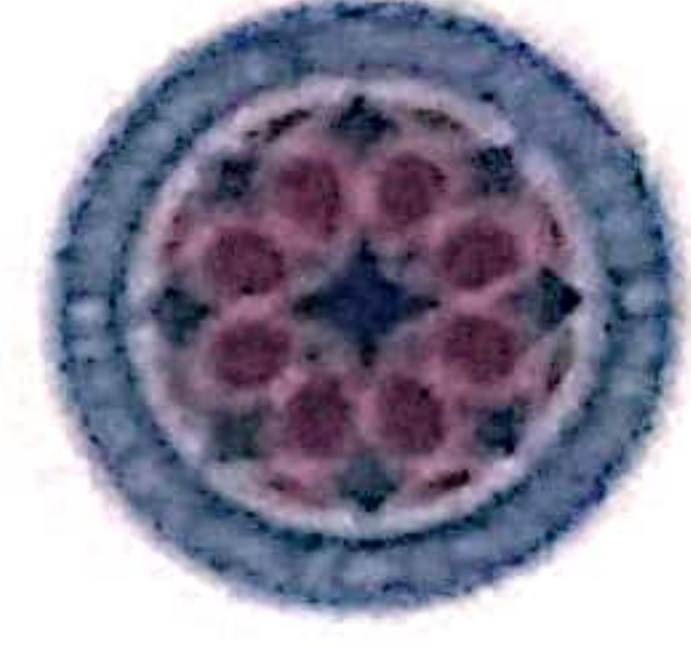




T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Yüksek Lisans Tezi

**TİROİD KANSERİNDE *Maackia amurensis* LEKTİN
UYGULAMASIYLA OLUŞAN ETKİLERİN MOLEKÜLER
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Suna BEKTAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

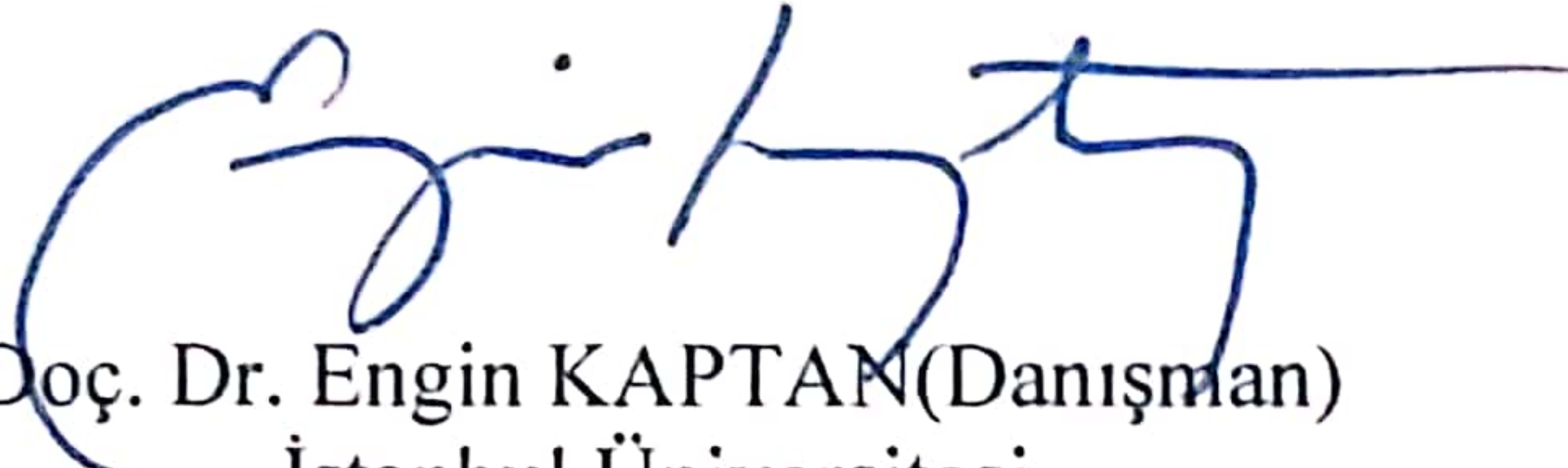

DANIŞMAN
Doç. Dr. Engin KAPTAN

Haziran, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 27.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Doç. Dr. Engin KAPTAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Hatice YORULMAZ
Haliç Üniversitesi
Tıp Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 32144 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgilerini, görüşlerini ve zamanını esirgmeden her konuda yol gösterip destek olan ve her zaman daha iyisini yapmam konusunda beni motive eden değerli danışman hocam Doç. Dr. Engin KAPTAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmanın ortaya çıkmasındaki katkılarının yanı sıra bana kazandırdığı bilimsel bakış açısından dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Değerli bilgileriyle eğitim hayatıma katkı sağlayan anabilim dalı başkanımız, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT başta olmak üzere bütün Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tez deneylerim sırasında görüş ve önerileri ile yol gösteren pozitif enerjisi ile çalışma isteği veren sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR BAŞ'a,

Lisanstan bu yana pozitif enerjisi ile bende çalışma şevki uyandıran değerli görüş ve bilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen güler yüzü, duruşu ve işine olan sevgisi ile örnek alınası kıymetli hocam Prof. Dr. Selda GEZGİNCİ OKTAYOĞLU'na,

Kütüphanesinden yararlandığım ve bu süreçte desteğini hissettiğim sevgili hocam Doç. Dr. Pelin ARDA PİRİNÇÇİ'ye,

Tezimin her aşamasında bilgisini, zamanını, sabrını ve desteğini esirgemedi hep yanımda olan ve karşılaştığım zorluklar esnasında yardım elini uzatan, beni daha çok çalışmaya teşvik eden canım arkadaşım Araş. Gör. Merve ERÇİN'e,

Bu süreçte manevi destekleri ile yanımda olan ekip arkadaşım Biyolog Sevgi BİNAY'a, Uzman Biyolog Cansu ÖZAL COŞKUN'a, Biyolog Ertan ÇELİK'e, Biyolog Ezgi SARI'ya ve varlığından hep destek aldığım değerli arkadaşım Biyolog Burak TATLİDEDE'ye,

Tezimin gerçekleşmesini olanaklı kılan ve maddi destek sağlayan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, qPCR cihazlarını kullandığım MedSanTek firmasına ve bu süreçte yardımcı olan Dr. Özgecan KAYALAR'a teşekkür ederim.

Hayattaki en büyük şansım olarak nitelendirdiğim, beni bugünlere getiren canım annem Melek BEKTAŞ'a, babam Doğan BEKTAŞ'a varlıklarıyla hayatıma neşe katan abilerim Hakan BEKTAŞ'a ve Gökhan BEKTAŞ'a gönülden sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2019

Suna BEKTAŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. KANSER.....	5
2.2. TİROİD KANSERİ.....	9
2.3. GLİKOZİLASYON	14
2.4. LEKTİNLER.....	18
2.5. RNA DİZİLEME	22
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	29
3.1. MAL MARUZİYETİ	29
3.1.1. Hücre Kültürü.....	29
3.1.2. Lektin Hazırlanması	29
3.1.3. Hücre Canlılık Testi	30
3.2. YENİ NESİL DİZİLEME VE BİYOİNFORMATİK ANALİZ	30
3.2.1. RNA İzolasyonu	32
3.2.2. RNA'nın Saflık, Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi	33
3.3. SONUÇLARIN VALİDASYONU	33
3.3.1. cDNA Sentezi.....	33
3.3.2. Gerçek Zamanlı PCR.....	34
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI.....	37
4.2. RNA SAFLIK, MİKTAR VE KALİTE BULGULARI.....	38
4.3. RNA DİZİLEME BULGULARI	39

4.3.1. RNA Dizileme Analizinin Anlamlılık ve Kalite Kontrol Parametreleri	39
4.3.2. RNA Transkript Miktarındaki Değişiklikler	43
4.3.3. Gen Ontoloji Analizi	44
4.4. VALİDASYON BULGULARI	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	109



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Fare derisinde gerçekleştirilen çok aşamalı kimyasal karsinogenez. Evrelerde gerçekleşen olaylar şu şekilde özetlenebilir. A) 1. Prokarsinojenin metabolik aktivasyonu ve DNA'ya kovalent bağlanması, 2. DNA onarımı/hücre replikasyonu ve mutasyon tespiti, 3. Kıl folikülünün çıkıntı bölgesinde veya interfoliküler epidermisin bazal kısmındaki kök hücrelerin kritik hedef genlerinde mutasyonun uyarılması. B) 1. Artan DNA sentezi, inflamasyon, 2. Gen ekspresyonu ve enzim aktivitelerindeki değişiklikler, 3. Kök hücre popülasyonunun artması. C) 1. Kronik hücre çoğalmasının sağlanması, 2. Papilloma denilen klonal büyümelerin gelişimi, 3. Diploid lezyonlar. D) 1. İlave genetik olaylar değişken şekilde gerçekleşir, 2. Anoploidi, LOH (Heterozigotluğun kaybı). E) 1. İnvazyon, 2. Metastaz (Abel ve diğ., 2009'dan değiştirilerek alınmıştır).6
- Şekil 2.2:** Tümör gelişim evreleri. Bu evreler; A. Hücrelerin normalden daha hızlı bölünmesi, B. Hücrelerin şekil değiştirmesi, C. Hücrelerin tek bir yerde kalması, D. Kanser hücrelerinin invazyonu ve kan dolaşımına geçerek uzak bölgelere metastazı şeklindedir (Kanwal, 2013'ten değiştirilerek alınmıştır).7
- Şekil 2.3:** Metastaz. Ekstrasellüler matriks unsurlarını parçalayarak köken aldıkları primer odaktan ayrılan kanser hücreleri intravazasyon adı verilen aşama ile dolaşım sistemine geçerler. Ardından hedef organlarındaki kan damarlarının endotel hücreleriyle etkileşerek sekonder odaklar oluşturmak üzere ekstrasvazasyon olarak adlandırılan aşama ile hedef organlarına ulaşırlar. (Mohammadalipour ve diğ., 2018'den değiştirilerek alınmıştır).8
- Şekil 2.4:** DNA Mikroarray ve RNA Dizileme Karşılaştırılması. DNA mikroarrayleri bir yüzeye yapıştırılmış nükleik asit problemlerinden oluşur. Öncelikle RNA örneklerden izole edilir ve floresan etiketleri (1) ile etiketlenmiş olan cDNA'ya dönüştürülür. Daha sonra, etiketli cDNA fragmentleri, array (2) üzerindeki nükleik asitlerle hibritlenir. Mikroarray taraması, her noktada floresans seviyesini ölçerek gen ekspresyon seviyelerini ortaya çıkarır (3). RNA-dizilemede, RNA örneklerden izole edilir ve cDNA'ya dönüştürülür (A). Ardından, cDNA kütüphanesi sıralanır (B). Elde edilen okumalar genomla eşleştirilir ve gen ifadesi nicelenir (C) (www.the-scientist.com adresinden değiştirilerek alınmıştır).24
- Şekil 2.5:** Transkriptomik analizlerin kategorileri. Diferansiyel analizler; tümör ve normal dokular arasındaki gen ve gen seti, yolak veya ağ seviyesindeki farklara odaklanır. En az iki grup eşleştirilmiş veya eşleştirilmemiş örnek gerektirir. Karşılaştırmalı analizler, tek bir örneği veya bir grup örneği karşılaştırır ve klinik olarak yararlı işaretler veya alt tipler gibi transkripsiyonel ayraçları belirlemeye çalışır. Düzensel analizler, tümör hücresi saflığını değerlendirmek (veya kontrol etmek), örnekleri tümör oluşturu ve tümör dışı hücre tiplerine göre ayırmak ve

immün hücre varlığını karakterize etmek için farklı hücre tiplerinin gen ekspresyon işaretlerini kullanır. Evrensel analizler, bir örneği geniş bir referans grubu ile karşılaştırılarak, kanser belirtilerinin, primer doku tipinin veya genotip-fenotip ilişkilerinin saptanması gibi çeşitli transkriptomik özelliklerin belirlenmesinde kullanılır. Bütünleştirici analizler; transkriptomik verileri, DNA dizileme, işlevsel genomik (örn, DNA CpG metilasyonu) ve klinik verilerle (örn, patoloji) birleştirme eğilimindedir (Cieşlik ve Chinnaiyan, 2018'den değiştirilerek alınmıştır).	27
şekil 3.1: RNA Dizileme teknolojisine genel bakış. Illumina HiSeq cihazı kullanılarak yapılan RNA dizileme analiz basamakları özetlenmiştir. Bu basamaklar; 1. RNA izolasyonu ve saflaştırma, 2. RNA'nın cDNA'ya çevrimi ve dizileme adaptörlerinin eklenmesi, 3. Bir dizileme platformu kullanılarak cDNAların dizilenmesi, 4. Elde edilen kısa okuma dizilerinin analizidir (www.biocluster.ucr.edu adresinden değiştirilerek alınmıştır).	31
şekil 3.2: cDNA eldesi için hazırlanan reaksiyon karışımı.	34
şekil 4.1: MAL'nin 8505C hücrelerine 0,25 ve 0,5 µM konsantrasyonda 24 saat süreyle uygulanması sonucu elde edilen MTT hücre canlılık bulgularını gösteren grafik. Yüzde canlılık ortalama ± SD olarak verilmiştir, Kontrol: 100 ± 7,53; 0,5 µM MAL: 73,57 ± 7,96; 0,25 µM MAL: 65,63 ± 5,22 ***Kontrole göre önemli derecede anlamlı (p≤0,001).	37
şekil 4.2: MAL'nin 8505C hücrelerine 0,25 ve 0,5 µM konsantrasyonda 48 saat süreyle uygulanması sonucu elde edilen MTT hücre canlılık bulgularını gösteren grafik. Yüzde canlılık ortalama ± SD olarak verilmiştir, Kontrol: 100 ± 12,52; 0,5 µM MAL: 41,75 ± 4,3; 0,25 µM MAL: 42,26 ± 5,4. ***Kontrole göre önemli derecede anlamlı (p≤0,001).	38
şekil 4.3: 8505C hücrelerinden izole edilen total RNA'ların %2'lik agaroz jelde ayrıştırılması ile elde edilen RNA'nın kalitesini gösteren jel görüntüsü.	39
şekil 4.4: Kontrol ve MAL uygulanmış gruba yönelik dağılım grafiği.	41
şekil 4.5: Kontrol ve MAL uygulanmış gruba yönelik volkan grafiği.	42
şekil 4.6: RNA Dizileme analizi sonucunda tüm transkriptlerin Panther analiz sistemi kullanılarak ilişkili olduğu sinyal yolaklarını gösteren diyagram. Toplam transkript verileri ile ilişkili ön plana çıkan yolakları temsil eden pikler şekil üzerinde belirtilmiştir. CCKR: hücre döngüsü ile ilişkili kinaz, ROCK: Rho ile ilişkili kinaz yolağı, PDGF: platelet kökenli büyüme faktörü.	45
şekil 4.7: RNA Dizileme sonucu elde edilen verilerin valide edilmesi amacıyla istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyi en yüksek olan ilk 50 gen arasından seçilen GPC5, LGR5 ve PTGFR'nin mRNA seviyeleri. Kat değişimi ortalama ± SD olarak verilmiştir, GPC5 Kontrol: 1,38 ± 0,35; MAL: 34,39 ± 10,30 **Kontrole göre anlamlı (p≤0,01). LGR5 Kontrol: 1,00 ± 0,16; MAL: 0,08 ± 0,01 ***Kontrole göre önemli derecede anlamlı (p≤0,001). PTGFR Kontrol: 1,00 ± 0,13; MAL: 0,31 ± 0,04 **Kontrole göre anlamlı (p≤0,01).	46

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: RNA'dan cDNA'ya çevrim prosedürünün basamakları.	34
Tablo 3.2: Gen ekspresyon analizleri için yapılan qPCR yönteminde kullanılan genlerin baz dizisi ve referansları.	35
Tablo 3.3: qPCR için gerekli reaksiyon içeriğinin hazırlanışı.	35
Tablo 3.4: qPCR basamakları.	36
Tablo 4.1: RNA miktar ve saflık değerleri. K1-3: MAL uygulanmamış kontrol grubu, D1-3: MAL uygulanmış deney grubunu temsil etmektedir.	39
Tablo 4.2: Örneklerin kalite kontrol istatistikleri. K1-3: MAL uygulanmamış kontrol grubu, D1-3: MAL uygulanmış deney grubunu temsil etmektedir.	40
Tablo 4.3: Örneklerin haritalanmış okuma istatistikleri. KK*: Kalite kontrol, K1-3: MAL uygulanmamış kontrol grubu, D1-3: MAL uygulanmış deney grubunu temsil etmektedir.	40
Tablo 4.4: En fazla anlamlılık gösteren ilk 50 genin listesi. FPKM* haritalanmış milyon okuma başına kilobazdaki fragment birimini, SS-** referans genomda saptanamayan genleri temsil etmektedir.	43
Tablo 4.5: En fazla anlamlılık gösteren ilk 50 genin rol aldığı biyolojik işlevler.	44

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kisaltmalar	Açıklama
Aab	: Otoantikör
ACTG1	: Aktin γ 1
ADAMTS1	: Disintegrin ve metalloproteinazın trombospondin tekrarı
ANXA2P3	: Anneksin A2 Pseudogen 3
ASAP3	: Ankirin tekrar ve PH domain 3
ATC	: Anaplastik tiroid karsinoma
BPA	: Bisfenol A
BRAF	: B tip RAF kinaz
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CFS	: Common Fragile Sites
CHFR	: Checkpoint with forkhead associated and ring finger domains
ConA	: Konkanavalin A
COX-2/PTGS2	: Siklooksigenaz 2/Prostaglandin endoperoksit sentaz-2
CPEB4	: Sitoplazmik poliadenilasyon element bağlayıcı protein 4
CR	: C-terminalinde sistein bakımından zengin
CRD	: Karbohidrat tanıyıcı bölge
CRPC	: Kastrasyon dirençli prostat kanseri
CS	: Kondriotin sülfat
CSC	: Kanser kök hücresi
CTLD	: C tipi lektin benzeri domain
CTLR/CLR	: C tip lektin benzeri reseptörü/C tip lektin reseptör
DC	: Dendritik hücre
DKK1	: Dickkopf-1
DLG	: Disk large homolog
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DUSP	: Çift spesifik fosfataz
ECACC	: European Collection of Authenticated Cell Cultures
ECM	: Ekstraselüler matriks
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü

E-kaderin	: Epitelial kaderin
EMT	: Epitelial mezenkimal geçiş
EPN	: Glu-Pro-Asn motif
ERK	: Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz
EST	: Etiketlenmiş fonksiyonel gen segmentleri
EtBr	: Etidyum Bromür
FBS	: Fetal sığır serumu
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FPKM	: Haritalanmış milyon okuma başına kilobazdaki fragment
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
FTC	: Foliküler tiroid kanseri
FUT	: Fukoziltransferaz
GAG	: Glikozaminoglikan
Gal	: Galaktoz
GalNAc	: N-asetilgalaktozamin
Galβ1-4GlcNAc	: N-asetillaktozamin
GC	: Mide kanseri
GDP	: Guanozin difosfat
GluNAc	: N-asetilglukozamin
GLUT	: Glukoz taşıyıcısı
GNA	: <i>Galanthus nivalis</i> aglütinin
GPC5	: Glipikan 5
GPCR	: G protein bağı reseptör
GPI	: Glikozil fosfatidilinositol
HCC	: Hepatosellüler karsinoma
HDAC	: Histon deasetilaz
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit tamponu
Hh	: Hedgehog
HIF1	: Hipoksi uyarılabilir faktör 1
HIV1	: İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1
HPA	: <i>Helix pomatia</i> aglütinin
HS	: Heparan sülfat
IF	: Ara filament
IL	: İnterlökin

KSHV	: Kaposi'nin sarkoma herpes virüsü
LGR5	: Lösin bakımından zengin tekrar içeren G protein bağlı reseptör 5
LH	: Lüteinleştirici hormon
Lys	: Lizin
MAH	: <i>Maackia amurensis</i> hemaglütinin
MAL	: <i>Maackia amurensis</i> lökoaglütinin
MAM	: <i>Maackia amurensis</i> mitojen
MAPK	: Mitojen ile aktive olan protein kinaz
MEM	: Minimum Essential Medium Eagle
miRNA	: mikroRNA
ML	: <i>Mistletoe</i> lektinleri
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MTC	: Medullar tiroid karsinoma
MTRNR2L1	: Humanin benzeri-1
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid
MTX	: Mitoxantrone
NEC	: Normal endotel hücresi
NeuNAc	: Siyalik asit
NF-κB	: Nükleer faktör κB
NGS	: Yeni nesil dizileme (next generation sequencing)
NIS	: Sodyum-iyodür simporter
NKA	: Na/K-ATPaz
N-Kaderin	: Nöral kaderin
NPC	: Nazofarinks karsinoma
NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
OPSCC	: Orofaringeal skuamöz hücre karsinomu
PARP1	: Poli (ADP-riboz) polimeraz 1
PBS	: Fosfat tamponu
Pca	: Prostat kanseri
PCD	: Programlı hücre ölümü
PCL	: <i>Polygonatum cyrtonema</i> lektin
PCNA	: Proliferatif hücre nükleer antijeni
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDAC	: Pankreatik duktal adenokarsinoma

pErk	: Fosforillenmiş ERK
PI3K	: Fosfoinositol 3 kinaz
PKC	: Protein kinaz C
PLK1	: Polo benzeri kinaz
PNA	: Peanut aglütinin
POL	: <i>Polygonatum crytonema</i> lektini
PRR	: Patojen tanıma reseptörü
PSA	: Prostat spesifik antijen
PTC	: Papiller tiroid kanseri
Ptch	: Patched
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
PTGFR/FP	: Prostaglandin F Reseptörü
PTPRA	: Protein tirozin fosfataz reseptörü tip A
qPCR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
QPD	: Gln-Pro-Asp motif
RAGE	: Gelişmiş glikasyon son ürünleri
RARRES	: Retinoik asit reseptör yanıtlayıcı
RCC	: Böbrek hücre karsinomu
RIN	: RNA Integrity Number
RMS	: Rabdomiyosarkoma
RO	: Renal onkositoma
ROCK	: Rho ile ilişkili kinaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RSPO	: R-spondin
RT	: Revers Transkriptaz
SACC	: Tükürük adenoid kistik karsinom
SAGE	: Gen anlatımının seri analizi
Ser	: Serin
SLC35F2	: Solute Carrier Family Member 35 F2
SLe^a	: Siyalil Lewis a antijeni
SLe^x	: Siyalil Lewis x antijeni
STn	: Siyalillenmiş Thomsen Nouvelle antijeni
STS	: Yumuşak doku sarkoma
T3	: Triiyodotironin

T4	: Tetraiyodotironin/Tiroksin
TAE	: Tris asetat EDTA
TEC	: Tümör endotel hücresi
TERT	: Telomeraz revers transkriptaz
TF	: Thomsen Friedenreich
TGFβR1	: Transforme edici büyüme faktörü β tip I reseptörü
Thr	: Treonin
TLR	: Toll-like reseptör
Tn	: Thomsen Nouvelle antijeni
TNF-α	: Tümör nekroz faktör α
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon
Ub	: Ubikitin
UDP-Gal	: Uridin difosfat galaktoz
u-PA	: Ürokinaz tip plazminojen aktivatör
VAA	: <i>Viscum album</i> aglütinin
VEGF	: Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
Wnt	: Wingless ve Int1'in Bileşimi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TİROİD KANSERİNDE *Maackia amurensis* LEKTİN UYGULAMASIYLA OLUŞAN ETKİLERİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Suna BEKTAŞ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Engin KAPTAN

Lektinler; serbest şekerlerle, polisakkaritlerin şeker bakiyeleriyle, glikoproteinlerle ve glikolipitlerle geri dönüşümlü olarak bağlanabilen ve hemen hemen bütün organizmalarda bulunan oldukça önemli görevlere sahip biyoaktif moleküllerdir. Fitohemaglutinin olarak da bilinen bitki lektinlerinin biyolojik özellikleri, normal ile malign hücreler üzerindeki etkileri ve bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmalar pek çok araştırmaya konu olmuştur. Amur ağacı bitkisinden elde edilen *Maackia amurensis* leukoagglutin (MAL)'nin anaplastik tiroid kanserinin tümörjenik ve malignant kabiliyetlerini azalttığı bilinmesine karşın, bu etkilerin moleküler mekanizması henüz aydınlatılmamıştır. Çalışmamızda, MAL'nin anaplastik tiroid kanser hücrelerinde meydana getirdiği anti-tümöral etkinin ortaya çıkmasında rol alan olası moleküler mekanizmaların araştırılması planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, 0,25 µM konsantrasyonda 24 saat boyunca MAL uygulanmış 8505C anaplastik tiroid kanser hücrelerinden izole edilen total RNA izolatlarından elde edilen cDNA kütüphaneleri kullanılarak Illumina yeni nesil dizileme teknolojisiyle tüm transkriptom analizi yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, MAL uygulamasının anaplastik tiroid kanser hücrelerinde *LGR5*, *GPC5*, *PTGFR*, *CHFR*, *CTNNA3* gibi kanserin tümörjenik ve malign karakteri ile ilgili genlerin ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı değişiklikler olduğunu göstermiştir. Bulgularımız MAL uygulanmasıyla ekspresyon örüntülerinde değişiklik saptanan genlerin; gelişim, proliferasyon, kök hücre kontrolü ve karsinogenezde önemli bir sinyal iletim yolağı olan Wnt/β-katenin ile bağlantılı olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte; hormonlara, mitojenlere, nörotransmitterlere, iyonlara, fotonlara ve diğer uyaranlara cevap olarak çeşitli

hücre içi sinyalleşmeyi düzenleyen G-protein aracılı reseptör sinyalleşme sürecinin etkilendiği de tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz veriler, MAL'nin anaplastik tiroid kanserinin tümörjenik ve malign karakterinin baskılanması yönünde etkin bir biyoaktif molekül olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, bulgularımız MAL'nin anaplastik tiroid kanserinin tedavisinde kullanılabilecek aday molekül olarak önemli bir potansiyele sahip olduğuna dikkat çekmektedir. Ancak, MAL'nin anaplastik tiroid kanser hücreleri üzerindeki etkisi ile ilgili spesifik mekanizmaların aydınlatılması için bahsi geçen genlerin ve yolların işlevselliğinin geleneksel yöntemlerle test edilmesi gerekmektedir.

Haziran 2019, 127 sayfa.

Anahtar kelimeler: Lektinler, MAL, Tiroid kanseri, RNA dizileme



SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISM OF THE EFFECTS OCCURRING WITH *Maackia amurensis* LECTIN TREATMENT ON THYROID CANCER

Suna BEKTAŞ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Engin KAPTAN

Lectins are bioactive molecules and have highly important roles in various cellular process. They can bind specifically and irreversibly to free sugars and sugar residues of polysaccharides, glycolipids and glycoproteins and are found in almost all organisms. The biological properties of plant lectins known as phytohemagglutinin as well and their effects on normal and malignant cells and the underlying molecular mechanisms of the action have been subjected to many researches. Although it is known that *Maackia amurensis* leucoagglutinin II (MAL), which is obtained from Amur Tree, decreases the tumorigenic and malignant capabilities of anaplastic thyroid cancer cells, the molecular mechanism of these action has not been known yet. In this study, it was planned to investigate the possible molecular mechanisms playing role in suppressing malignant and tumorigenic characteristics of anaplastic thyroid cancer cells through the treatment of MAL. For this purpose, whole transcriptome analysis was performed using Illumina next generation sequencing technology by using cDNA libraries obtained from total RNA isolates of 8505C anaplastic thyroid cancer cells treated with 0.25 μ M MAL-II during 24 hours. Gene expression profile of MAL treated anaplastic thyroid cancer cells showed significant changes in the expression of various genes related to the tumorigenic and malignant characteristics of cancer cells such as *LGR5*, *GPC5*, *PTGFR*, *CHFR*, *CTNNA3*. Our findings indicated that the genes detected changings in expression patterns found to be associated with Wnt/ β -catenin pathway, which is an important signal transduction pathway in development, proliferation, stem cell control and carcinogenesis. Besides, G-protein-mediated receptor

signalling processes that regulate various intracellular signals in response to hormones, mitogens, neurotransmitters, ions, photons and other stimuli have also been found to be affected. Our data pointed out that MAL-II is an effective bioactive molecule for the suppression of the tumorigenic and malignant characteristics of anaplastic thyroid cancer. In addition, our findings indicate that MAL-II has a significant potential for candidate molecules that can be used in the treatment of anaplastic thyroid cancer. However, in order to elucidate specific mechanisms for the effect of MAL on anaplastic thyroid cancer cells, the functionality of the related genes and pathways needs to be tested by conventional methods.

June 2019, 127 pages.

Keywords: Lectins, MAL, Thyroid cancer, RNA sequencing



1. GİRİŞ

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların tümör büyümesini kontrol etmek için gerekli olan konsantrasyonlarının normal hücreleri de etkilemesi ve birçok yan etkiye sebep olması, kanser hücrelerinin geliştirdiği ilaç direnç mekanizmaları, tamoksifen gibi bazı ilaçların sekonder malignansiye yol açması gibi handikaplar bu ilaçların terapötik değerini düşürmektedir. Bu bağlamda, özel sinyal iletim yollarına ve ilacı dışarı pompalayarak ilaca direnç sağlayan proteinlerin varlığına bağımlı olmadan, seçici olarak kanser hücrelerine etki eden anti-kanser ilaçların geliştirilmesi günümüzde önemli çabalardan biri haline gelmiştir (Perez Tomas, 2006). Akabinde, geleneksel olmayan kaynakları kullanan yeni tanı ve tıbbi tedavilere artan bir talep ortaya çıkmıştır. Kanseri tedavi etmek ya da tedaviyi iyi bir klinik tablo ile sürdürebilmek adına yapılan çalışmalar, bu potansiyele sahip çok sayıda maddenin doğal kaynaklardan elde edilebileceğini göstermiştir. Bu özelliklere sahip ve kanser tedavisinde kullanılan biyoaktif moleküllerden biri de lektinlerdir. Lektinler; spesifik olarak karbohidrat zincirlerine bağlanabilen ve virüslerden bakterilere, bitkilerden hayvanlara kadar pek çok canlı türünde bulunan bir protein ailesidir (Nizet ve diğ., 2017).

Hayvanlarda bulunan lektinlerin pek çok hücre etkileşimlerine yardımcı olduğu, bitki lektinlerinin ise parazit ya da patojenlere karşı savunma mekanizmasında rol oynadığı bilinmektedir (Loris, 2002). Bütün lektinler fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol almalarının yanı sıra, bağışıklık sistemi ile farklı derecelerde etkileşirler (Fujita ve diğ., 2004; De Hoff ve diğ., 2009). Hücreler üzerinde apoptoz da dahil olmak üzere çeşitli süreçleri uyarabilmeleri ya da baskılayabilmeleri lektinleri kansere karşı tedavi seçeneği olarak birçok araştırmanın konusu yapmıştır (Mehta ve diğ., 2013; Kaptan ve diğ., 2018). Şimdiye kadar bitkilerden; farklı karbohidrat bağlanma özelliklerine sahip, yüzlerce lektin saflaştırılarak tanımlanmış ve biyolojik etkinlikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Hayvan lektinlerinin inhibisyonunun kanser hücrelerinin malign kabiliyetlerini baskıladığını gösteren çalışmaların yanında (Guha ve diğ., 2013), bitki lektinlerinin uygulanması yoluyla kanser hücrelerinin agresif karakterlerini baskıladığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Ochoa-Alvarez ve diğ., 2012). Diğer yandan, spesifik bağlanma özelliklerine göre bitki lektinleri, malign ve malign olmayan hücreler arasındaki ayrımları incelemek için tanıma araçları olarak pek çok çalışmada kullanılmıştır (Babal ve diğ., 2006). Ayrıca, bitki lektinleri protein glikozilasyon analizleri veya memeli

hücrelerinin yüzeylerindeki global glikozilasyon değişikliklerini profillemeye çalışmalarında da kullanılmaktadır (Tateno ve diğ., 2007).

Lektinler bu anti-tümoral etkilerini kanser hücrelerinde anormal glikozilasyon olarak tarifleyebileceğimiz değişmiş oligosakkarit bakiyelerine bağlanarak gerçekleştirirler. Bunun yanında başka bazı mekanizmaları da kullandıkları düşünülmektedir (Poiroux ve diğ., 2017). Pek çok araştırmacı, hücre yüzey glikanlarındaki değişikliklerin tümörün malign karakterinin desteklenmesinde önemli bir role sahip olduğuna dikkat çekmektedir. Bu durum kanser ve bazı hastalıklarda karşılaşılan bir olgudur ve günümüzde bazı glikan yapılarındaki değişiklikler tümör belirteçleri olarak öne çıkmaktadır (Narayanan, 1994). Yapılan çalışmalar insan tiroid kanser hücreleri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde hücre yüzeyinin α -2,3 siyalik asit bakiyelerince zengin olduğunu göstermiştir (Büll ve diğ., 2013). Hücre yüzeyindeki glikan örtüsü büyük oranda membran glikoproteinleri ve glikosifingolipitler gibi glikokonjugatlardan kaynaklanmaktadır (Fuster ve Esko, 2005).

Lektinlerle yapılan çalışmalar çoğunlukla kanser hücreleri üzerindeki toksik etkilere odaklanmıştır. Ancak bu durum onların tedaviye yönelik potansiyelini anlamayı güçleştirmektedir. Wang ve diğ., (2000) bu konuda yaptıkları kapsamlı bir çalışmada, insan hepatoma ve koriokarsinoma, fare melanoma ve sıçan osteosarkoma hücrelerine farklı karbohidrat spesifitelerine özgü 11 lektinden bazılarının bu kanser hücreleri üzerinde belirgin toksik etkiler ortaya koyduğunu rapor etmişlerdir. Ancak transforme olmamış normal epitel hücrelerindeki toksik etkileri hakkında bilgi vermemişlerdir. Dolayısıyla lektin uygulaması sonrasında ortaya çıkan anti-tümöral etkiler, normal hücrelere nazaran kanser hücrelerinde artan terminal glikan bakiyelerindeki farklılıktan mı kaynaklanmaktadır sorusunu karşımıza çıkarmaktadır. Bu konu üzerinde en çok çalışılan lektinlerden biri olan *Viscum album* (VAA, ökse otu) lektininin anti-tümöral etkisi üzerinde çok sayıda çalışma mevcuttur (Kienle ve diğ., 2009). Anti-tümöral etkiye sahip pek çok lektinin etki mekanizması henüz aydınlatılamamış olmasına rağmen, ökse otu lektini olan *Mistletoe* lektinleri (ML I, II ve III) etki mekanizması aydınlatılmış lektinlerdendir. Bu lektinler, α ve β olmak üzere iki alt üniteden oluşur. Karbohidrat bağlayıcı özelliğe sahip olan β zinciri hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak proteinlerin hücre içine girişini engeller, ancak α zincir ribozomların 60S ünitesinin 28S RNA'sından adenin bakiyesini uzaklaştırarak ribozomları inaktif hale getirir ve protein sentezini inhibe eder (Stirpe ve diğ., 1992). Bu lektinler kuvvetli apoptoz indükleyici özelliklerinin

yanında (Büssing ve diğ., 1998), çoklu ilaç direncine sahip kolon kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahiptirler (Valentiner ve diğ., 2002) ve kanser ilaçlarının sitotoksik etkilerini arttıırırlar (Bantel ve diğ., 1999).

Kaptan ve diğ. (2018) MAL maruziyetinin anaplastik insan tiroid kanserinin tümörijenik ve malignant karakterini çok belirgin bir biçimde azalttığını, fakat foliküler ve papillar insan tiroid kanser hücrelerinde proliferasyonu arttırdığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, MAL uygulanmasının metastatik sürecin önemli basamaklarından biri olan tümör hücresi-endotel etkileşimini belirgin bir biçimde azalttığına işaret etmişlerdir. Bu etkinin varlığı *in vitro* modelde sağlıklı tiroid epitel hücre soyu üzerinde toksik etkinin olmadığı sınırlarda test edilmiştir. Normal epitel hücre soyu olan Nthy-ori 3-1 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle ve 0,001-1 μ M konsantrasyon aralığında uygulanan MAL'nin hücre canlılığını etkileyecek herhangi bir toksik etkisi bulunmamaktadır. Sonuçlar, normal tiroid epitel hücreleri için toksik olmayan dozlarda MAL uygulamalarının anaplastik kanser soyu olan 8505C hücrelerinde 0,1-1 μ M doz aralıklarında toksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak bu etkinin moleküler mekanizması konusunda net bir bilgi bulunmamaktadır. Sonuç olarak, tiroid kanser hücrelerinin α -2,3 siyalik asit bakiyelerince zengin membran glikoproteinlerinin, kanser hücrelerinin değişen glikozidik fenotipine önemli ölçüde katkı sağladığı anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda, çeşitli kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif ve anti-metastatik etkileri bilinen ve amur ağacı bitkisinden elde edilmiş MAL uygulanmasıyla anaplastik tiroid kanser hücrelerinde ortaya çıkan anti-karsinojenik etkilerin hangi genlerin işlevselliğini arttırdığı ya da azalttığının anlaşılması hedeflenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada, MAL maruziyeti sonrasında bu hücrelerde meydana gelen transkripsiyon etkinliklerindeki değişikliklerin geniş ölçekte analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, MAL ile muamele edilen hücrelerden elde edilen total RNA izolatları kullanılarak RNA dizileme yöntemiyle transkriptom analiz yapılmış ve elde edilen veriler biyoinformatik olarak analiz edilerek, MAL uygulamasıyla açığa çıkan malignat ve tümörijenik karakterlerin baskılanması sürecindeki olası moleküler mekanizmalar değerlendirilmiştir. Aynı zamanda, çalışmamızın bu alanda yeni çalışmaların şekillendirilmesi amacıyla veri havuzunun genişletilmesine aracılık etmesi hedeflenmiştir. Günümüzde, kanser hücrelerine tümoral aktivite ve metastatik yetkinlik açısından avantaj kazandıran glikozilasyon değişikliklerinin, bu değişikliklere spesifik bitki lektinleri ile hedeflenerek, kanserin malignant özelliklerinin baskılanması yönündeki

yaklaşımlar oldukça önem kazanmıştır. Son yıllarda çeşitli lektinlerin anti-kanser özellikleriyle ilgili olarak, artış gösteren çalışmaların yanı sıra, artan patent ve patent başvuruları dikkat çekici düzeydedir. Bununla birlikte, sindirim sürecinden aktivitelerini kaybetmeksizin dolaşıma geçebilmeleri, lektinlerin kanser tedavisinde kullanılabilecek önemli bir aday molekül grubu olmalarını desteklemektedir. Dolayısıyla, çalışmamızda elde edilen sonuçların, sodyum-iyot simporter yoksunluğundan dolayı radyo-iyodin terapisine karşı dirençli olan ve kötü prognozuyla ön plana çıkan anaplastik tiroid kanserinin tedavi stratejilerinin şekillenmesindeki sürece katkı sağlayacağı kanısındayız.



2. GENEL KISIMLAR

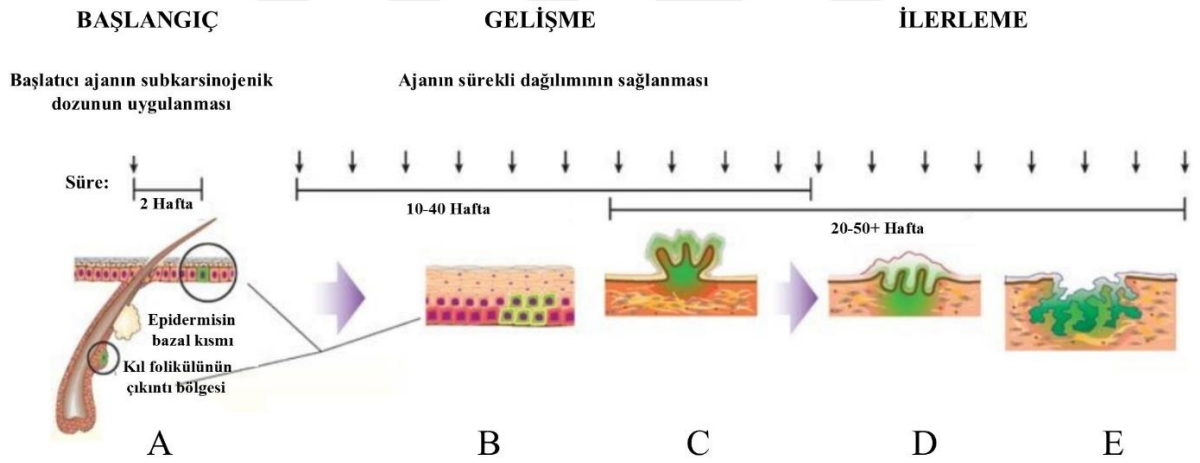
2.1. KANSER

Kanser, çeşitli etmenlerin genlerde meydana getirdiği mutasyonlar sonucu hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki homeostazın bozulması ve hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıdır. Kontrol dışı çoğalan bu hücreler, çevre dokuları istila eder ve köken aldıkları bölgeden veya primer odaktan vücudun diğer bölgelerine yayılarak metastaz yaparlar. Karsinogeneze (kanser oluşum süreci) neden olan genlerdeki çoklu değişiklikler normal hücre özelliklerini zamanla kanser fenotipine dönüştürür. Bu kanser fenotipi; sürekli proliferatif sinyalleme, hücre ölümüne direnç, oksijen ve besin temini için damar büyümesini uyarma (anjiyogenez), aktif invazyon ve metastaz ile karakterize edilir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

“Yeni büyüme” anlamına gelen neoplazm terimi sıklıkla tümör terimi yerine kullanılır ve kanseröz büyümeyi işaret eder. Bununla birlikte, davranışlarına bağlı olarak tümörler benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Bu ayrımın yapılması, hastaya uygun tedavinin belirlenmesi ve hastalığın seyri açısından oldukça büyük bir öneme sahiptir. Kanser kaynaklı ölümlerin %90’ından sorumlu olan malign tümörler, kan ve lenf damarları aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılarak ikincil tümörleri oluştururken, kapsül ile çevrili olan benign tümörler ise genellikle lokal olarak büyür ve çevre dokulara yayılmazlar. Malign tümörler kökenlendikleri dokunun normal hücrelerinden farklılaşmışlardır ve anaplastik olma eğilimindedirler, benign tümörlerin aksine büyümeleri oldukça hızlıdır. Öyle ki benign tümörler sıklıkla yıllar sonra bile yavaş büyüme gösterirken, malign tümörler klinik olarak saptanma büyüklüğüne eriştikten haftalar ve aylar sonra önemli ölçüde büyüme kaydederler (Franks ve Knowles, 2005; Ruddon, 2007). Tümörler köken aldıkları dokuya bağlı olarak da sınıflandırılır. Epitel dokudan köken alan malign tümörlere karsinoma, mezoderminden (kas, kan, bağ doku öncülleri) köken alıyorsa sarkoma, kan dokusunu oluşturan çeşitli hücre tiplerinden kaynaklanıyorsa hematopoietik, merkezi ve periferik sinir sistemi hücrelerinden köken alıyorsa nöroektodermal tümör olarak adlandırılır (Weingberg, 2007).

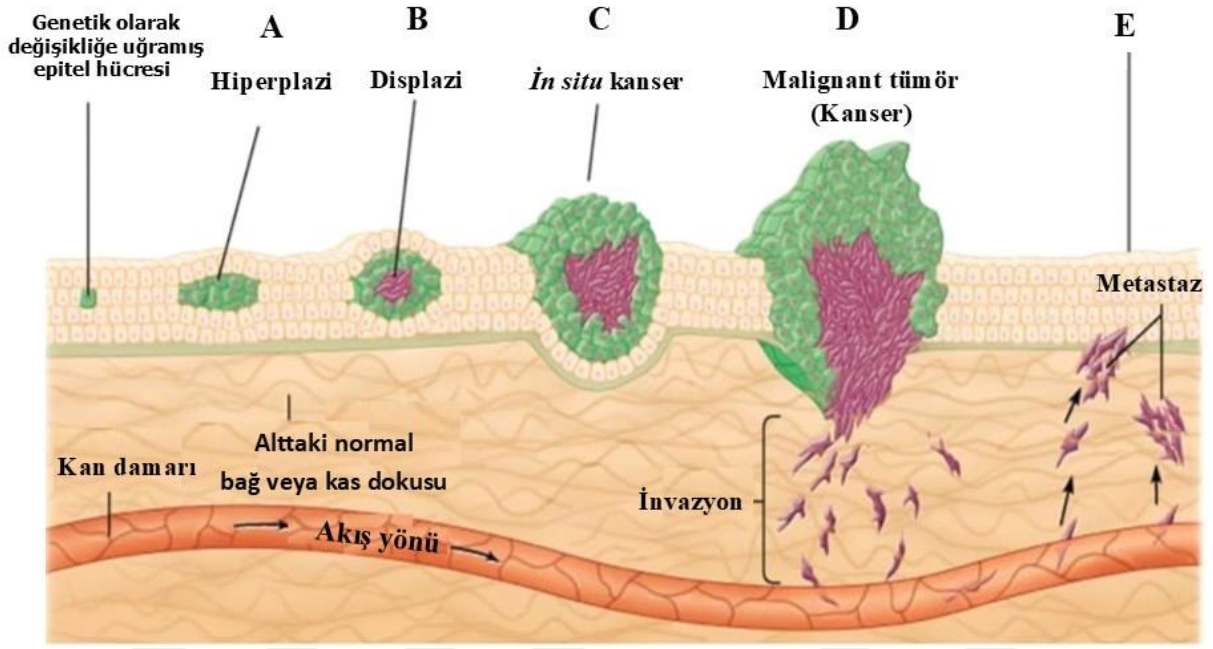
Bir tümörün oluşması için gerekli mutasyonların birikimi karsinogenezi çok basamaklı bir süreç haline getirir. Kansere yol açan bir ajanın (karsinojen) bir hayvana uygulanması hemen tümör oluşumuna yol açmamaktadır. Berenblum ve Shubik tarafından 1940’lı yıllarda fare derisi ile yapılan deneyler karsinogeneizde inisiyasyon (başlangıç), promosyon (gelişme), progresyon

(ilerleme) olmak üzere üç evrenin olduğunu göstermiştir (Yuspa, 1994). Geri dönüşümsüz olan başlangıç evresinde derideki kök hücrelere karsinojenin mutajenik etkileri söz konusudur. İkinci evre olan gelişme fazında ise DNA’da mutasyon yapmayan ve etkilerini çoğalma-sağkalım ile ilgili genlerin ekspresyonunu değiştirerek gösteren ilerletici ajanlar (forbol esterleri, büyüme hormonları) rol oynar ve bu evre belirli bir aşamaya kadar geri dönüşümlüdür. Bu ajanların uzun süre uygulanmaları sonucunda deride papillomalar (benign deri tümörleri) meydana gelir. Son olarak üçüncü evre olan ilerleme fazında ise premalignant büyümeler karsinomaya dönüşür. Bu evre; sürekli anjiyogenez, invazyon, metastaz, ilaca direnç, immün savunmadan kaçış, sınırsız replikasyon yeteneği ve büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık olarak tarif edilen daha saldırgan bir fenotip ile sonuçlanır (Norris ve King, 2000). Bu deneysel modelde tanımlanan dönemler insanlarda karsinogenez sürecini tarif etmek için yaygın olarak kullanılır (Şekil 2.1) (Franks ve Knowles, 2005).



Şekil 2.1: Fare derisinde gerçekleştirilen çok aşamalı kimyasal karsinogenez. Evrelerde gerçekleşen olaylar şu şekilde özetlenebilir. A) 1. Prokarsinojenin metabolik aktivasyonu ve DNA’ya kovalent bağlanması, 2. DNA onarımı/hücre replikasyonu ve mutasyon tespiti, 3. Kıl folikülünün çıkıntı bölgesinde veya interfoliküler epidermisin bazal kısmındaki kök hücrelerin kritik hedef genlerinde mutasyonun uyarılması. B) 1. Artan DNA sentezi, inflamasyon, 2. Gen ekspresyonu ve enzim aktivitelerindeki değişiklikler, 3. Kök hücre popülasyonunun artması. C) 1. Kronik hücre çoğalmasının sağlanması, 2. Papilloma denilen klonal büyümelerin gelişimi, 3. Diploid lezyonlar. D) 1. İlave genetik olaylar değişken şekilde gerçekleşir, 2. Anoploidi, LOH (Heterozigotluğun kaybı). E) 1. İnvazyon, 2. Metastaz (Abel ve diğ., 2009’dan değiştirilerek alınmıştır).

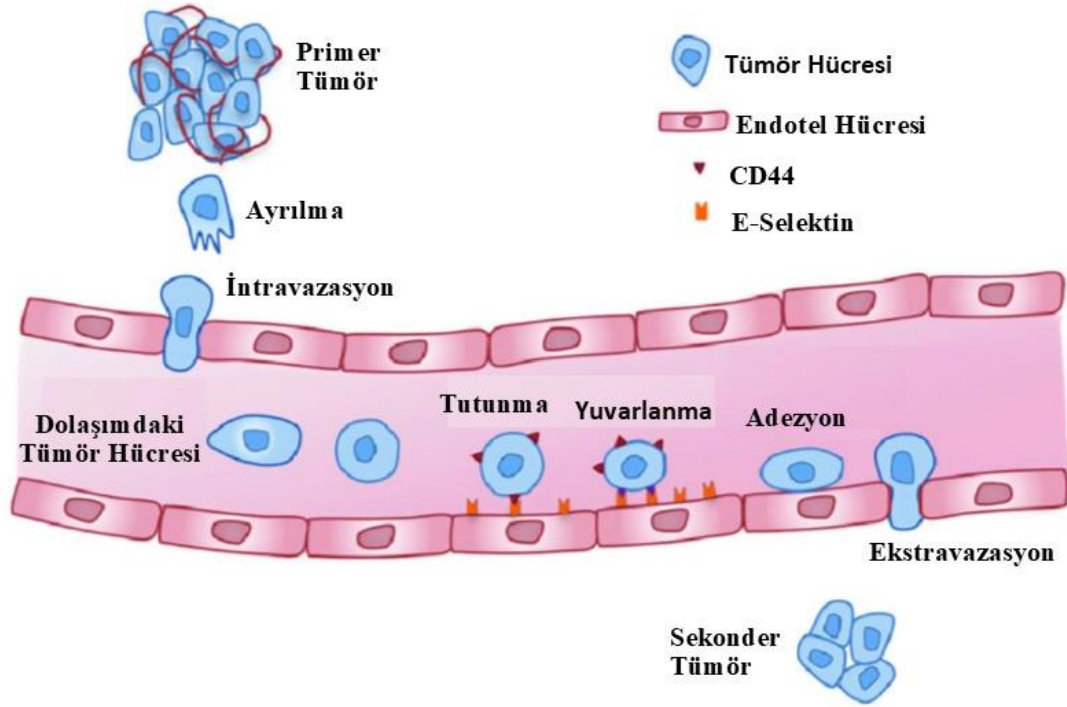
Normal bir dokunun malignant bir dokuya dönüşmesi esnasında ara görünümde dokular ortaya çıkmaktadır. Bu durum hücrelerin saldırgan ve invaziv karakter edinebilmeleri için kademeli olarak evrimleştiklerini ve tümör gelişiminin kompleks ve çok basamaklı bir süreç olduğunu göstermektedir. Bu değişiklikler Şekil 2.2’de gösterilmiştir (Kanwal ve Gupta, 2010).



Şekil 2.2: Tümör gelişim evreleri. Bu evreler; A. Hücrelerin normalden daha hızlı bölünmesi, B. Hücrelerin şekil değiştirmesi, C. Hücrelerin tek bir yerde kalması, D. Kanser hücrelerinin invazyonu ve kan dolaşımına geçerek uzak bölgelere metastazı şeklindedir (Kanwal, 2013’ten değiştirilerek alınmıştır).

Kanser hücreleri hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerine daha az duyarlıdır. Bunun sebebi, hücre yüzey adezyon moleküllerini daha az ifade etmeleridir. Epitelyal hücre davranışında, doku formasyonunda ve kanserin baskılanmasında görevli olan kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyon molekülü olan epitelyal kaderin (E-kaderin) ifadesindeki eksiklik kanser hücrelerinin yayılma ve metastaz yeteneğine katkı sağlar (Pecina-Šlaus, 2003). Kan damarları olmadan büyüemeyen ve metastaz yapamayan kanser hücreleri oksijen ve besin temini için çevre dokulardaki kapillerlerde bulunan endotel hücrelerinin proliferasyonunu uyarak tümöre doğru yeni kan damarları oluşturur (Carmeliet ve Jain, 2000). Kanser hücreleri anjiyogenezi uyardıkları bu süreçte fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üretirler. Anjiyogenez kanser hücrelerine besin sağlamanın yanı sıra kanser hücrelerinin dolaşıma geçmesine ve metastatik süreci başlatmasına katkı sağlar (Lodish ve diğ.,

2008). Fakat kanser hücrelerinin metastaz yapabilmesi için aşması gereken bazı engeller vardır. Öncelikle, ekstraselüler matriks (ECM) unsurlarını degrade ederek köken aldıkları primer odaktan ayrılmaları gerekir. Bu süreçte kollagenaz, ürokinaz tip plazminojen aktivatör (u-PA), matriks metalloproteinaz (MMP) sekresyonu kanser hücrelerinin bazal laminayı parçalamasında ve buradan bağ dokuya yayılmasında önemli rol üstlenirler. Bundan sonraki aşama intravazasyon olarak adlandırılan kanser hücrelerinin dolaşım sistemine geçişleridir. Dolaşıma geçen kanser hücreleri hedef organlarındaki kan damarlarının endotel hücreleriyle etkileşerek sekonder odaklar oluşturmak üzere ekstrasvazasyon olarak adlandırılan aşama ile hedef organlarına geçerler (Şekil 2.3) (Vanharanta ve Massague ve diğ., 2013).



Şekil 2.3: Metastaz. Ekstrasellüler matriks unsurlarını parçalayarak köken aldıkları primer odaktan ayrılan kanser hücreleri intravazasyon adı verilen aşama ile dolaşım sistemine geçerler. Ardından hedef organlarındaki kan damarlarının endotel hücreleriyle etkileşerek sekonder odaklar oluşturmak üzere ekstrasvazasyon olarak adlandırılan aşama ile hedef organlarına ulaşırlar. (Mohammadalipour ve diğ., 2018'den değiştirilerek alınmıştır).

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran bir diğer özellik ise temas inhibisyonuna (kontakt inhibisyon) duyarsızlıklarıdır. Oysaki normal fibroblastlar, bir kültür kabı yüzeyi boyunca komşu bir hücreyle temas edinceye kadar çoğalarak göç ederler, daha sonra hücre göçü engellenir ve normal hücreler birbirine yapışarak kültür kabı yüzeyi üzerinde düzenli bir hücre dizisi oluşturur. Tümör hücreleri ise komşu hücrelerle temas ettikten sonra hareket etmeye, komşu hücrelere göç ederek düzensiz, çok katmanlı modellerde büyümeye devam eder (Cooper, 2000; Alberts ve diğ., 2015a).

2.2. TİROİD KANSERİ

Alt boynun ön kısmında larenksin altında yer alan endokrin sisteminin en önemli organlarından biri olan tiroid bezi, 15-20 gram ağırlığındadır ve lobus dexter ile lobus sinister olmak üzere iki lob ve bunları birbirine bağlayan isthmustan oluşur (Akçakaya ve diğ., 2012). Tiroid kanseri, en yaygın görülen endokrin sistemi kanseridir ve tüm malignant kanserlerin yaklaşık %1'ini oluşturur (Hundahl ve diğ., 2000). Sıklığı yaşa ve cinsiyete göre değişmekle birlikte en sık 30-70 yaş arasında ve kadınlarda görülmektedir. Kadınlardaki malignitelerin %1,5'inden, erkeklerde ise %0,5'inden sorumludur. Tiroid kanseri, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de kansere bağlı ölümlerin kadınlarda %0,17, erkeklerde ise %0,26'sından sorumludur (Arslan ve diğ., 2011). ABD'de klinikte teşhis edilebilen tiroid lezyonlarının sayısının 10-20 milyon olduğu tahmin edilmektedir ve bu rakamın yaklaşık %5-30'u malign karakterdedir (Galliano ve Frishberg, 2012).

Kanser, multifaktöriyeldir. Şöyle ki; bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok etmen kanser oluşumuna neden olur (Williams, 2001). Tiroid kanseri risk faktörleri arasında çocukluk çağında iyonize radyasyona maruz kalmak; RAS, B tip Raf Kinaz (BRAF), RET/PTC, NTRK1, Fosfoinositol 3 kinaz (PI3K)/AKT, Fosfotaz ve tensin homologu (PTEN), PAX8/PPAR γ , p53 ve β katenin genlerinde mutasyon gibi bazı genetik değişiklikler (Xing 2007; Frasca ve diğ., 2008; Galliano ve Frishberg, 2012; Kumar ve diğ., 2015); hamartom, multinodüler guatr, Cowden Hastalığı, Ailesel Adenomatöz Polipozis, Gardner Sendromu ve Ailesel Non-medüller Tiroid Karsinomu gibi genetik geçişli bazı ailesel hastalıklar (Carling ve diğ., 2007); tiroid bezi fonksiyonlarında yetersizlik; Hashimoto gibi bazı benign tiroid bezi hastalıkları (Replinger ve diğ., 2008); guatrojen-zengin veya iyot içeriği zayıf besinlerle beslenmek (Galliano ve Frishberg, 2012; Kumar ve diğ., 2015) sayılmaktadır. Tiroid bezi, triiyodotironin (T3), tiroksin (T4) üreten

foliküler ve kalsitonin üreten parafoliküler (C hücreleri) hücrelerden oluşur. Tiroid kanseri histolojik olarak papiller, foliküler, medullar ve anaplastik karsinoma olmak üzere dört grupta sınıflandırılır. Papiller, foliküler ve anaplastik karsinomlar foliküler hücrelerden türevlenirken medullar karsinoma parafoliküler hücrelerden türevlenir (Xing, 2013). Farklı kökenlerden kaynaklanan bu kanser çeşitleri tümör farklılaşması, metastatik potansiyel ve agresiflik açısından da farklı özellikler sergiler.

Papiller tiroid kanseri (PTC), insan tiroid kanserlerinin % 80-90 'ını oluşturur (Hundahl ve diğ., 1998; Leenhardt ve diğ., 2004; Davies ve Welch, 2006). PTC'de en sık görülen genetik değişimler %40-60 oranında BRAF ve %20 oranında RET mutasyonlarıdır. RAF proteinleri; hücre çoğalması, farklılaşması ve sekresyonda önemli rol oynayan mitojen ile aktive olan protein kinaz/Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (MAPK/ERK) yolağında serin/treonin (Ser/Thr) protein kinaz olarak görev yaparlar (Peyssonnaud ve Eychène, 2001). BRAF mutasyonu Ser/Thr kinaz domaininde (V600E) meydana gelir ve protein kinaz aktivitesinde rol oynar (Xing, 2010a). Bu şekilde MAPK/ERK yolağının uygunsuz ve/veya sürekli aktivasyonu, birçok insan kanserinde anormal proliferasyon ve farklılaşma ile sonuçlanan güçlü bir promitotik kuvvet sağlar (Avruch, 2001).

Tiroid karsinom tedavisi ve saldırgan PTC teşhisi için anahtar mutasyon olarak düşünülen BRAF mutasyonu (Xing, 2010b) terapötik çalışmalarda oldukça ön plana çıkmaktadır. BRAF kinazı inhibe etmek için tiroid kanseri hücre kültürlerinde çok sayıda ajan denenmiştir. BAY 43-9006 (sorafenib), BRAF ve reseptör tirozin kinaz ile ilgili anjiyogenezi hedefleyen multikinaz bir inhibitördür. Şimdiye kadar üzerinde en çok çalışılan ajandır. Ancak, bu etkisini selektif olarak BRAF üzerinden değil de daha çok VEGF üzerinden anjiyogenezi bloke ederek yaptığı düşünülmektedir. Sorafenib ile yapılan Faz II çalışmada metastatik tiroid kanserli 30 hastada % 77 klinik yarar sağladığı görülmüştür (Kloos ve diğ., 2009).

PTC'de görülen bir başka mutasyon ise telomeraz revers transkriptaz (TERT) enziminin mutasyonudur. TERT, telomer uzunluğunu kromozomların sonunda koruyarak hücrelölümsüzlükte önemli bir rol oynayan ribonükleoprotein kompleksi olan telomerazın katalitik alt birimidir. TERT mutasyonunda, bu enzimi ifade eden 5. kromozomdaki 1.295.228. C nükleotidi ile (C228T) ve 1.295.250. C nükleotidi T nükleotidi ile (C250T) yer değiştirir. Bu şekilde, TERT'in anormal ifadesi telomeraz uzunluğu değişmeden hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (Sarin ve diğ., 2005).

PTC’de BRAF ve RET mutasyonu taşıyan tümörler arasındaki ayrım, radyasyona maruziyet ve yaş olmak üzere iki parametreye bağlı olarak yapılabilir. RET/PTC’nin aksine BRAF mutasyonları radyasyonla ilişkili PTC’lerde nadir görülür. Ek olarak, RET / PTC çocukluk çağı tiroid kanserlerinde daha sık görülürken, BRAF mutasyonları çocuklarda çok nadir görülür (Xing ve diğ., 2005; Ciampi ve Nikiforov, 2007).

Foliküler tiroid karsinoma (FTC), tiroid kanserleri arasında ikinci en sık (%15) görülenidir. FTC’de %49 oranında RAS nokta mutasyonu, %39 oranında PAX8-PPAR γ yeniden düzenlenmesi olduğu bildirilmiştir (Nikiforova ve diğ., 2003). RAS geni, hücre farklılaşması, çoğalması ve sağkalımına aracılık eden, MAPK ve PI3K-AKT yolağının efektörlerine sinyallerin tirozin kinaz ve G protein bağlı reseptörler (GPCR)’den iletilmesinde merkezi bir rol oynar (Xing ve diğ., 2013). PAX/PPAR γ yeniden düzenlenmesi PAX8 transkripsiyon faktörünün 5’ ucu ile nükleer hormon reseptör süper ailesinin bir üyesi olan PPAR γ 3’ ucunun birleşmesi ile gerçekleşir (Nikiforova ve diğ., 2003).

Tiroid kanserleri arasında %3-5 sıklıkla görülen medullar tiroid karsinomada (MTC), (Bucsky ve Parlowsky, 1997) görülen mutasyon RET protoonkogeninde meydana gelmektedir. Reseptör tirozin kinazı kodlayan gen olan RET, (Donis-Keller ve diğ., 1993) hücre proliferasyonu, büyüme, farklılaşma ve migrasyonda rol oynamaktadır (Manie ve diğ., 2001).

Anaplastik tiroid karsinoma (ATC), malign tiroid neoplazmalarının %5-15’ini oluşturur (Giuffrida ve Gharib, 2000). Papiller ve foliküler tiroid karsinomunun aksine, ATC kötü hastalık seyrine sahip en agresif kanserlerden biridir (Ain, 1998). ATC’de en sık görülen mutasyonlar β -katenin ve TP53 genlerindeki değişimlerdir (Smallridge ve diğ., 2012). Beta-katenin fizyolojik homeostazda merkezi rolü olan çok işlevli bir proteindir. Hem transkripsiyonel bir yardımcı regülatör hem de hücre içi yapışma için adaptör proteini olarak iş gören β -kateninin yüksek ekspresyonu, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açar (Shang ve diğ., 2017). TP53 mutasyonu insan kanserlerinde en sık rastlanılan mutasyondur (Olivier ve diğ., 2010).

Çoğu kanser hücresinin bir başka özelliği ise farklılaşmadaki başarısızlıklarıdır. Bu kapsamda, lösemi hücreleri kusurlu farklılaşma ile malignansi arasındaki ilişkiyi açıklamak için güzel bir örnektir. Bütün farklı tip kan hücreleri kemik iliğindeki ortak bir kök hücreden kökenlenir. Bu hücrelerin bir kısmı eritrosit bir kısmı makrofaj ya da lenfosit oluşturmak üzere farklılaşırken

sürekli bölünür ve tamamen farklılaştıklarında bölünmeleri durur. Ancak lösemi hücreleri, farklılaşmaya gitmekte başarısız kalırlar, olgunlaşmanın erken evrelerinde duraklar ve bu evrede çoğalma kapasitesi kazanıp yeniden bölünmeye başlarlar (Cooper, 2000). Tiroid folikül hücrelerinden kaynaklanan kanserler ise farklılaşma potansiyeline göre diferansiye (papiller ve foliküler) veya az diferansiye (anaplastik) olarak sınıflandırılabilir. Diferansiye tiroid kanserleri spesifik farklılaşmış tiroid fonksiyonlarını ve olumlu biyolojik davranışlarını korur ve bu hastalar bölgesel metastazlarına rağmen, genellikle cerrahi müdahale, radyoiyodin tedavisi (^{131}I), tümör büyümesini uyaran Tiroid Uyarıcı Hormon (TSH) reseptörünün susturulması temeline dayanan TSH supresyon tedavisi ile olumlu sonuçlar alırlar. Radyoiyodin ile tedavi, foliküler hücre kaynaklı farklılaşmış tiroid kanseri olan hastalarda total tiroidektomi sonrası lokal veya uzak metastazların azaltılması için genellikle etkilidir. Ne yazık ki, kötü prognozu ile bilinen anaplastik tiroid kanseri için aynı durum söz konusu değildir. Bunun sebebi diferansiyasyon sürecinde; bu karsinomalar radyoiyodu alma, organize etme ve tiroglobülin yapma kabiliyeti dahil olmak üzere, tiroid spesifik gen ekspresyonlarını kaybederler. Bu bağlamda, radyoiyodinin klinik alımı ile ilişkili olan tiroisitlerden iyodür alımına aracılık eden sodyum-iyodür simportör (NIS) geni, anaplastik tiroid kanserinde ifade edilmemektedir. Dolayısıyla, bu tümörler etkili bir şekilde tedavi edilmek için ^{131}I alma yetisine sahip değildir. NIS genleri, tükürük bezleri, gastrik mukoza ve emziren meme bezleri dahil olmak üzere tiroid dışındaki birkaç insan dokusunda da bulunur, ancak gen ekspresyonunun seviyesi maalesef terapötik olarak etkili olmak için çok düşüktür. Sonuç olarak, radyoiyodin tedavisi veya TSH baskılayıcı tedavi gibi diferansiye tiroid kanseri hastalarını tedavi etmek için kullanılan yöntemler anaplastik tiroid kanserli hastalarda sıklıkla etkili değildir. Bu tümörler aynı zamanda dış radyasyon veya sistemik kanser kemoterapisi ile alternatif tedaviye de cevap vermede başarısız olmaktadır (Hsu ve diğ., 2014).

Karsinogenezdeki genetik hasarın hedefi, hücre bölünmesinin regülasyonunu sağlayan ve büyümeyi destekleyen proto-onkogenler ile hücre bölünmesini yavaşlatan tümör baskılayıcı genler ve DNA hatalarını düzelter tamir genleridir. Çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların hücrelerin büyümelerini kontrol eden kritik genlerde (proto-onkogenler) mutasyona yol açması sonucunda bu mutant alleler aktif onkogen gibi fonksiyon yaparak onları taşıyan hücreleri kanseröz büyümeye sürükler (Lodish ve diğ., 2008). Özetle proto-onkogenlerdeki artış, tümör baskılayıcı genlerdeki azalış kontrolsüz çoğalmayla sonuçlanır. Ancak bu artış ve azalışın ortaya çıkmasındaki işleyiş birbirinden farklıdır. Popülasyonda bir genin olası değişik

hallerinden herhangi biri bir "allel"i temsil eder. Onkogenlerde, genin kromozomlardaki iki allelinden herhangi birinin mutant olması durumunda kanserleşme ortaya çıkabilmektedir. Buna karşılık bir tümör baskılayıcı genin kanserleşmeye yol açabilmesi için, her iki alleldeki genin de mutasyona uğramış olması gerekir. Bunun sebebi tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen ve fonksiyon kaybına neden olan mutasyonların çoğunun, doğada resesif olmasıdır. Bu iki alleldeki mutasyonlar kendiliğinden oluşabileceği gibi (de novo mutasyon) kalıtım yoluyla da aktarılmış olabilir. Bu durum, 1971'de genetikçi Alfred Knudson tarafından önerilen "çift-vuruş hipotezi (two-hit hypothesis)" olarak bilinir (Knudson, 1971).

DNA hasarı hücrelerimizin sürekli olarak maruz kaldıkları en önemli stres faktörlerinden biridir. Bu maruziyet hücresel genomda mutasyon, delesyon ve/veya translokasyon gibi genomik sapmaların ortaya çıkmasına neden olur ve böylece genomik kararsızlık indüklenir. Genomik sapmaların birikmesi sıklıkla kanserlerin gelişmesine neden olur. Bu bağlamda, genomik bütünlüğü ve hücreleri malign transformasyondan korumak için uygun bir stres tepkisi gereklidir. Bu evrede; oluşan strese tepki olarak p53 aracılı hücre döngüsü durdurma mekanizması önemli bir rol üstlenir ve DNA'da oluşan hasarlı bölge tamiri için hücre bölünmesini G₁ fazında durdurur. Akabinde, hücre siklusunda görevli protein kinazlar olarak bilinen siklin bağımlı kinazların (CDK) inhibe olmasına sebebiyet veren p21'in transkripsiyonunu artırarak DNA hasarına yanıt verir (Sherr ve McCormick, 2002; Cabadak, 2008). DNA onarımı tamamlandığında hücreler normal hücre döngüsüne tekrar girerler. Aksine, hücreler onarılamayacak düzeyde bir DNA hasarına sahip ise tümör baskılayıcı gen olan p53, hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak için pro-apoptotik işlevini uygular ve böylece hasarlı DNA'nın yeni hücrelere transferini önleyerek genomik bütünlüğü korur. P53 mutasyonu kanser hücrelerinde görülen en sık mutasyondur (Kandoth ve diğ., 2013). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, P53 mutasyonu ve anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 ifadesindeki artışın bir arada gözlenmesi neticesinde hücreler kontrolsüz çoğalmaya ve hücre ölümüne direnç geliştirmeye başlar (Igney ve Krammer, 2002). P53'ün yanı sıra p16 siklin kinaz inhibitör gibi intrasellüler proteinler, hücre proliferasyonunu durduran salgı hormonlarına özgü olarak üretilen reseptörler, apoptoza yönlendiren proteinler de tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinler arasında yer almaktadır (Lodish ve diğ., 2008).

Hücresel metabolizma ve proliferasyonun ana düzenleyicisi olarak nitelendirilen c-myc geni insan kanserlerinin çoğunda aşırı eksprese edilir (Miller ve diğ., 2012). Myc onkogeni aşırı

eksprese eden transgenik farelerde T hücreli veya akut miyeloid lösemi gelişmekte, onkogen inaktive edildiğinde ise lösemik hücrelerde proliferasyon duraklamakta, diferansiye olmakta ve apoptoz meydana gelmektedir (Felsher ve diğ.,1999). Proto-onkogen olan Ras ailesinin N-ras, H-ras ve K-ras olmak üzere üç üyesi vardır (Lowy ve Willumsen, 1993). Ras proteinleri; hücrel çoğalmayı, farklılaşmayı ve hayatta kalmayı kontrol eden sinyal ağlarının temel bileşenleri olarak nitelendirilen küçük GTPazlardır. Başlıca rolleri; transkripsiyonu, hücre şekli ve göçünü, endositozu, hücre sağkalımını ve hücre döngüsü ilerlemesini, farklılaşmasını, yaşlanmayı ve daha birçok olayı koordine eden sinyal iletim yollarını aktive ederek membrandaki geçici sinyal komplekslerini birleştirmektir (Rajalingam ve diğ., 2007). Onkogenik RAS aktivasyonu nokta mutasyonları sonucu oluşur ve kanser hücrelerindeki tüm mutasyonların %30'unda saptanmıştır (Delellis, 2006; Fernandez ve Santo, 2011). Onkogenik aktivasyonun ortaya çıkmasında nokta mutasyona ek olarak iki mekanizma daha mevcuttur. Bunlar; proto-onkogenleri içeren DNA segmentinin tekrar duplike olması böylece kodlanan proteinin fazla ifadesi ve kromozomal yer değiştirme sonucu farklı promotorlar ile kontrol edilebilen büyüme regülatör genlerinin anlatımıdır (Lodish ve diğ., 2008).

Büyüme faktörleri, özel biyolojik mesajları taşıyan bazı hücrelerden salındıktan sonra hücreler arası boşluktan hedef hücrelerine ulaşan küçük proteinlerdir. Büyüme faktör reseptörleri ligand yokluğunda monomerik halde plazma membranı boyunca ileri geri sürekli hareket ederler. Reseptör-ligand etkileşimi sonucu dimerizasyon ve transfosforilasyon meydana gelerek sinyal oluşur. Kanserde büyüme faktörlerinin aşırı ifadesi ya da bu reseptörlerin yapısını etkileyen mutasyonlar ligand olmaksızın reseptör dimerizasyonuna ve böylece otokrin sinyalizasyon ile sürekli hücre proliferasyonuna sebebiyet verir (Lu ve diğ., 2019).

2.3. GLİKOZİLASYON

Hücre yüzeyindeki glikan örtüsü büyük oranda membran glikoproteinleri ve glikosifingolipitler gibi glikokonjugatlardan kaynaklanmaktadır (Fuster ve Esko, 2005). Her ne kadar 1970'lerin başlarında yeterince anlaşılmamış olsa da, glikobiyolojide genomik, proteomik ve kütle spektrometrisindeki son gelişmelerle birlikte glikan yapısı ve bileşimi hastalık ile normal durumlar arasında kesin ayrımlar yapılmasını sağlar (Taylor ve Drickamer, 2011). Kanserde malign transformasyonu takiben hücre yüzeyi glikan değişiklikleri, tümör hücre farklılaşması ve metastaz geniş ölçüde belgelenmiştir (Hakomori, 2002). Yaygın değişiklikler arasında; glikoziltransferaz enzimlerinin fazla ya da az sentezlenmesi, değişmiş glikozidaz aktivitesi,

şeker nükleotid donörlerinin ve glukokonjugat akseptörlerinin ekspresyonlarının değişmesi, şeker nükleotid taşıyıcılarının aktivitesindeki değişiklikler, golgi fonksiyonundaki bozukluklar gösterilebilir (Pinho ve Reis, 2015).

Glikozilasyon, pek çok hücrel fonksiyonun yerine getirilebilmesi için birçok proteinde gerekli olan post-translasyonel ya da ko-translasyonel bir değişim olarak tanımlanır (Cadena ve diğ., 2019). Glikozilasyonun pek çok tipi olmakla birlikte en yaygın glikozilasyon tipleri asparaginin amid azotuna bağlanmasıyla oluşan N-bağlı glikozilasyon (Kornfeld ve Kornfeld, 1985) ve serin ya da treoninin hidroksil grubuna bağlanmasıyla oluşan O-bağlı glikozilasyondur (Steen ve diğ., 1998). Proteinlere bağlı glikan zincirleri hücre içi protein trafiği, hücre sinyalleşmesi, ligand bağlama, hücre-hücre etkileşimi, hücre-ECM etkileşimi, farklılaşma, hücre ölümü gibi fizyolojik süreçlerde rol almasına ek olarak, patofizyolojik süreçlerde de önemli bir rol üstlenir (Maenuma ve diğ., 2008). Glikozillenmiş biyomolekül grubunu temsil eden glikokonjugatların kanser gelişiminde ve ilerleyişinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Schultz ve diğ., 2012). Ayrıca, serumda ve dokuda kanserle bağlantılı glikokonjugatlar, hastalığın ilerleyiş sürecinin belirlenmesi için belirteç olarak kullanılmaktadır (Reis ve diğ., 2010). Kanser gibi patolojik süreçlerde tümör fenotipine katkıda bulunan değişmiş ya da anormal glikozilasyon sık rastlanılan bir olgudur. N-glikolizasyondaki en önemli değişiklik β -1,6 dallanmasıdır (Magalhaes ve diğ. 2017). Bunun yanında GlcNAcV'nin aktivitesi artar ve bu artışa siyaliltransferazların aktivitesindeki artış eşlik eder. N-glikolizasyondaki bu değişiklikler artmış siyalik asit kompozisyonuna neden olarak metastatik fenotipe (apoptotik direnç, migrasyon kabiliyeti, platelet penetrasyonu, invazyon, metastaz) katkı sağlar (Pinho ve Reis, 2015). O-glikozilasyondaki en önemli değişiklikler ise COSMC şaperon işlevsizliğinin GalNAc α -O-Ser/Thr, Thomsen Nouvelle antijeni (Tn) ve siyalillenmiş Thomsen Nouvelle antijeni (sTn) antijeni oluşumuna neden olmasıdır (Ju ve diğ., 2008).

Kumamoto ve diğ. (2001) kolon kanseri dokularında uridin difosfat galaktoz (UDP-Gal) taşıyıcısının mRNA miktarında, malign olmayan mukoza dokularına kıyasla anlamlı bir aşırı ekspresyon olduğunu bildirmiştir. Daha önemlisi, UDP-Gal taşıyıcı mRNA artışı, kolon kanserlerinde Thomsen Friedenreich (TF) ve siyalil Lewis A/X (SLe^a/SLe^x) antijenleri gibi kansere bağlı karbohidrat markörlerinin ekspresyonu ile ilişkilidir. Ek olarak, fukozilasyon veya fukoz bakiyelerinin proteinlere veya lipitlere bağlı oligosakkaritlere transferinin, kansere dahil olan en belirgin glikan modifikasyonlarından biri olduğu bilinmektedir (Listinsky ve diğ.,

1998). Fukozilasyon, genellikle karsinogenez sırasında artar ve esas olarak fukoziltransferazlar, guanozin difosfat (GDP) fukoz sentaz enzimleri ve GDP-fukoz taşıyıcı(ları) ile düzenlenir (Miyoshi ve diğ., 2008). Son zamanlarda, Chen ve diğ. (2013) küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) fukoziltransferaz (FUT) 8 ekspresyonundaki yükselişin tümör metastazı, hastalık nüksü ve hastalarda kötü sağkalım oranı ile bağlantılı olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma aynı zamanda agresif akciğer kanseri hücre soylarında FUT8'in baskılanmasının kanser hücre çoğalmasını, metastazını ve tümör büyümesini önemli ölçüde önlediğini rapor etmiştir. Ayrıca, α -L-fukozun tiroid karsinomu, lösemi, akciğer kanseri, yumurtalık karsinomu, kolorektal adenokarsinom ve beyin tümörü dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (Listinsky ve diğ., 2011). Sonuç olarak; defukozilasyon, birçok insan malignitesine karşı seçici bir tedavi stratejisi olarak Listinsky ve diğ. (2001) tarafından önerilmiştir. Bu hipotez, insan meme kanseri MDAMB-231'i α -L-fukozidaz, α -L-fukozu spesifik olarak gideren bir glikozidaz ile tedavi ederek ayrıca Yuan (2008) tarafından da test edilmiştir. Her ne kadar MDAMB-231 hücrelerinin çoğalması ve canlılığı fukozidaz işleminden etkilenmemiş olsa da, hücre yüzeyi CD44 ve CD15 seviyelerinin düşmesi nedeniyle kanser hücrelerinin invazyonu önemli ölçüde azalmıştır. Tersine, Zhao ve diğ. (2014) *core* fukozilasyonun mide kanserinde azaldığını ve *core* fukozilasyonun artmasının, insan mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu etkili bir şekilde önleyebileceğini keşfetmiştir.

Öte yandan dokuz karbonlu asidik bir monosakkarit olan siyalik asidin, glikan zincirlerinin uç pozisyonuna transfer edilmesi olarak bilinen siyalillenmenin, çoğu kanserde belirgin bir şekilde arttığı bilinmektedir (Pinho ve Reis, 2015). Kanserdeki yüksek derecede siyalillenmenin, kanser hücrelerini apoptozdan korumasının yanı sıra metastazı teşvik ettiği ve tedaviye direnç göstererek hastalığın ilerlemesini desteklediği bildirilmiştir (Büll ve diğ., 2014). Siyalillenmedeki artış genellikle dış N-asetillaktozamin (Gal β 1-4GlcNAc) birimlerine veya O-glikanlar üzerindeki GalNAc α 1-O-Ser/Thr birimlerine α -2,6 bağlı siyalik asitlerde spesifik bir artış olarak ortaya çıkar. Siyalillenmedeki bu spesifik değişimin, insan kanseri ilerlemesi, metastatik yayılması ve zayıf hastalık seyri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Pinho ve Reis, 2015). Bununla birlikte, α -2,3 siyalik asidin de kanser ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Cui ve diğ. (2011) meme kanserinde α -2,3 siyalik asit bakiyelerinin en yüksek ekspresyon seviyesinin metastatik potansiyel ile ilişkili olduğunu kanıtlamıştır.

Pek çok çalışma, metastazın gerçekleşmesinde rol alan olaylar dizisinde anormal glikozilasyon sürecinin önemine dikkat çekmektedir. Dolaşıma geçen tümör hücrelerinin plateletler ile mikrotromboz oluşturmada kanser hücrelerinin değişmiş yüzey glikanları ile platelet yüzeyindeki P-Selektinler görev alırlar (Varki, 2007). Bu tümör hücre emboli formasyonu kanser hücrelerine dolaşımda geçici ve koruyucu bir sığınak sağlamanın yanında kanser hücrelerinin ekstrasvazasyon ve metastazına aracılık eden endotel hücreleri ile adezyonuna destek olur (Labelle ve Hynes, 2012). Çalışmalar, dolaşımdaki karbohidrat bağlayıcı proteinler olan lektinlerin ve selektinlerin kanser hücrelerinin platelet, lökosit ve endotel hücreleriyle etkileşimine aracılık ederek metastatik süreci desteklediğini ortaya koymaktadır (Witz, 2008). Kanser hücrelerinin yüzeyinde artmış MUC1, MUC2, MUC4 ve MUC16 müsin proteinleri selektin ligandları taşır (Baldus ve diğ., 2002). Müsin proteinlerin taşıdığı SLe^x ve SLe^a gibi siyalillenmiş glikan motifleri sayesinde endotel ve plateletlerin yüzeyindeki E ve P-selektinler için birer ligand işlevi görür (Byrd ve Bresalier, 2004). Müsinler dışında, tümör hücreleri başka bazı selektin liganları da taşır. Bu ligandlar arasında CD24, CD44, ölüm reseptörü 3, E-selektin ligand-1, P-selektin ligand-1 ve podokaliksin benzeri protein bulunur. Bu ligandlar da glikoprotein tabiatlıdır ve taşıdıkları siyalillenmiş motifler selektinler için birer ligand görevi üstlenir (Aigner ve diğ., 1997). Bapu ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada *Peanut* agglutinin (PNA), *Konkanavalin A* (ConA) ve *Helix pomatia* agglutinin (HPA) lektinlerle meme kanser hücrelerinin yüzeyindeki değişmiş glikan motiflerinin maskelenmesi gerçekleştirilmiştir (Bapu ve diğ., 2016). Hücre yüzeyleri N-asetilgalaktozamin (GalNAc) glikan motiflerince zengin MCF-7 ve ZR-75-1 hücre hatlarının bu motiflere bağlanma yeteğine sahip HPA lektin tarafından maskelenmesi sonucunda kanser hücrelerinin endotel hücrelerine bağlanma kapasitesi çarpıcı bir şekilde azalmıştır. Ancak bu glikan motiflerine sahip olmayan BT-474 hücre hatlarında bu sonuç elde edilememiştir. Benzer şekilde bu glikan motiflerine özgü olmayan lektinler de endotel hücrelerine bağlanma kapasitesi üzerinde bir etki göstermemişlerdir.

2.4. LEKTİNLER

Lektin terimi ilk kez, 1954 yılında William C. Boyd tarafından, kan gruplarına özgü olan bitkisel aglütininler için kullanılmıştır. Ancak daha sonra bu terim hücreleri aglütine edebilen ve şekerlere özgüllük gösteren proteinleri içerecek şekilde genişletilmiştir (Sharon, 2007; Nilsson, 2007). Protein ya da glikoprotein yapıda olan lektinler, karbohidrat bağlayıcı molekül ailesinin genel adıdır ve virüslerden bakterilere, bitkilerden hayvanlara kadar pek çok organizmada bulunmaktadır. Lektinler mono ve oligosakkaritleri geri dönüşümlü olarak yüksek özgüllükte bağlayabilirler ancak katalitik aktiviteye sahip değildirler. Antikorların aksine, bir immün cevaba yanıt olarak üretilmezler. Kurt Drickamer, lektinlerin çoğunun karbohidrat bağlayıcı aktivitesinin belirli bir polipeptit domaini içinde yerleşim gösterdiğini önermiş ve bu bölgeye karbohidrat tanıyıcı bölge (CRD) adını vermiştir (Chrispeels ve Raikhel, 1991). Lektinler, karbohidratlarla bir hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşim ağı içerisinde birleşir ve metal iyonlarının da bu etkileşimlerde rolü vardır (Dodd ve Drickamer, 2001; Sharon, 2007). Genellikle, her bir lektin iki ya da daha fazla karbohidrat bağlama bölgesine sahiptir, bu sebeple lektinler di- veya polivalenttir (Harmanakaya ve diğ., 2014). Dolayısıyla eritrositlerle muamele edildiklerinde, eritrosit yüzeyindeki şeker moleküllerini bağlayarak hücreler arasında çapraz köprüler kurarlar ve böylelikle hücreleri aglütine ederler. Ek olarak, çözelti içindeki glikoproteinleri ve polisakkaritleri presipite etme yeteneğine de sahiptirler (Lis ve Sharon, 1998). Lektinler; dolaşımdaki glikoproteinlerin uzaklaştırılması, glikoproteinlerin hücre içi trafiğinin kontrolü, konak hücre-patojen etkileşimi, lökositlerin inflamatuvar alanlara göçü, immün hücre etkileşimleri, malignansi ve metastazda önemli roller üstlenirler (Lis ve Sharon, 1998). Lektinler anti-tümöral, immunomodülatör, anti-fungal ve insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) revers transkriptaz inhibisyonu gibi göze çarpan özellikleriyle araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Lam ve Ng, 2010). Günümüzde lektinlerin kullanılmasıyla malignan tümör dokularında değişmiş glikofenotipin histokimyasal olarak saptanması ve bu analiz yöntemiyle tanı koyma yaklaşımı en önemli çabalardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Kayser ve diğ., 2003; Arab ve diğ., 2010; De Lima ve diğ., 2010).

Lektinler; bitkisel (aglütininler), hayvansal, bakteriyel (adehsinler ve toksinler) ve viral (hemaglütininler) lektinler olmak üzere dört grupta kategorize edilir. Bitkilerin total proteinlerinin %2-10 kadarını lektinler oluşturur ve bu proteinler fizyolojik regülasyon, mikroorganizma saldırılarına karşı koruma, mitojenik uyarılma, *Rhizobium* cinsinin nitrojen

fikse eden bakterilerini tanıma gibi farklı fonksiyonları vardır. Bitki lektinleri sindirim sürecindeki enzimatik lizise karşı dirençlidir ve gastrointestinal hücrelere bağlanarak doğrudan dolaşım sistemine aktivitelerini kaybetmeksizin geçebilirler (Vasconcelos ve Oliveira, 2004; De Mejia ve Prisecaru, 2005). Bitki lektinleri yüksek afinitede bağlandıkları monosakkaritlere göre mannoz bağlayanlar, N-asetilglukozamin (GluNAc) bağlayanlar, fukoz bağlayanlar, galaktoz (Gal)/N-asetilgalaktozamin bağlayanlar ve siyalik asit (NeuNAc) bağlayanlar olmak üzere beş grupta kategorize edilir (Lis ve Sharon, 1998). Yapısal olarak ise merolektinler, hololektinler, kimerolektinler ve süperlektinler olmak üzere dört gruba ayrılır. Merolektinler tek karbohidrat bağlanma bölgesine sahipken hololektinlerde ise en az iki karbohidrat bağlanma bölgesi bulunur. Kimerolektinler, birçok karbohidrat bağlanma bölgesinin yanı sıra enzimatik bir bağlanma bölgesi de içerirler. Son grup olan süperlektinler ise birbirinden farklı en az iki karbohidrat bağlanma bölgesi bulundurur (Damme ve diğ., 1998). Moleküler yapıları ve evrimsel durumları göz önüne alındığında bitki lektinleri Amaranthin, *Agaricus bisporus* aglütinin, Cyanovirin, Chitinase ile ilişkili aglütinin, *Euonymus europaeus* aglütinin, *Galanthus nivalis* aglütinin (GNA), Jacalinler, Lizin motifi, Hevein, *Legume* lektin, Nictaba ve Ricin-B familyaları olmak üzere 12 aileye ayrılır. Bu 12 bitki lektin ailesinin anti-fungal, anti-viral ve anti-neoplastik aktiviteler gibi kapsamlı biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (Wu ve Bao, 2013).

Son yirmi yılda araştırmacılar, bitki lektinlerini malignant ve malignant olmayan hücreler arasındaki ince ayrıntıların saptanmasında, benign tümör ayırımının yapılmasında ve metastaz ile ilişkili glikozilasyon derecesinin saptanmasında, spesifik bağlanma yetenekleri nedeniyle kullanmışlardır (Wu ve diğ., 2009). Spesifik lektin-glikan etkileşimleri, immün cevap oluşumu ve tümör gelişimi gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte çarpıcı etkilere sahiptir (Sharon ve Lis, 2004). Bu etkileriyle lektinlerin kanser tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüş ve lektinlerin anti-karsinojen etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. *Polygonatum odoratum* lektin (POL), ökseotu lektin ve Con A anti-kanser özellikleri ile ön plana çıkan lektinlerdir. Bitki lektinleri, kanserde Bcl-2 ailesi, kaspaz ailesi, p53, PI3K/Akt, ERK, BNIP3, Ras-Raf ve ATG ailelerinde yer alan temsili sinyal yollarını modüle ederek hem apoptozu hem de otofajiyi etkilemektedir (Jiang ve diğ., 2015). Sitotoksik ve anti-tümöral ajan olarak çeşitli lektinlerin kullanılmasıyla yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, lektinin kaynağına, kanserin tipine ya da kullanılan hücre soyunun tipine bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya koymuştur (Wang ve diğ., 2000). Shi ve diğerleri (2017) bitki lektinlerinin, hücre ölümünü üç ana yoldan

gerçekleştirdiğini önermişlerdir. Bu yollar: 1) Doğrudan ribozomu etkisiz hale getirme, 2) Endositoza bağımlı mitokondriyal fonksiyon bozukluğu 3) ve/veya şeker içeren reseptörlere bağlanma olarak değerlendirilmiştir.

Eşsiz anti-kanser yetenekleri ve terapötik uygulamaları ile dikkat çeken ve ökse otu lektini olan ML I, II ve III etki mekanizması aydınlatılmış lektinlerdendir (Fu ve diğ., 2011). Bu lektinler, α ve β olmak üzere iki alt üniteden oluşur. Karbohidrat bağlayıcı özelliğe sahip olan β zinciri hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak proteinlerin hücre içine girişini engeller. Alfa zincir ise ribozomların 60S ünitesinin 28S RNA'sından adenin bakiyesini uzaklaştırarak ribozomları inaktif hale getirir ve protein sentezini inhibe eder (Stirpe ve diğ., 1992). Bu lektinler kuvvetli apoptoz indükleyici özelliklerinin yanında (Büssing ve Schietzel, 1999), çoklu ilaç direncine sahip kolon kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterirler (Valentiner ve diğ., 2002) ve kanser ilaçlarının sitotoksik etkilerini artırırlar (Bantel ve diğ., 1999). ConA gibi bitki lektinleri, hücre membranı yüzeyindeki glikoproteinlerin mannoz bakiyesine bağlandıktan sonra, klatrin aracılı endositoz yoluyla mitokondriye bağlanır. Böylelikle mitokondriyal membran potansiyelinde belirgin bir düşüş ortaya çıkar ve sonuç olarak mitokondriden sitokrom c salınımı gerçekleşir (Li ve diğ., 2011). Mitokondriyal transmembran potansiyelinin azalmasının, BNIP3 veya Beclin-1 ile etkileşime giren Bcl2/adenovirüs E1B (19 kDa)'nin uyarılmasıyla otofajiyi başlattığı da rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2016).

ConA ve Polygonatum cyrtonema lectin (PCL) gibi bazı lektinlerin, anti-ölüm/hayatta kalma yollarını doğrudan inhibe etmek için hücre yüzeyindeki şeker içeren reseptörlere bağlandıkları bildirilmiştir. Bu durum bu lektinlere özgü şeker bağlama özelliğinin anti-tümör aktiviteyi teşvik eden ana nedenlerden biri olabileceğini düşündürmektedir (Liu ve diğ., 2013). Bu modelde, üç yol birbirine yakından bağlıdır. Alfa ve β zincirlerine sahip olan ML, ribozomu inaktive etmeden önce membran reseptörlerine bağlanır (Gabijs ve diğ., 2001). Baklagil lektini olan ConA ise anjiyogenezi inhibe etmek, antijenlerle immünolojik hafıza oluşturmak ve ayrıca endositoz yoluyla programlı hücre ölümünü (PCD) uyarmak için hücre zarı üzerindeki matriks metalloproteinaz ailesi reseptörlerine bağlanmaktadır (Li ve diğ., 2011). Bir başka örnekte ise POL'un L929 murin fibrosarkoma hücrelerinde Fas ligandının, Fas aracılı ölüm domaininin miktarlarında bir artışa sebep olmakla birlikte kaspaz-8 seviyesinde de bir artışa yol açarak kaspaz bağımlı apoptozu başlattığı rapor edilmiştir (Liu ve diğ., 2009a). Benzer şekilde, POL MCF-7 hücrelerinde epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) aracılı Ras-Raf-MEK-ERK

yolakları ile hem apoptotik hem de otofajik hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir (Ouyang ve diğ., 2014).

ML-1 ve diğer Ricin-B familyası üyelerinin, Jurkat lösemi T hücrelerinde kaspaz-8 aktivasyonu sonucu ekstrinsik yol ve hepatokarsinom hücrelerinde p53'ten bağımsız olarak mitokondri aracılı yol ile apoptoza sebep olduğu rapor edilmiştir (Fu ve diğ., 2011). Khil ve diğ. (2007) COLO (kolon kanser hücre hattı) hücrelerinde Kore ökse otu lektininin, mitokondriyal membran potansiyelini bozarak sitokrom c salınmasına, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesinin artmasına ve böylece apoptozom oluşturmak için kaspaz-3'ü aktive ettiğini bildirmişlerdir. Fang ve diğ. (2011), ConA'nın hepatom hücrelerinde BNIP3 aracılı mitokondriyal yol ile otofajiye neden olduğunu göstermişlerdir. Ek olarak, Liu ve diğ. (2009b) PCL'nin A375 (melanoma hücre hattı) hücrelerinde mitokondriyal ROS-p38-p53 yolunun aktivasyonu ve ayrıca L929 hücrelerinde Ras-Raf ve PI3K/Akt yollarının bloke edilmesiyle otofajik ölümüne neden olduğunu rapor etmişlerdir. POL'un, EGFR aracılı Ras-Raf-MEK-ERK sinyal yolunu hedefleyerek insan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptoz ve otofajiye indüklediği gösterilmiştir (Ouyang ve diğ., 2014).

Lektinlerin tedavi amaçlı kullanılabileceklerine dair araştırmalar da bulunmaktadır. Örneğin, Viscum album bitkisinde bulunan ve galaktoza has bir lektin olan VAA, günümüzde Avrupa'da tümörlü hastalarda destek tedavisinde kullanılmaktadır. Tümör türlerine karşı, deri altına 1-2ng/kg olarak verilen VAA lektininin interlökin (IL)-1 ve IL-2 gibi sitokinlerin ve monositlerde tümör nekroz faktör- α (TNF- α) 'nın üretimini artırarak, immün sistemi uyardığı bildirilmiştir. Ayrıca bu lektinin, hücre yüzeyindeki ligandlarına bağlanıp hücre içi Ca^{+2} seviyesini artırdığı ve belli proteinlerin fosforilasyonunu uyardığı rapor edilmiştir (Gabijs, 1997).

Alfa 2,3 bağlı siyalik asitler için biyolojik bir araç olan ve birkaç alt birimden oluşan MAL'nin daha fazla hemaglutinin aktivitesi gösteren tipine *Maackia amurensis* hemaglutinin (MAH), daha fazla lenfotik aktivite potansiyeli olan tipine ise *Maackia amurensis* mitojen (MAM) adı verilir (Kawaguchi ve diğ., 1974). MAH O-glikozillenmiş iken MAM N-glikozillenmiştir. Daha sonraları MAM'ın lökositlere daha güçlü bağlandığının anlaşılmasıyla birlikte adı *Maackia amurensis* lökoaglutinin (MAL-II) olarak değiştirilmiştir. MAL α -2,3 siyalik aside bağlanabilme özgülüğü gösterirken α -2,6 siyalik aside bağlanamamaktadır (Wang ve Cummings, 1988). Daha sonraları ise N-bağlı glikanlarda NeuNAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc bakiyesine bağlanabildiği saptanmıştır (Knibbs ve diğ., 1991). Bunun yanında MAL

SO43Gal β 1,4GlcNAc bakiyesi için de spesifiktir. MAL'nin fare melanoma modeline oral olarak haftada bir kez verilmesi, deri altında melanoma hücrelerinin büyümesini hiçbir yan etki olmaksızın büyük ölçüde azaltmıştır (Ochoa-Alvarez ve diğ., 2012). Bununla birlikte *in vitro* çalışmalarda MAL'nin küçük hücreli akciğer kanserinde (Mehta ve diğ., 2013) ve çocuk akut lenfoblastik lösemi hücrelerinde (Kapoor ve diğ., 2008) apoptozu uyardığı saptanmıştır. Bunun yanı sıra araştırmacılar, podoplanin eksprese eden oral skuamöz karsinoma hücrelerinde MAL uygulamasının hücre hareketliliğini azalttığını tespit etmişlerdir (Ochoa-Alvarez ve diğ., 2015).

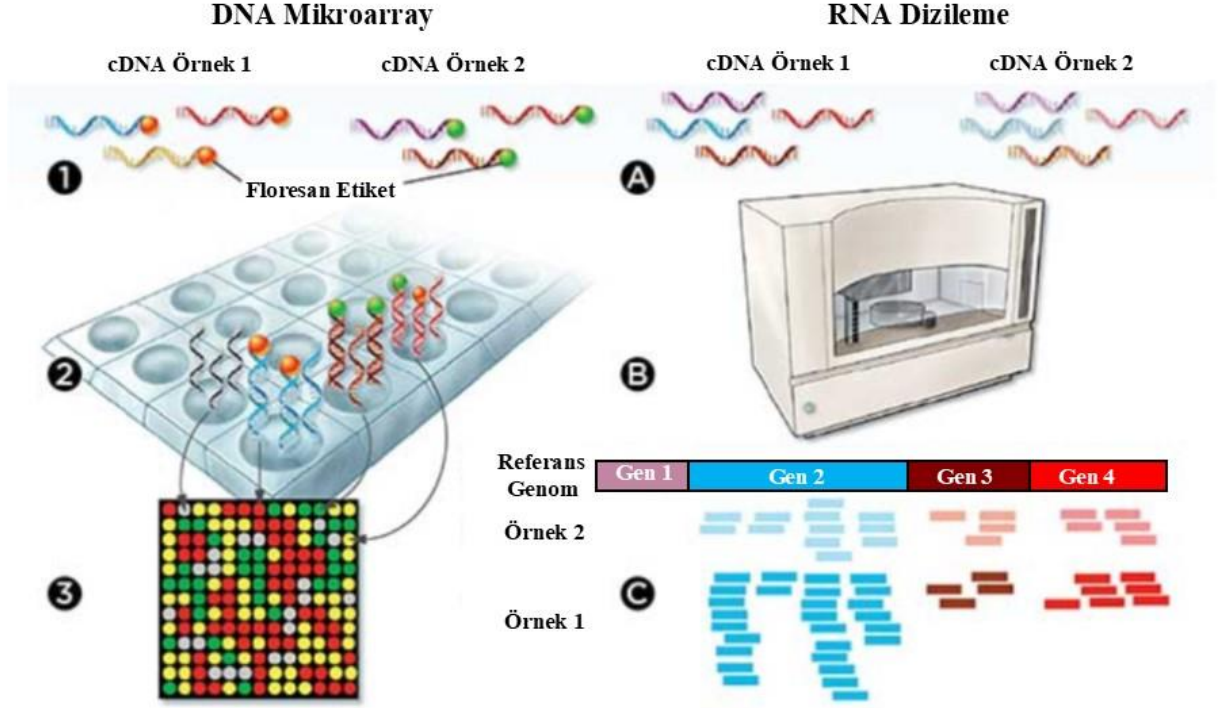
2.5. RNA DİZİLEME

İnsan Genom Projesinin tamamlanmasından sonra gen sayısının beklenenden çok daha az bulunması ve DNA'daki protein kodlayan bölge oranının düşük olması, bilim insanlarını genomdaki kodlanmayan bölgelerin araştırılmasına ve RNA dizilemelerine yönlendirmiştir. İnsan genom projesinden sonra ilk çalışmalar *Saccharomyces cerevisiae*, *Mus musculus* ve *Arabidopsis thaliana* ile yapılan RNA dizileme çalışmalarıdır (Lister ve diğ., 2008; Mortazav ve diğ., 2008; Nagalakshmi ve diğ., 2008).

DNA replikasyonları sırasında oluşan çeşitli mutasyonlar veya iyonize radyasyon gibi çeşitli mutajenlere maruziyet ile birlikte nükleer genomda çeşitli değişiklikler meydana gelir. Ancak nükleer genom, genel boyutu ve bileşimi yönünden organizmanın yaşamı boyunca nispeten sabittir. Aksine, transkriptom son derece değişkendir (Chambers ve diğ., 2019). Transkriptom, spesifik fizyolojik veya patolojik koşullar altında hücre, doku veya organizma tarafından anlatımı yapılan tüm gen transkript setleri veya RNA türlerini (mRNA, rRNA, tRNA, miRNA, snRNA, snoRNA, lncRNA, piwiRNA) kapsamaktadır (Assis ve diğ., 2014). Transkriptomik araştırmalar, genomun işlevsel çıktılarını ortaya koymak için çeşitli koşullar altında veya hastalık durumunda hücre ve dokuların gen anlatımlarındaki değişiklikleri inceler (Wang ve diğ., 2009; Kan ve diğ., 2017). Türleri ait transkriptlerin (mRNA'ların, kodlanmayan RNA'ların) ortaya çıkarılması ve gruplandırılması, post-translasyonel modifikasyonların anlaşılması, splicing mekanizmalarının aydınlatılması, transkriptlere ait 5' başlangıç ve 3' bitiş bölgeleri ve transkriptlere ait farklı koşullarda ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması transkriptom çalışmalarında anahtar konular arasındadır (Lowe ve diğ., 2017).

Hücrel transkriptomları anlamaya yönelik en erken girişim, toplam hücrel RNA'nın farklı organizmalardan, doku tiplerinden veya hastalık durumlarından ilgilenilen transkriptlerin

mevcudiyeti ve miktarı bakımından incelemelerini içermiştir (Cieşlik ve Chinnaiyan, 2018). RNA'yı analiz etmek için mevcut teknolojidaki gelişmeler son 40 yılda biyolojik bilimlerde keşfe neden olmuştur. 1980'lere kadar Nothern Blot ile nicelenebilen alan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve daha sonra kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) gelişimi ile ivme kazanmıştır. Günümüzde ise RNA transkriptleri bütün doku ve hücrelerden tanımlanabilir ve ölçülebilir hale gelmiştir. Aynı anda milyonlarca DNA parçasının dizilenmesine olanak sağlayan Yeni Nesil Dizileme Teknolojisinin (*Next Generation Sequencing*, NGS) ortaya çıkışından önce transkriptom analizleri Nothern Blot ve PCR'ın yanı sıra Sanger Dizileme, DNA mikroarray, Gen anlatımının seri analizi (SAGE), Etiketlenmiş fonksiyonel gen segmentleri (EST) analizleri yapılarak gerçekleştirilmekteydi. Bu yöntemlerden sadece mikroarray teknolojisi, genom düzeyinde transkriptom profilinin aydınlatılmasına olanak vermektedir. Yeni nesil dizileme teknolojisinin ortaya çıkışı ve geliştirilmesi ile birlikte, hücrenin genom düzeyinde transkriptom profili ve dinamiği nükleotid düzeyinde araştırılmaktadır (Mutz ve diğ., 2013). Mikroarray teknolojisi, işaretlenmiş RNA problemlerinin bir cam yüzey veya çip üzerine dizilmiş hedef dizilerle hibridize olması esasına dayanmaktadır. Prob diziler, tümörlü ve sağlıklı dokudaki mRNA'lardan elde edilmiş DNA dizileridir, bunlar iki farklı boya ile (örneğin, sırasıyla yeşil ve kırmızı) işaretlenmekte ve daha sonra da tek bir reaksiyonda çip üzerine dizilmiş hedef dizilerle komplementerlik esasına göre hibridize edilmektedir. Çip üzerinde belirli bir noktadaki kırmızı/ yeşil sinyal oranı bilgisayar tarafından hesaplanmaktadır (Alberts ve diğ., 2015b). RNA dizileme yönteminde ise genel olarak şöyle bir yol izlenir: RNA örneklerden izole edilir ve cDNA'ya dönüştürülür. Ardından, cDNA kütüphanesi sıralanır. Elde edilen okumalar genomla eşleştirilir ve gen ifadesi nicelenir. RNA dizileme için genellikle yeni nesil sekanslama aletlerinden; Illumina, Pasific BioScience, Oxford Nanopor, Ion Torrent ve Roche 454 kullanılmaktadır. Sentez yoluyla dizileme (*sequencing by synthesis*) teknolojisini kullanan Illumina (Solexa teknolojisi) günümüzde en popüler olan yeni nesil dizileme teknolojisidir. Reaksiyon başına yüksek veri üretim kapasitesi (600 Gb-1 Tb) ve yüksek doğruluk (%99.99) oranı, Illumina'nın en yaygın ve tercih edilen yöntem olarak öne çıkmasında önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.4: DNA Mikroarray ve RNA Dizileme Karşılaştırılması. DNA mikroarrayleri bir yüzeye yapıştırılmış nükleik asit problemlerinden oluşur. Öncelikle RNA örneklerden izole edilir ve floresan etiketleri (1) ile etiketlenmiş olan cDNA'ya dönüştürülür. Daha sonra, etiketli cDNA fragmentleri, array (2) üzerindeki nükleik asitlerle hibritlenir. Mikroarray taraması, her noktada floresans seviyesini ölçerek gen ekspresyon seviyelerini ortaya çıkarır (3). RNA-dizilemede, RNA örneklerden izole edilir ve cDNA'ya dönüştürülür (A). Ardından, cDNA kütüphanesi sıralanır (B). Elde edilen okumalar genomla eşleştirilir ve gen ifadesi nicelenir (C) (www.the-scientist.com adresinden değiştirilerek alınmıştır).

Bu kapsamda Brown ve diğ. (1995) gen anlatım profilini cDNA mikroarrayleri kullanarak göstermişlerdir. Bu çalışmada sadece bilinen genlerin anlatım düzeyleri hakkında veriler elde edilmiştir. 2002 yılında affimetrix teknolojisi ile tüm genomla ait anlatım profili ortaya konulmuş, bu bağlamda yeni genler ve alternatif splicing sonucu ortaya çıkan varyantlar ile ilgili veriler elde edilmiştir. 2008 yılında birçok grup tarafından RNA dizileme ve NGS teknolojisi kullanılarak tüm genom anlatım profili ortaya konulmuştur.

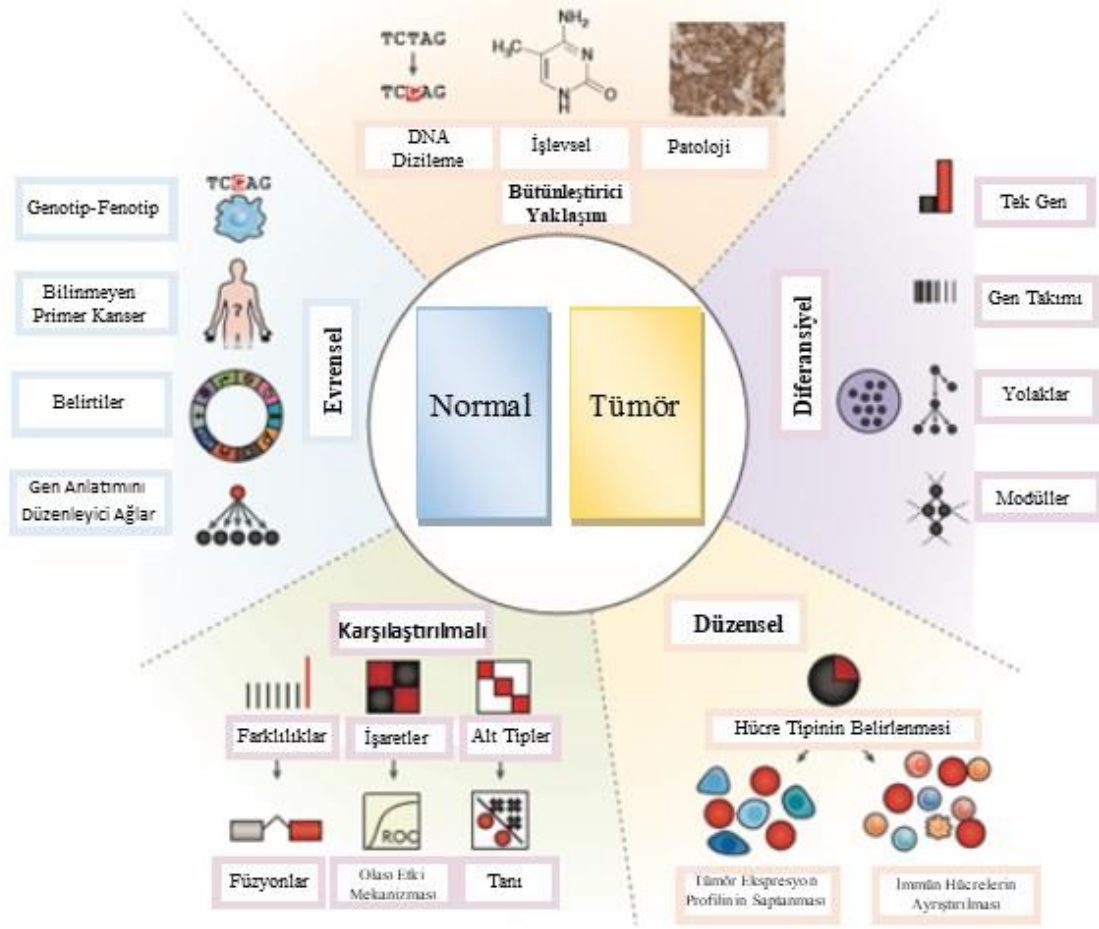
RNA dizilemenin temel amacı bir hücrede hangi genomik lokusun anlatım yaptığının belirlenmesidir ve bu yönüyle cDNA mikroarrayinden üstündür. RNA dizileme cDNA problemlerinin kullanımına dayalı bir yöntem olmadığı için splice izoformlarını, gen füzyonlarını, yeni transkriptleri ve protein-RNA etkileşim bölgelerini saptamada kullanım görmektedir. Bir hücrede bulunan bütün transkriptlerin çeşidinin ve miktarının eş zamanlı olarak incelenmesine

olanak sağlayan RNA dizilemenin en genel uygulama alanı, farklı hücre popölasyonları ve/veya deneysel koşullar arasındaki gen anlatım değışikliklerini (örneğin mRNA düzeyleri) saptamaktır.

RNA dizileme teknolojisinin Mikroarraye göre avantajları şu şekilde sıralanabilir (www.emea.illumina.com/science/technology) :

- Transkript düzeyinde gen ekspresyonunun hassas, doğru ölçümünü sağlar.
- Hem nitel hem de nicel veri üretir.
- Splice bağlantılarını, füzyonları, kodlamayı ve siRNA, miRNA, snoRNA ve tRNA gibi birden fazla kodlanmayan RNA formu yakalar.
- Son derece geniş bir dinamik aralığı kapsar.
- FFPE doku örnekleri gibi bozulmuş RNA ile üstün performans sunar.
- Verideki iplikçiklere özgü bilgileri korur ve izler.
- Keşif uygulamaları için daha güçlü bir yöntem sunar.
- Büyük çalışmalar ve yüksek örnek sayıları için uygundur.
- qPCR ve mikroarraylerle, yalnızca bilinen ve önceden sıralanan genom bölgeleri sorgulanabilir. RNA dizileme ile, hem bilinen hem de bilinmeyen bölgeler dahil tüm transkriptom yakalanır.
- RNA dizileme verilerinin bir başka özelliği mikroarray tarafından tespit edilebilecek olana kıyasla belirli bir hücre tipinde büyük ölçüde daha fazla transkript ekspresyonunun saptanmasına izin veren yüksek hassasiyetleridir. RNA sekans çalışmaları ayrıca çalışılan tüm organizmalarda eksprese edilen transkriptlerin listesinin artmasına katkıda bulunur. Bu yeni tanımlanmış transkriptlerin çoğu kodlama dışıdır.
- Hibridizasyon temelli yöntemlerden farklı olan RNA dizileme; transkript tanımlanmasında mevcut genomik sekanslara bağlı değildir.

Moleküler açıdan bakıldığında kanser, bir dizi genetik değişiklik ve ardından kontrolsüz çoğalmayı indükleyen gen ekspresyon paternlerinin değişimini içeren karmaşık bir hastalıktır (Sharma ve diğ., 2010). Aslında aynı histolojik kökene sahip iki kanser çoğalma, yayılma ve tedaviye vermiş oldukları cevap açısından farklılıklar gösterebilir. Bu farklılıklar her bir kansere ait kendilerine özgü genetik içerik nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Rao ve diğ., 2013). Farklı tiplerdeki tümörler aynı DNA'ya sahip olmalarına rağmen farklı gen anlatım profili sergilerler (Verma, 2012). Çeşitli kanserlere ait genomik karakterizasyonun ve transkriptomik çıktıların anlaşılmasıyla birlikte tanı ve hastalık seyri için biyobelirteçlerin saptanması ve bu sayede her bir hasta için sürdürülebilir ve etkili tedavi yöntemlerinin uygulanmasında aşamalar kaydedilecektir (Mehta ve diğ., 2010). Bu kapsamda NGS ve RNA dizileme mutasyona uğrayan genleri hedefleyen uygun terapi yöntemlerinin belirlenmesinin yanında kemoterapi veya hedefli terapiye karşı geliştirilen direnç mekanizmalarının da saptanmasına katkıda bulunacaktır (Azim ve diğ., 2018.) Bu teknoloji sayesinde tümörlerin tüm genom ve tüm ekson dizileme hedefli genom profilinin (kansere ilişkili bazı anahtar genlerin dizilenmesi) çıkartılması, transkriptom dizileme (kanserli RNA dizileme), karşılaştırmalı tümör-sağlıklı hücre çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler kanser ilişkili varyantların saptanmasına (yapısal yeniden düzenlemeler), kopya sayısı değişimlerini, nokta mutasyonlarının (nükleotid değişimleri, küçük insersiyon ve delesyonlar) ve gen anlatımı değişikliklerinin belirlenmesine katkı sağlamaktadır (Şekil 2.4) (Shyr ve Liu, 2013).



Şekil 2.5: Transkriptomik analizlerin kategorileri. Diferansiyel analizler; tümör ve normal dokular arasındaki gen ve gen seti, yolak veya ağ seviyesindeki farklara odaklanır. En az iki grup eşleştirilmiş veya eşleştirilmemiş örnek gerektirir. Karşılaştırmalı analizler, tek bir örneği veya bir grup örneği karşılaştırır ve klinik olarak yararlı işaretler veya alt tipler gibi transkripsiyonel ayraçları belirlemeye çalışır. Düzensel analizler, tümör hücresi saflığını değerlendirmek (veya kontrol etmek), örnekleri tümör oluşturmaya ve tümör dışı hücre tiplerine göre ayırmak ve immün hücre varlığını karakterize etmek için farklı hücre tiplerinin gen ekspresyon işaretlerini kullanır. Evrensel analizler, bir örneği geniş bir referans grubu ile karşılaştırılarak, kanser belirtilerinin, primer doku tipinin veya genotip-fenotip ilişkilerinin saptanması gibi çeşitli transkriptomik özelliklerin belirlenmesinde kullanılır. Bütünleştirici analizler; transkriptomik verileri, DNA dizileme, işlevsel genomik (örn, DNA CpG metilasyonu) ve klinik verilerle (örn, patoloji) birleştirme eğilimindedir (Cieslik ve Chinnaiyan, 2018'den değiştirilerek alınmıştır).

Smallridge ve diğ. (2014) yine bu teknolojiyi kullanarak BRAF genine sahip ve bu gen açısından kusurlu (V600E mutasyonu) PTC'lerde farklı anlatıma sahip olan genleri analiz etmişlerdir. Huang ve diğ. (2019) yaptıkları çalışmada Bisphenol (BPA) S maruziyetinin meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 üzerindeki epigenetik ve transkriptom ile ilgili değişikliklerini ortaya koymuşlardır. RNA-dizileme yöntemi kullanarak kontrol (BPAS uygulanmamış) ve

deney gruplarında gen ekspresyon değişiklerini ve bu değişikliklerin kanser gelişimindeki rollerini aydınlatmışlardır. BPAS maruziyeti sonucunda hücre dışı matriks ve meme kanseri gelişimine katkıda bulunan PI3K-Akt sinyal yolağında fonksiyonel olan gen ekspresyonlarının arttığını rapor etmişlerdir. Lin ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada *Lithospermum eritrorhizon* bitkisinin kurutulmuş kökünden izole edilmiş bir naftokinon olan şikonini farklı tipteki meme kanseri hücre hatları (MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231) ve insan meme epitel hücre hattına (M10) uygulamışlardır. Anti-tümöral etkiye sahip olduğu bilinen şikoninin etki mekanizmasını aydınlatmak amacıyla RNA dizileme yöntemi kullanarak maruziyet sonrası değişen gen ekspresyon profilini ortaya koymuşlardır. Bu bağlamda, farklı tipteki meme kanseri hücrelerinde anlamlı şekilde ekspresyonu değişen 38 ortak gen olduğunu ve bu genlerin esas olarak hücre ölümü, apoptoz, hücre döngüsü ve hücre büyümesinin kontrolünü düzenleyen MAPK sinyal yolu, p53 sinyal yolu, Hipoksi uyarılabilir faktör 1 (HIF-1) sinyal yolu, endositozla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçlar, MAPK yolağında treonin ve tirozin bakiyelerinin defosforilasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan ve JNK, p38'i inhibe eden çift spesifik fosfataz (DUSP)1 ve DUSP2 ekspresyonlarının arttına böylelikle şikonin uygulamasının meme kanserinde hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza yol açtına işaret etmektedir. Ek olarak, şikonin maruziyetinin insan meme epitel hücresi olan M10'da DUSP1 ve DUSP2 ekspresyonu üzerinde hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Çalışmada, DUSP1 ve DUSP2'nin çeşitli kanser türlerinde az eksprese edildiği belirtilerek şikonin maruziyeti sonrası artan DUSP1 ve DUSP2 ekspresyon sonucu vurgulanıp şikonini kanser tedavisi için bir teröpatik strateji olabileceği fikri ileri sürülmüştür. Mikroarray yöntemi kullanılarak yapılan bir diğer çalışmanın amacı ise, mitoxantrone (MTX) dirençli prostat kanserinde (PCa) değişen gen ekspresyon seviyelerinin tanımlanması, MTX direncinin altında yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılması ve bu direnci aşabilecek hedefli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktır. Analizlerde sıklıkla hücre ölümü, hücre büyümesi ve çoğalması dahil olmak üzere kanser gelişimi ile ilgili birçok fonksiyonu olan genlerde değişim bulunmuştur, böylelikle kastrasyon dirençli prostat kanserinde (CRPC) MTX direncini etkileyebilecek çeşitli genetik ağlar ve biyolojik yollar ile ilişkiler gösterilmiştir. Bu sonuçların PCa'da mevcut araştırma eğilimine yeni bir bakış açısı kazandırmak ya da MTX kemoterapi direncinin üstesinden gelmek için hedefli tedaviler geliştirmek açısından önemli olabileceğine dikkat çekilmiştir (Li ve diğ., 2019).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MAL MARUZİYETİ

3.1.1. Hücre Kültürü

Hücre kültüründe kullanılan 8505C anaplastik tiroid kanser hücre soyu European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)’den temin edilmiştir. Bu hücreler %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve antibiyotik (100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin) içeren Minimum Essential Medium (MEM)’de, 1 atmosfer basınçta, 37°C ve %5 CO₂’li etüvde kültüre edilmiştir. Çoğalan hücreler flasksı kapladığında flasktaki medyum dökülerek hücreler kalsiyum-magnezyum içermeyen steril fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmıştır. Ardından hücreler Triple (Gibco) ile kaldırıldı. Bir falkon tüpe alınan hücre süspansiyonu 1500 rpm’de 5 dk santrifüjlenerek toplandı ve yeni flasklara pasajı yapıldı veya Thoma hemasitometrede sayılarak istenilen sayıda hücre kültür plakalarına ekildi. Hücrelerin bir kısmı ise uzun süreli depo edilmeleri amacıyla donduruldu. Bu işlem için %90 oranında soğuk FBS ile %10 oranında kriyoprotektan ajan olarak kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) içeren dondurma medyumunu kullanıldı. Hücre peleti, dondurma medyumunda 1,5-2 milyon hücre/ml yoğunlukta olacak şekilde süspanse edilerek kriyotüplere aktarıldı. Kriyotüpler bir gece -86°C’de bekletilerek ertesi gün uzun süreli bekletilmek üzere -152°C’ye aktarıldı. Kademeli olarak dondurulan hücreler açılmak istendiğinde hızla 37°C’ye getirildi ve dondurma medyumundaki hücre süspansiyonu, içinde 5 ml medyum bulunan santrifüj tüpüne aktarıldı. 1500 rpm’de 5 dk santrifüj işleminin ardından oluşan hücre peleti DMSO’yu iyi bir şekilde uzaklaştırmak için 5 ml medyum içinde tekrar yıkandı. İkinci hücre peleti az miktarda medyumda süspanse edilerek 75 cm² ya da 25 cm² flasklara aktarıldı. Hücre canlılığı, her hücre sayımında PBS’te hazırlanan %4’lük tripan mavisi ile kontrol edildi.

3.1.2. Lektin Hazırlanması

Liyofilize olarak Vector Lab. firmasından temin edilen MAL, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit (HEPES) tamponu kullanılarak 2mg/ml konsantrasyonda ana stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden hücre kültür medyumunu kullanılarak 0,25 ve 0,5µM konsantrasyonda hazırlanan farklı lektin dozları 8505C anaplastik tiroid kanser hücrelerine uygulanmıştır.

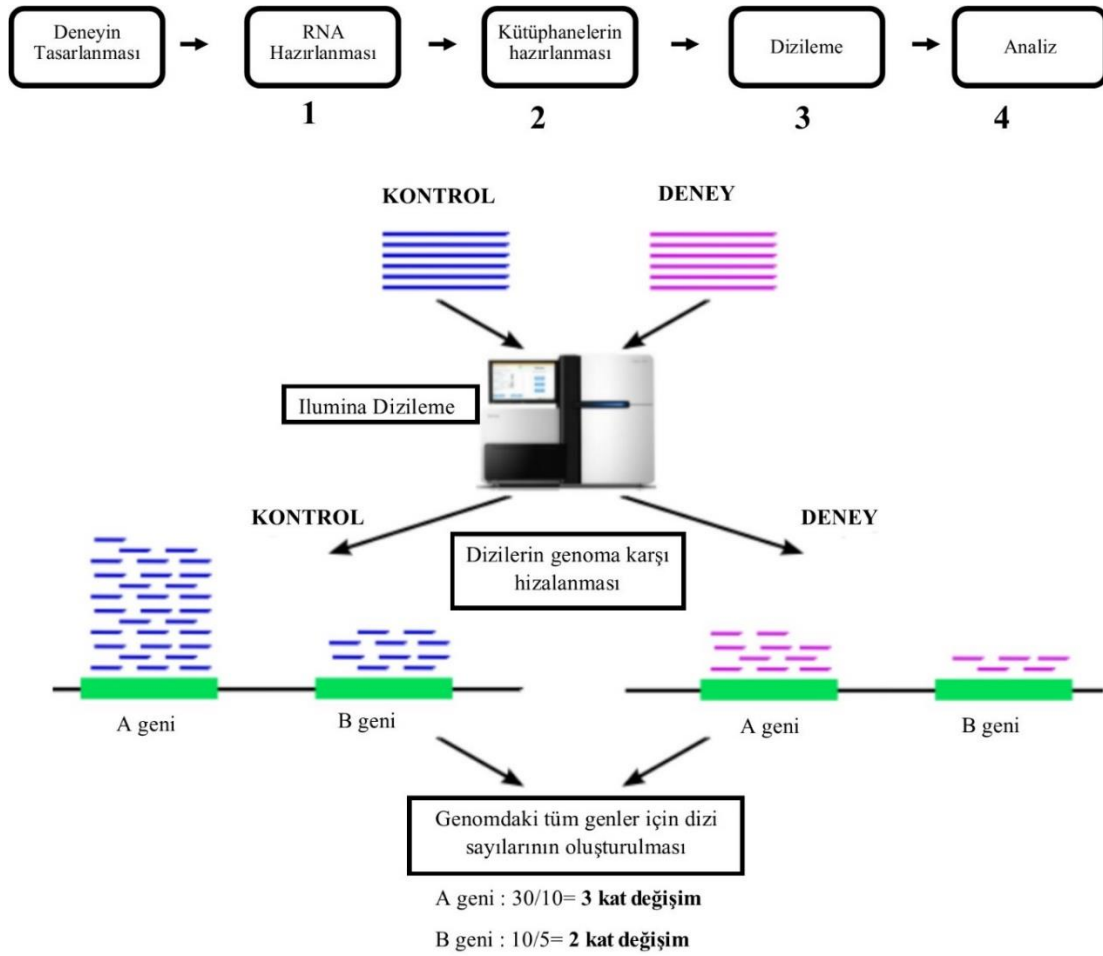
3.1.3. Hücre Canlılık Testi

MAL'ye 24 ve 48 saat boyunca maruz kalan hücreler 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, tiyazolil mavi tetrazolyum bromid) yöntemi kullanılarak MAL maruziyetinin hücre canlılığına etkisi araştırılmıştır. Tetrazolyum tuzu olan MTT canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenazların aktivitesi ile mor renkli formazan kristallerine indirgenmektedir. Oluşan mor rengin yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. MTT yöntemi 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla flaskta çoğaltılan hücreler Triple ile kaldırıldıktan sonra, santrifüj ile toplanmış ve hücre peleti, 100µl'de 5000 hücre olacak şekilde medyumda süspanse edildi ve her bir kuyuya 5000 hücre ekildi. Ertesi gün kuyucuklardaki medyum alındı ve kontrol grubuna taze medyum, deney grubuna ise 0,25 ve 0,5 µM MAL içeren medyum konuldu. Hayvansal bir kan ürünü olan FBS içerisinde, glikoproteinlerin varlığından dolayı uygulanan lektini bağlayarak aktivitesini düşüreceği göz önünde bulundurularak lektin uygulamalarında FBS içermeyen medyum kullanıldı. 24 ve 48 saat sonrasında plakadaki her kuyucuğa 30 µl MTT solüsyonu eklendi. MTT solüsyonu, 5 mg/ml yoğunlukta olacak şekilde PBS (pH 7.4) içinde hazırlanmış ve membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. MTT içeren medyumda hücreler 37°C'de CO₂'li etüvde 4 saat karanlıkta inkübe edildi. Ardından MTT'li medyum kuyulardan çekildi. MTT'nin indirgenmesi sonucu oluşan formazan kristallerinin her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmesi ile çözünmesi sağlandı. Plaka 5 dakika 150 rpm'de orbital çalkalayıcıda çalkalandı. Optik yoğunluk 570 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boylarında ölçüldü. Bu testte, kontrol ve deney grubu için 3 kuyucuk çalışıldı ve her deney 3 kez tekrar edildi. Kontrol grubundan elde edilen ortalama absorbans değerleri %100 hücre canlılığı olarak kabul edilmiş ve lektinin uygulandığı kuyucuklardan elde edilen değer kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir.

3.2. YENİ NESİL DİZİLEME VE BİYOİNFORMATİK ANALİZ

Daha ileri analiz için izole edilen total RNA'nın 1µl'si "Agilent 2100 Bioanalyzer System" cihazında sisteme uygun kit ile hazırlanarak analiz edilmiştir ve RNA'ların RNA Integrity Number (RIN) değerleri belirlenerek sekanslama için uygun olup olmadıkları kontrol edilmiştir (Bu işlem Eurofins Genomics, Almanya, tarafından gerçekleştirilmiştir). Yapılan kalite kontrol analizleri sonucunda, RIN değeri 7 ve üzeri olan ve absorbans değeri (260/280) yaklaşık 2 olan örneklerimiz çalışmaya uygun olarak belirlenmiştir. Kütüphanelerin hazırlanması amacıyla

total RNA örneklerinden cDNA'ya çevrim gerçekleştirilmiştir. Kite uygulanacak protokoller doğrultusunda sekans platformlarında okuma koşullarına uygun cDNA dizileri elde edilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri Illumina HiSeq sisteminde dizilenmek üzere Eurofins Genomics firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Referans genom olarak *Homo sapiens*'e özgü GRCh37/hg19 kullanılmıştır. Ham RNA dizi verileri öncelikle referans genom kullanılarak haritalanmıştır. Bütün örneklerdeki haritalanmış milyon okuma başına kilobazdaki fragment (FPKM) birimi kullanılarak gen ekspresyonundaki farklılıklar belirlenmiştir. İşlemin adımlarını gösteren şekil aşağıdaki gibidir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: RNA Dizileme teknolojisine genel bakış. Illumina HiSeq cihazı kullanılarak yapılan RNA dizileme analiz basamakları özetlenmiştir. Bu basamaklar; 1. RNA izolasyonu ve saflaştırma, 2. RNA'nın cDNA'ya çevrimi ve dizileme adaptörlerinin eklenmesi, 3. Bir dizileme platformu kullanılarak cDNAların dizilenmesi, 4. Elde edilen kısa okuma dizilerinin analizidir (www.biocluster.ucr.edu adresinden değiştirilerek alınmıştır).

RNA dizileme çalışmalarından elde edilen anlamlılık derecesine göre ilk elli genin bulunduğu gen listesi, gen ontoloji analizi için *web* tabanlı ShinyGO (v.0.60) yazılımı kullanılarak biyolojik işlevlerine göre sınıflandırılmıştır. Sinyal yollarının analizi için ise Panther (14.1) kullanılmıştır.

3.2.1. RNA İzolasyonu

MAL'ye maruz bırakılan 8505C anaplastik kanser hücrelerinin tüm gen ürünlerini elde etmek üzere öncelikle total RNA izolasyonu yapıldı. Bu işlem Ambion PureLink RNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Bu tür izolasyon kitleri, yüksek verimlilikte bir analiz yöntemi kullanılacaksa (örn. dizileme) yüksek saflıkta ve kalitede RNA eldesi için elzemdir. 8505C hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültür plakalarına her kuyucukta 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün kuyucuklardaki medyum alındı ve kontrol grubuna taze medyum, deney grubuna ise 0,25 μ M MAL içeren medyum eklendi. MAL lektine 24 saat maruziyet sonrasında medyumlar atılıp kuyucuklar soğuk PBS ile yıkandıktan sonra Trizol Reagent (Sigma) uygulandı ve pipetajlanarak homojenizasyon yapıldı. Hücresel içerik steril ve nükleaz içermeyen ependorf tüplere alındı. Oda ısısında 5 dakika beklendikten sonra, ependorf tüplere 200 μ l kloroform eklendi ve tüpler 15 saniye el yardımıyla çalkalandı. Oda sıcaklığında 3 dakika beklendikten sonra, tüpler 12000g'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan 3 fazdan RNA içeren şeffaf faz toplanarak temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. Bu tüpün içine eşit hacimde %70 etanol eklendi. Böylece son etanol hacminin %35 olması sağlandı. Ardından vorteksleme işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra Trizol Plus RNA Purification Kit kullanılarak RNA saflaştırıldı. Maksimum 700 μ l hacmi olan örnek toplama tüpü taşıyan filtreli tüpe %70 etanol eklenmiş solüsyon transfer edildi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 15 saniye 12000g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünden süzüntü döküldü ve tekrar filtreli tüpe takıldı. Bu işlem her bir kuyu için 2 kez gerçekleştirildi. Ardından 700 μ l kit içeriğinde bulunan 1 nolu yıkama tamponu filtreli tüpe eklendi ve oda sıcaklığında 15 saniye 12000 g'de santrifüj edildi. Sonrasında toplama tüpü ve süzüntü atıldı ve yeni bir toplama tüpü takılarak devam edildi. 500 μ l etanol içeren 2 no'lu yıkama tamponu filtreli tüpe eklendi ve oda sıcaklığında 15 saniye 12000g'de santrifüj edildi. Süzüntü döküldü ve tekrar filtreli tüpe takıldı. Bu aşama iki kez yapıldı. Membrana bağlı RNA ile birlikte filtrenin kuruması için filtreli tüp ve toplama tüpü oda sıcaklığında 1 dakika 12000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve yerine RNA toplama tüpü takıldı. 30 μ l nükleaz içermeyen su (Ambion) filtrenin tam ortasına konuldu ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe

edildi. Sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika 12000 g'de santrifüj edilerek saf RNA elde edildi. Ependorf tüplere 3'er µl DNaz tamponu ile DNaz I eklendi ve tüpler 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler buza oturtuldu ve son konsantrasyon 5 mM olacak şekilde stok 0,2 M etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) 1'er µl tüplere eklendi. Tüpler 70°C'de 7 dakika inkübe edilerek DNAaz'ın inhibisyonu sağlandı.

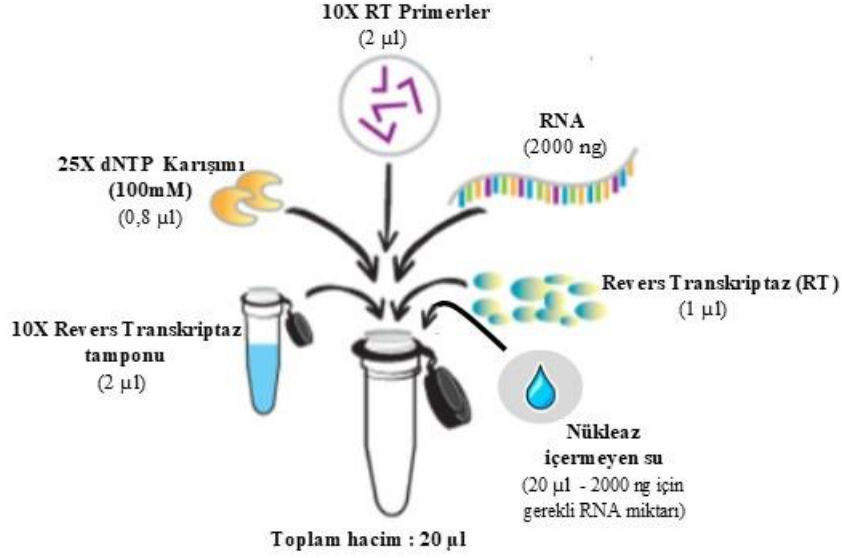
3.2.2. RNA'nın Saflık, Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi

Uygun tampon solüsyonu ile kolondan izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık tayinleri Nanodrop (ThermoFisher, USA) cihazı ile spektrofotometrik olarak, UV bölgesinde 280, 260 ve 230 nm dalga boylarındaki absorpsiyonların okunmasıyla belirlenmiştir. RNA kalitesi ise %2'lik agaroz jellerde izole edilen RNA'nın ayrıştırılmasıyla incelenmiştir. Bu amaçla 1 gr agaroz tartılarak 50 ml 1X Tris asetat EDTA (TAE) tamponu ile erlen içerisinde karıştırıldı ve mikrodalgada kaynatma işlemi gerçekleştirildi. Agaroz iyice çözündükten sonra musluk altında yaklaşık 60°C'ye kadar soğutma işlemi uygulanıp erlen içerisine Etidyum bromür (EtBr) eklendi. EtBr'nin çözeltiye homojen şekilde dağılması için erlen çalkalandı. Çözelti jel kasetine yavaşça döküldü, tarak yerleştirildi ve polimerize olması için en az 15 dakika beklendi. Polimerizasyon sonrası jelin üzeri kapanana kadar TAE tamponu ile tank dolduruldu. Tarak çıkarıldı ve kuyulara her örnekten 1 µl ve 6X yükleme boyasından 5 µl olacak şekilde yükleme yapıldı. 100 V'da 20 dakika yürütüldü. Elektroforez sonrasında sistemden çıkarılan agaroz jel UV translüminatör kullanılarak görüntülendi.

3.3. SONUÇLARIN VALİDASYONU

3.3.1. cDNA Sentezi

Hücrelerden izole edilen total RNA'nın revers transkriptaz (RT) enzimi kullanılarak cDNA'ya dönüşümü, High-Capacity cDNA Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için 2000 ng RNA cDNA'ya çevrilmek üzere işleme alınmıştır. İşlem sonrasında elde edilen cDNA karışımı istenen mRNA transkriptinin amplifikasyonu için PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. cDNA eldesi için gerçekleştirilen basamaklar aşağıdaki şekilde (Şekil 3.2) ve tabloda (Tablo 3.1) özetlenmiştir.



Şekil 3.2: cDNA eldesi için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Tablo 3.1: RNA'dan cDNA'ya çevrim prosedürünün basamakları.

	1.Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞

3.3.2. Gerçek Zamanlı PCR

8505C hücrelerine MAL uygulanması sonrasında yapılan transkriptom analizi ile elde edilen sonuçların doğruluğunu test etmek için lösin bakımından zengin tekrar içeren G protein bağlı reseptör 5 (LGR5) ve prostoglandin F reseptörü (PTGFR, FP Reseptörü), Glipikan 5 (GPC5) mRNA transkriptlerinin miktarı kat değişimi olarak qPCR yöntemiyle saptanmıştır. Bu işlem için kullanılan GeneMark SYBR kit protokolü doğrultusunda işleme 200ng cDNA kalıp molekülüyle başlanmıştır. Sonrasında 12,5 µl SYBR qPCR Mix ve aşağıdaki tabloda (Tablo 3.2) dizileri verilmiş olan forward ve reverse primerler reaksiyon karışımına eklenmiştir. İşlem Applied Biosytem qPCR cihazında, bu cihaza uygun 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Yalnızca GAPDH primerleri Amerikan Biyoteknoloji Bilgisi Ulusal Merkezi (NCBI)’nin nükleotid bilgi bankasından alınan mRNA verileri kullanılarak tasarlanmıştır. Primer3 (version 0.4.0) web tabanlı yazılım tasarım için kullanılmıştır. Bu yazılımdan elde edilen uygun kriterlere sahip primerlerin “Basic Local Alignment Search Tool” aracılığı ile çalışacağımız örnekler uygunluğu test edilmiştir. Reaksiyon karışımının hazırlanışı ve qPCR reaksiyon basamakları aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (Tablo 3.3/Tablo 3.4).

Tablo 3.2: Gen ekspresyon analizleri için yapılan qPCR yönteminde kullanılan genlerin baz dizisi ve referansları.

Gen	Baz dizisi (5'-3')	Kaynak
GPC5	Forward TCCGGTCGTTGGAAGAACTCTCG Reverse TCAGTCGCCACTGCACATCCAGC	(Kokenyesi ve diğ., 2001)
LGR5	Forward CTTCCAACCTCAGCGTCTTC Reverse TTTCCCGCAAGACGTAAGTC	(Michelotti ve diğ., 2015)
PTGFR	Forward CTCCGTCTTCTGCTCCTCAGAGA Reverse GGAATTGTTTCATGGACATTGTTGTG	(Akiyama ve diğ., 2013)
GAPDH	Forward GATGACATCAAGAAGGTGGTGA Reverse TTCGTTGTCATACCAGGAAATG	NCBI verileri kullanılarak Prime3 (v.0.4.0)’de tasarlandı.

Tablo 3.3: qPCR için gerekli reaksiyon içeriğinin hazırlanışı.

PCR Reaksiyon Karışımı İçeriği	Miktarlar (µl)
Nükleaz içermeyen su	9,7
cDNA (200 ng)	2
GM SYBR Mix	12,5
Forward primer (10 µM)	0,2
Reverse primer (10 µM)	0,2
Toplam reaksiyon hacmi	25

Tablo 3.4: qPCR basamakları.

qPCR aşamaları	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	5 dk	-
Denatürasyon	95°C	15 sn	40
Bağlanma	60°C	30 sn	
Uzama	72°C	30 sn	

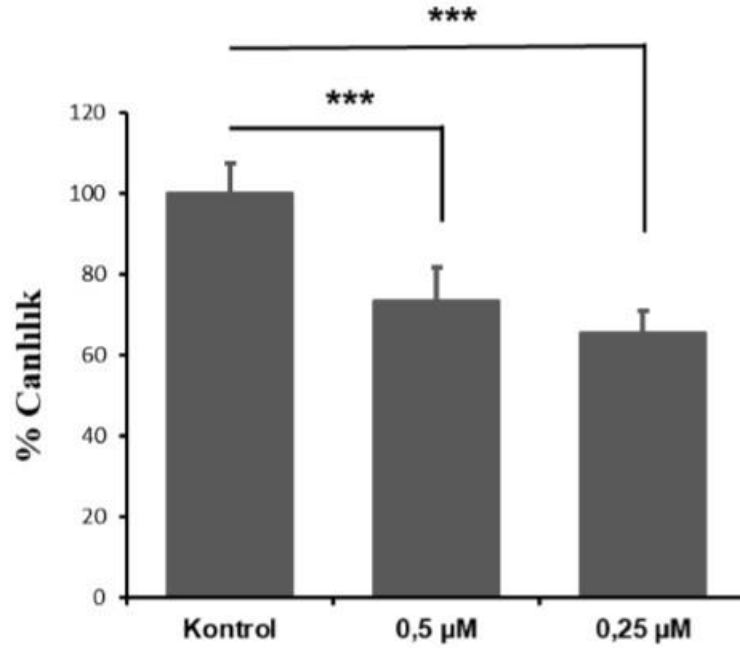
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Hücre canlılık verilerinin istatistiksel olarak analizi için farklı MAL dozlarına maruz bırakılmış grupların ortak varyansı one-way ANOVA yöntemiyle hesaplanmıştır. Ortak varyansları hesaplanan grupların karşılaştırılması için post hoc testi olarak ise Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. qPCR verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi için ise T-testi kullanılmıştır. İstatistiksel hesaplamalar GraphPAD Prism (v.5.0.1) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

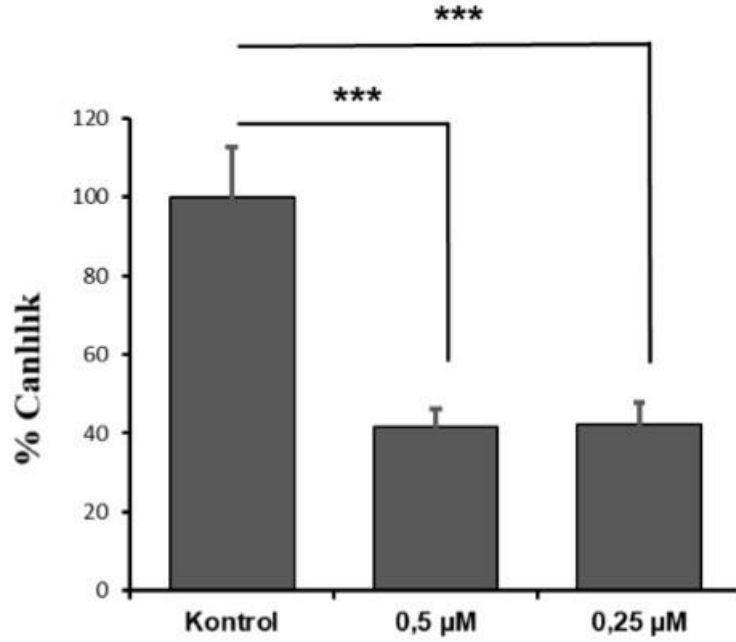
4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI

Anaplastik tiroid kanser soyu olan 8505C hücrelerine 24 saat süre, 0,25 ve 0,5 μ M dozlarda MAL uygulanması hücre canlılığını belirgin bir biçimde azaltmıştır. 0,25 μ M MAL uygulaması 24 saat sonunda hücre canlılığında yaklaşık olarak %35’lik bir azalmaya sebebiyet vermiştir ($p \leq 0,001$). 0,5 μ M MAL uygulaması ise aynı süre zarfında hücre canlılığında yaklaşık olarak %30’luk bir azalmayla sonuçlanmıştır ($p \leq 0,001$). Aşağıdaki grafikte 24 saat boyunca iki farklı dozda MAL uygulamasıyla elde edilen veriler gösterilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: MAL’nin 8505C hücrelerine 0,25 ve 0,5 μ M konsantrasyonda 24 saat süreyle uygulanması sonucu elde edilen MTT hücre canlılık bulgularını gösteren grafik. Yüzde canlılık ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir, Kontrol: $100 \pm 7,53$; 0,5 μ M MAL: $73,57 \pm 7,96$; 0,25 μ M MAL: $65,63 \pm 5,22$
***Kontrole göre önemli derecede anlamlı ($p \leq 0,001$).

Anaplastik tiroid kanser soyu olan 8505C hücrelerine 48 saat süre, 0,25 ve 0,5 μ M dozlarda MAL uygulanması hücre canlılığını belirgin bir biçimde azaltmıştır. 0,25 μ M MAL uygulaması 24 saat sonunda hücre canlılığında yaklaşık olarak %60'lık bir azalmaya sebebiyet vermiştir ($p \leq 0,001$). 0,5 μ M MAL uygulaması da aynı süre zarfında hücre canlılığında yaklaşık olarak %60'lık bir azalmayla sonuçlanmıştır ($p \leq 0,001$). Aşağıdaki grafikte 48 saat boyunca iki farklı dozda MAL uygulamasıyla elde edilen veriler gösterilmiştir (Şekil 4.2).



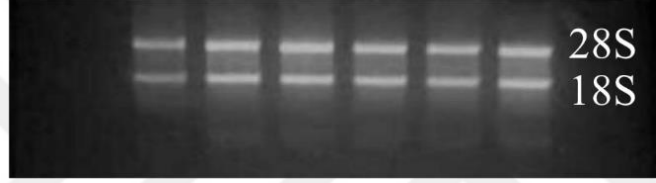
Şekil 4.2: MAL'nin 8505C hücrelerine 0,25 ve 0,5 μ M konsantrasyonda 48 saat süreyle uygulanması sonucu elde edilen MTT hücre canlılık bulgularını gösteren grafik. Yüzde canlılık ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir, Kontrol: $100 \pm 12,52$; 0,5 μ M MAL: $41,75 \pm 4,3$; 0,25 μ M MAL: $42,26 \pm 5,4$. ***Kontrole göre önemli derecede anlamlı ($p \leq 0,001$).

4.2. RNA SAFLIK, MİKTAR VE KALİTE BULGULARI

24 saat süreyle 0,25 μ M MAL uygulanan örneklerden, Ambion PureLink RNA izolasyon kiti ile yapılan izolasyon sonrasında Nanodrop'dan elde edilen veriler, RNA miktar ve saflığı hakkında bilgiler sunmuştur (Tablo 4.1). Hücrelerden elde edilen total RNA izolatlarının kalitesini saptamak amacıyla yapılan agaroz jel elektroforezi verileri, analizlerde kullanılabilecek ölçüde bütünlüğe sahip RNA'lar elde ettiğimizi göstermiştir (Şekil 4.3).

Tablo 4.1: RNA miktar ve saflık değerleri. K1-3: MAL uygulanmamış kontrol grubu, D1-3: MAL uygulanmış deney grubunu temsil etmektedir.

	RNA miktarı (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
K1	168,5	4,213	2,047	2,06	0,92
K2	198,0	4,950	2,414	2,05	1,36
K3	240,9	6,022	3,004	2,00	0,70
D1	177,9	4,448	2,162	2,06	1,21
D2	199,5	4,987	2,420	2,06	1,48
D3	215,4	5,384	2,619	2,06	1,51



Şekil 4.3: 8505C hücrelerinden izole edilen total RNA'ların %2'lik agaroz jelde ayrıştırılması ile elde edilen RNA'nın kalitesini gösteren jel görüntüsü.

4.3. RNA DİZİLEME BULGULARI

4.3.1. RNA Dizileme Analizinin Anlamlılık ve Kalite Kontrol Parametreleri

Ham dizi verilerinin toplam miktarı ve kalite filtresinin sonuçları aşağıdaki tabloda raporlanmıştır. Bu tablo, örneklerin her biri için referans genom/transkriptom ile eşlenen okumaların sayısını içermektedir. Referansın doğruluğu (genom/transkriptom) ve daha iyi haritalanmış okuma kalitesi referansa eşlenen daha yüksek okuma oranlarına yol açar. Elde edilen RNA izolatlarının RNA dizileme sonuçları %99,4 oranında temiz okumalarla sonuçlanmıştır (Tablo 4.2). Bu okumalar yaklaşık %99 oranında haritalanmıştır (Tablo 4.3). Aşağıdaki saçılma grafiği, RNA-dizileme deneyindeki koşullar arasındaki genel benzerlikleri ve spesifik ayrıları vurgulamaktadır. Bu grafik, RNA-dizileme verilerinin genel kalitesini kontrol etmek için kullanılmıştır (Şekil 4.4) Aşağıdaki volkan grafiği, kat değişimi temelinde test edilen şartlar ile şartlar arasında RNA-dizileme verileri üzerinde yapılan test istatistikleri

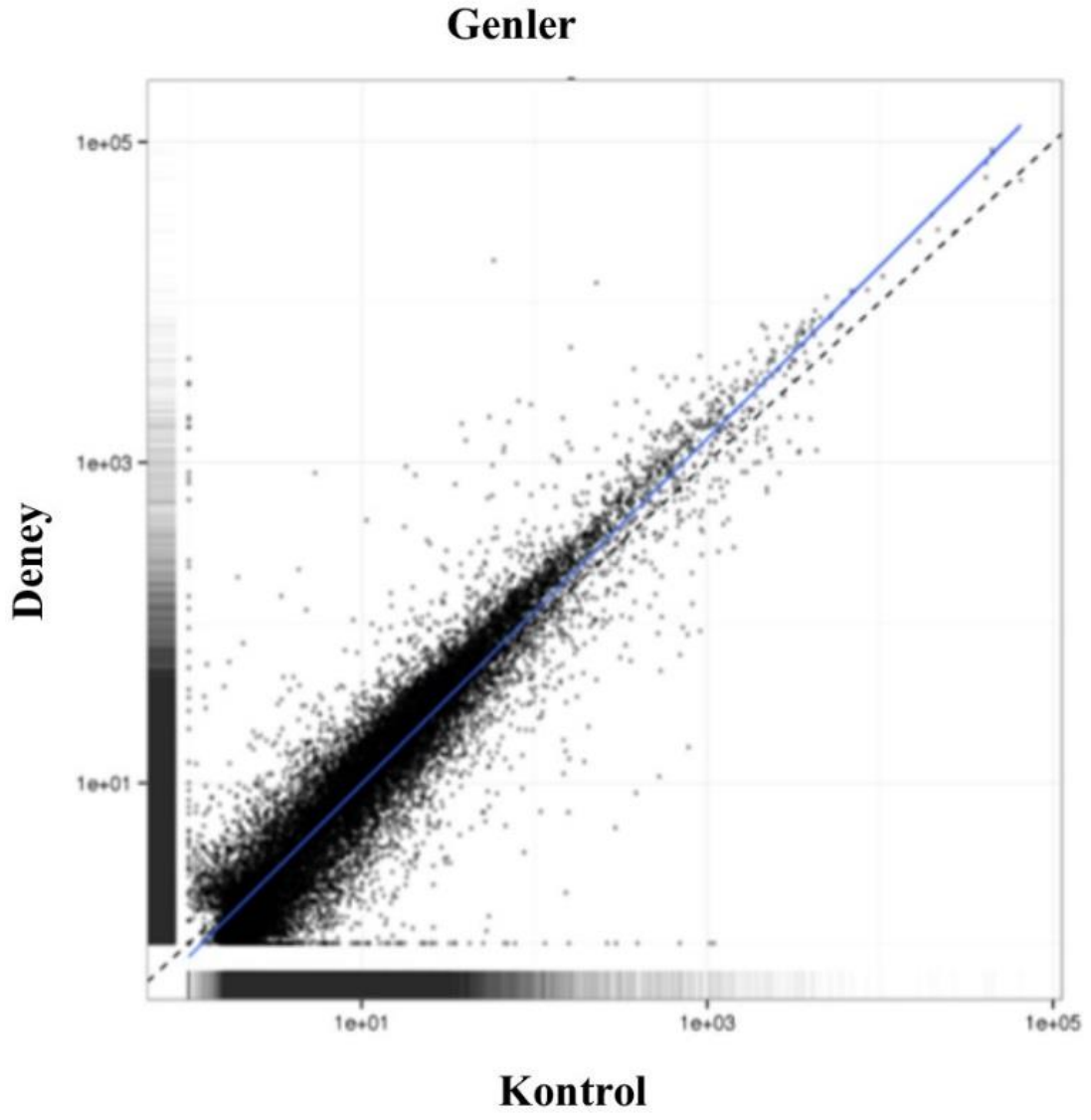
arasında anlamlı bir fark olduğunu vurgulamaktadır. Bu grafik, gen ekspresyonu seviyesindeki koşullar arasındaki ilişkiyi göstermek için kullanılmıştır (Şekil 4.5).

Tablo 4.2: Örneklerin kalite kontrol istatistikleri. K1-3: MAL uygulanmamış kontrol grubu, D1-3: MAL uygulanmış deney grubunu temsil etmektedir.

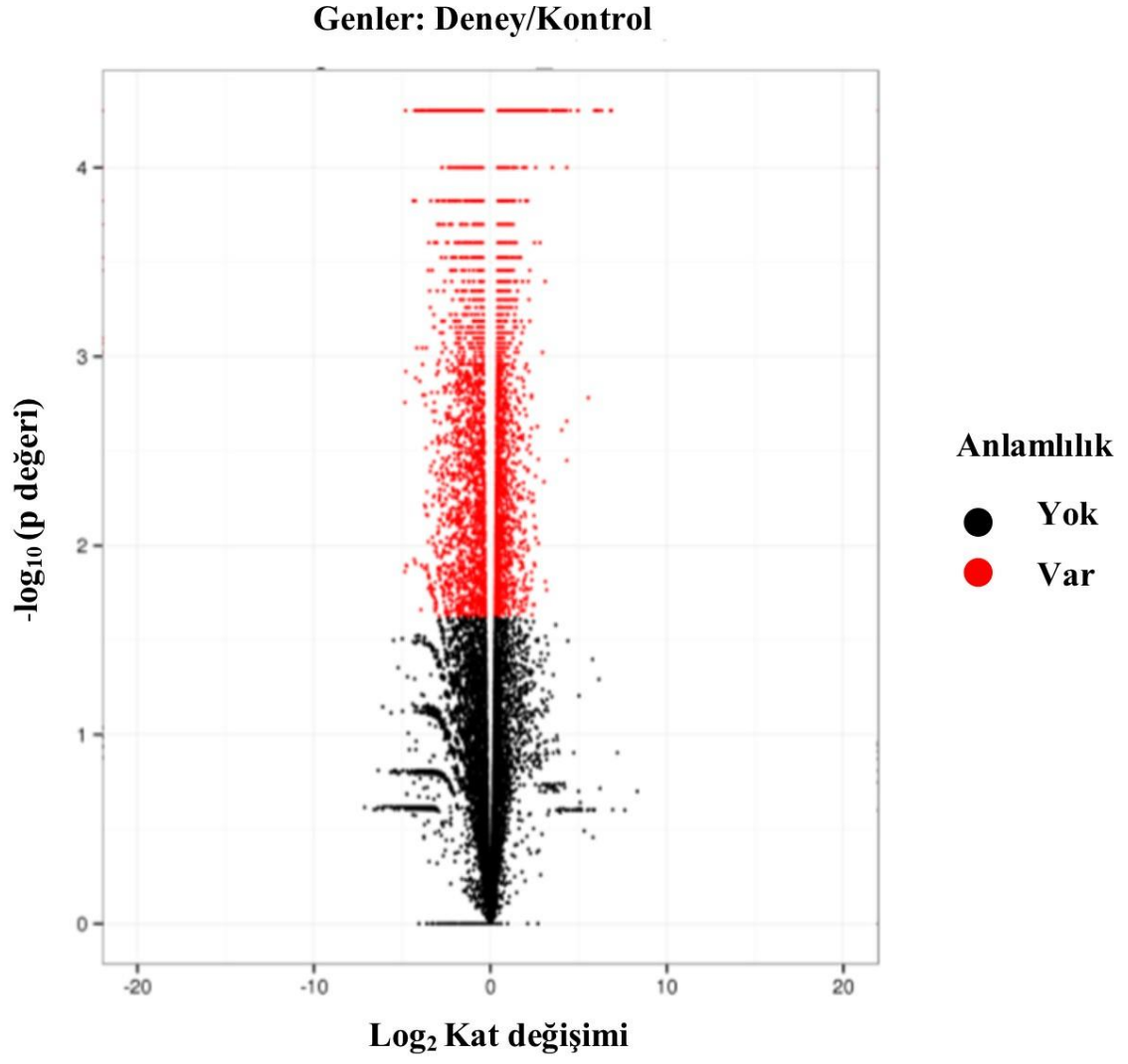
	Toplam Okuma Sayısı	Atılan Okuma Sayısı	Temiz Okuma Sayısı
D1	41,593,309	245,165 (%0,6)	41,348,144 (%99,4)
D2	39,547,544	239,935 (%0,6)	39,307,609 (%99,4)
D3	40,438,717	231,908 (%0,6)	40,206,809 (%99,4)
K1	35,391,884	205,680 (%0,6)	35,186,204 (%99,4)
K2	42,250,273	260,682 (%0,6)	41,989,591 (%99,4)
K3	34,538,090	199,148 (%0,6)	34,338,942 (%99,4)

Tablo 4.3: Örneklerin haritalanmış okuma istatistikleri. KK*: Kalite kontrol, K1-3: MAL uygulanmamış kontrol grubu, D1-3: MAL uygulanmış deney grubunu temsil etmektedir.

	KK* Geçen Okuma Sayısı	Haritalanmış Okumalar	% Haritalama
D1	41,348,144	40,648,516	98,3
D2	39,307,609	38,696,670	98,4
D3	40,206,809	39,610,366	98,5
K1	35,186,204	34,721,204	98,7
K2	41,989,591	41,438,625	98,7
K3	34,338,942	33,850,875	98,6



Şekil 4.4: Kontrol ve MAL uygulanmış gruba yönelik dağılım grafiği.



şekil 4.5: Kontrol ve MAL uygulanmış gruba yönelik volkan grafiği.

4.3.2. RNA Transkript Miktarındaki Değişiklikler

MAL uygulanmış 8505C hücrelerinde MAL uygulanmamış hücrelere göre yaklaşık olarak 19,000 genin transkript miktarında farklılıkların meydana geldiği saptanmıştır. İstatistiksel açıdan en çok anlamlılık gösteren ilk 50 genin listesi tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4: En fazla anlamlılık gösteren ilk 50 genin listesi. FPKM* haritalanmış milyon okuma başına kilobazdaki fragment birimini, SS-** referans genomda saptanamayan genleri temsil etmektedir.

GEN ADI	KONTROL (FPKM)*	DENEY (FPKM)*	GEN ADI	KONTROL (FPKM)*	DENEY (FPKM)*
<i>FAM73A</i>	3,477	6,895	<i>S-**</i>	16,803	23,941
<i>PTGFR</i>	4,292	1,191	<i>S-**</i>	10,391	14,513
<i>RP4-773A18.4</i>	3,550	6,313	<i>CHFR</i>	3,573	5,477
<i>RP11-312J18.5</i>	1,263	3,929	<i>PABPC3</i>	5,681	6,891
<i>RP5-857K21.4</i>	65,083	57,754	<i>GPC5</i>	0	4,449
<i>PTGES3P1</i>	2,388	4,985	<i>RP11-66N24.4</i>	44,768	85,062
<i>ALI36376.1</i>	5,930	7,169	<i>C14orf37</i>	6,113	10,013
<i>S100A6</i>	2,986	3,987	<i>DYNLL1P1</i>	2,245	4,105
<i>RP11-435P24.2</i>	2,999	3,923	<i>RPL3P4</i>	3,589	6,452
<i>VIM</i>	1,507	2,901	<i>SLC28A1</i>	2,685	5,967
<i>ANXA2P3</i>	3,359	6,500	<i>AGBL1</i>	161	5,220
<i>LRRTM3</i>	2,938	5,267	<i>RP11-14K2.1</i>	2,829	4,868
<i>HMG2P8</i>	3,292	6,194	<i>RP11-846F4.1</i>	2,428	4,281
<i>ALI38764.1</i>	4,155	6,230	<i>MTRNR2L1</i>	21,647	28,320
<i>CTNNA3</i>	2,546	3,775	<i>ATPAF2</i>	2,875	7,114
<i>ANO3</i>	2,770	2,628	<i>AC004448.5</i>	6,764	11,695
<i>RP11-727A23.10</i>	2,417	4,519	<i>TWF1P1</i>	2,043	3,622
<i>DLG2</i>	1,642	2,859	<i>RP11-60A24.3</i>	19,904	35,227
<i>SLC35F2</i>	3,152	5,162	<i>ACTG1</i>	1,786	4,972
<i>CLEC6A</i>	3,980	7,091	<i>TXNL4A</i>	4,055	7,674
<i>SOAT2</i>	3,280	1,936	<i>CTB-52I2.4</i>	2,381	3,448
<i>LGR5</i>	3,418	1,179	<i>S-**</i>	2,455	4,878
<i>NME2P1</i>	5,138	8,046	<i>RPL36P16</i>	1,802	3,675
<i>RP5-940J5.9</i>	3,314	5,713	<i>CTD-2562J15.6</i>	227	13,230
<i>S-**</i>	1,687	3,249	<i>S-**</i>	41,102	73,896

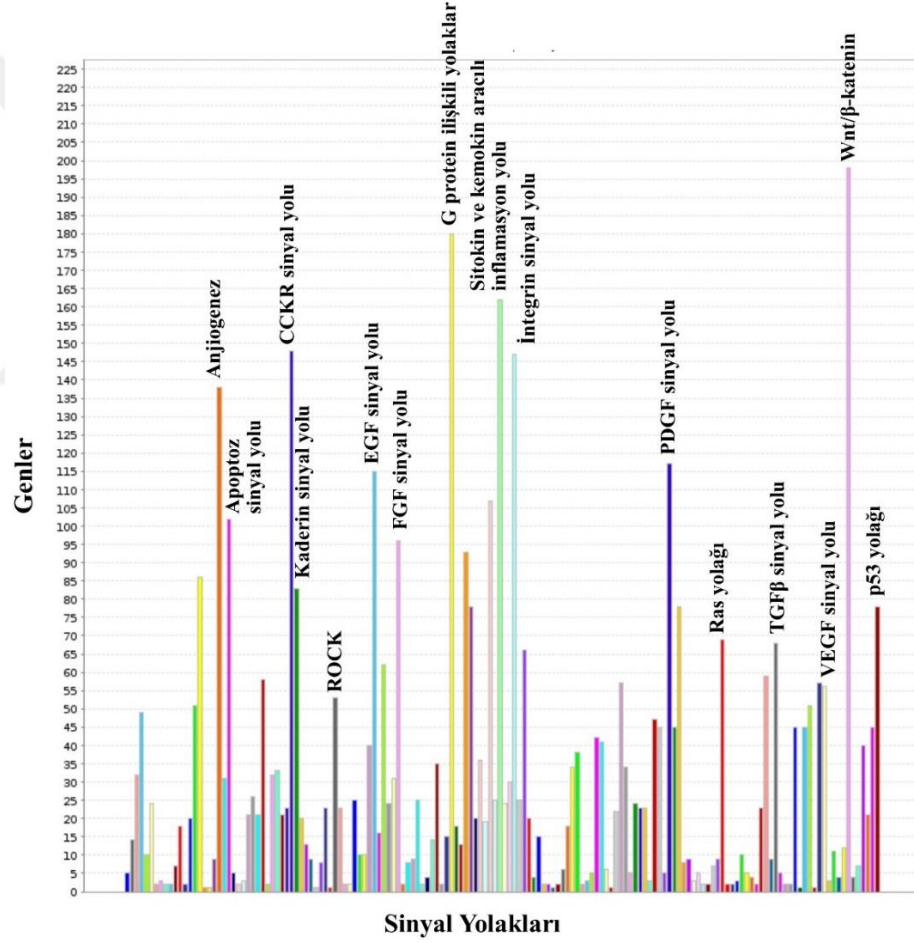
4.3.3. Gen Ontoloji Analizi

RNA dizileme çalışmalarından elde edilen anlamlılık derecesine göre ilk elli genin bulunduğu gen listesi, gen ontoloji analizi için web tabanlı ShinyGO (v0.60) yazılımı kullanılarak biyolojik işlevlerine göre aşağıdaki tabloda sınıflandırılmıştır (Tablo 4.5). Gen ontoloji analizi hücrelerde bazı süreçlerin etkilendiğini işaret etmektedir. Buna göre, ATC hücrelerine MAL uygulanması sonucunda hücrelerin hareket, sekresyon, enzim üretimi, gen ifadesi vb. uyaranlara cevaben ortaya çıkan süreçlerde değişikliklerin meydana geldiği anlaşılmaktadır. Bunun yanı sıra, hücre proliferasyonu, hücre-hücre ve hücre-ECM adezyonu, sinyal iletimi ve kataliz veya bağlanma gibi moleküler seviyede meydana gelen temel biyolojik aktivitelerin de etkilendiği görülmektedir. Ayrıca, hücre tarafından kullanılmak üzere enerjinin serbest bırakılması ile karbon bileşiklerinin parçalanması gibi katabolik reaksiyon ve yolların etkileneceği de söz konusudur.

Tablo 4.5: En fazla anlamlılık gösteren ilk 50 genin rol aldığı biyolojik işlevler.

Biyolojik İşlevler	Genler
Uyaranlara yanıtın düzenlenmesi	<i>LGR5, GPC5, CLEC6A, DLG2, ACTG1, PTGFR, ACTG1, CLEC6A, VIM</i>
Sinyal yollarının düzenlenmesi	<i>LGR5, GPC5, CLEC6A, DLG2</i>
Hücre Adezyonu	<i>ACTG1, DLG2, CTNNA3</i>
Hücre Proliferasyonu	<i>LGR5, PTGFR, S100A6</i>
Katabolik İşlemler	<i>CHFR, VIM, GPC5</i>
Moleküler fonksiyonun düzenlenmesi	<i>LGR5, DLG2</i>

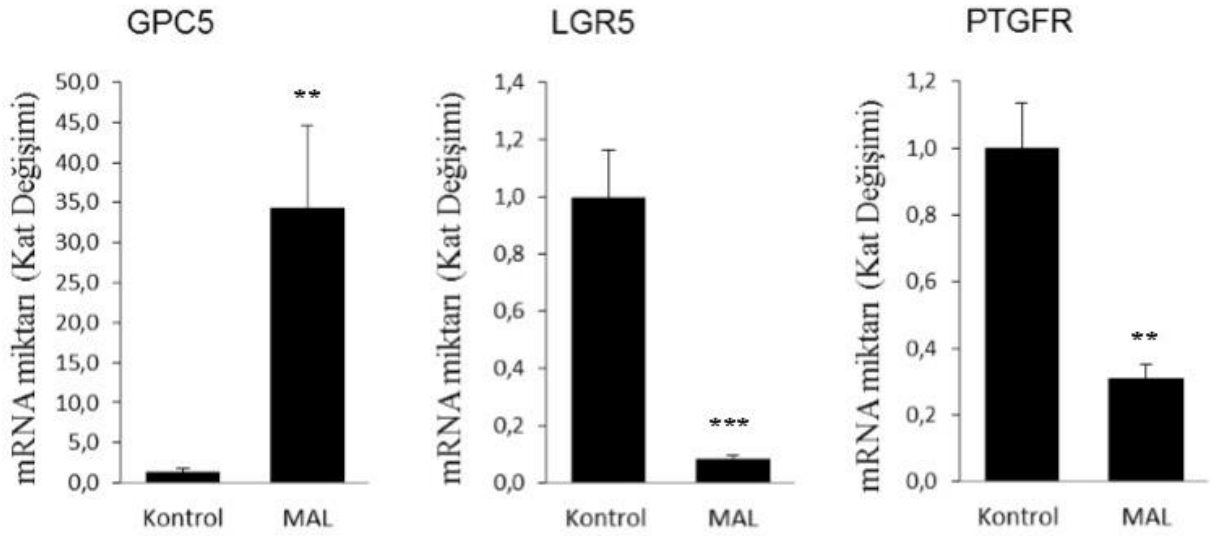
RNA dizileme çalışmaları sonucu elde edilen ve referans genomda karşılığı olan yaklaşık 17000 genin hangi sinyal yollarına aracılık ettiğini saptamak amacıyla Panther (14.1) *pathway* analiz sistemi kullanılmıştır. ATC hücrelerine MAL uygulanması sonucunda ekspresyon örüntülerinde anlamlı derecede değişiklik gösteren genlerin çoğunun özellikle Wnt- β -katenin sinyalinde rol aldığı dikkat çekmektedir. Bunun yanı sıra, G protein aracılı sinyal yollarının da ön plana çıktığı saptanmıştır. Ayrıca apoptoz, p53 sinyal yolu, anjiyogenez ve bu yolla ilişkili olan VEGF sinyalleme, çeşitli büyüme faktör reseptör yolları (EGF, FGF, PDGF), proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi süreçlerin düzenlenmesinde rolü olan TGF- β sinyal yolu gibi hücrel sinyal iletim unsurlarının da önem kazandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: RNA Dizileme analizi sonucunda tüm transkriptlerin Panther analiz sistemi kullanılarak ilişkili olduğu sinyal yollarını gösteren diyagram. Toplam transkript verileri ile ilişkili ön plana çıkan yolları temsil eden pikler şekil üzerinde belirtilmiştir. CCKR: hücre döngüsü ile ilişkili kinaz, ROCK: Rho ile ilişkili kinaz yolağı, PDGF: platelet kökenli büyüme faktörü.

4.4. VALİDASYON BULGULARI

Yüksek çıktılı veri elde edilen RNA dizileme analizlerinin düşük çıktılı bir yöntemle valide edilmesi amacıyla GPC5, LGR5, PTGFR transkriptlerindeki değişimin qPCR ile analizi sonucunda genlerin ekspresyonundaki değişikliklerin RNA dizilemeden elde edilen verilerle örtüştüğü görülmüştür. Buna göre GPC5 miktarının kontrole göre anlamlı şekilde arttığı ($p \leq 0,01$), LGR5 ($p \leq 0,001$) ve PTGFR ($p \leq 0,01$)'nin kontrole göre anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır. (Şekil 4.6).



Şekil 4.7: RNA Dizileme sonucu elde edilen verilerin valide edilmesi amacıyla istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyi en yüksek olan ilk 50 gen arasından seçilen GPC5, LGR5 ve PTGFR'nin mRNA seviyeleri. Kat değişimi ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir, GPC5 Kontrol: $1,38 \pm 0,35$; MAL: $34,39 \pm 10,30$ **Kontrole göre anlamlı ($p \leq 0,01$). LGR5 Kontrol: $1,00 \pm 0,16$; MAL: $0,08 \pm 0,01$ ***Kontrole göre önemli derecede anlamlı ($p \leq 0,001$). PTGFR Kontrol: $1,00 \pm 0,13$; MAL: $0,31 \pm 0,04$ **Kontrole göre anlamlı ($p \leq 0,01$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde, kanser hücrelerine tümoral aktivite ve metastatik yetkinlik açısından avantaj kazandıran glikozilasyon değişikliklerinin lektinler ile hedeflenerek, kanserin malignant özelliklerinin baskılanması yönündeki yaklaşımlar oldukça önem kazanmıştır. Son yıllarda çeşitli lektinlerin anti-kanser özellikleriyle ilgili olarak, sayısı artan çalışmaların varlığı dikkat çekici düzeydedir. Bununla birlikte, sindirim sürecinden aktivitelerini kaybetmeksizin dolaşıma geçebilmeleri lektinlerin farmakolojik açıdan önemli bir aday molekül grubu olmalarını desteklemektedir. Tiroid kanserinin tümörijenik ve malignant özelliklerinin, lektinlerin kullanılmasıyla baskılanması yönünde bazı yaklaşımlar mevcuttur. Kaptan ve diğ., (2018) yaptıkları çalışmada anaplastik tiroid kanser hücrelerinin yüzeyinde saptadıkları aşırı glikozilasyon paterninin bu hücrelerin malignant karakterlerinin bir belirtici olarak ortaya çıktığına işaret etmişlerdir. Bunun yanı sıra, bu hücrelerin α -2,3 siyalik asit bağlayan bir bitki lektini olan MAL'ye maruz bırakılması sonucunda, hücrelerin tümörijenik ve malignant karakterlerinin belirgin bir biçimde baskılandığı da aynı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Şöyle ki, MAL maruziyeti anaplastik tiroid kanser hücrelerinin proliferatif ve invaziv karakterlerini baskılamış, metastatik sürecin önemli basamaklarından biri olan tümör hücresi-endotelial etkileşimini belirgin bir biçimde azaltmıştır. Çalışmamızda 24 ve 48 saat süreyle 0,25 ve 0,5 μ M konsantrasyonlarda, anaplastik tiroid kanser hücre soyu olan 8505C hücrelerine MAL uygulanmasının hücre canlılığını belirgin bir biçimde azalttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla elde ettiğimiz bu bulgu daha önce Kaptan ve diğ., (2018) rapor ettiği sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Yaptığımız literatür taramaları sonucunda, MAL maruziyetinin anaplastik tiroid kanser hücrelerindeki etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaları ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Literatür taramalarımız aynı zamanda lektinlerin kanser hücreleri üzerinde ortaya koydukları etkilerin moleküler mekanizmalarının araştırılması yönünde çok sınırlı sayıda çalışma olduğunu da ortaya koymuştur. Bu çalışmada MAL uygulamasıyla anaplastik tiroid kanser hücrelerinde moleküler düzeyde hangi süreçlerin işlevselliğinin arttığının ya da azaldığının anlaşılması temel amaçlarımızdan biridir. Bu amaç doğrultusunda, MAL uygulanmış ve kontrol olarak kullanılan MAL uygulanmamış anaplastik tiroid kanser hücrelerinde RNA dizileme çalışması ile tam transkriptom analizi yapılmıştır. Bu analiz neticesinde elde edilen veriler kullanılarak yapılan gen ontoloji analizleri MAL maruziyetinin

hücre sinyal iletim yollarında, hücrenin adezyon kabiliyetinde, katabolik süreçlerin işlevselliğinde, proliferasyon gibi süreçlerde bir dizi etkileşimin meydana geldiğine işaret etmektedir. Bunun yanı sıra, transkript seviyelerinde istatistiksel açıdan en fazla anlamlılık değeri taşıyan ilk elli gen fonksiyonel özellikleri açısından da değerlendirilmiştir.

8505C anaplastik tiroid kanser hücre hattına 0,25µM doz ve 24 saat süreyle MAL uygulanması sonrasında elde edilen transkriptom analiz sonuçlarımız, *LGR5* (*GPR49*) ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir. *LGR5*, yedi transmembran domaini bulunan proteinleri içeren GPCR ailesinin bir üyesidir. GPCR'ler, peptid hormonları ve kemokinler de dahil olmak üzere çeşitli ligand sınıfları için reseptör görevi görmektedir (Schoneberg ve diğ., 1999). *LGR5*; TSH, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH) reseptörlerini içeren glikoprotein hormon reseptör alt ailesinin bir üyesidir (Hsu ve diğ., 1998; McDonald ve diğ., 1998). GPCR aileleri farmasötik açıdan önemli hedeflerdir (Brink ve diğ., 2004). Ayrıca, *LGR5* glikoprotein ligandları ile etkileşimi için önemli olan, 17 lōsin bakımından zengin tekrarları içeren büyük bir N-terminal hücre dışı domaine sahiptir (Hsu ve diğ., 1998; Barker ve diğ., 2007). *LGR5*, ince bağırsak ve saç köklerindeki (Barker ve diğ., 2007; Jaks ve diğ., 2008) yetişkin kök hücrelerin bir belirteci olarak tanımlanmıştır ve omurilik, meme, saç kökleri ve beyin dokularında yaygın olarak ifade edilmektedir (Hsu ve diğ., 1998).

LGR5, kanser kök hücrelerinde spesifik olarak eksprese edilir ve Wingless ve Int1'in bileşimi (Wnt)/β-katenin yolunun bilinen bir aşağı akış hedef genidir (Barker ve diğ., 2007; Kemper ve diğ., 2012). Son zamanlarda; *LGR5*'in, R-spondinler (RSPO1-4) olarak bilinen bir büyüme faktörü ligand ailesine yüksek afinite ile bağlandığı gösterilmiştir (De Lau ve diğ., 2011). Dört RSPO üyesinin hepsinin karakteristik özelliği, *LGR5*-LRP5/6 bağlanmasını aktive etme ve Wnt aracılı β-katenin aktivasyonunu artırma yetenekleridir (Carmon ve diğ., 2011; Peng ve diğ., 2013). Wnt/β-katenin sinyal yolu; kök hücre çoğalmasında, doku farklılaşmasında ve hücre polaritede önemli bir rol oynar (Grigoryan ve diğ., 2008; Valkenburg ve diğ., 2011). Bu sinyal yolundaki düzensizlik; insan PTC kanser kök hücre popülasyonunun çoğalmasına, tiroid mikroçevresinin bozulmasına, tümör dediferensiyasyonuna ve anjioinvazyon gelişmesine katkıda bulunur (Helmbrecht ve diğ., 2011; Liu ve diğ., 2011). Son zamanlarda, tiroid kanseri biyogenezi ile ilgili teoriler, klasik açıklamadan (yani, "multi-hit" genetik mutasyonlar ve çevresel riskler) ziyade, kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) çoğalmasıyla tümör oluşumunun teşvik edilmesi şeklinde açıklanan hipotezle desteklenmektedir (Thomas ve diğ., 2008; Lin ve

diğ., 2011). CSC hipotezinde, tiroid bezindeki embriyonik hücreler (tiroblastlar ve protiroisitler) tümör oluşumuna karşı hassastır ve tiroid kanserine yol açan mutasyonları biriktirir (Michelotti ve diğ., 2015). Michelotti ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada, *LGR5* ve ligand *RSPO*'nun insan PTC'sinde kontrol tiroid epitel hattına göre aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir. Ek olarak, *LGR5* ve ligand *RSPO2*'nin insan PTC'de tümör agresifliği, lenf nodu metastazları ve Wnt/ β -katenin aktivasyonu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. *LGR5*'in aşırı ekspresyonunun, insan PTC'sindeki tümör agresifliği ile ilişkili olduğu sonucundan yola çıkılarak *LGR5*'in PTC'de hasta risk sınıflandırması ve bölgesel metastazları için gelecekteki potansiyel bir biyobelirteç olarak görev yapabileceği fikri ileri sürülmüştür (Michelotti ve diğ., 2015). Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalar *LGR5*'in kolorektal (Al-Kharusi ve diğ., 2013), yumurtalık (McClanahan ve diğ., 2006), hepatoselüler (Yamamoto ve diğ., 2003), bazal hücre (Tanese ve diğ., 2008) ve özofagus kanserleri (Becker ve diğ., 2010) dahil olmak üzere çeşitli tümör tiplerinde aşırı eksprese edildiğine işaret etmektedir. Bu kanserlerin birçoğunda yüksek *LGR5* ekspresyonunun; tümörlerin başlatılması, invazyonu ve metastazı ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Merlos-Suárez ve diğ., 2011; Rot ve diğ., 2011). Uchida ve diğ. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada kolon kanseri hücre hatlarında *LGR5*'in ekspresyonunun fazla olduğu rapor edilmiştir. Ek olarak primer tümörlere kıyasla metastatik tümörlerden türetilmiş kolon kanseri hücre hatlarında ekspresyonun daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu bilgi ışığında, *LGR5* ekspresyonunun kolorektal karsinomanın malign potansiyeli ile ilişkili olabileceğini ortaya koyan Uchida ve diğ. (2010) *LGR5*'i umut vaat edici bir prognostik belirteç olarak göstermektedirler.

Kolorektal tümörögenizde *LGR5*'in rolünü aydınlatmayı amaçlayan Hirsch ve diğ. (2013) kolorektal kanser hücre hatlarında (SW480 ve HT-29) *LGR5* ekspresyonunu susturarak çeşitli kanseröz özelliklerde meydana gelen değişimleri analiz etmişlerdir. *LGR5* ekspresyonu yüksek kolorektal kanser hücrelerinde Notch sinyali ile ilişkili genlerin ekspresyonu fazla iken, *LGR5* susturulması sonucunda bu hücrelerde Notch sinyalinin baskılandığı tespit edilmiştir. Hirsch ve diğ. (2013) yaptıkları gen ekspresyon analizleri ışığında kolorektal kanser hücrelerinde *LGR5*'in susturulması sonrasında azalan proliferasyon ve göç kabiliyetinin, Notch sinyal iletiminde meydana gelen azalmanın bir sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bunun yanı sıra, tümöröjenik olmayan NIH3T3 fibroblastlarda ve HaCat keratinositlerde *LGR5*'in yükselmesi, koloni oluşumuna neden olmuş ve tümör oluşumunu arttırmıştır (McClanahan ve diğ., 2006). Servikal kanser hücrelerinde ise *LGR5*'in Wnt/ β -katenin yolunu aktive ederek proliferasyon ve

tümör oluşumunu desteklediği Chen ve diğ. (2014) tarafından bildirilmiştir. Yaptıkları hücre döngüsü analizi, artan *LGR5* ekspresyonunun S fazındaki hücrelerin yüzdesinde önemli bir artışa ve G₀/G₁ faz hücrelerinin yüzdesinde eş zamanlı bir azalışa yol açtığını ortaya koymuşlardır. Bu bulguları, *LGR5*'in servikal kanser hücrelerinde hücre döngüsünü hızlandırdığı yönünde yorumlamışlardır. Aynı zamanda, bu araştırmacılar Wnt/ β -katenin yolağının bir inhibitörü olan Dickkopf-1 (DKK-1) ile bloklanmasıyla *LGR5* tarafından uyarılan servikal kanser hücrelerinin çoğalmasında önemli ölçüde baskılandığını da ortaya koymuşlardır. Bu bulgular ışığında, *LGR5*'in servikal kanser hücrelerinin çoğalmasında Wnt/ β -katenin yolağı üzerinden gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. Lin ve diğ. (2015) tarafından yapılan bir başka çalışmada, *LGR5*'in Wnt sinyalinin iki ana bileşeni olan APC ve β -katenin ifadesi üzerindeki etkilerini anlamak için *LGR5*, siRNA kullanılarak HT-29 kolorektal kanser hücre hattında susturulmuştur. Bunun sonucunda APC ve β -katenin mRNA ekspresyonunda bir azalma olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada gözlemlenen APC ve β -katenin ifadesindeki eş zamanlı azalma, *LGR5*'in Wnt/ β -katenin yolağında (β -katenin veya APC yönlendirilmiş sinyalleşme) çift yönlü düzenlenmeye aracılık edebileceğini kanıtlamıştır. Ek olarak, *LGR5* anlatımındaki azalma HT29 hücre çoğalmasında negatif yönde etkilemiştir. Kolorektal tümörün başlatılmasında kritik rolü olan APC, β -katenin ve Wnt sinyal iletiminin *LGR5* ile ilişkili olması, *LGR5*'in kolorektal kanserli hastalar için potansiyel bir terapötik hedef olabileceğine işaret etmektedir. Benzer bir çalışma, *LGR5*'in meme kanseri hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolunu aktive ederek proliferasyon ve invazyonu teşvik ettiğini bildirmiştir (Yang ve diğ., 2015). *LGR5*'in aracılık ettiği invaziv ve metastatik mekanizmaların daha iyi anlaşılması için *LGR5*'in ekspresyonundaki değişikliklerin Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) üzerindeki etkisini araştıran Yang ve diğ. (2015), *LGR5* ile transfekte edilmiş hücrelerde E-kaderin ve β -katenin gibi epitelyal markörlerin azaldığını, mezenkimal markör olan nöral kaderin (N-kaderin) ve vimentinin ise arttığını rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, *LGR5* tarafından uyarılan EMT'nin, meme kanseri hücrelerini kök hücre durumuna geçirebileceğini ileri sürmüşlerdir. Aksine meme kanseri hücrelerinde *LGR5* ekspresyonunun susturulmasının ise EMT'nin dolayısıyla invaziv fenotipin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Yüksek *LGR5* ve düşük *LGR5* ekspresyonuna sahip hücreler arasındaki farkları değerlendiren Yang ve diğ. (2015), yalnızca yüksek *LGR5* popülasyonundaki hücrelerin, kendini yenileme yeteneğini gösteren güçlü sferoid oluşturma kabiliyeti sergilediğini bildirmişlerdir. Ek olarak, yüksek *LGR5*(+) popülasyonun *LGR5*(-) kanser hücrelerine kıyasla *in vivo* olarak daha yüksek tümörjeniteye sahip olduğu da

çalışmanın çıktıları arasında yer almaktadır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda MAL uygulaması sonucunda ekspresyonu azalan *LGR5*, 8505C anaplastik tiroid kanser hücre soyunda malignant özelliklerin azalmasının bir nedeni olarak düşünülebilir. Çünkü bulgularımız MAL uygulanmasının hücre çoğalmasını azalttığını göstermiştir. Aynı zamanda, Kaptan ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada da MAL'nin 8505C hücrelerinin hem proliferatif hem de invaziv karakterlerinin azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, Wnt sinyal yolunun hiperaktivasyonunun ATC'nin karsinogenezine olan katkısı, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Kurihara ve diğ., 2004; Jin ve diğ., 2016). *LGR5*'in Wnt sinyal yolunun aşağı akış hedef geni olduğu da göz önünde bulundurulduğunda, MAL'nin 8505C hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin *LGR5*/Wnt eksenini üzerinden gerçekleşmesi muhtemeldir.

Çalışmamızda 8505C anaplastik tiroid kanser hücre soyunda *GPC5* ekspresyonu çok düşük düzeydeyken, MAL uygulanması sonrasında *GPC5* ekspresyonunun çok belirgin bir biçimde arttığı ortaya konmuştur. Glipikanlar, plazma zarına bir glikozil fosfatidilinositol (GPI) çapası ile bağlanan membran proteoglikan ailesidir. Proteoglikanlar, glikozaminoglikan (GAG) zincirlerini taşıyan proteinlerdir. Bunlar, genellikle yüksek oranda sülfatlanmış disakkarit tekrar polimerleridir. Disakkaritlerin yapısına bağlı olarak çeşitli GAG zincirleri tanımlanmıştır (Esko ve diğ., 2009). En yaygın olanları heparan sülfat (HS) ve kondroitin sülfat (CS)'dir. Memeli genomu altı glipikan içerir (*GPC1-GPC6*) (Filmus ve diğ., 2008; Filmus ve Capurro, 2012) ve ortolog genleri, *Drosophila*'daki Dally ve Dlp de dahil olmak üzere Metazoanlarda tanımlanmıştır. Glipikanların ortak yapısal özellikleri, on dört sistein bakiyesinin yanı sıra, C-terminaline yakın olan GAG bağlanma bölgelerinin bulunmasıdır. Glipikanların GAG zincirleri diğer hücre yüzey proteinleri ile etkileşimlerinde rol oynamaktadır (Song ve diğ., 2002). Her glipikandaki GAG bağlanma bölgelerinin sayısı, aileye göre değişmekle birlikte bu varyasyonun fonksiyonel etkileri hala anlaşılamamıştır. Genel olarak, glipikanlar HS zincirleri taşır. Ancak rabdomiyosarkom (RMS) hücreleri tarafından üretilen *GPC5* ise CS zincirleri taşır (Li ve diğerleri, 2011). Yardımcı reseptör olarak görev yapan glipikanlar, spesifik sinyal alıcıları ve ligandları arasındaki etkileşimi kolaylaştırır. Böylece ilişkili sinyal yollarının işlevini düzenler (Yayon ve diğ., 1991; Higashiyama ve diğ., 1993; Cumberledge ve diğ., 1997). Genetik ve biyokimyasal çalışmalar, glipikanların, Hedgehogs (Hh), Wnt, kemik morfogenetik proteinleri ve FGF tarafından tetiklenen sinyal yollarının aktivitesini düzenlediğini göstermiştir (Filmus ve diğ., 2008).

Hh sinyal yolu embriyonik morfogenezde kritik bir rol üstlenmektedir (Ingham ve diğ., 2011; Briscoe ve Therond, 2013). Bu yolağın hiperaktivasyonunun çeşitli kanser türlerinde arttığı gösterilmiştir (Teglund ve Toftgard, 2010; Ng ve Curran, 2011). GPC5'in Hh sinyalini aktive ederek RMS hücre çoğalmasını uyardığı bildirilmiştir (Li ve diğ., 2011). Hh sinyalleri bağlamında GPC5'in, Hh aktivitesini uyaran ve hem Hh hem de Patched (Ptch) ile etkileşime giren Dlp gibi davrandığı belirtilmiştir (Yan ve diğ., 2010). GAG zincirleri taşımayan bir mutant kullanılarak yapılan deneyler, GAG zincirlerinin GPC5'in Hh ve Ptch'ye bağlanması için elzem olduğunu göstermiştir. Bu çalışma aynı zamanda Ptch'ye bağlanmayan, Hh sinyalini uyarmayan ve GAG taşımayan GPC5'in Hh için gerekli olan primer sil dışında kaldığını göstermiştir (Li ve diğ., 2011). Öte yandan GPC3'ün Hh'ye bağlanmak için Ptch ile rekabet ettiği bildirilmiştir. GPC3 de GPC5 gibi GAG zincirleri taşımasına rağmen GPC5'in GAG zincirleri Ptch'ye bağlanırken GPC3'te aynı durumun gerçekleşmemesinin nedenine dair iki öngörü bulunmaktadır. Bunlar; GPC5'in HS zincirlerinin GPC3'ünden daha fazla miktarda sülfat bulundurması (Li ve diğ., 2011) ve sülfat gruplarının sağladığı negatif yükün, HS zincirlerini içeren etkileşimlerin çoğundan sorumlu olmasıdır (Esko ve Linhardt, 2009). Başka bir olasılık ise, GPC3 ve GPC5'teki farklı tipteki sülfat modifikasyonlarının veya GAG zincirlerinin sayısının, Ptch ile farklı etkileşimlere neden olmasıdır. GPC5'in serebellar granül öncül hücrelerinde de Hh sinyalini dolayısıyla hücre proliferasyonunu teşvik ettiği rapor edilmiştir (Witt ve diğ., 2013). Ek olarak, bu çalışma serebellar hücrelerde GPC5'in sil dibinde bulunduğunu göstermiştir. Özellikle, GPC5'in HS zincirlerinin, Hh-stimülatör aktivite sergilemek için indirgeyici ucunda 2-O-sülfo-iduronik asit bakiyesi gerektirdiğini de ortaya koymuşlardır (Witt ve diğ., 2013). Williamson ve diğ. (2007) GPC5'in anlatımının RMS'de anlamlı olarak arttığını rapor etmişlerdir. Ardından, GPC5'in Hh sinyalini aktive ederek RMS hücre çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir (Li ve diğ., 2011).

Yapılan çalışmalarda, PCa'da düşük seviyede eksprese edildiğini ve GPC5'in anlatımındaki artmanın PCa hücrelerinde proliferasyonu, *in vitro* invazyonu ve *in vivo* tümör büyümesini baskıladığı rapor edilmiş ve bu sonuçlar GPC5'i PCa gelişimini baskılamakta temel bir oyuncu olarak nitelendirmiştir (Sun ve diğ., 2018). Ek olarak, araştırmacılar invazyonla pozitif bir ilişki kurarak kanserin ilerlemesi için çok önemli bir faktör olan ve epitelyal belirteçlerin kaybı, mezenkimal belirteçlerin kazancı ile ön plana çıkan EMT (Zhau ve diğ., 2008) ile GPC5 aşırı ekspresyonu arasındaki korelasyonu değerlendirmişlerdir. Bunun sonucunda, GPC5'in aşırı ekspresyonunun EMT markörlerinin ekspresyonunu değiştirdiğini ve böylece prostat

kanserinde invazyonu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. *GPC5* ekspresyonundaki artışın *Wnt/β-katenin* yolağını baskıladığını, *β-katenin* protein seviyesini ve bunun kritik hedef genleri olan *c-Myc* ile *siklin D1*'i önemli ölçüde azalttığını da rapor etmişlerdir (Sun ve diğ., 2018). Zhang ve diğ. (2016), düşük orta ve yüksek risk grubu prostat kanseri hastalarından ve kontrol grubu olarak kullanılan normal prostat dokularından yapılan *GPC5* proteininin immünohistokimyasal analiziyle özellikle yüksek riskli vakalarda *GPC5*'in en düşük miktarda bulunduğunu göstermişlerdir. *GPC5* protein seviyesinin prostat kanserinde klinikopatolojik önemi arasındaki ilişkiyi değerlendiren Zhang ve diğ. (2016) *GPC5*'in düşük miktarının artmış serum prostat spesifik antijen (PSA), daha yüksek Gleason skorları, gelişmiş tümör evresi (T3), pozitif lenf nodu metastazı ve biyokimyasal rekürrens (nüks) ile korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Dolayısıyla, *GPC5*'in prostat kanserinin tanı ve prognozunun öngörülmesi için yeni bir biyobelirteç olarak kullanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu veriler doğrultusunda, *GPC5*'in yüksek riskli PCa hastaları için potansiyel bir tümör baskılayıcı olabileceğini belirtmişlerdir.

GPC5'in akciğer kanserindeki rolü hakkında tartışmalı sonuçlar mevcuttur. Örneğin, yapılan bir çalışma yüksek *GPC5* ekspresyonunun lenf nodu metastazı ve NSCLC hastalarının kötü prognozu ile ilişkili olduğunu göstermiştir ve *GPC5*'in yüksek miktardaki ifadesinin hücre göçünü desteklediğini dolayısıyla, NSCLC'de *GPC5* için bir pro-onkogenik rol önerilmiştir (Li ve diğ., 2013). Aksine bir başka çalışmada ise, düşük *GPC5* ekspresyonunun lenf nodu metastazı ve NSCLC hastalarının daha kısa sağ kalımı ile ilişkili olduğunu, NSCLC hücrelerinde *GPC5*'in aşırı ekspresyonunun hücre döngüsünün durmasını tetiklediğini ve metastazı baskıladığını bildirmişlerdir (Yang ve diğ., 2013). Guo ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada *GPC5*'in akciğer kanserindeki rolü *in vivo* ve *in vitro* olarak aydınlatılmıştır ve sonuçlar *GPC5*'in bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü doğrular niteliktedir. *GPC5* ekspresyonunun, ERBB (hücre büyümesi ve hayatta kalma gibi anahtar hücre fonksiyonlarda yer alan bir reseptör tirozin kinaz) ailesi üyeleri ERBB2 ve ERBB3 de dahil olmak üzere akciğer kanseri için önemli olan birkaç reseptör tirozin kinazı inhibe ettiğini bildiren Guo ve diğ. (2016) *GPC5*'in farklı kanser türlerinde farklı sinyal yollarını düzenleyebileceğini ileri sürmüştür. Bu bağlamda, *GPC5*'i hedeflemenin farklı sonuçlara yol açabileceğini; örneğin *GPC5* antagonistlerinin, RMS veya mide kanseri (GC)'yi tedavi etmek için faydalı olabilirken, *GPC5*'i aktive eden moleküllerin NSCLC hastalarını tedavi etmek için yararlı olabileceğini önermişlerdir.

HS proteoglikanın üyelerinden biri olan GPC5'in, Wnt3a'ya rekabetçi bir şekilde bağlanarak Wnt/ β -katenin sinyalini etkisizleştirmesiyle akciğer kanserinde bir anti-tümör etki gösterdiği rapor edilmiştir. GPC5'in yüksek ekspresyonunun, *in vitro* akciğer kanseri hücrelerinde EMT'yi uyardığı gösterilmiştir. RNA dizileme verilerinin biyoinformatik analizi, GPC5'in EMT ile ilişkili belirteçler (E-kaderin ve vimentin) ile birlikte ifade edildiği bildirilmiştir. GPC5'in aşırı eksprese edilmesinin, β -kateninin sitoplazmadan nükleusa translokasyonunu bloke edebileceğini ve dolayısıyla Wnt3a'ya rekabetçi şekilde bağlanarak Wnt/ β -katenin sinyal yolunu baskılayabileceğini göstermiştir (Wang ve diğ., 2016).

MikroRNA'lar (miRNA) post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu negatif olarak düzenleyerek birçok kanser türünün patogenezinde önemli roller oynar. Ancak, ATC'de miRNA'ların rolü belirsiz kalmıştır. miRNA-4295'in hedef gen *CDKN1A*'yı negatif olarak düzenleyerek ATC hücre çoğalmasını desteklediği ortaya koyulmuştur. miRNA-4295'in aşırı ekspresyonunun, ATC hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonunu desteklediği, ancak miRNA-4295'in inhibisyonunun zıt bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Shao ve diğ., 2015). Yuan ve diğ. (2018) tarafından yapılan çalışmada GPC5 ekspresyonunun pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC) hücre hatlarında azaldığı gösterilmiştir. GPC5'i onkogenik bir miRNA olan miR-4295'in potansiyel hedef geni olarak tanımlayan Yuan ve diğ. (2018) GPC5'in aşırı ekspresyonunun anti-tümör etki gösterdiğini bildirmiştir. miRNA-4295'in baskılanmasının, GPC5 ekspresyonunu düzenlediği ve Wnt/ β -katenin sinyalleşmesinin aktivasyonu sonucunda PDAC hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu azalttığı rapor edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, miRNA-4295/GPC5/Wnt/ β -katenin ekseninin PDAC patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Öte yandan Wang ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada, GPC5 ekspresyonunun ve protein seviyesinin mide kanseri hücre hatlarında normal mide hücre hattına göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Düşük ifadesinin, daha yüksek tümör derecesi ve evresi ile ilişkili olduğu bilinen miRNA-217'nin potansiyel hedefinin GPC5 olduğunu ortaya koyan Wang ve diğ. (2015), miRNA-217'nin mide kanserinde tümör baskılayıcı etkisini GPC5 üzerinden gösterdiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, bu bulgular ışığında miRNA-217'nin bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü ve sonuç olarak GC hastaları için terapötik bir hedef olarak hizmet edebilecek olan GPC5'i hedefleyerek GC hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır.

Şimdiye kadar, GPC5'in kanserle ilgili rolü net değildir. Özellikle, GPC5'in rolü farklı kanser tipleri arasında değişim göstermektedir. Örneğin, GPC5, RMS'deki hücre proliferasyonunu uyarabilir; bu, GPC5'in bir onkogen olarak etki ettiğinin bir kanıtıdır (Li ve diğ., 2011). GPC5'in, tükürük adenoid kistik karsinomun (SACC) akciğer metastazında önemli ölçüde arttığı bildirmiştir; bunun sonucunda, GPC5'in SACC'de akciğer metastazını teşvik edebileceği önerilmiştir (Zhang ve diğ., 2014). Bununla birlikte, meme kanserinde, kötü huylu meme tümörlerinde GPC5 ekspresyonu, başlangıçtaki tümörlere kıyasla daha da azalmıştır, bu sonuç GPC5'in tümör baskılayıcı rol oynadığını gösterir (Zhang ve diğ., 2011). ATC'de aşırı ekspresyonu proliferasyon ve invazyonla sonuçlanan miRNA-4295'in (Shao ve diğ., 2015) hedef geninin GPC5 olabileceği göz önünde bulundurulduğunda GPC5 artışının miR-4295 inhibisyonu ile gerçekleşebileceği muhtemeldir. Bu bağlamda miRNA-4295/GPC5/Wnt/ β -katenin eksenini vasıtasıyla MAL'nin anaplastik tiroid kanseri üzerindeki anti-tümör etkisi (Kaptan ve diğ., 2018) açıklanabilir. Öte yandan, GPC5'in farklı kanser tiplerindeki etkisinin değişiklik gösterme sebebi örneğin RMS'de bulunan GPC5'in HS zinciri yerine CS zincirine sahip olması (Li ve diğ., 2011) olabilir. Bununla birlikte kanser hücrelerinin kökenlerinin farkı da etkilerin farklı olmasına neden olabilir. MAL'nin anaplastik tiroid kanserindeki etkileri göz önünde bulundurulduğunda GPC5'in tümöral özellikleri geriletmeye katkı sağladığı açıktır.

8505C anaplastik tiroid kanser hücre hattına MAL uygulanması sonrasında elde edilen transkriptom analiz sonuçları *PTGFR*'nin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir. Anjiyogenez olarak bilinen damar oluşum süreci, tümör ilerlemesi ve metastazı için gereklidir (Folkman, 1995); çünkü tümör kan damarları, tümör hücrelerine besin ve oksijen sağlayarak tümör ilerlemesini teşvik etmektedir (Folkman, 2002). Bu mekanizmayı hedef alan anti-anjiyogenik tedavinin, kanser için önemli bir terapötik potansiyeli olduğu düşünülmektedir (Folkman, 1971). Tümör endotel hücreleri (TEC'ler) normal endotel hücrelerine (NEC'ler) kıyasla farklı fenotipler göstermektedir (Matsuda ve diğ., 2010). Fare TEC'lerinin ve NEC'lerinin mikarray analizleri incelendiğinde bu genler arasında, *PTGFR*'yi kodlayan *PTGFR* mRNA ekspresyon seviyelerinin TEC'lerde NEC'lerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Siklooksijenaz-2 (COX-2, PTGS2, prostaglandin endoperoksit sentaz-2) tarafından sentezlenen PGF2 α için bir reseptör olan *PTGFR*'nin böbrek hücre karsinomada (RCC) tümör kan damarlarında ekspresyonunun fazla olduğunu gösteren Akiyama ve diğ. (2013) RCC'de *PTGFR*'nin spesifik olarak tümör kan damarlarını hedefleyebilen, anti-

anjiyogenik tedavi amacıyla kullanılabilecek yeni bir hedef molekül olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Mutasyon veya proteinlerin aşırı ekspresyonu kanserli hastaların serumlarında otoantikor (AAb) gelişmesine yol açabilir (Anderson ve diğ., 2005). Hastalığın erken evreleri dahil olmak üzere kanserli hastaların serumlarında tümör antijenine özgü AAb tanımlanmıştır (Gagnon ve diğ., 2008). p53 mutasyonu ve sonuçta ortaya çıkan protein stabilizasyonu ile ilişkili p53'e özgü AAb erken evre yumurtalık kanserinde tespit edilmiştir (Goodell ve diğ., 2006). Yeni AAb biyobelirteçlerinin tanımlanmasının, yumurtalık kanseri tespitinin hassasiyetini artıracaklarını varsayan Anderson ve diğ. (2014) yaptıkları analizlerle p53'e ek olarak, iki yeni yumurtalık otoantijeni olan PTGFR ve protein tirozin fosfataz reseptörü tip A (PTPRA)'yı tespit etmişlerdir. Yumurtalık kanserinde, *PTGFR*'nin aşırı ekspresyonunun, kanserli hastaların serum numunelerinde tespit edilmesinin yanı sıra, otoantikorların kendiliğinden gelişmesini ve salgılanmasını uyardığı gösterilmiştir. Sonuç olarak Anderson ve diğ. (2014) kansere bağlı hedef antijenlerle doldurulmuş özel protein mikroarray kullanarak yumurtalık kanserinin erken tespiti için potansiyel üç otoantikor biyolojik belirteç panelini tanımlamışlardır.

Endometrial adenokarsinomda $\text{PGF2}\alpha$ -FP kompleksi ile artan sinyal, *PTGS2* (Jabbour ve diğ., 2005) gibi tümörijenik genlerin ve damar fonksiyonunu parakrin olarak düzenleyen *FGF2* (Sales ve diğ., 2007) ve *VEGF* (Sales ve diğ., 2005) gibi anjiyogenik genlerin ifadesinde artış bildirilmiştir (Keightley ve diğ., 2010a). FP reseptörü, endometrial adenokarsinom hücrelerinin aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve fokal adezyon kinazın aktivasyonu yoluyla ECM adezyonunu da düzenleyebilir (Sales ve diğ., 2004; Sales ve diğ., 2008). Bu bulgular, $\text{PGF2}\alpha$ -FP kompleks sinyalinin, endometrial adenokarsinomun düzenlenmesinde çok faktörlü bir rol oynadığını göstermektedir (Keightley ve diğ., 2010a). FP reseptörü yoluyla $\text{PGF2}\alpha$ 'nın endometrial adenokarsinom hücrelerinin hareketliliğini *in vitro*'da arttırdığı rapor edilmiştir (Sales ve diğ., 2008). Keightley ve diğ. (2010b) bir disintegrin ve metalloproteinazın trombospondin tekrarı (ADAMTS1)'in epitelyal hücrelerde $\text{PGF2}\alpha$ -FP kompleksi aracılığıyla düzenlendiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, $\text{PGF2}\alpha$ -FP kompleksinin oluşturduğu sinyal ile uyarılan ADAMTS1'in endometrial adenokarsinomda tümör hücresi invazyonunu ve endotel hücre proliferasyonunu düzenleyen bir mekanizma açığa çıkarılmıştır. Alkhateeb ve diğ. (2019) RNA-dizileme yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada prostat kanseri ilerlemesini, özellikle evre II ve hastalığın sonraki aşamalarını tahmin etmek için potansiyel biyobelirteçler arasında

PTGFR'nin de olduğu bildirilmiştir. Bu durum ATC hücre soyunda MAL uygulanması sonucunda azalan *PTGFR* ekspresyonu, MAL'nin anti-anjiogenik etkinliğin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Fakat bu etkiyi net bir şekilde ortaya koymak için ATC hücre soylarında yapılacak anjiyogenez assaylerine ihtiyaç vardır. Ayrıca, PGF2 α -FP kompleksinin FGF2 artışına neden olduğu (Keightley ve diğ., 2010a) ve FGF2'nin azalmasının Wnt/ β -katenin yolağının baskılanmasıyla sonuçlandığı rapor edilmiştir (Zhang ve diğ., 2016). Dolayısıyla bulgularımızda saptadığımız *PTGFR* ekspresyonundaki azalış, FGF2'nin azalmasına yol açarak Wnt/ β -katenin yolağının baskılanmasıyla sonuçlanan anti-proliferatif etkinin bir sebebi olarak gösterilebilir.

Yapılan transkriptom analiz sonuçları *CLEC6A* (*Dectin-2*)'nin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığını göstermektedir. C tipi lektin benzeri reseptörler (CTLR'ler), zara bağlı veya çözünebilir formlarda bulunan 1000'den fazla reseptör grubunu oluşturur (Zelensky ve Gready, 2005). Başlangıçta, ligand etkileşiminin Ca⁺² bağımlı olmasından dolayı C-tip olarak adlandırıldığı, daha sonra tüm CTLR'lerin Ca⁺²'ye bağımlı olmadığı ve bu reseptörlerin daha çeşitli ligandları tanıyabildiği keşfedilmiştir (Kerscher ve diğ., 2013). Bu reseptörler, en az bir CRD veya daha geniş anlamda, yüksek oranda korunan sistein bakiyeleri arasındaki disülfid bağları ile oluşturulan C tipi lektin benzeri domain (CTLD)'nin varlığı ile karakterize edilir (Zelensky ve Gready, 2005). Bu aile, CRD'lerinin organizasyonuna göre 17 gruba ayrılmıştır ve işlevsel olarak klasik veya klasik olmayan C tip lektinler olarak tanımlanabilir (Drickamer ve Fadden, 2002; Zelensky ve Gready, 2005). Klasik C tip lektinler, CRD'lerinde Ca⁺² bağlanma bölgelerinin oluşturulmasından sorumlu korunmuş bakiyeler ve genel olarak, tipik karbohidrat ligandlarını bağlayan korunmuş motifler (örneğin mannoz tipi karbohidratları bağlayan EPN amino asit üçlüsü (Glu-Pro-Asn) veya galaktoz tipi karbohidratları bağlayan QPD üçlüsü (Gln-Pro-Asp motif) içermektedir. Klasik olmayan C tip lektinler veya lektin benzeri reseptörler bu motifleri içermezler (Drickamer ve Fadden, 2002). C tipi lektinler hem immün hem de immün olmayan fonksiyonları yerine getirirler. Bazıları, hücre-hücre ve hücre-ECM adezyonunu kolaylaştırmak için endojen ligandları tanıırken bir kısmı ise patojen tanıma reseptörü (PRR) gibi davranmaktadır (Graham ve Brown, 2009). Dectin-2 başlangıçta Langerhans hücresine özgü CTLR olarak tanımlanmıştır; ancak daha sonra doku makrofajları, nötrofiller ve birkaç dendritik hücre (DC) alt kümesi dahil olmak üzere çeşitli miyeloid hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (Ariizumi ve diğ., 2000). Dectin-2, mannoz bağlayan (McGreal ve diğ. 2006) EPN motifini barındıran "klasik" bir CTLD içerir ve PRR olması önem

taşımaktadır. Bu ailedeki diğer CTLR'ler gibi, Dektin-2 kısa bir sitoplazmik kuyruğa sahiptir ve FcR γ ile birleşir. İlginç bir şekilde, bu etkileşime Dektin-2'nin transmembran arjinin bakiyesi yerine kısa sitoplazmik kuyruğunun bir membran-proksimal kısmı aracılık eder (Sato ve diğ., 2006). Makrofajlar ve doğal immün sistemin diğer hücrelerinde bulunan C tipi bir lektin olan Dektin-2, patojenlere özellikle de mantarlara cevap olarak işlev görmektedir. C tipi lektin reseptörü (CLR) ailesinin bir üyesi olan Dektin-2'nin Kupffer hücreleri olarak bilinen karaciğerdeki makrofajlarda kanser hücrelerinin alımını ve temizlenmesini sağlamak için işlev gördüğü dolayısıyla Dektin-2'nin kanser hücrelerinin karaciğer metastazının baskılanması için kritik olduğu ileri sürülmüştür. Aynı zamanda, Dektin-2'nin uyarılmasının, Fc reseptör γ zinciri tarafından sinyal oluşturularak fagositoza neden olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda makrofajların kanser hücrelerini fagositte ettiği ve tümör gelişimini baskıladığı (Feng ve diğ., 2015) bilinmesine rağmen moleküler mekanizma henüz aydınlatılamamıştır (Kimura ve diğ., 2016). Yapılan bu çalışmada, Dektin-2 ve MCL dışındaki CLR aile üyelerinin bu anti-tümör yanıtlarına katkılarını incelemek önemli görülmektedir. Bu nedenle, bulgular karaciğerde ve diğer organlarda metastazı kontrol etmek için Dektin-2 ve/veya diğer CLR ailesi üyeleri için bir agonist geliştirerek makrofajların fagositotik aktivitesini artırmanın bir yolunu ortaya çıkarabilmesi açısından önem taşımaktadır (Kimura ve diğ., 2016). Kanser hücrelerinde, Dektin-2 ekspresyonu ile alakalı herhangi bir çalışma mevcut değildir. MAL uygulanması sonucunda anaplastik tiroid kanser hücrelerinde artan Dektin-2'nin bu hücrelerde hangi süreçlerde rol aldığını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattına MAL uygulanması sonrasında elde edilen transkriptom analiz sonuçları *VIM*'in kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığını göstermektedir. *VIM* geni tarafından kodlanan ve ara filament (IF) protein ailesinin ana bileşeni olan vimentin, normal mezenkimal hücrelerde bulunmaktadır (Satelli ve Li, 2011). Bir hücre iskeleti yapısal proteini olan vimentinin, hücrelerin sitozolik kısmı ile sınırlandırılması beklenirken; hücre yüzeyinde ve nükleusta da bulunduğu gösterilmiştir (Traub ve Shoeman, 1994). Vimentinin hücresel bütünlüğü korumanın yanı sıra strese karşı direnç sağladığı bilinmektedir (Satelli ve Li, 2011). Prostat kanseri (Zhao ve diğ., 2008), gastrointestinal tümörler (Takemura ve diğ., 1994), meme kanseri (Gilles ve diğ., 2003), malign melanoma (Chu ve diğ., 1996), akciğer kanseri (Upton ve diğ., 1986), PTC (Yamamoto ve diğ., 1992) ve diğer kanser türleri dahil olmak üzere çeşitli epiteliyal kanserlerde artan *vimentin* ekspresyonu bildirilmiştir. *Vimentinin* kanserdeki aşırı ekspresyonu artan tümör büyümesi, invazyon ve kötü

prognoz ile ilişkilidir. Bununla birlikte, vimentinin kanser ilerlemesindeki rolü belirsizliğini korumaktadır. Vimentin, epitel hücrelerin şekillerini çarpıcı bir şekilde değiştirmelerini ve artmış hareketlilik sergilemelerini sağlayan bir mezenkimal fenotip elde ettiği hücresel yeniden programlama işlemi olan EMT'nin markörü olarak ön plana çıkmaktadır. Dolayısıyla EMT'nin meme kanseri de dahil olmak üzere epitelial kanserlerde metastaz için kanser hücrelerine hareketlilik sağlayan önemli bir olay olduğu açıktır. Vimentinin çok işlevli bir protein olması ve çok sayıda proteinle etkileşime girebilme yeteneği, onu birçok farklı fizyolojik fonksiyonun potansiyel bir düzenleyicisi haline getirmektedir (Satelli ve Li, 2011). Örneğin, vimentinin bir MAP kinaz olan fosforillenmiş Erk (pErk) ile etkileşime girdiği ve onu defosforilasyondan koruduğu gösterilmiştir (Perlson ve diğ., 2006). AKT1 kinazın, fosforillenmiş vimentini bağladığı ve onu hücre hareketliliğinin artmasına ve yumuşak doku sarkoma (STS) hücrelerinin invazyonuna yol açan kaspaz kaynaklı proteolizden koruduğu gösterilmiştir (Zhu ve diğ., 2011). 14-3-3 proteinleri çok sayıda hücre sinyalleşme ve hücre döngüsü işlemine katılır. Fosforillenmiş vimentinin, 14-3-3 proteini ile etkileşime girdiği, Raf-14-3-3 ve diğer bu tür komplekslerin birleştirilmesini önlediği, böylece vimentinin, 14-3-3 komplekslerini düzenleyerek çeşitli hücre içi sinyal ve hücre döngüsü kontrol yollarını düzenlediğini öne sürmüşlerdir (Tzivion ve diğ., 2000). Hücre göçünde rol alan bir protein olan Scrib, vimentin ile etkileşime girdiğinde proteozomal bozulmaya karşı korunmaktadır. Bu durum, EMT sırasında vimentindeki artışın, hücrelerin invaziv kapasitesini arttırmak amacıyla yönlendirilmiş hücre göçünü teşvik etmek için Scrib'in stabilizasyonunu sağladığı ihtimalini ortaya koymaktadır (Phua ve diğ., 2009). Vimentinin, reseptör tirozin kinaz olan Axl 'in bir regülatörü olarak görev yaptığı ve Axl'i indükleyerek hücre göçünü arttırdığı gösterilmiştir (Vuoriluoto ve diğ., 2011). Bütün bu bilgiler doğrultusunda, vimentinin bir iskele proteini olmasının yanında çeşitli sinyal yollarına ve hücresel işlemlere de aracılık ettiği ortadadır.

Kanserde fazla eksprese edilen sitoplazmik poliadenilasyon element bağlama proteini 4 (CPEB4)'ün meme kanserindeki metastaz ve kanser ilerlemesi üzerindeki etkilerini ortaya koymayı hedefleyen Lu ve diğ. (2017), CPEB4'ün aşırı ekspresyonunun EMT'yi dolayısıyla meme kanseri hücrelerinin göçünü ve invazyonunu önemli ölçüde arttırdığını rapor etmişlerdir. CPEB4'ü susturmanın ise bu olayları ve *vimentin* ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını böylelikle metastatik ilerlemedeki ilk basamakları düzenleyen önemli bir mekanizma olan EMT ile CPEB4 arasında potansiyel bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir. CPEB4'ün *vimentin* ekspresyonunu düzenleyerek meme kanserinde EMT ve metastazı desteklediği gösterilmiştir.

Knockdown vimentin'in, meme kanseri hücrelerinde CPEB4 kaynaklı göç ve invazyonu çarpıcı bir şekilde tersine çevirdiği ortaya konmuştur. Bu bağlamda CPEB4'ün meme kanseri tedavisi ve prognoz öngörüsü için potansiyel bir moleküler belirteç olarak görev yapabileceği önerilmiştir. Ek olarak bütün bu bulgular ışığında, CPEB4 ve vimentin arasındaki etkileşimi hedeflemenin meme kanseri için etkili bir kanser terapisi olabileceği de ileri sürülmüştür.

EMT geçiren hücreler, epitel hücre-hücre temas kaybı (E-kaderin), MMP indüksiyonu ve metastatik ilerlemeyi teşvik ederek hareketliliğe neden olan ara filamentlerin (vimentin) artışı ile tarif edilir (Kalluri, 2009). Yaygın olarak mezenkimal dokularda eksprese edilen ve EMT markörü olan vimentini hedeflemek için FiVe1'i kullanan Bollong ve diğ. (2017) bu yolla yapılan tedavinin mezenkimal hücrelerin epitel benzeri duruma dönüşünü teşvik eden, ubiquitin (Ub)-proteozom bağımlı bir mekanizma yoluyla vimentin bozulmasını desteklediğini göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmada EMT sonrası hücrelerde vimentin yıkımının, hücresel morfolojiyi yeniden düzenlediği ve göç kapasitesini inhibe ettiği, vimentini hedeflemenin EMT'nin neden olduğu CSC özelliklerini antagonize edebileceği fikri vurgulanmıştır. Tüm hücrelerde bulunan filamentli proteinleri hedef alan diğer mitoz inhibe edici ilaçların (örneğin taksol) aksine, FiVe1'in sadece vimentin eksprese eden hücrelerde mitotik kusurları indüklemesi FiVe1'i diğer tedavi yöntemlerinden ayırdığı ön plana çıkarılmıştır. Bunun yanında vimentinin mezenkimal dokularda sınırlı kalması, vimentin hedeflemesinin, geleneksel kemoterapilerden daha az yan etki yaratacağını ileri sürmüşlerdir. FiVe1 tedavisinin, farklı histolojik orijinli altı STS hücre hattının büyümesini inhibe ettiğini ortaya koyan Bollong ve diğ. (2017), vimentin hedeflemesinin EMT sonrası CSC'lerin büyümesini inhibe etmesinin yanı sıra mezenkimal kanserlerin büyümesini de büyük ölçüde engellediğinin altını çizmişlerdir.

Ara filamentlerin fonksiyonunun post-translasyonel modifikasyonlardan çeşitli şekillerde etkilendiği ortaya konmuştur (Leduc ve Etienne-Manneville, 2015). Bunun yanı sıra, fosforilasyon süreci vimentinin polimerizasyon dinamiklerinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Inagaki ve diğ., 1996). Vimentin gibi IF proteinleri, birkaç kinaz için iyi substratlardır ve vimentinin birçok Protein Kinaz C (PKC) bölgesi tanımlanmıştır (Ku ve diğ., 1998; Yasui ve diğ., 2001). Vimentinin PKC aracılı fosforilasyonunun hücre içerisindeki integrin trafiğinde kilit bir işlem olduğu rapor edilmiştir (Ivaska ve diğ., 2005). *Vimentin*'in aşırı ekspresyonunun, hücre hareketliliğini arttırırken, PKCε/- hücrelerde bunun aksine ektopik vimentin etkisi gözlenmemiştir. Bu bulgular, vimentinin hücrelerin göçünü PKCε

bağımlı şekilde gerçekleştirdiğine kanıt sağlamaktadır. Özetle, burada sunulan kanıtlar, β 1-integrinlerin plazma membranına geri dönüşümü için vimentin üzerindeki amino terminal bölgelerin PKC ϵ tarafından fosforillenmesi gerektiğini göstermektedir. Bu bölgelerde meydana gelen mutasyonlar neticesinde oluşan inhibisyona paralel olarak hücre hareketliliği azalmaktadır. Ek olarak, filaminin vimentinin PKC tarafından fosforilasyonunu kolaylaştırdığını ve integrinin plazma zarına dönüşümünü teşvik ettiği gösterilmiştir. Böylece, integrinin hücre yüzeyi ekspresyonu dolayısıyla hücre yapışması ve yayılması artarken, filamin A'nın yokluğunda ise vimentinin PKC tarafından fosforilasyonunun meydana gelmediği bildirilmiştir (Macpherson ve Fagerholm, 2010). Yukarıdaki çalışmalardan da anlaşılabileceği üzere, vimentin fonksiyonu fosforilasyon süreci ile direkt olarak bağlantılıdır. Dolayısıyla vimentin ekspresyonundaki artış her zaman malign karakterle ilişkili olmayabilir. Daha önce Kaptan ve diğ. (2018) tarafından MAL uygulaması sonrasında hücre hareketliliğinde meydana gelen azalmaya karşın, bizim çalışmamızda MAL uygulamasıyla artan vimentin ekspresyonunu, vimentinin fosforilasyon sürecinde rol alan enzimler üzerinden değerlendirmenin daha sağlıklı bir yaklaşım olacağı kanaatindeyiz.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattına MAL uygulanması sonrasında elde edilen transkriptom analiz sonuçları *CHFR* (checkpoint with forkhead associated and ring finger domains)'nin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığını göstermektedir. *CHFR* geni, 12q24.33 kromozomunda bulunur. Kif22 (Maddika ve diğ., 2009), PLK1 (Polo benzeri kinaz) (Shtivelman, 2003) ve Aurora A (Yu ve diğ., 2005) gibi mitozla ilişkili onkoproteinlerin ubiquitinasyona bağlı bozulmasını teşvik etmek için bir E3 Ub ligazını kodlar. *CHFR* bir nükleer proteindir ve mikrotübül inhibitörlerinin neden olduğu mitotik strese yanıt olarak profazdan metafaza geçişi geciktiren erken bir mitotik kontrol noktası işlevi görür (Scolnick ve Halazonetis, 2000). *CHFR*, tüm normal dokuların sitoplazmasında eksprese edilir ve mikrotübül bozunması ya da radyasyona bağlı hasar stresine cevap olarak nukleusta birikir (Shtivelman, 2003). *CHFR*'nin mitotik kontrol noktasında nasıl davrandığı veya mitotik strese cevap olarak nasıl düzenlendiği tam olarak anlaşılmamıştır. *CHFR* bir N-terminal FHA domaini, merkezi bir “RING finger” domaini ve C-terminalinde sistein bakımından zengin (CR) bir bölge içerir. Mitotik kontrol noktası için FHA domain gereklidir (Scolnick ve Halazonetis, 2000). Ek olarak, FHA domaininin, Nükleer faktör κ B (NF- κ B) sinyalleşmesinin engellenmesi için gerekli olduğu bilinmektedir (Kashima ve diğ., 2009). *CHFR*'nin *RING finger* domaini, E3 Ub ligaz olarak işlevine aracılık eder ve *CHFR*, sırasıyla hedef protein yıkımını ve

değiştirici protein fonksiyonunu destekleyen lizin 48 (Lys-48)-bağlı ve lizin 63 (Lys-63)-bağlı poli-ubikitinasyon zincirlerinin sentezini katalizler (Chaturvedi ve diğ., 2002; Bothos ve diğ., 2003). Daha sonraları, CHFR'nin CR bölgesinde yeni bir poli ADP-riboz bağlayan çinko *finger* (PBZ) motifi tanımlanmıştır (Ahel ve diğ., 2008).

CHFR eksikliği olan fareler, kansere yatkındır (Yu ve diğ., 2005), bu da CHFR proteininin bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü gösterir (Toyota ve diğ., 2003; Privette ve Petty, 2008). Kromozomal bütünlüğün kontrolünde anahtar bir oyuncu olarak tanımlanan CHFR (Scolnick ve Halazonetis, 2000) diğer mitotik kontrol noktası genleriyle karşılaştırıldığında, *CHFR*'nin kanser hücrelerinde daha sık inaktive edildiği bilinmektedir (Scolnick ve Halazonetis, 2000). Kanserlerde *CHFR* inaktivasyonunun, promotör CpG ada metilasyonunun bir sonucu olabileceği ileri sürülmüştür ve bazı kanserlerde *CHFR* hipermetilasyonu olduğu bildirilmiştir (Derks ve diğ., 2014). Örneğin, *CHFR* mRNA'sının ekspresyonu mide kanserinde %53 azalmıştır ve bu azalmanın %16'sının DNA metilasyonundan kaynaklandığı bulunmuştur (Privette ve Petty, 2008). *CHFR* inaktivasyonu ile kanser prognozu arasındaki ilişki yaygın olarak incelenmiştir. Yapılan immünohistokimyasal analizler, azalmış CHFR protein seviyesinin akciğerde sigara ile ilişkili skuamoz hücreli karsinomun kötü prognozu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Takeshita ve diğ., 2008). Araştırmalar, CHFR'nin kanser hücrelerinde büyüme hızı, invazyon, hareketlilik ve genomik stabilitenin düzenlenmesi gibi birçok olayda rol oynayabileceğini rapor etmiştir (Privette ve diğ., 2007; Privette ve diğ., 2008).

Dai ve diğ. (2019) tarafından yapılan çalışma *CHFR* promotörlerinin metilasyonunun mide kanseri ile ilişkili olduğunu ve mide kanseri sürecinde koruyucu bir rol oynadığını göstermiştir. Profazdan metafaza hızlı geçişe neden olan *CHFR* inaktivasyonunun, hücrelerin mikrotübül inhibitörlerine duyarlılığının bir nedeni olabileceği ileri sürülmüştür (Satoh ve diğ., 2003; Koga ve diğ., 2006). Bir mikrotübül inhibitörü olan docetaxel ile tedavi edilen gastrik kanser hastalarının sağ kalımının *CHFR* metillenmiş grupta metillenmemiş gruba göre daha uzun olması sonucundan yola çıkan Dai ve diğ. (2019) gastrik kanserde *CHFR* metilasyonunun koruyucu rolünün, mikrotübül inhibitörlerinin duyarlılığının değişmesinin bir sonucu olabileceğini varsaymıştır. Bunun yanında başka bir mikrotübül inhibitörü olan oksaliptin ile tedavi edilen gastrik kanser hastalarının sağ kalımının metillenmiş ve metillenmemiş *CHFR* grupları arasında anlamlı bir fark ortaya koymadığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın aksine Yang ve diğ. (2019) yaptıkları çalışmada CHFR'nin insan mide kanserinde hücre göçünü

desteklediğini bildirmişlerdir. Keşfedildiğinden beri bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilen CHFR'nin mide kanseri hastalarının genel sağ kalımı ile negatif ilişkili olduğunu ve metastatik mide kanseri dokularında aşırı eksprese edildiğini belirtmişlerdir. Ek olarak CHFR'nin mide kanser hücrelerinde Histon deasetilaz 1 (HDAC1)'in inhibisyonu ile EMT'yi indükleyerek hücre göçünü teşvik eden bir onkogen olarak işlev gördüğünü açıklamışlardır. Bu nedenle, CHFR/HDAC1/EMT eksenini, mide kanserinin, özellikle metastatik tümörlerin tedavisi için yeni bir moleküler terapötik hedef olarak önermişlerdir. Zhang ve diğ. (2017a) tarafından yapılan çalışma pankreatik kanser hücrelerinde *CHFR*'nin aşırı ekspresyonunun, proliferasyonun, hücre göçünün ve invazyonun azalmasına yol açtığı rapor edilmiştir. Ayrıca *CHFR*'yi aşırı eksprese eden pankreas kanser hücreleri çoğalmanın G₁ fazında tutuklu kalmışlardır. CHFR'nin pankreas kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü bildiren Zhang ve diğ. (2017a) CHFR'nin pankreas kanseri hücrelerinin hücre döngüsünü kontrol etmedeki potansiyel rolünü de vurgulamışlardır. Kashima ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada *CHFR* ve poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP-1) ekspresyonu arasında negatif bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. *CHFR* knockout farelerden ve *CHFR* susturulmuş primer mide kanseri dokularından alınan hücrelerin, yüksek PARP-1 protein seviyesinin, CHFR ve PARP-1 arasındaki etkileşimin hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve kanser ile ilgili tedavi yaklaşımlarında önemli bir rol oynadığına dair veriler ortaya koymuşlardır. CHFR ile ilgili ortaya konulan bu bilgiler ışığında, anaplastik tiroid kanser hücre soyu olan 8505C hücrelerine MAL uygulanması sonucu *CHFR* transkriptlerindeki artış anti-proliferatif etkinin sebebi olarak düşünülebilir. Şöyle ki; hücre döngüsünün kontrol geni olan CHFR'nin ekspresyonundaki artış kontrolsüz hücre bölünmesini engelleyerek anti-proliferatif etkiyi desteklemiş olabilir.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattına MAL uygulanması sonrasında elde edilen transkriptom analiz sonuçları *S100A6*'nın kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığını göstermektedir. S100 gen ailesi, EF-hand (helix-loop-helix) tipi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin en büyük alt ailesidir (Donato, 2001). Şimdiye kadar bu alt grubun en az 25 ayrı üyesi tanımlanmıştır (Chen ve diğ., 2014) ve S100 proteinleri birbirleriyle homodimerik veya heterodimerik kompleksler oluştururlar (Donato, 1999). Kalsiyum bağlanması sonucunda, çoğu S100 proteini konformasyonel bir değişime uğrar, böylece proteinin farklı protein hedefleriyle etkileşime girmesine izin vererek bir dizi hücre içi ve hücre dışı işlev gösterir. Hücre içi fonksiyonları arasında kalsiyum homeostazının düzenlenmesi, hücre döngüsü, hücre büyümesi ve göçü, fosforilasyon, hücre iskeleti bileşenleri ve transkripsiyonel faktörlerin düzenlenmesi

bulunur. Hücre içi fonksiyonun aksine, hücre dışı S100 proteinleri, gelişmiş glikasyon son ürünleri (RAGE) ve Toll-like reseptörler (TLRs) gibi hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak sitokin benzeri etki oluşturlar (Heizmann ve diğ., 2002; Donato, 2003). *S100A6* geni, neoplazide kromozomal anormalliklerin sıkça meydana geldiği insan kromozomu 1q21'de bulunur (Heizmann ve diğ., 2002). S100 kalsiyum bağlayıcı protein ailesinin bir üyesi olan S100A6; hücre içi bir protein olarak proliferasyon, apoptoz, hücre iskeleti dinamikleri ve farklı stres faktörlerine hücrel cevap gibi çeşitli hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde rol almaktadır (Donato ve diğ., 2017). Çalışmalar, S100A6'nın, karsinogenez ve kanser ilerlemesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Örneğin, S100A6'nın kolorektal kanser hücrelerinde (Duan ve diğ., 2014), pankreas kanseri hücrelerinde (Nedjadi ve diğ., 2007; Nedjadi ve diğ., 2009) ve diğer malign tümör hücrelerinde (Li ve diğ., 2014; Li ve diğ., 2015) proliferasyon ve göçü desteklediğine dair kanıtlar mevcuttur. Ayrıca, S100A6'nın mide kanser hastalarının kötü prognozuyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2010). Benzer şekilde S100A6'nın osteosarkom hücrelerinin PI3K/Akt sinyal yoluyla proliferasyonunu ve göçünü destekleyebileceği gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2013). S100A6'nın PI3K/Akt (Li ve diğ., 2014), Wnt/ β -katenin (Kilańczyk ve diğ., 2012; Chen ve diğ., 2015), p38 MAPK (Li ve diğ., 2017) ve NF- κ B (Joo ve diğ., 2003) sinyali gibi bir dizi sinyalleşme yolunda yer aldığı gösterilmiştir.

Li ve diğ. (2018) , S100A6'nın servikal kanser hücrelerinin proliferasyon ve göçü ile ilişkili moleküler mekanizmalar üzerindeki etkisini araştırmayı hedeflemiştir. Bu amaç doğrultusunda; *S100A6*'nın aşırı ekspresyonunun, servikal kanser hücrelerinde N-kaderin, vimentin, snail ve twist seviyelerini arttırdığı ve PI3K/Akt sinyal yolunu aktive ettiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak S100A6'nın servikal kanser hücrelerinin malign potansiyelini, özellikle PI3K/Akt sinyal yolunu aktive ederek metastatik yeteneği ve EMT'yi kolaylaştırdığını göstermişlerdir. Li ve diğ. (2018) S100A6'nın servikal kanser hücrelerindeki proliferasyonu destekleyici etkisini kolorektal kanser (Duan ve diğ., 2014), hepatoselüler karsinoma (HCC) (Hua ve diğ., 2011; Li ve diğ., 2014) ve osteosarkomda (Li ve diğ., 2015) S100A6'nın etkilerini gösteren önceki çalışmalarla uyumlu şekilde bulmuşlardır. Çalışmada, S100A6'nın servikal kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceği ileri sürülmüştür. *S100A6*; meme, mide, pankreas, kolon kanserinde ve melanomda aşırı eksprese edilirken prostat ve oral kanserde ekspresyonu azdır (Chen ve diğ., 2014). Öte yandan, S100A6'nın p53 ile kalsiyum bağımlı bir şekilde etkileşime girdiği ve p53 transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı böylece p53'ün apoptotik etkisini

kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Slomnicki ve diğ., 2009). S100A6'nın, RAGE'ye bağlı JNK aktivitesini arttırarak hücre apoptozunu tetiklediği gösterilmiştir (Leclerc ve diğ., 2007). Ayrıca, S100A6 artışının karaciğer kanseri hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesini etkileyerek apoptozu arttırdığı böylelikle hücre canlılığını azalttığı rapor edilmiştir (Joo ve diğ., 2008). CacyBP/SIP; S100A6, S100A1, S100A12, S100B ve S100P'ye Ca^{+2} bağımlı bir şekilde bağlanan yeni bir hedeftir (Filipek ve diğ., 2002). Ning ve diğ. (2007) yaptıkları çalışmada, kalsiyum-bağlayıcı S100 protein ailesi için bir hedef olan *CacyBP/SIP*'nin aşırı ekspresyonunun mide kanserinde invaziv yeteneğin azalmasına yol açtığını bildirmiştir. Tersine, siRNA aracılı *CacyBP/SIP* susturulması, hücrelerin artan invaziv potansiyeli ile karakterize edilmiştir. Bu nedenle, *CacyBP/SIP*'nin mide kanserinde invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Li ve diğ. (2017) S100A6'nın nazofarinks karsinomunun (NPC) gelişimindeki rolünün altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmayı hedeflemişlerdir. Bu amaçla yapılan; *S100A6*'nın susturulması, NPC hücre çoğalmasını, p38/MAPK aktivitesini *in vitro* olarak önemli ölçüde azalttığını ve NPC ksenograft fare modelinde tümör büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Buna karşılık, *S100A6*'nın plazmid transfeksiyonu yoluyla aşırı eksprese edilmesinin, artan NPC hücre proliferasyonu ve p38/MAPK aktivasyonu ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Bu bulgular sonucunda Li ve diğ (2017), NPC için potansiyel bir terapötik hedef olarak S100A6/p38/MAPK sinyalini işaret etmişlerdir. Tiroid karsinomasında aşırı eksprese edilen *S100A6*'nın (Ito ve diğ., 2005) papiller tiroid karsinomunun ilerlemesinde ve gelişiminde anahtar rol oynadığı önerilmektedir (Zhao ve diğ., 2016). Ayrıca, *S100A6* ekspresyonunun ATC, PTC ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde azaldığı rapor edilmiştir ve S100A6'nın bu karsinomun ilerlemesi için gerekli olmadığı belirtilmiştir (Ito ve diğ., 2005). Dolayısıyla çalışmamızda MAL lektin uygulamasıyla ATC hücrelerinde *S100A6* transkriptlerinde meydana gelen artış, anti tümöral etkinin oluşmasında önemsiz gibi görünmektedir. Ancak, S100A6 ekspresyonunun ATC hücrelerindeki rolü ile ilgili kesin bir yargıya varmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattına MAL uygulanması sonrasında elde edilen transkriptom analiz sonuçlarında *DLG2* (Disks Large Homolog 2)'nin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır. DLG, membran guanilat kinazlar veya MAGUK'lar olarak bilinen moleküler iskele proteinleri ailesine ait multi-PDZ domaini içeren bir proteindir (Roberts ve diğ., 2012). *Drosophila*'daki DLG'nin genetik analizleri, epitel hücrelerin apiko-bazal polaritesinin yanı sıra asimetrik hücre bölünmesi ve invazyon gibi diğer polarite

işlemlerinin düzenlenmesi de dahil olmak üzere birçok biyolojik işlemde DLG'ye rol tanımlamaktadır (Oliva ve diğ., 2012). DLG fonksiyonunun bozulması kontrolsüz epitel hücre proliferasyonuna ve neoplastik transformasyona yol açar (Woods ve Bryant, 1989), bu durum DLG'nin potansiyel bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü ortaya koyar (Bilder ve Perrimon, 2000). *Drosophila*'da bulunan tek *DLG* geninin aksine, memelilerde *DLG1-4* olmak üzere dört adet *DLG* tanımlanmıştır (Roberts ve diğ., 2012). DLG1, DLG4 ve GPCR'ler gibi PDZ alanı içeren proteinler arasındaki fonksiyonel etkileşimler, kanser dahil birçok hastalıkla ilişkilidir (Dunn ve Ferguson, 2015). Bu bilgi ışığında, "Multi-species Prediction" (IMP) veri tabanını kullanarak DLG2'nin de GPCR sinyal yolunda bulunduğunu göstermişlerdir (Shao ve diğ., 2019). Bu nedenle, DLG2'nin tümör baskılayıcı fonksiyonuna, kısmen GTPaz sinyal yolunu modüle ederek aracılık etmesinin, muhtemel olduğu ileri sürülmüştür. DLG2'yi kemik tümörü baskılayıcısı olarak tanımlayan Shao ve diğ. (2019) DLG2'nin GTPaz sinyalinin ve 3D doku kültürü modelinde proliferasyon ve hücre döngüsünün düzenleyicisi olduğunu bildirmişlerdir. Retinoik Asit Reseptör Yanıtlayıcı 1 (RARRES1), kanserde ve yaşlanan normal hücrelerde sıklıkla susturulmuş olan bir karboksipeptidaz inhibitörü ve tümör baskılayıcısıdır (Wu ve diğ., 2006). Prostat epitel hücresi olan PWR-1E'de RARRES1 *knockdown*, hücre-hücre bağlantılarında iskele görevi gören bir neoplastik tümör baskılayıcı olan DLG2'nin artışı ile sonuçlanmıştır (Sahab ve diğ., 2010).

DLG2 homologunun, böbreğin iyi huylu bir tümörü olan onkositomda arttığı gösterilmiştir ve bu nedenle onkogen olarak kabul edilmiştir (Zubakov ve diğ., 2006). DLG2'nin yeni izoformu Renal onkositom (RO)'da yüksek oranda ifade edilirken diğer böbrek tümörlerinde ve normal böbrek dokularında düşük ekspresyon seviyesi göstermektedir. Zubakov ve diğ. (2006) DLG2'nin yeni izoformunun RO'da moleküler bir belirteç olarak umut verici aday bir gen olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ortak kırılma bölgeleri ("Common Fragile Sites", CFS), önemli tümör baskılayıcıları olduğu bilinen son derece büyük genleri kapsayan, şiddetli genomik kararsızlığı olan büyük bölgelerdir. Bu bölgelerin farklı kanserlerde delesyonlar, translokasyonlar ve diğer değişiklikler için sıcak noktalar olduğu bulunmuştur. Gao ve diğ. (2014) orofaringeal skuamöz hücre karsinomunda (OPSCC) altı büyük CFS geninin (PARK2, DLG2, NBEA, CTNNA3, DMD ve FHIT) ekspresyonlarının azalmasının tümör nüksüyle ilişkili olduğunu ve bu genlerin, OPSCC'de tümör nüksünü öngörmede potansiyel prognostik belirteçler olabileceğini önermişlerdir. Bu farklı fonksiyonel bulgulara rağmen, çalışmamızda

ortaya çıkan anti-tümöral etki, anaplastik tiroid kanserinde DLG2'nin tümör baskılayıcı fonksiyonuna atfedilebilir.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattına MAL uygulanması sonrasında elde edilen transkriptom analiz sonuçları *SLC35F2* (Solute Carrier Family Member 35 F2)'nin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığını ortaya koymaktadır. *SLC35F2* geni, Ras onkogen ailesinin bir üyesi olan *RAB39*'a yakın olan 11q22.3 kromozomu üzerinde bulunur (Bu ve diğ., 2011). Nükleotid şeker taşıyıcı proteinini kodlayan SLC35 geni, 320-400 amino asit bakiyeden oluşan bir hidrofobindir. SLC35A-F olmak üzere 6 üyesi vardır. SLC35F2, metabolitler, kofaktörler, vitaminler, besinler, iyonlar ve ilaçlar gibi her tür substratın taşınmasında yer alan membran bağlı taşıyıcıların bir üst ailesi olan çözünen taşıyıcı ailesine aittir (He ve diğ., 2018). SLC35F2'nin NSCLC dokularında yüksek oranda eksprese edildiğini ve patolojik evre ile ilişkili olduğunu ortaya koyan Bu ve diğ. (2011) *SLC35F2*'nin NSCLC için yeni bir terapötik hedef olabileceğini ortaya koymuşlardır. Li ve diğ. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada SLC35F2 susturulması sonucunda akciğer kanseri H1299 hücre hattında proliferasyon hızının azaldığı bildirilmiştir. Bunun nedenini, hücrelerin içinde nükleotid şekerinin ters taşınması sonucunda çoğalma için gerekli materyallerin sentezinin kısıtlanması olabileceği yönünde açıklamışlardır. SLC35F2 geninin inhibe edilmesinden sonra hücrelerin göç ve invazyon kapasitelerinin azaldığı; bu sebeple SLC35F2'nin, akciğer kanseri hücrelerinin periferik dokulara göçünde ve invazyonunda önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. YM155 (sepantronyum bromid), NSCLC, metastatik meme kanseri ve Hodgkin olmayan lenfoma dahil olmak üzere çeşitli maligniteler için klinik olarak değerlendirilen *in vitro* ve *in vivo* anti-tümör aktivitesine sahip küçük molekülü bir ajandır (Tolcher ve diğ., 2008). YM155'in, SLC35F2'nin ekspresyonuna ve ilaç alma aktivitesine bağlı olarak interkalasyon yoluyla DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir (Winter ve diğ., 2014). Bu gen-ilac etkileşiminin, yüksek seviyelerde SLC35F2 ekspresyonu olan tümör hücrelerine güvenli ve spesifik bir DNA hasarı hedefleme stratejisi sağlayabileceğini önermişlerdir (Winter ve diğ., 2014).

SLC35F2'nin, PTC dokularında hem protein hem de mRNA ekspresyon seviyesinin bitişik normal dokularla karşılaştırıldığında belirgin şekilde fazla olduğu bildirilmiştir. *SLC35F2*'nin yüksek ekspresyonunun PTC'li hastalarda lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu çalışmanın bir diğer sonucudur. CRISPR/Cas9 aracılı *SLC35F2 knockout*, hücre çoğalması, göç ve invazyon dahil olmak üzere PTC'nin tümörjenik özelliklerini zayıflatmıştır. SLC35F2, transforme

büyüme faktörü β tip I reseptörünü (TGF β R1) ve apoptoz sinyal düzenleyicisinin (pASK-1) fosforilasyonunu hedef alarak, PTC hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü hızlandırdığı, böylelikle MAPK sinyal yolunu aktive ettiği rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışma, yeni tanımlanan SLC35F2/TGF β R1/ASK-1 ekseninin insan PTC hücrelerinde MAPK yolu aktivasyonuna aracılık eden hücresel mekanizmalar hakkında yeni bir bakış açısı sağlamakla birlikte PTC için yeni, potansiyel bir terapötik hedefi temsil etmektedir (He ve diğ., 2018). Sodyum iyodür simporteri olan SLC5A, tiroid hormonu biyosentezini kolaylaştırmak için iyot anyonunun (I^-) tiroid foliküler hücrelere taşınmasına aracılık eder (Smanik ve diğ., 1996). SLC5A'nın gen polimorfizmi, farklılaşmış tiroid kanseri riskini ortaya koymuştur (Al-Rasheed ve diğ., 2015). Hu ve diğ. (2006), SLC5A8'in hipermetilasyonunun, PTC'de tümörlerin ileri evresi ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, SLC5A8'in metilasyonu, PTC gelişimi sırasında en sık görülen genetik olay olan BRAF V600E mutasyonu ile ilişkilidir (Porra ve diğ., 2005). Tiroid kanserinin farklı türlerinde yapılan çalışmalar, ele alınan aynı molekülün PTC ve ATC'de farklı etkilere neden olduğu bilinmektedir (Ito ve diğ., 2005). Her ne kadar, MAL uygulanması sonucu ATC hücrelerinde SLC35F2'nin artışı anti-tümöral etkiyi desteklemiyor gibi dursa da, SLC35F2'nin ATC hücrelerindeki rolü ile ilgili araştırmaların detaylı olarak yapılması gerekmektedir.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattına MAL uygulanması sonrasında elde edilen transkriptom analiz sonuçları ATP1A1 (AL136376.1)'in kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığını göstermektedir. Na/K-ATPaz (NKA), üç tip polipeptit (α ve β alt birimleri ve FXYD proteinleri) içeren P tipi ATPaz ailesinin en belirgin üyesidir. İnsanlarda dört farklı α izoformu (ATP1A1-1A4) ve üç farklı β izoformu (ATP1B1-1B3) tanımlanmıştır (Mijatovic ve diğ., 2007a; Mijatovic ve diğ., 2007b). Spesifik olarak, hidrolize edilmiş ATP molekülü başına bir hücreye üç Na iyonu ve iki K iyonu pompalayarak plazma zarında bir elektrokimyasal gradient oluşturur. Ek olarak, NKA, hücre bağlantılarında, adezyonda, hareketlilikte ve sinyal iletiminde rol oynayan çok işlevli bir proteindir (Xie ve Askari, 2002; Rajasekaran ve Rajasekaran, 2003). Na⁺/K⁺-ATPaz ayrıca bir sinyal iletilci reseptörü olarak da işlev görebilir ve bu sinyal iletiminin işlevi çoğunlukla $\alpha 1$ alt ünitesine (ATP1A1) atfedilir (Li ve diğ., 2011; Lan ve diğ., 2019). NKA'nın, çeşitli insan kanserlerinde anormal ifadesi ve etkinliği göz önüne alındığında, anti-kanser tedavisinde yeni bir hedef olarak düşünülebilir (Shen ve diğ., 1978; Yang ve diğ., 2014). Bununla birlikte, NKA alt birimlerinin düzenlenmesi kanserler arasında değişmektedir; bu nedenle, tümör gelişimindeki rolü belirsizliğini korumaktadır.

Zhuang ve diğ. (2015), insan HCC örneklerinde NKA α alt birimlerinin ekspresyon örüntüsünü tanımlamayı ve bu alt birimleri HCC tedavisi için potansiyel hedefler olarak değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Öncelikle, *ATP1A1* gen ekspresyonunun HCC örneklerinde bitişik normal dokulara göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanında, *ATP1A1* ekspresyonunun azaltılmasının, insan HCC hücrelerinde proliferasyonu ve göçü belirgin şekilde düşürdüğü ve tümöral özellikleri baskıladığı ortaya koyulmuştur. p53'ün aktivasyonunun oksidatif strese bir cevap niteliği taşıdığı ve hücre döngüsü kontrol noktası düzenlemesi için kritik olduğu bilinmektedir (Pflaum ve diğ., 2014). *ATP1A1* azalmasının hücre içi reaktif oksijen türlerinin birikmesine neden olduğunu böylece, artan ROS üretiminin, p53 aktivasyonunun *ATP1A1* susturulmuş hücrelerde proliferasyondaki azalmanın mekanizmalarından biri olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, Zhuang ve diğ. (2015) *ATP1A1*'in HCC gelişiminde önemli bir rol oynadığını ve HCC tedavisi için potansiyel bir hedef olduğunu önermişlerdir. *ATP1A1* ekspresyonu farklı tümör tiplerinde değişmektedir. *ATP1A1* ekspresyonu genellikle akciğer, karaciğer kanseri, glioblastoma ve melanom gibi kanser türlerinde artmaktadır (Mijatovic ve diğ., 2007; Lefranc ve diğ., 2008; Mathieu ve diğ., 2009; Zhuang ve diğ., 2015). Öte yandan *ATP1A1*'in ekspresyonu, prostat kansinomunda, normal ve hiperplazi gösteren prostat bezlerinden önemli ölçüde düşüktür. *ATP1A1*'in azalması, prostat kansinomunda NKA aktivitesinde bir azalmaya yol açmaktadır (Mobasheri ve diğ., 2003). Ek olarak kolorektal kanserde (Sakai ve diğ., 2004) ve renal kansinomada (Zhang ve diğ., 2017b) da *ATP1A* ekspresyonu düşüktür.

Lan ve diğ. (2019) tarafından yapılan çalışmada anti-kanser ajan olarak bilinen bufalinin (Takai ve diğ., 2012) potansiyel hedefinin *ATP1A1* olabileceği ileri sürülmüştür. Bufalin tarafından düzenlenen *ATP1A1* ve p53 sinyal aracılı mitokondriyal apoptotik yolları hedef alan tedavilerin, insan glioblastoma malignitesi için potansiyel tedavi yaklaşımı olabileceği vurgulanmıştır. Benzer şekilde başka bir çalışmada, perillil alkolün glioblastoma hücre hattında NKA ve Src aktivasyonunun baskılanmasıyla *ATP1A1* hedefli bir anti-tümör etki mekanizmasına sahip olduğu açıklanmıştır (Garcia ve diğ., 2015). Zhang ve diğ. (2017b) tarafından yapılan bir çalışma *ATP1A1* mRNA'sının RCC'de azaldığını ve *ATP1A1*'in azalması ile yüksek RCC tümör dereceleri ve hastanın kötü prognozu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda, *ATP1A1* pozitif olan RCC hastalarının, *ATP1A1* negatif hastalardan daha uzun sağ kalım süresine sahip olduğu gösterilmiştir. *ATP1A1*'in yükselişinin, muhtemelen ROS üretimini artırarak RCC hücre çoğalmasını ve hücre göçünü inhibe ettiği, *ATP1A1* aracılı

Raf/MEK/ERK sinyal yolunu baskılayarak hücre apoptozunu indüklediği gösterilmiştir. Bu bulgular ATP1A1'in RCC'de tümör baskılayıcı olarak rol üstlendiğinin doğrudan kanıtı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, ATP1A1'i anti-tümör ilacı geliştirmek veya terapi verimliliğini izlemek için umut verici bir tümör belirteci olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yukarıdaki bilgiler, ATP1A1'in farklı kanser türleri için farklı fonksiyonlarına atfetmektedir. ATC hücrelerine MAL uygulanmasıyla artan *ATP1A1*'in seviyesi ve saptanan anti-tümöral etki göz önüne alındığında, ATP1A1'in bu hücrelerde de malign karakterlerin baskılanmasında rolü olabileceği düşünülebilir. Ancak daha kapsamlı çalışmalarla etki mekanizması aydınlatılmalıdır.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattına MAL uygulanması sonrasında elde edilen transkriptom analiz sonuçları *CTNNA3*'ün kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığını ortaya koymaktadır. Alfa-kateninler, polarize olmuş hücrelerin (örn., Epitelyal hücrelerin), zonula adherens bağlantılarında bulunan bir transmembran hücre adezyon molekül ailesi olan klasik kaderinlerin sitoplazmik domaini ile ilişkili proteinlerdir. Fare ve insanda eksprese edilen üç α -katenin izoformu vardır: α E-katenin (*CTNNA1*), α N-katenin (*CTNNA2*) ve α T-katenin (*CTNNA3*). Alfa-kateninler, üç vinkulin homoloji domaini, N-terminal β -katenin bağlama bölgesi ve F-aktin ile etkileşime giren bir C-terminal domaini içerir ve kaderin/ β -katenin kompleksinin aktin hücre iskeleti ile bağlantısını kolaylaştırır (Kobielak ve Fuchs, 2004). Normal epitelde bol miktarda bulunan ve kanserlerde azalan (Kobielak ve Fuchs, 2004) adezyon-bağlantı proteinlerinin karsinogeneze ve birçok kanser türünün metastazına katkı sağladığı bilinmektedir (Perez-Moreno ve diğ., 2003). Zonula adherens, transmembran E-kaderin, β -katenin ve α -katenin tarafından oluşturulur (Kobielak ve Fuchs, 2004). Alfa-katenin, aktin hücre iskeleti ile yapışma bağlantılarını bütünleştirir ve hücreler arası yapışmayı teşvik edebilir (Kobielak ve Fuchs, 2004). Alfa-kateninin, miyeloid lösemi (Liu ve diğ., 2007), glioblastoma (Ji ve diğ., 2011), deri kanseri (Schlegelmilch ve diğ., 2011) ve meme kanserinde (Piao ve diğ., 2014) tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü rapor edilmiştir. Alfa-kateninin izoformlarından biri olan *CTNNA3* ise sıklıkla laringeal karsinomlarda (Fanjul-Fernández ve diğ., 2013) mutasyona uğrar ve mesanenin ürotelyal karsinomunda düşük miktarda eksprese edilir (Meehan ve diğ., 2007). He ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada *CTNNA3*'ün, HCC hücre hatlarının çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu hücrelerde, *CTNNA3*, Akt sinyalini inhibe etmiştir, proliferatif hücre nükleer antijenini (PCNA) ve bir matriks metalloproteinazı olan MMP-9'u azaltmıştır ve hücre döngüsü inhibitörü

olan p21Cipl/Waf1'i arttırmıştır. Hücre dışı matriksin ve bazal membranların proteolitik yıkımında önemli bir rol oynayan MMP-9, Akt sinyal yollarıyla artırılabilir (Chen ve diğ., 2012). Bu nedenle, CTNNA3'ün, Akt sinyal yoluyla MMP-9'u inhibe ederek invazyonu önlediği ortaya konmuştur. Çalışmanın bir diğer sonucu ise CTNNA3'ün miRNA-425 tarafından inhibe edildiğidir. CTNNA3'ün tümör baskılayıcı işlevi ve miRNA-425'in onkogenik işlevi, *nude* farelerde HCC hücre ksenografında doğrulanmıştır. Dolayısıyla miRNA-425/CTNNA3 ekseninin, HCC'nin altında yatan mekanizmalar hakkında fikir vermesi ve HCC'nin potansiyel terapötik stratejisine katkısı açısından önemli olduğu vurgulanmıştır.

Fanjul-Fernandez ve diğ. (2013) *CTNNA2* ve *CTNNA3*'ün larinks karsinomlarda sıklıkla mutasyona uğramış tümör baskılayıcı genler olduğunu bildirmiştir. Larinks kanseri hastalarında bu genlerdeki mutasyonların, her iki α -katenin proteininde de fonksiyon kaybına neden olarak, göç ve invazyon kabiliyetinin artmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle, α -kateninler ve bunlarla ilişkili yollar, larinks karsinomlarının gelecekteki tedavisine katkıda bulunabilecek stratejilerin geliştirilmesi için yeni aday hedefler olarak gösterilmiştir. Ayrıca, *CTNNA3* periferik sinir kılıfı tümörlerinde de yeni bir tümör süpresör gen olarak tanımlanmıştır (Stahn ve diğ., 2016). Bu bulgular doğrultusunda, ATC hücrelerine MAL uygulanması sonucu oluşan anti-proliferatif etkinin artan CTNNA3'den kaynaklandığı sonucuna varılabilir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda ATC hücrelerinde MMP-9 varlığına işaret edilmektedir (Kaptan ve diğ., 2017) ve MAL uygulanması sonucu ATC hücrelerinde arttığını tespit ettiğimiz *CTNNA3*, muhtemelen MMP-9'u baskılayarak daha önceki çalışmalarda ortaya konan anti-invaziv etkinin sebebi olarak gösterilebilir.

Sonuçlarımız, 24 saat süreyle MAL'ye maruz kalan anaplastik tiroid hücre hattında *MTRNR2L1* (humanin like-1)'in anlamlı olarak arttığını göstermektedir. Bu gen, insan proteinini kodlayan mitokondriyal *MTRNR2* geninin sayısız nükleer kopyasından biridir (Bodzioch ve diğ., 2009). Bu nükleer kopyalar hakkında çok az şey bilinmesine rağmen, bazı araştırmacılar mitokondriyal humaninin insülin direnci ile bağlantılı olduğunu bildirmiştir (Kuliawat ve diğ., 2013). Bu gen ailesi, oldukça benzer küçük salgılayıcı 21-24 amino asitlik peptidleri kodlar. Başlangıçta Alzheimer hastalığı bağlamında hayatta kalma faktörleri olarak tanımlanırken (Hashimoto ve diğ., 2001), hücreleri oksidatif stres, açlık ve hipoksiden koruduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Yen ve diğ., 2013). Başka bir çalışma pro-oksidan (örn. Fe/Asc) ve pro-inflamatuar (örn. LPS) uyarıcılarının Caco-2/15 hücrelerinde *MTRNR2L1* mRNA ekspresyonunu

indüklediğini göstermiştir. Bu nedenle, hücredeki potansiyel humanin benzeri 1'in rolü, oksidatif stresin enterositler üzerindeki olumsuz etkilerini hafifletme girişimini temsil edebilir (Veilleux ve diğ., 2015). *MTRNR2L1*'in işlevi hakkında çok az bilgi mevcuttur ve yumurtalık kanserinin bir tipi olan yüksek derece seröz kanser (HGSC) ile ilişkisi şimdiye kadar saptanmamıştır. Ancak, *MTRNR2L1*'in ekspresyonu yumurtalık kanserinde 2-5 yıl ve 5-10 yıl hayatta kalma sürelerine sahip gruplarda uzun süreli hayatta kalan gruplara göre önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Engqvist ve diğ., 2018). Veilleux ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışma, şiddetli obez deneklerinin bağırsaklarında insülin direnci ile düzenlenen genleri tespit etmeyi hedeflemiştir. Humanin-benzeri 1 proteini kodlayan *MTRNR2L1* geninin mRNA'sının, insüline dirençli deneklerin bağırsaklarında insüline duyarlı deneklerin bağırsaklarına kıyasla arttığı gösterilmiştir. Quan ve diğ. (2015), Kaposi'nin sarkoma herpes virüsü (KSHV) ile enfekte lenfoma hücrelerinde KSHV miRNA'ları tarafından düzenlenen hedef genleri tanımlamayı amaçlamıştır. Bu çalışmada, *IPO5*, *EDA*, *NT5C3*, *WSB1*, *KCNS1*, *PRAM1* ve *MTRNR2L6* dahil olmak üzere KSHV miRNA'ların toplam 7 potansiyel hedef geni tanımlanmıştır. Bunlar arasında, *EDA*, *IPO5* ve *MTRNR2L6*, birçok KSHV miRNA tarafından düzenlenmiştir. Bu sonuçların, KSHV ile enfekte lenfoma hücrelerinin patogenezinin detaylı anlaşılmasını geliştirmesi ve ilerideki deneysel çalışmalar için teorik bir temel sağlaması açısından önem taşıdığı belirtilmiştir. Bu genin işlevselliği ile ilgili bilgi oldukça sınırlıdır. Dolayısıyla çalışmamızda MAL uygulanmış 8505C hücrelerinde bu genin transkriptlerindeki artış, MAL uygulamasının yarattığı strese hücrenin verdiği tepki olarak düşünülebilir. Ancak, MAL uygulaması sonucu pek çok hücresel sürecin etkilenmesi sonucu *MTRNR2L6*'deki artış yine de anti-proliferatif etkinin önüne geçemediği şeklinde açıklanabilir.

Yapılan transkriptom analiz sonuçları 24 saat süreyle MAL'ye maruz kalan anaplastik tiroid hattı hücrelerinde *ACTG-1* (γ -actin-1) ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Aktinler, diğer fonksiyonlarının yanı sıra hücre hareketliliğinde ve hücre iskeletinin korunmasında rol oynayan yüksek oranda korunmuş proteinlerdir (Herman, 1993). Omurgalılarda α , β ve γ olmak üzere üç ana aktin izoformu tanımlanmıştır. Alfa-aktinler kas dokularında bulunur ve kasılma biriminin ana bileşenidir. Öte yandan β - ve γ -aktinler ise hücre tiplerinin çoğunda bulunurlar, hücre iskeletinin bileşenleri ve hücre hareketliliğinin aracıları olarak görev alırlar. *ACTG1*'in ekspresyonundaki değişimlerin işitme kaybı ve kanser gibi hastalıklarla olan ilişkisini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (Chou ve diğ., 1987). İşitsel hücrelerde, *ACTG1*'deki çoklu mutasyonların dominant ilerleyici sağırlıkla ilişkili olduğu

gösterilmiştir (Zhu ve diğ., 2003; Kruth ve diğ., 2012). *ACTG1 null* farelerde yapılan bir araştırma, *ACTG1* eksikliğinin büyüme bozukluğuna ve hücre canlılığının azalmasına yol açtığını göstermiştir (Bunnell ve diğ., 2010). Bunun yanı sıra, Shum ve diğ. (2011), SH-EP nöroblastom hücrelerinde *ACTG1 knockdown*, yara iyileşmesinde ve *transwell* göçünde belirgin bir düşüşe yol açtığını göstermiştir. Ek olarak, araştırmacılar, Rho ile ilişkili kinaz (ROCK) inhibitörü olan Y-27632 ile *ACTG1 knockdown* hücrelere uygulanması, göç etme kabiliyetini eski haline getirdiği, böylece *ACTG1*'in ROCK aracılı hücre göçünün bir yukarı akış regülatörü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, *ACTG1*'in aşırı ekspresyonunun H1299 ve HepG2 hücrelerinde kanser hücresi göçünü arttırdığını göstermiştir. Luo ve diğ. (2014) tarafından yapılan bir çalışma, hücre göçünde çok önemli olduğu bilinen ankirin tekrar ve PH domain 3 (ASAP3)'ün (Ha ve diğ., 2008) kaybının, *ACTG1*'in stabilizasyonunu bozarak hücre göçünü/invazyonunu baskıladığını bildirmiştir. ASAP3'ün hücre göçünü *ACTG1* üzerinden kontrol ettiğini gösteren bu çalışma, kanser hücresi göçü ve invazyonunu hedefleyen ilaçların gelecekteki gelişimine yardımcı olabileceği ileri sürülmüştür (Luo ve diğ., 2014).

Alkol tüketimi, HCC gelişmesi için bir risk faktörüdür, bununla birlikte alkol ve HCC arasındaki ilişki bilinmemektedir. Gao ve diğ. (2019) tarafından yapılan çalışma bu hastalığın patolojisinin mevcut anlayışını geliştirmek ve alkolle ilişkili HCC bağlantılı anahtar genleri tanımlamayı amaçlamıştır. *ACTG1* ve TLR3'ün, alkol kaynaklı HCC için biyobelirteçler olabileceğini göstermişlerdir. Özellikle, bu çalışma DEG (farklılaşmış gen ekspresyonu) ile ilişkili miRNA'ların alkol kaynaklı HCC tedavisinde potansiyel hedef olarak kabul edilebileceğini önermiştir. *ACTG1* ve TLR3'ün miRNA-6819-3P ve miRNA-6877-3P hedefleri olduğu öne sürülmüştür. Ek olarak, miRNA-6819-3P ve miRNA-6877-3P'nin ekspresyon seviyelerinin alkolle ilişkili olmayan HCC dokularına kıyasla alkolle ilişkili HCC'de daha yüksek olduğu gözlenmiştir; miRNA-6877-3P'nin yükselişinin, miRNA-6819-3P'nin yükselişiyle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Ek olarak, *ACTG1* ve TLR3'ün, VEGF ve VEGFR sinyalleşmesini, proteoglikan sindekan aracılı sinyalleşmeyi, erbB reseptör sinyalleşmesini ve $\beta 1$ integrin hücre yüzeyi etkileşimlerini düzenleyebileceği ayrıca bağışıklık tepkisi ve nükleik asit metabolizmasında da işlev görebileceği belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, miRNA-6819-3P ve miRNA-6877-3P'nin *ACTG1* ekspresyonunu arttırdığını ve TLR3'ün baskılandığını göstermiştir. Dahası, *ACTG1*'in deri kanseri dokusunda ekspresyonunun yüksek olduğu rapor edilmiştir ve ROCK sinyal yoluyla A431 hücre çoğalmasını ve göçünü düzenleyebileceği bildirilmiştir (Dong ve diğ., 2018). *ACTG1*'in

NSCLC’de miRNA-145-5P hedef geni olduğu öngörülmüştür (Gan ve diğ., 2017). Ayrıca ACTG1 ve MMP14, kolorektal kanser hücrelerinde miRNA-10a’nın hedefleri olarak doğrulanmıştır; ACTG1 ve MMP14’ün ektopik ekspresyonu, hücre yapışması ve anoikis direnç aktivitesindeki azalmaları geciktirebilir (Liu ve diğ., 2017). Ayrıca HBx kaynaklı HCC’de *ATCG1*’in insan karaciğer dokularında ekspresyonunun fazla olduğu bildirilmiştir (Sun ve diğ., 2007). Yan ve diğ. (2019) tarafından yapılan çalışmada ACTG1’in, HCC hücre döngüsünü düzenleyerek çoğalmayı desteklediği ve apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. RRAD, ACTG1 down regülasyonuna yol açarak HCC’de aerobik glikolizi inhibe etmiştir ve *in vivo* tümör büyümesini geciktirmiştir. *ACTG1*, bitişik normal dokulara kıyasla HCC dokularında aşırı eksprese edilirken, *RRAD* ekspresyonu tümör dokularında düşüktür. Düşük RRAD ve yüksek ACTG1 seviyeleri ileri tümör evresi ile anlamlı olarak ilişkilidir. Dolayısıyla yüksek RRAD ve düşük *ACTG1* ekspresyonu olan HCC hastalarının daha iyi prognoza sahip olabileceği belirtilmiştir. RRAD’ın, HCC’de glikoz metabolizmasını Glukoz taşıyıcısı (GLUT1)’i inhibe eder, (Warburg etkisini azaltır) ve *ACTG1* ekspresyonunu aşağı düzenleyerek, hücre proliferasyonunu azaltması, hücre döngüsünü durdurması ve apoptozu artırması RRAD’a tümör baskılayıcı bir rol kazandırır. Bu bulgular, potansiyel HCC tedavisi için yeni bir yol göstermektedir (Yan diğ., 2019). Ancak, çalışmamızda MAL uygulamasıyla ATC hücrelerinde tespit ettiğimiz anti-proliferatif ve daha önceki çalışmalarda gösterilen anti-invaziv sonuçlar ile artan ACTG1 transkript miktarı uyumlu gözükmemektedir. Ancak, tartışmamızın genel içeriğinde de vurguladığımız üzere farklı kanser türlerinde hatta aynı dokudan köken alan farklı tipteki kanser hücrelerinde dahi aynı gen farklı fonksiyonlara sahip olabilmektedir. Bu genin 8505C hücrelerindeki etkinliği hakkında net bir yorum yapabilmek için daha fazla bilgiye ve deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yapılan transkriptom analiz sonuçları 24 saat süreyle MAL’ye maruz kalan anaplastik tiroid hattı hücrelerinde Anneksin A2 Pseudogen 3 (*ANXA2P3*) ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Pseudogenlerin başlangıçta “genomik fosil” veya *junk genes* olarak görülmesine rağmen (Proudfoot, 1980; Zhang ve diğ., 2003) son zamanlarda yapılan araştırmalar, pseudogenlerin, özellikle insan kanserlerinin ilerlemesinde (Xiao-Jie ve diğ., 2015) rol oynamasının yanı sıra patolojik ve fizyolojik süreçlerde de çok katmanlı biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir (Groen ve diğ., 2014). Öyle ki, çok sayıda pseudogen ekspresyonlarının dokuya ve kansere özgü olduğu bildirilmiştir (Shi ve diğ., 2016). Bu bağlamda pseudogenler, tümör hücrelerinin hem transkripsiyonunda hem de post-

transkripsiyonunda düzenleyici rol oynayabilir. Örneğin, HCC hücrelerinde düşük miktarda eksprese edilen *PTENP1* adı verilen pseudogenlerden birinin, ana geni olan *PTEN* hücresel seviyelerini düzenleme kabiliyetinden dolayı anti-karsinom özelliği göstermiştir (Chen ve diğ., 2015). *ANXA2* geni, birçok neoplastik süreçlerde rol alan kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayıcı bir proteini kodlar. Gliomada *ANXA2* ekspresyonu tümör dokusunda neoplastik olmayan dokulardan daha yüksektir, mezenkimal ve metastatik glioblastoma fenotipi ile bağlantılıdır (Maule ve diğ., 2016). *ANXA2* ekspresyonunun, glioma hastalarının sağ kalımı ile pozitif olarak ilişkili olduğu bildirilmiştir (Reeves ve diğ., 1992; Gao ve diğ., 2013). Ek olarak, *ANXA2*'nin aşırı ekspresyonu, çoğalma ve adezyon yerine (Tatenhorst ve diğ., 2006) glioma anjiyogenezi, *in vitro* göç ve invazyona bağlanmıştır (Gao ve diğ., 2015; Onishi ve diğ., 2015; Maule ve diğ., 2016). Kemirgen beynindeki glioma ilerlemesini inceleyen araştırmacılar, *ANXA2 knockdown* grubunda tümör büyüklüğünün azaldığını ve tümör ilerlemesinin yavaşladığını rapor etmişlerdir (Zhai ve diğ., 2011). Li ve diğ. (2017) tarafından yapılan çalışma, diffüz gliom hastalarında tanısal veya terapötik stratejiler için uygun biyobelirteçler olarak bazı pseudogenleri bulmayı hedeflemiştir. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak, gen ekspresyon profiline dayanarak diferansiyel eksprese edilmiş pseudogenler belirlenmiş ve diffüz gliomalarda belirgin ifadesi olan bazı pseudogenler seçilmiştir. Ardından klinik önemi ortaya çıkarmak için, bu pseudogenlerin ekspresyonunun glioma hastalarının genel sağ kalım ve kemoradyoterapi sonucu ile olan ilişkisini incelemişlerdir. Sonuçlar, *ANXA2-P1*, *ANXA2-P2*, *ANXA2-P3* ve *ANXA2* ekspresyonunun gliomada önemli ölçüde arttığını göstermiştir. *ANXA2-P1*, *ANXA2-P2* ve *ANXA2-P3* sırasıyla 4., 9. ve 10. kromozomlara yerleştirilen üç *ANXA2* pseudogenidir. Ek olarak, *ANXA2*'nin ekspresyon seviyesinin, *ANXA2* pseudogenlerinin ekspresyonu ile pozitif bir korelasyon sergilediği gösterilmiştir. Bunun yanında, yüksek derecede eksprese edilmiş *ANXA2* ve *ANXA2* pseudogenlerinin, glioma hastalarının kötü sağ kalım sonuçları ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. *ANXA2* ve *ANXA2* pseudogenlerinin düşük ekspresyonunun, kemoterapi ve radyoterapi alan hastalarda sağ kalımın uzatılmasına katkı sağlayabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle *ANXA2* pseudogenlerinin ve *ANXA2*'nin gliomaların tanı, prognoz ve hedef tedavisi için yeni biyobelirteçler olarak kullanılabileceği önerisi sunulmuştur. Hayatta kalma ile ilişkili pseudogenleri belirleyen Gao ve diğ. (2015)'in yaptığı sınıflandırmada *SP3P*, *ANXA2P3*, *PTTG3P*, *LPAL2*, *CLCA3P* ve *TDH*'yi ortaya koymuştur. *ANXA2P3* ekspresyonunun 8505C hücrelerinde fonksiyonel önemi ile ilgili

herhangi bir çalışma mevcut değildir. Çalışmamızda MAL uygulamasıyla *ANXA2P3* transkriptlerindeki artışın sebebini açıklamak için daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, RNA dizileme analizi ile elde edilen fazla miktardaki çıktı anaplastik tiroid kanser hücrelerinde MAL maruziyeti sonucu ortaya çıkan etkinin değerlendirilmesi noktasında geniş bir çerçeve sunmuştur. Elde edilen bu çıktıların değerlendirilmesi bizi hücrelerde bazı yaşamsal süreçlerin etkilendiği sonucuna götürmektedir. İstatistiksel açıdan anlamlılığı yüksek ilk elli gen fonksiyonel açıdan değerlendirildiğinde; gelişim, proliferasyon, kök hücre kontrolü ve karsinogeneizde önemli bir sinyal iletim yolağı olan Wnt/ β -katenin ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, fonksiyonel değerlendirmelerimiz hormonlara, mitojenlere, nörotransmitterlere, iyonlara, fotonlara ve diğer uyaranlara cevap olarak çeşitli hücre içi sinyal süreçlerini düzenleyen G protein aracılı reseptör sinyalleşme sürecinin de etkilendiğine işaret etmektedir. Bu bilgiler ışığında MAL'nin anaplastik tiroid kanser tedavisi için önemli bir potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Ancak, elde edilen verilerin ve yapılan değerlendirmelerin düşük çıktılı geleneksel yöntemler kullanılarak teyit edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abel, E.L., Angel, J.M., Kiguchi, K. and DiGiovanni, J., 2009, Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications, *Nature protocols*, 4 (9), 1350.
- Ahel, I., Ahel, D., Matsusaka, T., Clark, A.J., Pines, J., Boulton, S.J. and West, S.C., 2008, Poly (ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins, *Nature*, 451 (7174), 81.
- Ain, K.B., 1998, Anaplastic thyroid carcinoma: behavior, biology, and therapeutic approaches, *Thyroid*, 8 (8), 715-726.
- Aigner, S., Sthoeger, Z.M., Fogel, M., Weber, E., Zarn, J., Ruppert, M., Zeller, Y., Vestweber, D., Stahel, R., Sammar, M. and Altevogt, P., 1997, CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells, *Blood*, 89 (9), 3385-3395.
- Akçakaya, A., Koç, B. and Ferhatoğlu, F., 2012, Tiroid Anatomisi ve Cerrahi Yaklaşım, *Okmeydanı Tıp Dergisi*, 28 (1), 1-9.
- Akiyama, K., Ohga, N., Maishi, N., Hida, Y., Kitayama, K., Kawamoto, T., Osawa, T., Suzuki, Y., Shinohara, N., Nonomura, K. and Shindoh, M., 2013, The F-prostaglandin receptor is a novel marker for tumor endothelial cells in renal cell carcinoma, *Pathology international*, 63 (1), 37-44.
- Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter. P., 2015a, *Cancer, Molecular Biology of the Cell*, In: Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K. and Walter P. (ed.), Chapter 20, Garland Science, New York, 1091-1143.
- Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter. P., 2015b, *Analyzing Cells, Molecules and Systems*, Molecular Biology of the Cell, In: Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K. and Walter P. (ed.), Chapter 8, Garland Science, New York, 439-529.
- Al-Kharusi, M.R., Smartt, H.J., Greenhough, A., Collard, T.J., Emery, E.D., Williams, A.C. and Paraskeva, C., 2013, LGR5 promotes survival in human colorectal adenoma cells and is upregulated by PGE 2: implications for targeting adenoma stem cells with NSAIDs, *Carcinogenesis*, 34 (5), 1150-1157.
- Alkhateeb, A., Rezaeian, I., Singireddy, S., Cavallo-Medved, D., Porter, L.A. and Rueda, L., 2019, Transcriptomics Signature from Next-Generation Sequencing Data Reveals New Transcriptomic Biomarkers Related to Prostate Cancer, *Cancer informatics*, 18, 1176935119835522.
- Al-Rasheed, M.M., Alzahrani, A.S., Macadam, A., Overall, A., Gard, P. and Dzimir, N., 2015, The potential role of the sodium iodide symporter gene polymorphism in the development of differentiated thyroid cancer, *Gene*, 572(2), 163-168.

- Anderson, K.S. and LaBaer, J., 2005, The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers, *Journal of proteome research*, 4 (4), 1123-1133.
- Anderson, K.S., Cramer, D.W., Sibani, S., Wallstrom, G., Wong, J., Park, J., Qiu, J., Vitonis, A. and LaBaer, J., 2014, Autoantibody signature for the serologic detection of ovarian cancer, *Journal of proteome research*, 14 (1), 578-586.
- Arab, M.R., Salari, S., Karimi, M. and Mofidpour, H., 2010, Lectin histochemical study of cell surface glycoconjugate in gastric carcinoma using helix pomatia agglutinin, *Acta Medica Iranica*, 209-213.
- Ariizumi, K., Shen, G.L., Shikano, S., Ritter, R., Zukas, P., Edelbaum, D., Morita, A. and Takashima, A., 2000, Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (16), 11957-11963.
- Arslan, M.S., Delibaşı, T. and Şahin, M., 2011, Tiroid kanserleri, *İç hastalıkları dergisi*, 18, 41-8.
- Assis, A.F., Oliveira, E.H., Donate, P.B., Giuliani, S., Nguyen, C. and Passos, G.A., 2014, *What is the transcriptome and how it is evaluated?*, Transcriptomics in Health and Disease, In: Passos G.A (Ed.), Chapter 1, Springer, Cham, 3-48.
- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J.M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D. and Zhang, X.F., 2001, Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade, *Recent progress in hormone research*, 56, 127-155.
- Azim, F.S., Houri, H., Ghalavand, Z. and Nikmanesh, B., 2018, Next Generation Sequencing in Clinical Oncology: Applications, Challenges and Promises: A Review Article, *Iranian journal of public health*, 47 (10), 1453.
- Babál, P., Janega, P., Černá, A., Kholová, I. and Brabencová, E., 2006, Neoplastic transformation of the thyroid gland is accompanied by changes in cellular sialylation, *Acta histochemica*, 108(2), 133-140.
- Baldus, S.E., Mönig, S.P., Hanisch, F.G., Zirbes, T.K., Flucke, U., Oelert, S., Zilkens, G., Madejczik, B., Thiele, J., Schneider, P.M. and Hölscher, A.H., 2002, Comparative evaluation of the prognostic value of MUC1, MUC2, sialyl-Lewisa and sialyl-Lewisx antigens in colorectal adenocarcinoma, *Histopathology*, 40 (5), 440-449.
- Bantel, H., Engels, I.H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K. and Wesselborg, S., 1999, Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis, *Cancer research*, 59 (9), 2083-2090.
- Bapu, D., Runions, J., Kadhim, M. and Brooks, S.A., 2016, N-acetylgalactosamine glycans function in cancer cell adhesion to endothelial cells: A role for truncated O-glycans in metastatic mechanisms, *Cancer letters*, 375 (2), 367-374.

- Barker, N., Van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., Van Den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J. and Clevers, H., 2007, Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*, *Nature*, 449 (7165), 1003.
- Becker, L., Huang, Q. and Mashimo, H., 2010, *Lgr5*, an intestinal stem cell marker, is abnormally expressed in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma, *Diseases of the Esophagus*, 23 (2), 168-174.
- Bilder, D., Li, M. and Perrimon, N., 2000, Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors, *Science*, 289 (5476), 113-116.
- Bodzioch, M., Lapicka-Bodzioch, K., Zapala, B., Kamysz, W., Kiec-Wilk, B. and Dembinska-Kiec, A., 2009, Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms, *Genomics*, 94 (4), 247-256.
- Bollong, M.J., Pietilä, M., Pearson, A.D., Sarkar, T.R., Ahmad, I., Soundararajan, R., Lyssiotis, C.A., Mani, S.A., Schultz, P.G. and Lairson, L.L., 2017, A vimentin binding small molecule leads to mitotic disruption in mesenchymal cancers, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (46), 9903-9912.
- Bothos, J., Summers, M.K., Venere, M., Scolnick, D.M. and Halazonetis, T.D., 2003, The Chfr mitotic checkpoint protein functions with Ubc13-Mms2 to form Lys63-linked polyubiquitin chains, *Oncogene*, 22 (46), 7101.
- Brink, C.B., Harvey, B.H., Bodenstein, J., Venter, D.P. and Oliver, D.W., 2004, Recent advances in drug action and therapeutics: Relevance of novel concepts in G-protein-coupled receptor and signal transduction pharmacology, *British journal of clinical pharmacology*, 57 (4), 373-387.
- Briscoe, J. and Théron, P.P., 2013, The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease, *Nature reviews Molecular cell biology*, 14 (7), 416.
- Brown, O.P., 1995, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, 270, 467-470.
- Bu, L., Jiang, G., Yang, F., Liu, J. and Wang, J., 2011, Highly expressed SLC35F2 in non-small cell lung cancer is associated with pathological staging, *Molecular medicine reports*, 4 (6), 1289-1293.
- Bucsky, P. and Parlow, T., 1997, Epidemiology and therapy of thyroid cancer in childhood and adolescence, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 105, 70-73.
- Bunnell, T.M. and Ervasti, J.M., 2010, Delayed embryonic development and impaired cell growth and survival in *Actg1* null mice, *Cytoskeleton*, 67 (9), 564-572.
- Büll, C., Boltje, T.J., Wassink, M., de Graaf, A.M., van Delft, F.L., den Brok, M.H. and Adema, G.J., 2013, Targeting aberrant sialylation in cancer cells using a fluorinated sialic acid analog impairs adhesion, migration, and in vivo tumor growth, *Molecular cancer therapeutics*, 12(10), 1935-1946.

- Büll, C., Stoel, M.A., den Brok, M.H. and Adema, G.J., 2014, Sialic acids sweeten a tumor's life, *Cancer research*, 74 (12), 3199-3204.
- Büssing, A., Multani, A.S., Pathak, S., Pfüller, U., and Schietzel, M., 1998, Induction of apoptosis by the N-acetyl-galactosamine-specific toxic lectin from *Viscum album* L. is associated with a decrease of nuclear p53 and Bcl-2 proteins and induction of telomeric associations, *Cancer letters*, 130 (1-2), 57-68.
- Büssing, A. and Schietzel, M., 1999, Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins, *Anticancer research*, 19, 23-28.
- Byrd, J.C. and Bresalier, R.S., 2004, Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23 (1-2), 77-99.
- Cabadak, H., 2008, Hücre siklusu ve kanser, *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9, (3), 51-61.
- Cadena, A.P., Cushman, T.R. and Welsh, J.W., 2019, Glycosylation and Antitumor Immunity, *International review of cell and molecular biology*, 343, 111-127.
- Carling, T., Ocal, I.T. and Udelsman, R., 2007, Special variants of differentiated thyroid cancer: does it alter the extent of surgery versus well-differentiated thyroid cancer?, *World journal of surgery*, 31 (5), 916-923.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K., 2000, Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature*, 407 (6801), 249.
- Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A. and Liu, Q., 2011, R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (28), 11452-11457.
- Chambers, D.C., Carew, A.M., Lukowski, S.W. and Powell, J.E., 2019, Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing, *Respirology*, 24 (1), 29-36.
- Chaturvedi, P., Sudakin, V., Bobiak, M.L., Fisher, P.W., Mattern, M.R., Jablonski, S.A., Hurle, M.R., Zhu, Y., Yen, T.J. and Zhou, B.B.S., 2002, Chfr regulates a mitotic stress pathway through its RING-finger domain with ubiquitin ligase activity, *Cancer research*, 62 (6), 1797-1801.
- Chen, C.L., Tseng, Y.W., Wu, J.C., Chen, G.Y., Lin, K.C., Hwang, S.M. and Hu, Y.C., 2015, Suppression of hepatocellular carcinoma by baculovirus-mediated expression of long non-coding RNA PTENP1 and MicroRNA regulation, *Biomaterials*, 44, 71-81.
- Chen, C.Y., Jan, Y.H., Juan, Y.H., Yang, C.J., Huang, M.S., Yu, C.J., Yang, P.C., Hsiao, M., Hsu, T.L. and Wong, C.H., 2013, Fucosyltransferase 8 as a functional regulator of nonsmall cell lung cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (2), 630-635.

- Chen, H., Xu, C. and Qing'e Jin, Z.L., 2014, S100 protein family in human cancer, *American journal of cancer research*, 4 (2), 89.
- Chen, J.S., Huang, X.H., Wang, Q., Huang, J.Q., Zhang, L.J., Chen, X.L., Lei, J. and Cheng, Z.X., 2012, Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer, *Carcinogenesis*, 34 (1), 10-19.
- Chen, Q., Cao, H.Z. and Zheng, P.S., 2014, LGR5 promotes the proliferation and tumor formation of cervical cancer cells through the Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Oncotarget*, 5 (19), 9092.
- Chen, X., Liu, X., Lang, H., Zhang, S., Luo, Y. and Zhang, J., 2015, S100 calcium-binding protein A6 promotes epithelial-mesenchymal transition through β -catenin in pancreatic cancer cell line, *PLoS One*, 10 (3), 0121319.
- Chou, C.C., Davis, R.C., Fuller, M.L., Slovin, J.P., Wong, A., Wright, J., Kania, S., Shaked, R., Gatti, R.A. and Salser, W.A., 1987, Gamma-actin: unusual mRNA 3'-untranslated sequence conservation and amino acid substitutions that may be cancer related, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84 (9), 2575-2579.
- Chrispeels, M.J. and Raikhel, N.V., 1991, Lectins, lectin genes, and their role in plant defense, *The plant cell*, 3 (1), 1.
- Chu, Y.W., Seftor, E.A., Romer, L.H. and Hendrix, M.J., 1996, Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility, *The American journal of pathology*, 148 (1), 63.
- Ciampi, R. and Nikiforov, Y.E., 2007, RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis, *Endocrinology*, 148 (3), 936-941.
- Cieşlik, M. and Chinnaiyan, A.M., 2018, Cancer transcriptome profiling at the juncture of clinical translation, *Nature Reviews Genetics*, 19 (2), 93.
- Cooper, G. 2000, *Cancer, The Cell : A Molecular Approach*, 2nd ed., Chapter 15, Sinauer Associates Inc., USA, 0-87893-106-6.
- Cui, H., Lin, Y., Yue, L., Zhao, X. and Liu, J., 2011, Differential expression of the $\alpha 2$, 3-sialic acid residues in breast cancer is associated with metastatic potential. *Oncology reports*, 25 (5), 1365-1371.
- Cumberledge, S. and Reichsman, F., 1997, Glycosaminoglycans and WNTs: just a spoonful of sugar helps the signal go down, *Trends in Genetics*, 13 (11), 421-423.
- Dai, D., Zhou, B., Xu, W., Jin, H. and Wang, X., 2019, CHFR Promoter Hypermethylation Is Associated with Gastric Cancer and Plays a Protective Role in Gastric Cancer Process, *Journal of Cancer*, 10 (4), 949.

- Damme, E.J.V., Peumans, W.J., Barre, A. and Rougé, P., 1998, Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17 (6), 575-692.
- Davies, L. and Welch, H.G., 2006. Epidemiology of head and neck cancer in the United States, *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 135 (3), 451-457.
- De Hoff, P.L., Brill, L.M. and Hirsch, A.M., 2009, Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense, *Molecular genetics and genomics*, 282(1), 1-15.
- De Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.K., Li, V.S., Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P.J., Van De Wetering, M. and Stange, D.E., 2011, Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling, *Nature*, 476 (7360), 293.
- De Lima, A.L., Cavalcanti, C.C., Silva, M.C., Paiva, P.M., Coelho, L.C., Beltrao, E.I. and Correia, M.T.D.S., 2010, Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin, *BioMed Research International*, 2010.
- De Mejía, E.G. and Prisecaru, V.I., 2005, Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment, *Critical reviews in food science and nutrition*, 45 (6), 425-445.
- DeLellis, R.A., 2006, Pathology and genetics of thyroid carcinoma, *Journal of surgical oncology*, 94 (8), 662-669.
- Derks, S., Cleven, A.H., Melotte, V., Smits, K.M., Brandes, J.C., Azad, N., Van Criekinge, W., De Bruïne, A.P., Herman, J.G. and Van Engeland, M., 2014, Emerging evidence for CHFR as a cancer biomarker: from tumor biology to precision medicine, *Cancer and Metastasis Reviews*, 33 (1), 161-171.
- Dodd, R.B. and Drickamer, K., 2001, Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity, *Glycobiology*, 11 (5), 71-79.
- Donato, R., 1999, Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1450 (3), 191-231.
- Donato, R., 2001, S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 33 (7), 637-668.
- Donato, R., 2003, Intracellular and extracellular roles of S100 proteins, *Microscopy research and technique*, 60 (6), 540-551.
- Donato, R., Sorci, G. and Giambanco, I., 2017, S100A6 protein: functional roles, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74 (15), 2749-2760.
- Dong, X., Han, Y., Sun, Z. and Xu, J., 2018, Actin Gamma 1, a new skin cancer pathogenic gene, identified by the biological feature-based classification, *Journal of cellular biochemistry*, 119 (2), 1406-1419.

- Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K.M., Toshima, K., Lairmore, T.C., Howe, J.R., Moley, J.F., Goodfellow, P. and Wells, S.A., 1993, Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC, *Human molecular genetics*, 2 (7), 851-856.
- Drickamer, K. and Fadden, A.J., 2002, *Genomic analysis of C-type lectins*, Biochemical Society Symposia, Portland Press Limited, USA, 59-72.
- Duan, L., Wu, R., Zou, Z., Wang, H., Ye, L., Li, H., Yuan, S., Li, X., Zha, H., Sun, H. and Zhang, Y., 2014, S100A6 stimulates proliferation and migration of colorectal carcinoma cells through activation of the MAPK pathways, *International journal of oncology*, 44 (3), 781-790.
- Dunn, H.A. and Ferguson, S.S., 2015, PDZ Protein Regulation of G Protein–Coupled Receptor Trafficking and Signaling Pathways, *Molecular pharmacology*, 88 (4), 624-639.
- Engqvist, H., Parris, T.Z., Rönnerman, E.W., Söderberg, E.M., Biermann, J., Mateoiu, C., Sundfeldt, K., Kovács, A., Karlsson, P. and Helou, K., 2018, Transcriptomic and genomic profiling of early-stage ovarian carcinomas associated with histotype and overall survival, *Oncotarget*, 9 (80), 35162.
- Esko, J.D. and Linhardt, R.J., 2009, *Proteins that bind sulfated glycosaminoglycans*, Essentials of Glycobiology, 2nd (ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Esko, J.D., Kimata, K. and Lindahl, U., 2009, *Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans*, Essentials of Glycobiology, 2nd (ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fang, E.F., Pan, W.L., Wong, J.H., Chan, Y.S., Ye, X.J. and Ng, T.B., 2011, A new Phaseolus vulgaris lectin induces selective toxicity on human liver carcinoma Hep G2 cells, *Archives of toxicology*, 85 (12), 1551-1563.
- Fanjul-Fernández, M., Quesada, V., Cabanillas, R., Cadiñanos, J., Fontanil, T., Obaya, Á., Ramsay, A.J., Llorente, J.L., Astudillo, A., Cal, S. and López-Otín, C., 2013, Cell–cell adhesion genes CTNNA2 and CTNNA3 are tumour suppressors frequently mutated in laryngeal carcinomas, *Nature communications*, 4, 2531.
- Felsher, D.W. and Bishop, J.M., 1999, Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages, *Molecular cell*, 4 (2), 199-207.
- Feng, M., Chen, J.Y., Weissman-Tsukamoto, R., Volkmer, J.P., Ho, P.Y., McKenna, K.M., Cheshier, S., Zhang, M., Guo, N., Gip, P. and Mitra, S.S., 2015, Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: roles of TLR and Btk, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (7), 2145-2150.
- Fernández-Medarde, A. and Santos, E., 2011, Ras in cancer and developmental diseases, *Genes & cancer*, 2 (3), 344-358.
- Filipek, A., Jastrzebska, B., Nowotny, M. and Kuznicki, J., 2002, CacyBP/SIP, a calcyclin and Siah-1-interacting protein, binds EF-hand proteins of the S100 family, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (32), 28848-28852.

- Filmus, J., Capurro, M. and Rast, J., 2008, Glypicans, *Genome biology*, 9 (5), 224.
- Filmus, J. and Capurro, M., 2012, The glypican family, *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, 209-220.
- Folkman, J., 1971, Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *New england journal of medicine*, 285 (21), 1182-1186.
- Folkman, J., 1995, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nature medicine*, 1 (1), 27.
- Folkman, J., 2002, *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*, Seminars in oncology, In: Fojo, A.T., (ed.), WB Saunders, USA, 15-18.
- Franks, L.M. and Knowles, M.A., 2005, What is cancer, *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*, 4, 4-9.
- Frasca, F., Nucera, C., Pellegriti, G., Gangemi, P., Attard, M., Stella, M., Loda, M., Vella, V., Giordano, C., Trimarchi, F. and Mazzone, E., 2008, BRAF (V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer, *Endocrine-related cancer*, 15 (1), 191-205.
- Fu, L.L., Zhou, C.C., Yao, S., Yu, J.Y., Liu, B.O. and Bao, J.K., 2011, Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43 (10), 1442-1449.
- Fuster, M.M. and Esko, J.D., 2005, The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets, *Nature Reviews Cancer*, 5 (7), 526.
- Fujita, T., Matsushita, M. and Endo, Y., 2004, The lectin-complement pathway—its role in innate immunity and evolution, *Immunological reviews*, 198(1), 185-202.
- Gabius, H.J., 1997, Animal lectins, *European journal of biochemistry*, 243 (3), 543-576.
- Gabius, H.J., Darro, F., Remmelink, M., André, S., Kopitz, J., Danguy, A., Gabius, S., Salmon, I. and Kiss, R., 2001, Evidence for stimulation of tumor proliferation in cell lines and histotypic cultures by clinically relevant low doses of the galactoside-binding mistletoe lectin, a component of proprietary extracts, *Cancer investigation*, 19 (2), 114-126.
- Gagnon, A., Kim, J.H., Schorge, J.O., Ye, B., Liu, B., Hasselblatt, K., Welch, W.R., Bandera, C.A. and Mok, S.C., 2008, Use of a combination of approaches to identify and validate relevant tumor-associated antigens and their corresponding autoantibodies in ovarian cancer patients, *Clinical Cancer Research*, 14 (3), 764-771.
- Galliano, G.E. and Frishberg, D.P., 2012, *Pathology and classification of thyroid tumor*, Thyroid cancer, In: Braunstein G.D. (ed.), Springer, Boston, 1-33.
- Gan, T.Q., Xie, Z.C., Tang, R.X., Zhang, T.T., Li, D.Y., Li, Z.Y. and Chen, G., 2017, Clinical value of miR-145-5p in NSCLC and potential molecular mechanism exploration: A retrospective study based on GEO, qRT-PCR, and TCGA data, *Tumor Biology*, 39 (3), 1010428317691683.

- Gao, B., Li, S., Tan, Z., Ma, L. and Liu, J., 2019, ACTG1 and TLR3 are biomarkers for alcohol associated hepatocellular carcinoma, *Oncology letters*, 17 (2), 1714-1722.
- Gao, G., Kasperbauer, J.L., Tombers, N.M., Wang, V., Mayer, K. and Smith, D.I., 2014, A selected group of large common fragile site genes have decreased expression in oropharyngeal squamous cell carcinomas, *Genes, Chromosomes and Cancer*, 53 (5), 392-401.
- Gao, H., Yu, B., Yan, Y., Shen, J., Zhao, S., Zhu, J., Qin, W. and Gao, Y., 2013, Correlation of expression levels of ANXA2, PGAM1, and CALR with glioma grade and prognosis, *Journal of neurosurgery*, 118 (4), 846-853.
- Gao, K.M., Chen, X.C., Zhang, J.X., Wang, Y., Yan, W. and You, Y.P., 2015, A pseudogene-signature in glioma predicts survival, *Journal of experimental & clinical cancer research*, 34 (1), 23.
- Garcia, D.G., de Castro-Faria-Neto, H.C., Da Silva, C.I., Gonçalves-de-Albuquerque, C.F., Silva, A.R., De Amorim, L.M.D.F., Freire, A.S., Santelli, R.E., Diniz, L.P., Gomes, F.C.A. and de Castro Faria, M.V., 2015, Na/K-ATPase as a target for anticancer drugs: studies with perillyl alcohol, *Molecular cancer*, 14 (1), 105.
- Gilles, C., Polette, M., Mestdagt, M., Nawrocki-Raby, B., Ruggeri, P., Birembaut, P. and Foidart, J.M., 2003, Transactivation of vimentin by β -catenin in human breast cancer cells, *Cancer research*, 63 (10), 2658-2664.
- Giuffrida, D. and Gharib, H., 2000, Anaplastic thyroid carcinoma: current diagnosis and treatment, *Annals of Oncology*, 11 (9), 1083-1089.
- Goodell, V., Salazar, L.G., Urban, N., Drescher, C.W., Gray, H., Swensen, R.E., McIntosh, M.W. and Disis, M.L., 2006, Antibody immunity to the p53 oncogenic protein is a prognostic indicator in ovarian cancer, *Journal of clinical oncology*, 24 (5), 762-768.
- Graham, L.M. and Brown, G.D., 2009, The Dectin-2 family of C-type lectins in immunity and homeostasis, *Cytokine*, 48 (1-2), 148-155.
- Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. and Birchmeier, W., 2008, Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss-and gain-of-function mutations of β -catenin in mice, *Genes & development*, 22 (17), 2308-2341.
- Groen, J.N., Capraro, D. and Morris, K.V., 2014, The emerging role of pseudogene expressed non-coding RNAs in cellular functions, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 54, 350-355.
- Guha, P., Kaptan, E., Bandyopadhyaya, G., Kaczanowska, S., Davila, E., Thompson, K., Martin, S.S., Kalvakolanu, D.V., Vasta, G.R. and Ahmed, H., 2013, Cod glycopeptide with picomolar affinity to galectin-3 suppresses T-cell apoptosis and prostate cancer metastasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (13), 5052-5057.
- Guo, L., Wang, J., Zhang, T. and Yang, Y., 2016, Glypican-5 is a tumor suppressor in non-small cell lung cancer cells, *Biochemistry and biophysics reports*, 6, 108-112.

- Ha, V.L., Bharti, S., Inoue, H., Vass, W.C., Campa, F., Nie, Z., de Gramont, A., Ward, Y. and Randazzo, P.A., 2008, ASAP3 is a focal adhesion-associated Arf GAP that functions in cell migration and invasion, *Journal of Biological Chemistry*, 283 (22), 14915-14926.
- Hakomori, S., 2002, Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (16), 10231-10233.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *cell*, 144 (5), 646-674.
- Harmankaya, A., Özcan, A. and Harmankaya, S., 2014, Lektinler ve Glikobilimlerdeki Önemi, *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7 (1), 1-14.
- Hashimoto, Y., Niikura, T., Ito, Y., Sudo, H., Hata, M., Arakawa, E., Abe, Y., Kita, Y. and Nishimoto, I., 2001, Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults, *Journal of Neuroscience*, 21 (23), 9235-9245.
- He, B., Li, T., Guan, L., Liu, F.E., Chen, X.M., Zhao, J., Lin, S., Liu, Z.Z. and Zhang, H.Q., 2016, CTNNA3 is a tumor suppressor in hepatocellular carcinomas and is inhibited by miR-425, *Oncotarget*, 7 (7), 8078.
- He, J., Jin, Y., Zhou, M., Li, X., Chen, W., Wang, Y., Gu, S., Cao, Y., Chu, C., Liu, X. and Zou, Q., 2018, Solute carrier family 35 member F2 is indispensable for papillary thyroid carcinoma progression through activation of transforming growth factor- β type I receptor/apoptosis signal-regulating kinase 1/mitogen-activated protein kinase signaling axis, *Cancer science*, 109 (3), 642-6550.
- Heizmann, C.W., Fritz, G. and Schafer, B.W., 2002, S100 proteins: structure, functions and pathology, *Front Biosci*, 7 (1), 1356-68.
- Helmbrecht, K., Kispert, A., Von Wasielowski, R. and Brabant, G., 2001, Identification of a Wnt/ β -catenin signaling pathway in human thyroid cells, *Endocrinology*, 142 (12), 5261-5266.
- Herman, I.M., 1993, Actin isoforms, *Current opinion in cell biology*, 5 (1), 48-55.
- Higashiyama, S., Abraham, J.A. and Klagsbrun, M., 1993, Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: dependence on interactions with cell surface heparan sulfate, *The journal of cell Biology*, 122 (4), 933-940.
- Hirsch, D., Barker, N., McNeil, N., Hu, Y., Camps, J., McKinnon, K., Clevers, H., Ried, T. and Gaiser, T., 2013, LGR5 positivity defines stem-like cells in colorectal cancer, *Carcinogenesis*, 35 (4), 849-858.
- Hsu, K.T., Yu, X.M., Audhya, A.W., Jaume, J.C., Lloyd, R.V., Miyamoto, S., Prolla, T.A. and Chen, H., 2014, Novel approaches in anaplastic thyroid cancer therapy, *The oncologist*, 19 (11), 1148-1155.

- Hsu, S.Y., Liang, S.G. and Hsueh, A.J., 1998, Characterization of two LGR genes homologous to gonadotropin and thyrotropin receptors with extracellular leucine-rich repeats and a G protein-coupled, seven-transmembrane region, *Molecular endocrinology*, 12 (12), 1830-1845.
- Hu, S., Liu, D., Tufano, R.P., Carson, K.A., Rosenbaum, E., Cohen, Y., Holt, E.H., Kiseljak-Vassiliades, K., Rhoden, K.J., Tolaney, S. and Condouris, S., 2006, Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer, *International journal of cancer*, 119 (10), 2322-2329.
- <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/microarray-rna-seq-comparison.html>
- Hua, Z., Chen, J., Sun, B., Zhao, G., Zhang, Y., Fong, Y., Jia, Z. and Yao, L., 2011, Specific expression of osteopontin and S100A6 in hepatocellular carcinoma, *Surgery*, 149 (6), 783-791.
- Huang, W., Zhao, C., Zhong, H., Zhang, S., Xia, Y. and Cai, Z., 2019, Bisphenol S induced epigenetic and transcriptional changes in human breast cancer cell line MCF-7, *Environmental Pollution*, 246, 697-703.
- Hundahl, S.A., Fleming, I.D., Fremgen, A.M. and Menck, H.R., 1998, A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the US, 1985-1995. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 83 (12), 2638-2648.
- Hundahl, S.A., Phillips, J.L. and Menck, H.R., 2000, The National Cancer Data Base Report on poor survival of US gastric carcinoma patients treated with gastrectomy: American Joint Committee on Cancer staging, proximal disease, and the “different disease” hypothesis, *Cancer*, 88 (4), 921-932.
- Igney, F.H. and Krammer, P.H., 2002, Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nature Reviews Cancer*, 2 (4), 277.
- Inagaki, M., Matsuoka, Y., Tsujimura, K., Ando, S., Tokui, T., Takahashi, T. and Inagaki, N., 1996, Dynamic property of intermediate filaments: regulation by phosphorylation, *Bioessays*, 18 (6), 481-487.
- Ingham, P.W., Nakano, Y. and Seger, C., 2011, Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa, *Nature reviews genetics*, 12 (6), 393.
- Ito, Y., Yoshida, H., Tomoda, C., Uruno, T., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F., Kakudo, K., Kuma, K. and Miyauchi, A., 2005, Expression of S100A2 and S100A6 in thyroid carcinomas, *Histopathology*, 46 (5), 569-575.
- Ivaska, J., Vuoriluoto, K., Huovinen, T., Izawa, I., Inagaki, M. and Parker, P.J., 2005, PKC ϵ -mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility, *The EMBO journal*, 24 (22), 3834-3845.

- Jabbour, H.N., Sales, K.J., Boddy, S.C., Anderson, R.A. and Williams, A.R., 2005, A positive feedback loop that regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin F₂ α synthesis via the F-series-prostanoid receptor and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway, *Endocrinology*, 146 (11), 4657-4664.
- Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., Van Es, J.H., Snippert, H.J., Clevers, H. and Toftgård, R., 2008, Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells, *Nature genetics*, 40 (11), 1291.
- Ji, H., Wang, J., Fang, B., Fang, X. and Lu, Z., 2011, α -Catenin inhibits glioma cell migration, invasion, and proliferation by suppression of β -catenin transactivation, *Journal of neuro-oncology*, 103 (3), 445-451.
- Jiang, Q.L., Zhang, S., Tian, M., Zhang, S.Y., Xie, T., Chen, D.Y., Chen, Y.J., He, J., Liu, J., Ouyang, L. and Jiang, X., 2015, Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy, *Cell proliferation*, 48 (1), 17-28.
- Jin, S., Borkhuu, O., Bao, W. and Yang, Y.T., 2016, Signaling pathways in thyroid cancer and their therapeutic implications, *Journal of clinical medicine research*, 8 (4), 284.
- Joo, J.H., Kim, J.W., Lee, Y., Yoon, S.Y., Kim, J.H., Paik, S.G. and Choe, I.S., 2003, Involvement of NF- κ B in the regulation of S100A6 gene expression in human hepatoblastoma cell line HepG2, *Biochemical and biophysical research communications*, 307 (2), 274-280.
- Joo, J.H., Yoon, S.Y., Kim, J.H., Paik, S.G., Min, S.R., Lim, J.S., Choe, I.S., Choi, I. and Kim, J.W., 2008, S100A6 (calcylin) enhances the sensitivity to apoptosis via the upregulation of caspase-3 activity in Hep3B cells, *Journal of cellular biochemistry*, 103 (4), 1183-1197.
- Ju, T., Lanneau, G.S., Gautam, T., Wang, Y., Xia, B., Stowell, S.R., Willard, M.T., Wang, W., Xia, J.Y., Zuna, R.E. and Laszik, Z., 2008, Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc, *Cancer research*, 68 (6), 1636-1646.
- Kalluri, R., 2009, EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells, *The Journal of clinical investigation*, 119 (6), 1417-1419.
- Kan, M., Shumyatcher, M. and Himes, B.E., 2017, Using omics approaches to understand pulmonary diseases, *Respiratory research*, 18 (1), 149.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A. and Leiserson, M.D., 2013, Mutational landscape and significance across 12 major cancer types, *Nature*, 502 (7471), 333.
- Kanwal, R. and Gupta, S., 2010, Epigenetics and cancer, *Journal of applied physiology*, 109 (2), 598-605.
- Kanwal, S., 2013, *Effect of O-GlcNAcylation on tamoxifen sensitivity in breast cancer derived MCF-7 cells*, (Doctoral dissertation, Paris 5).

- Kapoor, S., Marwaha, R., Majumdar, S. and Ghosh, S., 2008, Apoptosis induction by Maackia amurensis agglutinin in childhood acute lymphoblastic leukemic cells, *Leukemia research*, 32 (4), 559-567.
- Kaptan, E., Sancar Bas, S., Sancakli, A., Aktas, H.G., Bayrak, B.B., Yanardag, R. and Bolkent, S., 2017, Runt-Related Transcription Factor 2 (Runx2) Is Responsible for Galectin-3 Overexpression in Human Thyroid Carcinoma, *Journal of cellular biochemistry*, 118 (11), 3911-3919.
- Kaptan, E., Sancar-Bas, S., Sancakli, A., Bektas, S. and Bolkent, S., 2018, The effect of plant lectins on the survival and malignant behaviors of thyroid cancer cells, *Journal of cellular biochemistry*, 119 (7), 6274-6287.
- Kashima, L., Toyota, M., Mita, H., Suzuki, H., Idogawa, M., Ogi, K., Sasaki, Y. and Tokino, T., 2009, CHFR, a potential tumor suppressor, downregulates interleukin-8 through the inhibition of NF- κ B, *Oncogene*, 28 (29), 2643.
- Kashima, L., Idogawa, M., Mita, H., Shitashige, M., Yamada, T., Ogi, K., Suzuki, H., Toyota, M., Ariga, H., Sasaki, Y. and Tokino, T., 2012, CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation, *Journal of Biological Chemistry*, 287 (16), 12975-12984.
- Kawaguchi, T., Matsumoto, I. and Osawa, T., 1974, Studies on hemagglutinins from Maackia amurensis seeds, *Journal of Biological Chemistry*, 249 (9), 2786-2792.
- Kayser, K., Hoeft, D., Hufnagl, P., Caselitz, J., Zick, Y., André, S., Kaltner, H. and Gabius, H.J., 2003, Combined analysis of tumor growth pattern and expression of endogenous lectins as a prognostic tool in primary testicular cancer and its lung metastases, *Histology and histopathology*, 18 (3), 771-780.
- Keightley, M.C., Brown, P., Jabbour, H.N. and Sales, K.J., 2010a, F-Prostaglandin receptor regulates endothelial cell function via fibroblast growth factor-2, *BMC cell biology*, 11 (1), 8.
- Keightley, M.C., Sales, K.J. and Jabbour, H.N., 2010b, PGF 2 α -F-prostanoid receptor signalling via ADAMTS1 modulates epithelial cell invasion and endothelial cell function in endometrial cancer, *BMC cancer*, 10 (1), 488.
- Kemper, K., Prasetyanti, P.R., De Lau, W., Rodermond, H., Clevers, H. and Medema, J.P., 2012, Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells, *Stem cells*, 30 (11), 2378-2386.
- Kerscher, B., Willment, J.A. and Brown, G.D., 2013, The Dectin-2 family of C-type lectin-like receptors: an update, *International immunology*, 25 (5), 271-277.
- Khil, L.Y., Kim, W., Lyu, S., Park, W.B., Yoon, J.W. and Jun, H.S., 2007, Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells, *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13 (20), 2811.

- Kienle, G. S., Glockmann, A., Schink, M. and Kiene, H. 2009, *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research, *Journal of experimental & clinical cancer research*, 28 (1), 79.
- Kilańczyk, E., Graczyk, A., Ostrowska, H., Kasacka, I., Leśniak, W. and Filipek, A., 2012, S100A6 is transcriptionally regulated by β -catenin and interacts with a novel target, lamin A/C, in colorectal cancer cells, *Cell Calcium*, 51 (6), 470-477.
- Kimura, Y., Inoue, A., Hangai, S., Saijo, S., Negishi, H., Nishio, J., Yamasaki, S., Iwakura, Y., Yanai, H. and Taniguchi, T., 2016, The innate immune receptor Dectin-2 mediates the phagocytosis of cancer cells by Kupffer cells for the suppression of liver metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (49), 14097-14102.
- Kloos, R.T., Ringel, M.D., Knopp, M.V., Hall, N.C., King, M., Stevens, R., Liang, J., Wakely Jr, P.E., Vasko, V.V., Saji, M. and Rittenberry, J., 2009, Phase II trial of sorafenib in metastatic thyroid cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 27 (10), 1675.
- Knibbs, R.N., Goldstein, I.J., Ratcliffe, R.M. and Shibuya, N., 1991, Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leukoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*, Comparison with other sialic acid-specific lectins, *Journal of Biological Chemistry*, 266 (1), 83-88.
- Knudson, A.G., 1971, Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68 (4), 820-823.
- Kobielak, A. and Fuchs, E., 2004, α -catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin Dynamics, *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(8), 614.
- Koga, Y., Kitajima, Y., Miyoshi, A., Sato, K., Sato, S. and Miyazaki, K., 2006, The significance of aberrant CHFR methylation for clinical response to microtubule inhibitors in gastric cancer, *Journal of gastroenterology*, 41 (2), 133-139.
- Kokenyesi, R., 2001, Ovarian carcinoma cells synthesize both chondroitin sulfate and heparan sulfate cell surface proteoglycans that mediate cell adhesion to interstitial matrix, *Journal of cellular biochemistry*, 83 (2), 259-270.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S., 1985, Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Annual review of biochemistry*, 54 (1), 631-664.
- Kruth, K.A. and Rubenstein, P.A., 2012, Two deafness-causing (DFNA20/26) actin mutations affect Arp2/3-dependent actin regulation, *Journal of Biological Chemistry*, 287 (32), 27217-27226.
- Ku, N.O., Liao, J. and Omary, M.B., 1998, Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins, *The EMBO Journal*, 17 (7), 1892-1906.
- Kuliawat, R., Klein, L., Gong, Z., Nicoletta-Gentile, M., Nemkal, A., Cui, L., Bastie, C., Su, K., Huffman, D., Surana, M. and Barzilai, N., 2013, Potent humanin analog increases glucose-stimulated insulin secretion through enhanced metabolism in the β cell, *The FASEB Journal*, 27 (12), 4890-4898.

- Kumamoto, K., Goto, Y., Sekikawa, K., Takenoshita, S., Ishida, N., Kawakita, M. and Kannagi, R., 2001, Increased expression of UDP-galactose transporter messenger RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants, *Cancer research*, 61 (11), 4620-4627.
- Kumar-Sinha, C., Kalyana-Sundaram, S. and Chinnaiyan, A.M., 2015, Landscape of gene fusions in epithelial cancers: seq and ye shall find, *Genome medicine*, 7 (1), 129.
- Kurihara, T., Ikeda, S., Ishizaki, Y., Fujimori, M., Tokumoto, N., Hirata, Y., Ozaki, S., Okajima, M., Sugino, K. and Asahara, T., 2004, Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers, *Thyroid*, 14 (12), 1020-1029.
- Labelle, M. and Hynes, R.O., 2012, The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination, *Cancer discovery*, 2 (12), 1091-1099.
- Lam, S.K. and Ng, T.B., 2010, Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield, *Phytomedicine*, 17 (6), 457-462.
- Lan, Y.L., Zou, Y.J., Lou, J.C., Xing, J.S., Wang, X., Zou, S., Ma, B.B., Ding, Y. and Zhang, B., 2019, The sodium pump $\alpha 1$ subunit regulates bufalin sensitivity of human glioblastoma cells through the p53 signaling pathway, *Cell biology and toxicology*, 1-19.
- Leclerc, E., Fritz, G., Weibel, M., Heizmann, C.W. and Galichet, A., 2007, S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains, *Journal of Biological Chemistry*, 282 (43), 31317-31331.
- Leduc, C. and Etienne-Manneville, S., 2015, Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects, *Current opinion in cell biology*, 32, 102-112.
- Leenhardt, L., Grosclaude, P. and Chérié-Challine, L., 2004, Increased incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee, *Thyroid*, 14 (12), 1056-1060.
- Lefranc, F., Mijatovic, T., Kondo, Y., Sauvage, S., Roland, I., Debeir, O., Krstic, D., Vasic, V., Gailly, P., Kondo, S. and Blanco, G., 2008, Targeting the $\alpha 1$ subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells, *Neurosurgery*, 62 (1), 211-222.
- Li, A., Shi, D., Xu, B., Wang, J., Tang, Y.L., Xiao, W., Shen, G., Deng, W. and Zhao, C., 2017, S100A6 promotes cell proliferation in human nasopharyngeal carcinoma via the p38/MAPK signaling pathway, *Molecular carcinogenesis*, 56 (3), 972-984.
- Li, A., Gu, Y., Li, X., Sun, H., Zha, H., Xie, J., Zhao, J., Huang, M., Chen, L., Peng, Q. and Zhang, Y., 2018, S100A6 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway, *Oncology letters*, 15 (4), 5685-5693.

- Li, F., Shi, W., Capurro, M. and Filmus, J., 2011, Glypican-5 stimulates rhabdomyosarcoma cell proliferation by activating Hedgehog signaling, *The Journal of cell biology*, 192 (4), 691-704.
- Li, S., Xia, Y., Chen, K., Li, J., Liu, T., Wang, F., Lu, J., Zhou, Y. and Guo, C., 2016, Epigallocatechin-3-gallate attenuates apoptosis and autophagy in concanavalin A-induced hepatitis by inhibiting BNIP3, *Drug design, development and therapy*, 10, 631.
- Li, S., Zou, H., Shao, Y.Y., Mei, Y., Cheng, Y., Hu, D.L., Tan, Z.R. and Zhou, H.H., 2017, Pseudogenes of annexin A2, novel prognosis biomarkers for diffuse gliomas, *Oncotarget*, 8 (63), 106962.
- Li, S., Li, R., Ma, Y., Zhang, C., Huang, T. and Zhu, S., 2019, Transcriptome analysis of differentially expressed genes and pathways associated with mitoxantrone treatment prostate cancer, *Journal of cellular and molecular medicine*, 23 (3), 1987-2000.
- Li, W.W., Yu, J.Y., Xu, H.L. and Bao, J.K., 2011, Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics, *Biochemical and biophysical research communications*, 414 (2), 282-286.
- Li, Y., Miao, L., Cai, H., Ding, J., Xiao, Y., Yang, J. and Zhang, D., 2013, The overexpression of glypican-5 promotes cancer cell migration and is associated with shorter overall survival in non-small cell lung cancer, *Oncology letters*, 6 (6), 1565-1572.
- Li, Y., Wagner, E.R., Yan, Z., Wang, Z., Luther, G., Jiang, W., Ye, J., Wei, Q., Wang, J., Zhao, L. and Lu, S., 2015, The calcium-binding protein S100A6 accelerates human osteosarcoma growth by promoting cell proliferation and inhibiting osteogenic differentiation, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37 (6), 2375-2392.
- Li, Z., Zhang, Z., Xie, J.X., Li, X., Tian, J., Cai, T., Cui, H., Ding, H., Shapiro, J.I. and Xie, Z., 2011, Na/K-ATPase mimetic pNaKtide peptide inhibits the growth of human cancer cells, *Journal of Biological Chemistry*, 286 (37), 32394-32403.
- Li, Z., Tang, M., Ling, B., Liu, S., Zheng, Y., Nie, C., Yuan, Z., Zhou, L., Guo, G., Tong, A. and Wei, Y., 2014, Increased expression of S100A6 promotes cell proliferation and migration in human hepatocellular carcinoma, *Journal of Molecular Medicine*, 92 (3), 291-303.
- Lin, K.H., Huang, M.Y., Cheng, W.C., Wang, S.C., Fang, S.H., Tu, H.P., Su, C.C., Hung, Y.L., Liu, P.L., Chen, C.S. and Wang, Y.T., 2018, RNA-seq transcriptome analysis of breast cancer cell lines under shikonin treatment, *Scientific reports*, 8 (1), 2672.
- Lin, R.Y., 2011, Thyroid cancer stem cells, *Nature Reviews Endocrinology*, 7 (10), 609.
- Lin, Y.U., Wu, T., Yao, Q., Zi, S., Cui, L., Yang, M. and Li, J., 2015, LGR5 promotes the proliferation of colorectal cancer cells via the Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Oncology letters*, 9 (6), 2859-2863.
- Lis, H. and Sharon, N., 1998, Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition, *Chemical reviews*, 98 (2), 637-674.

- Lister, R., O'Malley, R.C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B.D., Berry, C.C., Millar, A.H. and Ecker, J.R., 2008, Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*, *Cell*, 133 (3), 523-536.
- Listinsky, J.J., Siegal, G.P. and Listinsky, C.M., 1998, α -L-fucose: A potentially critical molecule in pathologic processes including neoplasia, *American Journal of Clinical Pathology*, 110 (4), 425-440.
- Listinsky, J.J., Listinsky, C.M., Alapati, V. and Siegal, G.P., 2001, Cell surface fucose ablation as a therapeutic strategy for malignant neoplasms, *Advances in anatomic pathology*, 8 (6), 330-337.
- Listinsky, J.J., Siegal, G.P. and Listinsky, C.M., 2011, The emerging importance of α -L-fucose in human breast cancer: a review, *American journal of translational research*, 3 (4), 292.
- Liu, B., Zhang, B., Min, M.W., Bian, H.J., Chen, L.F., Liu, Q. and Bao, J.K., 2009a, Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790 (8), 840-844.
- Liu, B., Cheng, Y., Zhang, B., Bian, H.J. and Bao, J.K., 2009b, *Polygonatum cyrtoneura* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway, *Cancer letters*, 275 (1), 54-60.
- Liu, T.X., Becker, M.W., Jelinek, J., Wu, W.S., Deng, M., Mikhalkovich, N., Hsu, K., Bloomfield, C.D., Stone, R.M., DeAngelo, D.J. and Galinsky, I.A., 2007, Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding α -catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation, *Nature medicine*, 13 (1), 78.
- Liu, Y., Zhang, Y., Wu, H., Li, Y., Zhang, Y., Liu, M., Li, X. and Tang, H., 2017, miR-10a suppresses colorectal cancer metastasis by modulating the epithelial-to-mesenchymal transition and anoikis, *Cell death & disease*, 8 (4), 2739.
- Liu, Z., Kakudo, K., Bai, Y., Li, Y., Ozaki, T., Miyauchi, A., Taniguchi, E. and Mori, I., 2011, Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma, a novel predictor for lymph node metastasis; possible morphological indicator of epithelial mesenchymal transition, *Journal of clinical pathology*, 64 (4), 325-329.
- Liu, Z.1., Luo, Y., Zhou, T.T. and Zhang, W.Z., 2013, Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death?, *Cell proliferation*, 46 (5), 509-515.
- Lodish, H., Darnell, J.E., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P., 2008, *Molecular cell biology*, Macmillan.
- Loris, R., 2002, Principles of structures of animal and plant lectins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1572 (2-3), 198-208.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S. and Shafee, T., 2017, Transcriptomics Technologies, *PLoS computational biology*, 13 (5), 1005457.

- Lowy, D.R. and Willumsen, B.M., 1993, Function and regulation of ras, *Annual review of biochemistry*, 62 (1), 851-891.
- Lu, M., Flanagan, J.U., Langley, R.J., Hay, M.P. and Perry, J.K., 2019, Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications, *Signal transduction and targeted therapy*, 4 (1), 3.
- Lu, R., Zhou, Z., Yu, W., Xia, Y. and Zhi, X., 2017, CPEB4 promotes cell migration and invasion via upregulating Vimentin expression in breast cancer, *Biochemical and biophysical research communications*, 489 (2), 135-141.
- Luo, Y., Kong, F., Wang, Z., Chen, D., Liu, Q., Wang, T., Xu, R., Wang, X. and Yang, J.Y., 2014, Loss of ASAP3 destabilizes cytoskeletal protein ACTG1 to suppress cancer cell migration, *Molecular medicine reports*, 9 (2), 387-394.
- MacPherson, M. and Fagerholm, S.C., 2010, Filamin and filamin-binding proteins in integrin-regulation and adhesion. Focus on: "FilaminA is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading", *American Journal of Physiology*, 298, 206-208.
- Maddika, S., Sy, S.M.H. and Chen, J., 2009, Functional interaction between Chfr and Kif22 controls genomic stability, *Journal of Biological Chemistry*, 284 (19), 12998-13003.
- Maenuma, K., Yim, M., Komatsu, K., Hoshino, M., Takahashi, Y., Bovin, N. and Irimura, T., 2008, Use of a library of mutated Maackia amurensis hemagglutinin for profiling the cell lineage and differentiation, *Proteomics*, 8 (16), 3274-3283.
- Magalhães, A., Duarte, H.O. and Reis, C.A., 2017, Aberrant glycosylation in cancer: a novel molecular mechanism controlling metastasis, *Cancer cell*, 31 (6), 733-735.
- Manié, S., Santoro, M., Fusco, A. and Billaud, M., 2001, The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation, *TRENDS in Genetics*, 17 (10), 580-589.
- Mathieu, V., Pirker, C., Martin de Lassalle, E., Vernier, M., Mijatovic, T., DeNeve, N., Gaussin, J.F., Dehoux, M., Lefranc, F., Berger, W., Kiss, R., 2009, The sodium pump alpha1 subunit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13, 3960-72.
- Matsuda, K., Ohga, N., Hida, Y., Muraki, C., Tsuchiya, K., Kurosu, T., Akino, T., Shih, S.C., Totsuka, Y., Klagsbrun, M. and Shindoh, M., 2010, Isolated tumor endothelial cells maintain specific character during long-term culture, *Biochemical and biophysical research communications*, 394 (4), 947-954.
- Maule, F., Bresolin, S., Rampazzo, E., Boso, D., Della Puppa, A., Esposito, G., Porcù, E., Mitola, S., Lombardi, G., Accordi, B. and Tumino, M., 2016, Annexin 2A sustains glioblastoma cell dissemination and proliferation, *Oncotarget*, 7 (34), 54632.
- McClanahan, T., Koseoglu, S., Smith, K., Grein, J., Gustafson, E., Black, S., Kirschmeier, P. and Samatar, A.A., 2006, Identification of overexpression of orphan G protein-coupled

- receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors, *Cancer biology & therapy*, 5 (4), 419-426.
- McDonald, T., Wang, R., Bailey, W., Xie, G., Chen, F., Caskey, C.T. and Liu, Q., 1998, Identification and cloning of an orphan G protein-coupled receptor of the glycoprotein hormone receptor subfamily, *Biochemical and biophysical research communications*, 247 (2), 266-270.
- McGreal, E.P., Rosas, M., Brown, G.D., Zamze, S., Wong, S.Y., Gordon, S., Martinez-Pomares, L. and Taylor, P.R., 2006, The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose, *Glycobiology*, 16 (5), 422-430.
- Meehan, M., Melvin, A., Gallagher, E., Smith, J., Goldrick, A.M., Moss, C., Goossens, S., Harrison, M., Kay, E., Fitzpatrick, J. and Dervan, P., 2007, Alpha-T-catenin (CTNNA3) displays tumour specific monoallelic expression in urothelial carcinoma of the bladder, *Genes, chromosomes and cancer*, 46 (6), 587-593.
- Mehta, S., Shelling, A., Muthukaruppan, A., Lasham, A., Blenkiron, C., Laking, G. and Print, C., 2010, Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine, *Therapeutic advances in medical oncology*, 2 (2), 125-148.
- Mehta, S., Chhetra, R., Srinivasan, R., Sharma, S.C., Behera, D. and Ghosh, S., 2013, Potential importance of Maackia amurensis agglutinin in non-small cell lung cancer, *Biological chemistry*, 394 (7), 889-900.
- Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., Jung, P., Iglesias, M., Céspedes, M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Muñoz, P. and Clevers, H., 2011, The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse, *Cell stem cell*, 8 (5), 511-524.
- Michelotti, G., Jiang, X., Sosa, J.A., Diehl, A.M. and Henderson, B.B., 2015, LGR5 is associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid cancer, *Oncotarget*, 6 (33), 34549.
- Mijatovic, T., Roland, I., Van Quaquebeke, E., Nilsson, B., Mathieu, A., Van Vynckt, F., Darro, F., Blanco, G., Facchini, V. and Kiss, R., 2007a, The $\alpha 1$ subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers, *The Journal of pathology*, 212 (2), 170-179.
- Mijatovic, T., Van Quaquebeke, E., Delest, B., Debeir, O., Darro, F. and Kiss, R., 2007b, Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1776 (1), 32-57.
- Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D. and Sedoris, K., 2012, c-Myc and cancer metabolism, *Clinical Cancer Research*, 18 (20), 5546-5553.
- Miyoshi, E., Moriwaki, K. and Nakagawa, T., 2008, Biological function of fucosylation in cancer biology, *Journal of biochemistry*, 143 (6), 725-729.

- Mobasheri, A., Fox, R., Evans, I., Cullingham, F., Martín-Vasallo, P. and Foster, C.S., 2003, Epithelial Na, K-ATPase expression is down-regulated in canine prostate cancer; a possible consequence of metabolic transformation in the process of prostate malignancy, *Cancer cell international*, 3 (1), 8.
- Mohammadalipour, A., Burdick, M.M. and Tees, D.F., 2018, Deformability of breast cancer cells in correlation with surface markers and cell Rolling, *The FASEB Journal*, 32 (4), 1806-1817.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L. and Wold, B., 2008, Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq, *Nature methods*, 5 (7), 621.
- Mutz, K. O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J. G. and Stahl, F., 2013, Transcriptome analysis using next-generation sequencing, *Current opinion in biotechnology*, 24 (1), 22-30.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M. and Snyder, M., 2008, The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing, *Science*, 320 (5881), 1344-1349.
- Narayanan, S. 1994, Sialic acid as a tumor marker, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 24 (4), 376-384.
- Nedjadi, T., Smith, R., Jenkins, R.E. and Costello, E., 2007, Involvement of S100A6 (calcyclin) in pancreatic cancer progression, *Pancreas*, 35 (4), 419.
- Nedjadi, T., Kitteringham, N., Campbell, F., Jenkins, R.E., Park, B.K., Navarro, P., Ashcroft, F., Tepikin, A., Neoptolemos, J.P. and Costello, E., 2009, S100A6 binds to annexin 2 in pancreatic cancer cells and promotes pancreatic cancer cell motility, *British journal of cancer*, 101 (7), 1145.
- Ng, J.M. and Curran, T., 2011, The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11 (7), 493.
- Nikiforova, M.N., Lynch, R.A., Biddinger, P.W., Alexander, E.K., Dorn, G.W., Tallini, G., Kroll, T.G. and Nikiforov, Y.E., 2003, RAS point mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88 (5), 2318-2326.
- Nilsson, C.L., 2007. *Lectins: analytical tools from nature*, Lectins, Elsevier Science BV, 1-13.
- Ning, X., Sun, S., Hong, L., Liang, J., Liu, L., Han, S., Liu, Z., Shi, Y., Li, Y., Gong, W. and Zhang, S., 2007, Calcyclin-binding protein inhibits proliferation, tumorigenicity, and invasion of gastric cancer, *Molecular Cancer Research*, 5 (12), 1254-1262.
- Nizet, V., Varki, A., and Aebi, M., 2017, *Microbial lectins: hemagglutinins, adhesins, and toxins*, Essentials of Glycobiology, 3rd (ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Norris, J. and King D., 2000, *Carcinogenesis*, Basic Science of Cancer, In: Kruh, G.D., Tew, K.D. (ed.), Chapter 8, Current Medicine Inc, China, 154-167.
- Ochoa-Alvarez, J.A., Krishnan, H., Shen, Y., Acharya, N.K., Han, M., McNulty, D.E., Hasegawa, H., Hyodo, T., Senga, T., Geng, J.G. and Kosciuk, M., 2012, Plant lectin can target receptors containing sialic acid, exemplified by podoplanin, to inhibit transformed cell growth and migration, *PloS one*, 7 (7), 41845.
- Ochoa-Alvarez, J.A., Krishnan, H., Pastorino, J.G., Nevel, E., Kephart, D., Lee, J.J., Retzbach, E.P., Shen, Y., Fatahzadeh, M., Baredes, S. and Kalyoussef, E., 2015, Antibody and lectin target podoplanin to inhibit oral squamous carcinoma cell migration and viability by distinct mechanisms, *Oncotarget*, 6 (11), 9045.
- Oliva, C., Escobedo, P., Astorga, C., Molina, C. and Sierralta, J., 2012, Role of the MAGUK protein family in synapse formation and function, *Developmental neurobiology*, 72 (1), 57-72.
- Olivier, M., Hollstein, M. and Hainaut, P., 2010, TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2 (1), 001008.
- Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K., Inoue, S., Maruo, T., Otani, Y., Fujii, K., Ishida, J., Shimazu, Y., Yoshida, K. and Michiue, H., 2015, Annexin A2 regulates angiogenesis and invasion phenotypes of malignant glioma, *Brain tumor pathology*, 32 (3), 184-194.
- Ouyang, L., Chen, Y., Wang, X.Y., Lu, R.F., Zhang, S.Y., Tian, M., Xie, T., Liu, B. and He, G., 2014, Polygonatum odoratum lectin induces apoptosis and autophagy via targeting EGFR-mediated Ras-Raf-MEK-ERK pathway in human MCF-7 breast cancer cells, *Phytomedicine*, 21 (12), 1658-1665.
- Pećina-Šlaus, N., 2003, Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells, *Cancer cell international*, 3 (1), 17.
- Peng, W.C., de Lau, W., Forneris, F., Granneman, J.C., Huch, M., Clevers, H. and Gros, P., 2013, Structure of stem cell growth factor R-spondin 1 in complex with the ectodomain of its receptor LGR5, *Cell reports*, 3 (6), 1885-1892.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C. and Fuchs, E., 2003, Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions, *Cell*, 112 (4), 535-548.
- Perez-Tomas, R., 2006, Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment, *Current medicinal chemistry*, 13 (16), 1859-1876.
- Perlson, E., Michaelievski, I., Kowalsman, N., Ben-Yaakov, K., Shaked, M., Seger, R., Eisenstein, M. and Fainzilber, M., 2006, Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase, *Journal of molecular biology*, 364 (5), 938-944.
- Peyssonnaud, C. and Eychène, A., 2001, The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation, *Biology of the Cell*, 93 (1-2), 53-62.

- Pflaum, J., Schlosser, S. and Müller, M., 2014, p53 family and cellular stress responses in cancer, *Frontiers in oncology*, 4, 285.
- Phua, D.C., Humbert, P.O. and Hunziker, W., 2009, Vimentin regulates scribble activity by protecting it from proteasomal degradation, *Molecular biology of the cell*, 20 (12), 2841-2855.
- Piao, H.L., Yuan, Y., Wang, M., Sun, Y., Liang, H. and Ma, L., 2014, α -catenin acts as a tumour suppressor in E-cadherin-negative basal-like breast cancer by inhibiting NF- κ B signalling, *Nature cell biology*, 16 (3), 245.
- Pinho, S.S. and Reis, C.A., 2015, Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications, *Nature Reviews Cancer*, 15 (9), 540.
- Poiroux, G., Barre, A., Van Damme, E., Benoist, H., & Rougé, P., 2017, Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy, *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1232.
- Porra, V., Ferraro-Peyret, C., Durand, C., Selmi-Ruby, S., Giroud, H., Berger-Dutrieux, N., Decaussin, M., Peix, J.L., Bournaud, C., Orgiazzi, J. and Borson-Chazot, F., 2005, Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90 (5), 3028-3035.
- Privette, L.M., González, M.E., Ding, L., Kleer, C.G. and Petty, E.M., 2007, Altered expression of the early mitotic checkpoint protein, CHFR, in breast cancers: implications for tumor suppression, *Cancer research*, 67 (13), 6064-6074.
- Privette, L.M. and Petty, E.M., 2008, CHFR: a novel mitotic checkpoint protein and regulator of tumorigenesis, *Translational oncology*, 1 (2), 57-64.
- Privette, L.M., Weier, J.F., Nguyen, H.N., Yu, X. and Petty, E.M., 2008, Loss of CHFR in human mammary epithelial cells causes genomic instability by disrupting the mitotic spindle assembly checkpoint, *Neoplasia*, 10 (7), 643-652.
- Proudfoot, N., 1980, Pseudogenes, *Nature*, 286 (5776), 840.
- Quan, L., Qiu, T., Liang, J., Li, M., Zhang, Y. and Tao, K., 2015, Identification of target genes regulated by KSHV miRNAs in KSHV-infected lymphoma cells, *Pathology & Oncology Research*, 21 (4), 875-880.
- Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U.R. and Albert, Š., 2007, Ras oncogenes and their downstream targets, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773 (8), 1177-1195.
- Rajasekaran, A.K. and Rajasekaran, S.A., 2003, Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 285(3), 388-396.
- Rao, D.D., Wang, Z., Senzer, N. and Nemunaitis, J., 2013, RNA interference and personalized cancer therapy, *Discovery medicine*, 15 (81), 101-110.

- Reeves, S.A., Chavez-Kappel, C., Davis, R., Rosenblum, M. and Israel, M.A., 1992, Developmental regulation of annexin II (Lipocortin 2) in human brain and expression in high grade glioma, *Cancer research*, 52 (24), 6871-6876.
- Reis, C.A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C. and David, L., 2010, Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection, *Journal of clinical pathology*, 63(4), 322-329.
- Replinger, D., Bargren, A., Zhang, Y.W., Adler, J.T., Haymart, M. and Chen, H., 2008, Is Hashimoto's thyroiditis a risk factor for papillary thyroid cancer?, *Journal of Surgical Research*, 150 (1), 49-52.
- Roberts, S., Delury, C. and Marsh, E., 2012, The PDZ protein discs-large (DLG): the 'Jekyll and Hyde' of the epithelial polarity protein, *The FEBS journal*, 279 (19), 3549-3558.
- Rot, S., Taubert, H., Bache, M., Greither, T., Würl, P., Eckert, A.W., Schubert, J., Vordermark, D. and Kappler, M., 2011, A novel splice variant of the stem cell marker LGR5/GPR49 is correlated with the risk of tumor-related death in soft-tissue sarcoma patients, *BMC cancer*, 11 (1), 429.
- Ruddon, R.W., 2007, *Cancer biology*, Oxford University Press.
- Sahab, Z.J., Hall, M.D., Zhang, L., Cheema, A.K. and Byers, S.W., 2010, Tumor suppressor rarres1 regulates dlx2, pp2a, vcp, eb1, and ankrd26, *Journal of Cancer*, 1, 14.
- Sakai, H., Suzuki, T., Maeda, M., Takahashi, Y., Horikawa, N., Minamimura, T., Tsukada, K. and Takeguchi, N., 2004, Up-regulation of Na⁺, K⁺-ATPase α 3-isoform and down-regulation of the α 1-isoform in human colorectal cancer, *FEBS letters*, 563 (1-3), 151-154.
- Sales, K.J., Milne, S.A., Williams, A.R., Anderson, R.A. and Jabbour, H.N., 2004, Expression, localization, and signaling of prostaglandin F₂ α receptor in human endometrial adenocarcinoma: regulation of proliferation by activation of the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling pathways, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89 (2), 986-993.
- Sales, K.J., List, T., Boddy, S.C., Williams, A.R., Anderson, R.A., Naor, Z. and Jabbour, H.N., 2005, A novel angiogenic role for prostaglandin F₂ α -FP receptor interaction in human endometrial adenocarcinomas, *Cancer research*, 65 (17), 7707-7716.
- Sales, K.J., Boddy, S.C., Williams, A.R., Anderson, R.A. and Jabbour, H.N., 2007, F-prostanoid receptor regulation of fibroblast growth factor 2 signaling in endometrial adenocarcinoma cells. *Endocrinology*, 148 (8), 3635-3644.
- Sales, K.J., Boddy, S.C. and Jabbour, H.N., 2008, F-prostanoid receptor alters adhesion, morphology and migration of endometrial adenocarcinoma cells, *Oncogene*, 27 (17), 2466.
- Sarin, K.Y., Cheung, P., Gilson, D., Lee, E., Tennen, R.I., Wang, E., Artandi, M.K., Oro, A.E. and Artandi, S.E., 2005, Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells, *Nature*, 436 (7053), 1048.

- Satelli, A. and Li, S., 2011, Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Cellular and molecular life sciences*, 68 (18), 3033-3046.
- Sato, K., Yang, X.L., Yudate, T., Chung, J.S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R.P., Underhill, D., Cruz, P.D. and Ariizumi, K., 2006, Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor γ chain to induce innate immune responses, *Journal of Biological Chemistry*, 281 (50), 38854-38866.
- Satoh, A., Toyota, M., Itoh, F., Sasaki, Y., Suzuki, H., Ogi, K., Kikuchi, T., Mita, H., Yamashita, T., Kojima, T. and Kusano, M., 2003, Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer, *Cancer research*, 63 (24), 8606-8613.
- Schöneberg, T., Schultz, G. and Gudermann, T., 1999, Structural basis of G protein-coupled receptor function, *Molecular and cellular endocrinology*, 151 (1-2), 181-193.
- Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszk, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, B.T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R. and Camargo, F.D., 2011, Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation, *Cell*, 144 (5), 782-795.
- Schultz, M.J., Swindall, A.F. and Bellis, S.L., 2012, Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans, *Cancer and Metastasis Reviews*, 31 (3-4), 501-518.
- Scolnick, D.M. and Halazonetis, T.D., 2000, Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase, *Nature*, 406 (6794), 430.
- Shang, S., Hua, F. and Hu, Z.W., 2017, The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities, *Oncotarget*, 8 (20), 33972.
- Shao, Y.W., Wood, G.A., Lu, J., Tang, Q.L., Liu, J., Molyneux, S., Chen, Y., Fang, H., Adissu, H., McKee, T. and Waterhouse, P., 2019, Cross-species genomics identifies DLG2 as a tumor suppressor in osteosarcoma, *Oncogene*, 38 (2), 291.
- Sharma, S., Kelly, T.K. and Jones, P.A., 2010, Epigenetics in cancer, *Carcinogenesis*, 31 (1), 27-36.
- Sharon, N. and Lis, H., 2004, History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules, *Glycobiology*, 14 (11), 53-62.
- Sharon, N., 2007, Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules, *Journal of Biological Chemistry*, 282 (5), 2753-2764.
- Shen, S.S., Hamamoto, S.T., Bern, H.A. and Steinhardt, R.A., 1978, Alteration of sodium transport in mouse mammary epithelium associated with neoplastic transformation, *Cancer research*, 38 (5), 1356-1361.
- Sherr, C.J. and McCormick, F., 2002, The RB and p53 pathways in cancer, *Cancer cell*, 2 (2), 103-112.

- Shi, X., Nie, F., Wang, Z. and Sun, M., 2016, Pseudogene-expressed RNAs: a new frontier in cancers, *Tumor Biology*, 37 (2), 1471-1478.
- Shi, Z., Li, W.W., Tang, Y. and Cheng, L.J., 2017, A novel molecular model of plant lectin-induced programmed cell death in cancer, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, pp.b17-00363.
- Shtivelman, E., 2003, Promotion of Mitosis by Activated Protein Kinase B After DNA Damage Involves Polo-Like Kinase 1 and Checkpoint Protein CHFR11 Institutional funds from the Cancer Research Institute, University of California San Francisco, *Molecular cancer research*, 1 (13), 959-969.
- Shum, M.S., Pasquier, E., Po'uha, S.T., O'Neill, G.M., Chaponnier, C., Gunning, P.W. and Kavallaris, M., 2011, γ -Actin regulates cell migration and modulates the ROCK signaling pathway, *The FASEB Journal*, 25 (12), 4423-4433.
- Shyr, D. and Liu, Q., 2013, Next generation sequencing in cancer research and clinical application, *Biological procedures online*, 15 (1), 4.
- Słomnicki, Ł.P., Nawrot, B. and Leśniak, W., 2009, S100A6 binds p53 and affects its activity, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41 (4), 784-790.
- Smallridge, R.C., Ain, K.B., Asa, S.L., Bible, K.C., Brierley, J.D., Burman, K.D., Kebebew, E., Lee, N.Y., Nikiforov, Y.E., Rosenthal, M.S. and Shah, M.H., 2012, American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer, *Thyroid*, 22 (11), 1104-1139.
- Smallridge, R.C., Chindris, A.M., Asmann, Y.W., Casler, J.D., Serie, D.J., Reddi, H.V., Cradic, K.W., Rivera, M., Grebe, S.K., Necela, B.M. and Eberhardt, N.L., 2014, RNA sequencing identifies multiple fusion transcripts, differentially expressed genes, and reduced expression of immune function genes in BRAF (V600E) mutant vs BRAF wild-type papillary thyroid carcinoma, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99 (2), 338-347.
- Smanik, P.A., Liu, Q., Furminger, T.L., Ryu, K., Xing, S., Mazzaferri, E.L. and Jhiang, S.M., 1996, Cloning of the human sodium iodide symporter, *Biochemical and biophysical research communications*, 226 (2), 339-345.
- Song, H.H. and Filmus, J., 2002, The role of glypicans in mammalian development, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1573 (3), 241-246.
- Stahn, V., Nagel, I., Fischer-Huchzermeyer, S., Oyen, F., Schneppenheim, R., Gesk, S., Bohring, A., Chikobava, L., Young, P., Gess, B. and Werner, M., 2016, Molecular analysis of hybrid Neurofibroma/Schwannoma identifies common monosomy 22 and α -T-Catenin/CTNNA3 as a novel candidate tumor suppressor, *The American journal of pathology*, 186 (12), 3285-3296.
- Steen, P.V.D., Rudd, P.M., Dwek, R.A. and Opdenakker, G., 1998, Concepts and principles of O-linked glycosylation, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 33 (3), 151-208.

- Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M. and Lappi, D.A., 1992, Ribosome-inactivating proteins from plants: Present status and future prospects, *Bio/technology*, 10 (4), 405.
- Sun, Q., Wang, Y., Zhang, Y., Liu, F., Cheng, X., Hou, N., Zhao, X. and Yang, X., 2007, Expression profiling reveals dysregulation of cellular cytoskeletal genes in HBx-induced hepatocarcinogenesis, *Cancer biology & therapy*, 6 (5), 668-674.
- Sun, Y., Xu, K., He, M., Fan, G. and Lu, H., 2018, Overexpression of Glypican 5 (GPC5) inhibits prostate cancer cell proliferation and invasion via suppressing Sp1-mediated EMT and activation of Wnt/ β -catenin signaling, *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 26 (4), 565-572.
- Takai, N., Kira, N., Ishii, T., Yoshida, T., Nishida, M., Nishida, Y., Nasu, K. and Narahara, H., 2012, Bufalin, a traditional oriental medicine, induces apoptosis in human cancer cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13 (1), 399-402.
- Takemura, K., Hirayama, R., Hirokawa, K., Inagaki, M., Tsujimura, K., Esaki, Y. and Mishima, Y., 1994, Expression of vimentin in gastric cancer: a possible indicator for prognosis, *Pathobiology*, 62 (3), 149-154.
- Takeshita, M., Koga, T., Takayama, K., Kouso, H., Nishimura-Ikeda, Y., Yoshino, I., Maehara, Y., Nakanishi, Y. and Sueishi, K., 2008, CHFR expression is preferentially impaired in smoking-related squamous cell carcinoma of the lung, and the diminished expression significantly harms outcomes, *International journal of cancer*, 123 (7), 1623-1630.
- Tanese, K., Fukuma, M., Yamada, T., Mori, T., Yoshikawa, T., Watanabe, W., Ishiko, A., Amagai, M., Nishikawa, T. and Sakamoto, M., 2008, G-protein-coupled receptor GPR49 is up-regulated in basal cell carcinoma and promotes cell proliferation and tumor formation, *The American journal of pathology*, 173 (3), 835-843.
- Tatenhorst, L., Rescher, U., Gerke, V. and Paulus, W., 2006, Knockdown of annexin 2 decreases migration of human glioma cells in vitro, *Neuropathology and applied neurobiology*, 32 (3), 271-277.
- Tateno, H., Uchiyama, N., Kuno, A., Togayachi, A., Sato, T., Narimatsu, H., and Hirabayashi, J., 2007, A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray, *Glycobiology*, 17 (10), 1138-1146.
- Taylor, M.E. and Drickamer, K., 2011, *Introduction to glycobiology*, Oxford university press.
- Teglund, S. and Toftgård, R., 2010, Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805 (2), 181-208.
- Thomas, D., Friedman, S. and Lin, R.Y., 2008, Thyroid stem cells: lessons from normal development and thyroid cancer, *Endocrine-related cancer*, 15 (1), 51-58.
- Tolcher, A.W., Mita, A., Lewis, L.D., Garrett, C.R., Till, E., Daud, A.I., Patnaik, A., Papadopoulos, K., Takimoto, C., Bartels, P. and Keating, A., 2008, Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin, *Journal of Clinical Oncology*, 26 (32), 5198.

- Toyota, M., Sasaki, Y., Satoh, A., Ogi, K., Kikuchi, T., Suzuki, H., Mita, H., Tanaka, N., Itoh, F., Issa, J.P.J. and Jair, K.W., 2003, Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (13), 7818-7823.
- Traub, P. and Shoeman, R.L., 1994, Intermediate filament proteins: cytoskeletal elements with gene-regulatory function?, *International review of cytology*, Academic Press, 1-30.
- Tzivion, G., Luo, Z.J. and Avruch, J., 2000, Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (38), 29772-29778.
- Uchida, H., Yamazaki, K., Fukuma, M., Yamada, T., Hayashida, T., Hasegawa, H., Kitajima, M., Kitagawa, Y. and Sakamoto, M., 2010, Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer, *Cancer science*, 101 (7), 1731-1737.
- Upton, M.P., Hirohashi, S., Tome, Y., Miyazawa, N., Suemasu, K. and Shimosato, Y., 1986, Expression of vimentin in surgically resected adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung, *The American journal of surgical pathology*, 10 (8), 560-567.
- Valentiner, U., Pfüller, U., Baum, C. and Schumacher, U., 2002, The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines in vitro, *Toxicology*, 171 (2-3), 187-199.
- Valkenburg, K.C., Graveel, C.R., Zylstra-Diegel, C.R., Zhong, Z. and Williams, B.O., 2011, Wnt/ β -catenin signaling in normal and cancer stem cells, *Cancers*, 3 (2), 2050-2079.
- Vanharanta, S. and Massagué, J., 2013, Origins of metastatic traits, *Cancer cell*, 24 (4), 410-421.
- Varki, A., 2007, Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins, *Nature*, 446 (7139), 1023.
- Vasconcelos, I.M. and Oliveira, J.T.A., 2004, Antinutritional properties of plant lectins, *Toxicon*, 44 (4), 385-403.
- Veilleux, A., Mayeur, S., Bérubé, J.C., Beaulieu, J.F., Tremblay, E., Hould, F.S., Bossé, Y., Richard, D. and Levy, E., 2015, Altered intestinal functions and increased local inflammation in insulin-resistant obese subjects: a gene-expression profile analysis, *BMC gastroenterology*, 15 (1), 119.
- Verma, M., 2012, Personalized medicine and cancer, *Journal of personalized medicine*, 2 (1), 1-14.
- Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J.P., Nevo, J., Gjerdrum, C., Tiron, C., Lorens, J.B. and Ivaska, J., 2011, Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer, *Oncogene*, 30 (12), 1436.

- Wang, H., Ng, T.B., Ooi, V.E. and Liu, W.K., 2000, Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 32 (3), 365-372.
- Wang, H., Zou, Z., Duan, L., Chen, X., Li, H., Yuan, S., He, T.C. and Zhou, L., 2013, S100A6 promotes proliferation and migration of human osteosarcoma cell line 143B through PI3K/Akt signaling pathway, *Chinese Journal of Pathophysiology*, 29, 1928-1933.
- Wang, H., Dong, X., Gu, X., Qin, R., Jia, H. and Gao, J., 2015, The microRNA-217 functions as a potential tumor suppressor in gastric cancer by targeting GPC5, *PLoS One*, 10 (6), 0125474.
- Wang, S., Qiu, M., Xia, W., Xu, Y., Mao, Q., Wang, J., Dong, G., Xu, L., Yang, X. and Yin, R., 2016, Glypican-5 suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition of the lung adenocarcinoma by competitively binding to Wnt3a, *Oncotarget*, 7 (48), 79736.
- Wang, W.C. and Cummings, R.D., 1988, The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2, 3 to penultimate galactose residues, *Journal of Biological Chemistry*, 263 (10), 4576-4585.
- Wang, X.H., Zhang, L.H., Zhong, X.Y., Xing, X.F., Liu, Y.Q., Niu, Z.J., Peng, Y., Du, H., Zhang, G.G., Hu, Y. and Liu, N., 2010, S100A6 overexpression is associated with poor prognosis and is epigenetically up-regulated in gastric cancer, *The American journal of pathology*, 177 (2), 586-597.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M., 2009, RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Nature reviews genetics*, 10 (1), 57.
- Weinberg, R.A. and Weinberg, R.A., 2007, *The biology of cancer*, Garland science, New York.
- Williams, G.M., 2001, Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment, *Toxicology*, 166 (1-2), 3-10.
- Williamson, D., Selfe, J., Gordon, T., Lu, Y.J., Pritchard-Jones, K., Murai, K., Jones, P., Workman, P. and Shipley, J., 2007, Role for amplification and expression of glypican-5 in rhabdomyosarcoma, *Cancer research*, 67 (1), 57-65.
- Winter, G.E., Radic, B., Mayor-Ruiz, C., Blomen, V.A., Trefzer, C., Kandasamy, R.K., Huber, K.V., Gridling, M., Chen, D., Klampfl, T. and Kralovics, R., 2014, The solute carrier SLC35F2 enables YM155-mediated DNA damage toxicity. *Nature chemical biology*, 10 (9), 768.
- Witt, R.M., Hecht, M.L., Pazyra-Murphy, M.F., Cohen, S.M., Noti, C., van Kuppevelt, T.H., Fuller, M., Chan, J.A., Hopwood, J.J., Seeberger, P.H. and Segal, R.A., 2013, Heparan sulfate proteoglycans containing a glypican 5 core and 2-O-sulfo-iduronic acid function as Sonic Hedgehog co-receptors to promote proliferation, *Journal of Biological Chemistry*, 288 (36), 26275-26288.

- Witz, I.P., 2008, The selectin–selectin ligand axis in tumor progression, *Cancer and Metastasis Reviews*, 27 (1), 19-30.
- Woods, D.F. and Bryant, P.J., 1989, Molecular cloning of the lethal (1) discs large-1 oncogene of *Drosophila*, *Developmental biology*, 134 (1), 222-235.
- Wu, A.M., Lisowska, E., Duk, M. and Yang, Z., 2009, Lectins as tools in glycoconjugate research, *Glycoconjugate journal*, 26 (8), 899.
- Wu, C.C., Shyu, R.Y., Chou, J.M., Jao, S.W., Chao, P.C., Kang, J.C., Wu, S.T., Huang, S.L. and Jiang, S.Y., 2006, RARRES1 expression is significantly related to tumour differentiation and staging in colorectal adenocarcinoma, *European Journal of Cancer*, 42 (4), 557-565.
- Wu, L. and Bao, J.K., 2013, Anti-tumor and anti-viral activities of *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA)-related lectins, *Glycoconjugate journal*, 30 (3), 269-279.
- www.biocluster.ucr.edu
- www.the-scientist.com
- Xiao-Jie, L., Ai-Mei, G., Li-Juan, J. and Jiang, X., 2015, Pseudogene in cancer: real functions and promising signature, *Journal of medical genetics*, 52 (1), 17-24.
- Xie Z. and Askari A., 2002, Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer, *European Journal of Biochemistry*, 269, 2434–2439.
- Xing, M., Westra, W.H., Tufano, R.P., Cohen, Y., Rosenbaum, E., Rhoden, K.J., Carson, K.A., Vasko, V., Larin, A., Tallini, G. and Tolaney, S., 2005, BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90 (12), 6373-6379.
- Xing, M., 2007, BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications, *Endocrine reviews*, 28 (7), 742-762.
- Xing, M., 2010a, Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer, *Molecular and cellular endocrinology*, 321 (1), 86-93.
- Xing, M., 2010b, Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer, *Thyroid*, 20 (7), 697-706.
- Xing, M., 2013, Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer, *Nature Reviews Cancer*, 13 (3), 184.
- Yamamoto, Y., Izumi, K. and Otsuka, H., 1992, An immunohistochemical study of epithelial membrane antigen, cytokeratin, and vimentin in papillary thyroid carcinoma. Recognition of lethal and favorable prognostic types, *Cancer*, 70 (9), 2326-2333.

- Yamamoto, Y., Sakamoto, M., Fujii, G., Tsuiji, H., Kenetaka, K., Asaka, M. and Hirohashi, S., 2003, Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with β -catenin mutations, *Hepatology*, 37 (3), 528-533.
- Yan, D., Wu, Y., Yang, Y., Belenkaya, T.Y., Tang, X. and Lin, X., 2010, The cell-surface proteins Dally-like and Ihog differentially regulate Hedgehog signaling strength and range during development, *Development*, 137 (12), 2033-2044.
- Yan, Y., Xu, H., Zhang, L., Zhou, X., Qian, X., Zhou, J., Huang, Y., Ge, W. and Wang, W., 2019, rraD suppresses the Warburg effect by downregulating acTg1 in hepatocellular carcinoma, *OncoTargets and therapy*, 12, 1691.
- Yang, L., Tang, H., Kong, Y., Xie, X., Chen, J., Song, C., Liu, X., Ye, F., Li, N., Wang, N. and Xie, X., 2015, LGR5 promotes breast cancer progression and maintains stem-like cells through activation of Wnt/ β -catenin signaling, *Stem cells*, 33 (10), 2913-2924.
- Yang, P., Cartwright, C., Efuet, E., Hamilton, S.R., Wistuba, I.I., Menter, D., Addington, C., Shureiqi, I. and Newman, R.A., 2014, Cellular location and expression of Na⁺, K⁺-ATPase α subunits affect the anti-proliferative activity of oleandrin, *Molecular carcinogenesis*, 53 (4), 253-263.
- Yang, S., He, F., Dai, M., Pan, J., Wang, J. and Ye, B., 2019, chFr promotes the migration of human gastric cancer cells by inducing epithelial-to-mesenchymal transition in a hDac1-dependent manner, *OncoTargets and therapy*, 12, 1075.
- Yang, X., Zhang, Z., Qiu, M., Hu, J., Fan, X., Wang, J., Xu, L. and Yin, R., 2013, Glypican-5 is a novel metastasis suppressor gene in non-small cell lung cancer, *Cancer letters*, 341 (2), 265-273.
- Yasui, Y., Goto, H., Matsui, S., Manser, E., Lim, L., Nagata, K.I. and Inagaki, M., 2001, Protein kinases required for segregation of vimentin filaments in mitotic process, *Oncogene*, 20 (23), 2868.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P. and Ornitz, D.M., 1991, Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor, *Cell*, 64 (4), 841-848.
- Yen, K., Lee, C., Mehta, H. and Cohen, P., 2013, The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance, *Journal of molecular endocrinology*, 50 (1), 11-19.
- Yu, X., Minter-Dykhouse, K., Malureanu, L., Zhao, W.M., Zhang, D., Merkle, C.J., Ward, I.M., Saya, H., Fang, G., Van Deursen, J. and Chen, J., 2005, Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation, *Nature genetics*, 37 (4), 401.
- Yuan, K., Kucik, D., Singh, R.K., Listinsky, C.M., Listinsky, J.J. and Siegal, G.P., 2008, Alterations in human breast cancer adhesion-motility in response to changes in cell surface glycoproteins displaying α -L-fucose moieties, *International journal of oncology*, 32 (4), 797-807.

- Yuan, Q., Zhang, Y., Li, J., Cao, G. and Yang, W., 2018, High expression of microRNA-4295 contributes to cell proliferation and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma by the down-regulation of Glypican-5, *Biochemical and biophysical research communications*, 497 (1), 73-79.
- Yuspa, S.H., 1994, The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis—thirty-third GHA Clowes Memorial Award Lecture, *Cancer Research*, 54 (5), 1178-1189.
- Zelensky, A.N. and Gready, J.E., 2005, The C-type lectin-like domain superfamily, *The FEBS journal*, 272 (24), 6179-6217.
- Zhai, H., Acharya, S., Gravanis, I., Mehmood, S., Seidman, R.J., Shroyer, K.R., Hajjar, K.A. and Tsirka, S.E., 2011, Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression, *Journal of Neuroscience*, 31 (40), 14346-14360.
- Zhang, C., Zhang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Xu, Y. and Liu, S., 2011, A lung cancer gene GPC5 could also be crucial in breast cancer, *Molecular genetics and metabolism*, 103 (1), 104.
- Zhang, C., Liu, Z., Wang, L., Qiao, B., Du, E., Li, L., Xu, Y. and Zhang, Z., 2016, Prognostic significance of GPC5 expression in patients with prostate cancer, *Tumor Biology*, 37 (5), 6413-6418.
- Zhang, D., Xu, X.L., Li, F., Sun, H.C., Cui, Y.Q., Liu, S. and Xu, P.Y., 2017a, Upregulation of the checkpoint protein CHFR is associated with tumor suppression in pancreatic cancers, *Oncology letters*, 14 (6), 8042-8050.
- Zhang, D., Zhang, P., Yang, P., He, Y., Wang, X., Yang, Y., Zhu, H., Xu, N. and Liang, S., 2017b, Downregulation of ATP1A1 promotes cancer development in renal cell carcinoma, *Clinical proteomics*, 14 (1), 15.
- Zhang, X., Xu, J., Jiang, T., Liu, G., Wang, D. and Lu, Y., 2016, MicroRNA-195 suppresses colorectal cancer cells proliferation via targeting FGF2 and regulating Wnt/ β -catenin pathway, *American journal of cancer research*, 6 (11), 2631.
- Zhang, Y., Wang, J., Dong, F., Li, H. and Hou, Y., 2014, The role of GPC5 in lung metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma, *Archives of oral biology*, 59 (11), 1172-1182.
- Zhang, Z., Harrison, P.M., Liu, Y. and Gerstein, M., 2003, Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome, *Genome research*, 13 (12), 2541-2558.
- Zhao, M., Wang, K.J., Tan, Z., Zheng, C.M., Liang, Z. and Zhao, J.Q., 2016, Identification of potential therapeutic targets for papillary thyroid carcinoma by bioinformatics analysis, *Oncology letters*, 11 (1), 51-58.
- Zhao, Y., Yan, Q., Long, X., Chen, X. and Wang, Y., 2008, Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells, *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 26 (5), 571-577.

- Zhao, Y.P., Xu, X.Y., Fang, M., Wang, H., You, Q., Yi, C.H., Ji, J., Gu, X., Zhou, P.T., Cheng, C. and Gao, C.F., 2014, Decreased core-fucosylation contributes to malignancy in gastric cancer, *PloS one*, 9 (4), 94536.
- Zhau, H.E., Odero-Marah, V., Lue, H.W., Nomura, T., Wang, R., Chu, G., Liu, Z.R., Zhou, B.P., Huang, W.C. and Chung, L.W., 2008, Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer: lessons learned from ARCaP model, *Clinical & experimental metastasis*, 25 (6), 601.
- Zhu, M., Yang, T., Wei, S., DeWan, A.T., Morell, R.J., Elfenbein, J.L., Fisher, R.A., Leal, S.M., Smith, R.J.H. and Friderici, K.H., 2003, Mutations in the γ -actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26), *The American Journal of Human Genetics*, 73 (5), 1082-1091.
- Zhu, Q.S., Rosenblatt, K., Huang, K.L., Lahat, G., Brobey, R., Bolshakov, S., Nguyen, T., Ding, Z., Belousov, R., Bill, K. and Luo, X., 2011, Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion, *Oncogene*, 30 (4), 457.
- Zhuang, L., Xu, L., Wang, P., Jiang, Y., Yong, P., Zhang, C., Zhang, H., Meng, Z. and Yang, P., 2015, Na⁺/K⁺-ATPase α 1 subunit, a novel therapeutic target for hepatocellular carcinoma, *Oncotarget*, 6 (29), 28183.
- Zubakov, D., Stupar, Z. and Kovacs, G., 2006, Differential expression of a new isoform of DLG2 in renal oncocyoma, *BMC cancer*, 6 (1), 106.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Suna BEKTAŞ
Doğum Yeri	Bakırköy
Doğum Tarihi	04.08.1993
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05346406560
E-Posta Adresi	sunabektas@ogr.iu.edu.tr
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2015

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Moleküler Biyoloji

Makale ve Bildiriler	
Makale (SCI kapsamında)	
Kaptan E., Sancar Bas S., Sancaklı A., Bektas S. and Bolkent S., 2018, The Effect of Plant Lectins on the Survival and Malignant Behaviors of Thyroid Cancer Cells, <i>Journal of Cellular Biochemistry</i> , 119(7), 6274-6287.	
Sözlü Bildiri (Uluslararası)	
Kaptan E., Sancar Bas S., Sancakli A., Bektas S., Bolkent S., "Masking of α -2,3 Cell Surface Sialic Acid Motifs with Maackia amurensis Lectin (MAL-II) in Human Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells Inhibits Its Survival and Malignant Behavior", 1st INTERNATIONAL CONGRESS ON CANCER AND ION CHANNELS, ŞANLIURFA, TÜRKİYE, 21-23 Eylül 2017, 90-90.	