la finalidad de analizar el comportamiento de REST durante el desarrollo. Por consiguiente, se obtuvo que la expresión forzada de REST (en ausencia de antibiótico), en las células progenitoras del páncreas durante el desarrollo, causó una disminución en el número de progenitores endócrinos y de células α y β -pancreáticas, además de que estos ratones desarrollaron diabetes en la etapa adulta; asimismo, se obtuvo que la inactivación inducida de REST (en presencia de antibiótico) en los progenitores del páncreas reprimió la expresión de los genes NeuroD, Neurog3, Onecut1 y Hnf4 α , involucrados en la diferenciación endócrina (Johnson D. S., 2007), de manera que las células permanecieron en un estado de diferenciación parcial, por lo cual los autores sugirieron que existen múltiples vías en el proceso de diferenciación, así como otros represores o activadores que actúan de forma paralela a REST, entre los cuales, se identificaron precursores de NEUROG3 y de diferenciación celular endócrina (Martin D. K.-B., 2015).

Acorde con lo anterior, se sugirió que NEUROG3 podría ser un objetivo directo de REST y, a su vez, ser reprimido de forma independiente por el factor de transcripción HES1 (Jensen, 2000); la fig. 4 representa un mecanismo sugerido de represión múltiple, y se realizó tomando en cuenta los estudios realizados por (McGann, 2014) en los que se identificó que las proteínas represoras del grupo Polycomb (PCG) y REST actúan en paralelo en la diferenciación neuronal y de células β -pancreáticas (van Arensbergen, 2010).

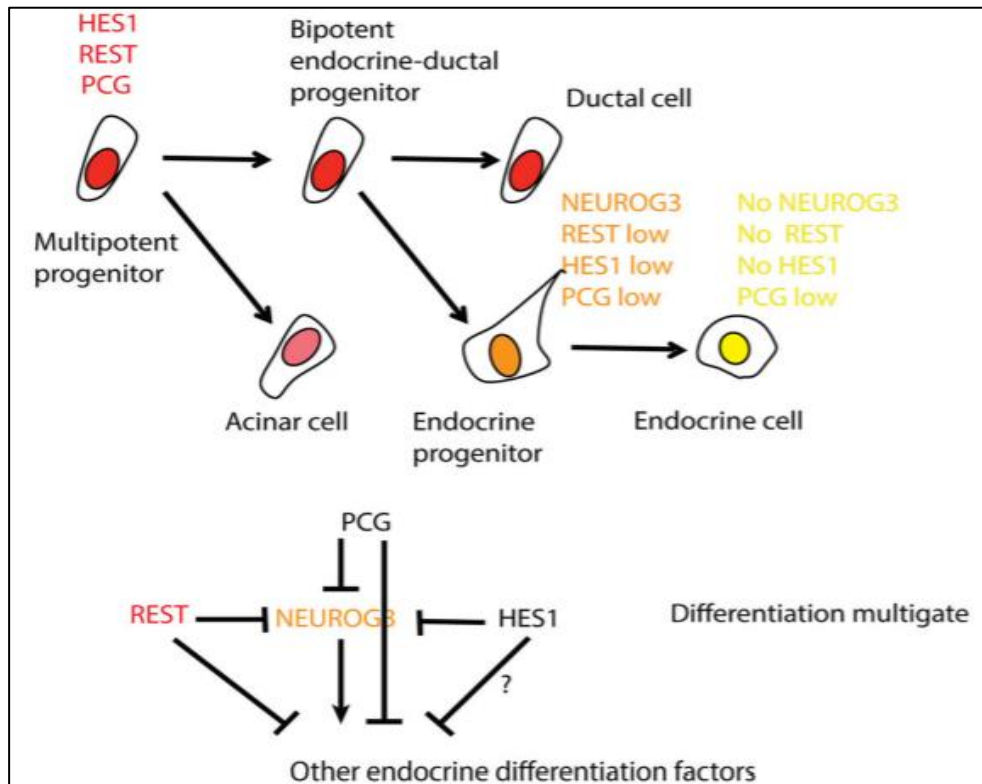


Figura 4. Niveles de REST e interacción con NEUROG3. Tomada de (Martin D. G., 2017)

Espectrometría de Masas (MS)

La espectrometría de masas (MS) es una poderosa técnica analítica descrita por físicos a finales de años 1880, pero no fue sino hasta el año de 1898 que el físico alemán Wilhelm Wien demostró que, al superponer campos eléctricos y magnéticos, estos son capaces de desviar iones positivos (Hoffmann, 2007). Inspirado en estos descubrimientos, Sir Joseph John Thomson, un profesor de física experimental de la Universidad de Cambridge, inventó el primer espectrómetro de masas en 1912 y al año siguiente demostró el valor de su novedoso descubrimiento dentro del campo de la química analítica (Cho W. , 2007) .

La MS se basa en la formación de iones en fase gas, con carga positiva o negativa que pueden ser aislados de forma eléctrica o magnética con base en su relación masa-carga (m/z); en un espectro de MS, el eje coordinado "x" representa

los valores de m/z , mientras que el eje “y” indica la corriente total de iones (medida como unidades arbitrarias), por lo que estos análisis son capaces de proveer información acerca de la estructura, pureza y composición de moléculas orgánicas e inorgánicas (Banoub, 2005); cabe señalar que el uso de esta técnica fue determinante para el estudio de isótopos estables (Henderson, 2005).

La cromatografía de gases, herramienta analítica inventada en 1952 capaz de separar compuestos biológicos térmicamente estables como ácidos grasos, esteroides y carbohidratos (James, 1952), se unió con la espectrometría de masas (GC-MS) por Holmes y Morrel en el año de 1957, expandiendo así el interés de aplicación de esta poderosa técnica en el ámbito de la bioquímica; no obstante, el uso de estas técnicas acopladas solamente permitía la separación de mezclas volátiles con peso molecular menor a 1 kDa, además la técnica de ionización convencional utilizada en aquellos años, denominada impacto electrónico (EI), era agresiva y provocaba la destrucción de biomoléculas complejas, por lo que no fue sino hasta la implementación de técnicas suaves de ionización y de separación de compuestos, tales como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-MS) y electroforesis capilar (CE-MS), que la espectrometría de masas fue utilizada para estudios proteómicos (Holmes, 1957). Independientemente del método por el cual se introduce una muestra en un espectrómetro de masas, como inyección directa (para materiales purificados), GC o HPLC, este consta primordialmente de una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector (Glish, 2003).

-Fuentes de ionización: Diversas técnicas de ionización son frecuentemente utilizadas en espectrómetros de masas, la más utilizada es EI, que utiliza haces de electrones energéticos durante el proceso de ionización y opera estrictamente al vacío mientras los analitos ya están en la fase gaseosa; en términos amplios, un haz de electrones (cargas negativas) se forma a partir de un filamento metálico calentado (tungsteno), estos electrones son acelerados eléctricamente y dirigidos para colisionar con la muestra en fase de gas, causando expulsión de electrones de los analitos y la subsecuente formación de cationes radicales cargados

positivamente (Kitson, 1996). Debido a las limitaciones de la ionización EI, mencionadas anteriormente, los métodos de ionización química (CI) y desorción de plasma (PD) fueron introducidos en 1966 y 1974 respectivamente, ambas técnicas forman predominantemente iones protonados o desprotonados, que son más estables que los iones radicales formados por la técnica EI (Munson, 1966).

La CI depende de la interacción entre electrones energéticos y moléculas con carga neutra, sus límites en términos de rango de masa son similares a los de EI (menor a 1 kDa), además requiere que las muestras posean características específicas de estabilidad térmica y volatilidad, por lo cual los métodos EI y CI no fueron capaces de ionizar los compuestos biológicos polares y térmicamente inestables (Torgerson, 1974). Por otro lado, la PD fue una de las primeras técnicas de ionización suave (con uso mínimo de energía interna transmitida a los analitos durante el proceso) capaz de analizar biomoléculas con un peso molecular mayor a 100 kDa; en esta técnica, la muestra se ioniza en un plasma (gas parcialmente ionizado como el ^{18}Ar que contiene electrones libres) que se genera al bombardear la muestra (colocada en una lámina delgada) con un fragmento de fisión energético de isótopo californio Cf-252 (Hilf, 1993).

Posteriormente se desarrollaron diversos métodos de ionización que reemplazaron dichas técnicas, entre las cuales destacan el bombardeo rápido de átomos (FAB), espectrometría de masas de iones secundarios líquidos (LSIMS), desorción-ionización láser asistida por matriz (MALDI) e ionización por aspersion eléctrica (ESI), de todas ellas las dos últimas técnicas destacan en particular por promover el uso de los espectrómetros de masas en el ámbito biológico, y permitir a los investigadores estudiar de una forma más precisa las biomoléculas (Yamashita, 1984). En ESI la muestra debe ser soluble en un disolvente preferiblemente polar que se pueda infundir en la fuente de ionización a través de una aguja delgada a presión atmosférica, ya que, a medida que la muestra se rocía constantemente, un potencial eléctrico (2-4kV) se aplica a la aguja para formar pequeñas gotas altamente cargadas que son conducidas eléctricamente y se

vaporizan con la ayuda de un gas inerte (usualmente nitrógeno), así su tamaño se reduce continuamente conforme estas gotas se rompen y se desplazan dentro de la fuente, esto ocurre debido a que las fuerzas repulsivas (denominadas fuerzas coulombicas) entre los iones, situadas en la superficie de las gotas se vuelven muy altas, promoviendo el encogimiento hasta que finalmente exceden la tensión superficial del solvente, resultando en iones que se desolvatan en fase gaseosa (Pramanik, 2002).

Analizadores de masas: Es la parte del instrumento en donde los iones son separados con base en su relación m/z , los más utilizados comúnmente son: i) tiempo de vuelo (ToF), ii) cuadrupolo (Q) y iii) cuadrupolo con trampa de ionización (QIT), mismos que se diferencian por tener variedad en tamaño, precio, resolución, rango de masa y su capacidad para realizar experimentos de espectrometría de masas múltiples (MS^n) o en tandem (MS/MS) (El-Aneed A. C., 2009).

Un espectrómetro con ToF separa los iones con base en su velocidad, ya que teóricamente todos los iones son formados al mismo tiempo, se sitúan en la fuente de ionización para después ser acelerados a través de un potencial fijo de (1-20kV) en el tubo de ToF, así todos los iones con la misma carga obtienen la misma energía cinética después de la aceleración, de manera que los iones con menor relación m/z alcanzan mayores velocidades que los iones con una relación mayor de m/z (la velocidad de los iones está inversamente relacionada con la raíz cuadrada de m/z); posterior a su aceleración, los iones viajan a través de una distancia fija que normalmente es de 0.5-2 m antes de llegar al detector, por lo tanto, el tiempo que le toma al ion alcanzar el detector ayuda a determinar su relación m/z (Weickhardt, 1996).

Por otra parte, la separación de masas en un analizador Q es resultado del movimiento de un ion dentro de un campo eléctrico dinámico (mejor conocido como radio-frecuencia), esta trayectoria se define por la relación m/z de cada ion; el análisis de masas está en función del voltaje en el campo eléctrico dinámico y los

voltajes de corriente directa aplicados en las cuatro barras cilíndricas; la trayectoria de los iones, descrita por ecuaciones diferenciales de segundo orden ayuda a discriminar los iones que son capaces de llegar al detector y los que no, que pueden ser detectados cuando se incrementa cualquiera de los voltajes previamente descritos (Glish, 2003). El analizador tipo QIT es muy similar al Q, la principal diferencia radica en que, mientras el analizador Q emite un campo eléctrico bidimensional sobre los ejes “x, y” haciendo que los iones se muevan de forma perpendicular a este sobre el eje “z”, el QIT emite un campo eléctrico tridimensional sobre los ejes “x, y, z” , por lo que los iones con una trayectoria oscilante estable quedan atrapados en este campo eléctrico, todo esto tiene como finalidad el poder hacer pasar de forma selectiva los iones de interés haciendo cambios en el voltaje para modificar la trayectoria y permitir el paso de los iones al detector (Goeringer, 1992).

Detectores de masas: Los iones que salen del analizador tienen una intensidad baja, por ello, el detector además de recibir la señal de corriente generada por los iones incidentes tiene la función de amplificar esta señal (SR, 2010). En este sentido, un multiplicador de electrones es un tipo de detector de masas, se basa en el fenómeno denominado “emisión de electrones secundarios”, este ocurre cuando una partícula cargada (ion) choca sobre una superficie determinada, liberando así electrones secundarios provenientes de la capa superficial, la cantidad de estos electrones liberados depende de la partícula primaria incidente, su energía y las características de la superficie en que incide (Ohring, 1995). Por su parte, en una copa de Faraday los iones incidentes golpean una placa que emite electrones e induce una corriente que se amplifica y registra, por esto se le conoce más como un colector de iones que como un detector, ya que básicamente los iones entran y transfieren su carga a la copa (Maithal, 2002). Otro tipo de detector es una placa fotográfica en la cual se integran las señales de iones durante un periodo de tiempo, así detecta iones de todas las masas simultáneamente que se procesan mediante técnicas fotográficas convencionales y se leen con la ayuda de un densímetro (Potts, 1987).

Proteómica

El término proteómica se refiere al análisis de todas las proteínas es un sistema vivo incluyendo las que sufren modificaciones postraduccionales, así como su asociación covalente y no-covalente con otras biomoléculas, su distribución espacial y temporal entre las células y cómo estos aspectos cambian debido a las condiciones intracelulares y extracelulares (Guerrera, 2005), para lograr esto, la proteómica reúne diversas técnicas como el sistema doble híbrido y los microarreglos de proteínas, que permiten analizar diferentes aspectos de la estructura, función, actividad e interacción de las proteínas (Cravatt, 2007).

En este ámbito, la degradación de Edman fue uno de los primeros experimentos realizados para poder secuenciar e identificar una proteína, este se basa en la identificación por espectroscopía de absorbanza UV de aminoácidos que han sido químicamente escindidos gradualmente del extremo N terminal al C, pero a pesar de su éxito, esta reacción química requiere de grandes cantidades de proteína purificada, ocupa horas o incluso días para llevarse a cabo, además de que el método falla completamente si la proteína está acetilada en el extremo N terminal o contiene alguna molécula que impida el corte, porque para que la reacción se lleve a cabo es imprescindible que exista un extremo N libre (Domon, 2006).

Por lo anterior, durante los años 90 la espectrometría de masas desplazó la degradación de Edman, debido a que es más sensible y es capaz de fragmentar péptidos en segundos en lugar de horas o días (Wilm, 1996), además no es necesario que las proteínas o péptidos se purifiquen, no tiene restricción de identificación derivada de modificaciones en el extremo N terminal, es más fácil de automatizar, se puede acoplar con técnicas de separación como HPLC para el análisis de mezclas complejas y, a pesar de que existen métodos más sensibles como son los micro-arreglos de proteínas, estos son más caros, sufren problemas técnicos y tienen una mala reproducibilidad (Steen, 2004); uno de los principales objetivos de la proteómica basada en espectrometría de masas es identificar y

cuantificar proteínas, así como sus modificaciones postraduccionales, contenidas en mezclas complejas de proteínas purificadas o enriquecidas (Matthiesen, 2013).

Hasta aquí, cabe mencionar que usualmente un experimento proteómico de MS consta de las siguientes 6 etapas (fig.5): i) la muestra proteica (extraída de una fuente biológica) se purifica en un gel SDS-PAGE, ii) la muestra purificada se digiere con una enzima proteasa (usualmente tripsina), iii) la mezcla de péptidos generada se separa por un método cromatográfico; una vez dentro del espectrómetro de masas, los péptidos se iv) ionizan, v) pasan a un analizador de masas y al detector; finalmente, vi) los datos de secuenciación de péptidos que se obtienen de los espectros de masas se buscan en bases de datos de proteínas, utilizando programas bioinformáticos; de este modo es posible identificar las proteínas contenidas en una mezcla (Cravatt, 2007).

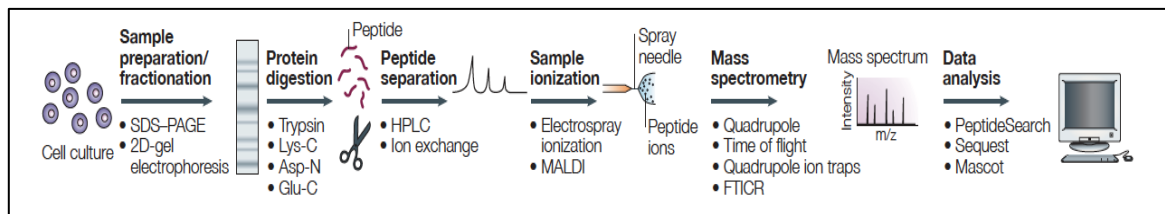


Figura 5. Estudio proteómico por espectrometría de masas. Tomada de (Steen, 2004)

El enfoque descrito anteriormente se conoce como “shotgun”, una variante del enfoque “bottom-up” (de abajo hacia arriba), su diferencia radica en que, en el primero es imprescindible el uso de métodos cromatográficos en dos dimensiones acoplados a la MS, mismos que son requeridos para poder separar una mezcla compleja de péptidos provenientes de muchas proteínas diferentes, mientras que en el segundo se puede prescindir de la separación cromatográfica de los péptidos; como ya se mencionó en el apartado de espectrometría de masas, existen diversos tipos de analizadores de masas (propios de cada instrumento) que permiten realizar un estudio proteómico con enfoque “top-down”(de arriba hacia abajo), en donde el espectrómetro de masas no requiere que la proteína entre digerida o purificada, ya que este aísla por sí mismo una proteína completa a la vez para fragmentarla

(haciendo uso de energía de colisión) y registra los espectros de masas de cada uno de los fragmentos para poder conocer la identidad de la proteína (Armirotti, 2010), la fig.6 representa cada uno de estos enfoques.

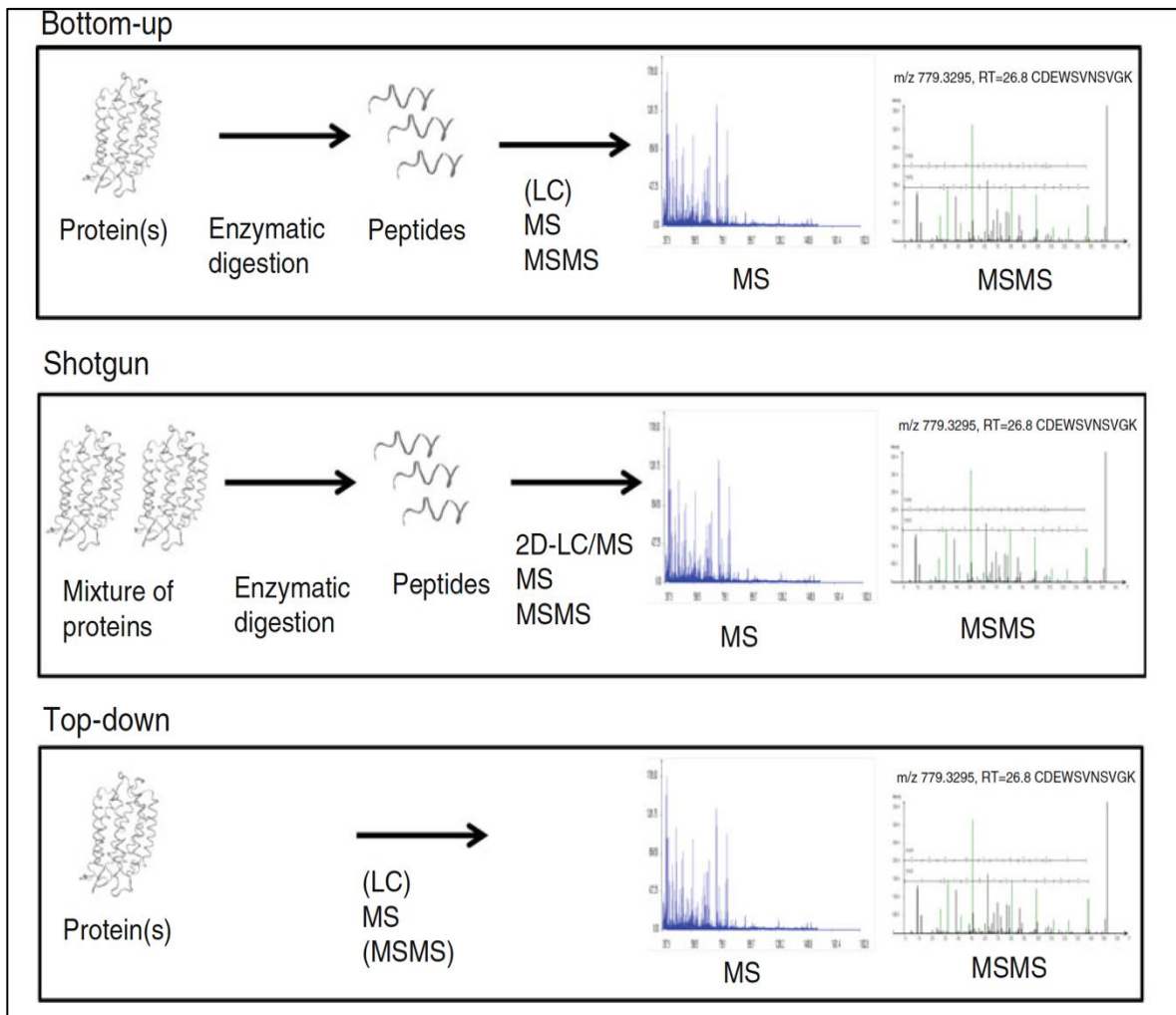


Figura 6. Tipos de enfoques en un estudio proteómico por MS. Tomada de (Matthiesen, 2013)

Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS)

El término tándem, cuyo significado es “conjunto de dos elementos que se complementan” se aplica a la espectrometría de masas para hacer referencia a un equipo que es capaz de trabajar con dos o más analizadores de masas, para identificar y cuantificar múltiples analitos dentro de una familia de compuestos, ya sea de forma selectiva (convencional) o múltiple (fig.7), esta última surgió por la

necesidad de aumentar el rendimiento de identificación de péptidos para experimentos de proteómica, cambiando así la fragmentación de un péptido a la vez por un enfoque de disociación paralelo, en el que la información sobre péptidos individuales puede recuperarse, haciendo coincidir independientemente múltiples secuencias con una sola masa en tándem (Chapman, 2013).

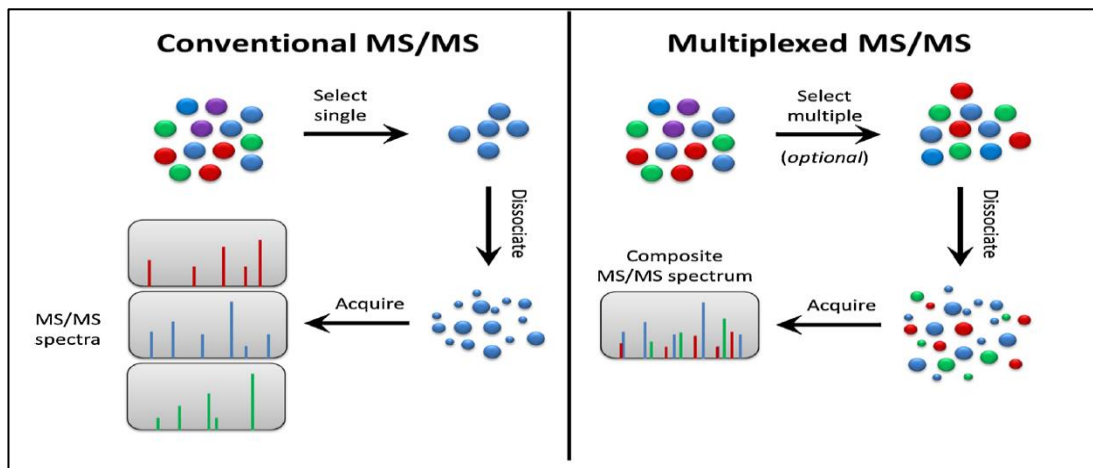


Figura 7. Tipos de MS-MS. Tomada de (Chapman, 2013)

Un equipo de MS/MS (en tándem) está constituido por los mismos elementos que conforman un espectrómetro de masas convencional, con la particularidad de que este tiene una celda de colisión ubicada entre dos analizadores de masas (Matern, 2001). Una vez que la muestra se introduce, sufre una ionización suave (por medio de la fuente de ionización) para adquirir carga y pasar al primer analizador de masas, cuya función primordial es ordenar los iones precursores conforme a su m/z , independientemente de que estos se separen selectivamente (para análisis en modo convencional) o no (para análisis en modo múltiple), a su vez, estos pasan a la celda de colisión donde (como producto de su colisión con un gas inerte) se generan fragmentos que pasan al segundo analizador de masas, para correlacionarlos con las moléculas intactas producidas en el primer analizador de masas (Chace, 2005). Con esta técnica se puede obtener información estructural acerca de un compuesto a través de la formación de fragmentos específicos, además es útil para identificar compuestos en mezclas complejas de acuerdo con su patrón de fragmentación (Spitzer, 2008).

Proteómica cuantitativa dirigida

Los datos provenientes del modo convencional se pueden obtener a través de monitoreo de reacción múltiple (MRM), monitoreo de reacción paralela (PRM) o adquisición dependiente de datos (DDA), donde la información de la masa de iones precursores (péptidos intactos) en un escaneo total de espectro de masas se utiliza para saber qué subconjunto de péptidos (necesarios para la identificación) serán objetivo de la adquisición de espectros de fragmentación (Stahl, 1996).

En MRM y PRM el usuario define que iones precursores serán fragmentados, mientras que en DDA el instrumento de MS lo hace con base en su abundancia, además DDA y PRM detectan todos los fragmentos, en lugar de solamente detectar un fragmento del ion precursor, como lo hace MRM (Hu, 2016).

Los datos provenientes del modo multiplexado son obtenidos a través de adquisición independiente de datos (DIA), donde los escaneos se recopilan de manera sistemática e independiente de la información precursora, cada equipo tiene una variación particular de este modo de adquisición de datos de fragmentación, entre estos destaca el uso de ventanas de aislamiento (amplias o estrechas) en las que el equipo determina un rango de m/z sobre los cuales se obtendrán los datos para después solapar la información en un espectro completo (Panchaud, 2009); la fig. 8 representa de manera ilustrativa los métodos de adquisición previamente descritos.

MS^E es otra variable DIA en el que, durante la adquisición de datos, la energía de la celda de colisión sufre cambios dinámicos de baja y alta energía, de manera que se producen dos espectros de masas alternos en tiempo real, uno compuesto de todos los iones precursores y otro compuesto de todos los iones fragmento, mismos que posteriormente se acoplan en uno mismo, basándose en el tiempo de retención, intensidad, estado de carga y otros parámetros fisicoquímicos (Law, 2013).

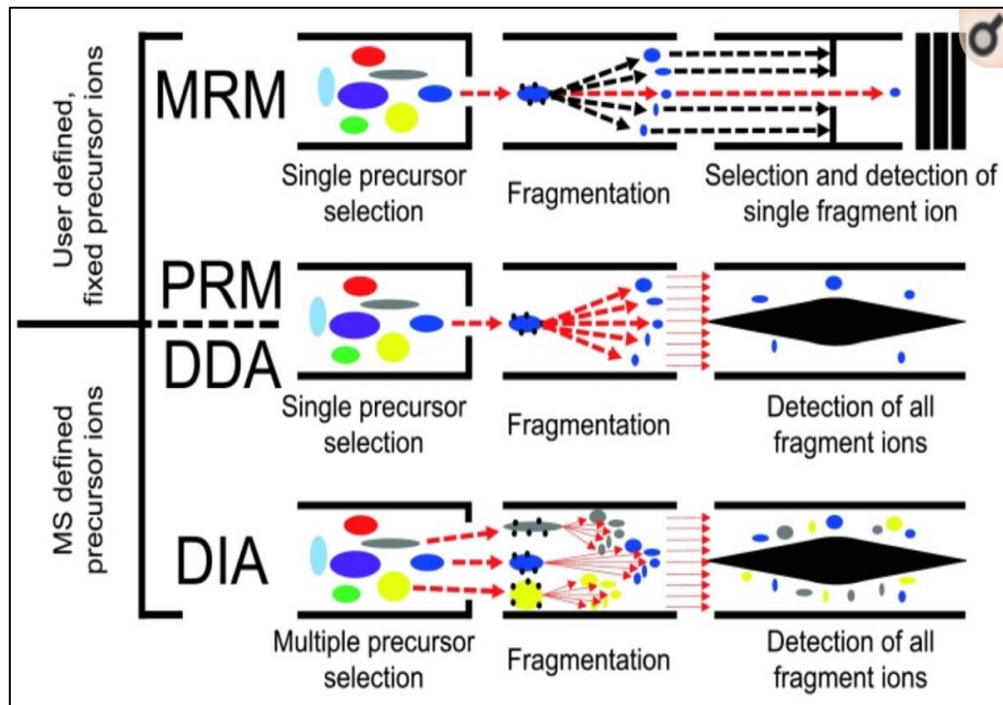


Figura 8. Métodos de proteómica cuantitativa dirigida. Tomada de (Hu, 2016)

Métodos cuantitativos a nivel proteómico

El objetivo principal de la proteómica en un principio era el análisis cualitativo, es decir, generar una lista de proteínas a partir de un organismo dado, pero conforme diversos estudios tuvieron lugar, fue sencillo percatarse que esta lista en sí misma era insuficiente, ya que los procesos biológicos están regulados en gran medida por las proteínas y su abundancia en un estado determinado, como resultado a esta problemática se desarrollaron nuevos métodos para realizar mediciones cuantitativas en la expresión de las proteínas, así como en sus modificaciones postraduccionales, mismos que se han vuelto una parte integral de cualquier estudio proteómico (Zhang Y. F., 2013).

Tradicionalmente, el uso de la proteómica cuantitativa estaba ligado con separaciones por electroforesis bidimensional con detección por UV, técnicas de inmunquímica con detección radiactiva, luminiscente o fluorescente y Western-Blot, no obstante, el primero de estos está limitado en cuanto a resolución (número

y tipo de proteínas por resolver), detecta solamente diferencias extremas y estima la cantidad de manera incorrecta, además de que es una técnica difícil de automatizar y que requiere mucho tiempo, por otro lado, las demás técnicas están condicionadas a la disponibilidad de anticuerpos de alta calidad (Calderón, 2018). En este sentido, la MS no era una técnica inherentemente cuantitativa, por lo que se desarrollaron múltiples estrategias para ayudar a la MS a cuantificar las proteínas, mismas que son seleccionadas con base al alcance del experimento, es decir, considerando si es que se realizará una cuantificación absoluta o relativa, así como si se llevará a cabo o no alguna técnica de marcaje (Ankney, 2018) .

-Cuantificación Relativa: Este tipo de estrategia provee información comparativa de abundancia en términos de proporcionalidad entre dos o más muestras, donde una de estas sirve como control biológico (Ong S. E., 2005).

-Cuantificación Absoluta: El objetivo de este tipo de cuantificación es proveer información en términos de cantidad total de concentración de proteínas individuales de interés en un proteoma, es decir, este experimento se realiza para una muestra (Calderón, 2018).

Métodos cuantitativos de MS con marcaje

Ambos métodos de cuantificación descritos anteriormente se suelen apoyar del uso de estrategias de marcaje con isótopos estables que se unen de forma química, metabólica o enzimática a los péptidos o proteínas para aumentar la fidelidad de los datos obtenidos, estos se dividen en dos grupos con base en la forma en la que el isótopo es insertado (Ankney, 2018):

-Estrategias de marcaje poscosecha: En este tipo de marcaje, el isótopo se incorpora a nivel de péptidos o proteínas después de que las células han sido lisadas, tal como lo hacen las etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ), este método químico utiliza moléculas que contienen un grupo

reactivo de amina primaria, una región reportera de masa y un grupo balance que mantiene una masa constante de 145 Da en equipos diseñados para analizar 4 muestras o de 305 Da para un análisis de 8 muestras (Ross, 2004), su principio se basa en que el mismo péptido de todas las muestras marcadas se muestra como un solo pico durante el primer escaneo de un experimento en tándem, mismo en el que, posterior a la fragmentación de los iones precursores de péptidos aislados, se liberan los iones reporteros con un m/z de 114-117 para el equipo de 4 muestras y de un m/z de 113-119 y 121 para la versión de 8 muestras (Rauniyar, 2014) .

Otro método químico es la cuantificación absoluta a través de marcaje (AQUA) que emplea estándares internos que contienen péptidos sintéticos idénticos a los péptidos nativos de interés, excepto que están marcados con isótopos estables (Gerber, 2003), al agregar una concentración conocida de este a los lisados celulares durante la digestión y analizar por MRM se puede identificar y cuantificar con precisión el péptido de interés en función de la proporción entre el péptido marcado y el péptido no marcado (Kirkpatrick, 2005). El uso de ^{18}O como trazador isotópico es un ejemplo de un método enzimático, ya que este toma ventaja del mecanismo proteolítico de la tripsina para incorporar dos moléculas de agua con ^{18}O o ^{16}O al extremo C-terminal de los péptidos tripticos, permitiendo así la cuantificación relativa al introducir un cambio de masa de 4 Da entre las dos muestras en los espectros de masas (Reynolds, 2004).

-Estrategias de marcaje metabólico: El isótopo se inserta de forma endógena en células metabólicamente activas, un ejemplo de este es el etiquetado con isótopo ^{15}N , consiste en insertar este al agregarlo al medio de cultivo de levaduras, de esta forma se obtienen diversos patrones entre los espectros de masas, permitiendo así la cuantificación relativa (Oda, 1999). Otro ejemplo es el etiquetado de isótopos estables con aminoácidos en cultivo celular (SILAC), donde la células son cultivadas en un medio de cultivo suplementado con versiones pesadas y ligeras de algún aminoácido (fig. 9), en el que después de cierto número de divisiones celulares o pasajes, cada ocurrencia del aminoácido se reemplaza por la versión marcada con

el isótopo pesado etiquetado (Zhu H. P., 2002), las células conservadas en un medio sin marcaje se comportan de manera similar a las que crecen en el medio con marcaje, mismas que después de ser lisadas pueden ser analizadas por MS (Ong S. E., 2002).

Otro método, denominado codificación de neutrones (NeuCode) permite analizar más de dos muestras a la vez, de una forma práctica y sencilla, en su forma básica incorpora por medio de marcaje metabólico seis isotopólogos de lisina (sintetizados con ^{13}C , ^{15}N y ^2H) a proteínas, para producir una diferencia de masa deseada entre seis muestras diferentes (Merrill, 2014), pero cuando esta técnica se acopla a métodos químicos de marcaje, es posible analizar hasta treinta muestras diferentes en un mismo experimento de MS (Potts G. K., 2016).

Métodos cuantitativos de MS sin marcaje “Label-free”

El uso de métodos de marcaje que implican el uso de isótopos estables permite realizar una cuantificación precisa de la expresión de proteínas, pero se acompañan de ciertas limitaciones como lo son: incluir pasos adicionales al procesamiento de las muestras, costo de los reactivos de marcaje, marcaje ineficiente, dificultad en el análisis de péptidos de baja abundancia y en algunos casos, limitación en el número de muestras a procesar; los métodos libres de marcaje “label-free” se utilizan con frecuencia como una alternativa a los inconvenientes de los métodos de marcaje, de entre estos destacan los siguientes (Ankney, 2018):

-Intensidad de ion: Se basa en la intensidad de los iones precursores, determinada por el cromatograma de iones extraídos, los componentes de este último son el tiempo de retención en el eje coordinado “x” y la intensidad en el eje “y” en un valor determinado de m/z (Ankney, 2018). En términos generales, la cuantificación se calcula a partir del área bajo la curva (AUC) de la intensidad de cada péptido de una proteína, en un tiempo de retención específico, debido a que

esta se relaciona directamente con la concentración de péptidos en un rango de 10 fmol-100 pmol (Bondarenko, 2002). A pesar de la eficiencia, se utilizan métodos computacionales que consideran diversos factores para asegurar la reproducibilidad y precisión, tales como los péptidos coeluyentes, particularmente cuando las señales de los péptidos se extienden en un gran periodo de retención; señales múltiples para el mismo péptido, producto de la variación biológica o técnica en el tiempo de retención; velocidad y sensibilidad del espectrómetro de masas, así como el ruido de fondo debido a interferencia química (Listgarten, 2005).

-Cuentas espectrales: Un enfoque de este tipo de cuantificación es analizar de forma separada las muestras por MS y comparar sus espectros de masa (fig. 9) para determinar la abundancia de péptidos en una muestra respecto de la otra (Bantscheff, 2007), el tamaño de pico en un espectro de masas correspondiente a un péptido es proporcional al número de iones peptídicos detectados por el instrumento, dado que las eficiencias de ionización varían entre los péptidos, no es posible comparar directamente la señal de MS de diferentes péptidos para determinar su abundancia en una muestra, sin embargo es posible comparar los picos del mismo péptido con la misma eficiencia de ionización en diferentes muestras, en este principio se basa la cuantificación relativa (Bondarenko, 2002). Existen problemas comunes a esta técnica, como lo es su baja sensibilidad con péptidos menos abundantes de una proteína (Old, 2005), así como proteínas menores a 20 kDa, ya que al ser digeridas producen menos péptidos en comparación con proteínas de longitud mayor (Lu, 2007), ambas situaciones representan una cuantificación menos precisa (Zybailov, 2006); para minimizar la discrepancia del conteo de espectros, se utiliza el factor de abundancia espectral normalizado (NSAF) que mejora la detección de espectro al relacionar la longitud y conteo de cada proteína en una muestra (Gemperline, 2016).

Los métodos descritos anteriormente proveen información de abundancia relativa, pero algunas aplicaciones, incluyendo las mediciones de biomarcadores, requieren cuantificación absoluta (Ankney, 2018). El enfoque más común se realiza

con cuantificación absoluta basada en la intensidad (iBAQ), este suma los picos de todos los péptidos para una proteína en específico y los divide entre el número teórico de péptidos (Schwanhäusser, 2011). Otro enfoque es el método Top-3 o Hi-3, en el que la abundancia se calcula con base en los tres péptidos más intensos de una proteína comparado con los tres péptidos más intensos de una proteína estándar sin marcaje (Silva J. C., 2006).

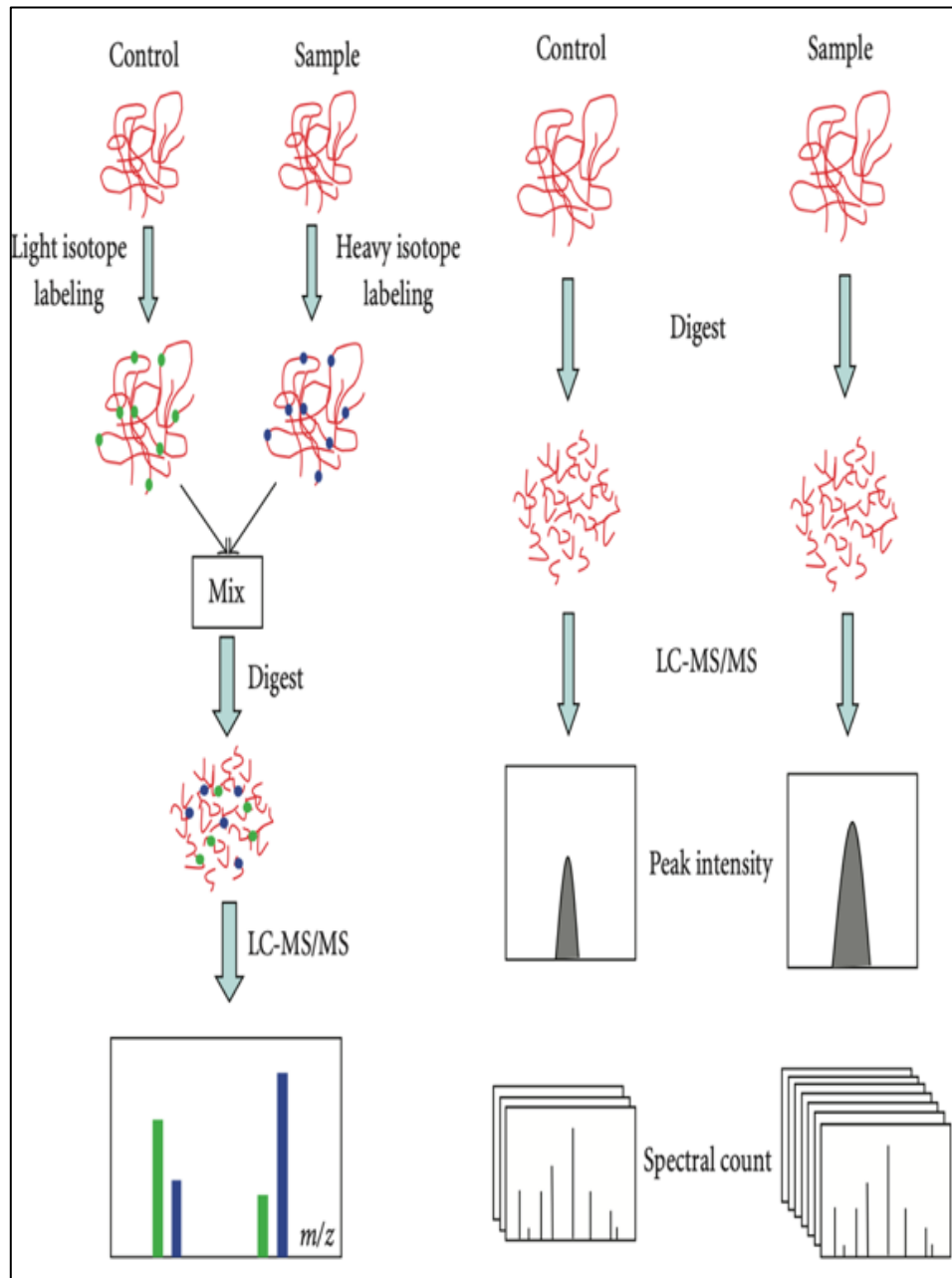


Figura 9. Ejemplo de un método cuantitativo con y sin marcaje. Tomada de (Zhu W. S., 2010)

Antecedentes

Previamente en nuestro grupo de trabajo se realizó la búsqueda y análisis de unión de REST a secuencias similares al elemento represor 1 (RE-1) en la región promotora del gen *pdx-1*. Mediante análisis bioinformático se identificaron 5 sitios con similitudes de ~62-85% del RE-1 consenso (tabla 1),

Tabla 1. Secuencias RE-1 like obtenidas en Genomatix MatInspector

Sitio	Secuencia	Similitud	Ubicación en <i>pdx-1</i>
RE-1 Consenso	5'-TTCAGCACCCACGGACAGCGCC-3'	-	-
RE-1 1	5'-GCTAGATCCACGGGGAAGTAC-3'	71.42%	-2535
RE-1 2	5'-GGAATACCCCGGCGATCCCC-3'	66.66%	-2312
RE-1 3	5'-ATTAGGTGCCCGGGCCCCACG-3'	61.90%	-1754
RE-1 4	5'-TTCTGCACCACTACCACCTCC-3'	85.71%	+3269
RE-1 5	3'-TTCAACATGACAGCCAGCTC-5'	80.95%	+4350

Además, ensayos de retardamiento (fig.10) y súper retardamiento (fig.11), utilizando anticuerpos monoclonales contra REST, mostraron la afinidad dirigida de REST hacia los elementos RE-1 like de *pdx-1*. Por consiguiente, dichos resultados fueron corroborados por ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, digestión y amplificación por PCR de las secuencias blanco (fig.12).

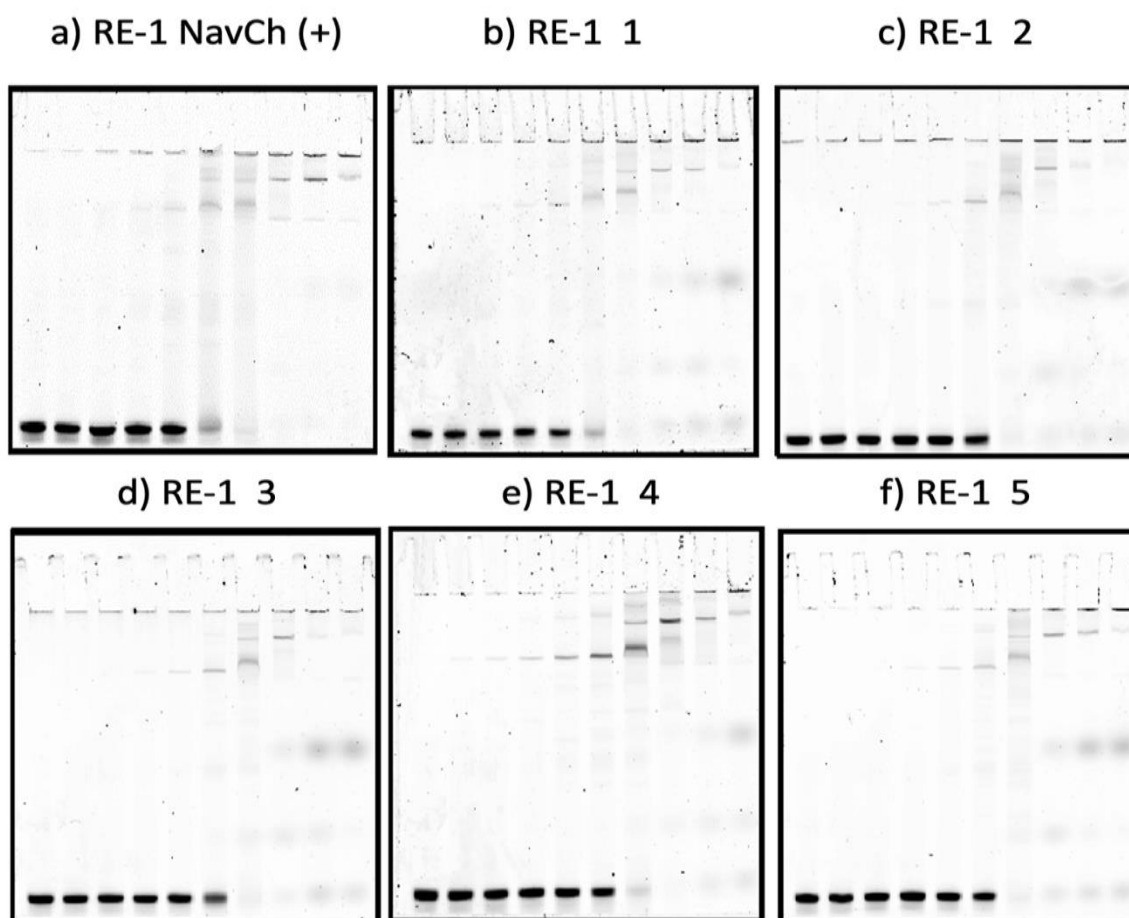


Figura 10. Retardamiento de secuencias RE-1 like

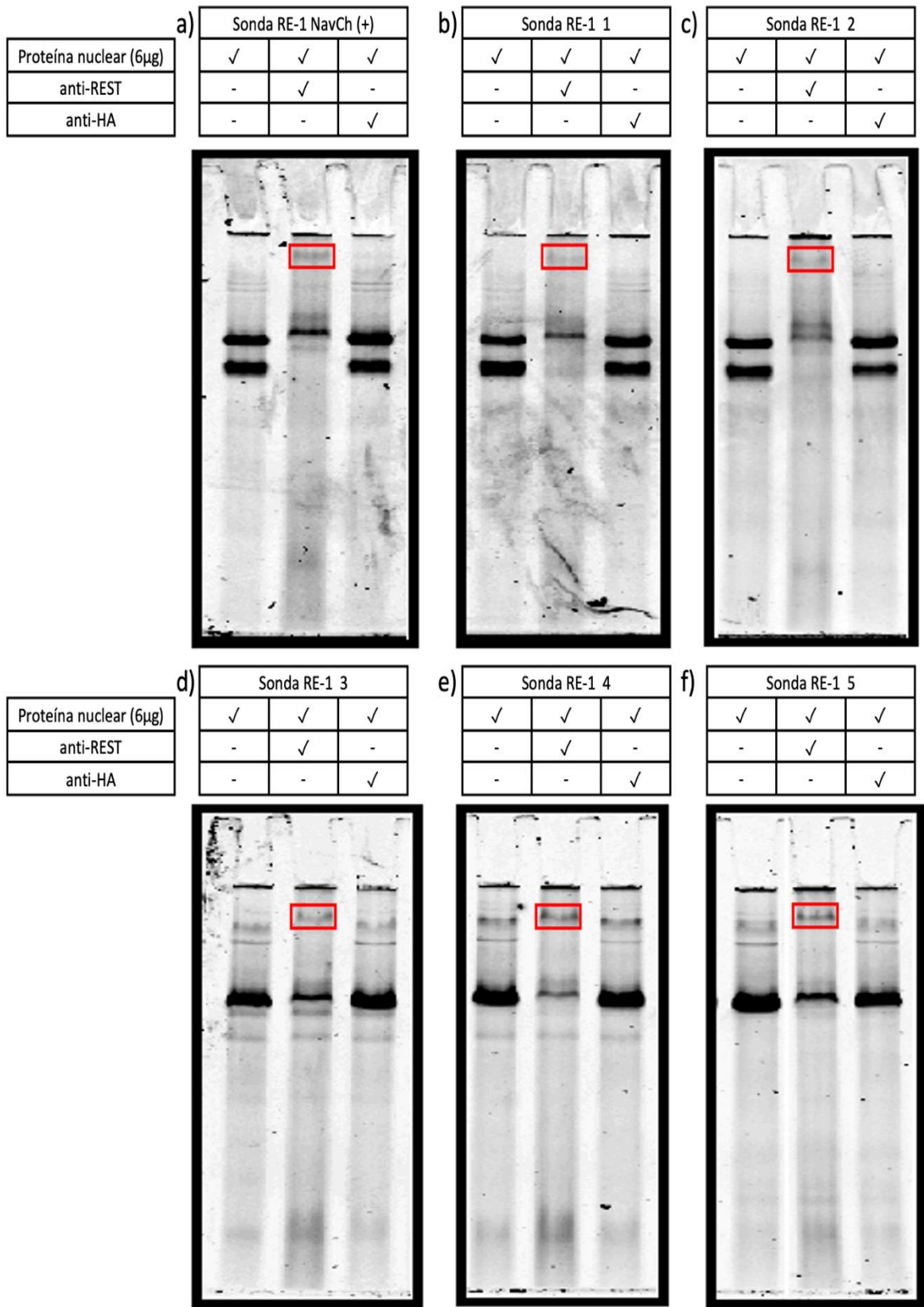


Figura 11. Súper retardamiento de secuencias RE-1 like

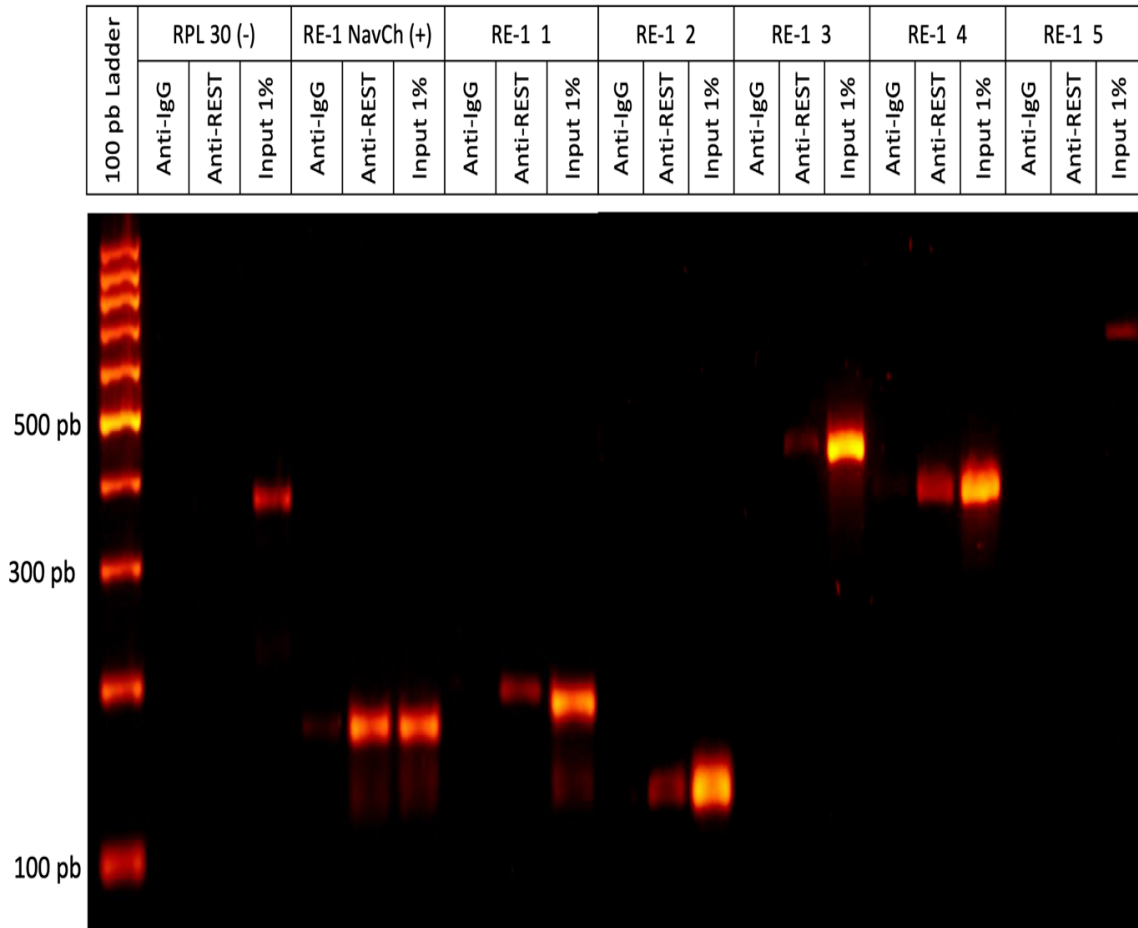
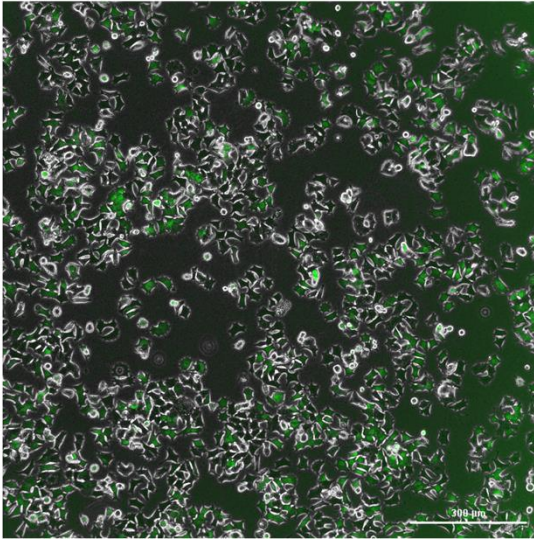


Figura 12. ChIP de secuencias RE-1 like

Como puede observarse en las figuras 10-12, los resultados fueron muy sugestivos del papel funcional que tendría el factor de transcripción REST en la expresión del gen *pdx-1*; de manera que, para evaluar esto en el contexto celular β -pancreático humano, se logró desarrollar 2 líneas celulares β -pancreáticas humanas 1.1E7 transfectadas de manera estable con REST, con un plásmido que expresa REST y GFP como proteína de fusión (fig.13).

Los resultados de la expresión de las proteínas PDX-1, REST e insulina (fig. 14), fueron sorprendentes y sugieren que la unión del factor de transcripción REST a los elementos RE-1 like del gen *pdx-1* regulan de manera positiva la expresión de *pdx-1*, así como que una sobreexpresión de PDX-1 no implica sobreexpresión de la insulina.

a) 1.1E7-REST PvuI



b) 1.1E7-REST Scal

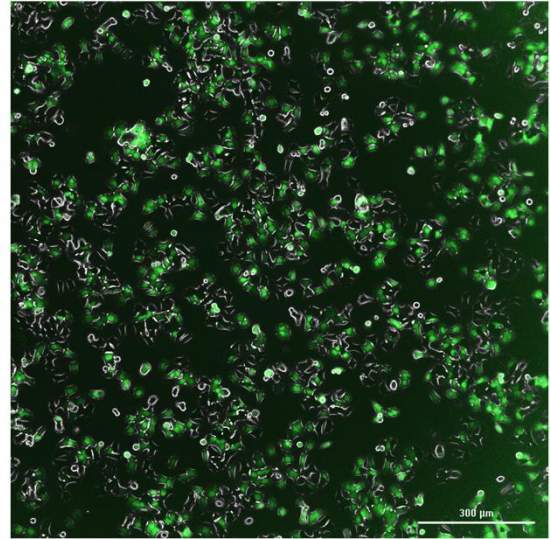


Figura 13. Expresión de GFP en transfectantes estables 1.1E7-REST

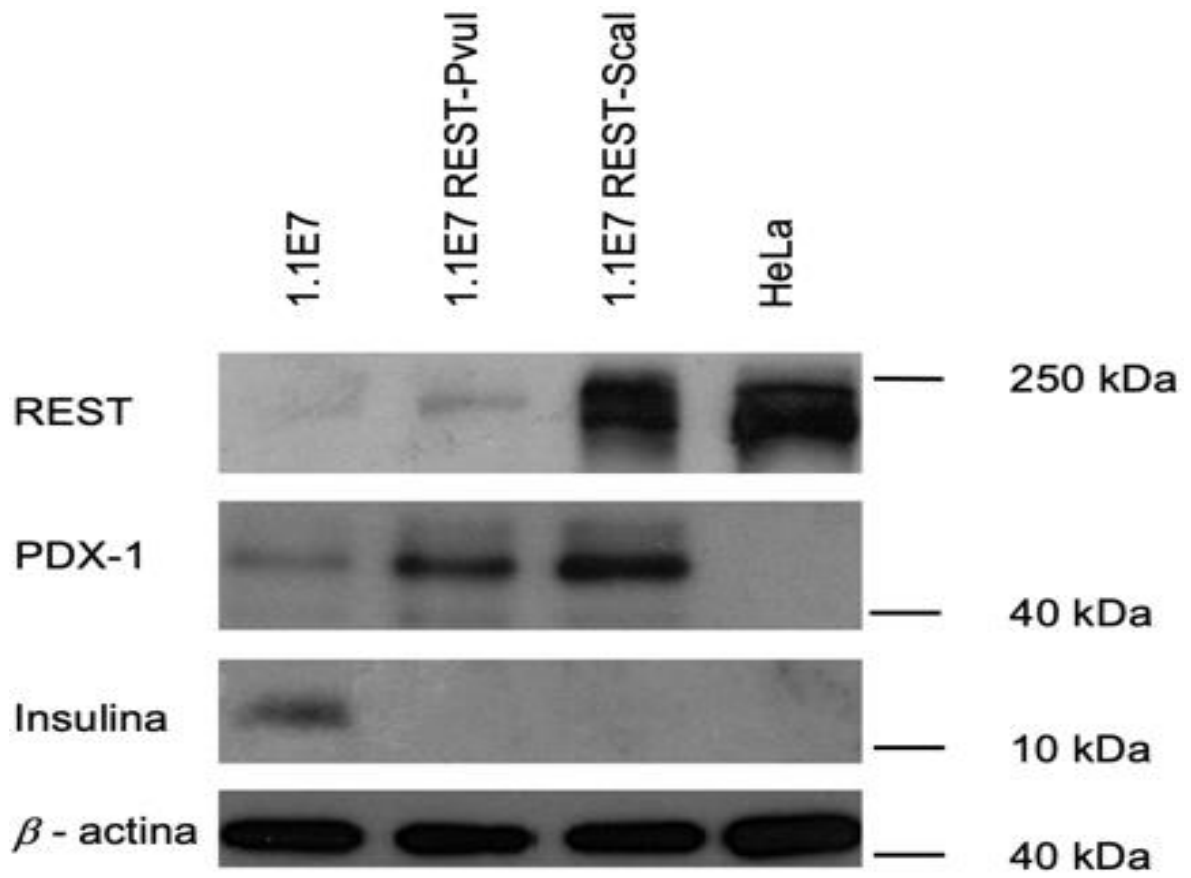


Figura 14. Western blot de REST, PDX-1 e Insulina en 1.1E7-REST

Justificación

i) Estudios recientes en ratones indican que estos desarrollan diabetes al expresar de forma ectópica a REST en las células β -pancreáticas, debido a que estas últimas sufren apoptosis (por mecanismos moleculares aún no identificados), generando una disminución en la producción de insulina; no obstante, actualmente se desconoce la función de REST en células β -pancreáticas humanas.

ii) Ahora es posible realizar estudios en líneas celulares β -pancreáticas humanas, con la finalidad de desarrollar terapias dirigidas a la proliferación de masa y/o función celular β -pancreática para tratar la diabetes.

iii) No existen trabajos sobre proteómica cuantitativa que se hayan realizado en líneas celulares β -pancreáticas humanas transfectadas con REST, usando espectrometría de masas.

Pregunta de investigación

Existen evidencias experimentales de laboratorio que sugieren que REST se une y regula al gen PDX-1, un activador directo del gen de la insulina; no obstante, evidencias experimentales subsecuentes muestran que, la expresión de REST en líneas celulares β -pancreáticas humanas aumenta la expresión de PDX-1 y reprime la expresión de insulina. Considerando lo anterior, ¿REST induce expresión diferencial de proteínas, asociadas a la expresión de insulina, en líneas celulares β -pancreáticas humanas?

Hipótesis

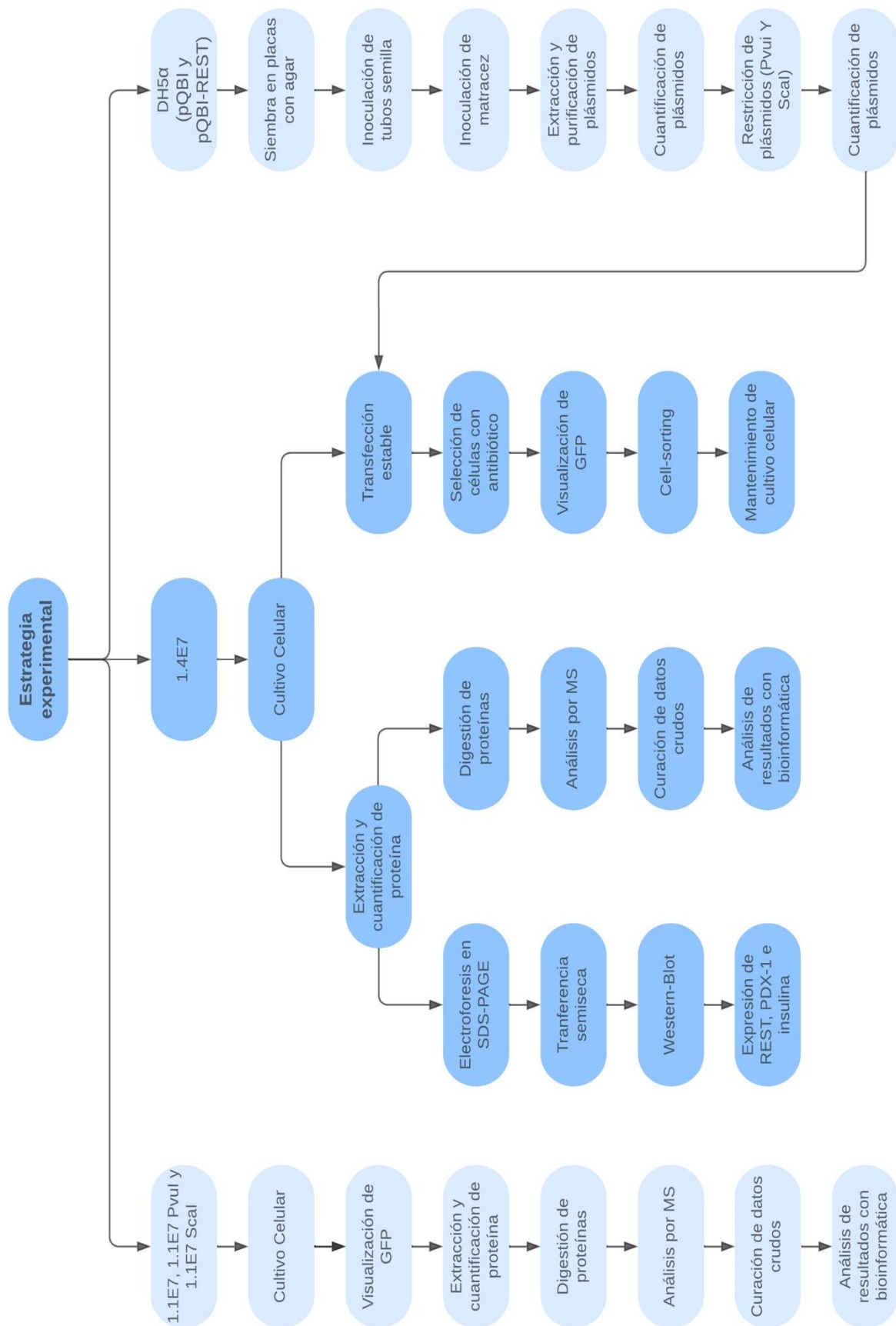
Se observarán patrones de expresión diferenciales en las células β -pancreáticas humanas transfectadas con REST, en comparación con la línea celular control no transformada.

Objetivo General

Identificar y analizar proteínas que se expresan de forma diferencial en células β -pancreáticas humanas transfectadas con REST, y que estén asociadas a la expresión de insulina.

Objetivos Específicos

- Comparar de forma relativa los cambios en los perfiles de expresión de proteínas en 2 líneas celulares de $1.1E7$ transfectadas con REST, usando metodología “label free”.
- Clasificar las proteínas diferencialmente expresadas por función molecular y rutas metabólicas participantes, haciendo uso de herramientas bioinformáticas.
- Identificar proteínas asociadas a la producción y/o secreción de insulina.
- Determinar la expresión de REST, PDX-1 e insulina en la línea celular $1.4E7$ mediante Western-Blot.
- Analizar el proteoma de $1.4E7$ mediante metodología “label free”.
- Construir transfectantes estables $1.4E7$ que expresen REST.



Metodología experimental

Cultivo, extracción y cuantificación de proteínas de las líneas celulares: 1.1E7, 1.1E7-REST Pvul y 1.1E7-REST Scal

Para esta parte del proyecto, se consideraron los métodos de cultivo sugeridos en la hoja de especificaciones de la línea celular 1.1E7, de manera que se descongeló un vial de cada línea celular a 40°C en baño maría durante 5 min, posteriormente se tomaron los 1.8mL de cada vial y se colocaron en tubos falcon de 15 mL, los cuales se llevaron a un volumen de 12 mL con medio RPMI 1640 (0.2% NaHCO₃ y 25mM HEPES). Las células se centrifugaron a 200 xg durante 10 min a 25°C, se les retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 2 mL de medio RPMI 1640 suplementado (10% FBS y 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina). Después, los 2 mL de cada línea celular se sembraron en una caja de cultivo p100, se añadieron 10mL del medio RPMI 1640 suplementado a las células 1.1E7 y medio RPMI 1640 suplementado, además con 500 µg/mL de G418 para las líneas 1.1E7 transfectadas con REST y se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada gaseada con CO₂ al 5%; los pases de mantenimiento se realizaron cada vez que las cajas tenían una confluencia ~85-90%, haciendo 2 lavados con PBS (137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2.7mM KCl y 1.8mM KH₂PO₄), despegando las células con Tripsina/EDTA 0.25X y resuspendiendo con PBS.

Una vez que las células cultivadas en una placa p100 alcanzaron el ~85-90% de confluencia, se realizó la cosecha de estas con 1 mL de PBS y se colocaron en microtubos de 1.5 mL; posteriormente se realizó la extracción de proteína de acuerdo con el método de purificación de proteínas modificado de (Thadikaran, 2008). Por consiguiente, las células se centrifugaron a 200 xg durante 10 min a 25°C, se les retiró el sobrenadante, se resuspendieron en 1 mL de buffer (10mM Tris pH 7.5, 10 mM KCl y 0.1 mM EDTA), se les agregó 1% de cocktail inhibidor de proteasas (Sigma P8340), se mezclaron e incubaron en hielo por 15 min. Posteriormente se agregaron 10 µL de IGEPAL (10%), se mezclaron y centrifugaron

a una velocidad de 15000 xg durante 2 min a 4°C, se les retiró el sobrenadante (fracciones citoplasmáticas), se colocaron en microtubos nuevos de 1.5mL y se incubaron a 4°C. Luego, en los microtubos originales se agregó 200 µL de buffer (0.34 M sacarosa y 0.05mM MgCl₂), se mezclaron nuevamente y se sonicaron en Biorruptor durante 40 ciclos (30s/on, 30s/off). Al terminar los ciclos, las muestras se centrifugaron a una velocidad de 15000 xg durante 5 min a 4°C, se recuperaron los sobrenadantes (fracciones nucleares) y se juntaron con las fracciones citoplasmáticas correspondientes. El procedimiento anterior se hizo con la finalidad de obtener la proteína total de las muestras, en una solución que permitiera retirar fácilmente el detergente empleado (IGEPAL), debido a que interfiere con la lectura del espectrómetro de masas (Yeung, 2010).

Posteriormente se enjuagaron microtubos de 2 mL, así como Amicon ultra-0.5 centrifugal filter devices con agua para retirar cantidades sobrantes de glicerina que estos contienen de fábrica. Después se colocaron en solución de Tween-20 al 5% durante 12 h debido a que, de acuerdo con (Erde, 2014) esta solución tiene como objetivo formar una película al interior de los filtros y tubos que permite obtener una mayor eficiencia en el procedimiento, es decir, reduce las pérdidas de proteína al intercambiar buffer. Posteriormente, cada tubo y dispositivos de filtro se enjuagaron nuevamente con agua para retirar el exceso de Tween-20. Después, se pasaron cada una de las muestras de proteína a través de los filtros, centrifugando a una velocidad de 14000 xg durante 30 min a 18°C; una vez que toda la muestra estaba contenida en el filtro, se realizó el intercambio de buffer centrifugando nuevamente las muestras 4 veces con 400µL de (NH₄HCO₃ 50mM). Finalmente, la cuantificación de proteínas se llevó a cabo utilizando el kit 2-D Quant de GE Healthcare y Epoch de Bio Tek.

Digestión de proteínas en gel

Se realizó un gel de acrilamida / bisacrilamida (30% / 0.8%) al 12% con 50µg de las muestras de proteína en “pool”, representando una mezcla equimolar de

triplicados biológicos y se corrió a un voltaje de 120 V observando que el frente de corrida llegara hasta una distancia de 1 cm posterior al gel separador, con la finalidad de obtener la mayor parte de la proteína concentrada en una banda, ubicada en la distancia más próxima del gel separador; posteriormente el gel se tiñó con azul de coomassie (50% metanol, 7% ácido acético y 2% coomassie R-250) y se destiñó con (5% metanol, 7% ácido acético), de manera que se pudo identificar la presencia de 3 bandas de alrededor de 1 cm², se escindieron en 4 partes iguales, se cortaron en cuadros de aproximadamente 1 mm² y se colocaron en microtubos con solución de almacenamiento (10% metanol y 7% ácido fórmico (AF)) para realizar digestión de proteínas en gel.

Para comenzar el proceso de digestión se les retiró a las muestras la solución de almacenamiento, se les agregó solución de desteñido (50% metanol y 2.5% AF) y se dejaron en incubación durante 2 h a TA; cabe destacar que, una vez terminado este tiempo, se repitió el paso agregando nuevamente esta solución con 1 h de incubación a TA, después se deshidrató el gel añadiendo acetonitrilo (ACN) y se evaporaron los restos de este haciendo uso de un concentrador SpeedVac. Posteriormente, se realizó la reacción de reducción de las muestras añadiendo solución de (ditiotreitól 10 mM disuelto en NH₄HCO 100mM), se incubaron durante 30 min a 56°C, después se retiró esta solución y se agregó solución de (iodoacetamida 50mM disuelta en NH₄HCO 100 mM) para alquilar los puentes disulfuro de las proteínas y evitar que estos se formen nuevamente; esta solución se dejó incubar durante 30 min a TA. Por consiguiente, se hicieron lavados de gel con NH₄HCO (100mM) y ACN, luego se realizó la digestión de proteínas con tripsina de páncreas porcino a 20 ng/μL disuelta en NH₄HCO (50 mM) y se incubaron las muestras a 37°C durante toda la noche. Una vez finalizado el tiempo de digestión, se realizó la extracción de la muestras en dos pasos: i) con solución de AF 5% y ii) solución de AF 5% con 50% ACN y se concentró a un volumen de 150 μL. Posterior a la extracción, se hizo un desalado de péptidos en columnas C18 de Pierce (Thermo Scientific) con gradiente de elución decreciente de polaridad, haciendo uso de soluciones a diversas concentraciones de ACN y agua, todas con 1% de AF;

una vez desalada la muestra en un volumen $\sim 80\mu\text{L}$, se concentró a un volumen de $50\mu\text{L}$ y se colocó en un vial para inyectar al espectrómetro de masas.

Análisis por MS

Los péptidos desalados de las 3 muestras fueron inyectados ($4\mu\text{L}$) en un espectrómetro de masas Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA), en modo MS^E para calcular el área bajo la curva (AUC) a partir de los TIC (total ion chromatogram) para poder normalizar la inyección en el HPLC. Así, la misma cantidad de péptidos en cada condición (1.1E7, 1.1E7-REST PvuI y 1-1E7-REST Scal) fue cargada en una precolumna Symmetry C18 Trap V/M ($180\mu\text{m} \times 20\text{mm}$, con tamaño de poro de 100Å , tamaño de partícula de $5\mu\text{m}$) y desalados usando fase móvil A (0.1% de AF) y fase móvil B (0.1% de AF en ACN) bajo el siguiente gradiente isocrático: 99.9% fase móvil A y 0.1% fase móvil B con un flujo de $5\mu\text{L}/\text{min}$ durante 3 min.

Posteriormente, los péptidos fueron cargados y separados en una columna HSS T3 C18 ($75\mu\text{m} \times 150\text{mm}$, tamaño del poro de 100Å , tamaño de partícula de $1.8\mu\text{m}$), utilizando el equipo de UPLC ACQUITY M-Class con las mismas fases móviles, en el siguiente gradiente: i) 0 min 7% B, ii) 121.49 min 40% B, iii) 123.15 - 126.46 min 85% B y iv) 129 - 130 min 7% B, a un flujo de $400\text{nL}/\text{min}$ y 45°C . Los datos espectrométricos fueron obtenidos en un espectrómetro de masas Synapt G2-Si, con ionización ESI y separación por movilidad iónica "IM-MS" usando la estrategia DIA en el modo HDMS^E (Waters). Los parámetros para la fuente de ionización fueron los siguientes: i) 2.75kV para el capilar de muestra, ii) 30V para el cono de muestra, iii) 30V para la fuente offset, 70°C de temperatura para la fuente, presión para el gas de nano flujo de 0.5Bar y $150\text{L}/\text{h}$ como flujo de gas de purga.

Con lo anterior, se obtuvieron dos cromatogramas de baja y alta energía en modo positivo, con un rango de m/z de 50-2000 y un tiempo de escaneo de 0.5 s. No se empleó energía de colisión para la obtención del cromatograma de baja

energía, y para el cromatograma de alta energía, los iones precursores se fragmentaron en el “transfer” aplicando una rampa de energía de colisión de 19-55 V. Los archivos en formato “*.raw” generados, se analizaron con el software DriftScope v2.8 (Waters) para aplicar de manera selectiva energías de colisión cuasi-específicas, con base en el tiempo de deriva de cada péptido detectado. Después, en el modo UDMS^E, se generó un archivo en formato “*.rul” y se utilizó para aplicar una energía de colisión específica para cada péptido detectado (a diferencia del modo HDMS^E, donde se aplicó una rampa lineal), se aplicaron las mismas condiciones cromatográficas y de la fuente utilizadas en el modo HDMS^E, a su vez, los péptidos trípticos de cada condición fueron inyectados por triplicado y se aplicó el modo UDMS^E. Todos los parámetros regulados, así como el manejo de los datos generados por computadora fueron realizados con base en el estudio realizado por (Landa, 2020).

Análisis de datos obtenidos por MS

Las intensidades de MS y MS/MS contenidas en los archivos “*.raw” fueron normalizadas, alineadas, comparadas y cuantificadas de manera relativa utilizando el software Progenesis QI for Proteomics v3.0.3 (Waters) contra una base de datos en formato “*.fasta” de *Homo sapiens*, (descargada de UniProt, última modificación el 27 de junio de 2017) concatenada con su base reversa. Los parámetros utilizados para la identificación de proteínas fueron: tripsina como enzima de corte y sólo un “missed cleavage” permitido; carbamidometilación de cisteína (C) como modificación fija, así como oxidación de metionina (M) y fosforilación en serina (S), treonina (T) y tirosina (Y) como modificaciones variables; la tolerancia en ppm para fragmentos y péptidos fue ajustada como automática, fragmentos iónicos mínimos que deben coincidir por péptido: 2, fragmentos iónicos que deben coincidir por proteína: 5, péptidos mínimos que coincidan por proteína : 1, y un FDR (False Discovery Rate) de $\leq 4\%$. El equipo Synapt G2-Si se calibró con [Glu1]-fibrinopéptido, $[M+2H]^{2+} = 785.84261$ a ≤ 1 ppm. Los resultados generados en el

software Progenesis se exportaron a archivos “*.xlsx” para verificar dos niveles de control de calidad de los datos a nivel de péptido y de proteína.

Análisis a nivel de péptidos

El análisis de péptidos se realizó con los datos obtenidos del modo UDMS^E, de acuerdo con las figuras de mérito (FOM) descritas por (Martins, 2017) para experimentos de cuantificación relativa libre de marcaje (label-free) que considera: i) porcentaje de péptidos detectados con un máximo de error de 10 ppm y ii) distribución del error de masa en ppm a través del rango de m/z. Además, se consideró el porcentaje de los péptidos conforme a los siguientes parámetros: i) identificados al primer pase del algoritmo “Progenesis QI for Proteomics” (PepFrag1), ii) con alguna modificación postraducciona l y que se identifican en el segundo pase de identificación del algoritmo (VarMod), iii) con un corte no realizado (MissedCleavage), iv) identificados en el tercer pase del algoritmo (PepFrag2), v) fragmentados en la fuente de ionización y vi) iones de pérdida neutral de H₂O o NH₃.

Análisis a nivel de proteína

Con los datos de proteínas identificadas y cuantificadas para ambas muestras obtenidos del modo UDMS^E, se graficó el rango dinámico de las mismas, considerando el promedio en base logarítmica 10 (log₁₀) de las 3 inyecciones por muestra, cada una con el valor del promedio de los 3 péptidos con mayor intensidad por proteína (Hi-3). Después, las proteínas identificadas fueron filtradas con el objetivo de reportar únicamente aquellas proteínas altamente confiables que cumplieran con los siguientes criterios: i) que tuvieran al menos 2 péptidos identificados, ii) con al menos 1 péptido único, iii) cuantificadas en al menos 2 de 3 inyecciones realizadas, iv) (p) value (ANOVA) ≤ 0.05 y v) descartando proteínas identificadas en la base reversa (reversed proteins).

Por consiguiente, las intensidades de las proteínas filtradas se analizaron, considerando que las proteínas presentaron un cambio de expresión cuando el cociente de su abundancia en 1.1E7-REST PvuI/1.1E7 ó 1.1E7-REST Scal/1.1E7 resultó de al menos ± 1.2 (expresado en logaritmo base 2); esto significa que estas proteínas tuvieron un cambio de expresión absoluto de al menos ± 2.29 veces. Cabe mencionar que, los cocientes mencionados previamente fueron calculados dividiendo el promedio de la señal de MS de los tres péptidos trípticos con mayor intensidad (Hi3) de cada proteína detectada en 1.1E7-REST PvuI o 1.1E7-REST Scal, entre el Hi3 de 1.1E7. Así, con los datos anteriores se construyeron dos gráficos de volcán, donde el eje de las abscisas corresponde con el p value (anova) en \log_{10} y el eje de las ordenadas corresponde al nivel expresión en base logarítmica 2 (\log_2); se extrajeron en formato “*.xlsx” únicamente los datos sobre y sub-expresados.

Por último, las proteínas exclusivas (ya sea en la condición 1.1E7, 1.1E7-REST PvuI o 1.1E7-REST Scal) fueron seleccionadas con base en el mismo criterio aplicado a las proteínas sobre y sub-expresadas (anova ≤ 0.05 , 2 péptidos identificados, al menos 1 único).

Análisis de las interacciones de las proteínas detectadas

Las proteínas diferencialmente expresadas de cada condición fueron analizadas usando el software en línea “REACTOME”, se consideraron las 25 rutas metabólicas con mayor confiabilidad con base en su “p value” (en \log_{10}), posteriormente, se enriquecieron las proteínas involucradas en dichas rutas y fueron exportadas para su análisis de interacción usando el software en línea “STRING 11.5”; para ello, se usó la base de datos de *Homo sapiens* y un score mínimo requerido de interacción de 0.15.

La visualización de los interactomas se realizó al exportar los archivos “*.tsv” dentro del software “Cytoscape_v3.9.1”, agrupando las redes en nodos de

interacción mediante el algoritmo “MCODE”, haciendo uso de la aplicación “Cluster Maker” bajo los siguientes parámetros: i) número mínimo de interacciones principales (degree cutoff): 2, ii) variación de puntaje de un nodo para unirse a un grupo (node score cutoff): 0.2 (20%), iii) número mínimo de interacciones secundarias por nodo (k-core): 2, iv) cantidad máxima de nodos por grupo: 100 y v) activando la función “Haircut”, que elimina los nodos conectados individualmente a un grupo. Por último, se hizo una búsqueda de las proteínas involucradas en los interactomas que, además, estuvieran asociadas al procesamiento de insulina.

Cultivo, extracción y cuantificación de proteínas de las líneas celulares: 1.4E7 y Vero

Para esta parte del proyecto, se consideraron los métodos de cultivo sugeridos en las hojas de especificaciones de cada línea celular, de manera que se descongeló un vial de células 1.4E7 y uno de células Vero a 40°C en baño maría durante 5 min, posteriormente se tomaron los 1.8mL de cada vial y se colocaron en tubos falcon de 15 mL, los cuales se llevaron a un volumen de 12 mL con medio RPMI 1640 (0.2% NaHCO₃ y 25mM HEPES) para las células 1.4E7 y con medio DMEM (0.37% NaHCO₃ y 25 mM HEPES) para las células Vero. Las células se centrifugaron a 200 xg durante 10 min a 25°C, se les retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 2 mL de medio RPMI 1640 suplementado (10% FBS y 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina) y en 2 mL de medio DMEM suplementado (10% FBS y 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina), respectivamente. Después, los 2 mL de cada línea celular se sembraron en una caja de cultivo p100, se añadieron 10mL del medio suplementado correspondiente y se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada gaseada con CO₂ al 5%; los pases de mantenimiento se realizaron cada vez que las cajas tenían una confluencia ~85-90%, haciendo 2 lavados con PBS (137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2.7mM KCl y 1.8mM KH₂PO₄), despegando las células con Tripsina/EDTA 0.25X y resuspendiendo con PBS.

La extracción de proteína total se llevó a cabo sembrando una caja extra del cultivo de mantenimiento para cada condición y cuando la misma alcanzó una confluencia ~85-90% (~48 h); posteriormente, cada caja se lavó 3 veces con 3mL de PBS c/u, se les agregó 1 mL de buffer RIPA (150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS y 50mM Tris base pH 8) y se incubaron durante 30 min en hielo, agitando cada 5 min la caja. Después se resuspendió y recuperó el mL de cada caja, se colocaron en microtubos de 1.5 mL, se centrifugaron a 14000 xg durante 15 min a 4°C, se recuperaron los sobrenadantes y se les agregó 1% de cocktail inhibidor de proteasas (Sigma P8340). Finalmente, se llevó a cabo la cuantificación de proteína por el método de Lowry con una curva estándar de BSA; se usó solución "C" de trabajo en una proporción 50:1 de solución "A" (2% Na₂CO₃, 0.4% NaOH y 26.8% tartrato de Na y K) y "B" (0.5% CuSO₄ · 5H₂O) respectivamente y el reactivo de Folin se usó en una proporción 1:1 con agua destilada estéril. La cuantificación se hizo en Synergy H4 de Bio Tek.

Ensayo de Western Blot para expresión de REST, PDX-1 e insulina en 1.4E7 y Vero

De los extractos de proteína totales cuantificados anteriormente, se cargaron 40 µg de proteína por muestra, se separaron en un gel desnaturante de acrilamida / bisacrilamida (30% / 0.8%) al 10% a un voltaje de 150 V durante 1.5 h y, finalmente el gel se fijó (50% etanol, 7% ácido acético) por 30 min, se tiñó con azul de coomassie (50% etanol, 0.05% Coomassie R-250, 10% ácido acético) por 1.5 h y se destiñó (30% etanol, 7% ácido acético) toda la noche para la visualización de proteínas.

Después, se preparó y corrió (150 V durante 1.5 h) un gel desnaturante de acrilamida / bisacrilamida al 10% para la detección de REST, PDX-1, insulina y β-actina como control de carga. Con lo anterior, se realizó la transferencia semiseca del gel a una membrana de nitrocelulosa (0.22 µm) en la celda de transferencia Tran-Blot SD BIORAD con buffer de transferencia semiseca (48mM Tris base, 39

mM Glicina, 0.0375% SDS, 20% Etanol) a 13V por 30 min. Posteriormente se llevó a cabo la tinción de las membranas con solución de rojo Ponceau S (0.1% Ponceau S, 1% ácido acético).

Una vez que se corroboró la transferencia de proteínas, se procedió a realizar la detección por Western-Blot; para ello, se preparó buffer TBST (1% de 1M Tris Base pH 8, 3% de 5M NaCl y 0.05% de Tween 20), se incubaron las membranas durante 1 h a TA con solución bloqueadora (leche descremada 10% en TBST) en agitación (ángulo=9, velocidad=9), posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios para REST (07-579), PDX-1 (H-140), insulina (C-12) y β -actina (monoclonal producido en el Depto. de Biología Celular, proporcionado por el Dr. José Hernández); los anticuerpos primarios se incubaron durante 6 h en agitación a una dilución de 1:500 para REST, 1:2000 para PDX-1 y 1:750 para insulina (en TBST), no así para β -actina el cual se incubó durante 4 h en agitación a una dilución de 1:500. Por consiguiente, se realizó 1 enjuague y 3 lavados de 10 min c/u (con TBST) a las membranas; a REST y PDX-1 se les agregó el anticuerpo secundario anti-conejo HRP una dilución de 1:7000, mientras que a β -actina se le agregó el anticuerpo secundario anti-ratón HRP a una dilución de 1:6000 y, se incubaron durante 1 hora en agitación. Finalmente, se enjuagaron y lavaron las membranas a las que se les añadió anticuerpo secundario (de la forma anteriormente descrita) y, todas las membranas se revelaron con sustrato quimioluminiscente 50 / 50 (luminol / H₂O₂) a sensibilidad alta en el equipo C-DiGiT de LICOR.

Análisis y datos obtenidos por MS de 1.4E7

Para esta parte del proyecto se utilizó el extracto de proteína de la línea celular 1.4E7, se hizo cuantificación de proteínas utilizando el kit 2-D Quant de GE Healthcare y de Epoch de Bio Tek; después, se realizó la digestión de proteínas con el kit de preparación de muestra iST de PREOMICS. Posterior a la digestión, se resuspendió la muestra con la solución "LC-LOAD" del kit para una concentración

final de péptidos de 0.73 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se agregó un estándar digerido de alcohol deshidrogenasa de *Escherichia coli* a una concentración final de 25 fmol/ μL ; la muestra se colocó en un vial para inyectar al espectrómetro de masas.

Posteriormente, los péptidos fueron cargados y separados en una columna HSS T3 C18 (75 μm X 150 mm, tamaño del poro de 100 Å, tamaño de partícula de 1.8), utilizando el equipo de UPLC ACQUITY M-Class usando fase móvil A (0.1% de ácido fórmico (AF)) y fase móvil B (0.1% de AF en acetonitrilo (ACN)) bajo el siguiente gradiente isocrático: 0 min 7% B, 121.49 min 40% B, 123.15 a 126.46 min 85% B, 129 a 130 min 7% B, a un flujo de 400 nL/min y 45°C.

Los datos espectrométricos fueron obtenidos en un espectrómetro de masas Synapt G2-Si, con ionización ESI y separación por movilidad iónica "IM-MS", usando la estrategia DIA en el modo HDMS^E (Waters). Los parámetros para la fuente de ionización fueron los siguientes: 2.75 kV para el capilar de muestra, 30 V para el cono de muestra, 30 V para la fuente offset, 70 °C de temperatura para la fuente, presión para el gas de nano flujo de 0.5 bar y 150 L/h como flujo de gas purga. Con lo anterior, se obtuvieron dos cromatogramas de baja y alta energía en modo positivo, con un rango de m/z de 50-2000 y un tiempo de escaneo de 0.5 s. No se empleó energía de colisión para la obtención del cromatograma de baja energía, y para el cromatograma de alta energía, los iones precursores se fragmentaron en el "transfer" aplicando una rampa de energía de colisión de 19-55 V. Los archivos en formato "*.raw" generados, todos los parámetros regulados y el manejo de los datos generados por computadora fueron realizados con base al estudio realizado por (Landa, 2020).

Las intensidades de MS/MS contenidas en los archivos "*.raw" fueron normalizadas y cuantificadas de manera absoluta utilizando el software Progenesis QI for Proteomics v3.0.3 (Waters) contra una base de datos en formato "*.fasta" de *Homo sapiens*, incluyendo la alcohol deshidrogenasa de *Escherichia coli* (descargada de UniProt, última modificación el 14 de febrero de 2022) concatenada

con su base reversa. Los parámetros utilizados para la identificación de proteínas fueron: i) tripsina/LysC como enzimas de corte, ii) sólo un “missed cleavage” permitido, iii) carbamidometilación de cisteína (C) como modificación fija, iv) oxidación de metionina (M), acetilación del N terminal y fosforilación en serina (S), treonina (T) y tirosina (Y) como modificaciones variables, v) la tolerancia en ppm para fragmentos y péptidos fue ajustada como automática, vi) fragmentos iónicos mínimos que deben coincidir por péptido: 2, vii) fragmentos iónicos que deben coincidir por proteína 5, viii) péptidos mínimos que coincidan por proteína:1 y ix) FDR (False Discovery Rate) de $\leq 4\%$. Cabe mencionar que el equipo Synapt G2-Si se calibró con [Glu1]-fibrinopéptido, $[M+2H]^{2+} = 785.84261$ a ≤ 1 ppm. Por consiguiente, los resultados generados en el software Progenesis se exportaron a archivos “*.xlsx” para verificar los niveles de control de calidad de los datos a nivel de péptido y de proteína.

Análisis a nivel de péptidos y proteínas de 1.4E7

El análisis de péptidos se realizó de la misma forma descrita previamente, solo que con los datos obtenidos del modo HDMS^E para este experimento.

Por otra parte, con los datos de proteínas identificadas y cuantificadas (obtenidos del modo HDMS^E) se graficó el rango dinámico, considerando el promedio en base logarítmica 10 (\log_{10}) de las 3 inyecciones, cada una con el valor del promedio de los 3 péptidos con mayor intensidad por proteína (Hi-3). Posteriormente, las proteínas identificadas fueron filtradas con el objetivo de reportar únicamente aquellas proteínas altamente confiables que cumplieran con los siguientes criterios: i) que tuvieran al menos 2 péptidos identificados, ii) con al menos 1 péptido único, iii) cuantificadas en al menos 2 de 3 inyecciones realizadas, iv) (p) value (ANOVA) ≤ 0.05 y v) descartando proteínas identificadas en la base reversa (reversed proteins).

Análisis de las interacciones de proteínas detectadas en 1.4E7

Para esta parte, las proteínas identificadas fueron analizadas usando el software en línea “REACTOME”, de manera que se buscaron rutas metabólicas asociadas con la insulina; posteriormente, se enriquecieron las proteínas involucradas en dichas rutas y se exportaron para su análisis de interacción, usando el software en línea “STRING 11.5”, con la base de datos de *Homo sapiens* y un valor de 0.15 como score de interacción mínimo requerido.

Finalmente, la visualización del interactoma se realizó con un archivo “*.tsv” exportado dentro del software “Cytoscape_v3.9.1”.

Viabilidad celular de 1.4E7 con G418

Previo a la transfección, se realizaron pruebas de viabilidad celular en 1.4E7 con la genética G418, ya que el fabricante hace mención de que la selección en células eucariontes debe realizarse en un rango de concentración de 300-500 µg/mL. Por lo anterior, se optó por analizar la viabilidad celular de 1.4E7 a 300, 400 y 500 µg/mL de G418 a la confluencia en que se iba a realizar la transfección; de manera que, se sembraron 4 cajas p60 al 90% de confluencia, y después de 24 h se agregaron las concentraciones antes mencionadas de G418 (con un control al que no se le agregó antibiótico). Las células se monitorearon cada 24 h hasta que se observó el 50% de confluencia a la concentración mayor de G418 (500 µg/mL), punto en el cual se les retiró el medio a todas las cajas p60, se les agregó 3mL de la solución de rojo neutro (4mg/mL en PBS) de trabajo 1:100 (en RPMI 1640) por las orillas y se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada gaseada con CO₂ al 5% durante 2 h; posteriormente se hicieron 6 lavados con 2 mL de PBS c/u, se agregó 1mL de solución de desteñido (50% etanol, 1% ácido acético), se pusieron en agitación durante 30 min (ángulo= 12, velocidad= 12) y , finalmente se tomaron 200 µL de sobrenadante y se leyó la absorbancia a 540nm en Synergy H4 de Bio Tek.

Transfección estable en 1.4E7

Para esta parte del proyecto, se tomaron células DH5 α transformadas con el plásmido pQBI de 6.6 kbp (para el control) y células DH5 α transformadas con el plásmido pQBI-REST de 9.8 kbp; ambas previamente transformadas por el equipo de trabajo de laboratorio. Considerando lo anterior, se inició descongelando un tubo con células DH5 α transformadas de cada condición, se hizo un raspado con asa bacteriológica y se sembraron en placas con agar LB (10% agar, 1% NaCl, 1% triptona, 0.5% extracto de levadura) a 75 μ g/mL de ampicilina; estas placas se incubaron a 37°C por 16 h, posteriormente se tomó una colonia de cada condición, se inocularon en 2 tubos de ensayo con 10 mL de medio LB (1% NaCl, 1% triptona, 0.5% extracto de levadura) a 75 μ g/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C por 16 h con agitación. Por consiguiente, se realizó extracción de plásmido MINIp prep con STET (0.1M NaCl, 10mM Tris base pH 8, 1 mM EDTA pH8 y 5% tritón x-100) y lisozima (10mg/mL en 10mM Tris pH 8), después se precipitó (3M acetato de sodio e isopropanol), se lavó (70% etanol) el DNA plasmídico y se resuspendió en agua inyectable estéril.

Una vez que se corroboró la integridad de ambos plásmidos en un gel de agarosa al 0.8% y que se comprobó su tamaño haciendo restricciones enzimáticas para linealizarlos con: i) BamHI (Sigma), ii) HindIII (NEB), iii) PvuI (NEB), iv) Scal (NEB) y cortando el inserto REST (doble restricción con BamHI y HindIII) de pQBI-REST, se procedió a realizar extracción de plásmido MEGAprep y purificación con el kit de QIAGEN, para ello se tomaron colonias de las mismas placas sembradas previamente, se inocularon tubos de ensayo con 10 mL de medio LB a 50 μ g/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C por 16 h con agitación, luego se tomaron 2mL de cultivo por cada condición para inocular 2 matraces con 1L de medio LB a 50 μ g/mL para cada condición e incubarlos en las mismas condiciones; posteriormente se realizó la extracción de plásmido acorde con el protocolo del kit. Una vez finalizado lo anterior, los plásmidos pQBI y pQBI-REST se cuantificaron, se corroboró el patrón de restricción de ambos nuevamente, se restringieron ~38 μ g de pQBI con PvuI y

~32 µg de pQBI-REST con PvuI y Scal por separado (2 condiciones) y, por último, se cuantificaron nuevamente en Synergy H4 de Bio Tek, previo a la transfección.

Posteriormente, la transfección estable se llevó a cabo conforme a la metodología utilizada en (Stuchbury, 2010), es decir, mediante la linealización del plásmido pQBI-REST en el sitio de restricción PvuI o Scal, en la región que codifica a la proteína de resistencia a ampicilina y, a su vez, considerando el protocolo del fabricante para transfección de células en cajas p60 (al 90% de confluencia) con Lipofectamina LTX plus de Thermofisher, de manera que se sembraron 9) cajas p60 con 1.89×10^6 de células 1.4E7 y se inició con el protocolo 24 h después.

Por consiguiente, ya que las células se habían adherido a la placa y que se corroboró la confluencia en un microscopio, se procedió a realizar la transfección con 3 concentraciones diferentes de DNA (5.5 µg, 8.25 µg y 11 µg) por cada plásmido (pQBI PvuI, pQBI-REST PvuI y pQBI-REST Scal), agregando el volumen correspondiente de plásmido (conforme a la cuantificación) a la mezcla OptiMEM / reactivo plus (300 µL en total, respetando la relación 1:1 masa-volumen de plásmido / reactivo plus) contenida en 9 microtubos de 1.5 mL y se incubaron por 5 min a TA; posteriormente, se añadió la mezcla de 11 µL de Lipofectamina LTX y 289 µL de OptiMEM (600 µL en total) y se incubaron 30 min a TA. Después, se retiró el medio de las cajas p60, se agregó la mezcla de complejos y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 h, agitando las cajas cada 30 min. Una vez terminado lo anterior, se añadió medio RPMI suplementado, se incubaron las células durante 24 h y al término se cambió el medio por medio de selección (RPMI suplementado + 500 µg/mL de G418); posteriormente, las células se analizaron en Cytation C10 de Bio Tek para corroborar la expresión de GFP.

Finalmente, a las 9 cajas p60 se les cambió el medio de selección cada 48 h y se monitorearon en Cytation C10 de Bio Tek cada 24 h durante 3 semanas, hasta que se realizó el otro criterio de selección por medio de cell sorting, utilizando la marca de GFP. Para lo anterior, se cosecharon (PBS con 25mM HEPES y 5mM

EDTA) y mezclaron las células de las concentraciones de 8.25 μg y 11 μg de DNA de cada condición, de manera que las células sorteadas se recuperaron en 3 placas de 96 pozos (1 por condición), colocando de 1 hasta 8 células en cada pozo por filas (8 filas A-H) y, en 3 tubos de citometría de flujo se recolectaron en pool las células GFP positivas por condición; todas las células sorteadas se mantuvieron en cultivo con medio de selección y se esperó a que estas proliferaran.

Resultados y Discusión

Análisis por MS de 1.1E7, 1.1E7-REST Pvul y 1.1E7-REST Scal

En la tabla 2 se muestra la concentración de las muestras de extracto de proteína para cada línea celular en triplicados, interpolados en una curva estándar de albúmina con $R^2 = 0.9852$, con el kit 2D-Quant.

Tabla 2. Cuantificación de proteína total en triplicados biológicos de 1.1E7 y sus transfectantes estables

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	*Volumen necesario de muestra para realizar el "pool" con 50 μg en total (μL)
1.1E7 (A)	14.09	1.18
1.1E7 (B)	13.52	1.23
1.1E7 (C)	15.18	1.10
1.1E7-REST Pvul (A)	13.56	1.23
1.1E7-REST Pvul (B)	13.56	1.23
1.1E7-REST Pvul (C)	13.04	1.28
1.1E7-REST Scal (A)	13.48	1.24
1.1E7-REST Scal (B)	13.89	1.20
1.1E7-REST Scal (C)	12.52	1.33

La tabla 3 representa los datos que se obtuvieron de MS^E.

Tabla 3. Área bajo la curva de 1.1E7 y sus transfectantes estables

Muestra	Volumen (μL)	Área bajo la curva	Volumen normalizado (μL)
1.1E7	4	1033843584	3.42
1.1E7-REST Pvul	4	882767424	4
1.1E7-REST Scal	4	1597865344	2.21

La cantidad de péptidos identificados usando el modo UDMS^E se representaron en un histograma de error en ppm (fig.15), en este se observa una

distribución normal de error con la mayoría de péptidos (83.17%) ubicados a no más de ± 10 ppm de error, lo cual indica una correcta calibración del espectrómetro de masas; además, se cumple con lo establecido de acuerdo a las “FOM” descritas por (Martins, 2017).

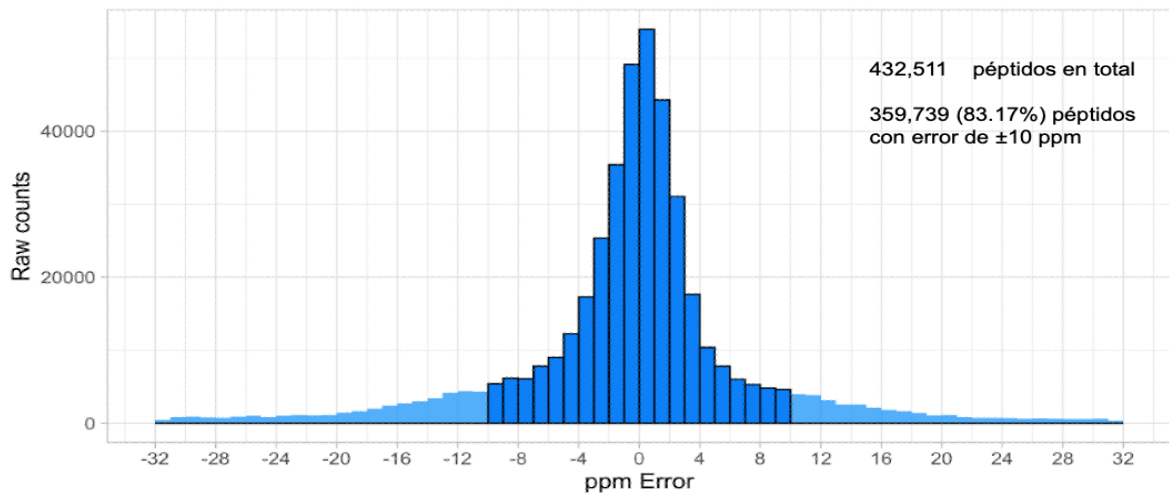


Figura 15. Histograma de frecuencias absolutas de péptidos (con error en ppm)

Por consiguiente, se realizó un gráfico de pastel (fig. 16) en el cual se muestra que la mayor cantidad de péptidos (51.25%) son clasificados como *PepFrag1* y son los más confiables de acuerdo con lo descrito por (Li G. Z., 2009), ya que estos son identificados y cuantificados durante el primer pase del algoritmo “PROGENESIS”, el cual considera 14 parámetros fisicoquímicos como: i) intensidad del ion precursor, ii) fragmentación experimental en sitios de corte preferidos y iii) masas precisas de iones fragmento, por mencionar algunos.

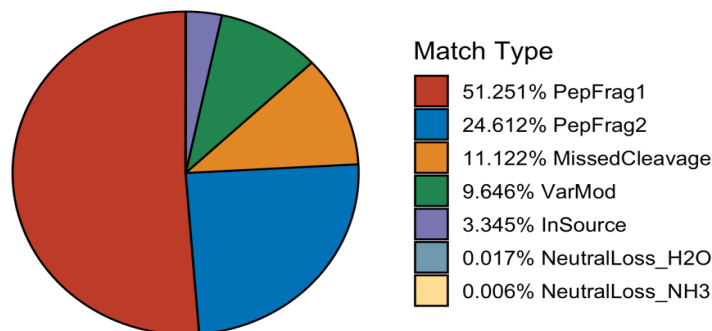


Figura 16. Gráfico de pastel de clasificación de péptidos (con base en su identificación)

Ahora bien, a nivel de proteínas fueron identificadas y cuantificadas un total de 1633 proteínas, las cuales fueron graficadas de acuerdo con su rango dinámico (fig.17). El rango dinámico es utilizado principalmente por 2 razones: i) corroborar que la inyección de péptidos para las 3 condiciones fue similar y, por consiguiente, las muestras fueron biológicamente comparables, además se muestra de forma gráfica que la normalización de la inyección realizada en el modo MS^E fue adecuada y ii) verificar la sensibilidad del equipo; en teoría, un espectrómetro de masas en la actualidad tiene la capacidad de identificar proteínas a niveles de expresión de hasta 6-7 órdenes de magnitud (expresado como log₁₀), para este experimento los resultados mostraron una alta sensibilidad del equipo Synapt G2-Si debido a que las proteínas en las 3 condiciones rondan ~10 órdenes de magnitud.

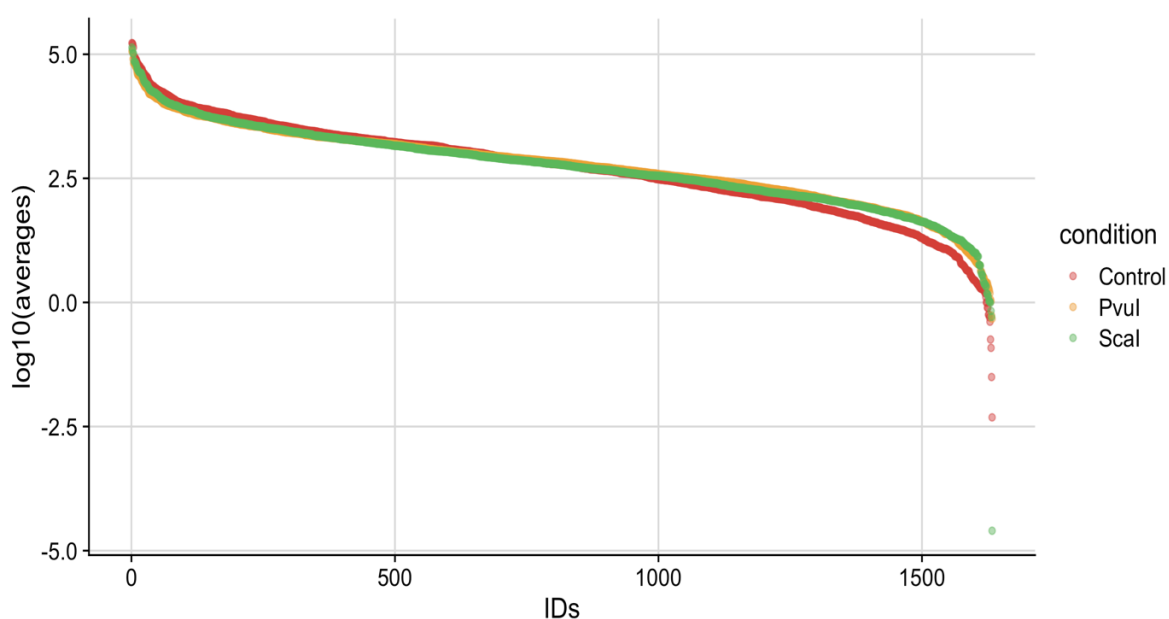


Figura 17. Rango dinámico en 1.1E7 y sus transfectantes estables

Hasta este punto es importante mencionar que, la posición en el rango dinámico de una proteína detectada en alguna de las 3 condiciones (1.1E7 y/o 1.1E7-REST Pvul y/o 1.1E7-REST Scal), puede ser muy distinta en cualquiera de las otras 2 condiciones y, el hecho de que los 3 rangos dinámicos tengan un ajuste adecuado (fig.17), fundamenta la cuantificación relativa ya que existe una variación dinámica de la expresión de proteínas entre las 3 condiciones.

Utilizando los criterios de filtrado mencionados en la metodología experimental (al menos 2 péptidos identificados por proteína, 1 único, p value ≤ 0.05 , cuantificadas en al menos 2 de 3 condiciones y proteínas “reversed” eliminadas), las proteínas detectadas fueron filtradas resultando en un total de 1067 proteínas altamente confiables, con las cuales se hicieron 2 gráficos de volcán para cada condición respecto del control (fig.18).

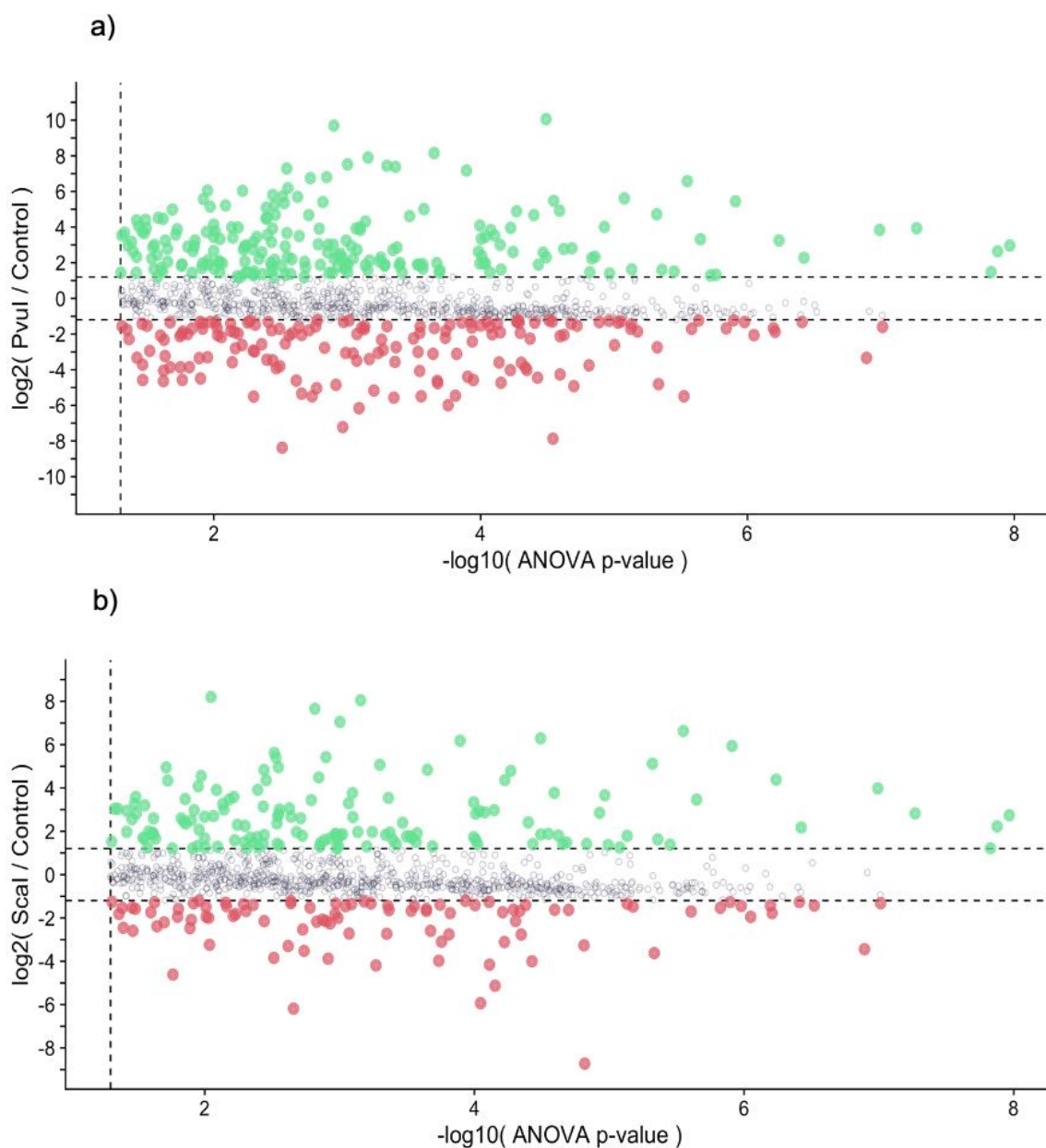


Figura 18. Gráfico de volcán para proteínas sobre-expresadas, sin cambios y sub-expresadas en las transfectantes estables respecto al control

De acuerdo con lo anterior, en 1.1E7-REST Pvul: i) 211 proteínas tuvieron un nivel de expresión mayor, ii) 691 no tuvieron cambio de expresión y iii) 165 tuvieron un nivel de expresión menor respecto de 1.1E7. Por su parte, en 1.1E7-REST Scal: i) 149 proteínas tuvieron un nivel de expresión mayor, ii) 821 no tuvieron cambio de expresión y iii) 97 tuvieron un nivel de expresión menor respecto de 1.1E7. La fig. 18 representa estos datos en color verde, blanco y rojo en los incisos a) y b), respectivamente. Los datos correspondientes a las proteínas con mayor y menor expresión se encuentran en el anexo A.

Adicionalmente, en este análisis fueron reportadas 12 proteínas exclusivas de 1.1E7-REST Pvul y 3 proteínas exclusivas de 1.1E7-REST Scal, que se muestran en la parte final del anexo A.

Posteriormente, las proteínas diferencialmente expresadas y exclusivas de cada condición fueron analizadas respectivamente por separado, haciendo uso del software en línea “REACTOME” con la finalidad de determinar las rutas metabólicas en las que participan. Los resultados mostraron, para cada condición, 25 rutas metabólicas mayormente destacadas (anexo B) con base en su “p-value” calculado por el software, el cual considera la significancia estadística de cada ruta metabólica con respecto a sus proteínas asociadas (Fabregat, 2017). Una vez obtenido lo anterior, se consideraron las proteínas involucradas en cada una de las 25 rutas metabólicas más relevantes por condición (anexo B), obteniendo: i) 57 proteínas para 1.1E7-REST Pvul y ii) 51 proteínas para 1.1E7-REST Scal.

Luego, para obtener las interacciones entre las proteínas (fig.19 y fig.20), estas se analizaron utilizando el software en línea “STRING” (Szklarczyk, 2015); después, los archivos “*.tsv” generados en STRING fueron visualizados en el programa “Cytoscape”, un software utilizado comúnmente para visualizar redes de interacción molecular (Shannon, 2003), y finalmente, las proteínas fueron agrupadas haciendo uso del algoritmo de detección molecular compleja “MCODE” por sus siglas en inglés, cuya función es detectar interacciones proteína-proteína

conectadas de forma densa en el interactoma; esto lo hace en 3 pasos: i) primero asigna un puntaje “score” alto a los nodos (proteínas) con elevadas interacciones próximas, ii) después forma un agrupamiento conforma se va recorriendo hacia afuera del mismo para incluir más nodos con un score similar y, por último elimina, descarta los nodos que solamente tienen una unión en un agrupamiento dado (Bader, 2003).

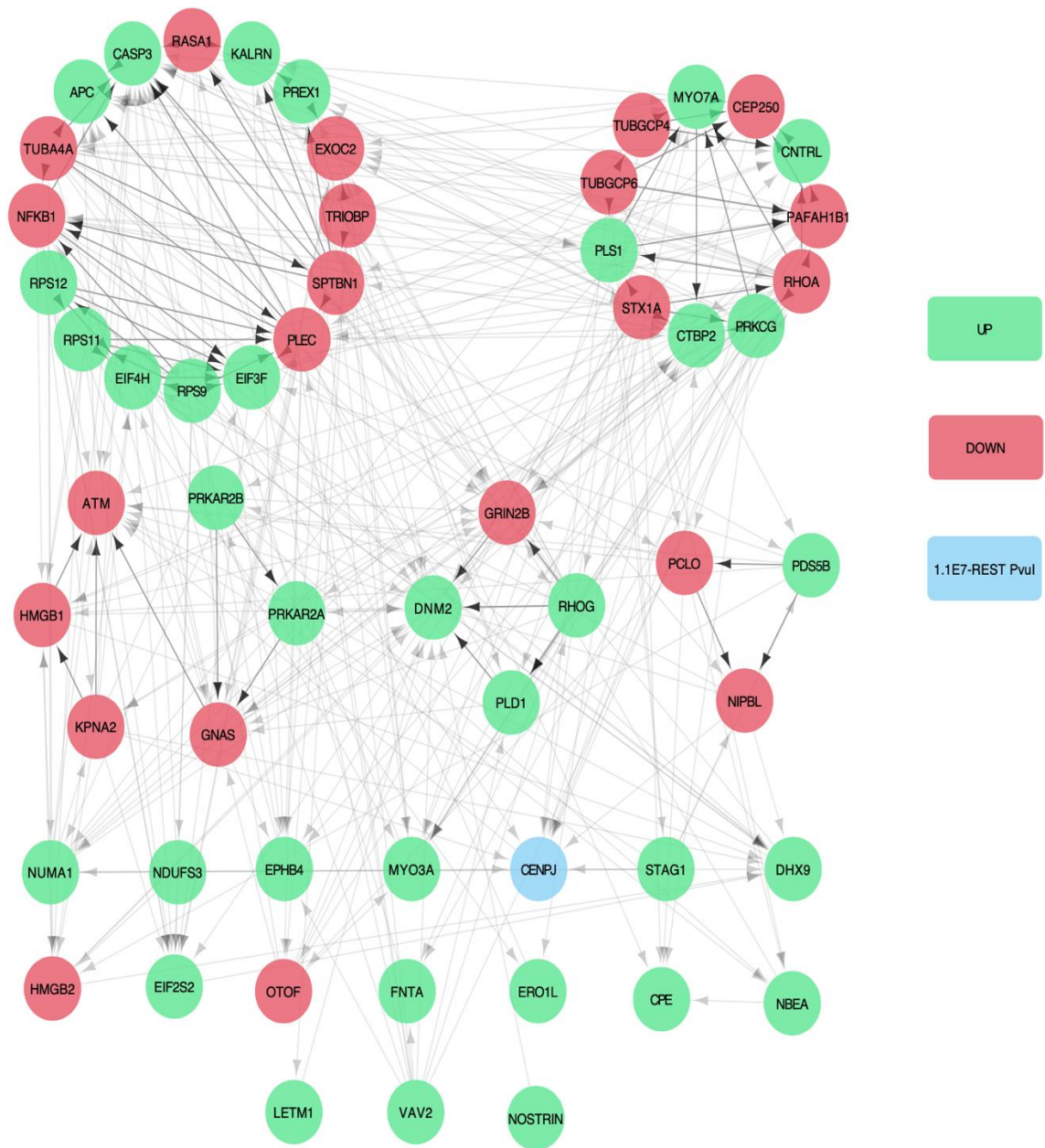


Figura 19. Interactoma de proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST PvuI

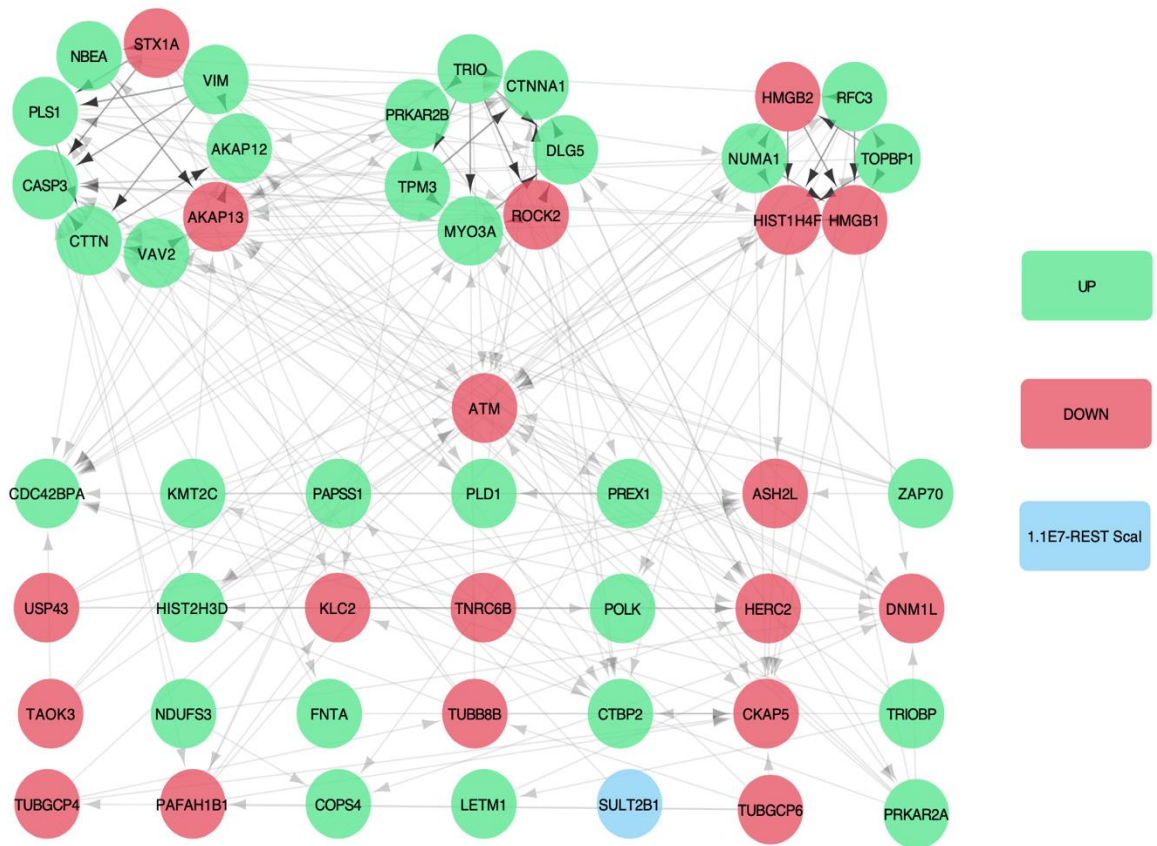


Figura 20. Interactoma de proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST Scal

Con la información de los análisis anteriores fue posible determinar las interacciones (fig. 21 a) y b)) y las proteínas por cada condición (tabla 4 y tabla 5) que participan en 3 rutas metabólicas asociadas a la insulina, denominadas por REACTOME como: i) Procesamiento de insulina, ii) Péptido 1 similar al glucagón regula la secreción de insulina y iii) Regulación de la secreción de insulina.

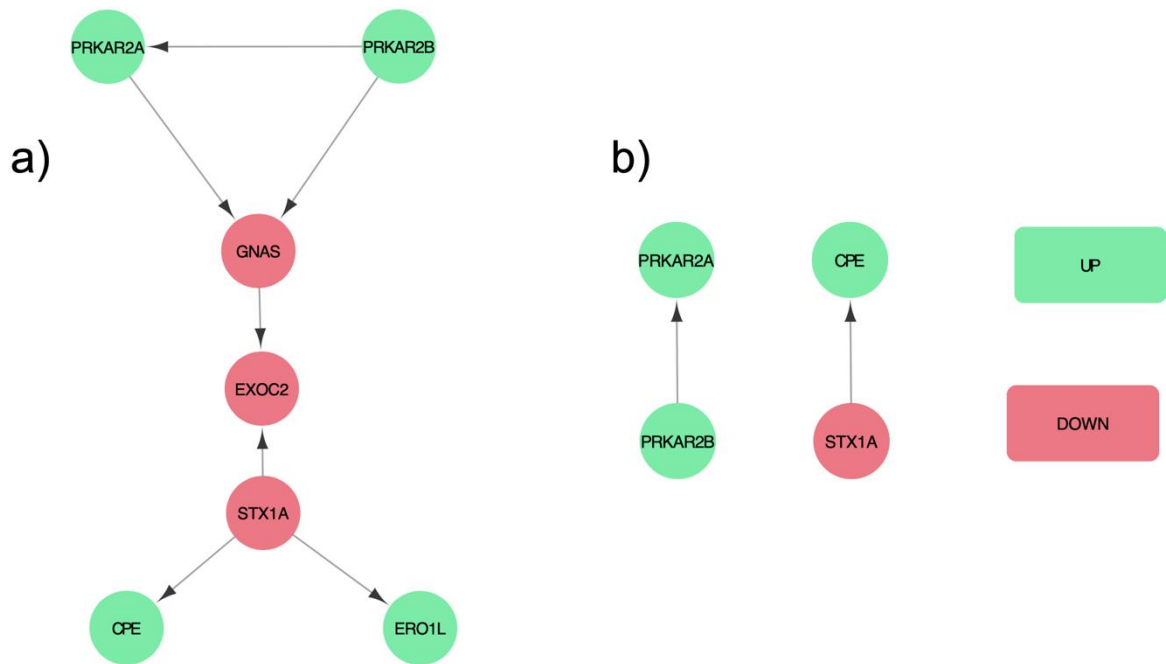


Figura 21. Interacción de proteínas asociadas a insulina en a) 1.1E7-REST PvuI y b) 1.1E7-REST Scal

Tabla 4. Proteínas asociadas a insulina en 1.1E7-REST PvuI

Protein	Gen	Condition	Description	Peptide count	Unique peptides	Relative change
P13861	PRKAR2A	up	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	6	1	15.55
P16870	CPE	up	Carboxypeptidase E	5	1	9.47
P31323	PRKAR2B	up	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	7	3	3.03
Q96HE7	ERO1L	up	ERO1-like protein alpha	6	2	2.71
Q5JWF2	GNAS	down	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	23	7	-2.36
Q96KP1	EXOC2	down	Exocyst complex component 2	2	1	-7.62
Q16623	STX1A	down	Syntaxin-1A	6	2	-11.83

Tabla 5. Proteínas asociadas a insulina en 1.1E7-REST Scal

Protein	Gen	Condition	Description	Peptide count	Unique peptides	Relative change
P13861	PRKAR2A	up	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	6	1	20.56
P16870	CPE	up	Carboxypeptidase E	5	1	3.18
P31323	PRKAR2B	up	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	7	3	3.08
Q16623	STX1A	down	Syntaxin-1A	6	2	-2.72

Como puede observarse en las tablas 4 y 5, entre las condiciones 1.1E7-REST Pvul y 1.1E7-REST Scal solamente se identificaron y cuantificaron 7 proteínas diferentes asociadas a la insulina, de las cuales se describirá brevemente su función molecular a continuación:

El gen *PRKAR2B* codifica para la subunidad reguladora tipo II “RII β ”, de la proteína quinasa “PKA” dependiente de cAMP, holoenzima involucrada en la fosforilación de proteínas que consta de dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras, éstas últimas actúan como un inhibidor cuando están adheridas a la región catalítica de PKA (Burton, 2007); en este sentido, RII β y la subunidad RII α , codificada por el gen *PRKAR2A*, interactúan con proteínas y estructuras celulares que parecen localizar la PKA en sitios subcelulares específicos (Scott, 1990), además las regiones del extremo N terminal de la subunidad reguladora tipo II (RII α y RII β) participan en el anclaje de esta a la proteína asociada a microtúbulos 2 “MAP2” (Luo, 1990) y a proteínas de anclaje A-quinasa “AKAPs” del citoesqueleto (Diviani, 2001). Cabe mencionar que la inactivación de PKA mediada por un exceso de sus subunidades reguladoras no ha sido analizada, sin embargo, cuando se hace uso de dihidrocloruro H-89 para inhibir la función de PKA, resulta en un aumento considerable de la desalineación cromosómica del huso durante la metafase, que puede provocar aneuploidía (Vandame, 2014) . Además,

estudios realizados por (Rorsman P. E., 2000) establecen que la activación de PKA por cAMP en células β -pancreáticas promueve la secreción de insulina, al aumentar el número de vesículas que están disponibles para su liberación. Aunado a lo anterior, es importante mencionar que cuando *PRKAR2A*, *PRKAR2B* y la proteína *GNAS* interactúan entre ellas, se les asocia con “Activación de PKA para señalización de glucagón”, ruta metabólica destacada en 1.1E7-REST P_{vul}, de acuerdo con REACTOME. En dicho contexto, *GNAS* es una subunidad proteica que une nucleótidos fosforilados de guanina a la proteína integral G, cuya función es actuar como receptor de glucagón en la membrana plasmática (Gelling, 2009), esta ruta metabólica en su estado activo promueve la secreción de insulina en estudios *in vivo* (Kim, 2018), sin embargo, las subunidades reguladoras de PKA están sobre-expresadas en ambas condiciones (1.1E7-REST P_{vul} y 1.1E7-REST Scal), de manera que es probable que la PKA no esté activa, además de que la proteína *GNAS* se encuentra sub-expresada (en 1.1E7-REST P_{vul}); considerando lo anterior, es posible que la ruta metabólica de activación de PKA esté reprimida.

Por otra parte, *STX1A* codifica a una proteína que, al interactuar con las proteínas SNAP-25 y VAMP forma un complejo heterotrimérico denominado SNARE (receptor de proteínas de fijación soluble) (Südhof, 2009), mismo que, facilita la fusión del gránulo secretor de insulina con la membrana plasmática y la liberación de la misma (Liang, 2017); a su vez, *EXOC2* es una subunidad del exocisto, un complejo multiproteico de 8 subunidades que dirige las vesículas de insulina a diversos sitios de la membrana plasmática (Gromley A. Y., 2005) y también actúa en conjunto con el complejo SNARE a través de un mecanismo desconocido (Dubuke, 2015). Tomando en cuenta lo anterior, es posible que la secreción de insulina esté desfavorecida en ambas condiciones (1.1E7-REST P_{vul} y 1.1E7-REST Scal), puesto que la translocación de las vesículas y la fusión de estas con la membrana plasmática está afectada.

Ahora bien, *CPE* participa (junto a las peptidasas PC1/3 y PC2) en el proceso de maduración de la insulina; estudios en ratón sugieren que la proinsulina es

escindida primeramente por PC1/3 en la unión entre el péptido B y C, de tal forma que después este sitio es procesado por *CPE* y, posteriormente ocurre un proceso similar con PC2 en la unión entre el péptido A y C (Seidah, 2012). De manera interesante, (Teitelman, 2019) realizó estudios de inmunofluorescencia en islotes de pacientes con diabetes tipo II para evaluar la expresión de las 3 peptidasas y, sobre *CPE* encontró que no hay cambios en su expresión, a pesar de que este tipo de pacientes se caracterizan por tener altos niveles de proinsulina; considerando lo anterior y, lo que se ha discutido hasta este punto se permite sugerir que (al igual que en los resultados previos donde se obtuvo que REST regula de forma positiva a PDX-1), la sobreexpresión de REST podría estar involucrada de forma directa o indirecta en la sobreexpresión de *CPE* en 1.1E7-REST P_{vul}, ya que aún en estado diabético, no hay cambios en la expresión de esta proteína.

Finalmente, *ERO1L* es una glicoproteína ubicada en el lumen del retículo endoplasmático y favorece la formación de puentes disulfuro mediante la oxidación selectiva de la proteína disulfuro isomerasa "PDI" (Mezghrani, 2001). Además, diversos autores han sugerido que *ERO1L* podría regular la progresión de diversos tumores, entre ellos los asociados a cáncer de mama (Kutomi, 2013) y adenocarcinoma de pulmón (Hsu, 2016). Bajo esa óptica, (Han, 2018) y colaboradores estudiaron su alta expresión en pacientes con cáncer de páncreas y determinaron que la sobre-expresión de *ERO1L* se asocia con la migración, invasión y crecimiento de este tipo de cáncer, por medio de diversas rutas metabólicas de señalización como Wnt/catenina. Por ello, se propone que la sobreexpresión de *ERO1L* en 1.1E7-REST P_{vul} podría estar asociada al crecimiento de las células que, si bien no fue mayor que el de las células 1.1E7 (control) sí fue mayor respecto a 1.1E7-REST Scal.

Detección de REST, PDX-1 e Insulina por Western-blot en 1.4E7 y Vero

Pasando a la parte de los análisis en la línea celular 1.4E7, en la tabla 6 se muestra la concentración de las muestras de extracto de proteína total para 1.4E7 y Vero, interpolados en una curva estándar de albúmina con $R^2 = 0.9938$, por el método de Lowry.

Tabla 6. Cuantificación de proteína total en 1.4E7 y Vero

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	*Volumen necesario de muestra para 40 μg (μL)
1.4E7	1.83	21.8
Vero	2.38	16.8

Como ya se mencionó en la metodología experimental, con los datos anteriores se procedió a realizar un gel desnaturalizante de acrilamida / bisacrilamida (30% / 0.8%) al 10%, mismo que se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (0.22 μm) y se tiñó con rojo de ponceau (fig.22). Hasta este punto, se puede apreciar una transferencia relativamente homogénea de las proteínas entre los carriles, mismos que fueron escindidos en grupos de 2 carriles para la detección de REST, PDX-1, insulina y β -actina en 1.4E7 y Vero.

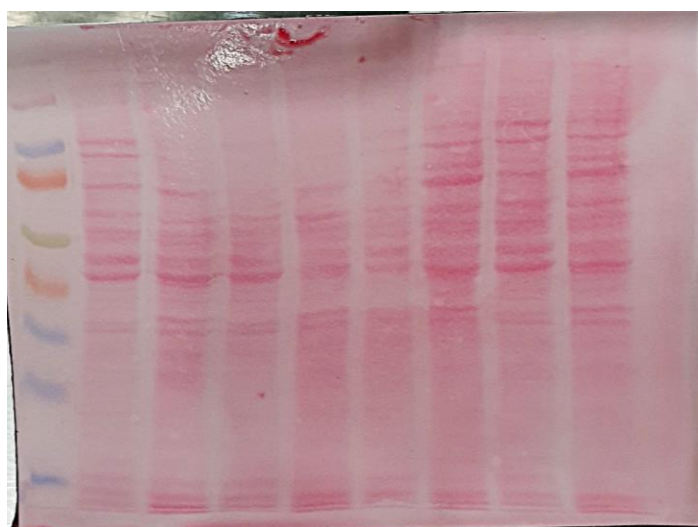


Figura 22. Transferencia en membrana de nitrocelulosa

Los western blot para la detección de REST, PDX-1, insulina y β -actina se muestran en la fig. 23, en los incisos a), b), c) y d), respectivamente.

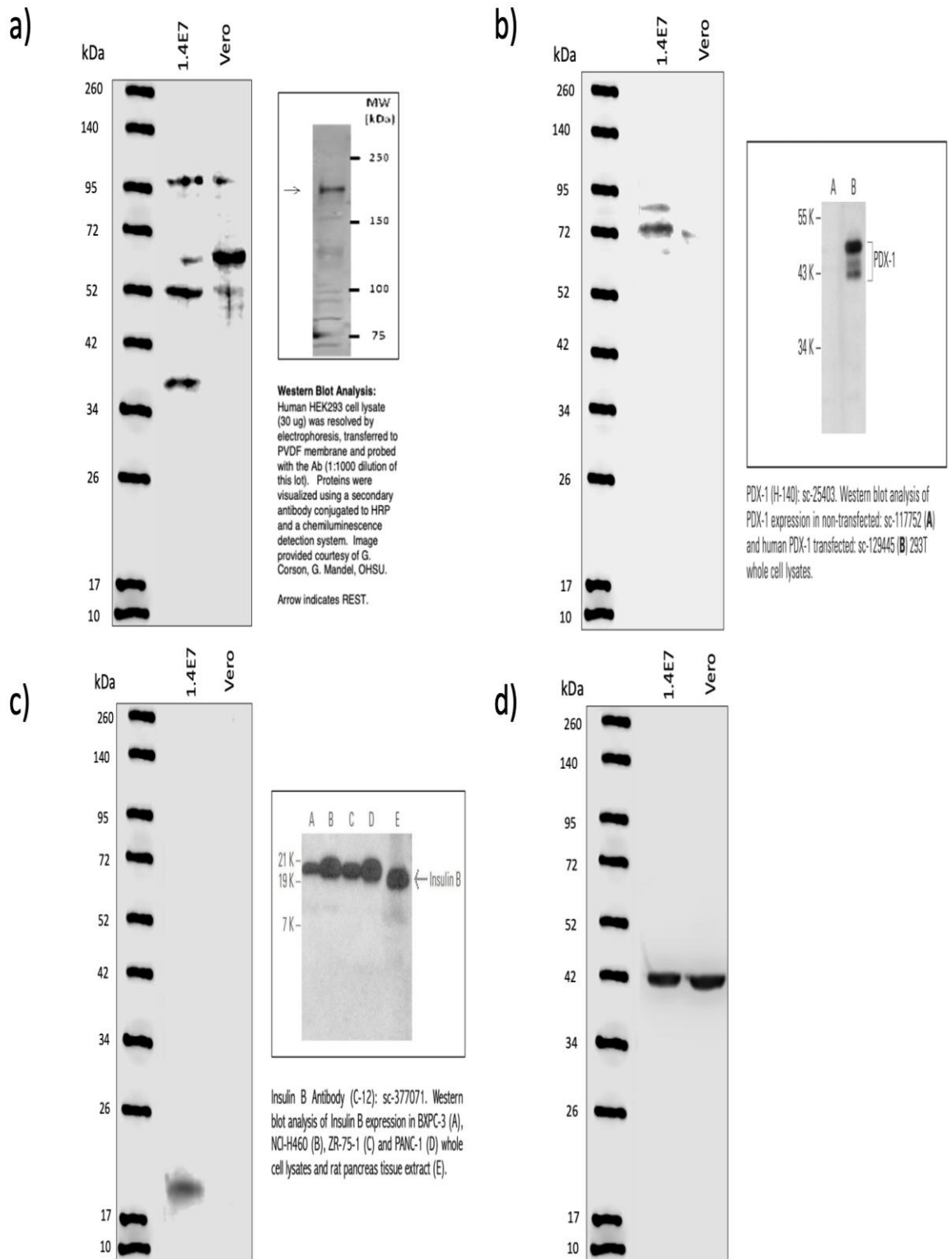


Figura 23. Detección de REST, PDX-1 e Insulina en extractos de 1.4E7 y Vero

Sobre la detección de REST es importante señalar que, de acuerdo con los datos de la hoja de especificaciones del anticuerpo utilizado (07-579), no se detectó a REST en los extractos de proteína total de 1.4E7 ni en lo de Vero (utilizado como control); si bien hay detección de bandas, estas también se encuentran en la referencia de la hoja de especificaciones del anticuerpo y son descritas como uniones inespecíficas, no obstante, cabe mencionar que estas podrían ser isoformas de REST que resultan del splicing alternativo y que se han descrito como isoformas que no actúan de forma similar a REST debido a que carecen del extremo N o C terminal y esto, a su vez, impide la unión a correpresores (Abramovitz, 2008).

Por otra parte, acerca de la detección de PDX-1 se puede comentar que, la detección de 3 bandas por encima del tamaño en kDa sugerido por la hoja de especificaciones del anticuerpo (H-140) en el extracto de 1.4E7 puede ser debido a una interacción de PDX-1 con otras proteínas o por modificaciones postraduccionales propias de la línea celular; tal es el caso de la detección de Insulina, ya que en la hoja de especificaciones del anticuerpo (C-12) se indica que la detección de la cadena B de insulina, en extractos totales de la línea celular PANC-1 (inciso "D)", en la hoja de especificaciones) se da en ~20 kDa, aun cuando la insulina tiene un peso molecular de 5.8 kDa y la cadena B de insulina de ~ 3kDa. De manera interesante, es preciso recordar en este punto que, la línea celular 1.4E7 es producto de electrofusión de cultivo primario de células β -pancreáticas humanas con la línea células PANC-1.

Como último comentario en este apartado, la detección de β -actina se obtuvo en el tamaño adecuado ~42kDa y se observó una carga similar entre los extractos de 1.4E7 y Vero; no se insertó alguna referencia dado que, como se mencionó en la metodología experimental, este anticuerpo monoclonal fue producido y proporcionado por el Dr. José Hernández del Depto. de Biología Celular del CINVESTAV.

Análisis por MS de 1.4E7

En la tabla 7 se muestra la concentración de la muestra del mismo extracto de proteína de 1.4E7 utilizado previamente, pero interpolado en una curva estándar de albúmina con $R^2 = 0.9860$, con el kit 2D-Quant.

Tabla 7. Cuantificación de proteína total en 1.4E7

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	*Volumen necesario de muestra para 50 μg (μL)
1.4E7	1.56	32.01

Ahora bien, la cantidad de péptidos identificados usando el modo HDMS^E se representaron en un histograma de error en ppm (fig.24), en este se observa una distribución normal de error con la mayoría de péptidos (95.11%) ubicados a no más de ± 10 ppm de error, lo cual indica una correcta calibración del espectrómetro de masas; además, nuevamente se cumple con lo establecido de acuerdo a las “FOM” descritas por (Martins, 2017).

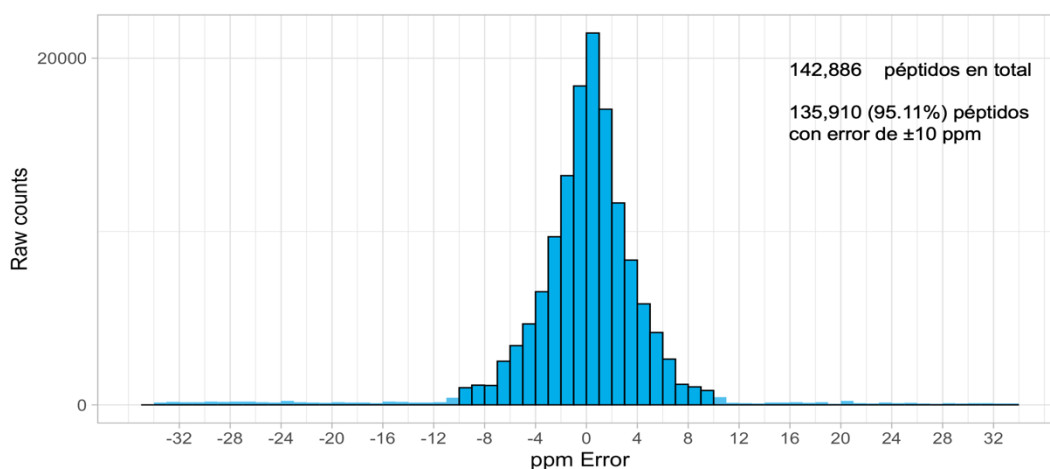


Figura 24. Histograma de frecuencias absolutas de péptidos (con error en ppm) en 1.4E7

De manera similar al análisis previo por MS, se realizó un gráfico de pastel (fig. 25) en el cual se muestra que la mayor cantidad de péptidos (46.79%) son clasificados como *Pepfrag1* y son los más confiables de acuerdo con lo descrito por

(Li G. Z., 2009), ya que, como se mencionó anteriormente estos son identificados y cuantificados durante el primer pase del algoritmo “PROGENESIS”.

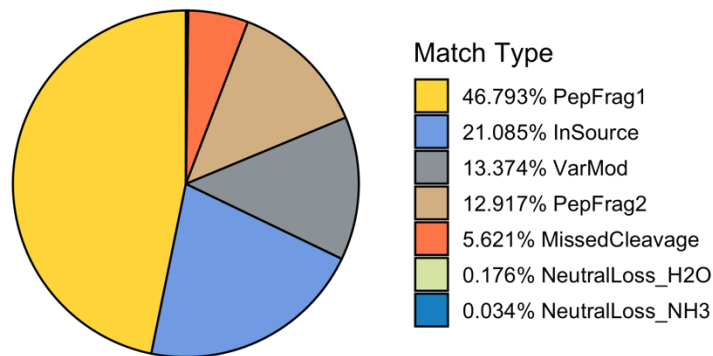


Figura 25. Gráfico de pastel de clasificación de péptidos (con base en su identificación) en 1.4E7

En este sentido, a nivel de proteínas fueron identificadas y cuantificadas un total de 1011 proteínas, las cuales fueron graficadas de acuerdo con su rango dinámico (fig.26). El rango dinámico, que en este caso es de una sola muestra, se utiliza principalmente para verificar la sensibilidad del equipo, ya que, como se mencionó previamente, teóricamente un espectrómetro de masas en la actualidad tiene la capacidad de identificar proteínas a niveles de expresión de hasta 6-7 órdenes de magnitud (expresado como \log_{10}), para este experimento los resultados mostraron una sensibilidad dentro del rango teórico en el equipo Synapt G2-Si, debido a que las proteínas rondan ~ 6 órdenes de magnitud.

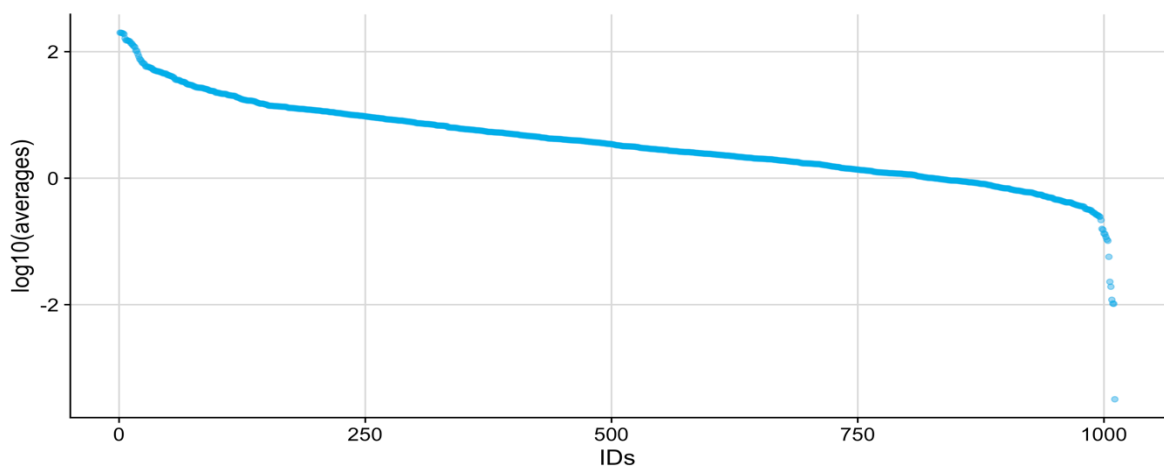


Figura 26. Rango dinámico en 1.4E7

Posteriormente, las 1011 proteínas fueron analizadas haciendo uso del software en línea “REACTOME” con la finalidad de determinar las rutas metabólicas en las que participan y que estuvieran asociadas a la insulina. Los resultados mostraron 8 rutas metabólicas denominadas por REACTOME como: i) Los efectos de la insulina incrementan la síntesis de xilulosa 5-fosfato, ii) La acetilcolina regula la secreción de insulina, iii) Reciclaje del receptor de insulina, iv) Péptido 1 similar al glucagón regula la secreción de insulina, v) Procesamiento de insulina, vi) Cascada de señalización del receptor de insulina, vii) Señalización del receptor de insulina y viii) Regulación de la secreción de insulina.

Por consiguiente, se obtuvieron las proteínas involucradas en esas rutas metabólicas y, con ellas se construyó un pequeño interactoma en “STRING” y se visualizó en “Cytoscape” como se muestra en la fig. 27.

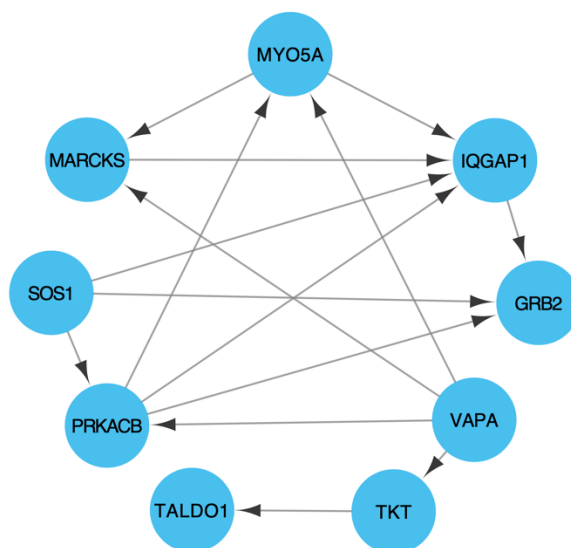


Figura 27. Interacción de proteínas asociadas a insulina en 1.4E7

La cuantificación absoluta de cada una de las proteínas contenidas en el interactoma previo se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Proteínas asociadas a insulina en 1.4E7

Accesion	Gen	Description	Peptide count	Unique peptides	Absolute expression (fmol/ μ L)
P37837	TALDO1	Transaldolase	8	8	10.34
P29966	MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	4	4	4.22
Q9P0L0	VAPA	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	4	2	9.92
P46940	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	34	22	20.50
Q9Y4I1	MYO5A	Unconventional myosin-Va	5	2	5.94
J3KT38	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2 (Fragment)	1	1	1.15
P29401	TKT	Transketolase	7	5	21.56
B1APF7	PRKACB	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta (Fragment)	1	1	2.19
Q07889	SOS1	Son of sevenless homolog 1	1	1	17.07

Hasta aquí cabe mencionar que, de acuerdo con los análisis de “STRING”, estas proteínas tienen función molecular de actividad transferasa con grupos aldehídos o cetónicos, así como unión específica de dominios proteicos. Considerando lo anterior es importante señalar que, aun cuando el análisis proteómico en este caso es más austero en comparación con el que se hizo en 1.1E7 y sus transfectantes estables, se obtuvieron resultados interesantes ya que hubo un mayor número de identificaciones de rutas metabólicas asociadas a insulina, así como de proteínas que interactúan en estas; además, cabe recordar que, como se mencionó en la metodología experimental, este fue un análisis por MS de cuantificación absoluta para una sola condición que, en este caso, fue 1.4E7 y se realizó con la finalidad de: i) tener un panorama más amplio de la línea celular previo a su transfección, ii) estandarizar otro método de digestión de proteínas y iii) estandarizar el análisis por MS para cuantificación absoluta; a propósito, se sugiere digerir mayor cantidad de muestra de 1.4E7 para aumentar el número de identificaciones y cuantificaciones, para experimentos futuros.

Viabilidad celular de 1.4E7

Previo a realizar la transfección estable en 1.4E7, se realizaron experimentos de viabilidad celular en esta línea celular con diferentes concentraciones de G418, a un 90% de confluencia (a la que se realizó la transfección) y se monitorearon cada 24h durante 8 días, tiempo en el que, como se muestra en la fig. 28, las células con mayor concentración de G418 tuvieron una confluencia ~50%, de manera que se hizo la prueba de viabilidad con rojo neutro, misma que se resume en la tabla 9. Con estos resultados, se optó por utilizar G418 a 500 µg/mL para la selección de las transfectantes estables, ya que, además fue la concentración a la cual la división celular se vio interrumpida desde las 24 h.

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular en 1.4E7 tratada con G418

Muestra	Abs 540nm	% Viabilidad
1.4E7	3.3145	100
1.4E7 300 µg/mL G418	2.7425	82.74
1.4E7 400 µg/mL G418	2.0625	62.23
1.4E7 500 µg/mL G418	1.3715	41.38

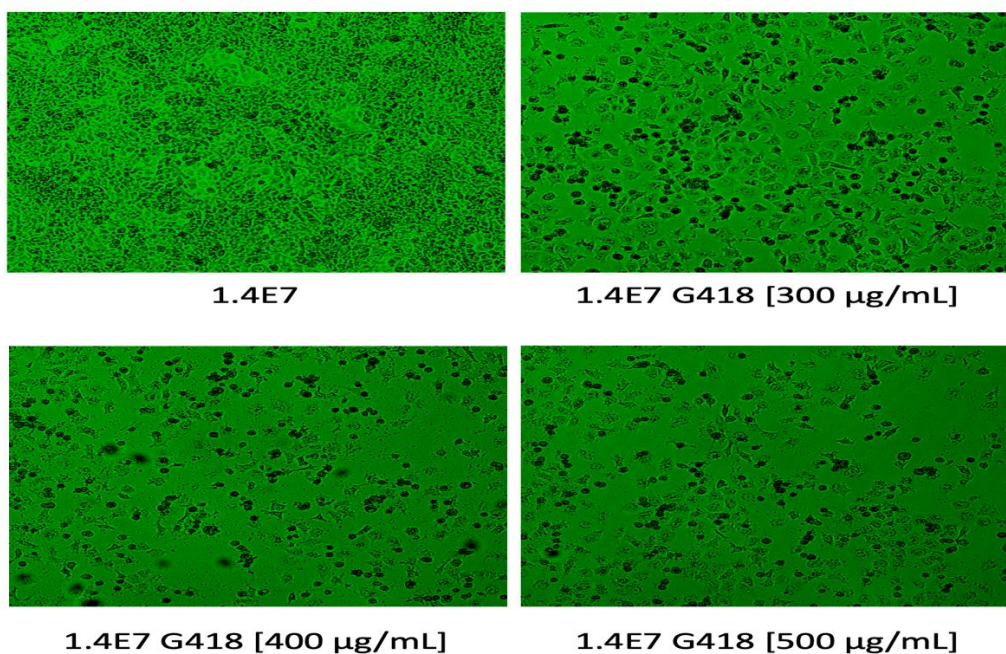


Figura 28. Confluencia de 1.4E7 a diferentes concentraciones de G418 después de 8 días

Construcción de transfectantes estables 1.4E7-REST PvuI y 1.4E7-REST ScaI

Para esta parte del proyecto, se realizó la extracción (MEGAprep de Qiagen) y cuantificación de DNA plasmídico de DH5 α transformadas con el plásmido pQBI de 6.6 kbp (para el control) y de DH5 α transformadas con el plásmido pQBI-REST de 9.8 kbp; la cuantificación se resume en la tabla 10.

Tabla 10. Cuantificación de pQBI y pQBI-REST

Cuantificación de DNA	(ng/ μ L)	260/280	Total
pQBI	476.762	1.863	6 mL
pQBI-REST	404.02	1.875	6 mL

Con lo anterior, se comprobó que se extrajo una cantidad más que suficiente, de DNA plasmídico para poder realizar los experimentos posteriores, además de que en ambos casos se cumplió con el límite de pureza para DNA, ya que la relación 260/280 es mayor a 1.8.

Posteriormente se corroboró la linealización (en geles de agarosa al 0.8%) de los plásmidos pQBI (control) y pQBI-REST con las enzimas PvuI y ScaI, así como con BamHI y HindIII para pQBI-REST, con la finalidad de extraer el inserto de REST de \sim 3.2 kbp, cargando en cada carril 80 ng de DNA; las restricciones para pQBI y pQBI-REST se representan en la fig.29 y fig. 30, respectivamente.

En las figuras se puede apreciar que, hay 2 conformaciones en cada uno de los plásmidos que, pertenecen a las de relajado y enrollado; asimismo, se corroboró el tamaño de cada uno de los plásmidos por medio de su linealización con las enzimas previamente mencionadas y, en la doble restricción se extrajo el fragmento de REST.

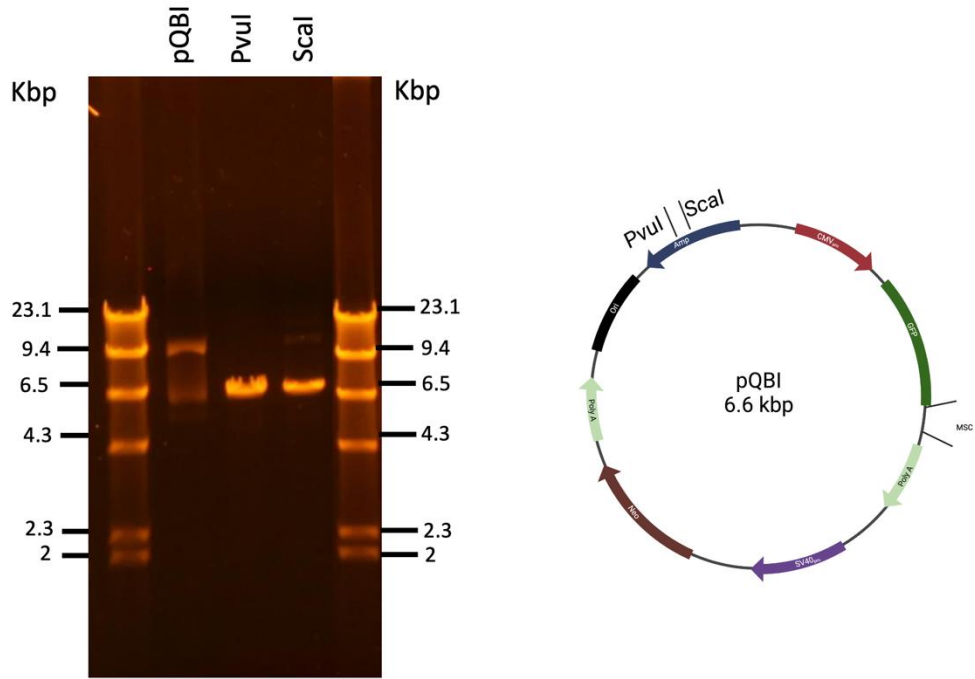


Figura 29. Restricciones en pQBI

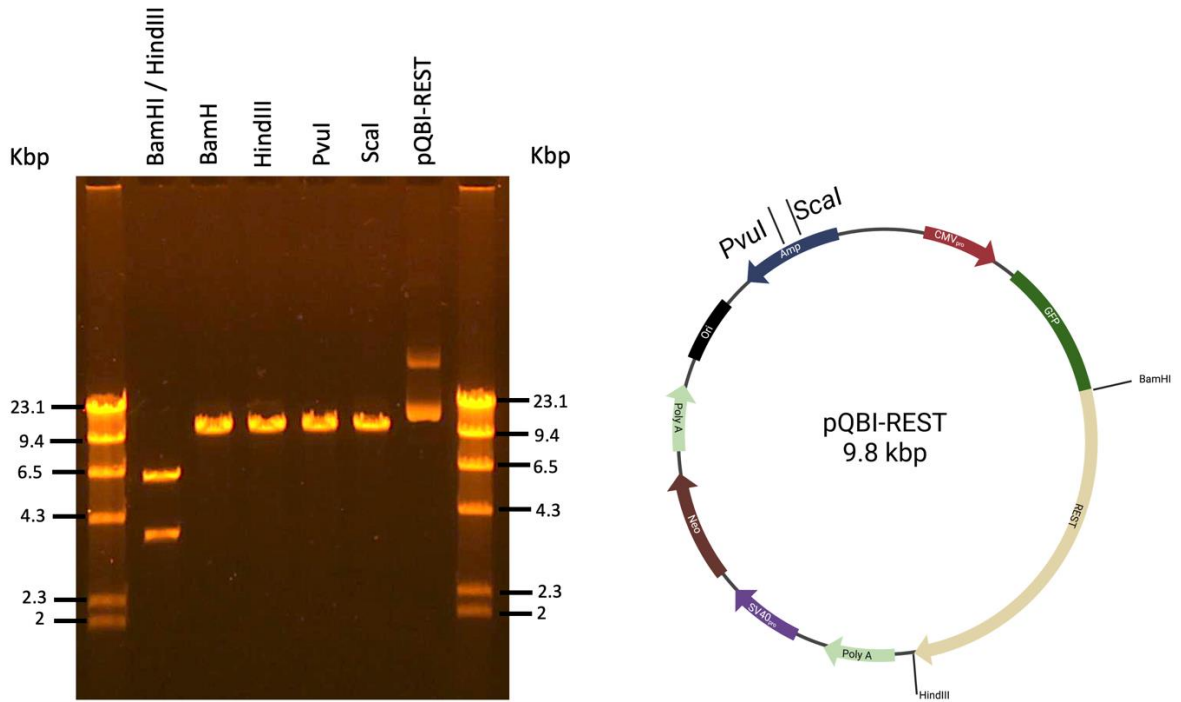


Figura 30. Restricciones en pQBI-REST

Por consiguiente, se consideró que para cada condición de transfección (1.4E7 pQBI, 1.4E7 pQBI-REST PvuI y 1.4E7 pQBI-REST ScaI) se requerían 24.75 µg de DNA para probar las concentraciones de 5.5µg, 8.25µg y 11 µg; de tal forma que se llevaron a cabo las restricciones enzimáticas resumidas en la tabla 11, tomando en cuenta el material necesario para corroborar la linealización de los plásmidos en un gel de agarosa al 0.8% (fig. 31) y cuantificar nuevamente (tabla 12).

Tabla 11. Restricciones enzimáticas para transfección estable

pQBI PvuI		pQBI-REST PvuI		pQBI-REST ScaI	
80 µL	DNA (38.14 µg)	80 µL	DNA (32.321 µg)	80 µL	DNA (32.321 µg)
8 µL	PvuI [10U/µL] (80U)	8 µL	PvuI [10U/µL] (80U)	4 µL	ScaI [20U/µL] (80U)
10 µL	Buffer r3.1	10 µL	Buffer r3.1	10 µL	Buffer rCutSmart
2 µL	Agua	2 µL	Agua	6 µL	Agua

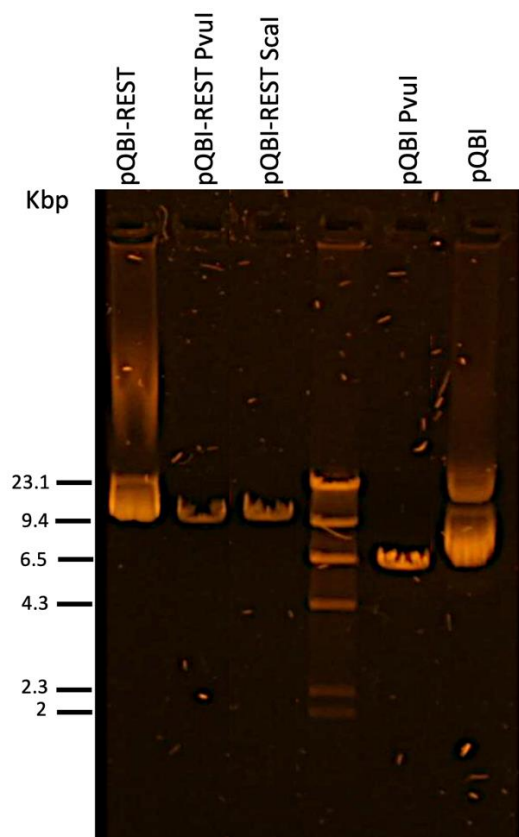


Figura 31. Restricciones en pQBI y pQBI-REST para transfección estable

Tabla 12. Cuantificación de pQBI y pQBI-REST para transfección estable

Cuantificación de DNA post-restricción	(ng/ μ L)	260/280	Total
pQBI PvuI	331.8	2.001	100 μ L
pQBI-REST PvuI	317.8	1.992	100 μ L
pQBI-REST Scal	316.1	2.006	100 μ L

Como se esperaba, la concentración de DNA disminuyó en todas las condiciones al diluirse en un 20%, respecto de la concentración inicial; una vez que se obtuvo el material plasmídico restringido, se realizó la siembra de células $1.4E7$ en cajas p60, de tal forma que a las 24 h estuvieran al 90% de confluencia (fig. 32) para poder realizar la transfección, misma que se llevó a cabo como se muestra, de manera resumida en la tabla 13.

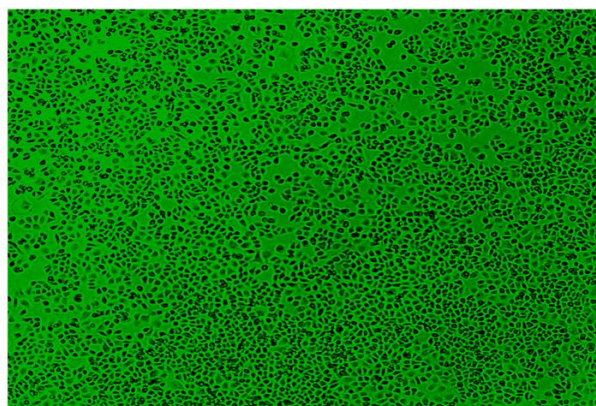


Figura 32. Visualización de $1.4E7$ al 90% de confluencia, previo a transfección

Tabla 13. Relación de Lipofectamina LTX, reactivo plus, OptiMEM y DNA para transfección estable en $1.4E7$

DNA (μ g)		5.5	8.25	11	Total
pQBI	OptiMem (μ L)	277.92	266.89	255.84	300 μ L (por condición) + 300 μ L Lipofectamina LTX/ OptiMem (v:v)
	Plásmido [PvuI] (μ L)	16.58	24.86	33.16	
	Reactivo Plus (μ L)	5.5	8.25	11	
pQBI-REST	OptiMem (μ L)	277.19	265.79	254.38	300 μ L (por condición) + 300 μ L Lipofectamina LTX/ OptiMem (v:v)
	Plásmido [PvuI] (μ L)	17.31	25.96	34.62	
	Reactivo Plus (μ L)	5.5	8.25	11	
	OptiMem (μ L)	277.1	265.74	254.2	300 μ L (por condición) + 300 μ L Lipofectamina LTX/ OptiMem (v:v)
	Plásmido [Scal] (μ L)	17.4	26.01	34.8	
	Reactivo Plus (μ L)	5.5	8.25	11	

De forma subsecuente, como se indica en la metodología, las células transfectadas fueron cultivadas durante 24 h y después se les cambió el medio, agregando G418 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y, después de 24 h (48 h post-transfección) fueron visualizadas para corroborar la expresión (fig. 33).

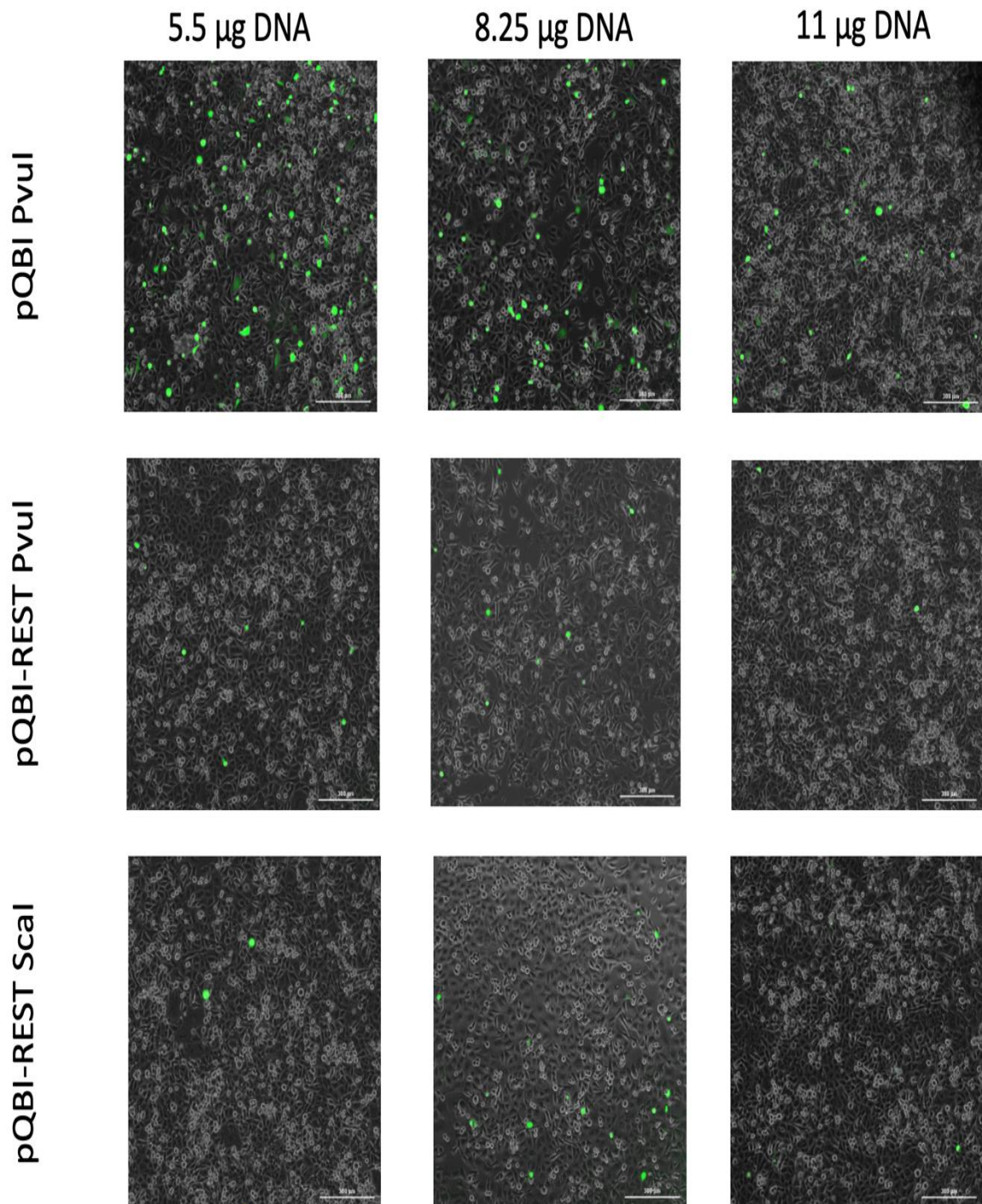


Figura 33. Expresión de GFP en transfectantes estables 1.4E7

Como puede observarse, en las $1.4E7$ transfectadas con el plásmido control (pQBI) la mayor eficiencia de transfección se obtuvo a una concentración de $5.5 \mu\text{g}$ de DNA, mientras que para las $1.4E7$ -REST PvuI y $1.4E7$ -REST ScaI, la mayor eficiencia de transfección se obtuvo a una concentración de $8.25 \mu\text{g}$ de DNA. En este sentido es importante destacar que, tomando en cuenta que el proceso de transfección por sí mismo es agresivo con las células y considerando el tamaño de los plásmidos (6.6 kbp y 9.8 kbp) con los que se llevó a cabo la transfección, de manera general se consideró el proceso de transfección como eficiente, ya que, de acuerdo con lo que se trabajó previamente en nuestro equipo de laboratorio (en $1.1E7$), la transfección suponía un problema ya que la eficiencia y el éxito del experimento era muy variable.

Posteriormente, se llevó a cabo el cell sorting para la selección de células GFP + y se colocaron en placas de 96 pozos como se ilustra en la fig. 34, además las células recolectadas en "pool": i) 30,270 pQBI PvuI, ii) 5,810 pQBI-REST PvuI y iii) 4,010 pQBI-REST ScaI, fueron cultivadas en placas p100 y se siguió el cultivo de estas, con la finalidad de poder realizar análisis futuros asociados a la expresión de insulina en esta línea celular.

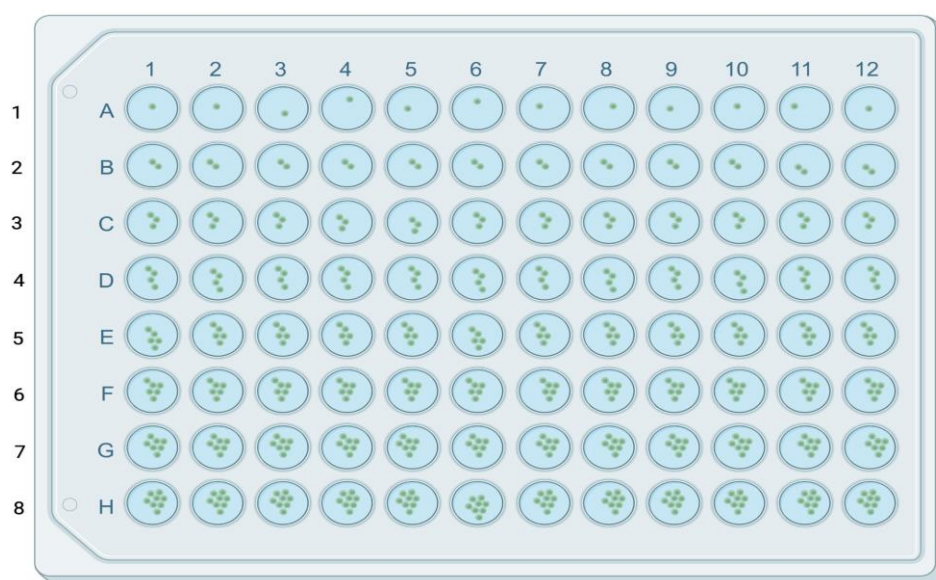


Figura 34. Distribución de células GFP + (por cell sorting) en placas de 96 pozos

Por último, llegados a este punto del proyecto es importante destacar las 2 principales diferencias entre 1.1E7 y 1.4E7, de acuerdo con el grupo de investigación de (McCluskey, 2011), quienes desarrollaron ambas líneas celulares: i) tienen una máxima secreción de insulina de 1.6 y 1.5 veces más a 11.1 mM y 5.6 mM de glucosa, respectivamente, ii) el calcio intracelular estimulado por glucosa es significativamente mayor en 1.4E7 y, con ello, considerando lo establecido en el marco teórico, es probable que la señalización de la formación del complejo SNARE para la fusión de vesículas con la membrana celular esté favorecida. Además, cabe mencionar que, mientras se trabajaba en los experimentos de la línea celular 1.1E7 se publicó en ECACC que la línea celular estaba contaminada con DNA de rata y fue descontinuada; no obstante, se han seguido publicando artículos con esta línea celular debido a que funciona como modelo de estudio, recientemente es el caso de (Díaz-Ganete, 2021) en donde se determinó la toxicidad de citoquinas, glucosa y lípidos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos de expresión diferencial en las líneas celulares de 1.1E7 sugieren que proteínas como *PRKAR2A*, *PRKAR2B* y *GNAS* pudieran estar alterando procesos asociados a la secreción de insulina; asimismo, es posible que *EXOC2* y *STX1A* estén perturbando el proceso de translocación y fusión de vesículas con la membrana plasmáticas, mientras que *CPE* y *ERO1L* estarían afectando el procesamiento de la insulina y el crecimiento celular, respectivamente.

Por su parte, los análisis en 1.4E7 indican que no hay expresión de REST en esta línea celular, que PDX-1 podría tener modificaciones postraduccionales debido al peso molecular elevado en el que se detectó y que la insulina detectada es similar a la insulina de los extractos de la línea celular PANC-1, con la cual se desarrollaron las líneas 1.1E7 y 1.4E7. Además, el análisis por MS permitió: i) identificar proteínas involucradas en diversas etapas de la expresión de insulina y ii) estandarizar un método de cuantificación absoluta por MS.

Por último, se determinó una alta eficiencia de transfección en 1.4E7 con 8.25 μg de pQBI-REST, en cualquiera de sus condiciones (PvuI y Scal) y su mantenimiento óptimo a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418.

Perspectivas

Se propone analizar diferentes candidatos de transfectantes estables para determinar el efecto general de REST en 1.4E7, ya que al no ser una transfección dirigida su efecto puede ser variable.

También, se sugiere optimizar el proceso de análisis por MS aumentando la cantidad de proteína a digerir y el volumen de inyección al equipo.

Además, se recomienda particionar, con diferentes enfoques, los datos masivos obtenidos de MS para obtener más información acerca del proteoma de las transfectantes estables.

A propósito, sería interesante comparar las transfectantes estables de 1.1E7 y 1.4E7.

Referencias

- Abderrahmani, A. S. (2001). The transcriptional repressor REST determines the cell-specific expression of the human MAPK8IP1 gene encoding IB1 (JIP-1). . *Molecular and cellular biology*, 7256–7267.
- Abramovitz, L. S.-D. (2008). Dual role of NRSF/REST in activation and repression of the glucocorticoid response. *The Journal of biological chemistry*, 110-119.
- Adriaenssens, A. E. (2016). Transcriptomic profiling of pancreatic alpha, beta and delta cell populations identifies delta cells as a principal target for ghrelin in mouse islets. *Diabetologia*, 2156–2165.
- Alghami, A. V. (2017). Reduction of RPT6/S8 (a proteasome component) and proteasome activity in the cortex is associated with cognitive impairment in lewy body dementia. *Journal of Alzheimer's disease*, 373-386.
- American Cancer Society. (2019, June 10). *Cancer Facts and Figures*. From American Cancer Society: <http://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research>
- American Diabetes Association. (2018). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*(41), S13-S27.
- Andrés, M. E.-R. (1999). CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9873–9878.
- Andrés, M. E.-R. (1999). CoREST: a functional corepressor required for regulation of neuronal-specific gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 9873-9878.
- Ankney, J. A. (2018). Relative and Absolute Quantitation in Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Annual review of analytical chemistry*, 49-77.
- Aragón, F. K. (2015). Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human alpha-cells. *Biochimica et biophysica acta*, 343-351.
- Arias, E. &. (2007). Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes & development*, 497–518.
- Arimura A, F. J. (1981). Somatostatin: regulation of secretion. *Neuroendocrinology*, 33(4), 246–256.
- Armirotti, A. D. (2010). Achievements and perspectives of top-down proteomics. *Proteomics*, 3566-3576.
- Arnes, L. H. (2012). Ghrelin expression in the mouse pancreas defines a unique multipotent progenitor population. *PloS one*, e52026.
- Arosio, M. R.-P. (2003). Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 701–704.
- Artner, I. &. (2008). Transcriptional Regulation of Insulin Gene Expression. In S. &. Seino, *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* (pp. 13-30). Hong Kong, Japan: Springer.

- Atouf, F. C. (1997). Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. Implication of neuron-restrictive silencing factor/repressor element silencing transcription factor, a neuron-restrictive silencer. *The Journal of biological chemistry*, 1929-1934.
- Atsumi, S. H. (2008). Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 86-89.
- Azimzadeh, J. B. (2007). Structure and duplication of the centrosome. *J. Cell. Sci.*, 2139-2142.
- Bader, G. H. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, Vol 4.
- Baez, M. C. (1987). *Reactores Anaeróbicos de alta tasa*. Barcelona: Universidad Nacional.
- Bai, G. N. (1998). Single-stranded DNA-binding proteins and neuron-restrictive silencer factor participate in cell-specific transcriptional control of the NMDAR1 gene. *J. Biol. Chem.*, 1086-1091.
- Balakrishnan, L. &. (2010). Eukaryotic lagging strand DNA replication employs a multipathway mechanism that protects genome integrity. *Journa of biological Chemistry*, 6865-6870.
- Ballas, N. G. (2005). REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*, 645-657.
- Ballas, N. G. (2005). REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*, 645-657.
- Balunas MJ, K. A. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 431-441.
- Banoub, J. H. (2005). Recent developments in mass spectrometry for the characterization of nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, and nucleic acids. *Chemycal reviews*, 1869-1915.
- Bantscheff, M. S. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 1017-1031.
- Bantscheff, M. S. (2007). Quantitative mass spectrometry un proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*, 1017-1031.
- Bastion Y, S. C. (1997). Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol. Epub*, 1587-94.
- Batterham RL, e. a. (2003). Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(8), 3989-3992.
- Bessis, A. C. (1997). The neuron-restrictive silencer element: a dual enhancer/silencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 5906-5911.
- Bond, J. R. (2005). A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat. Genet.*, 353-355.
- Bondarenko, P. V. (2002). Identification and relative quantitation of mprotein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 4741-4749.

- Brandon B. Boland, C. J. (2017). The dynamic plasticity of insulin production in B-cells. *Molecular Metabolism*, 958-973.
- Braun, P. (2012). History of protein-protein interactions: from egg-white to ocmlex networks. *Proteomics*, 1478-1498.
- Brennan, R. G. (1989). The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.*(264), 1903-1906.
- Brennan, R. G. (1992). DNA recognition by the helix-turn-helix motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 100-108.
- Brereton, M. F. (2015). Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 575-591.
- Briant, L. S. (2016). Glucagon secretion from pancreatic α -cells. *Upsala journal of medical sciences*, 113-119.
- Broca, C. V. (2014). Proteasome dysfunction mediates high glucose-induced apoptosis in rodent beta cells and human islets. *PLoS one*, e92066.
- Broglio, F. G. (2003). Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. . *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 4268–4272.
- Burgoyne, R. D. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiological reviews*, 581-632.
- Burton, K. M. (2007). PKA, germ cells and fertility. *Physiology*, 40-46.
- Cabanillas F, V. W. (1992). Clinical, biologic, and histologic features of late relapses in diffuse large cell lymphoma. *Blood.Epub*, 1024-8.
- Calderón-Celis, F. E.-M. (2018). Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 715-737.
- Calderón, F. R. (2018). Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mas Spec. Reviews*, 715-737.
- Cameron, D. E. (2014). Tunable protein degradation in bacteria. *Nat. Biotechnol.*, 1276-1281.
- Campbell, J. E. (2015). Islet α cells and glucagon--critical regulators of energy homeostasis. *Nature reviews. Endocrinology*, 329–338.
- Carnesoltas-Calvo, M. (2017). Fórmula lineal para determinar la temperatura del bulbo húmedo. *Revista Cubana de Meteorología (Vol.23)*, 141-145.
- Catterall, C. G. (2005). Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev.*, 397-309.
- Cersosimo, E. S.-H. (2014). Assessment of pancreatic β -cell function: review of methods and clinical applications. *Current Diabetes Reviews*(10), 2-42.
- Chace, D. K. (2005). A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin. Chem.*, 296-309.
- Chan SJ, P. K. (1976). Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci USA (73)*, 1964-1968.

- Chang, T. O. (2001). Evidence that APC regulates survivin expression. *Cancer Res.*, 8664-8667.
- Chapman, J. D. (2013). Multiplexed and Data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling. *Mass spectrometry reviews*, 452-470.
- Chávez, B. E. (1999). *Remedios, curaciones y tratamientos médicos*. Nueva York, Estados Unidos de América: Reader's Digest.
- Chen, C. C. (2017, Sep). Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Molecular Metabolism*, 943-957.
- Chen, Y. C. (2018). Islet prohormone processing in health and disease. *Diabetes*, 64-76.
- Chen, Z. F. (1998). NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat. Genet.*, 13-142.
- Chera, S. B. (2014). Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. *Nature*, 503-507.
- Cho, J. C. (2006). Depletion of CPAP by RNAi disrupts centrosome integrity and induces multipolar spindles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 742-747.
- Cho, W. (2007). Proteomics technologies and challenges. *Genom. Proteom. Bioinformat.*, 5: 77-85.
- Chong, J. A.-R.-A. (1995). REST: A mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 80, 949-957.
- Cirillo, L. G. (2017). The elephant in the room: the role of microtubules in cancer. In M. M. Gotta, *Cell division machinery and disease* (pp. 95-124). Cham, Switzerland: Springer.
- Clevers, H. a. (2017). Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell*, 985-999.
- Cole, J. B. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. Nature reviews. Nephrology.*, 377-390.
- Craig, R. (2007). Phylogenetic tree information aids supervised learning for predicting protein-protein interaction based on distance matrices. *BMC Bioinformatics*.
- Cravatt, B. F. (2007). The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature*, 991-1000.
- Curry D.L., B. L. (1968). Requirement for calcium ion in insulin secretion by perfused rat pancreas. . *American Journal of Physiology*, 174.
- Da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of clinical medicine*, 1-17.
- de Heer, J. R. (2008). Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. *Diabetologia*, 2263-2270.
- Dellomonaco, C. C. (2011). Engineered reversal of the b-oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. *Nature*, 355-359 .
- Dezaki, K. S. (2008). Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis. *Pharmacology & therapeutics*, 239-249.

- Diaz-Ganete, A. Q.-d.-C.-S. (2021). Toxicity Induced by Cytokines, Glucose, and Lipids Increase Apoptosis and Hamper Insulin Secretion in the 1.1E7 Beta Cell-Line. *International journal of molecular sciences*, 2559.
- Dietrich, J. a. (1970). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex synthesis in Escherichia coli K12. *Eur. J. Biochem.*, 258-269 .
- Diviani, D. S. (2001). AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.*, 1431-1437.
- Dolenšek, J. R. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, e1024405.
- Domon, B. A. (2006). Mass spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 212-217.
- Dubuke, M. M. (2015). The exocyst subunit Sec6 interacts with assembled exocytic SNARE complexes. *The journal of biological chemistry*, 28245-28256.
- Eckstein, E. (1974). *Fluid Mech.* Barcelona: Shapiro.
- Edgerton, D. K. (2017). Insulin's direct hepatic effect explains the inhibition of glucose production caused by insulin secretion. *JCI Insight*, e91863.
- Egea PF, R. S. (2005). Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol*(15), 213-220.
- Eissa N, G. J. (2015). Immunomodulatory effect of ghrelin in the intestinal mucosa. *Neurogastroenterol Motil*, 27(11), 1519-1527.
- Eizirik, D. L. (2020). Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *ature reviews. Endocrinology*, 349–362.
- El-Aneed, A. C. (2009). Mass Spectrometry a review of the basics. *Applied Spectroscopy Reviews*, 210-230.
- El-Aneed, A. C. (2009). Mass Spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 210-230.
- Emens, L. A. (1992). Hepatocyte nuclear factor 1 alpha is expressed in a hamster insulinoma line and transactivates the rat insulin I gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 7300–7304.
- Ensanut. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. From https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- Epstein AL, e. a. (1978). Biology of the human malignant lymphomas. *Cancer*, 2379-2391.
- Erde, J. O. (2014). Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. *Journal of proteome research*, 1885-1895.
- Evans, R. M. (1988). Zinc Fingers: Gilt by Association. *Cell*, 52(1).
- Faber, C. E. (2012). Gain of function Nanu1.7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy. *Ann. Neurol.*, 26-39.
- Fabregat, A. S. (2017). Reactome Pathway analysis: a high performance in-memory approach. *BMC Bioinformatics*, 18 (1) 142.

- Faure, V. C. (2010). Cdc13 and telomerase bind through different mechanisms at the lagging- and leading-strand telomeres. *Molecular cell*, 842–852.
- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry*, 477-513.
- Floriot, S. V. (2015). C-Nap1 mutation affects centriole cohesion and is associated with a Seckel-like syndrome in cattle. *Nature communications*, 6894.
- Foster, L. J. (1998). Binary interactions of the SNARE proteins syntaxin-4, SNAP23, and VAMP-2 and their regulation by phosphorylation. *Biochemistry*, 11089–11096.
- Freedman, L. P. (1988). The function and Structure of the Metal coordination Sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature*, 334-553.
- Fry, A. (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulates protein kinase. *J. Cell Biol.*, 1563-1574.
- Fu, Z. G. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*, 25–53.
- Gahete MD, e. a. (2010). Somatostatin and its receptors from fish to mammals. *Ann N Y Acad Sci*(1200), 43–52.
- Gao, X. S. (2007). Conditional stimulation of type V and VI adenylyl cyclases by G protein betagamma subunits. *Biol Chem*, 294-302.
- Gehring, W. J. (1994). Homeodomain proteins. *Annual review of biochemistry*, 487–526.
- Gelling, R. V. (2009). Pancreatic beta-cell function overexpression of the glucagon receptor gene results in enhanced beta-cell function and mass. *American Journal of physiology*, E695-E707.
- Gemperline, D. S. (2016). Morpheus Spectral Counter: A computational tool for label-free quantitative mass spectrometry using the morpheus search engine. *Proteomics*, 920-924.
- Gerber, S. A. (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6940–6945.
- German, M. A. (1995). The insulin gene promoter. A simplified nomenclature. *Diabetes*, 1002–1004.
- German, M. S. (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes & development*, 2165–2176.
- German, M. S. (1992). The insulin and islet amyloid polypeptide genes contain similar cell-specific promoter elements that bind identical beta-cell nuclear complexes. *Molecular and cellular biology*, 1777–1788 .
- Ghiasi, S. M.-H.-P. (2019). Endoplasmic Reticulum Chaperone Glucose-Regulated Protein 94 Is Essential for Proinsulin Handling. *Diabetes*, 747–760.
- Giddings, S. J. (1982). Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo. *Diabetes*, 624–629.

- Gittes, G. K. (2009). Developmental Biology of the pancreas: A comprehensive review. *Developmental Biology*(326), 4-35.
- Giuliani, A. (2018). Extreme ultraviolet (XUV) radiation: a means of ion activation for tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 7176-7180.
- Glickman, M. R. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, 615-623.
- Glickman, M. R. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, 615-623.
- Glish, G. L. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature reviews*, 140-150.
- Godinho, S. P. (2014). Causes and consequences of centrosome abnormalities in cancer. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, vol 369.
- Goeringer, D. E. (1992). Theory of high-resolution mass spectrometry achieved via resonance ejection in the quadrupole ion trap. *Anal. Chem.*, 1434-1439.
- Goodson, H. J. (2018). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, a022608.
- Göpel, S. K. (1999). Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *he Journal of physiology*(521), 717-728.
- Granata, R. &. (2013). Products of the ghrelin gene, the pancreatic β -cell and the adipocyte. *Endocrine development*(25), 144-156.
- Grayson, M. E. (2002). *Measuring Mass: From Positive Rays to Proteins*. Philadelphia: Chemical Heritage Press.
- Greenman, I. C. (2005). The selective recruitment of mRNA to the ER and an increase in initiation are important for glucose-stimulated proinsulin synthesis in pancreatic beta-cells. *The Biochemical journal*, 291–300.
- Greenstein B, W. D. (2011). *The endocrine system at a glance*. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Grigoriev, A. (2001). A relationship between gene expression and protein interactions on the proteome scale: analysis of the bacteriophage T7 and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 3513-3519.
- Grimes, J. A. (2000). The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex. *J. Biol.*, 9461-9467.
- Groden, J. T. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 589-600.
- Gromley, A. (2003). A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *The Journal of cell biology*, 535-545.
- Gromley, A. Y. (2005). Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell*, 75-87.
- Gu, Z. E. (2014). Proteasome assembly. *Cell Mol. Life Sci.*, 4729-4745.

- Guerrera, I. C. (2005). Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience reports*, 71-93.
- Guida, N. L. (2017). The neurotoxicant PCB-95 by increasing the neuronal transcriptional repressor REST down-regulates caspase-8 and increases Ripk1, Ripk3 and MLKL expression determining necroptotic neuronal death. *Biochemical pharmacology*, 229–241.
- Gustavsson, N. W. (2009). Synaptotagmin-7 is a principal Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ -induced glucagon exocytosis in pancreas. *The Journal of physiology*, 1169–1178.
- Gut, A. K. (2001). Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine beta-cells: their function in insulin exocytosis. *Journal of cell science*, 1709–1716.
- Gylfe, E. (2016). Glucose control of glucagon secretion-'There's a brand-new gimmick every year'. *Uppsala journal of medical sciences*, 120–132.
- Haefliger, J. A. (2003). The scaffold protein IB1/JIP-1 is a critical mediator of cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells. *Journal of cell science*, 1463-1469.
- Haeusler, R. A. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature reviews*, 31-44.
- Hall, J. R. (2008). Cdt1 and Cdc6 are destabilized by rereplication-induced DNA damage. *The journal of biological chemistry*, 25356-25363.
- Han C., e. a. (2012). Functional profiles of SCN9A variants in dorsal root ganglion neurons and superior cervical ganglion neurons correlate with autonomic symptoms in small fibre neuropathy. *Brain*, 2613-2628.
- Han, F. X. (2018). ERO1L promotes pancreatic cancer cell progression through activating the Wnt/catenin pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 8996-9005.
- Hanai, T. A. (2007). Engineered synthetic pathway for isopropanol production in Escherichia coli . *Appl. Environ. Microbiol.*, 7814-7818 .
- Hankey, W. e. (2018). Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Reviews*, 159-172.
- Hannah Ben-Bassat, A. P. (1991). Farage, a novel early B cell lymphoma cell line with trisomy 11. *Science*, 513-521.
- Hardikar, A. A. (2016). *Pancreatic Islet Biology*. Sydney: Springer.
- Harding, H. P. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell*, 1099–1108.
- Harrison, S. (1991). A structural taxonomy of DNA binding domains. *Science*, 715-719.
- Harrison, S. C. (1990). DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.*(59), 933-969.
- Hauge-Evans, A. C. (2009). Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes*, 403-411.

- Hay, C. W. (2005). Glucagon-like peptide-1 stimulates human insulin promoter activity in part through cAMP-responsive elements that lie upstream and downstream of the transcription start site. *The Journal of endocrinology*, 353–365.
- Hay, C. W. (2006). Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research. *Diabetes*, 3201–3213.
- Head, W. S. (2012). Connexin-36 gap junctions regulate in vivo first- and second-phase insulin secretion dynamics and glucose tolerance in the conscious mouse. *Diabetes*, 1700-1707.
- Hedekov CJ. (1980). Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev*(60), 442-509.
- Henderson, W. a. (2005). *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds*. Chichester: John Wiley and Sons.
- Henquin, J. C. (2006). Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes*(55), 3470-3477.
- Henzen, C. (2012). Monogenic diabetes mellitus due to effects in insulin secretion. *Swiss Medical Weekly*, 1-9.
- Henzen, C. (2012). Monogenic diabetes mellitus due to defects in insulin secretion. *Swiss medical weekly*, 1-9.
- Heriyati, H. (2008). *Determinación de la actividad antioxidante, antimutagénica y anticarcinogénica de heterantina y ditaxina presente en azafran de bolita*. Ciudad de México.
- Hilf, E. (1993). Approaches to plasma desorption mass spectrometry by some theoretical physics concepts. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. , 126: 25–36.
- Hirotsune, S. F. (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat. Genet.*, 333-339.
- Hoeijmakers, J. F. (2014). Channelopathies, painful neuropathy, and diabetes: which way does the causal arrow point? *CellPress*(962), 1-7.
- Hoffmann, E. a. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Chicester, England: 3rd ed. John Wiley & Sons: Chicester, England.
- Hofmeister-Brix, A. L. (2013). The ubiquitin-proteasome system regulates the stability and activity of the glucose sensor glucokinase in pancreatic β -cells. *The biochemical journal*, 173-184.
- Holmes, J. a. (1957). Oculographic mass spectrometric monitoring of gas chromatography. . *Appl. Spectros.*, 11: 86–87.
- Holzer, P. R. (2012). Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides*, 261-274.
- Hori, Y. G. (2005). Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. *PLoS medicine*, e103.
- Hsu, C. H. (2016). Identification and Characterization of Potential Biomarkers by Quantitative Tissue Proteomics of Primary Lung Adenocarcinoma. *Molecular & cellular proteomics*, 2396-2410.
- Hu, A. N. (2016). Technical advances in proteomics: new developments in data-independent acquisition. *F1000 Research*, 419.

- Huang XF, P. A. (1995). Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J Biol Chem* 1995(270), 20417-20423.
- Huang, L. S. (1995). Detection of exocytosis at individual pancreatic beta cells by amperometry at a chemically modified microelectrode. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*(92), 9608-9612.
- Huang, X. F. (1995). Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. . *The Journal of biological chemistry*, 20417–20423.
- Huang, Y. M. (1999). Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nature neuroscience*, 867–872.
- Huang, Y. M. (1999). Transcriptional Repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat. Neuroscience*, 2, 867-872.
- Huston, R. (2020). Appendix. In *Cell Mechanics and tumor development* (p. 396). Cincinnati: World Scientific.
- Hwang, J. Y. (2018). REST, a master transcriptional regulator in neurodegenerative disease. . *Current opinion in neurobiology*, 193–200.
- Ibarz, A. (2005). *Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos*. México, D.F.: Munsiprensa.
- Iezzi, M. K. (2004). Synaptotagmin V and IX isoforms control Ca²⁺ -dependent insulin exocytosis. *Journal of cell science*, 3119–3127.
- Inagaki N., G. T. (1995). Reconstitution of I-katp e an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 270, 1166-1170.
- Inagaki, N. M. (1992). c-Jun represses the human insulin promoter activity that depends on multiple cAMP response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1045–1049.
- INEGI. (2020). From <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2020/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf>
- Inokuma, K. L. (2010). : Improvement of isopropanol production by metabolically engineered *Escherichia coli* using gas stripping. *J. Biosci. Bioeng.*, 696-701.
- Ionescu-Tirgoviste, C. G. (2015). A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Scientific reports*, 1-14.
- Ionescu-Tirgoviste, C. G. (2015). A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Scientific reports*, 14634 .
- Ito, T. C. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 4569-4574.
- J. Miller, A. D. (1985). Repetitive Zinc-Binding Domains in the Protein Transcription Factor IIIA From *Xenopus Oocytes* . *EMBO J.*, 4(1609).

- J., F. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- J., N. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnology Journal*, e1800421.
- James, A. a. (1952). Gas-liquid partition chromatography: The separation and microestimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. . *Biochem. J.*, 50: 679–690.
- Jensen, J. H.-N. (2000). Independent development of pancreatic alpha and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes*, 49, 163-176.
- Jewell, J. L. (2010). xocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, R517–R531.
- Jiménez-Badillo, S. E.-G.-M.-S. (2017). Catsper1 promoter is bidirectional and regulates the expression of a novel lncRNA. *Scientific reports*, 7(1), 13351.
- Johnson D. S., M. A. (2007). Genomewide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science*, 316, 1497–1502.
- Johnson, R. T. (2008). REST regulates distinct transcriptional networks in embryonic and neural stem cells. *PLoS biology*, e256.
- Jullien, N. &. (2011). LUEGO: a cost and time saving gel shift procedure. *BioTechniques*, 51 (4), 267–269.
- K., T. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 678-687.
- Kadonaga, J. T. (1987). Isolation of cDNA Encoding Transcription Factor Sp1 and Functional Analysis of the DNA Binding Domain. *Cell*, 51, 1079.
- Kang, H. K. (2009). Transcription factor Glis3: a novel critical player in the regulation of pancreatic β -cell development. *Mol Cell Biol*, 6366-6379.
- Kaniuk, N. K. (2007). Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes*, 930-939.
- Kanno, T. G. (2002). Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on alpha-, beta- and delta-cells of the pancreatic islet. *Neuroscience research*, 79-90.
- Karlsson, O. T. (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature*, 879–882.
- Katunuma, N. M. (2001). Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysopoptases and its biological significances in apoptosis. *Adv enzyme Regul*, 237-250.
- Keasling, J. D. (2010). Manufacturing molecules through metabolic engineering,. *Science*, 1355-1358.
- Keller, J. G. (2002). The proteasome in brain aging. *Ageind research reviews*, 279-293.

- Kerppola, T. K. (1991). Fos-Jun Heterodimers and Jun Homodimers Bend DNA in Opposite Orientations: Implications for Transcription Factor Cooperativity. *Cell Press*, 66, 317-326.
- Kessler J, K. K. (2012). Symulation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis. *Science*, 348-53.
- Khan, R. C. (2019). From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 1-30.
- Khan, R. C. (2019). rom Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 1-30.
- Kim, T. H. (2018). Hepatic glucagon receptor signaling enhances insulin- stimulated glucose disposal in rodents. *Diabetes*, 2157-2166.
- Kirkpatrick, D. G. (2005). The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods*, 265-273.
- Kish-Trier, E. H. (2013). Structural biology of the proteasome. *Annual revies of biophysics*, 29-49.
- Kitson, F. L. (1996). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. . San Diego: Academic Press.
- Knoch, K. P. (2006). cAMP-dependent phosphorylation of PTB1 promotes the expression of insulin secretory granule proteins in beta cells. *Cell metabolism*,, 123–134.
- Kohlmaier, G. L. (2009). Overly long centrioles and defective cell division upon excess of the SAS-4-related protein CPAP. *Current Biology*, 1012-1018.
- Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorilation? *EMBO J.*, 1176-1179.
- Kristinsson, H. S. (2017). Basal hypersecretion of glucagon and insulin from palmitate-exposed human islets depends on FFAR1 but not decreased somatostatin secretion. *Scientific reports*, 4657.
- Kritzik, M. K. (2000). Transcription factor expression during pancreatic islet regeneration. *Mol. Cell. Endocrinol*, 99-107.
- Kushner, J. C. (2005). Cyclind D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic β -cell growth. *Molecular and cellular biology*, 3752-3762.
- Kutomi, G. T. (2013). Human endoplasmic reticulum oxidoreductin 1- α is a novel predictor for poor prognosis of breast cancer. *Cancer science*, 1091-1096.
- Kuwabara, T. H. (2004). A small modulatory dsRNA specifies the fate of adultt neural stem cells. *Cell*, 779-793.
- Kuwahara, K. S. (2003). NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *EMBO J.*, 6310-6321.
- Landa, H. R. (2020). Metabolic syndrome diminishes insulin-induced Akt antivation and causes a redistribution of Akt-interacting proteins in cardiomyocytes. *PlosOne*, 15(1), 1-25.
- Landschultz, W. H. (1988). The Leucine Zipper: A hypothetical Structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*(240), 1759-1764.

- Lasker, K. F. (2012). Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 1380-1387.
- Latchman, D. S. (1995). *Gene Regulation*. London: Chapman and Hall.
- Latchman, D. S. (1997). Transcription Factors: An overview. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1305-1312.
- Law, K. L. (2013). Recent Advances un mass spectrometry: data independent analysis and hyper reaction monitoring. *Expert Rev. Proteomics*, 551-566.
- Le Lay, J. &. (2006). Involvement of PDX-1 in activation of human insulin gene transcription. *The Journal of endocrinology*, 287–294.
- Lee, J. W. (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals, . *Nat. Chem. Biol.*, 536-546.
- Lera, M. K. (2015). Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology and clinical indications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1-98.
- Leung, Y. M. (2007). SNAREing voltage-gated K⁺ and ATP-sensitive K⁺ channels: tuning beta-cell excitability with syntaxin-1A and other exocytotic proteins. *Endocrine reviews*, 653–663.
- Li, C. L. (2012). Regulation of glucagon secretion in normal and diabetic human islets by γ -hydroxybutyrate and glycine. *The Journal of biological chemistry*, 3938-3951.
- Li, D. J. (2009). Suppression of sulfonylurea- and glucose-induced insulin secretion in vitro and in vivo in mice lacking the chloride transport protein CIC-3. *Cell Metab*(10), 309-315.
- Li, G. Z. (2009). Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*, 1696-1719.
- Liang, T. Q. (2017). New roles of syntaxin-1a in insulin granule exocytosis and replenishment. *Journal of biological chemistry*, 2203-2216.
- Lindemann, C. T. (2017). Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics. *Biological chemistry*, 687–699.
- Lisby, M. a. (2009). The choreography of recombination proteins during the DNA damage response. . *DNA Repair*, 1068–1076.
- Listgarten, J. E. (2005). Statistical and computational methods for comparative proteomic profiling using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics*, 419-434.
- Liu Y, e. a. (2010). The evolution of somatostatin in vertebrates. *Gene*, 463(1-2), 21-28.
- Lonovics J, e. a. (1981). Pancreatic polypeptide. A review. *Arch Surg*, 116(10), 1256–1264.
- Lu, P. V. (2007). Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nature biotechnology*, 117-124.
- Lu, T. A. (2014). REST and stress resistance in ageing and Alzheimer’s disease. *Nature*, 448-454.
- Luduenaa, R. B. (2008). The isotypes of tubulin: distribution and functional significance. In T. Fojo, *Cancer drug discovery ans development: the role of microtubules in cell biology*. Totowa: Humana Press.

- Luo, Z. S.-Z. (1990). Identification of the MAP2- and P75-binding domain in the regulatory subunit (RII beta) of type II cAMP-dependent protein kinase. Cloning and expression of the cDNA for bovine brain RII beta. *The Journal of Biological Chemistry*, 21804-21810.
- Lyss G, K. A. (1998). The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappa B by directly targeting p65. *Journal of Biological Chemistry*, 33508-33516.
- Maithal, K. &. (2002). Mass spectrometry and protein structure. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 205-216.
- Mampay, M. &. (2019). An epigenetic regulator of neuronal stress responses in the young and ageing brain. *Frontiers in neuroendocrinology*, 100744.
- Marciano, L. C. (2019). The role of health literacy in diabetes knowledge, self-care, and glycemic control: a meta analysis. *J. Gen. Intern. Med.*, 1007-1017.
- Marques, A. P. (2009). Catalytic mechanism and assembly of the proteasome. *Chemical reviews*, 1509-1536.
- Martin, D. &.-B. (2017). The Importance of REST for Development and Function of Beta Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5-12.
- Martin, D. A. (2008). Functional significance of repressor element 1 silencing transcription factor (REST) target genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 51, 1429-1439.
- Martin, D. A. (2012). Specific silencing of the REST target genes in insulin-secreting cells uncovers their participation in beta cell survival. *PLoS ONE*7, e45844.
- Martin, D. K.-B. (2015). REST represses a subset of the pancreatic endocrine differentiation program. *Developmental biology*, 405, 316–327.
- Martin, D. T. (2003). Critical role of the transcriptional repressor neuron-restrictive silencer factor in the specific control of connexin36 in insulin-producing cell lines. *The Journal of biological chemistry*, 278 (52), 53082–53089.
- Martin, D. T. (2003). Critical role of the transcriptional repressor neuron-restrictive silencer factor in the specific control of connexin36 in insulin-producing cell lines. *The Journal of biological chemistry*, 53082-53089.
- Martins, G. H. (2017). LC-MS^E, Multiplex MS/MS, Ion mobility, and Label Free Quantitation in Clinical Proteomics. In P. Guest, *Methods in Molecular Biology* (pp. 57-73). New York: Multiple Biomarker.
- Maša Skelin Klemen, J. D. (2017). The triggering pathway to insulin secretion: Functional similarities and differences between the human and the mouse β -cells and their translational relevance. *Islets*, 109-139.
- Matern, D. M. (2001). Mass Spectrometry Methods for metabolic and health assessment. *J Nutr.*, 1615-1620.
- Matthiesen, R. (2013). Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. In R. Matthiesen, *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics* (pp. 1-47). New York: Humana Press (Springer).

- Matthiesen, R. B. (2013). Introduction to Mass spectrometry-based proteomics. In R. Matthiesen, *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics* (pp. 1-47). Porto: Humana Press.
- Mayor, T. S. (2000). The centrosomal protein C-nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion. *J. Cell. Biol.*, 837-846.
- McCabe, W. L. (2007). *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química*. Ciudad de México: McGraw-Hill.
- McCluskey, J. H.-P. (2011). Development and functional characterization of insulin-releasing human pancreatic beta cell lines produced by electrofusion. *The journal of biological chemistry*, 21982-21992.
- McGann, J. C. (2014). Polycomb- and REST-associated histone deacetylases are independent pathways toward a mature neuronal phenotype. *eLife*, e04235.
- Meraldi, P. N. (2001). Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *J. Cell. Sci.*, 3749-3757.
- Merdes, A. H. (2000). Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *The journal of cell biology*, 851-862.
- Merrill, A. E. (2014). NeuCode labels for relative protein quantification. *Molecular & cellular proteomics*, 2503-2512.
- Mezghrani, A. F. (2001). Manipulation of oxidative protein folding and PDI redox state in mammalian cells. *The EMBO journal*, 6288-6296.
- Miller, C. P. (1994). IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *The EMBO journal*, 1145–1156.
- Mitchel, P. &. (1989). Transcriptional Regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 371-378.
- Mizuta, M. K.-K. (1997). Localization and functional role of synaptotagmin III in insulin secretory vesicles in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 2002–2006.
- Mori, N. S. (1992). A common silencer element in the SCG10 and type II Na⁺ channel genes binds a factor present in nonneuronal cells but not in neuronal cells. *Neuron*, 9, 45-54.
- Moser, B. A. (2009). Differential arrival of leading and lagging strand DNA polymerases at fission yeast telomeres. *The EMBO journal*, 810-820.
- Munro S, H. P. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* (48), 899-907.
- Munson, M. a. (1966). Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction. *J. Am. Chem. Soc.*, 88: 2621–2630.
- Mziaut, H. T. (2006). Synergy of glucose and growth hormone signalling in islet cells through ICA512 and STAT5. *Nature cell biology*, 435-445.
- Naya, F. J. (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes & development*, 1009–1019.

- Nishi M, T. S. (1990). Islet amyloid polypeptide. A new beta cell secretory product related to islet amyloid deposits. *J Biol Chem* 1990(265), 4173-4176.
- O'Shea, E. K. (1991). X-ray Structure of the GCN4 Leucine Zipper, a two-stranded, Parallel Coiled Coil. *Science*(254), 539-544.
- Oda, Y. H. (1999). Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *PNAS*, 6591-6596.
- Ohneda, K. M. (2000). The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Molecular and cellular biology*, 900-911.
- Ohring, M. (1995). Engineering materials science. San Diego, CA: Academic Press.
- Old, W. M.-A.-W. (2005). Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol. Cell. Proteom.*, 1487-1502.
- Olofsson, C. S. (2002). Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*(444), 43-51.
- Omar-Hmeadi, M. &.-H. (2021). Insulin granule biogenesis and exocytosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 1957–1970.
- Ong, S. E. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics*, 376-386.
- Ong, S. E. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics*, 376-386.
- Ong, S. E. (2005). Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology*, 252-262.
- Ooi, L. &. (2007). Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nature reviews.* , 544–554.
- Ooi, L. B. (2006). BRG1 chromatin remodeling activity is required for efficient chromatin binding by repressor element 1-silencing transcription factor (REST) and facilitates REST-mediated repression. *The Journal of biological chemistry*, 38974-38980.
- Ooi, S. L. (2006). Global synthetic-lethality analysis and yeast functional profiling. *Trends in genetics*, 56-63.
- Ortsäter, H. &. (2007). A busy cell--endoplasmic reticulum stress in the pancreatic beta-cell. *Molecular and cellular endocrinology*, 1–5.
- Ou, Y. M. (2002). CEP110 and ninein are located in a specific domain of the centrosome associated with centrosome maturation. *J. Cell. Sci.*, 1825-1835.
- Pabo, C. O. (1982). The operator-binding domain of lambda repressor: structure and DNA recognition. *Nature*(298), 443-447.
- Pajarillo, E. R. (2020). The transcription factor REST up-regulates tyrosine hydroxylase and antiapoptotic genes and protects dopaminergic neurons against manganese toxicity. . *The Journal of biological chemistry*, 3040–3054.

- Panchaud, A. S. (2009). Precursor acquisition independent from ion count: how to dive deeper into the proteomics ocean. *Analytical chemistry*, 6481-6488.
- Pantalone, K. H. (2015). Clinical characteristics, complications, comorbidities and treatment patterns among patients with type 2 diabetes mellitus in a large integrated health system. *BMJ Open Diabetes Res. Care*, 000093.
- Pappireddi, N. M. (2019). A Review on Quantitative Multiplexed Proteomics. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 1210–1224.
- Park, S. K. (2011). Structural defects in the regulatory particle-core particle interface interface of the proteasome induce a novel proteasome stress response. *J. Biol. Chem.*, 36652-36666.
- Patzelt C, A. L. (1978). Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci USA* (75), 1260-1264.
- Peach, M. M. (2015). Solubilization of proteins: the importance of lysis buffer choice. *Methods in molecular biology*, 49-60.
- Peng, S. Y. (2005). SL1 physically interacts with BETA2 to promote insulin gene transcriptional synergy in non-beta cells. *Biochimica et biophysica acta*, 154–159.
- Perera, A. E. (2015). TET3 is recruited by REST for context-specific hydroxymethylation and induction of gene expression. *Cell reports*, 283-294.
- Petković, M. &. (2011). FAB, ESI and MALDI Mass Spectrometric methods in the study of metallo-drugs and their biomolecular interactions. . *Metallomics : integrated biometal science*, 550-565.
- Pfeiffer, V. &. (2013). Replication of telomeres and the regulation of telomerase. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, a010405.
- Pihan, G. P. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res*, 3974-3985.
- Pino, M. F. (2005). Elevated glucose attenuates human insulin gene promoter activity in INS-1 pancreatic beta-cells via reduced nuclear factor binding to the A5/core and Z element. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 1343-1360.
- Porte, D. J. (1969). Insulin responses to glucose: evidence for a two pool system in man. *he Journal of clinical investigation*, 2309–2319.
- Porter, M. (1979). *Handbook of Separation techniques for Chemical Engineers*. Nueva York: McGraw-Hill.
- Potts, G. K. (2016). Neucode Labels for Multiplexed, Absolute Protein Quantification. *Analytical chemistry*, 3295-3303.
- Potts, P. (1987). Spark source mass spectroscopy. In *A Handbook of Silicate Rock Analysis* (pp. 566-574). Boston, MA.: Springer.
- Powell, S. Z.-B. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 235-237.
- Pramanik, B. N. (2002). *Applied Electrospray Mass Spectrometry*. New York: Marcel Dekker.

- Qian, J. (2010). The mitochondrial protein hTID-1 partners with the caspase-cleaved adenomatous polyposis cell tumor suppressor to facilitate apoptosis. *Gastroenterology*, 1418-1428.
- Qian, J. e. (2007). Caspase cleavage of the APC tumor suppressor and release of an amino-terminal domain is required for the transcription-independent function of APC in apoptosis. *Oncogene*, 4872-4876.
- Quintyne, N. R. (2005). Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science*, 127-129.
- Rauniyar, N. &. (2014). Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics. *Journal of proteome research*, 5293-5309.
- Ravichandran, V. C. (1996). Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 13300–13303.
- Regazzi, R. W. (1995). VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic beta-cells and are essential for Ca(2+)-but not for GTP gamma S-induced insulin secretion. *The EMBO*, 2723-2730.
- Reimer, M. K. (2003). Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 916–921.
- Religa, T. L. (2007). The helix turn helix motif as an ultrafast independently folding domain: The pathway of folding of Engrailed homeodomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22), 9272-9277.
- Reynolds, K. J. (2004). Quantitative protein analysis using proteolytic ¹⁸O water labeling. *Curr. Protoc. Protein Sci*, 23.4.1-23.4.9.
- Rilifson, I. K. (2007). Wnt signaling regulates pancreatic β cell proliferation. *Proceedings of the national academy of sciences*, 6247-6252.
- Rindi, G. S. (2002). Ghrelin expression in gut endocrine growths. *Histochemistry and cell biology*, 521–525.
- Ríos, R. C. (1992). Identification of a high affinity binding protein for the regulatory subunit RII beta of cAMP-dependent protein kinase in golgi enriched membranes of human lymphoblasts. *EMJO. J.*, 1723-1731.
- Rivett, A. (1989). The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J. Biol. Chem.*, 12215-12219.
- Robinson, G. L. (1994). Isolation and characterization of a novel transcription factor that binds to and activates insulin control element-mediated expression. *Molecular and cellular biology*, 6704–6714.
- Rockowitz, S. a. (2015). Significant expansion of the REST/NRSF cistrome in human versus mouse embryonic stem cells: potential implications for neural development. *Nucleic Acids Res*, 5730-5743.

- Röder, P. V. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, e219.
- Rohila, J. S. (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant Journal*, S172-S181.
- Romero, O. (2016). *Análisis de la interacción del factor de transcripción REST/NRSF con elementos RE1-like del gen pdx-1*. Ciudad de México: CINVESTAV.
- Roopra, A. Q. (2004). Localized domains of G9a-Mediated Histone Methylation are required for Silencing of Neuronal genes. *Molecular Cell*, 727-738.
- Rorsman, P. &. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*(46), 1029-1045.
- Rorsman, P. &. (2018). Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiological reviews*, 117-214.
- Rorsman, P. E. (2000). The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 72-77.
- Ross, P. H. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteom.*, 1154-1169.
- Rossi, M. L. (2008). Pif1 helicase directs eukaryotic Okazaki fragments toward the two-nuclease cleavage pathway for primer removal. *The journal of biological chemistry*, 27483-27493.
- Rozzo, A. M.-R. (2009). Exocytosis of insulin: in vivo maturation of mouse endocrine pancreas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 53-62.
- Rubakhin, S. S. (2010). A mass spectrometry primer for mass spectrometry imaging. *Methods in molecular biology*, 21-49.
- Saito K, I. N. (1978). Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. *Exp Med*, 124-177.
- Sakula, A. (1988). Paul Langerhans (1847-1888): a centenary tribute. *J R Soc Med*, 414-415.
- Salaverria I, e. a. (2006). Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Hematologica*, 11-16.
- Salehi, A. D. (2004). Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regulatory peptides*, 143–150.
- San-Filippo, J. S. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.*(77), 229–257.
- Sander, M. G. (1998). A novel glucose-responsive element in the human insulin gene functions uniquely in primary cultured islets. *roceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11572–11577.
- Sander, M. N. (1997). Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes & development*, 1662–1673.

- Sato, N. M. (1999). Centrosome abnormalities in pancreatic ductal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 963-970.
- Satoh, J. K. (2013). ChIP-Seq Data Mining: Remarkable Differences in NRSF/REST Target Genes between Human ESC and ESC-Derived Neurons. *Bioinformatics and biology insights*, 357-368.
- Scheuner, D. S.-W. (2001). Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Molecular cell*, 1165-1176.
- Schoenherr, C. J. (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*, 1360-1363.
- Schuit F.C., D. V. (1997). Glucose-induced B-cell recruitment and the expression of hexokinase isoenzymes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (426), 259-266.
- Schwanhäusser, B. B. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 337-342.
- Schwanhäusser, B. B. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 337-342.
- Scalfani, R. H. (2007). Cell cycle regulation of DNA replication. *Annual review of genetics*, 237-280.
- Scott, J. S. (1990). Type II regulatory subunit dimerization determines the subcellular localization of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 21561-21566.
- Seeling, J. (1999). Regulation of β -catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science*, 2089-2091.
- Seidah, N. G. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature reviews. Drug discovery.*, 367-383.
- Sekine N., C. V. (1994). Low lactate-dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells e potential role in nutrient sensing. *Journal of Biological Chemistry*(269), 4895-4902.
- Shankland KR, A. J. (2012). Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 380 (9844), 848-57.
- Shannon, P. e. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 2498-2504.
- Sharma, A. A. (2016). Centriolar CPAP/SAS-4 imparts slow processive microtubule growth. *Developmental Cell*, 362-376.
- Sheeman, B. C. (2003). Determinants of *S. cerevisiae* dynein localization and activation: implication for the mechanism of spindle positioning. *Curr Biol.*, 364-372.
- Shieh, S. Y. (1991). cell-specific and ubiquitous factors are responsible for the enhancer activity of the rat insulin II gene. *The Journal of biological chemistry*, 16708-16714.
- Silva, J. C. (2006). Absolute quantification of proteins by LC/MS^E: a virtue of parallel MS acquisition. *Molecular & cellular proteomics* , 144-156.
- Silva, V. P. (2015). Ketone bodies effectively compete with glucose for neuronal acetyl- CoA generation in rat hippocampal slices. *NMR Biomed*, 28(9), 1111-1116.

- Singh D, C. J. (2012). Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science*, 1231-5.
- Smith, D. C. (2007). Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol. Cell.*, 731-744.
- SOLEIL. (2018). *Soleil Synchrotron*. From Breaking up molecules with UV radiation: a new activation method for tandem mass spectrometry: <https://www.synchrotron-soleil.fr/en/news/breaking-molecules-uv-radiation-new-activation-method-tandem-mass-spectrometry>
- Soma, Y. I. (2012). Direct isopropanol production from cellobiose by engineered *Escherichia coli* using a synthetic pathway and a cell surface display system. *J. Biosci. Bioeng.*, 80-85.
- Soma, Y. T. (2014). Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch. *Metab. Eng.* , 175-184 .
- Sorensen, L. e. (2006). The relationship among pain, sensory loss, and small nerve fibers in diabetes. *Diabetes care*, 883-887.
- Sosa-Pineda, B. (2004). The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic beta-cell development. *Molecules and cells*, 289–294.
- Spellman, R. &. (2006). Novel modes of splicing repression by PTB. *Trends in biochemical sciences*, 73–76.
- Spitzer, A. R. (2008). Proteomics- and metabolomics-based neonatal diagnostics in assessing and managing the critically ill neonate. *Clinics in perinatology*, 695-716.
- SR, S. V. (2010). A mass spectrometry primer for mass spectrometry imaging. *Methods Mol. Biol.*, 21-49.
- Srinivasa, V. S. (2014). Protein-Protein interaction detection: methods and analysis. *International Journal of Proteomics*, ID 147648, 12 pages.
- Stahl, D. S. (1996). Data-controlled automation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of peptide mixtures. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 532-540.
- Steen, E. J. (2010). Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 559-562 .
- Steen, H. &. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature*, 699-711.
- Steiner DF KW, C. J.—S.-1. (1972). The biosynthesis of insulin. In F. N. Steiner DF, *Handbook of Physiology- Section 7 Endocrinology I* (pp. 175-198). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Steiner, D. F. (1985). Structure and evolution of the insulin gene. *Annual review of genetics*, 463–484.
- Stodola, J. L. (2016). Resolving individual steps of Okazaki-fragment maturation at a millisecond timescale. *Nature structural & molecular biology*, 402–408.
- Strickland, E. H. (2000). Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.*, 5565-5572.
- Stuchbury, G. &. (2010). Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA. *Cytotechnology*, 189–194.

- Südhof, T. R. (2009). Membrane fusion: grappling SNARE and SM proteins. *Science*, 474-477.
- Sun, Q. S. (2006). Role of NuMA in vertebrate cells: review of an intriguing multifunctional protein. *Frontiers in Bioscience*, 1137-1146.
- Szklarczyk, D. F. (2015). STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*, 447-452.
- Tan D, H. S. (2013). Improvements in observed and relative survival in follicular grade 1-2 lymphoma during 4 decades: the Stanford University experience. *Blood. Epub*, 981-7.
- Tan, T. B. (2013). *Pancreatic Polypeptide*. Massachusetts: Academic Press: Cambridge.
- Tapia-Ramírez, J. E.-R. (1997). A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural-specific type II sodium channel promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1177-1182.
- Teitelman, G. (2019). Heterogeneous Expression of Proinsulin Processing Enzymes in Beta Cells of Non-diabetic and Type 2 Diabetic Humans. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 385-400.
- Tengholm, A. (2012). Cyclic AMP dynamics in the pancreatic β -cell. *Uppsala journal of medical sciences*, 355-369.
- Thadikkar, e. a. (2008). Methods for Human CD8+ lymphocyte proteome analysis. *Methods in Molecular Biology*, VOL. 484.
- Thomas, M. R. (2000). Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic β -cells. *Diabetes*, 2039-2047.
- Thorens, B. (2014). Neural regulation of pancreatic islet cell mass and function. *Diabetes, obesity & metabolism*, 87-95.
- Thurmond, D. (2000). *Regulation of insulin action and insulin secretion by SNARE-mediated vesicle exocytosis*. Austin, TX.: Landes Bioscience.
- Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. (1995). *Genes & development*, 1009-1019.
- TJ, S. (1997). Helenanolide-type sesquiterpene lactones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 645-653.
- Tomita, T. (2016). Apoptosis in β -islet cells in type 2 diabetes. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 162-179.
- Tomita, T. (2017). Apoptosis of β -cells in type 1 diabetes. *Bosnian Journal of basic medical sciences*, 183-193.
- Tonoki, A. K. (2009). Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Molecular and cellular biology*, 1095-1106.
- Torgerson, D. S. (1974). New approach to the mass spectroscopy of non-volatile compounds. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 60: 616-621.
- Toshinai, K. M. (2001). Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochemical and biophysical research communications*, 1220-1225.

- Tovey, C. A. (2018). Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes and beyond. *Essays in biochemistry*, 765-780.
- Twelvetrees, A. L. (2019). The adaptor proteins HAP1 and GRIP1 collaborate to activate the kinesin-1 isoform KIFC5. *Journal of cell science*.
- Uehara, S. M. (2004). Metabotropic glutamate receptor type 4 is involved in autoinhibitory cascade for glucagon secretion by alpha-cells of islet of Langerhans. *Diabetes*, 998–1006.
- Urban, P. (2016). Quantitative mass spectrometry: an overview. *Series A ,Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374.
- Vakilian, M. T. (2019). A review on insulin trafficking and exocytosis. *Gene*, 52–61.
- van Arensbergen, J. G.-H. (2010). Derepression of Polycomb targets during pancreatic organogenesis allows insulin-producing beta-cells to adopt a neural gene activity program. *Genome research*, 722-732.
- van Arensbergen, J. G.-H. (2010). Derepression of Polycomb targets during pancreatic organogenesis allows insulin-producing beta-cells to adopt a neural gene activity program. *Genome Research*, 722-732.
- van der Meulen, T. D.-Z. (2015). rocortin3 mediates somatostatin-dependent negative feedback control of insulin secretion. *Nature medicine*, 769-776.
- Vandame, P. S. (2014). The spatio-temporal dynamics of PKA activity profile during mitosis and its correlation to chromosome segregation. *Cell Cycle*, 3232-3240.
- Venayak, N. A. (2015). Engineering metabolism through dynamic control. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 142-152 .
- Verma, R. A. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, 611-615.
- Vidova, V. &. (2017). A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Analytica chimica acta*, 7–23.
- Vinson, C. S. (1989). Scissors-grip Model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*(246), 911-916.
- Waeber, G. D. (2000). The gene MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nature genetics*, 291-295.
- Wang X, M. R. (2013). Regional differences in islet distribution in the human pancreas- preferential beta-cell loss in the head region in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*, e67454.
- Weickhardt, C. M. (1996). Time-of-Flight mass spectrometry: state of the art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrom. Rev.*, 139-162.
- Welsh, M. N. (1985). Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability. *The Journal of biological chemistry*, 13590–13594.
- Westbrook, T. F. (2005). A genetic screen for candidate tumor suppressor identifies REST. *Cell*, 837-848.

- Westermarck, P. A. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev*, 91(3), 795-826.
- Westwell-Roper, C. E. (2014). Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 β production and β -cell dysfunction. *Diabetes*, 63(5), 1698-1711.
- Wierup, N. S. (2013). The islet ghrelin cell. *Journal of molecular endocrinology*, R35–R49.
- Wilm, M. (1996). Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano electrospray mass spectrometry. *Nature*, 466-469.
- Wollerton, M. C.-B. (2004). Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Molecular cell*, 91–100.
- Wong, R. B. (2006). Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 19783-19787.
- Yamashita, M. a. (1984). Negative ion source production with electrospray ion source. . *J. Phys. Chem.*, 88: 4671–4675.
- Yang, Y. C. (2009). The kruppel like. zic finger protein Glis3 directly and indirectly activates insulin gene transcription. *Nucleic Acids Res*, 2529-2538.
- Yeung, Y. G. (2010). Rapid detergent removal from peptide samples with ethyl acetate for mass spectrometry analysis. In *Current protocols in protein science* (pp. Chapter 16, Unit–16.12).
- Yong, H. T. (2009). Distinct Dose-dependent cortical neuronal migration and neurite extension defects in Lis and Ndel1 mutant mice. *Journal of neuroscience*, 15520-15530.
- Yu, H. B. (2011). Coassembly of REST and its cofactors at sites of gene repression in embryonic stem cells. . *Genome research*, 1284–1293.
- Yuen AR, K. O. (1995). Long-term survival after histologic transformation of low-grade follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, 1726-33.
- Yuki Soma, T. Y. (2017). Synthetic metabolic bypass for a metabolic toggle switch enhances acetyl-CoA supply for isopropanol production by Escherichia coli . *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 625-633.
- Zepeda, C. (2021, 10 28). *Jornada*. From Política: <https://www.jornada.com.mx/notas/2021/10/28/politica/un-millon-86-mil-743-decesos-en-2020-destacan-covid-y-diabetes-inegi/>
- ZeRuth, G. T. (2013). The kruppel-like protein Gli-similar 3 (Glis3) functions as a key regulator of insulin transcription. *Mol Endocrinol*, 1692-1705.
- ZeRuth, G. W. (2015). HECT E3 Ubiquitin ligase ITCH functions as a novel negative regulator of Gli-Similar 3 (Glis3) transcriptional activity. *PLoS ONE*, e0131303.
- Zhang, F. a. (2011). Biosensors and their applications in microbial metabolic engineering. *Trends Microbiol.*, 323-329 .
- Zhang, Q. B. (2007). R-type Ca(2+)-channel-evoked CICR regulates glucose-induced somatostatin secretion. *Nature cell biology*, 453-460.

- Zhang, Q. C. (2014). Na⁺ current properties in islet alpha and beta cells reflect cell-specific Scn3a and Scn9a expression. *The journal of physiology*, 4677-4696.
- Zhang, Y. F. (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews*, 2343-2394.
- Zhao, L. C. (2000). The RIPE3b1 activator of the insulin gene is composed of a protein(s) of approximately 43 kDa, whose DNA binding activity is inhibited by protein phosphatase treatment. *The Journal of biological chemistry*, 10532–10537.
- Zheng, C. (2000). NuMA: a nuclear protein involved in mitotic centrosome function. *Microsc. Res. Tech.*, 467-477.
- Zheng, D. Z. (2009). Profiling RE1/REST-mediated histone modifications in the human genome. *Genome biology*, R9.
- Zhou, H. Z. (2007). Zinc, not insulin, regulates the rat alpha-cell response to hypoglycemia in vivo. *Diabetes*, 107–1112.
- Zhou, J. D. (2011). Unraveling pancreatic islet biology by quantitative proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 495-504.
- Zhu, D. K. (2013). Syntaxin-3 regulates newcomer insulin granule exocytosis and compound fusion in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 359–369.
- Zhu, D. Z. (2012). Dual role of VAMP8 in regulating insulin exocytosis and islet β cell growth. *Cell metabolism*, 238–249.
- Zhu, H. P. (2002). Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics. *Rapid communications in mass spectrometry*, 2115-2123.
- Zhu, W. S. (2010). Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 1-6.
- Zhuo Fu, E. R. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 25-53.
- Zybailov, B. M. (2006). Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome. Res.*, 2339-2347.

Anexo A

Tabla 14. Proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST PvuI

Accession	Gen	Condition	Description	Peptide count	Unique peptides	Log 2 ratio	Expression relative change
P20042	EIF2S2	up	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	5	1	10.0549976	1063.78998
Q8TCU6	PREX1	up	Phosphatidylinositol 3_4_5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	10	1	9.6901947	826.112642
A0A2R8YDP4	SCN9A	up	Sodium channel protein	4	1	8.15386405	284.81159
P54760	EPHB4	up	Ephrin type-B receptor 4	7	2	7.89975805	238.816392
A6NDL7	METTL21EP	up	Putative methyltransferase-like protein 21E pseudogene	2	1	7.51914613	183.43767
Q13023	AKAP6	up	A-kinase anchor protein 6	11	2	7.43959275	173.596343
Q9Y4D8	HECTD4	up	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4	28	1	7.38053968	166.63408
P13056	NR2C1	up	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 1	2	1	7.28332009	155.775019
O75489	NDUFS3	up	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3_ mitochondrial	4	1	7.16970025	143.977569
Q8NDH2	CCDC168	up	Coiled-coil domain-containing protein 168	15	3	6.80394791	111.735817
Q14146	URB2	up	Unhealthy ribosome biogenesis protein 2 homolog	4	2	6.7449293	107.257097

O75976	CPD	up	Carboxypeptidase D	17	1	6.57414201	95.2826747
P02549	SPTA1	up	Spectrin alpha chain_ erythrocytic 1	22	1	6.18544984	72.7789754
Q92187	ST8SIA4	up	CMP-N-acetylneuraminate-poly-alpha-2_8-sialyltransferase	2	1	6.05051	66.2803816
Q5TCS8	AK9	up	Adenylate kinase 9	12	1	6.03319503	65.4896509
Q92547	TOPBP1	up	DNA topoisomerase 2-binding protein 1	11	1	5.80468963	55.896639
Q9P0J7	KCMF1	up	E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1	2	1	5.72774729	52.9936389
O43581	SYT7	up	Synaptotagmin-7	4	2	5.69799881	51.9120953
O95996	APC2	up	Adenomatous polyposis coli protein 2	7	1	5.61389449	48.9723151
Q05BV3	EML5	up	Echinoderm microtubule-associated protein-like 5	21	4	5.57508837	47.6725987
Q8NEV4	MYO3A	up	Myosin-IIIa	16	1	5.47358891	44.4339013
Q9UHL4	DPP7	up	Dipeptidyl peptidase 2	2	1	5.44834524	43.6631782
Q6Q759	SPAG17	up	Sperm-associated antigen 17	8	1	5.41062376	42.5363329
A0A0A0MS63	LVRN	up	Aminopeptidase	9	1	5.34876991	40.7511793
P50570	DNM2	up	Dynamin-2	4	2	5.24386715	37.893202
P26640	VAR51	up	Valine--tRNA ligase	13	1	5.21586914	37.1649082
O43252	PAPSS1	up	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	5	1	5.14234008	35.3182041
O95202	LETM1	up	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein	7	1	5.09060214	34.0740644
Q5JYT7	KIAA1755	up	Uncharacterized protein KIAA1755	2	1	5.00991337	32.2206428
Q8NI08	NCOA7	up	Nuclear receptor coactivator 7	6	1	4.98692853	31.7113751
A0A0C4DG98	THOC2	up	THO complex subunit 2	5	1	4.9185603	30.2436488

Q9Y4E8	USP15	up	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	12	1	4.88845347	29.6190502
Q6NUK1	SLC25A24	up	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	4	1	4.71935845	26.3431955
Q15075	EEA1	up	Early endosome antigen 1	8	1	4.68547484	25.7316994
P16591	FER	up	Tyrosine-protein kinase Fer	4	1	4.6757596	25.559002
Q8NFP9	NBEA	up	Neurobeachin	28	2	4.67390987	25.5262529
Q99459	CDC5L	up	Cell division cycle 5-like protein	6	2	4.61869057	24.5676945
Q5VTI5	PLEKHA6	up	Pleckstrin homology domain-containing family A member 6	6	1	4.51379881	22.8448776
P09417	QDPR	up	Dihydropteridine reductase	7	1	4.51377259	22.8444624
P46781	RPS9	up	40S ribosomal protein S9	8	1	4.48305706	22.363236
Q6UXK2	ISLR2	up	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein 2	2	1	4.46378576	22.0664977
A0A2R8Y8B5	CC2D2B	up	Protein CC2D2B	2	1	4.40864624	21.2390338
A0A0A0MQW5	LMTK3	up	Serine/threonine-protein kinase LMTK3	3	1	4.37834161	20.797549
O95302	FKBP9	up	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	3	2	4.31080284	19.8463644
Q9BPX7	C7orf25	up	UPF0415 protein C7orf25	7	2	4.14093557	17.6419187
P78347	GTF2I	up	General transcription factor II-I	13	2	4.08675268	16.9916339
Q9H9F9	ACTR5	up	Actin-related protein 5	3	1	4.05501518	16.6219205
Q9Y6D5	ARFGEF2	up	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	15	1	4.01185426	16.1320095
O00203	AP3B1	up	AP-3 complex subunit beta-1	15	1	3.98162917	15.7975526

P59045	NLRP11	up	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 11	7	1	3.97889189	15.7676078
Q9P2P6	STARD9	up	StAR-related lipid transfer protein 9	32	1	3.97840795	15.7623196
P13861	PRKAR2A	up	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	6	1	3.95921902	15.554057
Q08211	DHX9	up	ATP-dependent RNA helicase A	15	3	3.93768092	15.323574
Q9NYL2	MAP3K20	up	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 20	2	1	3.93717092	15.318158
Q8N2N9	ANKRD36B	up	Ankyrin repeat domain-containing protein 36B	13	1	3.92537226	15.1933938
Q9Y4G6	TLN2	up	Talin-2	34	3	3.92445913	15.1837804
P56545-2	CTBP2	up	Isoform 2 of C-terminal-binding protein 2	3	2	3.90955015	15.0276774
Q12905	ILF2	up	Interleukin enhancer-binding factor 2	5	2	3.87723645	14.6948268
Q14651	PLS1	up	Plastin-1	9	1	3.84672494	14.3873097
D3DQ30	TTC39A	up	HCG40295_ isoform CRA_d	3	1	3.84510073	14.3711213
F8W726	UBAP2L	up	Ubiquitin-associated protein 2-like	4	1	3.82836199	14.2053452
E5RJ29	PSD3	up	PH and SEC7 domain-containing protein 3	4	1	3.77017827	13.6438441
Q15811-9	ITSN1	up	Isoform 9 of Intersectin-1	13	1	3.75788075	13.5280383
Q02952	AKAP12	up	A-kinase anchor protein 12	4	1	3.73137516	13.2817667
Q9ULD2	MTUS1	up	Microtubule-associated tumor suppressor 1	7	1	3.68803626	12.8887126
Q6KB66	KRT80	up	Keratin_ type II cytoskeletal 80	3	1	3.66865565	12.7167284
Q12860	CNTN1	up	Contactin-1	5	2	3.65766884	12.6202522
E9PJK2	EED	up	Polycomb protein EED	2	1	3.58499485	12.000269

Q9NTI5	PDS5B	up	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	15	1	3.56292481	11.8180885
Q8N1W2	ZNF710	up	Zinc finger protein 710	2	1	3.53174443	11.5654094
Q96SB8	SMC6	up	Structural maintenance of chromosomes protein 6	5	1	3.52481132	11.5099632
P06753	TPM3	up	Tropomyosin alpha-3 chain	6	1	3.49671604	11.2879847
J3KQ61	BRD1	up	Bromodomain-containing protein 1 (Fragment)	2	1	3.46180605	11.018119
Q96JB1	DNAH8	up	Dynein heavy chain 8_ axonemal	28	3	3.45819463	10.9905724
P01266	TG	up	Thyroglobulin	7	1	3.45028001	10.9304433
Q86X76	NIT1	up	Deaminated glutathione amidase	5	1	3.41085454	10.6357845
Q8N3C0	ASCC3	up	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	18	3	3.34478158	10.1596696
Q9BS26	ERP44	up	Endoplasmic reticulum resident protein 44	6	1	3.3384782	10.1153771
O14771	ZNF213	up	Zinc finger protein 213	2	1	3.32271398	10.0054488
Q9Y4B5	MTCL1	up	Microtubule cross-linking factor 1	12	1	3.25347586	9.53660567
P52735	VAV2	up	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	7	2	3.24869225	9.50503702
P16870	CPE	up	Carboxypeptidase E	5	1	3.24356961	9.47134696
Q9Y5B9	SUPT16H	up	FACT complex subunit SPT16	8	1	3.24311498	9.46836276
E5RIM3	PLAA	up	Phospholipase A-2-activating protein	3	1	3.18123194	9.07081351
Q38SD2	LRRK1	up	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 1	15	2	3.17430683	9.02737682
Q12849	GRSF1	up	G-rich sequence factor 1	7	2	3.1571933	8.92092494

P54886	ALDH18A1	up	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	16	2	3.0324371	8.18190678
Q6WKZ4	RAB11FIP1	up	Rab11 family-interacting protein 1	15	2	3.0195166	8.10895831
P50851	LRBA	up	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	17	1	3.01528126	8.08518769
P42574	CASP3	up	Caspase-3	6	5	3.00341834	8.0189778
Q96PN6	ADCY10	up	Adenylate cyclase type 10	14	2	3.00234447	8.01301107
P49354	FNTA	up	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	6	2	2.9763248	7.86978815
Q6ZRQ5	MMS22L	up	Protein MMS22-like	4	1	2.97394249	7.85680359
O00303	EIF3F	up	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	7	4	2.9672691	7.82054475
Q14247	CTTN	up	Src substrate cortactin	10	1	2.94258894	7.68789664
Q8WZ64	ARAP2	up	Arf-GAP with Rho-GAP domain_ ANK repeat and PH domain-containing protein 2	24	2	2.93938457	7.67084001
H0Y3A8	ASTN2	up	Astrotactin-2 (Fragment)	3	1	2.91839026	7.56002109
O60333	KIF1B	up	Kinesin-like protein KIF1B	15	1	2.90032992	7.46597108
Q9H2K8	TAOK3	up	Serine/threonine-protein kinase TAO3	5	1	2.89154212	7.42063229
Q0VDF9	HSPA14	up	Heat shock 70 kDa protein 14	5	1	2.87811932	7.35191107
A0A087WW83	GPR179	up	Probable G-protein-coupled receptor 179	5	1	2.85664497	7.24328917
P47897	QARS1	up	Glutamine--tRNA ligase	10	2	2.81512801	7.03781704
P42166	TMPO	up	Lamina-associated polypeptide 2_ isoform alpha	7	1	2.78949176	6.91386176

Q4LDE5	SVEP1	up	Sushi_ von Willebrand factor type A_ EGF and pentraxin domain-containing protein 1	11	1	2.77446571	6.84222578
Q8TDM6	DLG5	up	Disks large homolog 5	20	4	2.7525215	6.73893917
O15294	OGT	up	UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit	8	1	2.73765029	6.6698314
O60568	PLOD3	up	Procollagen-lysine_2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	8	1	2.73239932	6.64559938
Q9NYZ2	SLC25A37	up	Mitoferrin-1	2	1	2.71667916	6.57357946
Q4G0P3	HYDIN	up	Hydrocephalus-inducing protein homolog	47	2	2.65966311	6.31885479
Q16850	CYP51A1	up	Lanosterol 14-alpha demethylase	7	1	2.6594805	6.318055
Q6DN14	MCTP1	up	Multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1	5	1	2.64278895	6.24537823
Q71DI3	H3C13	up	Histone H3.2	7	2	2.64019085	6.23414127
P36542	ATP5F1C	up	ATP synthase subunit gamma_ mitochondrial	4	1	2.627317	6.17875857
Q0VDD8-4	DNAH14	up	Isoform 4 of Dynein heavy chain 14_ axonemal	40	2	2.6027839	6.07457677
Q9HB07	MYG1	up	UPF0160 protein MYG1_ mitochondrial	8	1	2.59058804	6.02344161
P50995	ANXA11	up	Annexin A11	6	1	2.5885761	6.01504739
A0A087WZN1	IDH3B	up	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit_ mitochondrial	11	3	2.56926629	5.93507511
Q6PJI9	WDR59	up	GATOR complex protein WDR59	3	1	2.50907542	5.69255142
Q9P2E9	RRBP1	up	Ribosome-binding protein 1	7	1	2.4538142	5.47862629

A0A0U1RQK7	EIF4G3	up	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	22	3	2.39136259	5.24652651
Q9UPT8	ZC3H4	up	Zinc finger CCCH domain-containing protein 4	2	2	2.38308478	5.21650949
A0A0A0MRM9	NOLC1	up	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (Fragment)	6	2	2.3355284	5.04735794
Q70CQ2	USP34	up	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34	33	3	2.33317716	5.03913866
Q96KP4	CNDP2	up	Cytosolic non-specific dipeptidase	11	2	2.3326159	5.03717866
P04114	APOB	up	Apolipoprotein B-100	71	6	2.30824042	4.95278647
A0A2R8YDM2	OPA1	up	Dynamin-like 120 kDa protein_ mitochondrial	9	3	2.29241735	4.8987625
Q15056	EIF4H	up	Eukaryotic translation initiation factor 4H	4	1	2.2814232	4.86157304
Q8WXX0	DNAH7	up	Dynein heavy chain 7_ axonemal	41	3	2.25686925	4.77953162
E7ESM1	NDRG1	up	Protein NDRG1	5	1	2.24689089	4.74658821
Q92738	USP6NL	up	USP6 N-terminal-like protein	2	1	2.23879633	4.72003098
Q92922	SMARCC1	up	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	8	1	2.23033973	4.69244466
Q9UBT6	POLK	up	DNA polymerase kappa	7	2	2.22696554	4.68148276
Q7Z7A1	CNTRL	up	Centriolin	35	3	2.22616095	4.67887262
Q9BXJ9	NAA15	up	N-alpha-acetyltransferase 15_ NatA auxiliary subunit	13	2	2.20057252	4.59661717
Q96K76	USP47	up	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	4	1	2.16489968	4.48435248
Q5VT25	CDC42BPA	up	Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha	16	3	2.14329492	4.41769836

Q9UIF8	BAZ2B	up	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B	6	1	2.12840352	4.37233371
Q8IVI9	NOSTRIN	up	Nostrin	4	1	2.07795598	4.22208603
P14735	IDE	up	Insulin-degrading enzyme	18	2	2.07659345	4.21810044
Q2NL82	TSR1	up	Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog	2	1	2.07612103	4.21671944
P30622	CLIP1	up	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	11	1	2.06042672	4.17109659
D6REX3	SEC31A	up	Protein transport protein Sec31A	7	2	2.05878945	4.16636562
P49411	TUFM	up	Elongation factor Tu_ mitochondrial	3	1	2.02311071	4.06459248
P23921	RRM1	up	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	12	4	1.99462243	3.98511798
P04275	VWF	up	von Willebrand factor	6	1	1.98481581	3.95812126
Q9Y463	DYRK1B	up	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B	3	1	1.98317872	3.95363234
E5RHW4	ERLIN2	up	Erlin-2 (Fragment)	7	2	1.98256024	3.95193779
Q9C0F0	ASXL3	up	Putative Polycomb group protein ASXL3	2	2	1.96075953	3.8926686
Q13393	PLD1	up	Phospholipase D1	2	1	1.95941678	3.88904729
Q6YHU6	THADA	up	Thyroid adenoma-associated protein	6	1	1.95923683	3.88856223
P25398	RPS12	up	40S ribosomal protein S12	7	2	1.95604703	3.87997411
Q7Z3Z0	KRT25	up	Keratin_ type I cytoskeletal 25	8	1	1.93020445	3.81109204
P49748	ACADVL	up	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial	8	2	1.91836601	3.77994701
Q5D1E8	ZC3H12A	up	Endoribonuclease ZC3H12A	7	1	1.91334334	3.7668102

Q14980	NUMA1	up	Nuclear mitotic apparatus protein 1	39	6	1.90720006	3.75080448
Q7Z2Y8	GVINP1	up	Interferon-induced very large GTPase 1	7	3	1.90009383	3.7323747
Q9UI26	IPO11	up	Importin-11	9	2	1.89940692	3.73059804
K7EK07	H3-3B	up	Histone H3 (Fragment)	6	1	1.89247411	3.7127138
Q9Y5X3	SNX5	up	Sorting nexin-5	5	1	1.88921438	3.70433449
Q5TCQ9	MAGI3	up	Membrane-associated guanylate kinase_ WW and PDZ domain-containing protein 3	3	1	1.88482405	3.69307881
Q15555	MAPRE2	up	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	2	1	1.87146184	3.6590315
J3KPQ0	FGFR4	up	Fibroblast growth factor receptor	3	1	1.85012459	3.60531319
O95631	NTN1	up	Netrin-1	4	1	1.84170534	3.58433465
O14556	GAPDHS	up	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific	5	1	1.83967774	3.57930067
O00567	NOP56	up	Nucleolar protein 56	9	3	1.83548748	3.56891979
P05129	PRKCG	up	Protein kinase C gamma type	5	1	1.82062407	3.53233964
Q6ZRK6	CCDC73	up	Coiled-coil domain-containing protein 73	10	1	1.81548106	3.51976977
Q13402	MYO7A	up	Unconventional myosin-VIIa	25	3	1.76945569	3.40925307
O60229	KALRN	up	Kalirin	25	3	1.74173647	3.34437464
C9J5X9	FANCB	up	Fanconi anemia group B protein (Fragment)	6	1	1.71083652	3.27350577
F8VV64	TNS2	up	Tensin-2	9	1	1.69800923	3.24452937
O15381	NVL	up	Nuclear valosin-containing protein-like	6	2	1.67229559	3.18721333
Q8NEZ4	KMT2C	up	Histone-lysine N-methyltransferase 2C	8	1	1.66894843	3.17982733

Q13206	DDX10	up	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	9	1	1.6544413	3.14801256
A0A0G2JNZ2	SCRIB	up	Protein scribble homolog	2	1	1.63902704	3.11455714
O60684	KPNA6	up	Importin subunit alpha-7	8	2	1.63306588	3.10171446
G3V419	MLH3	up	DNA mismatch repair protein Mlh3	6	2	1.62199863	3.07801152
P31323	PRKAR2B	up	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	7	3	1.60019807	3.03184936
Q5TZA2	CROCC	up	Rootletin	23	3	1.5969265	3.02498188
P21912	SDHB	up	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_mitochondrial	5	2	1.56871938	2.96641281
O00487	PSMD14	up	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	4	1	1.55592431	2.94022041
P07864	LDHC	up	L-lactate dehydrogenase C chain	6	1	1.52043137	2.86876813
Q9UKX2	MYH2	up	Myosin-2	21	1	1.51152838	2.85111925
Q9Y5L0	TNPO3	up	Transportin-3	14	5	1.50881096	2.845754
P84095	RHOG	up	Rho-related GTP-binding protein RhoG	4	2	1.4887138	2.80638667
P18206	VCL	up	Vinculin	28	7	1.47862914	2.78683799
P78527	PRKDC	up	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	42	5	1.46793408	2.76625486
A0A0A0MRC8	KCNQ5	up	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 5	5	1	1.46631312	2.76314854
Q9C0D2	CEP295	up	Centrosomal protein of 295 kDa	14	3	1.46533361	2.76127314
P62280	RPS11	up	40S ribosomal protein S11	11	4	1.46207126	2.75503617
Q9Y4C1	KDM3A	up	Lysine-specific demethylase 3A	19	2	1.46122228	2.75341539

Q49AM1	MTERF2	up	Transcription termination factor 2_ mitochondrial	2	1	1.46033048	2.7517139
A0A024R3M2	GRAMD1B	up	GRAM domain-containing protein 1B	2	1	1.4553668	2.74226273
P42285	MTREX	up	Exosome RNA helicase MTR4	4	1	1.44429816	2.72130406
Q96HE7	ERO1A	up	ERO1-like protein alpha	6	2	1.44059326	2.7143246
Q02252	ALDH6A1	up	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]_ mitochondrial	4	1	1.43723337	2.70801057
O60271	SPAG9	up	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	16	3	1.43022229	2.69488234
Q8WVM7	STAG1	up	Cohesin subunit SA-1	5	1	1.41325024	2.66336516
P36551	CPOX	up	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase_ mitochondrial	3	1	1.40376959	2.64592027
A2RRP1	NBAS	up	Neuroblastoma-amplified sequence	13	6	1.37976504	2.60225987
Q5VU65	NUP210L	up	Nuclear pore membrane glycoprotein 210-like	5	1	1.36006501	2.56696746
Q86TB9	PATL1	up	Protein PAT1 homolog 1	2	1	1.34909836	2.54752864
H0Y8P0	TBC1D1	up	TBC1 domain family member 1 (Fragment)	6	1	1.33569986	2.52397893
O14818	PSMA7	up	Proteasome subunit alpha type-7	7	5	1.32574166	2.50661714
P40938	RFC3	up	Replication factor C subunit 3	3	1	1.31236589	2.48348475
P25054	APC	up	Adenomatous polyposis coli protein	32	4	1.28805198	2.441981
P35813	PPM1A	up	Protein phosphatase 1A	5	1	1.2464951	2.3726431
P11055	MYH3	up	Myosin-3	16	2	1.21245118	2.3173102
B2RTY4	MYO9A	up	Unconventional myosin-IXa	30	5	1.20821494	2.31051577

P0C7M7	ACSM4	up	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM4_ mitochondrial	2	1	1.20456423	2.30467646
Q6ZP82	CCDC141	up	Coiled-coil domain-containing protein 141	8	2	1.20291177	2.3020382
Q15435	PPP1R7	down	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	5	2	1.22244596	-2.3334199
Q9BV73	CEP250	down	Centrosome-associated protein CEP250	28	4	1.22496933	-2.3375048
Q01082	SPTBN1	down	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 1	40	7	1.22884609	-2.3437945
J3KSB5	NF1	down	Neurofibromin (Fragment)	6	2	1.22929622	-2.3445259
Q5JWF2	GNAS	down	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	23	7	1.2379334	-2.3586043
Q9Y4A5	TRRAP	down	Transformation/transcription domain-associated protein	36	7	1.24126237	-2.364053
Q8WVM8	SCFD1	down	Sec1 family domain-containing protein 1	7	2	1.2573107	-2.3904972
Q13535	ATR	down	Serine/threonine-protein kinase ATR	22	4	1.26902793	-2.4099913
P09104	ENO2	down	Gamma-enolase	18	7	1.28329092	-2.4339355
Q15149	PLEC	down	Plectin	66	8	1.28845668	-2.4426661
P35637	FUS	down	RNA-binding protein FUS	10	4	1.30394038	-2.4690232
O15067	PFAS	down	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	15	2	1.30615712	-2.4728198
Q9BYV1	AGXT2	down	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2_ mitochondrial	4	1	1.30696676	-2.4742079
E7ESA7	NOS3	down	Nitric oxide synthase_ endothelial	3	1	1.31618556	-2.4900687
P26583	HMGB2	down	High mobility group protein B2	9	2	1.31954698	-2.4958772

Q13224	GRIN2B	down	Glutamate receptor ionotropic_ NMDA 2B	3	1	1.32149156	-2.4992437
Q12931	TRAP1	down	Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial	14	3	1.32193545	-2.5000127
Q92945	KHSRP	down	Far upstream element-binding protein 2	12	8	1.32219719	-2.5004663
P54136	RARS1	down	Arginine--tRNA ligase_ cytoplasmic	16	8	1.32304449	-2.5019353
A0A1B0GV23	CTSD	down	Cathepsin D	5	1	1.327544	-2.5097506
Q9Y536	PPIAL4A	down	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A	6	2	1.32775618	-2.5101197
Q9Y623	MYH4	down	Myosin-4	31	2	1.34701241	-2.5438479
Q14315	FLNC	down	Filamin-C	31	2	1.34766746	-2.5450032
Q9BYT8	NLN	down	Neurolysin_ mitochondrial	7	1	1.35040683	-2.5498402
O75145	PPFIA3	down	Liprin-alpha-3	22	3	1.35323129	-2.5548371
Q14498	RBM39	down	RNA-binding protein 39	8	3	1.36010722	-2.5670426
P21796	VDAC1	down	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	19	9	1.36290416	-2.5720241
O95714	HERC2	down	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	33	9	1.37505079	-2.5937704
Q92797	SYMPK	down	Symplekin	3	1	1.39275038	-2.6257879
Q86VH2	KIF27	down	Kinesin-like protein KIF27	12	1	1.40739263	-2.6525733
P68366	TUBA4A	down	Tubulin alpha-4A chain	26	3	1.41254946	-2.6620718
P30086	PEBP1	down	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	5	3	1.41498326	-2.6665664
Q96T76	MMS19	down	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	7	2	1.42241999	-2.6803474
Q12802	AKAP13	down	A-kinase anchor protein 13	20	3	1.46408078	-2.7588763

A0A2R8Y891	PFKM	down	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	5	1	1.47131945	-2.7727537
Q9NZJ4	SACS	down	Sacsin	45	1	1.47641214	-2.7825587
Q9Y3F4	STRAP	down	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	6	4	1.52173166	-2.8713549
P52292	KPNA2	down	Importin subunit alpha-1	2	1	1.536113	-2.9001208
Q86TC9	MYPN	down	Myopalladin	10	1	1.53821847	-2.9043563
P43034	PAFAH1B1	down	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	7	1	1.55972547	-2.9479774
Q8IXQ6	PARP9	down	Poly [ADP-ribose] polymerase 9	5	1	1.56075355	-2.9500789
A0A1W2PR46	GFAP	down	Glial fibrillary acidic protein	5	1	1.56960475	-2.9682338
Q96M86	DNHD1	down	Dynein heavy chain domain-containing protein 1	34	2	1.5733698	-2.9759903
Q9H115	NAPB	down	Beta-soluble NSF attachment protein	7	1	1.57437511	-2.9780647
P62805	H4-16	down	Histone H4	22	13	1.59379588	-3.0184248
B5MEG5	USP19	down	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 19	10	1	1.59770772	-3.0266204
A0A0A0MRX1	ELAVL2	down	ELAV-like protein	3	1	1.59805181	-3.0273423
Q13185	CBX3	down	Chromobox protein homolog 3	5	1	1.63624536	-3.1085577
F5GZS6	SLC3A2	down	4F2 cell-surface antigen heavy chain	6	1	1.64290741	-3.1229455
P42356	PI4KA	down	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	8	1	1.65670789	-3.1529622
Q8NDW8	TTC21A	down	Tetratricopeptide repeat protein 21A	15	3	1.66077252	-3.1618579
Q96RT7	TUBGCP6	down	Gamma-tubulin complex component 6	11	2	1.67458275	-3.1922702
Q08945	SSRP1	down	FACT complex subunit SSRP1	16	6	1.67836023	-3.2006396

B3KV94	KDM5B	down	Jumonji_ AT rich interactive domain 1B (RBP2-like)_ isoform CRA_a (Fragment)	8	1	1.69841337	-3.2454384
Q6KC79	NIPBL	down	Nipped-B-like protein	5	2	1.6997496	-3.2484457
Q6ZV73	FGD6	down	FYVE_ RhoGEF and PH domain-containing protein 6	2	2	1.70425166	-3.2585986
F6R0L0	SIMC1	down	SUMO-interacting motif-containing protein 1	2	1	1.70517913	-3.2606942
Q9ULT8	HECTD1	down	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1	21	5	1.70917795	-3.2697446
P62195	PSMC5	down	26S proteasome regulatory subunit 8	17	9	1.72623875	-3.308641
Q9ULL1	PLEKHG1	down	Pleckstrin homology domain-containing family G member 1	7	2	1.75238306	-3.3691463
Q9NWH9	SLTM	down	SAFB-like transcription modulator	2	1	1.78880602	-3.4552881
Q6WCQ1	MPRIP	down	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	14	3	1.79106293	-3.4606977
F8WA32	TSGA10	down	Testis-specific gene 10 protein (Fragment)	11	2	1.82081909	-3.5328172
Q86WI1	PKHD1L1	down	Fibrocystin-L	16	2	1.83771214	-3.5744274
P62633	CNBP	down	Cellular nucleic acid-binding protein	2	1	1.85188876	-3.6097246
Q9Y5H9	PCDHA2	down	Protocadherin alpha-2	2	1	1.86112872	-3.6329178
Q702N8	XIRP1	down	Xin actin-binding repeat-containing protein 1	7	1	1.87329062	-3.6636727
P50914	RPL14	down	60S ribosomal protein L14	5	2	1.89163661	-3.7105592
A0A1W2PR17	PFKFB3	down	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2_6-bisphosphatase 3	2	1	1.90380888	-3.7419982

O14929	HAT1	down	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	7	2	1.93173432	-3.8151356
Q8IV36	HID1	down	Protein HID1	7	1	1.93365448	-3.8202167
Q92879	CELF1	down	CUGBP Elav-like family member 1	5	1	1.94900898	-3.8610921
Q9UHB9	SRP68	down	Signal recognition particle subunit SRP68	12	2	1.97115835	-3.920828
Q495T6	MMEL1	down	Membrane metallo-endopeptidase-like 1	2	1	1.9969739	-3.9916187
P61586	RHOA	down	Transforming protein RhoA	5	4	1.9971242	-3.9920345
Q9HC10	OTOF	down	Otoferlin	7	1	2.00487828	-4.0135484
Q15293	RCN1	down	Reticulocalbin-1	6	3	2.01243998	-4.0346401
Q4VXU2	PABPC1L	down	Polyadenylate-binding protein 1-like	17	1	2.04738035	-4.1335472
Q12830	BPTF	down	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF	14	2	2.05469388	-4.1545548
Q14764	MVP	down	Major vault protein	16	3	2.06109071	-4.1730168
P08922	ROS1	down	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase R	2	1	2.0638961	-4.1811393
P48637	GSS	down	Glutathione synthetase	5	1	2.08332771	-4.2378359
Q14669	TRIP12	down	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	2	1	2.08909861	-4.2548215
O75400	PRPF40A	down	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	7	2	2.11815985	-4.3413985
P35240	NF2	down	Merlin	4	1	2.11956958	-4.3456427
Q8IYW2	CFAP46	down	Cilia- and flagella-associated protein 46	6	1	2.17379953	-4.5121015
O95071	UBR5	down	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	23	3	2.21397432	-4.639516
Q9H2D6	TRIOBP	down	TRIO and F-actin-binding protein	11	1	2.24928622	-4.7544756

Q5TIA1	MEI1	down	Meiosis inhibitor protein 1	11	2	2.25922311	-4.7873362
Q9P2I0	CPSF2	down	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	8	2	2.28189222	-4.8631538
Q9UQ35	SRRM2	down	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	5	1	2.32275219	-5.0028569
Q5JU85	IQSEC2	down	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2	5	2	2.32512436	-5.0110897
P07954	FH	down	Fumarate hydratase_ mitochondrial	8	3	2.41849655	-5.346136
Q9Y295	DRG1	down	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	4	1	2.52963837	-5.7742692
P30044	PRDX5	down	Peroxiredoxin-5_ mitochondrial	2	2	2.57214783	-5.9469413
F5GYS8	MEIS1	down	Homeobox protein Meis1	3	1	2.61600146	-6.130486
E7EQM8	DCC	down	Netrin receptor DCC	2	1	2.62233378	-6.1574533
O00170	AIP	down	AH receptor-interacting protein	4	1	2.73548852	-6.6598446
Q9H254	SPTBN4	down	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 4	34	2	2.74337087	-6.6963311
Q9UPQ9	TNRC6B	down	Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein	4	1	2.76734111	-6.8085194
Q7L5D6	GET4	down	Golgi to ER traffic protein 4 homolog	3	1	2.80358772	-6.9817452
Q9NY74	ETAA1	down	Ewing's tumor-associated antigen 1	5	1	2.88565753	-7.390426
Q96KP1	EXOC2	down	Exocyst complex component 2	2	1	2.9292876	-7.6173416
E9PB61	ALYREF	down	THO complex subunit 4	3	1	2.94308966	-7.6905654
A0A087X0V5	OAS2	down	2'-5'-oligoadenylate synthase 2	2	1	2.97787413	-7.8782441
Q13439	GOLGA4	down	Golgin subfamily A member 4	30	1	3.00184627	-8.0102445
A0A0G2JMZ6	KIF5C	down	Kinesin-like protein (Fragment)	23	2	3.05955775	-8.33717
Q01433	AMPD2	down	AMP deaminase 2	18	6	3.0638389	-8.361947

Q9Y6V0	PCLO	down	Protein piccolo	20	2	3.09049428	-8.5178792
B2RPK0	HMGB1P1	down	Putative high mobility group protein B1-like 1	8	1	3.10908361	-8.6283435
P09429	HMGB1	down	High mobility group protein B1	7	1	3.11105229	-8.6401256
H0YD68	ODF2L	down	Protein BCAP (Fragment)	3	1	3.23169172	-9.3936883
P06865	HEXA	down	Beta-hexosaminidase subunit alpha	8	2	3.29781008	-9.8342162
O95786	DDX58	down	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX58	5	1	3.33168484	-10.067858
P02768	ALB	down	Serum albumin	16	5	3.3403057	-10.128199
B1ANS9	WDR64	down	WD repeat-containing protein 64	6	1	3.3482493	-10.184119
P12532	CKMT1A	down	Creatine kinase U-type_ mitochondrial	9	3	3.39774288	-10.539561
Q9H6R7	WDCP	down	WD repeat and coiled-coil-containing protein	4	1	3.44033619	-10.855364
A0A2R8Y4H4	LRRC9	down	Leucine-rich repeat-containing protein 9	3	1	3.4715376	-11.092692
P54098	POLG	down	DNA polymerase subunit gamma-1	6	2	3.49291191	-11.25826
Q16623	STX1A	down	Syntaxin-1A	6	2	3.56428852	-11.829265
Q5JSH3	WDR44	down	WD repeat-containing protein 44	5	1	3.58501924	-12.000472
Q9NZB2	FAM120A	down	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	11	2	3.59739049	-12.10382
Q5JQF8	PABPC1L2A	down	Polyadenylate-binding protein 1-like 2	6	1	3.61073884	-12.216328
Q76N89	HECW1	down	E3 ubiquitin-protein ligase HECW1	7	1	3.7161717	-13.142535
Q9NYC9	DNAH9	down	Dynein heavy chain 9_ axonemal	48	2	3.75436223	-13.495086
Q8N2C7	UNC80	down	Protein unc-80 homolog	5	1	3.80596566	-13.986525
P16234	PDGFRA	down	Platelet-derived growth factor receptor alpha	6	2	3.8567058	-14.487189

O60486	PLXNC1	down	Plexin-C1	15	1	3.86371008	-14.557695
Q5VZK9	CARMIL1	down	F-actin-uncapping protein LRRC16A	2	1	3.86485543	-14.569257
Q9NR19	ACSS2	down	Acetyl-coenzyme A synthetase_ cytoplasmic	5	2	3.87169514	-14.638493
Q9GZU2	PEG3	down	Paternally-expressed gene 3 protein	4	1	3.91814898	-15.117514
Q8TDY2	RB1CC1	down	RB1-inducible coiled-coil protein 1	11	2	4.0104572	-16.116395
Q8WWL2	SPIRE2	down	Protein spire homolog 2	5	1	4.01971386	-16.220134
O94887	FARP2	down	FERM_ ARHGEF and pleckstrin domain-containing protein 2	11	1	4.05758408	-16.651544
Q6UXI7	VIT	down	Vitrin	2	1	4.07252627	-16.824903
Q70EL4	USP43	down	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 43	3	1	4.26677061	-19.249787
Q8IUR5	TMTC1	down	Transmembrane and TPR repeat-containing protein 1	4	2	4.39411671	-21.026207
O15397	IPO8	down	Importin-8	13	2	4.45175987	-21.883322
Q9BZZ2	SIGLEC1	down	Sialoadhesin	3	1	4.4922971	-22.506926
P20936	RASA1	down	Ras GTPase-activating protein 1	5	1	4.57219975	-23.788621
Q6N022	TENM4	down	Teneurin-4	4	1	4.57958184	-23.910657
Q13368	MPP3	down	MAGUK p55 subfamily member 3	3	1	4.58110407	-23.935899
Q6ZNJ1	NBEAL2	down	Neurobeachin-like protein 2	5	1	4.61089286	-24.435265
Q7Z591	AKNA	down	AT-hook-containing transcription factor	6	2	4.63025755	-24.765461
Q70J99	UNC13D	down	Protein unc-13 homolog D	2	1	4.63893156	-24.914808
Q14151	SAFB2	down	Scaffold attachment factor B2	3	1	4.73181248	-26.571587
P19838	NFKB1	down	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	4	1	4.74806915	-26.872696

Q9H2J4	PDCL3	down	Phosducin-like protein 3	2	1	4.81032487	-28.057701
P16885	PLCG2	down	1-phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2	13	2	4.84930975	-28.82622
Q9UGJ1	TUBGCP4	down	Gamma-tubulin complex component 4	4	1	4.92221457	-30.320352
Q96MZ0	GDAP1L1	down	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	5	2	5.032531	-32.729757
F8VVM2	SLC25A3	down	Phosphate carrier protein_mitochondrial	3	1	5.16737034	-35.936309
A0A2R8Y5E1	CBLB	down	E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B	3	1	5.34510771	-40.647866
Q08043	ACTN3	down	Alpha-actinin-3	20	1	5.45983564	-44.012324
Q96L91	EP400	down	E1A-binding protein p400	10	1	5.49099127	-44.973126
Q8NEV8	EXPH5	down	Exophilin-5	22	1	5.49195968	-45.003325
Q5CZC0-2	FSIP2	down	Isoform 2 of Fibrous sheath-interacting protein 2	20	1	5.49282074	-45.030192
Q13087	PDIA2	down	Protein disulfide-isomerase A2	2	1	5.50888018	-45.534249
Q9NX02	NLRP2	down	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 2	11	1	5.56753493	-47.423654
Q13315	ATM	down	Serine-protein kinase ATM	42	2	5.9904517	-63.577822
A0A1B0GUZ7	EFR3A	down	Protein EFR3 homolog A	6	1	6.15866698	-71.440337
P30793	GCH1	down	GTP cyclohydrolase 1	3	1	7.21904493	-148.98724
A0A1B0GTC3	FTO	down	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO	5	2	7.87120583	-234.13646
Q86YR7	MCF2L2	down	Probable guanine nucleotide exchange factor MCF2L2	5	1	8.37237439	-331.38727

Q96IZ5	RBM41		RNA-binding protein 41	2	1	-	Exclusive
P14543	NID1		Nidogen-1	2	1	-	Exclusive
A0A2R8Y6H3	DEPDC5		GATOR complex protein DEPDC5	5	1	-	Exclusive
Q502W6	VWA3B		von Willebrand factor A domain-containing protein 3B	11	1	-	Exclusive
Q9H0B3	IQCN		IQ domain-containing protein N	4	1	-	Exclusive
Q9ULI1	NWD2		NACHT and WD repeat domain-containing protein 2	11	1	-	Exclusive
A6NGW2	STRCP1		Putative stereocilin-like protein	2	1	-	Exclusive
A0A087WZ40	MAP7		Ensconsin	3	1	-	Exclusive
M0QZR9	ELAVL1		ELAV-like protein 1	2	1	-	Exclusive
Q9HC77	CENPJ		Centromere protein J	9	1	-	Exclusive
Q68DQ2	CRYBG3		Very large A-kinase anchor protein	18	1	-	Exclusive
B1AKJ5	NRDC		Nardilysin (N-arginine dibasic convertase)_ isoform CRA_d	14	1	-	Exclusive

Tabla 15. Proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST Scal

Accesion	Gen	Condition	Description	Peptide count	Unique peptides	Log 2 ratio	Expression relative change
Q9BS26	ERP44	up	Endoplasmic reticulum resident protein 44	6	1	8.199827	294.031518
P54760	EPHB4	up	Ephrin type-B receptor 4	7	2	8.051104	265.230707
Q6Q759	SPAG17	up	Sperm-associated antigen 17	8	1	7.652538	201.207183
A6NDL7	METTL21EP	up	Putative methyltransferase-like protein 21E pseudogene	2	1	7.046469	132.189979
O75976	CPD	up	Carboxypeptidase D	17	1	6.63007	99.0489654
P20042	EIF2S2	up	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	5	1	6.291957	78.3551937
O75489	NDUFS3	up	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3_ mitochondrial	4	1	6.18031	72.5201498
Q9UHL4	DPP7	up	Dipeptidyl peptidase 2	2	1	5.939344	61.3649943
Q9P0J7	KCMF1	up	E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1	2	1	5.621258	49.2229084
Q8TCU6	PREX1	up	Phosphatidylinositol 3_4_5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	10	1	5.423825	42.9273438
A0A0A0MS63	LVRN	up	Aminopeptidase	9	1	5.40741	42.4416841
Q6NUK1	SLC25A24	up	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	4	1	5.122355	34.8323282
Q13023	AKAP6	up	A-kinase anchor protein 6	11	2	5.070189	33.5953347
P13056	NR2C1	up	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 1	2	1	4.960923	31.1448777

E9PJK2	EED	up	Polycomb protein EED	2	1	4.948682	30.8817371
A0A2R8YDP4	SCN9A	up	Sodium channel protein	4	1	4.840436	28.6494592
Q9Y4G6	TLN2	up	Talin-2	34	3	4.829959	28.4421575
Q9Y4E8	USP15	up	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	12	1	4.787637	27.6199155
O43252	PAPSS1	up	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	5	1	4.552878	23.4721485
Q8NDH2	CCDC168	up	Coiled-coil domain-containing protein 168	15	3	4.48747	22.4317458
Q9Y4B5	MTCL1	up	Microtubule cross-linking factor 1	12	1	4.385648	20.9031433
P13861	PRKAR2A	up	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	6	1	4.361515	20.5563897
P50570	DNM2	up	Dynamin-2	4	2	4.36098	20.5487681
Q12905	ILF2	up	Interleukin enhancer-binding factor 2	5	2	4.34265	20.2893396
Q92187	ST8SIA4	up	CMP-N-acetylneuraminate-poly-alpha-2_8-sialyltransferase	2	1	4.080078	16.913203
Q14651	PLS1	up	Plastin-1	9	1	3.981956	15.8011319
O95202	LETM1	up	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein	7	1	3.911318	15.0461033
P26640	VARs1	up	Valine--tRNA ligase	13	1	3.910141	15.0338332
A0A0C4DG98	THOC2	up	THO complex subunit 2	5	1	3.773186	13.6723184
P59045	NLRP11	up	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 11	7	1	3.764459	13.5898629
P36551	CPOX	up	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase_ mitochondrial	3	1	3.663302	12.6696257
A0A2R8Y8B5	CC2D2B	up	Protein CC2D2B	2	1	3.589254	12.0357488
Q5TCS8	AK9	up	Adenylate kinase 9	12	1	3.587171	12.0183838

Q9Y4D8	HECTD4	up	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4	28	1	3.542895	11.6551446
Q14247	CTTN	up	Src substrate cortactin	10	1	3.491656	11.2484632
Q9P2P6	STARD9	up	StAR-related lipid transfer protein 9	32	1	3.468335	11.0680948
O14771	ZNF213	up	Zinc finger protein 213	2	1	3.461637	11.0168281
P56545-2	CTBP2	up	Isoform 2 of C-terminal-binding protein 2	3	2	3.44225	10.8697737
P78347	GTF2I	up	General transcription factor II-I	13	2	3.3402	10.1274566
Q8N2N9	ANKRD36B	up	Ankyrin repeat domain-containing protein 36B	13	1	3.297042	9.82898198
Q12860	CNTN1	up	Contactin-1	5	2	3.267905	9.63246474
O00203	AP3B1	up	AP-3 complex subunit beta-1	15	1	3.259393	9.57579986
Q96PN6	ADCY10	up	Adenylate cyclase type 10	14	2	3.201941	9.20195882
Q6ZRK6	CCDC73	up	Coiled-coil domain-containing protein 73	10	1	3.145237	8.8472985
O43581	SYT7	up	Synaptotagmin-7	4	2	3.058556	8.33138299
Q9ULD2	MTUS1	up	Microtubule-associated tumor suppressor 1	7	1	3.047319	8.26674279
Q6ZRQ5	MMS22L	up	Protein MMS22-like	4	1	3.039621	8.22275019
P02549	SPTA1	up	Spectrin alpha chain_ erythrocytic 1	22	1	3.009667	8.05378523
Q86X76	NIT1	up	Deaminated glutathione amidase	5	1	3.004381	8.02433035
Q05BV3	EML5	up	Echinoderm microtubule-associated protein-like 5	21	4	2.975852	7.86720949
P42574	CASP3	up	Caspase-3	6	5	2.973985	7.85703507
Q96KP4	CNDP2	up	Cytosolic non-specific dipeptidase	11	2	2.942902	7.68956507
J3KQ61	BRD1	up	Bromodomain-containing protein 1 (Fragment)	2	1	2.938442	7.66582997
F8W726	UBAP2L	up	Ubiquitin-associated protein 2-like	4	1	2.872428	7.3229655

Q9Y6D5	ARFGEF2	up	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	15	1	2.853718	7.22860872
Q08211	DHX9	up	ATP-dependent RNA helicase A	15	3	2.827304	7.09746584
Q9NYL2	MAP3K20	up	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 20	2	1	2.823085	7.07674041
P08670	VIM	up	Vimentin	10	1	2.817086	7.04737508
Q6KB66	KRT80	up	Keratin_ type II cytoskeletal 80	3	1	2.806769	6.99715767
O00303	EIF3F	up	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	7	4	2.740361	6.68237525
B4DYE1	NFE2L1	up	Endoplasmic reticulum membrane sensor NFE2L1	5	1	2.702771	6.51051198
Q13393	PLD1	up	Phospholipase D1	2	1	2.699869	6.49742916
Q9BPX7	C7orf25	up	UPF0415 protein C7orf25	7	2	2.672137	6.373726
P06753	TPM3	up	Tropomyosin alpha-3 chain	6	1	2.671238	6.36975552
D3DQ30	TTC39A	up	HCG40295_ isoform CRA_d	3	1	2.657617	6.30989938
P16591	FER	up	Tyrosine-protein kinase Fer	4	1	2.603367	6.07703247
P43403	ZAP70	up	Tyrosine-protein kinase ZAP-70	4	1	2.599241	6.05967744
Q6UXK2	ISLR2	up	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein 2	2	1	2.598708	6.05743912
Q15811-9	ITSN1	up	Isoform 9 of Intersectin-1	13	1	2.555886	5.88028467
J3KNQ4	PARVA	up	Alpha-parvin	6	2	2.510266	5.69725113
Q16850	CYP51A1	up	Lanosterol 14-alpha demethylase	7	1	2.457356	5.49209279
Q8NFP9	NBEA	up	Neurobeachin	28	2	2.411337	5.31967091
Q99459	CDC5L	up	Cell division cycle 5-like protein	6	2	2.396454	5.2650747
HOY3A8	ASTN2	up	Astrotactin-2 (Fragment)	3	1	2.36011	5.13409503

P52735	VAV2	up	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	7	2	2.356663	5.12184289
P49354	FNTA	up	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	6	2	2.301481	4.92963558
P40938	RFC3	up	Replication factor C subunit 3	3	1	2.245331	4.7414588
Q71DI3	H3C13	up	Histone H3.2	7	2	2.224947	4.67493725
Q15056	EIF4H	up	Eukaryotic translation initiation factor 4H	4	1	2.175746	4.51819332
Q5VT25	CDC42BPA	up	Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha	16	3	2.07414	4.21093323
Q5VTI5	PLEKHA6	up	Pleckstrin homology domain-containing family A member 6	6	1	1.990052	3.97251316
A0A0A0MQW5	LMTK3	up	Serine/threonine-protein kinase LMTK3	3	1	1.970838	3.91995747
J3KPQ0	FGFR4	up	Fibroblast growth factor receptor	3	1	1.970505	3.91905277
P14735	IDE	up	Insulin-degrading enzyme	18	2	1.967882	3.91193392
D6REX3	SEC31A	up	Protein transport protein Sec31A	7	2	1.967479	3.91084132
A0A087WW83	GPR179	up	Probable G-protein-coupled receptor 179	5	1	1.940824	3.83924865
Q9UKX2	MYH2	up	Myosin-2	21	1	1.925999	3.7999989
Q5JYT7	KIAA1755	up	Uncharacterized protein KIAA1755	2	1	1.908617	3.75449013
O15230	LAMA5	up	Laminin subunit alpha-5	25	2	1.892084	3.71171001
Q8NEV4	MYO3A	up	Myosin-IIIa	16	1	1.886183	3.69655915
F8VV64	TNS2	up	Tensin-2	9	1	1.868374	3.65120836
Q12907	LMAN2	up	Vesicular integral-membrane protein VIP36	4	1	1.864812	3.64220468
Q9BT78	COPS4	up	COP9 signalosome complex subunit 4	11	4	1.859415	3.62860496
P04114	APOB	up	Apolipoprotein B-100	71	6	1.852382	3.6109589
Q14980	NUMA1	up	Nuclear mitotic apparatus protein 1	39	6	1.839986	3.58006554

Q9NYZ2	SLC25A37	up	Mitoferrin-1	2	1	1.837916	3.5749325
Q92547	TOPBP1	up	DNA topoisomerase 2-binding protein 1	11	1	1.827836	3.55004177
E7ESM1	NDRG1	up	Protein NDRG1	5	1	1.818663	3.52754136
Q4LDE5	SVEP1	up	Sushi_ von Willebrand factor type A_ EGF and pentraxin domain-containing protein 1	11	1	1.800482	3.48336584
O60684	KPNA6	up	Importin subunit alpha-7	8	2	1.793982	3.46770699
Q14146	URB2	up	Unhealthy ribosome biogenesis protein 2 homolog	4	2	1.792071	3.46311669
Q9UI26	IPO11	up	Importin-11	9	2	1.771227	3.41344144
Q9H2D6	TRIOBP	up	TRIO and F-actin-binding protein	11	1	1.762798	3.39355642
Q9NRC1	ST7	up	Suppressor of tumorigenicity 7 protein	3	1	1.732313	3.32260087
Q9C0F0	ASXL3	up	Putative Polycomb group protein ASXL3	2	2	1.731734	3.32126767
Q9UBT6	POLK	up	DNA polymerase kappa	7	2	1.71224	3.27669184
Q0VDF9	HSPA14	up	Heat shock 70 kDa protein 14	5	1	1.698404	3.24541731
Q15555	MAPRE2	up	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	2	1	1.684704	3.21474432
Q4G0P3	HYDIN	up	Hydrocephalus-inducing protein homolog	47	2	1.677655	3.19907541
A0A0U1RQK7	EIF4G3	up	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	22	3	1.669927	3.18198492
P16870	CPE	up	Carboxypeptidase E	5	1	1.666849	3.17520337
A0A0G2JNZ2	SCRIB	up	Protein scribble homolog	2	1	1.656763	3.15308268
P49748	ACADVL	up	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial	8	2	1.646877	3.13155019
P31323	PRKAR2B	up	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	7	3	1.623559	3.08134239

Q9Y463	DYRK1B	up	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B	3	1	1.606951	3.04607402
Q9UPT8	ZC3H4	up	Zinc finger CCCH domain-containing protein 4	2	2	1.60248	3.03664866
Q8WVM7	STAG1	up	Cohesin subunit SA-1	5	1	1.585266	3.00063118
O15294	OGT	up	UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit	8	1	1.582406	2.99468861
Q8N1W2	ZNF710	up	Zinc finger protein 710	2	1	1.527671	2.88320017
O15381	NVL	up	Nuclear valosin-containing protein-like	6	2	1.50262	2.83356834
P50995	ANXA11	up	Annexin A11	6	1	1.500643	2.82968802
Q8TDM6	DLG5	up	Disks large homolog 5	20	4	1.493098	2.81492796
P47897	QARS1	up	Glutamine--tRNA ligase	10	2	1.483724	2.79669708
Q6WKZ4	RAB11FIP1	up	Rab11 family-interacting protein 1	15	2	1.465429	2.76145573
Q12849	GRSF1	up	G-rich sequence factor 1	7	2	1.433456	2.70092953
H0Y8P0	TBC1D1	up	TBC1 domain family member 1 (Fragment)	6	1	1.419038	2.67407142
O75962	TRIO	up	Triple functional domain protein	27	2	1.418614	2.67328564
P35221	CTNNA1	up	Catenin alpha-1	19	3	1.417305	2.67086119
Q8WXX0	DNAH7	up	Dynein heavy chain 7_ axonemal	41	3	1.414985	2.66656963
Q6YHU6	THADA	up	Thyroid adenoma-associated protein	6	1	1.414394	2.66547749
K7EK07	H3-3B	up	Histone H3 (Fragment)	6	1	1.407722	2.65317898
Q9Y5L0	TNPO3	up	Transportin-3	14	5	1.383393	2.60881203
Q8IWV7	UBR1	up	E3 ubiquitin-protein ligase UBR1	17	2	1.367221	2.57973165
Q70CQ2	USP34	up	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34	33	3	1.34669	2.54327947
Q02952	AKAP12	up	A-kinase anchor protein 12	4	1	1.315112	2.48821647

Q9C0D2	CEP295	up	Centrosomal protein of 295 kDa	14	3	1.303701	2.46861354
Q9HB07	MYG1	up	UPF0160 protein MYG1_ mitochondrial	8	1	1.302585	2.46670467
Q8TE73	DNAH5	up	Dynein heavy chain 5_ axonemal	8	2	1.301977	2.46566534
Q9Y5B9	SUPT16H	up	FACT complex subunit SPT16	8	1	1.300094	2.46244926
P23284	PPIB	up	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	8	4	1.28551	2.43768211
P09417	QDPR	up	Dihydropteridine reductase	7	1	1.262958	2.3998729
Q9P2E9	RRBP1	up	Ribosome-binding protein 1	7	1	1.255966	2.38827009
Q13206	DDX10	up	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	9	1	1.255542	2.38756829
O95996	APC2	up	Adenomatous polyposis coli protein 2	7	1	1.254186	2.38532525
Q96JD6	AKR1E2	up	1_5-anhydro-D-fructose reductase	5	2	1.216186	2.32331698
P18206	VCL	up	Vinculin	28	7	1.213396	2.3188283
Q8NEZ4	KMT2C	up	Histone-lysine N-methyltransferase 2C	8	1	1.209239	2.31215642
C9J5X9	FANCB	up	Fanconi anemia group B protein (Fragment)	6	1	1.207423	2.30924781
Q9H158	PCDHAC1	up	Protocadherin alpha-C1	2	1	1.207074	2.30868925
Q9UBL3	ASH2L	down	Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2	6	1	1.20758944	-2.3095142
Q13185	CBX3	down	Chromobox protein homolog 3	5	1	1.21202238	-2.3166215
Q14008	CKAP5	down	Cytoskeleton-associated protein 5	22	2	1.21733147	-2.3251624
A6NNZ2	TUBB8B	down	Tubulin beta-8 chain-like protein LOC260334	20	3	1.23259654	-2.3498954
P43034	PAFAH1B1	down	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	7	1	1.25755586	-2.3909034
O75746	SLC25A12	down	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	14	3	1.26419455	-2.4019307
Q15435	PPP1R7	down	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	5	2	1.265666	-2.4043818

A0A1B0GV23	CTSD	down	Cathepsin D	5	1	1.26930411	-2.4104527
Q5JU85	IQSEC2	down	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2	5	2	1.2789878	-2.4266866
P50914	RPL14	down	60S ribosomal protein L14	5	2	1.29776868	-2.4584835
P62805	H4-16	down	Histone H4	22	13	1.31811462	-2.4934005
Q9C0G6	DNAH6	down	Dynein heavy chain 6_ axonemal	38	3	1.31860278	-2.4942443
B3KV94	KDM5B	down	Jumonji_ AT rich interactive domain 1B (RBP2-like)_ isoform CRA_a (Fragment)	8	1	1.32033049	-2.4972331
A0A0G2JMZ6	KIF5C	down	Kinesin-like protein (Fragment)	23	2	1.33235824	-2.5181396
P26583	HMGB2	down	High mobility group protein B2	9	2	1.3340779	-2.5211429
Q12802	AKAP13	down	A-kinase anchor protein 13	20	3	1.34167907	-2.5344612
Q8IUG5	MYO18B	down	Unconventional myosin-XVIIIb	26	3	1.35551802	-2.5588898
A0A1B0GUZ7	EFR3A	down	Protein EFR3 homolog A	6	1	1.36006855	-2.5669738
Q07020	RPL18	down	60S ribosomal protein L18	6	2	1.38949388	-2.6198676
P30044	PRDX5	down	Peroxiredoxin-5_ mitochondrial	2	2	1.40003605	-2.6390818
Q5VTE0	EEF1A1P5	down	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	43	20	1.40110349	-2.6410351
Q8N3C0	ASCC3	down	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	18	3	1.41010485	-2.6575648
Q96RT7	TUBGCP6	down	Gamma-tubulin complex component 6	11	2	1.42673849	-2.6883826
O15050	TRANK1	down	TPR and ankyrin repeat-containing protein 1	21	3	1.42746864	-2.6897436
Q92945	KHSRP	down	Far upstream element-binding protein 2	12	8	1.44412999	-2.7209869
Q16623	STX1A	down	Syntaxin-1A	6	2	1.44456952	-2.721816
Q96L91	EP400	down	E1A-binding protein p400	10	1	1.44723439	-2.7268482
Q7L5D6	GET4	down	Golgi to ER traffic protein 4 homolog	3	1	1.45531515	-2.7421646
Q92738	USP6NL	down	USP6 N-terminal-like protein	2	1	1.4563559	-2.7441434

P62633	CNBP	down	Cellular nucleic acid-binding protein	2	1	1.47748585	-2.7846304
O00763	ACACB	down	Acetyl-CoA carboxylase 2	19	1	1.48584206	-2.800806
O75436	VPS26A	down	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	6	2	1.52073167	-2.8693653
O94925	GLS	down	Glutaminase kidney isoform_ mitochondrial	17	8	1.52839751	-2.8846524
Q96T76	MMS19	down	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	7	2	1.53179176	-2.8914472
Q9BRZ2	TRIM56	down	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56	5	2	1.53206617	-2.8919972
Q8NF91-9	SYNE1	down	Isoform 9 of Nesprin-1	6	2	1.57678442	-2.9830423
O60333	KIF1B	down	Kinesin-like protein KIF1B	15	1	1.58723664	-3.0047327
E9PFR3	PPP2R5D	down	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit	7	1	1.59077225	-3.0121054
O95714	HERC2	down	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	33	9	1.62132403	-3.0765726
Q70EL4	USP43	down	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 43	3	1	1.62320508	-3.0805866
Q9UGJ1	TUBGCP4	down	Gamma-tubulin complex component 4	4	1	1.63045331	-3.0961027
O00170	AIP	down	AH receptor-interacting protein	4	1	1.63957669	-3.115744
Q13439	GOLGA4	down	Golgin subfamily A member 4	30	1	1.6713074	-3.185031
B2RPK0	HMGB1P1	down	Putative high mobility group protein B1-like 1	8	1	1.67435999	-3.1917773
Q9NR19	ACSS2	down	Acetyl-coenzyme A synthetase_ cytoplasmic	5	2	1.67554208	-3.1943936
A0A087X0V5	OAS2	down	2'-5'-oligoadenylate synthase 2	2	1	1.68065451	-3.2057335
O00429	DNM1L	down	Dynamin-1-like protein	22	1	1.70466451	-3.2595313
Q14669	TRIP12	down	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	2	1	1.73449203	-3.3276231
Q15413	RYR3	down	Ryanodine receptor 3	48	4	1.73476538	-3.3282536
Q702N8	XIRP1	down	Xin actin-binding repeat-containing protein 1	7	1	1.77656559	-3.426096
P09429	HMGB1	down	High mobility group protein B1	7	1	1.77797943	-3.4294553

Q9P2I0	CPSF2	down	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	8	2	1.81668507	-3.5227084
P30793	GCH1	down	GTP cyclohydrolase 1	3	1	1.81703573	-3.5235648
Q9H2K8	TAOK3	down	Serine/threonine-protein kinase TAO3	5	1	1.82239178	-3.5366704
F5GYS8	MEIS1	down	Homeobox protein Meis1	3	1	1.91014081	-3.7584578
E5RJ29	PSD3	down	PH and SEC7 domain-containing protein 3	4	1	1.93889505	-3.8341188
P17858	PFKL	down	ATP-dependent 6-phosphofructokinase_ liver type	5	1	1.94359762	-3.8466368
Q14764	MVP	down	Major vault protein	16	3	1.94885177	-3.8606714
P08922	ROS1	down	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase R	2	1	1.99736333	-3.9926963
Q01433	AMPD2	down	AMP deaminase 2	18	6	2.00383133	-4.0106368
H0Y390	MACF1	down	Microtubule-actin cross-linking factor 1_ isoforms 1/2/3/5 (Fragment)	60	6	2.07508357	-4.2136882
Q9BZZ2	SIGLEC1	down	Sialoadhesin	3	1	2.08942917	-4.2557965
Q5JQF8	PABPC1L2A	down	Polyadenylate-binding protein 1-like 2	6	1	2.14064642	-4.4095958
A0A2R8Y4H4	LRRC9	down	Leucine-rich repeat-containing protein 9	3	1	2.14739056	-4.4302575
Q7Z3T8	ZFYVE16	down	Zinc finger FYVE domain-containing protein 16	3	1	2.15039924	-4.4395063
Q9UPQ9	TNRC6B	down	Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein	4	1	2.17324984	-4.5103827
Q9H0B6	KLC2	down	Kinesin light chain 2	7	2	2.20585891	-4.6134912
O75116	ROCK2	down	Rho-associated protein kinase 2	23	3	2.25524251	-4.7741454
Q68E01	INTS3	down	Integrator complex subunit 3	8	1	2.38537738	-5.2248057
Q6PIF6	MYO7B	down	Unconventional myosin-VIIb	22	1	2.45417832	-5.4800092
B1ANS9	WDR64	down	WD repeat-containing protein 64	6	1	2.47275396	-5.5510241

O43143	DHX15	down	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	13	2	2.533176	-5.7884457
Q7Z591	AKNA	down	AT-hook-containing transcription factor	6	2	2.59401514	-6.0377672
Q13368	MPP3	down	MAGUK p55 subfamily member 3	3	1	2.59493801	-6.0416307
P54098	POLG	down	DNA polymerase subunit gamma-1	6	2	2.71788469	-6.5790747
Q9NX02	NLRP2	down	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 2	11	1	2.7304885	-6.6368032
Q08043	ACTN3	down	Alpha-actinin-3	20	1	2.76187858	-6.7827888
Q8TDY2	RB1CC1	down	RB1-inducible coiled-coil protein 1	11	2	2.76641102	-6.8041315
Q13315	ATM	down	Serine-protein kinase ATM	42	2	3.09601786	-8.5505538
Q8WWL2	SPIRE2	down	Protein spire homolog 2	5	1	3.10858721	-8.6253751
P49411	TUFM	down	Elongation factor Tu_ mitochondrial	3	1	3.23726957	-9.4300771
Q9NYC9	DNAH9	down	Dynein heavy chain 9_ axonemal	48	2	3.26576397	-9.6181803
Q6ZNJ1	NBEAL2	down	Neurobeachin-like protein 2	5	1	3.29592468	-9.8213727
P02768	ALB	down	Serum albumin	16	5	3.44035819	-10.855529
Q5CZC0-2	FSIP2	down	Isoform 2 of Fibrous sheath-interacting protein 2	20	1	3.52193095	-11.487006
Q9H2J4	PDCL3	down	Phosducin-like protein 3	2	1	3.62095994	-12.303185
Q86YR7	MCF2L2	down	Probable guanine nucleotide exchange factor MCF2L2	5	1	3.84407083	-14.360866
P16885	PLCG2	down	1-phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2	13	2	3.88290612	-14.75269
O95071	UBR5	down	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	23	3	3.97727757	-15.749974
O15397	IPO8	down	Importin-8	13	2	4.00212759	-16.023613
O94813	SLIT2	down	Slit homolog 2 protein	7	1	4.15410709	-17.803723

Q9NY74	ETAA1	down	Ewing's tumor-associated antigen 1	5	1	4.19068664	-18.260909
P20936	RASA1	down	Ras GTPase-activating protein 1	5	1	4.61526816	-24.509483
Q14151	SAFB2	down	Scaffold attachment factor B2	3	1	5.1289591	-34.992143
Q9BWD1	ACAT2	down	Acetyl-CoA acetyltransferase_ cytosolic	5	2	5.93209485	-61.057426
A0A2R8Y5E1	CBLB	down	E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B	3	1	6.18864052	-72.940112
A0A0A0MRC8	KCNQ5	down	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 5	5	1	8.72342485	-422.68082
P17948	FLT1		Vascular endothelial growth factor receptor 1	6	1	-	Exclusive
Q8IVU3	HERC6		Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC6	4	1	-	Exclusive
O00204	SULT2B1		Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1	2	1	-	Exclusive

Anexo B

Tabla 16. Proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST P_{vul} y representadas en el interactoma

Accesion	Gen	Condition	Description	Peptide count	Unique peptides	Log 2 ratio	Expression relative change
P20042	EIF2S2	up	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	5	1	10.0549976	1063.78998
Q8TCU6	PREX1	up	Phosphatidylinositol 3_4_5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	10	1	9.6901947	826.1126417
P54760	EPHB4	up	Ephrin type-B receptor 4	7	2	7.89975805	238.816392
O75489	NDUFS3	up	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3_ mitochondrial	4	1	7.16970025	143.9775686
Q8NEV4	MYO3A	up	Myosin-IIla	16	1	5.47358891	44.43390135
P50570	DNM2	up	Dynamin-2	4	2	5.24386715	37.89320201
O95202	LETM1	up	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein	7	1	5.09060214	34.07406437
Q8NFP9	NBEA	up	Neurobeachin	28	2	4.67390987	25.52625291
P46781	RPS9	up	40S ribosomal protein S9	8	1	4.48305706	22.36323599
P13861	PRKAR2A	up	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	6	1	3.95921902	15.55405697
Q08211	DHX9	up	ATP-dependent RNA helicase A	15	3	3.93768092	15.32357399

P56545-2	CTBP2	up	Isoform 2 of C-terminal-binding protein 2	3	2	3.90955015	15.0276774
Q14651	PLS1	up	Plastin-1	9	1	3.84672494	14.38730967
Q9NTI5	PDS5B	up	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	15	1	3.56292481	11.81808855
P52735	VAV2	up	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	7	2	3.24869225	9.505037023
P16870	CPE	up	Carboxypeptidase E	5	1	3.24356961	9.471346956
P42574	CASP3	up	Caspase-3	6	5	3.00341834	8.018977802
P49354	FNTA	up	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	6	2	2.9763248	7.869788148
O00303	EIF3F	up	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	7	4	2.9672691	7.820544747
Q15056	EIF4H	up	Eukaryotic translation initiation factor 4H	4	1	2.2814232	4.861573045
Q7Z7A1	CNTRL	up	Centriolin	35	3	2.22616095	4.67887262
Q8IVI9	NOSTRI N	up	Nostrin	4	1	2.07795598	4.222086033
Q13393	PLD1	up	Phospholipase D1	2	1	1.95941678	3.889047293
P25398	RPS12	up	40S ribosomal protein S12	7	2	1.95604703	3.879974111
Q14980	NUMA1	up	Nuclear mitotic apparatus protein 1	39	6	1.90720006	3.750804479
P05129	PRKCG	up	Protein kinase C gamma type	5	1	1.82062407	3.532339642

Q13402	MYO7A	up	Unconventional myosin-VIIa	25	3	1.76945569	3.409253065
O60229	KALRN	up	Kalirin	25	3	1.74173647	3.344374641
P31323	PRKAR2 B	up	cAMP-dependent protein kinase type II- beta regulatory subunit	7	3	1.60019807	3.031849356
P84095	RHOG	up	Rho-related GTP-binding protein RhoG	4	2	1.4887138	2.806386668
P62280	RPS11	up	40S ribosomal protein S11	11	4	1.46207126	2.755036167
Q96HE7	ERO1A	up	ERO1-like protein alpha	6	2	1.44059326	2.714324599
Q8WVM7	STAG1	up	Cohesin subunit SA-1	5	1	1.41325024	2.663365157
P25054	APC	up	Adenomatous polyposis coli protein	32	4	1.28805198	2.441981001
Q9BV73	CEP250	down	Centrosome-associated protein CEP250	28	4	1.22496933	-2.337504799
Q01082	SPTBN1	down	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 1	40	7	1.22884609	-2.343794506
Q5JWF2	GNAS	down	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	23	7	1.2379334	-2.358604306
Q15149	PLEC	down	Plectin	66	8	1.28845668	-2.442666124
P26583	HMGB2	down	High mobility group protein B2	9	2	1.31954698	-2.495877238
Q13224	GRIN2B	down	Glutamate receptor ionotropic_ NMDA 2B	3	1	1.32149156	-2.499243665
P68366	TUBA4A	down	Tubulin alpha-4A chain	26	3	1.41254946	-2.662071765
P52292	KPNA2	down	Importin subunit alpha-1	2	1	1.536113	-2.900120805

P43034	PAFAH1 B1	down	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	7	1	1.55972547	-2.947977412
Q96RT7	TUBGC P6	down	Gamma-tubulin complex component 6	11	2	1.67458275	-3.19227016
Q6KC79	NIPBL	down	Nipped-B-like protein	5	2	1.6997496	-3.248445718
P61586	RHOA	down	Transforming protein RhoA	5	4	1.9971242	-3.992034525
Q9HC10	OTOF	down	Otoferlin	7	1	2.00487828	-4.013548367
Q9H2D6	TRIOBP	down	TRIO and F-actin-binding protein	11	1	2.24928622	-4.754475583
Q96KP1	EXOC2	down	Exocyst complex component 2	2	1	2.9292876	-7.617341644
Q9Y6V0	PCLO	down	Protein piccolo	20	2	3.09049428	-8.51787924
P09429	HMGB1	down	High mobility group protein B1	7	1	3.11105229	-8.640125649
Q16623	STX1A	down	Syntaxin-1A	6	2	3.56428852	-11.82926493
P20936	RASA1	down	Ras GTPase-activating protein 1	5	1	4.57219975	-23.78862119
P19838	NFKB1	down	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	4	1	4.74806915	-26.8726957
Q9UGJ1	TUBGC P4	down	Gamma-tubulin complex component 4	4	1	4.92221457	-30.32035151
Q13315	ATM	down	Serine-protein kinase ATM	42	2	5.9904517	-63.57782232
Q9HC77	CENPJ		Centromere protein J	9	1	-	Exclusive

Tabla 17. Proteínas diferencialmente expresadas en 1.1E7-REST Scal y representadas en el interactoma

Accesion	Gen	Condition	Description	Peptide count	Unique peptides	Log 2 ratio	Expression relative change
O75489	NDUFS3	up	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3_ mitochondrial	4	1	6.18031	72.5201498
Q8TCU6	PREX1	up	Phosphatidylinositol 3_4_5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	10	1	5.423825	42.92734376
O43252	PAPSS1	up	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	5	1	4.552878	23.47214853
P13861	PRKAR2A	up	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	6	1	4.361515	20.55638967
Q14651	PLS1	up	Plastin-1	9	1	3.981956	15.80113187
O95202	LETM1	up	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein	7	1	3.911318	15.04610335
Q14247	CTTN	up	Src substrate cortactin	10	1	3.491656	11.24846317
P56545-2	CTBP2	up	Isoform 2 of C-terminal-binding protein 2	3	2	3.44225	10.8697737
P42574	CASP3	up	Caspase-3	6	5	2.973985	7.85703507
P08670	VIM	up	Vimentin	10	1	2.817086	7.047375079
Q13393	PLD1	up	Phospholipase D1	2	1	2.699869	6.497429163
P06753	TPM3	up	Tropomyosin alpha-3 chain	6	1	2.671238	6.369755516
P43403	ZAP70	up	Tyrosine-protein kinase ZAP-70	4	1	2.599241	6.059677439
Q8NFP9	NBEA	up	Neurobeachin	28	2	2.411337	5.319670913
P52735	VAV2	up	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	7	2	2.356663	5.121842891

P49354	FNTA	up	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	6	2	2.301481	4.929635579
P40938	RFC3	up	Replication factor C subunit 3	3	1	2.245331	4.7414588
Q71DI3	H3C13	up	Histone H3.2	7	2	2.224947	4.674937249
Q5VT25	CDC42BP A	up	Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha	16	3	2.07414	4.210933231
Q8NEV4	MYO3A	up	Myosin-IIla	16	1	1.886183	3.696559154
Q9BT78	COPS4	up	COP9 signalosome complex subunit 4	11	4	1.859415	3.628604956
Q14980	NUMA1	up	Nuclear mitotic apparatus protein 1	39	6	1.839986	3.580065542
Q92547	TOPBP1	up	DNA topoisomerase 2-binding protein 1	11	1	1.827836	3.550041771
Q9H2D6	TRIOBP	up	TRIO and F-actin-binding protein	11	1	1.762798	3.393556422
Q9UBT6	POLK	up	DNA polymerase kappa	7	2	1.71224	3.276691841
P31323	PRKAR2B	up	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	7	3	1.623559	3.081342391
Q8TDM6	DLG5	up	Disks large homolog 5	20	4	1.493098	2.814927958
O75962	TRIO	up	Triple functional domain protein	27	2	1.418614	2.673285645
P35221	CTNNA1	up	Catenin alpha-1	19	3	1.417305	2.670861193
Q02952	AKAP12	up	A-kinase anchor protein 12	4	1	1.315112	2.488216466
Q8NEZ4	KMT2C	up	Histone-lysine N-methyltransferase 2C	8	1	1.209239	2.312156418
Q9UBL3	ASH2L	down	Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2	6	1	1.20758944	-2.309514234
Q14008	CKAP5	down	Cytoskeleton-associated protein 5	22	2	1.21733147	-2.325162383
A6NNZ2	TUBB8B	down	Tubulin beta-8 chain-like protein LOC260334	20	3	1.23259654	-2.349895405

P43034	PAFAH1B1	down	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	7	1	1.25755586	-2.390903427
P62805	HIST1H4F	down	Histone H4	22	13	1.31811462	-2.493400478
P26583	HMGB2	down	High mobility group protein B2	9	2	1.3340779	-2.521142912
Q12802	AKAP13	down	A-kinase anchor protein 13	20	3	1.34167907	-2.534461195
Q96RT7	TUBGCP6	down	Gamma-tubulin complex component 6	11	2	1.42673849	-2.688382637
Q16623	STX1A	down	Syntaxin-1A	6	2	1.44456952	-2.72181596
O95714	HERC2	down	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	33	9	1.62132403	-3.076572587
Q70EL4	USP43	down	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 43	3	1	1.62320508	-3.080586578
Q9UGJ1	TUBGCP4	down	Gamma-tubulin complex component 4	4	1	1.63045331	-3.096102653
O00429	DNM1L	down	Dynamin-1-like protein	22	1	1.70466451	-3.259531254
P09429	HMGB1	down	High mobility group protein B1	7	1	1.77797943	-3.429455254
Q9H2K8	TAOK3	down	Serine/threonine-protein kinase TAO3	5	1	1.82239178	-3.536670406
Q9UPQ9	TNRC6B	down	Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein	4	1	2.17324984	-4.510382656
Q9H0B6	KLC2	down	Kinesin light chain 2	7	2	2.20585891	-4.613491225
O75116	ROCK2	down	Rho-associated protein kinase 2	23	3	2.25524251	-4.774145422
Q13315	ATM	down	Serine-protein kinase ATM	42	2	3.09601786	-8.550553762
O00204	SULT2B1		Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1	2	1	-	Exclusive

Anexo C

Tabla 18. Expresión absoluta de proteínas en 1.4E7

Accesion	Gen	Description	Peptide count	Unique peptides	Absolute expression (fmol/uL)
P61586	RHOA	Transforming protein RhoA	1	1	311.139077
Q92922	SMARCC1	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	1	1	199.861652
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	69	34	198.472397
A0A0G2JPD3	HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen, A alpha chain	3	1	197.044708
P05783	KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18	69	55	194.004802
P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	36	20	189.569762
P23528	CFL1	Cofilin-1	25	7	162.716072
P06733	ENO1	Alpha-enolase	53	34	151.467624
P14618	PKM	Pyruvate kinase PKM	38	24	150.24919
A0A7I2YQC0	NPM1	Nucleophosmin	35	34	150.125721
P07737	PFN1	Profilin-1	16	14	147.679201
P07437	TUBB	Tubulin beta chain	52	7	144.875222
A0A7P0TBM9	BLM	DNA helicase	3	1	136.000588
P08670	VIM	Vimentin	138	92	135.651984
O43707	ACTN4	Alpha-actinin-4	83	45	133.895731
P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	78	38	125.978941
P68032	ACTC1	Actin, alpha cardiac muscle 1	61	2	122.186666
P05386	RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1	1	1	118.151985
P00330	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1	38	36	103.601746

P04406-2	GAPDH	Isoform 2 of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	31	25	92.4645331
Q4G0N4	NADK2	NAD kinase 2, mitochondrial	1	1	89.0103107
A0A7I2V659	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha	41	38	84.069945
P05787	KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8	104	66	76.3389239
Q9BXT6	MOV10L1	RNA helicase Mov10l1	3	1	73.9937407
P07355-2	ANXA2	Isoform 2 of Annexin A2	32	6	69.2895955
O75376-3	NCOR1	Isoform 3 of Nuclear receptor corepressor 1	4	4	65.7482772
H0YFX9	H2AJ	Histone H2A (Fragment)	1	1	65.6492316
Q3MIP1	ITPRIPL2	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-interacting protein-like 2	1	1	64.0925115
P63104	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	29	14	63.064097
Q13029	PRDM2	PR domain zinc finger protein 2	2	1	62.4295749
A0A1B0GUL7	A0A1B0GUL7	Protein kinase domain-containing protein	2	1	58.3870694
P13639	EEF2	Elongation factor 2	33	28	57.8847577
P27348	YWHAQ	14-3-3 protein theta	27	9	57.714191
P60174	TPI1	Triosephosphate isomerase	23	21	57.5533143
P24534	EEF1B2	Elongation factor 1-beta	8	4	56.3595412
Q5TCY1	TTBK1	Tau-tubulin kinase 1	2	1	55.3975183
P07900-2	HSP90AA1	Isoform 2 of Heat shock protein HSP 90-alpha	56	26	55.3087602
Q96Q05	TRAPPC9	Trafficking protein particle complex subunit 9	1	1	53.8237545
P10599-2	TXN	Isoform 2 of Thioredoxin	7	7	53.2766314
O00299	CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	10	7	51.1309349
P19338	NCL	Nucleolin	31	30	50.7449729
P00338	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	33	27	50.081458
P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	11	6	49.3103368

P37802	TAGLN2	Transgelin-2	9	7	48.9250682
P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	15	10	48.8933657
P09960	LTA4H	Leukotriene A-4 hydrolase	2	1	48.1014083
Q13501	SQSTM1	Sequestosome-1	7	6	47.5447633
P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	32	23	47.1290356
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	10	8	46.1149948
P08758	ANXA5	Annexin A5	11	11	45.20413
O75427	LRCH4	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 4	1	1	45.0860054
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	20	12	44.7856101
A0A7P0TB65	CANX	Calnexin	18	17	42.6529394
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1	30	22	42.2508257
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1	13	11	41.2105501
P35579	MYH9	Myosin-9	70	43	41.1847927
P10809	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	34	31	40.375086
P55209	NAP1L1	Nucleosome assembly protein 1-like 1	10	6	39.7072078
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	23	18	38.5394849
Q9HCE1	MOV10	Helicase MOV-10	1	1	38.3778776
H3BU53	MGA	MAX gene-associated protein (Fragment)	2	1	37.3697373
G3V325	ATP5MF-PTCD1	ATP5MF-PTCD1 readthrough	2	1	36.8920956
P11021	HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	43	24	36.3975616
Q7Z406	MYH14	Myosin-14	16	4	35.6810838
P31946	YWHAB	14-3-3 protein beta/alpha	29	8	35.6264451
P11413-3	G6PD	Isoform 3 of Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	20	17	35.5423049

Q96IV0-2	NGLY1	Isoform 2 of Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase	2	2	34.815331
P16403	H1-2	Histone H1.2	9	8	33.7828765
D6RCD7	HSPA9	75 kDa glucose-regulated protein	26	20	33.5229982
P52597	HNRNPF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	9	5	33.2920455
P23246-2	SFPQ	Isoform Short of Splicing factor, proline- and glutamine-rich	2	1	33.2621399
P62258	YWHAE	14-3-3 protein epsilon	26	10	32.7145272
P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	11	9	31.4341376
P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	86	15	30.8094602
P62820	RAB1A	Ras-related protein Rab-1A	4	2	30.1863753
P04083	ANXA1	Annexin A1	12	9	30.18474
P27797	CALR	Calreticulin	18	16	29.9670582
P31949	S100A11	Protein S100-A11	9	7	29.5444203
P02768	ALB	Albumin	9	8	28.9856203
H0YLA2	SRP14	Signal recognition particle 14 kDa protein	2	1	28.2229608
A0A804HL72	FLNB	Filamin-B	49	34	28.0871689
Q5T7B8-2	KIF24	Isoform 2 of Kinesin-like protein KIF24	2	1	27.8531456
Q13564	NAE1	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	1	1	27.4212911
P55072	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	23	17	27.1951871
P61160	ACTR2	Actin-related protein 2	6	4	27.1828566
P38159	RBMX	RNA-binding motif protein, X chromosome	2	1	27.0152187
P31948	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1	16	12	26.9208628
Q9HB71	CACYBP	Calcyclin-binding protein	3	2	26.835228
A0A1B0GVD5	CTSD	Cathepsin D	20	15	26.8349156

F8W1R7	MYL6	Myosin light polypeptide 6	10	7	26.5866246
Q13151	HNRNPA0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	1	1	26.5698196
P62244	RPS15A	40S ribosomal protein S15a	1	1	26.1973957
Q15084-4	PDIA6	Isoform 4 of Protein disulfide-isomerase A6	10	6	25.9790018
P08865	RPSA	40S ribosomal protein SA	8	6	25.7062615
P07195	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain	13	9	25.5241332
P51692	STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B	1	1	25.4282974
O15067	PFAS	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	4	2	25.3052573
P08727	KRT19	Keratin, type I cytoskeletal 19	46	23	24.6921345
Q3ZCQ8	TIMM50	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	14	13	24.1749892
H0YIV0	HSP90B1	Endoplasmin	27	18	24.1424641
Q15185	PTGES3	Prostaglandin E synthase 3	5	5	23.9474636
P05387	RPLP2	60S acidic ribosomal protein P2	9	9	23.8999318
O60664-4	PLIN3	Isoform 4 of Perilipin-3	9	8	23.7884608
P68366-2	TUBA4A	Isoform 2 of Tubulin alpha-4A chain	27	2	23.4560539
Q92621	NUP205	Nuclear pore complex protein Nup205	3	1	22.9611515
Q12797	ASPH	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	4	2	22.5466134
E9PAV3	NACA	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	10	4	22.5064532
P39019	RPS19	40S ribosomal protein S19	8	7	22.4373406
E9PRY8	EEF1D	Elongation factor 1-delta	14	3	22.4025236
H0Y449	YBX1	Y-box-binding protein 1 (Fragment)	6	3	21.9668311
P56192	MARS1	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	4	2	21.8983697

P22314	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	17	8	21.6821374
P29401	TKT	Transketolase	7	5	21.5598911
Q14974	KPNB1	Importin subunit beta-1	8	4	21.5480516
Q01484-2	ANK2	Isoform 2 of Ankyrin-2	3	1	21.5050184
P61224-3	RAP1B	Isoform 3 of Ras-related protein Rap-1b	4	4	21.472069
Q8N4C6	NIN	Ninein	9	2	21.3236971
E9PC85	LRRK2	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2	9	2	20.9846016
P46940	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	34	22	20.5015349
P22626-2	HNRNPA2B1	Isoform A2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	19	17	20.4763507
P06576	ATP5F1B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	18	13	20.3825406
Q13011	ECH1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	8	5	20.2103864
H7BZJ3	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment)	3	1	20.1294805
Q460N5	PARP14	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP14	7	2	20.1074112
Q7Z3Y8	KRT27	Keratin, type I cytoskeletal 27	1	1	20.0249258
Q9HD67	MYO10	Unconventional myosin-X	2	1	19.9671245
P05141	SLC25A5	ADP/ATP translocase 2	6	5	19.9165782
Q13129	RLF	Zinc finger protein Rlf	1	1	19.3838662
C9JLJ4	USP17L13	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 17-like protein 13	2	2	19.2783798
E9PQE3	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK (Fragment)	1	1	19.0741835
Q86UW7	CADPS2	Calcium-dependent secretion activator 2	1	1	19.0101629
I3L397	EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A (Fragment)	8	7	18.9460124
F5H7V1	NRDC	Nardilysin	3	2	18.7700271

Q8WYB5	KAT6B	Histone acetyltransferase KAT6B	3	1	18.5015803
Q9NZM1	MYOF	Myoferlin	21	8	18.0857733
P28370	SMARCA1	Probable global transcription activator SNF2L1	1	1	17.8518691
O00264	PGRMC1	Membrane-associated progesterone receptor component 1	1	1	17.7860943
Q5JR95	RPS8	40S ribosomal protein S8	2	2	17.7478173
P12956	XRCC6	X-ray repair cross-complementing protein 6	13	9	17.3826755
R4GN98	S100A6	Protein S100 (Fragment)	8	8	17.3242456
P26641-2	EEF1G	Isoform 2 of Elongation factor 1-gamma	12	11	17.2660483
P0C221	CCDC175	Coiled-coil domain-containing protein 175	4	1	17.117016
Q13595-2	TRA2A	Isoform Short of Transformer-2 protein homolog alpha	1	1	17.1107782
Q07889	SOS1	Son of sevenless homolog 1	1	1	17.0665631
A0A6Q8PGE6	RAB7A	Ras-related protein Rab-7a	5	2	17.0172479
Q09028-3	RBBP4	Isoform 3 of Histone-binding protein RBBP4	3	2	16.9201577
K7ENG2	U2AF2	Splicing factor U2AF subunit	3	2	16.8616556
Q9Y5B9	SUPT16H	FACT complex subunit SPT16	1	1	16.8378099
P12036	NEFH	Neurofilament heavy polypeptide	8	1	16.8317484
P78371	CCT2	T-complex protein 1 subunit beta	13	11	16.8219546
Q16720-8	ATP2B3	Isoform ZG of Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3	2	2	16.7282946
A0A7I2V4L2	CSPP1	Centrosome and spindle pole-associated protein 1	1	1	16.7165991
P60842	EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-l	13	10	16.5681263
O95985	TOP3B	DNA topoisomerase 3-beta-1	2	1	16.5556826
H0Y6I0	GOLGA4	Golgin subfamily A member 4 (Fragment)	5	1	16.5413657
Q8WWM7	ATXN2L	Ataxin-2-like protein	1	1	16.4391012

E9PMV1	PLEC	Plectin (Fragment)	4	1	16.3690367
M0R0F0	RPS5	40S ribosomal protein S5 (Fragment)	2	1	15.9966825
A0A6I8PIQ6	COG4	Component of oligomeric Golgi complex 4	3	2	15.9642062
Q1MX18-5	INSC	Isoform 5 of Protein inscuteable homolog	1	1	15.7139635
Q9Y6F8	CDY1	Testis-specific chromodomain protein Y 1	1	1	15.6981954
P61981	YWHAG	14-3-3 protein gamma	21	4	15.4995261
O75094	SLIT3	Slit homolog 3 protein	1	1	15.3746363
Q6PJG2	MIDEAS	Mitotic deacetylase-associated SANT domain protein	1	1	15.0897407
Q9UQ80	PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4	7	3	15.0829138
A0A0G2JIW1	HSPA1B	Heat shock 70 kDa protein 1B	36	7	15.0761338
P36578	RPL4	60S ribosomal protein L4	9	9	15.0756898
A0A7P0Z497	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	7	4	14.8896798
Q6ZMW3	EML6	Echinoderm microtubule-associated protein-like 6	2	1	14.8160577
Q5XKE5	KRT79	Keratin, type II cytoskeletal 79	10	1	14.7987115
Q32Q12	NME1-NME2	Nucleoside diphosphate kinase	13	1	14.7548629
E9PCA1	CCT5	CCT-epsilon	8	4	14.580822
Q01105-4	SET	Isoform 4 of Protein SET	3	3	14.5766005
A0A0J9YWL9	TEX13C	Putative testis-expressed protein 13C	3	1	14.5437737
P11216	PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form	9	6	14.1669829
P84098	RPL19	60S ribosomal protein L19	4	3	13.9644437
Q5VVC8	RPL11	60S ribosomal protein L11	3	2	13.9419009
A0A7I2V385	EIF4H	Eukaryotic translation initiation factor 4H	2	2	13.9394862
A0A7P0NMY4	FLNA	Filamin-A	30	21	13.8843701
H3BLT5	KIAA1109	Transmembrane protein KIAA1109 (Fragment)	2	1	13.8491752

P53355-4	DAPK1	Isoform 4 of Death-associated protein kinase 1	2	1	13.8156895
Q99497	PARK7	Parkinson disease protein 7	6	6	13.7831285
Q07020-2	RPL18	Isoform 2 of 60S ribosomal protein L18	5	5	13.7502284
P68371	TUBB4B	Tubulin beta-4B chain	42	1	13.7455426
P0DPD8	EEF1AKMT4- ECE2	EEF1AKMT4-ECE2 readthrough transcript protein	1	1	13.7346936
P31150	GDI1	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	12	5	13.7025154
A0A590UJ10	KIAA1549L	UPF0606 protein KIAA1549L	1	1	13.6904686
P30086	PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	3	2	13.614032
P02545	LMNA	Prelamin-A/C	45	38	13.6011997
I3L4X5	USP31	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31	2	1	13.59216
P12814-3	ACTN1	Isoform 3 of Alpha-actinin-1	34	8	13.5113946
P62277	RPS13	40S ribosomal protein S13	1	1	13.4940475
Q71U36	TUBA1A	Tubulin alpha-1A chain	44	1	13.4879407
Q9HCS7	XAB2	Pre-mRNA-splicing factor SYF1	2	1	13.4536695
P50990	CCT8	T-complex protein 1 subunit theta	16	13	13.4474764
Q00839	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	8	6	13.440986
P08708	RPS17	40S ribosomal protein S17	7	4	13.3160423
Q16658	FSCN1	Fascin	9	8	13.1604448
A0A087WUI6	PIBF1	Progesterone-induced-blocking factor 1	1	1	13.0039924
Q5RHP9	ERICH3	Glutamate-rich protein 3	3	1	12.907899
O75604	USP2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2	1	1	12.9063956
Q01518-2	CAP1	Isoform 2 of Adenylyl cyclase-associated protein 1	11	9	12.8351853
P33240	CSTF2	Cleavage stimulation factor subunit 2	5	3	12.7798837

Q6P0N0	MIS18BP1	Mis18-binding protein 1	1	1	12.7776478
Q96AE4	FUBP1	Far upstream element-binding protein 1	11	5	12.6602628
Q15276-2	RABEP1	Isoform 2 of Rab GTPase-binding effector protein 1	6	1	12.6529905
P51530	DNA2	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2	2	2	12.6012342
P13667	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	11	9	12.5279551
P25705	ATP5F1A	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	16	13	12.4542022
Q9BXP5	SRRT	Serrate RNA effector molecule homolog	5	1	12.4438709
H0Y400	DDX39B	Spliceosome RNA helicase DDX39B (Fragment)	3	1	12.4316222
P05388	RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0	8	7	12.4203998
H7BYL6	AKAP9	A-kinase anchor protein 9 (Fragment)	6	5	12.183348
E7EQR4	EZR	Ezrin	15	7	12.1754581
Q9UPW5	AGTPBP1	Cytosolic carboxypeptidase 1	2	1	12.1451065
Q99996-4	AKAP9	Isoform 4 of A-kinase anchor protein 9	17	4	12.1425947
A0A7P0Z4P5	SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	9	9	12.1391045
Q15181	PPA1	Inorganic pyrophosphatase	10	6	12.1058347
Q07021	C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	5	5	12.0950241
E9PQD7	RPS2	40S ribosomal protein S2	4	4	12.0209763
P34897-3	SHMT2	Isoform 3 of Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	3	2	11.9858137
A0A7P0TAS2	ARHGAP21	Rho GTPase-activating protein 21	2	1	11.9423062
P30044-2	PRDX5	Isoform Cytoplasmic+peroxisomal of Peroxiredoxin-5, mitochondrial	4	3	11.8917815
A0A024R571	EHD1	EH domain-containing protein 1	16	7	11.8744942
Q9NQW6	ANLN	Anillin	1	1	11.8700044

Q75V66	ANO5	Anoctamin-5	1	1	11.7657727
P30050	RPL12	60S ribosomal protein L12	7	7	11.7631024
E9PEI0	CDCA2	Cell division cycle-associated protein 2	1	1	11.7419285
P40925	MDH1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	5	4	11.6934296
Q8NDI1	EHBP1	EH domain-binding protein 1	2	1	11.674467
Q14203-6	DCTN1	Isoform 6 of Dynactin subunit 1	4	1	11.6369698
Q9NQT8	KIF13B	Kinesin-like protein KIF13B	2	1	11.6039851
P09382	LGALS1	Galectin-1	9	8	11.4658033
Q9ULU4	ZMYND8	Protein kinase C-binding protein 1	4	1	11.4329422
Q9UKX2	MYH2	Myosin-2	16	2	11.4075538
Q8N8A2	ANKRD44	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B	1	1	11.3896338
P52732	KIF11	Kinesin-like protein KIF11	1	1	11.3349031
Q96PK6	RBM14	RNA-binding protein 14	2	1	11.3102482
A0A087WZC3	SYCP1	Synaptonemal complex protein 1	1	1	11.1020073
Q96T23	RSF1	Remodeling and spacing factor 1	2	1	11.0687161
P62269	RPS18	40S ribosomal protein S18	6	4	11.0640715
O60296	TRAK2	Trafficking kinesin-binding protein 2	4	1	10.8516469
P17174	GOT1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	5	2	10.8074905
P40227	CCT6A	T-complex protein 1 subunit zeta	6	5	10.755911
J3QS39	UBB	Polyubiquitin-B (Fragment)	10	9	10.7389342
K7ES69	CNN2	Calponin-2	1	1	10.6961407
P61088	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	4	4	10.6432307
P14868	DARS1	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	5	4	10.5237522

P62942	FKBP1A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	7	6	10.4675939
H3BRU6	PCBP2	Poly(rC)-binding protein 2 (Fragment)	7	1	10.4495624
P37837	TALDO1	Transaldolase	8	8	10.3405454
P13797	PLS3	Plastin-3	12	5	10.3378683
Q5VTB9	RNF220	E3 ubiquitin-protein ligase RNF220	2	1	10.2490459
Q8N1F7	NUP93	Nuclear pore complex protein Nup93	2	1	10.2178022
P52565	ARHGDI A	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	4	3	10.1427518
Q4AC94-1	C2CD3	Isoform 1 of C2 domain-containing protein 3	5	2	10.1333094
B4DXW1	ACTR3	Actin-like protein 3	1	1	10.1039407
H0YN26	ANP32A	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	4	4	10.0424331
A0A7I2YQN9	G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	9	4	10.0118382
A0A669KAZ1	REG3A	Regenerating islet-derived protein 3-alpha (Fragment)	1	1	9.9977381
Q96QT4	TRPM7	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7	5	2	9.94628935
Q9P0L0	VAPA	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	4	2	9.921171
P49589	CARS1	Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	10	6	9.86406598
J3KP06	LMO7	LIM domain only protein 7	2	1	9.85911313
Q13509	TUBB3	Tubulin beta-3 chain	43	2	9.83068671
P08603	CFH	Complement factor H	1	1	9.69493163
P23526	AHCY	Adenosylhomocysteinase	7	5	9.69009168
O60264	SMARCA5	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	2	1	9.65979699
O43491	EPB41L2	Band 4.1-like protein 2	6	1	9.6239035

Q99733-2	NAP1L4	Isoform 2 of Nucleosome assembly protein 1-like 4	6	4	9.6047818
Q5U5R9	HECTD2	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD2	1	1	9.55946166
P26639	TARS1	Threonine--tRNA ligase 1, cytoplasmic	11	5	9.54251033
O00232	PSMD12	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	5	4	9.54075908
Q70UQ0-4	IKBIP	Isoform 4 of Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein	2	1	9.46482771
P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	9	7	9.41364661
Q8IYA2	CCDC144CP	Putative coiled-coil domain-containing protein 144C	3	2	9.41015938
P15531-2	NME1	Isoform 2 of Nucleoside diphosphate kinase A	11	2	9.3413801
P32969	RPL9	60S ribosomal protein L9	5	4	9.30790537
P31939	ATIC	Bifunctional purine biosynthesis protein ATIC	9	4	9.2801589
P49458	SRP9	Signal recognition particle 9 kDa protein	1	1	9.19883442
P40926	MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	12	5	9.16262542
Q08211	DHX9	ATP-dependent RNA helicase A	5	2	9.14717988
O60701	UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase	8	8	9.10909244
Q8WWL7	CCNB3	G2/mitotic-specific cyclin-B3	4	2	9.08503201
B5MDF5	RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	8	6	9.06449709
Q14247-3	CTTN	Isoform 3 of Src substrate cortactin	9	6	8.9909428
D6RAT0	RPS3A	40S ribosomal protein S3a	6	5	8.98522166
P17980	PSMC3	26S proteasome regulatory subunit 6A	4	4	8.9243048
P04181	OAT	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	1	1	8.89055498
P09525	ANXA4	Annexin A4	5	5	8.83971518
P16070-16	CD44	Isoform 16 of CD44 antigen	9	8	8.81596182
P52907	CAPZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	6	6	8.79426086

A0A087WTG0	NBPF36	Neuroblastoma breakpoint family member 26	2	1	8.79085424
Q13442	PDAP1	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	2	1	8.7067153
Q13201	MMRN1	Multimerin-1	2	1	8.70348436
P61289	PSME3	Proteasome activator complex subunit 3	3	2	8.60347318
Q13263-2	TRIM28	Isoform 2 of Transcription intermediary factor 1-beta	7	5	8.57386595
Q6PKG0-3	LARP1	Isoform 2 of La-related protein 1	3	2	8.56747207
O14818	PSMA7	Proteasome subunit alpha type-7	4	4	8.51912784
P46783	RPS10	40S ribosomal protein S10	3	1	8.50533665
P61019-2	RAB2A	Isoform 2 of Ras-related protein Rab-2A	5	2	8.463622
O95292	VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	4	2	8.43560594
P23396	RPS3	40S ribosomal protein S3	8	6	8.41724183
P43243	MATR3	Matrin-3	10	6	8.35670559
Q13155	AIMP2	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	1	1	8.34605083
A0A0C4DGF8	EHMT1	Histone-lysine N-methyltransferase EHMT1 (Fragment)	2	2	8.34276744
Q96L34	MARK4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	2	1	8.32033157
P30048	PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	11	7	8.27732146
Q02878	RPL6	60S ribosomal protein L6	10	8	8.26418163
Q9NQ75	CASS4	Cas scaffolding protein family member 4	1	1	8.24198304
A0A7P0TB26	P4HB	Protein disulfide-isomerase	20	18	8.17246762
Q12907	LMAN2	Vesicular integral-membrane protein VIP36	8	5	8.16113413
P49721	PSMB2	Proteasome subunit beta type-2	1	1	8.15061975
O14617	AP3D1	AP-3 complex subunit delta-1	1	1	8.13309276

P35237	SERPINB6	Serpin B6	2	2	8.132752
D6R9P3	HNRNPAB	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	4	2	8.11658059
Q14019	COTL1	Coactosin-like protein	2	2	8.03082974
P02452	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	3	1	8.00921805
P26885	FKBP2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	2	2	7.89417748
E9PBS1	PAICS	Multifunctional protein ADE2 (Fragment)	4	3	7.87754616
P50747	HLCS	Biotin--protein ligase	1	1	7.85875186
Q9UHD8-5	SEPTIN9	Isoform 5 of Septin-9	6	5	7.83921336
P49411	TUFM	Elongation factor Tu, mitochondrial	6	4	7.83331849
Q5VTT5	MYOM3	Myomesin-3	2	1	7.76518915
P11586	MTHFD1	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	12	7	7.75507739
P62805	H4-16	Histone H4	4	3	7.65149885
Q8IVV2	LOXHD1	Lipoxygenase homology domain-containing protein 1	4	2	7.6421785
A0A087WTP3	KHSPR	Far upstream element-binding protein 2	2	1	7.59942096
P49023	PXN	Paxillin	3	1	7.54695242
Q9Y266	NUDC	Nuclear migration protein nudC	13	8	7.49992495
Q7Z460-4	CLASP1	Isoform 4 of CLIP-associating protein 1	1	1	7.49272409
P11532-12	DMD	Isoform 6 of Dystrophin	6	1	7.4249151
Q5SSJ5	HP1BP3	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	2	1	7.41876329
A0A7I2YQN2	SYNCRIP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	8	4	7.39531998
K7EJV9	RPL23A	60S ribosomal protein L23a (Fragment)	3	3	7.39366672
P50395	GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	9	4	7.37595024
O76003	GLRX3	Glutaredoxin-3	4	3	7.35606094
U3KQK0	H2BC15	Histone H2B	9	7	7.32458743

Q8TBY8	PMFBP1	Polyamine-modulated factor 1-binding protein 1	6	2	7.30929112
Q6NZI2	CAVIN1	Caveolae-associated protein 1	7	4	7.27224014
Q01968	OCRL	Inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL	5	1	7.26045999
P09651-2	HNRNPA1	Isoform A1-A of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9	7	7.21744864
Q5BJE1	CCDC178	Coiled-coil domain-containing protein 178	1	1	7.20247145
A0A2R8Y5A0	CSNK2A1	Non-specific serine/threonine protein kinase	1	1	7.1937809
P55060	CSE1L	Exportin-2	6	2	7.18547359
P18206-2	VCL	Isoform 1 of Vinculin	21	16	7.16900003
Q9NQC3	RTN4	Reticulon-4	5	3	7.16672046
Q9C0A6	SETD5	Histone-lysine N-methyltransferase SETD5	2	1	7.15388021
Q9Y4B6	DCAF1	DDB1- and CUL4-associated factor 1	1	1	7.14933367
P50454	SERPINH1	Serpin H1	5	2	7.10140829
Q9BZ29	DOCK9	Dedicator of cytokinesis protein 9	6	3	7.09736547
P52292	KPNA2	Importin subunit alpha-1	5	4	7.06598822
F5H228	TRIO	Triple functional domain protein	2	1	7.01224002
P34932	HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4	9	6	7.00851347
O60739	EIF1B	Eukaryotic translation initiation factor 1b	3	1	6.95021924
H0YMT1	TLN2	Talin-2 (Fragment)	4	3	6.83815196
Q9Y6N5	SQOR	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	8	5	6.80265535
P43686	PSMC4	26S proteasome regulatory subunit 6B	3	3	6.797135
Q15019	SEPTIN2	Septin-2	7	3	6.79437789
A0A087X2D0	SRSF3	Serine/arginine-rich-splicing factor 3	5	2	6.77452339
H0Y5C6	FLNA	Filamin-A (Fragment)	7	2	6.76689589
Q7L2H7	EIF3M	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	4	1	6.76066193

P20042	EIF2S2	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	6	5	6.7328015
Q5SQ80	ANKRD20A2P	Putative ankyrin repeat domain-containing protein 20A2	1	1	6.69339669
Q02383	SEMG2	Semenogelin-2	2	2	6.67127981
A0A286YFD6	RRM2	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	2	1	6.66410363
Q7Z3Z4	PIWIL4	Piwi-like protein 4	1	1	6.61515583
P13674-3	P4HA1	Isoform 3 of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	5	2	6.49538238
P30876	POLR2B	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	5	1	6.3840588
P50991	CCT4	T-complex protein 1 subunit delta	10	8	6.36152564
Q15750	TAB1	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1	2	1	6.36084328
Q9Y5V3	MAGED1	Melanoma-associated antigen D1	1	1	6.34828304
Q96KP4	CNDP2	Cytosolic non-specific dipeptidase	6	5	6.32928069
Q96ST2-2	IWS1	Isoform 2 of Protein IWS1 homolog	1	1	6.3175446
H0YA96	HNRNPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment)	7	2	6.29986279
Q92841	DDX17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	16	6	6.29831964
P26373	RPL13	60S ribosomal protein L13	4	3	6.28639261
P06744	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	12	7	6.27042709
P29320	EPHA3	Ephrin type-A receptor 3	1	1	6.26355928
P17987	TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	14	10	6.25768349
H0Y966	CEP192	Centrosomal protein of 192 kDa (Fragment)	3	1	6.21002212
Q9NVP4	DZANK1	Double zinc ribbon and ankyrin repeat-containing protein 1	1	1	6.17131613
Q7Z7B0	FILIP1	Filamin-A-interacting protein 1	2	1	6.13256353
O95373	IPO7	Importin-7	4	4	6.06401383
P49591	SARS1	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	3	1	6.05338773
Q8NDA8	MROH1	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 1	1	1	6.04830974

A0A1B0GUA8	KIF13A	Kinesin-like protein KIF13A	4	3	6.03492352
O00151	PDLIM1	PDZ and LIM domain protein 1	8	3	6.0276485
Q04637	EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	9	3	5.98485779
Q14194-2	CRMP1	Isoform LCRMP-1 of Dihydropyrimidinase-related protein 1	1	1	5.97227037
P62424	RPL7A	60S ribosomal protein L7a	9	7	5.94930461
Q9Y411	MYO5A	Unconventional myosin-Va	5	2	5.94447421
G3XAN3	MCMDC2	Chromosome 8 open reading frame 45, isoform CRA_b	1	1	5.94347683
P84074	HPCA	Neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin	5	2	5.93715612
Q9P1Z9	CCDC180	Coiled-coil domain-containing protein 180	5	1	5.93037129
Q9Y222-5	DMTF1	Isoform 5 of Cyclin-D-binding Myb-like transcription factor 1	1	1	5.92485075
A7E2Y1	MYH7B	Myosin-7B	7	1	5.91856333
P62917	RPL8	60S ribosomal protein L8	2	2	5.90598233
P42166	TMPO	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	5	3	5.89314702
A0A3B3IS84	COPA	Coatamer subunit alpha	5	1	5.87571579
Q5T795	MDN1	Midasin (Fragment)	4	1	5.87530531
P29317	EPHA2	Ephrin type-A receptor 2	3	2	5.86700172
Q8IZU2-2	WDR17	Isoform 2 of WD repeat-containing protein 17	2	1	5.86260726
Q15365	PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1	6	3	5.83498001
O00231	PSMD11	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	7	3	5.82959503
Q9BXT4-3	TDRD1	Isoform 3 of Tudor domain-containing protein 1	2	1	5.80081886
P05455	SSB	Lupus La protein	10	5	5.79408096
J3KRX5	RPL17	60S ribosomal protein L17 (Fragment)	6	6	5.77818796
Q9UKX3	MYH13	Myosin-13	14	2	5.72467
P61604	HSPE1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	10	10	5.70947107

P13010	XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	12	8	5.70641802
Q6JEL2	KLHL10	Kelch-like protein 10	2	2	5.67053584
P12004	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	5	4	5.66227138
H0Y4X3	RBM39	RNA-binding protein 39 (Fragment)	5	4	5.62410025
Q14160	SCRIB	Protein scribble homolog	5	1	5.62385786
P04264	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	13	5	5.60662695
Q8NC51-4	SERBP1	Isoform 4 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	7	6	5.5699366
Q9NP81	SARS2	Serine--tRNA ligase, mitochondrial	3	1	5.56976199
Q96SB8	SMC6	Structural maintenance of chromosomes protein 6	4	1	5.5383327
Q86V48	LUZP1	Leucine zipper protein 1	5	3	5.51647955
F5H6I7	ATL3	Atlastin-3	2	1	5.49822261
P53618	COPB1	Coatomer subunit beta	5	1	5.48379883
A0A0A6YYJ5	MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5 (Fragment)	1	1	5.46188004
P48444	ARCN1	Coatomer subunit delta	3	1	5.41615607
Q9Y272	RASD1	Dexamethasone-induced Ras-related protein 1	1	1	5.41134355
P62851	RPS25	40S ribosomal protein S25	4	4	5.39075331
P42677	RPS27	40S ribosomal protein S27	4	2	5.38867588
P62829	RPL23	60S ribosomal protein L23	3	3	5.38572611
H0YCG5	PAK1	Serine/threonine-protein kinase PAK 1 (Fragment)	3	1	5.38158423
A8K8J9	DCTN2	Dynactin 2 (P50), isoform CRA_b	5	4	5.37065877
Q9UL46	PSME2	Proteasome activator complex subunit 2	3	2	5.36686146
P05556	ITGB1	Integrin beta-1	5	5	5.33200464

P61204	ARF3	ADP-ribosylation factor 3	3	2	5.31420681
Q15691	MAPRE1	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	2	2	5.30811398
A0A494C039	HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1	9	4	5.2857774
O75110	ATP9A	Probable phospholipid-transporting ATPase IIA	4	1	5.2806552
Q9UPN4	CEP131	Centrosomal protein of 131 kDa	4	1	5.28001598
Q9BTT0-3	ANP32E	Isoform 3 of Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	2	2	5.27095397
Q8IYM0	FAM186B	Protein FAM186B	1	1	5.2699217
P04844-2	RPN2	Isoform 2 of Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	3	1	5.26431788
P21796	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	6	3	5.24850041
P19105	MYL12A	Myosin regulatory light chain 12A	13	1	5.20910282
Q8IYF3	TEX11	Testis-expressed protein 11	2	2	5.15327101
A0A7P0S5H5	RPS20	40S ribosomal protein S20 (Fragment)	2	2	5.14597486
Q00610	CLTC	Clathrin heavy chain 1	19	6	5.10270382
P26038	MSN	Moesin	17	8	5.09446624
P52272-2	HNRNPM	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	9	7	5.07462238
P11277	SPTB	Spectrin beta chain, erythrocytic	4	1	5.0733876
Q9Y262-2	EIF3L	Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	3	2	5.06159991
A0A1B0GVI3	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	7	1	5.02871489
P35637	FUS	RNA-binding protein FUS	3	1	5.01660357
P28838	LAP3	Cytosol aminopeptidase	3	1	5.01634559
O95425	SVIL	Supervillin	5	4	5.00672511
Q9UIF9	BAZ2A	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A	7	1	5.00123418

H0Y8W2	RACK1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (Fragment)	5	3	4.98288566
P50570	DNM2	Dynamin-2	1	1	4.97389322
P13535	MYH8	Myosin-8	10	1	4.96017034
Q9H270	VPS11	Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog	1	1	4.93301049
A0A0A0MR02	VDAC2	Outer mitochondrial membrane protein porin 2 (Fragment)	3	2	4.91701959
P62701	RPS4X	40S ribosomal protein S4, X isoform	8	6	4.91379393
Q92688	ANP32B	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	3	2	4.87409191
P02786	TFRC	Transferrin receptor protein 1	8	5	4.84752611
Q9HD23	MRS2	Magnesium transporter MRS2 homolog, mitochondrial	1	1	4.80526235
Q9BSJ8	ESYT1	Extended synaptotagmin-1	5	1	4.78083102
P30040	ERP29	Endoplasmic reticulum resident protein 29	3	3	4.74911101
P55036	PSMD4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	1	1	4.7251786
X1WI28	RPL10	60S ribosomal protein L10 (Fragment)	2	1	4.71865754
Q14764	MVP	Major vault protein	7	3	4.71025636
Q14152	EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	8	2	4.66950543
Q92598	HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	8	5	4.66451098
Q96IX5	ATP5MK	ATP synthase membrane subunit K, mitochondrial	2	1	4.66437314
Q502W6	VWA3B	von Willebrand factor A domain-containing protein 3B	4	1	4.66205052
P42704	LRPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	10	7	4.64571356
H0YC42	H0YC42	Uncharacterized protein	3	2	4.63290666
P11137	MAP2	Microtubule-associated protein 2	1	1	4.60373947
P84095	RHOG	Rho-related GTP-binding protein RhoG	3	2	4.59119182

O95155	UBE4B	Ubiquitin conjugation factor E4 B	1	1	4.58629931
Q7Z7A1-2	CNTRL	Isoform 2 of Centriolin	3	1	4.55233448
P06396-2	GSN	Isoform 2 of Gelsolin	3	2	4.52842644
E9PES6	HMGB3	High mobility group protein B3 (Fragment)	4	4	4.49885491
E7EPB3	RPL14	60S ribosomal protein L14	4	3	4.48996779
P00492	HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	5	5	4.48623513
P49736	MCM2	DNA replication licensing factor MCM2	1	1	4.41581902
Q9P2F8	SIPA1L2	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2	2	2	4.39708258
A0A590UJ92	CCDC30	Coiled-coil domain-containing protein 30 (Fragment)	1	1	4.39055761
Q96AG4	LRRC59	Leucine-rich repeat-containing protein 59	4	2	4.38965251
P12277	CKB	Creatine kinase B-type	6	4	4.375107
E9PFT7	APC	Adenomatous polyposis coli protein (Fragment)	4	2	4.35775932
Q13472-3	TOP3A	Isoform 3 of DNA topoisomerase 3-alpha	2	1	4.3552141
Q04695	KRT17	Keratin, type I cytoskeletal 17	11	1	4.31269435
P41252	IARS1	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	6	1	4.31250863
Q7L592	NDUFAF7	Protein arginine methyltransferase NDUFAF7, mitochondrial	3	1	4.24912364
F5GY37	PHB2	Prohibitin	2	2	4.24438492
Q96Q06	PLIN4	Perilipin-4	6	2	4.22454038
P29966	MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	4	4	4.21857647
P04080	CSTB	Cystatin-B	4	4	4.21498293
P13489	RNH1	Ribonuclease inhibitor	7	5	4.1919176
Q01813	PFKP	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	13	4	4.18941245
C9J9W2	LASP1	LIM and SH3 domain protein 1 (Fragment)	6	5	4.18771621
K7ES31	EIF3K	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	1	1	4.18499925

Q6UXY8-2	TMC5	Isoform 2 of Transmembrane channel-like protein 5	1	1	4.17622011
Q99832-3	CCT7	Isoform 3 of T-complex protein 1 subunit eta	6	4	4.17397725
Q86YA3	ZGRF1	Protein ZGRF1	5	1	4.16518528
P39023	RPL3	60S ribosomal protein L3	4	1	4.16279392
P35527	KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9	9	3	4.15711243
Q7KZ85	SUPT6H	Transcription elongation factor SPT6	3	3	4.15312997
Q86V81	ALYREF	THO complex subunit 4	5	3	4.1515684
A0A2R8Y811	RPS14	40S ribosomal protein S14 (Fragment)	4	3	4.13508691
Q5TZA2	CROCC	Rootletin	9	4	4.11831095
O14979	HNRNPDL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	8	2	4.07300832
P07384	CAPN1	Calpain-1 catalytic subunit	3	1	4.07242407
Q8IWIJ2	GCC2	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2	13	3	4.06666786
Q14191	WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase	1	1	4.025358
P39880	CUX1	Homeobox protein cut-like 1	2	1	4.01492434
Q9HCM4-4	EPB41L5	Isoform 4 of Band 4.1-like protein 5	1	1	4.00963171
Q0VF96	CGNL1	Cingulin-like protein 1	3	2	4.00318445
P47914	RPL29	60S ribosomal protein L29	1	1	3.9854012
Q9BY44	EIF2A	Eukaryotic translation initiation factor 2A	1	1	3.9628683
Q9Y230	RUVBL2	RuvB-like 2	9	6	3.94216969
P04899-4	GNAI2	Isoform sGi2 of Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	2	2	3.92245899
A0A5F9ZI39	JAK1	Tyrosine-protein kinase	2	1	3.90167065
P48147	PREP	Prolyl endopeptidase	2	1	3.89399313
O15360	FANCA	Fanconi anemia group A protein	4	1	3.88239266

P14314-2	PRKCSH	Isoform 2 of Glucosidase 2 subunit beta	5	3	3.87504654
P54136	RARS1	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	11	6	3.8640664
Q8WVC2	RPS21	40S ribosomal protein S21	4	3	3.8344765
P24666	ACP1	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	3	1	3.8268078
P35268	RPL22	60S ribosomal protein L22	3	3	3.79798972
O60706	ABCC9	ATP-binding cassette sub-family C member 9	2	1	3.77697234
K7EM49	PGD	Phosphogluconate dehydrogenase (NADP(+)-dependent, decarboxylating) (Fragment)	5	4	3.75954503
Q9Y281	CFL2	Cofilin-2	17	1	3.75918064
Q9C099-2	LRRCC1	Isoform 2 of Leucine-rich repeat and coiled-coil domain-containing protein 1	1	1	3.73116156
P31689	DNAJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1	5	3	3.73078709
O14976	GAK	Cyclin-G-associated kinase	1	1	3.73026682
Q96NW7-2	LRRC7	Isoform 2 of Leucine-rich repeat-containing protein 7	2	1	3.71992566
O00267	SUPT5H	Transcription elongation factor SPT5	3	1	3.71279616
Q9Y310	RTCB	RNA-splicing ligase RtcB homolog	2	1	3.70694795
P38398	BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein	5	1	3.70321788
Q9Y6X6	MYO16	Unconventional myosin-XVI	5	1	3.69348923
P35749	MYH11	Myosin-11	18	2	3.67047289
P49368	CCT3	T-complex protein 1 subunit gamma	6	3	3.66422118
Q9BQS8	FYCO1	FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1	5	2	3.66014336
Q6N021	TET2	Methylcytosine dioxygenase TET2	2	2	3.65869468
P62333	PSMC6	26S proteasome regulatory subunit 10B	4	3	3.64498464
P53999	SUB1	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	1	1	3.63911191

Q8NFA0	USP32	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 32	3	1	3.62924445
P78417-2	GSTO1	Isoform 2 of Glutathione S-transferase omega-1	3	2	3.61645226
H3BPG0	COX4I1	Cytochrome c oxidase subunit 4 (Fragment)	2	2	3.60806577
O75116	ROCK2	Rho-associated protein kinase 2	1	1	3.59471307
P50402	EMD	Emerin	4	3	3.58185604
P55786	NPEPPS	Puromycin-sensitive aminopeptidase	7	1	3.58061356
P31153	MAT2A	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	4	3	3.57444822
Q9UGP8	SEC63	Translocation protein SEC63 homolog	2	1	3.5594324
Q8TF21	ANKRD24	Ankyrin repeat domain-containing protein 24	3	1	3.5471776
G5EA31	SEC24C	Protein transport protein Sec24C	1	1	3.54612242
Q9H223	EHD4	EH domain-containing protein 4	11	5	3.53151151
Q9H3U1	UNC45A	Protein unc-45 homolog A	3	1	3.52838119
A0A1B0GVP4	LCORL	Ligand-dependent nuclear receptor corepressor-like protein	2	1	3.49490728
A0A7I2V482	MTHFD2	Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	4	1	3.48970564
P0CG38	POTE1	POTE ankyrin domain family member I	13	1	3.48497729
P25398	RPS12	40S ribosomal protein S12	4	3	3.48425532
P07910-4	HNRNPC	Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	4	3	3.4804145
F5GYN4	OTUB1	Ubiquitinyl hydrolase 1	5	3	3.47108324
A0A494C1B8	TPP2	Tripeptidyl-peptidase 2	1	1	3.46985692
Q9ULI0	ATAD2B	ATPase family AAA domain-containing protein 2B	3	2	3.46031735
Q7Z4Q2-2	HEATR3	Isoform 2 of HEAT repeat-containing protein 3	2	2	3.44425913
P56715	RP1	Oxygen-regulated protein 1	5	3	3.43765291
Q99715-2	COL12A1	Isoform 2 of Collagen alpha-1(XII) chain	3	2	3.43601714

A0A1B0GVY1	NEDD4L	HECT-type E3 ubiquitin transferase	3	1	3.42487149
P53004	BLVRA	Biliverdin reductase A	3	1	3.42049535
Q3B7T1-5	EDRF1	Isoform 4 of Erythroid differentiation-related factor 1	2	1	3.42041369
Q8NFI4	ST13P5	Putative protein FAM10A5	2	2	3.4128792
P06753-5	TPM3	Isoform 5 of Tropomyosin alpha-3 chain	12	2	3.39646018
Q9Y6D5	ARFGEF2	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	1	1	3.38399583
O15031	PLXNB2	Plexin-B2	2	2	3.37248642
Q9P107	GMIP	GEM-interacting protein	3	1	3.31993681
E9PCY7	HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	8	2	3.3093397
P18124	RPL7	60S ribosomal protein L7	8	6	3.28367139
P27695	APEX1	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) endonuclease	4	2	3.27622442
P50995-2	ANXA11	Isoform 2 of Annexin A11	3	1	3.27228716
O00303	EIF3F	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	2	2	3.25495786
B8ZZQ6	PTMA	Prothymosin alpha	2	2	3.22965278
A0A1W2PR28	IQSEC2	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2	2	2	3.21767839
Q07065	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	10	7	3.21412249
Q9UHV9	PFDN2	Prefoldin subunit 2	2	1	3.20955499
O75923	DYSF	Dysferlin	8	1	3.20234314
Q9P2E9-3	RRBP1	Isoform 2 of Ribosome-binding protein 1	7	3	3.20019597
Q9UK61	TASOR	Protein TASOR	6	2	3.18936802
P31947	SFN	14-3-3 protein sigma	15	2	3.18852726
Q7L7X3	TAOK1	Serine/threonine-protein kinase TAO1	1	1	3.18305628
Q6ZU80	CEP128	Centrosomal protein of 128 kDa	8	2	3.1741644
Q9UHB6	LIMA1	LIM domain and actin-binding protein 1	8	5	3.17354281

E7EU81	GOLGB1	Golgin subfamily B member 1 (Fragment)	2	2	3.17079024
Q6PJI9	WDR59	GATOR complex protein WDR59	2	1	3.16421185
P60981	DSTN	Dextrin	8	3	3.15497134
P04179	SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	4	2	3.1492731
S4R403	SSX2IP	Afadin- and alpha-actinin-binding protein	1	1	3.14487563
O14795	UNC13B	Protein unc-13 homolog B	4	1	3.13583675
A0A669KBG2	SYNE2	Nesprin-2	1	1	3.10942394
Q99666	RGPD5	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6	1	1	3.09515563
P98179	RBM3	RNA-binding protein 3	1	1	3.07262842
I3L0A0	PEDS1-UBE2V1	HCG2044781	2	1	3.06395158
A0A6Q8PGA8	GARS1	Diadenosine tetraphosphate synthetase	5	3	3.04330489
P35125	USP6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 6	1	1	3.03647352
O75339	CILP	Cartilage intermediate layer protein 1	1	1	3.03090722
E9PLY5	MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5 (Fragment)	3	1	3.02526584
O15355	PPM1G	Protein phosphatase 1G	2	1	3.00966095
Q06323	PSME1	Proteasome activator complex subunit 1	7	4	3.00601079
A0A2R8Y7C0	HBA2	Hemoglobin subunit alpha (Fragment)	1	1	3.00101758
Q01650	SLC7A5	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	1	1	2.99436585
Q6P158	DHX57	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	2	1	2.99393823
Q04837	SSBP1	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	1	1	2.993034
P00740-2	F9	Isoform 2 of Coagulation factor IX	2	1	2.9849093
H0Y8P0	TBC1D1	TBC1 domain family member 1 (Fragment)	1	1	2.98118627
A0A5F9ZHJ7	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	3	3	2.97870827

P08133	ANXA6	Annexin A6	2	1	2.9782779
P07954	FH	Fumarate hydratase, mitochondrial	5	5	2.966041
K7EIJ8	KATNAL2	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2 (Fragment)	1	1	2.95893793
Q15596	NCOA2	Nuclear receptor coactivator 2	4	2	2.93131245
P12883	MYH7	Myosin-7	14	2	2.91402851
Q96P26	NT5C1B	Cytosolic 5'-nucleotidase 1B	2	1	2.90382134
P11217	PYGM	Glycogen phosphorylase, muscle form	3	1	2.89290137
Q562R1	ACTBL2	Beta-actin-like protein 2	33	1	2.88738696
Q96PU4	UHRF2	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF2	1	1	2.88585437
J3QSU0	ANKS1B	Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain-containing protein 1B	1	1	2.85731206
Q6ZRF8-4	RNF207	Isoform 4 of RING finger protein 207	1	1	2.85037058
O15523	DDX3Y	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	6	1	2.84968983
P16401	H1-5	Histone H1.5	6	5	2.83651324
O75822	EIF3J	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	1	1	2.83142125
O14828	SCAMP3	Secretory carrier-associated membrane protein 3	3	2	2.82338365
H7C0E5	ZPR1	Zinc finger protein ZPR1 (Fragment)	2	2	2.82299201
Q7L576-2	CYFIP1	Isoform 2 of Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	1	1	2.81161821
Q9Y265	RUVBL1	RuvB-like 1	6	3	2.80409454
Q5SNV9	C1orf167	Uncharacterized protein C1orf167	1	1	2.78186859
Q15907-2	RAB11B	Isoform 2 of Ras-related protein Rab-11B	2	1	2.77993976
A0A7I2V668	CTSB	Cathepsin B	2	2	2.77275706
Q15427	SF3B4	Splicing factor 3B subunit 4	1	1	2.75204425

Q96N16-2	JAKMIP1	Isoform 2 of Janus kinase and microtubule-interacting protein 1	1	1	2.73363225
P30740	SERPINB1	Leukocyte elastase inhibitor	1	1	2.72644248
F8W775	NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	2	2	2.71879716
P47756	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta	6	5	2.70921254
P53675-2	CLTCL1	Isoform 2 of Clathrin heavy chain 2	11	1	2.70538882
Q8IY82	DRC7	Dynein regulatory complex subunit 7	1	1	2.69888585
F8VR82	PPP1CC	Serine/threonine-protein phosphatase	1	1	2.69253028
C9J712	PFN2	Profilin	1	1	2.68928306
Q5M9N0	CCDC158	Coiled-coil domain-containing protein 158	5	2	2.6888378
E9PJD9	RPL27A	60S ribosomal protein L27a	3	3	2.67595909
Q04917	YWHAH	14-3-3 protein eta	20	3	2.67399406
P61956-2	SUMO2	Isoform 2 of Small ubiquitin-related modifier 2	1	1	2.66773873
O00429	DNM1L	Dynamin-1-like protein	3	3	2.66011643
Q00341	HDLBP	Vigilin	7	2	2.65406778
E7EQV9	RPL15	Ribosomal protein L15 (Fragment)	4	3	2.62286274
Q9UJZ1-2	STOML2	Isoform 2 of Stomatin-like protein 2, mitochondrial	5	4	2.62071312
H0Y4T6	PIN4	Peptidylprolyl isomerase	1	1	2.61695419
F5H157	RAB35	Ras-related protein Rab-35 (Fragment)	6	2	2.61272128
P17844	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	12	3	2.61121887
P40121	CAPG	Macrophage-capping protein	7	4	2.60359006
P26599	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1	6	5	2.60091723
Q9C093-3	SPEF2	Isoform 3 of Sperm flagellar protein 2	1	1	2.59940624
P26640	VAR51	Valine--tRNA ligase	5	2	2.5925942

Q16222	UAP1	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	1	1	2.58686067
Q96N67	DOCK7	Dedicator of cytokinesis protein 7	6	1	2.58476709
Q53Z42	HLA-A	HLA class I antigen	3	1	2.58416534
M0R2J8	DCDC1	Doublecortin domain-containing protein 1	2	2	2.57682592
H0YLY7	CHP1	Calcineurin B homologous protein 1 (Fragment)	1	1	2.5758498
O95816	BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2	3	2	2.56526129
F8VV56	CD63	CD63 antigen	1	1	2.56332729
P63167	DYNLL1	Dynein light chain 1, cytoplasmic	1	1	2.5619711
E9PP21	CSRP1	Cysteine and glycine-rich protein 1	2	1	2.55646223
Q9ULZ3-3	PYCARD	Isoform 3 of Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	2	1	2.54978823
Q9BXJ9	NAA15	N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	1	1	2.52608354
P35232	PHB1	Prohibitin 1	4	3	2.51519489
Q9HC35-2	EML4	Isoform 2 of Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	2	1	2.51461458
O60333-4	KIF1B	Isoform 4 of Kinesin-like protein KIF1B	3	1	2.5093624
O43776	NARS1	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	4	1	2.50509194
C9JKI3	CAV1	Caveolin (Fragment)	3	3	2.48570899
Q02790	FKBP4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	3	1	2.47512369
O14737	PDCD5	Programmed cell death protein 5	3	3	2.46735246
Q92783-2	STAM	Isoform 2 of Signal transducing adapter molecule 1	3	1	2.46140575
Q9P2J5	LARS1	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	9	4	2.45255577
Q12929	EPS8	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	3	2	2.44856455
O43399	TPD52L2	Tumor protein D54	7	3	2.43841022

H0YJW7	SLIRP	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial (Fragment)	1	1	2.43810869
Q14444	CAPRIN1	Caprin-1	6	4	2.4379773
P26583	HMGB2	High mobility group protein B2	2	1	2.4331582
P39748	FEN1	Flap endonuclease 1	3	2	2.42610306
O60884	DNAJA2	DnaJ homolog subfamily A member 2	3	2	2.4114517
Q9UPR0	PLCL2	Inactive phospholipase C-like protein 2	1	1	2.38815095
Q9HDC9	APMAP	Adipocyte plasma membrane-associated protein	4	3	2.38461795
P78344-2	EIF4G2	Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	7	2	2.37795958
P38432	COIL	Coilin	1	1	2.3625475
Q9Y2K3	MYH15	Myosin-15	9	3	2.34884376
Q16181	SEPTIN7	Septin-7	7	5	2.34708115
P17931	LGALS3	Galectin-3	3	3	2.34553206
Q8IV33	KIAA0825	Uncharacterized protein KIAA0825	3	1	2.32534014
Q9H3R1	NDST4	Bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 4	4	1	2.32394257
P33121	ACSL1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	1	1	2.32355498
A0A2R8Y7B1	CCDC88A	Girdin	3	2	2.3078282
E5RIM3	PLAA	Phospholipase A-2-activating protein	2	2	2.29034935
Q9NP97	DYNLRB1	Dynein light chain roadblock-type 1	2	2	2.27535628
P16949	STMN1	Stathmin	4	3	2.27105082
Q9NUQ6-2	SPATS2L	Isoform 2 of SPATS2-like protein	2	2	2.25589893
Q8NF91-5	SYNE1	Isoform 5 of Nesprin-1	2	1	2.24456883
Q96JH7	VCPIP1	Deubiquitinating protein VCPIP1	2	2	2.23979089

E7EVA0	MAP4	Microtubule-associated protein	6	4	2.23919667
P00367	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	7	4	2.22145815
P98175	RBM10	RNA-binding protein 10	2	1	2.21619857
Q13555	CAMK2G	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	2	1	2.19804136
B1APF7	PRKACB	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta (Fragment)	1	1	2.19361388
P04843	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	8	3	2.19077097
P55884	EIF3B	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	5	3	2.18767088
Q05BV3	EML5	Echinoderm microtubule-associated protein-like 5	1	1	2.17095606
K7EP07	TBCB	Tubulin-folding cofactor B (Fragment)	2	1	2.17040992
P53396	ACLY	ATP-citrate synthase	7	3	2.16239819
P54819-6	AK2	Isoform 6 of Adenylate kinase 2, mitochondrial	4	1	2.16085607
Q8N554	ZNF276	Zinc finger protein 276	2	1	2.1504702
P20290	BTF3	Transcription factor BTF3	5	3	2.14854994
H7C323	KCTD17	BTB/POZ domain-containing protein KCTD17 (Fragment)	1	1	2.14712229
Q9UM54	MYO6	Unconventional myosin-VI	5	1	2.1378291
A6NM62	LRRC53	Leucine-rich repeat-containing protein 53	1	1	2.13460774
Q14677	CLINT1	Clathrin interactor 1	1	1	2.13119636
Q8WUM4	PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein	5	4	2.13050391
E5RGS4	PFDN1	Prefoldin subunit 1	1	1	2.12853152
A0A087WSW 9	TXNRD1	Thioredoxin-disulfide reductase	5	4	2.11747308

Q14993	COL19A1	Collagen alpha-1(XIX) chain	3	1	2.10656483
A0A712V4L7	PABPC4	Polyadenylate-binding protein	11	2	2.10627415
A0A804HIY8	TAF1	Transcription initiation factor TFIID subunit 1 (Fragment)	1	1	2.10111609
O60716	CTNND1	Catenin delta-1	3	2	2.09663606
A0A7P0T8V5	OPHN1	Oligophrenin-1	1	1	2.08952183
P50416	CPT1A	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	5	1	2.07865166
Q70EK8	USP53	Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 53	2	1	2.06972572
P12268	IMPDH2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	2	1	2.06538706
Q5H8C1	FREM1	FRAS1-related extracellular matrix protein 1	2	1	2.0613809
P61026	RAB10	Ras-related protein Rab-10	2	1	2.05640309
Q9H9B4	SFXN1	Sideroflexin-1	5	3	2.05124544
A0A087WV29	NAT10	RNA cytidine acetyltransferase	2	1	2.04901534
E9PFT6	HBD	Hemoglobin subunit delta	1	1	2.03614304
P60953	CDC42	Cell division control protein 42 homolog	4	4	2.03428836
O60437	PPL	Periplakin	5	4	2.0320301
P61353	RPL27	60S ribosomal protein L27	3	3	2.03106285
Q99714	HSD17B10	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	5	1	2.02897525
P30085	CMPK1	UMP-CMP kinase	1	1	2.02621583
O75874	IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	3	1	2.01195492
P16615	ATP2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	6	1	2.0088928
P36871	PGM1	Phosphoglucomutase-1	2	1	2.00113595
A0A712V461	XPO1	Exportin-1	6	1	1.99591279
P49959-2	MRE11	Isoform 2 of Double-strand break repair protein MRE11	1	1	1.9913259
A0A6Q8JFT6	PABPC1L	Polyadenylate-binding protein	3	1	1.98689607

Q9UBS4	DNAJB11	DnaJ homolog subfamily B member 11	2	1	1.9837317
E9PS97	PARVA	Alpha-parvin (Fragment)	1	1	1.98122406
Q5SW79-2	CEP170	Isoform 2 of Centrosomal protein of 170 kDa	2	1	1.97927269
Q8N7U6	EFHB	EF-hand domain-containing family member B	2	1	1.97172911
P09874	PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	8	1	1.96362285
Q9H2G2	SLK	STE20-like serine/threonine-protein kinase	2	2	1.95328714
P39900	MMP12	Macrophage metalloelastase	1	1	1.95141407
F5H6E2	MYO1C	Unconventional myosin-Ic	5	2	1.94934547
I1YAP6	TRIM77	Tripartite motif-containing protein 77	1	1	1.93106182
P09972	ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	7	1	1.92254598
H7BY36	EWSR1	RNA-binding protein EWS (Fragment)	5	3	1.91716418
P35606	COPB2	Coatamer subunit beta'	3	2	1.91096175
P16989	YBX3	Y-box-binding protein 3	3	1	1.90420485
Q13185	CBX3	Chromobox protein homolog 3	3	2	1.89739239
P25786	PSMA1	Proteasome subunit alpha type-1	3	2	1.8934541
Q13045	FLII	Protein flightless-1 homolog	4	1	1.88625103
O75563	SKAP2	Src kinase-associated phosphoprotein 2	1	1	1.88587611
Q3KR16-3	PLEKHG6	Isoform 3 of Pleckstrin homology domain-containing family G member 6	1	1	1.8837641
Q12906	ILF3	Interleukin enhancer-binding factor 3	10	5	1.88319357
P56537	EIF6	Eukaryotic translation initiation factor 6	2	2	1.86074121
P07814	EPRS1	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	15	4	1.83832929
O43852-5	CALU	Isoform 5 of Calumenin	5	2	1.83675795
A0A286YFL2	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	4	2	1.82800428

P18085	ARF4	ADP-ribosylation factor 4	1	1	1.82574812
Q9UBE0	SAE1	SUMO-activating enzyme subunit 1	1	1	1.82454185
P08559-3	PDHA1	Isoform 3 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	2	1	1.8171843
Q00G26	PLIN5	Perilipin-5	2	1	1.81071002
F8VVM2	SLC25A3	Phosphate carrier protein, mitochondrial	2	1	1.81036524
A0A7I2V5A1	ACO2	Aconitate hydratase, mitochondrial	2	1	1.80656586
H3BV07	TBC1D24	TBC1 domain family member 24 (Fragment)	1	1	1.8055499
Q15717	ELAVL1	ELAV-like protein 1	2	1	1.79718222
Q92614	MYO18A	Unconventional myosin-XVIIIa	3	1	1.79571555
Q02952	AKAP12	A-kinase anchor protein 12	2	1	1.79454631
O43242	PSMD3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	3	1	1.78911801
C9JA28	SSR3	Signal sequence receptor subunit gamma	1	1	1.78527327
Q5JPF3	ANKRD36C	Ankyrin repeat domain-containing protein 36C	2	1	1.7634417
P62857	RPS28	40S ribosomal protein S28	5	2	1.74714992
E7EUK8	CDK14	Cyclin-dependent kinase 14	3	1	1.72440148
Q32MZ4	LRRFIP1	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	10	6	1.71806612
P33316	DUT	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	3	2	1.71693767
P00491	PNP	Purine nucleoside phosphorylase	3	3	1.7158555
Q9UJW7-2	ZNF229	Isoform 2 of Zinc finger protein 229	1	1	1.71443075
H0YFD6	HADHA	Enoyl-CoA hydratase	7	3	1.71203222
P49588	AARS1	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	8	4	1.71043501
P54577	YARS1	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	7	3	1.70803014

Q9Y617-2	PSAT1	Isoform 2 of Phosphoserine aminotransferase	4	2	1.70616278
Q5T9S5	CCDC18	Coiled-coil domain-containing protein 18	7	3	1.70262705
O94964	SOGA1	Protein SOGA1	7	1	1.69697669
P00533	EGFR	Epidermal growth factor receptor	1	1	1.6910802
P62753	RPS6	40S ribosomal protein S6	5	2	1.68783393
C9JX88	PSMC2	26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT1	6	4	1.67012356
P49321	NASP	Nuclear autoantigenic sperm protein	7	4	1.66924325
P46777	RPL5	60S ribosomal protein L5	9	8	1.66675393
Q96J94-2	PIWIL1	Isoform 2 of Piwi-like protein 1	1	1	1.66331548
Q9UHP3	USP25	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25	1	1	1.66192469
P09493-3	TPM1	Isoform 3 of Tropomyosin alpha-1 chain	9	3	1.65546372
Q12931	TRAP1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	9	2	1.63629155
P17812-2	CTPS1	Isoform 2 of CTP synthase 1	3	1	1.6222916
Q9NRJ7	PCDHB16	Protocadherin beta-16	5	2	1.6082157
P15144	ANPEP	Aminopeptidase N	9	2	1.60582958
Q8TDW0	LRRC8C	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8C	2	1	1.59758034
Q9UNZ2	NSFL1C	NSFL1 cofactor p47	8	3	1.57656823
Q03252	LMNB2	Lamin-B2	6	1	1.56804411
Q86W56	PARG	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	1	1	1.55880916
P61254	RPL26	60S ribosomal protein L26	3	3	1.55509174
Q9Y2A7	NCKAP1	Nck-associated protein 1	1	1	1.55447111
P51572	BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	8	6	1.5506127
Q08999	RBL2	Retinoblastoma-like protein 2	4	1	1.53820563

Q96I99	SUCLG2	Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	3	1	1.53016449
Q86T65	DAAM2	Disheveled-associated activator of morphogenesis 2	4	4	1.5161228
Q5T7C4	HMGB1	High mobility group protein B1	7	5	1.50434514
P46060	RANGAP1	Ran GTPase-activating protein 1	4	2	1.49794226
Q5SZD1	C6orf141	Uncharacterized protein C6orf141	1	1	1.49065627
Q4KWH8	PLCH1	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1	5	2	1.47767593
Q01814	ATP2B2	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	1	1	1.46657867
A6NJA2	USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	7	4	1.46295871
P68036	UBE2L3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	2	1	1.45805451
P28066	PSMA5	Proteasome subunit alpha type-5	3	2	1.44933334
P14866-2	HNRNPL	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	3	3	1.44814937
Q15233	NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	4	1	1.44522882
O60841	EIF5B	Eukaryotic translation initiation factor 5B	4	2	1.4367935
O75477	ERLIN1	Erlin-1	1	1	1.41293095
Q92973-2	TNPO1	Isoform 2 of Transportin-1	4	3	1.41238365
Q8IWY7	TTBK2	Tau-tubulin kinase	11	1	1.40877091
P60903	S100A10	Protein S100-A10	3	1	1.40629165
F1T0B5	AIPL1	Aryl-hydrocarbon-interacting protein-like 1	1	1	1.38975394
U3KQE2	CAPNS1	Calcium-activated neutral proteinase small subunit (Fragment)	2	2	1.37794888
Q9NR30	DDX21	Nucleolar RNA helicase 2	4	2	1.37544051
H0Y5F3	FLNA	Filamin-A (Fragment)	3	3	1.37534337

Q9C040	TRIM2	Tripartite motif-containing protein 2	1	1	1.37373103
P09884	POLA1	DNA polymerase alpha catalytic subunit	2	1	1.37354991
A0A1B0GV59	LOC101059915	Uncharacterized protein	2	1	1.37215738
E9PGK7	TRPM2	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 2	1	1	1.37018211
P32970	CD70	CD70 antigen	3	1	1.37014256
Q96TA1	NIBAN2	Protein Niban 2	2	2	1.36887023
Q9Y2Z0-2	SUGT1	Isoform 2 of Protein SGT1 homolog	6	2	1.3586804
P13569	CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	4	1	1.34957417
O15027-2	SEC16A	Isoform 2 of Protein transport protein Sec16A	1	1	1.34370694
O75368	SH3BGRL	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	3	3	1.34256495
P23588-2	EIF4B	Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 4B	2	2	1.3382798
P14174	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	5	2	1.33709576
Q8N6H7	ARFGAP2	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	1	1	1.33300856
O43295	SRGAP3	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3	6	1	1.32660036
O75145	PPFIA3	Liprin-alpha-3	7	3	1.32065227
Q15631	TSN	Translin	1	1	1.31418791
Q99613	EIF3C	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	8	5	1.31411245
P06681	C2	Complement C2	4	1	1.31159775
P61106	RAB14	Ras-related protein Rab-14	5	1	1.292802
E5RGN3	ATOX1	Copper transport protein ATOX1	1	1	1.28867499
A0A7I2YQP9	EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	2	1	1.28733385
P04040	CAT	Catalase	6	2	1.27771209
P33993	MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	7	1	1.26729466

Q96S38	RPS6KC1	Ribosomal protein S6 kinase delta-1	7	2	1.26569259
A0A7P0TB55	ACADM	Medium-chain-specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2	1	1.26403742
O43896	KIF1C	Kinesin-like protein KIF1C	2	1	1.25585689
Q14161	GIT2	ARF GTPase-activating protein GIT2	1	1	1.24515673
Q68CK6	ACSM2B	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM2B, mitochondrial	1	1	1.24428428
A0A3B3ITG6	EIF2B5	Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon (Fragment)	1	1	1.24234522
P08579	SNRPB2	U2 small nuclear ribonucleoprotein B''	1	1	1.2394932
Q5TCU3	TPM2	Tropomyosin beta chain	9	1	1.23553818
Q8N1G4	LRRC47	Leucine-rich repeat-containing protein 47	2	1	1.22823522
Q13459	MYO9B	Unconventional myosin-IXb	2	1	1.22633851
O15226	NKRF	NF-kappa-B-repressing factor	2	1	1.21803105
J3KTL2	SRSF1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	5	5	1.21608756
P49221	TGM4	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4	2	1	1.20833283
P48681	NES	Nestin	8	2	1.20549469
P01031	C5	Complement C5	2	1	1.2009144
Q14676	MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	2	1	1.1944483
P78357	CNTNAP1	Contactin-associated protein 1	2	2	1.19059303
Q9NTX5-6	ECHDC1	Isoform 6 of Ethylmalonyl-CoA decarboxylase	4	1	1.1896906
A0A0A0MSK5	TOR1AIP1	Torsin-1A-interacting protein 1	1	1	1.18572114
Q99584	S100A13	Protein S100-A13	1	1	1.18452775
P36405	ARL3	ADP-ribosylation factor-like protein 3	1	1	1.18053687
Q09019	DMWD	Dystrophia myotonica WD repeat-containing protein	2	2	1.17969769
Q96JE9	MAP6	Microtubule-associated protein 6	1	1	1.17940606

Q01432-3	AMPD3	Isoform 1C of AMP deaminase 3	2	1	1.17860709
F6TLX2	GLOD4	Glyoxalase domain-containing protein 4	1	1	1.1694025
O60522	TDRD6	Tudor domain-containing protein 6	7	2	1.16181204
Q9BZ23	PANK2	Pantothenate kinase 2, mitochondrial	2	2	1.1587579
P29590	PML	Protein PML	1	1	1.15743249
P62195	PSMC5	26S proteasome regulatory subunit 8	7	2	1.14866554
P80723	BASP1	Brain acid soluble protein 1	2	2	1.14762668
Q96C19	EFHD2	EF-hand domain-containing protein D2	4	2	1.14595039
J3KT38	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2 (Fragment)	1	1	1.14551858
P08243-2	ASNS	Isoform 2 of Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	2	1	1.12803137
Q14008	CKAP5	Cytoskeleton-associated protein 5	8	2	1.12001229
P17655	CAPN2	Calpain-2 catalytic subunit	2	1	1.11238236
Q8TCS8	PNPT1	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	2	2	1.09530941
A0A7P0T862	NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	1	1	1.08459113
Q9UNH7-2	SNX6	Isoform 2 of Sorting nexin-6	1	1	1.07864408
A0A096LNH2	EFCAB8	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 8	2	1	1.07153836
P62318-2	SNRPD3	Isoform 2 of Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	1	1	1.06601384
Q5SRN1	CDC40	Pre-mRNA-processing factor 17	3	1	1.06344259
O95405-2	ZFYVE9	Isoform 2 of Zinc finger FYVE domain-containing protein 9	3	1	1.05336881
Q8IVL1-5	NAV2	Isoform 5 of Neuron navigator 2	5	1	1.04988901
Q86YJ6	THNSL2	Threonine synthase-like 2	1	1	1.04822335
O75821	EIF3G	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	3	1	1.04111066
D6RAW0	UBE2D3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3 (Fragment)	1	1	1.03618089
P05198	EIF2S1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	3	2	1.03553575

P20618	PSMB1	Proteasome subunit beta type-1	4	2	1.03031236
M0R210	RPS16	40S ribosomal protein S16	2	2	1.01545075
H0YA77	CPLANE1	Ciliogenesis and planar polarity effector 1 (Fragment)	6	2	1.01271885
Q9Y696	CLIC4	Chloride intracellular channel protein 4	5	3	1.01041559
H0YJ63	AHSA1	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 (Fragment)	1	1	1.00380089
Q15643	TRIP11	Thyroid receptor-interacting protein 11	4	2	0.99312515
E9PD53	SMC4	Structural maintenance of chromosomes protein	7	4	0.99259507
Q9UJU6	DBNL	Drebrin-like protein	5	3	0.98555742
E5RHG8	ELOC	Elongin-C (Fragment)	2	1	0.98102572
Q7Z6L1	TECPR1	Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 1	2	1	0.96803142
P62081	RPS7	40S ribosomal protein S7	1	1	0.95929309
P51571	SSR4	Translocon-associated protein subunit delta	4	1	0.95769446
Q9BUF5	TUBB6	Tubulin beta-6 chain	15	3	0.9507327
F8W7Q4	FAM162A	Protein FAM162A	1	1	0.95072229
P46779-4	RPL28	Isoform 4 of 60S ribosomal protein L28	2	2	0.93535586
O60292	SIPA1L3	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 3	3	1	0.92931037
Q15393	SF3B3	Splicing factor 3B subunit 3	6	3	0.91948719
Q96QE3	ATAD5	ATPase family AAA domain-containing protein 5	6	1	0.91924504
Q86UP2	KTN1	Kinectin	11	2	0.91586963
Q8WXX5	DNAJC9	DnaJ homolog subfamily C member 9	2	1	0.90255041
Q8WXH0-3	SYNE2	Isoform 3 of Nesprin-2	3	1	0.89632952
J3QT28	BUB3	Mitotic checkpoint protein BUB3 (Fragment)	1	1	0.89115554
E5RG13	IMPA1	Inositol monophosphatase 1 (Fragment)	1	1	0.88929566

O60271	SPAG9	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	5	1	0.88251175
Q96IZ0	PAWR	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	2	1	0.87923066
Q96CS3	FAF2	FAS-associated factor 2	2	1	0.87274029
O00410	IPO5	Importin-5	7	3	0.86155509
Q6P1N0-2	CC2D1A	Isoform 2 of Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A	1	1	0.85668593
Q9ULD2-2	MTUS1	Isoform 2 of Microtubule-associated tumor suppressor 1	2	1	0.84914237
Q5VT82	PCDH9	Protocadherin-9	1	1	0.84166688
A0A7P0TBI9	SNX9	Sorting nexin	2	2	0.83470332
Q15293	RCN1	Reticulocalbin-1	3	1	0.82357151
P19367-4	HK1	Isoform 4 of Hexokinase-1	1	1	0.81960235
H0Y630	STK24	Serine/threonine-protein kinase 24 (Fragment)	3	1	0.81492006
P13611-3	VCAN	Isoform V2 of Versican core protein	1	1	0.81276642
Q86YS3-2	RAB11FIP4	Isoform 2 of Rab11 family-interacting protein 4	2	1	0.81270705
P20700	LMNB1	Lamin-B1	15	3	0.80254236
P02671-2	FGA	Isoform 2 of Fibrinogen alpha chain	1	1	0.79716702
O95831	AIFM1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	9	4	0.79542582
Q13136	PPFIA1	Liprin-alpha-1	3	1	0.77853425
P40763	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	7	3	0.77471991
B1AL69	CDC37L1	Hsp90 co-chaperone Cdc37-like 1	2	1	0.76865763
Q92626	PXDN	Peroxidasin homolog	2	2	0.76821145
P29692-3	EEF1D	Isoform 3 of Elongation factor 1-delta	13	1	0.75002327
P09601	HMOX1	Heme oxygenase 1	3	1	0.74850985
O60237-6	PPP1R12B	Isoform 6 of Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	2	1	0.74271833
Q9NQR4	NIT2	Omega-amidase NIT2	1	1	0.74075791

Q93098	WNT8B	Protein Wnt-8b	1	1	0.73796107
P35241	RDX	Radixin	11	3	0.7348192
Q6P996	PDXDC1	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	3	1	0.70547419
P41229	KDM5C	Lysine-specific demethylase 5C	2	1	0.6956715
Q9Y5M8	SRPRB	Signal recognition particle receptor subunit beta	2	1	0.69240372
Q16543	CDC37	Hsp90 co-chaperone Cdc37	4	2	0.68930663
O14578-4	CIT	Isoform 4 of Citron Rho-interacting kinase	1	1	0.68364112
O00592-2	PODXL	Isoform 2 of Podocalyxin	2	1	0.6737739
P35580	MYH10	Myosin-10	20	1	0.64677683
H3BRG4	UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	3	1	0.63667098
Q8TCT9	HM13	Minor histocompatibility antigen H13	3	3	0.63602994
Q53SF7	COBLL1	Cordon-bleu protein-like 1	2	1	0.62842109
P12111-3	COL6A3	Isoform 3 of Collagen alpha-3(VI) chain	2	1	0.62485787
P13533	MYH6	Myosin-6	12	1	0.62467937
H0YK42	SNX1	Sorting nexin-1	1	1	0.61592715
P29373	CRABP2	Cellular retinoic acid-binding protein 2	4	2	0.60049164
Q9H254-2	SPTBN4	Isoform 2 of Spectrin beta chain, non-erythrocytic 4	9	1	0.59850138
A6NKT7	RGPD3	RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 3	6	1	0.57484013
Q8N137-3	CNTROB	Isoform 3 of Centrobin	3	2	0.56106059
P27708	CAD	CAD protein	7	1	0.55443716
P22102	GART	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	4	1	0.55054328
B4E3S0	CORO1C	Coronin	2	1	0.54921195
Q99698-2	LYST	Isoform 2 of Lysosomal-trafficking regulator	5	1	0.54865944

P14649	MYL6B	Myosin light chain 6B	5	1	0.54658102
Q9BUJ2	HNRNPUL1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	2	1	0.54489669
A0A7P0T9Z2	DENND5A	DENN domain-containing protein 5A	2	2	0.53917636
D6RBU4	PPIP5K2	Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase (Fragment)	1	1	0.52415506
P08779	KRT16	Keratin, type I cytoskeletal 16	12	2	0.49724732
Q96HW7	INTS4	Integrator complex subunit 4	2	1	0.48988454
E7ETU9	PLOD2	Procollagen-lysine 5-dioxygenase	2	1	0.48061318
O75534	CSDE1	Cold shock domain-containing protein E1	5	1	0.47466827
A0A804HJ69	ALMS1	Alstrom syndrome protein 1 (Fragment)	9	1	0.46301746
P09661	SNRPA1	U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	1	1	0.44532546
A0A7I2V4B4	EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	4	2	0.43028862
H0Y325	SYNE1	Nesprin-1 (Fragment)	4	1	0.42462513
Q9NUQ9	CYRIB	CYFIP-related Rac1 interactor B	3	2	0.41447521
Q14566	MCM6	DNA replication licensing factor MCM6	4	2	0.41358469
E5RJD8	TBCA	Tubulin-specific chaperone A	2	2	0.37174454
Q14980	NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1	12	1	0.35295796
Q13200	PSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	6	1	0.32614558
P51148	RAB5C	Ras-related protein Rab-5C	3	2	0.31841828
P13929	ENO3	Beta-enolase	7	1	0.31277942
Q13615	MTMR3	Myotubularin-related protein 3	2	1	0.31116088
Q96JM3	CHAMP1	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	3	1	0.30708641
Q9Y623	MYH4	Myosin-4	18	1	0.28817477
P10911-2	MCF2	Isoform 2 of Proto-oncogene DBL	2	1	0.26076916

O95996	APC2	Adenomatous polyposis coli protein 2	6	1	0.22907262
Q2TB90	HKDC1	Hexokinase HKDC1	3	2	0.1959694
A0A494C0R8	CLUH	Clustered mitochondria protein homolog	2	1	0.17112301
Q6ZMR3	LDHAL6A	L-lactate dehydrogenase A-like 6A	3	1	0.13307805
O95678	KRT75	Keratin, type II cytoskeletal 75	18	1	0.1072242
Q8IZD2-6	KMT2E	Isoform 6 of Inactive histone-lysine N-methyltransferase 2E	1	1	0.06898497
O60229-2	KALRN	Isoform 2 of Kalirin	3	1	0.05768582
P49748	ACADVL	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	4	1	0.03582376
O43426	SYNJ1	Synaptojanin-1	3	1	0.03122107
A7KAX9	ARHGAP32	Rho GTPase-activating protein 32	4	1	0.03095172
P01871	IGHM	Immunoglobulin heavy constant mu	2	1	0.00095836