

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

AKCİĞER KANSERİ KÖK HÜCRE SEKRETOMLARININ
PROTEOMİK ANALİZİ

Hazırlayan
FATİH ÖMERLİ

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi SEÇİL YILMAZ

Doktora Tezi

Eylül 2024

KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİMDALI

AKCİĞER KANSERİ KÖK HÜCRE SEKRETOMLARININ
PROTEOMİK ANALİZİ

Doktora Tezi

Hazırlayan

Fatih ÖMERLİ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi SEÇİL YILMAZ

Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2022-12454 kodlu proje ile desteklenmiştir

Eylül 2024

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kurallarının gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Fatih ÖMERLİ

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Akciğer Kanseri Kök Hücre Sekretomlarının Proteomik Analizi” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Fatih ÖMERLİ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ

Kök Hücre Bilimleri ABD Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

KABUL VE ONAY SAYFASI

Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ danışmanlığında **Fatih ÖMERLİ** tarafından hazırlanan “**Akciğer Kanseri Kök Hücre Sekretomlarının Proteomik Analizi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Kök Hücre Bilimleri** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

26.09.2024

JÜRİ:

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ

Üye : Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Üye : Dr. Öğr. Üyesi. Mete GÜNDOĞ

Üye : Doç. Dr. Burcu GÜNGÖR

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Şerife AYAZ GÜNER

İmza

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....
Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her zaman yardımcı olan, rehberlik eden, destek olan, deneyimleri ile yol gösteren ve bana güvenen çok değerli sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ'a teşekkür ederim.

Bilimsel bilgi birikimiyle ve tecrübeleriyle bana her zaman yol gösteren ve tez çalışmam boyunca bana destek olup yardımlarını hiçbir zaman esirgememiş olan sayın hocam Prof. Dr. Servet ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimin süresince bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen eden ekip arkadaşlarım Medine DOĞAN SARIKAYA, Elif Yaşar ve Nilhan MUTLU ve tüm ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yıllardır beraber çalışıp akademik öğrenimim boyunca destek olan, yardımını ve bilgisini hiç esirgmeden yanımda olan değerli arkadaşım Dr. Mustafa Burak ACAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarına yardım eden Melis GÜZEL'e, veri analizinde destek olan Murat ÇOKKEÇECİ'ye, Yardımlarından dolayı Hüseyin GÜNER'e teşekkür ederim.

Akademik öğrenimim boyunca yardım eden tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) ekibi ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Doktora tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Bana olan desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve beni bu günlere getiren aileme;

Sevgi ve saygı dolu içten teşekkürlerimi sunarım.

FATİH ÖMERLİ

Kayseri, Eylül 2024

AKCİĞER KANSERİ KÖK HÜCRE SEKRETOMLARININ PROTEOMİK ANALİZİ

Fatih ÖMERLİ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Eylül 2024

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ

ÖZET

Akciğer kanseri, özellikle de küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), dünya genelinde en fazla ölüme neden olan kanser türlerinden biridir. Kanser kök hücreleri (KKH), tümör oluşumu ve metastaz süreçlerinde kritik bir rol oynayan, kök hücre benzeri bir tümör alt popülasyonudur. Bu hücrelerin, diğer tümör hücrelerinden farklı genetik ifadeler ve proteomik profillere sahip olduğu düşünülmektedir. Proteom, bir organizmada üretilen tüm proteinlerin toplamını ifade eder ve sabit değildir; hücreden hücreye farklılık gösterebilir ve zamanla değişir. Sekretom ise hücreler tarafından dış ortama salgılanan proteinlerin toplamıdır ve teşhis, tedavi ve biyobelirteç keşfi için önemli hedefler sunmaktadır. Bu durumda kanser kök hücreleri, diğer hücrelerden farklı genetik ifadeleri yani farklı proteomik ifadeleri olması beklenir. Sekretomlar, kanser tanı ve tedavi hedefleri ile biyobelirteç keşfi için önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda küçük hücreli dışı akciğer kanseri olan A549 hücre hattından KKH'leri temsil eden CD133 ve pluripotent kök hücre belirteci olan CD326 ifade eden hücreler manyetik olarak aktive edilmiş hücre ayırma yöntemi ile izole edilmiştir. İzole edilen hücrelerin ve parental A549 hücrelerinin sekretom proteinleri sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) yöntemiyle bottom-up proteomik kullanılarak analiz edilmiştir. Gruplara ait özgün proteinlerin gen ontolojisi zenginleştirme analizi ile işlevleri belirlenmiş, ayrıca GEPIA2 kullanılarak tespit ettiğimiz proteinlerin diğer kanser türlerindeki varlığı ve ifade oranlarının sağkalım üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak, CD133 pozitif hücrelerin anjiyogenez, mezenkimal KKH farklılaşması ve hücre migrasyonu gibi işlevlere katkı sağladığı; CD326 pozitif hücrelerin ise epitelden mezenkimale geçiş, nöron farklılaşması ve plasenta morfogenezi gibi işlevleri ile pluripotent özellik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu hücrelerin metastazda rol oynayabileceği de tespit edilmiştir. Akciğer kanseri için SERPINE2 ve ADAM10, pluripotent KKH'ler için ise YWHAZ ve TRIM28 biyobelirteç adayları olarak belirlenmiştir. Çalışmamız, CD133 ve CD326 pozitif hücrelerin özgün sekretom proteinlerini detaylı bir şekilde analiz ederek, KKH'lerin biyolojik işlevlerini ve potansiyel biyobelirteçlerini belirlemeyi amaçlayan ilk çalışmalardan biridir. Bu çalışmanın sonuçları, akciğer kanserinde kök hücre alt popülasyonlarının sekretom proteinlerinin biyobelirteç keşfindeki potansiyelini ortaya koymaktadır. Ayrıca, elde edilen proteinler akciğer kanserinde erken tanı ve tedavi hedeflerinin geliştirilmesine yönelik gelecekteki araştırmalarda kullanılma potansiyeline de sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Kanser Kök Hücresi; Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri; Proteomiks; Sekretom.

PROTEOMIC ANALYSIS OF LUNG CANCER STEM CELL SECRETOMES

Fatih ÖMERLİ

Erciyes University, Health Sciences Institute,

Department of Stem Cell Sciences

Doctoral Thesis, September 2024

Supervisor: Asst. Prof. Seçil YILMAZ

ABSTRACT

Lung cancer, particularly non-small cell lung cancer (NSCLC), is one of the leading causes of cancer deaths worldwide. Cancer stem cells (CSCs) are a stem cell-like tumor subpopulation that play a critical role in tumorigenesis and metastasis. These cells are thought to have genetic expressions and proteomic profiles that differ from other tumor cells. Proteome refers to the sum of all proteins produced in an organism and is not fixed; it can vary from cell to cell and changes over time. Secretome is the sum of proteins secreted by cells to the external environment and offers important targets for diagnosis, treatment and biomarker discovery. In this case, cancer stem cells are expected to have different genetic expressions, i.e. different proteomic expressions, than other cells. Secretomes are important for cancer diagnosis and treatment targets and biomarker discovery. Therefore, in our study, cells expressing CD133, representing CSCs, and CD326, a pluripotent stem cell marker, were isolated from the A549 non-small cell lung cancer cell line using the magnetically activated cell separation method. Secretome proteins of the isolated cells and parental A549 cells were analyzed using bottom-up proteomics using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The functions of the unique proteins belonging to the groups were determined by gene ontology enrichment analysis. In addition, the proteins we identified were detected in other cancer types and the effect of their expression rates on survival was examined using GEPIA2. As a result, it was determined that CD133 positive cells contribute to functions such as angiogenesis, mesenchymal stem cell differentiation and cell migration; CD326 positive cells exhibit pluripotent properties with functions such as epithelial-mesenchymal transition, neuronal differentiation and placental morphogenesis. It was also determined that these cells may play a role in metastasis. SERPINE2 and ADAM10 were determined as biomarker candidates for lung cancer, and YWHAZ and TRIM28 were determined for pluripotent CSCs. Our study is one of the first studies aiming to determine the biological functions and potential biomarkers of cancer stem cells by analyzing the specific secretome proteins of CD133 and CD326 positive cells in detail. The results of this study reveal the potential of secretome proteins of cancer stem cell subpopulations in lung cancer in biomarker discovery. In addition, the obtained proteins have the potential to be used in future studies aimed at developing early diagnosis and treatment targets in lung cancer.

Keywords: Caner Stem Cell; Non-Small Cell Lung Cancer; Proteomics; Secretome.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xii
TABLO LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	1
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	6
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Akciğer Kanseri.....	9
2.2. Kök Hücre.....	10
2.2.1. Kanser Kök Hücresi.....	13
2.2. Proteomiks.....	15
2.2.1. Sekretom.....	16
2.2.2. Kütle Spektroskopisi.....	17
2.2.3. LC-MS/MS.....	19
2.2.4. Bottom-Up Proteomik.....	21
2.3. Biyoinformatik.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. A549 Hücre Hattı Kültürü.....	25
3.2. A549 Hücre Hattından CD133 Ve CD326 İfade Eden Hücrelerin Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) İle Eldesi.....	25
3.3. Kontrol, CD133 ve CD326 İfade Eden Hücrelerden Sekretom Eldesi.....	26
3.4. Bead Üzerindeki Proteinlerin Kütle Spektroskopi Analizine Hazırlanması.....	26
3.5. LC-MS/MS Analizi.....	27
3.6. Verilerin Analizi.....	29
4. BULGULAR.....	29
4.1. A549 Hücre Hattında CD133 Pozitif ve CD326 Pozitif Oranlarının Flow Sitometri Analizi.....	29
4.2. Kontrol Grubu, CD133 Pozitif ve CD326 Pozitif Hücrelerin Sekretom Protein Analizi.....	31
4.3. Kontrol Grubu Hücrelerin Sekretom Protein Analizi.....	33
4.4. CD326 Pozitif ve CD133 Pozitif Hücre Sekretom Protein Analizi.....	38
4.5. CD133 Pozitif ve CD326 Pozitif Hücrelerin Sekretom Proteinlerinin LFQ Analizi.....	

4.6. GEPIA 2 Kullanılarak Belirlenen Proteinlerin Kanserde İfade Düzeyleri ve Sağkalım Analizleri.....	46
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
7. KAYNAKLAR	64
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	



KISALTMALAR ve SİMGELER

ACN	:Acetonitrile
ACTB	:Actin, Cytoplasmic 1
ADAM10	:Disintegrin And Metalloproteinase Domain-Containing Protein 10
ALDH3A1	:Aldehyde Dehydrogenase, Dimeric NADP-Preferring
ANG	:Angiogenin
B4GALT1	:Beta-1,4-Galactosyltransferase 1
BCAM	:Basal Cell Adhesion Molecule
BSA	:Bovine Serum Albümin
CALD1	:Caldesmon
CXCL5	:C-X-C Motif Chemokine 5
DDX21	:Nucleolar RNA Helicase 2
DKK1	:Dickkopf-Related Protein 1
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
DPBS	:Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DPY30	:Protein Dpy-30 Homolog
EDTA	:Ethylenediaminetetraacetic Acid
EKH	:Embriyonik Kök Hücreler
EMT	:Epithelial Mesenchymal Transition / Epitel Mezenkimal Geçiş
FBS	:Fetal Bovine Serum
FGA	:Fibrinogen Alpha Chain
FGB	:Fibrinogen Beta Chain
FGG	:Fibrinogen Gamma Chain
FN1	:Fibronectin

GAPDH	:Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GEPIA2	:Gene Expression Profiling Interactive Analysis
GLOBOCAN	:The Global Cancer Observatory
HKH	:Hematopoietik Kök Hücreler
HPA	:Human Protein Atlas
HSPA7	:Putative Heat Shock 70 Kda Protein 7
IAA	:Indole-3-acetic Acid
IGFBP	:Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein
iPKH	:İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerde
KHAK	:Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	:Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KICH	:Böbrek Kromofob
KKH	:Kanser Kök Hücreleri
LAMC1	:Laminin Subunit Gamma-1
LC	:Sıvı Kromatografi
LC-MS/MS	:Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / Sıvı Kromatografi- Tandem Kütle Spektrometri
LFQ	:Label-Free Quantitation / Etiketsiz Kantifikasyon
LGG	:Beyin Düşük Dereceli Gliom
LTBP1	:Latent-Transforming Growth Factor Beta-Binding Protein 1
LUSC	:Akciğer Skuamöz Hücreli Karsinom
MACS	:Magnetic-Activated Cell Sorting / Manyetik Olarak Aktive Edilmiş Hücre Ayırma
MDH2	:Malate Dehydrogenase, Mitochondrial
MESO	:Mezotelyoma
MKH	:Mezenkimal Kök Hücre

MS	:Kütle Spektrometrisi
MS/MS	:Tandem Kütle Spektrometri
MUSE	:Multilineage-Differentiating Stress-Enduring
NRCAM	:Neuronal Cell Adhesion Molecule
PDAK	:Pankreas Duktal Adenokarsinomu
PTM	:Post-Translasyonel Modifikasyon
PTPRK	:Receptor-Type Tyrosine-Protein Phosphatase Kappa
SERPINE2	:Glia-Derived Nexin
SSEA-3	:Stage-Specific Embryonic Antigen 3
TCEP	:tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEAB	:Tetraethylammonium Bromide
TFA	:Trifluoroacetic Acid
TGFB	:Transforming Growth Factor Beta
TIMP1	:Metalloproteinase İnhibitor 1
TMSB4X	:Thymosin Beta-4
TRIM28	:Transcription İntermediary Factor 1-Beta
Tris	:Tromethamine
VTN	:Vitronectin
WHO	:World Health Organization / Dünya Sağlık Örgütü
YWHAZ	:14-3-3 Protein Zeta/Delta

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1. Hücre Gruplarının Özgün Protein Listesi	30
Tablo 4.2. Hücre Gruplarının LFQ Analizine Göre Upregüle ve Downregüle Edilen Proteinler	39



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1.	A549 Hücre Hattında CD133 ve CD326 Pozitif Hücrelerin Flow Sitometri Analizlerine Göre Oranları	29
Şekil 4.2.	Hücre Gruplarına Özgü Protein Sayılarının Ven Şeması Şeklinde Gösterimi	30
Şekil 4.3.	Kontrol Grubu Hücrelerin Proteinlerinin Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç Zenginleştirme Analizi Sonuçları	32
Şekil 4.4.	CD133 Pozitif Grubu Hücrelerin Proteinlerinin Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç Zenginleştirme Analizi Sonuçları	34
Şekil 4.5.	CD326 Pozitif Grubu Hücrelerin Proteinlerinin Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç Zenginleştirme Analizi Sonuçları	35
Şekil 4.6.	CD133 Pozitif Hücre Sekretom Proteinlerinin STRING Network Analizi ve Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç Analizi	37
Şekil 4.7.	CD326 Pozitif Hücre Sekretom Proteinlerinin STRING Network Analizi.....	38
Şekil 4.8.	CD133 Pozitif Hücrelerin Sekretom Proteinlerinin Kontrol Grubuna Göre Ekspresyon Farklılıklarını Gösteren Volkan Grafiği	40
Şekil 4.9.	CD326 Pozitif Hücrelerin Sekretom Proteinlerinin Kontrol Grubuna Göre Ekspresyon Farklılıklarını Gösteren Volkan Grafiği	41
Şekil 4.10.	CD326 Pozitif Grubun Upregüle Edilen Proteinlerinin STRING Network Analizi.....	43
Şekil 4.11.	CD133 Pozitif Grubun Upregüle Edilen Proteinlerinin STRING Network Analizi ve Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç Analizi.	44
Şekil 4.12.	CD326 Pozitif Hücre Grubunun Özgün Proteinlerinin İfadesinin Sağkalım Analizleri.	45
Şekil 4.13.	CD326 Pozitif Hücre Grubunun Özgün Proteinlerinin İfadesinin Kanser Türlerinde Sağkalım Analizleri.	46
Şekil 4.14.	CD326 Pozitif LFQ Upregüle Proteinlerinin İfadesinin Sağkalım Analizleri	47
Şekil 4.15.	CD326 Pozitif LFQ Upregüle Proteinlerinin İfadesinin Kanser Türlerine Göre Sağkalım Analizleri.	48

Şekil 4.16.	CD133 Pozitif Hücre Grubunun Özgün Proteinlerinin İfadesinin Sağkalım Analizleri.	50
Şekil 4.17.	CD133 Pozitif Hücre Grubunun Özgün Proteinlerinin İfadesinin Kansere Türlerinde Sağkalım Analizleri.	51
Şekil 4.18.	CD133 Pozitif LFQ Upregüle Proteinlerinin İfadesinin Sağkalım Analizleri	
Şekil 4.19.	CD133 Pozitif LFQ Upregüle Proteinlerinin İfadesinin Kansere Türlerine Göre Sağkalım Analizleri.	51



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, tümör oluşumuna ve kötü huylu hücrelerin vücutta potansiyel yayılmasına yol açabilen kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalmasıyla karakterize karmaşık bir hastalık grubudur. Kanser anlayışı, her biri benzersiz biyolojik özelliklere ve davranışlara sahip 100'den fazla farklı türü kapsadığı kabulüyle önemli ölçüde gelişmiştir. Kanser gelişiminin altında yatan temel ilkeler arasında çoğalma sinyallemesini sürdürmek, büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, hücre ölümüne direnmek, replikatif ölümsüzlüğü sağlamak, anjiyogenezi başlatmak ve istila ve metastazı aktive etmek yer alır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanser, biyolojik, çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin karmaşık bir etkileşimiyle karakterize edilen önemli bir küresel sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve çeşitli kanser kayıtları, farklı bölgelerdeki kanser teşhisi ve ölüm oranlarında endişe verici eğilimleri belgelemiştir. The Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) 2020 raporuna göre, dünya çapında yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser ölümü olmuştur ve bu da etkili önleme ve tedavi stratejilerine olan acil ihtiyacı vurgulamaktadır (Sung ve ark., 2021). Meme kanseri 2020'de tahmini 2,3 milyon yeni vaka ile küresel olarak en yaygın kanser olarak ortaya çıkarken, akciğer kanseri 1,8 milyon ölüme neden olarak kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir (Siegel ve ark., 2022).

Bu sağlık sorununun nedeni kanserin biyolojik, çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin karmaşık bir etkileşimiyle karakterize edilmesi ve yine karmaşık şekillerde etkileşime giren genetik, çevresel ve biyolojik faktörleri kapsayan çok yönlü doğasından kaynaklanmaktadır. Kanser yalnızca bir hastalık koleksiyonu değil, çeşitli hücresel bileşenler ve yollar arasındaki dinamik etkileşimlerle karakterize edilen karmaşık bir adaptif sistemdir. Bu karmaşıklık, tümör oluşumunun çeşitli

mekanizmalarında, kanser hücrelerinin heterojenliğinde ve hastaların tedaviye verdiği yanıtlardaki değişkenlikte belirgindir (Derbal, 2018). Dahası, kanser hastalığının evrimi, terapilere uyum sağlama ve direnç geliştirme yeteneğiyle belirlenir. Bu uyum yeteneği, tedavi başarısızlıklarına yol açabileceği ve aynı anda birden fazla yolu hedefleyebilen kombinasyon terapilerinin araştırılmasını gerektirdiği için kanserin karmaşıklığının bir işaretidir (Lopez ve Banerji, 2017).

Kanser ayrıca tümör mikroçevresinde çeşitli hücre tiplerinin varlığından kaynaklanan dikkate değer hücre heterojenliği ile de karakterize edilir. Bu karmaşıklık yalnızca kanserin bir özelliği olmakla kalmaz, aynı zamanda tümör ilerlemesinde, metastazda ve terapötik dirençte de önemli bir rol oynar. Çeşitli çalışmalar, kanser kök hücreleri (KKH'ler), bağımsız hücreleri ve stromal bileşenler dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinin tümörü şekillendirmedeki önemini vurgulamıştır. Kanser kök hücreleri, kendini yenileme ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip tümör hücrelerinin bir alt popülasyonudur. Bu durum tümör heterojenliğine ve tekrarına katkıda bulunur. KKH hipotezi, bu hücrelerin zorlu koşullarda hayatta kalmalarını ve tedavilerden kaçmalarını sağlayan benzersiz özelliklere sahip oldukları için tümör başlatma ve yayılımından sorumlu olduğunu ileri sürer (Leder ve ark., 2010). Araştırmalar, KKH'lerin çevresel ipuçlarına yanıt olarak farklı fenotipler arasında geçiş yapmalarını sağlayan esneklik gösterebildiğini ve bunun da metastatik potansiyelleri ve tedaviye dirençleriyle bağlantılı olduğunu göstermiştir (Das ve ark., 2020).

Kanser metastazı, kanserle ilişkili morbidite ve mortaliteye önemli ölçüde katkıda bulunan karmaşık ve çok yönlü bir süreçtir. Metastazın altında yatan mekanizmalar, lokal invazyon, intravazasyon, dolaşım, ekstrasvazasyon ve uzak organların kolonizasyonu dahil olmak üzere bir dizi adımı içerir. Bu adımların her biri, genetik değişiklikler, tümör mikroçevresi ve konak dokularıyla etkileşimler dahil olmak üzere çeşitli hücre ve moleküler faktörlerden etkilenir. Kanser metastazındaki kritik mekanizmalardan biri epitel-mezenkimal geçiştir (EMT), epitel hücrelerinin hücre polaritesini ve yapışma özelliklerini kaybettiği ve göç etme ve invaziv yetenekler kazandığı bir süreçtir. Bu geçiş, kanser hücrelerinin çevre dokulara invazyonu ve daha sonra uzak bölgelere yayılması için gereklidir (Park ve ark., 2022;

Wang ve ark., 2015). Bu durum kanser kök hücrelerin kendilerine özgün proteomik ifadelerinin olduğuna işaret etmektedir.

Proteomik, proteinlerin biyolojik sistemlerdeki işlevleri, yapıları ve etkileşimleri de dahil olmak üzere kapsamlı çalışmasına odaklanan hızla gelişen bir alandır. Bu disiplin, kütle spektrometrisi ve biyoinformatik gibi teknolojilerdeki gelişmeler nedeniyle önemli bir ivme kazanmıştır ve bu da karmaşık protein karışımlarının benzeri görülmemiş bir ölçekte analiz edilmesini sağlar (Graham ve ark., 2005). Kanser proteomiği, kanserle ilişkili proteinleri tanımlamak ve karakterize etmek için gelişmiş proteomik teknolojilerden yararlanan ve böylece tanı, prognoz ve terapötik yanıt için yeni biyobelirteçlerin keşfini kolaylaştıran hızla gelişen bir alandır (Hadjidemetriou ve ark., 2019).

Sekretom, bir hücre, doku veya organizma tarafından hücre dışı boşluğa salgılanan, hücreler arası iletişimde ve çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynayan tüm protein setini ifade eder. Bu proteinler, fizyolojik işlevleri düzenlemek ve çevresel uyarılara yanıtları iletmek için gerekli olan sitokinler, büyüme faktörleri ve enzimler gibi çeşitli proteinleri içerir (Tran ve Damaser, 2015). Proteomik teknolojilerdeki son gelişmeler, özellikle kanser biyolojisi bağlamında, sekretom hakkındaki anlayışımızı önemli ölçüde artırmıştır. Sekretomlar, tümör mikro ortamları, hücre sinyal yolları ve hastalıklar için potansiyel biyobelirteçler hakkında içgörüler ortaya çıkarabilmektedirler (Shevchenko ve ark., 2013). Kanser sekretomu, tümör hücreleri tarafından salgılanan karmaşık bir protein dizisinden oluşur ve kanserin ilerlemesi ile metastazında önemli bir rol oynar. Sekretomun, tümör mikroçevresindeki hem kanserli hem de kanserli olmayan hücrelerin davranışını etkileyebildiği ve böylece tümör büyümesini ve yayılmasını kolaylaştırdığı belirlenmiştir. Örneğin, araştırmalar kanser sekretomunun, doku protein lokalizasyonunu değiştirebileceğini ve bu salgılanan faktörlerin normal hücreleri kanserli hücrelere dönüştürebileceğini ve böylece tümör gelişimi için destekleyici bir mikroçevreyi teşvik edebileceğini göstermektedir (Hamilton ve ark., 2017).

Bu bilgiler ele alındığında, farklı hücrelerin farklı sekretom profillerinin olması beklenir. Kansere neden olan hücreleri üreten kanser kök hücrelerinin, tümör

içerisindeki diğer hücrelerden farklı genetik ifadeleri yani farklı proteomiks ifadeleri olması beklenir. Bu durumda, kanser heterojenesini oluşturan kanser kök hücreleri ve bu hücrelerin sekretom proteinlerinin araştırılması bu kök hücrelerin görevleri ve bu görevleri nasıl gerçekleştirdiklerinin incelenmesi önem arz etmektedir. Ayrıca farklı doku kaynaklarından oluşan kanser hücrelerinin, farklı dokularda metastaz oluşturma kapasitesi, pluripotent kök hücre özelliği gösteren bir kanser kök hücrenin varlığını işaret etmektedir. Bu çalışma, en sık görülen küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) türü üzerinde gerçekleştirilmiş olup, bu amaçla KHDAK modeli olarak kullanılan A549 hücre hattı tercih edilmiştir. Hücrelerin seçilmesi için manyetik olarak aktive edilmiş hücre ayırma yöntemi kullanıldı. Parental A549 hücre hattının sekretom proteinleri, A549 hücre hattından kanser kök hücresi için standart kabul edilen CD133 belirteci ile elde edilen hücrelerin sekretom proteinleri ve yine A549 hücre hattından kök hücreler için pluripotent belirteci kabul edilen CD326 (EpCAM) belirteci kullanılarak elde edilen hücrelerin sekretom proteinleri LS-MS/MS yöntemi ile belirlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında CD133 ve CD326 (EpCAM) pozitif hücrelerin özgün sekretom proteinlerini analiz ederek, bu hücrelerin biyolojik işlevlerini ve kanserle ilişkili özelliklerini anlamaktır. Bu analizler, potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesine ve erken tanı ile tedavi hedeflerinin geliştirilmesine katkı sağlamayı hedeflemektedir. Bu çalışma, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde CD133 ve CD326 (EpCAM) pozitif hücrelerin özgün sekretom proteinlerini detaylı bir şekilde analiz ederek, kanser kök hücrelerinin biyolojik işlevlerini ve potansiyel biyobelirteçlerini belirlemeyi amaçlayan ilk çalışmalardan biridir. KHDAK üzerinde çeşitli protein analizleri yapılmış olmasına rağmen, farklı alt popülasyonlara ait özgün proteinlerin kapsamlı işlev ve özelliklerinin incelendiği bir çalışmaya, mevcut literatürde rastlanmamıştır.

Bulunan proteinler arasından 3 gruba özgü olanlar tespit edilmiş ve bu proteinlerin fonksiyonları Gen Ontolojisi Zenginleştirme Analizi (Gene Ontology Enrichment Analysis) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu proteinlerin oluşturduğu bağlantılar ve bunların işlevleri de STRING-db kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca etiketsiz kantifikasyon yöntemi ile hücre gruplarının parental gruba göre daha fazla sekrete ettikleri proteinler yine STRING-db kullanılarak analiz edilmiştir. Belirlenen

proteinlerin ifadelerinin akciğer kanserinde ve diğer kanser türlerinde sağkalımı nasıl etkilediği GEPIA 2 ile incelenmiştir. Bu çalışma ve analizlerle yalnızca farklı kanser kök hücre gruplarının varlığı ve fonksiyonlarının tespiti değil, aynı zamanda akciğer kanseri için kullanılacak potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesi de amaçlanmıştır. Tespit edilen biyobelirteç adaylarının sekretom temelli olması, bu proteinlerin çeşitli vücut sıvılarından tespit edilebilme olasılığını artırmaktadır. Bu durum, potansiyel tarama yöntemlerinin geliştirilmesiyle kanser için kritik öneme sahip erken tanının yapılmasına olanak sağlayabilir. Ayrıca, hastalığın seyri, durumu ve agresifliği hakkında bilgi sunarak bu durumlara karşı yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Bu çalışmanın, ileride yapılacak daha kapsamlı araştırmalar için bir temel oluşturması ve yeni klinik biyobelirteç tespit uygulamalarına yol gösterici bir kaynak olması da hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, vücutta anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılmasıyla karakterize edilen karmaşık ve çok yönlü bir hastalık grubudur. Genellikle kanser olarak adlandırılan kötü huylu tümörler, lenfatik ve dolaşım sistemleri aracılığıyla çevre dokuları istila etme ve uzak organlara metastaz yapma potansiyeline sahiptir (Sucharitha ve Bhuvana 2023). Kanser patofizyolojisi, normal hücresel işlevleri bozan ve kontrolsüz hücre bölünmesine ve büyümesine yol açan genetik mutasyonlarda kök alır. Bu mutasyonlar, çevresel maruziyetler, yaşam tarzı seçimleri ve kalıtsal genetik yatkınlıklar dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. Genetik değişikliklerin birikmesi, hücre döngüsünü ve apoptozu düzenlemede kritik rol oynayan onkogenlerin aktivasyonuna veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olabilir. Bu genetik değişiklikler ve tümör mikro çevresi arasındaki etkileşim, iltihaplanma ve hipoksi gibi faktörler tümör oluşumunu destekleyebildiğinden kanser manzarasını daha da karmaşık hale getirmektedir (Brown ve ark., 2023).

Kanser istatistikleri, hastalığın küresel yükünü anlamak, kamu sağlığı girişimlerine rehberlik etmek ve kanser kontrol stratejilerini bilgilendirmek için önemlidir. GLOBOCAN 2022 tahminlerine göre, 2022'de dünya çapında yaklaşık 20 milyon yeni kanser vakası ve 9,7 milyon kanserle ilişkili ölüm meydana geldi ve bu da önemli bir kamu sağlığı sorununa işaret ediyor. Kanser geliştirme yaşam boyu riski hem erkekler hem de kadınlar için yaklaşık beşte birdir ve ölüm oranları dokuz erkekten birinin ve on iki kadından birinin kanserden öldüğünü göstermektedir (Bray, 2024). Küresel olarak meme kanseri, 2020'de bildirilen tahmini 2,3 milyon

yeni vaka ile akciğer kanserini geride bırakarak en sık teşhis edilen kanser olarak ortaya çıkmıştır (Sung ve ark., 2021).

Kanserin ekonomik etkileri büyüktür ve yalnızca sağlık hizmeti maliyetlerini değil aynı zamanda üretkenlik kayıplarını ve daha geniş ekonomik istikrarı da etkiler. Kanser bakımının mali yükü, tedavi ve hastane yatışları gibi doğrudan maliyetlerin yanı sıra hastalık ve erken ölüm nedeniyle kaybedilen üretkenlikle ilişkili dolaylı maliyetleri de içerir. Etki, düşük ve orta gelirli ülkelerde de benzer şekilde gözlemlenmektedir. Burada kanser türlerinin artan görülme sıklığı, sağlık hizmeti kaynaklarını sınırlamış ve ekonomik eşitsizlikleri daha da kötüleştirmiştir (Siegel ve ark., 2023).

Kanser karmaşıklığı, özellikle sistem biyolojisi merceğinden bakıldığında son yıllarda önemli ilgi gören çok yönlü bir zorluktur. Kanser yalnızca anormal hücrelerin bir koleksiyonu değil aksine, genetik, epigenetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimlerle karakterize edilen dinamik bir sistemdir. Bu karmaşıklık, tümör oluşumunu ve ilerlemesini yönlendiren altta yatan mekanizmaları anlamak için kapsamlı bir yaklaşımı gerektirmektedir. Kanser sistemleri biyolojisi, genomik, transkriptomik ve proteomik bilgiler de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik veri türlerini entegre ederek bu karmaşıklıkları çözmeyi amaçlamaktadır. Bu yaklaşım, araştırmacıların farklı moleküler bileşenlerin tümör davranışını etkilemek için nasıl etkileşime girdiğini açıklayabilen kanser yolaklarını ve ağlarının ayrıntılı modellerini oluşturmalarına olanak tanımaktadır. Bu da kanser biyolojisinin ortaya koyduğu zorlu soruları ele almak için disiplinler arası iş birliğine olan ihtiyacı vurgulamaktadır (Archer ve ark., 2016). Kanser hücrelerinin heterojenliği ise karmaşıklığa başka bir katman daha eklemektedir. Tümör davranışını anlamak, genellikle hücre tiplerinde ve bunlar arasındaki etkileşimlerde önemli çeşitlilikle karakterize edilen tümör dokuları içindeki networkların incelenmesini gerektirmektedir (Koutsogiannouli ve ark., 2013).

2.1.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, önemli bir küresel sağlık sorunu oluşturan karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Dünya çapında en yaygın kanser ve kanserle ilişkili ölümler akciğer kanseri kaynaklıdır. Hem erkekleri hem de kadınları etkilemektedir ve yüksek vaka

ve ölüm oranına sahiptir (Doğan ve Doğan, 2019). Öncelikle histolojik desenlere göre iki ana türe ayrılır: küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) (Huang ve ark., 2022). Akciğer adenokarsinomlarını, akciğer skuamöz hücreli karsinomlarını ve büyük hücreli karsinomları içeren KHDAK, akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85-90'ını oluşturur (Cheng ve ark., 2016; Huang ve ark., 2022). Öte yandan KHAK vakaların yaklaşık %15-20'sini temsil eder (Cheng ve ark., 2016).

Akciğer kanserlerinin çoğu tütün dumanında bulunan kanserojenlere uzun süreli maruziyet sonucu ortaya çıkar (Rudin ve ark., 2009). Ancak, akciğer kanserinin hiç sigara içmeyenlerde de ortaya çıkabileceğini ve bu kanserlerin etiolojisinde çevresel risk faktörlerinin de rol oynadığı bilinmektedir (Samet ve ark., 2009).

Akciğer kanseri tedavisinde son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilerek bu zorlu hastalıkla mücadele için daha etkili ve kişiselleştirilmiş yaklaşımlar sağlanmıştır. Terapötik seçenekler gelişmiş ve daha önce belirli müdahalelere uygun olmayan, akciğer fonksiyonu zayıf hastalarda da tedavi olanağı sağlanmıştır (Abdullah ve ark., 2016). Bu ilerlemeler arasında minimal invaziv cerrahi teknikleri, hedefli ilaç tedavileri ve akciğeri koruyan stereotaktik radyoterapi de yer almaktadır (Abdullah ve ark., 2016). İmmünoterapi, özellikle küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK) hasta sağ kalımını etkileyen umut verici bir tedavi yöntemi olarak ortaya çıkmıştır (Lahiri ve ark., 2023). Ek olarak, gen terapisi ve düşük doz sisplatin içeren kombinasyon tedavileri, fare modellerinde akciğer kanserini baskılamada umut verici sonuçlar göstermiştir (Bai ve ark., 2009).

Akciğer kanseri için tedavi seçenekleri artık hastalığın heterojenliğini ele alırken yan etkileri en aza indirmek için hedefli ajanları, immünoterapileri ve geleneksel sitotoksik tedavileri entegre eden çok yönlü bir yaklaşımı kapsamaktadır (La'ah, 2024). Dahası, biyobelirteçlerin tanımlanması ve kişiselleştirilmiş tedavinin kullanımı akciğer kanseri hastalarının tedavi kararlarına rehberlik etmede önemli hale gelmiştir (Domvri ve ark., 2013).

Biyobelirteçler ve proteomik, akciğer kanseri araştırmalarında erken teşhis, tanı, prognoz ve tedavi stratejilerine ilişkin içgörüler sağlamaktadır. Proteomik analiz, eksüdatif plevral efüzyonlar, ekshale edilen nefes kondensatı, akciğer kanseri hücre

hatlarının şartlandırılmış ortamı, serum ve bronkoalveolar lavaj sıvısı dahil olmak üzere çeşitli biyolojik örneklerde akciğer kanseri için potansiyel biyobelirteçler belirlemiştir (Liu ve ark., 2015; Matthiesen, 2020).

Proteomik profillemeye, akciğer kanseri ilerlemesinin ve tedavi yanıtlarının moleküler mekanizmalarını anlamada etkilidir. Çalışmalar, ektopik ATP sentaz inhibitörü sitreoviridin gibi tedavilere yanıt olarak protein ekspresyon düzeylerinde değişiklikler olduğunu ortaya çıkarmış ve potansiyel terapötik hedeflere ilişkin içgörüler sunmuştur (Wu ve ark., 2013). Proteomik stratejiler ayrıca tümör alt gruplarını tanımlamak, akciğer kanserinin histolojik tiplerini ayırt etmek ve çeşitli hasta popülasyonlarında sağ kalım sonuçlarını tahmin etmek için de kullanılmaktadır (Conrad ve ark., 2008; Jacot ve ark., 2008; Seike ve ark., 2005).

2.2. Kök Hücre

Kök hücreler, kendini yenileme ve çeşitli özel hücre tiplerine farklılaşma konusundaki yetenekleriyle karakterize edilen hücrelerdir. Kök hücreler, her biri farklılaşma potansiyeli ve kökenine göre tanımlanan totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücreler dahil olmak üzere çeşitli tiplere genel olarak kategorize edilebilir. Örneğin, embriyonik kök hücreler (EKH) ve pluripotent kök hücreler, vücuttaki hemen hemen tüm hücre tiplerine farklılaşabilir ve terapötik uygulamalar için iyi bir potansiyeldirler. (Chu, 2023; Jin ve ark., 2018). Embriyonik kök hücreler, blastosistin iç hücre külesinden türetilir ve çok yönlü yeteneklere sahiptir, yani vücuttaki herhangi bir hücre tipine farklılaşabilirler. Bu çok yönlülük, EKH'lerin bir özelliğidir ve embriyonik gelişim sırasında üç germ katmanına da katkıda bulunmalarını sağlar (Slack, 2021).

Buna karşılık, yetişkin kök hücreler tipik olarak multipotenttir yani buldukları dokuyla ilgili sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilirler. Örneğin, hematopoetik kök hücreler (HKH'ler) çeşitli kan hücresi tiplerine yol açabilirken, nöral kök hücreler nöronlara ve glial hücrelere farklılaşabilir (Slack, 2018).

Kök hücrelerin düzenlenmesi karmaşıktır ve genetik programlama gibi içsel faktörler ve buldukları mikroçevre veya "niş" gibi dışsal faktörlerden etkilenir (Gooi ve Gopalakrishnan, 2016). Niş, kök hücre özelliklerini koruyan ve kendi kendini yenileme ile farklılaşma gibi olayları düzenleyen temel sinyaller sağlar (Watt ve

Hogan, 2000). Kök hücre nişindeki bozulmalar, hematopoetik kök hücrelerde görüldüğü gibi kanser de dahil olmak üzere patolojik durumlara yol açabilir, niş değişiklikleri miyeloproliferatif bozukluklara yol açabilir (Perry ve Li, 2007).

Kök hücre araştırmalarındaki devam eden ilerlemeler, özellikle dejeneratif hastalıklar ve yaralanmalar bağlamında karşılanamayan klinik ihtiyaçları ele alma ihtiyacından kaynaklanmaktadır. Son çalışmalar, EKH'lerin nörodejeneratif hastalıklar ve omurilik yaralanmaları gibi daha önce tedavi edilemez olduğu düşünölen durumlar için terapiler geliştirmedeki potansiyelini vurgulamıştır (Borziak ve ark., 2021; Volarević ve ark., 2013). Dahası, transkriptomik ve proteomik de dahil olmak üzere çoklu omik yaklaşımların entegrasyonu, kök hücre davranışını yöneten moleküler mekanizmalar hakkında daha derin içgörüler sağlayarak, kendini yenileme ve farklılaşma süreçleri hakkındaki anlayışımızı geliştirmektedir (Wang ve ark., 2014; Young, 2011).

Kök hücre araştırmalarındaki son gelişmeler, nörodejeneratif bozukluklar, diyabet ve kalp hastalıkları da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde terapötik potansiyellerini vurgulamıştır (Lodi ve ark., 2011).

Ayrıca yapılan son çalışmalar, yetişkin insanda pluripotent kök hücrelerin varlığını da ortaya koymuştur. Multilineage-differentiating stress-enduring (MUSE) hücreler, pluripotent benzeri özellikleri, stres direnci ve tümör oluşturmama özelliği ile karakterize edilen mezenkimal kök hücrelerin (MKH'ler) benzersiz bir alt popölasyonunu temsil eder. İlk olarak 2010 yılında tanımlanan MUSE hücreleri, geleneksel mezenkimal belirteçler olan CD90 ve CD105'in yanı sıra, özellikle stage-specific embryonic antigen 3 (SSEA-3) olmak üzere spesifik yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile ayırt edilir (Fouad ve ark., 2018; Yamauchi ve ark., 2017). Bu ikili ekspresyon, MUSE hücrelerinin pluripotent kök hücrelere benzer özellikler sergilemesini sağlayarak, üç germ tabakasında da çeşitli hücre tiplerine farklılaşmalarını sağlar: ektoderm, mezoderm ve endoderm (Alessio ve ark., 2018; Yamashita ve ark., 2021).

2.2.1. Kanser Kök Hücresi

Kanser kök hücreleri (KKH'ler), tümör içindeki çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen ve kendini yenileme yetenekleriyle karakterize edilen bir tümör hücresi alt

popülasyonunu temsil eder. Bu kavram, bir tümör içindeki tüm hücrelerin aynı olmadığı; bunun yerine, normal kök hücrelere benzer şekilde küçük bir hücre fraksiyonunun tümör oluşumunu yönlendirdiği ve kanser heterojenliğine katkıda bulunduğu hipotezinden ortaya çıkmıştır (Chen ve ark., 2014; Gentry ve ark., 2009). KKH'ler, tümör başlangıcı, metastaz ve geleneksel tedavilere direnç dahil olmak üzere tedavi stratejilerini karmaşıklaştıran ve kanserin tekrarlamasına katkıda bulunan birkaç kritik süreçte yer almaktadır (Peng ve ark., 2024; Zhao ve ark., 2018).

KKH'lerin tanımlanması, tümör tipine bağlı olarak değişen spesifik hücre yüzey belirteçleri tarafından gerçekleştirilir. Örneğin, meme kanserinde, CD44+ /CD24- fenotipi genellikle KKH'lerle ilişkilendirilir (Burke ve ark., 2012; Kim ve Nam, 2011). Dahası, KKH'ler kemoterapi ve radyoterapi dahil olmak üzere geleneksel tedavilere karşı hayatta kalmalarını ve dirençlerini artıran farklı metabolik profiller ve sinyal yolları sergiler (Mehus, 2023; Spina ve ark., 2018; Kuo ve Ann, 2018). Bu direncin altında yatan mekanizmalar çok yönlüdür ve yavaş hücre döngüsü aktivitesi, gelişmiş DNA onarım yetenekleri ve apoptozdan kaçma gibi özelliklerini içerir (Chen ve ark., 2016; Hashemi ve ark., 2022).

Araştırmalar, KKH'lerin stemness yapısını düzenleyen çeşitli moleküler yolları ve transkripsiyon faktörlerini ortaya koymuştur. Oct4, Nanog ve Sox2 transkripsiyon faktörleri, farklı kanser türlerinde, normal kök hücrelerde olduğu gibi KKH'lerin özelliklerini korumak için de önemlidir. (Lin ve ark., 2022; Noh ve ark., 2012).

Son araştırmalar ayrıca tümör mikroçevresinin KKH özelliklerini korumadaki rolünü vurgulamaktadır. Hipoksi, inflamasyon ve hücre dışı matris bileşenleri gibi faktörler KKH davranışını etkileyerek hayatta kalmalarını ve kendini yenilemelerini destekleyebilmektedir (Kuo ve Ann, 2018; Ponomarev ve ark., 2022). Dahası, KKH'lerin esnekliği, terapötik baskılara uyum sağlamalarına olanak tanır ve bu da tümörler içinde ilaç dirençli popülasyonların ortaya çıkmasına neden olur (Batlle ve Clevers, 2017; Sharma ve Singh, 2011; Telang, 2022). Bu uyum sağlanabilirlik, geleneksel tedavilerin genellikle bu dirençli hücreleri ortadan kaldırmada başarısız olması ve hastalığın tekrarlamasına ve metastaza yol açması nedeniyle, özellikle KKH'leri hedef alan yeni terapötik stratejilere olan ihtiyacı vurgulamaktadır (Telang ve Katdare, 2012; Vicente-Dueñas ve ark., 2023).

2.3. CD133 ve CD326 Belirteçleri

CD133 çeşitli malignitelerde kanser kök hücreleri için önemli bir belirteç olarak ortaya çıkan bir pentaspan transmembran glikoproteindir. Tümör biyolojisindeki rolü çok yönlüdür ve tümör başlangıcı, metastaz ve tedavi direnci gibi süreçleri etkiler. CD133 ekspresyonu genellikle daha agresif bir tümör fenotipi ile ilişkilidir; bu CD133 pozitif kanser kök benzeri hücrelerin CD133 negatif benzerlerine kıyasla gelişmiş göç ve invaziv yetenekler sergilediğini gösteren çalışmalarla kanıtlanmıştır. 45 adenoid kistik karsinom hastası üzerinden yapılan çalışmada, CD133 pozitif gözlenen hastaların vaskülojenik taklit ve buna bağlı olarak migrasyon ve invazyon ile bağdaştırılmıştır. Ayrıca CD133 pozitif gözlenen hastaların bölgesel tekrarlama, uzak metastaz ve daha kötü prognoz göstermiştir. Ayrıca, CD133 pozitif KKH'lerin, CD133 negatif hücrelere kıyasla adenoid kistik karsinom göçüne ve invazyonuna katkıda bulunduğunu gösterilmiştir. Bu veriler, CD133'ün invazyon ve metastazla ilişkili olduğunu ve adenoid kistik karsinom da prognoz belirteci olarak işlev görebileceğini göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise akciğer kanseri CD133 pozitif hücrelerin tümör küreleri olarak sonsuza kadar büyüebildiği gösterilmiştir. Farklılaşma sonucunda ise CD133 pozitif özelliğini kaybeden hücrelerin ise tümör oluşturma potansiyelini kaybettiği rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2016).

23 çalışma ve 2538 hastanın incelenmiş olduğu bir başka yayında da yüksek düzeyde CD133 ekspresyonunun, KHDAK hastalarında daha kötü bir prognoz ve daha yüksek lenf nodu metastazı oranıyla ilişkili olma eğilimi göstermiştir ve bu da CD133'ün KHDAK hastaları için potansiyel bir patolojik prognostik belirteç olduğunu ortaya koyduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada mevcut meta-analiz CD133 ekspresyonunun zayıf bir genel sağkalım ve yüksek oranda lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir, Akciğer kanserinde potansiyel bir prognostik belirteç ve yararlı bir terapötik hedef olabileceği belirtilmiştir (Wu ve ark., 2014).

KHDAK hastası 305 Çinli hasta üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise CD133 pozitif hastaların, CD133 negatif hastalara göre sağkalım sürelerinin daha az olduğu gözlenmiştir. Bu durum CD133 pozitif hücrelerin hastalığın seyrini olumsuz etkilediği ve hastalığın daha agresif ilerlediğini göstermektedir (Wu ve ark., 2012).

Yapılan başka bir meta analizde ise 11 çalışmadan 1004 hasta incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre CD133 fenotipinin tümör farklılaşması, lenf nodu metastazı ile genel sağkalımı, bu belirtecin klinik uygulamalar için geliştirilebileceğini belirtilmiştir. Yine bu çalışmada CD133 pozitif hastaların, CD133 negatif hastalara göre sağkalım sürelerinin daha az olduğu gözlenmiştir (Qu ve ark., 2013).

CD326 veya EpCAM, hücre yapışması, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere tümör biyolojisinin çeşitli yönlerini etkileyerek akciğer kanserinde önemli bir rol oynamaktadır. EpCAM, özellikle küçük hücreli dışı akciğer kanserinde olmak üzere akciğer kanseri dokularında sıklıkla aşırı ifade edilir. Burada ifadesi ileri hastalık evreleri ve zayıf prognozla ilişkilendirilmiştir (Wang ve ark., 2021). Bu aşırı ifade, kanser hücrelerinde kök hücre benzeri özelliklerle ilişkili olan Wnt/ β -katenin yolu gibi tümör büyümesini ve metastazı teşvik eden sinyal yollarının aktivasyonu ile bağlantılıdır (Zhu ve ark., 2021). EpCAM baskılanmasının, son derece invaziv hücre hattı olan H358'de invazifliği azalttığını göstermiştir. Bu da EpCAM ifadesinin akciğer kanserinin invazyonunda önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. EpCAM ifadesinin akciğer kanseri hücrelerinin invaziv fenotipindeki rolünü doğrulamak için daha fazla hücre hattı kullanılarak, daha fazla analiz yapılması gerektiği de başka bir çalışmada belirtilmiştir (Hase ve ark., 2011). Bir başka çalışmada ameliyat sonrası adjuvan kemoterapi sonrasındaki kandaki dolaşan tümör hücrelerindeki EpCAM ifade oranı incelenmiş ve metastaz ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu durum EpCAM ifadesinin metastaz ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir (Zhen ve ark., 2021).

2.4. Proteomik

Proteomik, proteinlerin yapılarını, işlevlerini ve biyolojik sistemlerdeki etkileşimlerini kapsayan geniş ölçekli bir çalışma alanıdır. Bu disiplin, genler tarafından kodlanan proteinlerin dinamik doğasına ilişkin içgörüler sağladığı için genomik için kritik bir tamamlayıcı olarak ortaya çıkmıştır. DNA'nın statik dizilerine odaklanan genomikten farklı olarak, proteomik, çeşitli biyolojik uyarılara ve koşullara yanıt olarak oluşan protein ifadesinin, modifikasyonlarının ve etkileşimlerinin karmaşıklığını inceler (Conrad ve ark., 2008; Hanash, 2003).

Proteomiğin evrimi, özellikle kütle spektrometrisi ve sıvı kromatografisi olmak üzere analitik tekniklerdeki gelişmelerden önemli ölçüde etkilenmiştir. Bu teknolojiler araştırmacıların karmaşık biyolojik örneklerdeki proteinleri tanımlamasını ve miktarını belirlemesini sağlayarak protein modifikasyonlarının, etkileşimlerinin ve izoformlarının araştırılmasını kolaylaştırmaktadır (Taylor ve ark., 2007; Zhan, 2015). Proteomiğe yönelik sistematik yaklaşım iki ana alana ayrılabilir: proteinlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesine odaklanan profillemeye proteomiği ve bu proteinlerin biyolojik yollardaki rollerini ve etkileşimlerini inceleyen işlevsel proteomik (Maurer, 2004). Bu ikili yaklaşım, sağlık, hastalık ve çevresel tepkiler dahil olmak üzere çeşitli bağlamlarda protein dinamiklerinin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamaktadır.

Proteomik, protein işlevi ve düzenlemesi için kritik olan post-translasyonel modifikasyonları (PTM'lar) açıklamakta önemli bir rol oynamaktadır. Bu modifikasyonlar protein aktivitesini, lokalizasyonunu ve etkileşimlerini önemli ölçüde değiştirebilir ve böylece hücresel süreçleri etkileyebilmektedir (Jiang, 2024). PTM'lari sistematik bir şekilde inceleme yeteneği, araştırmacıların hücresel işlevleri ve çevresel değişikliklere verilen yanıtları yöneten düzenleyici ağları ortaya çıkarmalarına olanak tanımaktadır (Coorssen, 2024).

Dahası, proteomiğin transkriptomik ve metabolomik gibi diğer omik teknolojileriyle bütünleştirilmesi, biyolojik sistemlere dair daha bütünsel bir bakış açısının önünü açmıştır. Araştırmacılar protein ifadesini, gen ifadesi ve metabolik profillerle ilişkilendirerek karmaşık düzenleyici ağları ortaya çıkarabilmekte ve hastalıklar için potansiyel biyobelirteçleri belirleyebilmektedirler (Carty ve ark., 2013).

Proteomik, kanser araştırmalarında erken tanı, prognoz ve tedavi stratejilerini geliştirebilecek biyobelirteçlerin tanımlanmasını kolaylaştıran temel bir araç olarak ortaya kullanılmaktadır. Kantitatif proteomiğin uygulanması, hücre hatları, klinik örnekler ve vücut sıvıları gibi çeşitli örnek kaynaklarını kullanarak çeşitli kanser türlerinde kanser biyobelirteçlerini karakterize etmede etkili olmaktadır. Bu çok yönlülük, proteomun kapsamlı bir analizine olanak tanımakta ve hastalığın varlığını, ilerlemesini ve tedaviye yanıtı gösterebilen biyobelirteçlerin keşfini sağlamaktadır (Maes ve ark., 2015; Yang ve ark., 2021). Plazma ve serum proteomlarının analizi,

çok sayıda çalışmada meme ve pankreas kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanserler için potansiyel biyobelirteçler bildirilmesiyle önemli bulgular ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar, meme kanseri için tanı belirteçleri olarak kullanılabilir serumdaki bir protein panelini tanımlamış ve biyobelirteç tespitinde yüksek duyarlılık ile özgüllüğün önemini vurgulamıştır (Pan ve ark., 2011; Wang ve ark., 2017).

Proteomik, kanserin altında yatan moleküler mekanizmaları anlamada da önemli bir rol oynamaktadır. Sinyal yollarını ve protein etkileşimlerini haritalayarak, araştırmacılar tümörlerin patolojisi hakkında fikir edinebilmekteler. Çalışmalar, proteomik analizlerin menenjiyomlardaki sinyal yolları değişiklikleri ortaya çıkarabileceğini ve tümör davranışının ve potansiyel terapötik hedeflerin anlaşılmasına yardımcı olabileceğini göstermiştir (Sharma ve ark., 2015). Dahası, biyoinformatik araçlarının proteomik çalışmalara entegre edilmesi, biyobelirteçlerin tanımlanmasını ve doğrulanmasını artırmaktadır (Vandenbrouck ve ark., 2019).

Proteomik uygulamalarının, kanserin ötesine uzanarak sinirbilim, kardiyovasküler araştırma ve bitki biyolojisi gibi alanları da etkileyerek karmaşık biyolojik soruları ele almadaki çok yönlülüğünü ve önemini ortaya koymaktadır (Lam ve ark., 2008; Nordon ve ark., 2009).

2.4.1. Sekretom

"Sekretom" terimi, belirli koşullar altında bir hücre, doku veya organizma tarafından salgılanan proteinlerin tam setini ifade etmektedir. Bu kavram, özellikle hücresel iletişimin ve salgılanan proteinlerin çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolünün anlaşılmasında biyolojik araştırmalarda öne çıkmıştır. Sekretom, hücreler ve mikro çevreleri arasındaki etkileşimleri aracılık etmek için çok önemli olan büyüme faktörleri, sitokinler ve enzimler dahil olmak üzere çok çeşitli proteinleri kapsamaktadır (Cunha ve ark., 2019; Hathout, 2007).

Sekretomun bileşimi hücresel kaynağa ve biyolojik aktivitesi ile terapötik etkinliğini etkileyen çevresel duruma bağlı olarak önemli ölçüde değişebilir (Sipos ve Múzes, 2022). Örneğin, mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), bağışıklık tepkilerini düzenleyebilen, hücre sağkalımını destekleyebilen ve doku onarım süreçlerini

geliştirebilen çeşitli sinyal molekülleri salgılamaktadır (Hocking ve ark., 2010; Mirabdollahi ve ark., 2019; Zagoura ve ark., 2019).

Son çalışmalar, yara iyileşmesi ve nöroproteksiyon dahil olmak üzere çeşitli klinik bağlamlarda sekretomun terapötik potansiyelini vurgulamıştır. Yağ kaynaklı kök hücrelerden türetilen sekretomun, fibroblast çoğalmasını ve göçünü teşvik ederek yara iyileşmesini hızlandırdığı ve böylece doku onarımını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Damayanti ve ark., 2021; Lee ve ark., 2017). Benzer şekilde, göbek kordonu MKH'lerinden elde edilen sekretom, travmatik beyin yaralanmalarından sonra nörogenezi ve bilişsel iyileşmeyi artırarak nöroprotektif etkiler göstermiştir (Liu ve ark., 2019; Wuschko ve ark., 2019).

Kanser kök hücresi araştırmalarında sekretomların incelenmesi, tümör mikroçevresindeki hücrel etkileşimleri aracılık etmedeki temel rolleri nedeniyle önemli bir ivme kazanmıştır. Hücreler tarafından salgılanan çeşitli proteinler, metabolitler ve sinyal moleküllerinden oluşan sekretomlar, kanser hücrelerinin ve kök hücre karşılıklarının davranışlarını etkilemektedir (Wanandi ve ark., 2020). Kanser hücrelerinin salgılarını çevresel değişikliklere yanıt olarak uyarılma yeteneği gözlenmiştir (Zhou ve ark., 2016). Bu uyarlanabilirlik, özellikle tümör tekrarı ve metastazında sıklıkla rol oynayan KKH'ler bağlamında, salgıların kanser biyolojisindeki rolünün karmaşıklığını vurgulamaktadır.

Sekretomları inceleme metodolojileri, hücreler tarafından salgılanan proteinleri analiz etmek için gelişmiş proteomik teknikler kullanılmaktadır. Yüksek verimli tarama yöntemleri, yeni salgılanan proteinlerin ve çeşitli biyolojik işlevsel rollerinin tanımlanmasına olanak tanımaktadır (Ding ve ark., 2020; Ding ve ark., 2021). Bu yaklaşımlar, kanser ve otoimmün bozukluklar dahil olmak üzere hastalıklar için potansiyel terapötik hedefler veya biyobelirteçler olarak hizmet edebilecek sekretom bileşenlerinin keşfini kolaylaştırmaktadır (Lacerenza ve ark., 2020; Lawlor ve ark., 2009).

2.5. Kütle Spektroskopisi

Kütle spektrometresi, iyonların kütle-yük oranını ölçmek için kullanılan analitik bir araçtır. Bu teknik, kimya, biyoloji ve tıp gibi çeşitli bilimsel alanlarda, numunedeki kimyasal bileşiklerin tanımlanmasını ve miktarlarının belirlenmesini sağlamaktadır.

Kütle spektrometrisinin temel ilkesi, kimyasal türlerin iyonlaştırılmasını ve iyonların kütle-yük oranlarına göre sıralanmasını içerir ve bu da analiz edilen numunenin bileşiminin belirlenmesini sağlar (Wang ve ark, 2023).

İşlem tipik olarak üç ana aşamayı içerir: numunenin iyonlara dönüştürüldüğü iyonizasyon; iyonların bir elektrik alanı tarafından hızlandırıldığı ivme ve iyonların kütle-yük oranlarına göre sıralandığı ve belirlendiği edildiği tespit. Farklı tipteki kütle spektrometreleri, her biri belirli uygulamalar için uygun olan elektron darbesi, kimyasal iyonizasyon ve matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) gibi çeşitli iyonizasyon yöntemlerini kullanır (Becker, 2007; Toyoda ve ark., 2003).

Kütle spektrometrisinin çok yönlülüğü, özellikle karmaşık protein karışımlarını analiz etmek için temel taş görevi gördüğü proteomikte olmak üzere geniş uygulama yelpazesine sahiptir. Biyobelirteç keşfi ve klinik teşhis için çok önemli olan proteotipik peptitlerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Li ve ark., 2008; Mischak ve ark., 2009). Dahası, kütle spektrometrisi protein yapıları ve etkileşimlerini aydınlatmada etkili olmuş ve böylece moleküler düzeyde biyolojik süreçlere ilişkin içgörüler sağlamıştır (Aebersold ve Mann, 2016; Yates ve ark., 2009). Kütle spektrometrisinin kapiler elektroforez gibi diğer analitik tekniklerle bütünleştirilmesi, yeteneklerini daha da genişletmiş ve proteinlerin ile metabolitlerin yüksek çözünürlüklü analizine olanak sağlamaktadır (Gomes ve Yates, 2019).

Ayrıca kütle spektrometrisi, biyolojik örneklerdeki proteinleri ve metabolitleri analiz etmek için kullanıldığı proteomik ve metabolomikte kritik bir rol oynamaktadır. Biyomoleküllerin kantitatif analizini ve yapısal karakterizasyonunu gerçekleştirme yeteneği, kütle spektrometrisini modern biyolojik araştırmalarda vazgeçilmez bir araç haline getirmiştir (Heck, 2008; Werner, 2004). Ek olarak, kütle spektrometrisinin kromatografi gibi diğer tekniklerle bütünleştirilmesi, analitik yeteneklerini daha da artırarak karmaşık biyolojik sistemlerin kapsamlı analizini mümkün kılmaktadır (Chernushevich ve ark., 2001).

2.5.1. LC-MS/MS

Sıvı Kromatografi- Tandem Kütle Spektrometri (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; LC-MS/MS), klinik tanı, farmakokinetik ve çevresel izleme dahil olmak üzere çeşitli alanlarda temel bir analitik teknik olarak ortaya çıkmıştır.

Bu yöntem, sıvı kromatografisinin (LC) ayırma kabiliyetlerini, tandem kütle spektrometrisinin (MS/MS) tespit gücüyle birleştirerek, karmaşık biyolojik matrislerde bile çok çeşitli bileşiklerin hassas bir şekilde ölçülmesini ve tanımlanmasını sağlar. LC-MS/MS'nin temel prensibi, analitlerin sıvı fazda ayrılmasını, ardından kütle spektrometresinde iyonizasyonunu ve parçalanmasını içerir (Chen ve ark., 2022).

LC-MS/MS'in çok yönlülüğü, hormonların, ilaçların ve metabolitlerin ölçümü için kullanıldığı klinik uygulamalarda özellikle dikkat çekicidir. Örneğin, çalışmalar LC-MS/MS'in immünolojik analizlere kıyasla tiroid hormonlarını ölçmede üstün doğruluk sağladığını göstererek endokrinolojide tanı doğruluğunu iyileştirme potansiyelini vurgulamıştır (Kushchayeva, 2019). Ek olarak, yöntem immünosüpresif ilaçların analizi için doğrulanmış olup, terapötik ilaç izlemedeki önemini ortaya koymuştur (Deslandes ve ark., 2016). Birden fazla analiti aynı anda analiz etme yeteneği, klinik ortamlardaki kullanımını daha da artırarak kapsamlı metabolik profillemeye olanak tanımaktadır (Hua ve ark., 2022). Avantajlarına rağmen, LC-MS/MS tekniğinin zorlukları vardır. Teknik, iyon baskılama ve izobarik girişimler gibi ölçümlerin doğruluğunu etkileyebilecek girişimlere karşı hassas olabilir. Bu nedenle, sonuçların güvenilirliğini sağlamak için titiz veri inceleme kriterleri ve yöntem doğrulama protokolleri oluşturmak çok önemlidir (Eisenhofer ve ark., 2017; Sauvage ve ark., 2008). Ek olarak, LC-MS/MS'deki veri analizinin karmaşıklığı, sonuçları doğru bir şekilde yorumlamak için gelişmiş yazılım ve deneyimli personel kullanımını gerektirmektedir (Hua ve ark., 2022).

Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi özellikle biyobelirteç keşfi, ilaç kantifikasyonu ve proteomik profillemeye için kanser araştırmalarında temel bir analitik teknik olarak ortaya çıkmıştır. LC-MS/MS'nin duyarlılığı ve özgüllüğü, onu kanser teşhisi ve tedavi izleme bağlamında kritik öneme sahip olan karmaşık biyolojik örnekleri analiz etmek için önemli bir araç haline getirmektedir. LC-MS/MS'in önemli avantajlarından biri, kanserin varlığını veya tekrarını gösterebilen biyobelirteçleri tespit etmek için gerekli olan yüksek duyarlılığı ve özgüllüğüdür. LC-MS/MS kullanılarak yapılan metabolomik profillemenin, meme kanseri araştırmalarında görüldüğü gibi, kanserli ve kanserli olmayan dokular arasında etkili bir şekilde ayırım yapabileceğini göstermiş; burada belirli metabolit profilleri

hastalığın tekrarıyla ilişkilendirilmiştir (Asiago ve ark., 2010). Benzer şekilde, pankreas kanserinde, hedeflenmemiş LC-MS metabolomikleri, pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC) ile kronik pankreatit arasında ayırım yapmak için kullanılmış ve bu tekniğin biyobelirteç görevi gören yeni metabolitleri tespit etme potansiyelini ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2021; Lindahl ve ark., 2017).

Ayrıca, LC-MS/MS onkoloji ilaçlarının farmakokinetik çalışmalarında etkili olmuştur. Bu yöntem, klinik ortamlarda ilaç etkinliği ve güvenliğini değerlendirmek için çok önemli olan biyolojik matrislerdeki küçük molekülü ilaçların hızlı bir şekilde kantifikasyonuna olanak tanımaktadır (Wong ve ark., 2018).

Biyobelirteç keşfi ve ilaç kantifikasyonundaki rolüne ek olarak, LC-MS/MS ayrıca kanserdeki protein ekspresyon değişikliklerini araştırmak için proteomikte de kullanılmaktadır. Teknik, tümörlü dokulara kıyasla normal dokularda farklı şekilde veya tümöre özel ifade edilen proteinlerin tanımlanmasını sağlayarak kanser ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmalara ilişkin içgörüler sağlamaktadır (Bereman ve ark., 2014; Rudnick ve ark., 2010). LC-MS/MS'in çok yönlülüğü, erken evre kanserleri tespit etme ve tedavi yanıtlarını izlemek için vücut sıvılarındaki metabolitleri analiz edebildiği sıvı biyopsilerdeki uygulamasına kadar uzanmaktadır. Bu invaziv olmayan yaklaşım, invaziv doku biyopsilerine ihtiyaç duyulmadan hastalık durumunun gerçek zamanlı izlenmesine olanak tanıdığı için klinik onkolojide özellikle değerlidir (Özer ve ark., 2022).

2.5.2. Bottom-Up Proteomik

Bottom-up proteomik, sıklıkla shotgun proteomik olarak anılır, kütle spektrometrisi (MS) teknikleri kullanılarak analiz edilmelerinden önce proteinlerin daha küçük peptitlere enzimatik sindirimini içeren proteomik alanında yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Bu yöntem, tanımlanan peptitlerden protein varlığını ve bolluğunu çıkararak karmaşık protein karışımlarının kapsamlı karakterizasyonuna olanak tanır. İşlem tipik olarak proteinlerin proteolitik sindirimiyle başlar ve genellikle tripsin gibi enzimler kullanılarak proteinleri belirli amino asit kalıntılarından ayırır ve sıvı kromatografisi ile tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) birleştirilerek daha kolay analiz edilebilen peptitlerle sonuçlanır (Jiang, 2024; Liang ve ark., 2023; Miller ve ark., 2021).

Bottom-up proteomik iş akışı tipik olarak proteinlerin proteolitik sindirimiyle başlar, öncelikle belirli amino asitleri belirli bölgelerde parçalayan tripsin kullanılır. Bu adım kritiktir, çünkü proteaz seçimi peptit tanımlamasının kalitesini ve sonraki protein çıkarımını önemli ölçüde etkileyebilir (Miller ve ark., 2021). Numune hazırlama tekniklerindeki gelişmeler, bu sürecin verimini ve tekrarlanabilirliğini artırmada önemli rol oynamış ve kalp dokusu gibi küçük miktarlarda biyolojik materyalin bile analizine olanak sağlamıştır (Aballo ve ark., 2021).

Kütle spektrometrisi teknolojisindeki son gelişmeler de bottom-up proteomiğin evrimine katkıda bulunmuştur. Kütle spektrometrelerinin gelişmiş kütle doğruluğu, çözme gücü ve hassasiyeti, proteinlerin işlevsel çeşitliliğini anlamak için çok önemli olan translasyon sonrası modifikasyonların (post translational modifications; PTM) ve proteoformların tanımlanmasını kolaylaştırmıştır (Bamberger ve ark., 2018; Chen ve ark., 2021). Ek olarak, biyoinformatik araçlarının ortaya çıkması, araştırmacıların yüksek verimli proteomik deneyler tarafından oluşturulan karmaşık veri kümelerini ele almasını sağlayarak veri analizini kolaylaştırmıştır (Nickerson ve ark., 2023; Quast ve ark., 2021).

Bottom-up proteomiğin temel avantajlarından biri, yüksek çözünürlüklü ayırma ve yüksek protein kapsamı kapasitesidir. Bu, özellikle spesifik protein değişikliklerinin tanımlanmasının tümör biyolojisi ve potansiyel terapötik hedefler hakkında fikir verebileceği kanser araştırmalarında oldukça önemlidir (Darville ve Sokolowski, 2014). Gelişmiş kromatografik tekniklerin entegrasyonu, araştırmacıların kanser için biyobelirteç görevi görebilecek düşük miktardaki proteinleri tanımlamak için gerekli olan daha derin proteom kapsamına ulaşmalarını sağlamıştır (Liang ve ark., 2023; Wang ve ark., 2022). Bottom-up proteomiğiyle birlikte hedefli kütle spektrometrisinin kullanılması, biyobelirteçlerin doğrulanmasını ve proteinlerin kantifikasyonunu kolaylaştırmış, böylece klinik ortamlarda proteomik analizlerin güvenilirliğini artırmıştır (Manes ve Nita-Lazar, 2018).

Son çalışmalar, hasta kaynaklı tümör ksenogreflerini karakterize etmede bottom-up proteomiğin etkinliğini vurgulamış hem peptit hem de proteoform düzeylerinde kansere özgü sapsmaları tespit etme yeteneğini göstermiştir. Bu yetenek, kanserin

moleküler temellerini anlamak ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejileri geliştirmek için oldukça önemlidir (Ntai ve ark., 2016).

2.6. Biyoinformatik

Biyoinformatik, özellikle genomik ve proteomik düzeylerde biyolojik verileri analiz etmek ve yorumlamak için biyoloji, bilgisayar bilimi ve istatistiği birleştiren disiplinlerarası bir alandır. "Biyoinformatik" terimi ilk olarak 1970 yılında Paulien Hogeweg ve Ben Hesper tarafından "biyotik sistemlerdeki bilişimsel süreçlerin incelenmesi" olarak kavramsallaştırılarak ortaya atılmıştır (López-López ve ark., 2020). Dizileme teknolojilerinin hızla ilerlemesi, muazzam miktarda biyolojik veri üretmiş ve veri yönetimi, analizi ve yorumlaması için karmaşık hesaplama araçları gerektirmiştir (Luscombe ve ark., 2001).

Biyoinformatiğin tanımı, biyolojik verilerin depolanması, elde edilmesi ve analizi ile veri yorumlama için algoritmalar ve yazılım araçlarının geliştirilmesi de dahil olmak üzere çok çeşitli faaliyetleri kapsar. European Bioinformatics Institute (EBI), biyoinformatiği biyolojik veri yönetimi ve analizi için bilgisayar biliminin kullanımı olarak tanımlayarak, hesaplamalı teknikler ile biyolojik araştırma arasında bir köprü olarak rolünü vurgulamaktadır (Tikhvinskiy ve Porozov, 2013). Bu disiplinler arası yapı, biyoinformatiğin, genomik ve kişiselleştirilmiş tıp gibi alanlardaki ilerlemeler için çok önemli olan genetik diziler ve bunların işlevsel etkileri arasındaki ilişkileri anlamak gibi karmaşık biyolojik soruları ele almasına olanak tanır (Butte, 2009).

Biyoinformatik yalnızca akademik araştırmalarda değil, aynı zamanda ilaç keşfi ve kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesi gibi klinik uygulamalarda da önemli bir rol oynamaktadır (Hulsen ve ark., 2019). Biyoinformatik araçlarının yaşam bilimlerinin çeşitli dallarına entegre edilmesi, büyük ölçekli verilerin analizini kolaylaştırarak araştırmacıların daha önce ulaşılamayan içgörülerini ortaya çıkarmasını sağlamıştır. Biyoinformatik metabolik yolların incelenmesinde ve hastalıklar için biyobelirteçlerin belirlenmesinde etkili olmuş ve böylece sağlık ve hastalık mekanizmalarına ilişkin anlayışımızı geliştirmiştir (Paul ve ark., 2020).

Dahası, biyoinformatik alanı, makine öğrenimi ve yapay zeka gibi ortaya çıkan trendlerin biyoinformatik metodolojilerine giderek daha fazla entegre edilmesiyle sürekli olarak gelişmektedir. Bu gelişmeler, biyolojik sonuçları tahmin etme ve

büyük veri kümelerinin analizini kolaylaştırma yeteneğini artırarak biyolojik araştırmanın verimliliğini ve doğruluğunu iyileştirmektedir (Kurgan ve Zhou, 2011). Biyoinformatiğin disiplinler arası doğası, karmaşık biyolojik soruları etkili bir şekilde ele almak için biyologlar, bilgisayar bilimcileri ve istatistikçiler arasındaki iş birliğinin önemini de vurgulamaktadırlar (Williams ve diğerleri, 2019).

Biyoinformatik, kanser araştırmalarında temel bir alan olarak ortaya çıkmış, kanser mekanizmaları, tanı ve tedavi anlayışımızı geliştirmek için biyolojik verilerin hesaplamalı tekniklerle bütünleştirilmesini kolaylaştırmıştır. Biyoloji, bilgi bilimi ve hesaplamanın bir araya gelmesi, biyoinformatiği kanser genetiği ve patolojisinin karmaşıklıklarını çözmede temel bir bileşen haline getirmiştir (Ebrahimi ve ark., 2023). Bu disiplinler arası yaklaşım yalnızca kanser biyobelirteçlerinin tanımlanmasına yardımcı olmakla kalmamakta, aynı zamanda hasta sonuçlarını iyileştirmek için çok önemli olan kişiselleştirilmiş tıp stratejilerinin geliştirilmesini de desteklemektedir (Chin ve ark., 2011). Biyoinformatiğin klinik verilerle bütünleştirilmesi, spesifik genetik değişiklikleri klinik sonuçlarla ilişkilendiren çalışmalarla kanıtlandığı gibi, tümör davranışı ve hasta prognozunun anlaşılmasını da geliştirmektedir. Biyoinformatik analizleri, mesane kanserinde kirpi sinyal yollarının prognostik önemini ortaya çıkararak, hesaplamalı yaklaşımların klinik karar vermeyi nasıl bilgilendirebileceğini de göstermiştir (Yu ve ark., 2023).

Proteomik biyoinformatiği, protein ekspresyonu, modifikasyonları ve etkileşimlerinin analizi yoluyla tümör biyolojisinin anlaşılmasını kolaylaştırarak kanser araştırmalarında önemli bir alan olarak ortaya çıkmıştır. Proteomiğin biyoinformatikle bütünleştirilmesi, karmaşık biyolojik verilerin kapsamlı analizine olanak tanımaktadır. Proteinlerin geniş ölçekli çalışması olan proteomik, kanser biyolojisinde, özellikle teşhis ve tedavi için biyobelirteçlerin belirlenmesinde önemli hale gelmiştir. Kütle spektrometrisindeki son gelişmeler, tümör örneklerindeki proteinlerin hassas bir şekilde ölçülmesini ve tanımlanmasını sağlayarak kanser ilerlemesi ve metastazının altında yatan moleküler mekanizmalara ilişkin içgörüler sağlamaktadır (Rani ve ark., 2023). Proteomiğin uygulanması biyobelirteç keşfinin ötesine de uzanmaktadır. Kanser heterojenliğini ve tedavi yanıtını anlamada önemli bir rolde almaktadır. Kapsamlı proteomik analizler, yalnızca genomik yaklaşımlarla

tespit edilemeyen farklı kanseri alt tiplerini belirleyerek, kanser sınıflandırmasını ve tedavi stratejilerini iyileştirmede proteomik verilerin önemini vurgulanmıştır (Yanovich ve ark., 2018).

Biyoinformatik araçları, proteomik çalışmalarda üretilen muazzam miktardaki veriyi yönetmek ve yorumlamak için büyük öneme sahiptir. Bu araçlar, proteomik verilerin diğer omik verilerle bütünleştirilmesini kolaylaştırır ve araştırmacıların kanser biyolojisi hakkında daha kapsamlı sonuçlar çıkarmasını sağlamaktadır (Nelakurthi, 2023). Hedefli proteomiklerin geliştirilmesi, kanser biyobelirteçlerinin doğrulanması sürecini de hızlandırmış ve bunların keşiften klinik uygulamaya geçişini hızlandırmıştır (Ogata ve ark., 2022).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. A549 Hücre Hattı Kültürü

Dondurulmuş A549 hücreleri (ATCC CCL-185 TM) çözüm esnasında Dimetil sülfoksit (DMSO) etkisini azaltmak için Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ile 1:10 oranında seyreltildi. Hücreler 350 x g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) ile yıkama gerçekleştirildi. Süpernatantı atılan hücelere besiyeri olarak DMEM High Glucose içerisine son hacmi %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin olacak şekilde besiyeri hazırlanarak uygun miktarda eklenerek kültür kaplarına ekimi gerçekleştirildi. Kültür kapları etiketlenerek %5 CO₂ içeren 37 °C'de nemli inkübatörde kültüre edildi. Kültüre edilen hücrelerin besiyerleri 3-4 günde bir tazelendi.

Kültür kaplarındaki hücreler, kabın yaklaşık %80'ini doldurduğunda, pasajlama amacıyla besiyeri uzaklaştırılarak DPBS ile yıkandı. Yapışmış olan hücrelerin kaldırılması için tripsin eklenerek 3 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. Hücreler, kültür kabında yüzmeye başladıktan sonra tripsin aktivitesini durdurmak için besiyeri eklendi. Hücreler tüplere alındıktan sonra 350 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı uzaklaştırılan hücre pelletine 1 ml kendi besiyeri eklenerek süspanse edildi. Hücreler THOMA lamı ile sayıldıktan sonra yeni hücre kaplarına ekimi yapıldı. Bu işlemler, deneyler için yeterli hücre sayısına elde edilene kadar tekrarlandı.

3.2. A549 Hücre Hattından CD133 Ve CD326 İfade Eden Hücrelerin Manyetik Olarak Aktive Edilmiş Hücre Ayırma (MACS) İle Eldesi

CD133 ve CD326 (Epcam) ifade eden hücrelerin elde edilmesi için pasajlama yöntemi ile hücreler, hücre kültür flasksından alındı. Hücreler sayısal olarak iki eşit miktara bölünerek, etiketlenmiş hücre tüplerine alındı. MACS Bovine serum albümin (BSA) stok solüsyonu içerisine 1:20 oranında olmak üzere autoMACS yıkama solüsyonu ile seyreltilerek MACS tamponu hazırlandı ve uygulama boyunca buz içerisine alındı.

İki farklı hücre tüpündeki hücreler protokollere uygun olarak aynı işlemi geçti. İlk olarak 300 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı atılan hücre pelleti üzerine 10^8 hücre için 300 µL olacak şekilde MACS tamponu eklendi. Aynı ayrı olarak 10^8 hücre için 100 µL CD133 ve CD326 manyetik MicroBeads eklenerek 30 dakika +4 °C'de inkübe edildi. Daha sonra, 10^8 hücre için 1 mL tampon kullanılarak hücreler yıkandı ve süpernatantı atıldı. MidiMACS ayırıcı, MultiStanda yerleştirilerek, ayırıcı kolon, ayırıcıya tutturuldu ve ayırma işlemi için gerekli alan oluşturuldu. Kolon altına ise istediğimiz belirteci ifade etmeyen hücrelerin toplanması için tüp yerleştirildi. Ayırıcı kolon 3 mL MACS tamponu ile yıkandı. Kolon hücreler geçirildikten sonra 3 defa 3 mL MACS tamponu ile yıkanarak belirteci ifade etmeyen hücrelerin tüplerde toplanması sağlandı. Kolonlar ayırıcıdan çıkartılarak ayrı ve etiketlenmiş tüplerine yerleştirildi. Kolonlar 5 mL MACS tamponu eklenerek, piston yardımı ile etiketlenmiş hücreler tüplere toplandı.

Toplanan hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra sekretomunun toplanması için hücre kaplarına, koşullandırılmış besiyeri ile ekimi gerçekleştirildi.

3.3. Kontrol, CD133 ve CD326 İfade Eden Hücrelerden Sekretom Eldesi

Sekretom edesi için, serum içermeyen DMEM High Glucose besiyeri (koşullandırılmış besiyeri) ile uygun miktarda ekilen hücreler 24 saat boyunca 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi. Süre sonunda sekretom içeren besiyeri toplandı. Toplanan besiyeri +4 °C 10000 x g'de 15 dakika santrifüj edilecek ve böylece hücrelere ait kalıntılar uzaklaştırılmış olacaktır. Sekretom proteinlerini toplamak için StrataClean beadler kullanıldı. Beadleri protein bağlamaya hazır hale getirmek için üzerinde olası peptid kontaminasyonunu engellemek ve fenol mimik

eden protein bağlayıcı yapıyı aktive etmek amacıyla Tris-EDTA (tromethamine-ethylenediaminetetraacetic acid) tamponu (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH:7) ile iki kez yıkandı ve örnek başına 20 µL bead eklendi. Üzerine 200 µL 12 M HCl eklenerek 100 °C'de gece boyu inkübe edildi. Bu adımdan sonra her 5 mL koşullandırılmış besiyeri için 20 µL aktif bead eklendi ve besiyerleri +4 °C'de gece boyu çalkalayıcıda bekletildi. Beadlere bağlanan proteinler, 8000 x g'de 15 dakika çöktürülerek besiyerinden ayrıştırıldı ve Tris-EDTA yıkaması ile besiyeri kalıntıları uzaklaştırıldı. Vakumlu santrifüjde kurutulan örnekler pudramsı bir hale geldikten kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de saklandı (Bonn ve Otto, 2018).

3.4. Bead Üzerindeki Proteinlerin Kütle Spektroskopisi Analizine Hazırlanması

Kurutulmuş beadler, 100 uL 50mM TEAB (Tetraethylammonium bromide) içeren %2 (w/v) RapiGest ile yeniden süspansiyon edildi. Çözeltinin son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) eklendi ve örnekler 30 dakika 60 °C'de inkübe edilerek buz üzerinde soğutuldu. Oda sıcaklığı ve karanlıkta bulunan örnekler, IAA (Indole-3-acetic acid) son konsantrasyonu 40 mM olacak şekilde eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 200 ng Lys-C ilave edildi ve 37 °C'de 1000 rpm'de 4 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra örnekler 800 ng Tripsin-Gold ilave edilerek gece boyunca inkübe edildi. 10000 x g'de 1 dakika süreyle santrifüj ardından peptit içeren süpernatantlar toplandı ve RapiGest'i uzaklaştırmak için 12000 x g'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Örnekler, StageTip'lerdeki C18'e yüklenebilmesi için %1 TFA (Trifluoroacetic acid) ile asidifiye edildi. C18 materyali süspansiyon edilip StageTip'lere yerleştirildi. StageTip'ler tampon B (%0.1 Asetik Asit, %80 ACN (Acetonitrile)) ile yıkandı ve tampon A (%0.1 Asetik Asit) ile dengelendi. Asidifiye edilmiş örnekler, tiplere yüklendi ve peptit bağlı tipler, tampon A ile iki kez yıkandı. Yıkamanın ardından, tiplere tampon B ilave edildi ve peptitler tüplerden bir şırınga ile elüe edildi. Örnekler SpeedVac ile kurutuldu ve LC-MS/MS analizine kadar -20 °C'de saklandı (Bonn ve Otto, 2018).

3.5. LC-MS/MS Analizi

Shotgun proteom analizi LC-MS/MS Eksigent ekspert™ nanoLC 400 System ile bütünlük AB SCIEX TripleTOF® 5600+ sistemi ile gerçekleştirildi. Ayrıştırma

işlemi ise GL Sciences Monolithic Capillary HPLC (0.1 mm x 250 mm) kolonu ile gerçekleştirildi. Sekretom örnekleri için 180 dakikalık akış gradiyenti kullanıldı.

Cihazın raporlaması, oluşturulan ham veri analizi ve tek örnekte çoklu analiz ölçümleri Analyst® TF v.1.6 (AB SCIEX) ile yapıldı. Peptitlerin ve iyonlaşmış peptit ürünlerinin (ion-product) değerlendirmesi PeakView (1.2, AB Sciex) ile gerçekleştirildi. Proteinlerin tanımlanmasında modifikasyonlar, izoformlar ve protein sub-setleri gibi değişkenlerinde tanımlamada kullanılabilmesi için oluşturulan pik-listeleri ProteinPilot 4.5 Beta (AB SCIEX) ile MS/MS spectraları (PMF ve MS/MS ion) protein kaynak listeleri (canonical + isoforms) Homo sapiens türüne ait UniProtKB tabanlı referans kütüphanesi üzerinden değerlendirildi (Uniprot 2023.06.02). Böylelikle örneklerden analiz edilen protein listeleri elde edildi.

3.6. Verilerin Analizi

LC-MS/MS analizinden sonra elde edilen protein listeleri <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> sitesi kullanılarak, hücre gruplarına özgü olan protein listeleri belirlendi.

Yapılan diğer analizler, gruplara özgü olan bu proteinler üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen proteinler, hem heatmap tool (Ning ve ark., 2022) kullanılarak Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç (Gene Ontology Biological Process) ile zenginleştirme analizi (Enrichment Analysis) gerçekleştirildi. Bu analiz çalışmada proteinlerin bir grup olarak hangi işlevleri gerçekleştirdiği bilgisini sağladı.

Aynı proteinler STRING veri tabanı (<https://string-db.org>) (Szklarczyk ve ark., 2023) kullanılarak ağ ve fonksiyon analizleri gerçekleştirdi. Cytoscape (Shannon ve ark., 2003) versiyon 3.10.1. ve eklentisi olarak stringApp versiyon 2.1.1 kullanılarak STRING veri tabanından elde edilen veriler görselleştirildi. Bu analiz ise proteinlerin tek başlarına veya birkaç protein ile hangi biyolojik işlevleri gerçekleştirdiği bilgisini sağladı.

Etiketsiz Kantifikasyon (Label-Free Quantitation; LFQ) analizleri ise MaxQuant versiyon 2.4.2.0 (Cox ve Mann, 2008) Perseus versiyon 2.0.11 (Tyanova ve ark., 2016) ve R (R 4.0.2) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu analizler ile proteinlerin özgün

olup olmamasına değil, CD326 ve CD133 pozitif gruplarında gözlenen proteinlerin, kontrol grubunda gözlenen aynı proteinlere göre miktarının artıp artmadığı değerlendirildi Buradan elde edilen bilgiler ile upregüle edilen proteinlerin analizleri yine STRING kullanılarak network ve fonksiyon analizleri gerçekleştirdi. Bulunan özgün ve LFQ proteinleri ise Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA 2) (Tang ve ark., 2019) kullanılarak ifadelerinin kanserdeki sağkalım analizleri gerçekleştirilmiştir.

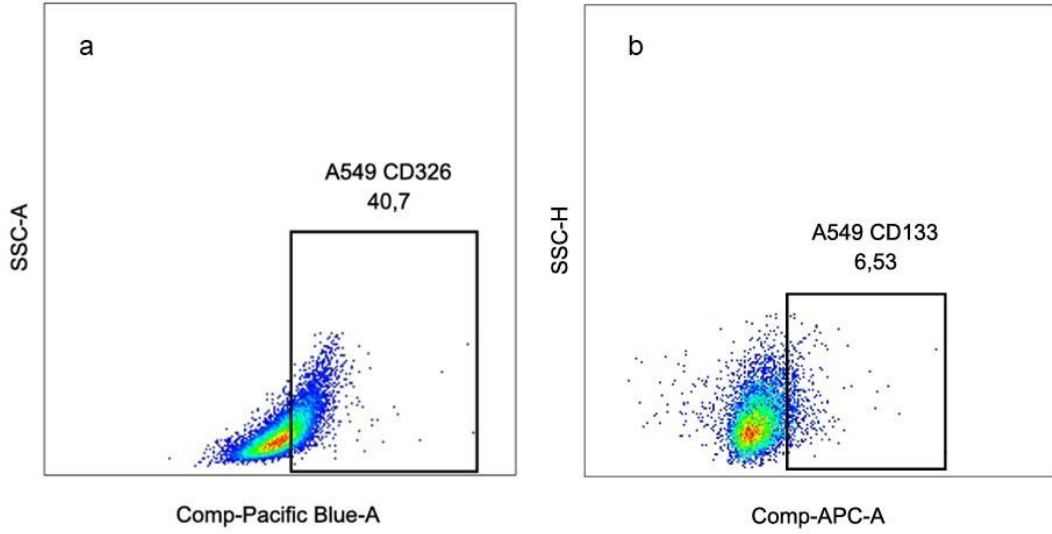
Tespit edilen proteinler, Uniprot (UniProt Consortium, 2013) ve Human Protein Atlas (Sjöstedt ve ark., 2020) kullanılarak fonksiyonları ve kanserde olan önemleri incelenmiştir.



4. BULGULAR

4.1. A549 Hücre Hattında CD133 Pozitif ve CD326 Pozitif Oranlarının Flow Sitometri Analizi

A549 popülasyonunda, multipotent belirteç CD133 pozitif hücreler ve pluripotent belirteç CD326 (EpCAM) pozitif hücrelerin oranı akış sitometri ile belirlenmiştir. Sonuçlara göre, A549 popülasyonunda CD133 pozitif hücre oranı %6.53, CD326 pozitif hücre oranı ise %40.7 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).

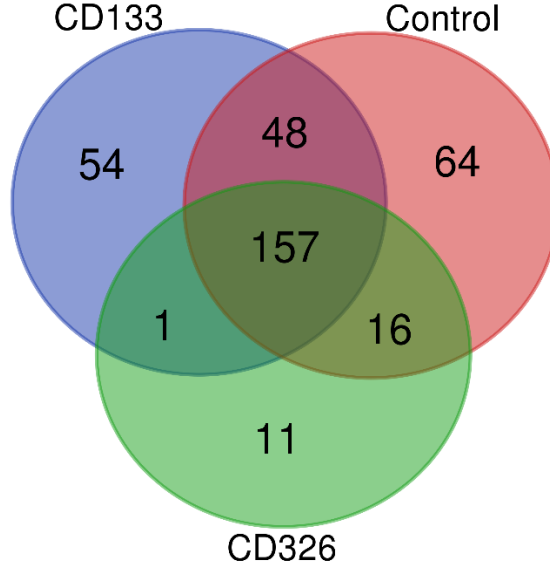


Şekil 4.1. A549 Hücre Hattında CD133 ve CD326 Pozitif Hücrelerin Flow Sitometri Analizlerine Göre Oranları

4.2. Kontrol Grubu, CD133 Pozitif ve CD326 Pozitif Hücrelerin Sekretom Protein Analizi

LC-MS/MS analizi ile grupların protein listesi belirlendi. Analiz sonucunda; kontrol grubunda 64, CD326 (Epcam) pozitif grubunda 11 ve CD133 pozitif grubunda 54

özgün protein tespit edilmiştir (Şekil 4.2.). Bu protein listesi Tablo 4.1.'de görülmektedir.



Şekil 4.2. Hücre Gruplarına Özgü Protein Sayılarının Ven Şeması Şeklinde Gösterimi

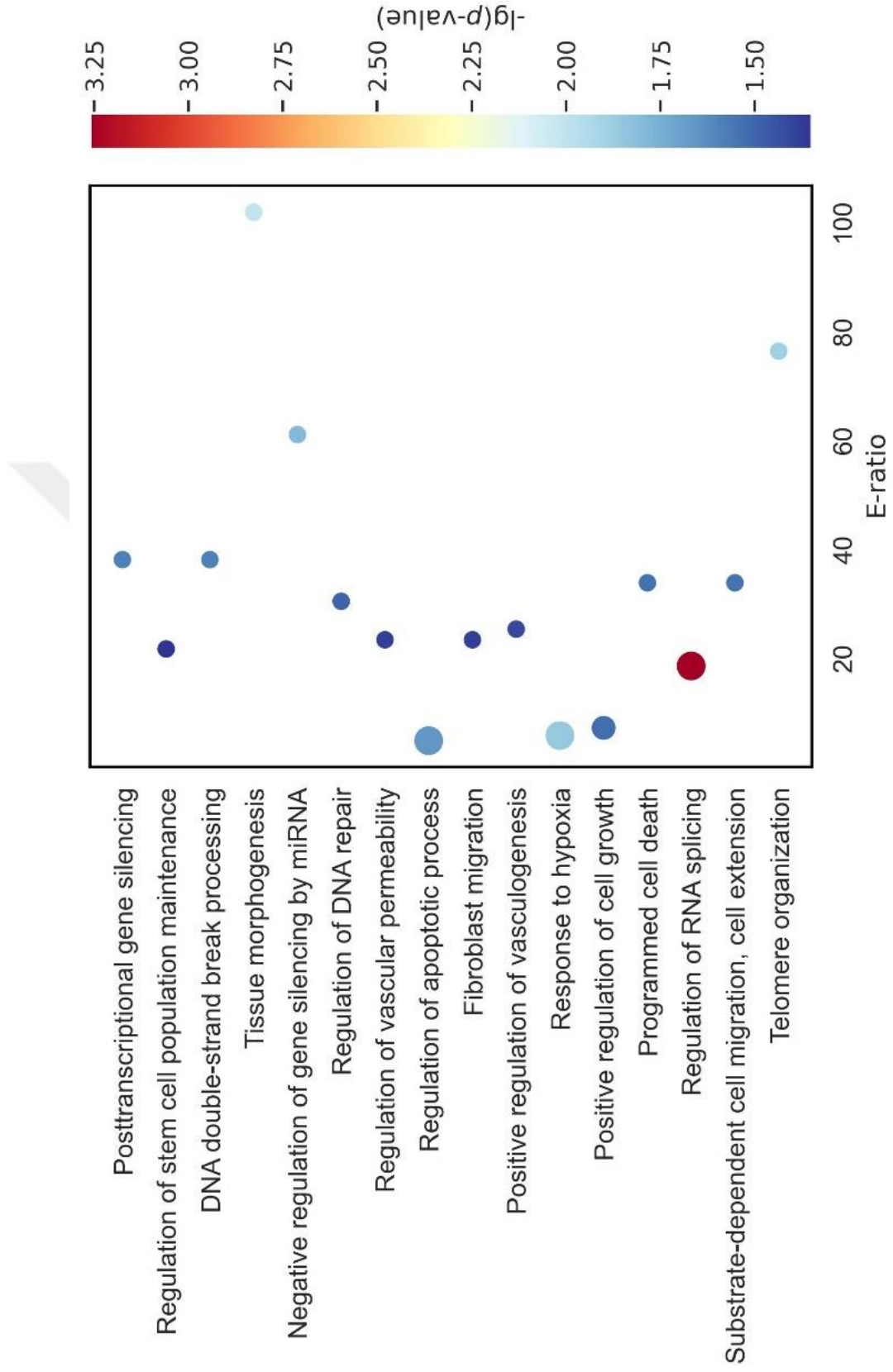
Tablo 4.1. Hücre Gruplarının Özgün Protein Listesi

Kontrol	ACTN4 GOT2 KRT19 ARPC5 TBCB RPS2 PDAP1 AIFM1 RPS18 G3BP1 HNRNPH1 CYCS CTSB STC1 CNDP2 NONO NAMPT ELAVL1 RPS6 GCNT3 UGDH CSTB ADM SRXN1 RPS10 SNRPD3 RPL11 RPL8 YBX3 H3-3B HSPA9 UBQLN4 PCNP NUMA1 TPM3 EIF1 RPL12 UBE2V2 SFN ENSA RRBP1 TAX1BP3 CCT2 AHNAK2 NTS PFDN5 RPL30 PLEC NME1 HSP90B1 LAMA5 PAPP A CTTN EIF3G KHSRP TFG JPT2 BOLA2B EEF1G AHNAK NSFL1C PFDN2 EEF1A2 HSPH1
CD133	PTPRK EDN1 H2BC12 C1R CLSTN1 CTSS LMAN2 SUB1 SLC39A10 H2BC9 C5 HLA-B LYZ RARRES1 COX6B1 AGRN DNASE2 H3C13 CLTA SDF4 VTN C3 IGFBP6 APOH IGFBP1 SUMF2 CDH1 IGFBP3 FGG CSF1 H2BC14 PRDX5 ANG INSL4 MYH9 BCAM TF SEMA3B H3C14 TGFB1 RPL6 B4GALT1 LTBP1 CDH2 HSPG2 FCGBP LTBP3 LAMC1 PIN4 SRP9 CFD RBMXL1 H3C15 APLP1
CD326	DPY30 SYTL4 NRCAM SQSTM1 RANBP1 CALD1 SMAP TMSB4X HMGA1 TRIM28 DDX21

4.3. Kontrol Grubu Hücrelerin Sekretom Protein Analizi

Kontrol grubu proteinleri üzerinde Gen Ontolojisi (GO) kullanılarak yapılan zenginleştirme analizi sonuçları incelendiğinde, kök hücre popülasyonunun sürdürülmesi, çift sarmal DNA kırıkları ve DNA hasar onarımları, RNA metabolizması, telomer bakımı, transkripsiyon sonrası modifikasyonlar ve apoptotik sürecin düzenlenmesi gibi normal hücresel biyolojik süreçlerin yer aldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.).



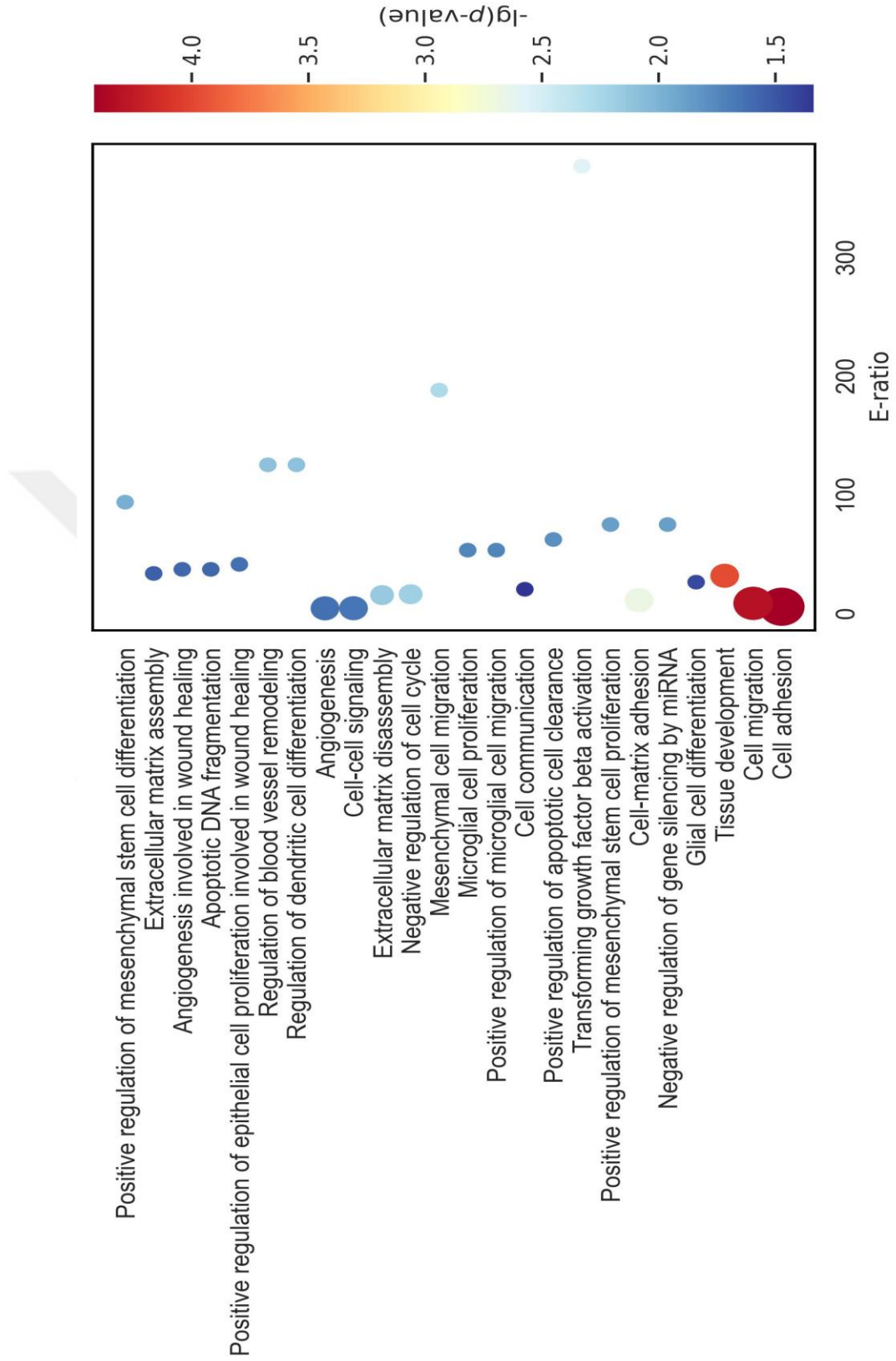


Şekil 4.3. Kontrol Grubu Hücrelerin Proteinlerinin Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç Zenginleştirme Analizi Sonuçları

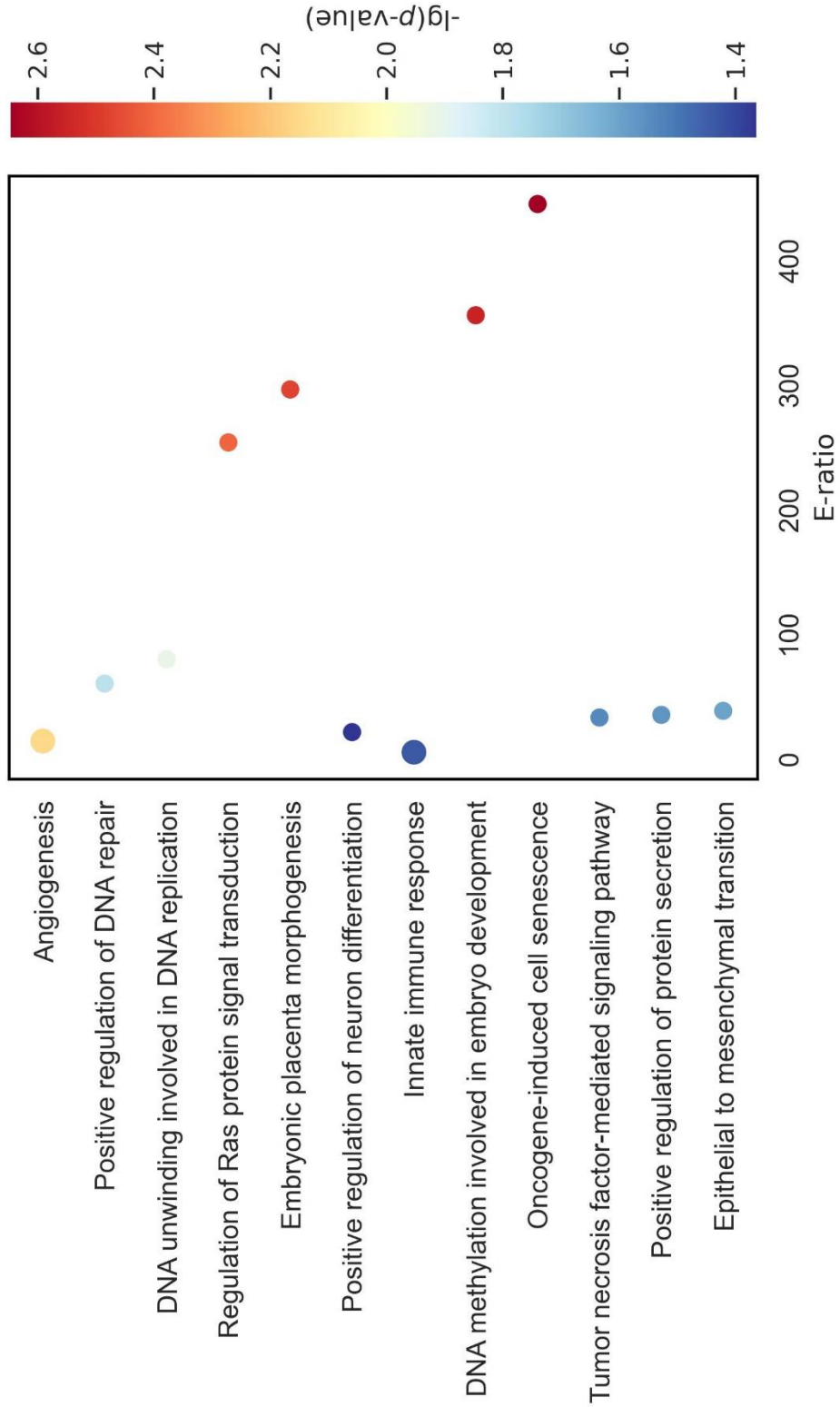
4.4. CD326 Pozitif ve CD133 Pozitif Hücre Sekretom Protein Analizi

CD133 pozitif ifade eden popülasyonların sekretom proteinlerinin gen ontolojisi analizleri anjiyogenez, kan damarı gelişimi, yara onarımı, hücre dışı matris organizasyonu, bağışıklık tepkisi, mezenkimal kök hücre farklılaşması, hücre migrasyonu, hücre yapışması ile ilgili ontolojilerin zenginleştiğini göstermektedir. Ancak, GO analizinde sadece CD326 pozitif ifade eden grupta epitelden mezenkimale geçiş, nöron farklılaşması, plasenta morfogenezi gibi biyolojik süreçler ile ilgili moleküllerin varlığı dikkat çekicidir (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.).



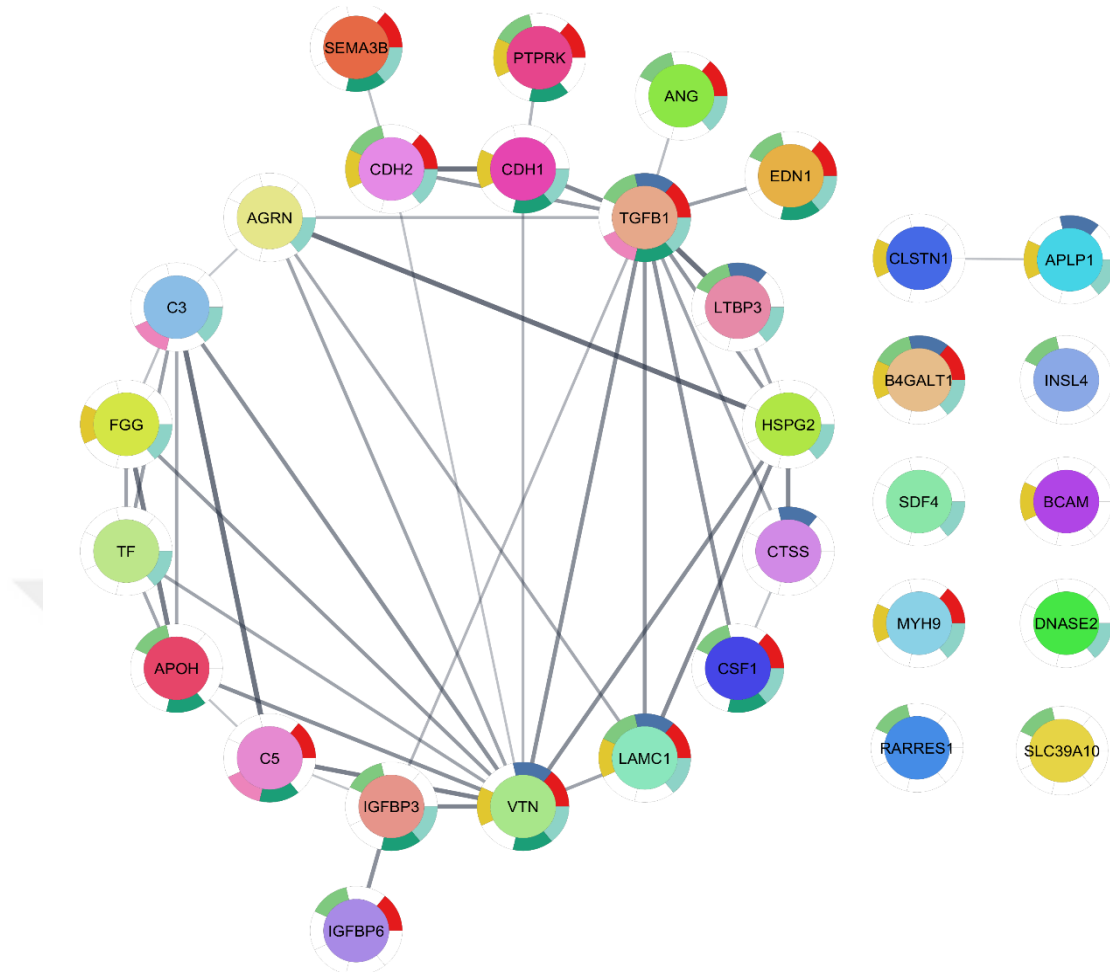


Şekil 4.4. CD133 Pozitif Grubu Hücrelerin Proteinlerinin Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç Zenginleştirme Analizi Sonuçları



Şekil 4.5. CD326 Pozitif Grubu Hücrelerin Proteinlerinin Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç Zenginleştirme Analizi Sonuçları

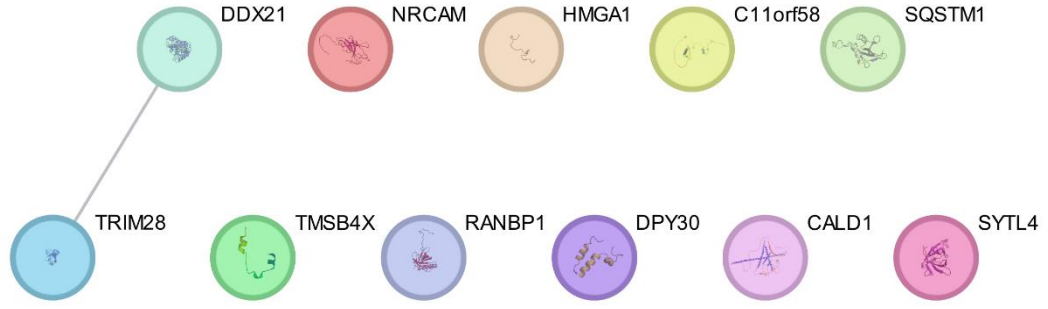
Grup-spesifik proteinlerin STRING network analizleri yapıldığında, CD133 pozitif grubunda VTN, BCAM, LAMC1 gibi mezoderm kökenli moleküllerin varlığı gözlemlendi. Bu networkda TGFB1 de mevcuttur. CD133 pozitif olan ve multipotent olduğu düşünülen bu hücre grubu, malign dokularda vaskülarizasyonu tetikleyen ANG ve tümör invazyonunu ve metastazını kontrol ettiği bilinen PTPRK moleküllerinin varlığıyla da dikkat çekmektedir. CD133 pozitif hücrelerin hücre adezyonu, farklılaşması ve göçü ile ilgili moleküllerce zengin ontolojiler sergilediği ve bu ontolojilerde TGFB1, VTN, LAMC1 ve B4GALT1 gibi proteinlerin ortak olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hücre popülasyon proliferasyonu ve hücre migrasyonu ile alakalı ontolojiler de gözlenmiş ve bu ontolojilerin ise TGFB1, PTPRK, IGFBP3 ve APOH proteinleri tarafından ortak düzenlendiği gözlenmiştir. CD133 pozitif ilişkili moleküllerin GO biyolojik süreç analizleri Şekil 4.6.'de görselleştirilmiştir.



Biological Process (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0007155	Cell adhesion	11 of 965	0.62	0.0212
GO:0030154	Cell differentiation	21 of 3507	0.34	0.0466
GO:0016477	Cell migration	13 of 903	0.72	0.0123
GO:0030198	Extracellular matrix organization	7 of 278	0.96	0.0151
GO:0010575	Positive regulation of vascular endothelial growth factor produc...	3 of 29	1.58	0.0278
GO:0030334	Regulation of cell migration	10 of 927	0.59	0.0437
GO:0042127	Regulation of cell population proliferation	15 of 1669	0.52	0.0171

Şekil 4.6. CD133 Pozitif Hücre Sekretom Proteinlerinin STRING Network Analizi ve Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç Analizi

CD326 pozitif grubunda ise anjiyogenez biyolojik sürecinde yer alan NRCAM ve CALD1 moleküllerinin varlığı, CD326 popülasyonuna özgü proteinlerde öne çıkmaktadır. Ayrıca, SUMOylation yolağında yer alan TRIM28 proteininin varlığı, bu grubun DNA hasar onarım kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir. STRING veritabanı ile yapılan CD326 pozitif ilişkili moleküllerin GO biyolojik süreç analizleri Şekil 4.7.'de görselleştirilmiştir.



Şekil 4.7. CD326 Pozitif Hücre Sekretom Proteinlerinin STRING Network Analizi

4.5. CD133 Pozitif ve CD326 Pozitif Hücrelerin Sekretom Proteinlerinin LFQ Analizi

Çalışmanın devamında CD133 pozitif ve CD326 pozitif grupların, kontrol grubu arasındaki ekspresyon farklılıklarıyla gözlenen proteinler etiketsiz kantifikasyon (LFQ) yöntemi kullanılarak incelenmiştir. LFQ protein listesi Tablo 4.2.'de yer almaktadır. Proteinlerin LFQ analizleri sonucunda çıkan volkan grafikleri ise CD133 pozitif için Şekil 4.8. ve CD326 pozitif için Şekil 4.9.'da yer almaktadır.

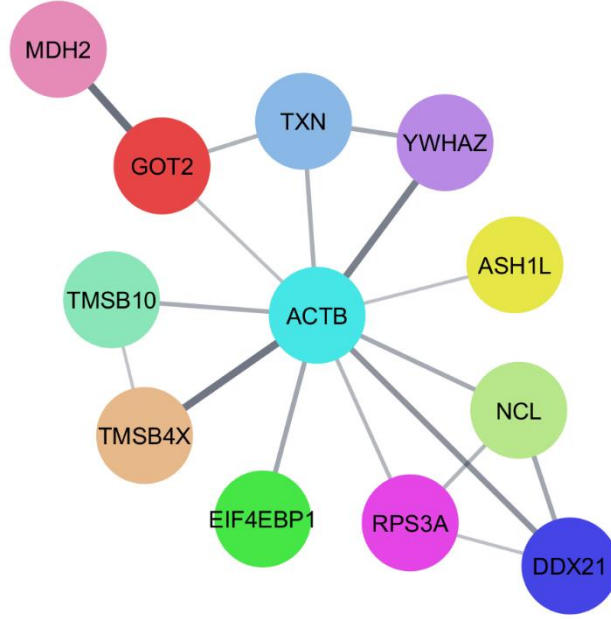
Tablo 4.2. Hücre Gruplarının LFQ Analizine Göre Upregüle ve Downregüle Edilen Proteinler

CD133 Pozitif Upregüle	FCGBP RNASET2 GSN CHGB LILRB3 CTSD C1R SDF4 PCSK9 CFD DNASE2 FGG HEXB PTPRK C1S CDH1 ADAM10 DKK1 GCNT3 AGR2 TIMP1 CST3 CST1 FGA FGB FN1 VTN CHGB CFH SPP1 TFPI CLU IGFBP2 IGFBP4 GRN RNASE4 MARCKSL1 B2M TGFB2 MUC5AC HSPG2 NUCB1 ODF1 IGFBP7 GOLM1 SMOC1 SLC38A10 MUC5B PCSK1N
CD133 Pozitif Downregüle	HNRNPDL EEF1A1 TSC22D1 HNRNPM PRDX1 HSPA1B PTBP1 H3F3B AARS HSPD1 HNRNPA1 NCL NONO PABPC1 FLNB PLEC ACTN4 NQO1 EEF1E1 HNRNPAB UCHL1 G6PD EIF4B CALD1 PAICS EEF1D HSPA8 CCT2 TUBA1B RANBP1 RPL28 RPS17 EIF5A HN1 KPNB1 NARS PLIN3 RPS11 KHSRP UGDH HIP1R HEXIM1 ALDH1A1 GSR AK1 GAPDH KRT18 SERPINE2 TUBB SCG2 EEF2 HNRNPL HSPA7 RPL12 PEBP1 ALDH3A1 HNRNPH3 SFN MAP1B SRP9 CRIP1 RPS18 SNRPD2 TMSB4X RPL11 ACTG1 TMSB10 YBX1 TUBB4B FKBP4 KHDRBS1 TRIM28 CTTN LASP1 PPA1 PCBP1 HMGN3 TXNRD1 LRRFIP1 SERBP1 MAPK1IP1L TAF15 SRXN1 HN1L CACYPB UBQLN4 PA2G4
CD326 Pozitif Upregüle	NCL ASH1L DDX21 RPS3A YWHAZ GOT2 TXN MDH2 ACTB TMSB4X TMSB10 EIF4EBP1
CD326 Pozitif Downregüle	FCGBP TSC22D1 CREG1 H3F3B SDF4 ADAM9 BTF3 NAMPT CFD PKM PFDN1 C1S SLC12A2 SRP14 CDH1 RPS17 KPNB1 HIP1R DKK1 PRSS23 GCNT3 TIMP1 CST1 FGA FGB FN1 CFH CLU SCG2 MIF IGFBP4 GRN RPL12 RNASE4 CXCL5 RPS10 SRP9 STC1 RPS18 HIST1H4A RPL11 ACTA1 MUC5AC HSPG2 NUCB1 RPL6 KHDRBS1 DAG1 DSG2 ODF1 IGFBP7 TSKU SMOC1 PFDN2

CD326 pozitif hücrelerin LFQ analizleri, IGFBP4 ve 7 gibi stres koşulları altında salgılanan moleküllerin bu hücrelerde aşağı regüle edildiğini göstermiştir. Ayrıca TIMP1 ve CXCL5 moleküllerinin ekspresyonlarında da azalma gözlenmiştir. Pluripotent hücre grubunda ekspresyonu artan proteinler arasında DDX21, MDH2 ve TMSB4X gibi moleküller dikkat çekmektedir. Ayrıca bu grupta YWHAZ proteininin ekspresyonunda da artış gözlenmiştir. Human Protein Atlas'a göre pluripotent alt grubun sekretomunda artan bu molekülün ekspresyonunun akciğer kanseri sağ kalım oranını etkilediği gözlenmiştir. YWHAZ molekülünün ekspresyonunun arttığı durumlarda sağ kalım olasılığında anlamlı azalma görülmüştür.

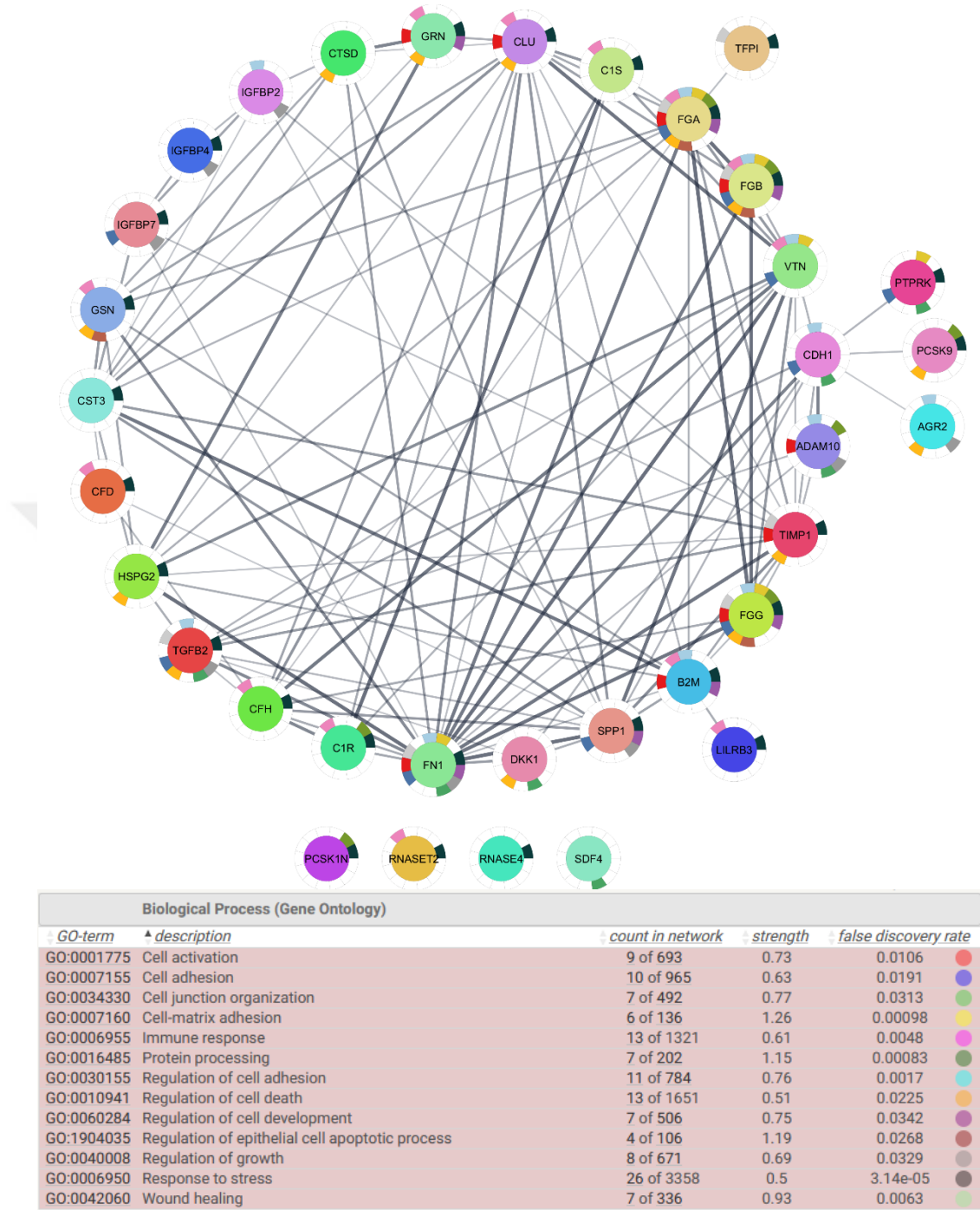
CD133 pozitif hücre grubunun bağıl ekspresyon çalışmalarında SERPINE2, HSPA7, GAPDH, TRIM28, ALDH3A1 gibi moleküllerin ekspresyonlarında azalmalar gözlenmiştir. Bu multipotent alt grupta ekspresyonu artan proteinler incelendiğinde pluripotent gruptan farklı olarak IGFBP2, 4 ve 7 proteinlerinin ekspresyonunda artış gözlenmiştir. ADAM10 ve TIMP1 gibi ekstraselüler matris modifiye edici proteinlerin ekspresyonunda da artış kaydedilmiştir. Bu grupta ekspresyonu artan bir diğer dikkat çekici molekül ise TGFB2'dir. Ayrıca CD133 pozitif hücrelerde VTN proteininin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Epitel kökenli hücrelerde ekspresyonu artan bu mezenkimal kökenli belirteç dikkat çekici bir bulgudur. HPA analizlerine bakıldığında bu belirtecin akciğer dokusu ve akciğer kanseri ile ilişkili olmadığı dikkat çekmektedir. CD133 pozitif grupta eksprese edilen bu proteinin epitelden mezenkimale geçişle ilişkili olabileceği düşünülebilir.

CD326 pozitif grubun LFQ proteinlerinin STRING network analizi ve Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç analizi yapıldığında ise aktin proteini olan ACTB'nin diğer tüm proteinler ile bağlantılı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. CD326 Pozitif Grubun Upregüle Edilen Proteinlerinin STRING Network Analizi.

CD133 pozitif grubun LFQ proteinlerinin STRING network analizi ve GO Biyolojik Süreç analizi sonucundai hücre aktivasyonu, hücre-hücre adhezyonu, hücre-matriks adhezyonu gibi biyolojik süreçlerle ilgili proteinlerin ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hücreyle ilgili gelişme, büyüme, ölüm ve yara iyileşmesi gibi süreçlerle ilgili proteinler için durumun aynı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11.). Bu süreçler için genellikle TGFB2, FN1, FGA, FGB ve FGG proteinlerinin çoklu görevleri olduğu görülmüştür.



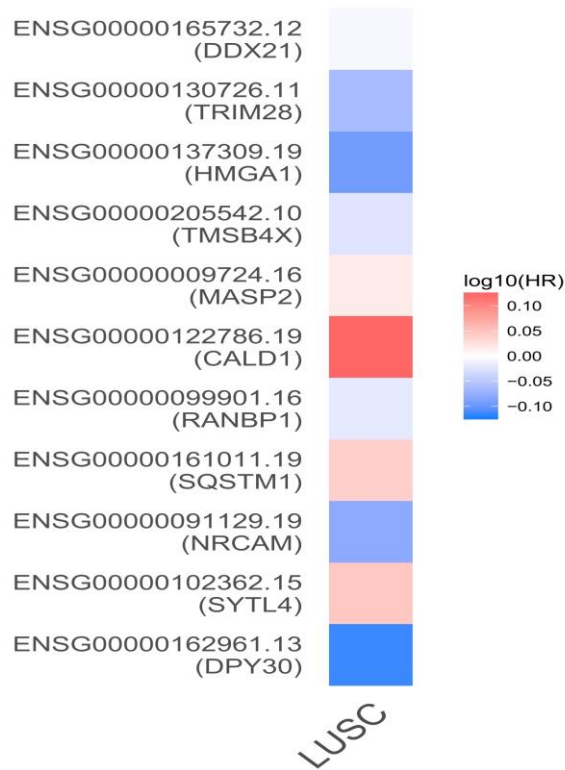
Şekil 4.11. CD133 Pozitif Grubun Upregüle Edilen Proteinlerinin STRING Network Analizi ve Gen Ontolojisi Biyolojik Süreç Analizi.

4.6. GEPIA 2 Kullanılarak Belirlenen Proteinlerin Kanserde İfade Düzeyleri ve Sağkalım Analizleri

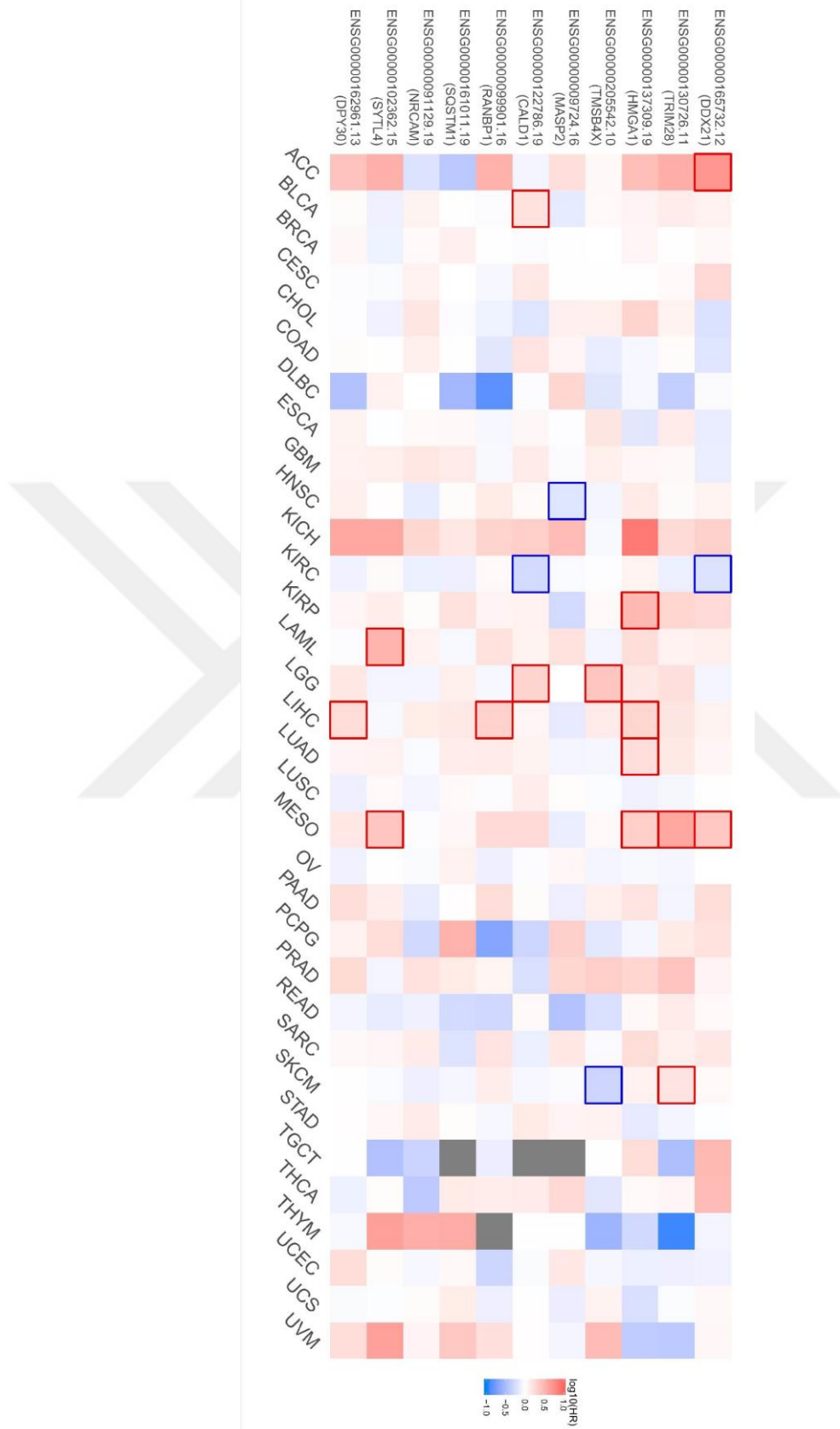
CD133 ve CD362 pozitif grupların özgün proteinleri ve LFQ yöntemi ile tespit ettiğimiz proteinlerin ifadelerinin kanser de sağkalımlarının analiz edilmesi için Gene

Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA 2) aracı kullanılmıştır. Bu araç ile yapılan analizler sonucunda, bulunan proteinlerin kanser türlerinde sağkalımları fazla ifade etmesi ve az ifade etmesine göre analiz edilmiştir. Şekillerdeki kırmızı rengin koyulaşması o proteinin yüksek ifadesinin, mavi rengin koyulaşması ise o proteinin az ifadesinin daha ölümcül olduğunu göstermektedir.

CD326 pozitif özgün proteinlerinin sağkalım analizleri Şekil 4.12’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde CALD1 proteinin yüksek ifadesi ve TRIM28 ve TMSB4X proteinlerinin az ifadesinin sağkalımı etkilediği görülmüştür. Bu proteinlerin diğer kanser türlerine göre de analizi Şekil 4.13’tedir. Analiz edilmiş olan LUSC (Akciğer Skuamöz Hücreli Karsinom) kanserindeki pluripotent olduğu düşünülen hücre grubuna ait olan özgün proteinlerin, MESO (Mezotelyoma), LGG (Beyin Düşük Dereceli Gliom), KICH (Böbrek Kromofob) gibi farklı germ dokularından köken alan kanserler de görülmesi ve yüksek ifadesinin sağkalımı olumsuz etkilemesi dikkate değerdir.

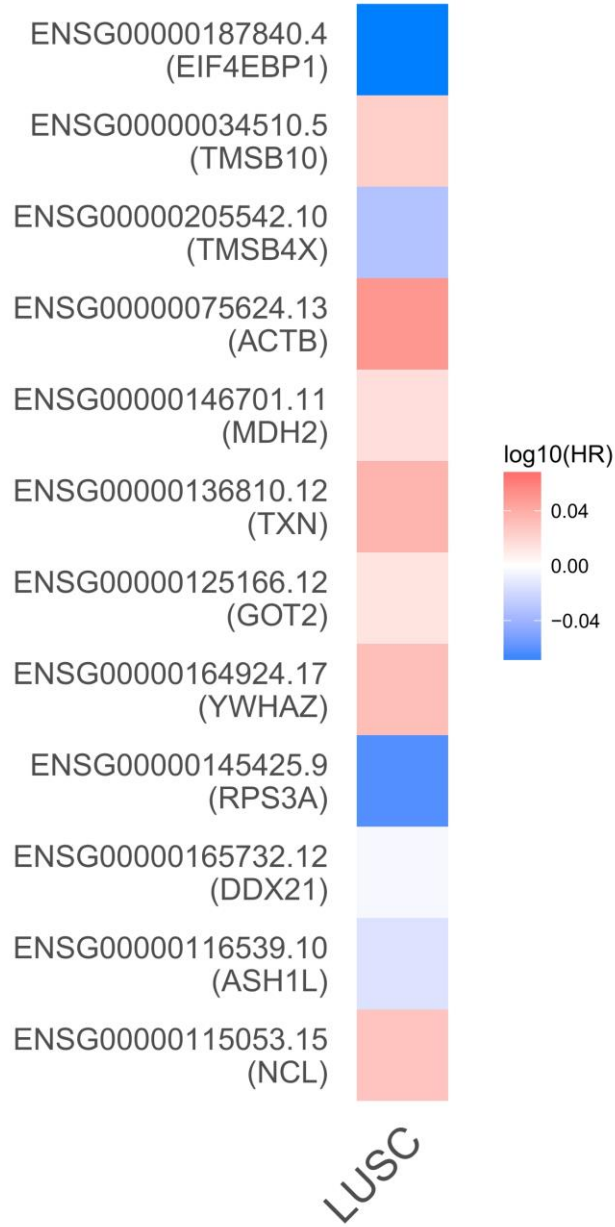


Şekil 4.12. CD326 Pozitif Hücre Grubunun Özgün Proteinlerinin İfadesinin Sağkalım Analizleri.

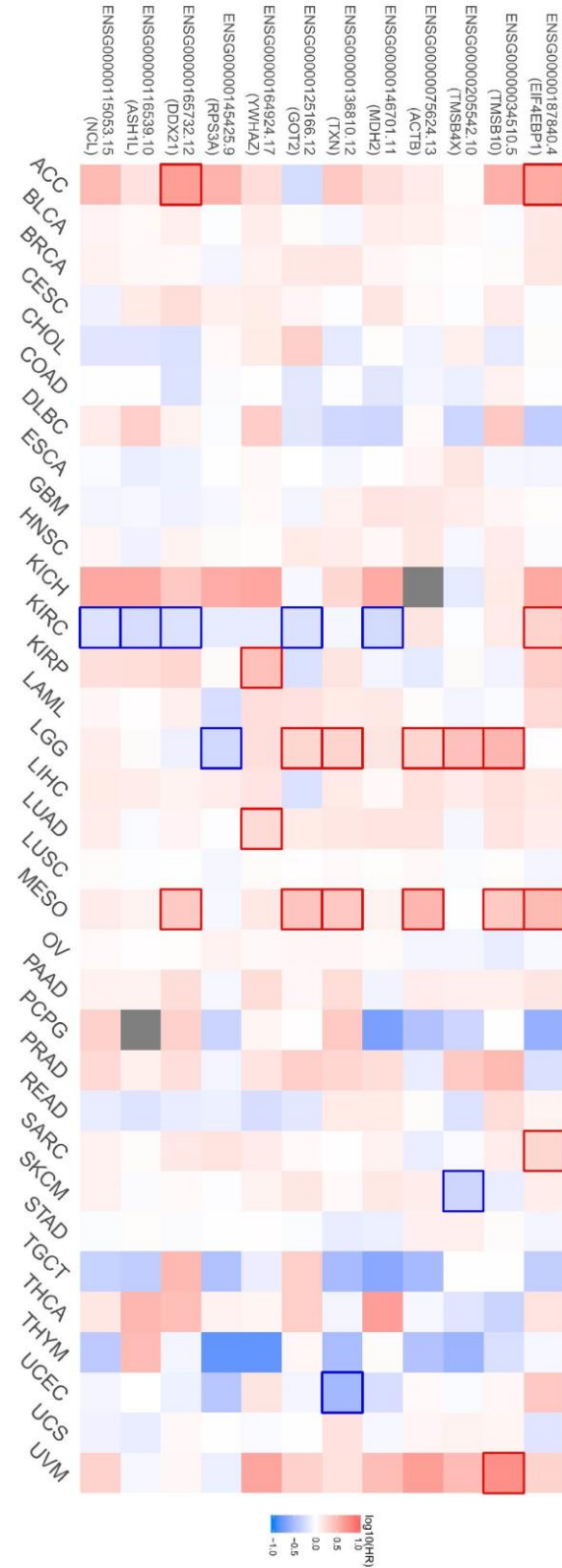


Şekil 4.13. CD326 Pozitif Hücre Grubunun Özgün Proteinlerinin İfadesinin Kanser Türlerinde Sağkalm Analizleri.

CD326 pozitif hücrelerin LFQ analizindeki upregüle edilen proteinlerinin de sağkalım analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.14.). Bu analize de dikkate değer noktalar, YWHAZ proteinin yüksek ifadesi ile TMSB4X ifadesinin az ifadesinin sağkalımı olumsuz etkilemesidir. Diğer kanser türlerine göre analiz edildiğinde ise MESO, LGG ve KICH ile benzerlikleri göze çarpmaktadır (Şekil 4.15.).



Şekil 4.14. CD326 Pozitif LFQ Upregüle Proteinlerinin İfadesinin Sağkalım Analzileri

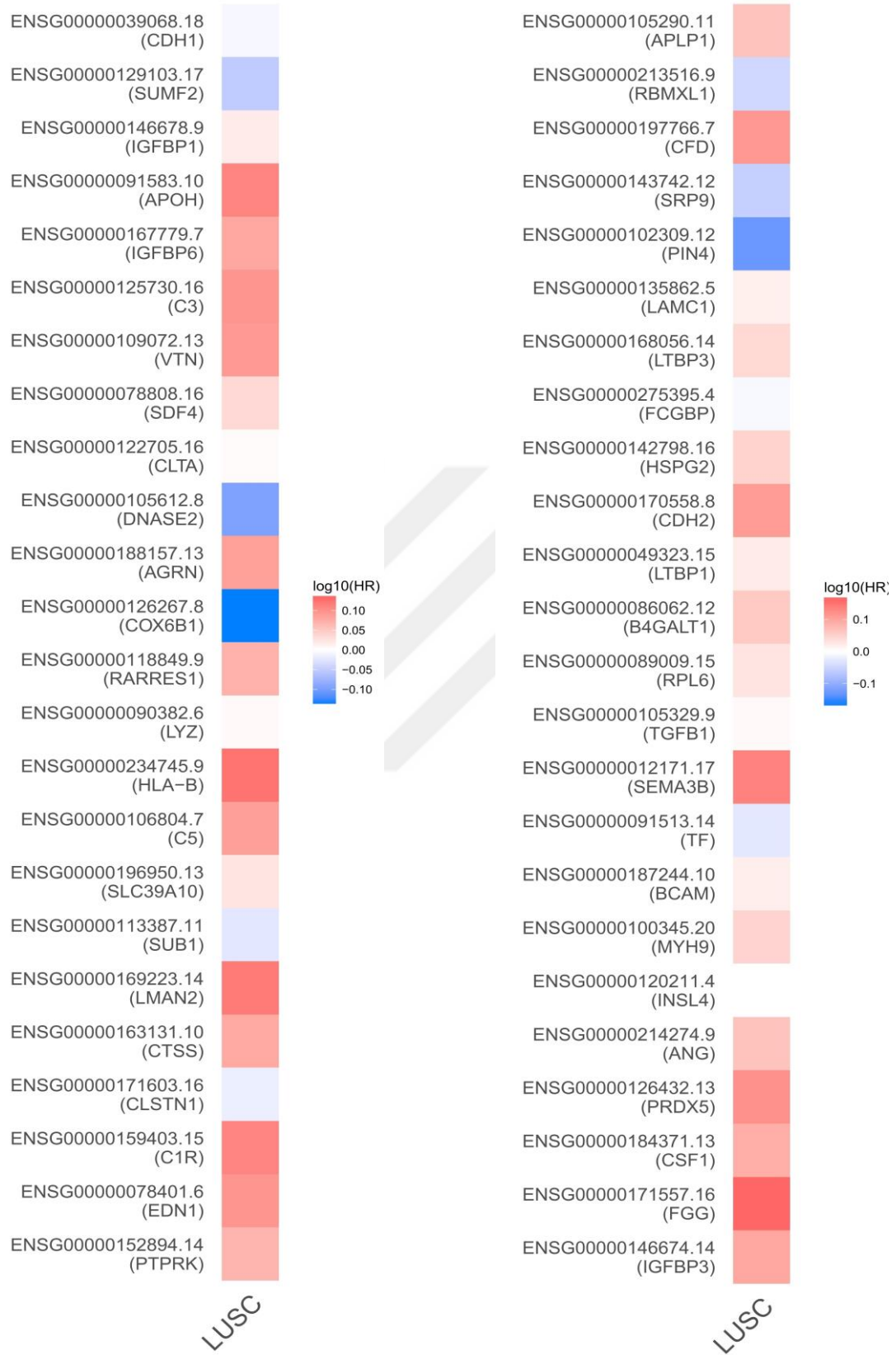


Şekil 4.15. CD326 Pozitif LFQ Upregüle Proteinlerinin İfadesinin Kansere Türlerine Göre Sağkalım Analizleri.

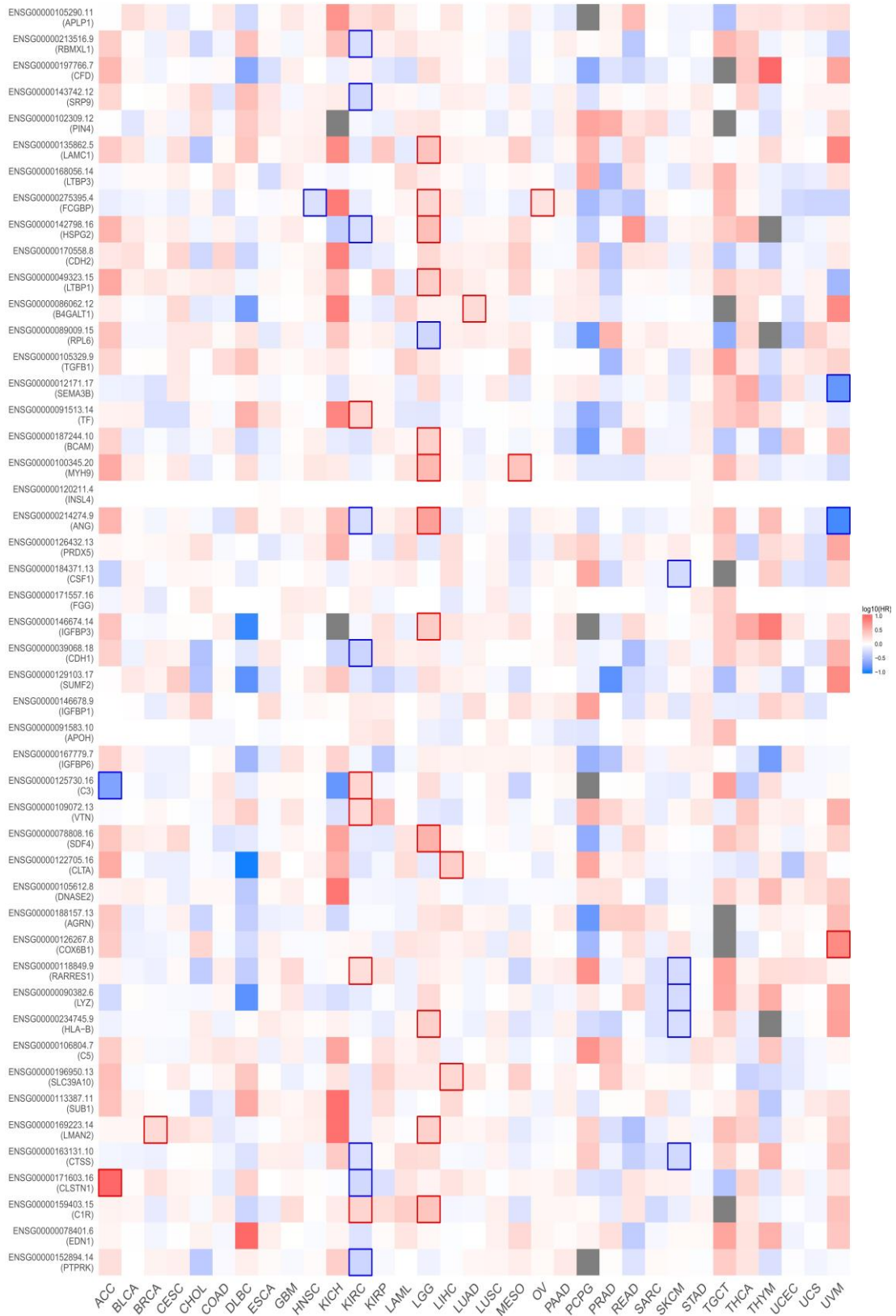
Bu durum, pluripotent kök hücrenin hiyerarşik durumu ve farklı germ doku kaynaklı kanser türleri olmaları göz önüne alındığında KKH'ler için bir tablo oluşturmaktadır.

CD133 pozitif özgün proteinlerinin sağkalım analizleri Şekil 4.16.'de verilmiştir. Burada VTN, PTPRK ve IGFBP3 yüksek ifadesinin olumsuz sağkalımı önemlidir. Diğer kanser türlerine göre durum incelendiğinde ise (Şekil 4.17.) LAMC1, LTBP1, BCAM, ANG genleri öne çıkmaktadır. LFQ upregüle edilen proteinlerin analizleri yapıldığında ise (Şekil 4.18.) TIMP1, ADAM10, PTPRK, FN1, FGA ve FGG gibi genler öne çıkmaktadır. Upregüle edilen proteinlerin diğer kanser türlerine göre durumuna bakıldığında ise (Şekil 4.19.) LGG (Beyin) kanserinde yüksek ifadelerinin sağkalım durumu görülmektedir. Birçok upregüle edilen proteinin beyin kanserinde de yüksek ifadesinin sağkalımı olumsuz etkilediği görülmektedir. Bu bulgular, akciğer kanserinin beyne yaptığı yüksek metastaz oranı düşünüldüğünde ve metastaz olan kanserin daha agresif olduğu göz önüne alındığında önemli veriler olduğunu ortaya koymaktadır.

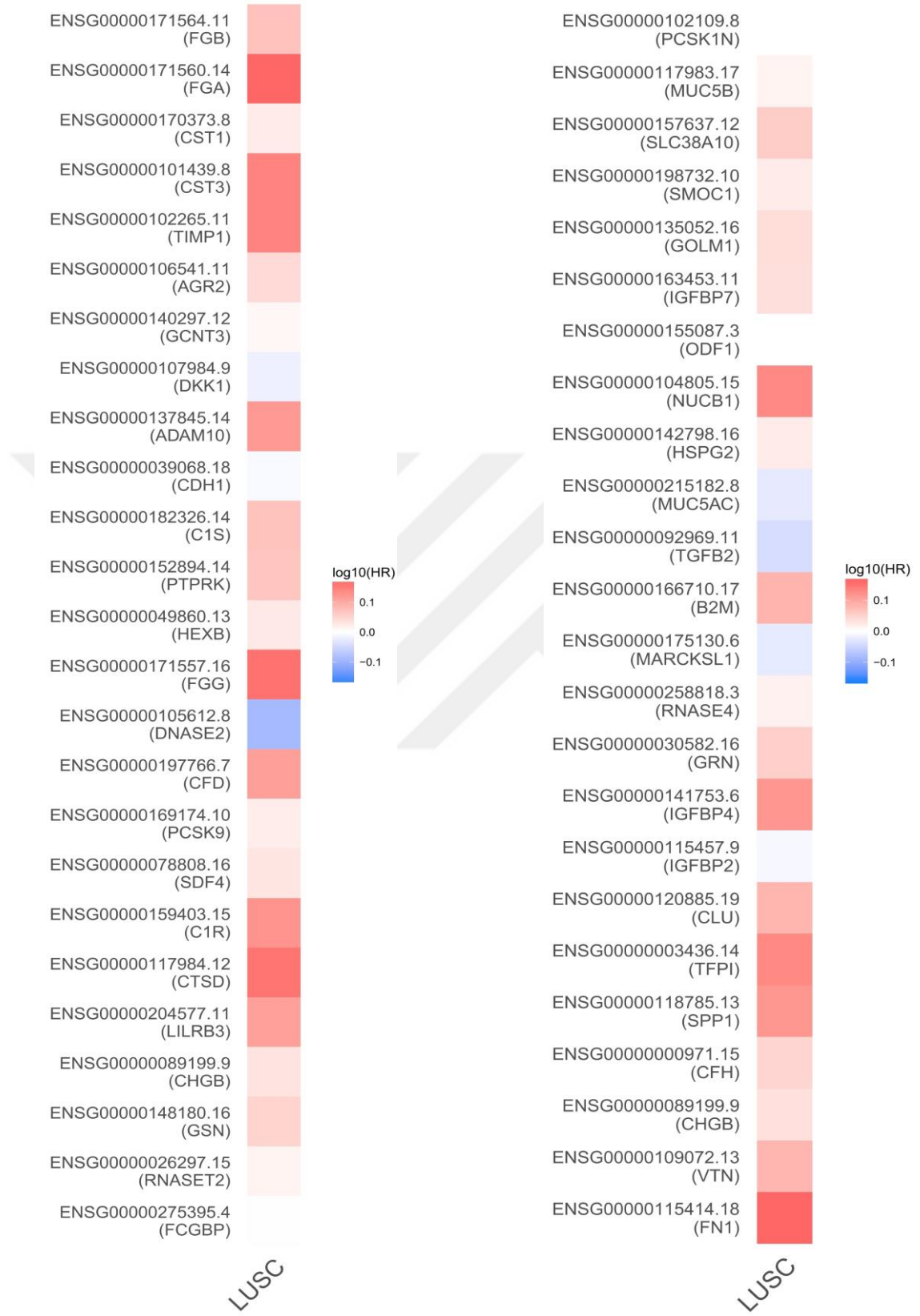
Bu bilgiler göze alındığında, tespit edilen proteinler 4 farklı kanser türünde de tespit edilip benzer sağkalım oranları gözlenmiştir. Üç farklı kanser türünün (KICH, LGG, LUSC) görüldüğü dokuların üç farklı germ tabakasından köken alması da ayrıca ilgi çekicidir. En önemlisi ise pluripotent olarak kabul ettiğimiz CD326 pozitif hücrelere özgün olan proteinlerin bu diğer kanser türlerinde de önemli olduğunun gözlenmesidir. Bu durum bu hücre popülasyonunun metastazın nedeni olduğu düşüncemizi desteklemektedir. Tespit edilen bu proteinlerin özellikleri ve farklı dokulardaki farklı kanserlerde de gözlenmesi tartışmada ayrıntılı olarak ele alınacaktır.



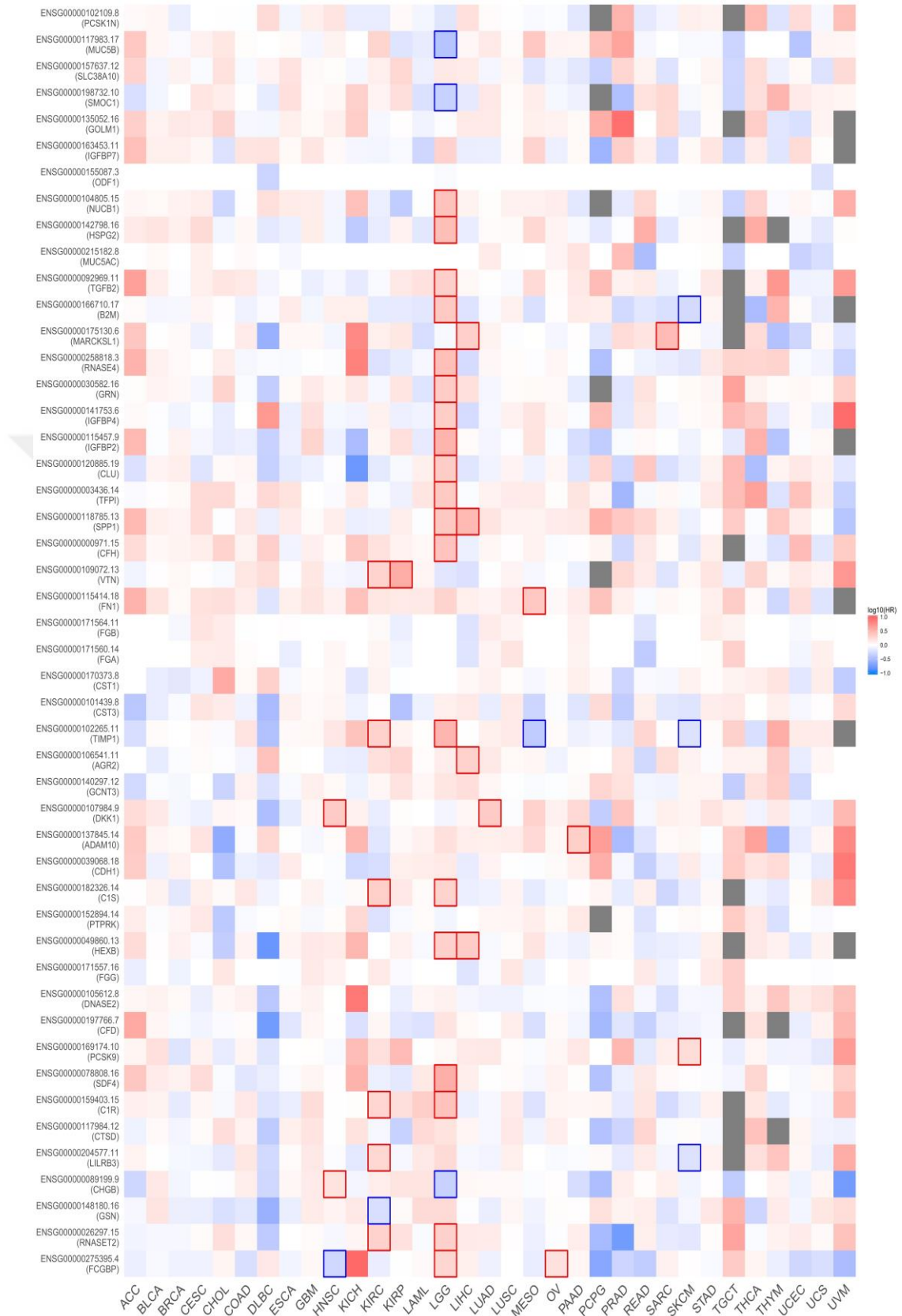
Şekil 4.16. CD133 Pozitif Hücre Grubunun Özgün Proteinlerinin İfadesinin Sağkalım Analizleri.



Şekil 4.17. CD133 Pozitif Hücre Grubunun Özgün Proteinlerinin İfadesinin Kansere Türlerinde Sağkalm Analizleri.



Şekil 4.18. CD133 Pozitif LFQ Upregüle Proteinlerinin İfadesinin Sağkalım Analizleri



Şekil 4.19. CD133 Pozitif LFC Upregüle Proteinlerinin İfadesinin Kanser Türlerine Göre Sağkalm Analizleri.

5. TARTIŞMA

Kanser kök hücreleri (KKH'ler), tümörler içerisinde, tümör kütesini oluşturan çeşitli hücre tiplerine farklılaşma ve kendini yenileme gibi yeteneklere sahip olan belirgin bir hücre alt popülasyonudur. Bu kavram, tümörlerin hiyerarşik olarak organize olduğunu ve tepedeki KKH'lerin tümör başlangıcını, ilerlemesini ve metastazını yönlendirdiğini varsayan kanser kök hücre teorisine dayanmaktadır (Yang ve ark., 2019; Yu ve ark., 2012). KKH'lerin tanımlanması, kanser tedavisi için önemli sonuçlar doğurur, çünkü bu hücreler kemoterapi ve radyasyona karşı doğal dirençleri nedeniyle genellikle tümörün tekrarlamasından ve metastazından sorumludurlar (Zhao ve ark., 2018). Yapılan çalışmalar, KKH'lerin tümörün büyük kısmını etkili bir şekilde ortadan kaldıran tedavi protokollerinden sağ çıkabildiğini ve hastalığın tekrarlamasına ve ilerlemesine yol açtığını göstermiştir (Noh ve ark., 2012). Tümörler içindeki KKH'lerin heterojenliği, farklı KKH popülasyonlarının terapilere farklı yanıtlar verebilmeleri nedeniyle etkili tedavilerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır (Shipitsin ve ark., 2007). Bu heterojenlik yalnızca tedavi için bir zorluk değil, aynı zamanda kanser evriminin ve adaptasyonunun dinamik doğasını yansıttığı için tümör biyolojisini anlamının da önemli bir yönünü oluşturmaktadır (Gentry ve ark., 2009). Bu nedenle, KKH davranışını yöneten moleküler mekanizmalar ve tümör mikroçevresindeki etkileşimleri üzerine devam eden araştırmalar, bu dayanıklı hücreleri hedeflemeyi amaçlayan yeni terapötik stratejiler geliştirmek için önemlidir (Ben-Porath ve ark., 2008).

Bu tez çalışmasında ise A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattından CD133 ve CD326 (Epcam) ifade eden hücreler MACS yöntemi kullanılarak izole edilmiş, kontrol grubu olarak ise A549 hücre hattı kullanılmıştır. Elde edilen bu 3 grubun sekretom proteinleri LC-MS/MS yöntemi kullanılarak proteomiks olarak

incelenmiştir. Belirlenen proteinlerin fonksiyonları ve görevleri, çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak incelenmiştir.

Deney gruplarından biri olan prominin-1 olarak da bilinen CD133 biyobelirteci, çeşitli kanserlerde, özellikle kanser kök hücreleri (KKH'ler) bağlamında önemli bir biyobelirteç olarak ortaya çıkmıştır. CD133, kendi kendini yenileme yetenekleri ve tümör oluşturma potansiyeli ile karakterize edilen KKH'leri tanımlama ve izole etmede önemli bir rol oynayan 5-transmembran glikoproteindir. Çalışmalar, CD133 pozitif hücrelerin CD133 negatif olanlara kıyasla gelişmiş proliferatif aktivite, kemoterapi ve radyoterapiye karşı artan direnç ve tümör başlatma konusunda daha büyük bir yetenek sergilediğini göstermiştir (Gisina ve ark., 2023). Örneğin, endometriyal kanserde, CD133 pozitif hücreler yalnızca daha yüksek bir çoğalma oranı göstermekle kalmamış, aynı zamanda sisplatin ve paklitaksel gibi yaygın terapötik ajanlara karşı artan kemoterapi direnci de göstermiştir Dahası, CD133 ekspresyonu, varlığının ileri hastalık evreleri ve tekrarlama olasılığının artmasıyla ilişkili olduğu kolorektal ve gastrik kanserler dahil olmak üzere çeşitli malignitelere kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Ding ve ark., 2017).

Epitel hücre adezyon molekülü (EpCAM) olarak da bilinen ve diğer deney grubunu oluşturan CD326 biyobelirteci ise, pluripotent kök hücreler (PKH'ler) için önemli bir belirteç olarak kabul edilir. İfadesi, embriyonik kök hücrelerinde (EKH'ler) ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde (iPKH'ler) farklılaşmamış durumun sürdürülmesiyle ilişkilendirilmiştir. Çalışmalar, CD326'nın farklılaşmamış EKH hatlarında sürekli olarak ifade edildiğini göstermiştir ve bu da onu pluripotent hücreleri tanımlamak için güvenilir bir belirteç haline getirmektedir (Ng ve ark., 2009). CD326'nın pluripotensi sürdürmede hayati süreçler olan hücre sinyalizasyonu ve göçünde rol oynadığı da gösterilmiştir (Hughes ve ark., 2011). CD326'nın pluripotent bir belirteç olarak kullanılması, SSEA-4 ve Tra-1-60 gibi diğer pluripotensi belirteçlerle etkili ortak ifadesiyle kanıtlandığı gibi, PKH'lerin heterojen hücre popülasyonlarından izole edilmesini kolaylaştırma yeteneğiyle daha da desteklenmektedir (Gundry ve ark., 2012). CD326 yalnızca pluripotansiyellik için bir belirteç olarak değil, aynı zamanda kök hücrelerin farklılaşmamış durumunu sürdüren düzenleyici ağlarda işlevsel bir bileşen olarak da hizmet eder. Bu bilgiler

ışınında CD326 ifade eden kanser kök hücreleri, pluripotent kök hücreler olarak değerlendirilebilir.

Kanser kök hücrelerini inceleyen çalışmalar yapılmış olsa da A549 hücre hattında farklı biyobelirteçler kullanılarak belirlenen hücre popülasyonlarından elde edilen sekretom proteinlerinin fonksiyon ve işlev olarak inceleyen bir çalışma bilgilerimiz dahilinde bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, multipotent ve pluripotent özelliklere sahip kanser kök hücrelerinin sekretom proteinlerini inceleyerek bu hücrelerin çevreleri üzerindeki etkileri hakkında bilgi edinmeyi amaçladık. Bu kapsamda, sekretom proteinlerinin tanımlanması için kütle spektrometresi yöntemi kullanılmış ve elde edilen veriler çeşitli biyoinformatik araçlar ile analiz edilmiştir.

CD133 pozitif hücreler, uzun süredir kanser kök hücrelerinin biyobelirteci olarak kullanılmaktadır ve bu hücrelerin tanımlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Aghajani ve ark., 2019). Bu çalışmada, CD133 pozitif hücrelerin multipotent kök hücrelere benzer şekilde işlev gören proteinler salgıladığı belirlenmiştir. Bu bulgular, 2007 yılında Sobhani ve arkadaşlarının çalışmasında elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir. Bu hücreler mezenkimal kök hücre farklılaşmasını, beyin dokusu hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını indükleyen proteinler salgılamaktadırlar. Bu işlevlerin kanser hücrelerinin bulunduğu dokuda gerçekleşiyor gibi görünmektedir. Ayrıca, bu hücrelerin anjiyogenez, hücre dışı matris yapılanması, kan damarlarının yeniden şekillenmesi, hücre-hücre ve hücre-matris yapışması gibi süreçlerde rol oynadığı ve bu işlevlerin kanser hücreleri için destekleyici bir niş oluşturduğu belirtilmiştir (Plaks ve ark., 2015). Bunun yanı sıra, bu hücrelerin hücre göçünü ve metastazı indüklediği de gözlemlenmiştir.

Belirttiğimiz sonuçlarımız bu hücrelerin kanser destek hücreleri olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Bu hücreler yakın dokuyu yeni kanser hücreleri için uygun hale getirdiği ve yeni kanser hücreleri oluşturduğu, sonunda ise bu hücreler göç etmeye başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.4).

STRING analiz verileri bu işlevlerin çoğunlukla TGFB1, LAMC1 ve VTN tarafından düzenlendiğini gözlenmiştir (Şekil 4.6.). TGFB1 (TGF- β ailesi), kök

hücrelerin kendini yenileme işlevi için gereklidir (Wang ve ark., 2024). Kanser hücrelerinde bu proteinlerin kötüye kullanımı kanser hücrelerini destekler. LAMC1'in kanser hücrelerini, tümör ilerlemesini ve göçünü desteklediği bilinmektedir (Plaks ve ark., 2015; Kunitomi ve ark., 2020). LAMC1, TGFB tarafından upregüle edilir (Fang ve ark., 2021) ve bazı kanser tipleri için prognostik bir faktör olarak kabul edilir (Fang ve ark., 2021; Kunitomi ve ark., 2020). Verilerimiz bu bulguları desteklemektedir. VTN veya Vitronektin'in bilinen işlevleri hücre yapışmasını, yayılmasını ve göçünü teşvik etmektir (Schvartz ve ark., 1999). Kanserde ise Vitronektin hücre farklılaşmasını ve tümör oluşumunu desteklemektedir (Hurt ve ark., 2010). Vaskülarizasyonu destekleyen ANG (Aghajani ve ark., 2019; Caporarello ve ark., 2017), PTPRK tümör invazyonu ve metastazda da gözlenmektedir.

LFQ upregüle edilen proteinler, CD133 pozitif hücrelerin salgısının, hücre popülasyonunu korumada heterojen hücrelere göre daha fazla çalıştığını göstermektedir. Bu işlev için TGFB2 (Liao ve ark., 2021) kullanılmakta. Ekstraselüler matrisi değiştiren proteinler olan ADAM10 (Siney ve ark., 2017) ve TIMP1 (Duch ve ark., 2022) de CD133 pozitif hücrelerde upregüle edilmiştir. HPA'ya göre, upregüle ADAM10 ve DKK1 proteinleri akciğer kanserinde olumsuz prognostik belirteçlere sahiptir.

SERPINE2, CD133 ve CD326 pozitif hücrelerin tek ortak sekretom proteindir. SERPINE2, serpin ailesinden bir proteindir. Başlıca işlevleri serin proteazlarını inhibe etmektir. SERPINE2 baskılanması, radyodirencini, DNA hasarı onarımını, göçü ve in vitro invazyonu inhibe etmektedir (Zhang ve ark., 2022). Bu protein ailesi bir süredir biyobelirteç hedefidir. SERPINE2 upregülasyonu 12 kanser tipinde gözlemlenmiştir (Liu ve ark., 2024). 2020 yılında yapılan bir çalışmada, SERPINE2'nin aşırı ekspresyonunun akciğer adenokarsinomunda kötü prognoza yol açtığı ve akciğer adenokarsinomunun prognostik bir belirtecini önerdiği bulunmuştur (Dokuni ve ark., 2020). Belirlediğimiz CD133 ve CD326 pozitif hücrelerin işlevleri göz önüne alındığında bulgularımız bu çalışmalar ile paraleldir.

CD326 (EpCAM) pozitif kanser hücreleri, hücre-hücre yapışması, çoğalma, pluripotent bir durumun sürdürülmesi, farklılaşmanın düzenlenmesi, göç ve invazyon

gibi işlevlerle ilişkilidir (Dollé ve ark., 2015). Pluripotent kök hücreler ektoderm, mezoderm ve endoderm olan üç embriyonik germ katmanına farklılaşma yeteneğine sahiptir. Bu üç germ katmanı ise tüm dokuların kaynağıdır (Ohtsuka ve Dalton, 2008). Ayrıca bu hücreler diğer hücrelerden daha fazla DNA onarım kapasitesine sahiptir. Bu kapasite onları hücre ölüm mekanizmalarının çoğundan korumaktadır (Luo ve ark., 2012). Bulgularımız CD326 pozitif hücrelerin pluripotent kök hücre işlevleri gibi işlev gören proteinler salgıladığını göstermektedir. Kanser hücrelerinin dokudaki kanser ilerlemesini genişletmek ve etkilemek için sekretomu kötüye kullandığı bilinmektedir (Kilmister ve ark., 2022). DNA onarımı ve kemoterapi direnciyle bilinen TRIM28 proteini (Zhang ve ark., 2023) belirtilmesi gereken önemli bir proteindir. TRIM28 upregülasyonu ayrıca küçük hücreli dışı akciğer kanserinde sisplatin direnciyle de ilişkilidir (Tan ve ark., 2022).

HPA'ya göre LFQ upregüle edilmiş protein YWHAZ, akciğer kanserinde olumsuz prognostik belirteçtir. Bu protein epitel mezenkimal geçiş, akciğer kanserinde hücre çoğalmasımı ve göçünü/invazyonunu teşvik etmesiyle bilinmektedir (Chen ve ark., 2012; Gan ve ark., 2020). Bu özellikler YWHAZ'ı pluripotent kanser hücreleri için potansiyel bir biyobelirteç yapmaktadır.

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastalarının yaklaşık %40'ına beyin metastazı tanısı konmaktadır (El Rassy ve ark., 2018). Kanser metastaz olduğunda genellikle tedaviye daha dirençlidir ve daha ölümcüldür. Bu durumun altında yatan mekanizmalar günümüzde yeterince anlaşılammıştır (Kilmister ve ark., 2022). Endoderm kökenli akciğer hücreleri ektoderm kökenli bir beyin dokusuna göç edip metastaz yapabiliyorsa, akciğer kanserinde olduğu gibi, bu pluripotent kanser hücresi tarafından da mümkün olabilir ve CD326 pozitif ifade eden hücrelerin sekretom protein analizlerinin sonuçları bu fikri desteklemektedir. CD326 pozitif hücreler de pluripotent kök hücreler gibi epitel mezenkimal geçiş mekanizmalarında işlev gören proteinler salgılamaktadır.

Bu çalışmada tespit edilen proteinleri incelenirse; CD326 da özgün olan proteinlerden, CALD1 proteininin periferik sinir rejenerasyonu sırasında Schwann hücre göçünde rol oynadığı Uniprot veri tabanında belirtilmiştir. Bu durum zenginleştirme analizindeki (Şekil 4.5.) nöron farklılaşmasının pozitif regülasyonu

gözlenmesiyle ilişkili olabilir. Ayrıca bu proteinin yüksek ifadesi LGG kanserinde sağkalımı olumsuz etkilemektedir. TMSB4X ise downregüle edilen bir protein. Uniprot'a göre bu proteinin görevleri arasında kök hücre değişimini baskılamak ve pluripotent hücrelerin S fazına girmesini engellemektir yer almaktadır. GEPIA2'ye göre bu proteinin düşük ifadesi LUSC kanserinde ve yüksek ifadesi ise LGG kanserinde sağkalımı olumsuz etkilemekte. Bu durum akciğer kanserinde pluripotent hücrelerin az aktive olmasıyla birlikte saklanmasına ve beyine geçtiğinde veya bu hücreler beyinde aktive olduğunda akciğer kanserine göre daha agresifleştiği ile açıklanabilir. TRIM28, DNA tamirinde rol almasının yanında KHDAK'de epitel-mezenkimal geçiş regülasyonunda rolü olduğu ve kanser kök hücrelerinin, stemness özelliğini korumada da rol aldığı bilinmektedir (Chen ve ark., 2014; Li ve ark., 2024). Ayrıca upregülasyonu sispaltin direnciyle de ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Tan ve ark., 2022). TRIM28 üzerine yapılan bir çalışma da TRIM28 baskılanmasının tümör büyümesini baskıladığı ve upregülasyonunun ise glioma hastalarında kötü sonuçlarla ilişkili olduğu göstermiştir (Qi ve ark., 2016). Bu durum TRIM28'in akciğer ve gliomada KKH için biyobelirteç olarak kullanılabilineceğini göstermektedir. DPY30 ile yapılan çalışma sonucunda EMT regülasyonunda görevi olabileceği ifade edilmiştir (He ve ark., 2019). Bu özgün proteinlerin görevleri düşünüldüğünde DNA tamiri ve pluripotent hücreler için önemli olan EMT mekanizmalar ile ilgili oldukları görülmektedir. Literatür ile ortaya koyduğumuz bulgular bir araya getirildiğinde CD326 pozitif hücrelerin pluripotent karakteristikli KKH'leri olduğu savımız diğer çalışmalar ile paralel olduğu ortaya çıkmaktadır.

CD326 upregüle edilen proteinler ele alındığında, GEPIA2 analizine göre CD326 pozitif hücrelerde upregüle olan 12 proteinden 7'sinin LGG kanserinde de upregüle durumunun sağkalımı olumsuz etkilediğinin ortaya konulması, düşünülen pluripotentlik özelliği ve akciğer kanserinin en yüksek metastaz yaptığı dokunun beyin olması bilgisiyle bu hücrelerin önemini ortaya koymaktadır. Buradaki en önemli protein YWHAZ proteinidir. Bu proteinin akciğer kanserindeki görevleri arasında EMT, hücre çoğalması, göçü ve invazyon vardır. Ayrıca bu proteinin yüksek ifadesi akciğer kanserinde sağkalımı olumsuz etkilemektedir.

CD133 özgün proteinleri ele alındığında, TGFB1, kök hücrelerin kendini yenileme işlevi için gereklidir. TGFB'nın KHDAK'de EMT işlevinin güçlü bir indükleyicisi olduğu ve çeşitli hayvan modellerinde inhibisyonunun metastazı önlediği gösterilmiştir (Ramundo ve ark., 2023). Aynı proteinin LGG kanserinde de sağkalımı olumsuz etkilediği gözlenmiştir. LAMC1'in kanser hücrelerini, tümör ilerlemesini ve göçünü desteklemektedir. Glioma hastalarında ise LAMC1'in yüksek ifadesinin daha kısa sağkalıma neden olduğu gözlenmiştir (Liu ve ark., 2019). Bu durum Şekil 4.16'deki GEPIA2 analizleri ile uyumludur.

CD133 upregüle edilen proteinler ele alındığında, GEPIA2 analizine göre upregüle edilen 49 proteinden 22'sinin LGG kanserinde de yüksek ifadesinin sağkalımı olumsuz etkilediği gözlenmiştir. ADAM10 proteinin KHDAK'de erken teşhis ve sonuç tahmini için bir biyomarker adayı olarak gösterilmiştir (Yoneyama ve ark., 2018), glioblastoma için de migrasyon ve farklılaşma da görevli olduğu bildirilmiştir (Siney ve ark., 2017). FN1 proteinin yüksek ifadesinin LUSC ve LGG kanserleri için olumsuz sağkalıma neden olduğu GEPIA2 tarafından gösterilmiştir. Bu proteinin baskılanması KHDAK'da sispilin duyarlılığını artırmaktadır (Gao ve ark., 2016) Yapılan multi-omics çalışma sonucunda ise glioblastoma da prognostik bir biyobelirteç adayı olduğu bildirilmiştir (Kabir ve ark., 2022). Şekil 4.11 ve 4.17'deki bulgularımız da bu durumu desteklemektedir.

GEPIA2 analizleri sonucunda, tespit edilen proteinlerin ve bu proteinlerin ifade durumlarının KICH, LGG ve LUSC gibi 3 farklı germ tabakasında da gözlenmiş olması dikkate değer sonuçlardır. Metastatik renal hücreli karsinomun hedefi %40-50 arasında akciğerdir (Seitlinger ve ark., 2021). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %40'ında beyin metastazı tanısı konulmakta (El Rassy ve ark., 2018). Bu durum mezoderm kökenli kanserin, endoderm kökenli dokuya, endoderm kökenli kanserin ise ektoderm kökenli dokuya metastaz yaptığını göstermektedir. Bu durum kanserde pluripotent kök hücre özelliği gösteren hücrelerin varlığına işaret etmektedir. Elde ettiğimiz bulgular, CD326 pozitif kanser hücrelerin pluripotensite için gerekli olan EMT gibi işlevleri olduğunu göstermiştir. Bu hücrelerde ifade edilen proteinlerin ise LGG kanserinde de gözlenmiş olması ve yüksek ifadesinin sağkalımı olumsuz etkilediği de GEPIA2 analizleri ile ortaya konulmuştur (Şekil

4.13 ve Şekil 4.15). Bu durum akciğer kanserinde pluripotent özelliği gösteren KKH'lerin varlığını ortaya koymaktadır ve bu hücrelerin metastaz da görev alğını göstermektedir. Ayrıca pluripotent kök hücrelerin, kök hücrelerdeki hiyerarşisi düşünüldüğünde, KKH'ler için bir tablo ortaya çıkmaktadır.

Metastaz başlatıcı olarak tespit ettiğimiz CD133 pozitif KKH'leri ise kanserin yayılmasını desteklemekte ve EMT işlevini indüklemektedir. Bu çalışmadaki sonuçlar, CD133 pozitif hücrelerin metastazı başlatmakta ve CD326 pozitif hücrelerin ise dokular arası geçiş yaparak vardığı yeni dokularda tümör başlattığına işaret etmektedir.

CD326 pozitif hücrelerin diğer hücre gruplarından daha az sekretom proteini salgıladığı da gözlemlenmiştir. Bu, bu hücrelerin diğer kanser hücrelerinden daha az aktif olması ve belki de bağışıklık sisteminden saklanmaya çalışmasıyla açıklanabilir.

CD133 ve CD326 pozitif hücre fonksiyonlarını düşünüldüğünde birbirlerinin tamamlayıcı olduğu söylenebilir. Birisi dokuyu kansere yatkın hale getirmekte ve metastazı başlatırken, diğeri DNA onarımını ve doku farklılaşmasını başlatmaktadır. Bu durum, farklı kanser kök hücrelerinin normal kök hücreler gibi birlikte çalışmasıyla açıklanabilir.

Sonuç olarak elde edilen veriler, kanser hücrelerinin pluripotent hücre fonksiyonu, farklı hücre ve doku tiplerine farklılaşma, göç ve metastaz gibi farklı hücre tiplerine ve fonksiyonlarına sahip heterojen bir popülasyon olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada iki farklı KKH ortaya konulmuş olsa da daha fazla alt popülasyonun varlığı büyük bir ihtimaldir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser üzerine olan çalışmalar her geçen yıl artmaktadır. Kanser nedenlerinin ve mekanizmasının karmaşıklığı, kanser türlerinin birbirine olan farklılıkları, bireye göre gösterdiği çeşitlilik bu çalışmaları zorlaştırmaktadır. Ayrıca kanserin de kendi içerisinde heterojenlik göstermesi, farklı görevleri ve fonksiyonları olan hücre popülasyonlarına sahip olması kanserin anlaşılmasına ayrı bir karmaşıklık katmanı eklemektedir.

Kanser heterojenliğinin çözümlenmesi, sınıflandırılması, popülasyonlar arasındaki farklılıklarının anlaşılmasının, popülasyonların fonksiyonlarının ve özelliklerinin belirlenmesinin kanseri anlamamızda önemli bir yeri vardır. Kanser tam olarak tedavi edilebilmesi ve nüksün önlenmesi için kanser kök hücrelerinin tamamen ortadan kaldırılması kritik önem taşımaktadır. Aksi takdirde, geride kalan kanser kök hücreleri genellikle metastaza yol açarak daha güçlü ve tedaviye daha dirençli bir şekilde geri dönmektedir. Bu çalışmada, kök hücreler gibi kanser kök hücrelerinin de kendi hiyerarşilerine ve benzersiz işlevlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmamız, yalnızca iki farklı popülasyona odaklanmış olsa da daha fazla popülasyon ve alt popülasyonların varlığı öngörülmektedir.

Bu çalışmada incelediğimiz CD133 ve CD326 pozitif hücre popülasyonlarının sekretom protein analizleri, bu hücrelerin biyolojik işlevlerini ve özelliklerini detaylı bir şekilde ortaya koymuştur. Ayrıca, SERPINE2, ADAM10 ve pluripotent KKH'leri için YWHAZ ve TRIM28 biyobelirteç adayları olarak belirlenmiştir. Bu proteinlerin sekretom kaynaklı olması, çeşitli vücut sıvılarından tespit edilebilme olasılığını artırmaktadır. Geliştirilecek potansiyel tanı protokolleri sayesinde bu proteinlerin vücut sıvılarında tespiti, hastalığın agresifliği, seyri ve metastaz potansiyeli hakkında

önemli bilgiler sağlayabilir. Bu durumu desteklemek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Tespit edilen birçok proteinin farklı germ tabakalarından köken alan dokularda benzer özellikler sergilemesi, pluripotent KKH hipotezini desteklemektedir. Bu bulgular, bu tür çalışmaların önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Daha ayrıntılı ve geniş çaplı araştırmalar, kanserin biyolojik mekanizmalarının yanı sıra metastaz süreçlerini daha iyi anlamaya olanak sağlayabilir. Bu durum, gelecekte kansere karşı etkili tedavi stratejilerinin ve biyobelirteçlerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir

Bu çalışmanın tek bir hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiş olması, araştırmanın kısıtlayıcı yönlerinden biridir. Ancak, farklı kanser kök hücre popülasyonlarının varlığının ve işlev farklılıklarının belirlenmesi, sekretom proteinlerinin detaylı bir şekilde incelenmesiyle elde edilen veriler, bu tür çalışmaların potansiyelini açıkça ortaya koymaktadır. Bu çalışma, gelecekte yapılacak araştırmalar için bir temel oluşturarak, daha fazla hücre popülasyonunun kullanılmasını ve bu popülasyonların hastalardan alınan çeşitli kanser örneklerine uygulanmasını mümkün kılabilir. Bu yaklaşım, kanser türlerini daha iyi anlamak, daha etkili tedavi yöntemleri geliştirmek ve kullanılabilir biyobelirteçlerin tespitinde önemli bir katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Aballo TJ, Roberts DS, Melby JA, Buck KM, Brown KA, Ge Y. Ultrafast and Reproducible Proteomics from Small Amounts of Heart Tissue Enabled by Azo and timsTOF Pro. *J Proteome Res.* 2021;20(8):4203-4211.
- Abdullah R, Tavare AN, Creamer A, Creer D, Vancheeswaran R, Hare SS. Lung cancer tissue diagnosis in poor lung function: addressing the ongoing percutaneous lung biopsy FEV1 paradox using Heimlich valve. *Thorax.* 2016;71(8):757-758.
- Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature.* 2016;537(7620):347-355.
- Aghajani M, Mansoori B, Mohammadi A, Asadzadeh Z, Baradaran B. New emerging roles of CD133 in cancer stem cell: Signaling pathway and miRNA regulation. *J Cell Physiol.* 2019;234(12):21642-21661.
- Alessio N, Squillaro T, Özcan S, Di Bernardo G, Venditti M, Melone M, Peluso G, Galderisi U. Stress and stem cells: adult Muse cells tolerate extensive genotoxic stimuli better than mesenchymal stromal cells. *Oncotarget.* 2018;9(27):19328-19341.
- Archer TC, Fertig EJ, Gosline SJ, Hafner M, Hughes SK, Joughin BA, Meyer AS, Piccolo SR, Shajahan-Haq AN. *Systems Approaches to Cancer Biology.* 2016;76(23):6774-6777.
- Asiago VM, Alvarado LZ, Shanaiah N, Gowda GA, Owusu-Sarfo K, Ballas RA, Raftery D. Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer Res.* 2010;70(21):8309-8318.

- Bai RZ, Wu Y, Liu Q, Xie K, Wei YQ, Wang YS, Liu K, Luo Y, Su JM, Hu B, Liu JY, Li Q, Niu T, Zhao ZW, Yang L. Suppression of lung cancer in murine model: treated by combination of recombinant human endostatin adenovirus with low-dose cisplatin. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009;28(1):31.
- Bamberger C, Martínez-Bartolomé S, Montgomery M, Pankow S, Hulleman JD, Kelly JW, Yates JR 3rd. Deducing the presence of proteins and proteoforms in quantitative proteomics. *Nat Commun.* 2018;9(1):2320.
- Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* 2017;23(10):1124-1134.
- Becker J. Introduction to mass spectrometry. 2007;1-6
- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* 2008;40(5):499-507.
- Bereman MS, Johnson R, Bollinger J, Boss Y, Shulman N, MacLean B, Hoofnagle AN, MacCoss MJ. Implementation of statistical process control for proteomic experiments via LC MS/MS. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2014;25(4):581-587.
- Bonn F, Otto A. Protein Enrichment from Highly Dilute Samples with StrataClean. *Methods Mol Biol.* 2018;1841:11-18.
- Borziak K, Parvanova I, Finkelstein J. Introducing a Platform for Integrating and Sharing Stem Cell Research Data. *Stud Health Technol Inform.* 2021;281:387-391.
- Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229-263.
- Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ. Updating the Definition of Cancer. *Mol Cancer Res.* 2023;21(11):1142-1147.
- Burke AR, Singh RN, Carroll DL, Wood JC, D'Agostino RB Jr, Ajayan PM, Torti FM, Torti SV. The resistance of breast cancer stem cells to conventional hyperthermia and their sensitivity to nanoparticle-mediated photothermal therapy. *Biomaterials.* 2012;33(10):2961-2970.
- Butte AJ. Translational bioinformatics applications in genome medicine. *Genome Med.* 2009;1(6):64.

- Caporarello N, Lupo G, Olivieri M, Cristaldi M, Cambria MT, Salmeri M, Anfuso CD. Classical VEGF, Notch and Ang signalling in cancer angiogenesis, alternative approaches and future directions (Review). *Mol Med Rep.* 2017;16(4):4393-4402.
- Carty DM, Schiffer E, Delles C. Proteomics in hypertension. *J Hum Hypertens.* 2013;27(4):211-216.
- Chen CH, Chuang SM, Yang MF, Liao JW, Yu SL, Chen JJ. A novel function of YWHAZ/ β -catenin axis in promoting epithelial-mesenchymal transition and lung cancer metastasis. *Mol Cancer Res.* 2012;10(10):1319-1331.
- Chen D, McCool EN, Yang Z, Shen X, Lubeckyj RA, Xu T, Wang Q, Sun L. Recent advances (2019-2021) of capillary electrophoresis-mass spectrometry for multilevel proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 2023;42(2):617-642.
- Chen J, Lu A, Tan D, Zhang Q, Lu Y, Qin L, He Y. Determination of Scopolamine Distribution in Plasma and Brain by LC-MS/MS in Rats. *Int J Anal Chem.* 2022;2022:8536235.
- Chen L, Muñoz-Antonia T, Cress WD. Trim28 contributes to EMT via regulation of E-cadherin and N-cadherin in lung cancer cell lines. *PLoS One.* 2014;9(7):e101040.
- Chen W, Dong J, Haiech J, Kilhoffer MC, Zeniou M. Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1740936.
- Cheng TY, Cramb SM, Baade PD, Youlden DR, Nwogu C, Reid ME. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *J Thorac Oncol.* 2016;11(10):1653-1671.
- Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2001;36(8):849-865.
- Chin L, Andersen JN, Futreal PA. Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine. *Nat Med.* 2011;17(3):297-303.
- Chu C. What're the functions and characteristics of stem cell. *Theoretical and Natural Science.* 2023;15,197-200.

- Conrad DH, Goyette J, Thomas PS. Proteomics as a method for early detection of cancer: a review of proteomics, exhaled breath condensate, and lung cancer screening. *J Gen Intern Med.* 2008;23 Suppl 1(Suppl 1):78-84.
- Coorssen JR, Padula MP. Proteomics-The State of the Field: The Definition and Analysis of Proteomes Should Be Based in Reality, Not Convenience. *Proteomes.* 2024;12(2):14.
- da Cunha BR, Domingos C, Stefanini ACB, Henrique T, Polachini GM, Castelo-Branco P, Tajara EH. Cellular Interactions in the Tumor Microenvironment: The Role of Secretome. *J Cancer.* 2019;10(19):4574-4587.
- Damayanti RH, Rusdiana T, Wathoni N. Mesenchymal Stem Cell Secretome for Dermatology Application: A Review. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2021;14:1401-1412.
- Darville LN, Sokolowski BH. Bottom-up and shotgun proteomics to identify a comprehensive cochlear proteome. *J Vis Exp.* 2014;(85):51186.
- Das PK, Pillai S, Rakib MA, Khanam JA, Gopalan V, Lam AKY, Islam F. Plasticity of Cancer Stem Cell: Origin and Role in Disease Progression and Therapy Resistance. *Stem Cell Rev Rep.* 2020;16(2):397-412.
- Derbal Y. The Adaptive Complexity of Cancer. *Biomed Res Int.* 2018;2018:5837235.
- Deslandes G, Grégoire M, Renaud C, Monteil-Ganière C, Azoulay C, Pineau A, Jolliet P, Dailly E. Comparison Between an Automated and Manual Extraction for the Determination of Immunosuppressive Drugs Whole Blood Concentrations by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(6):924-929.
- Ding DC, Liu HW, Chang YH, Chu TY. Expression of CD133 in endometrial cancer cells and its implications. *J Cancer.* 2017;8(11):2142-2153.
- Ding M, Malhotra R, Ottosson T, Lundqvist M, Mebrahtu A, Brengdahl J, Gehrman U, Bäck E, Ross-Thriepfand D, Isaksson I, Magnusson B, Sachsenmeier KF, Tegel H, Hober S, Uhlén M, Mayr LM, Davies R, Rockberg J, Schiavone LH. Secretome screening reveals immunomodulating functions of IFN α -7, PAP and GDF-7 on regulatory T-cells. *Sci Rep.* 2021;11(1):16767.

- Ding M, Tegel H, Sivertsson Å, Hober S, Snijder A, Ormö M, Strömstedt PE, Davies R, Holmberg Schiavone L. Secretome-Based Screening in Target Discovery. *SLAS Discov.* 2020;25(6):535-551.
- Dogan N, Dogan I. Global Patterns of Incidence and Mortality in Lung Cancer. *EJMO.* 2019; 3(1): 28-32
- Dokuni R, Nagano T, Jimbo N, Sato H, Kiriu T, Yasuda Y, Yamamoto M, Tachihara M, Kobayashi K, Maniwa Y, Nishimura Y. High expression level of serpin peptidase inhibitor clade E member 2 is associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Respir Res.* 2020;21(1):331.
- Dollé L, Theise ND, Schmelzer E, Boulter L, Gires O, van Grunsven LA. EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;308(4):G233-G250.
- Domvri K, Zarogoulidis P, Darwiche K, Browning RF, Li Q, Turner JF, Kioumis I, Spyrtos D, Porpodis K, Papaiwannou A, Tsiouda T, Freitag L, Zarogoulidis K. Molecular Targeted Drugs and Biomarkers in NSCLC, the Evolving Role of Individualized Therapy. *J Cancer.* 2013;4(9):736-754.
- Duch P, Díaz-Valdivia N, Ikemori R, Gabasa M, Radisky ES, Arshakyan M, Gea-Sorlí S, Mateu-Bosch A, Bragado P, Carrasco JL, Mori H, Ramírez J, Teixidó C, Reguart N, Fillat C, Radisky DC, Alcaraz J. Aberrant TIMP-1 overexpression in tumor-associated fibroblasts drives tumor progression through CD63 in lung adenocarcinoma. *Matrix Biol.* 2022;111:207-225.
- Ebrahimi F, Dehghani M, Makkizadeh F. Analysis of Persian Bioinformatics Research with Topic Modeling. *Biomed Res Int.* 2023;2023:3728131.
- Eisenhofer G, Peitzsch M, Kaden D, Langton K, Pamporaki C, Masjkur J, Tsatsaronis G, Mangelis A, Williams TA, Reincke M, Lenders JWM, Bornstein SR. Reference intervals for plasma concentrations of adrenal steroids measured by LC-MS/MS: Impact of gender, age, oral contraceptives, body mass index and blood pressure status. *Clin Chim Acta.* 2017;470:115-124.
- El Rassy E, Botticella A, Kattan J, Le Péchoux C, Besse B, Hendriks L. Non-small cell lung cancer brain metastases and the immune system: From brain metastases development to treatment. *Cancer Treat Rev.* 2018;68:69-79.

- Eramo A, Lotti F, Sette G, Pillozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008;15(3):504-514.
- Fang L, Che Y, Zhang C, Huang J, Lei Y, Lu Z, Sun N, He J. LAMC1 upregulation via TGF β induces inflammatory cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma via NF- κ B-CXCL1-STAT3. *Mol Oncol.* 2021;15(11):3125-3146.
- Fouad AM, Gabr MM, Abdelhady EK, Zakaria MM, Khater SM, Ismail AM, Refaie AF. In vitro differentiation of human multilineage differentiating stress-enduring (Muse) cells into insulin producing cells. *J Genet Eng Biotechnol.* 2018;16(2):433-440.
- Gan Y, Ye F, He XX. The role of YWHAZ in cancer: A maze of opportunities and challenges. *J Cancer.* 2020;11(8):2252-2264.
- Gao W, Liu Y, Qin R, Liu D, Feng Q. Silence of fibronectin 1 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jul 15;476(1):35-41.
- Gentry SN, Ashkenazi R, Jackson TL. A Maturity-Structured Mathematical Model of Mutation, Acquisition in the Absence of Homeostatic Regulation. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena.* 2009;4(3):156-182.
- Gisina A, Kim Y, Yarygin K, Lupatov A. Can CD133 Be Regarded as a Prognostic Biomarker in Oncology: Pros and Cons. *Int J Mol Sci.* 2023;24(24):17398. Published 2023 Dec 12. doi:10.3390/ijms242417398
- Gomes FP, Yates JR 3rd. Recent trends of capillary electrophoresis-mass spectrometry in proteomics research. *Mass Spectrom Rev.* 2019;38(6):445-460. doi:10.1002/mas.21599
- Gooi L, Gopalakrishnan J. Regulation of stem cells in their niche. *Curr Stem Cell Rep* 2. 2016;2(3), 282-289.
- Graham DR, Elliott ST, Van Eyk JE. Broad-based proteomic strategies: a practical guide to proteomics and functional screening. *J Physiol.* 2005;563(Pt 1):1-9.
- Gundry RL, Riordon DR, Tarasova Y, Chuppa S, Bhattacharya S, Juhasz O, Wiedemeier O, Milanovich S, Noto FK, Tchernyshyov I, Raginski K, Bausch-Fluck D, Tae HJ, Marshall S, Duncan SA, Wollscheid B, Wersto RP,

- Rao S, Van Eyk JE, Boheler KR. A cell surfaceome map for immunophenotyping and sorting pluripotent stem cells. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(8):303-316.
- Hadjidemetriou M, Al-Ahmady Z, Buggio M, Swift J, Kostarelos K. A novel scavenging tool for cancer biomarker discovery based on the blood-circulating nanoparticle protein corona. *Biomaterials*. 2019;188:118-129. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.10.011
- Hamilton SL, Ferando B, Eapen AS, Yu JC, Joy AR. Cancer Secretome May Influence BSP and DSP Expression in Human Salivary Gland Cells. *J Histochem Cytochem*. 2017;65(3):139-151.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanash S. Disease proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):226-232.
- Hase T, Sato M, Yoshida K, Girard L, Takeyama Y, Horio M, Elshazley M, Oguri T, Sekido Y, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD, Kondo M, Hasegawa Y. Pivotal role of epithelial cell adhesion molecule in the survival of lung cancer cells. *Cancer Sci*. 2011;102(8):1493-1500.
- Hashemi M, Abbasi-Azam A, Oraee-Yazdani S, Lenzer J. Response of human glioblastoma cells to hyperthermia: Cellular apoptosis and molecular events. *Tissue Cell*. 2022;75:101751.
- Hathout Y. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics*. 2007;4(2):239-248.
- He FX, Zhang LL, Jin PF, Liu DD, Li AH. DPY30 regulates cervical squamous cell carcinoma by mediating epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Oncotargets Ther*. 2019;12:7139-7147.
- Heck AJ. Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nat Methods*. 2008;5(11):927-933. doi:10.1038/nmeth.1265
- Hocking SL, Wu LE, Guilhaus M, Chisholm DJ, James DE. Intrinsic depot-specific differences in the secretome of adipose tissue, preadipocytes, and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells. *Diabetes*. 2010;59(12):3008-3016.

- Hua KF, Wu YH, Zhang ST. Clinical diagnostic value of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for primary aldosteronism in patients with hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:1032070.
- Huang T, Liu L, Lv Z, Zhao K, Yi Q, Zhang J. Recent Advances in DNA Vaccines against Lung Cancer: A Mini Review. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(10):1586
- Hughes CS, Nuhn AA, Postovit LM, Lajoie GA. Proteomics of human embryonic stem cells. *Proteomics*. 2011;11(4):675-690.
- Hulsen T, Jamuar SS, Moody AR, Karnes JH, Varga O, Hedensted S, Spreafico R, Hafler DA, McKinney EF. From Big Data to Precision Medicine. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:34
- Hurt EM, Chan K, Serrat MA, Thomas SB, Veenstra TD, Farrar WL. Identification of vitronectin as an extrinsic inducer of cancer stem cell differentiation and tumor formation. *Stem Cells*. 2010;28(3):390-398.
- Jacot W, Lhermitte L, Dossat N, Pujol JL, Molinari N, Daurès JP, Maudelonde T, Mangé A, Solassol J. Serum proteomic profiling of lung cancer in high-risk groups and determination of clinical outcomes. *J Thorac Oncol*. 2008;3(8):840-850.
- Jiang Y, Rex DAB, Schuster D, Neely BA, Rosano GL, Volkmar N, Momenzadeh A, Peters-Clarke TM, Egbert SB, Kreimer S, Doud EH, Crook OM, Yadav AK, Vanuopadath M, Hegeman AD, Mayta ML, Duboff AG, Riley NM, Moritz RL, Meyer JG. Comprehensive Overview of Bottom-Up Proteomics Using Mass Spectrometry. *ACS Meas Sci Au*. 2024;4(4):338-417.
- Jin C, Tian H, Li J, Jia S, Li S, Xu GT, Xu L, Lu L. Stem cell education for medical students at Tongji University: Primary cell culture and directional differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Mol Biol Educ*. 2018;46(2):151-154.
- Jin Lee Y. Mass spectrometric analysis of cross-linking sites for the structure of proteins and protein complexes. *Mol Biosyst*. 2008;4(8):816-823.
- Kabir F, Apu MNH. Multi-omics analysis predicts fibronectin 1 as a prognostic biomarker in glioblastoma multiforme. *Genomics*. 2022 May;114(3):110378.

- Ke C, Yuan L, Xiujiang Y, Danjie S. Integrated analysis of metabolome in a EUS-FNA sample with transcriptome in the TCGA cohort of pancreatic head and body/tail adenocarcinoma. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(6):8880-8894.
- Kilmister EJ, Koh SP, Weth FR, Gray C, Tan ST. Cancer Metastasis and Treatment Resistance: Mechanistic Insights and Therapeutic Targeting of Cancer Stem Cells and the Tumor Microenvironment. *Biomedicines*. 2022;10(11):2988.
- Kim RJ, Nam JS. OCT4 Expression Enhances Features of Cancer Stem Cells in a Mouse Model of Breast Cancer. *Lab Anim Res*. 2011;27(2):147-152.
- Koutsogiannouli E, Papavassiliou AG, Papanikolaou NA. Complexity in cancer biology: is systems biology the answer?. *Cancer Med*. 2013;2(2):164-177.
- Kunitomi H, Kobayashi Y, Wu RC, Takeda T, Tominaga E, Banno K, Aoki D. LAMC1 is a prognostic factor and a potential therapeutic target in endometrial cancer. *J Gynecol Oncol*. 2020;31(2):e11.
- Kuo CY, Ann DK. When fats commit crimes: fatty acid metabolism, cancer stemness and therapeutic resistance. *Cancer Commun (Lond)*. 2018;38(1):47.
- Kurgan L, Zhou Y. Machine learning models in protein bioinformatics. *Curr Protein Pept Sci*. 2011;12(6):455.
- Kushchayeva Y, Soldin SJ, Stolze B, Yu X, Auh S, Lin TC, Skarulis M, Brown RJ. Comparison of Thyroid Panel by Immunoassay and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry during Transition from Euthyroid to Hyperthyroid State. *Annals Thyroid Res*. 2019; 5(1): 178-184
- La'ah AS, Chiou SH. Cutting-Edge Therapies for Lung Cancer. *Cells*. 2024;13(5):436.
- Lacerenza S, Ciregia F, Giusti L, Bonotti A, Greco V, Giannaccini G, D'Antongiovanni V, Fallahi P, Pieroni L, Cristaudo A, Lucacchini A, Mazzoni MR, Foddìs R. Putative Biomarkers for Malignant Pleural Mesothelioma Suggested by Proteomic Analysis of Cell Secretome. *Cancer Genomics Proteomics*. 2020;17(3):225-236.
- Lahiri A, Maji A, Potdar PD, Singh N, Parikh P, Bisht B, Mukherjee A, Paul MK. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. *Mol Cancer*. 2023;22(1):40. Published 2023 Feb 21.

- Lam TC, Chun RK, Li KK, To CH. Application of proteomic technology in eye research: a mini review. *Clin Exp Optom*. 2008;91(1):23-33.
- Lawlor K, Nazarian A, Lacomis L, Tempst P, Villanueva J. Pathway-based biomarker search by high-throughput proteomics profiling of secretomes. *J Proteome Res*. 2009;8(3):1489-1503.
- Leder K, Holland EC, Michor F. The therapeutic implications of plasticity of the cancer stem cell phenotype. *PLoS One*. 2010;5(12):e14366.
- Lee SC, Kim KH, Kim OH, Lee SK, Hong HE, Won SS, Jeon SJ, Choi BJ, Jeong W, Kim SJ. Determination of optimized oxygen partial pressure to maximize the liver regenerative potential of the secretome obtained from adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):181.
- Li K, Wang H, Jiang B, Jin X. TRIM28 in cancer and cancer therapy. *Front Genet*. 2024;15:1431564.
- Li Y, Sokoll LJ, Barker PE, Zhang H, Chan DW. Mass spectrometric identification of proteotypic peptides from clinically used tumor markers. *Clinical Proteomics*, 2008;4, 58-66.
- Liang Y, Zhang L, Zhang Y. Chromatographic separation of peptides and proteins for characterization of proteomes. *Chem Commun (Camb)*. 2023;59(3):270-281.
- Liao H, Liang Y, Kang L, Xiao Y, Yu T, Wan R. miR-454-3p inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation and metastasis by targeting TGFB2. *Oncol Rep*. 2021;45(5):67.
- Lin YA, Carter-Harris L, Yang JN, Lin XJ, Huang FF. Adaptation and validation of the Chinese version of the lung cancer screening health belief scales. *BMC Public Health*. 2022;22(1):620.
- Lin YW, Su HC, Raj EN, Liu KK, Chang CJ, Hsu TC, Cheng PY, Wang RH, Lai YH, Chen CH, Lin YC, Chao JI. Targeting EGFR and Monitoring Tumorigenesis of Human Lung Cancer Cells In Vitro and In Vivo Using Nanodiamond-Conjugated Specific EGFR Antibody. *Pharmaceutics*. 2022;15(1):111.

- Lindahl A, Heuchel R, Forshed J, Lehtiö J, Löhr M, Nordström A. Discrimination of pancreatic cancer and pancreatitis by LC-MS metabolomics. *Metabolomics*. 2017;13(5):61.
- Liu J, Liu D, Yang Z, Yang Z. High LAMC1 expression in glioma is associated with poor prognosis. *Onco Targets Ther*. 2019;12:4253-4260.
- Liu PJ, Chen CD, Wang CL, Wu YC, Hsu CW, Lee CW, Huang LH, Yu JS, Chang YS, Wu CC, Yu CJ. In-depth proteomic analysis of six types of exudative pleural effusions for nonsmall cell lung cancer biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(4):917-932.
- Liu XY, Wei MG, Liang J, Xu HH, Wang JJ, Wang J, Yang XP, Lv FF, Wang KQ, Duan JH, Tu Y, Zhang S, Chen C, Li XH. Injury-preconditioning secretome of umbilical cord mesenchymal stem cells amplified the neurogenesis and cognitive recovery after severe traumatic brain injury in rats. *J Neurochem*. 2020;153(2):230-251.
- Liu Y, Li X, Chen S, Zhu C, Shi Y, Dang S, Zhang W, Li W. Pan-cancer analysis of SERPINE family genes as biomarkers of cancer prognosis and response to therapy. *Front Mol Biosci*. 2024;10:1277508.
- Lodi D, Iannitti T, Palmieri B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):9. Published 2011 Jan 17.
- Lopez JS, Banerji U. Combine and conquer: challenges for targeted therapy combinations in early phase trials. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(1):57-66.
- López-López E, Bajorath J, Medina-Franco JL. Informatics for Chemistry, Biology, and Biomedical Sciences. *J Chem Inf Model*. 2021;61(1):26-35.
- Luo LZ, Gopalakrishna-Pillai S, Nay SL, Park SW, Bates SE, Zeng X, Iverson LE, O'Connor TR. DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells. *PLoS One*. 2012;7(3):e30541.
- Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods Inf Med*. 2001;40(4):346-358.
- Maes E, Mertens I, Valkenburg D, Pauwels P, Rolfo C, Baggerman G. Proteomics in cancer research: Are we ready for clinical practice?. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;96(3):437-448.

- Manes NP, Nita-Lazar A. Application of targeted mass spectrometry in bottom-up proteomics for systems biology research. *J Proteomics*. 2018;189:75-90.
- Matthiesen R. MS-Based Biomarker Discovery in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Lung Cancer. *Proteomics Clin Appl*. 2020;14(1):e1900077.
- Maurer MH. The path to enlightenment: making sense of genomic and proteomic information. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2004;2(2):123-131.
- Mehus AA, Jones M, Trahan M, Kinnunen K, Berwald K, Lindner B, Al-Marsoumi S, Zhou XD, Garrett SH, Sens DA, Sens MA, Somji S. Pevonedistat Inhibits SOX2 Expression and Sphere Formation but Also Drives the Induction of Terminal Differentiation Markers and Apoptosis within Arsenite-Transformed Urothelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24(11):9149.
- Miller RM, Ibrahim K, Smith LM. ProteaseGuru: A Tool for Protease Selection in Bottom-Up Proteomics. *J Proteome Res*. 2021;20(4):1936-1942.
- Mirabdollahi M, Haghjooy Javanmard S, Sadeghi-Aliabadi H. In Vitro Assessment of Cytokine Expression Profile of MCF-7 Cells in Response to hWJ-MSCs Secretome. *Adv Pharm Bull*. 2019;9(4):649-654.
- Mischak H, Coon JJ, Novak J, Weissinger EM, Schanstra JP, Dominiczak AF. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in biomarker discovery and clinical diagnosis: an update of recent developments. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(5):703-724.
- Nelakurthi VM, Paul P, Reche A. Bioinformatics in Early Cancer Detection. *Cureus*. 2023;15(10):e46931.
- Nickerson JL, Baghalabadi V, Rajendran SRCK, Jakubec PJ, Said H, McMillen TS, Dang Z, Doucette AA. Recent advances in top-down proteome sample processing ahead of MS analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2023;42(2):457-495.
- Ning W, Wei Y, Gao L, Han C, Gou Y, Fu S, Liu D, Zhang C, Huang X, Wu S, Peng D, Wang C, Xue Y. HemI 2.0: an online service for heatmap illustration. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(W1):W405-W411.
- Noh KH, Kim BW, Song KH, Cho H, Lee YH, Kim JH, Chung JY, Kim JH, Hewitt SM, Seong SY, Mao CP, Wu TC, Kim TW. Nanog signaling in cancer

- promotes stem-like phenotype and immune evasion. *J Clin Invest.* 2012;122(11):4077-4093.
- Nordon I, Brar R, Hinchliffe R, Cockerill G, Loftus I, Thompson M. The role of proteomic research in vascular disease. *J Vasc Surg.* 2009;49(6):1602-1612.
- Ntai I, LeDuc RD, Fellers RT, Erdmann-Gilmore P, Davies SR, Rumsey J, Early BP, Thomas PM, Li S, Compton PD, Ellis MJ, Ruggles KV, Fenyő D, Boja ES, Rodriguez H, Townsend RR, Kelleher NL. Integrated Bottom-Up and Top-Down Proteomics of Patient-Derived Breast Tumor Xenografts. *Mol Cell Proteomics.* 2016;15(1):45-56.
- Ogata S, Masuda T, Ito S, Ohtsuki S. Targeted proteomics for cancer biomarker verification and validation. *Cancer Biomark.* 2022;33(4):427-436.
- Ohtsuka S, Dalton S. Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. *Gene Ther.* 2008;15(2):74-81.
- Özer Ö, Nemutlu E, Reçber T, Eylem CC, Aktas BY, Kır S, Kars A, Aksoy S. Liquid biopsy markers for early diagnosis of brain metastasis patients with breast cancer by metabolomics. *Eur J Mass Spectrom (Chichester).* 2022;28(1-2):56-64.
- Pan S, Chen R, Crispin DA, May D, Stevens T, McIntosh MW, Bronner MP, Ziogas A, Anton-Culver H, Brentnall TA. Protein alterations associated with pancreatic cancer and chronic pancreatitis found in human plasma using global quantitative proteomics profiling. *J Proteome Res.* 2011;10(5):2359-2376.
- Park M, Kim D, Ko S, Kim A, Mo K, Yoon H. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6806.
- Paul P, Antonydhasan V, Gopal J, Haga SW, Hasan N, Oh JW. Bioinformatics for Renal and Urinary Proteomics: Call for Aggrandization. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):961.
- Peng H, Ye T, Deng L, Yang X, Li Q, Tong J, Guo J. Activin and Hepatocyte Growth Factor Promotes Colorectal Cancer Stemness and Metastasis through FOXM1/SOX2/CXCR4 Signaling. *Gut Liver.* 2024;18(3):476-488.
- Perry JM, Li L. Disrupting the stem cell niche: good seeds in bad soil. *Cell.* 2007;129(6):1045-1047.

- Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?. *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):225-238.
- Ponomarev A, Gilazieva Z, Solovyeva V, Allegrucci C, Rizvanov A. Intrinsic and Extrinsic Factors Impacting Cancer Stemness and Tumor Progression. *Cancers (Basel)*. 2022;14(4):970.
- Qi ZX, Cai JJ, Chen LC, Yue Q, Gong Y, Yao Y, Mao Y. TRIM28 as an independent prognostic marker plays critical roles in glioma progression. *J Neurooncol*. 2016;126(1):19-26.
- Qu H, Li R, Liu Z, Zhang J, Luo R. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(11):2644-2650.
- Quast JP, Schuster D, Picotti P. protti: an R package for comprehensive data analysis of peptide- and protein-centric bottom-up proteomics data. *Bioinform Adv*. 2021;2(1):vbab041.
- Ramundo V, Palazzo ML, Aldieri E. TGF- β as Predictive Marker and Pharmacological Target in Lung Cancer Approach. *Cancers (Basel)*. 2023;15(8):2295.
- Rani A, Devi Singh V, Mazumder R, Dua K. Cancer Proteomics for Cellular Dysfunction: Insights and Trends. *Curr Pharm Des*. 2023;29(9):697-712.
- Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC, Herman JG, Hirsch FR, Pao W, Schwartz AG, Vahakangas KH, Samet JM. Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2009;15(18):5646-5661.
- Rudnick PA, Clauser KR, Kilpatrick LE, Tchekhovskoi DV, Neta P, Blonder N, Billheimer DD, Blackman RK, Bunk DM, Cardasis HL, Ham AJ, Jaffe JD, Kinsinger CR, Mesri M, Neubert TA, Schilling B, Tabb DL, Tegeler TJ, Vega-Montoto L, Variyath AM, Wang M, Wang P, Whiteaker JR, Zimmerman LJ, Carr SA, Fisher SJ, Gibson BW, Paulovich AG, Regnier FE, Rodriguez H, Spiegelman C, Tempst P, Liebler DC, Stein SE. Performance metrics for liquid chromatography-tandem mass spectrometry systems in proteomics analyses. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(2):225-241.

- Samet JM, Avila-Tang E, Boffetta P, Hannan LM, Olivo-Marston S, Thun MJ, Rudin CM. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin Cancer Res.* 2009;15(18):5626-5645.
- Sauvage FL, Gaulier JM, Lachâtre G, Marquet P. Pitfalls and prevention strategies for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the selected reaction-monitoring mode for drug analysis. *Clin Chem.* 2008;54(9):1519-1527. doi:10.1373/clinchem.2008.105478
- Schwartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(5):539-544.
- Seike M, Kondo T, Fujii K, Okano T, Yamada T, Matsuno Y, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signatures for histological types of lung cancer. *Proteomics.* 2005;5(11):2939-2948.
- Seitlinger J, Prieto M, Siat J, Renaud S. Pulmonary metastasectomy in renal cell carcinoma: a mainstay of multidisciplinary treatment. *J Thorac Dis.* 2021;13(4):2636-2642.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-2504.
- Sharma B, Singh RK. Emerging candidates in breast cancer stem cell maintenance, therapy resistance and relapse. *J Carcinog.* 2011;10:36.
- Sharma S, Ray S, Mukherjee S, Moiyadi A, Sridhar E, Srivastava S. Multipronged quantitative proteomic analyses indicate modulation of various signal transduction pathways in human meningiomas. *Proteomics.* 2015;15(2-3):394-407.
- Shevchenko VE, Kovalev SV, Arnotskaya NE, Kudryavtsev IA. Identification of potential lung cancer biomarkers by liquid chromatography tandem mass spectrometry-based proteomics analysis of secretomes of two lung cancer cell lines. *Eur J Mass Spectrom (Chichester).* 2013;19(5):377-389.
- Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL,

- Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*. 2007;11(3):259-273.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):7-33.
- Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(1):17-48.
- Siney EJ, Holden A, Casselden E, Bulstrode H, Thomas GJ, Willaime-Morawek S. Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 Mediate Migration and Differentiation in Glioblastoma Sphere-Forming Cells. *Mol Neurobiol*. 2017;54(5):3893-3905.
- Sipos F, Múzes G. Disagreements in the therapeutic use of mesenchymal stem cell-derived secretome. *World J Stem Cells*. 2022;14(6):365-371.
- Sjöstedt E, Zhong W, Fagerberg L, Karlsson M, Mitsios N, Adori C, Oksvold P, Edfors F, Limiszewska A, Hikmet F, Huang J, Du Y, Lin L, Dong Z, Yang L, Liu X, Jiang H, Xu X, Wang J, Yang H, Bolund L, Mardinoglu A, Zhang C, von Feilitzen K, Lindskog C, Pontén F, Luo Y, Hökfelt T, Uhlén M, Mulder J. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science*. 2020;367(6482):eaay5947
- Slack J. *Stem Cells: A Very Short Introduction* (2 nd edn), *Very Short Introductions* (Oxford, 2021; online edn, Oxford Academic, 23 Sept. 2021)
- Slack JMW. What is a stem cell? *WIREs Dev Biol*. 2018; 7:e323
- Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran*. 2017;55(1):6-23.
- Spina R, Voss DM, Asnaghi L, Sloan A, Bar EE. Flow Cytometry-based Drug Screening System for the Identification of Small Molecules That Promote Cellular Differentiation of Glioblastoma Stem Cells. *J Vis Exp*. 2018;(131):56176.
- Sucharitha A, Bhuvana D. An Overview of Cancer. *Advances in Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2023;1(1), 1-8
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and*

- Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
- Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, Gable AL, Fang T, Doncheva NT, Pyysalo S, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D638-D646.
- Tan Q, Ma J, Zhang H, Wu X, Li Q, Zuo X, Jiang Y, Liu H, Yan L. miR-125b-5p upregulation by TRIM28 induces cisplatin resistance in non-small cell lung cancer through CREB1 inhibition. *BMC Pulm Med.* 2022 Dec 7;22(1):469.
- Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W556-W560.
- Taylor CF, Paton NW, Lilley KS, Binz PA, Julian RK Jr, Jones AR, Zhu W, Apweiler R, Aebersold R, Deutsch EW, Dunn MJ, Heck AJ, Leitner A, Macht M, Mann M, Martens L, Neubert TA, Patterson SD, Ping P, Seymour SL, Souda P, Tsugita A, Vandekerckhove J, Vondriska TM, Whitelegge JP, Wilkins MR, Xenarios I, Yates JR 3rd, Hermjakob H. The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE). *Nat Biotechnol.* 2007;25(8):887-893.
- Telang N, Katdare M. Epithelial cell culture models for the prevention and therapy of clinical breast cancer (Review). *Oncol Lett.* 2012;3(4):744-750.
- Telang N. Cancer stem cells: innovative approach for testable alternatives against therapy resistant cancer. *Medical Research Archives,* 2022;10(8).
- Tikhvinskiy DA, Porozov YuB. Bioinformatics and tools for computer analysis and visualization of macromolecules. *Russian Open Medical Journal.* 2013; 2: 0101.
- Toyoda M, Okumura D, Ishihara M, Katakuse I. Multi-turn time-of-flight mass spectrometers with electrostatic sectors. *J Mass Spectrom.* 2003 Nov;38(11):1125-42.
- Tran C, Damaser MS. Stem cells as drug delivery methods: application of stem cell secretome for regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;82-83:1-11.

- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016 Sep;13(9):731-40. 2016;13(9):731-740.
- UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(D1):D523-D531.
- Vandenbrouck Y, Christiany D, Combes F, Loux V, Brun V. Bioinformatics Tools and Workflow to Select Blood Biomarkers for Early Cancer Diagnosis: An Application to Pancreatic Cancer. *Proteomics*. 2019;19(21-22):e1800489.
- Vicente-Dueñas C, Sánchez-García I, Brown G. Editorial: Special Issue "Stem Cell Biology and Cancer". *Int J Mol Sci*. 2023;24(14):11533.
- Volarevic V, Erceg S, Bhattacharya SS, Stojkovic P, Horner P, Stojkovic M. Stem cell-based therapy for spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2013;22(8):1309-1323.
- Wanandi SI, Lestari DR, Hilbertina N, Siregar NC, Jusman SW, Abdullah M. Secretomes of Primary Cancer-associated Fibroblasts Upregulate the Expression of Stemness Markers in HT-29 Human Colorectal Carcinoma Cells. *Indonesian Biomedical Journal*. 2020;12(4):333-339.
- Wang C, Chen S, Wu Y, Wu D, Wang J, Li F. The combination therapy with EpCAM/CD3 BsAb and MUC-1/CD3 BsAb elicited antitumor immunity by T-cell adoptive immunotherapy in lung cancer. *Int J Med Sci*. 2021;18(15):3380-3388.
- Wang C, Liang Y, Yang X, Zhong B, Zhang X, Zhao B, Liang Z, Zhang L, Zhang Y. Surface-Charged Hybrid Monolithic Column for MS-Compatible Peptide Separation with High Peak Capacity and Its Application in Proteomic Analysis. *Anal Chem*. 2022;94(27):9525-9529.
- Wang DL, Xiao C, Fu G, Wang X, Li L. Identification of potential serum biomarkers for breast cancer using a functional proteomics technology. *Biomark Res*. 2017;5:11.
- Wang H, Zhang Q, Fang X. Transcriptomics and proteomics in stem cell research. *Front Med*. 2014;8(4):433-444.

- Wang SS, Gao XL, Liu X, Gao SY, Fan YL, Jiang YP, Ma XR, Jiang J, Feng H, Chen QM, Tang YJ, Tang YL, Liang XH. CD133+ cancer stem-like cells promote migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma by inducing vasculogenic mimicry formation. *Oncotarget*. 2016;7(20):29051-29062.
- Wang SS, Jiang J, Liang XH, Tang YL. Links between cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther*. 2015;8:2973-2980.
- Wang X, Cheng Y, Chen L, Dong M, Feng T, Zhao L, Zhang R. Development of a high-voltage radio frequency power supply for quadrupole mass spectrometers with a wide dynamic measurement range. *Journal of Instrumentation*, 2023;18(12),
- Wang Y, Gao M, Zhang M, Pang Y, Xu Z, Zeng L, Yuan S. Tgfb1 deficiency impairs the self-renewal capacity of murine hematopoietic stem/progenitor cells in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024;703:149686.
- Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000;287(5457):1427-1430.
- Werner T. Proteomics and regulomics: the yin and yang of functional genomics. *Mass Spectrom Rev*. 2004;23(1):25-33. doi:10.1002/mas.10067
- Williams JJ, Drew JC, Galindo-Gonzalez S, Robic S, Dinsdale E, Morgan WR, Triplett EW, Burnette JM 3rd, Donovan SS, Fowlks ER, Goodman AL, Grandgenett NF, Goller CC, Hauser C, Jungck JR, Newman JD, Pearson WR, Ryder EF, Sierk M, Smith TM, Tosado-Acevedo R, Tapprich W, Tobin TC, Toro-Martínez A, Welch LR, Wilson MA, Ebenbach D, McWilliams M, Rosenwald AG, Pauley MA. Barriers to integration of bioinformatics into undergraduate life sciences education: A national study of US life sciences faculty uncover significant barriers to integrating bioinformatics into undergraduate instruction. *PLoS One*. 2019;14(11):e0224288.
- Wong AL, Xiang X, Ong PS, Mitchell EQY, Syn N, Wee I, Kumar AP, Yong WP, Sethi G, Goh BC, Ho PC, Wang L. A Review on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods for Rapid Quantification of Oncology Drugs. *Pharmaceutics*. 2018;10(4):221.

- Wu H, Qi XW, Yan GN, Zhang QB, Xu C, Bian XW. Is CD133 expression a prognostic biomarker of non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(6):e100168.
- Wu S, Yu L, Wang D, Zhou L, Cheng Z, Chai D, Ma L, Tao Y. Aberrant expression of CD133 in non-small cell lung cancer and its relationship to vasculogenic mimicry. *BMC Cancer*. 2012 Nov 21;12:535. 2012;12:535.
- Wu YH, Hu CW, Chien CW, Chen YJ, Huang HC, Juan HF. Quantitative proteomic analysis of human lung tumor xenografts treated with the ectopic ATP synthase inhibitor citreoviridin. *PLoS One*. 2013;8(8):e70642.
- Wuschko S, Gugerell A, Chabicovsky M, Hofbauer H, Laggner M, Erb M, Ostler T, Peterbauer A, Suessner S, Demyanets S, Leuschner J, Moser B, Mildner M, Ankersmit HJ. Toxicological testing of allogeneic secretome derived from peripheral mononuclear cells (APOSEC): a novel cell-free therapeutic agent in skin disease. *Sci Rep*. 2019;9(1):5598.
- Yamashita T, Kushida Y, Abe K, Dezawa M. Non-Tumorigenic Pluripotent Reparative Muse Cells Provide a New Therapeutic Approach for Neurologic Diseases. *Cells*. 2021;10(4):961.
- Yamauchi T, Yamasaki K, Tsuchiyama K, Koike S, Aiba S. A quantitative analysis of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells in human adipose tissue and efficacy of melanocytes induction. *J Dermatol Sci*. 2017;86(3):198-205.
- Yang F, Cui P, Lu Y, Zhang X. Requirement of the transcription factor YB-1 for maintaining the stemness of cancer stem cells and reverting differentiated cancer cells into cancer stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):233.
- Yang XL, Shi Y, Zhang DD, Xin R, Deng J, Wu TM, Wang HM, Wang PY, Liu JB, Li W, Ma YS, Fu D. Quantitative proteomics characterization of cancer biomarkers and treatment. *Mol Ther Oncolytics*. 2021;21:255-263.
- Yanovich G, Agmon H, Harel M, Sonnenblick A, Peretz T, Geiger T. Clinical Proteomics of Breast Cancer Reveals a Novel Layer of Breast Cancer Classification. *Cancer Res*. 2018;78(20):6001-6010.
- Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2009;11:49-79.

- Yin CL, Lv SQ, Chen XY, Guo H. The role of glioma stem cells in glioma tumorigenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19(5):818-824.
- Yoneyama T, Gorry M, Sobo-Vujanovic A, Lin Y, Vujanovic L, Gaither-Davis A, Moss ML, Miller MA, Griffith LG, Lauffenburger DA, Stabile LP, Herman J, Vujanovic NL. ADAM10 Sheddase Activity is a Potential Lung-Cancer Biomarker. *J Cancer*. 2018;9(14):2559-2570.
- Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell*. 2011;144(6):940-954.
- Yu S, Zhang R, Liu F, Wang H, Wu J, Wang Y. Notch inhibition suppresses nasopharyngeal carcinoma by depleting cancer stem-like side population cells. *Oncol Rep*. 2012;28(2):561-566.
- Yu X, Li W, Feng Y, Gao Z, Wu Q, Xia Y. The prognostic value of hedgehog signaling in bladder cancer by integrated bioinformatics. *Sci Rep*. 2023;13(1):6241.
- Zagoura D, Trohatou O, Makridakis M, Kollia A, Kokla N, Mokou M, Psaraki A, Eliopoulos AG, Vlahou A, Roubelakis MG. Functional secretome analysis reveals Annexin-A1 as important paracrine factor derived from fetal mesenchymal stem cells in hepatic regeneration. *EBioMedicine*. 2019;45:542-552.
- Zhan X. Current status of two-dimensional gel electrophoresis and multi-dimensional liquid chromatography as proteomic separation techniques. *Ann Chromatogr Sep Tech*. 2015;1.2 1009.
- Zhang FL, Yang SY, Liao L, Zhang TM, Zhang YL, Hu SY, Deng L, Huang MY, Andriani L, Ma XY, Shao ZM, Li DQ. Dynamic SUMOylation of MORC2 orchestrates chromatin remodelling and DNA repair in response to DNA damage and drives chemoresistance in breast cancer. *Theranostics*. 2023 Jan 22;13(3):973-990.
- Zhang J, Wu Q, Zhu L, Xie S, Tu L, Yang Y, Wu K, Zhao Y, Wang Y, Xu Y, Chen X, Ma S, Zhang S. SERPINE2/PN-1 regulates the DNA damage response and radioresistance by activating ATM in lung cancer. *Cancer Lett*. 2022;524:268-283.

- Zhao AY, Dai YJ, Lian JF, Huang Y, Lin JG, Dai YB, Xu TW. YAP regulates ALDH1A1 expression and stem cell property of bladder cancer cells. *Onco Targets Ther.* 2018;11:6657-6663.
- Zhen Z, Li YS, Su CY, Cheng X, Zhou SJ, Han Y, Yu DP, Song XY, Xiao N, Liu ZD, Wang F. Expression level of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) of circulating tumor cells (CTCs) of patients with NSCLC as an early indicator to monitor the effects of postoperative adjuvant chemotherapy. *Transl Cancer Res.* 2021;10(7):3299-3305.
- Zhou R, Kuang Y, Zhou J, Du X, Li J, Shi J, Haburcak R, Xu B. Nanonets Collect Cancer Secretome from Pericellular Space. *PLoS One.* 2016;11(4):e0154126.
- Zhu T, Peng X, Cheng Z, Xing D, Zhang M. Diagnostic rather than prognostic markers-relationship between EpCAM overexpression and lung cancer: a meta-analysis. *Ann Palliat Med.* 2021;10(4):4025-4036.

EKLER

EK 1. Denev Grularının LC-MS/MS Analizi Sonucunda Elde Edilen Protein Listeleri

Kontrol Grubu Proteinleri:

ENO1, ALDOA, HNRNPA2B1, GAPDH, KRT8, ALDH1A1, PGK1, ACTB, CLU, PFN1, H2BC15, TKT, PKM, HSPA8, EEF1A1, GPI, HNRNPA1, AKR1C3, FLNB, PPIA, KRT18, TPI1, HNRNPM, HNRNPC, NME1-NME2, SFPQ, CST1, CST3, CFL1, LMNA, BASP1, CHGB, FLNA, FN1, ALDH3A1, CTSL, STIP1, HSPB1, RPS21, NUCB1, TUBB4B, UCHL1, HSPE1, PABPC1, FGA, GOLM1, MAP1B, GSR, PPIB, TMSB10, TAGLN2, CACYBP, MSN, HINT1, NPM1, H1-4, NQO1, RPS28, LASP1, TXNRD1, HNRNPA3, MDH1, HNRNPD, COL5A2, H4C1, H4C11, H4C12, H4C13, H4C14, H4C15, H4C16, H4C2, H4C3, H4C4, H4C5, H4C6, H4C8, H4C9, YWHAG, MUC5AC, CAST, C1S, HDGF, CXCL5, JPT1, MIF, PRDX1, ADAM9, MMP7, NCL, LDHA, PDIA3, IGFBP4, TGFBI, RBMX, TMPO, HBA1, HBA2, BLVRB, MDH2, HSPA1B, GRN, HSPD1, CBR1, HMGB1, TIMP2, STMN1, SCG2, PARK7, PGAM1, B2M, PDLIM1, VCL, HNRNPAB, SRSF3, YBX1, SRSF1, KRT7, VIM, AKR1C1, HNRNPDL, SNRPD2, MARCKS, PSMA1, RPLP2, SMOC1, PRSS23, KHSRP, TFPI, TUBB, NAMPT, AGR2, YWHAZ, FKBP3, TAF15, ACTN4, PLIN3, FKBP1A, CNTN1, HNRNPL, FGB, YWHAQ, PDCD5, EZR, DAG1, SPP1, RPL11, SERBP1, EEF2, PCBP1, HNRNPU, TUBA1A, RPS12, SLC9A3R1, HNRNPK, CPLX2, TSKU, IGFBP7, DSG2, SERPINH1, TGFB2, VCP, PRDX6, PNPO, ALYREF, CTSD, NSFL1C, SRSF2, CRIP1, LDHB, LRRFIP1, CFH, RPS18, MAP4, ELAVL1, FUS, CSRP1, TBCA, TCEA1, PLEC, TIMP1, DKK1, EIF4H, SRSF7, APP, ACTG1, HSPA5, SF3B2, GSN, NUMA1, SLC12A2, CCT2, EIF1, EIF5A, RPL10A, RPS6, EIF4B, CFL2, EEF1D, YWHAB, NONO, ILF3, ERP29, LAMA5, AHNAK2, HNRNPH3, RPL24, RPS3A, NTS, CNDP2, RPL12, ADAM10, RRPB1, TBCB, APEX1, SRSF10, ALB, MATR3, EEF1A2, STC1, DYNLRB2, MUC5B, AIFM1, THSD4, BTF3, HMGB3, JPT2, HNRNPH1, TP53I3, ST13, BOLA2B, RNASE4, HSPH1, RBM3, RPS2, RPS19, TPM3, PCSK1N, SNRPD3, TXNDC5, ARPC5, KRT19, PAPP, EEF1G, PFDN2, SFN, RPS10, AHNAK, H2BC11, PCNP, PA2G4, EIF3G, PDAP1, GCNT3, H1-2, PCSK9, HSP90B1, TAX1BP3, PFDN5, GOT2, TFG, CTSB, NME1, G6PD, FUBP1, UGDH, H3-3B, ENSA, G3BP1, HLA-A, HSPA9, UBQLN4, RPL8, SRXN1, CYCS, CTTN, YBX3, ADM, CSTB, UBE2V2, RPL30, RPL4, IGFBP2, PARP1, YWHAH

CD133 Grubu Proteinleri:

CHGB, FN1, ALDOA, CST3, FGB, CLU, CFH, CST1, HNRNPA2B1, GOLM1, NUCB1, PGK1, H2BC15, ENO1, TKT, MUC5AC, ACTB, PFN1, ALDH1A1, FCGBP, GAPDH, CFL1, CTSL, RNASE4, GPI, BASP1, HNRNPA1, IGFBP4

EEF1A1, PKM, PPIA, GRN, AKR1C3, AGR2, NME1-NME2, HSPA8, FLNA, SPP1, RPS28, H1-4, DAG1, SRSF1, HINT1, C1S, HSPB1, PPIB, ANG, TAGLN2, HNRNPA3, CNTN1, HSPE1, STIP1, CAST, NPM1, HNRNPM, ADAM9, MDH2, HNRNPAB, IGFBP7, RPS21, GSR, HDGF, TGFB1, PRSS23, PDIA3, TUBB, CXCL5, MUC5B, KRT8, ADAM10, YWHAZ, SFPQ, KRT18, MMP7, UCHL1, MIF, APOH, TIMP1, MARCKS, HNRNPD, PDLIM1, DKK1, TGFB2, CTSD, VTN, STMN1, ERP29, TFPI, SMOC1, APP, B2M, FLNB, PABPC1, SLC9A3R1, PARK7, RPS12, CLTA, HMGB1, SUMF2, SERPINE2, JPT1, HNRNPC, HSPA5, CPLX2, IGFBP2, PSMA1, SRSF3, FKBP1A, PCSK9, HNRNPU, FUBP1, RBMXL1, LDHA, PGAM1, ALB, FKBP3, HMGB3, MSN, PDCD5, TSKU, HNRNPK, COL5A2, PRDX6, H4C1, H4C11, H4C12, H4C13, H4C14, H4C15, H4C16, H4C2, H4C3, H4C4, H4C5, H4C6, H4C8, H4C9, THSD4, HBA1, HBA2, LMNA, ACTG1, RBM3, NCL, SLC12A2, PCSK1N, SCG2, HSPD1, FGG, RPL10A, RPLP2, SRSF2, CFD, RARRES1, C1R, C3, YBX1, YWHAG, CDH1, CBR1, IGFBP3, PTPRK, EZR, ALDH3A1, HNRNPH3, AGRN, SRSF7, TUBB4B, H2BC14, TPI1, RBMX, PRDX1, GSN, MDH1, SERPINH1, BLVRB, TMSB10, TBCA, CTSS, AKR1C1, LASP1, CLSTN1, RPS19, EEF2, HSPG2, G6PD, SUB1, PRDX5, DSG2, TF, PLIN3, VCL, PARP1, ILF3, YWHAQ, TUBA1A, LAMC1, TGFB1, HLA-A, INSL4, SRSF10, TXNDC5, KRT7, NQO1, BCAM, SF3B2, EIF4H, LTBP3, BTF3, IGFBP6, H3C13, H3C14, H3C15, SNRPD2, B4GALT1, CFL2, H1-2, H2BC12, HSPA1B, TMPO, DYNLRB2, YWHAH, H2BC9, MAP1B, PCBP1, SDF4, CSF1, TIMP2, CDH2, CACYBP, ALYREF, PIN4, C5, SEMA3B, CRIP1, SERBP1, MYH9, PNPO, TXNRD1, MAP4, SRP9, RPL6, VCP, DNASE2, HLA-B, RPS3A, COX6B1, APLP1, ST13, LTBP1, EDN1, IGFBP1, EIF5A, TCEA1, LYZ, YWHAB, LMAN2, CSRP1, HNRNPDL, SLC39A10

CD326 Grubu Proteinleri:

ENO1, ALDOA, HNRNPA2B1, ALDH1A1, KRT8, ACTB, HNRNPA1, KRT18, EEF1A1, GAPDH, CLU, CFL1, TPI1, PGK1, PPIA, H2BC15, HSPA8, HNRNPC, HNRNPM, PFN1, HSPE1, TMSB10, BASP1, CST3, AKR1C3, TKT, LMNA, FLNA, TMSB4X, GPI, RPS28, HDGF, RPS21, NME1-NME2, YWHAZ, TUBB, PKM, STIP1, HNRNPA3, VIM, NPM1, MAP1B, FN1, CST1, FLNB, NCL, NQO1, HSPB1, YBX1, PDLIM1, HNRNPAB, HNRNPD, SRSF1, LDHA, H1-2, PRDX1, NUCB1, CXCL5, TXNRD1, MDH1, RPLP2, MARCKS, JPT1, PSMA1, GSR, GOLM1, ALDH3A1, PPIB, SFPQ, UCHL1, G6PD, PGAM1, MDH2, HSPD1, RBMX, YWHAB, HINT1, TAGLN2, TBCA, TGFB1, EZR, HMGB1, HBA1, HBA2, CPLX2, IGFBP4, SERPINE2, SPP1, HSPA1B, TIMP2, TMPO, CACYBP, SNRPD2, EEF2, VCL, AGR2, COL5A2, LASP1, KRT7, PDIA3, PRDX6, STMN1, PABPC1, TAF15, MAP4, PARK7, ALYREF, YWHAQ, CTSL, SERBP1, SRSF7, ACTG1, DDX21, RPS12, BLVRB, EIF5A, SERPINH1, VCP, PRSS23, FGA, ALB, SRSF2, EIF4B, CBR1, FKBP3, TCEA1, LRRFIP1, HNRNPDL, HNRNPH3, PARP1, TSKU, ERP29, LDHB, EEF1D, PDCD5, CHGB, TUBB4B, MSN,

ADAM9, MIF, MATR3, CFL2, YWHAG, CRIP1, H1-4, FUS, HMGA1, MMP7,
NRCAM, CAST, SF3B2, SMOC1, TGFB2, ILF3, CALD1, SQSTM1, TP53I3,
RPL4, RPL24, SRSF10, EIF4H, H4C1, H4C14, H4C15, H4C16, H4C3, H4C5,
SLC9A3R1, SRSF3, HNRNPU, TRIM28, GRN, TFPI, SCG2, SMAP, HNRNPK,
PA2G4, HNRNPL, RANBP1, DPY30, DAG1, APEX1, H2BC11, IGFBP2, SYTL4



Turnitin Raporu

AKCİĞER KANSERİ KÖK HÜCRE SEKRETOMLARININ PROTEOMİK ANALİZİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 3	% 2	% 2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	Bedez, Gülşah. "Hematolojik Kanser Hastalarında Kahkaha Yogasının Bulantı Kusma ve Anksiyete Üzerine Etkisi", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
3	Guclu, Ebru. "Uzun Kodlamayan Rna Hif1a-as2'Nin Kucuk Hucreli Akciger Kanserinde Otofaji ile iliskili Kemoterapotik Direncteki Etkinliginin Arastirilmesi", Necmettin Erbakan University (Turkey), 2021 Yayın	<% 1
4	acikerisim.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	avesis.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	microbiologynote.com İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Fati ÖMERLİ
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti (T.C.)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri ABD	2018
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2019-2021	DetaGen Genetik Tanı Araştırma ve Uygulama Merkezi	Ar-Ge ve Proje Yönetimi
2012-2014	AkSoft Bilgisayar	BT Personeli

Yabancı Dil : İngilizce

MAKALELER:

Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses

Servet Özcan, Nicola Alessio, Mustafa B. Acar, Eda Mert, Fatih Omerli, Gianfranco Peluso, Umberto Galderisi.

Aging 2016; 8: 7: 1316-29 doi: 10.18632/aging.1009715.

BİLDİRİLER:

Analysis of Effect of Metformin on Multipotent Stromal Cells

Fatih Ömerli, Eda Mert Gökduman, Mustafa Burak Acar, Hilal Akalın, Umberto Galderisi, Servet Özcan

Erciyes Medical Genetics Days 2019 (International). 2019 Kayseri/Türkiye

An Investigation of Protective Immunogenic Proteins of *Acinobacter boumannii* With Immunoproteomic Analysis

Gokcen Dinc, Aysegul Kılıc, Eda Mert Gokduman, Mustafa Burak Acar, Aysegul Murat, Fatih Omerli, Servet Ozcan, Mehmet Doganay

16th Medical Biodefense Conference. 2018 Munich/Germany

Investigation of Metformin Effect on Mesenchymal Stem Cell Senescence

Mustafa Burak Acar, Servet Özcan, Umberto Galderisi, Nicola Alessio, Güler Toprak, Eda Mert, Fatih Ömerli, Ahmet Raşit Öztürk, Ayşegül Murat

2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies

2015 Antalya/Turkey

PROJE ve PROJE GÖREVLERİ

TÜSEB-A 28852 Akciğer Kanseri Kök Hücrelerinin Tüm Hücre Proteomlarının Proteomik Analizi (2023-devam ediyor). Proje Yöneticisi

TÜBİTAK 1001 119S457 B-Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (B-All) Yüzey Proteomunun Analiz Edilmesiyle Yeni Kimerik Antijen Reseptörü (Car) Hedeflerinin Tanımlanması (2020-2024)