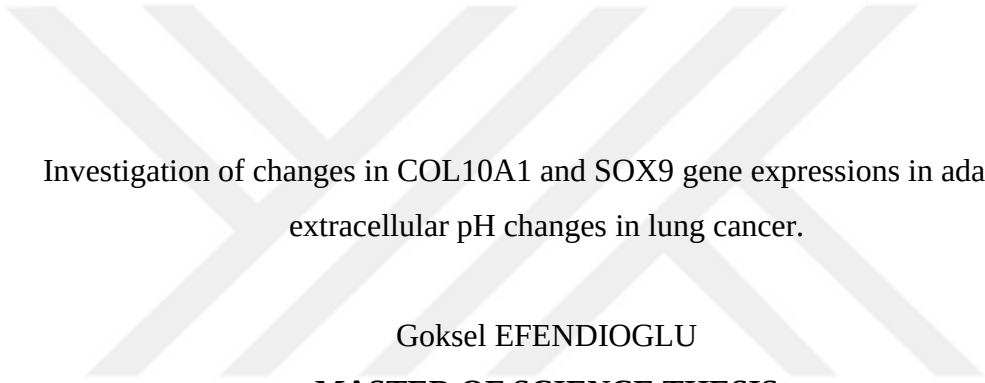


Akciğer kanserinde adaptif ekstraselüler pH değışikliklerinde COL10A1 ve SOX9 gen ifadelerinin değışiminin incelenmesi

Göksel EFENDİOĞLU
YÜKSEK LİSANS

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı
Nisan 2023



Investigation of changes in COL10A1 and SOX9 gene expressions in adaptive
extracellular pH changes in lung cancer.

Goksel EFENDIOGLU
MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

April 2023

Akciğer kanserinde adaptif ekstraselüler pH değişikliklerinde COL10A1 ve SOX9 gen ifadelerinin değişiminin incelenmesi

Göksel Efendioğlu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uyarınca

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sedef Hande AKTAŞ

İkinci Danışman: Doç. Dr. Dilara Fatma AKIN

“ESOGÜ-BAP tarafından TYL-2021-1751 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.”

Nisan 2023

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Göksel Efendioğlu'nun YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Akciğer kanserinde adaptif ekstraselüler pH değişikliklerinde COL10A1 ve SOX9 gen ifadelerinin değişiminin incelenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Sedef Hande AKTAŞ

İkinci Danışman : Doç. Dr. Dilara Fatma AKIN

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye: Doç. Dr. Behiye ŞENEL

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Emel TEKİN

Üye:

Üye:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Sedef Hande AKTAŞ danışmanlığında hazırlamış olduğum “Akciğer kanserinde adaptif ekstraselüler pH değişikliklerinde COL10A1 ve SOX9 gen ifadelerinin değişiminin incelenmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

17/04/2023

Göksel EFENDİOĞLU

İmza

ÖZET

Akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi tüm kanserler içinde ilk sırada yer almaktadır. Hastalık lokalize olduğunda beş yıllık sağkalımın %56 olduğu, metastaz varlığında ise bu sağkalımın sadece %5 olduğu ifade edilmektedir. Metastaz kanser prognozu açısından önemli bir patofizyolojik olaydır. Bu nedenle özellikle metastaza neden olan etmenlerin analizi hastalık özelinde son derece önemlidir. Epitelyal mezenkimal geçişin metastaza katkı sağladığı ve ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesinde önemli etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Bu patofizyolojik durumda ise ekstraselüler matriksin önemli bileşeni olan kolajen ailesinden farklı genlerin ifadesinin pek çok kanser türünde bir biyobelirteç olarak değerlendirildiği bilinmektedir. Güncel araştırmalar COL10A1 geninin promotörü üzerinde SOX9'un bağlandığı bir bölgenin mevcut olduğunu ve bu bağlanmanın COL10A1 ifadesinin artışına neden olarak epitelyal mezenkimal geçişte rolü olduğunu ortaya koymuştur.

Mevcut araştırmada akciğer metastazı için önemli değişimlerden biri olan epitelyal mezenkimal geçişe neden olduğu ifade edilen ve aynı zamanda ekstraselüler matriksin önemli bir bileşeni olan kolajen ailesinden COL10A1 ve hem epitelyal mezenkimal geçişte rolü olduğu olduğu bilinen hem de COL10A1'in yukarı regülatörü olan SOX9 genlerinin ifade değişimleri asidik tümör ortamında incelenmiştir.

Bu amaçla, A549 akciğer adenokarsinom hücre hattında belirli pH seviyeleri oluşturularak kanser hücrelerinin oluşturulan pH seviyelerine adaptif hale gelmesi sağlanmıştır. Oluşturulan farklı adaptif pH seviyeleri de SOX9, COL10A1 gen ifade seviyeleri eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak analiz edilmiştir. Epitelyal mezenkimal geçişte bir epitelyal belirteç olan CDH1 geni ve mezenkimal belirteç olan VIM geni ifadesi ile araştırılmıştır. Ayrıca farklı adaptif pH koşullarında hücre proliferasyonu ve hücre göçü analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, sağlıklı akciğer hücreleri ile kıyaslandığında araştırılan genler olan COL10A1 ve SOX9 genlerinin ve epitelyal mezenkimal geçişin analizi için kullanılan CDH1 ve VIM genlerinin adaptif pH 7.0 seviyelerindeki ifadeleri dikkat çekicidir.

Anahtar Kelimeler: SOX9, COL10A1, Akciğer Kanseri, EMT, Asidik tümör mikroçevresi

SUMMARY

The incidence and mortality of lung cancer ranks first among all cancers. When the disease is localised, the five-year survival rate is 56%, whereas this rate is only 5% in the presence of metastasis. Metastasis is an important pathophysiological event in terms of cancer prognosis. For this reason, the analysis of the factors causing metastasis is extremely important for the specific disease. Studies have shown that epithelial mesenchymal transition (EMT) contributes to metastasis and remodelling of extracellular matrix (ECM) has important effects. In this pathophysiological situation, it is known that the expression of different collagen families, which are important components of the extracellular matrix, is evaluated as a biomarker in many cancer types. Recent studies have revealed that there is a region on the promoter of COL10A1 gene where SOX9 binds and this binding causes an increase in COL10A1 expression and plays a role in epithelial mesenchymal transition.

In the present study, the expression changes of COL10A1, a member of the collagen family, which is also an important component of the ECM and is expressed to cause epithelial mesenchymal transition (EMT), which is one of the important changes for lung metastasis, and SOX9 genes, which are both known to be involved in EMT and up-regulator of COL10A1, were examined in acidic tumour environment.

For this purpose, certain pH levels were created in the A549 lung adenocarcinoma cell line and cancer cells were adapted to the pH levels created. SOX9, COL10A1 gene expression levels at different adaptive pH levels were analyzed using simultaneous polymerase chain reaction. EMT was investigated by expression of CDH1 gene, an epithelial marker, and VIM gene, a mesenchymal marker. Cell proliferation and cell migration were also analyzed under different adaptive pH conditions. As a result, compared to healthy lung cells, the expression of the investigated genes COL10A1 and SOX9 and the CDH1 and VIM genes used for the analysis of EMT transition at adaptive pH 7.0 levels is remarkable.

Keywords: SOX9, COL10A1, Lung Cancer, EMT, Acidic tumor microenvironment

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin pandemi dönemi dahil olmak üzere en başından bu yana akademik gelişimim için benden hiçbir desteğini sakınmayan, karşılaştığım her zorluk için tüm yardımlarını sunan, tez çalışmam süresince bilgi birikiminden yararlandığım ve beni bu süreçte yönlendirmeleriyle büyük kolaylıklar sağlayan kıymetli hocalarım tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sedef Hande AKTAŞ ve eş danışmanım Doç. Dr. Dilara Fatma AKIN'a,

Tezimin deneysel kısımlarını yürütebilmem için bana her türlü imkânı sağlayan, anlayış ve hoşgörülerinden dolayı minnettar olduğum, hiçbir tecrübesini benden esirgemeyen en başta değerli hocalarım Öğr. Üyesi Tayfun ŞENGEL ve ESOGÜ Araştırma ve Uygulama Merkezi (ARUM) merkez müdürü Prof. Dr. Onur KOYUNCU olmak üzere tüm ESOGÜ ARUM personeline,

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak istediğim ve hayal ettiğim kariyer yolu üzerinde beni desteklemekten bir adım bile geri durmamış aileme ve yol arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
SUMMARY	viii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1 Akciğer yapısı ve fonksiyonu	3
2.2 Akciğer kanserleri	8
2.2.1 Adenokarsinom	10
2.2.1.1 Adenokarsinom hücre hattı olan A549 hücreleri.....	11
2.3 Transkripsiyon faktörleri	12
2.4 SOX transkripsiyon faktörü gen ailesi	13
2.4.1 SOX9	13
2.5 Tümör mikroçevresi	16
2.5.1 Asidik Tümör mikroçevresi	16
2.5.2 Tümör mikroçevresi içerisindeki hücre çeşitliliği	18
2.5.2 Ekstraselüler Matriks (ECM)	19
2.6 Kolajenler	21
2.6.1 COL10A1	24
2.7 Epitelyal mezenkimal geçiş	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Materyal	27
3.1.1 Çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasallar.....	27
3.1.2 Hücre kültürü	29

İÇİNDEKİLER

Sayfa

3.2. Yöntem	29
3.2.1 Hücrelerin çoğaltılması	29
3.2.2 Hücrelerin pasajlanması	30
3.2.3 Hücrelerin dondurulması	30
3.2.4 Hücre sayımı	30
3.2.5 A549 hücre hattının pH adaptif hale getirilmesi.....	31
3.3 Hücre Canlılık Analizi Deneyi.....	33
3.4 Yara İyileşme (Scratch / Wound Healing) Deneyi	34
3.5 PZR Optimizasyonu ve eş zamanlı PZR için total RNA izolasyonu	34
3.5.1 RNA'nın spektrofotometrik analizi	35
3.6 Revers Transkriptaz PZR ile cDNA sentezi	37
3.7 Primer tasarımı	39
3.7.1 Primer Çiftlerinin Optimizasyonu	40
3.7.2 Referans Genin Belirlenmesi	40
3.8 Konvansiyonel (Klasik) PZR	40
3.9 Agaro Jel Elektroforezi	42
3.10 Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	42
3.10.1 Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kurulması.....	42
3.10.2 Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi	44
3.11 İstatiksel Analizler	44
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	45
4.1 Asit adaptif A459 hücre hatları morfolojilerinin mikroskop ile değerlendirilmesi.....	45
4.2 Hücre Canlılık Analiz Deneyi Sonuçları	50
4.3 Yara İyileşme (Scratch / Wound Healing) Deneyi Sonuçları ...	54
4.4 Konvansiyonel (Klasik) PZR ve Agaro Jel Elektroforez Sonuçları.....	60
4.5 Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları	62
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	73
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

2.1. Toraks boşluğu	3
2.2. Akciğer dış tabaka katmanları.....	4
2.3. İletken hava yolları.....	4
2.4. İletken hava yolları üzerindeki hücre çeşitliliği.....	5
2.5. SOX gen ailesi üyeleri.....	13
2.6. SOX9 proteininin diyagramı.....	14
3.1. BEAS-2B ve A549 hücre hatları mikroskop görüntüsü.....	29
3.2. pH değişimleri yapılan A549 hücre hatlarının mikroskop görüntüleri.....	32
4.1. A549-pH 7.4 1, 2 ve 3. haftalarının mikroskop görüntüleri.....	45
4.2. A549-pH 7.2 1, 2 ve 3. haftalarının mikroskop görüntüleri.....	46
4.3. A549-pH 7.0 1, 2 ve 3. haftalarının mikroskop görüntüleri.....	47
4.4. A549-pH 6.7 1, 2 ve 3. haftalarının mikroskop görüntüleri.....	48
4.5. A549-pH 6.4 1, 2 ve 3. haftalarının mikroskop görüntüleri.....	59
4.6. A549-pH 7.4 hücre hattı $2,5 \times 10^3$ hücrenin zamana göre absorbans değerleri.....	50
4.7. A549-pH 7.2 hücre hattı $2,5 \times 10^3$ hücrenin zamana göre absorbans değerleri.....	50
4.8. A549-pH 7.0 hücre hattı $2,5 \times 10^3$ hücrenin zamana göre absorbans değerleri.....	51
4.9. A549-pH 6.7 hücre hattı $2,5 \times 10^3$ hücrenin zamana göre absorbans değerleri.....	51
4.10. A549-pH 6.4 hücre hattı $2,5 \times 10^3$ hücrenin zamana göre absorbans değerleri.....	52
4.11. A549 tüm pH seviyeleri 24. saat absorbans değerleri ($2,5 \times 10^3$ hücre).....	53
4.12. A549 tüm pH seviyeleri 24. saat absorbans değerleri (1×10^3 hücre).....	53
4.13. A549-pH 7.4 hücre hattı 0, 48, 96 ve 120. saat mikroskop görüntüleri.....	55
4.14. A549-pH 7.2 hücre hattı 0, 48, 96 ve 120. saat mikroskop görüntüleri.....	56
4.15. A549-pH 7.0 hücre hattı 0, 48, 96 ve 120. saat mikroskop görüntüleri.....	57
4.16. A549-pH 6.7 hücre hattı 0, 48, ve 96. saat mikroskop görüntüleri.....	58
4.17. A549-pH 6.4 hücre hattı 0, 48, 96 ve 120. saat mikroskop görüntüleri.....	59
4.18. CDH1 bantının adaptif pH seviyelerindeki agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	60
4.19. COL10A1 bantının adaptif pH seviyelerindeki agaroz jel elektroforez görüntüsü....	60
4.20. VIM bantının adaptif pH seviyelerindeki agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

4.21. SOX9 bantının adaptif adaptif pH seviyelerinde agaroz jel elektroforez görüntüsü..	61
4.22. COL10A1 geninin erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği.....	62
4.23. COL10A1 geninin A549-pH 7.4 hücre hattı temel alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.....	62
4.24. COL10A1 geninin BEAS hücre hattı temel alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.....	63
4.25. SOX9 geninin erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği.....	64
4.26. SOX9 geninin A549-pH 7.4 hücre hattı temel alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.....	64
4.27. SOX9 geninin BEAS hücre hattı temel alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.....	65
4.28. CDH1 geninin erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği.....	65
4.29. CDH1 geninin A549-pH 7.4 hücre hattı temel alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.....	66
4.30. CDH1 geninin BEAS hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.....	66
4.31. VIM geninin erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği.....	67
4.32. VIM geninin A549-pH 7.4 hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği	67
4.33. VIM geninin BEAS hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.....	68
4.34. RPLP0 geninin erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Kolajen tipleri ve kodladıkları genler.....	22
3.1 Çalışma sırasında kullanılan laboratuvar cihazları.....	28
3.2 Adaptif pH değişikliği için kullanılan HCl miktarları.....	32
3.3 BEAS ve pH adaptif A549 hücre hatları total RNA izolasyon sonuçları	37
3.4 Adaptif pH seviyelerine göre cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları.....	38
3.5 cDNA sentezi için Revers Transkriptaz basamakları	39
3.6 Konvansiyonel ve Eş Zamanlı PZR reaksiyonları için kullanılacak primerler	39
3.7 Primer çiftlerinin bağlanma sıcaklıkları.....	40
3.8 Konvansiyonel PZR basamakları	41
3.9 PZR reaksiyonu için gerekli bileşenler ve miktarları.....	41
3.10 Eş zamanlı PZR termal döngü koşulları.....	43
3.11 Eş zamanlı PZR reaksiyon bileşen ve miktarları.....	43
4.1 BEAS ve A549 tüm pH seviyeleri hücre hatları ikiye katlanma süreleri.....	54
4.2 A549 hücre hatları pH seviyelerinin zamana göre doluluk oranları.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

CO ₂	Karbondiyoksit
MgCl ₂	Magnezyum klorür
HCl	Hidroklorik asit
O ₂	Oksijen
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
pH	Hidrojen Kuvveti
mM	Milimolar
°C	Sıcaklık

Kısaltmalar

Açıklama

KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
ECM	Ekstraselüler Matriks
TME	Tümör Mikroçevresi
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
MET	Mezenkimal Epitelyal Geçiş
AT1	Alveolar Tip I Hücreler
AT2	Alveolar Tip II Hücreler
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
TF	Transkripsiyon Faktörü
KRAS	Kirsten Sıçan Sarkoma Viral Onkogen Homoloğu
TTF-1	Tiroid Transkripsiyon Faktörü-1
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
PDGF	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β
MMP	Matriks Metallo Proteinaz
PTEN	Fosfotaz ve Tensin Homolog
HIF-1	Hipoksi ile İlişkili Faktör-1
CAF	Kanserle İlişkili Fibroblastlar
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
FBS	Fetal Sığır Serum

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akciğer kanseri en yaygın kanser türlerinden biridir. Dünya genelinde kansere bağlı ölümler arasında birinci sırada yer almaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olarak iki alt sınıfta incelenmektedir. KHDAK tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'ini oluşturur ve temelde üç alt tipte incelenir; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom. Adenokarsinom akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturmasıyla en sık görülen alt türüdür.

Asidik tümör mikroçevresi kanser hücrelerinin oluşturduğu karakteristik özelliklerden biridir. Tümör hücrelerinin oluşturduğu hipoksik koşullar, laktat ve CO₂ salınımı sonucu tümör mikroçevresinde asiditeye kayma gözlemlenir. Asiditenin DNA üzerinde mutajenik etkisi vardır. Ayrıca gen ifadesinin anormal aktivasyonuna neden olur. Sinyal yollarında ve moleküler düzeyde değişim sağlayarak ekstraselüler matriks (ECM) yapısının bozulmasına sebebiyet verir. Tümör hücrelerinin agresifliğinin artmasında önemli rolü olduğu gibi primer tümör hücrelerinin metastazı için ilk adımlardan biri olarak görülen epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) indükler.

EMT, hücrelerin epitelyal özelliklerinin kaybı sonrası mezenkimal özellikler kazanarak fenotipte görülen değişiklikler ile bağımsız hareket ve hücre göçüne yönltilmesini niteleyen süreçtir. Tümör hücrelerinin metastazı için çok önemli olan bu süreç, hücre adezyon kuvvetlerindeki değişiklikler ve hücre yüzeyi bağlantılarının kaybolmasıyla primer tümör hücrelerinden ayrılan kanserli hücrelerin, EMT'nin indüklediği anjiyogenez ile kan veya lenf dolaşımına ulaşımı ile sonuçlanır. Hücrelerin epitelyal ve mezenkimal fenotiplerinin takibi için bazı epitelyal ve mezenkimal biyobelirteçler mevcuttur. CDH1 geninin kodladığı E-kaderin proteini epitelyal biyobelirteçler arasındayken VIM geninin kodladığı Vimentin proteini mezenkimal biyobelirteçler arasında yer almaktadır. EMT'nin indüklenmesi için doğrudan ilişkili transkripsiyon faktörlerine ek olarak sinyal yollarının aşağı akış hedefleri olan ve dolaylı yollardan EMT'nin indüklenmesine yol açacak transkripsiyon faktörleri de mevcuttur.

SRY ile ilişkili gen ailesi olarak adlandırılan SOX transkripsiyon faktörü gen ailesinin 20 üyesinden biri olan SOX9, SoxE grubu içerisinde yer alır. Birçok kanser türünde SOX9'un onkogen olarak aşırı ifadesinin gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Akciğer, meme, beyin, prostat gibi kanserlerde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Transkripsiyon faktörü olmasından dolayı çeşitli genlerin ifadesinin ve sinyal yollarının kontrolünde önemli rol oynar. Yakın zamanda yapılan araştırmalar COL10A1 geninin promotörü üzerinde SOX9'un bağlandığı bir bölge olduğunu ortaya koymuştur. Bulgular SOX9'un ifade seviyelerinin artışının COL10A1'in ifade seviyelerinin de artışına neden olduğunu ortaya koymaktadır.

Kolajenler temelde hücrelerarası bağlantıları sağlayan ve hücre iskeleti destek yapılarını oluşturan glikoproteinlerdir. Hücrelerdeki protein varlığının %30'unu oluştururlar. Kolajen ailesinin üyesi olan COL10A1 geni tip X kolajen alfa zincirini kodlar. Hücre farklılaşması, büyümesi ve apoptozu gibi önemli süreçlere etki eder. COL10A1 ifadesi ECM yapısını etkiler. Hücreler arası bağlantıların kaybıyla sonuçlanan değişikliklerle EMT'yi indükler.

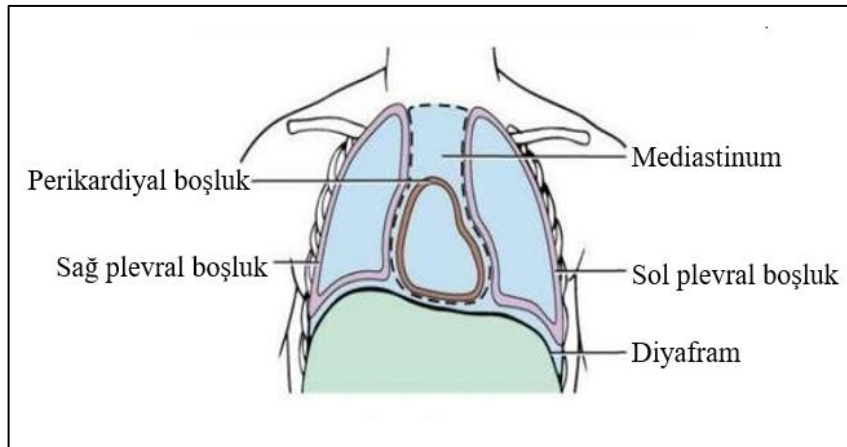
Çalışmamızda, KHDAAK içerisinde en sık görülen alt tip olan adenokarsinom için A549 akciğer adenokarsinom hücre hattı ile çalışılmış, bu hücre hattının kademeli olarak pH'sının düşürülmesiyle pH 7.2-7.0-6.7 ve 6.4 seviyelerine adaptasyonu sağlanmıştır. Pek çok kanser türünde ifadesi önemli ölçüde artan COL10A1 geninin ve SOX9 transkripsiyon faktörünün kanser hücrelerinin malign biyolojik fonksiyonlarını arttırdığı gösterilen çalışmalar temel alınarak bu iki genin değişen pH koşulları altındaki ifadeleri ve bu ifadelerin EMT'ye etki düzeyinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

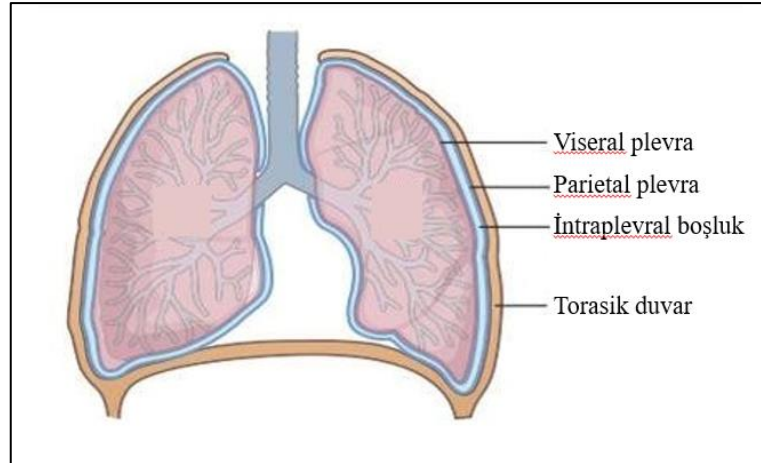
2.1 Akciğer yapısı ve fonksiyonu

Omurgalı canlılar sınıfının metabolizmalarını sürdürebilmeleri ve yaşamlarını devam ettirebilmeleri için oksijen ihtiyaçları vardır. Bu karmaşık yapılı yüksek organizmaların vücutlarında yakıtlar depolanabilirse de oksijen hücrelerde depolanamamaktadır. Bu sebeple hücrelerin anlık olarak oksijen ihtiyaçlarını karşılayabilmek için oksijenin dışarıdan solunum yoluyla alınması ve hücrelerin mitokondrilerine ulaştırılması gereklidir. Dış ortamdan oksijenin alınmasını ve kardiyovasküler sistem yoluyla hücrelere ulaştırılmasını sağlayan organ akciğerdir (Hsia, Hyde, ve Weibel 2016). İki yönlü olarak çalışan akciğer, hücreler için atmosferden alınması gereken oksijen ihtiyacını karşılarken hücrelerde enerji üretiminin son aşamasında oluşan atık gazlar ve karbondioksiti vücuttan uzaklaştırır (LeMessurier vd. 2020).

Akciğer, mediastinum yanında, göğüs boşluğunda bulunan, plevra adı verilen ince, çift katmanlı seröz bir zarla kaplıdır (Şekil 2.1, Şekil 2.2). Bu çift katman parietal ve viseral katman olarak bilinir (Şekil 2.2). Viseral plevra, altında bağ dokusu ve elastik lifler bulunan mezotelyal bir tabaka ile kaplıdır. Akciğerin primer karsinomunu evrelendirilirken viseral plevranın elastik tabakasının invazyonu değerlendirildiği için önem taşır. Bu bulgu tümörün T evresini belirlemede anlamlıdır (Robinson ve Scullion 2021).

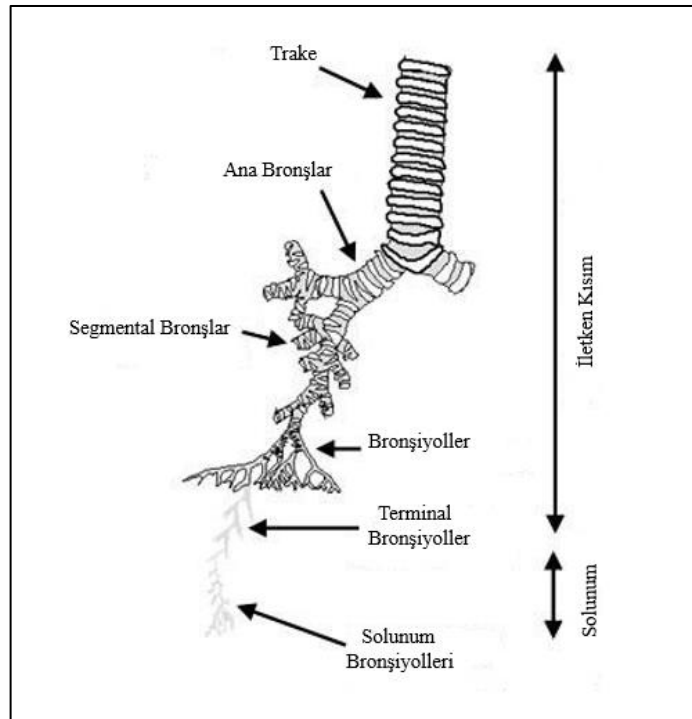


Şekil 2.1. Toraks boşluğu (Efia 2014).



Şekil 2.2. Akciğer dış tabaka katmanları (Robinson ve Scullion 2021).

Solunum sistemi, iletken (conducting) kısım ve solunum (respiratuvar) kısmı olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. İletken kısmı burun, nazofarenks, gırtlak, trakea, bronş, bronşiyollerin bir dizi ardışık daralma segmentini içerir ve terminal bronşiyolde son bulur. Solunum kısmı ise solunum bronşiyolünden başlayarak alveoler kanallar, alveoler keseler ile devam eder ve önemli miktarda gaz değişiminin gerçekleştiği alveollerde son bulur (Şekil 2.3) (Paxton, Peckham, ve Knibbs 2003).

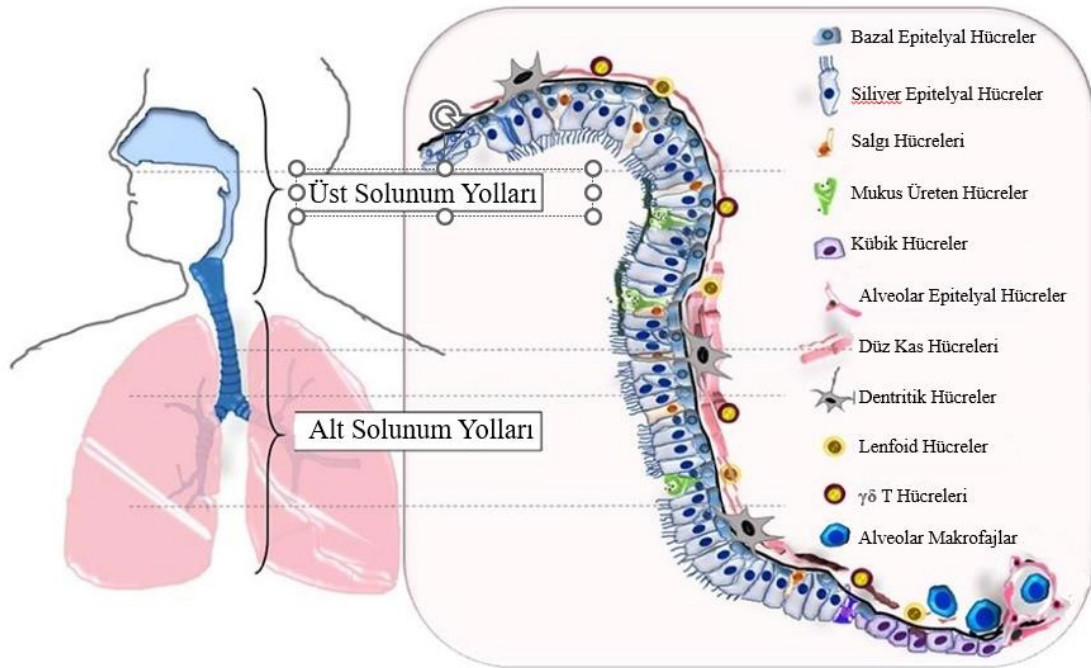


Şekil 2.3 İletken hava yolları (Paxton, Peckham, ve Knibbs 2003).

İletken (conducting) kısmın ana işlevi, solunan havayı 'koşullandırmaktır'. Hava şu şekilde uygun duruma getirilir:

- nemlendirme (seröz ve mukus salgılarıyla),
- ısıtma (kan damarlarıyla) ve
- süzme (partiküllerin mukus salgılarında tutulması ve mukusun yutulacağı boğaza doğru taşınması).

Bu amaçla özelleşmiş hücreler, giren parçacıkları ısıtmak, nemlendirmek ve çıkarmak için iş birliği yapar. Bu hücreler çoğu siliyer psödostratifiye kolumnar epitel olan solunum epitelidir ve temelde beş hücre türü içerir: kirpikli (ciliated) hücreler, kadeh (goblet) hücreleri, bazal hücreler, fırça (brush) hücreler, nöroendokrin hücreler (Khan ve Lynch 2022).



Şekil 2.4 İletken hava yolları üzerindeki hücre çeşitliliği (LeMessurier vd. 2020).

Akciğer yapısı üzerinde sayıca en fazla siliyer hücreler bulunur. Doğal savunma mekanizmalarından biri olan mukosiliyer temizlemenin mekanik hareketlerini kontrol ederler. Kadeh hücreleri tarafından salgılanan mukusun solunan partikülleri hapsedmesi

sonrası kirpikli hücreler yutmak veya öksürmek için partiküllerin birikintisini farinkse hareket ettirir (Ganesan, Comstock, ve Sajjan 2013).

Kadeh hücrelerinin yüzeyleri mûsin granülleri ile kaplıdır. Bu sebeple hücre çekirdekleri bazal tabakaya yakın konumlanmıştır. Salgı hücreleri mukosilyer savunma mekanizması için sıvı, elektrolit, mukus ve savunma proteinlerini üretir. Bronşiyollerin dallanması arttıkça kadeh hücrelerinde azalma gözlemlenir. Solunum sisteminin en uç noktası olan respiratuar bronşiyallerde clara hücreleri kadeh hücrelerinin yerini almış olur. Kadeh ve siliyer hücrelerin bazal membrana bağlanmasını sağlamak için bazal hücreler bağlanma tabakası oluşturur (Evans vd. 2001).

Fırça hücreleri bazı kaynaklarda tip III pnömosit olarak da adlandırılır. Solunum mukozasının her bölümünde seyrek olarak bulunurlar. Apikal katmanları küçük mikrovilluslarla kaplıdır. İşlevlerinin ne olduğu tartışmalı bir konudur ve halen tam olarak belirlenememiştir. Güçlü bir yaklaşım, miyelinsiz sinir uçlarıyla aralarındaki ilişkilerden dolayı solunan havadaki bakteriyel protein parçacıklarını tespit eden ve hava kalitesini kontrol eden bir kemoreseptör olduklarıdır. Bir nörotransmitter olan asetilkolini serbest bırakırlar. Asetilkolin mukosilyer temizleme sürecinde bulunan hücrelerin hareketliliğini artırarak mekanik işlevlere hız kazandırır (Perniss vd. 2020; Brody 2005).

Bronşiyal mukoza içerisinde nöroendokrin hücre kümeleri içerir. Bu nöroendokrin kümeleri Kulchitsky hücreleri tarafından oluşturulur. Katekolamin, serotonin, kalsitonin ve bombesin gibi faktörleri salgırlar. Fırça hücreleri gibi seyrek olarak mukoza içerisinde yer alırlar (Drozdov vd. 2009).

İletken hava yolunun geniş submukozal bezleri siliyer, kadeh, fırça, kulchitsky ve nöroendokrin hücrelerin bir arada bulunması ile oluşur. Solunum sisteminin gelişimi boyunca farklı hücre çeşitlerinin oluşumu temelde epitelyal, mezenkimal, endotelyal ve immün sistem hücrelerinin farklılaşmaları ile gerçekleşir. İmmün sistem hücrelerinin farklılaşması ile doğal savunma sistemlerinin önemli parçaları olan T lenfositler, B lenfositler, bazofiller ve makrofajlar meydana gelir. Endotelyal hücrelerin farklılaşması ile temel olarak lenfatik ve vasküler endotelyal hücreler oluşurken mezenkimal hücrelerin farklılaşması ile perisitler, matris fibroblastları, miyofibroblastlar ve düz kas hücreleri

oluşur. Epitelyal hücrelerin farklılaşmaları ile iletken kısımda görev alan siliyer hücreler ve salgı hücreleri oluşurken solunum kısmında görülen alveolar tip I (AT1) ve alveolar tip II (AT2) hücreleri oluşturulur (Whitsett vd. 2019).

Solunum yolunun son basamağı ve gaz değişim yüzeyleri olarak da adlandırılan alveollerin işlevi, skuamöz AT1 hücrelerinin geniş alveolar epitel bir yüzey oluşturarak pulmoner mikro sirkülasyon yapan kılcal endotel hücrelerine yakın temasta bulunması ile sağlanır. AT1 epitel hücreleri ve kılcal endotel hücreleri arasında oluşturulan bağlantıda yüksek derecede verimli oksijen ve CO₂ alışverişi gerçekleştirilir (Williams 2003). Olgun bir akciğerde yüzey alanının %95'i AT1 hücreleri ile kaplıdır. Geriye kalan %5'lik kısımda ise yüzey aktif madde lipidleri ve alveollerin alveolar gazlar ile hidratlı epitel hücre yüzeyleri arasındaki yüzey gerilimini azaltmak için gerekli proteinleri üreten AT2 hücreleri bulunur (Whitsett ve Alenghat 2015).

Alveoller, hava yolu dallarının terminal uçlarında oluşur. Oluşturulan alveollerin duvarları ile pulmoner arterler ve pulmoner venin terminal dallarına yoğun bir kılcal damar ağı ile bağlantı kurulur. Alveoller, akciğer gaz değişim bölgesinin yoğunluğunu ve yüzey hacmini arttırmak üzere akciğer dallanmasında gerçekleştirilen fraktal geometri sürecini takip ederek kıvrımlar üzerine kıvrımlar ekleyerek oluşturulur. Bu sayede hava yolları ve kan damarları birbirine çok yakın ve geniş bir ara yüzde faaliyet gösterir. Pulmoner kan damarları, ara yüzdeki boşluğu değerlendirmek için çok iyi tasarlanmıştır ve akış direncini en aza indireyecek bir düzen içerisindedir. Asiner yapıların alveollere dönüşmesi sırasında arterler daha sık dallanarak gaz değişim birimlerine ulaşmak için “süpernumerer” dallar oluşturur (Weibel, Sapoval, ve Filoche 2005). Değişim bölgelerinde hava ve kanı ayıran doku bariyeri minimuma indirgenir. Alveollerin oluşumu parankimal hava hacmini arttırmanın yanı sıra distal hava yollarının yüzey/hacim oranını da önemli ölçüde arttırır. İnce alveol duvarları, pulmoner arter ve pulmoner venin terminal dalları arasında uzanan bir kapiller ağ içerir (Hsia, Hyde, ve Weibel 2016).

Fibroblastlar, miyofibroblastlar ve lipofibroblastlar alveollerin destek yapılarını oluşturur. Terminal solunum kanalları ve alveoller, fibroblastlar ve miyofibroblastlar tarafından üretilen, elastin ve kolajen açısından zengin bir ağ tarafından desteklenir. Matris fibroblastları, AT2 hücrelerine ve endotel hücrelerine yakın bir yerde bulunarak, alveolleri

destekleyen kolajen ve elastik lifleri sentezlerken, interstisyel miyofibroblastlar, alveolar duvarlara paralel şekilde konumlandırılan miyofibrilleri içerir. Oluşturulan dinamik ve esnek yapı, solunum sırasında alveollerin genişlemesini ve sıkıştırılmasını sağlayarak gaz alışverişini kolaylaştırır ve verimi artırır (McGowan ve McCoy 2011).

2.2 Akciğer Kanseri

Tüm kanser tipleri arasında akciğer kanseri, sıklık ve mortalite açısından dünyada ilk sırada yer alır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre dünya genelinde her sene yaklaşık 1.6 milyon ölüme sebep olur (M. C. S. Wong vd. 2017). Bu sayı her geçen sene artmaktadır. GLOBOCAN 2020 verilerine bakıldığında, 2020 yılı içerisinde dünya genelinde 2.2 milyon insana akciğer kanseri teşhisi konulmuştur. Ayrıca 2020 yılı içerisinde tüm kanser türleri arasında teşhis edilen en sık ikinci kanser akciğer kanseridir (%11.4). Kansere bağlı ölümlerin %18'lik kısmını oluşturur (Sung vd. 2021). Tüm dünyada kansere bağlı ölümler içerisinde en yüksek oran, her beş ölümden birini oluşturmasıyla akciğer kanserine aittir (Ferlay vd. 2015).

Türkiye dünyada akciğer kanseri sıklığı en yüksek dördüncü ülkedir. Erkekler arasında akciğer kanseri sıklığında ve ölümlerinde Türkiye dünya genelinde birinci sırada yer almaktadır. GLOBOCAN verilerine göre ülkemizde 2020 yılında teşhis edilen kanserler arasında 233.834 vaka ile akciğer kanseri %17.6'lık bir oranla ilk sırada yer almaktadır. 2020 yılı içerisindeki kansere bağlı ölümlerde akciğer kanseri tüm ölümlerin %29.3'ünü oluşturmaktadır ve kansere bağlı ölümlerde ilk sıralardadır. 5 yıllık sağkalım oranı ülkemizde %54.08'dir (Sung vd. 2021).

Akciğer kanseri histolojik olarak KHAK ve KHDAK olarak iki alt kategoride sınıflandırılır. Tüm akciğer kanserleri arasında görülme sıklığı en yüksek kanser türü, KHDAK'a aittir. KHDAK tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %80-85'ini oluştururken, KHAK yaklaşık %15-20 olarak görülmektedir (Rami-Porta vd. 2014).

DSÖ, KHDAK'ı 3 ana tipe sınıflandırmıştır. Bu 3 ana tip; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak adlandırılmıştır. Ayrıca bu karsinom türlerine ait olmayan ve herhangi bir sınıfa atfedilemeyen KHDAK türleri de mevcuttur.

Skumoz hücreli karsinom KHDAK'lerinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Adenokarsinomdan sonra görülme sıklığı en yüksek KHDAK tipi skumöz hücreli karsinomdur. Sıklıkla sigara kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Skumöz hücreler akciğerde hava yollarının içini kaplayan yassı hücrelerdir. Genellikle bronş üzerinde ve merkezde bulunma eğilimindedirler. Skumöz hücreli karsinomların insidansı 1980'lerden bu yana azalma eğilimindedir. Bu durumun filtreli sigara kullanımının 1900'lerin başından itibaren daha yaygın kullanılmasına ve tütün içeriğinin değiştirilmesine bağlanılmaktadır. Filtreli sigara kullanımının artması sonucu sigara dumanının derin inhalasyonu ile akciğerin daha alt kısımlarına ulaşarak, trakea ve bronşlarda oluşan skumöz hücreli karsinomlardan ziyade periferik yerleşimli adenokarsinoma neden olduğu düşünülmektedir (Schabath ve Cote 2019).

Büyük hücreli karsinom akciğer kanserleri arasında en az rastlanan alt tiptir. Fakat erken metastaza eğilimlidir ve kötü prognoz gösterir. Yüksek miktarda sitoplazmaya, büyük çekirdeklere sahiptirler ve tek tabaka halinde büyürler. Periferik yerleşimli olabileceği gibi akciğer merkezinde de görülebilir (Rosado-de-Christenson, Templeton, ve Moran 1994).

Akciğer kanserine yatkınlık ve terapilere yanıt kanserin patogeneğinde genetik değişenlere bağlıdır. Ailesel kanser geçmişinin bulunması, akciğer kanserine yakalanma risk tahminlerinde algoritmalara eklenmiştir (Cassidy vd. 2008). Soy ağacında erken başlangıçlı akciğer kanseri öyküsü olan kişilerin akciğer kanserine yakalanma riskleri 2 kat daha fazladır (Matakidou, Eisen, ve Houlston 2005). Genom üzerinde yapılan araştırmalarda akciğer kanserine yatkınlık ile ilişkilendirilen nöronal asetilkolin reseptörleri olan CHRNA3, CHRNA5, telomeraz ters transkriptaz olan TERT, BRCA2 geni, CHEK2 geni ve HLA lokusları tespit edilmiştir (Y. Wang vd. 2014; Mucci vd. 2016).

Akciğer kanserinde gözlemlenen düşük penetrans ve yüksek frekansın bulunduğu birçok gen raporlanmıştır. Yapılan bir çalışmanın mikrosatellit sonuçları ARID1B ve REL genlerinin ve bazı sinyal yollarının akciğer karsinomunda kromatin şekillerinde değişiklikler ve tümör mikroçevresinin yapılandırılması gibi değişikliklere neden olabileceğini göstermiştir (Velmurugan vd. 2017). Ayrıca hücre döngüsünün kontrolünü sağlayan genler, apoptotik süreçleri denetleyen FAS ve FASL genleri, tümör baskılayıcı p53

ve p73 genleri akciğer karsinomu oluşmasında önemli rollere sahiptir (Bade ve Dela Cruz 2020).

Akciğer kanseri tanısı ve tedavisi için genetik düzeyde çalışmalar devam etmektedir. ROS1 gen testinin akciğer kanseri için önemi, ALK tirozin kinazın immünohistokimya boyama yöntemi ile belirleme çalışmaları ve akciğer kanseri tedavisinde uygulanan anti-EGFR yöntemi için T790M mutasyonlarının saptanması ilerleme kaydedilen genetik çalışmalardır. Ek olarak BRAF, HER2, RET ve MET genleri üzerindeki moleküler çalışmalar akciğer kanseri tanı ve tedavileri için umut vadetmektedir (Lindeman vd. 2018). Akciğer kanseri türleri arasında gözlemlenen gen mutasyonlarında değişiklikler olabilir. Örneğin, Kirsten sıçan sarkoma virüs homoloğu (KRAS) ve serin-treonin kinaz olan LKB1 genleri üzerindeki mutasyonlar akciğer adenokarsinomunda diğer akciğer kanseri türlerine oranla daha sık gözlemlenir. Küçük hücreli ve skuamöz hücreli karsinomlarda p53 ve FGFR1 gen amplifikasyonları akciğer adenokarsinomuna oranla daha yaygındır (Matsumoto vd. 2007; Le Calvez vd. 2005; Dutt vd. 2011).

Ayrıca sigara kullanımı gibi asbest, radon, arsenik ve hava kirliliğine maruz kalma gibi çevresel faktörler akciğer kanseri için risk faktörleridir. Bu çevresel faktörlerin aynı zamanda gen mutasyonuna etkisi de bilinmektedir. Örneğin, KRAS ve p53 geni mutasyonları sigara kullanımı ile ilişkilidir. Özellikle sigara kullanımı gibi diğer çevresel kanserojenler de akciğer kanserleri üzerinde birçok farklı fenotipte kanser oluşumuna neden olur (Le Calvez vd. 2005).

Akciğer kanserleri üzerinde yapılan mutasyon tanımlama çalışmaları ve moleküler çalışmalar sıklıkla kullanılan histolojik sınıflandırmanın yetersiz olabileceğini göstermiştir. Çok daha fazla sayıda farklı fenotipik özellikler, moleküler profillemeye çalışmaları ve genomik analizler ile belirlenebilir (Gabrielson 2006).

2.2.1 Adenokarsinom

Adenokarsinom, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %40'ını oluşturur ve akciğer kanserleri arasında görülme sıklığı en yüksek kanser türüdür. Adenokarsinomlar periferik yerleşimlidir. Genellikle akciğerlerin dış kenarlarında ve bronşların astarında

(akciğerlere hava yolu geçişleri) başlar. Bronşiyollerin öncüllerinden, tip II pnömositlerin öncüllerinden ve müsin üreten hücrelerden köken almaktadır (Minna, Roth, ve Gazdar 2002).

Akciğer adenokarsinomu 4 alt tipte sınıflandırılır; adenokarsinom in situ, minimal invaziv adenokarsinom, invaziv adenokarsinom ve diğer adenokarsinom varyantları (Travis vd. 2011).

Adenokarsinom gelişiminde de diğer insan karsinomlarının gelişiminde olduğu gibi transkripsiyon faktörleri önemli rol oynar. Kanser hücrelerinin geneline bakıldığında transkripsiyon faktörü kodlayan genlerin düzensizliği dikkat çekmektedir. Bu sebeple transkripsiyon faktörleri birçok kanser türünde onkogen olarak nitelendirilir. Örneğin adenokarsinomlarda Tiroid Transkripsiyon Faktör-1 (TTF1)'in yüksek ifadesi gözlemlenir ve TTF1'in yüksek ifadesi biyobelirteç olarak değerlendirilir. Onkogenlere bağlı akciğer kanseri türleri arasında adenokarsinomlar ilk sırada yer almaktadır (Planchard vd. 2018).

2.2.1.1 Adenokarsinom hücre hattı olan A549 hücreleri

A549 hücreleri, insan alveolar bazal epitel hücrelerinden köken alan adenokarsinom hücreleridir. İlk olarak 1972'de 58 yaşındaki beyaz bir erkeğin tümöründen kanserli akciğer dokusunun çıkarılması ve kültürlenmesi yoluyla elde edilmiştir (K. A. Foster vd. 1998; Giard vd. 1973).

A549 hücreleri küboidal veya poligonal görünümlü hücreler olup in vitro ortamda çoğaltıldıklarında kültür kaplarına yapışarak tek tabaka halinde büyürler. Kültürlenmelerinde ikiye katlanma süresi genelde 22 saat olarak ifade edilmektedir. Ancak bu süre bazen 40 saate kadar sürebilir. Bu hücrelerin idamesi F12/K (Gibco/Invitrogen) besiyerine tam büyüme ortamı yapmak için %10 fetal sığır serumu (FBS) eklenmesi ya da yüksek glikoz içeren Dulbecco MEM'e (DMEM) %10 FBS eklenerek oluşturulan tam besiyeri ortamı ile sağlanır (K. A. Foster vd. 1998).

2.3. Transkripsiyon Faktörleri [TF]

Transkripsiyon faktörleri, histon proteinlerinin asetilasyonunu veya deasetilasyonunu katalize ederek, DNA üzerinde gene spesifik hızlandırıcı (enhancer) veya promoter bölgelerine bağlanıp RNA polimeraz aktivitesini etkileyerek ve koaktivatör veya korepressör proteinlerini DNA kompleksine dahil ederek genlerin doğru zamanda ve doğru miktarda ifadelerini sağlar. Hücrelerde gerçekleşen bazal transkripsiyonların düzenlenmesi, hücresel gelişim, hücreler arası sinyallere yanıt, patogenez, çevreye tepki verme ve hücre döngüsü kontrolü gibi birçok önemli olayda kritik rollere sahiptirler (Darnell 2002; Blume-Jensen ve Hunter 2001).

Transkripsiyon faktörlerinin spesifik olarak DNA'ya nereden bağlanacağını belirleyen bölge DNA bağlanma bölgeleridir. Bu DNA bağlanma alanı HMG kutusu, winged heliks, heliks-dönüş-heliks, çinko parmak gibi yapısal motiflerin olduğu protein alanıdır. Bu TF bağlanma bölgeleri genellikle 6 ile 12 baz arası uzunluğa sahiptir. DNA'ya bağlanmak için bu bölgenin birebir uyuşması gerekmez. TF bağlanma bölgeleri üzerinde benzerlik gösteren DNA bölgelerinde de TF-DNA bağlanması gerçekleşebilir. Bağlanma bölgesinin baz sayıları ve birebir benzerlik şartı aranmadığı dikkate alındığında TF'lerin genler üzerinde birçok potansiyel bağlanma bölgesinin bulunması şaşırtıcı değildir. Fakat hücrelerde TF'lerin DNA üzerinde tüm uyumlu dizilere bağlanması mümkün değildir. TF'lerin istenilen şekilde DNA'ya bağlanmasını sağlayacak kofaktörlerin varlığı ve DNA'nın erişebilirlik durumu gibi düzenlemeler mevcuttur (Latchman 1997).

Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin çoğu, hücre döngüsünü ve sinyal yollarını düzenleyen TF'leri kodlar. Normal olmayan TF aktivitesi, gen ifadelerindeki değişiklikler, protein stabilitesinin bozulması, protein-protein etkileşimlerinde bozulma ve posttranslasyonel modifikasyonlarla sonuçlanır. Tümör hücrelerinin çoğunda genellikle çeşitli mutasyonlar sonucu anormal TF aktiviteleri gözlemlenir. TF'lerin tümör proliferasyonunu arttırdığı, metastaz ve tümör anjiyogenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Libermann ve Zerbin 2006).

2.4. SOX Transkripsiyon Faktörü Gen Ailesi

Y kromozomunda bulunan ve cinsiyet belirlenmesinde rol alan SRY geninin HMG alanını içeren genler SOX ailesini oluşturur. SOX ailesi genleri arasında HMG alanları %50 ve üzeri bir benzerlik gösterir. Günümüze kadar tespit edilip gruplandırılmış toplamda 20 farklı SOX geni vardır (Kumar ve Mistri 2020). SOX gen ailesi proteinleri retina, kardiyovasküler sistem, merkezi sinir sistemi ve kondrosit farklılaşmasında önemli rollere sahiptir. Cinsiyet organlarının gelişimi ve cinsiyet belirlenmesinde görev alırlar.

SOX genlerinin gelişim sırasında hücre farklılaşmasına etki etmesinin yanı sıra tümör oluşumunda da önemli etkileri vardır (She ve Yang 2015). Kanseri türlerine göre etki mekanizmaları değişiklik gösterebilir. Onkogen, tümör baskılayıcı ve hatta hem onkogen hem tümör baskılayıcı olarak hareket edebilirler. Bu sebeple SOX genleri üzerinde gözlemlenen yukarı veya aşağı regülasyon kanser proliferasyonuna etki edebilir. Transkripsiyon faktörleri olarak hücre kaderine etki edecek mekanizmalar üzerinde değişiklikler yapabilirler (Vervoort vd. 2018).

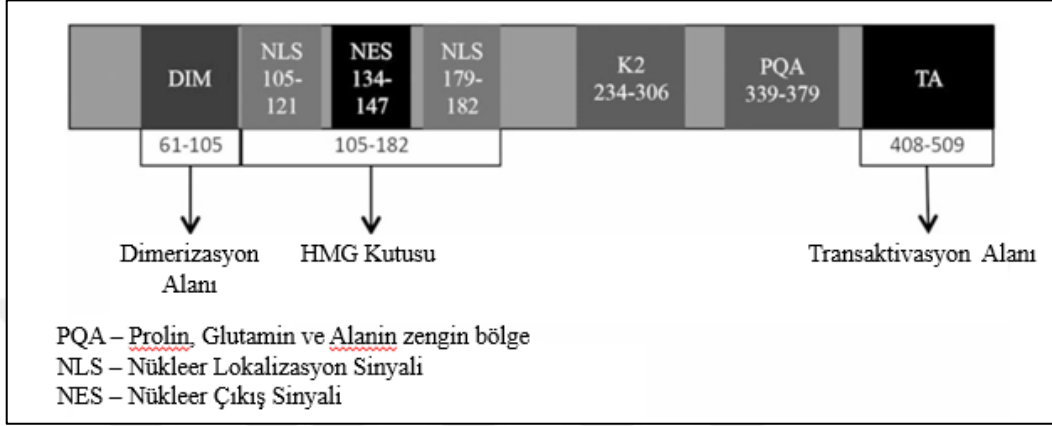
SoxA	SoxB1	SoxB2	SoxC	SoxD	SoxE	SoxF	SoxG	SoxH
SRY	SOX1	SOX14	SOX4	SOX5	SOX8	SOX7	SOX15	SOX30
	SOX2	SOX21	SOX11	SOX6	SOX9	SOX17		
	SOX3		SOX12	SOX13	SOX10	SOX18		

Şekil 2.5. SOX gen ailesi üyeleri.

2.4.1. SOX9

SOX9, erken embriyonik gelişimde rolü bulunan ve yüksek düzeyde koruma sağlayan HMG (high mobility group) bağlanma alanları içeren SOX ailesinin bir üyesidir. SOX transkripsiyon faktörü ailesinin E grubunda bulunan SOX9 toplam 509 aminoasitten oluşur ve 79 aminoasit uzunluğunda DNA bağlanma bölgesi içeren HMG alanı barındırır. Lokasyon olarak 17q24.3-q25.1’de bulunur. HMG alanına ek olarak SOX9 geni üzerinde dimerizasyon alanı (DIM), PQS ve transaktivasyon alanı (TAD) bulunur. PQS alanı bir TAD

bölgesi olmasına rağmen transkripsiyon başlatamaz. Fakat transkripsiyon aktivitesini artırıcı özelliği vardır (Geraldo vd. 2016). Ayrıca, NLS ve NES dizilerine sahip olması SOX9 proteininin hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunabileceğini ve sitoplazma ile çekirdek arasında yer değiştirebileceğini gösterir (Südbeck ve Scherer 1997).



Şekil 2.6. SOX9 proteininin diyagramı (Belo vd. 2013)

SOX9'un hücrelerdeki ifadesinin fizyolojik işlevi kıkırdak oluşumu, sinir gliyalı, kalp gelişimi ve cinsiyet farklılaşmasıdır.

SOX9'un anormal ifadesi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bunları şu şekilde özetleyebiliriz; SOX9 üzerinde oluşan belirli mutasyonlar çeşitli vücut deformasyonları, solunum yolları ve sinir sistemi bozuklukları ile kendini gösteren bir hastalık tablosu olan kampomelik displaziye neden olur (J. W. Foster vd. 1994).

SOX9 ifadesi birçok kanser türüyle de ilişkilendirilmiştir. Akciğer, meme, cilt, beyin ve prostat kanserlerinde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir. Çeşitli kanser türlerinde metastaz ve kanser proliferasyonuna sebep olduğu ile ilgili birçok çalışma vardır (Belo vd. 2013). Örneğin; SOX9'un aşırı ifadesi ile invaziv meme kanseri hücrelerinde tümör büyümesini tetiklediği ve proliferasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Chakravarty vd. 2011). Ayrıca akciğer kanseri hücrelerinde WNT sinyalinin aktivasyonunu artırarak metastaz ve hücre proliferasyonunu artırmasının yanı sıra epitel hücrelerinin hücreler arası adezyon gibi epitel özelliklerini kaybederek mezenkimal bir fenotip gösterme sürecine sebep olan EMT'yi indüklediği bildirilmiştir (Guo vd. 2018).

SOX9'un çoğu kanser türünde onkogen olarak görev aldığını ve ifade seviyelerindeki artışın invazivliğe, proliferasyona ve metastaza sebep olduğu söylenebilir. SOX9 çoğu kanser progresyonu için pozitif bir faktördür. Kanser malignitesi üzerinde çeşitli yolları etkiler. Ek olarak SOX9 bazı kanser türlerinde tümör baskılayıcı olduğu da gözlemlenmiştir. Rahim ağzı kanseri ve melanom kanser türlerinde SOX9 ifadesi tümör büyümesini önlemektedir. Rahim ağzı kanseri ve sağlıklı dokular üzerine yapılan çalışmalarda normal dokulardaki SOX9 ifadesinin rahim ağzı kanseri dokularından daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. p21 geni promotörü üzerinde SOX9'un bağlandığı bir bölgenin tespitiyle SOX9 ifadesinin rahim ağzı kanserinde p21 geninin ifadesinin artışına sebebiyet vererek G1/S fazı geçişine etki ettiği ve tümör proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (H. Wang, Lian, ve Zheng 2015). Aynı şekilde A375 ve B16 melanoma hücreleri üzerinde yapılan araştırmalarda yine SOX9'un p21 promotörüne doğrudan bağlanarak G1 fazı sırasında hücre döngüsünü durdurduğu belirlenmiştir (Passeron vd. 2009).

Bu sebeple SOX9'un ifadesinin çeşitli kanserlere göre ifadenin düzenlenmesi ve kontrol altına alınması tümör proliferasyonu için etkili bir yöntem olabilir. Bir transkripsiyon faktörü olarak kanser türlerine göre çok yönlülük sunan SOX9, onkogen ve tümör baskılayıcı olarak davranabilir.

Tümör baskılayıcı miRNA'lar ile yapılan çalışmalarda bazı miRNA'ların SOX9 geninin ifadesini düzenlediği bulunmuştur ve akciğer kanserinde metastazın ve tümör proliferasyonunun azalması gibi olumlu sonuçlarla karşılaşmıştır. Örneğin, miRNA-124 SOX9 genini 3'UTR bölgesine bağlanarak ifadesini azaltmıştır (X. Wang vd. 2016). Bir başka çalışmada miRNA-124 gibi SOX9'un 3'UTR bölgesine bağlanabildiği belirlenen miRNA-216b, SOX9 ifadesini azaltmıştır. SOX9 yüksek ifadesinin ve SOX9 protein seviyesinin azalması sonucu KHDAK hücrelerinde hücre proliferasyonu ve invazyonunda azalma gözlemlenmiştir (S. Liu vd. 2018). Tümör baskılayıcı bazı miRNA'lar ve SOX9 arasındaki ters korelasyonun daha iyi anlaşılmasıyla akciğer kanserinde tümör ilerlemesinin, metastazın, apoptoz mekanizmalarının ve malignitenin üzerine daha efektif tedaviler geliştirilebilir.

2.5. Tümör mikroçevresi (TME)

Tümör hücreleri, bulundukları ortamın moleküler, hücrel ve fiziksel aktivitelerini değiştirir. Tümör hücreleri tarafından oluşturulan tümör mikroçevresi, sadece tümör hücrelerinin bulunduğu bir ortam değildir. Kan damarları, ECM, sağlıklı hücreler ve birçok sinyal moleküllerinin olduğu karmaşık bir yapıdır. TME de bulunan farklı türlerdeki hücreler farklı ECM proteinleri ve molekülleri bulundururlar. Bu sebeple TME içeriği kanser türleri arasında değişkenlik gösterebilir (Junttila ve de Sauvage 2013; Quail ve Joyce 2013).

TME'nin oksijen perfüzyonu açısından yetersiz, glikoz ve besin maddelerinin düşük seviyelerde bulunduğu ve genellikle asidik pH ile karakterize bir yapısı vardır. Bu koşullarda hücrelerin yaşaması zor olmasına rağmen tümör hücrelerinin adaptasyonları hızlıdır ve şartları kendi çıkarlarına kullanabilme özellikleriyle fark yaratırlar. Örneğin hipoksik bir ortamda oksijenli solunum yerine fermentatif glikozu tercih ederek anaerobik solunum yaparlar. Yetersiz perfüzyon ve hipoksi gibi TME'de görülen durumlar tümör hücreleri üzerinde genetik ve epigenetik değişiklikleri indükler. Yetersiz perfüzyon sonucu oluşan reaktif oksijen molekülleri DNA üzerinde hasara neden olur. Tek ve çift sarmalda oluşan kırıklar, nokta mutasyonları, duplikasyonlar ve replikasyon çatalı oluşumu gibi mutasyonlara yol açar (C. Liu vd. 2007; Brahimi-Horn ve Pouyssegur 2007).

Tümör mikroçevresinin maligniteyi arttırması, metastaza teşviki ve proliferasyon için mikroçevrenin oluşmasını ve sürdürülmesini sağlayan bilenen veya bilinmeyen birçok faktör vardır. Kanser tedavisi için tümör mikroçevresinin kontrol altına alınması etkili bir yöntem olarak düşünülmektedir.

2.5.1. Asidik Tümör Mikroçevresi

Warburg etkisi, tümör hücrelerinin oksijenli solunum ile glikozdan daha çok ATP üretebilmesine rağmen aerobik ortamda fermentatif glikoza yönelerek glikozun laktata dönüştürülmesiyle enerji üretmeyi tercih etmesidir. Tümör hücrelerinin bu tercihi sonucunda laktik asit ve CO₂ salınımı ile tümör mikroçevresi asidik hale gelir. Tümör hücreleri arasında asit verici ve alıcı hücreler bulunduğundan tümör mikroçevresinde heterojenlik vardır. Bu sebeple yapılan ölçümlerde nötre yakın pH derecelerine yakın ölçümler yapılırken pH 5.6'ya

kadar düşen yüksek asidite bölgeleri de ölçülmüştür. Fakat genel olarak ölçülen bölgelerin çoğunluğu pH 6.4-7.0 aralığındadır (Vaupel, Kallinowski, ve Okunieff 1989; Griffiths 1991).

Asidik ortamın klastojenik olabileceği ve DNA zincirinde kırılmalar gibi yapısal değişiklikler yapabileceği gösterilmiştir. Ek olarak asidik ortam sadece DNA'nın yapısının bozulmasına değil aynı zamanda DNA onarım sürecinin sekteye uğramasına da neden olur. Genetik dengesizliğe ve epigenetik değişikliklere sebep olan bu ortam onkogenik mutasyonlara yol açabilir. Potansiyel olarak tümör hücrelerinin proliferasyonuna etki etmesinin yanı sıra sağlıklı hücrelerin daha erken kanserleşmesine geçişi için olanak sağlar (Massonneau vd. 2018).

Hücre dışı asitlenme hipoksi ile ilişkilendirilir ve Hipoksi ile İlişkili Faktör-1 (HIF-1) çoğu glikolitik enzimlerin ifade seviyelerini düzenler. Monokarboksilat taşıyıcı ailesinden olan MCT4 hücre yüzeyinde bulunan ve laktik asidin hücre dışına taşınmasını sağlayan proteindir. MCT4 ifadesinin HIF-1 ile ilişkili olduğu ve laktik asit salınımının tümör hücrelerinin proliferasyonunu etkilediği görülmüştür. Ayrıca HIF-1'in aktivasyonu anjiyogenezi düzenler. Anjiyogenez ile yeni damar ağları oluşumu sonucu primer tümörlerin dolaşım yollarına ulaşımı sağlanır. HIF-1'den bağımsız olarak asidik mikroçevre Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A (VEGF-A) ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü C (VEGF-C) olarak bilinen büyüme faktörleri, anjiyogenez promotörü olarak bilinen interlökin-8 gibi proteinlerin ifadesini indükler (Sutoo vd. 2020). Ancak tümördeki asidik ekstraselüler pH'ın doku hipoksisinden bağımsız olarak gen ifadesini etkileyebildiği ifade edilmektedir (Rauschner vd. 2021).

Asidik tümör mikroçevresi daha agresif tümör hücreleri için evrimsel baskı oluşturur. Tümör hücrelerinin zaten uyum sağlama konusunda çok hızlı adapte oldukları bilinmektedir. Dolayısıyla tümör hücrelerinin normal hücrelere göre yeni mutasyonlara uğraması daha olasıdır. Ayrıca DNA üzerinde değişiklik olmadan da asidik ortam gibi çevresel streslere uyum sağlayarak proliferasyonlarını hızlandırıp tedavi direnci oluştururlar. Ek olarak, tümör mikroçevresine yakın olan normal hücrelerinde asiditeden etkilenip genotip ve fenotiplerinde farklılıklar, epigenetik değişiklikler ve kanserleşmeye yönelimin artması gözlemlenir (Massonneau vd. 2018).

Asidik mikroçevre hücreler arası bağlantıların kaybolmasını sağlama, epitel hücrelerin polaritelerinin kaybedilmesi ve invazivlik gibi özellikler kazandırarak etki etmektedir. Asidik ortam ile kazanılan bu özellikler EMT'yi kolaylaştırmaktadır. Melanom hücreleri üzerinde yapılan bir araştırmada, 24 saat asidik ortama maruz bırakılan hücrelerde EMT biyobelirteçlerinde artış gözlemlenmiştir (Peppicelli vd. 2014). Ayrıca bir başka araştırmada asidik ortam ile tümör hücrelerin metastazı için gerekli olan hücre-hücre adezyonlarının azaldığı görülmüştür. Asidik ortam hücreler arası bağlantılardaki değişiklikler, ECM'nin yapısının bozulması ve metastaz için ön koşul olarak görülen EMT üzerinde kritik bir rol oynar (Hofschroer vd. 2017).

2.5.2. TME İçerisindeki Hücre Çeşitliliği

TME içerisinde T ve B lenfositler, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar, nötrofiller ve dentritik hücreleri gibi immün sistem hücrelerini, vasküler endotel hücreler, fibroblastlar, adipositler ve stellat hücreleri gibi stromal hücreleri bulundurur. TME alanının yakınında bulunan sağlıklı stromal hücre bileşenleri tümör hücreleri tarafından değişikliğe uğratarak anjiyogenezi, invazyonu, proliferasyonu ve metastatik aktiviteyi etkileyecek birçok faktör salgılanmasına yol açar. Stromal hücre çeşitleri arasında bulunan endotel hücreler damarlanma oluşumunun düzenlenmesinde görev alır. Birincil tümör oluşumunda ilk olarak pasif oksijen difüzyonu ile büyüme devam ettirilebilir fakat büyüme gerçekleştikçe yetersiz gelmeye başlayan oksijen difüzyonu sonucu hücrel metabolik atıklar, yetersiz oksijen ile birlikte tümör mikroçevresinde hipoksik ve asidik alanlar oluşur. Oluşan stres ortamı sonucunda HIF transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonları artar. HIF genlerinin aktivasyonu endotel hücrelerin Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), VEGF gibi proanjiyogenik çeşitli büyüme faktörlerinin aktivasyonunu indükler. Anjiyogenez başlangıcına ek olarak endotelial hücreler de kanserle ilişkili fibroblastlara (CAF) dönüşüm gözlemlenir. CAF'lar da sıklıkla epitelyal özelliklerin kaybı gerçekleşir. EMT ve anjiyogenez için önemli bir faktör olan Dönüştürücü Büyüme Faktörü β (TGF- β) salgılanmasını sağlarlar. Ayrıca CDH1 geninin tarafından kodlanan E-Kaderin proteinini parçalayan yüksek Matriks Metallo Proteinaz-3 (MMP-3) ifadeleri gösterirler (Anderson ve Simon 2020).

2.5.3. Ekstraselüler Matriks (ECM)

ECM'nin bileşenleri epitel veya endotel tabakayı stromadan ayrı tutmak için epitel, endotel ve stromal hücreler tarafından üretilen bazal membranı ve interstisyel matrisi içerir. Bileşenler içerisinde destek yapılarını oluşturan ve bölünmeyi sağlayan kolajenler, elastinler ve biyokimyasal açıdan her birinin farklı görevi bulunan glikoproteinler, proteoglikanlar, polisakkaritler ve integrinler gibi özel proteinler bulunur (Whittaker vd. 2006). İnterstisyel matriks glikoproteinler açısından zengin olduğu için yüksek oranda yüklüdür. Fibriler kolajenler, proteoglikanlar ve fibronektin gibi glikoproteinlerin varlığı interstisyel matrisin hidratlaşmasına ve dokuların gerilme kuvveti oluşturmaya önemli katkıda bulunur. Her bileşenin düzenli şekilde bir arada çalışması ile hücre davranışı kontrol edilir. Yapısal ve biyokimyasal çeşitlilik efektif çok yönlülük sağlar. Bu dinamik yapı biyomekanik, biyokimyasal ve fiziksel olarak çok farklı özellikler gösterebilir (Egeblad, Rasch, ve Weaver 2010).

Hücrelerin dışarıdan gelen sinyalleri karşıladığı ilk yer ECM'dir. Hücre yüzeyinden başlayarak çekirdeğe kadar giderek gen ifadelerini etkileyen ve hücre davranışında değişiklikler gibi önemli olaylarla sonuçlanabilen çoğu sinyalleşme mekanizmalarının başlangıcında ECM bulunur.

ECM'ye ait enzimlerin ifadeleri ve aktiviteleri sıkı olarak birçok kontrol noktasında gerçekleştirilir. Matriks Metallo Proteinazlar (MMP) gibi ECM üzerinde önemli etkileri bulunan enzimlerin anormal aktiviteleri yıkıcı sonuçlara neden olur. Kontrol sadece transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerde gerçekleşmez. Translasyon sonrası prodomainler ve proteinaz inhibitörleri gibi kontrol mekanizmaları da vardır. Fakat bulunulan ortamda değişiklikler ve hücre yaşlılığı gibi çeşitli nedenlerle enzim aktiviteleri yine de değişebilir. Enzim aktivitesinde anormal değişiklikler ile ECM içeriğinin bozulmasına genellikle katkıda bulunan hücre çeşitleri kanserle ilişkilendirilmiş fibroblastlar, bağışıklık hücreleri ve stromal hücrelerdir (Quante vd. 2011; Singer ve Caplan 2011).

Genel olarak ECM'nin dinamik yapısı fibroblastlar tarafından oluşturulur. Fakat tümör hücrelerinde fibroblastların yerini miyofibroblastların almasıyla birlikte protein içeriği değiştirilerek ECM yapısında bozulmalar yaşanır. Tümör mikroçevresi oluşumunda

gözlemlenen ilk adımlardan biri ekstraselüler matriksin yeniden düzenlenmesidir. ECM'de bulunan proteinlerin hidrolizini sağlayan MMP enzimleri genellikle tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilirler (Klein vd. 2004). MMP'ler endotel migrasyona yani tümör hücrelerinin sağlıklı hücrelerin oluşturduğu doku bariyerlerini aşmalarına zemin hazırlar. Ayrıca ECM yapısının bozulması sırasında tümör agresifliğini ve istilasını destekleyen büyüme faktörlerinin ifadelerini etkiler. Örneğin, bir büyüme faktörü olan VEGF, ECM üzerinde alfa ve beta alt tiplerinden oluşan integrin proteinlerini etkiler. Hücre yüzeyi reseptörü olan integrin proteinlerinin görevi hücreler ve ECM arasında bağlantı sağlamak ve stabiliteyi korumaktır. İntegrin proteinleri tümör mikroçevresi oluşumunda önemli bir yere sahiptir. Tirozin kinazlar ile birlikte hücre göçünü, çoğalmasını ve metastazı indüklerler. Yapılan birçok çalışma integrin proteinlerinin anjiyogenezi ve metastazı indüklediğini göstermiştir (Alphonso ve Alahari 2009). VEGF tarafından aktive edilen bir integrin proteini fibronektinlere bağlanarak yeni damar oluşumlarını teşvik eder (White ve Muller 2007).

ECM, sıklıkla tümör ilerlemesinde düzensizliği ile dikkat çeker. Her tümör hücresi için farklı olabilecek ECM yapısının bozulması, TME üzerinde hipoksik ve asidik alanlar oluşturarak anjiyogenezi ve kanser proliferasyonu ile sonuçlanabilir. Tümör hücrelerinin anjiyogenezi kaotik bir dallanmaya sebep olur. Damar oluşumunda lümen tabaka genellikle düzensiz olduğu için sızma gözlemlenir. Düzensiz lümen tabakası interstisyel sıvı basıncını etkileyerek besin dağılımını ve kan akışını bozar. Tümör malignitesine katkıda bulunan kaotik anjiyogenezi ayrıca hipoksiye yol açar. TME ve ECM kanser proliferasyonunda, anjiyogenezi ve tedavi direnci oluşturulmasında önemli rol oynar (Carmeliet ve Jain 2011).

Katı tümör kütlelerinin %55-60'ını ECM birikintileri oluşturur. ECM içeriğinde bulunan kolajen, fibronektin, elastin ve laminin yapılarının düzensiz regülasyonu ECM birikintilerinin çoğalmasına ve yapı bozulmasına yol açar. Tümör mikroçevresinde kolajen birikmesi desmoplazi ile sonuçlanır. Kolajenler ile oluşturulan sıkı bağ dokuları ile metastaz olasılığının azalması beklenebilir fakat tam tersi bir şekilde kolajenler ile oluşturulan lifler metastatik hücrelerin migrasyonu için tümör mikroçevresinden ayrılma ve uzak yayılmayı sağlayan damar sistemine gidiş için yol oluşturur (Provenzano vd. 2006; Anderson ve Simon 2020).

2.6. Kolajenler

Memeli canlılarda en çok bulunan proteinler kolajenlerdir. Protein kütlesinin yaklaşık %30'unu oluştururlar. İlk kez keşfedildikleri ve sınıflandırıldıkları 1960'lı yıllardan bu yana 28 kolajen çeşidi tespit edilmiştir (Ricard-Blum 2011).

Kolajenler arasındaki çeşitliliği üçlü sarmal yapıları sağlar. Üçlü sarmal yapıları kolajenlerin genel yapılarının büyük veya küçük bir kısmını oluşturabilir. Örneğin sarmal yapılar kolajen I'in %96'sını oluştururken kolajen XII'in %10'nundan az bir kısmını oluşturur. Alternatif promotörler, alternatif kırılmalar (splicing), üç boyutlu yapısal izoformlar ve supramoleküler yapıların varlığı kolajen çeşitliliğine katkıda bulunur. Aynı kolajen tipinin birkaç farklı izoformu bulunabileceği gibi farklı kolajen tiplerine ait zincirlerin karışımı olarak hibrit moleküler izoformlarda meydana gelir (Ricard-Blum 2011).

Çizelge 2.1 Kolajen tipleri ve kodladıkları genler.

Kolajen Tipleri	Genler
Kolajen tip I	COL1A1, COL1A2
Kolajen tip II	COL2A1
Kolajen tip III	COL3A1
Kolajen tip IV	COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6
Kolajen tip V	COL5A1, COL5A2, COL5A3
Kolajen tip VI	COL6A1, COL6A2, COL6A3, *COL6A5
Kolajen tip VII	COL7A1
Kolajen tip VIII	COL8A1, COL8A2
Kolajen tip IX	COL9A1, COL9A2, COL9A3
Kolajen tip X	COL10A1
Kolajen tip XI	COL11A1, COL11A2
Kolajen tip XII	COL12A1
Kolajen tip XIII	COL13A1
Kolajen tip XIV	COL14A1
Kolajen tip XV	COL15A1
Kolajen tip XVI	COL16A1
Kolajen tip XVII	COL17A1
Kolajen tip XVIII	COL18A1
Kolajen tip XIX	COL19A1
Kolajen tip XX	COL20A1
Kolajen tip XXI	COL21A1
Kolajen tip XXII	COL22A1
Kolajen tip XXIII	COL23A1
Kolajen tip XXIV	COL24A1
Kolajen tip XXV	COL25A1
Kolajen tip XXVI	EMID2
Kolajen tip XXVII	COL27A1
Kolajen tip XXVIII	COL28A1

*COL6A5, daha sonradan COL29A1 olarak belirlenmiştir.

Kolajenler üç homolog zinciri bulunan veya hiç homolog zinciri bulunmayan alfa zincirlerinden oluşurlar. Sağ-el sarmalı şeklinde düzenlenen bu glikoproteinlerin homolog veya homolog olmayan alfa zinciri kısımları sol-el sarmalı ile oluşur. Alfa zincirinin içerisinde bulunan aminoasit dizileri genellikle prolin veya hidroksiprolin ile oluşturulan glisin bağlantılarını içerir. Temelde kolajenler 3 sınıf altında incelenir; fibril yapı oluşturan kolajenler, fibril yapılar üzerinde destek yapıları oluşturan fibrille ilişkili kolajenler ve C-terminal ve N-terminal tetramerlerini üreten ağ oluşturuvcu kolajenler. Kolajen türüne bağlı olarak fibroblastlar, epitel hücreleri ve endotel hücreleri tarafından eksprese edilirler (Brodsky ve Persikov 2005; Franzke, Bruckner, ve Bruckner-Tuderman 2005).

Akciğerlerin yapısında en yaygın olarak bulunan kolajen tipleri I, II, III, IV ve I-III hibritleridir. Tip I ve tip III kolajenler akciğer mekaniğini ve dinamizmine katkı sağlamakla birlikte bronşlarda, interstisyumda ve alveol duvarlarında yapısal çerçeve oluştururlar. Tip II kolajen, iletken hava yolu kıkırdığında bulunan kolajenlerin yaklaşık %85-90'nını oluşturur. Ayrıca ECM'nin kondrosit sentezine yardımcı olur. Tip IV kolajen, bazal membranın işlevini ve dayanıklılığını sağlayan temel bileşendir. Hibrit tip I-III kolajen yapısı, akciğerlerde oluşturulan mekanik kuvvetlerin kolajen liflerini parçalanmasına karşı direncini belirler (Laurent 1986).

Kanser hücrelerinde kolajen üretimi sıklıkla artmaktadır. Tümör hücrelerindeki ECM yapısındaki değişikliklerden biri de kolajen içeriğinin ve dağılımının değişmesidir. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu, reseptörler, sinyal yolları ve transkripsiyon faktörleri TME'deki kolajen koşullarını değiştirir. Tümör baskılayıcı bir gen olan p53'ün anormal ifadesi kanser invazyonu ile karakterize kolajen demetlerini oluşturur (Kenny vd. 2017). Ayrıca Fosfataz ve Tensin Homolog (PTEN) geni üzerinde oluşan delesyonlar CAF'ların oluşmasını ve COL1A1 üretiminin artmasını tetikleyerek kanser ilerlemesinde önemli etkiler sağlar (Jolly vd. 2016).

Kolajenler kanser hücrelerinde proliferasyon, apoptoza direnç, invazyon, hipoksik koşulların oluşumu, anjiyogenez ve metastaz ile ilişkilidir.

2.6.1. COL10A1

Kolajen ailesinin üyeleri içinde bulunan COL10A1 tip X kolajen alfa zincirini kodlar. Bu kısa zincir endrokondral ossifikasyon sırasında hipertrofik kondrositler tarafından eksprese edilmektedir. Stromanın öncül bileşenlerinden olan Tip X kolajen alfa zinciri hücre farklılaşması, hücre büyümesi, apoptoz gibi süreçlerde görev alırken tümör hücrelerinin büyümesi, anjiyogenezi ve kötü prognoza sebebiyet ile ilişkilendirilmiştir (Kielty vd. 1985).

Özellikle gastrik kanserde yüksek ifade seviyelerine ulaşan COL10A1 geni meme, beyin, kolon ve akciğer kanserlerinde de tümör ilerlemesine sebep olmaktadır (Zhang vd. 2022). Hücrelerde bol miktarda eksprese edilen kolajen gen ailesi ECM'nin önemli bileşenlerindendir. Kolajen genlerinin anormal ve ektopik ifadesi epitelyal hücrelerin morfolojisini değiştirebilir. Epitelyal hücrelerin işlevlerinin ve özelliklerinin değişmesi sonucu EMT gerçekleşmesi ve tümör hücrelerinin kan dolaşımı ve lenf dolaşımına girerek hücre istilasının hızlanmasına olanak sağlayacak metastatik bir rol sergilemesine neden olabilir.

Akciğer kanserinde A549 ve H1299 hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda, COL10A1 yüksek ifadesinin olduğu hücrelerde mezenkimal biyobelirteçlerin [N-cadherin, Vimentin] mRNA seviyelerinde bir artış gözlemlenirken, epitelyal biyobelirteç olan ve CDH1 geni tarafından kodlanan E-Kaderin proteini seviyelerinde düşüş belirlenmiştir. Aynı zamanda COL10A1 geni susturulduğunda tam tersi bir durum gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar COL10A1 geninin EMT ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Liang vd. 2020).

Gastrik kanser üzerinde COL10A1 ve SOX9 geni ile yapılan bir başka çalışmada, SOX9'un doğrudan COL10A1 promotörüne bağlandığı bulunmuştur. SOX9 bağlanması sonucu COL10A1 transkripsiyonunda artış yaşanırken kanser hücrelerinin malign biyolojik fonksiyonları da artmaktadır (Li vd. 2018).

2.7. Epitelyal Mezenkimal Geçiş [EMT]

EMT, epitelyal özelliklerin kaybedilmesiyle hücre hareketliliğinin arttığı ve göç yeteneklerinin kazanıldığı mezenkimal fenotipe geçiş sürecini niteler. Doku homeostazı, yara iyileşmesi, kök hücre plastisitesi ve embriyogenez gibi fizyolojik süreçlerde önemli rol oynar. EMT'nin gerçekleşebilmesi için birçok biyokimyasal ve moleküler değişiklikler gerekmektedir. EMT'yi indükleyen SNAI1, ZEB ve TWIST1 gibi doğrudan etkileyen transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra hücreler arası bağlantıları etkileyen hücre yüzeyi proteinlerinin ifadesi, ECM'nin parçalanmasına neden olan enzimler, spesifik miRNA'lar ve hücre iskeletini oluşturan proteinlerin ifade seviyelerinin değişmesi ve düzenlenmesi gibi birçok faktör mevcuttur. Temel olarak işlevsellik açısından üç başlık altında toplanan EMT tipi vardır. Bu EMT tiplerinden ilki implantasyon, embriyogenez ve organ gelişimi ile ilişkili EMT, ikincisi doku rejenerasyonu ve organ fibrozu ile ilişkili EMT ve üçüncüsü kanser proliferasyonu ve metastaz ile ilişkili EMT'dir (Kalluri ve Weinberg 2009).

EMT sadece kanser proliferasyonu ve metastaz ile ilişkili olmayıp anjiyogenez, antiapoptoz, ilaç direnci gibi durumları da etkiler. EMT gözlemlenen hücrelerde E-Kaderin, γ -katenin ve claudin-1 gibi epitelyal biyobelirteçlerde düşüş yaşanırken VIM geni tarafından kodlanan vimentin proteininin yanı sıra fibronektin ve N-cadherin gibi mezenkimal biyobelirteçlerde artış gözlemlenir. EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörleri akciğer karsinomu, hepatoselüler karsinomu, meme karsinomu ve pankreas karsinomu gibi birçok kanser türü ile ilişkilendirilir (Thiery 2002).

EMT, KHDAK hücrelerinde metastazın erken bir öncüsüdür. SOX9 geninin aşırı ifadesinin olduğu KHDAK hücre hatlarında E-Kaderinin düşük regülasyonuna ek olarak Vimentin, fibronektin ve N-cadherin gibi mezenkimal biyobelirteçlerin yüksek regülasyonu tespit edilmiştir. Aynı zamanda KHDAK hücrelerindeki SOX9 yıkımı sonucunda epitelyal biyobelirteçlerde bir artış olurken tam tersine mezenkimal biyobelirteçlerde bir düşüş olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda SOX9 geninin aşırı ifadesinin EMT'yi indükleyerek KHDAK hücrelerinde metastazı artırdığı düşünülmektedir (Huang vd. 2019).

Kanser metastazının erken evresi için bir öncül mekanizma olarak kabul edilen EMT'nin yanı sıra tam tersi bir geçiş süreci olan mezenkimal-epitelyal geçiş (MET)

sürecinin de önemi vardır. Primer tümör hücrelerinden EMT ile dolaşıma katılan tümör hücreleri daha sonra MET özellikleri göstererek sekonder tümör oluşumuna neden olur. Mezenkimal hücrelerin dolaşıma katılıp birkaç hücre bölünmesi yaşadıktan sonra epitelyal özellikleri benimsediği görülmüştür (Beerling vd. 2016). Epitelyal özelliklerin kazanılması metastatik kolonizasyon için önemlidir. MET sürecinin ayırt edici özellikleri arasında EMT'nin tersine E-Kaderin ifadesinin yukarı regülasyonu vardır (Wells, Yates, ve Shepard 2008). miR-200 tarafından MET'in indüklenmesi ile mesane kanseri metastazının kolaylaştırıldığını gösteren bulgular mevcuttur (Chaffer vd. 2006). Ek olarak mezenkimal yapıda bulunan metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının akciğer mikro metastazlarında E-Kaderin ifadesi gözlemlenerek MET benzeri bir durumu desteklediği gösterilmiştir (Chao, Shepard, ve Wells 2010). EMT özelliği gösteren tümör hücrelerinin dolaşıma katıldıktan sonra tersine MET özellikleri göstermesiyle sekonder tümör oluşumu göstermesinin yanı sıra bir başka hipotez de primer tümörlerden ayrılan mezenkimal hücrelerle iş birliği içerisinde bulunan epitelyal özellikli hücrelerin toplu göçüyle oluşabilecek metastazdır. Böylelikle primer tümörlere histopatolojik olarak benzer metastazlar oluşmaktadır (Tsuji, Ibaragi, ve Hu 2009).

EMT ve MET geçişleri geri döndürülemez geçişler değildir. Hücrelerin epitelyal ve mezenkimal özellikleri aynı anda paylaştığı hibrit durumlarda vardır. Böyle durumlarda tümör hücrelerinin hücre bağlantıları korunurken koordineli bir şekilde hareket etmeleri sağlanır (Nieto 2013). Tümör hücreleri bulundukları durum ve şartlara göre epitelyal ve mezenkimal özellikler arasında dinamik bir geçiş sağlayarak, tümörün hareketsiz veya aktif durumlarını belirlemesiyle invazyon ve metastaz oluşumu döngüsüne izin verebilir (Gunasinghe vd. 2012). Bu geçiş süreçlerinin değişimini inceleyerek mekanizmalarını anlamak kanser ilerlemesini ve metastaz sürecinin yapısını anlamamıza yardımcı olacaktır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan cihazlar, kimyasallar ve sarflar

DMEM-HG (Capricorn Scientific, Cat No: DMEM-HA), FBS (Serox, Cat No: SF101-100), Penisilin-Streptomisin (Capricorn Scientific, Cat No: PS-B), HCl (Isolab Chemicals, Cat No: 932.106.2501), PBS (Bioshop, Cat No: PBS415), %0.25 tripsin & %0,03 EDTA çözeltisi (Capricorn Scientific, Cat No: TRY-3B), Agarose (Prona Biomax, Cat No: 000133PR), Borik asit (EMSURE, Cat No: M100165.0500), Tris (hidroksimetil) aminometan (Millipore, Cat No: 1083821000), Tampon çözeltisi pH 7.0 (Tekkim, Cat No: TK.400.356), Tampon çözeltisi pH 4.0 (Tekkim, Cat No: TK.400.352), Tampon çözeltisi pH 10.0 (Tekkim, Cat No: 400.359). Tripan mavisi (Sigma, Cat No: T8154-20ML), Hücre Kültürü T25 Flask (Serox, Cat No: L211025), pH-indikatör kâğıdı (Sigma Aldrich, Cat No: 1.09557.003).

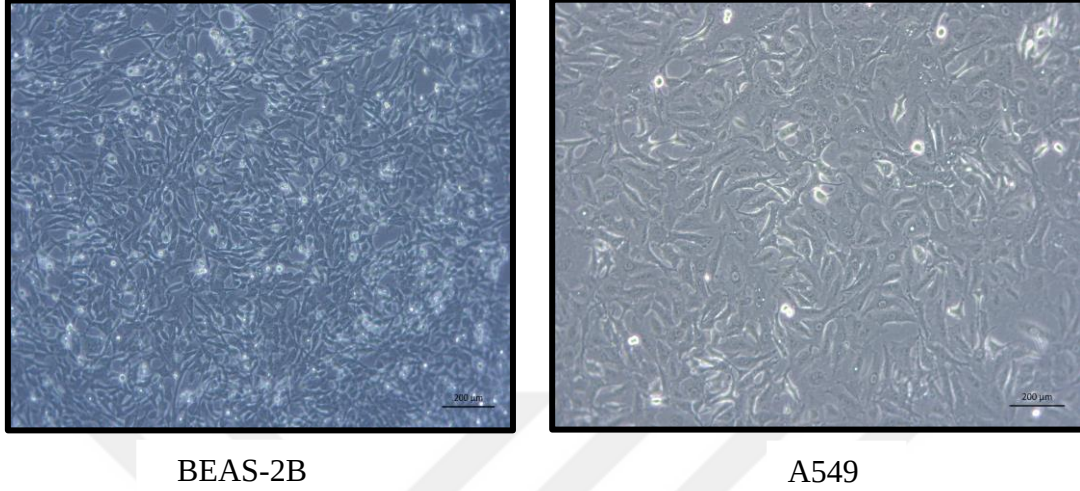
Hücre canlılığı testi için CCK-8 (MedChemExpress, Cat No: HY-K0301) kullanılmıştır. cDNA sentezi için cDNA Synthesis Kit (A.B.T. Cat No: C03-01-05) kullanılmıştır. Konvansiyonel PZR reaksiyonları için Taq DNA Polymerase w.o/dNTPs kit (A.B.T., Cat No: E01-02-50) kullanılmıştır. cDNA örneklerinin jelle yüklenmesi için 6X DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific, Cat No: R0611) ve marker için 100 bp DNA Ladder Plus (Hibrogen, Cat No: MG-LDR-100P) kullanılmıştır. Eş Zamanlı PZR için 2X qPZR SYBR-Green MasterMix w.o/ROX (A.B.T., Cat No: Q03.01.01) kullanılmıştır.

Çalışma sırasında kullanılan laboratuvar cihazlarının listesi çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma sırasında kullanılan laboratuvar cihazları.

Kullanılan Cihazlar	Marka-Model
CO2 İnkübatör	Panasonic MCO-18AC
Otoklav	ALP-CL-40M
Biyogüvenlik Kabini	ESCO Airstream AC2-4E8
Mikroskop	Zeiss Primovert
Mikroskop Kamerası	Zeiss AxioCam 105 Color
Santrifüj	Hermle Z326K
Su Banyosu	N-Biotek NB-301
PZR	Biorad T100 Thermal Cycler
Elektroforez Güç Kaynağı	Biorad Power Basic
Jel Görüntüleme Sistemi	Syngene GBox
Real Time PZR	StepOne Plus
Hassas Terazî	Ohaus AX224
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Standard
Saf Su Cihazı	Elga FLEX4
pH Ölçer	Ohaus Startus3100
NanoDrop UV Spektrofotometre	Thermo Scientific

3.1.2. Hücre Kültürü



Şekil 3.1 BEAS-2B ve A549 hücre hatları mikroskop görüntüsü

pH adaptif hücre hattı oluşturulması, proliferasyon deneyi, Konvansiyonel (Klasik) Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu için ana materyal olarak kullanılacak cDNA, hücre kültüründen elde edilmiştir.

İnsan Akciğer Epitelyal Hücre Hattı (BEAS-2B) ve Akciğer Kanseri Hücre Hattı (A549) hücre kültürü kabına tutunmuş olarak Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Dr. Süloğlu Laboratuvarı'ndan alınmıştır. Hücrelerin sağlıklı olduğu mikroskop altında (Zeis, Primovert) ve DAPI boyası ile doğrulanmıştır (Şekil 3.1).

3.2.Yöntem

3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler, 25T hücre kültürü flasklarına temel besiyeri ortamı olan DMEM'e %10 fetal sığır serumu (FBS) eklenerek tam (complete) besiyerinde idame ettirilmiştir. Antibiyotik olarak %1 oranında penisilin-streptomisin uygulanmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlama için mevcut besiyeri uzaklaştırılıp yaklaşık 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkama yapılmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 200 µl % 0,25 tripsin & % 0,03 EDTA çözeltisi eklenerek inkübatörde (37°C'de) 2-3 dakika hücrelerin tutundukları yüzeyden kalkmaları beklenmiştir. Hücrelerin yüzeyden kalkmalarının gözlemlenmesinden sonra 8 mL tam besiyeri eklenerek her bir kültür kabında 4 ml olacak şekilde ikinci kültür kabına bölünmüştür.

3.2.3 Hücre Dondurulması

7.5 ml DMEM'e 2 ml FBS ve 0.5 ml DMSO eklenerek dondurma çözeltisi hazırlanmıştır. Tripsinizasyon ile kaldırılan hücreler 2 ml besiyerine eklenerek falcon tüp içerisinde 300g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası falcon tüp içerisinde çöken hücrelere dokunmadan 1.9 ml besiyeri uzaklaştırılarak kalan 100 µl besiyeri içerisinde hücreler homojen hale getirilmiştir. Hücre sayımı yapıldıktan sonra her cyrovial tüpte 10^6 hücre/1.5 ml olacak şekilde hazırlanan dondurma çözeltisinden alınarak paylaştırılmıştır. Tüpler -20°C'de 1 saat dondurulmaya bırakıldıktan sonra -80°C'ye kaldırılmıştır. Bir gün -80°C'de bekletilen hücreler daha sonra sıvı azot içerisine alınarak muhafaza edilmiştir.

3.2.4 Hücre Sayımı

Yapılan her bir deneye belirli sayıda hücreler ile başlamak için Thoma lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. T25'lik flasklarda bulunan hücrelerin besiyerleri çekildikten sonra PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. 200 µl % 0,25 tripsin & % 0,03 EDTA çözeltisi eklenerek hücreler kaldırılmıştır. Falcon tüpe aktarılan hücreler 300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kaldırıldıktan sonra hücre peleti üzerine 2 ml besiyeri eklenmiştir. Homojen hale getirilen hücreleri içeren besiyerinden 100-150 µl alınarak buradan örneklem alımı yapılmıştır; 10 µl örnek alınarak üzerine 10 µl tripan mavisi eklenmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra hücre sayımı için thoma lamı üzerine koyulmuştur. Mikroskop altında sayım gerçekleştirilmiştir. Hücre membran bütünlüğü bozulduğu için mavi renkte görülen hücreler ölü, boyanmayan ve beyaz bir şekilde görülen hücreler canlı kabul edilmiştir.

Thoma lamının üzerindeki beş kare bölgeden hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiş ve ortalamaları alınarak aşağıdaki formüle göre hücre sayısı hesaplanmıştır;

1. Adım- Hücre Canlılığı; (Canlı hücre sayısı) / (Toplam hücre sayısı)
2. Adım- Ortalama; (Hücre Canlılığı) / (Sayım yapılan kare sayısı)
3. Adım- Dilüsyon faktörü; (Toplam hacim) / (Hücre Hacmi)
4. Adım- Konsantrasyon hesaplaması; (Ortalama) / (Dilüsyon faktörü) X 10^4

Falcon tüp içerisinde süspanse halde bulunan hücreler, sayım sonucunda çıkan hesaplamalara göre kurulacak deney planı için dilue edilerek kullanılmıştır.

3.2.5. A549 hücre hattının pH adaptif hale getirilmesi

pH değeri 7.4 olarak ölçülen tam kültür ortamına 1 N HCl ilave edilerek kimyasal olarak farklı pH değerine sahip dört ortam (pH: 7.2, pH: 7.0, pH: 6.7, pH: 6.4) oluşturulmuştur. Adaptif pH bir hücre hattında sürekli pH değişimi yapılarak oluşturulmuştur. Bu amaçla normal pH değeri 7.4 olan hücre hattı 1 hafta boyunca pasajlanmıştır. 3 hafta sonunda pH değeri 7.2'ye ayarlanarak 3 hafta boyunca her gün pH 7.2 besiyeri ile idame ettirilmiştir. Hücreler %85-90 doluluk oranına ulaşınca haftada yaklaşık 2-3 kez pasajlama yapılmıştır. Yine 3 hafta sonunda pH değeri 7.0'ye ayarlanarak 3 hafta boyunca her gün pH 7.0 besiyeri ile idame ettirilmiştir. Bir 3 hafta sonra pH değeri 6.7'ye ayarlanarak 3 hafta boyunca her gün pH 6.7 besiyeri ile idame ettirilmiştir. Son olarak, 3 hafta sonra pH değeri 6.4'ye ayarlanarak 3 hafta boyunca her gün pH 6.4 besiyeri ile idame ettirilmiştir. Sonuçta her 3 haftada bir pH değeri azaltılarak pH 6.4 seviyesine inilmiştir. Tüm işlemler 25T hücre kültürü flasklarında gerçekleştirilmiştir.

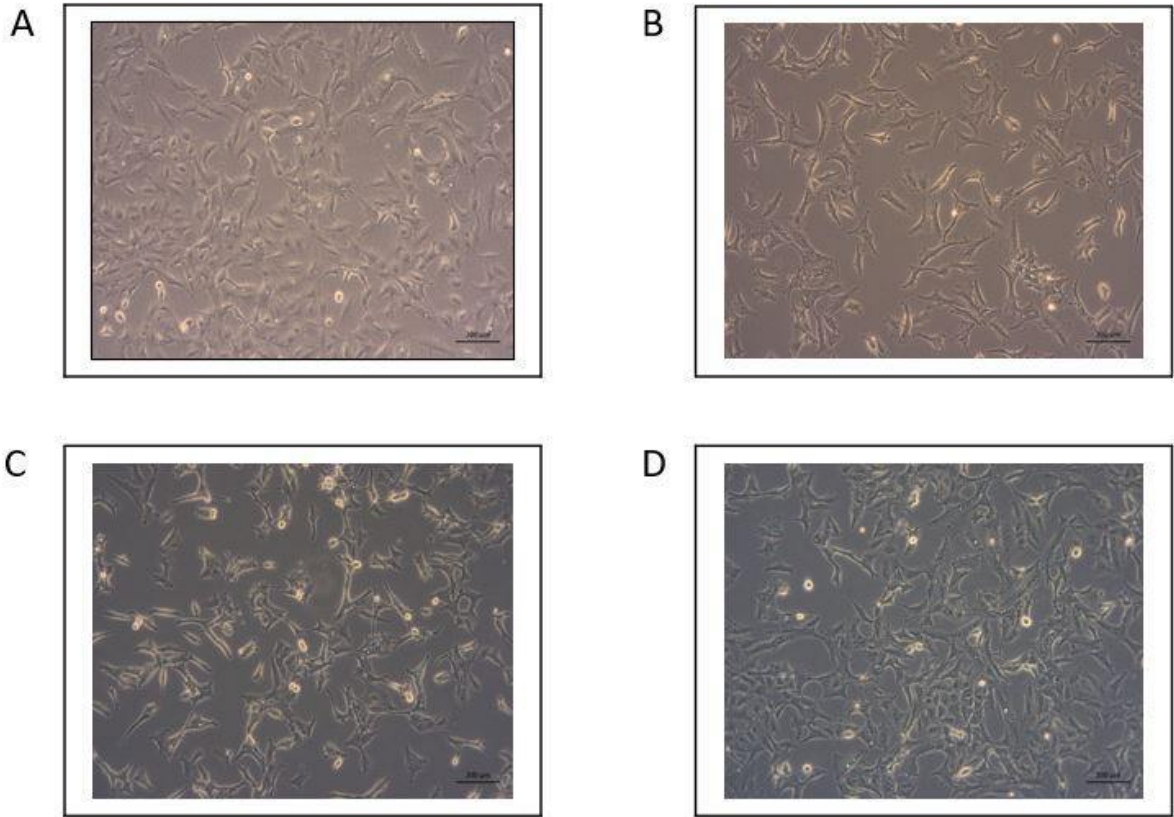
pH değerlerini oluşturmak için kullanılacak HCl miktarı pH 6.4-8.0 aralığına sahip pH indikatör kağıtları kullanılarak ayarlanmıştır. Ayarlanan pH ayrıca pH metre cihazı ile doğrulanmıştır. %10 FBS, %1 Penisilin-streptomisin içeren DMEM'e 15 µl 1 N HCl ilave edilerek pH: 7.2 ortamı, %10 FBS, %1 Penisilin-streptomisin içeren DMEM'e 20 µl 1 N

HCl ilave edilerek pH: 7.0 ortamı, %10 FBS, %1 Penisilin-streptomisin içeren DMEM'e 30 μ l 1 N HCl ilave edilerek pH: 6.7 ortamı, %10 FBS, %1 Penisilin-streptomisin içeren DMEM'e 40 μ l 1 N HCl ilave edilerek pH: 6.4 ortamı oluşturulmuştur (çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Adaptif pH değişikliği için kullanılan HCl miktarları

pH	HCl	Toplam Besiyeri Hacmi
pH: 7.2	15 μ l	7 mL
pH: 7.0	20 μ l	7 mL
pH: 6.7	30 μ l	7 mL
pH: 6.4	40 μ l	7 mL

Her hafta pH değişikliği yapılan hücre hattının mikroskopik görüntüleri kaydedilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. pH değişiklikleri yapılan A549 hücre hatlarının mikroskop görüntüleri.

(A- A549-pH 7.2, B- A549-pH 7.0, C- A549-pH 6.7, D- A549-pH 6.4).

3.3. Hücre Canlılık Analizi Deneyi

Bir hücre kültürünün önemli özelliklerinden biri popülasyon büyüme hızıdır. Gerçekleştirilen deneyler sırasında, hücre adaptasyonu ve rekabeti sebebiyle büyüme hızında değişiklikler gözlemlenebilir. Hücre kültürü ortamı içerisinde hücreler için toksik maddelerin bulunması ya da ilaç varlığı gibi etmenler arasında gözlemlenen artan büyüme hızı, hücrelerin bulundukları ortama uyum sağladığını ve dirençli bir hale geldiklerini gösterir. Belirli zamanlar içerisinde ölçülen büyüme oranları, hücrelerin evrimsel bir ortama adaptasyonunu belirlemek için önemlidir. Doğrudan hücre sayımı gerçekleştirilerek zamana bağlı büyüme hesaplanamadığı için büyümenin üç nokta ölçümleri kullanılarak belirlenmesi sık görülen bir durumdur (Lindström ve Friedman 2020).

Hücre canlılığı, 2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfopenil)-2H-tetrazolyum (CCK-8) ile kontrol edilmiştir. Adaptif pH'ı sağlanmış kanser hücreleri, tam büyüme ortamında 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Adaptif pH seviyelerine adapte edilmiş her A549 hücre hattı için kuyucuklara sırasıyla 10^4 , 5×10^3 , $2,5 \times 10^3$, 10^3 hücre ekimi yapılmıştır. 1. ve 6. günler arası ölçüm gerçekleştirilmiştir. 37°C 'de %5 CO_2 ortamda inkübasyon ile 1. ve 6. günler arasında tamamlanan her gün için ortama 10 μl CCK-8 reaktifi ilave edilmiştir. CCK-8 eklenmesiyle birlikte başlayan 1,5 saatlik inkübasyon sonrası mikropilaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de absorban ölçülmüştür.

İkiye Katlanma Süresi

BEAS ve A549 tüm pH seviyeleri hücre hatları (5×10^5), %10 FBS içeren tam kültür ortamında süspanse edilmiş ve 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. 3 saat sonra 10% FBSli tam kültür ortamı adaptif kültür ortamı pH'larına (pH:7.2, pH:7.0, pH:6.7, pH:6.4) değiştirilmiştir. Bu sırada, 0. gün ölçümü için belirlenmiş kuyucuklardaki hücreler sayılıp 0. gündeki hücre sayısı belirlenmiştir. Hücreler, tripsin / EDTA kullanılarak toplanmış ve her kuyucuktaki hücre sayısı, tripan mavisi boyası yöntemi kullanılarak sayılmıştır. İkiye katlanma süresi $(T1 - T0) / \log_2(N1 / N0)$ olarak hesaplanmıştır. $N0$ ve $N1$ sırasıyla ilk andaki ($T0$) hücre sayısı ve kültürasyon sonrası T ($T1$) zamanı olarak tanımlanmıştır.

3.4. Yara İyileşme (Scratch / Wound Healing) Deneyi

2B yöntemlerden biri olan yara iyileştirme deneyi ilaç testi, kanser hücresi analizi ve benzer yaklaşımlarda kullanılmaktadır. Hücresel göçün ve çoğalmanın yanı sıra hücre-hücre etkileşimlerinin de analiz edilmesine yardımcı olmaktadır. Uygulaması kolay ve kısmen maliyeti düşük yara kantitatif yara iyileştirme deneyi, istatistiksel olarak hücre göçünün ve çoğalmasının yorumlanmasına olanak sağlamaktadır.

Yara iyileşme deneyi için; 6 kuyucuklu kültür kaplarına 2 ml tam besiyeri hazırlanarak 5×10^5 hücre ekimi yapılmıştır. pH adaptasyonu sağlanmış A549 hücrelerinde %80-90 oranında yayılma gözlemlendiğinde 200 μ l'lik pipet ucuyla kültür kaplarında baştan sona lineer şekilde bir çizik oluşturulmuştur. Çizilen hattın doldurulma süresinin net bir şekilde hesaplanabilmesi için hücre büyümesini yavaşlatmak adına %2 FBS'li besiyerinde gelişme gözlemlenmiştir. pH adaptasyonu sağlanmış hücrelerin besiyerlerinin aynı pH seviyesinde kalmalarını sağlamak için günlük olarak tazelenmiştir. Her 24 saatte bir görüntüler alınarak çizilen hattın doldurulma süresi takip edilmiştir. Yara iyileştirme deneyi sonuçlarının analizi için image J programı kullanılmıştır.

3.5. PZR Optimizasyonu ve Eş Zamanlı PZR İçin Total RNA İzolasyonu

Gen ifade analizleri için BEAS-2B ve A549 hücre hattından TRIzol kimyasalı kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

TRIzol hem biyolojik materyali çözen hem de proteinleri denatüre eden fenol ve guanidinyum izotiyosiyanatın monofazik bir çözeltisidir (Rio vd. 2010).

İzolasyon için Macedo, N.J. and Ferreira, T.L. tarafından oluşturulup sunulan “Maximizing total RNA yield from TRIzol reagent protocol: a feasibility study” protokol üç farklı şekilde denenerek araştırma için modifiye edilmiştir. Nanodrop ölçüm analizlerine göre en yüksek verimde çalışan protokol izolasyon protokolü olarak seçilmiştir (Macedo ve Ferreira, 2014).

Protokol:

1. İnkübatörden alınan 25T hücre kültüründe gelişen hücrelerin mevcut tam besiyeri uzaklaştırılıp fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkama yapıldı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra taze %0,25 tripsin, %0,03 EDTA çözeltisi eklenerek inkübatörde (37°C'de) 2-3 dakika hücrelerin tutundukları yüzeyden kalkmaları beklendi. Yüzeyden kalkan hücrelerin üzerine 3-4 ml serumsuz DMEM koyuldu.
2. Hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra her bir ependorf tüpte 10^6 hücre olacak şekilde 2 adet 2 ml'lik ependorf tüpe alınmıştır. 300xg, 5 dakika santrifüj yapıldı,
3. Santrifüj sonrası pellet haline getirilen 10^6 hücreye 200 µl Trizol koyuldu. Pellete pipetaj yapıldı, vortekslendi, tekrar pipetaj yapılarak pelletin tamamen parçalanması sağlandı. Daha sonra 1-2 dakika oda ısısında bekletildi,
4. Üzerine 75 µl 24:1 kloroform/izoamil alkol karışımı eklendi, 15 sn boyunca yüksek devirde vortekslendi.
5. 4 °C'de, 12000xg , 15 dakika santrifüj yapıldı,
6. Santrifüj sonrası en üstteki RNA içeren şeffaf renkli sıvı kısım dikkatli bir şekilde ayrı bir ependorfa aktarıldı,
7. Üzerine 25 µl isopropanol eklendi, 2-3 kere el ile tüpe vurma yöntemiyle karıştırıldı.
8. 4 °C'de, 12000xg ,10 dakika santrifüj yapıldı,
9. Süpernatant atıldı,
10. 50 µl %75 soğuk etanol pelletin üzerine aktararak 2-3 kere karıştırıldı,
11. 4 °C'de, 7500xg, 5 dakika santrifüj yapıldı,
12. Süpernatant atıldı,
13. Ependorfun ağzı açılıp havada kurutma yapıldı (7 dk)
14. Ependorfa 25 µl distile su koyuldu ve 5 dk buz kabında bekletilerek RNA'nın tamamen çözünmesi sağlandı. 5 dk sonunda ependorfa santrifüjde spin atırıldı. Ölçüm amaçlı 2-3 µl kadar örnek ayrılarak kalan miktara aliquotlama (tüplere bölme) yapıldı.
15. Tüpler üzerine tarih, protokol adı yazıldı, ependorflar kullanılıncaya kadar -80'e kaldırıldı.

3.5.1. RNA'nın spektrofotometrik analizi

RNA izolasyonu yapılarak ölçüm için ayrılmış olan örnekler seçilerek NanoDrop UV spektrofotometre cihazında ölçüm yapılmıştır. Bu amaçla;

1. Örnekleme kolu açılarak ölçüm öncesi distile su ile yıkama yapıldı. Ardından RNA'nın çözücü olarak kullanıldığı distile su ile kör (blank) okuma yapıldı. İşlem sonrası örnekleme kolu açılarak alt ve üst ölçüm tabanı yumuşak gazlı bez ile temizlendi.
2. 1 µl RNA örneği alt ölçüm tabanına pipetle aktarıldı.
3. Örnekleme kolu kapatılarak bilgisayardaki yazılımdan spektral ölçüm başlatıldı. Bunun için ana menü ekranından "Nükleik Asit" butonu seçildi. Gelen ekrandan "RNA-40" seçilerek örnekleme kolunun örneği otomatik olarak alt ve üst ölçüm tabanından çekerek verdiği spektral ölçüm ekrandan kaydedildi.
4. İşlem sonrası örnekleme kolu açılarak alt ve üst ölçüm tabanı yumuşak gazlı bez ile temizlendi.

NanoDrop UV spektrofotometre diğer spektrofotometrelerden farklı olarak küvet veya kapiller kullanma ihtiyacını ortadan kaldırmakta, mikro hacimli numunelerle çalışma imkânı tanımaktadır. Cihaz çok küçük miktarlarda numuneyi yakalamak ve tutmak için fiber optik teknolojisi ile doğal yüzey gerilimi özelliklerini birleştirerek çalışmaktadır. Bir diğer kullanım avantajı kısa yol (path) uzunlukları ile çalıştığı için geniş bir nükleik asit konsantrasyon ölçümü aralığına imkan tanımakta ve seyreltme ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır (Desjardins ve Conklin 2010). Böylece, homojen hale getirilmiş örnekten 1-2 µl okuma için yeterli olmaktadır.

Nükleik asitlerin ve proteinlerin maksimum absorbands verdiği dalga boyları farklı olup bu değer nükleik asitler için 260 nm, proteinler için 280 nm'dir. Bu absorbandsların oranı (A_{260}/A_{280}) bir saflık ölçüsü olarak kullanılmaktadır. A_{260}/A_{280} oranının 1,8-2,2 aralığında olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir. Bir diğer analiz edilen absorbands değeri diğer kirlilikleri ifade ettiğinden 230 nm'deki absorbandır. A_{260}/A_{230} oranının 2,0-2,2 aralığında olması kirliliğin olmadığını göstermektedir (Desjardins ve Conklin 2010). Adaptasyon sağlanmış pH seviyelerinin 3. haftalarında elde edilen RNA'ların $A_{260}/280$, $A_{260}/230$ ve ng/µl oranları çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. BEAS ve pH adaptif A549 hücre hatları total RNA izolasyon sonuçları.

pH	A260/280	A260/230	ng/μl
BEAS	1.87	1.75	424.01
pH 7.4	1,91	1,45	763,73
pH 7.2	2.02	1.01	589.25
pH 7.0	1.94	1.50	189.18
pH 6.7	1.89	0.62	1330.89
pH 6.4	1.89	0.91	982.47

3.6. Revers Transkriptaz PZR ile cDNA sentezi

RNA ekstraksiyonundan ve kalite kontrollerinden sonraki basamak izole edilen RNA havuzundan ters transkripsiyon ile cDNA'nın sentezlenmesi sürecini kapsamaktadır. Ters transkripsiyon, ters transkriptaz enzimi ile Revers Transkriptaz PZR reaksiyonu için RNA kalıbını ve kısa dizi primerlerini kullanarak ilk sarmal cDNA'nın sentezini gerçekleştirmektedir. Her birinin avantaj ve dezavantajları olan farklı ters transkripsiyon enzimleri mevcuttur. Ayrıca farklı cDNA hazırlama teknikleri olup tüm deneyler için önerilen tek bir strateji bulunmamaktadır.

İlkin çalışma (priming), oligo-dT primerleri veya rastgele (random) primerler veya her ikisinin karışımı kullanılarak gerçekleştirilebilir. Mevcut araştırma projesinde rastgele hexamerler kullanılmıştır. Rastgele primerler, tüm RNA dizilerinin ters transkripsiyonunu sağlayarak, RNA'nın tüm uzunluğu boyunca bağlanabilen primerlerdir. RT kontrol cDNA içermez, ancak cDNA numunesi ile aynı miktarda genomik DNA kontaminasyonu içerir; bu nedenle, qPZR primerlerinin reaksiyonda genomik DNA'yı çoğaltıp çoğaltmadığını test etmek için yararlı bir kontroldür. cDNA sentezi için bileşenler ve miktarları çizelge 3.4'te verilmiş olan kit protokolü doğrultusunda yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Adaptif pH seviyelerine göre cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları.

Revers Transkriptaz Reaksiyonu (cDNA)	pH 7.4	pH 7.2	pH 7.0	pH 6.7	pH 6.4
10X Reaksiyon Tamponu (µl)	2	2	2	2	2
dNTP karışımı (2.5 Mm/dNTP) (µl)	1	1	1	1	1
Rasgele hexamer (50 µM) (µl)	2	2	2	2	2
Ters Transkriptaz (200 U/µl)	1	1	1	1	1
Rnaz inhibitörü (µl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Distile su (µl)	12,18	11,98	7,62	12,7	12,5
Kalıp RNA* (µl)	1,31	1,52	5,88	0,8	1
Toplam Reaksiyon Hacmi (µl)	20	20	20	20	20

*Kalıp RNA reaksiyonda 1000 ng olacak şekilde hesap yapılmıştır.

Protokol:

1. Su ve RNA haricindeki tüm bileşenler dört farklı pH için çalışma gerçekleştirileceğinden yukarıda miktarları bir tüp için verilmiş olan miktarların 4,5 katı ile çarpılarak bir tüpte karışım hazırlanır (Dört kat yerine 4,5 kat hazırlama sebebi pipetaj nedeni ile hacim kaybı olması durumudur).
2. Karışım dört tüpe her tüpte 19,5 µl olacak şekilde dağıtılır.
3. 1000 ng'a denk gelen RNA örnekleri karışıma eklenir, pipetaj yapılarak sonrasında spin yapılır.
4. Son olarak hacim RNaz içermeyen su ile tamamlanır.
5. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirilir. Kit protokolünde belirtilen sıcaklık ve süreler uygulanır.
6. Reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edilen c-DNA, -20 °C'de saklanır.

Çizelge 3.5. cDNA sentezi için Revers Transkriptaz basamakları

Revers Transkripsiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Basamak 1	25	10 dakika	1
Basamak 2	37	120 dakika	1
Basamak 3	85	5 dakika	1
Basamak 4	4	∞	1

3.7. Primer tasarımı

Mevcut proje kapsamında SOX9 ve COL10A1 genlerinin değişen adaptif pH koşullarındaki ifadesi inceleneceğinden bu iki gen için primer tasarımı yapılmıştır. Ek olarak, bu iki genin epitelyal mezenkimal geçişteki etkisi de incelenmek istendiğinden epitelyal belirteçlerden E-Kaderin (CDH1) ve mezenkimal belirteçlerden Vimentin (VIM) için de primer tasarımı yapılmıştır.

Çizelge 3.6. Konvansiyonel ve Eş Zamanlı PZR reaksiyonları için kullanılacak primerler

Gen Adı	İleri (forward) primer (5'—3')	Geri (reverse) primer (5'—3')	Amplikon boyutu
SOX9	AGCGAACGCACATCAAGAC	CTGTAGGCGATCTGTTGGGG	85
COL10A1	ATGCTGCCACAAATACCCTTT	GGTAGTGGGCCTTTTATGCCT	107
CDH1	CGAGAGCTACACGTTTACGG	GGGTGTCGAGGGAATAAGG	119
VIM	AGTCCACTGAGTACCGGAGAC	CATTTACGCATCTGGCGTTC	98

3.7.1. Primer Çiftlerinin Optimizasyonu

Primer çiftleri en etkin çalıştıkları bağlanma sıcaklıklarını bulmak için her adaptif pH koşulundan izole edilen cDNA örnekleri kullanılarak 60°C-63°C sıcaklık aralığında denenmiştir.

Çizelge 3.7 Primer çiftlerinin bağlanma sıcaklıkları.

Genler	Forward primer bağlanma sıcaklığı (°C)	Reverse primer bağlanma sıcaklığı (°C)
SOX9	61,5	62,81
COL10A1	61,06	62,67
CDH1	63,32	60,9
VIM	63,19	63,25
RPLP	62,57	60,3

3.7.2. Referans genin belirlenmesi

Referans gen her dokuda ifadesinin değişmediği hücresel yaşam fonksiyonlarından sorumlu genler arasından seçilmektedir. Referans gen olarak dokularda stabil ifade gösterdiği bildirilmiş olan RPLP0 geni kullanılmıştır.

3.8. Konvansiyonel (Klasik) PZR

Konvansiyonel PZR ile elde edilen cDNA üzerinde istenilen DNA bölgesinin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. Çalışılacak gen bölgeleri için spesifik primerler tasarlanması, sadece istenilen gen bölgelerinin çoğaltılmasını sağlamak için önem teşkil etmektedir. Klasik PZR temel olarak üç basamakta ilerlemektedir. DNA zincirlerinin ayrılmasını sağlamak için sıcaklığın 94 °C'ye çıkarıldığı denatürasyon basamağı ilk basamağı oluşturmaktadır. Daha sonra ikinci basamak olarak primerlerin DNA iplikçikleri üzerine bağlanabilmeleri için her primere özgül olan sıcaklık seviyesine düşülmesi gerekmektedir. Primer bağlanmaları gerçekleştikten sonra son basamak olarak DNA iplikçikleri boyunca uzama sağlanması için taq polimerazın aktivitesi gerekmektedir. Bu sebeple sıcaklık, taq polimerazın optimal bir şekilde çalışabilmesi için belirli seviyelere getirilir. Taq polimeraz serbest dolaşan dNTP'leri DNA iplikçiklerinin karşısına dizerek uzama sağlamaktadır. Uzama sağlandıktan sonra ilk basamağa dönülerek tekrar sıcaklık 94 °C'ye getirilir ve DNA zincirlerinde ayrılma gerçekleştirilir. Bu süreç sürekli tekrar edilerek üstel olarak artan cDNA sentezi gerçekleştirilir. Bu çalışmada, kullanılan kit protokolüne göre optimizasyon sağlanarak PZR basamakları çizelge 3.7'te gösterilmiştir.

Konvansiyonel PZR için kullanılan bileşenler ve miktarları çizelge 3.5'te gösterilmiştir. Reaksiyon ortalama 500 ng cDNA ile gerçekleştirilmiştir. BEAS-2B ve pH adaptif A549 hücrelerinden elde edilen cDNA'larda SOX9, COL10A1, CDH1, VIM ve RPLP0 genlerinin ifadeleri optimizasyon sağlanarak incelenmiştir. Agaroz jel elektroforezi tekniği kullanılarak sonuçlar görüntülenmiş ve değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 3.8 Konvansiyonel PZR basamakları.

PZR Basamakları	Sıcaklık °C	Zaman	Döngü
İlk Denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	25-40
Primer Bağlanması	50-65	30 sn	
Uzama	72	60 sn	
Final Uzaması	72	5 dk	1

Revers Transkriptaz PZR ile cDNA sentezi sonrası, elde edilen gen bölgelerinin kontrolü ve optimizasyonu için konvansiyonel (klasik) PZR gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kitin içeriğine göre optimizasyon sağlanarak eş zamanlı PZR için kullanılacak genlerin ifadeleri kontrol edilmiştir. Optimizasyon ile kullanılacak bileşenlerin ve her pH seviyesi için cDNA miktarları belirlenmiştir (çizelge 3.5).

Çizelge 3.9. PZR reaksiyonu için gerekli bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	Miktar
Distile Su	15,72 µl
10X Buffer w/MgCl ₂	2 µl
dNTP Karışımı	0,8 µl
Taq polimeraz	0,08 µl
Forward Primer	0,2 µl
Reverse Primer	0,2 µl
Kalıp RNA	0,5 µl (ort. 500 ng)
TOPLAM HACİM	20 µl

3.9. Agaroz Jel Elektroforezi

Klasik PZR ile çoğaltılan gen bölgelerinin görüntülenmesi için agaroz jel elektroforez tekniği ile yürütme gerçekleştirilmiştir. 100 ml 0,5 M TBE tamponu içerisine 1,4 gr agaroz koyularak mikrodalga fırında berrak hale gelene kadar kaynatılmıştır. Daha sonra çözelti içerisine, DNA çiftleri arasına giren ve UV ışık altında ışıma sağlayarak görüntülemeyi sağlayan Etidyum Bromür (5 µl) eklenerek karıştırılmıştır. Jel tepsisi üzerine tarak yerleştirildikten sonra jel dökülmüştür ve 20-25 dk katılaşması için bekletilmiştir. Soğuyan jel, içerisinde 0,5 M TBE tamponu bulunan yürütme tankına yerleştirilmiştir. Tarak çıkarıldıktan sonra jel içerisindeki kuyucuklara PZR ürünlerinin yüklenmesi için 6X loading buffer kullanılmıştır. 2 µl buffer ve 10 µl cDNA örneği pipetaj yöntemi ile homojen hale getirilip karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Yürütülen gen bölgelerinin baz uzunluklarının belirlenmesi için 100 bp'lik marker kullanılmıştır. Yükleme işleminin tamamlanmasının ardından elektroforez işlemi 100 V'da 1 saat süre ile uygulanmıştır.

1x TBE Tamponu

10.8 gr Tris ve 5.5 gr borik asit 900 ml distile su içerisine eklenmiştir ve ısıtmalı manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanmıştır. Çözeltiye 2 ml 1 M Na₂ EDTA (pH 8.0) eklenerek toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.10. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Eş zamanlı PZR ile BEAS-2B ve 3. haftalarındaki pH adaptasyonu sağlanmış A549 hücre hatlarının üzerinde SOX9, COL10A1, CDH1, VIM ve RPLP0 genlerinin ifadeleri incelenmiştir. PZR termal döngü koşulları kullanılan kit için önerilen şartlarda gerçekleştirilmiştir (çizelge 3.10).

Çizelge 3.10 Eş zamanlı PZR termal döngü koşulları.

	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95	10 dk	1
	95	15 sn	
Amplifikasyon	Değişken (T _m)	30 sn	45
		30 sn	
Erime eğrisi	95	10 sn	1
	65	1 dk	
	95	Sonsuz	
Soğuma	40	1 dk	1

3.10.1. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kurulması

Eş zamanlı PZR için kullanılan bileşenler ve miktarları çizelge 3.11’de gösterilmiştir. Reaksiyon ortalama 500 ng cDNA ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları Eş Zamanlı PZR için 2X qPCR SYBR-Green MasterMix w.o/ROX (A.B.T., Cat No: Q03.01.01) protokolüne göre oluşturulmuştur. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları dikkate alınarak qPCR reaksiyonu 63-60°C arasında gerçekleştirilmiştir (çizelge 3.7).

Çizelge 3.11 Eş zamanlı PZR reaksiyon bileşen ve miktarları.

Bileşenler	Miktar	Konsantrasyon
A.B.T.™ 2X qPCR SYBR- Green MasterMix (without ROX)	10 µl	1X
Forward Primer (10 µM)	0.2 µl	0.1 µM
Revers Primer (10 µM)	0.2 µl	0.1 µM
Distile Su	9.1 µl	-

Protokol:

- 1- Kit içeriği bileşenlerinin buz üzerinde erimesi sağlanır.
- 2- cDNA haricindeki tüm bileşenler, dört farklı pH seviyesi ve BEAS-2B için çalışma gerçekleştirileceğinden, yukarıda bir reaksiyon için verilmiş olan bileşen miktarlarının 5,5 katı ile çarpılarak bir tüpte karışım hazırlanır (Beş kat yerine 5,5 kat hazırlama sebebi pipetaj nedeni ile hacim kaybı olması durumudur).
- 3- Hazırlanan reaksiyon karışımına pipetaj yapıp spin atıldıktan sonra her bir kuyucukta 19.5 µl olacak şekilde qPZR plate içerisine aktarılır.
- 4- Revers Transkriptaz PCR aşamasında 1µl'sinde 1000 ng olacak şekilde elde edilmiş cDNA örneklerinden 0,5 µl (500 ng) cDNA örnekleri karışıma eklenir, reaksiyon kurulumunun ardından plate üzeri şeffaf sealing yardımıyla kaplanır.
- 5- Pipetaj yapıldıktan sonra masa üzeri plate santrifüjde 900g'de 30 sn. santrifüj edilir.
- 6- Plate cihaza yerleştirilerek çizelge 3.10'da belirtilen termal döngü koşullarına uygun biçimde reaksiyon gerçekleştirilir.

Deney protokolünün sonuçlanması ardından bulgular qPZR reaksiyonu gerçekleştirilen cihaz üzerindeki program ile primer özgüllüğü dahil olmak üzere analiz edilmiştir. Primer özgüllüğü erime eğrisi (melting curve) analizi ile belirlenmiştir.

3.10.2. Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi

Primer özgüllüğü, erime eğrisi analizi ile de kontrol edilebilir. Erime eğrisi analizi ısıtma sırasında çift sarmallı DNA'nın ayrışma özelliklerinin bir değerlendirmesidir ve SYBR Green gibi araya giren boyalarla qPZR reaksiyonlarında kullanılmaktadır.

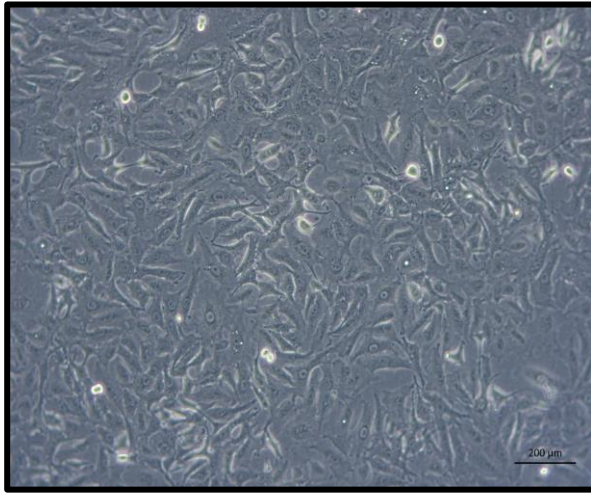
3.11. İstatistiksel Analizler

RNA boyutunda yapılacak analizlerde, çalışma grubu için hesaplanacak ΔC_t değerleri referans değer olarak alınacak, 1'e karşı tek örneklem t-testi ile incelenecektir. Amplifikasyon verimliliğinin hesaplaması Eş Zamanlı-PZR analizinde önemli bir aşamadır. Bağıl kantitasyon ölçümünde bu yöntem örneklerin karşılaştırmalı ifadenme düzeyinin hesaplanmasında kullanılmaktadır. Bütün analizler SPSS paket programı kullanılarak gerçekleştirilecektir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.

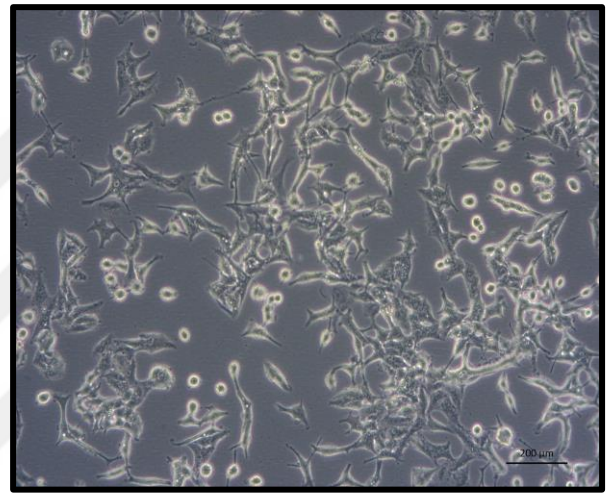
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Asit adaptif A459 hücre hatları morfolojilerinin mikroskop ile değerlendirilmesi

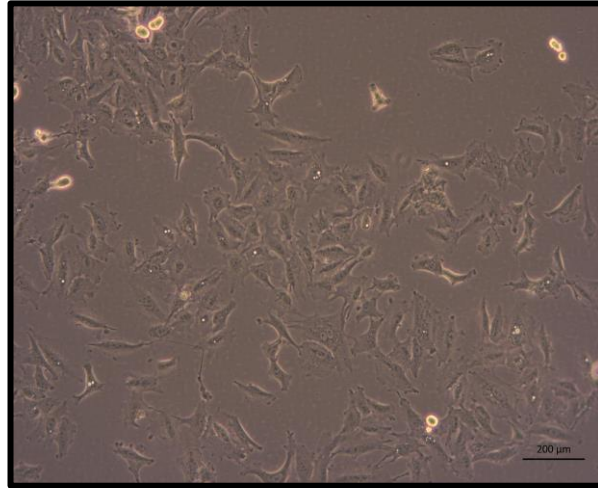
A549 hücre hatlarının pH değişimleri yapılarak adaptasyonları sağlanmış ve haftalara göre mikroskop altında görüntüleri alınarak morfolojik değişimleri incelenmiştir.



1. HAFTA

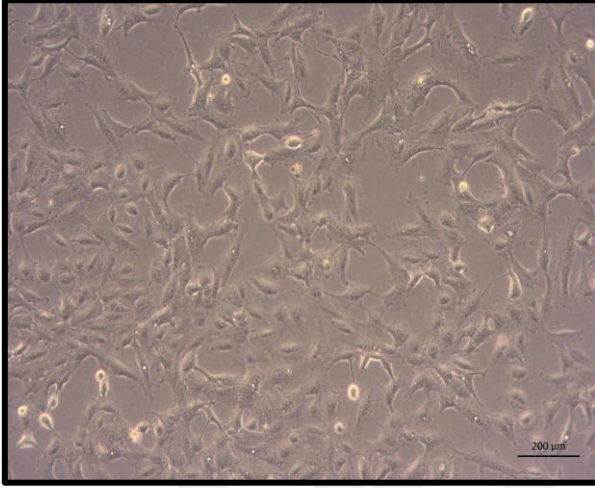


2. HAFTA

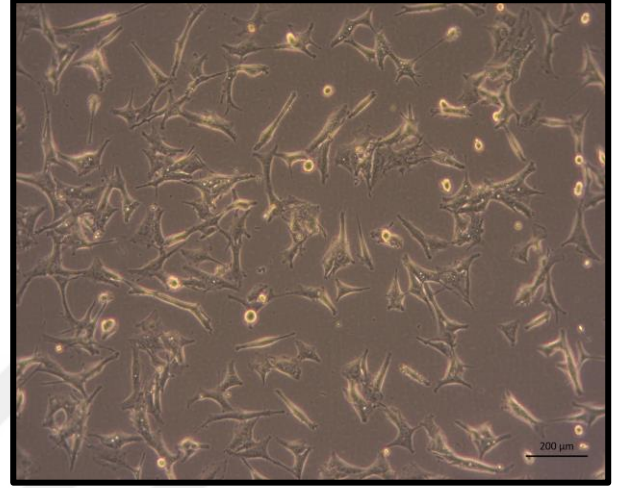


3. HAFTA

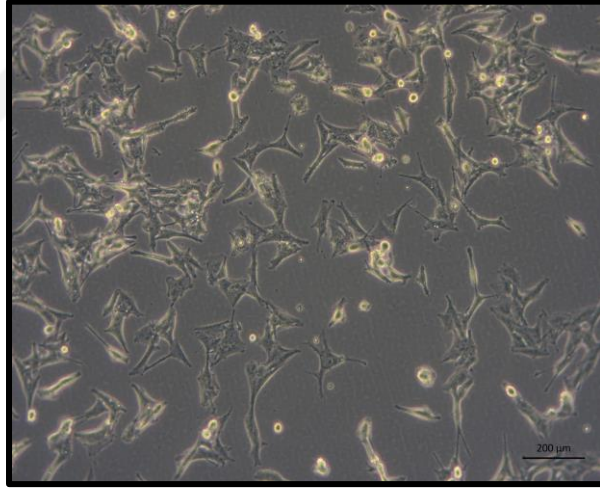
Şekil 4.1. A549-pH 7.4 1, 2 ve 3. haftalarının mikroskop görüntüleri.



1. HAFTA

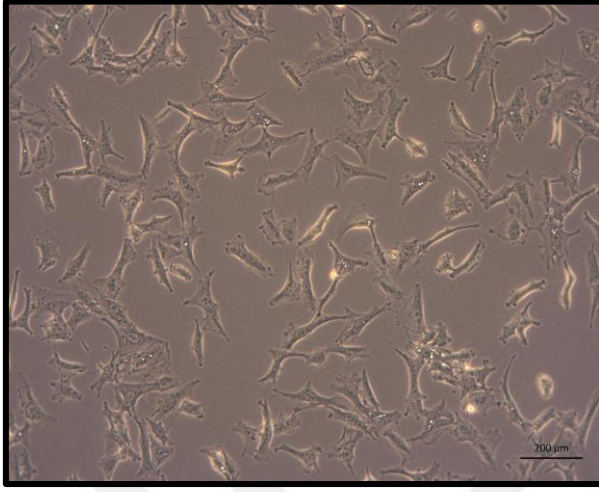


2. HAFTA

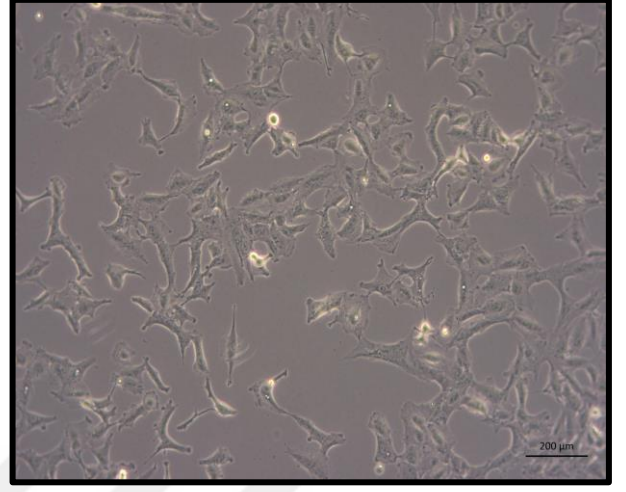


3. HAFTA

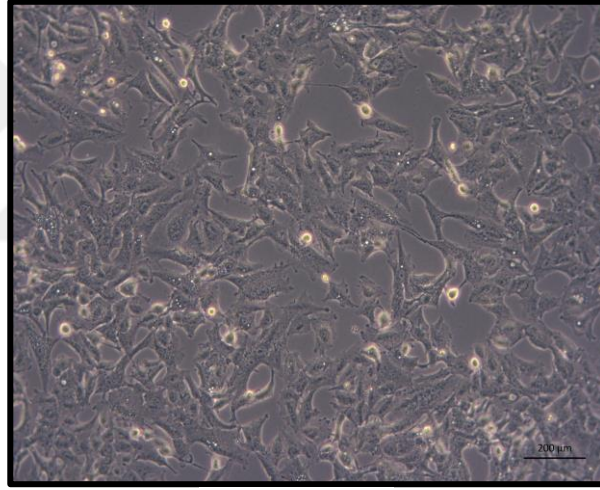
Şekil 4.2. A549-pH 7.2 1, 2 ve 3. haftalarının mikroskop görüntüleri.



1. HAFTA

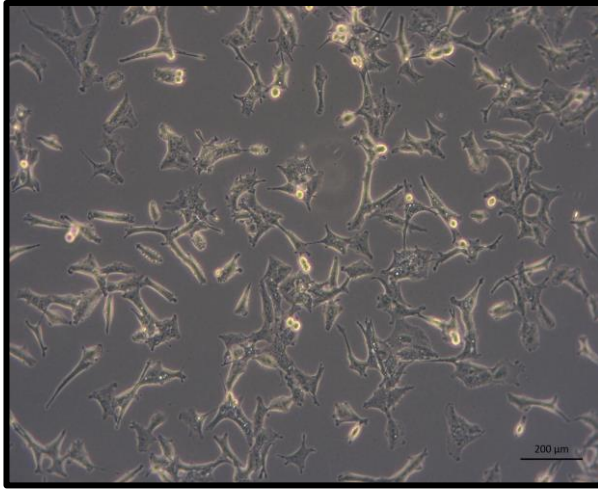


2. HAFTA

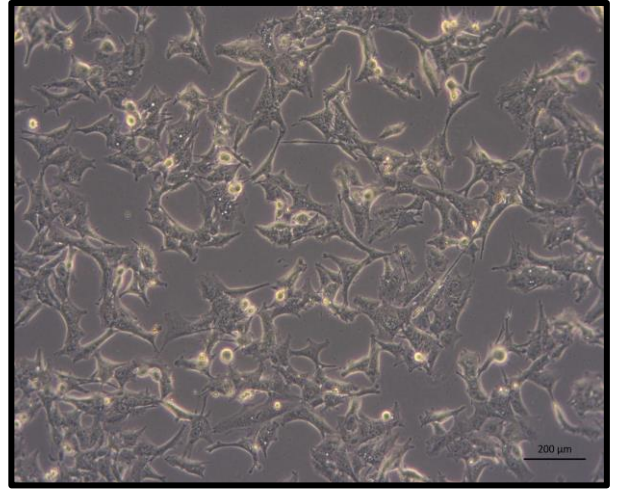


3. HAFTA

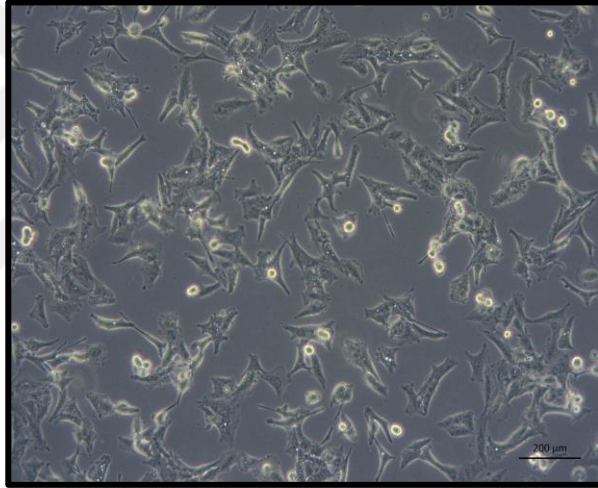
Şekil 4.3. A549-pH 7.0 1, 2 ve 3. haftalarının mikroskop görüntüleri.



1. HAFTA

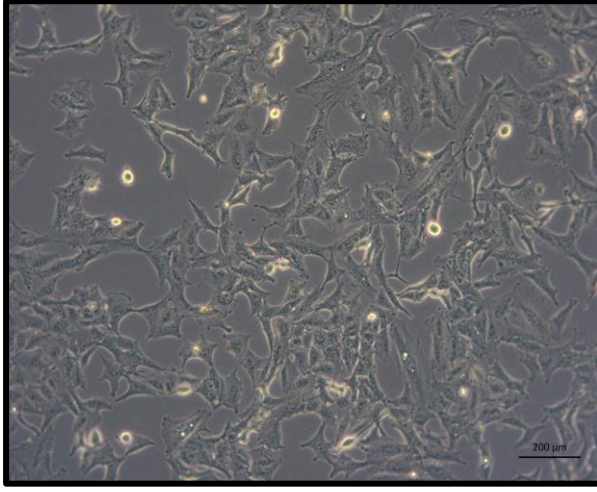


2. HAFTA

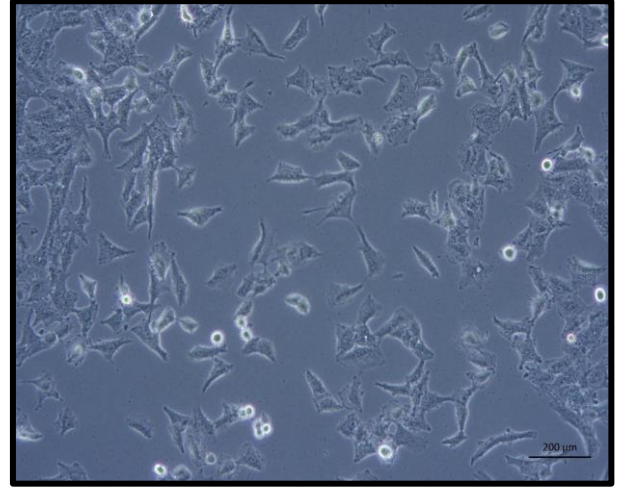


3. HAFTA

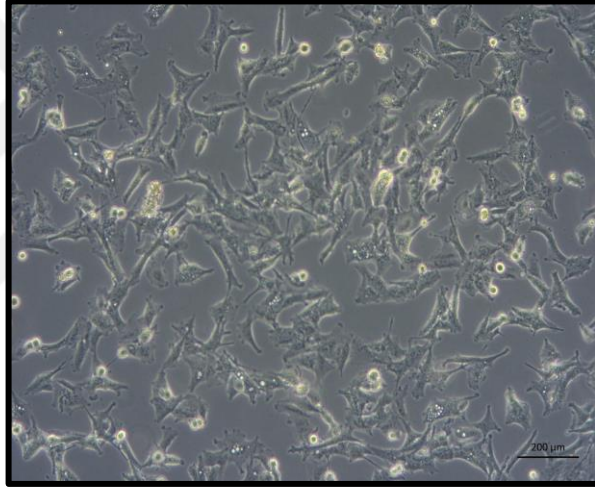
Şekil 4.4. A549-pH 6.7 1, 2 ve 3. haftalarının mikroskop görüntüleri.



1. HAFTA



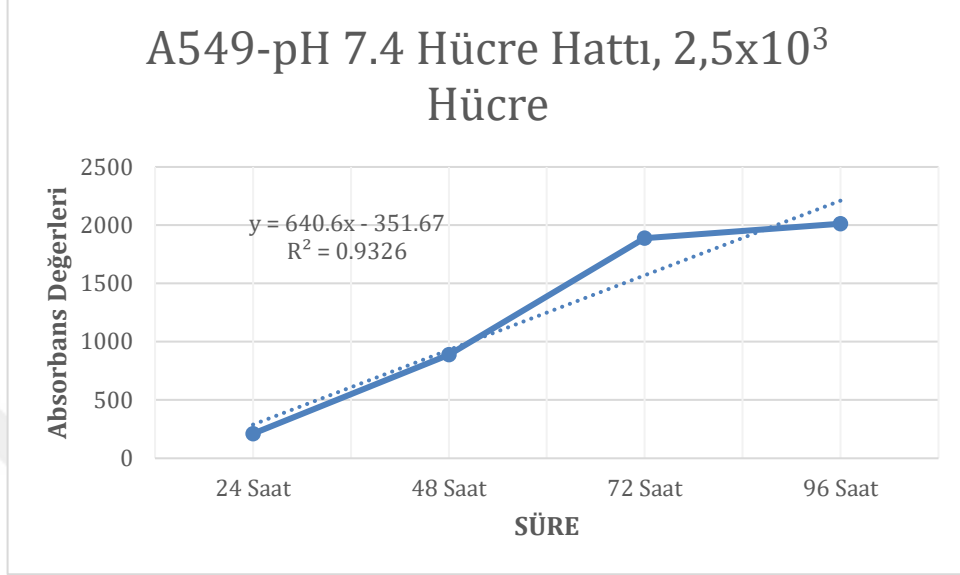
2. HAFTA



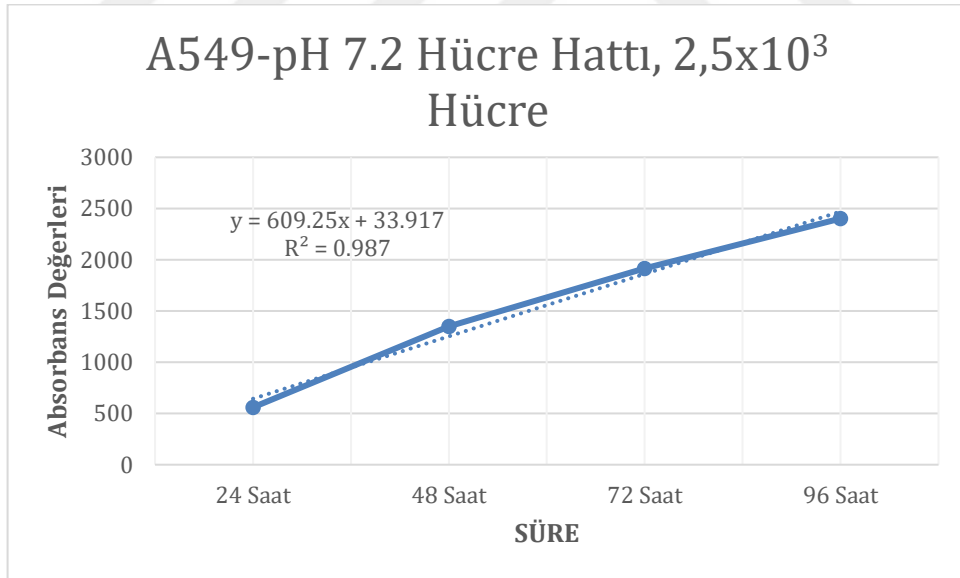
3. HAFTA

Şekil 4.5. A549-pH 6.4 1, 2 ve 3. haftalarının mikroskop görüntüleri.

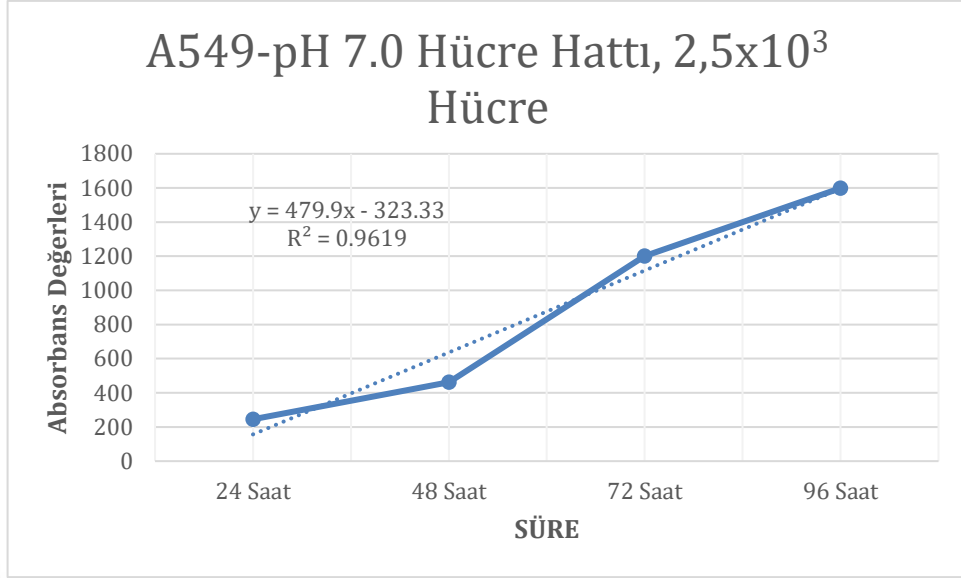
4.2. Hücre Canlılık Analiz Deneyi Sonuçları



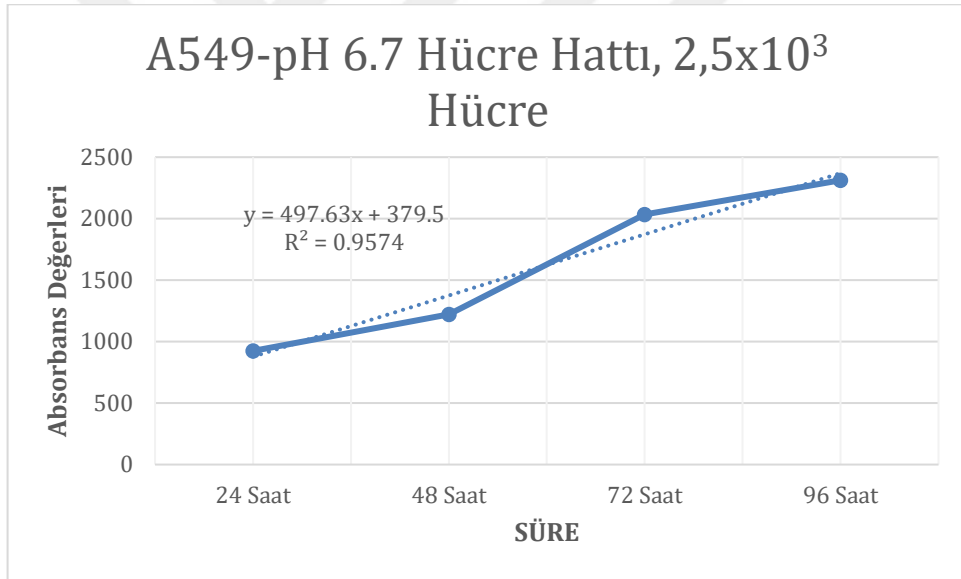
Şekil 4.6. A549-pH 7.4 hücre hattı $2,5 \times 10^3$ hücrenin zamana göre absorbans değerleri.



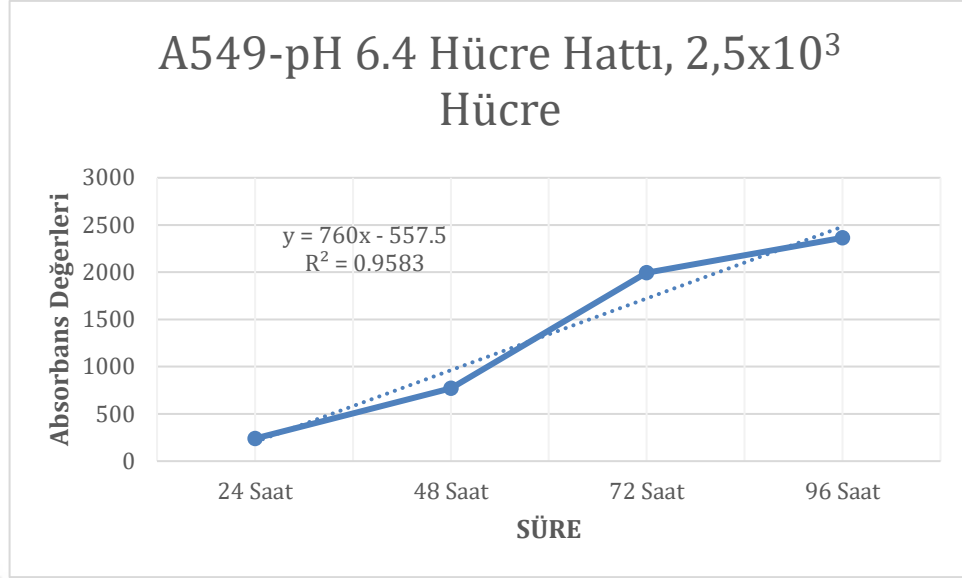
Şekil 4.7. A549-pH 7.2 hücre hattı $2,5 \times 10^3$ hücrenin zamana göre absorbans değerleri.



Şekil 4.8. A549-pH 7.0 hücre hattı $2,5 \times 10^3$ hücrenin zamana göre absorbans değerleri.

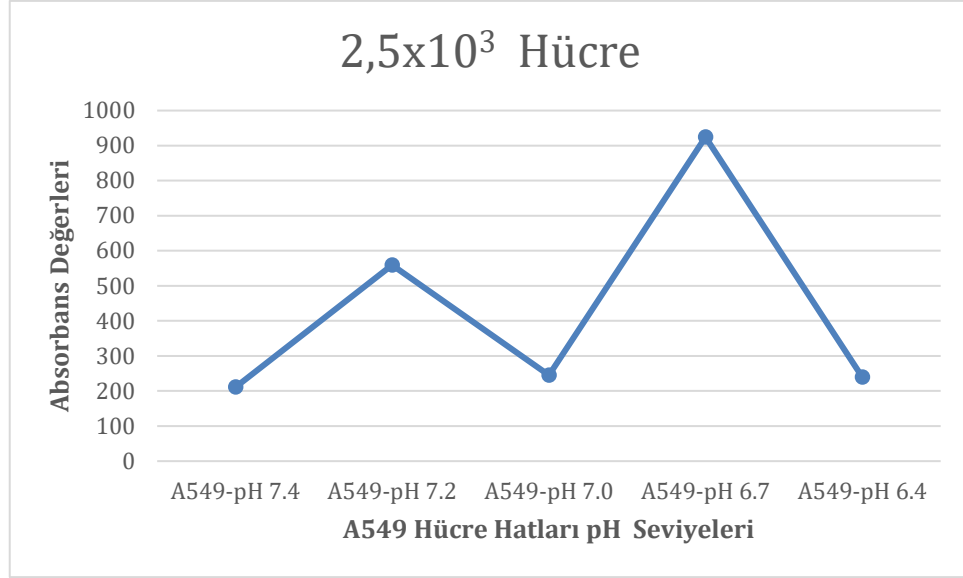


Şekil 4.9. A549-pH 6.7 hücre hattı $2,5 \times 10^3$ hücrenin zamana göre absorbans değerleri.

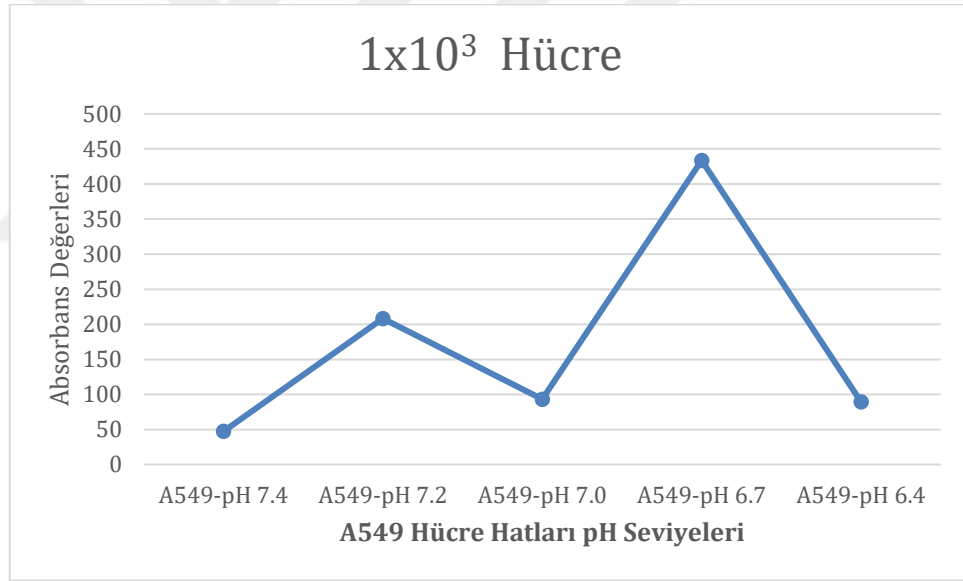


Şekil 4.10. A549-pH 6.4 hücre hattı $2,5 \times 10^3$ hücrenin zamana göre absorbans değerleri.

Tüm pH seviyelerine adaptasyonu sağlanmış A549 hücre hatları için WST-8 ile hücre canlılık analizi deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin 96 kuyucuklu plakaya yapıştıktan sonra günlere göre çoğalmaları izlenmiş ve absorbans değerlerinin ölçümü yapılmıştır. pH değişikliği kanser hücreleri üzerinde evrimsel seçim baskısı oluşturur (Massonneau vd. 2018). Bu nedenle ekstraselüler pH değişikliklerinde hücrelerin canlılıklarını koruyabilmesi ve devam ettirebilmesi önemlidir. pH adaptasyonun sağlanması için belirlenen süre 2 ile 4 hafta arasındadır. Çalışmamızda pH adaptasyonu için 3 hafta süre ile A549 hücre hatlarını belirlenen pH seviyelerinde pasajlanmıştır. Elde edilen verilere göre A549 hücre hatlarının pH seviyelerine adaptasyonun sağlandığı ve canlılıklarını devam ettirebildikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12).



Şekil 4.11. A549 tüm pH seviyeleri 24. saat absorbans değerleri ($2,5 \times 10^3$ hücre).



Şekil 4.12. A549 tüm pH seviyeleri 24. saat absorbans değerleri (1×10^3 hücre).

Farklı pH seviyelerine adaptasyonu sağlanmış A549 hücre hatlarının hücre proliferasyonu için ekimi yapıldıktan sonra $2,5 \times 10^3$ ve 1×10^3 hücre sayısında birinci gün sonundaki absorbans değerleri gösterilmiştir (şekil 4.12, şekil 4.11). Aynı hücre sayısıyla başlayan pasajlanma süresinin sonucunda absorbans değerleri üzerindeki farklı sonuçlar, farklı pH seviyelerinde A549 hücre hatlarının canlılık ve üreme kabiliyetlerinin değiştiğini göstermektedir. Yara iyileşme deneyi ile ilişkili olarak, oluşturulan çizdiği en hızlı kapatan A549-pH 6.7 hücre hattı absorbans değeri olarakta en yüksek değerdedir (çizelge 4.2). Aynı

zamanda pH adaptif hücre hatlarının ikiye katlanma sürelerinde en kısa süre 17,5 saat ile A549-pH 6.7 hücre hattına aittir (çizelge 4.1).

İkiye Katlanma Süresi

Tüm A549-pH seviyeleri ve BEAS hücre hatları için ikiye katlanma zamanı deneyi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu kültür kaplarına 1×10^5 hücre ekimi yapılmış ve her 24 saatte hücreler kaldırılarak tripan mavisi ile sayım yapılmıştır. 24, 48,72 ve 96 saatler sonunda hücre sayıları belirlenmiş ve $(T1 - T0) / \log_2 (N1 / N0)$ formülü ile ikiye katlanma süreleri hesaplanmıştır. N0 ve N1 sırasıyla ilk andaki (T0) hücre sayısı ve kültivasyon sonrası T (T1) zamanı olarak tanımlanmıştır. Hesaplanan sonuçların ortalaması alınarak hücre hatlarının ikiye katlanma süreleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 BEAS ve A549 tüm pH seviyeleri hücre hatları ikiye katlanma süreleri.

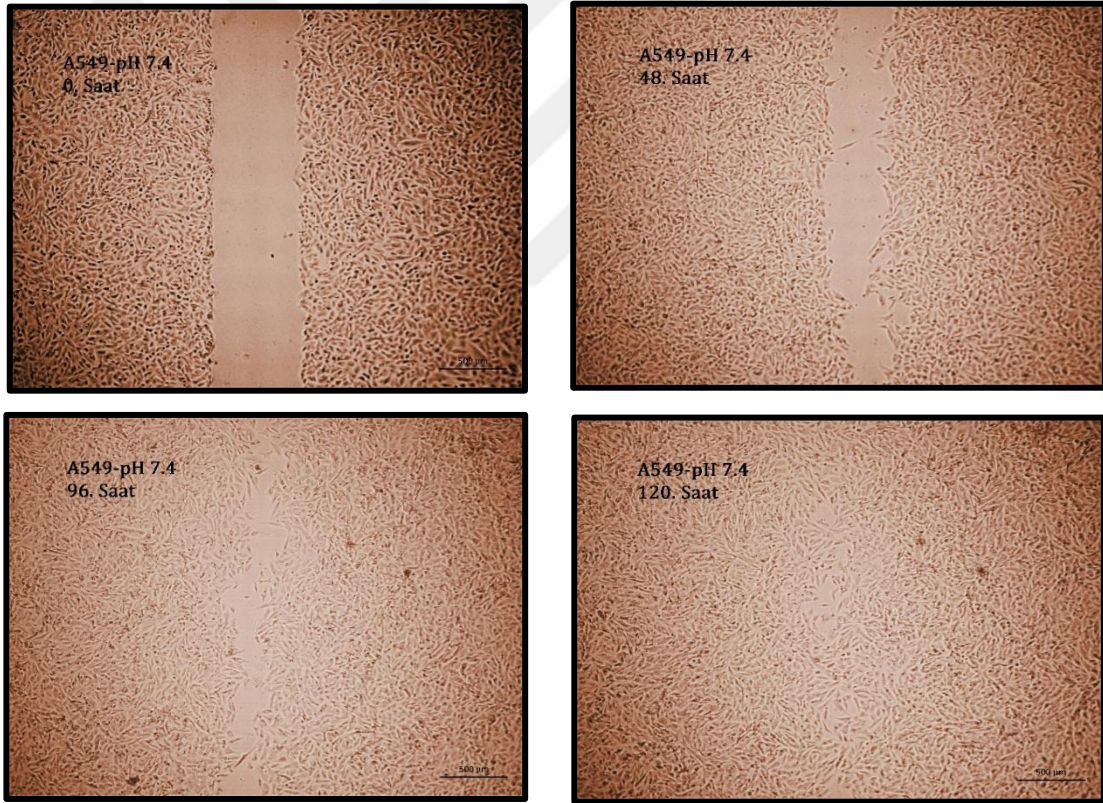
Hücre Hatları	İkiye Katlanma Süreleri (Saat)
BEAS	23,7
A549-pH 7.4	23,5
A549-pH 7.2	22,3
A549-pH 7.0	23,2
A549-pH 6.7	17,5
A549-pH 6.4	22,9

4.3. Yara İyileşme (Scratch / Wound Healing) Deneyi Sonuçları

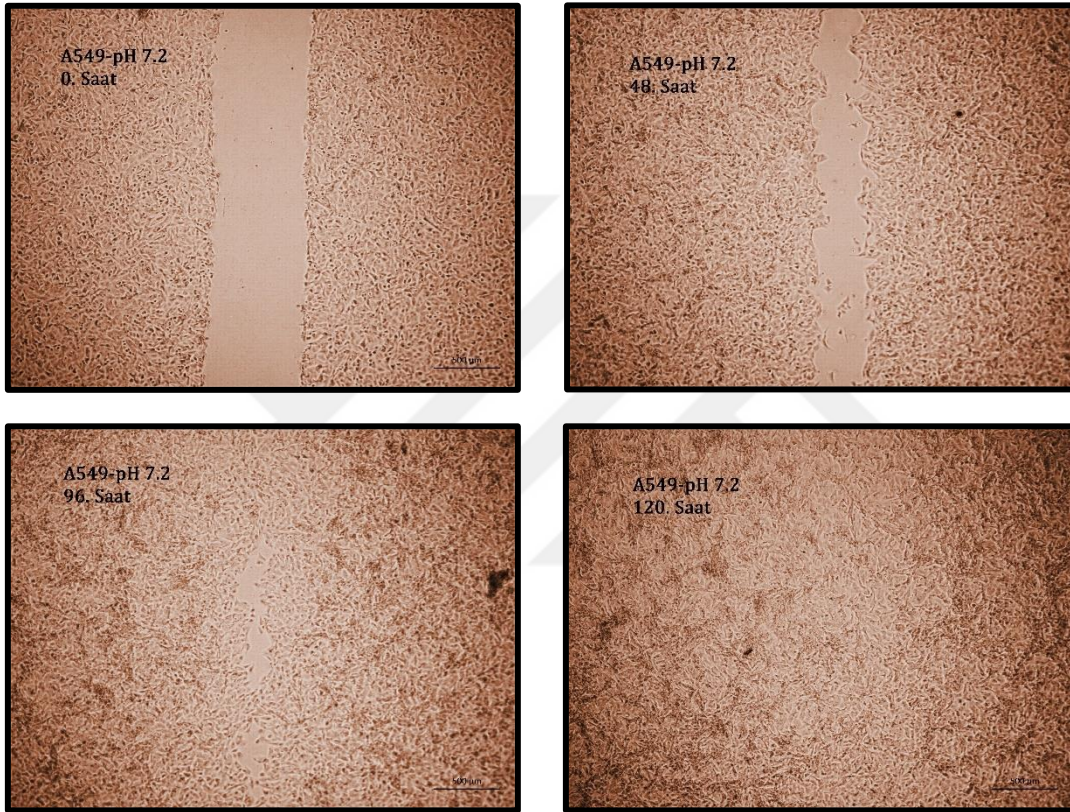
Yara iyileşme deneyi için 6 kuyucuklu kültür kaplarına 5×10^5 hücre ekimi yapılarak %80-90 doluluğa ulaştırılmaları sağlanmıştır. Hücre hatları yeterli doluluğa ulaşıldığında 200 mL'lik pipet ucuyla baştan sona lineer bir çizik oluşturulmuştur. 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde görüntüler alınarak hücrelerin gelişimi takip edilmiştir.

Çizelge 4.2 A549 hücre hatları pH seviyelerinin zamana göre çizik doluluk oranları.

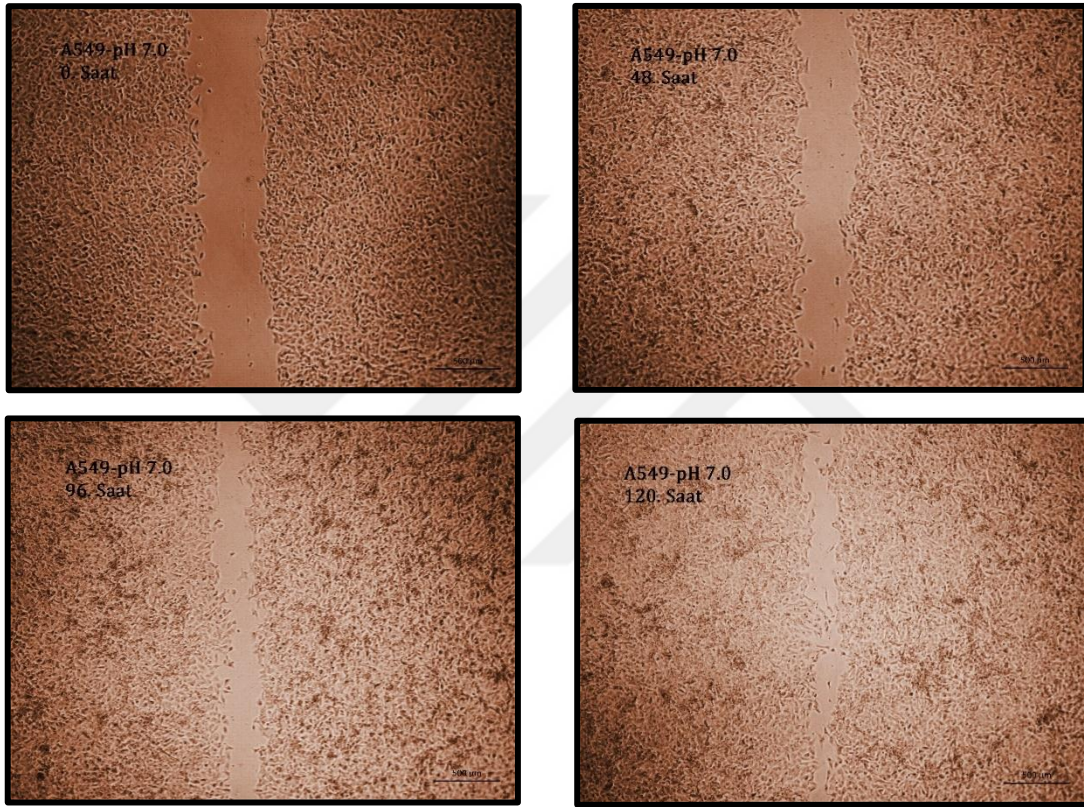
	A549 Hücre Hatları pH Seviyeleri				
Zaman/Süre	A549-pH 7.4	A549-pH 7.2	A549-pH 7.0	A549-pH 6.7	A549-pH 6.4
0. Saat	%0	%0	%0	%0	%0
24. Saat	%27	%39,7	%21,2	%29,6	%20,1
48. Saat	%55	%67,8	%28,2	%62,2	%48,9
72. Saat	%58	%78	%65	%81,5	%68,7
96. Saat	%74,3	%95,8	%75	%100	%84,9
120. Saat	%93,8	%99,2	%85,6	-	%96,84



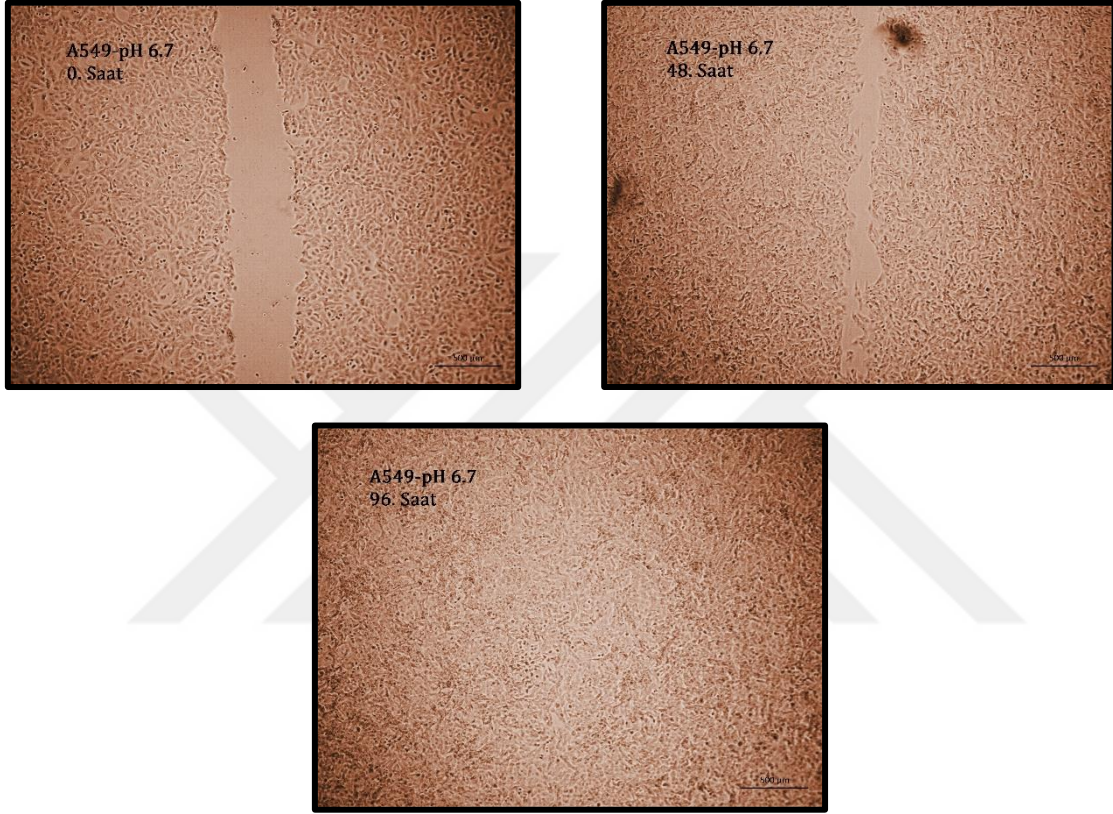
Şekil 4.13. A549-pH 7.4 hücre hattı 0, 48, 96 ve 120. saat mikroskop görüntüleri.



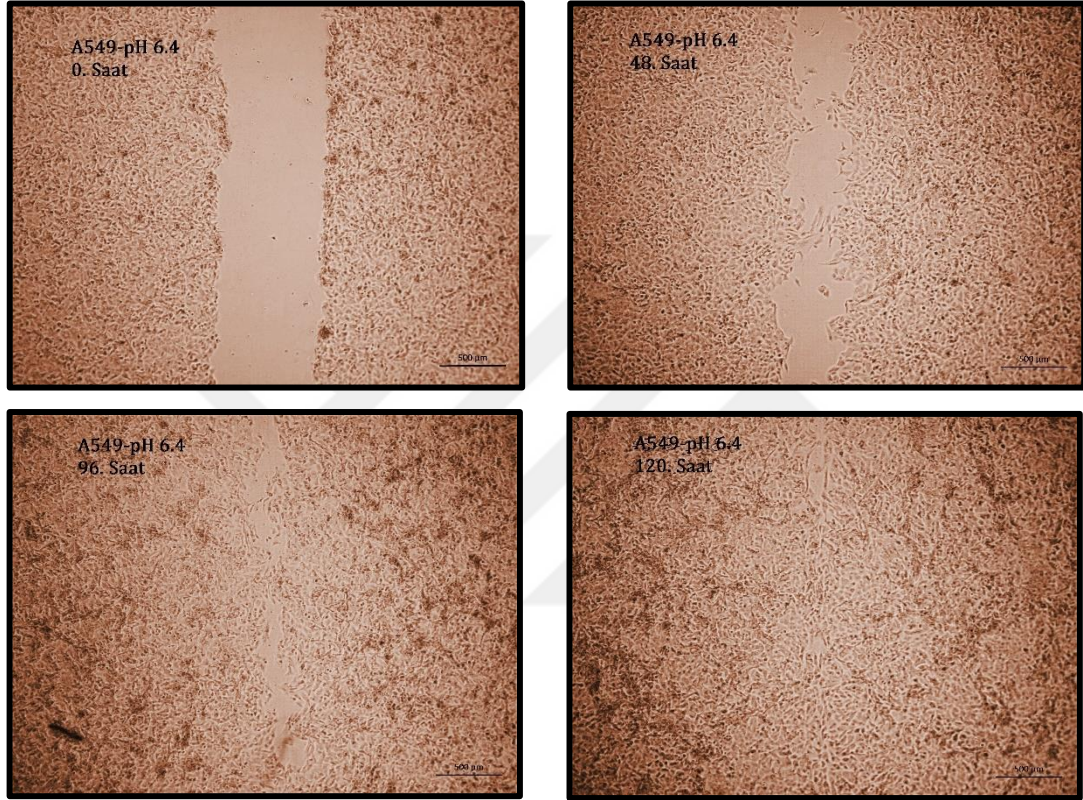
Şekil 4.14. A549-pH 7.2 hücre hattı 0, 48, 96 ve 120. saat mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.15. A549-pH 7.0 hücre hattı 0, 48, 96 ve 120. saat mikroskop görüntüleri.

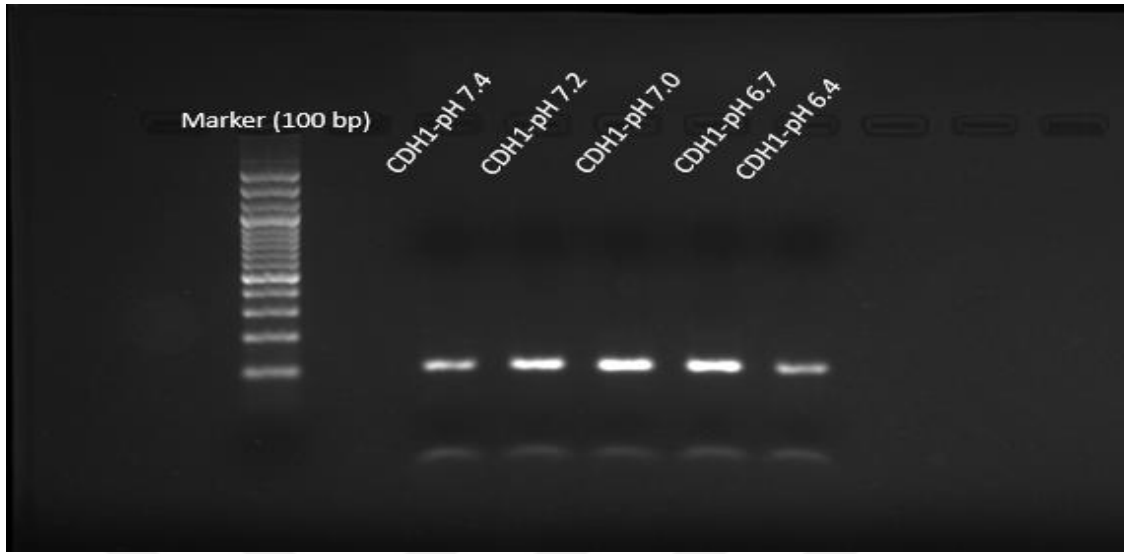


Şekil 4.16. A549-pH 6.7 hücre hattı 0, 48 ve 96. saat mikroskop görüntüleri.



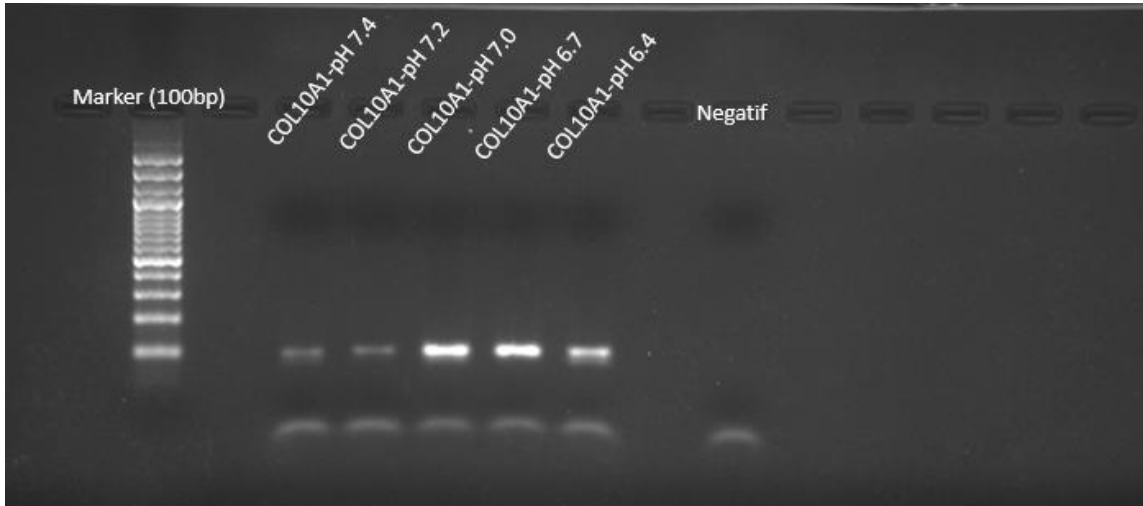
Şekil 4.17. A549-pH 6.4 hücre hattı 0, 48, 96 ve 120. saat mikroskop görüntüleri

4.4. Konvansiyonel (Klasik) PZR ve Agaroz Jel Elektroforez Sonuçları



Şekil 4.18. CDH1 bantının adaptif pH seviyelerindeki agaroz jel elektroforez görüntüsü.

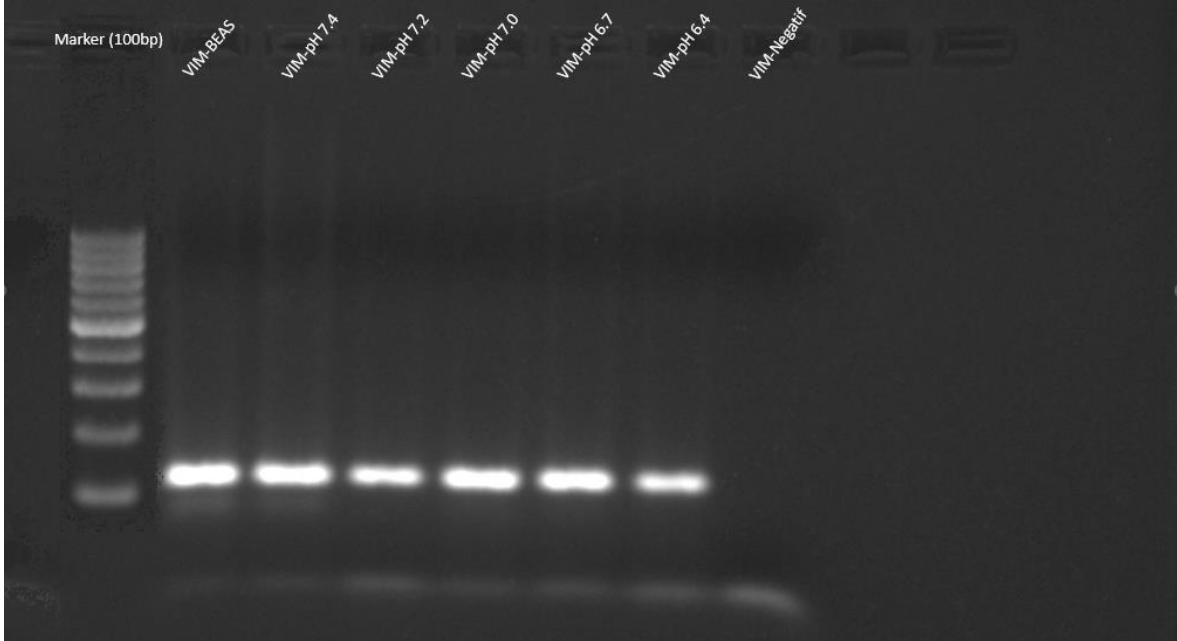
A549 hücre hatları adaptif pH seviyelerinde CDH1 geni ifadesini gözlemlemek için 0,5 ul (500 ng) cDNA kullanılarak klasik PZR reaksiyonu hazırlanmıştır. Agaroz jelde yürütülme sonucu A549 hücre hattı tüm pH seviyelerinde CDH1 geni ifadesi gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.19. COL10A1 bantının A549 hücre hattı pH seviyeleri jel elektroforez görüntüsü.

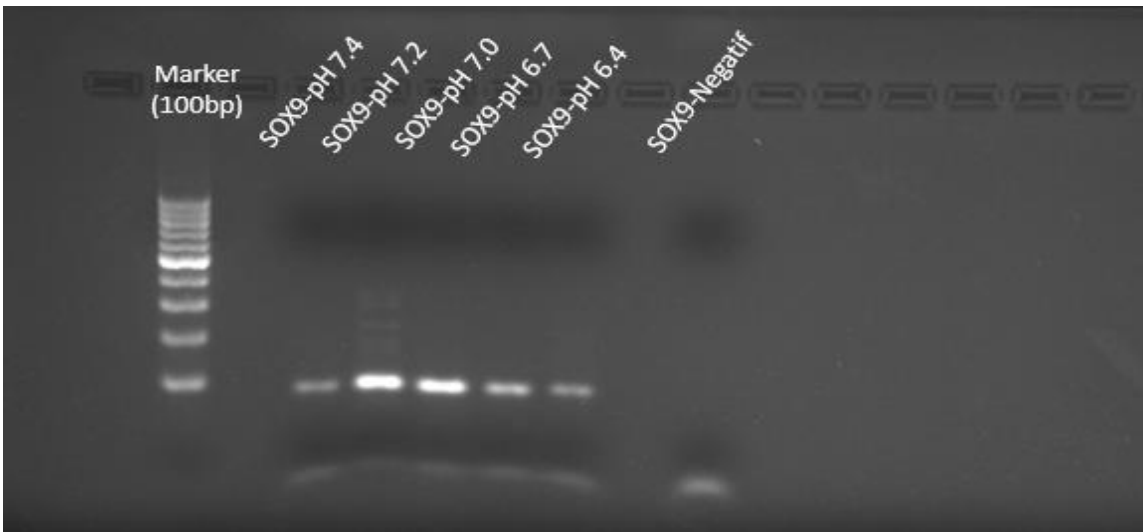
A549 hücre hatları adaptif pH seviyelerinde COL10A1 ifadesini gözlemlemek için 0,5 uL (500 ng) cDNA kullanılarak klasik PZR reaksiyonu hazırlanmıştır. Agaroz jelde

yürütölme sonucunda A549 hücre hattı tüm pH seviyelerinde COL10A1 ifadesi gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.20. VIM bantının BEAS ve A549 hücre hattı pH seviyeleri jel elektroforez görüntüsü.

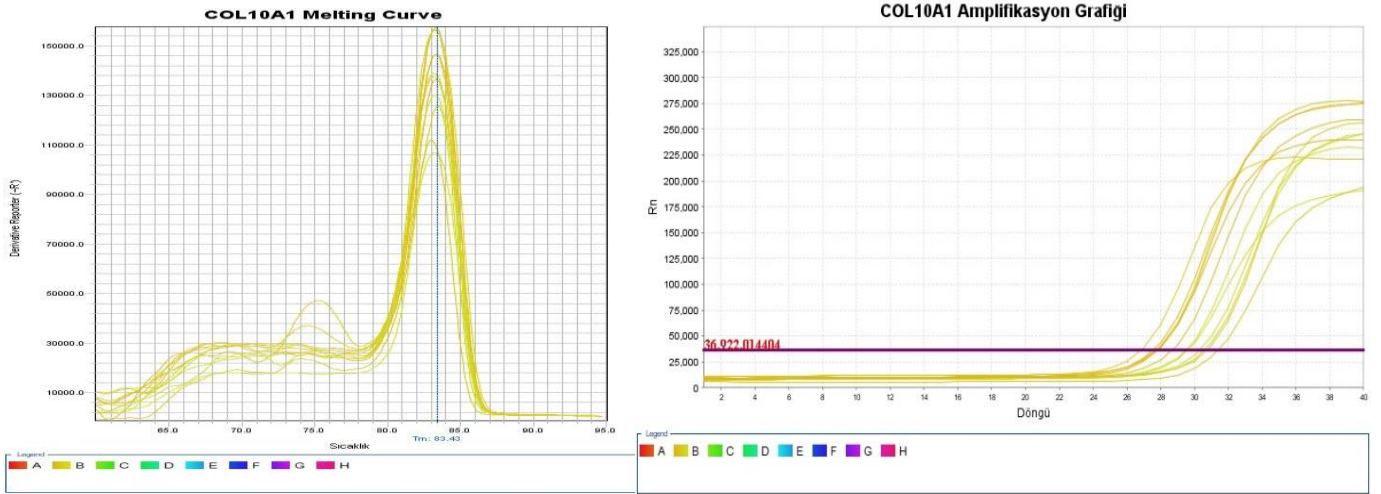
A549 hücre hatları adaptif pH seviyeleri ve BEAS hücre hattında VIM geni ifadesi gözlemlenmek için 0,5 ul (500 ng) cDNA kullanılarak klasik PZR reaksiyonu hazırlanmıştır. Agaroz jelde yürütölme sonucunda BEAS ve A549 hücre hattı tüm pH seviyelerinde VIM geni ifadesi gözlemlenmiştir (Şekil 4.20).



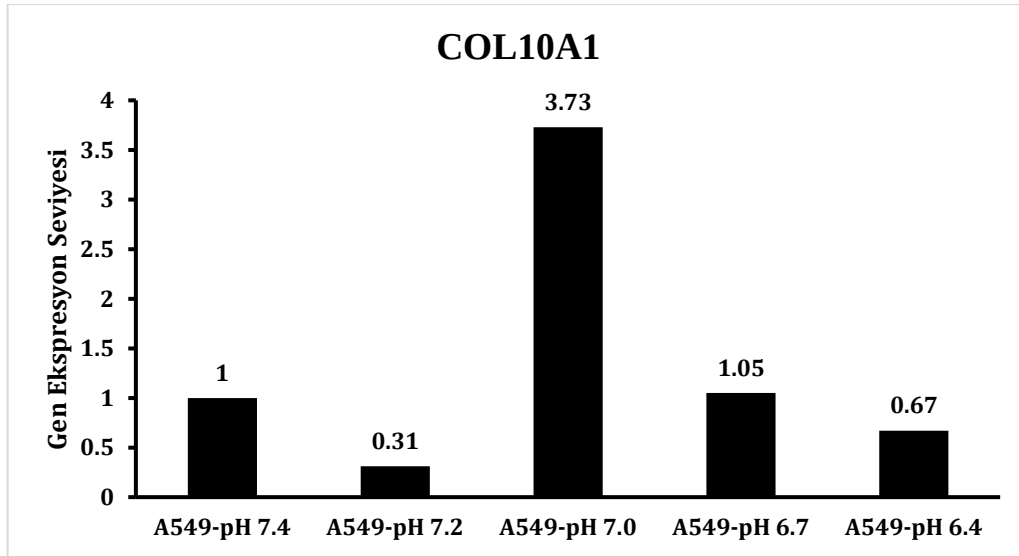
Şekil 4.21. SOX9 bantının A549 hücre hattı pH seviyeleri jel elektroforez görüntüsü.

Adaptif pH gerçekleştirilmiş A549 hücre hatları cDNA'larından 1 µl örnek alınarak 59 °C'de klasik PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve agaroz jel elektroforezi ile SOX9 gen ifadeleri incelenmiştir. A549 hücre hattı tüm pH seviyelerinde SOX9 ifadesi gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).

4.5. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

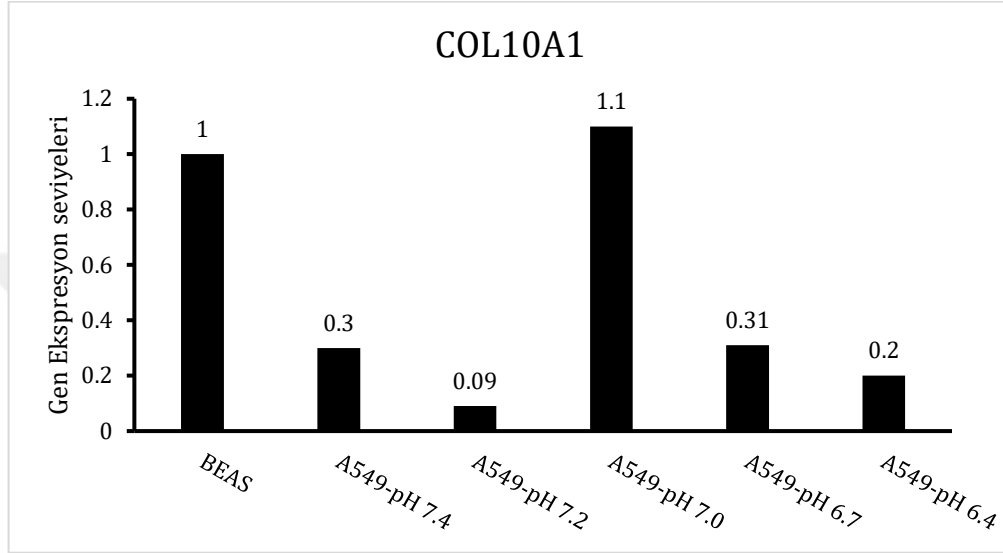


Şekil 4.22. COL10A1 geninin erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği.



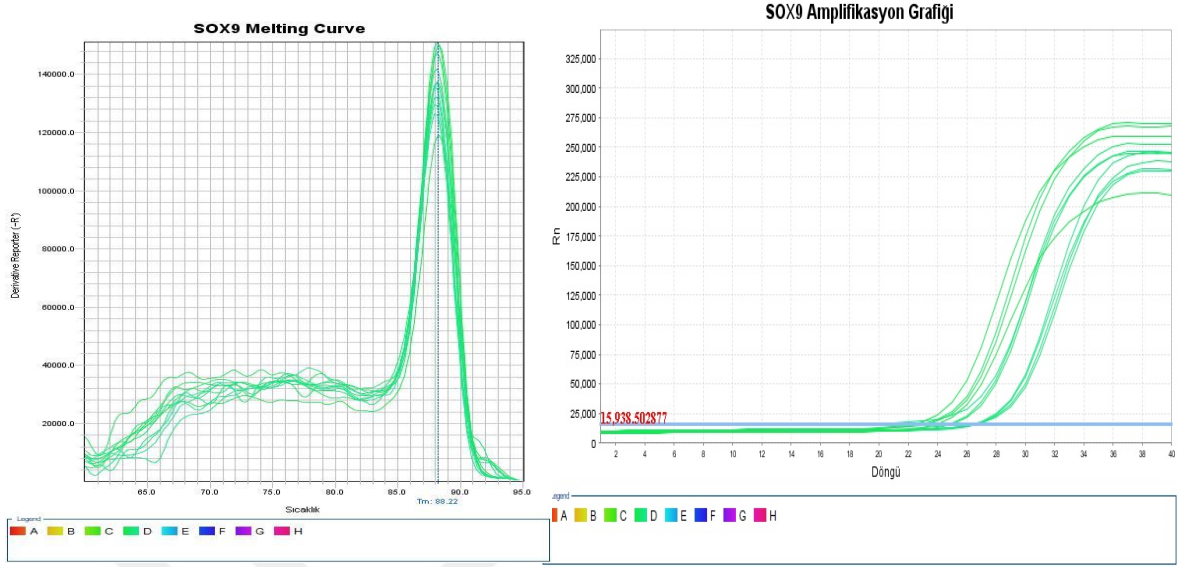
Şekil 4.23. COL10A1 geninin A549-pH 7.4 hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.

A549-pH 7.4 kontrol grubu olarak alınarak oluşturulan ifade seviyesi oranlarına göre COL10A1 geni ifade seviyelerinin pH 7.2 (0,31) ve pH 6.4 (0,67)'te düşük olduğu ve pH 7.0 (3,73) ve pH 6.7 (1,05)'da yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.23).

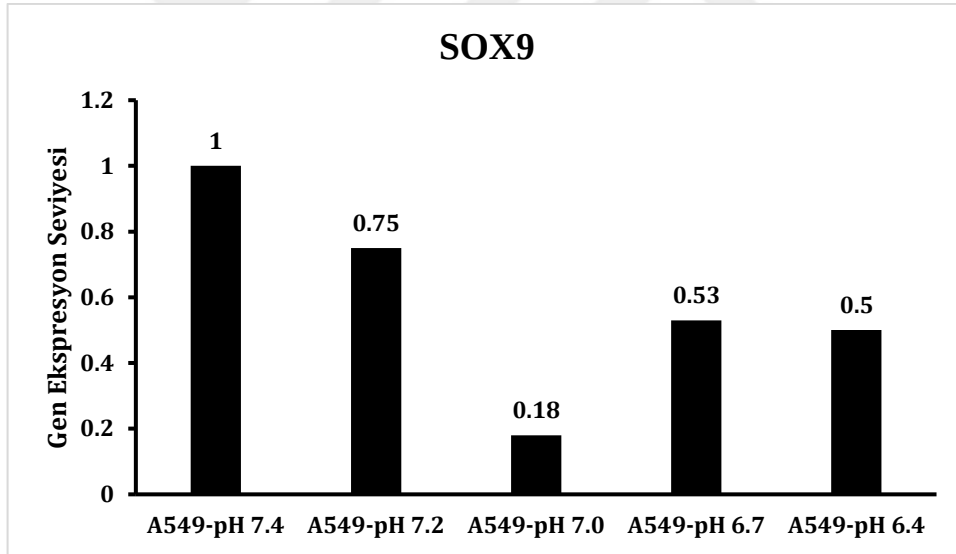


Şekil 4.24. COL10A1 geninin BEAS hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.

BEAS hücre hattının kontrol grubu olarak alındığında oluşturulan ifade seviyesi oranlarına göre COL10A1 geni ifade seviyelerinin pH 7.4 (0,3), pH 7.2 (0,09), pH 6.7 (0,31) ve pH 6.4 (0,2)'de düşük olduğu ve pH 7.0 (1,1)'da yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.24).

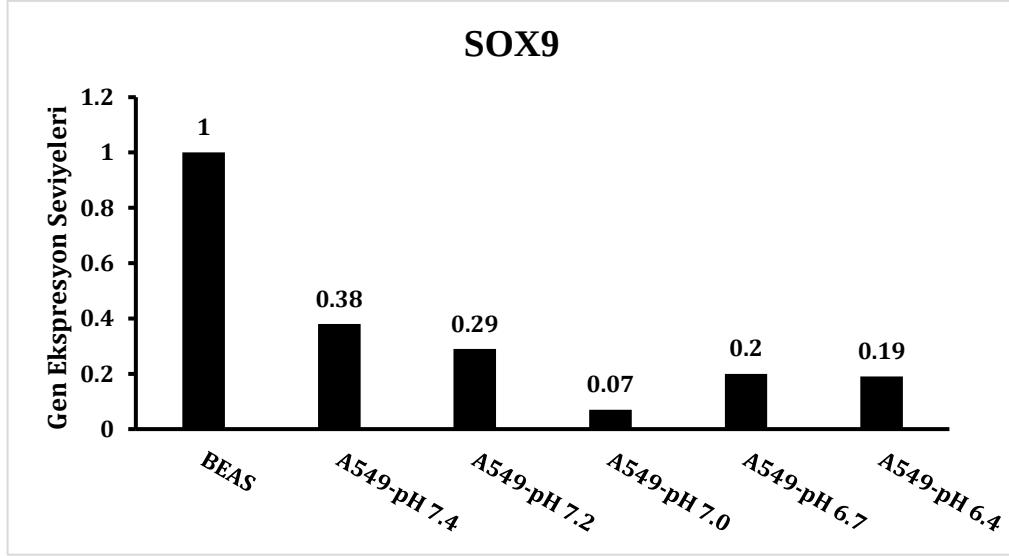


Şekil 4.25. SOX9 geninin erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği.



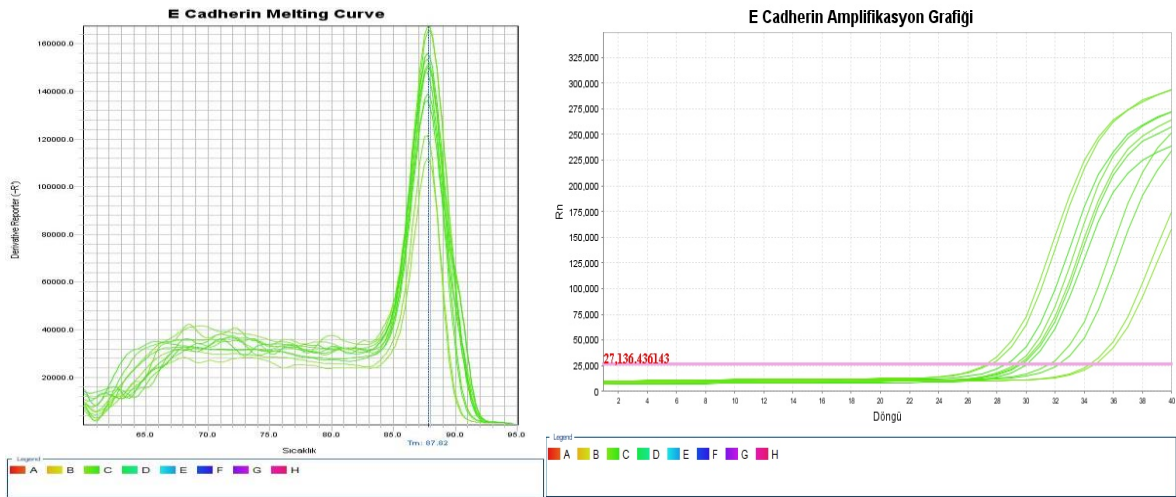
Şekil 4.26. SOX9 geninin A549-pH 7.4 hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.

A549-pH 7.4 hücre hattının kontrol grubu olarak alındığında oluşturulan ifade seviyesi oranlarına göre SOX9 geni ifade seviyelerinin tüm pH seviyelerinde düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.26).

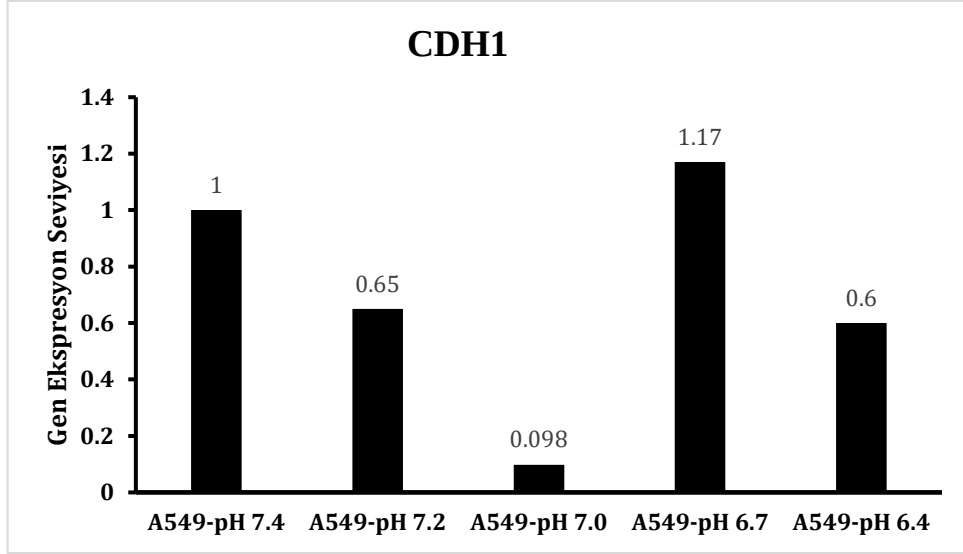


Şekil 4.27. SOX9 geninin BEAS hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.

BEAS hücre hattının kontrol grubu olarak alındığında oluşturulan ifade seviyesi oranlarına göre SOX9 geni ifade seviyelerinin tüm pH seviyelerinde düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.27).

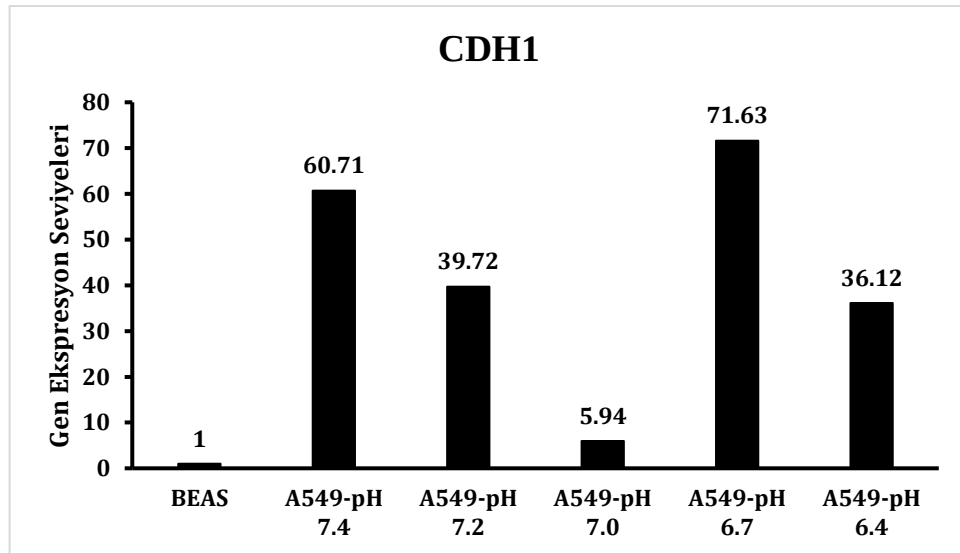


Şekil 4.28. CDH1 geninin erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği.



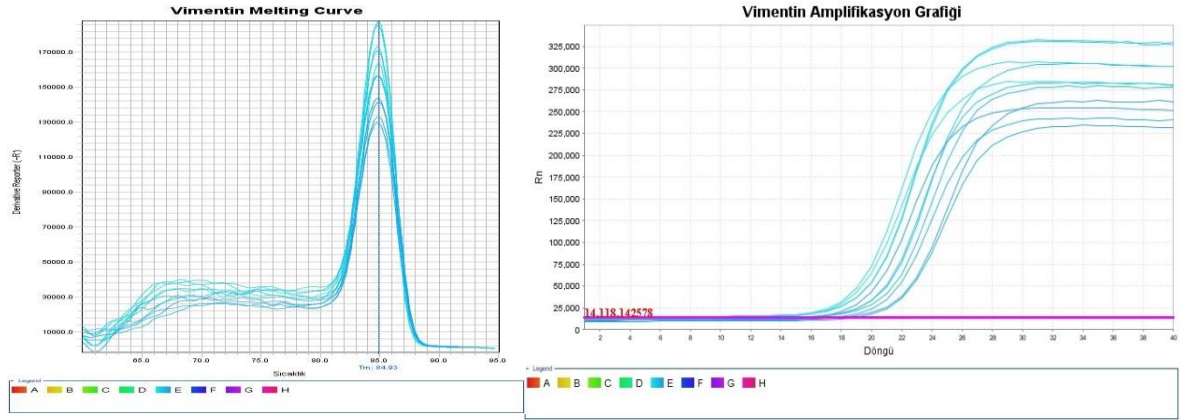
Şekil 4.29. CDH1 geninin A549-pH 7.4 hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.

A549-pH 7.4 hücre hattının kontrol grubu olarak alındığında oluşturulan ifade seviyesi oranlarına göre CDH1 geni ifade seviyelerinin pH 7.2 (0,65), pH 7.0 (0,1), pH 6.4 (0,6)'te düşük olduğu ve pH 6.7 (1,17)'de yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.29).

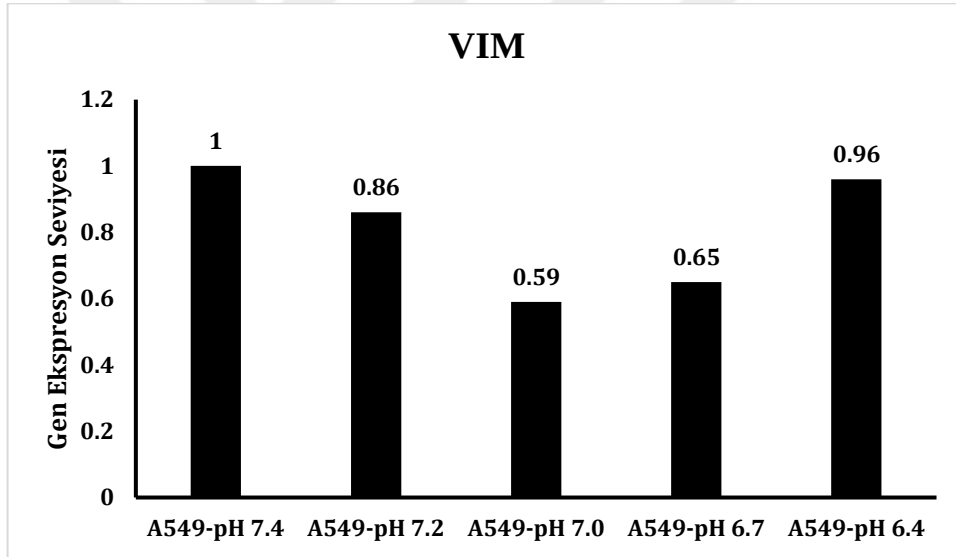


Şekil 4.30. CDH1 geninin BEAS hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.

BEAS hücre hattının kontrol grubu olarak alındığında oluşturulan ifade seviyesi oranlarına göre CDH1 geni ifade seviyelerinin tüm pH seviyelerinde önemli artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.30).

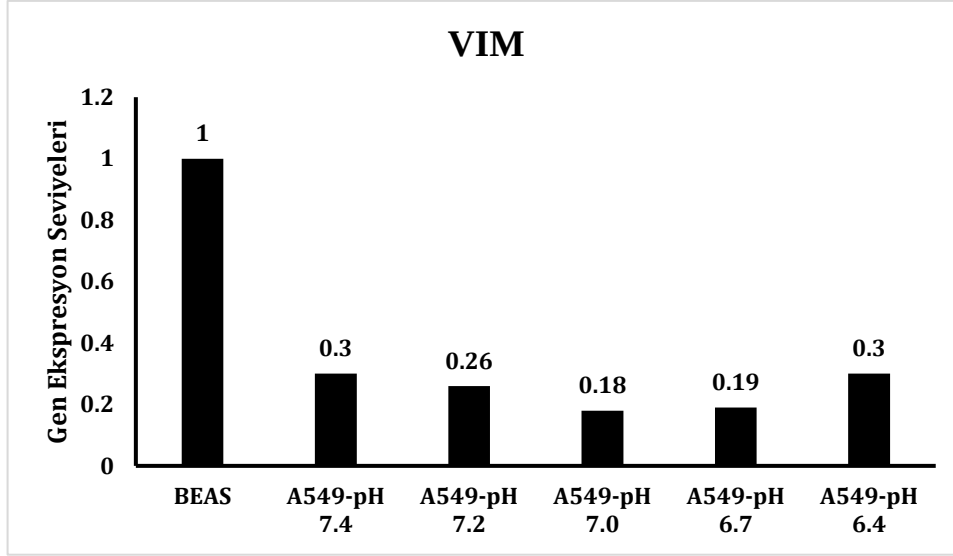


Şekil 4.31. VIM geninin erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği.



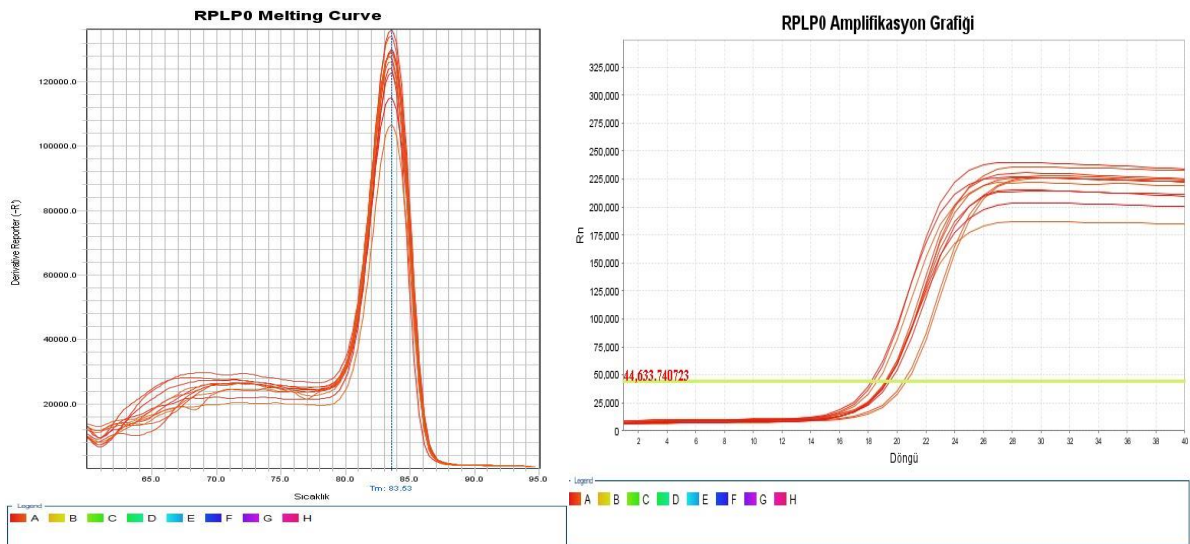
Şekil 4.32. VIM geninin A549-pH 7.4 hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.

A549-pH 7.4 hücre hattının kontrol grubu olarak alındığında oluşturulan ifade seviyesi oranlarına göre VIM geni ifade seviyelerinin tüm pH seviyelerinde düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.33. VIM geninin BEAS hücre hattı baz alınarak oluşturulan tüm A549 adaptif pH hücre hatlarındaki ifade seviyesi grafiği.

BEAS hücre hattının kontrol grubu olarak alındığında oluşturulan ifade seviyesi oranlarına göre VIM geni ifade seviyelerinin tüm pH seviyelerinde düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.34. RPLP0 geni, erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği.

Önerdiğimiz projede akciğer kanseri gelişimi ve metastazı için en önemli değişimlerden biri olan epitelyal mezenkimal geçişte önemi ortaya koyulan iki genin (SOX9, COL10A1) normal ve adaptif ekstraselüler pH ortamındaki ifade düzeylerine bakılmıştır.

Araştırılan genlerden biri olan SOX9 geninin aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olduğu, akciğer kanseri dahil pek çok kanser türünde arttığı, ekstraselüler matrikse etki ettiği, ekstraselüler matriksin en önemli bileşeni olan kolajen ailesi üyesi COL10A1 gen ifade değişimine neden olarak EMT'ye neden olduğu yapılan araştırmalar ile ortaya konulmuştur. Ancak, SOX9 geninin COL10A1 üzerinden EMT'ye neden olduğu gastrik kanserde gösterilmiş olup akciğer kanserinde çalışılmış değildir (Li vd. 2018). Ayrıca, COL10A1 üzerine olan etkisi ekstraselüler pH değişikliklerinde araştırılmamıştır. Oysa pH'ın asiditeye kayması protein aktivitesini, miRNA ifadesini ve dolayısıyla transkripsiyonu, RNA işlenmesini etkileyebilen önemli bir değişimdir. Bu amaçla, önerdiğimiz proje kapsamında akciğer kanserini en kapsamlı şekilde ifade edecek olan akciğer kanserinin %40'ını oluşturduğu bilinen adenokarsinom alt tipi ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler literatürde ağırlıklı olarak ifade edilen SOX9 geninin pek çok kanser türünde ifadesinin arttığı analizlerinden farklılık göstermektedir. Akciğer küçük hücre dışı karsinomu alt tipi olan adenokarsinomu A549 hücre hattı ile yaptığımız araştırmada en dikkat çekici bulgu pH değişimi yapılmayan ve pH adaptif tüm kanser hücre hatlarında SOX9 gen ifadesinin azaldığı yönündedir. SOX9 ifadesi kanser türleri arasında farklılık gösterebilir. Genellikle çoğu kanser türünde SOX9 ifadesinde bir artış gözlemlenirken, mesane ve rahim ağzı kanserleri gibi bazı kanser türlerinde SOX9 ifade seviyelerinin düşük ifadesi ile karşılaşılmıştır (Aleman vd. 2008; Liang vd. 2020). Farklı tümör çeşitlerine bağlı olarak genler onkogen veya tümör baskılayıcı olarak çeşitlilik gösterebilir. SOX9 geni kanser türlerine göre onkogen ve tümör baskılayıcı olarak iki farklı düzeyde etkinlik sağlar. Aynı zamanda çevresel değişiklikler gibi oluşturulan stres ortamlarına hücre çeşitlerinin vereceği tepkiler farklılık gösterirken genotipik, fenotipik ve epigenetik değişiklikler ile sinyal yolları üzerinde, moleküler düzeyde ve gen ifade seviyelerinde farklılıklar meydana gelir. SOX9 geni onkogen olarak WNT/ β -katenin sinyal yolağı üzerinden etkisini gösterirken, p21 geni ifade seviyesini attararak apoptozun hızlandırılmasına etki eder ve tümör baskılayıcı gen olarak davranır. Çalışmamızda SOX9 ifade seviyesinin pH'a bağlı olarak düştüğü gözlemlenirken hangi mekanizmalara etki ettiğinin saptanması ayrıca önemlidir.

SOX9 ifadesinin en fazla azaldığı pH derecesi 7.0 olup COL10A1'in en fazla artış gösterdiği pH yine pH 7.0 olarak görülmektedir. SOX9 geninin COL10A1 promotörüne

bağlanarak ifadesini arttırdığı düşünüldüğünde, SOX9 geninden ayrı olarak COL10A1 geni üzerinde farklı genlerin etkisinin olabileceği ve bir çevresel faktör olarak farklı pH seviyelerinin ifade seviyelerini değiştirebileceği öngörülmüştür.

Bir diğer önemli bulgu CDH1 geni ifadesi ile ilgilidir. CDH1 geni tarafından kodlanan E-Kaderin proteini, hücre-hücre bağlantılarının oluşturulmasında önemli rolü bulunan bir hücre adezyon molekülüdür. Hücresel gelişim sırasında, hücrelerin uygun şekilde konumlandırılması, doku katmanlarından ayrılmanın sağlanması ve hücresel göçten sorumludur. E-Kaderin kanserde tümör oluşumu ve büyümesine ek olarak bir tümör dokusunun nasıl büyümeye devam edeceğiyle ilgili kritik adımlarda önemli rol oynar. Genellikle tümör baskılanması için pozitif bir faktör olarak görülür. Fakat kanser hücrelerinin karmaşık molekül mekanizmaları içerdiği göz önünde bulundurulduğunda genlerin ve proteinlerin alışılmışın dışında etkilere neden olabileceği bir gerçektir. Çeşitli çalışmalar E-Kaderinin bazı tümör progresyonu mekanizmalarında destekleyici bir rolü olabileceğini göstermiştir (Kowalski, Rubin, ve Kleer 2003; A. S. Wong vd. 1999). E-Kaderin ifade seviyelerinin korunduğu tümör durumları mevcuttur. E-Kaderin varlığı tümör hücre göçü veya istilasını engelleyemez. Tümör hücrelerinde epitelyal özellikler her zaman kaybolmaz. Epitelyal özelliklerin devam ettirilmesi ile toplu/kolektif hücre göçleri oluşabilir (Friedl, Hegerfeldt, ve Tusch 2004). Hücre-hücre etkileşimlerinin korunması toplu hücre istilasını sağlayarak tümör yayılımını kolaylaştırabilir. A549-pH 7.4 hücre hattı CDH1 geninin ifade seviyeleri ile diğer pH seviyeleri karşılaştırıldığında pH 6.7 dışında tüm pH seviyelerinde CDH1 geninin ifade seviyesinin düştüğü gözlemlenmektedir. Farklı pH seviyelerine sahip A549 hücre hatlarının kendi içinde değerlendirilmesi yapıldığında, CDH1 geninin ifade seviyelerinin düşmesi epitelyal özelliklerin azaldığını göstermektedir. Fakat akciğer sağlıklı hücre hattı BEAS ile bir kıyaslama yapıldığında, CDH1 geni ifadesinin A549 hücre hatlarında çok daha yüksek ifadesi görülmektedir. A549 hücre hatları primer tümör hücreleridir. Çoğu kanser türünde primer tümör hücreleri epitelyal özelliklere sahiptir (Liao ve Yang 2017).

Mezenkimal bir biyobelirteç olan VIM geni ifade seviyelerine bakıldığında A549-pH 7.4 hücre hattına göre diğer pH seviyelerinde düşüş gözlemlenmiştir. Fakat pH 7.0'a kadar olan ifade seviyesindeki düşüş pH 6.7 ve pH 6.4'te yükselişe geçme eğilimindedir ve A549-pH 7.4 hücre hattına en yakın Vimentin ifade seviyesi A549-pH 6.4'tedir. Sağlıklı

akciğer hücre hattı BEAS ile kıyaslama yapıldığında VIM geni ifade seviyeleri tüm A549 hücre hatlarında düşüktür.

Geçici asitleştirme (3-48 saat) ile adaptif (kronik) asitleştirme arasında tümör hücrelerinin verdiği tepkiler farklı olabilmektedir. Melonom tümör hücreleri üzerinde yapılan bir deneyde, hücreler 24 ve 48 saat süreyle pH 6.8 seviyesinde kültürlenmiştir. Kültürlenmiş hücreler pH 7.4 seviyesinde bulunan melanom hücrelerine göre daha çok metastatik aktivite göstermiştir. Fakat 48 saat boyunca pH 6.8 seviyesine maruz bırakılan hücreler daha sonradan pH 7.4 seviyesinde tekrardan kültürlendiklerinde metastatik seviyenin zamanla azaldığı ve 24 saat içinde pH 7.4 seviyesinde bulunan hücrelerle eşdeğer hale geldiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar geçici asitleştirmenin tümör hücreleri için kazanılmış olan bir fenotip değil “kısa süreli hafıza etkisi” denilen tersine çevrilebilir bir duruma neden olduğunu göstermiştir (Riemann vd. 2014). 2019 yılında LLC (Lewis Lung Carcinoma) hücre hatları üzerinde yapılan deneylerde tümör hücrelerinin 2-4 hafta süreyle pH 6.8 seviyesine adaptasyonları sağlanarak epitelyal ve mezenkimal markörler, MMP’ler ve metastatik aktivite kontrolleri gerçekleştirilmiştir. pH 6.8 seviyesine adaptasyonları sağlanan LLC hücre hatlarında mezenkimal bir belirteç olan ACT2 geninin ifadesinin azalma ve bazal epitel hücrelerin hücre iskeletini oluşturan KRT5 geninin ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara ek olarak, metastatik aktivitenin pH 6.8 seviyesine adaptasyonu sağlanmış hücrelerde daha fazla gözlemlendiği, bu metastatik aktivitenin pH 7.4’te 28 seri geçiş boyunca devam ettiği ve MET benzeri bir durumla sekonder tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. pH adaptasyonu ile metastatik aktivitenin geçici bir etki değil kazanılmış bir fenotip olduğu belirlenmiştir (Sutoo vd. 2020). Çalışmamızda, bahsedilen araştırmalara paralel bir şekilde A549 hücre hatlarında pH 7.4’e oranla pH 6.7 seviyesinde CDH1 geninin ifade seviyesinde artış gözlemlenirken, VIM geninin ifade seviyesinde düşüş gözlemlenmiştir. Ayrıca hücre canlılık analizinde pH 6.7 seviyesinin pH 7.4 seviyesine göre daha yüksek absorbans değerlerinin olduğu, ikiye katlanma süresinin daha kısa olduğu ve yara iyileşme deneyinde oluşturulan çiziği çok daha erken kapattığı görülmüştür. Sonuç olarak geçici pH değişikliği ile adaptasyon sağlanmış pH değişiklikleri arasında farklı mekanizmalar etkili olsa da agresif fenotipik özellikler gözlemlenmektedir. Geçici asitleştirme ve adaptif (kronik) asitleştirme DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu ile epigenetik değişikliklere sebep olmaktadır (Corbet vd. 2016; Chano vd. 2016).

A549 hücre hattında adaptasyonları sağlanmış farklı pH seviyeleri içerisinde de genlerin ifade seviyelerinde farklılıklar bulunmaktadır. Bu sebeple A549 hücre hatları pH seviyelerinin 3. hafta verilerine ek olarak 1 ve 2 ve 4. hafta verilerinin de elde edilmesi yapılacak yorumun genişletilebilmesi ve daha geniş bir perspektiften bakma açısından yararlı olabilir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Asidik pH RNA işlenmesini, transkripsiyonu, protein aktivitesini ve miRNA ifadesini etkileyebilen önemli bir değişimdir. Pek çok kanser türünde bu asiditeye doğru kayma söz konusu olup sağlıklı doku ve kanserli doku arasındaki en büyük fark akciğer kanserinde gözlemlenmektedir. Mevcut bulgularımız bir primer akciğer adenokarsinomu olan A549 hücre hattında asiditeye doğru kayan pH değişikliklerinde SOX9 ifadesinin azalışını işaret etmektedir ve farklı pH seviyeleri COL10A1 ifadesi üzerinde farklı etkiler göstermektedir. pH seviyeleri arasında özellikle pH 7.0 verileri dikkat çekicidir. Tüm adaptif pH seviyeleri verilerine bakıldığında ileri analizlerin yapılması, hücrelerin EMT ve MET süreçlerinin daha detaylı açıklanabilmesi, hücreler üzerinde erken dönemde yapılan pH değişikliği ve uzun süreli pH değişikliği etkilerine ışık tutulabilmesi için 1, 2 ve 4. hafta verilerinin de detaylı analizinin yapılması anlamlı olabilir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aleman, A., L. Adrien, L. Lopez-Serra, C. Cordon-Cardo, M. Esteller, T. J. Belbin, ve M. Sanchez-Carbayo. 2008. "Identification of DNA Hypermethylation of SOX9 in Association with Bladder Cancer Progression Using CpG Microarrays". *British Journal of Cancer* 98 (2): 466-73. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604143>.
- Alphonso, Aimee, ve Suresh K Alahari. 2009. "Stromal Cells and Integrins: Conforming to the Needs of the Tumor Microenvironment". *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11 (12): 1264-71.
- Anderson, Nicole M., ve M. Celeste Simon. 2020. "Tumor Microenvironment". *Current biology : CB* 30 (16): R921-25. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>.
- Bade, Brett C., ve Charles S. Dela Cruz. 2020. "Lung Cancer 2020". *Clinics in Chest Medicine* 41 (1): 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>.
- Beerling, Evelyne, Daniëlle Seinstra, Elzo de Wit, Lennart Kester, Daphne van der Velden, Carrie Maynard, Ronny Schäfer, vd. 2016. "Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity". *Cell Reports* 14 (10): 2281-88. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.034>.
- Belo, Jamie, Mansa Krishnamurthy, Amanda Oakie, ve Rennian Wang. 2013. "The Role of SOX9 Transcription Factor in Pancreatic and Duodenal Development". *Stem Cells and Development* 22 (22): 2935-43. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0106>.
- Blume-Jensen, Peter, ve Tony Hunter. 2001. "Oncogenic Kinase Signalling". *Nature* 411 (6835): 355-65. <https://doi.org/10.1038/35077225>.
- Brahimi-Horn, M. Christiane, ve Jacques Pouyssegur. 2007. "Oxygen, a Source of Life and Stress". *FEBS Letters, Cellular Stress*, 581 (19): 3582-91. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.018>.
- Brodsky, Barbara, ve Anton V. Persikov. 2005. "Molecular Structure of the Collagen Triple Helix". İçinde *Advances in Protein Chemistry*, 70:301-39. Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70009-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70009-7).
- Brody, Arnold R. 2005. "The Brush Cell". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172 (10): 1349-1349. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.172.10.1349>.

- Carmeliet, Peter, ve Rakesh K. Jain. 2011. "Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis". *Nature* 473 (7347): 298-307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.
- Cassidy, A., J. P. Myles, M. van Tongeren, R. D. Page, T. Liloglou, S. W. Duffy, ve J. K. Field. 2008. "The LLP Risk Model: An Individual Risk Prediction Model for Lung Cancer". *British Journal of Cancer* 98 (2): 270-76. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604158>.
- Chaffer, Christine L., Janelle P. Brennan, John L. Slavin, Tony Blick, Erik W. Thompson, ve Elizabeth D. Williams. 2006. "Mesenchymal-to-Epithelial Transition Facilitates Bladder Cancer Metastasis: Role of Fibroblast Growth Factor Receptor-2". *Cancer Research* 66 (23): 11271-78. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2044>.
- Chakravarty, Geetika, Krzysztof Moroz, Nick M. Makridakis, Shelby Elaine Lloyd, Sarah E. Galvez, Peter R. Canavella, Michelle R. Lacey, Krishna Agrawal, ve Debasis Mondal. 2011. "Prognostic Significance of Cytoplasmic SOX9 in Invasive Ductal Carcinoma and Metastatic Breast Cancer". *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.) 236 (2): 145-55. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010086>.
- Chano, Tokuhiro, Sofia Avnet, Katsuyuki Kusuzaki, Gloria Bonuccelli, Pierre Sonveaux, Dante Rotili, Antonello Mai, ve Nicola Baldini. 2016. "Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells". *American Journal of Cancer Research* 6 (4): 859-75.
- Chao, Yvonne L., Christopher R. Shepard, ve Alan Wells. 2010. "Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition". *Molecular Cancer* 9 (1): 179. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-179>.
- Corbet, Cyril, Adán Pinto, Ruben Martherus, João Pedro Santiago de Jesus, Florence Polet, ve Olivier Feron. 2016. "Acidosis Drives the Reprogramming of Fatty Acid Metabolism in Cancer Cells through Changes in Mitochondrial and Histone Acetylation". *Cell Metabolism* 24 (2): 311-23. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.003>.
- Darnell, James E. 2002. "Transcription Factors as Targets for Cancer Therapy". *Nature Reviews Cancer* 2 (10): 740-49. <https://doi.org/10.1038/nrc906>.
- Desjardins, Philippe, ve Deborah Conklin. 2010. "NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids". *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, sy 45 (Kasım): 2565. <https://doi.org/10.3791/2565>.

- Drozdov, Ignat, Irvin M. Modlin, Mark Kidd, ve Viktor V. Goloubinov. 2009. "From Leningrad to London: The Saga of Kulchitsky and the Legacy of the Enterochromaffin Cell". *Neuroendocrinology* 89 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1159/000140663>.
- Dutt, Amit, Alex H. Ramos, Peter S. Hammerman, Craig Mermel, Jeonghee Cho, Tanaz Sharifnia, Ajit Chande, vd. 2011. "Inhibitor-Sensitive FGFR1 Amplification in Human Non-Small Cell Lung Cancer". *PLOS ONE* 6 (6): e20351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020351>.
- efia. 2014. "Chapter 1 Organization of the Human Body". SlideServe. 01 Ağustos 2014. <https://www.slideserve.com/efia/chapter-1-organization-of-the-human-body>.
- Egeblad, Mikala, Morten G. Rasch, ve Valerie M. Weaver. 2010. "Dynamic Interplay between the Collagen Scaffold and Tumor Evolution". *Current Opinion in Cell Biology* 22 (5): 697-706. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.015>.
- Evans, M. J., L. S. Van Winkle, M. V. Fanucchi, ve C. G. Plopper. 2001. "Cellular and Molecular Characteristics of Basal Cells in Airway Epithelium". *Experimental Lung Research* 27 (5): 401-15. <https://doi.org/10.1080/019021401300317125>.
- Ferlay, Jacques, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman, ve Freddie Bray. 2015. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012". *International Journal of Cancer* 136 (5): E359-86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- Foster, J. W., M. A. Dominguez-Steglich, S. Guioli, C. Kwok, P. A. Weller, M. Stevanović, J. Weissenbach, S. Mansour, I. D. Young, ve P. N. Goodfellow. 1994. "Campomelic Dysplasia and Autosomal Sex Reversal Caused by Mutations in an SRY-Related Gene". *Nature* 372 (6506): 525-30. <https://doi.org/10.1038/372525a0>.
- Foster, Kimberly A., Christine G. Oster, Mary M. Mayer, Michael L. Avery, ve Kenneth L. Audus. 1998. "Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism". *Experimental Cell Research* 243 (2): 359-66. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4172>.
- Franzke, Claus-Werner, Peter Bruckner, ve Leena Bruckner-Tuderman. 2005. "Collagenous Transmembrane Proteins: Recent Insights into Biology and Pathology *". *Journal of Biological Chemistry* 280 (6): 4005-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400034200>.

- Friedl, Peter, Yael Hegerfeldt, ve Miriam Tusch. 2004. "Collective Cell Migration in Morphogenesis and Cancer". *The International Journal of Developmental Biology* 48 (5-6): 441-49. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041821pf>.
- Gabrielson, Edward. 2006. "Worldwide Trends in Lung Cancer Pathology". *Respirology* 11 (5): 533-38. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00909.x>.
- Ganesan, Shyamala, Adam T. Comstock, ve Uma S. Sajjan. 2013. "Barrier Function of Airway Tract Epithelium". *Tissue Barriers* 1 (4): e24997. <https://doi.org/10.4161/tisb.24997>.
- Geraldo, Marcos Tadeu, Guilherme Targino Valente, Rafael Takahiro Nakajima, ve Cesar Martins. 2016. "Dimerization and Transactivation Domains as Candidates for Functional Modulation and Diversity of Sox9". Editör Klaus Roemer. *PLOS ONE* 11 (5): e0156199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156199>.
- Giard, Donald J., Stuart A. Aaronson, George J. Todaro, Paul Arnstein, John H. Kersey, Harvey Dosik, ve Wade P. Parks. 1973. "In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2". *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 51 (5): 1417-23. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>.
- Griffiths, J. R. 1991. "Are cancer cells acidic?" *British Journal of Cancer* 64 (3): 425-27.
- Gunasinghe, N. P. A. Devika, Alan Wells, Erik W. Thompson, ve Honor J. Hugo. 2012. "Mesenchymal–Epithelial Transition (MET) as a Mechanism for Metastatic Colonisation in Breast Cancer". *Cancer and Metastasis Reviews* 31 (3): 469-78. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9377-5>.
- Guo, Y.-Z., X.-L. Xie, J. Fu, ve G.-L. Xing. 2018. "SOX9 Regulated Proliferation and Apoptosis of Human Lung Carcinoma Cells by the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway". *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 22 (15): 4898-4907. https://doi.org/10.26355/eurev_201808_15626.
- Hofschröer, Verena, Alexander Koch, Florian Timo Ludwig, Peter Friedl, Hans Oberleithner, Christian Stock, ve Albrecht Schwab. 2017. "Extracellular Protonation Modulates Cell-Cell Interaction Mechanics and Tissue Invasion in Human Melanoma Cells". *Scientific Reports* 7 (1): 42369. <https://doi.org/10.1038/srep42369>.
- Hsia, Connie CW, Dallas M. Hyde, ve Ewald R. Weibel. 2016. "Lung structure and the intrinsic challenges of gas exchange". *Comprehensive physiology* 6 (2): 827.

- Huang, Jing-Qiang, Fa-Kai Wei, Xiu-Li Xu, Shi-Xing Ye, Jun-Wei Song, Pei-Kun Ding, Jing Zhu, vd. 2019. "SOX9 drives the epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer through the Wnt/ β -catenin pathway". *Journal of Translational Medicine* 17 (1): 143. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1895-2>.
- Jolly, Lee Ann, Sergey Novitskiy, Phillip Owens, Nicole Massoll, Nikki Cheng, Wei Fang, Harold L. Moses, ve Aime T. Franco. 2016. "Fibroblast-Mediated Collagen Remodeling Within the Tumor Microenvironment Facilitates Progression of Thyroid Cancers Driven by BrafV600E and Pten Loss". *Cancer Research* 76 (7): 1804-13. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2351>.
- Junttila, Melissa R., ve Frederic J. de Sauvage. 2013. "Influence of Tumour Micro-Environment Heterogeneity on Therapeutic Response". *Nature* 501 (7467): 346-54. <https://doi.org/10.1038/nature12626>.
- Kalluri, Raghu, ve Robert A. Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition". *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420-28. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
- Kenny, Timothy C, Hank Schmidt, Kerin Adelson, Yujin Hoshida, Anna P Koh, Nagma Shah, John Mandeli, Jess Ting, ve Doris Germain. 2017. "Patient-Derived Interstitial Fluids and Predisposition to Aggressive Sporadic Breast Cancer through Collagen Remodeling and Inactivation of P53". *Clinical Cancer Research* 23 (18): 5446-59. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-0342>.
- Khan, Yusuf S., ve David T. Lynch. 2022. "Histology, Lung". İçinde *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534789/>.
- Kielty, C. M., A. P. Kwan, D. F. Holmes, S. L. Schor, ve M. E. Grant. 1985. "Type X Collagen, a Product of Hypertrophic Chondrocytes". *The Biochemical Journal* 227 (2): 545-54. <https://doi.org/10.1042/bj2270545>.
- Klein, G., E. Vellenga, M. W. Fraaije, W. A. Kamps, ve E. S. J. M. de Bont. 2004. "The Possible Role of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in Cancer, e.g. Acute Leukemia". *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 50 (2): 87-100. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.001>.
- Kowalski, Paul J., Mark A. Rubin, ve Celina G. Kleer. 2003. "E-Cadherin Expression in Primary Carcinomas of the Breast and Its Distant Metastases". *Breast Cancer Research: BCR* 5 (6): R217-222. <https://doi.org/10.1186/bcr651>.

- Kumar, Prasann, ve Tapan Kumar Mistri. 2020. "Transcription Factors in SOX Family: Potent Regulators for Cancer Initiation and Development in the Human Body". *Seminars in Cancer Biology* 67 (Pt 1): 105-13. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.016>.
- Latchman, D. S. 1997. "Transcription Factors: An Overview". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (12): 1305-12. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(97\)00085-x](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(97)00085-x).
- Laurent, G J. 1986. "Lung collagen: more than scaffolding." *Thorax* 41 (6): 418-28.
- Le Calvez, Florence, Anush Mukeria, Jay D. Hunt, Olaf Kelm, Rayjean J. Hung, Philippe Tanière, Paul Brennan, Paolo Boffetta, David G. Zaridze, ve Pierre Hainaut. 2005. "TP53 and KRAS Mutation Load and Types in Lung Cancers in Relation to Tobacco Smoke: Distinct Patterns in Never, Former, and Current Smokers". *Cancer Research* 65 (12): 5076-83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0551>.
- LeMessurier, Kim S., Meenakshi Tiwary, Nicholas P. Morin, ve Amali E. Samarasinghe. 2020. "Respiratory barrier as a safeguard and regulator of defense against influenza A virus and Streptococcus pneumoniae". *Frontiers in Immunology* 11: 3.
- Li, Tingting, Haipeng Huang, Guangyao Shi, Liying Zhao, Tuanjie Li, Ze Zhang, Ruoyan Liu, vd. 2018. "TGF-B1-SOX9 Axis-Inducible COL10A1 Promotes Invasion and Metastasis in Gastric Cancer via Epithelial-to-Mesenchymal Transition". *Cell Death & Disease* 9 (9): 849. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0877-2>.
- Liang, Yingkuan, Wenjie Xia, Te Zhang, Bing Chen, Hui Wang, Xuming Song, Zeyu Zhang, Lin Xu, Gaochao Dong, ve Feng Jiang. 2020. "Upregulated Collagen COL10A1 Remodels the Extracellular Matrix and Promotes Malignant Progression in Lung Adenocarcinoma". *Frontiers in Oncology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.573534>.
- Liao, Tsai-Tsen, ve Muh-Hwa Yang. 2017. "Revisiting Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis: The Connection between Epithelial Plasticity and Stemness". *Molecular Oncology* 11 (7): 792-804. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12096>.
- Libermann, Towia A., ve Luiz F. Zerbini. 2006. "Targeting Transcription Factors for Cancer Gene Therapy". *Current Gene Therapy* 6 (1): 17-33. <https://doi.org/10.2174/156652306775515501>.

- Lindeman, Neal I., Philip T. Cagle, Dara L. Aisner, Maria E. Arcila, Mary Beth Beasley, Eric H. Bernicker, Carol Colasacco, vd. 2018. "Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology". *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 142 (3): 321-46. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0388-CP>.
- Lindström, H. Jonathan G., ve Ran Friedman. 2020. "Inferring Time-Dependent Population Growth Rates in Cell Cultures Undergoing Adaptation". *BMC Bioinformatics* 21 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03887-7>.
- Liu, Chenghu, Shangxian Gao, Zhonghua Qu, ve Lining Zhang. 2007. "Tumor Microenvironment: Hypoxia and Buffer Capacity for Immunotherapy". *Medical Hypotheses* 69 (3): 590-95. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.12.053>.
- Liu, Sida, Han Dong, Hui Dai, Danwei Liu, ve Zhihao Wang. 2018. "MicroRNA-216b regulated proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by targeting SOX9". *Oncology Letters* 15 (6): 10077-83. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8573>.
- Macedo, Nicholas J, ve Tracie L Ferreira. t.y. "Maximizing Total RNA Yield from TRIzol® Reagent Protocol: A Feasibility Study".
- Massonneau, Julien, Camille Ouellet, Fabrice Lucien, Claire M. Dubois, Jessica Tyler, ve Guylain Boissonneault. 2018. "Suboptimal extracellular pH values alter DNA damage response to induced double-strand breaks". *FEBS Open Bio* 8 (3): 416-25. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12384>.
- Matakidou, A., T. Eisen, ve R. S. Houlston. 2005. "Systematic Review of the Relationship between Family History and Lung Cancer Risk". *British Journal of Cancer* 93 (7): 825-33. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602769>.
- Matsumoto, S., R. Iwakawa, K. Takahashi, T. Kohno, Y. Nakanishi, Y. Matsuno, K. Suzuki, vd. 2007. "Prevalence and Specificity of LKB1 Genetic Alterations in Lung Cancers". *Oncogene* 26 (40): 5911-18. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210418>.
- McGowan, Stephen E., ve Diann M. McCoy. 2011. "Fibroblasts Expressing PDGF-Receptor-Alpha Diminish during Alveolar Septal Thinning in Mice". *Pediatric Research* 70 (1): 44-49. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31821cfb5a>.
- Minna, John D, Jack A Roth, ve Adi F Gazdar. 2002. "Focus on Lung Cancer". *Cancer Cell* 1 (1): 49-52. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00027-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00027-2).

- Mucci, Lorelei A., Jacob B. Hjelmborg, Jennifer R. Harris, Kamila Czene, David J. Havelick, Thomas Scheike, Rebecca E. Graff, vd. 2016. "Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries". *JAMA* 315 (1): 68-76. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.17703>.
- Nieto, M. Angela. 2013. "Epithelial Plasticity: A Common Theme in Embryonic and Cancer Cells". *Science (New York, N.Y.)* 342 (6159): 1234850. <https://doi.org/10.1126/science.1234850>.
- Passeron, Thierry, Julio C. Valencia, Takeshi Namiki, Wilfred D. Vieira, Hélène Passeron, Yoshinori Miyamura, ve Vincent J. Hearing. 2009. "Upregulation of SOX9 Inhibits the Growth of Human and Mouse Melanomas and Restores Their Sensitivity to Retinoic Acid". *The Journal of Clinical Investigation* 119 (4): 954-63. <https://doi.org/10.1172/JCI34015>.
- Paxton, Steve, Michelle Peckham, ve Adele Knibbs. 2003. "The Leeds Histology Guide". https://www.histology.leeds.ac.uk/respiratory/basic_structure.php.
- Peppicelli, Silvia, Francesca Bianchini, Eugenio Torre, ve Lido Calorini. 2014. "Contribution of Acidic Melanoma Cells Undergoing Epithelial-to-Mesenchymal Transition to Aggressiveness of Non-Acidic Melanoma Cells". *Clinical & Experimental Metastasis* 31 (4): 423-33. <https://doi.org/10.1007/s10585-014-9637-6>.
- Perniss, Alexander, Shuya Liu, Brett Boonen, Maryam Keshavarz, Anna-Lena Ruppert, Thomas Timm, Uwe Pfeil, vd. 2020. "Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides". *Immunity* 52 (4): 683-699.e11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.005>.
- Planchard, D., S. Popat, K. Kerr, S. Novello, E.F. Smit, C. Faivre-Finn, T.S. Mok, vd. 2018. "Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up". *Annals of Oncology* 29 (Ekim): iv192-237. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275>.
- Provenzano, Paolo P., Kevin W. Eliceiri, Jay M. Campbell, David R. Inman, John G. White, ve Patricia J. Keely. 2006. "Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion". *BMC Medicine* 4 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-4-38>.

- Quail, Daniela F., ve Johanna A. Joyce. 2013. "Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis". *Nature Medicine* 19 (11): 1423-37. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.
- Quante, Michael, Shui Ping Tu, Hiroyuki Tomita, Tamas Gonda, Sophie S. W. Wang, Shigeo Takashi, Gwang Ho Baik, vd. 2011. "Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth". *Cancer Cell* 19 (2): 257-72. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.020>.
- Rami-Porta, Ramón, Vanessa Bolejack, Dorothy J. Giroux, Kari Chansky, John Crowley, Hisao Asamura, ve Peter Goldstraw. 2014. "The IASLC Lung Cancer Staging Project: The New Database to Inform the Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer". *Journal of Thoracic Oncology* 9 (11): 1618-24. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000334>.
- Rauschner, Mandy, Luisa Lange, Thea Hüsing, Sarah Reime, Alexander Nolze, Marcel Maschek, Oliver Thews, ve Anne Riemann. 2021. "Impact of the acidic environment on gene expression and functional parameters of tumors in vitro and in vivo". *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01815-4>.
- Ricard-Blum, Sylvie. 2011. "The Collagen Family". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (1): a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
- Riemann, Anne, Bettina Schneider, Daniel Gündel, Christian Stock, Oliver Thews, ve Michael Gekle. 2014. "Acidic Priming Enhances Metastatic Potential of Cancer Cells". *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 466 (11): 2127-38. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1458-6>.
- Rio, Donald C., Manuel Ares, Gregory J. Hannon, ve Timothy W. Nilsen. 2010. "Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent)". *Cold Spring Harbor Protocols* 2010 (6): pdb.prot5439. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>.
- Rosado-de-Christenson, M L, P A Templeton, ve C A Moran. 1994. "Bronchogenic Carcinoma: Radiologic-Pathologic Correlation." *RadioGraphics* 14 (2): 429-46. <https://doi.org/10.1148/radiographics.14.2.8190965>.
- Schabath, Matthew B., ve Michele L. Cote. 2019. "Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer". *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 28 (10): 1563-79. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0221>.

- She, Zhen-Yu, ve Wan-Xi Yang. 2015. "SOX Family Transcription Factors Involved in Diverse Cellular Events during Development". *European Journal of Cell Biology* 94 (12): 547-63. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.08.002>.
- Singer, Nora G., ve Arnold I. Caplan. 2011. "Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation". *Annual Review of Pathology* 6: 457-78. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130230>.
- Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, ve Freddie Bray. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71 (3): 209-49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Sutoo, Shusaku, Toyonobu Maeda, Atsuko Suzuki, ve Yasumasa Kato. 2020. "Adaptation to Chronic Acidic Extracellular PH Elicits a Sustained Increase in Lung Cancer Cell Invasion and Metastasis". *Clinical & Experimental Metastasis* 37 (1): 133-44. <https://doi.org/10.1007/s10585-019-09990-1>.
- Südbeck, P., ve G. Scherer. 1997. "Two Independent Nuclear Localization Signals Are Present in the DNA-Binding High-Mobility Group Domains of SRY and SOX9". *The Journal of Biological Chemistry* 272 (44): 27848-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.27848>.
- Thiery, Jean Paul. 2002. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Tumour Progression". *Nature Reviews. Cancer* 2 (6): 442-54. <https://doi.org/10.1038/nrc822>.
- Travis, William D., Elisabeth Brambilla, Masayuki Noguchi, Andrew G. Nicholson, Kim R. Geisinger, Yasushi Yatabe, David G. Beer, vd. 2011. "International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma". *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (2): 244-85. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318206a221>.
- Tsuji, Takanori, Soichiro Ibaragi, ve Guo-fu Hu. 2009. "Epithelial-Mesenchymal Transition and Cell Cooperativity in Metastasis". *Cancer Research* 69 (18): 7135-39. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1618>.
- Vaupel, P., F. Kallinowski, ve P. Okunieff. 1989. "Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review". *Cancer Research* 49 (23): 6449-65.

- Velmurugan, K. R., R. T. Varghese, N. C. Fonville, ve H. R. Garner. 2017. "High-Depth, High-Accuracy Microsatellite Genotyping Enables Precision Lung Cancer Risk Classification". *Oncogene* 36 (46): 6383-90. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.256>.
- Vervoort, Stephin J, Ana Rita Lourenço, Ana Tufegdžic Vidakovic, Enric Mocholi, José L Sandoval, Oscar M Rueda, Cynthia Frederiks, vd. 2018. "SOX4 can redirect TGF- β -mediated SMAD3-transcriptional output in a context-dependent manner to promote tumorigenesis". *Nucleic Acids Research* 46 (18): 9578-90. <https://doi.org/10.1093/nar/gky755>.
- Wang, Hai-yan, Ping Lian, ve Peng-Sheng Zheng. 2015. "SOX9, a potential tumor suppressor in cervical cancer, transactivates p21WAF1/CIP1 and suppresses cervical tumor growth". *Oncotarget* 6 (24): 20711-22.
- Wang, Xiaoying, Yanli Liu, Xiaoli Liu, Jingyan Yang, Guoxin Teng, Lulu Zhang, ve Chengjun Zhou. 2016. "MiR-124 Inhibits Cell Proliferation, Migration and Invasion by Directly Targeting SOX9 in Lung Adenocarcinoma". *Oncology Reports* 35 (5): 3115-21. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4648>.
- Wang, Yufei, James D. McKay, Thorunn Rafnar, Zhaoming Wang, Maria N. Timofeeva, Peter Broderick, Xuchen Zong, vd. 2014. "Rare Variants of Large Effect in BRCA2 and CHEK2 Affect Risk of Lung Cancer". *Nature Genetics* 46 (7): 736-41. <https://doi.org/10.1038/ng.3002>.
- Weibel, Ewald R., Bernard Sapoval, ve Marcel Filoche. 2005. "Design of Peripheral Airways for Efficient Gas Exchange". *Respiratory Physiology & Neurobiology* 148 (1-2): 3-21. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2005.03.005>.
- Wells, Alan, Clayton Yates, ve Christopher R. Shepard. 2008. "E-Cadherin as an Indicator of Mesenchymal to Epithelial Reverting Transitions during the Metastatic Seeding of Disseminated Carcinomas". *Clinical & Experimental Metastasis* 25 (6): 621-28. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9167-1>.
- White, Donald E., ve William J. Muller. 2007. "Multifaceted Roles of Integrins in Breast Cancer Metastasis". *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 12 (2-3): 135-42. <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9045-5>.
- Whitsett, Jeffrey A., ve Theresa Alenghat. 2015. "Respiratory Epithelial Cells Orchestrate Pulmonary Innate Immunity". *Nature Immunology* 16 (1): 27-35. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>.

- Whitsett, Jeffrey A., Tanya V. Kalin, Yan Xu, ve Vladimir V. Kalinichenko. 2019. "Building and regenerating the lung cell by cell". *Physiological reviews* 99 (1): 513-54.
- Whittaker, Charles A., Karl-Frederik Bergeron, James Whittle, Bruce P. Brandhorst, Robert D. Burke, ve Richard O. Hynes. 2006. "The Echinoderm Adhesome". *Developmental Biology* 300 (1): 252-66. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.044>.
- Wong, A. S., S. L. Maines-Bandiera, B. Rosen, M. J. Wheelock, K. R. Johnson, P. C. Leung, C. D. Roskelley, ve N. Auersperg. 1999. "Constitutive and Conditional Cadherin Expression in Cultured Human Ovarian Surface Epithelium: Influence of Family History of Ovarian Cancer". *International Journal of Cancer* 81 (2): 180-88. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990412\)81:2<180::aid-ijc3>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990412)81:2<180::aid-ijc3>3.0.co;2-7).
- Wong, Martin C. S., Xiang Qian Lao, Kin-Fai Ho, William B. Goggins, ve Shelly L. A. Tse. 2017. "Incidence and Mortality of Lung Cancer: Global Trends and Association with Socioeconomic Status". *Scientific Reports* 7 (1): 14300. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14513-7>.
- Zhang, Miao zun, Ming Jin, Zhiqiang Gao, Weiming Yu, ve Wei Zhang. 2022. "High COL10A1 Expression Potentially Contributes to Poor Outcomes in Gastric Cancer with the Help of LEF1 and Wnt2". *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 36 (9): e24612. <https://doi.org/10.1002/jcla.24612>.