



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**MALİGN MELANOMA
KANSER KÖK HÜCRE MODELİNDE
HİF1A GENİNİN SUSTURULMASI İLE
GERÇEKLEŞEN OLASI YANITLARIN
İNCELENMESİ**

Doktora Tezi

Berrin ÖZDİL BAY

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**MALİGN MELANOMA
KANSER KÖK HÜCRE MODELİNDE
HİF1A GENİNİN SUSTURULMASI İLE
GERÇEKLEŞEN OLASI YANITLARIN
İNCELENMESİ**

Berrin ÖZDİL BAY

Danışman(lar)
Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Doktora Programı

İzmir
2023

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Hüseyin AKTUĞ

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Gülperi ÖKTEM

Üye : Prof.Dr. Sevinç İNAN

Üye : Prof.Dr. Altuğ YAVASOĞLU

Üye : Prof.Dr. Meltem KURUŞ

Üye : Dr.Öğr.Üyesi Günnur GÜLER

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Kanser, hem sosyokültürel hem de ekonomik açıdan dünya genelinde insan hayatını etkileyen bir hastalıktır. Kanser başlatıcı olarak da isimlendirilen kanser kök hücreleri, tümör popülasyonunda sayıları az olmasına karşın tedaviye direnç mekanizması yüksek olan hücrelerdir. Bu tez, melanoma kanseri özelinde kanser kök hücreleri odaklı bir araştırmadır. Dünya ve ülke genelindeki sosyal ve ekonomik değişiklikler hem temel hem klinik araştırmaları etkilese de kanser araştırmalarının devam ve sürekliliği yadsınamaz derecede önemlidir. Bu tez, melanoma kanseri ve kanser kök hücrelerinin moleküler mekanizmalarını anlamak için yapılan çalışmaların önemini vurgulamaktadır. Bu tez dahilinde kanser kök hücre direnç mekanizmasında etkili hedef moleküller ortaya çıkarılmış, metodolojik olarak hem moleküler hem de biyokimya ve biyofiziksel yöntemler dahil edilmiştir.

Bu tez çalışması, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiş olup, Ege Üniversitesi Çok Disiplinli Öncelikli Alanlar Projesi (20785) tarafından desteklenmiştir. Bu tez çalışması, Ege Üniversitesi tarafından sağlanan kaynaklar ve eğitimler sayesinde gerçekleştirilmiştir.

İzmir, 11.05.2023

Berrin ÖZDİL BAY

Özet

Malign Melanoma Kanser Kök Hücre Modelinde Hif1 α Geninin Susturulması ile Gerçekleşen Olası Yanıtların İncelenmesi

Malign melanoma, görülme sıklığı hızla artan ve ölümcül bir kanser türü olmasına rağmen, etkili tedavi yöntemleri geliştirme çabaları devam etmektedir. Kanser kök hücresi (KKH) yaklaşık 20 yıldır hızla yükselen bir araştırma konusu olup, tümörü başlatıcı, depo hücre olarak kullanılan ve kendini yenileme özelliği ile diğer bazı özellikleri nedeniyle kök hücre olarak adlandırılan kanser tipine özgü hücredir. Malign melanomanın agresif davranışı diğer kanser türlerindeki gibi kanser kök hücrelerinin varlığı ve aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Tümör içindeki heterojenitenin saptanması, farklılaşmamış moleküler belirteçler ve embriyonik benzeri farklılaşma plastisitesi, malign melanoma kök hücrelerinin varlığını ve bu malignitenin başlamasında ve yayılımında rol oynadığını kuvvetle işaret eder.

Kanser kök hücrelerinin ayırt edilmesi için kullanılan belirteçlerden bir tanesi CD133 proteindir. Kanser hücre popülasyonunun çok küçük bir yüzdesi (%0.05-1) kanser kök hücresi olarak tanımlanır. Bu yüzdeyi oluşturan kanser kök hücrelerini hedefleyen araştırmalar hızla artış göstermektedir.

Bu tez projesindeki temel düşünce, kanser kök hücresi ve kök hücre olmayan kanser hücresinin davranışlarını hücreler arası madde bileşeni varlığında göstermek, ayrıca hedef gen olarak seçilen Hif1 α geninin susturulması ile kök hücre karakterinin baskılanmasını sağlamaktır.

Hücreler arası maddenin, hücrelerin üzerine olan etkisi yadsınamaz derecede önemlidir. Hücreler arası madde bileşeninin hücre kültürü çalışmalarında kullanımı *in vivo* benzeri ortam yarattığından dolayı çalışmayı ileri götürmektedir. Kanser kök hücre ile hücreler arası madde kullanımı içeren literatür oldukça kısıtlıdır.

Tez çalışması içerisinde, kanser kök hücreleri (CD133+) ile kök hücre olmayan kanser hücreleri (CD133-) arasındaki farklar hücreler arası madde varlığında incelenirken, aynı zamanda, Hif1 α geninin kanser kök hücrelerinde susturulması ile gerçekleşecek olan hücresel süreçlerde durum tespiti yapılmıştır. Yöntemsel olarak moleküler biyolojik yöntemlerin yanı sıra çalışmaya SEM-EDS ve ATR-FTIR teknikleri ile atomik ve moleküler seviyede fiziksel ve kimyasal bir boyut da getirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, Hif1 α hedefli gen susturması ile kanser kök

hücrelerinin üzerindeki değişimin farkları ortaya konmuş ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi sağlanmıştır. Literatürde daha önce belirlenmemiş moleküler etkileşimler ve sinyal yolaklarının ilerlemesi ile ilgili yeni bilgiler elde edilmiştir. Ek olarak yüzey morfolojisinin, gen ekspresyonu ve protein ekspresyonundaki değişimlerinin ve elemental (inorganik) farklılıklarının multidisipliner açıyla karşılaştırılması sağlanmıştır. Kök hücre ve kök hücre olmayan malign melanoma arasındaki fark, hücre biyolojisi literatürüne katkı sağladığı gibi; ayrıca, gen susturma aşamaları ile dediferansiyasyon çalışmaları da literatüre yenilik sunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Malign melanoma; Hif1 ; Kanser Kök Hücresi; Hücreler arası madde

Abstract

Analysis of Potential Responses in a Malignant Melanoma Cancer Stem Cell Model by Silencing the Hif1 α Gene

Although malignant melanoma is a deadly cancer with a rapidly increasing incidence, efforts to proceed an effective treatment method still not applicable. Cancer stem cell (CSC) has been a rapidly hot research topic for about 20 years, and it is a specific cell type that is used as a tumor initiator, called stem cell, due to its self-renewal and other stem cell like properties. The aggressive behavior of malignant melanoma is thought to be related to the presence and activity of CSCs, as in other cancer types. Detection of heterogeneity within the tumor, molecular stem cell markers, and embryonic-like differentiation plasticity strongly suggest the presence of malignant melanoma stem cells and their role in the initiation and spread of this malignancy.

One of the markers used to distinguish CSCs is the CD133 protein. A very small percentage (0.05-1%) of the cancer cell population is defined as CSC. Studies targeting the CSCs that focus on this percentage are increasing rapidly.

The main idea behind this thesis is to demonstrate the behavior of cancer stem cells and non-stem cells in the presence of an extracellular matrix component, and to suppress the stem cell character by silencing target gene Hif1 α .

The effect of the extracellular matrix on the cells is undeniably important. The use of the extracellular matrix component in cell culture studies takes the work forward because it creates an *in vivo-like* environment. There is a limited research on extracellular matrix use and cancer stem cells.

Within the scope of the thesis, the differences between cancer stem cells (CD133+) and non-stem cell cancer cells (CD133-) were examined in the presence of intercellular substance, while at the same time, the cellular processes that would occur by silencing the Hif1 α gene in cancer stem cells were determined. Methodologically, in addition to molecular biological methods, a physical and chemical dimension has been tried to be caught with the study at the atomic and molecular level with SEM-EDS and ATR-FTIR techniques. Furthermore, Hif1 α targeted gene silencing revealing differences in the change on CSCs and identifying new therapeutic targets. Possible information about the progression of signalling pathways and molecular interactions were obtained that had not previously been

identified in the literature. In addition, a multidisciplinary comparison of surface morphology, changes in gene expression and protein expression, additionally elemental (inorganic) differences was provided. The difference between melanoma CSC and non-CSC is contributed to the cell biology literature. Furthermore, gene silencing steps and dedifferentiation studies have also presented innovations to the literature.

Keywords; Malignant melanoma, Hif1 α , Cancer Stem Cell, Extracellular Matrix



İçindekiler

1. Önsöz.....	II
2. Özet.....	III
3. Abstract.....	V
4. İçindekiler	VII
6. Tablolar Dizini.....	IX
7. Şekiller Dizini	X
8. Kısaltma Listesi	XIII
1. Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	3
1.6. Araştırmanın Amacı	3
2. Genel Bilgiler	5
2.1. Melanoma	5
2.2. Melanoma Epidemiyolojisi, Morbidite ve Mortalite.....	6
2.3. Malign Melanoma Patogenezinin Moleküler Bakış.....	7
2.4. Kanser Kök Hücre Kavramı	8
2.5. Malign melanoma Kanser Kök Hücresi.....	10
2.6. Kanser ve Hücreler Arası Madde.....	11
2.7. Malign Melanoma ve Hedef Gen Hif1 α	14
2.8. Moleküler Çalışmalarda SEM-EDS ve ATR-FTIR metodolojisi	17
3. Gereç ve Yöntem	19
3.1. Hücre Kültürü Uygulamaları	20
3.1.1. Hücrelerin genel protokole uygun kültüre edilmesi	20
3.1.2. Hücre Pasajı.....	20
3.1.3. Hücre Sayımı	21
3.2. Akış (flow) sitometri cihazı ile kanser kök hücrelerinin izole edilmesi.....	22
3.3. Hücreler arası maddenin (matrijel) yüzey kaplaması olarak kullanılırken optimize edilmesi ve kanser hücreleri ile kanser kök hücrelerin bu yüzey üstünde büyütülmesi	23

3.4. Hedef Gen Hif1 α 'nın Susturulması için Small interfering RNA (siRNA) transfeksiyonu	24
3.5. Taramalı Elektron Mikroskobu/Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (SEM/EDS)	25
3.6. Hücre İçi Organik Bileşenlerdeki Değişimin Belirlenmesi (ATR-FTIR)	26
3.7. Hücre döngüsü analizleri.....	27
3.8. Gen Ekspresyon Analizleri-Gerçek Zamanlı Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (real time qRT-PCR)	28
3.9. İmmünofloresan Boyama	28
3.10. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	29
4. Bulgular.....	31
4.1. Malign Melanoma Hücrelerinin Kültüre Edilmesi.....	31
4.2. Akış Sitometri Tekniği ile Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu.....	31
4.3. Matrijel Yüzey Yayılımı	32
4.4. Hedef Gen Hif1 α 'nın Susturulması için Kullanılan siRNA Dozunun Belirlenmesi	34
4.5. Malign Melanoma Kanser Kök Hücrelerinde Hif1 α susturulması ile Hücre Morfoljilerinin ve Elemental Yüzdelerin Kök Hücre Olmayan Malign Melanoma Kanser Hücreleri ile Karşılaştırılması: SEM/EDS	35
4.6. Hücre İçi Organik Bileşenlerdeki Değişimin Belirlenmesi (ATR-FTIR)	40
4.7. Malign Melanoma Kanser Kök Hücrelerinde Hif1 α susturulması ile Hücre Döngüsü Fazlarının Kök Hücre Olmayan Malign Melanoma Kanser Hücreleri ile Karşılaştırılması	42
4.8. Gen Ekspresyon Analizleri.....	45
4.9. İmmünofloresan Boyama	53
4.10. Morfolojik değerlendirme	70
5. Tartışma	72
6. Sonuç ve Öneriler	87
7. Kaynaklar	88
8. Ekler	109
9. Teşekkür	110
10. Özgeçmiş	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

Tablolar Dizini

Tablo 1: siRNA dozunu belirlemek için CD133+ hücrelerine farklı dozlarda Hif1 α siRNA uygulanımı gerçekleştirilmiş, sonrasında Hif1 α gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre değişimi hesaplanmıştır.	35
Tablo 2: SEM-EDS analizi matrijel elemental analizi. Matrijel içeriğinde karbon, azot, oksijen, sodyum, sülfür ve potasyum tespit edilmiştir.	37
Tablo 3: CD133+ hücre grubu özelinde SEM-EDS analizi.	37
Tablo 4: CD133- hücre grubu özelinde SEM-EDS analizi.	38
Tablo 5: CD133+/Neg hücre grubu özelinde SEM-EDS analizi.	39
Tablo 6: CD133+/Hif1 α - hücre grubu özelinde SEM-EDS analizi.	40
Tablo 7: RNA örneklerinin miktarı ve 260/280 değerleri.	45
Tablo 8: RT-PCR kat değişimi sonuçları	46
Tablo 9: miRNA ekspresyon seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.	52

Şekiller Dizini

Şekil 1: Malign melanoma kanser kök hücresi üzerinde Hif1 α siRNA uygulananı sonrasında kök hücre olmayan kanser hücresi ile karşılaştırılması olarak hücresel süreçlerin incelenmesi için kullanılan iş akış şeması.	19
Şekil 2: Hücre sayımı için kullanılan ekipman A) Muse hücre analizatörü B) Tripan mavisi ile boyanmış hücrelerin hemasitometre ile sayımı	21
Şekil 3: Deney gruplarının şematize edilmiş hali. Kanser kök hücreleri (CD133+), kök hücre olmayan kanser hücreleri, Hif1 α siRNA ve negative kontrol siRNA uygulaması yapılmış gruplar resmedilmiştir.	22
Şekil 4: Deney gruplarının elde edilmesi. Hücreler akış sitometrisi ile CD133+ belirteci ile ayrılmıştır. Bunun sonucunda CD133+ ve CD133- hücre grupları elde edilmiştir. Elde edilen CD133+ hücrelerine Hif1 α siRNA ve negatif kontrol siRNA (boş siRNA) uygulaması yapılmış ve hücreler arası madde üzerinde kültürlenmiştir.	23
Şekil 5: SPM ile matrijel kaplamasının görünmesi.....	24
Şekil 6: Kullanılan siRNA malzemeleri. A) Negatif kontrol siRNA ve Hif1 α siRNA stok solüsyonları B) Seyreltmeler için kullanılan siRNA tamponu ve RNase free su C) siRNA solüsyonlarının kullanım öncesi santrifüj edilmesi.....	25
Şekil 7: SEM-EDS analizinde kullanılan cihazlar A) Au-pd kaplama B) SEM cihazı C) SEM cihazı içerisinde örnek analiz alanı	26
Şekil 8: ATR-FTIR analizi için kullanılan cihaz (Perkin Elmer UATR Two, UK) ..	27
Şekil 9: Protein ışımlarının karşılaştırılması için her protein için ayrı ayrı her gruptan en az 100 hücre olacak şekilde manuel olarak hücre çevreleri çizilmiştir. Buna göre fotoğraflar ImageJ programı ile siyah beyaz kanallara ayrılmış (A) ve ilgili protein ile DAPI görüntüsü (B) senkronize edilerek çizim kontrollü şekilde gerçekleştirilmiştir. Kırmızı çarpı işareti çizim başlangıç noktasını, beyaz ok devam eden çizimi göstermektedir.	30
Şekil 10: CHL-1, CD133+ ve CD133- hücre hatlarının örnek faz-kontrast görüntüleri. Ölçek: 20 μ m.....	31
Şekil 11: Akış sitometrisi örnek kapılama grafikleri gösterilmiştir. Hücreler p4 kapısı üzerinden izole edilen CD133+ hücreler yaklaşık olarak %0,2 ile %0,4 arasında bulunmuştur.	32
Şekil 12: Lamel üzerine matrijel kaplama görseli.....	33

Şekil 13: SPM ile matrijel kaplamasının görüntüleri ve yüzey dağılımı/pürüzlülüğü ile ilgili grafiksel dağılımlar.....	33
Şekil 14: Nanodrop ölçüm sonuçları.....	34
Şekil 15: Hücre gruplarına ait SEM fotoğrafları.....	36
Şekil 16: Hif1 α siRNA uygulaması sonrasında ATR-FTIR analizi.	42
Şekil 17: Hücre döngüsü fazlarının hücre grupları bazlı karşılaştırılması. Hücre döngüsü fazlarının A) CD133+, B) CD133-, C)CD133/ Hif1 α - ve D)CD133/neg olarak hücre gruplarından elde edilen örnek yüzdesel dağılımları ve E) karşılaştırılmalı analizi.....	44
Şekil 18: RT-PCR sonuçları. A) Gen ekspresyon ısı haritası B ve C) Hif1 α geni ile ilişkili genlerin şematik gösterimi.....	47
Şekil 19: Hif1 α ilişkili genler ve bu genlerin Hif1 α ile ilişkili olan durumları.....	48
Şekil 20: RT-PCR sonuçlarına göre housekeeping gen ekspresyonların CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.	48
Şekil 21: RT-PCR sonuçlarına göre hipoksi ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.	49
Şekil 22: RT-PCR sonuçlarına göre SHH sinyal yolağı ile ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.....	49
Şekil 23: RT-PCR sonuçlarına göre RT-PCR sonuçlarına göre Histon Asetilasyon Mekazizması ile İlgili Epigenetik ile ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.	50
Şekil 24: RT-PCR sonuçlarına göre diferansiyasyon ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.	51
Şekil 25: RT-PCR sonuçlarına göre migrasyon ve hücre iskeleti ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.....	51
Şekil 26: RT-PCR sonuçlarına göre vaskülarizasyon ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.	52
Şekil 27: HIF1 α protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	58
Şekil 28: KLF4 protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	59
Şekil 29: SHH protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	60

Şekil 30: Gli1 protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immünofloresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	61
Şekil 31: Smo protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immünofloresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	62
Şekil 32: VEGF protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immünofloresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	63
Şekil 33: Mif protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immünofloresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	64
Şekil 34: MMP9 protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immünofloresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	65
Şekil 35: EP300 protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immünofloresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	66
Şekil 36: HDAC9 protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immünofloresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	67
Şekil 37: F-actin protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immünofloresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.	68
Şekil 38: Belirlenen proteinlerin hücre grupları arasındaki istatistiksel değerlendirilmesi. A) Hif1 α B) KLF4 C) SHH D) Gli1 E) Smo F) VEGF G) P300 H) HDAC9 I) Mif J) MMP9 K) F-aktin.....	69
Şekil 39: Hücre grupları arasındaki morfolojik değerlerin istatistiksel değerlendirilmesi. A) Aspect Ratio (major/minör) değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması. B) Feret değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması. C) Alan (area) değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması. D) Perimeter (Çevre) değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması. E) Round değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması. F) Circularity değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması.	70

Kısaltma Listesi

CD	: Cluster of Differentiation (farklılaşma kümesi)
Hif	: Hipoksi ile indüklenen faktör
DNA	: Deoksiribonükleik asit
miRNA	: mikroRNA
IPS	: İndüklenmiş pluripotent hücre
siRNA	: short interfering RNA
SEM	: Scanning electron microscope (taramalı elektron mikroskop)
EDS	: Energy Dispersive Spectroscopy
BRAF	: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
NRAS	: neuroblastoma ras viral oncogene homolog
CDKN2A	: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
MHC	: major histocompatibility complex
NK	: Natural killer (doğal öldürücü)
ATP	: adenosine triphosphate
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
ROS	: reactive oxygen species
KLF4	: Kruppel-like factor 4
ALDH	: Aldehyde dehydrogenase
ER	: Endoplasmic reticulum

EMT	: epithelial–mesenchymal transition
VEGF	: vascular endothelial growth factor
ECM	: Extracellular matrix
LIF	: Leukemia Inhibitory Factor
ATR-FTIR	: Attenuated Total Reflection Fourier Transform IR
EMEM	: Eagle's Minimal Essential Medium
TIC	: tumor initiator cells (kanser başlatıcı hücreler)
real time qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	: paraformaldehit
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
NFkB	: nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells
WNT	: Wingless-related integration site
mTOR	: mammalian target of rapamycin
PI3K	: phosphatidylinositol-3 kinase
O ₂	: Oksijen
SOX2	: Sex determining region Y-box 2
Oct3/4	: octamer-binding transcription factor 3/4
Gbx2	: gastrulation brain homeobox 2
Au	: Altın

Pd	: Paladyum
kV	: kilovat
nA	: Nano amper
Smad2	: Suppressor of Mothers against Decapentaplegic 2
CREBBP	: Cyclic adenosine monophosphate Response Element Binding protein
VHL	: von Hippel-Lindau
SHH	: Sonic Hedgehog
SMO	: Smoothed, Frizzled Class Receptor
PTCH1	: Protein patched homolog 1
MIF	: macrophage migration inhibitory factor
HDAC	: Histone deacetylase
EP300	: E1A-associated protein p300 (gen)
p300	: E1A-associated protein p300 (protein)
ACTB	: Beta-actin
PFN	: Profilin
MMP	: Matriks metalloproteinaz
AFM	: Atomik Güç Mikroskobu
SPM	: Taramalı Uç Mikroskobu
ERK	: extracellular signal-regulated kinase

Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Kanser kök hücreleri, kanser direnci için oldukça önemli bir topluluk olup, bu hücre grubunun direncinin kırılması, kanser prognoz ve tedavisinde oldukça önemlidir. Kanser kök hücre direncinin kırılması için hedef moleküllerin oluşturulması ve bu hedef moleküller çerçevesinde hücreler üzerinde manipülasyonlar yaparak hücre içi değişikliklerin araştırılması kanser çalışmaları için gereklidir. Malign melanoma kanser ve kanser kök hücreleri üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında, *in vivo* ortamı taklit eden çalışmalar kısıtlıdır. Ayrıca, kanser kök hücre ve kök hücre olmayan kanser hücrelerinin karşılaştırılması da nadir çalışılmıştır. Hasta örneklerinden elde edilen CD133+ melanoma hücreleri CD133- hücreleri ile karşılaştırıldıklarında ikisinin de tümör başlatıcı olabileceği; fakat CD133- hücrelerin metastatik kapasitelerinin olmadığı belirlenmiştir (Madjd vd., 2016). Bu tez çalışmasında ise, yine aynı bakış açısı ile CD133+ ve CD133- hücreleri karşılaştırılmış, hücreler üzerinde hem moleküler, hem fiziksel hem de kimyasal bağlarla ilgili veriler elde edilmiştir. Bu çalışmanın temel problemi kanser kök hücrelerinin, kök hücre olmayan kanser hücreye göre karakterizasyonunun eksikliğidir. Ayrıca, kanser kök hücresi özelinde önemli olan hipoksi indükleyici faktör elemanlarından biri Hif1 α 'nın (Carnero & Lleona, 2016; Nallanthighal, Heiserman, & Cheon, 2019) susturulması ile kanser kök hücre karakterinin değiştirilebilme kapasitesinin araştırılmasıdır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Kanser kök hücrelerini kök hücre olmayan kanser hücresi karakterine doğru yönelimini başarabilir miyiz?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

- Hedef gen Hif1 α 'nın susturulması sonucunda malign melanoma kanser kök hücrelerinin, kök hücre olmayan kanser hücresi karakterine geçişi ile hipoksi özelliğinin, metastaz ve anjiyogenez kapasitesinin, azalması, DNA asetilasyonunda

değişim gözlenmesi, hücre içi iskelet moleküllerinin inhibisyon öncesine göre farklı olması ve onkogenik miRNA'ların ekspresyonlarında farklılık beklenmektedir.

- Tezdeki temel hipotez, kanser kök hücresi ve kök hücre olmayan kanser hücresinin davranışlarını hücreler arası madde bileşeni varlığında göstermek, ayrıca, Hif1 α geninin susturulması ile kök hücre karakterinin baskılanmasını sağlamaktır. Böylece, daha önce yapılan çalışmaların aksine; kök hücreyi daha az aktif olan kanser hücresine doğru bir uyarım yapılmıştır.

- Gen susturma siRNA yöntemi ile yapılmıştır. Bu susturma işlemi ile hücrelerin farklı sinyal yollarında değişimler beklenmektedir.

- Malign melanoma kanser kök hücresinin izolasyonu ve bu hücrenin biyolojik davranışını gözlemek çalışmada önemli bir noktayı oluşturmaktadır.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

- Literatür bilgilerine bakıldığında kanser kök hücreleri ile ilgili bilgiler son 20 yıla dayanmaktadır. 2017-2018 çalışmalarına bakıldığında ise artık çalışmaların uyarılmış pluripotent kök hücre (induced pluripotent cell-IPS) mantığı ile kanser hücresini Yamanaka faktörleri kullanılarak kanser kök hücresine doğru uyarmayı hedeflemişlerdir. Bu çalışmanın özgünlüğü ise Hif1 α genin susturularak kanser kök hücresinin kanser hücresine uyarılmasının hedeflenmesidir. Yani, daha önce yapılan çalışmaların aksine; kök hücreyi daha az aktif olan kanser hücresine doğru uyarma yapılmıştır.

- siRNA uygulaması sonrası kanser kök hücresinin etkinliği ve metastatik kapasitesinin azalması belirlenmiş ve klinik uygulamaya geçebilecek bir tedavi tartışılmıştır.

- Literatüre malign melanoma kanser kök hücresi ve kök hücre olmayan malign melanoma kanser hücresi ile ilgili yeni bilgiler sunulmaktadır.

- Çalışma ile bir malign melanoma modeli oluşturulmuştur. Hücreler, hücreler arası madde üzerinde kültüre edileceğinden *in vitro* ortamda *in vivo* taklidi bir düzen içerisinde büyüme gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda literatüre yeni bir melanoma çalışma düzeneği sağlanmıştır.

- Tez sonucunda elde edilen veriler ile siRNA ve miRNA'lar kullanılarak daha spesifik terapi yöntemlerine geçiş sağlanabilmesi düşünülmektedir.

- Malign melanoma kanser kök hücresi ve kök hücre olmayan kanser hücresi grupları ile hücreler arası madde uygulanması ve gen susturulması sonucunda gerçekleştirilen analizler sadece moleküler biyolojik yöntemlerle değil, farklı disiplinlerin de katkısıyla daha bütünsel incelenmiştir.

- Hücre dinamiğinin biyolojik parametrelerle incelenmesine ilaveten morfolojik bakı (SEM görüntülemesi) ile sonuçları desteklemiş ve SEM-EDS analizi ile inorganik bileşenler tespit edilmiştir. Sonuçlar, ATR-FTIR analiz sonuçları ile de desteklenmiştir. Malign melanoma kanser biyolojisi ile ilgili hem morfolojik hem de elemental düzeyde literatüre yeni bilgiler sunulmuştur. Ayrıca, ATR-FTIR analizi ile hücre içindeki makromoleküllerin miktarları karşılaştırılmıştır. ATR-FTIR analizi sonucunda daha önceden literatüre girmiş melanoma bilgileri eşliğinde, melanoma kanser kök hücresinin değerleri de literatüre eklenmiştir. Sonuç olarak, DNA/RNA, lipid, karbohidrat ve özellikle protein başlıkları altında değerlendirmeler karbon bağlarının spektrumlarına bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Malign melanoma kanser biyolojisi ile ilgili literatüre yeni bilgiler sunulmaktadır.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

- Araştırma kapsam olarak *in vivo* taklit eden hücreler arası madde kullanımına uygulama açısından yenilikçidir, fakat bir sonraki adım olan üç boyutlu hücre kültürü ve *in vivo* hayvan ya da primer kültür eksikleri nedeniyle sınırlıdır.

- Araştırma siRNA uygulaması sonrası 24 saat sonra gerçekleşen süreçlerin araştırmasını içermektedir. Süre ve bütçe uygunluğu bulunduğu ek olarak farklı inkübasyon süreleri sonuçları daha ileri seviyeye taşıyabilir.

1.6. Araştırmanın Amacı

Hücreler arası madde üzerinde kültüre edilen malign melanoma kanser kök hücresinde hedef gen $Hif1\alpha$ 'nın susturulmasına bağlı olarak kök hücre karakterindeki farklılaşmanın incelenmesi ve malign melanoma kök hücre olmayan kanser hücresi ile moleküler/biyokimyasal bazda karşılaştırması amaçlanmıştır.

Literatür bilgilerine bakıldığında kanser kök hücresi ile kök hücre olmayan kanser hücrelerinin karşılaştırılması son derece kısıtlıdır. Hipoksi kanser biyolojisinde ve özellikle kanser kök hücresinin lokalizasyon ve aktivasyonunda önemli bir

kavramdır. Kanser kök hücresi, kanserleşmiş hücre topluluğunun en iç kısmında olarak nitelendirilir. Bu oluşumda iç kısımlara doğru oksijen seviyesi azalarak hipoksik bir ortam oluşur. Bu nedenle kanser kök hücre kavramı ve hipoksi birbiri ile ilişkilendirilebilir ve Hif1 α hedef gen konumuna gelmektedir.



Genel Bilgiler

2.1. Melanoma

Deri, hem embriyonik mezodermden hem de ektodermden derive olmuş, organizma ile çevre arasında bir bariyer sağlayan karmaşık bir dokudur (Pons & Quintanilla, 2006). Derinin dış tabakası epidermis, yetişkin yaşamı boyunca kök hücreler tarafından korunan, çoğunluğu keratinositler tarafından oluşturulan çok katmanlı skuamöz epiteldir. Kök hücreler, asimetrik bölünerek kök hücre olarak kalan bir hücre (kendi kendini yenileme) ve hızla bölünerek çoğalan hücrelerden oluşan bir yavru hücre (transit çoğaltan hücreler) meydana getirir. Keratinosite ek olarak, epidermiste üç tip özelleşmiş hücre daha vardır: i) melanin pigmenti üreten melanosit; ii) lenf düğümlerinde antijen sunan bir hücre gibi davranan Langerhans hücresi; ve iii) adapte edici bir mekanoreseptör olarak kabul edilen Merkel hücresi.

Melanositler, deride pigment üreten ve nöral krest hücrelerinden köken alan hücrelerdir. En agresif deri tümörü olan malign melanoma, melanositlerden köken almaktadır (Bandarchi, Ma, Navab, Seth, & Rasty, 2010; Davey, Miller, & McInerney, 2021; Villanueva & Herlyn, 2008). Ortalama yaşam 8-10 ay iken beş yıllık sağkalım oranı %20'dir (Garbe, Eigentler, Keilholz, Hauschild, & Kirkwood, 2011). Malign melanomanın agresif davranışı diğer kanser türlerindeki gibi kanser kök hücrelerinin varlığı ve aktivitesi ile ilişkilidir (La Porta & Zapperi, 2017). Tümör heterojenitesinin saptanması, farklılaşmamış moleküler belirteçler ve embriyonik-benzeri farklılaşma plastisiteli melanoma alt gruplarının artmış tümör özelliği, malign melanoma kök hücrelerinin varlığını ve malignitenin başlamasında ve yayılımında rol oynadığını işaret eder (Schatton & Frank, 2008).

Bazal ve skuamöz hücre karsinomalarının aksine, malign melanomalar çok aşamalı bir süreç olarak gelişmektedir. Klinik olarak melanomalar, milimetre cinsinden toplam kalınlığa, mitotik oranına, ülserasyon varlığına, nüfuz derinliğine ve mevcut metastazların konumuna göre sınıflandırılır. Melanomalar histolojik olarak beş farklı aşamada sınıflandırılır: 1) displazisiz ortak edinsel ve konjenital nev, 2) displastik nevüs, 3) radyal büyüme fazı melanoma, 4) dikey büyüme fazı melanoma ve 5) metastatik melanoma. Radyal büyüme fazı melanomu lateral olarak büyür ve büyük ölçüde epidermisle sınırlı kalırken, dikey büyüme fazı melanomu epiderminin üst katmanlarını göç eder ve alttaki dermise ve deri altı dokuya nüfuz ederek genişleyen

malign hücre nodüllerini oluşturur (Schatton & Frank, 2008; Zaidi, Day, & Merlino, 2008). Malign melanomaya geçişte en önemli adımın radyal büyüme fazından dikey büyüme fazı melanomuna geçiş olduğu düşünülmektedir (Chin, 2003; Pons & Quintanilla, 2006; Vinay Kumar, Abul K. Abbas, 2020)

2.2. Melanoma Epidemiyolojisi, Morbidite ve Mortalite

Malign melanoma, görülme sıklığı hızla yükselen ölümcül bir kanser türü olmakla beraber, etkili bir tedavi yöntemi oluşturma çabaları devam etmektedir. Malign melanoma, cilt kanserleri içinde mortalitesi en yüksek olandır. Malign melanoma en sık görülen 5. ve 6. kanserdir; erkeklerde ve kadınlarda kanser vakalarının sırasıyla %5 ve %4'ünü temsil eder (Moran, Silva, Perry, & Gallagher, 2018). Dermal tümör vakalarının sadece %4'ünü temsil etmesine rağmen, melanoma dermal tümörün en tehlikeli ve ölümcül şeklidir. Cilt kanserine bağlı ölümlerin %75'inden sorumludur (Apalla, Lallas, Sotiriou, Lazaridou, & Ioannides, 2017; Hessler vd., 2020; Z. Liu vd., 2022). Erken evre melanoma, nispeten yüksek 5 yıllık sağkalım oranıyla cerrahi müdahale ile tedavi edilebilir, ancak metastatik melanoma sağkalım oranını önemli ölçüde kısaltır (Z. Liu vd., 2022; Smart, Oleksak, & Hartsough, 2021). 5 yıllık sağ kalımı %97'dir. Uzak organlara metastaz dönemi kapsayan geç safhası, günümüzde kullanılan tedavilere direnç göstermektedir. Bu durumdaki 5 yıllık sağ kalım %10'dur. Erken tanı ile dahi, melanoma hızlı proliferasyonu nedeniyle kötü prognoz gösterir. Agresif metastatik melanoma genellikle cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyasyon terapisi de dahil olmak üzere multimodal tedaviye dirençlidir (Chin, Garraway, & Fisher, 2006). Melanoma gelişimi açısından yüksek risk altında olanlarda açık deri ve göz rengi, ailesel melanoma, ortak ya da displastik / atipik nevüs varlığı, yanıklarla aralıklı güneşe maruz kalma ve / veya diğer akıntı veya önceki cilt kanseri lezyonları sıralanabilir (Howell, Li, Riker, & Xi, 2010).

Tümörü tanımlayan en önemli özellikleri radial ve vertikal büyümesidir. Radial büyüme, epidermis içinde horizontal olarak in situ büyümeyi kasteder ve tümör hücreleri genellikle bu evrede metastaz yapamaz. Tümör hücreleri zamanla hücresel olgunluktan yoksun olarak derin dermal tabakalara doğru vertikal büyüme evresine geçer. Bu evrede daha önce düz olan bir lezyon yerine artık nodül oluşmuş olur ve hücrelerin metastaz kapasitesi de bu oluşumla korele olarak artar. Melanomaların az bir kısmı kalıtsal iken (%5-10'dan azı), çoğu sporadik olarak ortaya çıkar. Bu vakaların genetik analizleri melanomaların patogenezi anlamada önemli bilgiler

sunmuştur. Mikroskopik olarak malign hücreler, epidermisin her katmanında (pajetoid yayılım) ve dermise uzanan nodüller olarak zayıf oluşmuş bir ağ halinde veya tek hücre olarak, sırasıyla radyal ve vertikal olarak büyürler. Süperfisyal yayılan melanomalar, tümör spesifik antijenlere konağın cevabını belirleyecek şekilde genellikle hızlı lenfatik infiltrasyon yaparlar. Melanomaların biyolojik davranışını belirleyen vertikal büyümesinin derinliğidir (Elder, 2010; Kumar vd., 2015).

Malign melanomada primer lezyonların çoğu deride olmasına rağmen, oral, anogenital mukoza yüzeylerinde, özafagus, meninksler ve gözde bulunabilir. Asimetri, sınırlarının düzensizliği, renk ve çap gibi özellikler kutanöz malign melanoma lezyonlarını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Süperfisyal lezyonların çoğunluğu cerrahi ile tedavi edilebilirken, metastatik olanların prognozu genellikle çok kötüdür. Derine doğru büyümenin yanı sıra, yüksek mitotik indeksi olan ve lokal immün yanıtı yetersiz olan tümörlerin de metastatik olma oranları yüksektir. Malign melanoma bölgesel lenf nodları, karaciğer, akciğerler, beyin gibi organlara hematojenik metastaz yapabilir. Biyolojik agresifliği belirlemede en önemli kriterlerden biri sentinel lenf nodunun değerlendirilmesidir. Bazı vakalarda metastaz primer tümörün alınmasından yıllar sonra ortaya çıkabilir. Bu durumun oluşmasında konağın immün yanıtı çok önemlidir (Swetter vd., 2019).

2.3. Malign Melanoma Patogenezinin Moleküler Bakış

Son zamanlarda, BRAF mutasyonu geçirmiş, NRAS mutasyona uğramış ve c-kit mutasyonlu melanomalardaki moleküler farklılaşma, yeni tedavi stratejilerine yol açmıştır (Murer, Kranzlin-Stieger, French, Dummer, & Goldinger, 2017). CDKN2A (9p21) gen mutasyonu familyal melanomaların yaklaşık %40'ında bulunmuştur. Melanomalar, çoğunlukla majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I moleküllerinin ekspresyonunu düşürerek doğal öldürücü (NK) hücrelerindeki sitolitik aktivite sağlayan NKp30, NKp44 ve NKG2D ekspresyonunu inhibe edip doğal immünoterapiden kaçarlar (Balsamo vd., 2012; Chen vd., 2016).

Malign melanoma, diğer kanser türleri gibi artmış sağkalım mekanizmalarına sahiptir. Bu hücreler konak organizmanın oluşturduğu immün yanıttan kaçarak hipoksi, oksidatif stres, apoptoz gibi durumlardan sağ kalım sağlayabilmekte ve metastatik yayılım gösterebilmektedirler.

Mitokondri, melanoma tümör hücreleri de dahil olmak üzere tüm hücrelerde metabolik homeostazda merkezi bir rol oynamaktadır. Melanoma hücreleri, hipoksi ve düşük hücre dışı glikoz gibi metabolik olarak sınırlayıcı koşullar altında sağlıklı dokulara kıyasla gelişmiş metabolik uyarlanabilirlik sergilerler. Mitokondri, hücresel metabolizmanın çeşitli yönlerini bütünleştirir, düzenler ve hücre ATP'nin çoğunu üretir. Melanomada aerobik ve anaerobik piruvat kullanımının düzenlenmesi kritik öneme sahiptir. Bu kontrol noktalarının karakterizasyonu, glikoz metabolizmasını düzenleyen melanomada MAPK yolağının aktivasyonunun oynadığı çoklu rolleri vurgulanmaktadır. Mitokondri, aynı zamanda apoptozun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde ve düzenlenmesinde mitokondrinin rolü, melanoma araştırmacıları için özel bir önem taşır (Theodosakis, Micevic, Kelly, & Bosenberg, 2014).

Kanser biyolojisinde bir diğer terapötik hedef olarak son yıllarda çalışmaları hızlanan kavram ise miRNA ekspresyonlarıdır. Örneğin miR145, mesane kanserinde cMyc ve KLF4'ü inhibe ederek Warburg etkisini durdurmuştur (Minami vd., 2017). Başka bir çalışma melano-miR çalışması olarak metazda etkili olan miR-214'ü tanımlamıştır (Bar-Eli, 2011). Bu miRNA sekansının AP-2gama ve AP-2alfa genlerini susturduğu ve hücre metabolizmasında önemli değişikliklere neden olduğunu açıklamışlardır.

Malign melanoma ile ilgili çalışmalar miRNA ekspresyonlarının malign melanoma hücrelerinde melanosit hücrelerine göre dramatik olarak arttığı ve azaldığını göstermişlerdir (Gajos-Michniewicz & Czyz, 2019).

2.4. Kanser Kök Hücre Kavramı

Tümör kitlesi heterojen hücre populasyonları içerir. Bu heterojenlik, kanser hücrelerinde inflamasyon, hipoksi, düşük pH ve besinler gibi tümör mikroçevresine uyum sağlamasına izin verir. Kanser kök hücresi tümör oluşumu, progresyonu, tedaviye direnç, invazyon, metastaz ve tümör kitlesi içerisinde yer alan diğer hücrelerin oluşmasından sorumlu olmakla birlikte kendini yenileme ve farklılaşma özellikleri ile kök hücreleri ile benzer özellik taşıyan bir alt populasyondur. Kanser kök hücreleri genel olarak belirlenen bazı belirteçler (CD34, ALDH1, CD271, CD44, ALDH1, JARID1, CD133, CD20, ABCB5) ile diğer kanser hücrelerinden (kök hücre olmayan kanser hücrelerinden) ayırt edilmektedir (Lang, Mascarenhas, & Shea, 2013; Parmiani, 2016). Melanoma heterojenitesi ve plastisiteyle ilgili yeni bulgulara

dayanarak kanser kök hücresi konsepti ışığında alternatif bir hipotez ortaya atılmış ve melanoma için öncül olarak deride mevcut olan mutasyona uğramış melanoma kök hücrelerini veya olgunlaşmamış progenitör hücreleri öne sürmüştür. Tümör heterojenitesinin saptanması, farklılaşmamış moleküler belirteçler ve embriyonik benzeri farklılaşma plastisiteli melanoma alt gruplarının artmış tümör özdeşliği, malign melanoma kök hücrelerinin varlığını ve bu malignitenin başlamasında ve yayılımında rol oynadığını kuvvetle işaret eder (Palacios-Ferrer vd., 2021; Schatton & Frank, 2008).

Sağlıklı kök hücreler gibi kanser kök hücreleri, kök hücre özelliklerini sürdürmek için farklılaşmış, fizyolojik hücre tipleriyle veya kendi tümör olmayan kanser popülasyonlarıyla hücresel etkileşimlere bağımlı olabilir. Salgılanan faktörler veya diğer niş bileşenleri tümör oluşumunu, büyümesini ve ilerlemesini düzenleyebilir. Tümör başlatıcı hücreler olarak adlandırılan CD133 protein ekspresyonu, birçok hücre içi ve hücre dışı eleman tarafından düzenlenir. Kök hücre ile kanser kök hücresi ortak yollar kullandığından, kök hücrede aktif olan JAK/STAT, Wnt/ β -katenin, Notch, TGF- β , PI3K/AKT, Hedgehog ve NF- κ B yolları kanser kök hücre özelliklerinin korunmasında rol oynayan önemli kök sinyal yolları olarak düşünülmekte ve tedavide hedef olarak gösterilmektedir (Aghajani, Mansoori, Mohammadi, Asadzadeh, & Baradaran, 2019).

Tümörler, homeostatik mekanizmaların kaybolduğunu göstermesi bakımından fizyolojik dokulardan farklıdırlar. Bu nedenle, onkogeneze, kendi kendini yenilemenin bir deregölasyonu olarak görülebilir. Bununla birlikte, sağlıklı dokularda ve tümörlerde, kök hücreler ve tümöre özgü kanser hücreleri arasında çarpıcı paralellikler kabul edilmektedir; her ikisi de geniş çoğalma kapasitelerine sahiptirler, klonojenik potansiyelleri değişen fenotipik olarak heterojen hücre popülasyonları bulunur ve kök hücre sistemlerinin birçok özelliği, kök hücre plastisitesi de dahil olmak üzere, tümör büyümesi ile de ilgilidir. Kök hücre biyolojisinin simetrik ve asimetrik bölünebilme yönü, fizyolojik dokulardaki fizyolojik kök hücrelerin nispeten seyrekliğine kıyasla insan tümörlerinde kanser kök hücresinin daha yüksek göreceli frekanslarının gözlemlenmesi için potansiyel bir açıklama sunmaktadır. Mutasyona uğramış somatik hücrelerin sağlıklı kök hücrelerle kaynaşabileceği ve böylece malign kanser kök hücresi üretebileceği de düşünülebilir. Ek olarak, kanser kök hücresi, sağlıklı kök hücrelerinin işlevsel olmayan bir çevresel niş ile epigenetik

dönüşümü yoluyla da evrimleşebilir. Göç kapasitelerinin, malign melanoma hücrelerinin metastaz yapmaya yönelik güçlü eğilimini yansıttığı olması, tümör kök hücrelerine özgü olduğu düşünülen bir özelliğe sahip olması ile açıklanabilir (Schatten & Frank, 2008).

2.5. Malign melanoma Kanseri Kök Hücreleri

Melanomanın kemoterapiye karşı dirençli bir tümör olduğu bilinmektedir; ancak, direnç mekanizmasının kanser kök hücrelerine özgü olan mekanizma ile aynı olup olmadığı bilinmemektedir (Parmiani, 2016). Melanoma kök hücreleri kanser hastalarının periferik kanında kan dolaşımında bulunan kanser hücrelerini zenginleştirir, bolca bulunur ve metastaz durumunda kritik önem taşır. Bu hücreler hematopoietik hücrelerin üretimi destekleyecek faktörleri salgılayarak damar içerisindeki dolaşımlarını sürdürmelerine katkı sağlarlar (N. Lee, Barthel, & Schatten, 2014). Derleme bir makalede primer tümör başlatan özellikler sadece CD133 ekspresyonu ile karakterize edilen melanoma hücre alt gruplarında bulunurken, CD133- melanoma hücrelerinin tümörjenik özelliğe sahip olmadığı belirtilmiştir (Schatten & Frank, 2008). Ayrıca, meta analiz çalışmasında CD133+ ve CD133- gruplarında her iki hücrede tümör oluşturduğunu, fakat hasta örneklerinden alınan CD133- hücrelerinin metastaz yapmadığını göstermişlerdir (Majid vd., 2016).

Kanser kök hücreleri, parakrin faktörlerin salgılanması ya da direkt hücre-hücre teması yoluyla nişleri karşılıklı olarak modüle edebilir. Bu nedenle, kanser kök hücreleri, tümör başlatma özelliklerine ek olarak kemoterapiden sonra kalan ve tümör rekürrensi ve metastatik hastalığa neden olan ilaç dirençli hücrelerin küçük rezervuarını oluşturabilir ve nüks etme ve metastaz riskini azaltabilir (Schatten & Frank, 2008).

Kanser hücreleri metabolik olarak sağlıklı hücrelerden farklılaşmış hücre grubudur ve moleküler bazlı detaylı çalışmalar kanser ve normal hücrelerin arasındaki farkları belirleyerek kanser hücrelerinin seçimleri ile ilgili yargılara varmaya hedeflenmiştir. Bu yargılar ışığında ise, umut verici tedavi modelleri oluşturulması amaçlanmıştır. Kanser hücreleri normal hücrelere göre hipoksik ortamı yaratırlar ve tercih ederler. Hif1 α bu nedenle hedef bir molekül olmakla birlikte genellikle mTOR yolu üzerinden araştırılmış ve etkileri sunulmuştur. Kanser kök hücrelerinde hipoksik stres altında yaşamına devam ederken, aynı zamanda, bu etkinin hücre içindeki etkileri de

diğer yolaklarda bozukluklar yaratabilir. Örneğin, düz endoplazmik retikulumun (ER) sentez merkezi olduğu lipid metabolizmasında kanser hücrelerinde normal hücrelere göre farklı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ER stresi ile protein katlanmalarındaki yanlışlıklar kanser hücrelerinde yanlış katlanmış protein birikmesine neden olabilir. Tümör kitlesi ile karşılaştırıldığında, kanser kök hücreleri kök hücre benzeri fenotiplerini sürdürmek için gerekli olan ve kanser tipine bağlı olarak değişen metabolik değişiklikler gösterir (Acikgoz, Soner, Ozdil, & Guven, 2021). Kanser hücre topluluğu içerisinde sub-popülasyonlar bulunmakta olup bu popülasyonların karakteri farklıdır. Kanser hücre topluluğunun merkezi bölgesine ilerledikçe hipoksi, glikoliz ve oksidatif fosforilasyon miktarı artmaktadır. Ayrıca NF- κ B ve Wnt/B-catenin sinyal yollarının etkinliği artmaktadır (Tirinato vd., 2017).

Gerçekleştirilen çalışmalarda, kanser hücrelerini kanser kök hücrelerine indüklemek ve bu indüksiyon epitelyal mezenkimal geçiş mekanizmasını aktive etme ile ya da Yamanaka faktörlerini kullanarak hücreleri IPS mantığı ile kök hücre karakterine döndürmek istemişlerdir (Murakami & Tashiro, 2015).

Kanser progenitör hücrelerden kanser kök hücrelerine geçiş çalışmaları, benzer yöntemlerle parakrin ve otokrin faktörleri kullanmışlardır. Hücreler, çevreleriyle sürekli iletişim halindedir. Bu durumu baz alarak hücre mikroçevresinde düzenlemeler yapıp hücreleri kanser kök hücre fenotipine yönlendirmek istemişlerdir. Hücre mikroçevresinde hipoksi oluşturma, perivasküler nişte eNOS aktivasyonu, tümör ilişkili makrofajların aktivasyonu hücrede bir takım sinyal yollarını aktive ederek onların dediferansiyasyonunu sağlamışlardır (Yunqing Li & Laterra, 2012).

2.6. Kanser ve Hücreler Arası Madde

Tümör mikroçevresi, tipik olarak düşük oksijen seviyesi ve sınırlı bir besin kaynağı içerir. Bu ortamdaki stres koşulları, epitelyal mezenkimal geçişi teşvik ederek, kendi kendini yenileme ve hücre göçü potansiyelini artırır (García-Heredia ve Carnero, 2020). Hif-1 (Hipoksi indükleyici faktör 1) indüksiyonu, artan VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ekspresyonu ve azalan E-kaderin düzeyi, moleküler düzeyde oksijen barındırmayan bir mikroçevre, tümörigenezinin ve ileri evre hastalığın nedeni olabilir. Bu bilgiler ışığında kanser kök hücreleri de dahil olmak üzere, malign hücrelerin tümöre özgü potansiyelinin farklı mikroçevre ile

değiştirilebileceğini ortaya konmuştur (Cho vd., 2013; Lang vd., 2013; Schatton & Frank, 2008).

Genel olarak, melanoma hücrelerinin mikro çevreleriyle etkileşimi için üç tip etkileşim vardır. Birincisi melanoma hücreleriyle karşılıklı etkileşim içerisinde olan fibroblastlar, endotel hücreleri, immün hücreleri, çözünür moleküller ve hücreler arası madde (extracellular matrix; ECM), içeren stroma ile olan iletişimidir. İkincisi keratinositler ile olan iletişimidir. Normal koşullar altında keratinositler, epidermisteki melanositlerin lokalizasyonu ve proliferatif davranışını kontrol eder. Bu denge bozulduğunda ve bir melanoma ilerledikçe, melanoma hücreleri epidermal tümör mikro çevresinin kontrolünü ele geçirebilir. Üçüncüsü ise melanoma hücrelerinin oluşturduğu tümörün farklı bölgeleri farklı oksijen ve besin konsantrasyonuna sahip mikroçevre ile etkileşim içindelerdir (Brandner & Haass, 2013). Fonksiyonel olarak hücrelerin işlevlerini yerine getirebilmeleri için doku mimarisi doğru oluşturulmalıdır.

Tümör mikro çevresi olan ECM molekülleri tümörün ilerlemesinden sorumludur. Bu nedenle, spesifik hedef terapileri oluşturmak için, tümör mikro çevresini oluşturmak son derece önemlidir. İntegrin ve hücreler arası maddelerde bulunan pek çok madde bu nedenle terapötik hedef olarak belirlenmiş ve siRNA ile ifadenmeleri susturulmuştur. Fakat bu çalışmalar, tümör çeşidine göre susturma işleminin aynı sonucu vermediğini göstermiştir (Botti vd., 2013).

Melanoma hücreleri, metastatik kapasitesi artırabilmek için içerisinde bulundukları ECM'i manipüle eder ve bunun için hücre dışına faktörler salgılar (Botti vd., 2013). ECM'de en fazla bulunan makromoleküller kolajendir. Kolajen, hücreler arası ECM'in en belirgin yapısal proteini olup, 28 kollajen türü tanımlanmıştır. ECM üzerindeki her bir değişim ya da modifikasyon, kanser biyolojik davranışı üzerinde etkindir ve incelenme zorunluluğu doğmuştur (Yue, 2014).

ECM, hücreleri çevreleyen yapısal bir bileşendir. ECM, doku homeostazını, organ gelişimini, inflamasyonu düzenleyen yaklaşık 300 proteinden oluşur (Gilkes, Semenza, & Wirtz, 2014). Doku gelişimi ve işlevinde çok önemli bir rol oynar. Spesifik reseptörler aracılığıyla hücrelerle etkileşime giren proteinler, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler dahil olmak üzere çeşitli makromoleküllerden oluşur (Hynes & MacDonald, 2009). ECM sadece hücreler için yapısal destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre göçü, doku onarımı ve doku

mimarisinin bakımı için bir iskele görevi görür. ECM'nin düzensizliği, kanser, fibrosiz ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara katkıda bulunabilir (Hynes & MacDonald, 2009). Bu nedenle, ECM'yi ve hücrelerle etkileşimlerini anlamak, bu hastalıklar için terapötik stratejilerin geliştirilmesi için önemlidir.

Hücreler ortamda bulunan ECM bileşenlerine göre biyolojik etkinliğini düzenler. Hücre kültüründe ECM taklitlemesi, hidrojeller olarak tanımlanan polimerler ile gerçekleştirilir. Hidrojeller, suda çözünmeyen ve su içinde belirli yapıları koruyan hidrofilik, çapraz bağlı ve adsorban polimerlerdir. Bu nitelikler, başta biyotıpta olmak üzere birçok uygulamanın altında yatmaktadır (Marzi, Rostami Chijan, & Zarenezhad, 2022). Bu bilgi ışığında yapılan kanser araştırmaları, ECM'in farklılaştırılması ile hücrelerin davranışları değiştirilebilir. Matrijel, ECM simulatörü olarak kullanılan bir maddedir. Matrijel, ECM'nin *in vitro* kullanımı için tasarlanmıştır. İçeriğinde büyüme faktörleri, proteoglikanlar ve ECM kompleksinde bulunan proteinler vardır.

Matrijel, hücrelerin diferensiyasyonu, migrasyonu ve adezyon özelliklerini incelemek için kullanılır. Ayrıca, *in vitro* hücre kültürlerinde doku modelleme için de kullanılır. Matrijel, kanser hücrelerinin *in vitro* olarak incelenmesinde önemli bir araçtır ve bu nedenle, kanser çalışmalarında sıklıkla kullanılır (Rijal & Li, 2017).

ECM içerikleri çeşitli çalışmalarla incelenmiştir. Örneğin, akciğer kanseri üzerinde yapılan çalışmalar, kolajen, matrijel ve kolajen matrijel karışımı ve ek moleküllerin hücrelerde adezyon, göç hızı ve hareket şeklini değiştirdiğini göstermiştir (Mokkapatı, Bechtel, Reibetanz, Miosge, & Nischt, 2012). Kondrositler ile ilgili bir başka çalışma, yine kolajen içeren sistemde çalıştıkları genlerin matrijel içeren sisteme göre yüksek olarak ifadelendiğini belirtmiştir (Miao vd., 2018). Melanoma hücresinde yapılan bir çalışma ise, ilaç uygulanımında kolajene göre matrijel üzerinde hücrelerin adezyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir (De Luca vd., 2017). Ayrıca B16.F10 melanoma hücreleri ile yapılan çalışmalar ECM varlığında hücrelerin 2 boyutlu kültüre göre daha yavaş bölünme gösterdiği ve gen ekspresyonunda farklılıkların oluştuğunu göstermişlerdir (Heller vd., 2021).

Kanser biyolojisinde bir diğer terapötik hedef olarak hızlanan kavram ise miRNA ekspresyonlarıdır (Bu vd., 2017; Bustos vd., 2017; S. Liu vd., 2012; Melnik, 2015; Satzger vd., 2012; van Kempen vd., 2012). Malign melanoma ile ilgili çalışmalar

miRNA ekspresyonlarının malign melanoma hücrelerinde melanosit hücrelerine göre dramatik olarak arttığı ve azaldığını göstermişlerdir (Gajos-Michniewicz & Czyz, 2019). Tümör heterojenitesinin saptanması, farklılaşmamış moleküler belirteçler ve embriyonik benzeri farklılaşma plastisiteli melanoma alt gruplarının artmış tümör özdeşliği malign melanoma kök hücrelerinin varlığını ve bu malignitenin başlamasında ve yayılımında rol oynadığını kuvvetle işaret eder (Schatten & Frank, 2008).

2.7. Malign Melanoma ve Hedef Gen Hif1 α

Hipoksinin, ECM'in yeniden şekillenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Gilkes vd., 2014). Hipoksi, kolajen ve fibronektin gibi ECM moleküllerinin üretiminin artmasına neden olabilir (Dekker, Le Dévédec, Danen, & Liu, 2022; Y.-L. Lee, Cheng, Chen, Chen, & Shih, 2014). Bu, ECM'nin kalınlaşmasına ve sertleşmesine yol açabilir; ve bu da daha sonra hücre davranışını ve doku mimarisini etkileyebilir. Ayrıca hipoksinin, ECM'yi bozabilen enzimler olan matris metaloproteinazların (MMP'ler) ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu, ECM'nin bozulmasına yol açabilir ve dokunun yeniden şekillenmesine katkıda bulunabilir. Bu nedenle, hipoksinin ECM yeniden modellemesindeki rolünü anlamak, hipoksinin yaygın olduğu kanser gibi hastalıklar için terapötik stratejilerin geliştirilmesi için önemlidir.

Malign melanoma ile ilgili hedef gen olarak seçilen Hif1 α , bu çalışmada kanser kök hücresi özelinde ele alınmıştır. Temel olarak çalışmada kök hücre karakteri, invazyon, metastaz ve anjiyogenez kapasitesi, hipoksi özelliği, DNA asetilasyonu, hücre içi iskelet ve hücre adezyon molekülleri hedeflenmiş olup bu kavramlar RNA ve protein seviyesinde bakılacak, ayrıca organik ve inorganik yapılanma yapı/fonksiyon ilişkisi bakımından incelenmiştir.

Kök hücre biyolojisinde kanser kök hücre belirteçleri hücre tipine göre değişiklik gösterse de kanser kök hücresi izolasyonu için CD133 belirteci kullanılmıştır. 2019 yılında yapılan bir çalışmada, melanoma hücre hattı ve primer melanoma hücrelerinden elde edilen CD133+ ve CD133- hücre grupları PI3K/MAPK sinyal yolağı üzerinden tartışılmış, bu yolak üzerinden iki hücre grubunun farkı ortaya çıkarılmıştır (Jamal vd., 2020).

Hif ailesi, düşük O₂ tarafından indüklenen primer transkripsiyon faktörüdür; anjiyojenik faktörler, eritropoietin, glukoz taşıyıcıları, glikolitik enzimler ve tirozin hidroksilaz dahil olmak üzere birçok hipoksi ile indüklenebilir genin ekspresyonunu düzenler. Bu proteinler, sınırlı O₂ mevcudiyeti koşulları altında hücresel ve organizma seviyelerinde O₂ dağıtımını artırır ve/veya O₂ kullanımını azaltır. Hipoksinin arttığı durumda Hif1 α nükleusa girer ve hedef genin aktifleşmesini sağlar (J. W. Lee, Ko, Ju, & Eltzhig, 2019). Hif1 α 'nın aktivasyonu embriyogenez ve yara iyileşme süreçlerinde fizyolojik iken kanserde Hif1 α malignite ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Hif1 α 'nın anormal stabilizasyonu ve downstream hedeflerinin up-regülasyonu, birçok solid tümörde belirlenmiştir (Iommarini, Porcelli, Gasparre, & Kurelac, 2017). İnsanlarda, epidermin bazal tabakasında bazal membran boyunca yer alan melanositler, büyümelerini sağlayan ve hipoksik koşullar altında sağkalımı artıran yüksek/stabilize Hif1 α ekspresyonu gösterir (Bedogni & Powell, 2009; D'Aguanno, Mallone, Marengo, Del Bufalo, & Moramarco, 2021).

Hipoksi kanser biyolojisinde ve özellikle kanser kök hücrelerinin lokalizasyon ve aktivasyonunda önemli bir kavramdır. Kanser kök hücresi, kanserleşmiş hücre topluluğunun en iç kısmında olarak nitelendirilir ve bu oluşumda iç kısımlara doğru oksijen seviyesi azalarak hipoksik bir ortam oluşur. Hücrelerde hipoksi kavramı niteliğinde ekspresyona genellikle Hif1 α ve Hif2 α ile bakılır ve çalışmalarda bu genlerin yüksek sentezlendiği hücrelerde, Notch, Tert, OCT4, cMyc, KLF4 ve SOX2 genlerinin de yüksek seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir (Carnero & Lleontart, 2016). Malign melanoma üzerinde yapılan bir çalışma, Hif1 α proteinin LIF (lösemi inhibitör faktörü) proteinin etkinliğini düzenlediğini ve LIF proteinin de kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunu regüle ettiğini göstermiştir. Bu çalışmaya göre, Hif1 α geni susturulduğunda LIF protein ekspresyonu artmıştır. LIF geni susturulduğunda ise, Nanog, Oct3/4, Gbx2 gen ekspresyonlarında azalış görülmüştür (Hajizadeh vd., 2019; Kuphal, Wallner, & Bosserhoff, 2013). Başka bir çalışma, A375 hücre hattı üzerinde kanser ve kanser kök hücrelerini karşılaştırmış ve CD133, CD44, Oct4, Nanog Sox2 gen ekspresyonlarının kanser kök hücrelerde daha yüksek olduğunu göstermiştir (Hong Li vd., 2018). Ayrıca, Nodal ekspresyonunun artışının Hif1 α ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir. Bu nedenle, kanser kök hücre kavramı ve hipoksi birbiri ile ilişkilendirilebilir ve Hif1 α hedef gen konumuna gelir.

Hipoksik kanser hücreleri kök hücre belirteçlerini ifade edebilir ve gelişmiş klonojenik potansiyel sergiler. Hipoksi, artan ECM birikimine ve yeniden şekillenmesine yol açabilir. Klinik tümör örneklerle yapılan histolojik çalışmalar, tümörlerin hipoksik bölgelerinde fibrozisle sonuçlanan artan kolajen birikimini göstermiştir. Hif1 α ekspresyonunun susturulması, hem meme kanserinde hem de fibroblastlardan *in vitro* ve *in vivo* kollajen birikimini engellemiştir (Nallanthighal vd., 2019).

Gen susturma, belirli bir genin inhibe edildiği/baskılandığı süreçtir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, susturucu RNA olarak da bilinen Small interfering RNA (siRNA) ve mikroRNA (miRNA) gibi küçük RNA moleküllerinin kullanımı dahil olmak üzere gen susturma için kullanılan birden fazla yol bulunmaktadır. siRNA, hedef genlerin ekspresyonunu spesifik olarak inhibe etme yeteneğine sahip RNA molekülüdür. Kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar için terapötik kullanılma potansiyeline sahiptir. Kanserde siRNA, kanser hücrelerinin gelişimi ve ilerlemesinde yer alan genleri hedeflemek ve susturmak için kullanılabilir. siRNA, melanoma, meme kanseri ve over kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisi için preklinik çalışmalarda umut vaat etmektedir. 2009'da yapılan bir çalışmada normal insan melanositlerinde ve radyal büyüme fazı, vertikal büyüme fazı ve metastatik melanomalardan izole edilen bir dizi insan melanoma hücre hattında; Hif1 α RNA ve proteininin normoksik ekspresyonu incelenmiştir. Hif1 α mRNA ve proteininin en yüksekten düşüğe metastatik melanoma hücreleri, vertikal faz melanoma hücreleri, radyal faz melanoma hücreleri ve melanositler şeklinde sıralandığı görülmüştür. Hif1 α ekspresyonunun siRNA ile inhibe edildiği metastatik WM9 melanoma hücre hattındaki hücrelerde ise, spesifik olmayan siRNA ile tedavi edilen hücrelere göre hem soft agar koloni formasyonunda hem de matrijel invazyonunda ciddi bir azalma gözlenmiştir (Mills, Joshi, & Niles, 2009).

Tezdeki temel hipotez, kanser kök hücresi ve kök hücre olmayan kanser hücresinin davranışlarını ECM bileşeni varlığında göstermek; ayrıca, Hif1 α geninin susturulması ile kök hücre karakterinin baskılanmasını sağlamaktır. Böylece, daha önce yapılan çalışmaların aksine; kanser kök hücresini daha az aktif olan kanser hücresine doğru uyarma yapılacaktır. Ayrıca, uyarma gen susturma tekniği olan siRNA ile yapılacaktır.

2.8. Moleküler Çalışmalarda SEM-EDS ve ATR-FTIR metodolojisi

Çalışmamız moleküler bakış açısının yanı sıra metodolojik olarak klinik yansıması olan ve içerisinde temel bilimle birlikte mühendislik alanını da kapsayan bir çalışmadır. Bu nedenle, hem terapötik hedef hem de metodolojik olarak SEM-EDS ve ATR-FTIR klinik kullanımı olası çıktı olarak düşünülmüştür.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), hücre yüzey morfolojisinin tipik olarak daha yüksek çözünürlükte üç boyutlu görüntülenmesini sağlamak için ışık mikroskobu tekniklerinin yanı sıra hücre kültürü sistemlerinde uzun süredir kullanılan etkili bir tekniktir (Ali, El-Boubbou, & Boudjelal, 2021; Allen, 1983; Boyde, Weiss, & Veselý, 1972). SEM-Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS) hakkında, ilgilenilen bölge içindeki element bileşimini gösteren sınırlı sayıda araştırma vardır (Kaminskyj & Dahms, 2008; Berrin Ozdil vd., 2021; Ozisik vd., 2023; Scimeca, Bischetti, Lamsira, Bonfiglio, & Bonanno, 2018)

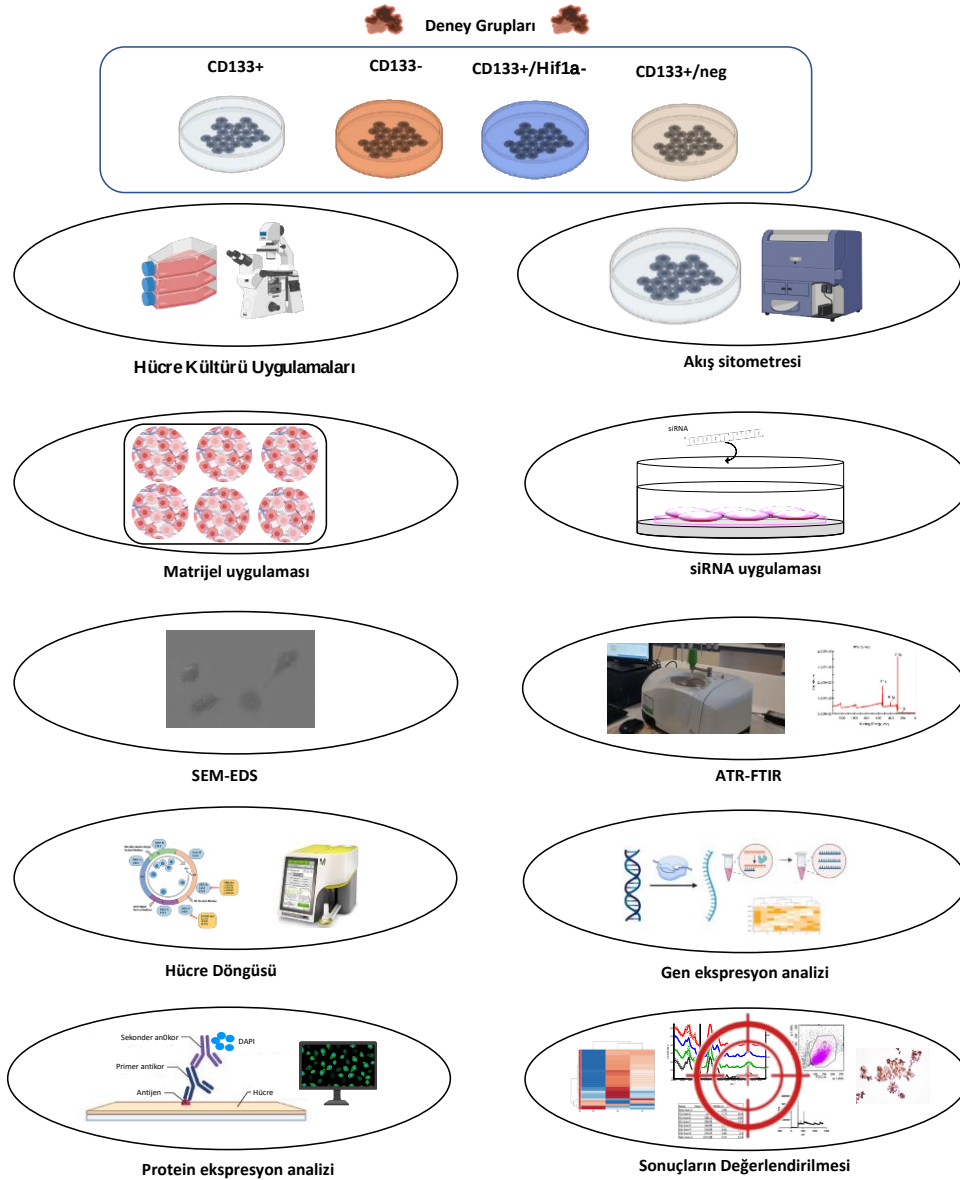
Moleküler biyolojik çalışmalarda FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi) spektrometre son 20 yıl içerisinde yaygınlaşarak kullanılan bir teknik olup, kanser biyolojisinde kullanımı hızla artmaktadır. Farklı tedavi modalitelerine direnç geliştiren premalign hücrelerdeki değişiklikleri saptamak için güvenli, non-invaziv ve etkili yeni yaklaşımlar geliştirme ihtiyacı vardır. FTIR, potansiyel olarak hücrelerdeki biyolojik aktivitenin spektral özelliklerini belirlemek için güçlü bir analitik yöntemdir. Sağlıklı ve malign dokuların FTIR spektrumu çeşitli dalgalardan farklı olmakla birlikte, bazı parmak izi dalgaları, geniş bir yelpazede dokulara diğerlerinden daha düzenli varyasyonlar gösterebilir ve bu da teşhis aletlerinin geliştirilmesi için bir temel oluşturabilir. Mordechai ve ark. çalışmasında, dalga boylarından 1121 ve 1020 cm^{-1} 'den hesaplanan nükleik asitlerin oranı muhtemelen kanser tanısında FTIR metoduyla belirlenebilen böyle ortak bir biyolojik belirteç olabileceği gösterilmiştir (Mordechai vd., 2004). Ayrıca, morfolojik olarak ayırt edilemeyen hücreler arasında sadece ortak bir kemoterapötik ilaca duyarlılıklarında farklılık gösteren hücre gruplarının FTIR spektrumlarının ayırt edilebileceği belirlenmiştir (Zwielly, Gopas, Brkic, & Mordechai, 2009). Kansere bağlı ölümlerin büyük çoğunluğuna metastatik tümörler neden olmaktadır. Bu nedenle, kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinin belirlenmesi hem prognoz hem de doğru tedavinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Malign melanoma, hücre hatları ve hastadan alınan örnekler üzerinden FTIR tekniğiyle incelenmiştir (Ghimire, Venkataramani, Bian, Liu, &

Perera, 2017; Mordechai vd., 2004; Shakya, Teppo, & Rieppo, 2022). Ancak, henüz malign melanoma kanser kök hücreleri üzerinden gerçekleştirilmiş yayınlanan bir çalışma bulunmamaktadır. Kanser kök hücreleri, kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinin belirlenmesi hem prognoz hem de doğru tedavinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, malign melanoma kanser hücreleri ile kök hücre olmayan malign melanoma kanser hücreleri ile karşılaştırılarak; kök hücre karakteri, invazyon, metastaz ve anjiyogenez kapasitesi, hipoksi özelliği, DNA asetilasyonu ve hücre içi iskelet moleküllerinin farklılıkları ve benzerlikleri incelenmiştir. Olası değişikliklerin ortaya konması ve olası hedef moleküllerin tespiti tümör tedavi strateji alternatiflerinde alanı genişleteceği düşünülmektedir. ECM taklitmesi ile oluşturulan malign melanoma modelinde hedef genlerin susturulmasıyla elde edilen veriler, malign melanoma kanser hücreleri ile malign melanoma kanser kök hücrelerinin agresif davranışını ve kanser hücre sağ kalımını arttırdığı bilinen genlerin analiz sonuçlarıyla biyofiziksel analizlerin sonuçları karşılaştırılarak; biyofiziksel araştırma ve analiz yöntemlerinin malign melanoma hücrelerinin agresif davranışlarını tespit edebilmesi üzerine olası tanısal araç olarak kullanılabilirliği araştırılmak istenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Malign melanoma kanser kök hücresi ve kök hücre olmayan kanser hücresi bu tez içerisinde farklı açılardan ele alınarak Hif1 α siRNA uygulamasıyla hücresel süreçlerdeki durum değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Uygulaması yapılan yöntemler Şekil 1’de şematize edilmiştir.



Şekil 1: Malign melanoma kanser kök hücresi üzerinde Hif1 α siRNA uygulaması sonrasında kök hücre olmayan kanser hücresi ile karşılaştırılması olarak hücresel süreçlerin incelenmesi için kullanılan iş akış şeması.

3.1. Hücre Kültürü Uygulamaları

3.1.1. Hücrelerin genel protokole uygun kültüre edilmesi

Pigmente olmayan insan melanoma hücre hatları CHL-1 (ATCC® CRL-9446TM), Ege Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiş ve %10 fetal sıgır serumu (Biowest, S1810) içeren EMEM'de (Eagle's Minimum Essential Medium) (Biowest L0416) 37°C'de %5 CO₂'de kültürlenmiştir. Akış sitometrisi için pasaj 6-8 aralığındaki hücreler kullanılmıştır.

Melanoma kanser kök hücreleri olarak nitelendirilen grup CD133+ hücreler, melanoma kök hücre olmayan kanser hücreleri CD133- olarak değerlendirilmiştir. Literatürlerde kanser kök hücreleri kanser kök hücre benzeri hücreler (cancer stem like cells) ya da kanser başlatıcı hücreler (tumor initiator cells-TIC) olarak da geçmektedir.

3.1.2. Hücre Pasajı

Flask yüzeyini %80-90 kaplayan hücreler pasaj işlemine alınmıştır. Pasajlanacak hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler T25'de ise 500 µl, T75'de ise 1000 µl tripsin/accutase ile yıkanmış ve bu solüsyon dökülmüştür. Daha sonra T25 için 1 ml, T75 için 2 ml tripsin/accutase flask içine konarak 3 dakika inkübatör içerisinde bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeyden kalkmalarını kolaylaştırmak için flask yan ve alt duvarları hafifçe vurulmuştur. Enzimatik etkiyi durdurmak için serum içeren besiyeri flaska eklenmiş ve yüzeydeki hücreler pipetleme ile kaldırılmıştır. Solüsyon toplanarak 15 ml falkon içerisine konulmuş ve flask yeni besiyeri ile yıkanarak falkona eklenmiştir. Toplanan hücreleri solüsyondan ayırmak için falkon 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak çökelti 1 ml taze besiyerinde pipetlenmiş ve çözölmüştür. Deney için kullanılacak hücreler, hücre analizatörü ya da hemasitometre yardımı ile sayılmıştır. Devam ettirilecek hücreler taze besiyeri içerisine eklenerek ve 37°C %5 CO₂ inkübatörde büyümeye bırakılmıştır.

3.1.3. Hücre Sayımı

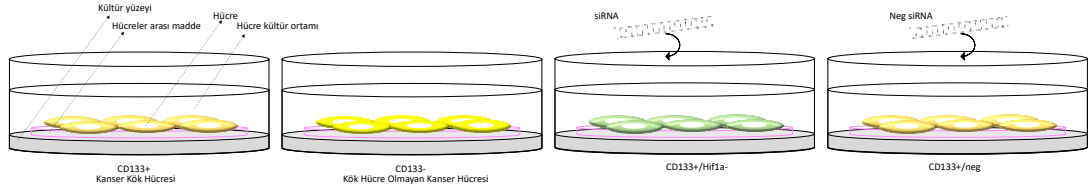
Hücre sayımı, hücre analizatör cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu cihaz ile hem hücre sayısı hem de hücrenin canlılık oranı belirlenmiştir. Cihaz çalışma prensibi olarak iki farklı floresan boya kullanır; biri sadece ölü hücreleri boyarken diğeri ise sadece canlı hücreleri boyamaktadır. Böylece hücrelerin canlılık oranı hassas bir şekilde tespit edilir. Hücrelerin bölünme hızına göre, sonraki aşamalar için bu sayımlar doğrultusunda hücre ekim konsantrasyonları belirlenmiştir. Hücre sayımı için hücreler pasaj sonrası 1 ml besi yerinde çözülerek içerisinde 20 µL alınmış ve 380 µL içerisinde floresan belirteç bulunan solüsyon ile karıştırılmıştır. Canlılık ve ölüm oranını belirlemek üzere Muse hücre analizatör cihazında ölçüm yapılmıştır (Şekil 2 A). Ayrıca, sayımlar Tripan mavisi ile de gerçekleştirilmiştir. Pasaj sonrasında 1 ml besi yeri içerisinde çözölen peletten alınan 10 mikrolitre hücre solüsyonu ile 10 mikrolitre Tripan mavisi karıştırılmış ve sayım gerçekleştirilmiştir (Şekil 2 B).



Şekil 2: Hücre sayımı için kullanılan ekipman A) Muse hücre analizatörü B) Tripan mavisi ile boyanmış hücrelerin hemasitometre ile sayımı

Deney grupları (Şekil 3):

- 1.Malign melanoma CD133+: Malign melanoma kanser kök hücresi
- 2.Malign melanoma CD133+/Hif1 α -: Hif1 α geni susturulmuş malign melanoma kanser kök hücresi
- 3.Malign melanoma CD133+/neg: Boş siRNA aktarılmış malign melanoma kanser kök hücresi
- 4.Malign melanoma CD133-: Kök hücre olmayan malign melanoma kanser hücresi



Şekil 3: Deney gruplarının şematize edilmiş hali. Kanser kök hücreleri (CD133+), kök hücre olmayan kanser hücreleri, Hif1 α siRNA ve negative kontrol siRNA uygulaması yapılmış gruplar resmedilmiştir.

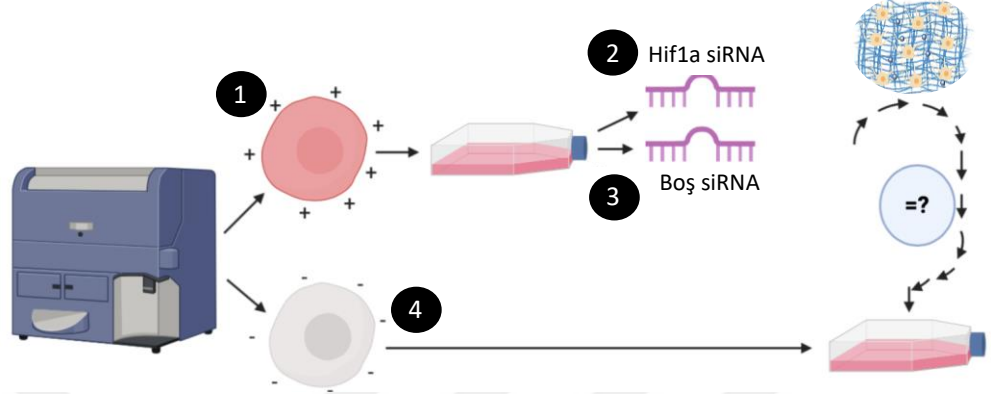
3.2. Akış (flow) sitometri cihazı ile kanser kök hücrelerinin izole edilmesi

Malign melanoma kök hücre izolasyonu için akış sitometrisi yöntemi kullanılmıştır. Hücreler pasaj işlemi sonrası CD133 antikoru ile inkübe edilmiş ve daha sonra cihaza verilmiştir. CD133+ hücreler malign melanoma kök hücresi, CD133- olanlar ise kök hücre olmayan malign melanoma kanser hücresi olarak kullanılmıştır. Daha önceki ve devam eden çalışmalarda anabilim dalımızda, diğer kanser türlerinde kanser kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Acikgoz vd., 2021; Aktug vd., 2016; Guler, Guven, & Oktem, 2019; Oktem vd., 2014; Soner vd., 2014).

Hücreler, tripsinizasyon ile flask yüzeyinden ayrılmış ve 10⁶ hücre/ml'ye olacak şekilde seyreltilmiştir. Muse® Cell Analyzer ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücreler, CD133 fikoeritrin (PE) etiketli antikor (Miltenyi Biotec Ltd.) ve DAPI ile +4°C'de 15 dakika inkübe edilmiş ve %1 diyalizli fetal sıgır serumu eklenmiş PBS ile yıkanmıştır. Kontrol hücreleri antikor ile inkübe edilmemiştir. Toplama tüpleri, CD133+ ve CD133- olarak etiketlenmiştir. İzolasyon sonrasında hücreler genel hücre protokolüne uygun olarak ekilmiş ve deneylerde kullanılmıştır. Hücre diferansiyasyonunu en aza indirmek amacıyla en fazla 3 pasaj kullanılmıştır. Sferoid oluşturma kapasitesinin ölçümü için hücreler %3 agar içeren PBS ile serum içermeyen besi yeri ile birebir karıştırılmış; %1.5 agar içeren kültür yüzeyi üzerinde büyütülmüştür. Hücreler 5, 10 ve 15. gün gözlenmiş, CD133+ hücrelerde sferoid oluşumu belirlenmiştir.

CD133+ malign melanoma hücreleri akış sitometresi sonrasında Hif1 α genlerinin baskılanması için Hif1 α siRNA'sı ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyon kontrolü deney grubu olarak negatif siRNA kullanımı diğer deney grubudur. Bu deney

grupları ve CD133+ hücreler ile akış sonrası elde edilen CD133+ olmayan hücreler matrijel yüzey üzerinde kültüre edilmiştir (Şekil 4). Bu dört deney grubu moleküler ve biyokimyasal yöntemler ile incelenmiş ve karşılaştırılmıştır.



Şekil 4: Deney gruplarının elde edilmesi. Hücreler akış sitometrisi ile CD133+ belirteci ile ayrılmıştır. Bunun sonucunda CD133+ ve CD133- hücre grupları elde edilmiştir. Elde edilen CD133+ hücrelerine Hif1 α siRNA ve negatif kontrol siRNA (boş siRNA) uygulaması yapılmış ve hücreler arası madde üzerinde kültürlenmiştir.

Hücreler akış sitometrisinden CD133+ ve CD133+ olmayan hücreler olarak ayrılarak CD133+ hücreler Hif1 α siRNA ile ve boş siRNA ile transfeğe edilmiştir.

3.3. Hücreler arası maddenin (matrijel) yüzey kaplaması olarak kullanılırken optimize edilmesi ve kanser hücreleri ile kanser kök hücrelerin bu yüzey üstünde büyütülmesi

Hücre dışı elemanlar ile deneysel bazlı çalışmalarının yapılması için, hücreler ECM olarak kullanılacak olan matrijel üzerine ekilmiş ve bu yüzey ortamında büyütülmüştür. ECM bileşeni olarak sıkça kullanılan matrijel -80°C de saklanan stok solüsyonu öncelikle alikotlar halinde saklanacak şekilde hazırlanmıştır. Kullanılmadan bir gün önce matrijel alikotları buz içinde +4°C de eritilmiş ve hücre besi yeri ile seyreltikten sonra yüzey eşit bir şekilde dağılması için çalkalayıcı üzerinde 10 dakika soğuk ortamda, sonrasında polimerleşmesi için 37°C inkübatörde 10-20-30 dakika bekletilmiştir. Bu sırada hazırlanan hücreler inkübasyon süresi sonunda kaplanan yüzeye ekilmiştir (B. Ozdil, Güler, Acikgoz, Kocaturk, & Aktug,

2020). Kaplama sonrası yüzey görüntülemesi atomik güç mikroskobu (AFM) tekniklerinden biri olan taramalı uç mikroskobu (SPM) ile görüntülenmiştir (Şekil 5).

AFM için numune üzerindeki fazla su buharlaşınca numune cihazdaki tablaya yerleştirilmiştir. AFM cihazında maksimum alan olan $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ alan seçilmiştir. 2 boyutlu ve 3 boyutlu görüntüler Bruker Dimension Edge ile ScanAsyst AFM (Bruker, Almanya) cihazı ile PeakForce Tapping modunda ortam sıcaklığında havada elde edilmiştir. Bu modda, ScanAsyst-Air konsollarının yay sabiti ve frekansı sırasıyla 0,4 N/m ve 70 kHz (Bruker, Almanya) olarak tespit edilmiştir. $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ 'lik bir alanı taramak için 1,0 Hz tarama hızı seçilmiştir. Kalibrasyon standardı olarak, z-konumu kalibrasyonu için Yüzey Topografi Referansı (VGRP-15M) (Bruker, Almanya) kullanılmıştır. Basamaklı yapılara sahip bu standart nano ızgara numuneleri, yüzeyinde kare bir çukur dizilimi olan Pt kaplı bir silikon substrattır. Bu dizinin her çukuru $10 \mu\text{m}$ uzunluğa sahip ve 180 nm derinliğinde oyulmuştur. Bu kalibrasyon, adım yüksekliklerinin doğruluğunu ve morfolojisini doğrulamak, AFM tarayıcısının z konumunu periyodik olarak yeniden kalibre etmek için gereklidir. Görüntü analizini değerlendirmek için NanoScope Analysis 1.5 yazılımı (Bruker, Almanya) kullanılmıştır.

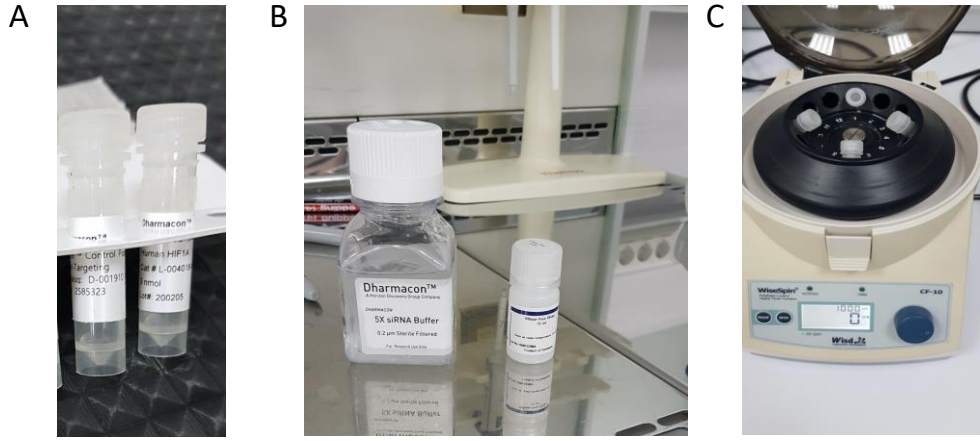


Şekil 5: SPM ile matrijel kaplamanın görünmesi

3.4. Hedef Gen Hif1 α 'nın Susturulması için Small interfering RNA (siRNA) transfeksiyonu

Hücreler 0-200 nM Hif1 α siRNA (On-Targetplus Human Hif1 α Sirna, Smartpool, L-004018-00-0010, Horizon) ile siRNA dozunun tespiti için transfekte edilmiş ve

RT-PCR ile gen ekspresyon seviyeleri kontrol edilmiştir (Şekil 6). Çıkan sonuçlara göre etkili doz 5 nM Hif1 α siRNA olarak tespit edilmiş ve sonraki deneyler için 5 nM Hif1 α siRNA kullanılmıştır. Deneylerde 25 nM negatif kontrol siRNA kullanılmıştır. Hücreler, siRNA uygulaması sonrası analizler için 24 saat sonra sabitlenmiştir.

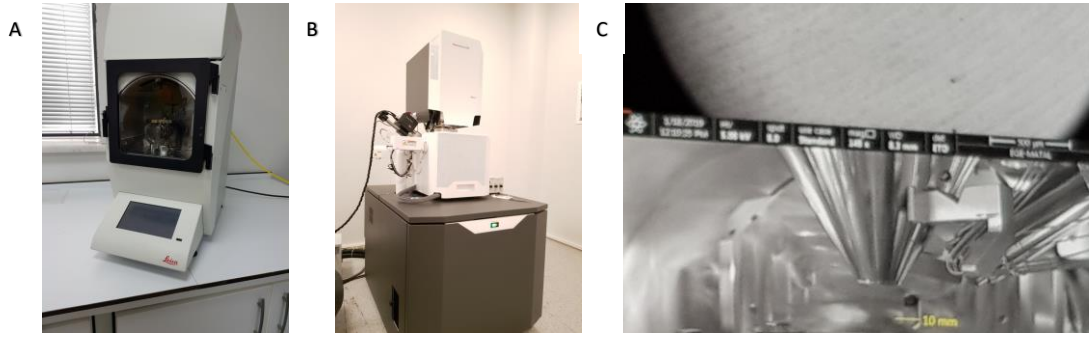


Şekil 6: Kullanılan siRNA malzemeleri. A) Negatif kontrol siRNA ve Hif1 α siRNA stok solüsyonları B) Seyreltmeler için kullanılan siRNA tamponu ve RNase free su C) siRNA solüsyonlarının kullanım öncesi santrifüj edilmesi

3.5. Taramalı Elektron Mikroskobu/Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (SEM/EDS)

Hücreler 10⁵ hücre/ml' seyreltme ile yüzeye ekilmiş ve 24 saat sonra transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonraki 24 saat sonunda ise, %4 PFA içinde sabitlenmiş ve PBS içinde saklanmıştır.

SEM görüntüleme ve analizinden önce numuneler kuru havada tamamen kurutulmuştur. Hücrelerin yüzeylerini SEM görüntüleme için iletken hale getirmek üzere tüm numuneler 6 nm altın-paladyum ile kaplanmış ve tüm numunelere Leica EM ACE600 (Leica Microsystems, Almanya) püskürtmeli kaplayıcı kullanılarak vakum altında kaplama uygulanmıştır. Bu işlem argon gazı ile yaklaşık 30 dakika sürmüştür (Şekil 7 A).



Şekil 7: SEM-EDS analizinde kullanılan cihazlar A) Au-pd kaplama B) SEM cihazı C) SEM cihazı içerisinde örnek analiz alanı

Görüntüleme çözünürlüğü ve hızlanma voltajı sırasıyla 0,9 nm ve 1 kV olarak belirtilmiştir. SEM/EDS görüntüleme, Schottky Alan Emisyon Tabancası ile donatılmış Thermo Scientific Apreo S LoVac SEM (ThermoFisher Scientific, U.S.A.) tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 7 B). Görüntüleri toplamak için yüksek vakum modu seçilmiştir. (Şekil 7 C). Ölçümler için 30 kV hızlanma potansiyeli ve 50 nA maksimum akım demeti kullanılmıştır. Deneylerde her hücreden elemental spektrumları analiz etmek için kullanılan EDS dedektörü (AMETEK, ABD) EDAX kullanılmıştır. Tüm hücreler için elektron ışınları için hızlandırıcı voltaj, yüksek 5 kV uygulanmıştır.

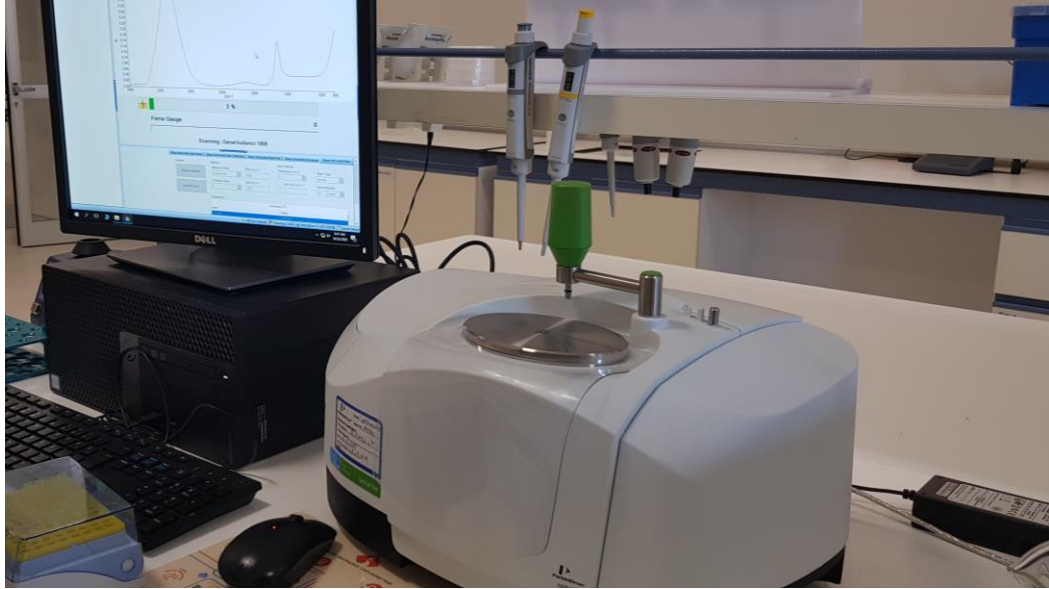
3.6. Hücre İçi Organik Bileşenlerdeki Değişimin Belirlenmesi (ATR-FTIR)

Yöntem kısmının başında belirtilen 4 hücre grubuna ek olarak matrijelden gelebilecek herhangi bir sinyalin etkisini elimine etmek için sadece matrijel ve besi yeri grubu da analiz edilmiştir (Şekil 8). Hücre grupları ve matrijel NaCl solüsyonunda yıkanmış ve İzmir Ekonomi Üniversitesi bünyesindeki FTIR Spektrometre ile ölçüm yapılmıştır. Ölçümler ATR birimi ve DLATGS dedektörü ile donatılmış PerkinElmer UATR Two FTIR spectrometre (Perkin Elmer UATR Two, UK) ile elde edilmiştir. Her ölçüm için içerisinde 2×10^5 hücre/ml olan solüsyondan 2 mikrolitre alınmış ve yaklaşık on iki dakika kurutmaya bırakılmıştır. Solüsyon içerisindeki sıvıdan gelen sinyalin önlenmesi için kuruma işlemi spektrumlar ile kontrol edilmiştir. Buna göre kuruma işleminin sonunda yaklaşık beş ölçüm alınarak sıvının uzaklaştırıldığı kesinleştirilmiştir. Örnek ölçümü için oda sıcaklığında 4000

ila 800 cm^{-1} orta kızılötesi aralığında her örnek için minimum dört spektrum kaydedilmiştir. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Her interferogram için 4 cm^{-1} spektral çözünürlükte toplam 128 taramanın ortalaması alınmıştır. ATR ölçüm alanı boş ve temiz iken hava spektrumu arka plan olarak kaydedilmiştir.

Hücre grupları:

- 1.Malign melanoma CD133+
- 3.Malign melanoma CD133+/ Hif1 α -
- 5.Malign melanoma CD133+/nsiRNA
- 6.Malign melanoma CD133-
- 7.Matrijel
- 8.Besi yeri



Şekil 8: ATR-FTIR analizi için kullanılan cihaz (Perkin Elmer UATR Two, UK)

3.7. Hücre döngüsü analizleri

Hücre döngüsü fazları, Muse® hücre analizörü kullanılarak belirlenmiştir (Berrin Ozdil, Guler, Acikgoz, Kocaturk, & Aktug, 2019). Hücreler standart pasaj protokolüne tabi tutulmuş ve hücre pelleti oluşturulmuştur. Hücreler %70 soğuk etanol ile sabitlenmiş ve gece boyunca -20°C 'de tutulmuştur. Ertesi gün numunelerden etanol uzaklaştırılarak hücre döngüsü kitindeki çözelti (Millipore

lot:294162) eklenmiştir. Örnekler karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra Muse® hücre analizörü ile hücre döngüsü analiz modunda okuma yapılmıştır.

3.8. Gen Ekspresyon Analizleri-Gerçek Zamanlı Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (real time qRT-PCR)

Hücreler sayım sonrası 10^5 hücre/ml olacak şekilde seyreltilmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra, StemPro™ Accutase™ Hücre Ayırma Reaktifi (Thermo Fisher) çözeltisi ile yüzeyden ayrılan hücreler 1X Fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmış ve RNA tamponu (Roche) içerisinde çözülmüştür. Sonraki adımlar için, Roche izolasyon kitine ve gen ekspresyonu profillemesi için kullanılan özelleştirilmiş Roche paneline göre gerçekleştirilmiştir. Örnekler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Nanodrop ile 260-280 nanometrede saflık ve konsantrasyon ölçümü alınmıştır. RNA konsantrasyonları uygun olarak seyreltilip cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi işlemi gerçekleştirilmiştir. cDNA'lar PCR cihazı ile GAPDH, referans cDNA alınarak kontrol edilmiştir. Gerçek zamanlı qRT-PCR işlemi için satın alınan kitler, önerilen protokol sırası ile kullanılmıştır. Elde edilen değerler referans RNA ile normalize edilecek ve gruplar karşılaştırılarak ifadenmenin anlamlı olup olmadığı belirlenmiştir. Kök hücre karakteri, invazyon, metastaz ve anjiyogenez kapasitesi, hipoksi özelliği, DNA asetilasyonu, hücre içi iskelet ve hücre adezyon molekülleri ile ilişkili seçilen toplam 30 gen (26 gen + 4 kontrol) için 3 tekrar şeklinde çalışılıp, gruplar karşılaştırılmıştır. Kanser kök hücresi belirteci olarak CD133 kullanılmıştır.

RT-PCR ile analiz edilen genler:

KLF4, SOX2, NANOG, MYC, SMAD2, HIF1A, CREBBP, VHL, SHH, SMO, GLI1, PTCH2, MIF, HDAC9, HDAC1, EP300, ACTB, PFN1, PFN2, HIF2A (EPAS1), MMP2, MMP9, ERK (MAPK1), VEGFR2 (KDR), VEGFR1 (FLT1), VEGFA, CD133 (PROM1)

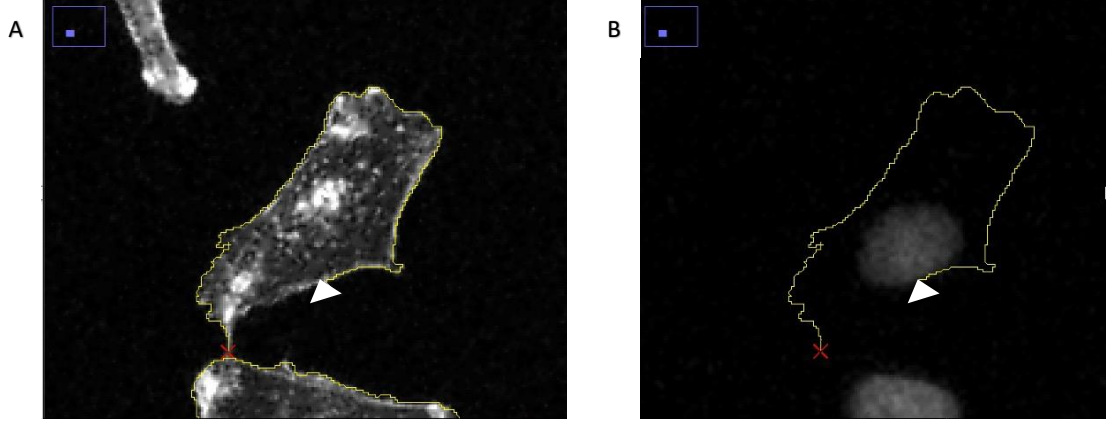
3.9. İmmünofloresan Boyama

Hücreler, %4 paraformaldehit (PFA) (Sigma P-6148) ile 24 saat transfeksiyondan sonra sabitlenmiş ve %0.25 TritonX-100 (Biotech, C34H62011) ile hücre membranı

geçirgen hale getirilmiştir. Hücreler, bloklama için %3 BSA (Chem Cruz, sc-2323) ile muamele edilmiş ve gece boyunca 1:200 oranında seyreltilmiş birincil antikor (Hif1 α , Bioss bs-0737R; KLF4, Thermo PA1-095; SHH, Santa cruz, sc-373779; Gli1, Bioss AI05040; Smo, Bioss AA062588; VEGF, bs-1665R; EP300, Bioss, bs-5339R; HDAC9, Bioss, bsm-54186R; Mif, Santa Cruz sc-271631; MMP9, Bioss bs-4593R) ile inkübe edilmiştir. Hücreler, oda sıcaklığında ikincil antikorlarla (Alexa Fluor® 488-AffiniPure Goat Anti-Rabbit Jackson Immuno Research, 111-545-003) muamele edilmiş ve DAPI içeren Fluoroshield kapama mediumu (abcam, ab104139) ile kapama işlemi yapılmıştır. F-aktin boyaması için, bloklama işlemi sonrası hücreler, oda sıcaklığında 1 saat süreyle %1 seyreltilmiş Phalloidin 488 (abcam, ab176753) ile inkübe edilmiş ve DAPI içeren Fluoroshield kapama mediumu (abcam, ab104139) ile kapama yapılmıştır. Fotoğraflar Olympus BX-51 mikroskobu (Olympus Optical Co., Tokyo, Japonya) ile çekilmiştir.

3.10. Sonuçların Değerlendirilmesi

Gen ekspresyon profillerini incelemek için 'Çoklu Plaka Analizi' aracı kullanılmıştır. Göreceli niceleme için referans housekeeping genlerinin (aktin, gliseraldehit 3fosfat dehidrojenaz mRNA ve miRNA için u6) ifadesi ölçülmüştür. Kat değişimi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ kullanılarak belirlenmiştir. Deney grupları, Students' t-testi istatistiksel analizi kullanılarak karşılaştırılmış ve kat değişim değerleri, iki kattan küçük veya büyük olup olmadıklarını görmek için analiz edilmiştir. Tüm RT-PCR, protein yoğunluğu, ATR-FTIR, SEM, EDS ve hücre döngüsü verileri için görüntü işleme ve analizler tamamen kör olarak gerçekleştirilmiştir. ATR-FTIR ölçümleri, spektrometre yazılım programı Spektrum IR 10.7.2 (Perkin Elmer UATR Two, UK) ile alınmıştır. MATLAB altında çalışan Kinetics yazılımı kullanılarak spektral ön işleme ve temel bileşen analizi (PCA) yapılmıştır. PCA, spektral benzerliklere ve farklılıklara dayalı puan grafiklerinde veri kümeleri içindeki benzer spektrumların kümelenmesini temsil eder ve yükleme grafiklerinde (negatif ve pozitif yükler) spektral değişkenlerin belirlenmesini sağlar. Burada PCA, her koşulun tüm spektrumları için kullanılmıştır. 3100 ila 2800 ve 1800 ila 850 cm^{-1} birleşik spektral aralığı için tamamen önceden işlenmiş absorbans spektrumları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



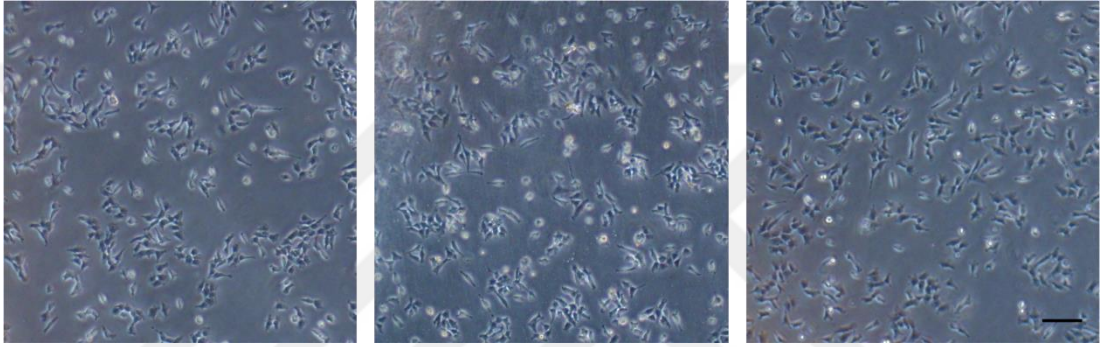
Şekil 9: Protein ışımlarının karşılaştırılması için her protein için ayrı ayrı her gruptan en az 100 hücre olacak şekilde manuel olarak hücre çevreleri çizilmiştir. Buna göre fotoğraflar ImageJ programı ile siyah beyaz kanallara ayrılmış (A) ve ilgili protein ile DAPI görüntüsü (B) senkronize edilerek çizim kontrollü şekilde gerçekleştirilmiştir. Kırmızı çarpı işareti çizim başlangıç noktasını, beyaz ok devam eden çizimi göstermektedir.

Proteinlerin yoğunluğunu ölçmek için ImageJ/Fiji kullanılmıştır (Görüntü analiz yazılımı, Ulusal Sağlık Enstitüleri, Bethesda, MD) (Şekil 9). Verilerin analizinde IBM SPSS Statistics 25.0 kullanılmıştır. Veriler normallik için Shapiro Wilk testi ve varyans homojenliği için Levene testi kullanılarak incelenmiştir. Normal dağılım gösteren örneklerin analizinde ANOVA ve Bonferroni post-hoc testi, normal dağılım göstermeyen örneklerin incelenmesinde ise Kruskal-Wallis ve Pairwise karşılaştırması kullanılmıştır. Aksi belirtilmedikçe sonuçlar ortalama standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı fark $p < 0.05$ olarak tanımlanmıştır. Verilerden oluşturulan grafiklerde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak belirtilmiştir.

Bulgular

4.1. Malign Melanoma Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

Malign melanoma hücreleri olarak kullanılan adherent CHL-1 hücreleri, %10 FBS içeren EMEM içerisinde kültüre edilmiştir. Hücre kültürü optimizasyon aşamasında tripsin ile yüzeyden ayırma süresi 2 ila 7 dakika arasında denenmiş ve 3 dakikada hücrelerin yüzeyden kaldırılabilceği belirlenmiştir. CHL-1 hücre hattı faz-kontrast örnek görüntüsü Şekil 10'da gösterilmiştir.

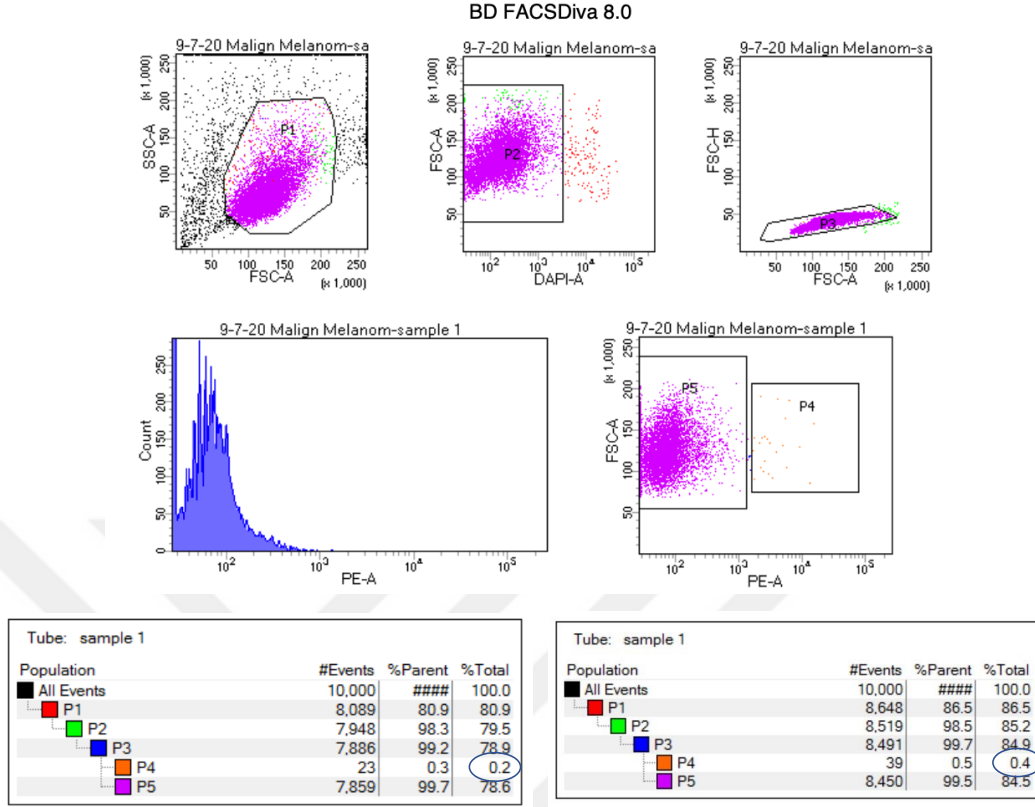


Şekil 10: CHL-1, CD133+ ve CD133- hücre hatlarının örnek faz-kontrast görüntüleri. Ölçek: 20 µm.

Hücreler adherent hücre tipinde olup poligonal şekildedir. Genellikle kümeler halinde lokalize olup yüzeyi doldurmaktadırlar.

4.2. Akış Sitometri Tekniği ile Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu

Kültüre edilen malign melanom hücreleri flask yüzeyini %80 oranında kapladıklarında pasaj işlemine hazırdır. Hücreler yöntem bölümünde açıklandığı gibi CD133+ etiketi ile boyanmış 1×10^6 ml/hücre olarak seyreltilerek akış sitometresi cihazına yüklenmiştir. Negatif kontrol olarak sadece nüklear bölgeyi tanıyan DAPI ile etiketlenen hücreler kullanılmıştır. CD133+ hücrelerin en saf halini alabilmek için hücrelerin büyüklük ve granül yapısına göre alan seçilerek dört aşamalı kapılama yapılmıştır. Hücreler p4 üzerinden seçilecek şekilde ayarlanmıştır. Malign melanom hücre popülasyonunun %0,1 ile 0,4 arasında değişen bir CD133+ hücre popülasyonuna sahip olduğu görülmüş, bu hücreler izole edilmiştir (Şekil 11).

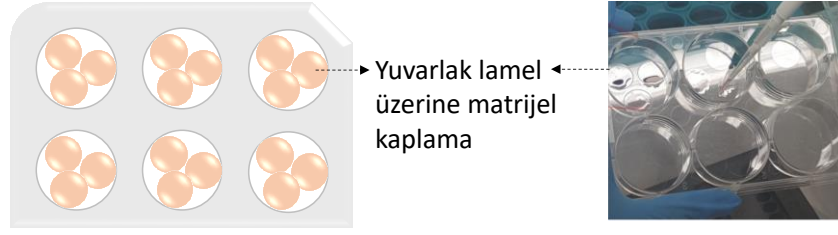


Şekil 11: Akış sitometrisi örnek kapılma grafikleri gösterilmiştir. Hücreler p4 kapısı üzerinden izole edilen CD133+ hücreler yaklaşık olarak %0,2 ile %0,4 arasında bulunmuştur.

Hücrelerin kök hücre karakterizasyonu için kanser kök hücrelerin sfeoid oluşturma kapasitesi araştırılmıştır . Bunun için %3 agar içeren PBS solüsyonu 1:1 serumsuz besi yeri ile karıştırılmış, CD133+ ve CD133- hücreleri agar yüzeyinde kültüre edilmiştir. CD133+ hücrelerin sfeoid oluşturduğu, bunun aksine CD133- hücrelerin hücre topluluğu oluşturduğu, fakat sferoide dönmediği ve oluşan yapının hücrelere ayrıldığı belirlenmiştir.

4.3. Matrijel Yüzey Yayılımı

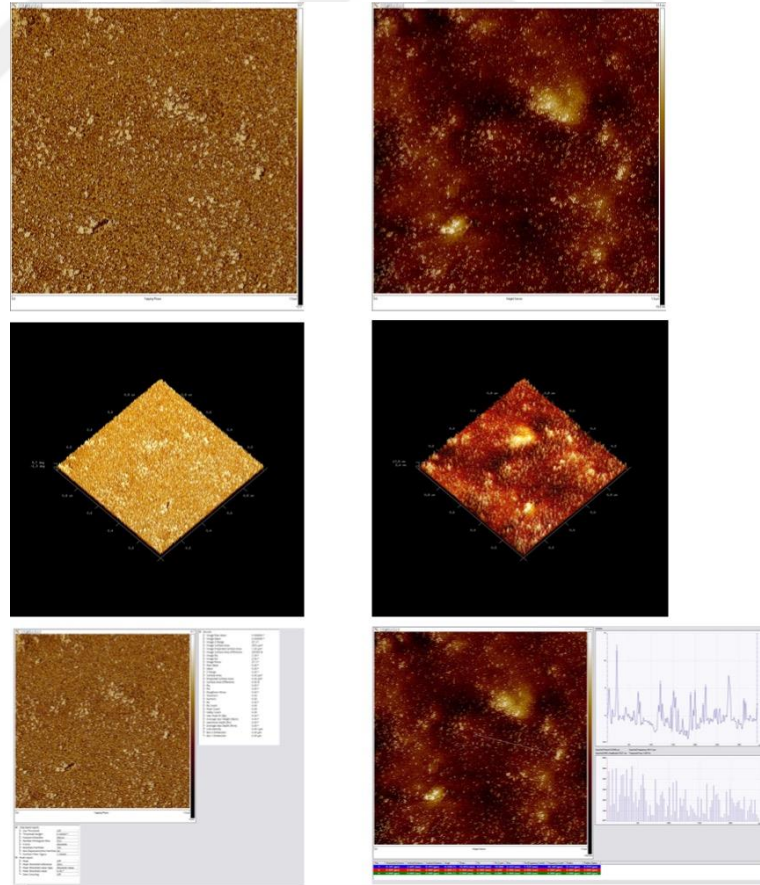
Hücreler yüzeye ekilmeden önce yüzey matrijel ile kaplanmıştır. Bunun için önce kullanılacak malzemeler soğutulmuş kullanılmıştır. Böylece matrijel kaplaması sırasında henüz sıvı formunda olan matrijel eşit bir şekilde yüzeye dağıtılmıştır (Şekil 12).



Şekil 12: Lamel üzerine matrijel kaplama görseli.

Eşit yayılım için ayrıca örnekler çalkalayıcı üzerine sabitlenen soğuk yüzey ile temas halinde tutulmuştur. Matrijel polimerizasyonu için örnekler 37°C’ de 15-20-30 dakika bekletilmiş ve 20 dakikanın polimerizasyon için uygun olduğu görülmüştür.

Matrijel yüzey dağılımlar SPM ile görüntülenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13: SPM ile matrijel kaplamanın görüntüleri ve yüzey dağılımı/pürüzlülüğü ile ilgili grafiksel dağılımlar

4.4. Hedef Gen Hif1 α 'nın Susturulması için Kullanılan siRNA Dozunun Belirlenmesi

Malign melanoma kanser kök hücreleri yani CD133+ olarak etiketlenen hücreler Hif1 α geni susturulması için farklı dozlarda siRNA ile muamele edilmiştir. Firmanın önerdiği şekilde toz halinde olan siRNA çözölmüştür. Bunun için RNase-free su ile 5x siRNA tampon solüsyonu 1x'e seyreltilmiştir. Temin edilen siRNA'ların miktarı 5nmol'dür. Stok solüsyon siRNA için siRNA'lar 50 mikrolitre tampon solüsyonu içerisinde protokol uyarınca çözölüp 100 mikroMolar stok elde edilmiştir. RNA miktarları 100 mikroMolar stoktan 5 mikroMolar stok hazırlandıktan sonra nanodrop cihazı ile ölçölmüştür (Şekil 14).



Şekil 14: Nanodrop ölçüm sonuçları

Transfeksiyon deney kurulumu için önce firmanın da önerdiği gibi 6 kuyucuklu plaka içerisine hücreler ekilmiş (kuyucuk başına 10^4 / ml'de 10^5 olacak şekilde öneriliyor) ve bir gece inkübe edilmiştir. Protokole uygun olarak, öncelikle firmanın önerdiği şekilde hem Hif1 α hem negatif siRNA için 25 nM kullanılmıştır. Kat değişim limiti olarak 2 limit kabul edilmiş ve 0-2 aralığındaki kat değişim fark yok

olarak kabul edilmiştir. 25 nM Hif1 α kullanımında sonuç limite çok yakın olduğu için ve susturulmanın daha belirgin olması istenildiğinden ek olarak 5, 10, 100 ve 200 nM siRNA uygulaması yapılmış ve -56.44 kat düşüş gösteren 5nM HIF1 α siRNA kullanılmasına karar verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: siRNA dozunu belirlemek için CD133+ hücrelerine farklı dozlarda Hif1 α siRNA uygulananı gerçekleştirilmiş, sonrasında Hif1 α gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre değişimi hesaplanmıştır.

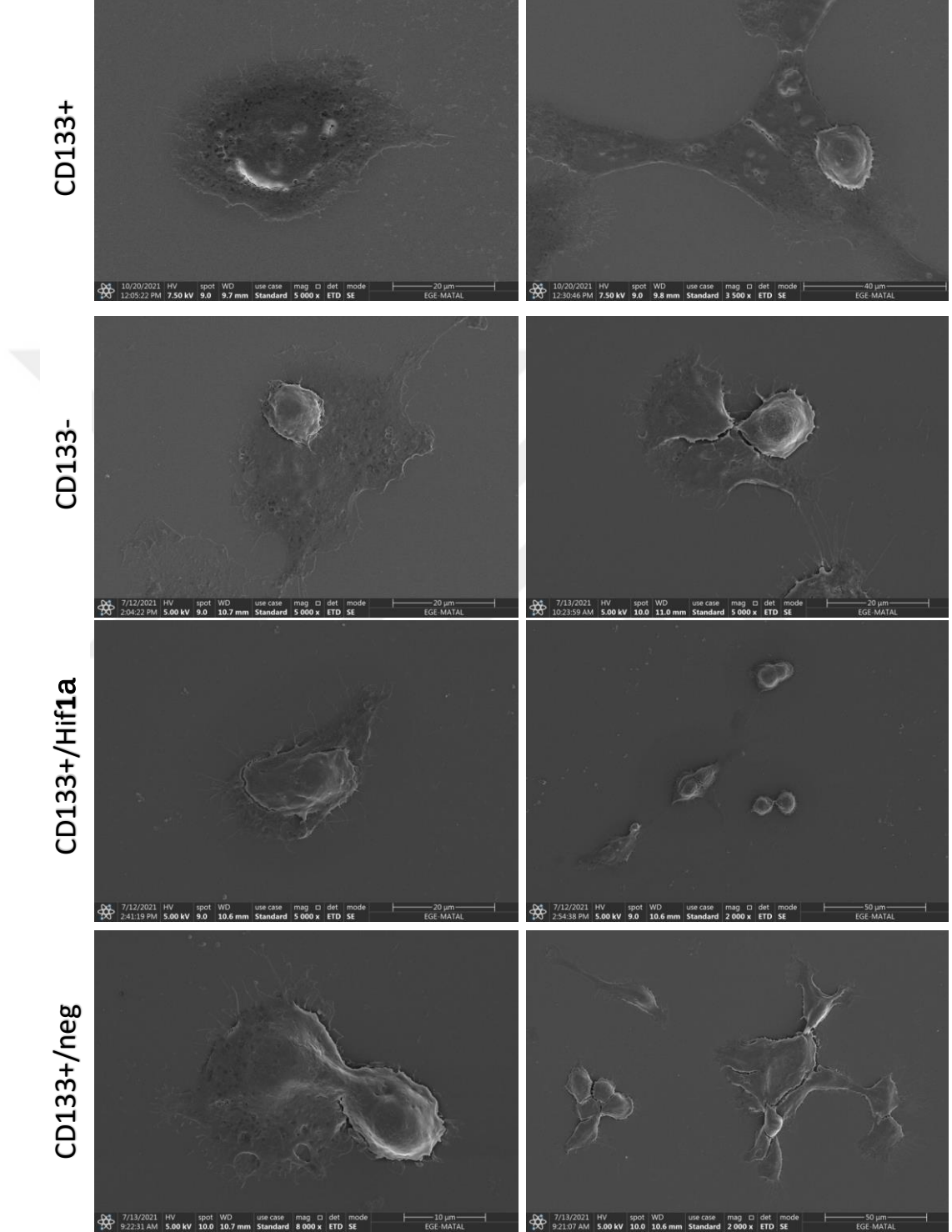
A	[siRNA]	CD133+	B	[siRNA]	CD133+
	Hif1a 5nM	-59.44		neg	-1.56
	Hif1a 10nM	-9.02			
	Hif1a 25nM	-2.08			
	Hif1a 100nM	1.95			
	Hif1a 200nM	14.12			

siRNA dozunu belirlemek için CD133+ hücrelerine farklı dozlarda Hif1 α siRNA uygulananı gerçekleştirilmiş, sonrasında Hif1 α gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre değişimi hesaplanmıştır. Uygulanan Hif1 α siRNA dozları tabloda belirtildiği gibi 5, 10, 25, 100 ve 200 nM olarak belirlenmiştir. Firmanın önerdiği negatif kontrol siRNA miktarı ise 25 nM'dır. Hif1 α siRNA uygulananı sonrası en efektif doz 5 nM olarak bulunmuştur. Bu aşamadan sonra Hif1 α gen susturulması için 5 nM siRNA kullanılmıştır. Yeşil negatif kat değişimini (ekspresyon azalışı), kırmızı pozitif kat değişimini (ekspresyon artışı) göstermektedir. Kat değişiminde 2 limit olarak belirlenmiştir. 0-2 aralığındaki kat değişimi siyah olarak yazılmıştır.

4.5. Malign Melanoma Kanseri Kök Hücrelerinde Hif1 α susturulması ile Hücre Morfolojilerinin ve Elemental Yüzdelerin Kök Hücre Olmayan Malign Melanoma Kanseri Hücreleri ile Karşılaştırılması: SEM/EDS

Hücre morfolojilerinin karşılaştırılması için SEM görüntüleri kullanılırken (Şekil 15), periferik ve nükleer veri noktalarından alınan bilgilere göre hücrelerden gelen sinyaller o bölgedeki elemental yüzdelere göre karşılaştırılmıştır. Hücre yüzey morfolojileri bakımından karşılaştırıldıklarında tüm hücre gruplarında yüzey

pürüzlülükleri ve hücre dışına doğru filapodia yapıları bulunurken, hücre dışına doğru oluşan kabarcıklar (blebbing yapıları) CD133+ hücre grubunda belirgin şekilde azdır.



Şekil 15: Hücre gruplarına ait SEM fotoğrafları.

Hücre gruplarının karşılaştırılmasını yanı sıra hücrelerin matrijel yüzeyinde kültüre edilmesi nedeniyle SEM-EDS analizi matrijel için ayrı olarak gerçekleştirilmiştir. Matrijel içeriğinde karbon, azot, oksijen, sodyum, sülfür ve potasyum tespit edilmiştir. Karbon oranı hücre bazlı analizde en yüksek oranda olurken, matrijelde en yüksek oran oksijen ve sodyum element yüzdeleri olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Hücre grupları merkezi (central) ve hücre sınırına yakın (periferal) olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 2: SEM-EDS analizi matrijel elemental analizi. Matrijel içeriğinde karbon, azot, oksijen, sodyum, sülfür ve potasyum tespit edilmiştir.

	C	N	O	Na	S	K
matrigel	6.38	0.01	61	22.67	0.16	9.78
	6.1	0.01	60.9	22.94	0.19	9.86
	5.69	0.01	61.2	23	0.21	9.88
	5.8	0.01	61.22	22.85	0.19	9.92
	5.9925	0.01	61.08	22.865	0.1875	9.86

CD133+ hücre grubunda karbon, azot, oksijen, sodyum, sülfür ve potasyum tespit edilmiştir (Tablo 3). En yüksek elemental yüzde karbon elementinde bulunurken, periferal bölgeye doğru karbon miktarında azalma meydana gelmiştir.

Tablo 3: CD133+ hücre grubu özelinde SEM-EDS analizi.

nuclear	C	N	O	Na	S	K
	56	9	21.97	5.01	1.06	6.96
	54.31	10.39	22.44	5.16	1.02	6.69
	54.94	11.22	26.56	3.74	1.13	2.41
	61.02	5.38	21.91	2.87	0.84	7.98
	60.22	2.9	18.26	2.81	0.7	15.11
	54.1	12.01	26.54	3.87	1.12	2.35
	59.49	6.63	22.27	3.08	0.85	7.67
	58	4.82	19.04	3.12	0.73	14.29
	52.13	9.26	28.1	5.68	0.63	4.2
	50.91	10.39	28.17	5.83	0.63	4.07
	58.1	6.92	24.27	4.48	1.25	4.98
	57.13	8.37	25.53	4.39	1.29	3.29
periferal	C	N	O	Na	S	K
	49.03	9.95	25.74	7.08	0.71	7.49
	47.66	11.17	26.02	7.24	0.72	7.19
	37.32	7.66	36.21	9.98	0.46	8.38
	35.64	7.48	37.31	10.28	0.43	8.85
	36.49	8.84	36.11	10.05	0.47	8.04
	34.62	8.62	37.35	10.42	0.44	8.55
	33.84	7.33	40.5	11.31	0.64	6.37
	31.43	12.2	41.36	9.85	0.32	4.84

CD133- hücre grubunda karbon, azot, oksijen, sodyum, fosfor, sülfür ve potasyum tespit edilmiştir (Tablo 4). En yüksek elemental yüzde karbon elementinde bulunurken, periferel bölgeye doğru karbon miktarında azalma meydana gelmiştir. Merkezi bölgede CD133+ hücrelerine göre daha düşük karbon yüzdesi göstermiştir. CD133+ hücre grubundan farklı olarak CD133- hücre grubundaki farklı örneklerde merkezi bölgede fosfor tespiti yapılmıştır.

Tablo 4: CD133- hücre grubu özelinde SEM-EDS analizi.

nuclear	C	N	O	Na	P	Al	S	K	TiK	ZnK
	47.5	12.18	29.12	6.22	0	0	0	0.6	4.37	0
	35.5	9.83	40.09	9.34	0	0	0	0.15	5.09	0
	43.64	8.94	33.42	8.46	0	0	0	0.23	5.31	0
	29.6	7.56	45.28	11.25	0	0	0	0.17	6.13	0
	28.66	6.82	47.65	11.11	0	0	0	0.19	5.56	0
	54.22	9.7	27.93	4.57	0	0	0	0.78	2.81	0
	34.94	11.97	38.17	9.14	0	0	0	0.2	5.59	0
	45.38	7.45	26.34	9.62	0	0	0	7.65	3.56	0
	42.29	14.39	34.14	2	0	0	0	0	3.54	1.48
	50.45	12.42	23.19	2.41	0	2.11	0	4.48	1.98	2.94
	47.73	11.09	33.66	0	0	0	0	3.74	1.67	2.12
	47.8	13.53	31.13	1.53	0.59	0	0	2.81	1.17	1.44
	52.04	12.98	24.89	1.83	0.67	1.6	0	3.02	1.28	1.7
	53.33	10.99	25.81	1.56	1.17	1.56	0	2.79	1.2	1.58
	50.96	16.82	28.32	0	1.2	1	0	1.71	0	0
	57.74	0	35.38	1.39	0	0	0	2.84	1.21	1.44
	55.07	10.82	26.63	0	1.45	0	0	3.01	1.26	1.76
peripheral	C	N	O	Na	P	Al	S	K	Ti	Zn
	29.43	2.5	49.57	11.78	0	0	0	0.22	6.49	0
	31.88	6.95	44.37	11.02	0	0	0	0.24	5.54	0
	29.51	3.11	46.83	4.02	0	0	0	7.2	3.43	0
	23.83	0.01	47.68	5.57	0	4.74	0	7.8	3.93	6.44
	24.61	0.88	49.4	4.85	0	4.42	0	6.88	3.37	5.59
	14.9	0	61.6	0	0	5.1	0	8.09	3.9	6.4
	16.61	56.01	5.35	4.99	0	7.4	0	0	3.55	6.08
	14.35	56.49	5.36	5.43 P		7.94	0	0	3.82	6.61
	32.39	43.91	4.7	3.98	0	6.63	0	0	3.22	5.17
	39.3	35.29	5.54	3.92	0	7.09	0	0	3.43	5.42
	37.75	37.68	4.81	3.97	0	6.89	0	0	3.32	5.58

CD133+/Neg hücre grubunda karbon, azot, oksijen, sodyum, fosfor, sülfür ve potasyum tespit edilmiştir (

Tablo 5). En yüksek elemental yüzde karbon elementinde bulunurken, periferel bölgeye doğru karbon miktarında azalma meydana gelmiştir. CD133+ hücre grubundan farklı olarak CD133+/Neg hücre grubundaki farklı örneklerde merkezi bölgede fosfor tespiti yapılmıştır.

Tablo 5: CD133+/Neg hücre grubu özelinde SEM-EDS analizi.

nuclear	C	N	O	Na	S	AlK	P	ZrL	K	TiK	ZnK
	54.82	10.25	28.58	4.13	0.52	0	0	0	0	1.7	0
	54.21	10.92	28.46	4.23	0.52	0	0	0	0	1.66	0
	47.9	11.29	30.69	6.13	0.4	0	0	0	0	3.59	0
	49.83	8.06	27.98	7.58	0.66	0	0	0	0	5.89	0
	47.06	12.1	30.65	6.28	0.41	0	0	0	0	3.49	0
	48.62	9.21	28.09	7.72	0.67	0	0	0	0	5.69	0
	53.05	7.51	29.88	5.88	0.5	0	0	0	0	3.18	0
	53.54	7.73	28.54	5.7	0.59	0	0	0	0	3.91	0
	52.16	8.39	29.84	6.01	0.5	0	0	0	0	3.1	0
	52.44	8.75	28.58	5.83	0.6	0	0	0	0	3.8	0
	54.83	8.45	26.35	2.35	0	1.46	1.25	0	2.69	1.1	1.53
	45.05	17.62	32.19	0.47	0	1.07	0.67	0	1.59	0.62	0.73
	50.73	15.89	26.18	0.8	0	1.3	0.97	0	2.13	0.89	1.1
	49.17	13.93	25.5	4.71	0	1.18	0	2.8	2.02	0.68	0
	49.42	16.14	24.88	4.42	0	1.11	0	1.82	1.59	0.6	0
	49.73	7.73	25.99	5.42	0	1.78	0	3.74	4.02	1.59	0
	49.65	15.91	24.86	4.44	0	1.11	0	1.83	1.6	0.61	0
	54.02	8.52	25.04	2.61	0	1.85	1.12	0	3.39	1.46	1.99
	47.64	15.18	27.04	2.01	0	1.58	1.03	0	2.81	1.15	1.55
	46.62	8.47	28.63	3.4	0	2.43	0.86	0	4.52	2.01	3.06
peripheral	C	N	O	Na	S	AlK	P	ZrL	K	TiK	ZnK
	27.98	6.2	48.1	11.3	0.18	0	0	0	0	6.23	0
	27.26	7.27	47.82	11.43	0.19	0	0	0	0	6.04	0
	38.84	5.86	41.13	9.28	0.24	0	0	0	0	4.64	0
	38.06	6.9	40.91	9.37	0.25	0	0	0	0	4.5	0
	32.21	14.38	40.35	8.52	0.19	0	0	0	0	4.35	0
	28.68	7.01	45.88	11.02	0.2	0	0	0	0	7.19	0
	34.1	11.69	39.23	8.88	0.21	0	0	0	0	5.89	0
	31.58	15.06	40.21	8.7	0.2	0	0	0	0	4.25	0
	28.08	8.1	45.57	11.09	0.21	0	0	0	0	6.93	0
	33.43	12.6	39.05	9	0.22	0	0	0	0	5.7	0
	28	10.96	43.39	3.09	0	3.08	0	0	0	5.09	2.41
	31.98	7.65	36.36	4.35	0	3.82	0	0	0	6.85	3.38
	36.05	9.04	29.78	4.53	0	3.5	0	0	0	7.4	3.48
	26.65	7.88	43.7	10.65	0	3.24	0	0	0	5.22	2.42
	33.81	10.37	34.71	9.48	0	3.05	0	0.49	5.48	2.61	0
	33.68	4.89	34.7	11.24	0	3.97	0	0.64	7.27	3.61	0
	26.85	7.55	43.72	10.7	0	3.25	0	0.25	5.25	2.43	0
	33.97	10.13	34.72	9.51	0	3.06	0	0.49	5.5	2.62	0
	34.15	4.67	34.59	11.17	0	3.94	0	0	7.24	3.6	0
	28.12	4.62	44.95	4.41	0	3.82	0	0	6.15	2.93	5.01
	33.95	4.71	37.73	4.87	0	3.86	0	0	6.71	3.14	5.02
	27.94	7.59	42.37	4.25	0	3.71	0	0	6.24	2.95	4.96

CD133+/Hif1 α - hücre grubunda karbon, azot, oksijen, sodyum, fosfor, sülfür ve potasyum tespit edilmiştir (Tablo 6). En yüksek elemental yüzde karbon elementinde bulunurken, periferik bölgeye doğru karbon miktarında azalma meydana gelmiştir. CD133+ hücre grubundan farklı olarak CD133+/Hif1 α - hücre grubundaki nükleer bölge oksijen seviyesi daha yüksek seyretmiştir.

Tablo 6: CD133+/Hif1 α - hücre grubu özelinde SEM-EDS analizi.

nuclear	C	N	O	Na	S	AlK	K	TiK	ZnK	Si
	52.32	11.44	30.09	4.13	0.68	0	1.34	0	0	0
	47.28	12.86	30.43	6.07	0.45	0	2.91	0	0	0
	54.57	4.63	22.83	6.92	0.71	0	10.35	0	0	0
	55.18	8.12	24.73	5.58	0.63	0	5.76	0	0	0
	48.15	6.95	30.68	8.01	0.48	0	5.74	0	0	0
	52.21	11.24	27.05	5.29	0.51	0	3.71	0	0	0
	49.16	5.91	26.92	8.1	0.13	0	9.78	0	0	0
	50.56	15.38	25.89	4.51	0	1.42	2.24	0	0	0
	52.3	15.91	25.82	3.55	0	1.03	1.39	0	0	0
	51.48	15.93	27.73	0	0	1.39	2.31	0	1.16	0
	62.72	8.04	21.66	2.51	0	1.53	3.54	0	0	0
	55.38	13.39	24.41	2.36	0	1.3	3.16	0	0	0
	51.36	12.13	27.05	4.67	0	1.62	3.16	0	0	0
	60.89	8.53	25.93	3.85	0	0	0.81	0	0	0
	60.06	8.77	25.99	3.68	0	0	1.5	0	0	0
	58.25	12.93	24.01	3.67	0	0	1.13	0	0	0
peripheral	C	N	O	Na	S	AlK	K	TiK	ZnK	Si
	30.41	3.34	47.24	11.88	0.26	0	6.87	0	0	0
	52.41	11.45	30.02	4.11	0.68	0	1.33	0	0	0
	39.84	4.69	40.19	9.62	0.18	0	5.49	0	0	0
	22.78	0	56.57	0	0	4.25	7.07	3.53	5.81	0
	26.08	0	50.7	4.75	0	4.01	6.42	3.03	5.02	0
	27.69	0	52.97	3.58	0	3.43	5.51	2.56	4.25	0
	32.72	4.63	42.14		0	3.91	7.33	3.49	5.79	0
	37.78	9.08	35.23	3.09	0	2.96	5.29	2.54	4.03	0
	41.32	0	21.16	2.55	0	1.75	4.47	1.98	3.45	23.31
	37.79	6.81	32.05	4.67	0	3.46	6.7	3.21	5.31	0
	29	6.8	47.56	0	0	3.31	5.91	2.75	4.67	0
	33.91	9.08	38	2.32	0	3.17	5.99	2.83	4.71	0
	30.7	0.01	46.28	3.85	0	3.88	6.54	3.04	5.7	0
	28.81	6.6	47.76	0	0	3.36	5.97	2.78	4.72	0

4.6. Hücre İçi Organik Bileşenlerdeki Değişimin Belirlenmesi (ATR-FTIR)

Hücrelerin FTIR spektrumu, hücresel bileşenlerden (lipitler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler vb.) kaynaklanan sinyalleri içerir ve bu nedenle hücresel makromoleküllerin bileşimi, yapısı ve dinamikleri hakkında bol miktarda bilgi sağlar.

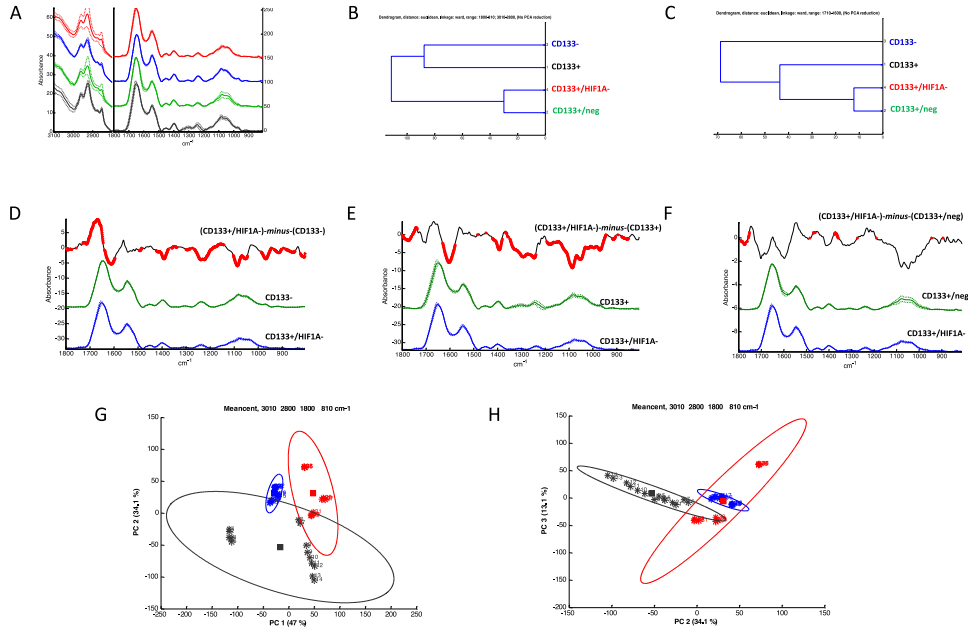
Ölçümler 2×10^5 hücre/ml solüsyon içerisinde 2 mikrolitre alınarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin cihaza transferi öncesi vorteks cihazı ile hızlı ve kısa süre karıştırılmıştır. Hücre solüsyonu içerisindeki sıvının buharlaşması için yaklaşık 12 dakika kuruma aşamasına geçilmiştir. Hücrelerin FTIR spektrumundaki atmosferik su buharı katkısı 1562 ila 1555 cm^{-1} referans pik olarak alınarak çıkarılmıştır. Daha sonra, spektrumlar 1710 ve 1485 cm^{-1} arasındaki eşit alan için taban çizgisi düzeltilmiş ve normalize edilmiştir.

Taban çizgisi düzeltilmesi (baseline-correction) için, önce çoklu dalga sayılarında spektrumun noktaları arasına düz çizgiler yerleştirilmiş; daha sonra spektrumdan çıkarılmışlardır. Daha sonra, "ortalama" spektrum, her hücre koşulu için üç tekrarlı deneylerin spektrumlarının ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Hücre grupları arasında spektrum karşılaştırması yapılması sonucunda özellikle protein bazında karşılaştırmalara ağırlık verilmiştir. Siyah renk CD133+ hücre grubunu gösterirken, mavi renk CD133- ve yeşil renk CD133+/neg hücre grubunu göstermektedir. Kırmızı renk ise siRNA uygulanan grubu (CD133+/ Hif1 α -) temsil etmektedir. Hücre gruplarının analizi için öncelikle 4000 cm⁻¹ ile 800 cm⁻¹ arasındaki spektrumlar incelenmiştir.

Gruplar arasında yapılan genel karşılaştırılma (mean spectra) Şekil 16 A grafiğinde gösterilmiştir. Toplam hücre özelliklerine göre grupların karşılaştırılması Şekil 16 B' de gösterilmiş olup, burada hücrelerin özelliklerinin birbirine yakınlıkları belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre negatif siRNA uygulanan grup ile hedef siRNA uygulanan gruplar benzer bulunmuştur. CD133+ ve CD133- hücre grupları benzer bulunurken, Hif1 α gen susturulmasından sonra CD133+ ve CD133- gruplarından farklı çıkmıştır.

Protein özelinde analiz için ise 1710-1600 cm⁻¹ aralığına bakılmış ve gruplar karşılaştırılmıştır (Şekil 16 C). Bu karşılaştırma sonucu ise negatif siRNA uygulanan grup ile hedef siRNA uygulanan gruplar benzer bulunurken, Hif1 α siRNA uygulanan gruba CD133+ hücre grubu CD133- grubuna göre daha benzer bulunmuştur.



Şekil 16: Hif1 α siRNA uygulaması sonrasında ATR-FTIR analizi.

Gruplar arasındaki farklar FTIR-fark spektrum ile gösterilmiştir (Şekil 16 D, E, F). Ayrıca hücre grupları arasındaki benzerlik/farklılık için temel bileşenler analizi (PCA) oluşturulmuştur (Şekil 16 G, H). Elde edilen verilere göre Hif1 α siRNA uygulanan grup, CD133+ hücre grubundan farklılaşmıştır. Fakat, bu farklılaşma CD133- karakteri ile belli bir kısımda örtüşse de yeni bir karaktere sahip olup hem hücre içine alınan siRNA nedeniyle hem de bu etkinin sinyal yollarındaki etkisi ile gerçekleşen süreçler nedeniyle farklılık göstermesi olabilir.

4.7. Malign Melanoma Kanseri Kök Hücrelerinde Hif1 α Susturulması ile Hücre Döngüsü Fazlarının Kök Hücre Olmayan Malign Melanoma Kanseri Hücreleri ile Karşılaştırılması

Hücre döngüsü fazları G0/G1, S ve G2/M olarak hücre grupları karşılaştırılmıştır. Şekil 17 A-D'de hücre gruplarının ayrı ayrı örnek hücre döngüsü yüzde grafikleri bulunmaktadır. Şekil 17 E'de ise hücre gruplarının faz bazlı yüzdesel karşılaştırmaları bulunmaktadır.

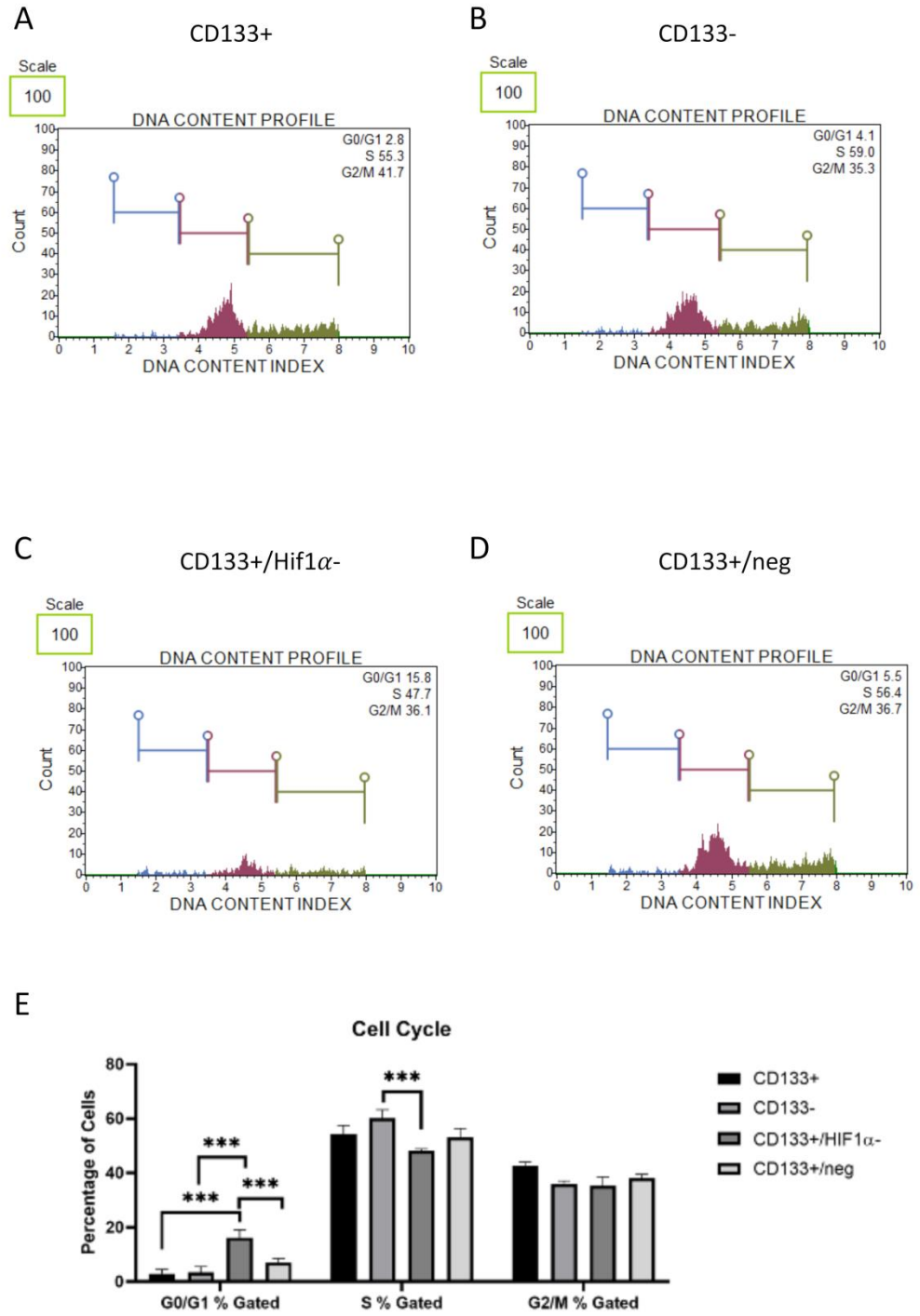
G0/G1 fazı incelendiğinde (Şekil 17), CD133+ ve CD133- hücreler arasında fark olmadığı gösterilmiş (%2.9, %3.4), Hif1 α susturulması ile CD133+ hücrelerinin

(CD133+/ Hif1 α -) belirgin yüzdesel bir artış göstermiştir (%16.2) ($p<0.001$). Bu artış ile CD133+/HIF1 α hücre grubu CD133+ ve CD133- hücre gruplarından istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0.001$). Negatif siRNA uygulanan grup (CD133+/neg, %7.03) ise CD133+/Hif1 α - ve CD133- hücre gruplarından istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0.001$).

S fazı incelendiğinde (Şekil 17), CD133+ ve CD133- hücreler arasında fark olmadığı gösterilmiş (%54.3, %60.1), CD133+/ Hif1 α - hücrelerinde CD133- hücrelerine göre belirgin yüzdesel bir azalış gözlenmiştir (%48.2) ($p<0.001$).

G2/M fazında (Şekil 17) hücre grupları arasında fark bulunmamıştır.





Şekil 17: Hücre döngüsü fazlarının hücre grupları bazlı karşılaştırılması. Hücre döngüsü fazlarının A) CD133+, B) CD133-, C)CD133/ Hif1 α - ve D)CD133/neg olarak hücre gruplarından elde edilen örnek yüzdesel dağılımları ve E) karşılaştırmalı analizi

Sonuç olarak: CD133- hücrelerde S fazındaki hücrelerin sayısı kök hücrelere göre daha yüksektir. Hif1 α siRNA sonrasında G1 fazında hücre yoğunluğunda artış; S fazında azalış görülmüştür. G2 fazında değişim olmamıştır.

Hif1 α ekspresyonunun baskılanması G0/G1 fazında birikime yol açmıştır.

4.8. Gen Ekspresyon Analizleri

Hücre gruplarından elde edilen total RNA örnekleri miktar ve saflıklarının değerlendirilmesi için nanodrop cihazı ile analiz edilmiştir. Elde edilen örneklerin 260/280 oranlarının 1.8 ile 2.0 arasında olması elde edilen RNA örneklerinin saflık derecesinin yüksek olduğunu göstermiştir (Tablo 7).

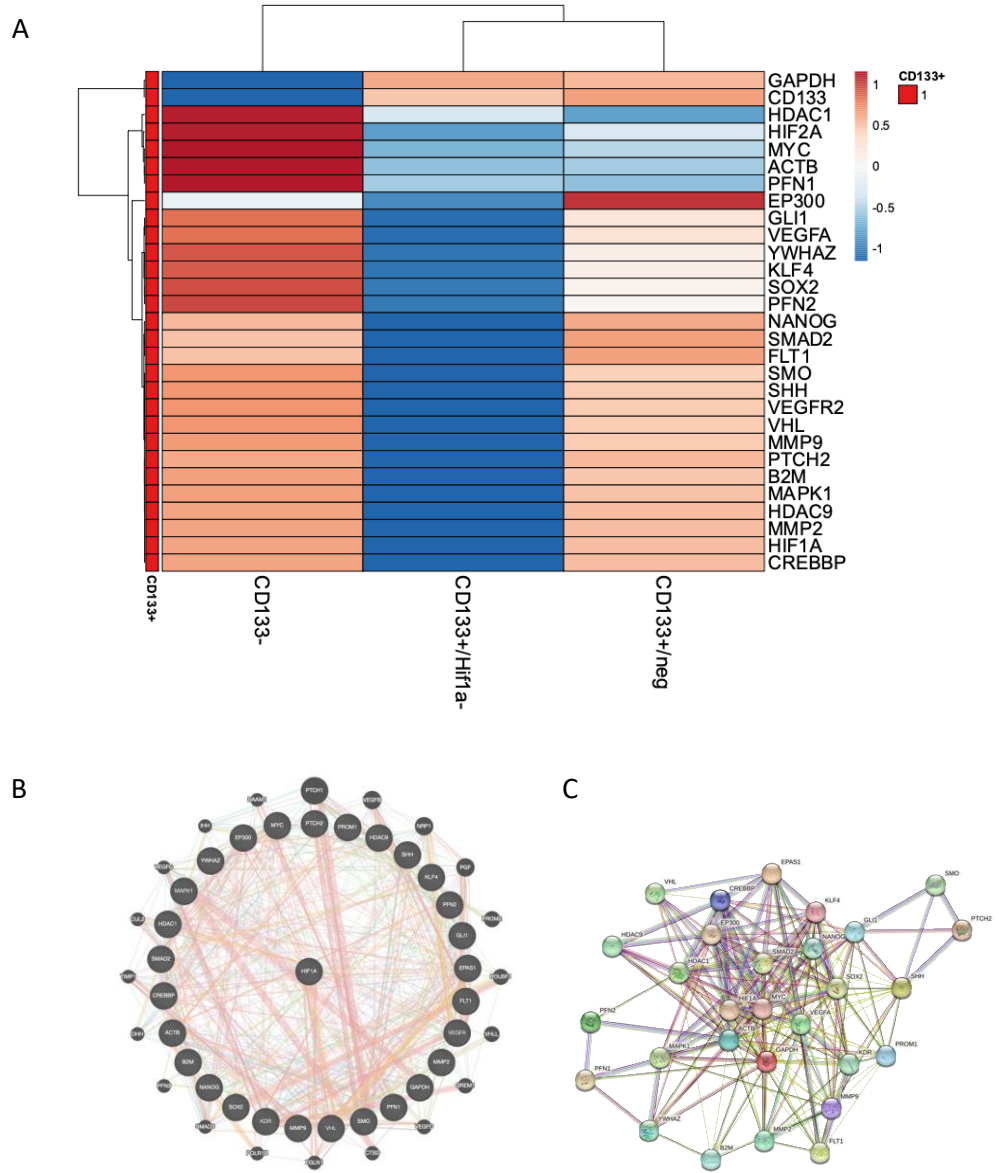
Tablo 7: RNA örneklerinin miktarı ve 260/280 değerleri

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	Sample Type	Factor
Untreated CD133+	303	ng/ μ l	1.81	RNA	40
Untreated CD133+	174	ng/ μ l	1.83	RNA	40
Untreated CD133+	286	ng/ μ l	1.78	RNA	40
NEG.CONT. CD133+	274	ng/ μ l	1.95	RNA	40
NEG.CONT. CD133+	248	ng/ μ l	1.95	RNA	40
NEG.CONT. CD133+	233	ng/ μ l	1.92	RNA	40
CD133+/Hif1A-	333	ng/ μ l	1.92	RNA	40
CD133+/Hif1A-	258	ng/ μ l	1.94	RNA	40
CD133+/Hif1A-	304	ng/ μ l	1.93	RNA	40
CD133-	343	ng/ μ l	1.92	RNA	40
CD133-	252	ng/ μ l	1.93	RNA	40
CD133-	335	ng/ μ l	1.94	RNA	40

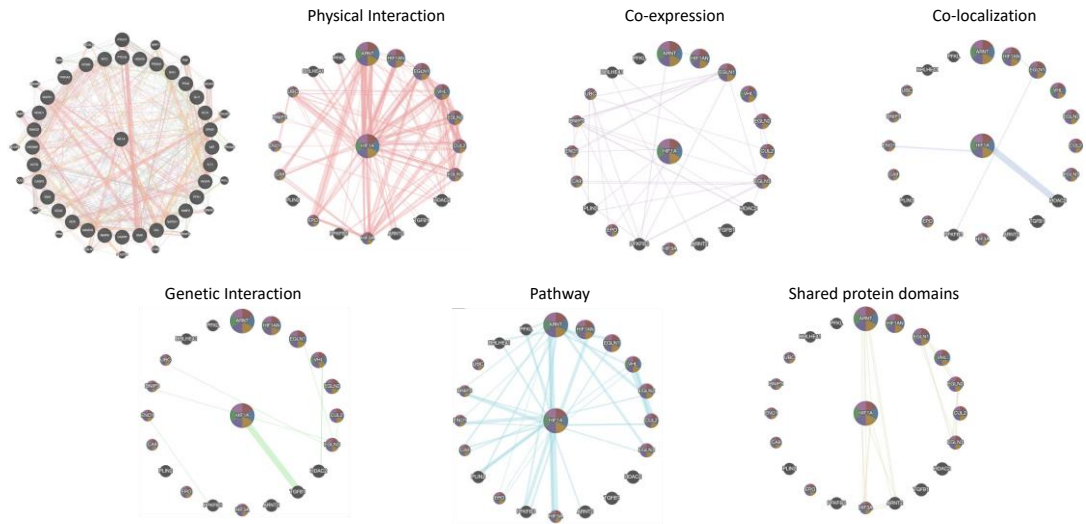
Gen ekspresyon analizi için 4 tanesi house keeping gen olacak şekilde 30 gene ekspresyonuna bakılmıştır (Tablo 8, Şekil 18). Ekspresyonlar CD133+ grubu baz alınarak karşılaştırılmış ve 2 kat değişimi gen ekspresyon farkı için anlamlı olarak kabul edilmiştir. Gen ekspresyon kat değişim sonuçları sayısal tablo (Tablo 8) ve ısı haritası (heat map) (Şekil 18 A) olarak gösterilmiştir. Ayrıca Hif1 α ilişkili genler şematize edilmiştir (Şekil 18 B-C). Hif1 α geni ile ilişkili genlerin sınıflandırması ise Şekil 19'de belirtilmiştir.

Tablo 8: RT-PCR kat değişimi sonuçları

	gen	CD133+	CD133-	CD133+/Hif1a-	CD133+/neg
HOUSEKEEPING GENLER	ACTB	1	1.6	-1.45	-1.35
	GAPDH	1	-1.6	1.45	1.35
	B2M	1	-2.37	-45.31	-6.65
	YWHAZ	1	2.27	-14.07	-4.31
HİPOKSİ	HIF1A	1	-1.78	-52.89	-4.82
	VHL	1	-1.45	-13.16	-3
	HIF2A	1	-1.67	-4.83	-3.98
SHH Yolağı	SHH	1	-1.8	-5.77	-2.35
	GLI1	1	-3.36	-41.98	-15.21
	SMO	1	-1.88	-15.26	-3.85
	PTCH2	1	-3.4	-435.04	-15.17
EPİGENETİK BELİRTEÇLER	HDAC9	1	-9.56	-144.17	-19.34
	CREBBP	1	-3.41	-18.23	-4.37
	HDAC1	1	-1.5	-1.59	-1.62
	EP300	1	-7.34	-9.95	-3.36
DİFERANSİYASYON	CD133	1	-23.1	-3.85	-1.72
	KLF4	1	-4.29	-5.2	-4.65
	NANOG	1	1.06	-1.02	1.14
	MYC	1	1.14	-2.51	-2.11
	SMAD2	1	-4.87	-19.14	-3.36
	MAPK1	1	-2.02	-14.91	-3.28
	SOX2	1	-1.36	-17.86	-8.75
MİGRASYON ve HÜCRE İSKELETİ	MMP2	1	-2.82	-19.58	-4.05
	MMP9	1	-3.99	-38.63	-8.46
	PFN1	1	1.85	1.41	1.39
	PFN2	1	-1.79	-13.22	-7.19
VASKÜLERİZASYON	VEGFR2	1	-1.1	-46.05	-7.36
	FLT1	1	-5.83	-19.95	-4.41
	VEGFA	1	1.27	-11.7	-2.58
miRNA	u6	1	1	1	1
	Hsa-mir-21-5p	1	2.55	-2.59	-1.09
	Hsa-mir-9-5p	1	3.78	-4.31	-2.08
	Hsa--mir-200a-5p	1	1.07	-1.05	-1.41

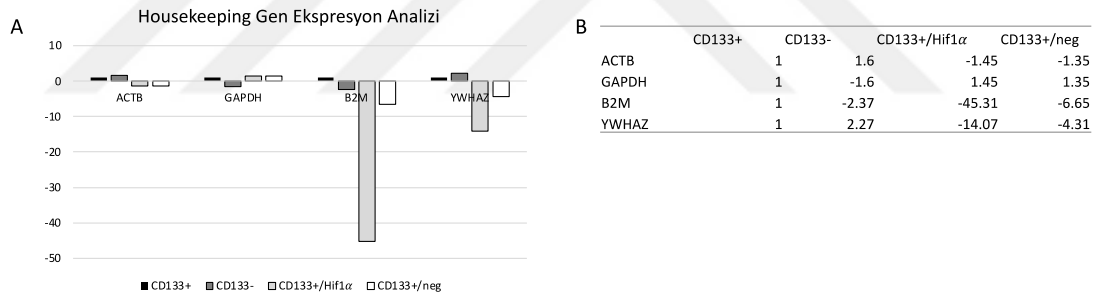


Şekil 18: RT-PCR sonuçları. A) Gen ekspresyon ısı haritası B ve C) Hif1 α geni ile ilişkili genlerin şematik gösterimi



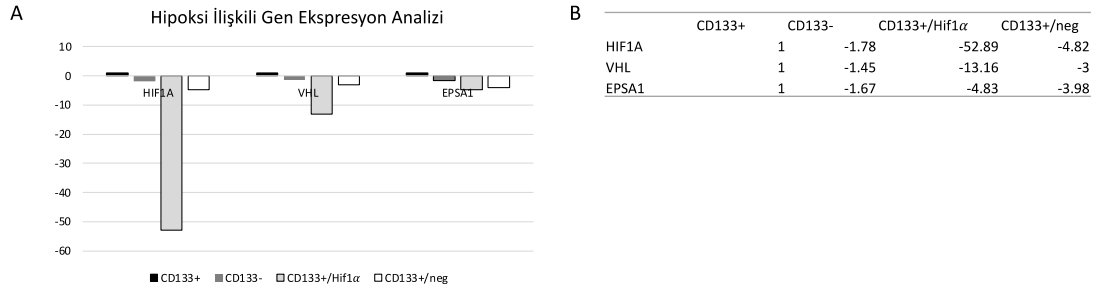
Şekil 19: Hif1 α ilişkili genler ve bu genlerin Hif1 α ile ilişkili olan durumları.

RT-PCR sonuçlarının normalizasyonu için 4 farklı housekeeping gen ekspresyonu belirlenmiştir (Şekil 20). Sonuçlara göre ACTB ve GAPDH genleri normalizasyon için kullanılmıştır.



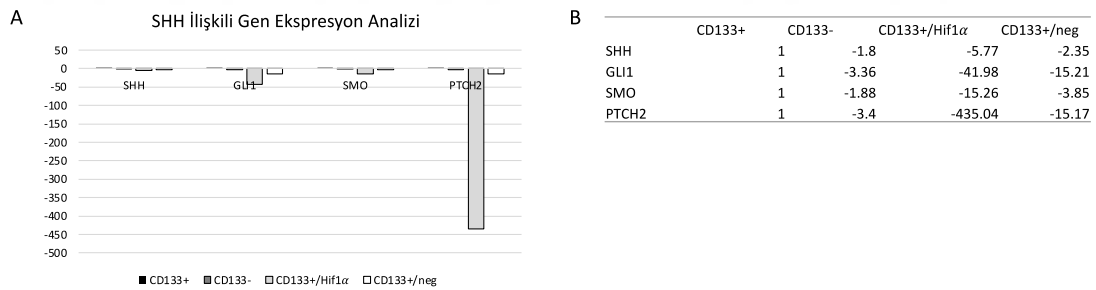
Şekil 20: RT-PCR sonuçlarına göre housekeeping gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.

Hipoksi ilişkili genler olarak Hif1 α , Vhl ve Epsa1(Hif2a) genleri ele alınmıştır (Şekil 21). CD133+ ve CD133- hücre gruplarında fark bulunmazken siRNA uygulanan gruplarda her üç gende azalış gözlenmiştir. Buna göre siRNA uygulaması hipoksi mekanizması üzerinde gen ekspresyonu bazında etkili bulunmuştur.



Şekil 21: RT-PCR sonuçlarına göre hipoksi ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.

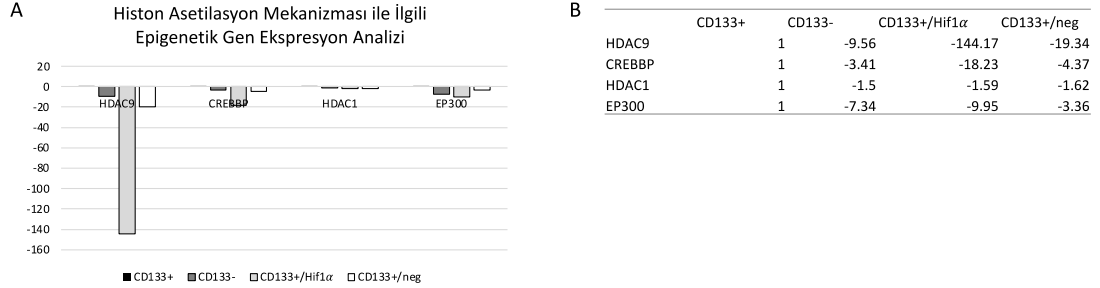
SHH yolağı ile ilişkili genler olarak Shh, Gli1, Smo, Ptch2 genleri ele alınmıştır (Şekil 22). CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında Gli1 geni dışında fark bulunmazken Gli1 gen ekspresyonu CD133- hücre grubunda daha az bulunmuştur. siRNA uygulanan gruplarda her üç gende azalış gözlenmiştir. Hif1α siRNA uygulanan grup özellikle Gli1 ve Ptch2 geni üzerinden negatif regülasyon göstermiştir. Buna göre siRNA uygulaması SHH sinyal yolağı mekanizması üzerinde gen ekspresyonu bazında etkili bulunmuştur.



Şekil 22: RT-PCR sonuçlarına göre SHH sinyal yolağı ile ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.

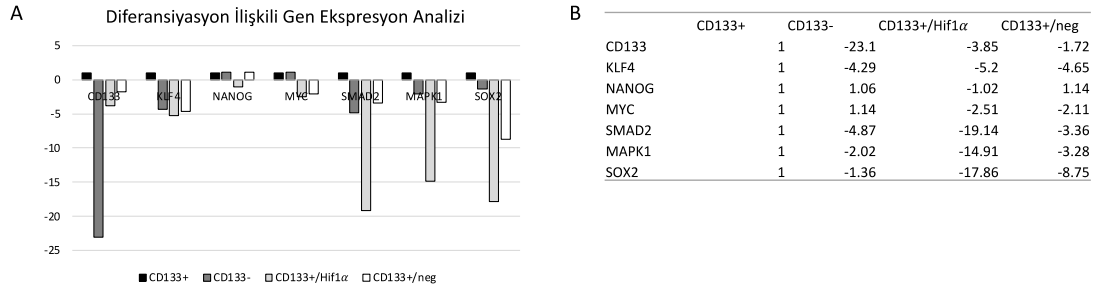
Histon asetilasyon mekanizması ile ilişkili genler olarak HDAC9, Crebbp, HDAC1 ve Ep300 genleri ele alınmıştır (Şekil 23). CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında HDAC1 geni dışında (-1.5x) diğer genler CD133- hücre grubunda negatif regülasyon göstermiştir. siRNA uygulanan gruplarda benzer şekilde HDAC1 ekspresyon seviyesi CD133+ hücre grubu ile benzerken, diğer üç gende azalış gözlenmiştir. Hif1α siRNA uygulanan grup özellikle HDAC9 geni üzerinden negatif

regülasyon göstermiştir (-144.17x). Buna göre siRNA uygulaması histon asetilasyonda görevli genler üzerinde etkili olabilecek potansiyeldedir.



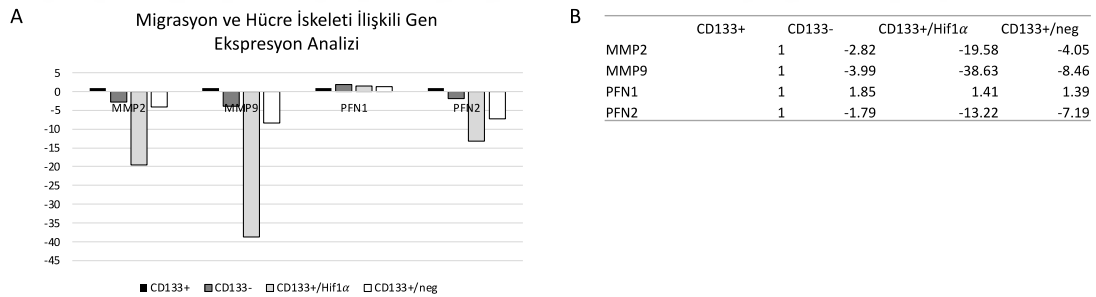
Şekil 23: RT-PCR sonuçlarına göre RT-PCR sonuçlarına göre Histon Asetilasyon Mekanizması ile İlgili Epigenetik ile ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.

Diferansiyasyon ile ilişkili genler olarak CD133, KLF4, NANOG, MYC, SMAD2, MAPK1, SOX2 genleri ele alınmıştır (Şekil 24). CD133 belirteci kanser kök hücre ayırımında kullanılan bir etiket olmakla beraber burada deney aşamasında da CD133- hücre grubunun CD133- olduğunu ya da CD133+ hücre grubunda köklülük olarak farklı olduğunu göstermektedir (-23.1x) ve bu kanser kök hücre popülasyonumuzun varlığını göstermiştir. NANOG, MYC ve SOX2 genleri CD133+ ve CD133- hücre gruplarında benzer seyretmiştir (1.06x, 1.14x ve -1.36x). Ayrıca, MAPK1 gen ekspresyonu da bu her iki hücre grubunda benzer (-2.02x) olarak nitelendirilebilir. KLF4 ve SMAD2 genleri ise CD133- hücre grubunda negatif regüledir (-4.29x ve -4.87x). Hif1α siRNA uygulanan grup CD133+ özelliğini azaltırken, diğer bir deyişle, CD133+ hücre grubuna göre daha az CD133 gen ekspresyonu gösterilen negatif kontrol siRNA uygulanan CD133+ hücre grubu CD133+ hücre grubu ile benzer CD133 gen ekspresyonu sergilemiştir. siRNA uygulanan gruplarda ise NANOG benzer gen ekspresyonu göstermiştir (-1.02x ve 1.14). Bu gruplarda ayrıca MYC gen ekspresyonu da bu her iki hücre grubunda benzer (-2.51x ve -2.11x) olarak nitelendirilebilir. Hif1α siRNA uygulanan grup özellikle SMAD2 (-19.14), MAPK1 (-14.91x) ve SOX2 (-17.86x) geni üzerinden negatif regülasyon göstermiştir. Ayrıca, KLF4 geni de Hif1α siRNA uygulanan grupta negatif regülasyon göstermiştir (-5.2x).



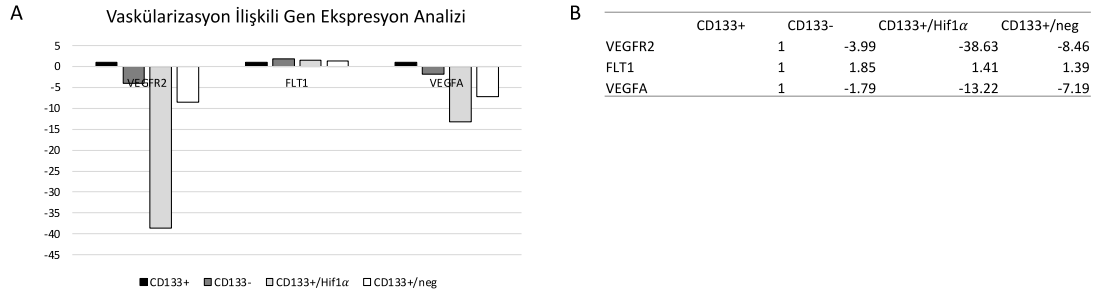
Şekil 24: RT-PCR sonuçlarına göre diferansiyasyon ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.

Migrasyon ve hücre iskeleti ile ilişkili genler olarak MMP2, MMP9, PFN1, PFN2 genleri ele alınmıştır (Şekil 25). PFN1 ve PFN2 gen ekspresyonları CD133+ ve CD133- hücre gruplarında benzer seyrederken (1.85x, -1.79x), MMP2 ve MMP9 gen ekspresyonları CD133+ hücre grubunda daha yüksek bulunmuştur (-2.82x, -3.99x). Hif1α siRNA uygulanan grup CD133+ hücre grubuyla benzer PFN1 gen ekspresyonu gösterirken (1.41x), MMP2 (-19.58x), MMP9 (-38.63x) ve PFN2 (-13.22x) genlerinde ekspresyon seviyesi azalış göstermiştir.



Şekil 25: RT-PCR sonuçlarına göre migrasyon ve hücre iskeleti ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.

Vaskülarizasyon ile ilişkili genler olarak VEGFR2, FLT1 ve VEGFA genleri ele alınmıştır (Şekil 26). FLT1 ve VEGFA gen ekspresyonları CD133+ ve CD133- hücre gruplarında benzer seyrederken (1.85x, -1.79x); VEGF gen ekspresyonu CD133- hücre grubunda negatif regüledir. Hif1α siRNA uygulanan grup CD133+ hücre grubuyla benzer FLT1 gen ekspresyonu gösterirken, VEGFR2 ve VEGFA gen ekspresyonlarında azalış gerçekleşmiştir (-38.63x, -13.22x).



Şekil 26: RT-PCR sonuçlarına göre vaskülarizasyon ilişkili gen ekspresyonlarının CD133+ hücre grubuna göre kat değişimi.

miRNA araştırması yapılması için bir kontrol miRNA olarak u6 kullanılmıştır. Karşılaştırması yapılan miRNA'lar ise mir-21-5p, mir-9-5p, mir-200a-5p olarak belirlenmiştir (Tablo 9). Kanseri kök hücre ve kök hücre olmayan kanser hücresi olarak nitelendirdiğimiz CD133+ ve CD133- hücre grupları karşılaştırıldığında mir-200a-5p ekspresyonunun her iki grupta benzer seyrettiği belirlenmiştir.

Tablo 9: miRNA ekspresyon seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

Hücre grubu	CD133+	CD133-	CD133+/ Hif1α-	CD133+/neg
miRNA	Fold Regulation	Fold Regulation	Fold Regulation	Fold Regulation
u6		1.00	1.00	1.00
Hsa-mir-21-5p		2.55	-2.59	-1.09
Hsa-mir-9-5p		3.78	-4.31	-2.08
Hsa--mir-200a-5p		1.07	-1.05	-1.41

mir-9-5p ekspresyonu Hif1α siRNA uygulanan grupta azalış gösterirken (-4.31x), CD133- hücre grubunda yükselme ile seyretmiştir (3.78x). mir-21-5p ekspresyonunda da benzer şekilde regüle olmuş, fakat kat değişiminde 2 kata yakın olacak şekilde değişmiştir. Buna göre mir-21-5p ekspresyonu için Hif1α siRNA uygulanan grupta azalış (-2.59x) ve CD133- hücre grubunda yüksek (2.55x) seyretmiştir.

4.9. İmmüno Floresan Boyama

Hücre grupları ilgili protein için uygun olan antikorlar ile etiketlenmiş ve fotoğraflar 10x, 20x, 40x büyütmelemlerde çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar içerisinde en az 3 ayrı fotoğraftan en az 100 hücre analiz edilmiştir. Elde edilen veriler gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Hif1 α protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında fark olmadığı gösterilmiştir. Hif1 α susturulması ile CD133+ hücrelerinin (CD133+/Hif1 α) ekspresyonu CD133+ ile benzer seyrederken, CD133- hücrelerinden yüksektir ($p<0.001$). Ayrıca negatif siRNA uygulanan grup (CD133+/neg) ise CD133- hücre gruplarından istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0.001$) ve CD133+/neg hücre grubu daha yüksek Hif1 α protein ekspresyonu seviyesi göstermiştir.

Hif1 α siRNA sonrasında Hif1 α protein seviyesi benzer seyretilmiştir. Hif1 α proteinin lokalizasyonu sitoplazmik bölgeden nüklear bölgeye doğru artış göstermiştir. **RNA düzeyinde anlık durum tespitinde Hif1 α transkripsiyonu düşük iken, protein seviyesinin yükselme trendine geçişi gözlenmiştir.**

KLF4 protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: Deney grupları benzer KLF4 protein ekspresyonu göstermiştir. Hif1 α siRNA sonrasında KLF4 protein seviyesi benzer seyretilmiştir. **RNA düzeyinde anlık durum tespitinde KLF4 transkripsiyonu düşük belirlenmiştir; bu durum ilk 24 saatte Hif1 α susturulmasının KLF4 proteini bazında protein seviyesinde değişime henüz neden olmadığını göstermiştir.**

SHH protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: Hücre gruplarının karşılaştırılması sonrası CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında fark belirlenmiştir ($p<0.01$) ve CD133+ SHH proteini daha yüksek seyretilmiştir.

CD133+/Hif1 α - hücre grubu ise CD133- hücre grubu ile benzer SHH protein seviyesindedir.

Hif1 α siRNA sonrasında Shh protein seviyesi benzer seyretmiştir. **RNA düzeyinde anlık durum tespitinde SHH transkripsiyonu ise Hif1 α susturulması ile düşmüştür; bu durum ilk 24 saatte Hif1 α susturulmasının SHH proteini bazında protein seviyesinde değişeme henüz neden olmadığını göstermiştir. CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında olan farkın susturma sonrası yani CD133+/Hif1 α - ve CD133- arasında fark olmaması köklülüğün susturulma ile azaldığını göstermiş, ayrıca SHH yolağında ileri soluklu bir araştırma yapılabilirliğini öne çıkarmıştır.**

Gli1 protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: CD133+ ve CD133+/Hif1 α - hücre grupları arasında fark olmadığı gösterilmiştir. CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında fark belirlenmiştir ($p<0.05$) ve CD133+ hücre grubunda Gli1 proteini daha yüksek seyretmiştir. Negatif siRNA uygulanan grup (CD133+/neg) ise diğer tüm hücre gruplardan istatistiksel olarak farklıdır ($p<0.001$).

Hif1 α siRNA sonrasında Gli protein seviyesi benzer seyretmiştir. **RNA düzeyinde anlık durum tespitinde ise SHH ile benzer şekilde Gli1 transkripsiyonu ise Hif1 α susturulması ile düşmüştür; bu durum ilk 24 saatte Hif1 α susturulmasının GLI1 proteini bazında protein seviyesinde değişeme henüz neden olmadığını göstermiştir. CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında olan farkın susturma sonrası yani CD133+/Hif1 α - ve CD133- arasında fark olmaması SHH yolağında ileri soluklu bir araştırma yapılabilirliğini öne çıkarmıştır.**

Smo protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında fark belirlenmiştir ($p<0.01$) ve CD133- hücre grubunda Smo proteini daha yüksek seyretmiştir. Ayrıca CD133+ ve negatif siRNA uygulanan grup (CD133+/neg) arasında istatistiksel fark bulunmaktadır ($p<0.001$).

Gruplar arasında en yüksek Smo protein ekspresyonunu CD133+/neg hücre grubu göstermiştir.

Hif1 α siRNA sonrasında Smo protein seviyesi benzer seyretmiştir. **RNA düzeyinde anlık durum tespitinde ise SHH ve GLI1 ile benzer şekilde Smo transkripsiyonu ise Hif1 α susturulması ile düşmüştür; bu durum ilk 24 saatte Hif1 α susturulmasının GLI1 proteini bazında protein seviyesinde değişime henüz neden olmadığını göstermiştir. CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında olan farkın susturma sonrası yani CD133+/Hif1 α - ve CD133- arasında fark olmaması SHH yolağında ileri soluklu bir araştırma yapılabilirliğini öne çıkarmıştır.**

VEGF protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında fark yoktur. Hif1 α susturulması ile CD133+ hücrelerinin (CD133+/Hif1 α) VEGF protein ekspresyonu yükselmiştir ve istatistiksel olarak CD133+ ($p<0.001$) ve CD133- ($p<0.05$) hücre gruplarından istatistiksel olarak farklıdır. CD133+/Hif1 α - hücre grubu ayrıca CD133+/neg hücre grubundan farklı düzeyde ekspresyon göstermiştir. Hücre grupları içerisinde en yüksek VEGF protein ekspresyonunu CD133+/Hif1 α - hücre grubu göstermiştir.

Hif1 α siRNA sonrasında VEGF protein seviyesi artış göstermiştir. **RNA düzeyinde anlık durum tespitinde ise VEGF ve ilişkili genlerin ekspresyonunda ilk 24 saat susturmada düşüş gerçekleşmiştir. Protein bazında artışın nedeni hücre içerisindeki sinyalizasyonlar ve susturmanın oluşturduğu stres ile gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.**

Mif protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: CD133- hücre grubunda CD133+ hücre grubuna göre Mif proteini daha yüksek seyretmiştir ($p<0.01$). Hif1 α susturulması ile CD133+ hücrelerinin (CD133+/ Hif1 α -) Mif protein ekspresyonu CD133+ ($p<0.001$) ve CD133- ($p<0.01$) hücre gruplarına göre yüksektir. Ayrıca CD133+/ Hif1 α - hücre grubu ile CD133+/neg hücre grubu

arasında istatistiksel fark bulunmaktadır ($p<0.001$) ve CD133+/Hif1 α - hücre grubu daha yüksek Mif protein ekspresyonu bulundurmaktadır.

Hif1 α siRNA sonrasında Mif protein seviyesinde artış belirlenmiştir. **İmmün kontrol noktasından kaçış için melanoma hücrelerinin yüksek olarak eksprese ettiği düşünülen Mif proteini susturulma ile daha da yükselmiş olup, immünoloji ve kanser ile ilgili Mif proteininin Hif1 α ile ilişkilendirilebileceğini ve korelasyonunun yapılabileceğini ileri sürmektedir.**

MMP9 protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: CD133+ ve CD133+/Hif1 α - hücre grubu arasında fark belirlenmiştir ($p<0.05$) ve CD133+ hücre grubunda MMP9 proteini daha düşük seyretmiştir. Gruplar arasında bunun dışında başka bir istatistiksel fark belirlenmemiştir.

Hif1 α siRNA sonrasında MMP9 protein seviyesinde artış belirlenmiştir. **RNA düzeyinde anlık durum tespitinde ise MMP9 ve ilişkili genlerin ekspresyonunda ilk 24 saat susturmada düşüş gerçekleşmiştir. Protein bazında artışın nedeni hücre içerisindeki sinyalizasyonlar ve susturmanın oluşturduğu stres ile gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.**

P300 protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında fark belirlenmiştir ($p<0.05$) ve CD133- hücre grubunda P300 proteini daha yüksek seyretmiştir. Hif1 α susturulması ile CD133+ hücrelerinin (CD133+/ Hif1 α) P300 protein ekspresyonu yükselmiştir ve istatistiksel olarak CD133+ ve CD133- hücre gruplarından istatistiksel olarak farklıdır ($p<0.001$).

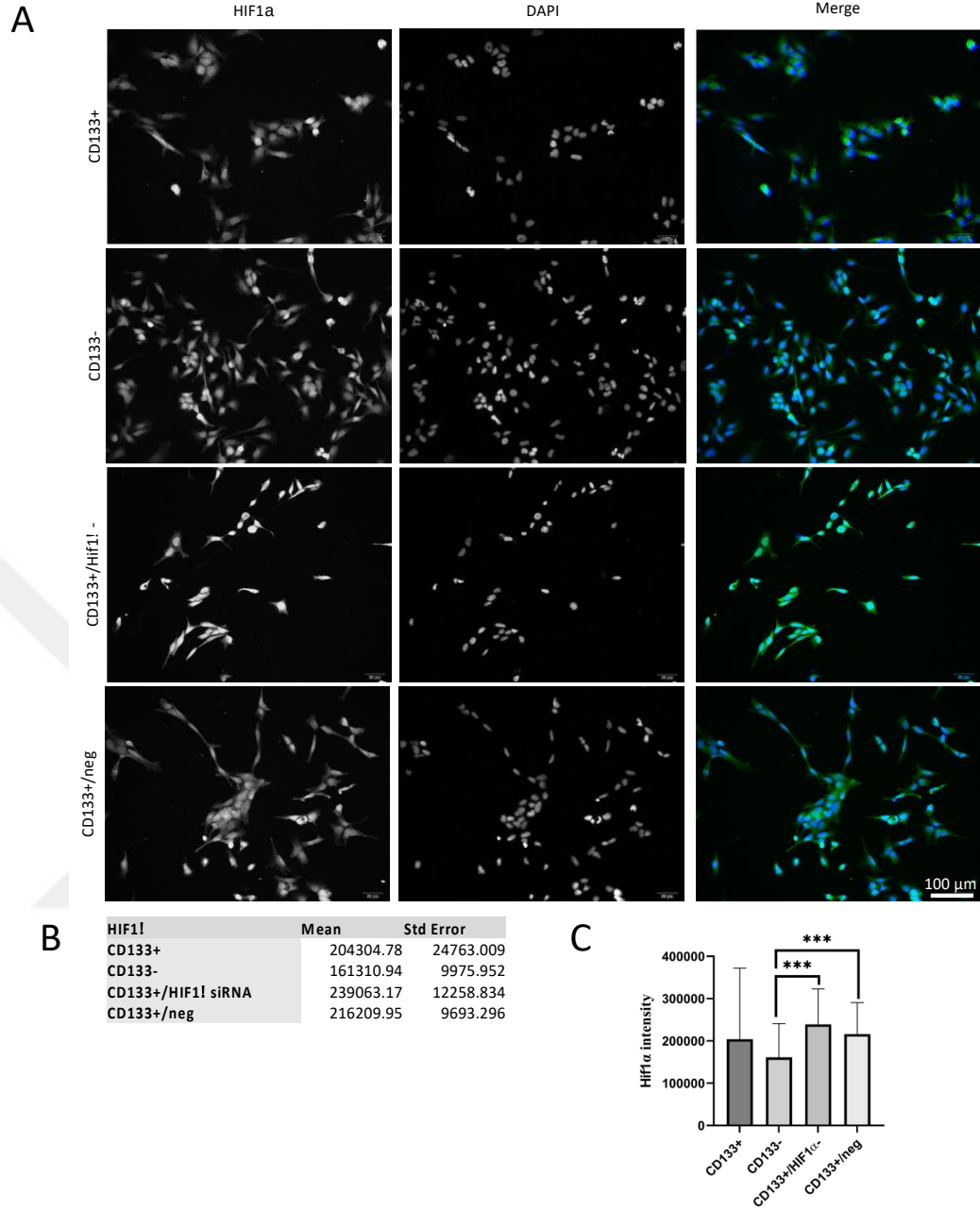
Hif1 α siRNA sonrasında P300 protein seviyesi artış göstermiştir. **RNA düzeyinde anlık durum tespitinde ise EP300 gen ekspresyonunda ilk 24 saat susturmada düşüş gerçekleşmiştir. Protein bazında artışın nedeni susturmanın oluşturduğu stres ile gen ekspresyonlarının hızlı bir şekilde düzenleme çabası olarak düşünülebilir.**

HDAC9 protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında fark belirlenmiştir ($p<0.001$) ve CD133+ hücre grubunda HDAC9 proteini daha yüksek seyretmiştir. Hif1 α susturulması ile CD133+ hücrelerinin (CD133+/Hif1 α -) HDAC9 protein ekspresyonu CD133+ ile benzer iken CD133- ile istatistiksel olarak farklıdır ($p<0.01$). Ayrıca CD133+/neg hücre grubu CD133- hücre grubu ile istatistiksel olarak farklı düzeyde ekspresyon göstermiştir ($p<0.001$), fakat CD133+ ekspresyon düzeyi benzerdir.

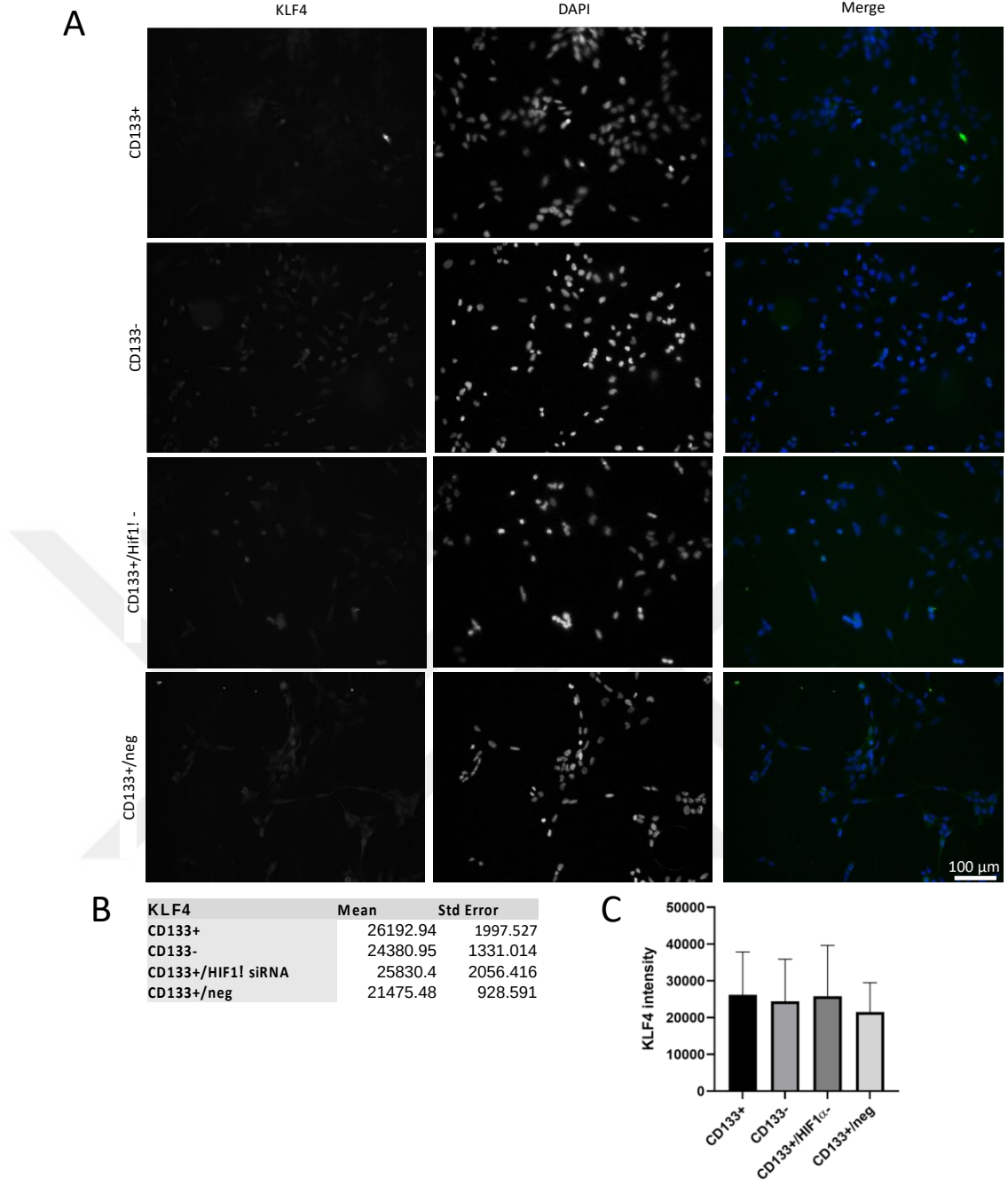
Hif1 α siRNA sonrasında HDAC9 protein seviyesi benzer seyretmiştir. **Susturma sonrasında hem RNA hem protein bazında HDAC9 ekspresyonu CD133- ile benzer eğilimde olmuş, CD133+ ve CD133- ile ara bir form yaratmıştır.**

F-actin protein ekspresyonunun deney gruplarında karşılaştırılması: CD133- ile CD133+/Hif1 α - hücre grubu arasında fark belirlenmemiştir. Diğer ikili karşılaştırmaların hepsi istatistiksel olarak farklıdır. CD133+ hücre grubu CD133- ($p<0.001$), CD133+/Hif1 α ($p<0.05$) ve CD133+/neg ($p<0.01$) hücre gruplarından yüksek F-actin protein ekspresyonuna sahiptir. CD133+/neg hücre grubu ise CD133- ($p<0.01$) ve CD133+/Hif1 α ($p<0.001$) hücre grubuna göre daha yüksek F-actin proteini göstermiştir.

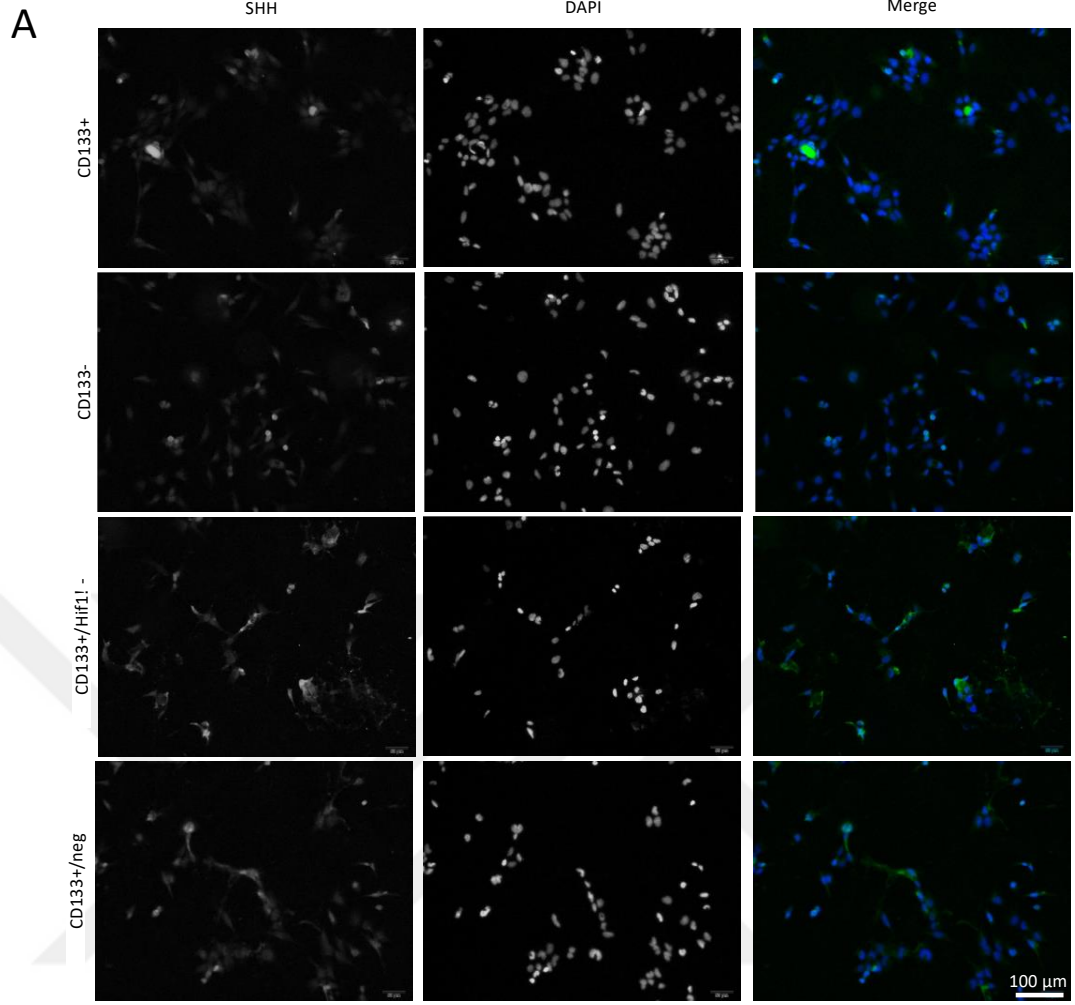
Hif1 α siRNA sonrasında aktin seviyesinde düşüş gerçekleşmiştir. **Susturma işlemi sonrasında hücre içerisindeki aktin seviyesi istatistiksel olarak azalmış, aktin fiber yapıları çözünmüştür. RNA seviyesinde ise PFN1 gruplar arasında benzer seviyede iken; PFN2 ekspresyonu azalmıştır.**



Şekil 27: HIF1 α protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.

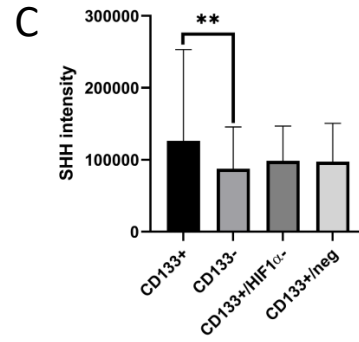


Şekil 28: KLF4 protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.

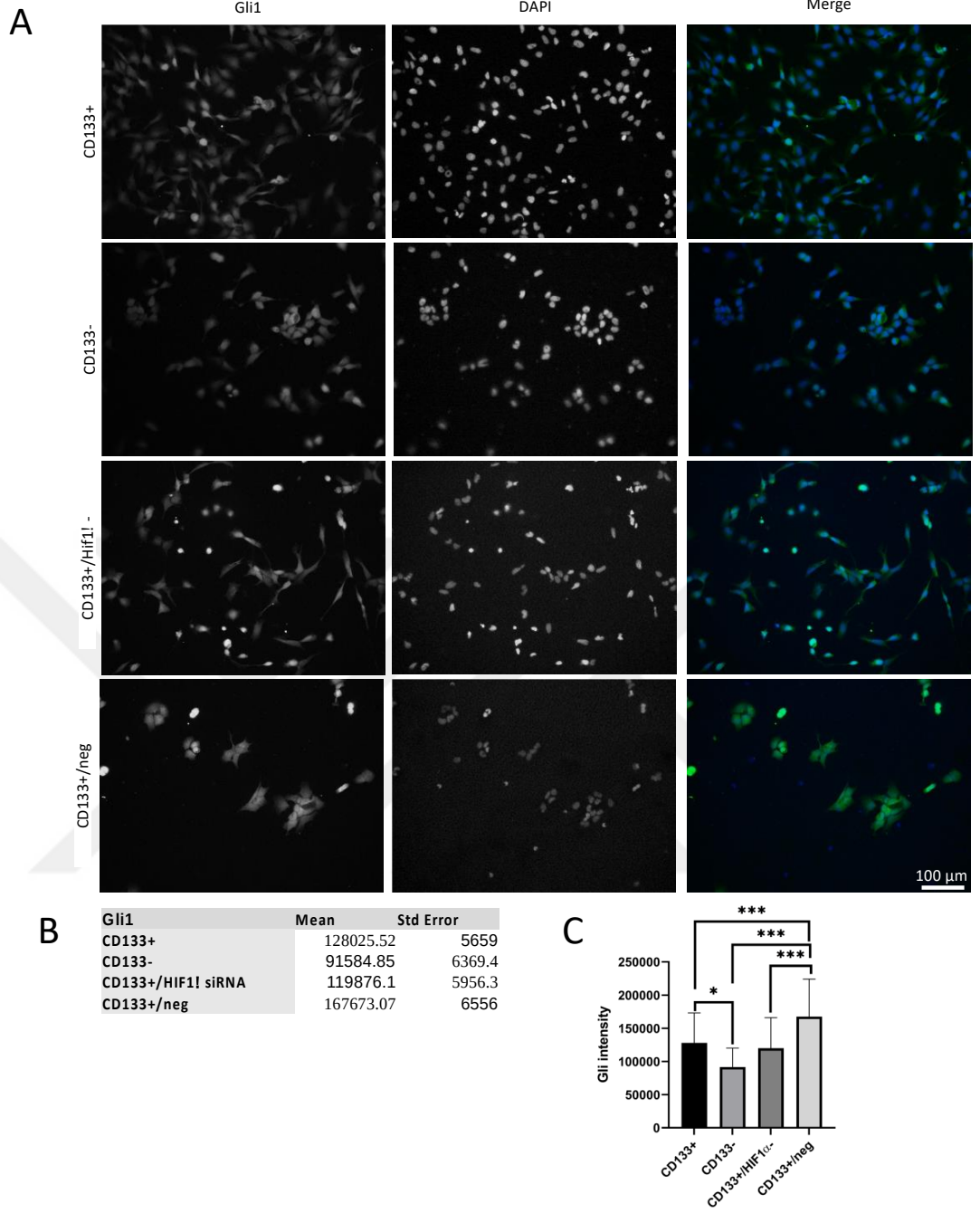


B

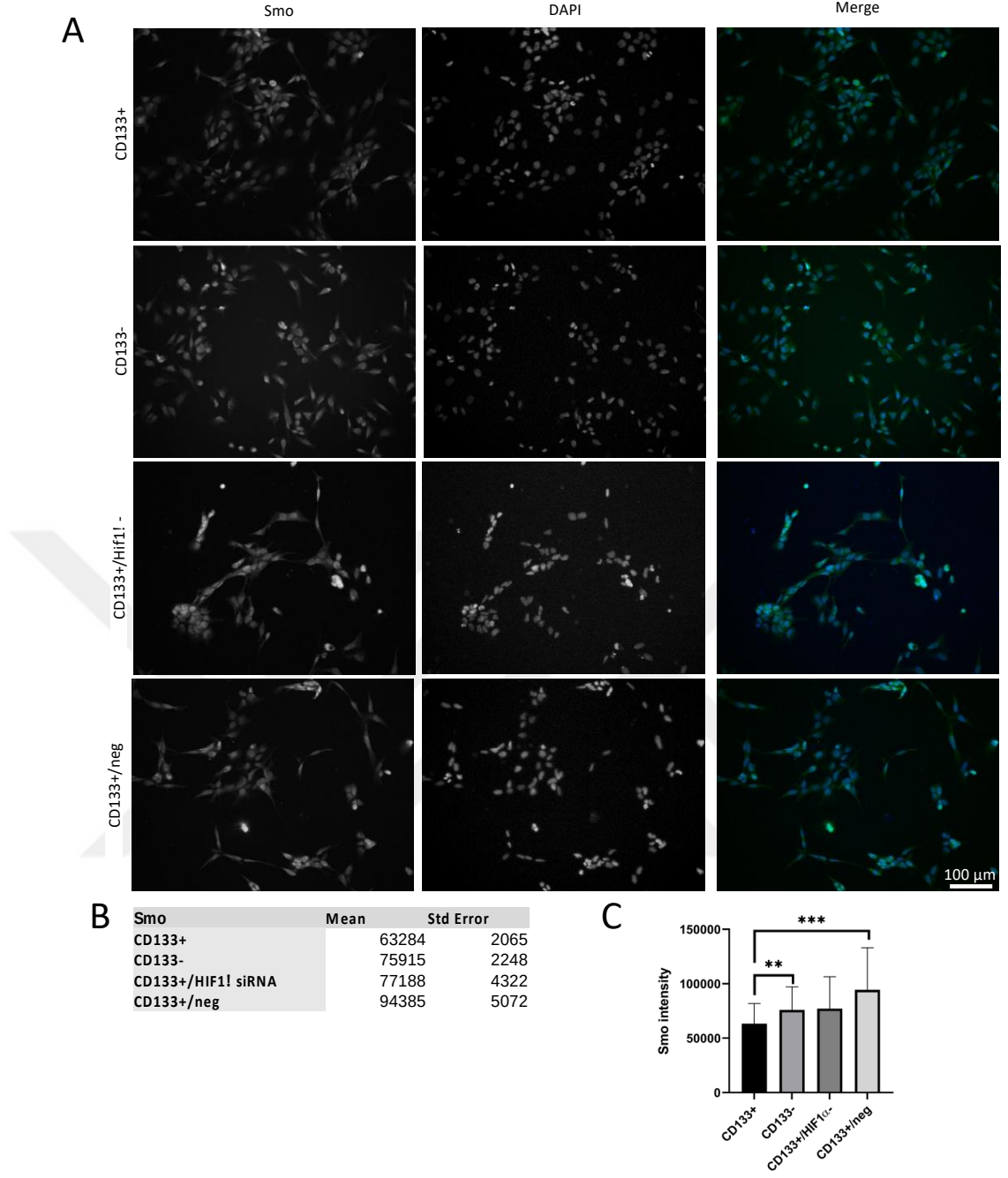
SHH	Mean	Std Error
CD133+	126438.6	14160
CD133-	87366.56	5272
CD133+/HIF1 ^{si} siRNA	98566.21	5031
CD133+/neg	97269.87	4600



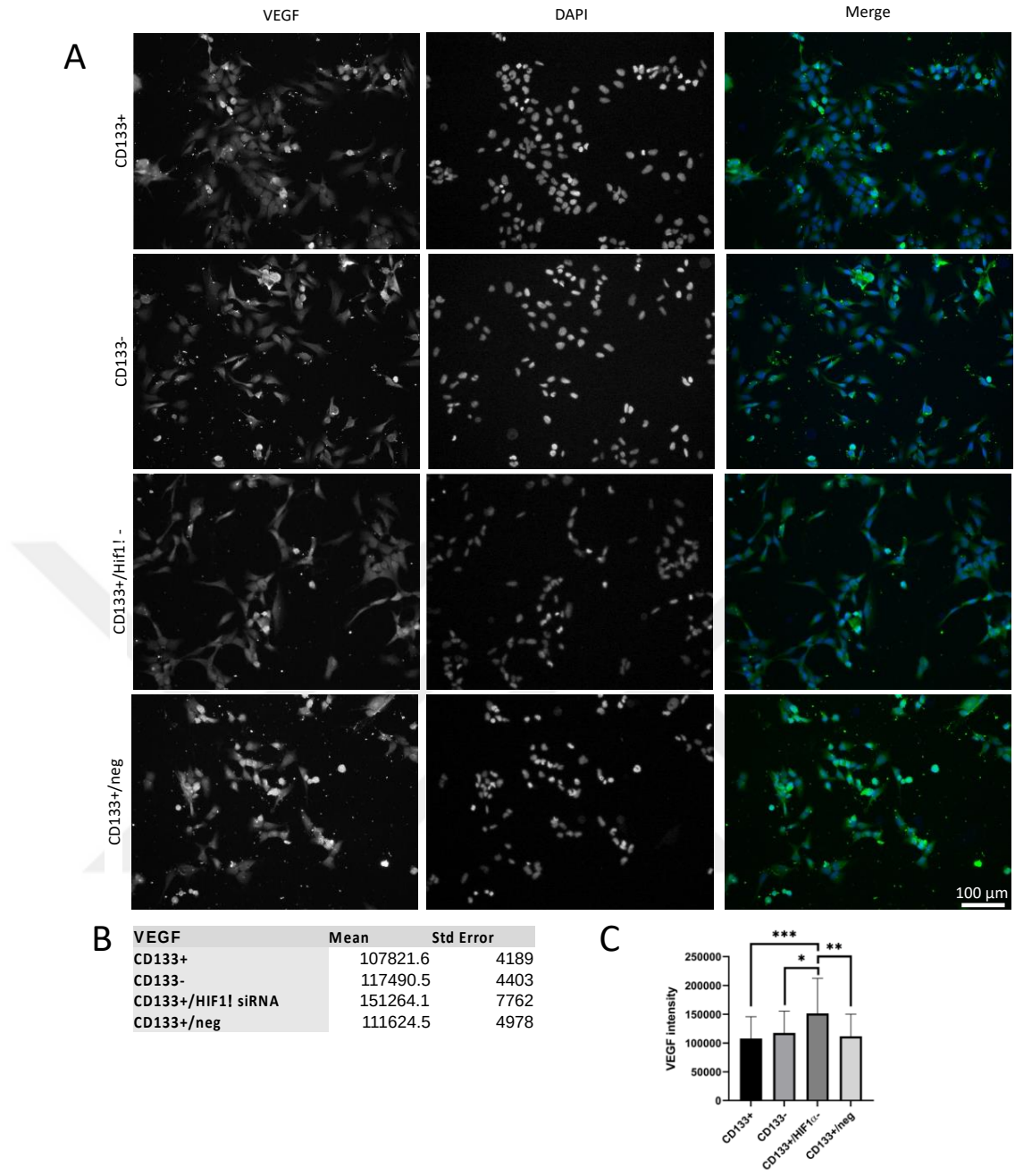
Şekil 29: SHH protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.



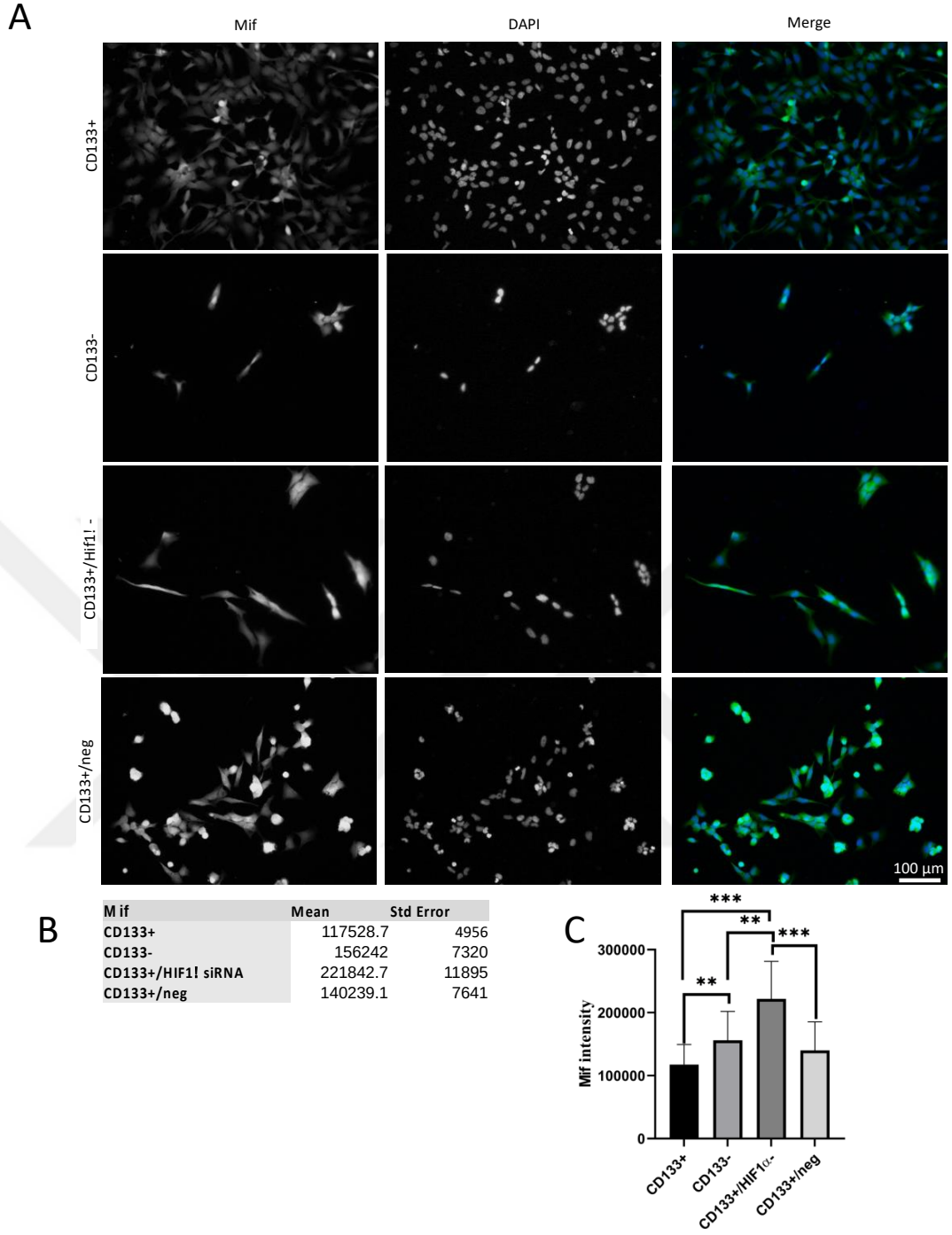
Şekil 30: Gli1 protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.



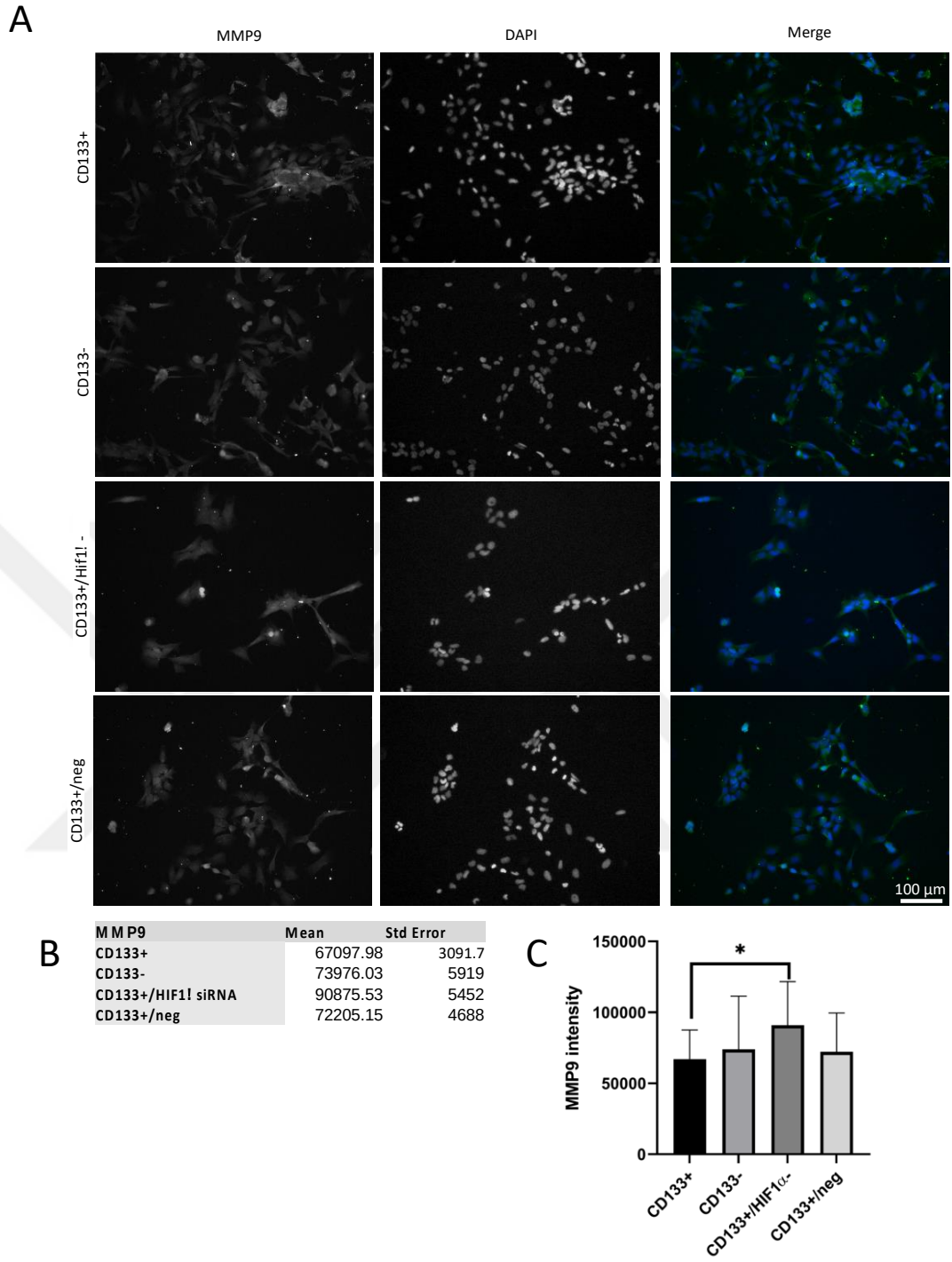
Şekil 31: Smo protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.



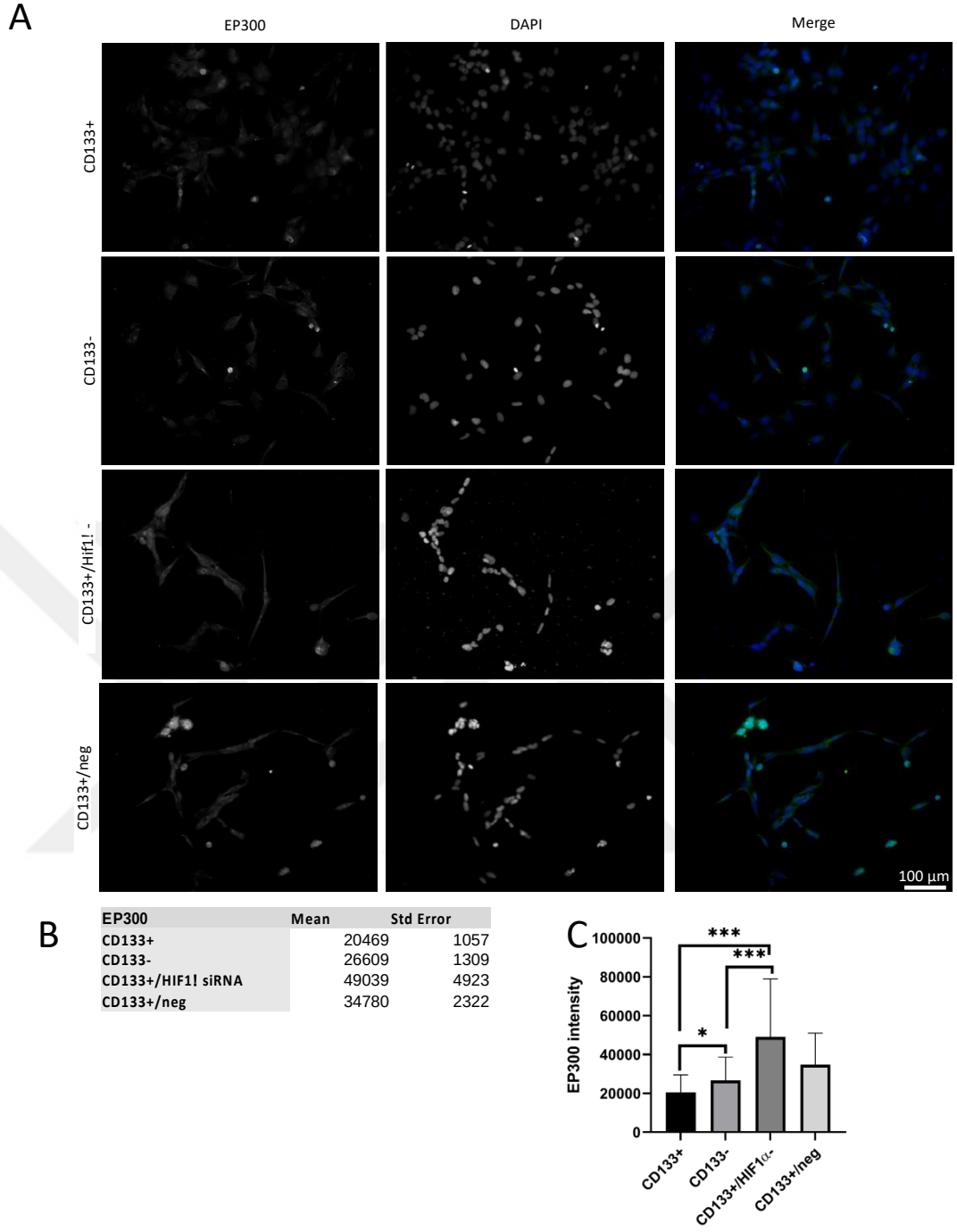
Şekil 32: VEGF protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.



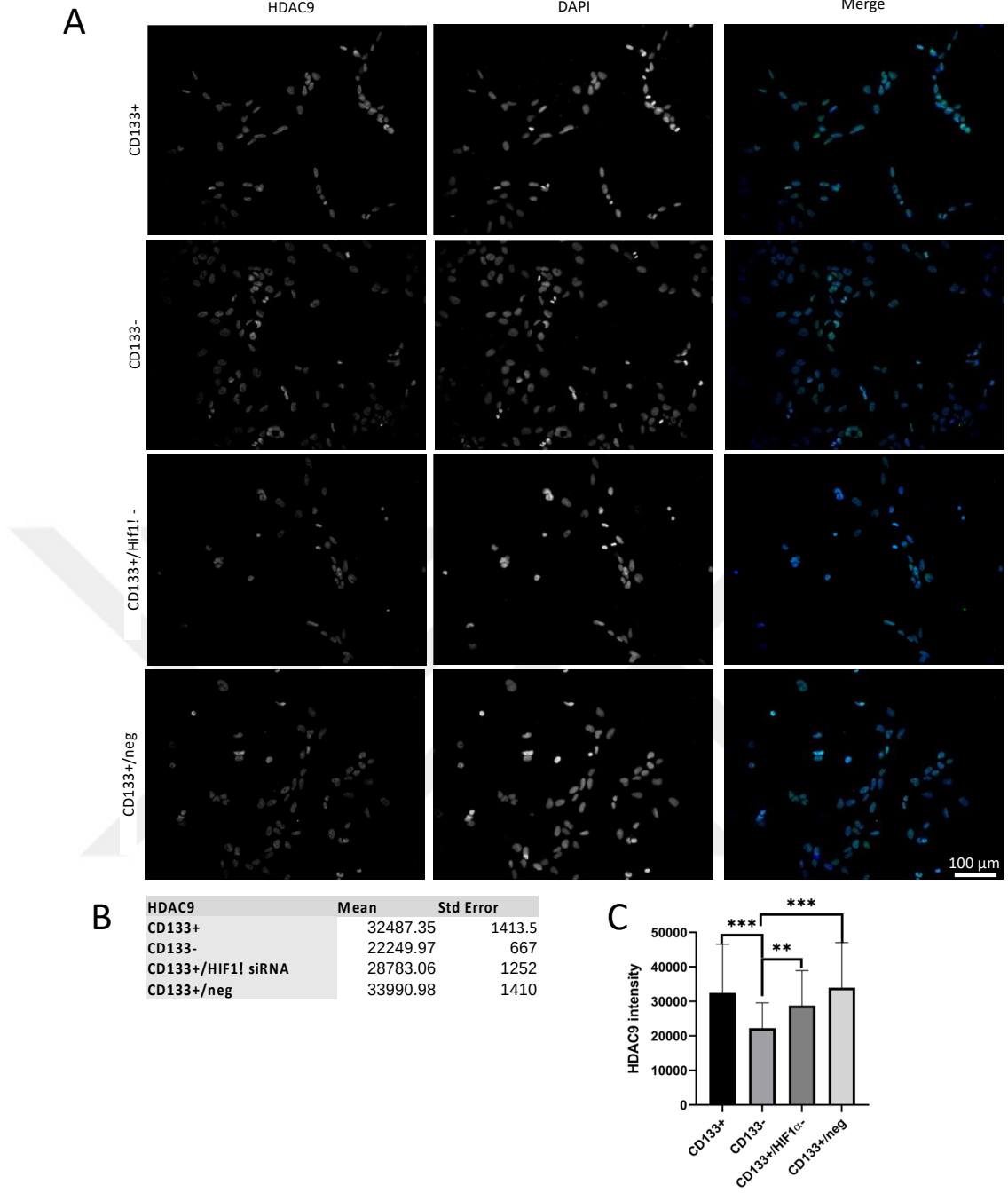
Şekil 33: Mif protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.



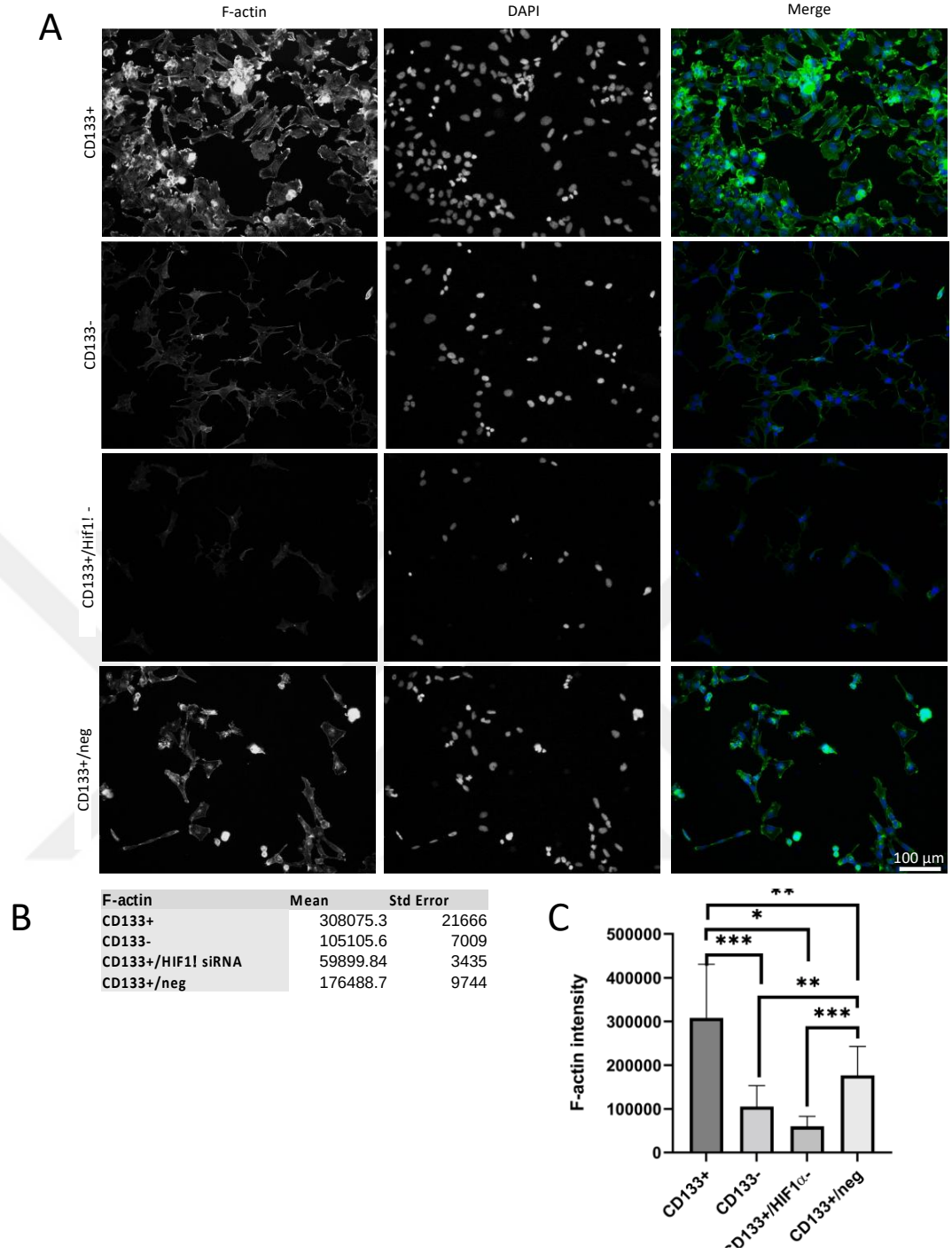
Şekil 34: MMP9 protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.



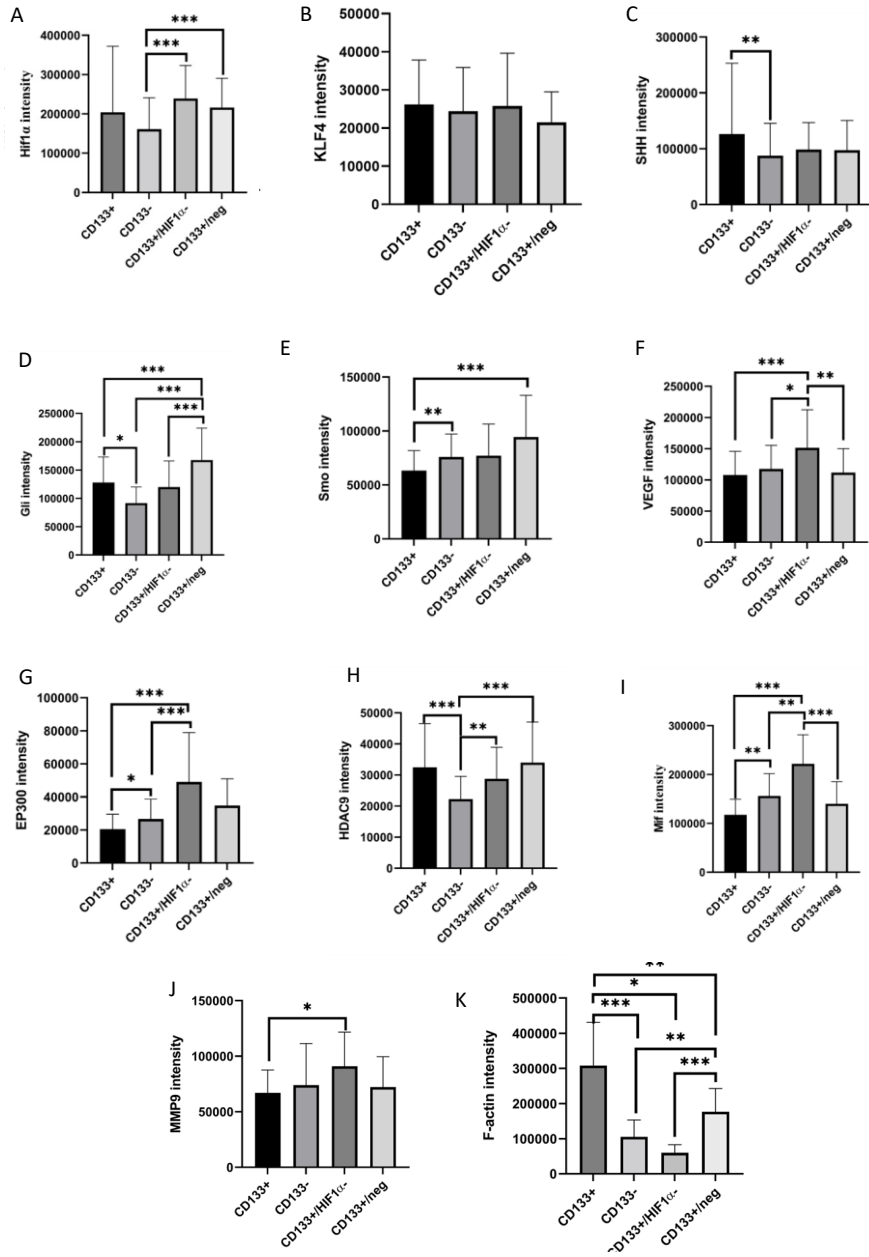
Şekil 35: EP300 protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.



Şekil 36: HDAC9 protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.



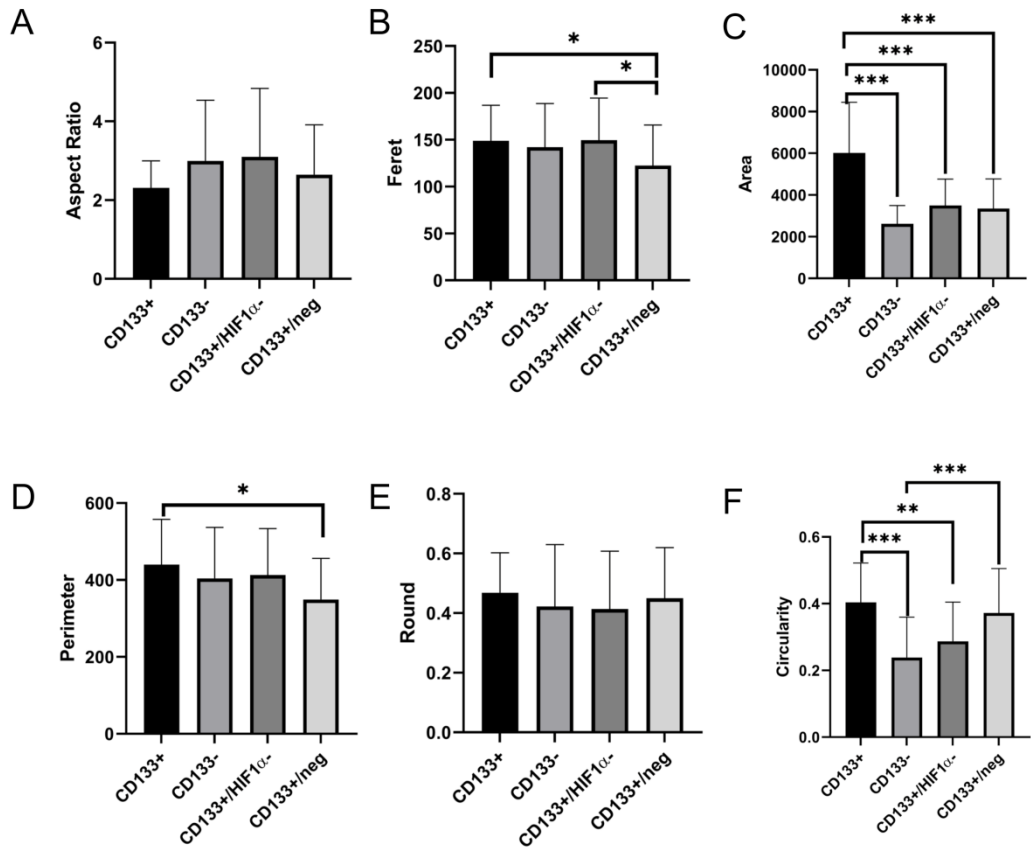
Şekil 37: F-actin protein ekspresyonunun deney gruplarındaki örnek immüno Floresan fotoğrafları ve ışıma değerleri.



Şekil 38: Belirlenen proteinlerin hücre grupları arasındaki istatistiksel değerlendirilmesi. A) Hif1 α B) KLF4 C) SHH D) Gli E) Smo F) VEGF G) P300 H) HDAC9 I) Mif J) MMP9 K) F-aktin

4.10. Morfolojik değerlendirme

F-actin boyaması ile elde edilen hücre iskeleti değerlendirmeleri morfolojik değerlendirmelerle ilerletilmiştir. F-actin hücre iskelet elemanlarından birini temsil etmektedir ve hücrenin alan, çevre vb. değerlendirmeleri çalışmada gerçekleştirilmiştir. Buna göre hücre gruplarının aspect ratio, feret, area, perimeter, round, circularity değerleri karşılaştırılmıştır (Şekil 39).



Şekil 39: Hücre grupları arasındaki morfolojik değerlerin istatistiksel değerlendirilmesi. A) Aspect Ratio (major/minör) değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması. B) Feret değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması. C) Alan (area) değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması. D) Perimeter (Çevre) değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması. E) Round değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması. F) Circularity değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılması.

Aspect Ratio (major/minör) değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılmasında hücre grupları arasında istatistiksel fark bulunmamıştır, buna karşılık ortalama değerlerde en yüksek CD133+/HIF1α grubu göstermiştir. Hif1α siRNA sonrasında major/minor eksen verisi benzer seyretmiştir.

Feret değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılmasında CD133+/neg hücre grubu ile CD133+ ($p<0.05$) ve CD133+/HIF1 α ($p<0.05$) hücre grupları arasında istatistiksel fark bulunmuştur. Ortalama değer karşılaştırılmasında en düşük değer CD133+/neg grubuna aittir. Hif1 α siRNA sonrasında feret (max uzaklık) verisi benzer seyretmiştir.

Alan (area) değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılmasında CD133+ hücre grubu istatistiksel olarak diğer gruplardan farklıdır ($p<0.001$). Alan bazlı en yüksek değer CD133+ hücre grubuna aittir. Hif1 α siRNA sonrasında alan verisi azalış göstermiştir.

Perimeter (Çevre) değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılmasında gruplar arasında ortalama değeri en yüksek olan CD133+ hücre grubu iken; sadece CD133+ ve CD133+/neg hücre grupları arasında istatistiksel fark bulunmaktadır ($p<0.05$). Hif1 α siRNA sonrasında çevre sayısal verisi benzer seyretmiştir.

Round değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılmasında hücre grupları arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Hif1 α siRNA sonrasında hücre yuvarlaklık verisi benzer seyretmiştir.

Circularity değerlerinin deney gruplarında karşılaştırılmasında CD133+ hücre grubu istatistiksel olarak diğer gruplardan farklıdır. Circularity bazlı en yüksek değer CD133+ hücre grubuna aittir. CD133+ hücreleri, CD133- ($p<0.001$), CD133+/Hif1 α - ($p<0.01$) ve CD133+/neg ($p<0.001$) hücre gruplarına göre daha yüksek circularity değerine sahip olduğu görülmüştür. Hif1 α siRNA sonrasında hücre dairesellik (circularity) verisi azalış göstermiştir. Hücre protrüzyonlarının azaldığı söylenebilir.

Tartışma

Melanoma, çoklu ilaç direnci düşük sağkalım oranı nedeniyle terapötik yaklaşımlar için çok az olasılığa sahip en agresif cilt kanseri formlarından biridir. Melanoma insidansı son 50 yılda artmakta ve her yıl dünya çapında 160.000'den fazla yeni vakaya ulaşmaktadır (J. E. Kim vd., 2019; Usher-Smith, Emery, Kassianos, & Walter, 2014). Bu kanser türü cilt, saç ve göz renginden sorumlu olan melanin pigmentinin üretiminden sorumlu hücreler olan melanositlerden gelişir. Melanoma tedavisine yönelik geleneksel tedaviler, çeşitli yan etkileri olan radyoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapiyi içerir. Bu nedenle, son yıllarda farmasötik ve biyomedikal araştırmalar, hücre spesifik yeni alternatif tedavi stratejilerine odaklanmıştır (Cassano, Cuconato, Calviello, Serini, & Trombino, 2021). Erken evre melanomaların tedavisi genellikle melanomu çıkarmak için ameliyat ile tedavi edilir. Çok ince bir melanom biyopsi sırasında tamamen çıkarılabilir ve daha fazla tedavi gerektirmez. Aksi takdirde, cerrahınız kanserin yanı sıra normal derinin bir kenarını ve derinin altındaki bir doku tabakasını da çıkaracaktır.

Intratümöral heterojenite, geleneksel kemoterapi, radyasyon tedavisi ve moleküler hedefli tedavi dahil olmak üzere antikanser tedavi yöntemlerinin başarısızlığı ile sıkı bir şekilde ilişkilidir. Kanser kök hücrelerinin bir tümör hücresi hiyerarşisinin tepesinde var olduğu; gelişmiş tümörjenik ve metastatik potansiyel, kendi kendini yenileme kapasitesi ve terapötik direnç gösteren farklılaşmamış tümör hücreleri olduğu öne sürülmektedir (Yoshida & Saya, 2021).

Kanser kök hücrelerinin biyolojik özelliklerinin moleküler temellerinin açıklanması, yeni anti kanser tedavilerinin geliştirilmesinin anahtarıdır. Bu nedenle kanser kök hücresi temelli çalışmalar kanser çalışmalarında hızla artış göstermiştir. Kanser kök hücresi özelinde birçok belirteç ortaya konmuştur. ALDH, CD44, CD133, CD24, Oct4 ve Nanog gibi birçok molekülün kanser kök hücreleri ilişkili olduğu bildirilmiş ve bu moleküllerin yüksek düzeyinin kanser tedavisinde kemoterapi ve radyoterapiye direnç ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Qin vd., 2017; Soltanian & Matin, 2011; Szotek vd., 2006; Vermeulen, Sprick, Kemper, Stassi, & Medema, 2008). Bir çalışmada ALDH yüksek/düşük melanoma hücreleri karşılaştırılarak morfolojik değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir (Stecca, Santini, Pandolfi, & Penachioni,

2013). Malign melanoma da dahil olmak üzere farklı melanoma türlerinde kanser kök hücresi CD133+ ile tanımlanmıştır (Al Dhaybi, Sartelet, Powell, & Kokta, 2010; El-Khattouti vd., 2015; Gedye vd., 2009; Jamal vd., 2020; Kloskowski vd., 2020; Shidal, Singh, Nagarkatti, & Nagarkatti, 2019).

Bu tez dahilinde CD133 belirteci kanser kök hücrelerini temsil edecek şekilde düşünülmüştür. Gen ekspresyon aşamasında hem CD133 hem de NANOG gen ekspresyonu araştırılmış, CD133+ ve CD133- hücre gruplarında NANOG gen ekspresyon seviyelerinde fark görülmemiştir (Şekil 24). CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında ise CD133 gen ekspresyonu seviyesinde 23 kat fark bulunmuştur. Bu durum akış sitometrisi ile elde edilen hücrelerin matrijel üzerinde de CD133 etiketi üzerinden kök hücre özelliğini devam ettirdiğini göstermektedir. Ayrıca, ek olarak siRNA uygulanan gruplar karşılaştırıldığında köklülük özelliğinin azaldığı belirlenmiştir. Buna göre her üç siRNA uygulaması ile CD133 gen ekspresyonu azalış göstermiştir. Bu sonuç kanser kök hücre karakterinin belirli sinyal yolları ile azaltılabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada, farklı gen panellerine bakılması ile hücrelerin hangi sinyal yolları ile kök hücre karakterini değiştirerek kök hücre olmayan kanser hücrelerine diferansiye edip edemeyeceği belirlenmeye çalışılmıştır.

Bir pentaspan transmembran glikoproteini olan CD133 (takma adı prominin-1/AC133), normal doku hücrelerinde de görülen kök hücreler ve kanser kök hücreleri için bir belirteçdir (Grosse-Gehling vd., 2013; W.-T. Kim & Ryu, 2017). Normal kök hücrelerde, CD133 esas olarak hücre proliferasyonu ile ilişkilidir (H. Wang vd., 2020). Kanser kök hücrelerinde ise kanser hücresi proliferasyonu, karsinogenez, metastaz, nüks ve kemoterapi direnciyle ilgilidir (Jang, Song, Kim, Kim, & Seo, 2017; F. Liu & Qian, 2021; S. Zhang vd., 2022). CD133 pozitifliği, kötü prognoz ve genel sağkalımda azalma ile korelasyon göstermiştir. Ayrıca, hasta tümörlerinden izole edilen CD133+ hücrelerin nude fare ksenograftlarında tümör oluşumu gerçekleştirdiği, fakat CD133- hücrelerin oluşturmadığını göstermişlerdir (Sharma vd., 2012). Başka bir çalışma ise CD133+ melanoma hücrelerinin klinikte kullanılan multikinaz inhibitörlerine direnç sağladığını ve melanomanın sağkalım ve tekrarlamasına kaynak oluşturan bir alt popülasyon olduğu raporlanmıştır (Simbulan-Rosenthal vd., 2019). Çalışmamızda CD133 etiketi kullanarak elde edilen hücreler siRNA uygulamasında kullanılmıştır. Akış sitometresi ile elde edilen hücreler, RT-

PCR ile hem kültür sürecinde hem de deney aşamasında matrijel yüzey üzerinde kontrol edilmiş ve CD133+ ve CD133- hücreler kontrollü şekilde süreç ilerlemiştir.

Kanser kök hücrelerinin karakterini farklılaştırırken, onların *in vivo*daki çevresini taklit etmek için pek çok hücrelerarası madde ya da bu maddelerin birleşimi kullanılmaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada, laminin, fibronektin, vitronektin vb. hücrelerarası maddeler ayrı ayrı kültür ortamında denenmiş ve bu kültür yüzeylerinin yanı sıra bir proteaz inhibitörünün etkinliğine bakılmıştır (Bonturi vd., 2022). CHL-1 hücre hattının da içinde bulunduğu çeşitli melanoma çalışmalarında matrijel hem kültür yüzeyinde taklitleme çalışmalarında hem de invazyon araştırmalarında hücrelerin invazyon kapasitelerinin farklı etkiler. Bu bulguların diferansiyasyon kapasitesinin araştırılması için kullanıldığı bilinmektedir (Bonturi vd., 2022; Tan vd., 2016; Wardwell-Ozgo vd., 2014). Başka bir çalışma ise geliştirilen DN gel ismini verdikleri bir hidrojel uygulaması ile kanser hücrelerinin kanser kök hücrelerine dönüşümünü gerçekleştirdiklerini göstermişlerdir (Suzuka vd., 2021). Bu çalışmadaki özgün değerimiz, hücreler arası madde olarak kullanılan matrijel iletişimde CHL-1 hücre hattından elde edilen kanser kök hücre ve kök hücre olmayan kanser hücrelerinin de içinde olduğu hücre gruplarında kanser kök hücrelerinin Hif1 α genlerinin susturulması ile kanser ilişkili panellerin değişiminin araştırılmasıdır.

Hücresel süreçlerde çoğu fizyolojik işlev oksijen konsantrasyonuna göre düzenlenmektedir. Düşük oksijen seviyesinin olduğu ortamda yani hipoksi durumunda Hif1 α tarafından transkripsiyonu regüle edilir (Qin vd., 2017; Semenza, 2010). Hipoksi durumuna göre gerçekleşen bu geri besleme mekanizmaları, kanser hücrelerinde somatik mutasyon ya da farklı epigenetik faktörlerin devreye girmesi ile sağlıklı hücrelere göre değişkenlik gösterir. Kanser ilerlemesinde bu hipoksiye karşı adaptasyon süreci önemlidir (Harris, 2002; Qin vd., 2017). Tümör hipoksisi, anjiyogenezi aktive edebilir, böylece invazyon ve metastaz riskini artırabilir. Bu durum ise tümörün içerisindeki hücre sağkalımını artırır, ayrıca anti-tümör bağışıklığını bastırır ve terapötik yanıtı engeller. Bu projede hipoksi mekanizmasının Hif1 α ile baskılanması, böylece kanser kök hücrelerinin köklülük özelliğinin değişiminin izlenmesi amaçlanmıştır.

Hücre membranının elemental bileşiminin incelenmesi, bakteri/maya gibi düşük sınıf türlerle sınırlıdır (Apte vd., 2013; Salvadori, Ando, Nascimento, & Corrêa, 2017; Shen vd., 2019; L. Wang vd., 2015). Öte yandan, ökaryotik organizmalarda kemik/diş gibi kalsifiye dokularında nadir çalışmalar vardır (Mishima & Kozawa, 1998; Vermeij vd., 2012; VincenzoAU vd., 2022; Zamudio-Ortega vd., 2014). Önceki çalışmada, fare embriyonik, somatik ve kanser hücrelerini karşılaştırılmıştır (Berrin Ozdil vd., 2021). 2023 yılında yayınlanan çalışmaya göre ise normal tiroid hücre hattı ile farklı tirodi kanser hücre ahtları SEM-EDS ile karşılaştırılmış, ve sonuçlara göre merkezi bölgede daha yüksek karbon yüzdesi saptanırken, peripheral bölgeye doğru karbon miktarında azalış gözlenmiştir. Ters orantılı olarak oksijen miktarı peripheral bölgede merkezi bölgeden fazla belirlenmiştir. Ayrıca, kontrol grubu olaak kullanılan noral tiroid hücre hattında karbon miktarı kanser hücrelerine göre merkezi bölgede daha düşüktür (Ozisik vd., 2023). Bu çalışmada, hücre hatlarının ultra struktür yapıları SEM kullanılarak raporlanmıştır. Hücrelerinin yapısı SEM altında görüntülenmiş ve hücre içindeki lokalizasyonlarına göre kategorize edilmiştir. Hücre membranında en bol bulunan elementler C, O ve N olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, bu hücre gruplarında Na ve K elementleri belirlenmiştir. SEM/EDS'deki elektron ışını penetrasyon derinliğinin, 2 kV'un üzerindeki çok çeşitli nanomalzemeler için 10-100 nm aralığında olduğu bildirilmektedir. Penetrasyon derinliği nedeniyle, element oranları merkezi ve çevresel bölgelerde farklı olabilir.

Matrijelin yapılan XPS ölçümlerinde içinde bulunan iki ana bileşen olan laminin ve kolajen nedeniyle N tepeleri belirgin çıkmaktadır (Ramadan vd., 2007). Çalışmamızda yaptığımız SEM-EDS analizine göre ise matrijel içeriğinde %0.01 kadar azot bulunmaktadır. Sodyum seviyesi de hücre gruplarına göre oldukça yüksek tespit edilmiştir. Matrijel içeriğinde ayrıca karbon, oksijen, sodyum, sülfür ve potasyum da belirlenmiştir. Hücre gruplarında merkezi bölgeye göre periferik bölgeden daha çok sodyum sinyali alınmıştır. Bunun nedeni, hücre gruplarının matrijel üzerinde olmasından, yani matrijelden gelen sinyallerden kaynaklanabilir. Grupların merkezi ve periferik bölgeleri karşılaştırıldığında periferik bölgeye doğru hücrelerin karbon miktarında bir azalış trendi tespit edilmiştir. Yüzdesel olarak bütün hücre gruplarında karbon en yüksek seviyededir. Bu durum karbon bağımlı canlılığın felsefesini desteklemektedir. CD133- ve CD133+/neg hücre gruplarındaki bazı örnekleme bölgelerinde fosfor elementi belirlenmiştir. Bu durum o bölgelerde

bulunan P-O ya da P-C bağları gerçekleştiren aminoasit grupları ile ilişkilendirilebileceği gibi (Arribat, Cavelier, & Rémond, 2020), örneklemin içerisinde olabilecek fosfolipit hücre membranından da gelebilir.

FTIR spektroskopisi, örneklerde bulunan biyokimyasal ve biyolojik özellikleri tespit etmedeki çok yönlülüğü sayesinde önemli bir etki oluşturmuştur. Kimyasal analize dayalı sınıflandırma için güçlü bir araç olarak ortaya çıkan FTIR çalışmaları, kimyasal bileşimin moleküler seviyedeki mekansal dağılımı hakkında ayrıntılı bilgi sunabilme özelliğine sahiptir. Uygulamaları, malzeme bilimi, adli tıp, biyokimya, biyomedikal bilim ve jeokimya gibi bir dizi disiplini kapsar (Zwielly vd., 2009).

Elde ettiği verilerin karşılaştırmalı farklarının belirlenmesi sağlıklı ve patolojik durumdaki örneklerin farklarının belirlenmesi ile ayırım yapmak için kullanılabilir. Daha önceki çalışmalarda, FTIR spektroskopisi ile sağlıklı ve hastalıklı durumları ayırt etmek için kullanılmıştır (Acikgoz, Güler, Camlar, Oktem, & Aktug, 2019; Güler, Güven, AÇIKGÖZ, & Öktem, 2020; Mordechai vd., 2004). Ayrıca farklı kanser kök hücreleri ile ilgili yapılan karakterizasyon çalışmaları da FTIR spektroskopisinin kanser çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir (AÇIKGÖZ, GÜLER, & ÖKTEM, 2020; Güler, Guven, & Oktem, 2019). Bogomolny ve ark. çalışması sonuçları, malignitenin erken tespiti için basit, reaktif içermeyen bir yöntem olarak FTIR mikrospektroskopi geliştirme potansiyelini güçlü bir şekilde desteklemektedir (Bogomolny, Huleihel, Suproun, Sahu, & Mordechai, 2007). Kronik lenfositik lösemi hücre hatları üzerinden gerçekleştirilen başka bir çalışmada ilaç duyarlılığı, hücrelerin plazma membranı ve mitokondriyal membranı arasında FTIR analizi sonucu oluşturulan spektrumların karşılaştırılması yapılarak gerçekleştirilmiştir (K. Z. Liu vd., 1999). İzole membranların biyokimyasal bileşenleri lipitler, membran (hücre zarı) proteinleri, glikolipidler ve glikoproteinlerden kaynaklanan karbonhidratlardır. Bu üç bileşenin tümü, sırasıyla $2800\text{--}3050\text{ cm}^{-1}$, $1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ ve $950\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ aralığında IR spektrumunda gösterilmiştir. Bu çalışmada plazma membranlarının ve mitokondrilerin spektrumları oldukça benzer bulunmuştur (K. Z. Liu vd., 1999). Attenuated Total Reflection Fourier Transform IR (ATR-FTIR) spektrometresinin kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinin belirlenmesinde kullanılabileceği ortaya konulmuştur (Minnes vd., 2017). Kanser biyolojisindeki deneysel karakterizasyon tekniği olarak

kullanılabilmesinin yanı sıra (Acikgoz vd., 2019; Guler vd., 2018, 2019), FTIR kök hücre biyolojisi ve somatik hücreler ile kanser ve embriyonik hücrelerin farklarını gösterebilecek bir teknik olarak sunulmuştur (Guler vd., 2018).

Bu çalışma ile birlikte, malign melanoma kanser kök hücresi için analizler yapılmış ve kök hücre olmayan kanser hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, hedef genler bazında susturulma yapılmış ve spektral farklar ortaya konmuştur. Ortaya konan spektrumlara göre amide I bölgesi 1710-1600 cm^{-1} aralığında incelenmiştir. Buna göre, siRNA uygulanan hücre grupları CD133+ ve CD133- hücre gruplarından farklı çıkmıştır, fakat CD133+/neg hücre grubuyla benzerdir. Gen ekspresyonu bazında susturulan hücrelerin karşılaştırma gruplarından farklı çıkmasının nedeni ana sinyal yollarının baskılanması ve karşılaştırma grupları ile belli bir kısımda örtüşse de yeni bir karaktere sahip olup hem hücre içine alınan siRNA nedeniyle hem de bu etkinin sinyal yollarındaki etkisi ile gerçekleşen süreçler nedeniyle farklılık göstermesi olabilir. Bu deneylerde kullanılan hücrelerin hepsi kanser hücre popülasyonudur. İlerleyen deneylerde sağlıklı hücre grupları da eklenerek bu hücre grupları ile karşılaştırmalar yapılabilir.

Hücre döngüsü, hücrelerin bölünmesi sürecidir ve hayati önem taşımaktadır. Anormal hücre döngüsü, hücrelerin anormal şekilde bölünmesine ve kanser gibi hastalıklara neden olabilir. Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak, sınırsız bölünme potansiyeline sahiptir ve bu nedenle, kanser hücreleri anormal hücre döngüsüne sahiptir. Kanser hücreleri, normal hücrelerden daha hızlı bölünür ve bu nedenle, kanser hücrelerinin bölünme hızını yavaşlatmak için hücre döngüsünü hedef alan tedaviler geliştirilmiştir.

Hücre döngüsü ile ilgili genler, hücre döngüsünün kontrol edilmesinde önemli rol oynar. Bu genler, hücre döngüsü sırasında DNA'nın kopyalanması, hücrelerin bölünmesi ve hücreler arasındaki iletişimin kontrolü gibi işlevleri yerine getirir. Hücre döngüsü ile ilgili genler arasında, hücre döngüsü sırasında DNA'nın kopyalanmasını kontrol eden genler (örneğin, PCNA, CDC6, MCM2), hücrelerin bölünmesini kontrol eden genler (örneğin, CDK1, cyclin A, cyclin B), ve hücreler arasındaki iletişimin kontrolünü sağlayan genler (örneğin, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin) bulunmaktadır. Anormal hücre döngüsüne neden olan mutasyonlar bu genlerin çalışmasını etkileyebilir ve bu nedenle, hücre döngüsü ile ilgili genler, kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde önemli hedeflerdir (Goda vd., 2003). Hücre

döngüsündeki düzenleme, tümör direncinin önemli bir belirteçtir. Özellikle damar yapısından, diğer bir değişle oksijen ve besinden uzak olan hipoksik tümör hücreleri hücre döngüsünde yavaşlamaya gider. Bu durum hücre döngüsü hedefli tedavileri de öne çıkarmaktadır. Fakat bu hücreler hücre metabolizmalarını değiştirerek ilaç direncini arttırabilir ve hücre dışını asidik bir ortama çevirir. Asidik stresin, Hif1α'nın Hif2α aktivasyonunu up-regüle edebildiği Hif-2α indüksiyonu için bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Emami Nejad vd., 2021). Yüksek seviye hipoksi, G1/S fazında replikasyonu durdurarak mitotik duraklamaya neden olur. Bazı çalışmalar bu duraklamanın Hif1α üzerinden işlediğini göstermektedir (Gardner vd., 2001; Goda vd., 2003; Jun, Rathore, Younas, Gilkes, & Polotsky, 2017; Krtolica, Krucher, & Ludlow, 1998). Hif1α'nın yükselmesi c-myc inhibisyonuna yol açar ve hücre döngüsü üzerinde etkili olan Cdk inhibitörlerinden p21 artışı meydana gelir. Fakat yapılan bazı çalışmalar ise Cdk inhibitörleri ile Hif1α düzeyini ilişkilendirememiştir (Jun vd., 2017; Mills vd., 2009). Burada tamamladığımız çalışmada ise Hif1α geninin susturulmasından sonraki 24 saat incelenmesi, hücrelerin G0/G1 fazında duraklamasına sebep olduğunu göstermiştir. CD133+ ve CD133- hücre gruplarına göre siRNA uygulanan grup S fazında azalış göstermiştir. Literatürle uyumlu olan bu sonuç Hif1α özelinde kanser kök hücrelerinin hedef alınabileceğini göstermiş ve ileriki çalışmaların özellikle tümör mikroçevresiyle de ilişkilendirilmesi ile vaskülarizasyon ve glikolitik yolların incelenmesi ve organel düzeyinde mitokondriyal süreçlerin değerlendirilmesini gerektirdiğini göstermiştir.

Gen ekspresyon analizlerinin yorumlanması için gerekli olan en önemli elemanlardan birisi housekeeping genlerdir. Housekeeping genlerin seçimi deneysel süreçlerin doğru değerlendirilmesi için kritik öneme sahiptir (de Jonge vd., 2007). Ayrıca housekeeping genlerin farklı durum değerlendirmelerinde dalgalanmalı bir ekspresyon patterni göstermesi olasıdır. Bu dalgalanmaların elimine edilmesi için çalışmada dört farklı housekeeping gen ekspresyonu (ACTB, GAPDH, B2M, YWHAZ) gruplar arasında karşılaştırılmıştır. ACTB ve GAPDH benzer ekspresyon seviyesi gösterirken B2M ve YWHAZ gen ekspresyonları gruplar arasında farklılık göstermiştir (Şekil 20). Bu nedenle gen ekspresyonunun normalizasyonu için ACTB ve GAPDH sonuçları kullanılmıştır.

Housekeeping genlerinden biri olarak seçilen B2M geni farklı çalışmalarda RT-PCR sonuçlarının normalizasyonu için kullanılmış olsa da bu çalışmada özellikle Hif1 α gen ekspresyonunun susturulmasına bağlı olarak ekspresyonu azalmıştır (Şekil 20,-45.31x). Bu durum glioblastoma çalışmasında B2M yüksek ekspresyonunun malinite, tümör progresyonu ve hasta prognozu ile ilişkili olduğu ve B2M'nin potansiyel bir immünotreapi ajanı olarak varsayılabileceğini raporlamıştır (Hao Zhang vd., 2021). Melanoma, yüksek genomik mutasyon yükü ve kansere ilişkili antijenlerin ekspresyonu nedeniyle en immünojenik kanserlerden biri olarak kabul edilmektedir, bu nedenle anti-tümör CD8+ T hücreleri tarafından tanınmayı sağlamak için güçlü bir potansiyele sahiptir ve immünoterapiye duyarlıdır (Marzagalli, Ebel, & Manuel, 2019; C. Wang, Wang, Yao, Zhou, & Wang, 2022). B2M proteini MHC1 (majör histocompatibility complex 1) alt birimidir tümör bağışıklığında önemli biyolojik işlevlere ve rollere sahiptir (C. Wang vd., 2022). B2M, çoğu nükleuslu hücre tarafından sentezlenir; hücre membranında ya da serbest halde bulunabilir (C. Wang vd., 2022). Serbest B2M'nin çeşitli kanser türleri için sağkalım için önemli prognostik faktörlerinden ve öngörücülerinden biri olduğu gösterilmiştir. Metastatik melanomda yapılan bir çalışma, tedaviden önce hastaların %24'ünde serum içerisindeki B2M düzeylerinin yükseldiğini ve serum içerisindeki B2M düzeylerindeki değişikliklerin hastalığın ilerlemesi ile iyi bir korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (M. A. Hofmann, Kiecker, Kuchler, Kors, & Trefzer, 2011; C. Wang vd., 2022). Ayrıca farklı melanoma hücre hatlarında B2M mutasyonları da belirlenmiştir (C. Wang vd., 2022).

Housekeeping genlerinden bir diğeri olarak seçilen YWHAZ geni farklı çalışmalarda RT-PCR sonuçlarının normalizasyonu için kullanılmış olsa da bu çalışmada özellikle Hif1 α gen ekspresyonunun susturulmasına bağlı olarak ekspresyonun azalması ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 20, -14.07x). Farklı kanser tabanlı çalışmalar YWHAZ gen ekspresyonunun up-regüle olduğunu ve YWHAZ'IN hücre büyümesi, hücre döngüsü, apoptoz gibi hücresel süreçlere dahil olduğunu belirtmişlerdir (Gan, Ye, & He, 2020; Yaoyao Li vd., 2015; Tong vd., 2016; W. Wang vd., 2017; Zhao vd., 2018).

Çalışma içerisinde Hif1 α gen ekspresyonunun kanser kök hücresinde susturulması ile ilgili deneysel süreçleri ele alındığı için ve kanser kök hücrelerinde hipoksi ilişkili

genlerin hem hücre hatlarında hem de kanser kitlelerinde özellikle de sferoid modellerde daha belirgin şekilde gösterilebilen hipoksik bölge bulunmasına bağlı olarak kök hücre kapasitesinin devamlılığını sağlama hipotezine dayanarak kanser kök hücrelerinin Hif1 α geni susturulmuştur (Däster vd., 2016; Riffle, Pandey, Albert, & Hegde, 2017). Buradaki amaç kanser kök hücrelerinin hipoksi ilişkili bir genin susturulması ile tedaviye daha az direnç gösteren kök hücre olmayan kanser hücrelerine benzerliğinin araştırılmasıdır. Gen ekspresyonu bazında Hif1 α , VHL ve EPSA1 (Hif2 α) karşılaştırılması gruplar arasında gerçekleştirilmiştir. CD133+ ve CD133- hücre grupları arasında fark çıkmamasına rağmen, Hif1 α geninin susturulması gen ekspresyonu seviyesinde doğrulanmıştır. Aynı zamanda hipoksi ilişkili diğer iki gen üzerinden ekspresyon seviyelerinin değiştirilebileceği gösterilmiştir. Hif1 α geni susturulan CD133+ hücre grubunda Hif1 α gen ekspresyonu -52.89 kat azalmıştır (Şekil 21). Bu hücre grubunda ayrıca VHL -13.16 kat, EPSA1 ise -4.83 kat azalma göstermiştir. Sonuç olarak Hif1 α gen ekspresyonunun susturulduğu hücre grubu hem CD133+ hem de CD133- grubundan farklıdır; fakat hipoksi ilişkili genlerin azalması kanser ilerlemesi, migrasyon ve metastaz kapasitesinde etkili bir potansiyel araç olabilir. Diğer bir deyişle, hipoksi ilişkili tedavi yöntemi hem kanser kök hücresi hem de kök hücre olmayan kanser hücresi üzerinde etkili olabilir.

Hif1 α proteini CD133 geninin promotörüne bağlanarak OCT4 ve SOX2 yoluyla CD133+ glioblastoma, kolon ve pankreas hücrelerin yani kanser kök hücrelerinin sayısının artışı desteklemekte olduğu ileri sürülmüştür (Chiu, Zhang, Tse, & Wong, 2019; Hajizadeh vd., 2019; O. Hashimoto vd., 2011; Ohnishi vd., 2013; Soeda vd., 2009; Q. Zhang, Han, Zhu, Chen, & Li, 2021). Ayrıca, diğer bölümlerinden ziyade sitoplazma içerisindeki Hif1 α ve CD133 arasında bir korelasyon bulunmuştur (K. Hashimoto, Aoyagi, Isobe, Kouhiji, & Shirouzu, 2014). Hif1 α proteinin transkripsiyon faktörü olarak CD133 geni üzerinde etkili olmasının yanı sıra CD133, Hif1 α ekspresyonunu ve hipoksi durumunda nükleusa translokasyonunu teşvik eder (Maeda vd., 2016). Bununla birlikte, hipoksi ile indüklenen Hif1 α ekspresyonunun, CD133'ü aşırı eksprese eden gastrointestinal kanser hücrelerinde CD133 ekspresyonunda bir azalmaya yol açtığına dair farklı bir görüş vardır. Normoksik koşullar altında, CD133'ü aşırı eksprese eden gastrointestinal kanser hücrelerinde mTOR sinyalinin inhibisyonu, Hif1 α ekspresyonunu baskılar ve CD133'ünü

destekler (Matsumoto vd., 2009). Glioblastoma, meme, akciğer, kolon ve prostat kanserini de içeren bir grup set hücre hattında yapılan çalışmada insan embriyonik kök hücre belirteçleri olan Myc, KLF4, Oct4 ve NANOG karşılaştırılmıştır. Prostat kanser hücrelerinde hipoksi koşullarının embriyonik kök hücre belirteçleri olan NANOG ve OCT4 ekspresyonlarının Hif1 α ile orantılı olarak arttığını göstermiştir (Mathieu vd., 2011). Gen ekspresyonunun düzenlenmesi farklı kanser hatlarında farklı sonuçlanabilir. Ayrıca bu fark incelemenin yapıldığı materyele göre de değişebilir. Bu çalışmada malign melanoma hücre kültürü üzerinden hücreler arası madde varlığında incelenmiştir. Prostat kanseri çalışmasında Hif1 α ve NANOG benzer trendler gösterse de burada Hif1A gen ekspresyonunun azalması NANOG gen ekspresyonunu değiştirmemiştir (Şekil 24). Bu çalışma hedef siRNA uygulamanımdan 24 saat sonraki durum değerlendirmesini içermektedir. Protein basamağına geçiş için ek süreler de ileriki çalışmalarda denenebilir.

Onkoprotein olarak tanımlanan MYC , hücresel bölünmesi, farklılaşma, apoptoz, anjiyogenez, DNA replikasyonu, RNA işleme, metabolizma ve ribozom biyogenezi dahil olmak üzere, çeşitli hücresel süreçleri koordine etmek için gen ekspresyonunu aktive eden veya baskılayan ana bir transkripsiyon düzenleyicisidir (Baluapuri, Wolf, & Eilers, 2020; Bretones, Delgado, & León, 2015; Kress, Sabò, & Amati, 2015; Yanping Li, Sun, Qian, & Dai, 2020). MYC proteini tümör belirteçlerinin neredeyse tümü ile ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol eder. Onkogenezdaki rolleriyle uyumlu olarak, MYC, gen amplifikasyonu, kromozomal translokasyon, artan translasyonu, düzensiz protein stabilizasyonu veya Wnt, Notch, Hedgehog sinyali gibi upstream yollarının yapısal aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla kanserde sıklıkla aşırı eksprese edilir (Dang, 2012; Kress vd., 2015; Nesbit, Tersak, & Prochownik, 1999). Bu tez kapsamında, CD133+ ve CD133- arasında bir fark bulunmazken, 2 kat değerine yakın olmakla birlikte MYC gene ekspresyonu Hif1 α genini susturulması ile azalmıştır. Bu durum MYC ve Hif1 α etkileşimi ile ilişkilendirilebilir. Fizyolojik normoksik koşullarda, hızlı protein yıkımı nedeniyle MYC ve Hif düşük seviyelerde ifade edilir. Ancak her ikisi de normal hücre homeostazı ve gelişimi için de gereklidir (Yanping Li vd., 2020). Hipoksi altında MYC aktivitesi, düşük oksijen koşulları altında hücrenin sağkalımını destekleyen adaptif bir yanıt olarak Hif1 α tarafından inhibe edilir (Yanping Li vd., 2020).

Hif, kronik hipoksi durumunda MYC'nin proteazomal degradasyonunu destekler (Wong, Qiu, Nakazawa, Qing, & Simon, 2013; Huafeng Zhang vd., 2007). Hif, kullanılan hücre tipine ve sisteme bağlı olarak MYC'nin hipoksiye bağlı degradasyonu için gereklidir (Q. Li, Kluz, Sun, & Costa, 2009; Wong vd., 2013; Zarrabi, Kao, Nguyen, Loscalzo, & Handy, 2017; Huafeng Zhang vd., 2007). Ek olarak, Hif1 α , MYC ile fiziksel olarak etkileşime girerek, yeterli bHLA/PAS alanlarını içeren N-terminali yoluyla, p21 ekspresyonunu ve hücre siklusunu G1 fazında arrestini indüklemiştir (Koshiji vd., 2004). Bu tür fiziksel etkileşimin MYC aktivitesini doğrudan engelleyip engellemediği henüz belirlenmemiştir. MYC, pVHL kompleksi bileşenlerinin seviyesini artırmasına rağmen, Hif1 α 'nın pVHL kompleksine bağlanmasını azaltarak Hif1 α degradasyonunu önler (Doe, Ascano, Kaur, & Cole, 2012; Yanping Li vd., 2020). Bu literatür desteği ile Hif1 α geninin susturulması, MYC ve VHL gen ekspresyonunun azalma trendi göstermesini desteklemektedir.

MYC, kromatin seviyelerinde Hif1 α aktivitesini de artırabilir. Hif1 α histon H3 lizin 4 metilasyonu ve RNA polimeraz II aktivasyonu ile belirli transkripsiyonel olarak aktif bölgelere bağlanır (Yanping Li vd., 2020; Xia & Kung, 2009). MYC, histon asetil-transferaz (HAT) ve kromatin yeniden modelleme komplekslerini çağırarak, kromatin açılmasını teşvik edebilir (Tu vd., 2015) ve RNA polimeraz II'nin aktivasyonunu duraklatmayı kolaylaştırabilir (Yanping Li vd., 2020; Rahl vd., 2010). Bu çalışmada Hif1 α susturulması ile MYC gen ekspresyonu az da olsa düşüş gösterse de HAT proteinlerinden biri olan P300'ü kodlayan EP300 geni 9 kat az ekspresyon göstermiştir. NF- κ B aracılı inflamatuvar sinyali, MYC'in P300 ile rekabete girmesini sağlayarak HRE kodlayan genlerin promotörüne bağlanmasını regüle eder ve Hif1 α transkripsiyon ilerlemesini durdurur (Mendonça, Mendonça, Aragão, & Cooper, 2011). Bu durum da yine Hif1 α susturulmasında EP300 gen ekspresyonunun azalış nedeni olarak desteklenebilir. Ayrıca histon deasetilaz proteinlerini kodlayan HDAC1 ve HDAC9 genleri incelendiğinde, HDAC1'de herhangi bir fark görülmezken, HDAC9 gen ekspresyonu 144 kat azalmıştır. cAMP-response element binding protein (CREBBP), embriyonik gelişim, büyüme kontrolü ve homeostazda kritik roller oynadığı bilinmektedir. Bu gen tarafından kodlanan protein, intrinsik histon asetiltransferaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca transkripsiyon kompleksi ile ilave protein etkileşimlerini stabilize etmek için bir iskele görevi görür.

Bu protein hem histon hem de histon olmayan proteinleri asetiller. Çalışmamızda en yüksek CREBBP ekspresyonunu gösteren grup CD133+ olmuştur. siRNA uygulamaları ile bu gen ifadenmesi düşüş yaşamıştır. Bu durum sinyal yolları özelinde açıklanabileceği gibi, köklülük özelliğinin kaybı olarak nitelendirilme potansiyeli vardır. Çalışmamızda siRNA uygulamasıyla HDCA9 ve P300 proteini artmıştır. Ayrıca sekresyon bazında her siRNA uygulaması CD133+ hücre grubuna göre daha az HDAC9 protein göstermiştir.

Programlı hücre ölüm mekanizmalarından birisi olan apoptoz çeşitli sinyal yollarının sonucu olarak aktivelebilen bir yoldur. Apoptoz süreci, tümör baskılayıcı p53 tarafından pozitif olarak düzenlenir ve pro-hayatta kalma PI3K/AKT yolu tarafından negatif olarak düzenlenir (Y.-H. Wang & Scadden, 2015). Birçok tümör, tümör kitlesinin küçülmesi ve klinik remisyona yansıttığı gibi, başlangıçta geleneksel tedaviye yanıt verir. Fakat, ikincil tümörlerin gelişimi sıklıkla hastalığın nüksetmesine ve tedaviye karşı direncin artmasına neden olur. Tümör kitlesinin geneli ile karşılaştırıldığında, kanser kök hücreleri apoptotik sinyallere karşı daha az duyarlıdır ve konvansiyonel tedaviye daha dirençli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca glioblastomada CD133+ ve CD133- hücrelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada CD133+ hücrelerin radyasyon tedavisine daha az yanıt verdiği ve bu durumun kanser kök hücresi popülasyonunun sessiz olarak ortamda kaldığı belirtilmiştir (Bao vd., 2006; H. Liu, Lv, & Yang, 2015; Signore, Ricci-Vitiani, & De Maria, 2013). Kanser kök hücresi popülasyonu ise kanser popülasyonuna tekrar kaynak sağlamaktadır.

MMP2 ve MMP9 iki ayrı matriks metalloproteinaz proteini olup, fizyolojik koşullarda enzimatik aktiviteleri ile hücrelerarası maddenin yıkımında görev almaktadırlar. Normal koşullarda embriyonik gelişim, kıkırdak ve kemik gelişimi, menstürel döngü gibi süreçlerde görev aldığı gibi, artirit ve kanser süreçlerinde de görev alırlar. Hasta dokularında yapılan bir çalışma MMP2 ve MMP9 proteinlerinin meme kanseri için belirteç olarak kullanılabileceğini immünohistokimyasal boyaların desteğinde göstermiştir (Hai Li, Qiu, Li, & Wang, 2017). 530, 1F6, MV1, M14, Mel57, 1F6m, MV3 ve BLM melanoma hücre hatlarında yapılan çalışmada ise MMP9 ve MMP2 protein seviyeleri belirlenmiş ve MMP2 proteinin melanoma hücrelerinde yüksek olduğu tespit edilmiştir (U. B. Hofmann vd., 1999). A375, B16 ve CHL-1 melanoma hücre hatlarının kullanıldığı bir çalışmada ise antitümoral etkisi olduğu düşünülen bir maddenin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada A375 ve B16

hücre hatlarında MMP2 ve MMP9 proteinlerinin de yüksek olduğu belirlenmiş, CHL-1 ile ilgili herhangi bir bilgi sunulmamıştır (Yang vd., 2018). Bizim çalışmamızda ise, CHL-1 hücre hattından elde edilen kanser kök hücre ve kök hücre olmayan kanser hücreleri arasında karşılaştırılma yapıldığında MMP ekspresyonlarının kök hücre olmayan kanser hücresinde daha düşük olduğu görülmüştür. Aynı zamanda siRNA uygulamasıyla MMP2 ve MMP9 gen ekspresyonlarında düşüş gösterilmiştir. Bu durum Hif1 α ekspresyonunun bozulmasından kaynaklandığı da gen ekspresyon kat oranlarının yüksek olmasıyla desteklenmiş ve bu genlerin ve etkilediği sinyal proteinlerinin kanser hücreleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Glioblastoma odaklı yapılan bir çalışmada ise Hif1 α , MMP9 ve VEGF proteinlerinin benzer düşüş ve yükseliş trendi izlediği gösterilmiştir. Bu durum Hif1 α susturulduğunda VEGF ve MMP9 gen ekspresyonu düşüşünü açıklayabilir (Doğanlar, Doğanlar, Delen, & Doğan, 2021).

Kanserlerin ortak bir özelliği olarak, melanomanın sağkalım ve büyümesi için kansere özgü bir kan damarı ağları gerekir (Hanahan & Weinberg, 2011). Melanoma hücre hatlarında yapılan çalışmalarda VEGFR2 ile VEGFA'nın hücre metaztazında önemli rol oynadığı belirtilirken, VEGFR2'nin invazyonda daha baskın bir karaktere sahip olduğu, diğer bir deyişle daha çok eksprese edildiği belirtilmiştir (Ceci, Atzori, Lacal, & Graziani, 2020). Bizim çalışmamızda ise kök hücre olmayan kanser hücresi VEGFR2 gen ekspresyonu kanser kök hücresine göre düşüken, VEGFA gen ekspresyonu benzerdir. Ayrıca siRNA uygulaması sonrasında her iki gen ekspresyonunda azalma görülürken, bu azalma VEGFR'de daha belirgindir. Bu durum MMP gen ekspresyonunun da desteklediği bir değer olup, invazyonun siRNA uygulaması ile azaldığını işaret eder. Melanoma hücrelerinde, otokrin veya parakrin ligandları tarafından aktive edilen VEGFR-1 (FLT1), kanser hücresinin sağ kalımı, hücre göçünü, invazyonunu ve kemoterapi direncini artırır. A375 ve M14 hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışmada da VEGFR-1 inhibisyonunun invazyon kapasitesini azalttığı gösterilmiştir (Atzori vd., 2020). Bu çalışmada, Hif1 α susturulmasında CD133+ hücre grubu ile benzer VEGFR1(FLT1) gen ekspresyon seviyesi belirlenmiştir. Bu durum MMP9 protein ekspresyonunun Hif1 α susturulması ile artması da bu durum ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca, VEGF protein ekspresyonu Hif1 α susturulması ile artış göstermiştir.

Hücre iskeleti hücrenin dinamik yapısı içerisinde belirli bir şekilde bulunmasını sağlayan ve bu dinamik süreçte ilgili değişime yanıt veren filamentler bütünüdür. Aktin filamentleri hücre iskeleti elemanlarından biri olup, bu çalışmada ele alınmıştır. Kanser hücrelerinde aktinin yeniden düzenlenmesi hücre invazyonu ve metastazında büyük önem taşımaktadır. Hücre iskeleti ve kanser ile ilgili bir derlemede ACTB melanoma hücrelerinde yüksek ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir (Suresh & Diaz, 2021). Bu çalışmada, hücre grupları arasında ACTB gen ekspresyonu seviyesinde fark oluşmamıştır. Bu hücre gruplarımızın hepsinin kanser hücresi olmasından kaynaklanabilir. Profilin 2 (PFN2) ekspresyonu epitelyal-mezenkimal geçiş ve migrasyonda öneme sahip olduğu meme ve kolorektal kanser türlerinde belirlenmiştir (Ling vd., 2021; Hui Zhang vd., 2018). Bizim çalışmamızda bu çıktıları destekler nitelikte PFN2 gen ekspresyonu siRNA uygulamasıyla belirgin şekilde azalış göstermektedir. Bunu destekler şekilde F-actin protein seviyesi siRNA uygulaması ile düşüş göstermektedir.

Morfolojik değerlendirmeler hücrelerin kanser kök hücre ve kök hücre olmayan kanser hücresi arasındaki farklar ile siRNA uygulanan gruplar arasındaki farklar belirlenmiştir. Kanser kök hücresi ile kök hücre olmayan kanser hücresi arasında alan ve dairesellik arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. siRNA uygulamasında alan bazında azalış belirlenmiştir. Aspect ratio hücrenin uzun eksenini ile kısa ekseninin oranını belirlerken, kök hücrelerde diferansiyasyon oranını ve mitozaya eğilimi göstermektedir. Bizim çalışmamızda 1'e en yakın olan değeri CD133+ hücre grubu gösterirken bu durum siRNA uygulanan grupta artmış, diğer bir deyişle köklülüğü azalırken, perimetre (çevre) ve alan (alan) değerleri de azalış göstermiştir.

Çalışmamızda onkogen ve protoonkogenlerden mir9, mir21 ve mir200 olmak üzere 3 adet miRNA seçilmiş olup onların deney gruplarındaki ekspresyon farklarını değerlendirilmiştir. u6 miRNA ekspresyon değerlendirmesi için kontrol olarak kullanılmıştır. miR9 böceklerden insana korunmuş bir sekans içerir ve özellikle nörojeniz üzerindeki çalışmalar gelişimsel süreçte mir9 ekspresyonunu göstermişlerdir (Yuva-Aydemir, Simkin, Gascon, & Gao, 2011). mir9 ekspresyonu mide ve nöral kanserlerde yüksek çıkarken overan kanserde düşük bulunmuştur (Yuva-Aydemir vd., 2011). SHH yüksek ekspresyonu GBM ile ilişkilendirilmiş ve

ligandı olan PTCH proteinin artışı GBM tedavisinde kullanılan temozolomid için bir direnç oluşturduğu belirlenmiştir. mir9'un PTCH ile ilişkili olduğu ve SHH yolağını etkilediği de yine GBM çalışmasında gösterilmiştir, fakat bunun SHH ekspresyon seviyesinden bağımsız olduğu belirtilmiştir (Munoz, Rodriguez-Cruz, Ramkissoon, vd., 2015). Ayrıca GBM kanser kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada mir9'un kanser kök hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edildiği belirtilmiştir (Munoz, Rodriguez-Cruz, & Rameshwar, 2015). mir200 çeşitli kanser türlerinde tümör supresör olarak belirtilmiştir (Klicka, Grzywa, Mielniczuk, Klinke, & Włodarski, 2022). mir200 ailesi mir200a, mir200b, mir200c olarak sınıflanabilir. Sağlıklı doku ve melanoma karşılaştırılması yapılan çalışmalar bu üç mir200 ekspresyonunun sağlıklı dokuya göre daha düşük olduğunu göstermiştir (Klicka vd., 2022).

Kanser kök hücresi ve kök hücre olmayan kanser hücreleri literatürde bu üç miRNA özelinde karşılaştırılmamıştır. Bu çalışmada hem kanser kök hücrelerini kök hücre olmayan kanser hücresi ile karşılaştırılmış, hem de kanser kök hücrelerini siRNA teknolojisi ile Hif1 α geni bazında susturma yapılmış ve mir9, mir21 ve mir200 ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda deney grupları arasında mir200 ekspresyonunda fark belirlenememiştir. Bu durumda mir200 seviyesinin normal melanosit ile karşılaştırılarak melanoma için çıkarımda bulunulabilir.

Projemizde, hücreler arası madde üzerinde kültüre edilen malign melanoma kanser kök hücresinde hedef gen Hif1 α susturulmasına bağlı olarak kök hücre karakteri, invazyon, metastaz ve anjiyogenez kapasitesi, hipoksi özelliği, DNA asetilasyonu, hücre içi iskelet ve hücre adezyon moleküllerinin farklılıklarının incelenmesi ve malign melanoma kök hücre olmayan kanser hücresi ile bu paneller bazında karşılaştırması hedeflenmiştir.

Sonuç ve Öneriler

Bu bulgular, Hif1 α hedefli tedavi modalitelerinin, bu moleküller üzerinden kanser kök hücresinde dinamik etkisi nedeniyle temel indükleyicileri olarak hareket edebileceğini göstermiş ve patolojik koşullarda bu bakış açısı ile siRNA temelli bir tedavi modeli oluşturulabilir. Tez çalışması süresinde hücreler hücrelerarası madde etkileşiminin de etkisi gözardı edilmemelidir. Bu durum çalışmanın *in vivo* benzeri düzen oluşturmaları planlanmıştır. Ayrıca, hücre iskeletini temsilen seçilen F-actin boyaması özellikle Hif1 α siRNA uygulaması ile belirgin şekilde azalış göstermiştir. Bu durum kök hücre olmayan kanser hücreye benzerliğin yanı sıra hücre iskeletinin direk olarak etkilendiğini düşünülmektedir. siRNA uygulaması ile epigenetik regülasyonların değiştiği de söylenebilir. Hem transkriptom düzeyinde hem de protein düzeyinde EP300 ve HDAC9 CD133+ hücre grubuna göre istatistiksel olarak farklı çıkmıştır. siRNA uygulaması ile SHH yolağında ana proteinlerden olan Gli1 ve PTCH2 ise bu tez sonucunda ileriki çalışmalar için hedef moleküller olarak öne çıkmıştır.

Sonuç olarak, bu doktora tezi, Hif1 α 'nın melanoma kanser kök hücrelerindeki rolüne yeni bir ışık tutmuş ve bu mortalitesi yüksek bu kanser türünün agresif davranışının altında yatan moleküler mekanizmaların daha da derinleşmesini sağlamıştır. Bu tezde sunulan bulgular, kanser kök hücreleri alanındaki hem temel hem de translasyonel araştırmalar için önemli çıkarımlara sahiptir ve bu bağlamda Hif1 α 'nın kanser kök hücresindeki dinamik yapıda temel düzenleyicilerden bir tanesi olduğunu göstermiş; diğer sinyal yolları arasındaki karmaşık etkileşime ilişkin daha fazla kaynak olmuştur. Bu çalışma melanoma kanserinde yeni ve daha etkili tanı ve tedavi stratejilerinin gelişmesinde rol alabilecek önemli bir çalışma olmuştur.

Kaynaklar

- Acikgoz, E., Güler, G., Camlar, M., Oktem, G., & Aktug, H. (2019). Glycogen synthase kinase-3 inhibition in glioblastoma multiforme cells induces apoptosis, cell cycle arrest and changing biomolecular structure. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 209, 150–164. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2018.10.036>
- AÇIKGÖZ, E., GÜLER, G., & ÖKTEM, G. (2020). Effect of Flavopiridol on Cell Cycle, Apoptosis and Biomolecule Structure Changes in Breast Cancer Stem Cells. *Bezmîâlem Science*, 8(3), 275–281. <https://doi.org/https://doi.org/10.14235/bas.galenos.2019.3491>
- Acikgoz, E., Soner, B. C., Ozdil, B., & Guven, M. (2021). CD133+/CD44+ prostate cancer stem cells exhibit embryo-like behavior patterns. *Acta Histochemica*, 123(5), 151743. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151743>
- Aghajani, M., Mansoori, B., Mohammadi, A., Asadzadeh, Z., & Baradaran, B. (2019). New emerging roles of CD133 in cancer stem cell: Signaling pathway and miRNA regulation. *Journal of cellular physiology*, 234(12), 21642–21661.
- Aktug, H., Acikgoz, E., Uysal, A., Oltulu, F., Oktem, G., Yigitturk, G., ... Cetintas, V. B. (2016). Comparison of cell cycle components, apoptosis and cytoskeleton-related molecules and therapeutic effects of flavopiridol and geldanamycin on the mouse fibroblast, lung cancer and embryonic stem cells. *Tumor Biology*, 37(9), 12423–12440.
- Al Dhaybi, R., Sartelet, H., Powell, J., & Kokta, V. (2010). Expression of CD133+ cancer stem cells in childhood malignant melanoma and its correlation with metastasis. *Modern Pathology*, 23(3), 376–380.
- Ali, R., El-Boubbou, K., & Boudjelal, M. (2021). An easy, fast and inexpensive method of preparing a biological specimen for scanning electron microscopy (SEM). *MethodsX*, 8, 101521. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101521>
- Allen, T. D. (1983). The application of scanning electron microscopy to cells in culture: selected methodologies. *Scanning Electron Microscopy*, (Pt 4), 1963–1972.
- Apalla, Z., Lallas, A., Sotiriou, E., Lazaridou, E., & Ioannides, D. (2017). Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatology Practical & Conceptual*,

7(2), 1–6. <https://doi.org/10.5826/dpc.0702a01>

- Apte, M., Sambre, D., Gaikawad, S., Joshi, S., Bankar, A., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. (2013). Psychrotrophic yeast *Yarrowia lipolytica* NCYC 789 mediates the synthesis of antimicrobial silver nanoparticles via cell-associated melanin. *AMB Express*, 3(1), 32. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-32>
- Arribat, M., Cavelier, F., & Rémond, E. (2020). Phosphorus-containing amino acids with a P–C bond in the side chain or a P–O, P–S or P–N bond: from synthesis to applications. *RSC Advances*, 10(11), 6678–6724.
- Atzori, M. G., Ceci, C., Ruffini, F., Trapani, M., Barbaccia, M. L., Tentori, L., ... Graziani, G. (2020). Role of VEGFR-1 in melanoma acquired resistance to the BRAF inhibitor vemurafenib. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(1), 465–475. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14755>
- Balsamo, M., Pietra, G., Vermi, W., Moretta, L., Mingari, M. C., & Vitale, M. (2012). Melanoma immunoediting by NK cells. *Oncoimmunology*, 1(9), 1607–1609. <https://doi.org/10.4161/onci.21456>
- Baluapuri, A., Wolf, E., & Eilers, M. (2020). Target gene-independent functions of MYC oncoproteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(5), 255–267.
- Bandarchi, B., Ma, L., Navab, R., Seth, A., & Rasty, G. (2010). From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. *Dermatology Research and Practice*, 2010, 583748. <https://doi.org/10.1155/2010/583748>
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., ... Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120), 756–760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>
- Bar-Eli, M. (2011). Searching for the “melano-miRs”: miR-214 drives melanoma metastasis. *The EMBO Journal*, 30(10), 1880–1881. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.132>
- Bedogni, B., & Powell, M. B. (2009). Unique transforming properties of Notch1 in human melanocytes. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(6), 702–703. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00625.x>
- Bogomolny, E., Huleihel, M., Suproun, Y., Sahu, R. K., & Mordechai, S. (2007). Early spectral changes of cellular malignant transformation using Fourier transform infrared microspectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 12(2),

24003. <https://doi.org/10.1117/1.2717186>

- Bonturi, C. R., Salu, B. R., Bonazza, C. N., Sinigaglia, R. de C., Rodrigues, T., Alvarez-Flores, M. P., ... Oliva, M. L. V. (2022). Proliferation and Invasion of Melanoma Are Suppressed by a Plant Protease Inhibitor, Leading to Downregulation of Survival/Death-Related Proteins. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092956>
- Botti, G., Cerrone, M., Scognamiglio, G., Anniciello, A., Ascierto, P. A., & Cantile, M. (2013). Microenvironment and tumor progression of melanoma: new therapeutic perspectives. *Journal of Immunotoxicology*, 10(3), 235–252. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.723767>
- Boyde, A., Weiss, R. A., & Veselý, P. (1972). Scanning electron microscopy of cells in culture. *Experimental Cell Research*, 71(2), 313–324. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90299-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90299-6)
- Brandner, J. M., & Haass, N. K. (2013). Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology*, 45(5), 443–452. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e328363b3bd>
- Bretones, G., Delgado, M. D., & León, J. (2015). Myc and cell cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(5), 506–516.
- Bu, P., Luo, C., He, Q., Yang, P., Li, X., & Xu, D. (2017). MicroRNA-9 inhibits the proliferation and migration of malignant melanoma cells via targeting sirtuin 1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(2), 931–938. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4595>
- Bustos, M. A., Ono, S., Marzese, D. M., Oyama, T., Iida, Y., Cheung, G., ... Hoon, D. S. B. (2017). MiR-200a Regulates CDK4/6 Inhibitor Effect by Targeting CDK6 in Metastatic Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(9), 1955–1964. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.03.039>
- Carnero, A., & Lleónart, M. (2016). The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 38 Suppl 1, S65-74. <https://doi.org/10.1002/bies.201670911>
- Cassano, R., Cuconato, M., Calviello, G., Serini, S., & Trombino, S. (2021). Recent Advances in Nanotechnology for the Treatment of Melanoma. *Molecules*.

<https://doi.org/10.3390/molecules26040785>

- Ceci, C., Atzori, M. G., Lacal, P. M., & Graziani, G. (2020). Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041388>
- Chen, X., Han, J., Chu, J., Zhang, L., Zhang, J., Chen, C., ... Yu, J. (2016). A combinational therapy of EGFR-CAR NK cells and oncolytic herpes simplex virus 1 for breast cancer brain metastases. *Oncotarget*, 7(19), 27764–27777. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8526>
- Chin, L. (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nature Reviews Cancer*, 3(8), 559–570. <https://doi.org/10.1038/nrc1145>
- Chin, L., Garraway, L. A., & Fisher, D. E. (2006). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & Development*, 20(16), 2149–2182. <https://doi.org/10.1101/gad.1437206>
- Chiu, D. K.-C., Zhang, M. S., Tse, A. P.-W., & Wong, C. C.-L. (2019). Assessment of Stabilization and Activity of the HIFs Important for Hypoxia-Induced Signalling in Cancer Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1928, 77–99. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9027-6_6
- Cho, D. Y., Lin, S. Z., Yang, W. K., Lee, H. C., Hsu, D. M., Lin, H. L., ... Ho, L. H. (2013). Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. *Cell Transplantation*, 22(4), 731–739. <https://doi.org/10.3727/096368912X655136>
- D'Aguanno, S., Mallone, F., Marengo, M., Del Bufalo, D., & Moramarco, A. (2021). Hypoxia-dependent drivers of melanoma progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01926-6>
- Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell*, 149(1), 22–35.
- Däster, S., Amatruda, N., Calabrese, D., Ivanek, R., Turrini, E., Drosner, R. A., ... Muraro, M. G. (2016). Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget*; Vol 8, No 1. Tarihinde adresinden erişildi <https://www.oncotarget.com/article/13857/text/>
- Davey, M. G., Miller, N., & McInerney, N. M. (2021). A review of epidemiology

- and cancer biology of malignant melanoma. *Cureus*, 13(5).
- de Jonge, H. J. M., Fehrmann, R. S. N., de Bont, E. S. J. M., Hofstra, R. M. W., Gerbens, F., Kamps, W. A., ... ter Elst, A. (2007). Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLOS ONE*, 2(9), e898. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000898>
- De Luca, A., Carpanese, D., Rapanotti, M. C., Viguria, T. M. S., Forgione, M. A., Rotili, D., ... Caccuri, A. M. (2017). The nitrobenzoxadiazole derivative MC3181 blocks melanoma invasion and metastasis. *Oncotarget*, 8(9), 15520–15538. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14690>
- Dekker, Y., Le Dévédec, S. E., Danen, E. H. J., & Liu, Q. (2022). Crosstalk between Hypoxia and Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Genes*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/genes13091585>
- Doe, M. R., Ascano, J. M., Kaur, M., & Cole, M. D. (2012). Myc Posttranscriptionally Induces HIF1 Protein and Target Gene Expression in Normal and Cancer CellsMyc Induces HIF1. *Cancer research*, 72(4), 949–957.
- Doğanlar, O., Doğanlar, Z. B., Delen, E., & Doğan, A. (2021). The role of melatonin in angio-miR-associated inhibition of tumorigenesis and invasion in human glioblastoma tumour spheroids. *Tissue and Cell*, 73, 101617. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101617>
- El-Khattouti, A., Sheehan, N. T., Monico, J., Drummond, H. A., Haikel, Y., Brodell, R. T., ... Hassan, M. (2015). CD133+ melanoma subpopulation acquired resistance to caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis is attributed to the elevated expression of ABCB5: Significance for melanoma treatment. *Cancer Letters*, 357(1), 83–104.
- Elder, D. E. (2010). Dysplastic naevi: an update. *Histopathology*, 56(1), 112–120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2009.03450.x>
- Emami Nejad, A., Najafgholian, S., Rostami, A., Sistani, A., Shojaeifar, S., Esparvarinha, M., ... Manian, M. (2021). The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell International*, 21(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5>
- Gajos-Michniewicz, A., & Czyz, M. (2019). Role of miRNAs in Melanoma Metastasis. *Cancers*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cancers11030326>

- Gan, Y., Ye, F., & He, X.-X. (2020). The role of YWHAZ in cancer: A maze of opportunities and challenges. *Journal of Cancer*, 11(8), 2252.
- Garbe, C., Eigentler, T. K., Keilholz, U., Hauschild, A., & Kirkwood, J. M. (2011). Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *The Oncologist*, 16(1), 5–24. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0190>
- Gardner, L. B., Li, Q., Park, M. S., Flanagan, W. M., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2001). Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *Journal of biological chemistry*, 276(11), 7919–7926.
- Gedye, C., Quirk, J., Browning, J., Svobodová, S., John, T., Sluka, P., ... Davis, I. D. (2009). Cancer/testis antigens can be immunological targets in clonogenic CD133+ melanoma cells. *Cancer immunology, immunotherapy*, 58(10), 1635–1646.
- Ghimire, H., Venkataramani, M., Bian, Z., Liu, Y., & Perera, A. G. U. (2017). ATR-FTIR spectral discrimination between normal and tumorous mouse models of lymphoma and melanoma from serum samples. *Scientific Reports*, 7(1), 16993. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17027-4>
- Gilkes, D. M., Semenza, G. L., & Wirtz, D. (2014). Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 14(6), 430–439. <https://doi.org/10.1038/nrc3726>
- Goda, N., Ryan, H. E., Khadivi, B., McNulty, W., Rickert, R. C., & Johnson, R. S. (2003). Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 359–369. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.1.359-369.2003>
- Grosse-Gehling, P., Fargeas, C. A., Dittfeld, C., Garbe, Y., Alison, M. R., Corbeil, D., & Kunz-Schughart, L. A. (2013). CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *The Journal of pathology*, 229(3), 355–378.
- Guler, G., Acikgoz, E., Karabay Yavasoglu, N. U., Bakan, B., Goormaghtigh, E., & Aktug, H. (2018). Deciphering the biochemical similarities and differences among mouse embryonic stem cells, somatic and cancer cells using ATR-FTIR spectroscopy. *The Analyst*. <https://doi.org/10.1039/c8an00017d>
- Güler, G., Güven, Ü., AÇIKGÖZ, E., & Öktem, G. (2020). IR spektroskopisi

- kullanılarak in vitro meme kanser kök hücrelerinin araştırılması. *Ege Tıp Dergisi*, 59(3), 149–154.
- Guler, G., Guven, U., & Oktem, G. (2019). Characterization of CD133(+)/CD44(+) human prostate cancer stem cells with ATR-FTIR spectroscopy. *The Analyst*, 144(6), 2138–2149. <https://doi.org/10.1039/c9an00093c>
- Güler, G., Guven, U., & Oktem, G. (2019). Characterization of CD133+/CD44+ human prostate cancer stem cells with ATR-FTIR spectroscopy. *Analyst*, 144(6), 2138–2149.
- Hajizadeh, F., Okoye, I., Esmaily, M., Ghasemi Chaleshtari, M., Masjedi, A., Azizi, G., ... Jadidi-Niaragh, F. (2019). Hypoxia inducible factors in the tumor microenvironment as therapeutic targets of cancer stem cells. *Life Sciences*, 237, 116952. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116952>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews cancer*, 2(1), 38–47.
- Hashimoto, K., Aoyagi, K., Isobe, T., Kouhuji, K., & Shirouzu, K. (2014). Expression of CD133 in the cytoplasm is associated with cancer progression and poor prognosis in gastric cancer. *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 17(1), 97–106. <https://doi.org/10.1007/s10120-013-0255-9>
- Hashimoto, O., Shimizu, K., Semba, S., Chiba, S., Ku, Y., Yokozaki, H., & Hori, Y. (2011). Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 α -dependent manner in pancreatic cancer cells. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 78(4), 181–192. <https://doi.org/10.1159/000325538>
- Heller, L., Bulysheva, A., Arpag, S., Sales Conniff, A., Kohena, K., Shi, G., ... Cemazar, M. (2021). Growth environment influences B16.F10 mouse melanoma cell response to gene electrotransfer. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 140, 107827. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107827>
- Hessler, M., Jalilian, E., Xu, Q., Reddy, S., Horton, L., Elkin, K., ... Avanaki, K. (2020). Melanoma biomarkers and their potential application for in vivo

- diagnostic imaging modalities. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9583.
- Hofmann, M. A., Kiecker, F., Küchler, I., Kors, C., & Trefzer, U. (2011). Serum TNF- α , B2M and sIL-2R levels are biological correlates of outcome in adjuvant IFN- α 2b treatment of patients with melanoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(3), 455–462. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0900-1>
- Hofmann, U. B., Westphal, J. R., Waas, E. T., Zendman, A. J., Cornelissen, I. M., Ruiter, D. J., & van Muijen, G. N. (1999). Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *British Journal of Cancer*, 81(5), 774–782. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690763>
- Howell, P. M. J., Li, X., Riker, A. I., & Xi, Y. (2010). MicroRNA in Melanoma. *The Ochsner Journal*, 10(2), 83–92.
- Hynes, N. E., & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 177–184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.010>
- Iommarini, L., Porcelli, A. M., Gasparre, G., & Kurelac, I. (2017). Non-Canonical Mechanisms Regulating Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha in Cancer . *Frontiers in Oncology* . Tarihinde adresinden erişildi <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2017.00286>
- Jamal, S. M. El, Alamodi, A., Wahl, R. U., Grada, Z., Shareef, M. A., Hassan, S.-Y., ... Gomez, C. R. (2020). Melanoma stem cell maintenance and chemoresistance are mediated by CD133 signal to PI3K-dependent pathways. *Oncogene*, 39(32), 5468–5478.
- Jang, J.-W., Song, Y., Kim, S.-H., Kim, J., & Seo, H. R. (2017). Potential mechanisms of CD133 in cancer stem cells. *Life sciences*, 184, 25–29.
- Jun, J. C., Rathore, A., Younas, H., Gilkes, D., & Polotsky, V. Y. (2017). Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. *Current Sleep Medicine Reports*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s40675-017-0062-7>
- Kaminskyj, S. G. W., & Dahms, T. E. S. (2008). High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM. *Micron*, 39(4), 349–361.

- Kim, J. E., Chung, B. Y., Sim, C. Y., Park, A. Y., Lee, J. S., Whang, K. U., ... Lee, S. Y. (2019). Clinicopathologic Features and Prognostic Factors of Primary Cutaneous Melanoma: a Multicenter Study in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 34(16), e126. <https://doi.org/10.3346/jkms.2019.34.e126>
- Kim, W.-T., & Ryu, C. J. (2017). Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Reports*, 50(6), 285–298. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.6.039>
- Klicka, K., Grzywa, T. M., Mielniczuk, A., Klinke, A., & Włodarski, P. K. (2022). The role of miR-200 family in the regulation of hallmarks of cancer. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.965231>
- Kloskowski, T., Jarząbkowska, J., Jundziłł, A., Balcerzyk, D., Buhl, M., Szeliski, K., ... Pokrywczyńska, M. (2020). CD133 Antigen as a Potential Marker of Melanoma Stem Cells: In Vitro and In Vivo Studies. *Stem Cells International*, 2020, 8810476. <https://doi.org/10.1155/2020/8810476>
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E. A., Horikawa, I., Barrett, J. C., & Huang, L. E. (2004). HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *The EMBO journal*, 23(9), 1949–1956.
- Kress, T. R., Sabò, A., & Amati, B. (2015). MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. *Nature Reviews Cancer*, 15(10), 593–607.
- Krtolica, A. N. A., Krucher, N. A., & Ludlow, J. W. (1998). Hypoxia-induced pRB hypophosphorylation results from downregulation of CDK and upregulation of PP1 activities. *Oncogene*, 17(18), 2295–2304.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2015). *Robbins Basic Pathology*, 9th ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Kuphal, S., Wallner, S., & Bosserhoff, A. K. (2013). Impact of LIF (leukemia inhibitory factor) expression in malignant melanoma. *Experimental and Molecular Pathology*, 95(2), 156–165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.06.012>
- La Porta, C. A. M., & Zapperi, S. (2017). Complexity in cancer stem cells and tumor evolution: Toward precision medicine. *Seminars in Cancer Biology*, 44, 3–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.02.007>
- Lang, D., Mascarenhas, J. B., & Shea, C. R. (2013). Melanocytes, melanocyte stem

- cells, and melanoma stem cells. *Clinics in Dermatology*, 31(2), 166–178.
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.08.014>
- Lee, J. W., Ko, J., Ju, C., & Eltzschig, H. K. (2019). Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(6), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0235-1>
- Lee, N., Barthel, S. R., & Schatton, T. (2014). Melanoma stem cells and metastasis: mimicking hematopoietic cell trafficking? *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 94(1), 13–30.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.116>
- Lee, Y.-L., Cheng, W.-E., Chen, S.-C., Chen, C., & Shih, C.-M. (2014). The effects of hypoxia on the expression of MMP-2, MMP-9 in human lung adenocarcinoma A549 cells. *European Respiratory Journal*, 44(Suppl 58), P2699. Tarihinde adresinden erişildi
http://erj.ersjournals.com/content/44/Suppl_58/P2699.abstract
- Li, Hai, Qiu, Z., Li, F., & Wang, C. (2017). The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncology Letters*, 14(5), 5865–5870. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6924>
- Li, Hong, Chen, J., Wang, X., He, M., Zhang, Z., & Cen, Y. (2018). Nodal induced by hypoxia exposure contributes to dacarbazine resistance and the maintenance of stemness in melanoma cancer stem-like cells. *Oncology Reports*, 39(6), 2855–2864. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6387>
- Li, Q., Kluz, T., Sun, H., & Costa, M. (2009). Mechanisms of c-myc degradation by nickel compounds and hypoxia. *PloS one*, 4(12), e8531.
- Li, Yanping, Sun, X.-X., Qian, D. Z., & Dai, M.-S. (2020). Molecular crosstalk between MYC and HIF in cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 590576.
- Li, Yaoyao, Wang, J., Dai, X., Zhou, Z., Liu, J., Zhang, Y., ... Wang, X. (2015). miR-451 regulates FoxO3 nuclear accumulation through Ywhaz in human colorectal cancer. *American Journal of Translational Research*, 7(12), 2775.
- Li, Yunqing, & Laterra, J. (2012). Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Cancer Research*, 72(3), 576–580.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3070>
- Ling, Y., Cao, Q., Liu, Y., Zhao, J., Zhao, Y., Li, K., ... Chen, Z. (2021). Profilin 2

- (PFN2) promotes the proliferation, migration, invasion and epithelial-to-mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells. *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*, 28(2), 368–378. <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01169-x>
- Liu, F., & Qian, Y. (2021). The role of CD133 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, 22(4), 291–300.
- Liu, H., Lv, L., & Yang, K. (2015). Chemotherapy targeting cancer stem cells. *American Journal of Cancer Research*, 5(3), 880–893. Tarihinde adresinden erişildi <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26045975>
- Liu, K. Z., Schultz, C. P., Johnston, J. B., Beck, F. W. J., Al-Katib, A. M., Mohammad, R. M., & Mantsch, H. H. (1999). Infrared spectroscopic study of bryostatin 1-induced membrane alterations in a B-CLL cell line. *Leukemia*, 13(8), 1273–1280. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401463>
- Liu, S., Kumar, S. M., Lu, H., Liu, A., Yang, R., Pushparajan, A., ... Xu, X. (2012). MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF- κ B1-Snail1 pathway in melanoma. *The Journal of Pathology*, 226(1), 61–72. <https://doi.org/10.1002/path.2964>
- Liu, Z., Wang, H., Sun, C., He, Y., Xia, T., Wang, J., ... Liu, L. (2022). ZWZ-3, a Fluorescent Probe Targeting Mitochondria for Melanoma Imaging and Therapy . *Frontiers in Pharmacology* . Tarihinde adresinden erişildi <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2022.829684>
- Madjd, Z., Erfani, E., Gheytauchi, E., Moradi-Lakeh, M., Sharifabrizi, A., & Asadi-Lari, M. (2016). Expression of CD133 Cancer Stem Cell Marker in Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The International Journal of Biological Markers*, 31(2), 118–125. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000209>
- Maeda, K., Ding, Q., Yoshimitsu, M., Kuwahata, T., Miyazaki, Y., Tsukasa, K., ... Takao, S. (2016). CD133 Modulate HIF-1 α Expression under Hypoxia in EMT Phenotype Pancreatic Cancer Stem-Like Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ijms17071025>
- Marzagalli, M., Ebelt, N. D., & Manuel, E. R. (2019). Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, 59, 236–250. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.002>
- Marzi, M., Rostami Chijan, M., & Zarenezhad, E. (2022). Hydrogels as promising

- therapeutic strategy for the treatment of skin cancer. *Journal of Molecular Structure*, 1262, 133014.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133014>
- Mathieu, J., Zhang, Z., Zhou, W., Wang, A. J., Heddleston, J. M., Pinna, C. M. A., ... Ruohola-Baker, H. (2011). HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Research*, 71(13), 4640–4652.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3320>
- Matsumoto, K., Arao, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., ... Nishio, K. (2009). mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. *Cancer Research*, 69(18), 7160–7164.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1289>
- Melnik, B. C. (2015). MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma? *Journal of Translational Medicine*, 13, 202. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0570-5>
- Mendonça, D. B. S., Mendonça, G., Aragão, F. J. L., & Cooper, L. F. (2011). NF-κB suppresses HIF-1α response by competing for P300 binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(4), 997–1003.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.098>
- Miao, Z., Lu, Z., Wu, H., Liu, H., Li, M., Lei, D., ... Zhao, J. (2018). Collagen, agarose, alginate, and Matrigel hydrogels as cell substrates for culture of chondrocytes in vitro: A comparative study. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(10), 7924–7933. <https://doi.org/10.1002/jcb.26411>
- Mills, C. N., Joshi, S. S., & Niles, R. M. (2009). Expression and function of hypoxia inducible factor-1 alpha in human melanoma under non-hypoxic conditions. *Molecular cancer*, 8(1), 1–12.
- Minami, K., Taniguchi, K., Sugito, N., Kuranaga, Y., Inamoto, T., Takahara, K., ... Azuma, H. (2017). MiR-145 negatively regulates Warburg effect by silencing KLF4 and PTBP1 in bladder cancer cells. *Oncotarget*, 8(20), 33064–33077.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16524>
- Minnes, R., Nissinmann, M., Maizels, Y., Gerlitz, G., Katzir, A., & Raichlin, Y. (2017). Using Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infra-Red (ATR-FTIR) spectroscopy to distinguish between melanoma cells with a different metastatic potential. *Scientific Reports*, 7(1), 4381.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-04678-6>

- Mishima, H., & Kozawa, Y. (1998). SEM and EDS analysis of calcospherites in human teeth. *European Journal of Oral Sciences*, 106(S1), 392–396. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1998.tb02204.x>
- Mokkapati, S., Bechtel, M., Reibetanz, M., Miosge, N., & Nischt, R. (2012). Absence of the basement membrane component nidogen 2, but not of nidogen 1, results in increased lung metastasis in mice. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 60(4), 280–289. <https://doi.org/10.1369/0022155412436586>
- Moran, B., Silva, R., Perry, A. S., & Gallagher, W. M. (2018). Epigenetics of malignant melanoma. *Seminars in Cancer Biology*, 51, 80–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.10.006>
- Mordechai, S., Sahu, R. K., Hammody, Z., Mark, S., Kantarovich, K., Guterman, H., ... Argov, S. (2004). Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma. *Journal of Microscopy*, 215(Pt 1), 86–91. <https://doi.org/10.1111/j.0022-2720.2004.01356.x>
- Munoz, J. L., Rodriguez-Cruz, V., & Rameshwar, P. (2015). High expression of miR-9 in CD133+ glioblastoma cells in chemoresistance to temozolomide. *Journal of cancer stem cell research*, 3, e1003. <https://doi.org/10.14343/jcscr.2015.3e1003>
- Munoz, J. L., Rodriguez-Cruz, V., Ramkissoon, S. H., Ligon, K. L., Greco, S. J., & Rameshwar, P. (2015). Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level. *Oncotarget*, 6(2), 1190–1201. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2778>
- Murakami, S., & Tashiro, F. (2015). Prospects of differentiation therapy for cancer stem cells. *Adv. Tech. Biol. Med*, 3(10), 144–146.
- Murer, C., Kranzlin-Stieger, P., French, L. E., Dummer, R., & Goldinger, S. M. (2017). Successful treatment with imatinib after nilotinib and ipilimumab in a c-kit-mutated advanced melanoma patient: a case report. *Melanoma Research*, 27(4), 396–398. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000358>
- Nallanthighal, S., Heiserman, J. P., & Cheon, D.-J. (2019). The Role of the Extracellular Matrix in Cancer Stemness . *Frontiers in Cell and Developmental Biology* . Tarihinde adresinden erişildi

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2019.00086>

- Nesbit, C. E., Tersak, J. M., & Prochownik, E. V. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*, 18(19), 3004–3016.
- Ohnishi, S., Maehara, O., Nakagawa, K., Kameya, A., Otaki, K., Fujita, H., ... Takeda, H. (2013). hypoxia-inducible factors activate CD133 promoter through ETS family transcription factors. *PloS One*, 8(6), e66255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066255>
- Oktem, G., Sercan, O., Guven, U., Uslu, R., Uysal, A., Goksel, G., ... Bilir, A. (2014). Cancer stem cell differentiation: TGFbeta1 and versican may trigger molecules for the organization of tumor spheroids. *Oncology Reports*, 32(2), 641–649. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3252>
- Ozdil, B., Güler, G., Acikgoz, E., Kocaturk, D. C., & Aktug, H. (2020). The effect of extracellular matrix on the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(1). <https://doi.org/10.1002/jcb.29159>
- Ozdil, Berrin, Calik-Kocaturk, D., Altunayar-Unsalan, C., Acikgoz, E., Gorgulu, V., Uysal, A., ... Aktug, H. (2021). Spectroscopic and microscopic comparisons of cell topology and chemistry analysis of mouse embryonic stem cell, somatic cell and cancer cell. *Acta Histochemica*, 123(6), 151763. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151763>
- Ozdil, Berrin, Guler, G., Acikgoz, E., Kocaturk, D. C., & Aktug, H. (2019). The effect of extracellular matrix on the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.29159>
- Ozisik, H., Ozdil, B., Sipahi, M., Erdogan, M., Cetinkalp, S., Ozgen, G., ... Aktug, H. (2023). Stemness potency and structural characteristics of thyroid cancer cell lines. *Pathology - Research and Practice*, 241, 154262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154262>
- Palacios-Ferrer, J. L., García-Ortega, M. B., Gallardo-Gómez, M., García, M. Á., Díaz, C., Boulaiz, H., ... Marchal, J. A. (2021). Metabolomic profile of cancer stem cell-derived exosomes from patients with malignant melanoma. *Molecular Oncology*, 15(2), 407–428. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12823>
- Parmiani, G. (2016). Melanoma Cancer Stem Cells: Markers and Functions. *Cancers*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/cancers8030034>
- Pons, M., & Quintanilla, M. (2006). Molecular biology of malignant melanoma and

- other cutaneous tumors. *Clinical and Translational Oncology*, 8(7), 466–474.
<https://doi.org/10.1007/s12094-006-0046-4>
- Qin, J., Liu, Y., Lu, Y., Liu, M., Li, M., Li, J., & Wu, L. (2017). Hypoxia-inducible factor 1 alpha promotes cancer stem cells-like properties in human ovarian cancer cells by upregulating SIRT1 expression. *Scientific Reports*, 7(1), 10592.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09244-8>
- Rahl, P. B., Lin, C. Y., Seila, A. C., Flynn, R. A., McCuine, S., Burge, C. B., ... Young, R. A. (2010). c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell*, 141(3), 432–445.
- Ramadan, Q., Yu, C., Miao, J. H., Cheong, H. W., Oh, S., Choo, A., & Liang, T. H. (2007). Surface functionality enhancement for on-chip human embryonic stem cell culture. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 126(2), 351–353.
- Riffle, S., Pandey, R. N., Albert, M., & Hegde, R. S. (2017). Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer*, 17(1), 338. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3319-0>
- Rijal, G., & Li, W. (2017). A versatile 3D tissue matrix scaffold system for tumor modeling and drug screening. *Science advances*, 3(9), e1700764.
- Salvadori, M. R., Ando, R. A., Nascimento, C. A. O., & Corrêa, B. (2017). Dead biomass of Amazon yeast: A new insight into bioremediation and recovery of silver by intracellular synthesis of nanoparticles. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(11), 1112–1120.
<https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1340754>
- Satzger, I., Mattern, A., Kuettler, U., Weinspach, D., Niebuhr, M., Kapp, A., & Gutzmer, R. (2012). microRNA-21 is upregulated in malignant melanoma and influences apoptosis of melanocytic cells. *Experimental Dermatology*, 21(7), 509–514. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01510.x>
- Schatton, T., & Frank, M. H. (2008). Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 21(1), 39–55.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2007.00427.x>
- Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H. K., Bonfiglio, R., & Bonanno, E. (2018). Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry : EJH*, 62(1), 2841.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2018.2841>

- Semenza, G. L. (2010). Oxygen homeostasis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(3), 336–361.
- Shakya, B. R., Teppo, H.-R., & Rieppo, L. (2022). Optimization of measurement mode and sample processing for FTIR microspectroscopy in skin cancer research. *Analyst*, 147(5), 851–861.
- Sharma, B. K., Manglik, V., O’Connell, M., Weeraratna, A., McCarron, E. C., Broussard, J. N., ... Zapas, J. L. (2012). Clonal dominance of CD133+ subset population as risk factor in tumor progression and disease recurrence of human cutaneous melanoma. *International Journal of Oncology*, 41(5), 1570–1576. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1590>
- Shen, Y., Zhao, S., Zhao, X., Sun, H., Shao, M., & Xu, H. (2019). In vitro adsorption mechanism of acrylamide by lactic acid bacteria. *LWT*, 100, 119–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.058>
- Shidal, C., Singh, N. P., Nagarkatti, P., & Nagarkatti, M. (2019). MicroRNA-92 Expression in CD133+ Melanoma Stem Cells Regulates Immunosuppression in the Tumor Microenvironment via Integrin-Dependent Activation of TGFβmiR-92 Regulates Immunosuppression by Cancer Stem Cells. *Cancer research*, 79(14), 3622–3635.
- Signore, M., Ricci-Vitiani, L., & De Maria, R. (2013). Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Letters*, 332(2), 374–382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.01.013>
- Simbulan-Rosenthal, C. M., Gaur, A., Zhou, H., AbdusSamad, M., Qin, Q., Dougherty, R., ... Karna, K. (2019). CD133 is associated with increased melanoma cell survival after multikinase inhibition. *Journal of oncology*, 2019.
- Smart, J. A., Oleksak, J. E., & Hartsough, E. J. (2021). Cell adhesion molecules in plasticity and metastasis. *Molecular Cancer Research*, 19(1), 25–37.
- Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R. D., ... Park, D. M. (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*, 28(45), 3949–3959. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.252>
- Soltanian, S., & Matin, M. M. (2011). Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumor Biology*, 32(3), 425–440.
- Soner, B. C., Aktug, H., Acikgoz, E., Duzagac, F., Guven, U., Ayla, S., ... Oktem,

- G. (2014). Induced growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in CD133+/CD44+ prostate cancer stem cells by flavopiridol. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(5), 1249–1256. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1930>
- Stecca, B., Santini, R., Pandolfi, S., & Penachioni, J. Y. (2013). Culture and Isolation of Melanoma-Initiating Cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 24(1), 3.6.1-3.6.12. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc0306s24>
- Suresh, R., & Diaz, R. J. (2021). The remodelling of actin composition as a hallmark of cancer. *Translational Oncology*, 14(6), 101051. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101051>
- Suzuka, J., Tsuda, M., Wang, L., Kohsaka, S., Kishida, K., Semba, S., ... Tanaka, S. (2021). Rapid reprogramming of tumour cells into cancer stem cells on double-network hydrogels. *Nature Biomedical Engineering*, 5(8), 914–925. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00692-2>
- Swetter, S. M., Tsao, H., Bichakjian, C. K., Curiel-Lewandrowski, C., Elder, D. E., Gershenwald, J. E., ... Lamina, T. (2019). Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(1), 208–250. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.08.055>
- Szotek, P. P., Pieretti-Vanmarcke, R., Masiakos, P. T., Dinulescu, D. M., Connolly, D., Foster, R., ... Donahoe, P. K. (2006). Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11154–11159.
- Tan, L. Y., Mintoff, C., Johan, M. Z., Ebert, B. W., Fedele, C., Zhang, Y. F., ... Ebert, L. M. (2016). Desmoglein 2 promotes vasculogenic mimicry in melanoma and is associated with poor clinical outcome. *Oncotarget*, 7(29), 46492–46508. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10216>
- Theodosakis, N., Micevic, G., Kelly, D. P., & Bosenberg, M. (2014). Mitochondrial function in melanoma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 563, 56–59. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.028>
- Tirinato, L., Pagliari, F., Limongi, T., Marini, M., Falqui, A., Seco, J., ... Di Fabrizio, E. (2017). An Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem

- Cells. *Stem Cells International*, 2017, 1656053.
<https://doi.org/10.1155/2017/1656053>
- Tong, S., Xia, T., Fan, K., Jiang, K., Zhai, W., Li, J.-S., ... Wang, J.-J. (2016). 3 ζ promotes lung cancer cell invasion by increasing the Snail protein expression through atypical protein kinase C (aPKC)/NF- κ B signaling. *Experimental Cell Research*, 348(1), 1–9.
- Tu, W. B., Helander, S., Pilstål, R., Hickman, K. A., Lourenco, C., Jurisica, I., ... Penn, L. Z. (2015). Myc and its interactors take shape. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(5), 469–483.
- Usher-Smith, J. A., Emery, J., Kassianos, A. P., & Walter, F. M. (2014). Risk prediction models for melanoma: a systematic review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(8), 1450–1463. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0295>
- van Kempen, L. C., van den Hurk, K., Lazar, V., Michiels, S., Winnepenninckx, V., Stas, M., ... van den Oord, J. J. (2012). Loss of microRNA-200a and c, and microRNA-203 expression at the invasive front of primary cutaneous melanoma is associated with increased thickness and disease progression. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 461(4), 441–448. <https://doi.org/10.1007/s00428-012-1309-9>
- Vermeij, E. J., Zoon, P. D., Chang, S. B. C. G., Keereweer, I., Pieterman, R., & Gerretsen, R. R. R. (2012). Analysis of microtraces in invasive traumas using SEM/EDS. *Forensic Science International*, 214(1), 96–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.07.025>
- Vermeulen, L., Sprick, M. R., Kemper, K., Stassi, G., & Medema, J. P. (2008). Cancer stem cells—old concepts, new insights. *Cell Death & Differentiation*, 15(6), 947–958.
- Villanueva, J., & Herlyn, M. (2008). Melanoma and the tumor microenvironment. *Current Oncology Reports*, 10(5), 439–446.
- Vinay Kumar, Abul K. Abbas, J. C. A. (2020). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease* (10. baskı). Elsevier Health Sciences.
- VincenzoAU, V., Monterubbianesi, R., Orilisi, G., Gatto, M. L., Sparabombe, S., Memé, L., ... Orsini, G. (2022). Remineralization Efficacy of Four

- Remineralizing Agents on Artificial Enamel Lesions: SEM-EDS Investigation. *Materials*. <https://doi.org/10.3390/ma15134398>
- Wang, C., Wang, Z., Yao, T., Zhou, J., & Wang, Z. (2022). The immune-related role of beta-2-microglobulin in melanoma. *Frontiers in Oncology*, 12, 944722. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.944722>
- Wang, H., Gong, P., Li, J., Fu, Y., Zhou, Z., & Liu, L. (2020). Role of CD133 in human embryonic stem cell proliferation and teratoma formation. *Stem cell research & therapy*, 11(1), 1–14.
- Wang, L., Yue, T., Yuan, Y., Wang, Z., Ye, M., & Cai, R. (2015). A new insight into the adsorption mechanism of patulin by the heat-inactive lactic acid bacteria cells. *Food Control*, 50, 104–110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.041>
- Wang, W., Zhang, L., Wang, Y., Ding, Y., Chen, T., Wang, Y., ... Chen, S. (2017). Involvement of miR-451 in resistance to paclitaxel by regulating YWHAZ in breast cancer. *Cell death & disease*, 8(10), e3071–e3071.
- Wang, Y.-H., & Scadden, D. T. (2015). Harnessing the apoptotic programs in cancer stem-like cells. *EMBO Reports*, 16(9), 1084–1098. <https://doi.org/10.15252/embr.201439675>
- Wardwell-Ozgo, J., Dogruluk, T., Gifford, A., Zhang, Y., Heffernan, T. P., van Doorn, R., ... Scott, K. L. (2014). HOXA1 drives melanoma tumor growth and metastasis and elicits an invasion gene expression signature that prognosticates clinical outcome. *Oncogene*, 33(8), 1017–1026. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.30>
- Wong, W. J., Qiu, B., Nakazawa, M. S., Qing, G., & Simon, M. C. (2013). MYC degradation under low O₂ tension promotes survival by evading hypoxia-induced cell death. *Molecular and cellular biology*, 33(17), 3494–3504.
- Xia, X., & Kung, A. L. (2009). Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia. *Genome biology*, 10(10), 1–12.
- Yang, S., Zhang, Y., Luo, Y., Xu, B., Yao, Y., Deng, Y., ... Xie, Y. (2018). Hinokiflavone induces apoptosis in melanoma cells through the ROS-mitochondrial apoptotic pathway and impairs cell migration and invasion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 101–110.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.076>

- Yoshida, G. J., & Saya, H. (2021). Molecular pathology underlying the robustness of cancer stem cells. *Regenerative Therapy*, 17, 38–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.02.002>
- Yue, B. (2014). Biology of the extracellular matrix: an overview. *Journal of Glaucoma*, 23(8 Suppl 1), S20-3. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000108>
- Yuva-Aydemir, Y., Simkin, A., Gascon, E., & Gao, F.-B. (2011). MicroRNA-9: functional evolution of a conserved small regulatory RNA. *RNA Biology*, 8(4), 557–564. <https://doi.org/10.4161/rna.8.4.16019>
- Zaidi, M. R., Day, C.-P., & Merlino, G. (2008). From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(10), 2381–2391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/jid.2008.177>
- Zamudio-Ortega, C. M., Contreras-Bulnes, R., Scougall-Vilchis, R. J., Morales-Luckie, R. A., Olea-Mejía, O. F., & Rodríguez-Vilchis, L. E. (2014). Morphological, chemical and structural characterisation of deciduous enamel: SEM, EDS, XRD, FTIR and XPS analysis. *European Journal of Paediatric Dentistry*, 15(3), 275–280. Tarihinde adresinden erişildi <http://europepmc.org/abstract/MED/25306144>
- Zarrabi, A. J., Kao, D., Nguyen, D. T., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2017). Hypoxia-induced suppression of c-Myc by HIF-2 α in human pulmonary endothelial cells attenuates TFAM expression. *Cellular signalling*, 38, 230–237.
- Zhang, Hao, Cui, B., Zhou, Y., Wang, X., Wu, W., Wang, Z., ... Yang, K. (2021). B2M overexpression correlates with malignancy and immune signatures in human gliomas. *Scientific Reports*, 11(1), 5045. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84465-6>
- Zhang, Huafeng, Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K. I., ... Semenza, G. L. (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer cell*, 11(5), 407–420.
- Zhang, Hui, Yang, W., Yan, J., Zhou, K., Wan, B., Shi, P., ... Li, D. (2018). Loss of profilin 2 contributes to enhanced epithelial-mesenchymal transition and

- metastasis of colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 53(3), 1118–1128. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4475>
- Zhang, Q., Han, Z., Zhu, Y., Chen, J., & Li, W. (2021). Role of hypoxia inducible factor-1 in cancer stem cells (Review). *Molecular Medicine Reports*, 23(1). <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11655>
- Zhang, S., Zhu, N., Li, H. F., Gu, J., Zhang, C. J., Liao, D. F., & Qin, L. (2022). The lipid rafts in cancer stem cell: a target to eradicate cancer. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 1–15.
- Zhao, J.-F., Zhao, Q., Hu, H., Liao, J.-Z., Lin, J.-S., Xia, C., ... He, X.-X. (2018). The ASH1-miR-375-YWHAZ signaling axis regulates tumor properties in hepatocellular carcinoma. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 11, 538–553.
- Zwielly, A., Gopas, J., Brkic, G., & Mordechai, S. (2009). Discrimination between drug-resistant and non-resistant human melanoma cell lines by FTIR spectroscopy. *The Analyst*, 134(2), 294–300. <https://doi.org/10.1039/b805223a>

Ekler

Etik kurul onayı açıklama:

Araştırma hücre kültürü tabanlı bir çalışma olup etik kurul onayı gerektirmemektedir.



Teşekkür

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki araştırma yolculuğum boyunca paha biçilmez rehberliği, sarsılmaz desteği ve cesaretlendirmesi için danışmanım Prof. Dr. Hüseyin Aktuğ'a en derin teşekkürlerimi sunarım. Kendisinin bilime bakış açısındaki uzmanlığı, anlayışlı yorumları ve yapıcı eleştirisi, araştırmamı ve akademik yeteneklerimi şekillendirmemde etkili oldu. Öğrencilerinin başarısına olan bağlılığı ve motivasyonu ilham vericiydi. Danışmanlığında çalışma fırsatına sahip olduğum için onur duyuyorum. Ayrıca Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Altuğ Yavaşoğlu olmak üzere tüm öğretim üyelerine de bizlere huzurlu ve kapsamlı bir akademik ve araştırma ortamı sağladıkları için teşekkür ederim. Birlikte çalışma fırsatı yakaladığım Prof. Dr. Ayşegül Uysal'a, Prof. Dr. Gülperi Öktem'e, Doç. Dr. Fatih Oltulu'ya, Dr. Öğr. Üyesi Günnur Güler'e ve Doç. Dr. Eda Açıkgöz'e de teşekkürü borç bilirim. Tüm destekleri için Doç. Dr. Özlem Yılmaz ve Prof. Dr. Yiğit Uyanıkgil'e ayrıca teşekkür ederim.

Çalışma olanaklarının kapısını tez çalışması için ulaşılabilir sağlayan Doç. Dr. Çığır Biray Avcı ve Prof. Dr. Emin İlker Medine ve Araş. Gör. Özge Kozguş Güldü'ye teşekkür ederim. Çalışmalarda teknik destek ve yardım için her zaman yardımcı olmaya hazır olan Erdinç Yılmaz, Serap Güven, Çisem Altunayar Ünsalan ve Pınar Sözer Bahadır'a teşekkür ederim.

Bu yolculuk boyunca bana güç veren aileme ve arkadaşlarıma desteklerini ve sevgilerini sunarım. Onların cesaretlendirmesi ve bana olan inancı, karşılaştığım birçok zorluğun üstesinden gelmeme yardımcı oldu.

Sevgili annem Sibel Özdil, babam Fahri Özdil, kardeşim Başak Özdil ve eşim Veysel Bay'ın sevgisi, sabrı ve destekleri için özellikle minnetlerimi sunarım. Akademik yolculuğumun bir parçası oğlumuz Mustafa Ekin Bay'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TOA-2019-20785 numaralı proje ile destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimizi sunarız.