



**İNSAN BAŞ VE BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ
KARSİNOMUNDA POFUT1 GENİNİN MALİGN
FENOTİPLER VE PERİNÖRAL İNVAZYON İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Neslişah BARLAK

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ**

**2023
Her hakkı saklıdır.**



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**İNSAN BAŞ VE BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMUNDA POFUT1
GENİNİN MALİGN FENOTİPLER VE PERİNÖRAL İNVAZYON İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Neslişah BARLAK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2023

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

25 / 01 / 2023

Neslişah BARLAK

ÖZET

DOKTORA TEZİ

İNSAN BAŞ VE BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMUNDA POFUT1 GENİNİN MALİGN FENOTİPLER VE PERİNÖRAL İNVAZYON İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Neslişah BARLAK

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (BBSHK) dünya genelinde en sık görülen agresif malign hastalıklardan biridir. POFUT1 geninin yüksek düzeyde ifadesinin karsinogenez sürecinde önemli rol oynadığı gösterilmesine rağmen, BBSHK’de POFUT1’in rolü ve moleküler mekanizmaları şimdiye kadar araştırılmamıştır. Bu tez çalışması kapsamında yapılan *in siliko* analizler POFUT1’in BBSHK’de onkogenik role sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, tümör ve normal doku örneklerinin, BBSHK hücrelerinin daha ileri analizi kontrollere kıyasla BBSHK klinik tümör doku örneklerinde ve hücre hatlarında POFUT1’in yüksek düzeyde ifade edildiğini ortaya koymaktadır. *In vitro* araştırmalar, POFUT1’in yüksek düzeyde ifadesinin kanser agresifliği ile ilişkili fenotipleri uyardığını ve POFUT1’in BBSHK hücrelerinde susturulmasının bu fenotipleri baskıladığını göstermiştir. Yapılan ksenograft deneylerle, POFUT1’in BBSHK için aynı zamanda *in vivo* potansiyel bir onkogen adayı olduğu belirlenmiştir. Doku örneklerinin immünohistokimyasal analizi ve kanser hücresi-DRG *ex-vivo* ko-kültür modeli, POFUT1 ifadesinin deregülasyonunun BBSHK hücrelerinin perinöral invazyonunda önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Tez kapsamında elde ettiğimiz bulgular, POFUT1’in baş ve boyun kanserli hastalar için potansiyel bir prognostik belirteç olduğunu ve BBSHK karsinogenezi ile ilgili işlevlerini daha iyi tanımlamak için daha fazla moleküler araştırmaya ihtiyaç duyulmasına rağmen, BBSHK tedavisi için bir hedef olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

2023, 141 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, Onkogen, POFUT1, Perinöral invazyon

ABSTRACT

Ph.D

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF POFUT1 GENE WITH MALIGN PHENOTYPES AND PERINEURAL INVASION IN HUMAN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Neslişah BARLAK

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is one of the most aggressive malignant diseases and requires more effective prevention and treatment strategies. Previous studies revealed that POFUT1 overexpression promotes carcinogenesis, although the potential roles, underlying molecular mechanisms, and biological implications of POFUT1 in HNSCC were not investigated. In this study, *in silico* analyses referred POFUT1 as a potential oncogene in HNSCC. Further analysis of tumor and normal tissue samples as well as HNSCC cells showed significant overexpression of POFUT1 in HNSCC clinical tumor tissue specimens and cell lines compared to corresponding controls. *In vitro* investigations revealed that overexpression of POFUT1 promoted phenotypes associated with cancer aggressiveness and its knockdown in HNSCC cells suppressed those phenotypes. Further xenograft experiments demonstrated that POFUT1 is an oncogene *in vivo* for HNSCC. Immunohistochemical analysis with human clinical samples and cancer cell-dorsal root ganglion *ex-vivo* co-culture model showed that deregulation of POFUT1 is involved in the perineural invasion of HNSCC cells. These results suggest POFUT1 expression as a potential prognostic marker for patients with head and neck cancer and highlight its potential as a target for HNSCC therapy, although more molecular clues are needed to better define the functions of POFUT1 related to HNSCC carcinogenesis.

2023, 141 page

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma, Oncogene, POFUT1, Perineural invasion

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ile başlayan lisansüstü eğitimimin ve tez sürecimin her aşamasında ilgisini ve bilimsel desteğini asla esirgemeyen anlayışı, sabrı ve çalışma disiplini ile örnek olan, her türlü sorunda kapısını çaldığım, kendisiyle çalışmaktan mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a,

Doktora eğitimim süresince, birlikte zaman geçirdiğimiz, her birinden ayrı ayrı çok şey öğrendiğim, aynı laboratuvar ortamını paylaştığım, uzun ve zorlu olan bu süreçte beni motive eden değerli arkadaşlarım Abdulmelik AYTATLI, Ahsen KILIÇ, Fatma ŞANLI, Özel ÇAPIK, Mesut AKYÜZ, Gülnur KUŞDEMİR, Rasim GÜMÜŞ ve Muhammed Süleyman ÇELİK'e,

Ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, maddi ve manevi tüm destekleriyle hayatımın her anında yanımda olan, bana güvenmekten vazgeçmeyen, üzerimdeki emeklerini asla unutamayacağım kıymetli aileme,

Sonsuz teşekkürler...

Neslişah BARLAK
Ocak 2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser Etyolojisi ve İnsidansı.....	1
1.2. Baş ve Boyun Kanseri.....	7
1.3. Tümör Lokalizasyonuna Göre Baş ve Boyun Kanseri	9
1.3.1. Ağız boşluğu kanseri.....	9
1.3.2. Farenks kanseri	12
1.3.3. Larenks kanseri	15
1.4. Baş ve Boyun Kanseri İnsidansı, Prevalansı ve Ölüm Oranı	16
1.5. Baş ve Boyun Kanseri Epidemiyolojisi	19
1.6. Baş ve Boyun Kanseri Tedavisi Yaklaşımları	19
1.7. Baş ve Boyun Kanseri Tedavisinde Çevresel Faktörlerin Etkisi.....	26
1.8. Baş ve Boyun Kanseri Tanı.....	27
1.9. Baş ve Boyun Kanseri Evreleme.....	27
1.10. TNM Evreleme.....	27
1.11. Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinomlarda Genetik Değişiklikler	28
1.12. Onkogenlerin Aktivasyonunun Baş ve Boyun Kanseri Gelişimindeki Rolü	28
1.13. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnhibisyonunun Baş ve Boyun Kanseri Gelişimindeki Rolü.....	32
1.14. Fukosiltransferazlar, Fukosilasyon ve Kanser	35
1.15. POFUT1.....	37
1.16. POFUT1'in Kanser Sürecinde Rolü.....	41
1.17. Perinöral İnvazyon	43

1.18. Baş ve Boyun Kanserlerinde Perinöral İnvazyon	50
2. KAYNAK ÖZETLERİ	52
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	55
3.1. Materyal.....	55
3.2. Yöntem.....	63
3.2.1. Hastalar ve doku örnekleri	63
3.2.2. <i>In Silico</i> analiz	65
3.2.3. Hücreler ve kültür koşulları	65
3.2.4. Plazmitler ve hücelere stabil transfeksiyonu	66
3.2.5. POFUT1 genini yüksek düzeyde ifade eden veya POFUT1 geninin susturulduğu hücre hatlarının oluşturulması.....	67
3.2.6. Doku örneklerinden protein izolasyonu.....	67
3.2.7. Hücrelerden protein izolasyonu	68
3.2.8. Western blot analizi.....	68
3.2.9. POFUT1'in Hep-2, FaDu, SCC-9 ve HGF-1 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması.....	69
3.2.10. POFUT1'in Hep-2, FaDu, SCC-9 ve HGF-1 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkisinin araştırılması.....	69
3.2.11. Dokudan RNA izolasyonu	70
3.2.12. Hücrelerden RNA izolasyonu	71
3.2.13. cDNA sentezi.....	73
3.2.14. Kantitatif gerçek zamanlı PZR.....	73
3.2.15. Transwell migrasyon testi	75
3.2.16. Transwell matrigel invazyon testi	75
3.2.17. Kürecik oluşturma deneyi	76
3.2.18. Immunohistokimya analizi.....	76
3.2.19. Ksenograft fare modellerinin oluşturulması ve <i>in vivo</i> deneyler	77
3.2.20. Dorsal Root Ganglion (DRG) izolasyonu	78
3.2.21. <i>In vitro</i> perinöral invazyon.....	79
3.2.22. Aldehit dehidrogenaz aktivite analizi.....	80
3.2.23. İstatistiksel analiz	80
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	81
4.1. Baş ve Boyun Kanseri Dokularında POFUT1 İfade Düzeyi Analizi.....	81

4.2. Baş ve Boyun Kanseri Doku Örneklerinde POFUT1 İfade Düzeyi Analizi.....	84
4.3. Baş ve Boyun Kanseri Hücre Hatlarında POFUT1 İfade Düzeyi Analizi	87
4.4. POFUT1 Overekspresyon ve shRNA Plazmitleri ile Transfekte Edilen Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinde POFUT1 İfade Düzeyi Analizi	88
4.5. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	90
4.6. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	92
4.7. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Hücre Göçü Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	94
4.8. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Hücre İnvazyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	95
4.9. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerde EMT Genlerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	96
4.10. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Kürecik Oluşturma Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	98
4.11. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Kök Hücre İşaretçilerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	99
4.12. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin ALDH Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	100
4.13. POFUT1 Overekspresyon Plazmiti ile Transfekte Edilen HGF-1 Hücrelerinde POFUT1 İfade Düzeyi Analizi	101
4.14. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	102
4.15. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu ve İnvazyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	103
4.16. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin EMT Genlerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	104
4.17. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin Kürecik Oluşturma Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	105
4.18. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	106

4.19. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin Kök Hücre İşaretçilerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	107
4.20. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin ALDH Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	108
4.21. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Rolünün Ksenograft Modeller ile Araştırılması.....	109
4.22. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Perinöral İnvazyonu İle İlişkisinin Araştırılması.....	112
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	116
KAYNAKLAR.....	119



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°	Derece
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ g	Mikrogram
ml	Mililitre

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABK	Ağız Boşluğu Kanserleri
BBK	Baş ve Boyun Kanserleri
BBSHK	Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinomlar
BT	Bilgisayar Tomografisi
DRG	Dorsal Root Ganglion
DSHK	Dil Skuamöz Hücreli Karsinom
EGF	Epidermal Growth Faktör
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FUT	Fukosiltransferaz
GEO	Gene Expression Omnibus
HHSK	Hipofarenks Skuamöz Hücreli Karsinom
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
LK	Larenks Kanseri
OFSHK	Orofarenks Skuamöz Hücreli Karsinom
OSHK	Oral Skuamöz Hücreli Karsinom
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PNI	Perinöral İnvazyon

Pofut 1	Protein o fukosiltransferase 1
Pofut 2	Protein o fukosiltransferase 2
TBG	Tümör Baskılayıcı Genler
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TNM	Tümör-Nodül-Metastaz
q-RT PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Küresel kanser insidansına katkıda bulunan faktörler Anonymous (2022b)'dan değiştirilerek alınmıştır.....	4
Şekil 1.2. Yeni kanser vakalarının ve ölümlerinin önde gelen bölgeleri 2022 yılı tahminleri Siegel et al. (2022)'den değiştirilerek alınmıştır.	5
Şekil 1.3. Baş ve boyun bölgesinde kanser meydana gelebilen bölgeler Anonymous (2022c)'dan değiştirilerek alınmıştır	8
Şekil 1.4. Oral skuamöz hücreli karsinomların anatomik bölgeleri Montero and Patel (2015)'den değiştirilerek alınmıştır.	10
Şekil 1.5. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomun global insidansı Johnson et al. (2020)'dan değiştirilerek alınmıştır.	17
Şekil 1.6. Proto-onkogenlerin nokta mutasyonları, amplifikasyon ve translokasyon ile aktivasyon mekanizması Albertson (2006)'dan değiştirilerek alınmıştır.	29
Şekil 1.7. Fukosilasyon sentez yolları Jia et al. (2018)'den değiştirilerek alınmıştır.	36
Şekil 1.8. Notch reseptörüne O-Fukoz eklenmesinin şematik gösterimi Jafar-Nejad et al. (2010)'dan değiştirilerek alınmıştır.	39
Şekil 1.9. Epinöryum, Perinöryum ve Endonöryum tabakalarından oluşan sinir anatomisi	45
Şekil 1.10. PNI sürecinde perinöral nişin şematik gösterimi Zhang et al. (2021a)'dan değiştirilerek alınmıştır.	48
Şekil 1.11. Perinöral invazyonun in vitro dorsal root ganglion (DRG) modeli Bakst and Wong (2016)'dan değiştirilerek alınmıştır.	49
Şekil 1.12. Hematoksilen-eozin ile boyanan özofagus skuamöz hücreli karsinom örneğinde perinöral invazyon varlığı. (a) Sinir lifi kısmen tümör hücreleri ile çevrili PNI örneği (siyah ok). (b) Perinöryuma gömülü tümör hücreleri bulunan PNI örneği (siyah ok). Kim et al. (2021)'den değiştirilerek alınmıştır.....	50
Şekil 3.1. Holoklon, Meroklon ve Paraklon türü kolonilerin kristal viyole ile boyanan temsili görüntüleri.....	70
Şekil 3.2. Dokudan RNA izolasyonu basamakları.....	71
Şekil 3.3. Ksenograft fare modellerinin oluşturulması ve <i>in vivo</i> deney aşamaları.....	78
Şekil 3.4. Sprague Dawley sıçanlarından DRG izolasyonu.....	79

Şekil 3.5. DRG'lerden 0, 3 ve 5. günlerde oluşan uzantılar	80
Şekil 4.1. NCI/60, Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) 2012 ve CCLE 2019 hücre hattı kütüphanelerinde POFUT1'i içerisine alan genomik bölgede değişim sıklığı.	81
Şekil 4.2. Baş ve boyun kanseri doku örneklerinde POFUT1'in bulunduğu kromozomal bölgede saptanan genetik değişiklikler.	81
Şekil 4.3. Oncomine veri tabanında bulunan Peng veri setindeki POFUT1'in rölatif kopya sayısı.....	82
Şekil 4.4. Oncomine veri tabanında bulunan Peng, Ginos ve veri setindeki POFUT1'in rölatif mRNA ifade seviyesi	82
Şekil 4.5. TCGA veri tabanında bulunan baş ve boyun tümör doku örneklerinde rölatif POFUT1 ekspresyonu.....	83
Şekil 4.6. TCGA veri tabanında bulunan klinik olarak farklı tümör grade, T evresi ve N evresine sahip baş ve boyun tümör doku örneklerinde rölatif POFUT1 ekspresyon seviyesi.	83
Şekil 4.7. Larenks tümör ve normal doku örneklerinde POFUT1 ifade seviyesi.....	85
Şekil 4.8. Larenks tümör ve normal doku örneklerinde POFUT1 ifade seviyesi.....	85
Şekil 4.9. Larenks kanseri normal ve tümör dokularında POFUT1'in protein düzeyinde ifade seviyesi.....	86
Şekil 4.10. Normal ve Tümör Doku örneklerin POFUT1 ifade düzeyinin immünohistokimyasal analizi.....	87
Şekil 4.11. Baş ve boyun kanseri hücre hatlarında POFUT1 mRNA ve protein seviyesinin analizi	88
Şekil 4.12. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde POFUT1 ifade düzeyi.....	89
Şekil 4.13. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş FaDu ve Hep-2 hücrelerinde POFUT1 ifade düzeyi	90
Şekil 4.14. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde hücre proliferasyonu.....	91
Şekil 4.15. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş FaDu ve Hep-2 hücrelerinde hücre canlılığı.....	91
Şekil 4.16. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.	92

Şekil 4.17. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.	92
Şekil 4.18. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş FaDu ve Hep-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.	93
Şekil 4.19. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş FaDu ve Hep-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.	93
Şekil 4.20. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinin migrasyon potansiyeli	94
Şekil 4.21. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş FaDu ve Hep-2 hücrelerinin migrasyon potansiyeli.	95
Şekil 4.22. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinin invazyon potansiyeli	95
Şekil 4.23. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş FaDu ve Hep-2 hücrelerinin invazyon potansiyeli.	96
Şekil 4.24. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde EMT genlerinin ifadeleri.	97
Şekil 4.25. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş Hep-2 hücrelerinde EMT genlerinin ifadeleri.	97
Şekil 4.26. POFUT1 overekspresyon plazmitleri transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde kürecik oluşturma potansiyeli.	98
Şekil 4.27. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş FaDu ve Hep-2 hücrelerinde kürecik oluşturma potansiyeli.	98
Şekil 4.28. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde kök hücre işaretçilerinin ifadeleri.	99
Şekil 4.29. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş FaDu ve Hep-2 hücrelerinde kök hücre işaretçilerinin ifadeleri.	100
Şekil 4.30. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde ALDH aktivite analizi.	100
Şekil 4.31. POFUT1'in susturulduğu FaDu ve Hep-2 hücrelerinde ALDH aktivite analizi	101
Şekil 4.32. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde POFUT1 ifade düzeyi.	102
Şekil 4.33. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde hücre canlılığı.	103

Şekil 4.34. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde hücre göçü.	104
Şekil 4.35. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde hücre invazyonu.	104
Şekil 4.36. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde EMT genlerinin ifadeleri.	105
Şekil 4.37. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde kürecik oluşturma potansiyeli.	106
Şekil 4.38. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.	106
Şekil 4.39. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.	107
Şekil 4.40. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde kök hücre işaretçilerinin ifadeleri.	108
Şekil 4.41. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde ALDH aktivitesi.	108
Şekil 4.42. FaDu kontrol ve FaDu-shPOFUT1-1 hücrelerinin enjekte edildiği farelerin vücut ağırlığı.	109
Şekil 4.43. Kontrol ve FaDu-POFUT1-1 hücrelerinin oluşturduğu ksenograft tümörlerde H&E boyaması.	110
Şekil 4.44. Kontrol ve FaDu-POFUT1-1 hücrelerinin oluşturduğu ksenograft tümörlerin ölçülen hacimleri.	110
Şekil 4.45. Kontrol ve FaDu-POFUT1-1 hücrelerinin oluşturduğu ksenograft tümörlerin temsili görüntüleri.	111
Şekil 4.46. Deney sonunda Kontrol ve FaDu-POFUT1-1 hücrelerinin oluşturduğu ksenograft tümörlerin ölçülen ağırlığı.	111
Şekil 4.47. Kontrol ve FaDu-POFUT1-1 hücrelerinin oluşturduğu ksenograft tümörlerde rölatif Ki67 seviyesi	112
Şekil 4.48. TCGA veri tabanında bulunan baş ve boyun kanseri doku örneklerinde POFUT1 ekspresyon değişiklikleri ve PNI arasındaki ilişki.	113
Şekil 4.49. GEO veri tabanında bulunan GSE86544 veri setinde PNI'li veya PNI'siz baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinde POFUT1'in diferansiyel ifadesi.	113

- Şekil 4.50.** PNI olan veya olmayan HNSCC dokularında POFUT1 ekspresyonunu gösteren immünohistokimya bölümlerinin temsili görüntüleri (Beyaz ok sinir demetlerini ve kırmızı ok tümör hücrelerini göstermektedir) ve İmmünohistokimya bölümlerinde POFUT1 ekspresyonunun semi-kantitatif analizi. 114
- Şekil 4.51.** POFUT1'i yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücrelerinin nöral uzantılara doğru invazyonunu gösteren temsili görüntüler ve bu ex vivo modelde DRG uzantılarına göç eden rölatif POFUT1'i yüksek düzeyde ifade eden hücre sayısı. 115
- Şekil 4.52.** POFUT1'in susturulduğu FaDu hücrelerinin nöral uzantılara doğru invazyonunu gösteren temsili görüntüler ve bu ex vivo modelde DRG uzantılarına göç eden rölatif POFUT1'in susturulduğu hücre sayısı. 115

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi.	55
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler, kimyasal maddeler ve kitlerin listesi	58
Çizelge 3.3. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan temin edilen Larenks Kanseri tümör örneklerine ve hastalara ait bilgiler..	64
Çizelge 3.4. Larenks Kanseri tümör ve normal örneklerinden izole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyonları	72
Çizelge 3.5. Kantitatif gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primerler ve sekansları	74
Çizelge 4.1. Larenks Kanseri hastalara ait klino-patolojik bilgiler	84

1. GİRİŞ

1.1. Kanser Etyolojisi ve İnsidansı

Kanser, tedavi edilmediği takdirde ölümlle sonuçlanabilecek anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize olan hastalık grubudur. Kanseri gelişiminin nedenleri tam olarak bilinmemesine rağmen, çevresel (örneğin, tütün kullanımı ve aşırı vücut ağırlığı) ve genetik faktörlerin (örneğin, kalıtsal genetik mutasyonlar) kanser riskini artırdığı bilinmektedir. Bu risk faktörleri, kanser ilerlemesini başlatma veya indüklemeye için aynı anda veya sırayla rol alabilmektedir. Genel popülasyondaki tüm kanserlerin yaklaşık olarak %40'ı, tütün kullanımı, aşırı vücut ağırlığı, aşırı alkol tüketimi ve enfeksiyöz ajanlar gibi çevresel risklere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.1.). Bu risk faktörlerinin prevalansı ve risk faktörleri ile ilişkili kanser yükü, bölgeye göre büyük ölçüde farklılık göstermektedir (Anonymous 2022a).

Sigara kullanımı, ABD'de kanser oluşumu ve ölümünün en önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Sigara ve tütün ürünlerinin kullanımı dünya genelinde tüm kanser ölümlerinin yaklaşık olarak %30'unu oluşturmaktadır (Jacobs et al. 2015; Islami et al. 2018). Sigara kullanımının ağız boşluğu, farenks, larenks, akciğer, yemek borusu, pankreas, rahim ağzı, böbrek, mesane, mide, kolorektum, karaciğer ve akut miyeloid lösemi dahil olmak üzere en az 12 kanser türünün riskini artırdığı bilinmektedir (Anonymous 2014). Ayrıca, sigara kullanımının ölümcül prostat kanseri ve yumurtalık kanseri riskini de artırabileceğine dair bulgular da bulunmaktadır (Secretan et al. 2009). Sigaraya ek olarak, diğer yanıcı tütün kullanım biçimleri purlar, pipolar, nargileler ve diğer tütün ürünleri de kanser riski ile önemli derecede ilişkilendirilmektedir. Düzenli olarak puro içen bireylerde akciğer, ağız boşluğu, larenks ve özafagus kanseri riski artmaktadır. Birçok kullanıcı nargile içmenin sigaradan daha az zararlı olduğunu düşünse de, sigara ile aynı veya daha yüksek düzeyde toksik etkiye sahiptir ve artan kanıtlar kanser riski ile ilişkili olarak muhtemelen sigara ile aynı olumsuz etkilere sahip olduğunu göstermektedir (Haddad et al. 2016; Montazeri et al. 2017; Waziry et al. 2017). Sigaraya alternatif olarak ABD'de pazarlanan dumansız tütün ürünlerinin kullanımı ağız, özafagus ve pankreas kanser riski ile ilişkilendirilmiş ve sigaraya güvenli bir alternatif olmadığı belirlenmiştir (Henley et al. 2007; Boffetta et al. 2008). Ayrıca pasif sigara dumanına

maruz kalan fakat sigara içmeyen bireylerde akciğer kanseri riski artmaktadır. 2014 yılında ABD’de sigara içmeyip, pasif sigara dumanına maruziyetin sonucu olarak yaklaşık 5.840 bireye akciğer kanseri tanısı konulmuştur (Islami et al. 2018). Sigarayı bırakan bireylerde ise kanser dahil olmak üzere birçok hastalık riskinin azaldığı da belirlenmiştir.

Tütün kullanımından kaçınmanın yanı sıra, sağlıklı vücut ağırlığını korumak, fiziksel olarak aktif olmak, sağlıklı beslenmek ve alkol alımını önlemek veya sınırlamak kanser riskini azaltmak için en etkili stratejilerdir. Kanser vakalarının tahminen %18’i ve kanser ölümlerinin %16’sı aşırı vücut ağırlığı, alkol tüketimi, fiziksel hareketsizlik ve sağlıksız beslenmenin sinerjik etkilerine atfedilebilmektedir (Islami et al. 2018).

Alkol tüketimi oral, farenks, larenks, özafagus, karaciğer, kolorektum, meme ve mide kanserleri riskini artırmaktadır (Clinton et al. 2020). Kanser vakalarının tahminen %6’sı alkol tüketimine bağlı olarak gelişmektedir (Islami et al. 2018). Alkol tüketimi arttıkça kanser riski artmakta ve haftada birkaç porsiyon içki tüketimi bile bazı kanser türleri ile önemli derecede ilişkilendirilmektedir. Tütün kullanımıyla birlikte alkol tüketimi, oral kanserler, farenks, larenks ve yemek borusu kanserleri riskini sinerjik olarak, bu maruziyetlerin tek tek ilave etkisinden çok daha fazla artırmaktadır (Anonymous 2010).

Tüm kanser vakalarının yaklaşık %4-5’i kötü beslenme alışkanlığı ile ilişkilendirilmektedir (Islami et al. 2018). Kırmızı et, işlenmiş et ürünleri, nişastalı gıdalar, rafine karbonhidratlar ve şekerli içeceklerin yüksek olduğu diyetler, kanser (ağırlıklı olarak kolon kanseri) gelişme riski ile ilişkilendirilirken, çeşitli meyve ve sebzeler, kepekli tahıllar, bakliyatlar, balık veya tavuk ürünleri ağırlıklı diyetler daha düşük kanser riski ile ilişkilendirilmektedir (Grosso et al. 2017; Morze et al. 2020). Yapılan bir çalışmada, sağlıklı diyet ile beslenen bireylerin, kötü diyet ile beslenen bireylere oranla yaklaşık olarak %11-24 daha düşük kanser ölüm riskine sahip olduğu bulunmuştur (Liese et al. 2015). Ayrıca, sağlıklı bir diyet düzeni izleyen bireylerin kanser nedeniyle ölüm riskinin %17-18 daha düşük olduğu belirlenmiştir (Morze et al. 2020).

Fiziksel aktivite, kolon, meme, endometrium, böbrek, mesane, yemek borusu, mide ve akciğer kanseri riskini azaltmaktadır (Patel et al. 2019; Clinton et al. 2020). Kanser vakalarının yaklaşık olarak %3'ü fiziksel hareketsizliğe atfedilmesine rağmen bu oranın tahminin üzerinde olduğu düşünülmektedir. Fiziksel olarak aktif olan kanser hastalarının, tedaviden olumsuz etkilenme ve kanser nedeniyle ölüm oranı, fiziksel olarak aktif olmayan bireylere göre daha azdır (Cormie et al. 2017). Uzun süreli oturma da kanserden ölüm riskinin artmasıyla ilişkilendirilirken, hareketsiz zamanın kısa süreli, orta ile yüksek fiziksel aktivite ile değiştirilmesi kanser riskini azaltıyor gibi görünmektedir (Rees-Punia et al. 2019).

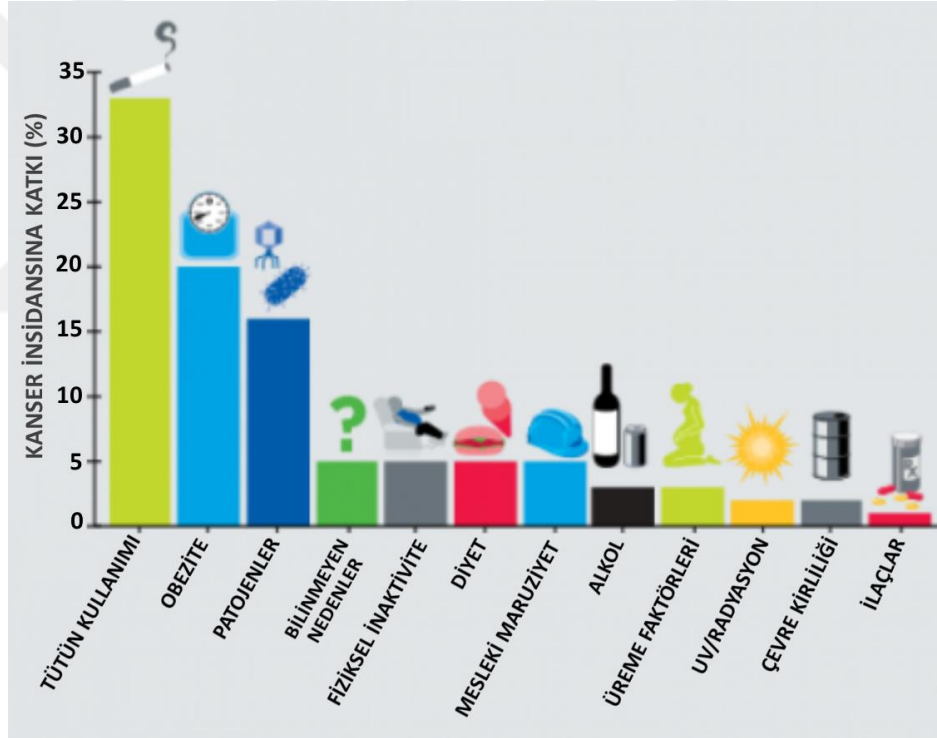
Aşırı vücut ağırlığı veya obezite, endometrium, özafagus, karaciğer, mide, böbrek, pankreas, kolorektum, safra kesesi, yumurtalık, meme ve tiroid kanserleri gibi çeşitli kanser türlerinin gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmektedir (Lauby-Secretan et al. 2016). Aşırı vücut ağırlığının oral, farenks, larenks ve erkek meme kanserlerinin yanı sıra ölümcül prostat kanseri ve lenfoma riskini de artırabileceğine dair bazı kanıtlar vardır (Clinton et al. 2020). Erkeklerde kanserlerin tahminen %5'i ve kadınlarda ise %11'i aşırı vücut ağırlığı ile ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte, ortaya çıkan araştırmalar, kilo kaybının, hormon replasman tedavisi kullanmayan 50 yaş ve üstü kadınlarda meme kanseri riskini azaltmaya yardımcı olabileceğini düşündürmektedir (Teras et al. 2020).

Vücudun insüline yanıt verme yeteneğini kaybettiği kronik bir durum olan Tip 2 diyabet, aşırı vücut ağırlığı, yetersiz ve dengesiz beslenme, fiziksel hareketsizlik gibi aynı zamanda kanser ile ilişkili olan birkaç risk faktörü ile karakterizedir. Yapılan çalışmalar, tip 2 diyabetin karaciğer, endometrium, pankreas, kolorektum, böbrek, mesane, meme ve yumurtalık kanserleri dahil olmak üzere birçok kanser riskini artırdığını göstermektedir (Giovannucci et al. 2010; Bao et al. 2013; Wang et al. 2017).

Çevresel faktörlerden kaynaklanan kanserlerin önemli bir kısmı önlenilmektedir. Melanom hariç diğer kanser türlerinde, ABD'de yeni tanılan kanserlerin en az %42'si (2022'de yaklaşık 805.600 vaka) potansiyel olarak önlenabilir kanserlerdir, buna sigaranın neden olduğu kanserlerin %19'u ve kilo, alkol tüketimi, kötü beslenme ve fiziksel hareketsizlik gibi aşırı vücut kombinasyonunun neden olduğu kanser türlerinin en az %18'i dahildir. İnsan papilloma virüsü (HPV), hepatit B virüsü (HBV),

1. GİRİŞ

hepatit C virüsü (HCV) ve *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) gibi enfeksiyöz ajanların neden olduğu bazı kanser türleri, enfeksiyonu tedavi ederek veya aşılama yoluyla önlenabilmektedir. Her yıl tanılanan 5 milyondan fazla cilt kanserinin büyük çoğunluğu cildi aşırı güneşe maruz kalmaktan koruyarak ve bronzlaşma cihazlarının kullanımı sınırlandırılarak önlenabilmektedir. Bir diğer yandan, belirli aralıklarla yapılan tarama testleri, kolon, rektum ve rahim ağzı kanserlerinin öncülerini tespit edip ortadan kaldırarak kolorektal ve rahim ağzı kanserlerinin önlenmesine yardımcı olabilir. Erken tarama testlerinin meme, kolon, rektum, serviks, akciğer (ağır sigara içme öyküsü olan kişiler arasında) ve prostat kanserlerinde mortaliteyi azalttığı bilinmektedir. Ayrıca vücuttaki değişikliklerin farkında olmak ve bunları bir sağlık uzmanının dikkatine sunmak da kanserin daha erken teşhisine neden olabilir (Islami et al. 2018).

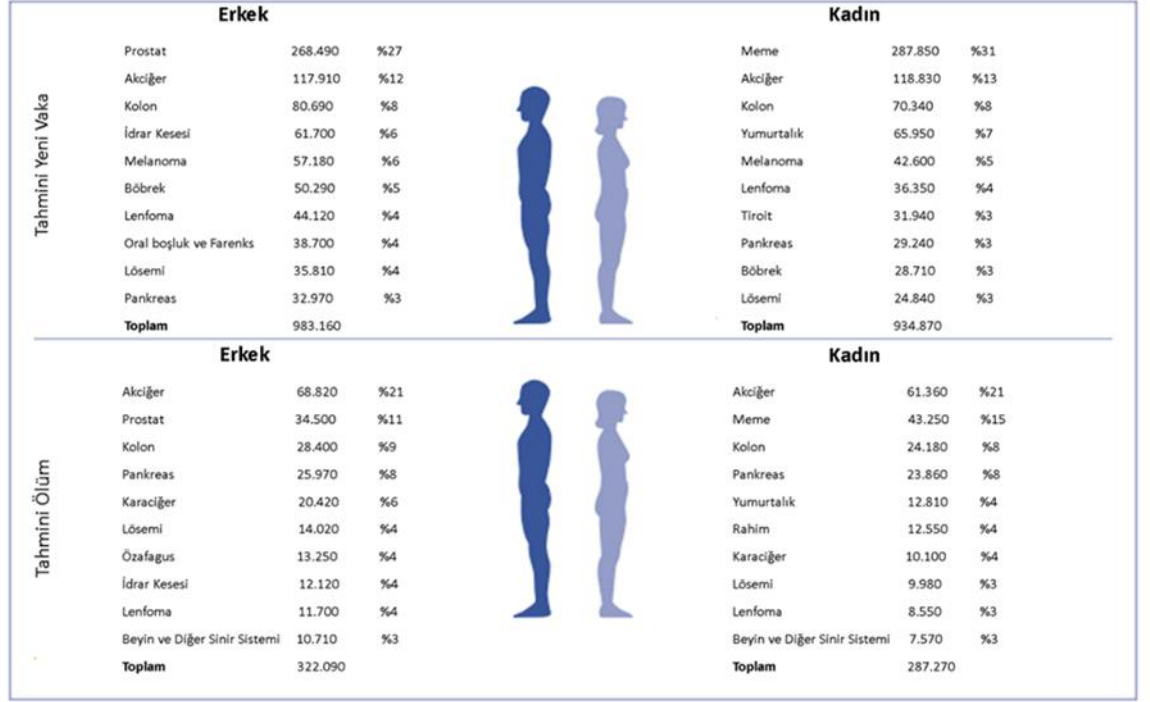


Şekil 1.1. Küresel kanser insidansına katkıda bulunan faktörler Anonymous (2022b)'dan değiştirilerek alınmıştır.

2022 yılında ABD’de 1,9 milyondan fazla kişiye kanser tanısı konulması beklenmektedir. ABD’de 2022 yılında kanser nedeniyle yaklaşık 609.360 ölüm beklenmekte, bu da günde yaklaşık 1.670 ölüm anlamına gelmektedir (Şekil 1.2.). Kanser, dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yaygın ikinci ölüm nedenidir. Kanser insidansı ve mortalite tahminleri, 2018 ve 2019 boyunca bildirilen kanser

1. GİRİŞ

insidansı ve mortalitesine dayanmaktadır ve bu nedenle, 2019 koronavirüs hastalığının (COVID-19) kanser tanıları ve ölümleri üzerindeki bilinmeyen etkisi hesaba katılmamaktadır. Bununla birlikte, sağlık hizmetlerinin kesintiye uğramasının, kanser taraması veya anormal sonuçların veya yeni semptomların takibi için randevuları kaçıran veya erteleyen milyonlarca insanın yanı sıra, tedavide gecikmeler ve/veya değişiklikler yaşayan halihazırda yeni tanı konan hastaların da ortaya çıktığı açıktır (Siegel et al. 2022).



Şekil 1.2. Yeni kanser vakalarının ve ölümlerinin önde gelen bölgeleri 2022 yılı tahminleri Siegel et al. (2022)'den değiştirilerek alınmıştır.

Son yıllarda kanser nedeniyle ölüm oranlarında azalma olduğu gözlemlenmektedir. Genel yaşa göre hazırlanmış kanser ölüm oranı verileri 1991 yılında, sigara nedeniyle 100.000 kişide 215 kanser ölümü meydana geldiğini gösterirken, 2019 itibariyle, çoğunlukla sigara içimindeki azalma ve bazı kanserlerin erken tanı ve tedavisindeki ilerlemeler nedeniyle bu oranın 100.000'de 146 kişi olarak tespit edilerek yaklaşık olarak %32 oranında azaldığını ortaya koymaktadır. Ölüm oranındaki azalma, büyük oranda akciğer, kolorektal, meme ve prostat kanserlerinin tanı ve tedavilerinde kaydedilen ilerleme nedeniyle 1991 yılından 2019 yılına kadar yaklaşık 3.5 milyon daha az kanser ölümü anlamına gelmektedir (Siegel et al. 2022).

Kansere yakalanma riski yaşla birlikte büyük oranda artmasına rağmen, her birey kanser geliştirme riski altındadır. ABD’de kanser tanısı konulan bireylerin %80’i 55 yaş ve üzerinde iken %57’si 65 yaş ve üzerinde olan bireylerdir. Sigara, alkol tüketimi, obezite, sağlıksız beslenme ve meyve sebzelerden yoksun diyetler yaştan bağımsız olarak kansere yakalanma riskini artırmaktadır. ABD’de her 100 erkekten 40’ı ve 100 kadından 39’unun yaşamları boyunca kanser geliştirebileceği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, bu tahminler genel popülasyonda kanser oluşumuna dayanmaktadır ve çevresel faktörlere maruziyet, aile öyküsü veya genetik yatkınlık farklılıkları nedeniyle bireylerde değişkenlik gösterebilmektedir (Anonymous 2022a).

Kanser sağkalımı tipik olarak, aynı yaş, ırk ve cinsiyetteki genel popülasyonla karşılaştırıldığında kanser hastaları arasındaki yaşam beklentisinin bir ölçüsü olan nispi sağkalım açısından tanımlanmaktadır. Tüm kanser türleri için 5 yıllık sağkalım oranı, 1960’ların başından beri, beyaz ırkta %39’dan %68’e ve siyah ırkta %27’den %63’e önemli ölçüde artmıştır. Sağkalım oranındaki önemli artış kanser tedavisindeki ilerlemelerin yanı sıra bazı kanser türleri için erken tanı oranındaki artışı yansıtmaktadır. Sağkalım oranı, kanser türüne, evresine ve ayrıca tanı yaşına göre büyük ölçüde değişkenlik göstermektedir (Siegel et al. 2022).

Kanser evresi, kanserin kapsamını veya yayılımını tanımlamaktadır ve tanı anında, bazen de tedavi başladıktan sonra belirlenmektedir. Tedaviyi optimize etmek ve prognozu değerlendirmek için doğru evreleme oldukça önemlidir. Kanser türlerinin tamamı için evrelendirme, primer tümörün boyutuna, büyüklüğüne ve kanserin yakındaki lenf düğümlerine veya vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmadığına bağlı olarak yapılmaktadır. Kanseri sınıflandırmak için çeşitli evreleme sistemleri kullanılmaktadır (Anonymous 2022a).

Klinisyenler tarafından sıklıkla kullanılan evreleme sistemi TNM (tümör boyutu, dahil olan düğümler ve metastaz varlığı) olarak adlandırılır. TNM evreleme sistemi, en erken evre için 0, daha ileri hastalık için I, II, III veya IV’e kadar bir evre atamaktadır. Bununla birlikte, testis ve lenfoma gibi bazı kanser türlerinde evre IV kanser yoktur ve alternatif evreleme sistemleri vardır. Kanser biyolojisi daha iyi anlaşıldıkça, bazı

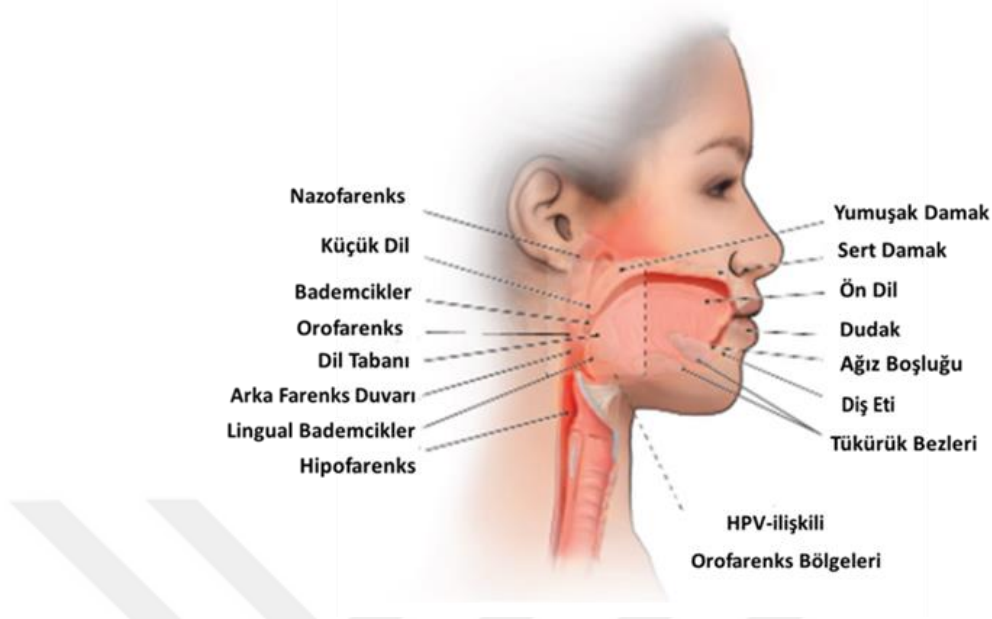
kanserler için evrelemeye tümöre özgü ek özellikler dahil edilmektedir (Anonymous 2022a).

Kanserin küresel maliyeti, doğrudan tıbbi maliyetler (tüm sağlık harcamalarının toplamı) ve dolaylı maliyetler (hastalık veya erken ölümden kaynaklanan iş kaybı nedeniyle kaybedilen kazançlar gibi) dahil olmak üzere çeşitli şekillerde tahmin edilmektedir. Ulusal Kanser Enstitüsü, ABD’de kansere bağlı doğrudan tıbbi maliyetlerin 2015 yılında 183 milyar dolar olduğunu ve sadece nüfus artışı ve yaşlanmaya bağlı olarak %34’lük bir artışla 2030 yılına kadar 246 milyar dolara yükseleceğini tahmin etmektedir. Bununla birlikte, artan tedavi maliyetleri nedeniyle tahminlerin üzerinde tıbbi maliyet ortaya çıkması öngörülmektedir (Anonymous 2022a).

1.2. Baş ve Boyun Kanseri

Baş ve boyun kanseri (BBK) dünya çapında görülen tüm kanser türlerinin yaklaşık olarak %4,8’ini oluşturmaktadır (Bray et al. 2018). Dünya çapında yılda yaklaşık 650.000 kişiye yeni BBK teşhisi konmaktadır (Crozier and Sumer 2010). BBK’nin %90’ı ağız boşluğu, farenks, larenks ve nadiren burun boşluğunda bulunan skuamöz epitel hücrelerinden kaynaklanır. Baş ve boyun bölgesinde ortaya çıkan bu karsinomlar; dudaktan, dilden, ağız tabanından, ağız boşluğundan kaynaklanan kanserler olan oral skuamöz hücreli karsinomlar, dil kökü, yumuşak damak, bademcikler, boğazın arkasından kaynaklanan kanserler olan orofarenks skuamöz hücreli karsinomlar, supraglottis, glottis, subglottisten kaynaklanan larenks skuamöz hücreli karsinomlar, nazal kavite ve paranazal sinüsleri kaplayan skuamöz epitel hücrelerinden kaynaklanan nazal skuamöz hücreli karsinomlardır (Şekil 1.3) (Tumban 2019). BBK’nin kalan %10’u lenfositlerden, bağ dokusu hücrelerinden (kas, kan damarı) ve tükürük bezlerinden kaynaklanmaktadır (Tumban 2019). Bu epitelyal malignitelerin neredeyse tamamı en önemli risk faktörlerinin tütün ve alkol tüketimi olan baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlardır (BBSHK) (Argiris and Eng 2003). Bununla birlikte, yapılan çalışmalar, HPV’nin BBSHK’nin bazı türlerinin bir nedeni olduğunu ortaya koymaktadır (D’Souza et al. 2007). BBSHK hastalarının yaklaşık üçte ikisi, yaygın olarak bölgesel lenf nodüllerini içeren ileri evre hastalık ile hastanelere başvurur. İlk başvuruda, uzak metastaz

nadir olmakla birlikte hastaların yaklaşık olarak %10'unda ortaya çıkmaktadır (Argiris et al. 2008).



Şekil 1.3. Baş ve boyun bölgesinde kanser meydana gelebilen bölgeler Anonymous (2022c)'dan değiştirilerek alınmıştır.

BBSHK hastaları için tedavi yaklaşımları genellikle karmaşıktır ve etkili tedavi yaklaşımının belirlenmesinde baş ve boyun cerrahları, tıbbi onkologlar, radyasyon onkologları, radyologlar, plastik cerrahlar ve diş hekimleri dahil olmak üzere birçok uzman birlikte karar verir. Primer tümör bölgesi, tümörün evresi, tümör bölgesinin cerrahi operasyona uygunluğu, çiğneme, yutma ve solunum ile ilişkili hayati fonksiyonlara sahip organların korunma isteği ve komorbid hastalıklar hastayı uygun tedavi yaklaşımına yönlendirmek için başlıca faktörler arasında yer almaktadır. Cerrahi ve radyoterapi uzun yıllardır başlıca tedavi yaklaşımı olarak kullanılmaktadır. Cerrahi ve radyoterapi yaklaşımlarındaki yenilikler ve sistemik ajanların tedavi yaklaşımlarına dahil edilmesi, klinik sonuçları iyileştirmiştir. Yeni tasarlanan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) inhibitörlerinin klinik tedavide kullanımı, BBSHK hastaları için yeni ve etkili tedavi yaklaşımı olarak ortaya çıkmaktadır (Argiris et al. 2008).

BBSHK hastalığını atlatan hastalar yaşamları boyunca yeniden primer ve sekonder tümör geliştirme riskiyle karşı karşıyadır ve her yıl yaklaşık olarak hastaların %3-5'i ikinci primer tümörler geliştirirler (Argiris et al. 2004; Khuri et al. 2006). Şimdiye kadar kanser gelişme riski yüksek kişiler için hastalığın takibi amacıyla kullanılan

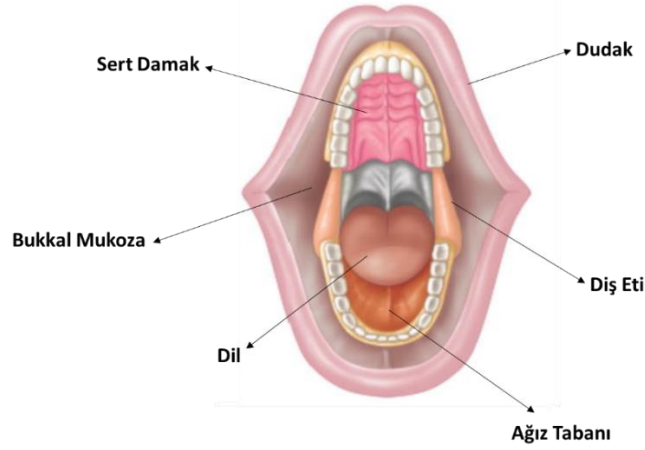
herhangi bir biyobelirteç veya görüntüleme sistemi mevcut değildir. Test edilen kemopreventif ajanların umut verici erken verilerine rağmen klinik çalışmalarla kanserin önlenmesinde etkisi ortaya konan herhangi bir kemopreventif ajan bulunmamaktadır (Khuri et al. 2006). Bu nedenle baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomların gelişiminde moleküler olayların daha fazla aydınlatılmasının, yeni, potansiyel olarak etkili antikanser ajanların geliştirilmesinin ve tedaviyi optimize edebilecek biyobelirteçlerin tanımlanmasının hızlandırılması gerekmektedir.

1.3. Tümör Lokalizasyonuna Göre Baş ve Boyun Kanserleri

BBK, ağız boşluğu, farenks, larenks ve paranasal sinüslerin yanı sıra majör ve minör tükürük bezlerinin kanserleri dahil olmak üzere üst solunum-sindirim sisteminin mukozal yüzeylerinde ortaya çıkan bir grup maligniteyi kapsamaktadır (Lydiatt et al. 2017). BBK'nin lenfomalar veya sarkomlar gibi değişik histolojik türleri bulunmasına rağmen yaygın görülen histolojik türü skuamöz hücreli karsinomlardır.

1.3.1. Ağız boşluğu kanserleri

Ağız boşluğu, dudakların kenarından, altta dil papillalarına ve üstte sert ve yumuşak damak birleşimine kadar uzanmaktadır. Ağız boşluğu dudak, dil, ağız tabanı, bukkal mukoza, üst ve alt diş eti, retromolar trigon ve sert damak anatomik bölgelerini içermektedir. Ağız boşluğunda bu anatomik bölgelerde meydana gelen kanserlerin tamamı da ağız boşluğu kanserlerini (ABK) oluşturmaktadır (Şekil 1.4) (Montero and Patel 2015).



Şekil 1.4. Oral skuamöz hücreli karsinomların anatomik bölgeleri Montero and Patel (2015)'den değiştirilerek alınmıştır.

Dünya çapında her yıl 405.000 yeni ABK vakası beklenmektedir ve en yüksek oranlara sahip ülkeler Sri Lanka, Hindistan, Pakistan, Bangladeş, Macaristan ve Fransa'dır (Ferlay et al. 2010). Avrupa Birliği'nde her yıl tahmini 66.650 yeni ağız boşluğu kanseri vakası tanısı konmaktadır. Tütün ve alkol kullanımı, oral skuamöz hücreli karsinomlarda (OSHK) ana etiyolojik faktörler olarak tanımlanmaktadır (Siegel et al. 2014).

Kullanılan tütün yılı ile OSHK riski arasında doğru orantı vardır. Bu risk sigarayı bıraktıktan sonra ilk 9 yılda %30 ve 9 yıldan sonra %50 azalmasına rağmen tam olarak ortadan kalkmamaktadır. Son 15 yılda, yaygın olarak tütün kullanımındaki azalmaya bağlı olarak ABK insidansında da azalma olduğu bildirilmiştir. Alkol ve tütün kullanımının OSHK etiyolojisinde sinerjik bir etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, yalnızca alkol kullanımı da OSHK riskinin artmasıyla bağlantılıdır (Macfarlane et al. 1995).

OSHK, çoğu etnik grupta erkeklerde kadınlara göre iki ile üç kat daha fazla yaygındır. Dünya çapındaki raporlarda, ağız boşluğu ve farenksin tüm bölgelerinin kanserleri gruplandırılmıştır ve toplu olarak dünyadaki en yaygın altıncı kanser türünü temsil etmektedir (Warnakulasuriya 2009). Dudak, dil, diş eti, ağız tabanı, parotis ve tükürük bezleri kanserlerini içeren ağız içi kanserler için Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) son raporlarına göre, dünya genelinde yıllık insidansı

300.000'in üzerinde ve ağız içi kanser ilişkili yıllık ölüm yaklaşık 145.000'dir (Rivera 2015).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bölgelere göre oral kanser insidansı ve mortalitesi verileri Güneydoğu Asya bölgesi ve Avrupa bölgesinin en kritik bölgeler olduğunu göstermektedir. Özellikle bölgelere göre yüksek oral kanser insidansı ile karakterize edilen bölgeler arasında Güney ve Güneydoğu Asya'da Sri Lanka, Hindistan, Pakistan ve Tayvan, Batı'da Fransa ve Doğu Avrupa'da Macaristan, Slovakya ve Slovenya, Latin Amerika ve Karayipler'de Brezilya, Uruguay ve Porto Riko ile Pasifik bölgeleri'nde Papua Yeni Gine ve Melanezya bulunmaktadır. Birleşmiş Milletler Kalkınma Programı'nın (UNDP) İnsani Gelişme Endeksi'ne göre ise gelişmişlik göstergesi daha iyi olan ülkelerde OSHK görülme sıklığı daha yüksektir. GLOBOCAN verileri, insidans hızı ve yaşa göre standardize edilmiş verileri dünya çapında daha gelişmiş bölgelerde OSHK insidansının daha yüksek olduğunu, ancak daha az gelişmiş bölgelerde mortalitenin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Rivera 2015).

OSHK insidansı yaşa ve cinsiyete göre farklılık göstermektedir. 65 yaş üstü bireylerde olguların %70'inden fazlasını erkek bireyler oluştururken, 45 yaş altındaki bireylerde bu oran %50-65'e düşmektedir. Bu farkın genç kadın bireylerde erkek bireylere oranla sigara ve alkol tüketiminin az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Paderno et al. 2018).

OSHK tüm oral malignitelerin yaklaşık %90-95'ini oluşturmaktadır. Dil skuamöz hücreli karsinomlar (DSHK) ise en sık görülen OSHK'dir, genellikle skuamöz hücreli karsinomlardan kaynaklanmaktadır ve tüm oral kavite kanserlerinin yaklaşık %25-45'ini oluşturmaktadır (Mohideen et al. 2019). Yapılan çalışmalar, son yıllarda DSHK insidansının dünya çapında arttığını ve önemli bir halk sağlığı sorunu haline geldiğini göstermektedir (Li et al. 2015). DSHK sıklıkla çiğneme, konuşma ve yutma bozukluklarına yol açarak hastaların yaşam kalitesini ve yüz görünümünü ciddi şekilde etkilemektedir (Yu and Li 2016; Gan et al. 2018). DSHK görülen hastalar, diğer oral kavite bölgelerinden kaynaklanan kanser hastalarına göre önemli ölçüde daha kötü prognoza sahiptir (Yan et al. 2014). Dil kanseri hızla komşu dokulara yayılmakta ve kan dolaşımı yoluyla diğer organlara invaze olmaktadır. Lenf nodu ve uzak metastaz, DSHK

hastalarında en kötü prognostik faktörlerdir (Yu and Li 2016). Tanı teknikleri ve terapötik yöntemlerdeki son gelişmelere rağmen, DSHK ile ilişkili ölümlerin sayısı son 5 yılda %10'un üzerinde artmıştır (Yu and Li 2016). Geç tanı, lokal invazyon ve uzak metastazlar ölümün başlıca nedenleri arasındadır (Aparna et al. 2015). Şu anda, DSHK tedavisinde kullanılacak terapötik yaklaşımlar yaş, tümör düğümü metastaz evresi ve histolojik grade dahil olmak üzere klinik-patolojik parametrelere dayanmaktadır. Yararlı olmasına rağmen, bu faktörler genellikle az ya da çok agresif tümör tipleri arasında ayrım yapmakta başarısız olmaktadır (Laimer et al. 2008). Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi kombinasyon tedaviler yaygın olarak kullanılmasına rağmen, DSHK hastalarının ölüm oranı yüksektir (Huang et al. 2009). DSHK hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı %50'den azdır (Li et al. 2015). Sağkalım oranı, ilerleyen yaş ve ileri klinik evre ile giderek azalmakta ve dil karsinomunun en kötü prognoza sahip oral malignite olduğuna inanılmaktadır (Aparna et al. 2015). Bu nedenle, dil kanseri gelişimini moleküler düzeyde engellemek hastaların prognozunu iyileştirmek açısından büyük önem taşımaktadır (Gan et al. 2018).

DSHK klinik olarak oldukça değişkendir, bu nedenle, hastaların prognozunu tahmin etmek zordur. Erken evre DSHK hastaları cerrahi tedavi yaklaşımı ile tedavi edilebilir; fakat hastalığın erken evrede tanınması oldukça zordur ve hastalık çoğunlukla agresiftir. Şu anda, DSHK klinik seyrini öngören güvenilir belirteçler bulunmamaktadır. Bu nedenle, hastalık prognozu ile ilişkili belirteçlerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır (Hwa et al. 2015).

1.3.2. Farenks kanserleri

Farenks, sindirim sisteminin yemek borusu üzerinde kalan burun ve ağız boşluğunun arkasındaki kısımdır ve hipofarenks, nazofarenks ve orofarenks olmak üzere üç bölüme ayrılmaktadır. Hipofarenks, larenksin arkasında ve yemek borusunun hemen üzerinde kalan kısımdır. Orofarenks, ağız boşluğunun arkasında kalan kısımdır. Bu bölüm solunum ve sindirim sistemlerinin ortak alanıdır. Nazofarenks burun boşluğu ile bağlantılıdır ve farenksin bu bölümü solunum sistemine aittir (Merati and Rieder 2003).

Hipofarenks, hyoid kemik seviyesinde başlayan ve krikoid kırırdağın alt sınırına kadar uzanan farenks bölgesi olarak tanımlanmaktadır. Hipofarenks içerisinde üç anatomik alt bölge bulunmaktadır: piriform sinüsler, postkrikoid alan ve posterior hipofarenks duvar. Piriform sinüs tüm hipofarenks kanser vakalarının %60'ından fazlasında tümörün köken aldığı bölgedir ve postkrikoid bölge hipofarenks kanser vakalarının %5'inden daha azını oluşturan tümörün en az tanındığı bölgedir (Hoffman et al. 1997). Farenks duvarı veya piriform sinüslerde tanılanan erken evre lezyonlar en iyi prognoza ve uzun süreli sağkalıma sahiptir ancak hipofarenks karsinomlarının %20'sinden daha azını oluşturmaktadır. Hipofarenksin larenks ve servikal özofagusa yakınlığı, tedaviye başlamadan önce hastalığın bulunduğu bölgenin doğru bir şekilde belirlenmesini zorlaştırmaktadır (Gourin and Terris 2004). Şu anda, HSHK hastaları için çeşitli tedavi seçenekleri mevcuttur. Radyasyon tedavisi ile birlikte cerrahi, hipofarenks karsinomlu hastaların büyük çoğunluğu için standart tedavidir. Radyoterapi tek başına da kullanılabilir ancak T1 veya T2 evre küçük lezyonlar için yararlı olduğu bilinmektedir. Hiperfraksiyone radyasyon tedavisi ise bölgesel hipofarenks kanserlerinin kontrolünde geleneksel radyasyon tedavisine göre daha başarılı sonuçlar vermektedir. Kemoradyoterapi ile organ koruma tedavisi giderek daha fazla çalışılmaktadır fakat yaklaşık olarak hastaların üçte birinde ciddi yan etkilere neden olmaktadır (Gourin and Terris 2004).

Hipofarenks kanserleri nadir görülen kanser türü olmasına rağmen tüm BBSHK arasında en yaygın görülen malign tümörlerden biridir (Carvalho et al. 2005; Kuo et al. 2014; Gatta et al. 2015; Wu et al. 2021a). Hipofarenks skuamöz hücreli karsinomlar (HSHK) tüm BBSHK arasında en yüksek ölüm oranı ile ilişkilidir. Hipofarenks kanserleri Ulusal Kanser Veri Tabanı tarafından bildirilen verilere göre tüm BBSHK'nin %4'ünü, üst solunum sistemi malignitelerinin ise %7'sini oluşturmaktadır (Gourin and Terris 2004). HSHK gizli yerleşim, kolay submukozal yayılım ve primer lezyonların çok merkezli büyümesi ile karakterize edilmektedir (Wu et al. 2021a). Hipofarenksin anatomisi nedeniyle tümör herhangi bir semptomla yol açmadan hızlı bir şekilde ilerleyebilmektedir (Wu et al. 2021a). Erken evrede belirgin semptomlar olmadığından, güvenilir tanı ölçütlerinin olmaması nedeniyle, hipofarenks karsinomlu hastaların büyük çoğunluğu hastalık teşhis edildiğinde ileri evrededir (Grégoire et al. 2018). Semptomların geç ortaya çıkması ve tümörün önemli ölçüde submukozal yayılımı göz önüne alındığında, HSHK genellikle ileri evrede (III ve IV), sıklıkla lokal veya uzak

metastazlarla saptanır ve bu nedenle kötü bir prognoza sahiptir (Chu and Chang 2009; Petersen et al. 2018). Genel sağkalım kademeli olarak iyileşmektedir, ancak 5 yıllık sağkalım oranı %28'den %41'e yükselmesine rağmen halen oldukça düşüktür (Gatta et al. 2015; Newman et al. 2015; Petersen et al. 2018). Hipofarenks hücreli karsinomlar 55 yaş civarında ve erkek bireylerde kadın bireylere göre daha sık görülmektedir (Archibald et al. 2005).

Nazofarenks karsinomları, nazofarenks epitelinden kaynaklanan kanser türüdür. Benzer hücre veya doku kökenine sahip olmalarına rağmen, nazofarenks karsinom ile baş ve boyun bölgesindeki diğer epitelyal tümörler arasında belirgin farklılıklar vardır. Diğer BBSHK ile karşılaştırıldığında, nazofarenks karsinomları nadir görülmektedir. 2012 yılında dünya çapında 86.500 nazofaringeal karsinom vakası rapor edilmiş olup, aynı yıl tanılanan tüm kanserlerin yaklaşık olarak %0,6'sını oluşturmaktadır. Yeni vakaların %71'i Asya'nın doğu ve güneydoğu bölgelerinde görülürken kalanı güney-orta Asya ve kuzey-doğu Afrika bölgelerinde görülmektedir (Chua et al. 2016). Demografik eğilimler değerlendirildiğinde, erkeklerin hastalığa yakalanma olasılığı kadınlara göre iki ile üç kat daha fazladır ve hastalığın görülme yaşı 50 ile 60 yaş arasındadır (Wee et al. 2010).

Orofarenks skuamöz hücreli karsinomların (OFSHK) insidansı her yıl artmakla birlikte ABD'de yılda 11.000'in üzerinde yeni vaka görülmektedir. OFSHK 1975 yılında ABD'de tanılanan tüm baş ve boyun kanserlerinin yaklaşık olarak %15'ini oluşturmaya rağmen, 2008 yılında yeni vakaların yaklaşık olarak %25'ini oluşturduğu belirlenmiştir. Orofarenks kanserleri, ağzın arka tarafındaki orofarenksin alt bölgeleri, dil tabanı, yumuşak damak ve fareks duvarlarında gelişmektedir (Brown et al. 2011; Skinner et al. 2012). Orofarenks kanseri büyük ölçüde 50-64 yaş arası erkeklerde görülmekle birlikte insidansı son on yılda yaklaşık olarak iki katına çıkmıştır. OFSHK insidansı etnik ve ırksal gruplar arasında karşılaştırıldığında beyaz ırkta siyah ırka göre daha yüksektir. Tüm BBSHK ile benzer şekilde tüm OFSHK'ların yaklaşık olarak %75'i aşırı alkol ve tütün kullanımıyla ilişkilendirilmiştir (Skinner et al. 2012).

1.3.3. Larenks kanserleri

Larenksin temel işlevi, nefes almak, konuşmaya izin vermek ve yutma sırasında hava yolunu korumaktır. Özellikle tedavi sırasında çoğu organ koruma stratejisi larenks fonksiyonunu korumayı veya potansiyel olarak onarmayı amaçladığından larenks anatomisinin bu fonksiyonlara nasıl katkıda bulunduğunu anlamak önemlidir. Tümörün bulunduğu bölge larenks kanser (LK) gelişimi sırasındaki hem mevcut semptomları hem de tanı anındaki evreyi etkileyebilmektedir. Glottis bölge tümörleri genellikle daha erken evrelerde ses değişikliğine neden olabilmektedir. Supraglottis tümörleri semptomatik hale gelmeden önce uzun süre boyunca nispeten yaşam kalitesini etkilemeden büyüyebilir ve ilerleyen evrelerde hasta sıklıkla nefes darlığı veya ses değişikliği ile başvurur. Subglottis tümörleri ise sıklıkla subglottisin dar yapısı nedeniyle daha erken evrede hava yolu engeli ile ortaya çıkmaktadır (Steuer et al. 2017).

2016 yılında tahmini olarak 13.430 yeni LK vakası tanısı konulmuş ve yaklaşık olarak 3.620 kişi hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir. LK erkek bireylerde 100.000’de 5,8 vaka ile kadın bireylerde 100.000’de 1,2 vaka ile erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir. Ayrıca, Afrikan Amerikalı’larda daha genç yaşta ortaya çıkması ve Kafkasyalı’lara kıyasla daha yüksek insidans ve mortaliteye sahip olması nedeniyle LK’da gözlemlenen ırksal farklılıklar da vardır (Steuer et al. 2017). Hastaların yaklaşık olarak %60’ı ileri evre (evre III veya IV) hastalık ile kliniklere başvurmaktadır. LK hastalarının hayatta kalma oranı, erken evre T1 ve T2 tümörler için %80 ile %90’a varan tedavi oranlarıyla, hastalığın ilk evresi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Evre IV hastalığı olan bireylerde sağkalım oranı başvuru anında %40’a kadar düşmektedir. LK ilerleyen yaşla birlikte ve erkeklerde daha sık görülmektedir. LK insidansı erkeklerde kadınlara oranla 5 kat daha fazladır. LK hastalarda medyan tanı yaşı 65 iken, medyan ölüm yaşı 68’dir (Obid et al. 2019). LK, genel insidansı azalan aynı zamanda son 40 yılda 5 yıllık sağkalım oranı düşen (%66’dan %63’e) nadir birkaç onkolojik hastalıktan biridir (Groome et al. 2003). Bu da LK ile ilişkili daha fazla araştırma ve yenilik ihtiyacını vurgulamaktadır.

LK, yeni kanser vakalarının yalnızca küçük bir kısmını oluşturmalarına rağmen, hastaların yaşam kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir. Konuşma, nefes alma ve yutma

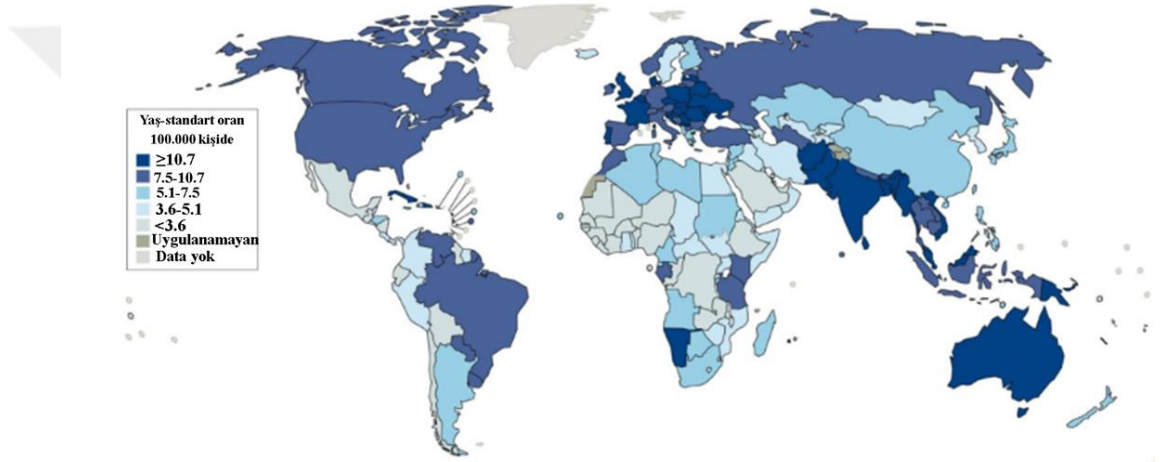
ile ilgili zorluklar LK'nin doğrudan etkilerinden sadece birkaçıdır. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yaklaşımları tedavi için potansiyel sunmasına rağmen, kapsamlı multimodalite tedaviler genellikle yutma, nefes alma ve ses fonksiyonlarında daha fazla bozulma ile birlikte yaşam kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Daha yakın yıllarda LK'nin tedavisi larenksi korumayı ve böylece hayatta kalma oranlarından ödün vermeden yaşam kalitesini iyileştirmeyi amaçlamıştır (Obid et al. 2019).

LK patogenezinde birçok risk faktörü rol oynamaktadır. LK için başlıca risk faktörü tütündür; diğer faktörler ise laringofaringeal reflü, HPV enfeksiyonu, çevresel veya mesleki maruziyetler ve alkoldür. Kadınlarda LK insidansı, son on yılda kadınlarda sigara kullanımındaki artışa paralel olarak artmıştır (Obid et al. 2019). Sigara kullanan bireylerin sigara kullanmayan bireylere kıyasla 10-15 kat daha yüksek LK geliştirme riski olduğu, en ağır sigara içen bireylerde ise bu riskin 30 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Tütün kullanımının azalmasıyla birlikte LK insidansı son 10 yılda her yıl %2,4 oranında azalmaktadır. Sigara içmeyen genç bireylerde LK için bir risk faktörü olarak HPV rolü halen araştırılmaktadır. Araştırmalar ayrıca tüketilen alkol miktarı ile LK riski arasında doğrusal bir ilişki olduğunu da göstermiştir (Steuer et al. 2017).

1.4. Baş ve Boyun Kanserlerinin İnsidansı, Prevalansı ve Ölüm Oranı

BBSHK 2018 yılında görülen 890.000 yeni vaka ve 450.000 ölüm sayısı ile dünya genelinde en yaygın görülen altıncı kanser türüdür. BBSHK insidansı her yıl artmakla birlikte (yılda 1,08 milyon yeni vaka) 2030 yılına kadar mevcut BBSHK vaka sayısının yaklaşık %30 artması beklenmektedir (Bray et al. 2018; Ferlay et al. 2019; Johnson et al. 2020). Güneydoğu Asya ve Avusturalya gibi bölgelerde BBSHK yüksek prevelansı kanserojen spesik ürünlerin tüketimi ile ilişkilendirilirken, HPV ile ilişkili orofarenks karsinomların oranı ABD ve Batı Avrupa ülkelerinde BBSHK prevelansına katkıda bulunmaktadır (Şekil 1.5) (Hashibe et al. 2007; Mehanna et al. 2013; Jiang et al. 2019). Genel olarak erkek bireylerde kadın bireylere göre BBSHK gelişme riski 2-4 kat daha fazladır. Viral ilişkili olmayan BBSHK için medyan tanı yaşı 66 iken, HPV ile ilişkili orofarenks kanserleri ve Epstein-Barr virüsü (EBV) ile ilişkili nazofarenks kanserleri için medyan tanı yaşı sırasıyla ~53 ve ~50'dir (Fung et al. 2016; Windon et al. 2018). SEER verilerine göre BBSHK için hayatta kalma oranı son 30 yılda iyileşme göstermektedir.

Tüm yaş grupları ve hasta bireyler anatomik olarak analiz edildiğinde 5 yıllık sağkalım oranı 1992–1996 yıllarında %55 iken bu oran 2002–2006 yıllarında %66’ya yükselmiştir. Alt grup analizi, 75 yaş altı tüm bireylerde ve larenks hariç BBSHK gelişen tüm anatomik bölgelerde sağkalımın iyileştiğini kaydetmiştir. Sağkalımdaki iyileşmenin nedeni olarak BBSHK tedavisindeki gelişmelerden ziyade, iyi bir prognoza sahip olan HPV ilişkili BBSHK popülasyonlarının ortaya çıkması düşünülmektedir. HPV ilişkili BBSHK hastalarına ait yapılan değerlendirmeyi içeren SEER verileri HPV-pozitif hastalarda sağkalımın iyileştiğini fakat HPV-negatif hastaların sağkalımında önemli bir değişiklik olmadığını ortaya koymaktadır (Chaturvedi et al. 2011).



Şekil 1.5. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomun global insidansı Johnson et al. (2020)’dan değiştirilerek alınmıştır.

1.5. Baş ve Boyun Kanserlerinin Epidemiyolojisi

Baş ve boyun bölgesinde ortaya çıkan kanserlerin geniş heterojenliği nedeniyle, baş ve boyun kanserlerinin epidemiyolojisini karakterize etmek oldukça zordur. Geleneksel olarak BBSHK’nin %80-90’ının gelişimi için tütün ve alkol tüketiminin, başlıca risk faktörlerini oluşturdukları iyi bilinmektedir (Kim et al. 2010; Vučićević Boras et al. 2019). Sigara kullanan bireyler için baş ve boyun kanseri geliştirme riski, sigara kullanmayan bireylere göre 5-25 kat daha fazladır ve bu risk sigara içme sıklığı, süresi ve sigara maruziyeti ile ilişkili olarak artmaktadır. Sigarayı bıraktıktan sonra zaman geçtikçe risk önemli ölçüde azalmakta, ancak bu risk asla sigara içmeyenlerin düzeyine ulaşamamaktadır. Aktif tütün kullanımı baş ve boyun kanserleri için ana risk faktörü

olmasına rağmen, pasif içicilikte artan baş ve boyun kanser riski ile ilişkilendirilmektedir (Kim et al. 2010). Yapılan uluslararası bir analizde, hem evde hem de işte 15 yıldan fazla bir süre boyunca pasif içiciliğe uzun süre maruz kalma özellikle farenks ve larenks kanserleri ile önemli ölçüde ilişkilendirilmiştir (Kim et al. 2010). Ayrıca sigara içme alışkanlığının erkeklerde kadınlara göre daha yüksek olması erkeklerde baş ve boyun kanseri insidansının kadınlara göre daha yüksek olmasıyla da doğrudan ilişkilidir (Vučićević Boras et al. 2019). Tek başına ağır alkol tüketimi önemli bir risk faktörüken, tütün kullanımıyla birlikte sinerjistik olarak baş ve boyun kanserleri için daha etkili bir risk faktörüdür (Kim et al. 2010). Günde üç veya daha fazla içecek olarak tanımlanan yüksek alkol tüketimi, diğer faktörlerden bağımsız olarak orofarenks, hipofarenks ve larenks kanseri riskinin artmasına katkıda bulunmaktadır (Kim et al. 2010).

Dünya genelinde tanısı konan BBSHK vakalarının beşte biri sigara veya alkol tüketiminden bağımsız olarak gelişmektedir (Argiris et al. 2008). HPV, baş ve boyun kanserleri için iyi bilinen bir başka etiyolojik faktördür (Vučićević Boras et al. 2019). Yüksek riskli HPV türleri (HPV 16, 18, 31 ve 33) ile enfeksiyon, farklı klinik ve moleküler özellikleri ile BBSHK patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (Argiris et al. 2008). HPV'nin oral ve orofarenks karsinogeneindeki rolü ilk olarak 1983 yılında OSHK biyopsilerinde görülen karakteristik HPV morfolojisi ve immünohistokimyasal özelliklerine dayanarak önerilmiştir (Kim et al. 2010). HPV, özellikle HPV 16, baş ve boyun kanserlerinin bazı türleri ile ilişkili bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Kim et al. 2010). Orofarenks kanserlerin yaklaşık %50'sinde onkogenik HPV DNA'sının bulunmasıyla, HPV'nin baş ve boyun kanseri gelişimine önemli katkıda bulunduğu dair bulgular vardır (Kim et al. 2010). Ayrıca yapılan çalışmalarda sigara ve alkol tüketimi bulunmayan orofareks kanserli hastalarda HPV bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Kim et al. 2010). İlginç bir şekilde HPV ilişkili baş ve boyun kanserlerinde sağkalım tütün ilişkili gelişen baş ve boyun kanser hastalarının sağkalımlarına göre oldukça yüksektir. Benzer terapötik müdahalelerle tedavi edilen BBSHK hastalarında, sigara kullanan hastaların üç yıllık sağ kalım oranı %57 iken, HPV ilişkili hastaların sağkalım oranının %82 olduğu gösterilmiştir (Argiris et al. 2008).

Baş ve boyun kanseri ile ilişkilendirilen diğer risk faktörleri arasında diyet ve mesleki maruziyetler yer alır. Çok sayıda çalışma baş ve boyun kanser riskini A vitamini

eksikliği ile ilişkilendirirken, diğer çalışmalar yüksek meyve ve sebze tüketimi ile baş ve boyun kanser riski arasında ters bir ilişki tanımlamaktadır. Krom, nikel ve radyum gibi mesleki maruziyetler de baş ve boyun kanserleriyle özellikle sinonazal karsinomlarla ilişkilendirilmektedir (Kim et al. 2010).

Farklı kanser türlerine benzer şekilde baş ve boyun kanseri geliştirme riski yaş ile birlikte artmaktadır. Baş ve boyun kanserleri sıklıkla 50 yaş ve üzeri hastalarda görülmektedir. Sigara ilişkili baş ve boyun kanserleri için medyan tanı yaşı 63'tür (Chang et al. 2017). HPV ile ilişkili baş ve boyun kanserleri genellikle tütünle ilişkili baş ve boyun kanserlerine göre daha genç yaşlarda teşhis edilir. HPV ile ilişkili baş ve boyun kanserleri tanısında medyan tanı yaşı erkekler için 58 iken kadınlar için 61'dir (Malhotra et al. 2017).

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi baş ve boyun kanserleri etiyolojisinde genetik yatkınlık ve genetik polimorfizmler de önemli rol oynamaktadır (Vučićević Boras et al. 2019).

1.6. Baş ve Boyun Kanserlerinin Tedavi Yaklaşımları

BBSHK hastalarının tedavisinde kullanılacak yöntem, tümörün bulunduğu anatomik bölgeye, tümör evresine ve tedavi sonrası organın korunması beklentisine bağlı olarak seçilmekte, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yalnız veya farklı kombinasyonlarda kullanılmaktadır. Lokal veya erken evre baş ve boyun kanserleri (Evre I ve II), hastaların yaklaşık olarak %40'ına baş ve boyun kanseri tanısı konulduğu evredir ve yalnızca cerrahi veya radyoterapi ile tedavi edilebilmektedir. Bu yöntemlerle tedavi edilen erken evre hastaların yaklaşık %80-90'ında iyileşme gözlenmektedir (Marur and Forastiere 2008; Pfister et al. 2013). Lokal olarak ileri evre BBSHK (Evre III ve IV) genellikle cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi birden fazla tedavi yaklaşımının kombinasyonu ile tedaviyi gerektirmektedir (Koh et al. 2019). Metastatik BBSHK, tek ajanlı kemoterapi veya kombinasyon kemoterapi ile tedavi edilmektedir (Marur and Forastiere 2016). Kemoterapi ve radyoterapinin birlikte uygulanması (kemoradyoterapi) ileri evre BBSHK hastaları için daha umut verici tedavi yaklaşımı olmuştur (Vokes and Weichselbaum 1990). Birkaç faz III klinik çalışma, ileri evre BBSHK hastalarında

kemoradyoterapinin tek başına radyoterapiden veya kemoterapi ve radyoterapinin ardışık uygulanmasından daha iyi sonuçlar verdiğini de göstermektedir (Argiris et al. 2008). Lokal veya bölgesel nüksün tedavisi nüks bölgesine, tümör yüküne ve hastanın önceki tedavisine bağlıdır. Bu durumda hastalık yeniden cerrahi veya radyasyon ile tedavi edilemiyorsa cerrahi ve radyasyon tedavi yaklaşımlarına alternatif veya ek olarak kemoradyoterapi ile tedavi edilebilmektedir (Marur and Forastiere 2016). Klinik olarak nodal tutulumu olmayan veya sadece tek bir nodüle tutulumu olan primer baş ve boyun kanseri hastalarında, cerrahi rezeksiyon veya radyoterapi ile %80'in üzerinde iyileşme oranı elde edilebilmektedir (Chow 2020).

Tedavi yaklaşımları primer tümör bölgesine göre farklılık göstermektedir. Erken evre OSHK hastaları cerrahi veya radyoterapi ile tedavi edilebilmektedir. Bu tedavi yaklaşımları arasındaki etkinlik karşılaştırılabilir olmasına rağmen, radyasyonun geç toksik etkilerinden kaçınılabilmesi ve böylece en doğru evrelemenin elde edilebilmesi için genellikle cerrahi ilk tedavi seçeneği olarak tercih edilmektedir. Klinik olarak etkilenmemiş boyundaki ipsilateral servikal lenf nodlarının seçici fonksiyonel boyun diseksiyonu, gizli boyun lenfadenopatisi için yüksek risk taşıyan hastalarda standart bir prosedür olmaya devam etmektedir (Duvvuri et al. 2004). Larenksi koruyan cerrahi tedavi yaklaşımının yanı sıra radyoterapi, erken evre larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarının tedavisi için kabul edilebilir seçeneklerdir, fakat tedavi seçimi, tümörün lokasyonuna, tedavi merkezinin uzmanlığına ve hasta tercihine bağlı olarak değişmektedir (Dey et al. 2002; Jones et al. 2004). Erken evre oral ve hipofarenks skuamöz hücreli karsinom hastaları için, radyoterapi yaklaşımı tedavide cerrahi ile karşılaştırılabilir başarı oranı sağladığı ve genellikle daha düşük morbidite ile ilişkili olduğu için genellikle ilk tedavi seçeneği olmaktadır (Mendenhall et al. 2006; Nakamura et al. 2006; Argiris et al. 2008). Ağız boşluğu kanserleri için genellikle cerrahi tedavi yaklaşımı seçilirken, farenks ve larenks kanserleri için radyoterapi daha yaygın olarak kullanılabilmektedir. Larenks kanserleri için orta derecede hipofraksiyone radyoterapi, standart radyoterapiye göre daha iyi lokal kontrol sağlamak ve daha iyi sağkalım ile sonuçlanmaktadır (Chow 2020).

Baş ve boyun kanserleri için cerrahi tedavi yaklaşımı, net sınırların elde edilebildiği ve organ fonksiyonunun korunabildiği rezektabl tümörler için tercih

edilmektedir. Anatomi ve tümör özelliklerine bağlı olarak klasik açık cerrahi, transoral robotik cerrahi veya lazer cerrahisi gibi tümör sınırlarında minimal invaziv prosedürler kullanılmaktadır. Klasik cerrahi tedavi yaklaşımı yüzeysel deformiteye ve organda işlev bozulmasına neden olabilmektedir. Mevcut transoral robotik cerrahi, fonksiyon koruyucu bir strateji olarak kemoradyoterapiye alternatif olarak sunulmaktadır. Deneyimli ekip ile transoral robotik cerrahi, cerrahi tedavi yaklaşımına uygun baş ve boyun kanserli hastalar için etkili ve onkolojik olarak güvenilir görünmektedir. Fakat transoral robotik cerrahinin klinik denemeleri tamamlanmamış olup halen daha devam etmektedir (Cohen et al. 2011; Kofler et al. 2014; Marur and Forastiere 2016).

Primer ve sekonder maligniteler ile tekrarlayan baş ve boyun kanserleri için ana tedavi seçeneği cerrahi tedavi yaklaşımıdır (Boehm et al. 2010). Erken evre orofarenks, hipofarenks ve supraglottik karsinomların tedavisinde transoral lazer destekli cerrahi ve ardından radyoterapi kullanımı yaygın bir uygulamadır (Karatzanis et al. 2010a). Öte yandan, erken glottik karsinomlar, transoral lazer cerrahisi ya da radyoterapi ile tek bir tedavi yaklaşımı sonrası oldukça başarılı onkolojik sonuçlar göstermektedir (Karatzanis et al. 2010b).

Lokal olarak ileri evre baş ve boyun kanserli hastalarda hastalığın tedavisi için radyoterapi, cerrahi veya kemoterapi ile birlikte kullanılmaktadır. Baş ve boyun kanseri için kullanılacak radyasyon dozu, tedaviye başlangıç zamanına ve adjuvan terapiler ile kullanımına bağlı olarak 55 Gray (Gy) ile 70 Gy arasında değişmektedir (Marur and Forastiere 2016). Radyasyon Terapisi Onkoloji Grubu'nun yapmış olduğu faz 3 denemesinde standart veya hızlandırılmış radyasyona ek her iki gruba da eş zamanlı sisplatin muamelesi ile iki grup karşılaştırıldığında bölgesel tümör büyüklüğü ve geç komplikasyonlar açısından herhangi bir fark bulunamamıştır (Nguyen-Tan et al. 2014). Tükürük bezleri, farenks ve tiroid bezine 55 Gy'yi aşan dozda radyasyon tedavisinin uzun süreli verilmesiyle toksisite riski artmakta, bu da ağız kuruluğu, disfaji, endoskopik gastrostomi tüpü bağımlılığı, kronik aspirasyon ve hipotiroidizme yol açmaktadır (Marur and Forastiere 2016). Yapılan son çalışmalar, yoğunluk ayarlı radyoterapi yaklaşımı ile, tedavi edilen baş ve boyun kanserli bölgelerde doz kısıtlamalarının uygulanmasına izin vermektedir (Vlacich et al. 2014). Yoğunluk ayarlı radyoterapi, hedef tümöre daha homojen doz kapsamı ve çevre dokulara dozun azalması ile geleneksel RT (2D) ve

konformal radyasyon (3D) gibi geleneksel tekniklerle karşılaştırıldığında, giderek daha avantajlı olduğu gösterilmiştir. Hedefe özgü en yüksek doz, daha iyi tümör kontrolü ve daha iyi hayatta kalma oranları ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca BBSHK hastalarında kullanılan hiperfraksiyone radyasyon tedavisi de vardır. Ancak bu tedavi seçeneği, oral mukozit gibi mukozada farklı yoğunluklarda reaksiyon geliştirerek belirgin ağrı, çiğneme ve yutma güçlüğüne neden olabilir ve baş boyun kanseri tedavisi sırasında en zayıflatıcı akut reaksiyon olarak kabul edilir (Santos et al. 2011). Bununla birlikte, orofarenks kanserlerinin tedavisinde farenks konstriktör kaslara doz kısıtlamaları ile alan sınırlaması yapmak oldukça zordur ve aspirasyon, disfaji ve endoskopik gastrotomi tüpü bağımlılığı riski hala mevcuttur (Vlacich et al. 2014). Baş ve boyun kanserli hastalarda radyasyon kaynaklarını ışınlanacak dokularla doğrudan temas halinde kullanan brakiterapi tedavisinin kullanılması ise yumuşak doku nekrozu gelişme riskini artırabilmektedir (Jham and da Silva Freire 2006).

Kemoterapi, indüksiyon kemoterapisinde radyoterapi ile birlikte adjuvan tedavi olarak kullanılmıştır. 1965 ve 2000 yılları arasında baş ve boyun kanserlerinde tümör bölgesinde yürütülen klinik çalışmaların kapsamlı bir meta-analizi, yalnızca sisplatinin radyasyonla birlikte uygulanmasının baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde kemoradyasyon başarısını artırdığını göstermiştir (Pignon et al. 2000; Blanchard et al. 2011). Baş ve boyun kanserlerinde yapılan bir diğer meta-analiz, kemoradyasyonla tedavinin tedavide başarı oranını 2 yılda %7 ve 5 yılda %8'e kadar artırdığını ortaya koymaktadır (Pignon et al. 2000). Sonraki yıllarda, kemoradyoterapi için alternatif ilaçlar olarak cetuximab ve panitumumab araştırılmıştır. Lokal ileri evre baş ve boyun kanserinde tek başına radyasyonu, radyasyon ve eşzamanlı haftalık cetuximab tedavisi ile karşılaştıran faz 3 çalışması, kombinasyon tedavi ile genel sağkalımın ve bölgesel nüks olmayan sağkalım süresini iyileştirdiğini ortaya koymuştur (Bonner et al. 2010). Buna karşılık, radyoterapi ile sisplatine cetuximabın eklenmesi, bir faz 3 çalışmasında tek başına radyoterapi ile sisplatine göre baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde herhangi bir başarı göstermemiş olmasına rağmen cetuximab, sisplatin ve radyoterapi muamlesiyle akut toksisite oldukça artmıştır (Ang et al. 2014). Radyoterapi ile sisplatine panitumumab eklenmesi ve sisplatin ve radyoterapi ile karşılaştırıldığında daha kötü genel sağkalım sonucu göstermiş, benzer toksisite bulguları bildirilmiştir (Giralt et al. 2015).

Cisplatin, tekrarlayan ve metastatik baş ve boyun kanserli hastaların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, postoperatif yüksek doz sisplatinin radyoterapi ile birlikte uygulanması, lokal olarak ileri evre BBSHK'li hastalarda tek başına radyoterapiden daha etkili olmakla birlikte daha az geç komplikasyonlara neden olmaktadır (Bernier et al. 2004). Veriler, tek ilaç olarak 5-florourasil (5-FU), sisplatin, karboplatin ve mitomisin C ile kombine radyasyon tedavisinin veya eş zamanlı 5-FU'nun diğer ilaçlardan biri ile kombinasyonlarının, radyasyon tedavisinden bağımsız olarak büyük bir hayatta kalma avantajı sağladığını göstermektedir (Budach et al. 2006).

Cetuximab, nükseden veya metastatik hastalığın birinci basamak tedavisinde ve platine dirençli hastalığın ikinci basamak tedavisinde kemoterapi ile birlikte kullanılabilir (Shin and Khuri 2013). Bir faz III çalışmasından elde edilen veriler, cetuximab ile birlikte radyoterapinin, bölgesel olarak ileri evre BBSHK hastaları için etkili bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, cetuximab ile birlikte radyoterapi, lokal kontrol ve sağkalımda önemli gelişmelere yol açmıştır ve bu sağkalım iyileştirmeleri, tek başına radyoterapi ile karşılaştırıldığında, 5 yıllık genel sağkalım oranında cetuximab ile birlikte radyoterapi için %9 artış ile uzun vadede korunabilmektedir. Cetuximab ve eş zamanlı kemoradyoterapi kombinasyonu şu anda faz III denemelerinde araştırılmaktadır. Larenks kanserlerinin tedavisinde indüksiyon kemoterapiden sonra cetuximab ve radyoterapi kombinasyonunun, platin bazlı kemoterapi ve eş zamanlı radyoterapiden daha etkili sonuçlar gösterdiği ortaya konulmuştur (Bourhis et al. 2010).

Taksanlar, dosetaksel ve paklitaksel, baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Birkaç faz II çalışması, 5-FU bazlı indüklenmiş kemoterapiye eş zamanlı olarak taksan eklenmesinin kemoterapiye yanıtı iyileştirdiğini göstermiştir. Dosetaksel ve 5-FU'nun birlikte ya da yalnızca 5-FU kullanıldığı indüklenmiş kemoterapi yaklaşımını karşılaştıran bir faz III çalışmasının sonuçları, bu tedavilere bir taksanın dahil edilmesinin, lokal olarak ilerlemiş baş ve boyun kanserinde klinik yanıtı ve sağkalımı önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. Bununla birlikte paklitakselin, özellikle sisplatin gibi diğer nörotoksik ajanlarla birlikte kullanımının nörotoksisite geliştirilmesine neden olarak farklı biyolojik sonuçlara da yol açabileceği bildirilmiştir (Posner 2005; Galbiatti et al. 2013).

Negatif cerrahi sınırlar elde etmek baş ve boyun cerrahisinin temel amacı olmasına rağmen, bazı durumlarda karotid arter veya prevertebral fasya gibi hayati yapıların infiltrasyonu nedeniyle bunu başarmak imkansız olabilmektedir. Negatif sınırlara ulaşmak bazen çiğneme, yutma ve konuşma gibi önemli işlevlerde bozulmaya neden olmakta ve yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir (Haque et al. 2006). Ancak, pozitif cerrahi sınır hastalarda sağkalımın azalmasıyla önemli derecede ilişkilidir, bu nedenle tümör tamamen çıkarılmamışsa hasta yeniden ameliyat edilmelidir (Sessions et al. 2000). Primer radyokemoterapi ileri evre baş boyun kanserli hastalarda organ fonksiyonunun korunması için alternatif bir tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır.

Lokal ileri evre baş ve boyun kanserlerinde sisplatin ve 5-FU ve ardından radyoterapi ile indüksiyon kemoterapi kavramı 1965-2000 yılları arasında araştırılmıştır. Yapılan bir meta-analiz, baş ve boyun kanserli hastaların tedavisinde tek başına radyoterapi ile karşılaştırıldığında, radyoterapi öncesi indüksiyon kemoterapisi ile %2,2'lik anlamlı olmayan başarı göstermiştir (Pfister et al. 2013). Daha yakın zamanlarda, sisplatin ve 5-FU'ya eklenen taksan kombinasyonu, bu tür bir tedavi gerektiğinde standart indüksiyon kemoterapi rejimi haline gelmiştir. İndüksiyonlu sisplatin ve 5-FU'yu taksan, sisplatin ve 5-FU ile doğrudan karşılaştıran çalışmalar, taksanın üçlü ilaç rejimi için progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalımda önemli bir gelişme ortaya çıkarmıştır (Marur and Forastiere 2016).

Baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde platin bileşikler, antimetabolitler ve taksanlar gibi çeşitli kemoterapötik ajan sınıfları, önemli kemoterapi aktivitesi göstermektedir (Colevas 2006). Platin bileşiği sisplatin, radyoterapi veya diğer kemoterapi ajanlarıyla kombinasyon halinde standart bir terapi olarak kabul edilmektedir. EGFR inhibitörlerinin moleküler olarak hedeflenen diğer ajanlar ile kombinasyonu yeni bir tedavi yaklaşımı olarak düşünülürken bu yeni ajanların kemoterapi ve radyoterapi ile kombinasyonu, metastatik baş ve boyun kanseri hastalarında EGFR, HER2, HER3 ve MET spesifik hücre zarı büyüme faktörü reseptörlerini veya NOTCH1, PI3K, MTOR, EGFR-RAS-RAF1-MEK ve WNT/ β -katenin downstream sinyal yolu mutasyonlarını hedef alan tedaviler şu anda araştırılmaktadır (Marur and Forastiere 2016).

1.7. Baş ve Boyun Kanserlerinin Tedavisinde Çevresel Faktörlerin Etkisi

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, çevresel faktörlerin yalnızca tümör indüklenmesini ve yayılımını değil, aynı zamanda hastaların tedaviye verdikleri yanıtları da etkilediğini göstermektedir. Örneğin, tedavi sırasında sigara kullanımı, artan semptomlar ile ilişkilendirilmiştir ve metabolik enzimlerin transkripsiyonel, epigenetik regülasyonu ile antikanser ajanların değişken farmakokinetik bozulmalarına neden olabilmektedir (Peppone et al. 2011; Petros et al. 2012; O'Malley et al. 2014). Radyoterapi sırasında sigara kullanımı, baş ve boyun kanserli hastalarda azalan tedavi yanıt oranları ve sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Browman et al. 1993). İlginç bir şekilde, mikrobiyal etkileşimlerin de antikanser tedavilerin etkinliğini etkilediği bildirilmiştir. Örneğin, genellikle süt ürünlerinde bulunan *Lactobacillus brevis* CD2 suşlarının kemoterapi veya radyoterapi alan baş ve boyun kanserli hastalarda malign mukoz tabakasının yoğunluğunu azaltarak tedavinin tamamlanmasında önemli bir indükleyici rolünün olduğu bulunmuştur (Sharma et al. 2012; Sharma et al. 2016). Ayrıca, yapılan araştırmalar, *in vivo* modellerden ve hastalardan elde edilen belirli bağırsak bakterilerinin, immünoterapötik CpG-oligonükleotitleri ve immün kontrol noktası blokajlarını güçlendirmek gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla kanser immünoterapisinin sonucunu olumlu yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir (Guan et al. 2019). Dikkat çekici bir şekilde, son araştırmalar, köpek tenyası *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*) gibi bazı parazitlerin de kansere karşı koruyucu bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Mekanizması henüz net bir şekilde ortaya koyulmamasına rağmen, *E. granulosus*'un antikanser etkisini dolaylı olarak konak immün aktivasyonu yoluyla gerçekleştirebileceği öne sürülmüştür (Guan et al. 2019).

Antikanser tedavileri sırasında belirli diyetlerin hastalar üzerindeki etkisine ilişkin klinik öncesi ve klinik araştırmalar da oldukça fazladır (Mittelman 2020). Birkaç çalışma, düşük kalorili diyetlerin hem kemoterapi hem de radyoterapi tedavileri üzerinde sinerjik bir etkiye sahip olduğunu ve tedavi toksisitelerini büyük ölçüde azalttığını ortaya koymaktadır (Mittelman 2020). Farelerde düşük kalorili veya ketojenik diyetlerin karboplatin gibi antitümör ajanların sağkalım üzerindeki etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (Allen et al. 2013). Düşük kalorili diyetler hala sorgulanmaya açık olsa da, baş ve boyun kanseri hastaları için destekleyici tedavi seçenekleri olarak potansiyel

faydalarına ilişkin güçlü parametreler özetlenmiştir (Klement 2014). Bununla birlikte, bu faktörlerin kanser tedavileri üzerindeki etkilerinin altında yatan biyolojik mekanizmalar ve etkileşimler henüz ortaya konulmamıştır. Bu faktörlerin daha yüksek terapötik etkileri için kullanımına ilişkin daha fazla araştırma gerekmektedir.

1.8. Baş ve Boyun Kanserlerinde Tanı

Baş ve boyun kanseri tanısı konulacak hastalarda fiziksel muayenede saptanan mukozal anormalliklerin ve primer olarak yeri bilinmeyen malign lenf düğümlerinin endoskopi ve saptanan anormalliklerin biyopsileri ile daha fazla araştırılması gerekmektedir. Primer bölgesi bilinmeyen baş ve boyun kanserli hastalarda, nazofarenks, hipofarenks ve dil kökünden biyopsi ve ayrıca ipsilateral veya bilateral tonsillektomi yapılmalıdır (Stoeckli et al. 2001; Guardiola et al. 2006).

Tanı konulduktan sonra doğru evreleme için hastalığın lokal ve bölgesel yaygınlığı belirlenmeli ve radyografik görüntüleme çalışmaları ile uzak metastaz olasılığı araştırılmalıdır. Baş ve boyun kanserinin ilk değerlendirmesi için, genellikle primer tümör bölgesi ve boyun kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme veya yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografisi (BT) yapılmaktadır. Uzak metastaz riski yüksek olan, nodal metastazları olan ve yüksek riskli tütün kullanan baş ve boyun kanserli hastalar için ikincil bir primer tümörü dışlamak için göğüs görüntülemesi de önerilmektedir (Baker and Latack 1986; van den Brekel et al. 1994).

Pozitron emisyon tomografisi (PET), baş ve boyun kanserlerinin hem ilk evrelemesi hem de tedaviden sonra yeniden evreleme için yaygın olarak kullanılmaktadır (Marur and Forastiere 2008). PET, malign lenf nodu ile başvuran hastada bilinmeyen bir primer tümörü lokalize etme, tümörü evreleme ve kemoradyoterapiden sonra kalıcı hastalığı tanımlamak için kullanılabilir (McGuirt et al. 1998). İlk evrelemenin yanı sıra, rutin görüntüleme çalışmalarında şüpheli bulguların değerlendirilmesinde de en çok kullanılan tanı yöntemidir (Ha et al. 2006). PET yüksek çözünürlüklü BT ile karşılaştırıldığında lenf nodu metastazlarını saptamak için yaklaşık olarak %90 duyarlılığa ve %94 özgüllüğe sahipken BT yaklaşık olarak %82 duyarlılığa ve %85 özgüllüğe sahiptir (Fischbein et al. 1998).

1.9. Baş ve Boyun Kanserlerinde Evreleme

Baş ve boyun kanserlerinde doğru evreleme, gerekli tedavi yaklaşımına karar vermeyi yönlendiren en önemli faktördür (Argiris et al. 2008). Evreleme yöntemleri, baş ve boyun cerrahî tarafından muayeneyi ve genellikle boynun tomografi veya manyetik rezonans ile veya her ikisi ile görüntülenmesini gerektiren radyolojik değerlendirmeyi içerir. Baş ve boyun kanserleri için en sık uzak metastaz yeri akciğerdir bunu lenf nodları, karaciğer ve kemikler takip etmektedir (Argiris et al. 2008).

Avustralya’da, TNM sistemi baş ve boyun kanserlerini evrelemek için en sık kullanılan yöntemdir. TNM, tumor-nodes-metastasis kısaltmasıdır. Bu sistemde her harfe kanseri tanımlamak için bir numara atanır. Baş ve boyun kanserleri tanılandıktan sonra, TNM numaralarına dayanarak kanserin genel evresi I, II, III veya IV olarak bir ölçekte hesaplanır. Baş ve boyun kanser türleri farklı şekillerde evrelendirilir. HPV ile bağlantılı olup olmaması baş ve boyun kanserlerinin evrelenme şeklini değiştirmektedir. Genel olarak evre I ve II, kanserin küçük olduğu ve primer bölgeden farklı bölgelere yayılmadığı erken baş ve boyun kanseri anlamına gelmektedir. Evre III ve IV ise, tümörün daha büyük olduğu ve vücudun farklı bölgelerine yayıldığı ileri evre baş ve boyun kanseri anlamına gelmektedir. Ayrıca, baş ve boyun kanserleri yakındaki doku veya lenf düğümlerine (lokal olarak ileri kanser) veya vücudun diğer bölgelerine (metastatik kanser) yayılımlarına göre de evrelenebilir (Zanoni et al. 2019).

1.10. TNM Evreleme

T (Tumor) 1-4: Primer tümörün büyüklüğünü göstermektedir. Genel olarak, bu evrelemede sayının büyüklüğü arttıkça, doku içerisindeki tümörün o kadar büyük veya o kadar doku derinine doğru büyüdüğünü ifade etmektedir.

N (Nodes) 0-3: Tümörün bulunduğu dokunun yakınındaki lenf düğümlerine yayılıp yayılmadığını göstermektedir. N0, kanserin lenf düğümlerine yayılmadığı anlamına gelmektedir. Ne kadar fazla lenf düğümü etkilenirse veya lenf düğümleri içerisinde ne kadar fazla tümör varsa, N sayının büyüklüğü artmaktadır.

M (Metastasis) 0-1: Tümörün vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmadığını yani metastaz yapıp yapmadığını göstermektedir. M0, tümörün bulunduğu dokudan vücudun diğer bölgelerine yayılmadığı anlamına gelirken, M1 ise tümörün diğer dokulara yayıldığı anlamına gelmektedir (Zanoni et al. 2019; Glastonbury 2020).

1.11. Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinomlarda Genetik Değişiklikler

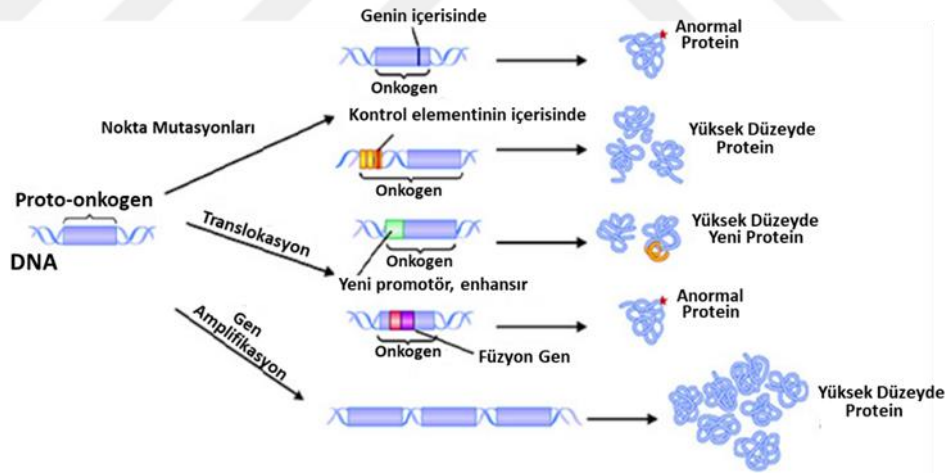
BBSHK fenotipi ile ilişkili moleküler mekanizmaları anlamak için başlatılan çalışmalar, sinyal iletim sürecine katılan genlerdeki değişikliklerin, hücreleri normalden kontrolsüz büyümeye yönlendiren spesifik genetik lezyonlarla sonuçlandığını göstermektedir. Bu değişiklikler, hem büyümeyi teşvik eden genlerin veya onkogenlerin aktivasyonundan hem de tümör baskılayıcı genler veya antionkogenler olarak da adlandırılan büyümeyi kısıtlayan genlerin inaktivasyonundan sorumludur.

1.12. Onkogenlerin Aktivasyonunun Baş ve Boyun Kanseri Gelişimindeki Rolü

Şimdiye kadar yapılan sitogenetik ve moleküler çalışmalar, BBSHK genetik değişikliklerin oluşumunu araştırmış ve onkogen aktivasyonunun hastalığın gelişiminde rol oynadığını göstermiştir. Baş ve boyun kanserlerinde onkogen aktivasyonuna yol açan, gen amplifikasyonları, mutasyonlar, translokasyonlar ve overekspresyonlar olmak üzere genetik ve epigenetik değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu değişikliklerin hastalık progresyonu ve sonucu ile ilişkisi hakkındaki veriler yetersiz kalmıştır.

Proto-onkogenler, embriyogenez, yaraların iyileşmesi, hasarlı karaciğerin rejenerasyonu ve büyüme faktörleri tarafından hücre mitozunun uyarılması gibi çok sayıda kontrollü büyüme prosesinde ifade edilmektedir. Proto-onkogenler yüksek oranda korunan genlerdir ve maya, *Drosophila*, insanlar gibi birbirinden farklı türlerde ifadeleri tespit edilmiştir. Bu genler, büyüme faktörlerini, tirozin kinaz aktivitesine sahip büyüme faktörü reseptörlerini, sinyal iletimindeki düzenleyici proteinleri, reseptör olmayan tirozin kinazları, serin/treonin kinazları ve çok sayıda transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır. Kodlanan proteinler, hücresel büyüme ve farklılaşmada, apoptoz veya programlı hücre ölümünde çok önemli bir rol oynamaktadır.

Onkogenler genetik veya epigenetik değişikliklerle de kanser gelişiminde rol oynayabilmektedir. Hem yapısal hem de düzenleyici değişikliklerin hücresel proto-onkogenlerin aktivasyonunu indüklediği ve bir hücrenin bağımsız olarak büyümesini belirlediği bilinmektedir (Osborne et al. 2004). Nokta mutasyonları DNA dizisinin uğrayabileceği en basit yapısal değişikliklerdir ve kodlanan proteinin amino asit dizisinin modifikasyonu ile sonuçlanan tek baz DNA değişikliklerinden oluşurlar. Çoğu zaman, nokta mutasyonları sonucunda etkilenen proteinde bir fonksiyon kaybı meydana gelirken onkoproteine aktif özellikler de verebilmektedir. Proto-onkogenlerde meydana gelen değişiklikler, bir proto-onkogen taşıyan kromozomal segmentin translokasyonu veya amplifikasyonu ile de meydana gelebilmektedir. Translokasyon ile proto-onkogen taşıyan kromozomal segmentin farklı bir kromozomal bölgeye bağlanarak normalde bulunduğu kromozomda inaktif iken transloke olduğu kromozomal bölgede yakınındaki genlerin aktif promotörlerinin etkisi altında kalarak aktifleşmektedir. Amplifikasyon mekanizması, bir proto-onkogenin düzensiz replikasyonuna yol açar, genin çoklu kopyalarının ve artan miktarda protein ürününün oluşmasına yol açmaktadır (Şekil 1.6) (Urbain 1999).



Şekil 1.6. Proto-onkogenlerin nokta mutasyonları, amplifikasyon ve translokasyon ile aktivasyon mekanizması Albertson (2006)'dan değiştirilerek alınmıştır.

EGFR, *Myc* ve *ERBB2* onkogenlerinin amplifikasyonu ve yüksek düzeyde ifadesi BBSHK'da yaygın olarak gözlenmektedir ve kötü prognoz ile yakından ilişkilidir. *Myc* gen ailesinin üyeleri (*c-Myc*, *N-Myc*, *L-Myc*), transaktivasyon aktivitesine sahip 62 kDa proteinler kodlamaktadır (Bouchard et al. 1998). *Myc*'nin yüksek seviyede ifadesi, *Myc* proteinlerinin miktarının artmasına yol açarak birçok genin düzenlenmesini değiştirerek

malign transformasyona katkıda bulunmaktadır. BBSHK’da literatürde bildirilen *c-Myc* amplifikasyon sıklığı %9-%48 arasında değişmektedir (Field et al. 1989; Rodrigo et al. 1996). İmmünohistokimya analizi kullanılarak değerlendirilen tümörlerin %48’inde *c-Myc* amplifikasyonu gözlemlenmiştir. *c-Myc* amplifikasyonu ile cinsiyet, yaş, tümör boyutu, klinik evre veya farklılaşma arasında bir ilişki bulunmamakla birlikte, yüksek düzeyde *c-Myc* ifadesine sahip baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hastalarının genel sağkalım süresinin kısaldığı belirlenmiştir. Nazofarenks tümörlerinin %22’sinde *c-Myc* amplifikasyonu olduğu ve *c-Myc* amplifikasyonu olan hastaların prognozunun amplifikasyon olmayan hastalarla karşılaştırıldığında daha kötü olduğu gösterilmiştir (Porter et al. 1994).

Her-2 veya *neu* olarak da bilinen *c-erbB-2* *c-erb-B2* geni tirozin kinaz aktivitesine sahip 185 kDa’lık bir proteini kodlamaktadır (Schechter et al. 1984). *c-erb-B2* amplifikasyonu ve yüksek ifadesi birkaç insan tümöründe gözlemlenmiştir. Baş ve boyun karsinomlarında, *erb-B2* amplifikasyon ve yüksek ifade frekansları %0-%41 aralığında değişmektedir (Nagai 1999). *erb-B2* onkogeninde gözlenen genetik değişikliklerin prognostik değeri tartışmalıdır. Field ve arkadaşları ve Craven ve arkadaşları yüksek *erb-B2* ekspresyonu ile klinikopatolojik özellikler veya hasta sağkalımı arasında bir korelasyon olmadığını bildirmiştir (Field et al. 1989; Craven et al. 1992). Bununla birlikte, Press ve arkadaşları yüksek *erb-B2* ifadesi olan tükürük bezi tümörlü hastaların kötü prognoza sahip olduğunu gözlemlemişlerdir (Press et al. 1994).

EGFR baş ve boyun kanseri hücre hatlarında ve primer baş ve boyun tümörlerinde sıklıkla amplifiye ve yüksek seviyede ifade edilmektedir. *EGFR* genetik değişikliklerinin varlığı ile larenks kanserlerinin kötü prognozu arasında önemli bir korelasyon bulunmuştur. Larenks tümörlerinin %61’inde *EGFR*’nin amplifikasyonu ve overekspresyonu tespit edilmiştir ve yüksek ifadesi kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Miyaguchi et al. 1990). Kötü diferansiye larenks tümörlerinde ve kısa hastalıklı ve genel sağkalıma sahip hastalardan alınan tümörlerde yüksek düzeyde *EGFR* ifadesi tespit edilmiştir.

11q13 bölgesinin amplifikasyonu baş ve boyun tümörlerinde sıklıkla görülmektedir. 11q13 kromozomal bölgesinde bulunan *BCL-1*, *INT-2*, *HST-1*, *EMS-1* ve *siklin*

D1/PRAD-1 dahil olmak üzere birkaç olası onkogen tanımlanmıştır. Baş boyun tümörlerinin %30-52'sinde *BCL-1*, *INT-2* ve *HST-1* amplifikasyonu veya koamplifikasyonu saptanmıştır (Berenson et al. 1989; Muller et al. 1997). *INT-2* (*FGF3*) ve *HST-1* (*FGF4*) onkogenleri, hücre proliferasyonu ve anjiyogenez indüklenmesi ile bağlantılı fibroblast büyüme faktörlerinin (FGF) üyeleridir. Bu genler, BBSHK oluşumunda önemli adaylar olarak kabul edilmektedir. Lenf nodu metastazı olan hipofarenks kanseri hastalarında yüksek oranda *HST-1/FGF4* ve *BCL-1* amplifikasyonu gözlenmiştir (Nagai 1999).

Siklin D1'in amplifikasyonu ve yüksek seviyede ifadesi, baş ve boyun kanserlerinin tümörojenik süreci ile önemli bir şekilde ilişkilendirilmiştir. *Siklin D1*'in yüksek seviyede ifadesi, BBSHK'nın %39-64'ünde tarif edilmiştir. Yüksek seviyede *Siklin D1* ifadesi, lenf nodu metastazı ve ileri klinik evreler ile anlamlı olarak ilişkilendirilmiştir (Schuuring et al. 1993).

Son yıllarda bilimsel araştırmalar insan kanserlerinde onkogenlerin potansiyel rolünü açıkça ortaya koymaktadır. İnsan tümörlerinin aktif onkogenler içerdiğinin gösterilmesinden bu yana, kanser gelişiminde onkogenlerin rollerini anlamak için çokça çaba sarf edilmiştir. Yapılan çalışmalar, onkogenlerin ifadelerinin yalnızca kanserin başlaması için değil aynı zamanda hastalığın sürdürülmesi için de gerekli olduğunu göstermektedir. Kanser fenotipi ile ilişkili mekanizmaları aydınlatmak için yapılan çalışmalar, sinyal iletim sürecine katılan genlerdeki değişikliklerin, hücreleri kontrolsüz büyümeye yönlendiren spesifik genetik bozukluklarla sonuçlandığını göstermiştir. Bu değişiklikler, hem büyümeyi teşvik eden genlerin veya onkogenlerin aktivasyonundan hem de tümör baskılayıcı genler veya anti-onkogenler olarak da adlandırılan büyümeyi sınırlandıran genlerin inaktivasyonundan sorumludur. Hem yapısal hem de düzenleyici değişikliklerin hücrel proto-onkogenlerin aktivasyonunu ve hücrenin bağımsız olarak büyümesini desteklediği bulunmuştur.

1.13. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnhibisyonunun Baş ve Boyun Kanseri Gelişimindeki Rolü

Tümör baskılayıcı genler (TBG), fonksiyon kaybı sonucunda malignitelerin artmasına neden olan genlerdir. TBG genellikle büyümenin negatif düzenleyicileridir, hücre adhezyonu ve proteaz aktivitesinin düzenlenmesi gibi invaziv ve metastatik fonksiyonları da düzenleyebilmektedir. Bazı durumlarda, tümör baskılayıcı genlerde mutasyon olmamasına rağmen, genin ifadesini veya fonksiyonunu etkileyen başka bir mekanizma olabilmektedir. Bu mekanizmalar, TBG transkripsiyonunu baskılayan promotör metilasyonunu veya gen ürünü ile etkileşime giren diğer proteinlerdeki anormallikleri içerebilir (Osborne et al. 2004).

Kanser, TBG ve proto-onkogenlerde genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklanan bir hastalıktır. TBG inaktivasyonu, kanser gelişimine katkıda bulunan yaygın bir mekanizmadır. TBG'lerin kanser gelişimindeki rolünü aydınlatmak için geçmişten günümüze kadar oldukça kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Kanserde, Knudson'un çift vuruş modeli hipotezine göre, TBG'lerin tek bir kopyası hücre çoğalmasını kontrol etmek için yeterlidir, bu nedenle, tümör gelişimi ile sonuçlanması için TBG'lerin her iki allelinin de kalıcı olarak inaktive olması veya delesyona uğraması gerekmektedir. Yani TBG'lerdeki mutasyonların tek bir hücre düzeyinde çekinik olduğu, bir TBG'deki tek bir mutasyonun karsinogeneze neden olmak için yeterli olmadığı bilinmektedir. Bununla birlikte, birçok çalışmada, delesyon yerine epigenetik susturma ile etkisiz hale getirilen genler de dahil olmak üzere, bu standart tanıma uymayan aday TBG'ler tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra, ubikitinasyon, anormal hücre lokalizasyonu ve transkripsiyonel düzenleme ile proteozomal degradasyonun da TBG'in inaktivasyonunda önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Sun and Yang 2010).

TBG'ler, DNA hasarı onarımında, hücre bölünmesinin inhibisyonunda, apoptozun indüklenmesinde ve metastazın baskılanmasında rol oynayan önemli gen grubudur. Bu nedenle, TBG'lerin işlevinin kaybı, çok sayıda farklı kanser türünün başlaması ve ilerlemesi ile sonuçlanmaktadır (Sun and Yang 2010). Tümör baskılayıcı genler genel olarak beş türde sınıflandırılır: 1) Hücre döngüsünün belirli bir aşamasına ilerlemeyi kontrol eden hücre içi proteinleri kodlayan genler (örneğin; *pRB* ve *p16*). 2)

Hücre proliferasyonunu inhibe eden salgı hormonları veya gelişim sinyalleri için reseptörleri veya sinyal transdüserlerini kodlayan genler (örneğin; transforme edici büyüme faktörü (*TGF-β*) ve adenomatöz polipozis koli (*APC*)). 3) DNA veya kromozomal hasarlara yanıt olarak hücre döngüsü kontrol noktalarının kontrol proteinlerini kodlayan genler (örneğin;meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini (*BRCA1*), *p16* ve *p14*). 4) Apoptozu indükleyen proteinleri kodlayan genler (örneğin; *p53*). 5) DNA hasarının tamirinde rol oynayan proteinleri kodlayan genler (örneğin; *p53* ve *MSH2*) (Wang et al. 2018).

Spesifik kromozomal bölgelerin delesyonu, solid tümörlerde gözlenen en yaygın genetik mutasyonlardandır ve delesyona uğrayan bölgelerin potansiyel tümör baskılayıcı genler içerdiği de bilinmektedir. BBSHK’da 3p, 5q, 8p, 9p, 9q, 11p ve 17p kromozomal bölgelerde yüksek sıklıkta heterozigosite kaybı bildirilmiştir. Bu kromozomal bölgelerde heterozigosite kaybı, baş ve boyun kanserlerinin gelişimi ve ilerlemesi ile önemli derecede ilişkilendirilmiştir (Ah-See et al. 1994).

p16 ve *TP53* tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen genetik değişiklikler, baş ve boyun kanserlerinde sıklıkla gözlenmektedir. Bu genlerin her ikisinin de inaktivasyonunun, hastalığın erken evrelerinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu genlerin tanısal ve prognostik değeri şu anda belirsizliğini korumaktadır (Nagai 1999).

9p21 kromozomal bölgesinde bulunan *p16* tümör baskılayıcı gen, *p15*, *p21* ve *p27*’yi içeren önemli bir siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDK’ler) grubuna ait olan bir 16-kDa proteini kodlamaktadır. Bu genler hücre döngüsünün G1 fazını negatif düzenlemektedir. *p16* gen ürünü, CDK4 ve CDK6’ya bağlanarak bunların siklin D1 ile birleşmesini engellemektedir. Siklin D1/CDK4/6 kompleks aktivitesinin inhibisyonu, *pRB* fosforilasyonunu ve E2F salınımını önleyerek G1-S geçişinde hücre döngüsünün inhibisyonuna yol açmaktadır (Serrano et al. 1993). *p16* genini inaktive eden genetik anormallikler, tümörojenik sürece katkıda bulunan hücre büyüme avantajları sağlayabilmektedir.

TBG'lerdeki delesyonlar ve hipermetilasyon, BBSHK'nin %20-67'sinde tespit edilmiştir ve p16 inaktivasyonu için de ana genetik mekanizmalar olarak kabul edilmektedir. BBSHK'nin ve pre-invaziv lezyonların önemli bir kısmında p16 ifadesinin baskılandığı veya azalan ifadesi gözlenmiştir. Baş ve boyun tümörlerinde p16 inaktivasyonunun yüksek insidansı, bu genin hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynadığını gösterir. Ancak şu anda, bu bulguların tanısal veya prognostik değeri henüz belirlenmemiştir (Birkeland et al. 2016).

TP53 tümör baskılayıcı geninin normal fonksiyonunun kaybına yol açan genetik değişikliklerin, insan kanserlerinin çoğunun gelişimine katkıda bulunduğuna inanılmaktadır. *TP53* geni 17p13.1 kromozomu üzerinde bulunur ve transkripsiyon faktörü olarak görev yapan spesifik DNA dizilerine bağlanabilen bir nükleer fosfoproteini kodlayan 11 ekzondan oluşmaktadır (Levine 1997). Çoğu *TP53* gen mutasyonu, proteinin evrimsel olarak korunan bölgesini içeren, 5. ve 8. ekzonlarında kümelenme eğiliminde olan yanlış anlamlı mutasyonlardır (Hussain and Harris 1998). Bu yüksek oranda korunmuş bölge, proteinin DNA bağlama bölgesini içeren 102-292 amino asitlerini kapsamaktadır (Cho et al. 1994). Bu nokta mutasyonlarının büyük çoğunluğu, yabancıl tip p53 konformasyonunu değiştirebilmekte, bu da protein stabilizasyonu ve hücrelerde birikmesi ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, bir dizi bulgu, p53'ün hücre döngüsünün hem G1/S hem de G2/M kontrol noktalarında ve birkaç farklı fizyolojik durumda apoptoz indüksiyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

İmmünohistokimyasal çalışmalar, baş ve boyun kanserleri tümör hücre hatlarının %50-%100'ünde p53 birikimi olduğunu göstermektedir. Primer BBSHK hastalarına ait tümörlerin %11-%79'unun p53 immünoreaktivite olduğu tespit edilmiştir. Moleküler çalışmalar, baş ve boyun tümörlerinin yaklaşık %50'sinin *TP53* mutasyonlarını barındırdığını göstermektedir (Nagai 1999).

TP53 genetik değişikliklerinin tümörojenik sürecin farklı aşamalarındaki kesin rolü tam olarak belirlenmemiştir. Baş ve boyun tümörlerinde, baş ve boyun kanserli hastaların normal mukozasında p53 immünoreaktivitesi ve invaziv olmayan lezyonlarda mutasyonlar gözlenmiştir, bu da *TP53* inaktivasyonunun hastalığın erken evrelerinde yer aldığını düşündürmektedir (Gallo and Bianchi 1995).

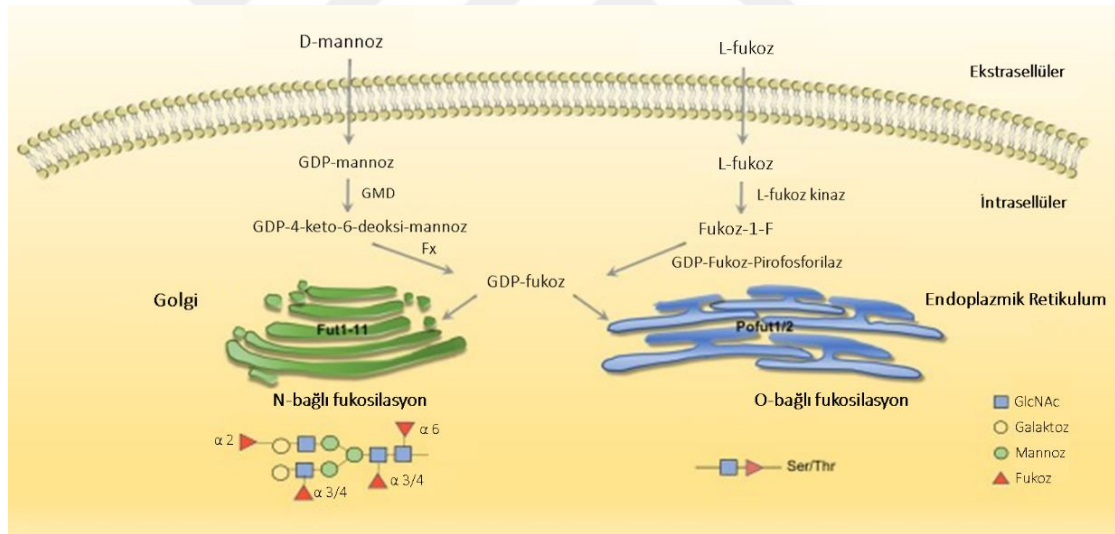
TP53 mutasyonları, tütünle ilişkili kanser türlerinde yaygın bir genetik değişiklik olarak belirlenmiştir. Baş ve boyun kanserli hastalarda, sigara içme öyküsü olan hastalardan alınan tümörlerde pozitif p53 immün boyamanın daha az olduğu görülmektedir. Ek olarak, p53 ifadesinin, sigara içmeyen hastalardan alınan normal mukoza örneklerinde sigara içen hastalara ait normal mukoza örneklerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Nagai 1999).

1.14. Fukosiltransferazlar, Fukosilasyon ve Kanser

L-Fukoz (6-deoksi-L-galaktoz), tüm memeli hücrelerinde glikan zincirlerinde bulunan monosakkaritlerden biridir (Becker and Lowe 2003). Fukosilasyon, fukozun GDP-fukozdan diğer moleküllere fukosiltransferazlar (FUT'ler) aracılığıyla aktarılması sürecidir. Tüm A,B,O kan grubu antijenleri, en iyi bilinen fukoz içeren glikanlar arasındadır (Zhang and Wang 2016). Fukosillenmiş glikanlar ayrıca selektin aracılı lökosit ekstrasvazasyonu ve lenfosit hedeflenmesi, patojen-konak etkileşimleri ve sayısız ontojenik süreçteki sinyal yollarında hayati rol oynamaktadır. Anormal fukosillenmiş glikanların, kanser ve romatoid artrit gibi çeşitli insan hastalıklarının patogeneğinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Shan et al. 2019). Erken çalışmalar, artan fukosilasyonun malign hücre transformasyonunun işareti olduğunu ve kanser gelişimi sırasında kontrolsüz hücre proliferasyonu, tümör hücresi invazyonu, anjiyogenez, metastaz, immün kaçış ve terapi direnci gibi birçok anormal prosese katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur (Pinho and Reis 2015). GDP-fukoz sentezi, α -L-fukosidaz aktivitesi, fukosillenmiş glikan yapıları ve farklı fukosiltransferazların (FUT) alt tiplerindeki değişikliklerin kanser hastalarında klinik tablo ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Spesifik fukosillenmiş glikan yapılarının saptanması, çeşitli kanserlerin tanı ve prognozu için klinik olarak kullanılmıştır. N-glikanlarda fukozun en içteki GlcNAc'ye transferini katalize eden α -1,6-fukosiltransferazın overekspresyonu, hem insanlarda hem de hayvanlarda hepatokarsinogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir. α -1,6-fukosillenmiş α -fetoprotein, hepatoselüler kanserli hastaların serumunda tespit edilmiş ve hastalarda hepatoselüler karsinomun erken tanısı için, ayrıca kanser hastalarını siroz hastalarından ayırt etmek için biyobelirteç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Shan et al. 2019).

1. GİRİŞ

Fukosilasyon, fukoz içeren glikanların, FUT katalizi ile yüksek enerjili bir fukoz olan GDP-fukoz kullanılarak bir araya getirilmesi prosesidir (Zhang and Wang 2016). GDP-fukoz, memeli hücrelerinin sitozolünde hem *de novo* hem de kurtarma yollarıyla sentezlenebilmektedir. HeLa hücrelerinde yapılan çalışmalar, sitozoldeki GDP-fukozun %90'ından fazlasının, GDP-mannoz 4,6-dehidrataz ve GDP-4-keto-6 deoksimannoz-3,5-epimeraz-4-redüktaz tarafından katalize edilen üç enzimatik reaksiyon yoluyla GDP mannozunun GDP-fukoza dönüştürüldüğü *de novo* yoldan sentezlendiğini göstermektedir (Yurchenco and Atkinson 1977; Tonetti et al. 1996; Shan et al. 2019). Kurtarma yolunda, sitozolde bulunan hücre dışındaki veya lizozomdaki serbest fukoz, fukoz kinaz ve GDP-fukoz pirofosforilaz aracılığıyla gerçekleştirilen iki aşamalı reaksiyonlar ile GDP fukoza dönüştürülmektedir. Sitozolde sentezlenen GDP-fukoz, GDP-L-fukoz transporter (GDP-L-Fuc Tr) aracılığıyla Golgi aygıtına girerek fukozun uygun substratlara aktarılması için FUT'lara yüksek enerji vericisi olarak görev almaktadır (Şekil 1.7) (Shan et al. 2019).



Şekil 1.7. Fukosilasyon sentez yolları Jia et al. (2018)'dan değiştirilerek alınmıştır

FUT'ler insan vücudunda birçok dokuda ifade edilirken ifade seviyeleri sıklıkla değişebilmektedir ve farklı kanser türlerine sahip hastalardan alınan serum veya tümör biyopsi örneklerinde ifade seviyeleri kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Erken çalışmalar, artan FUT aktivitesinin, monoklonal antikorlar tarafından tanınabilen artan fukosillenmiş glikanlara yol açtığını ortaya koymaktadır (Shan et al. 2019).

İnsan genomunda tanımlanan 13 *FUT* geni vardır. N-bağlı glikanları değiştiren *FUT*'lerin büyük çoğunluğu Golgi aygıtında bulunurken, O-fukosiltransferazlar genellikle endoplazmik retikulumda bulunur (Zhang and Wang 2016). Keşfedilen *FUT*'ler arasında *FUT1* (H enzimi) ve *FUT2* (sekretör enzim), A,B,H ve Lewis kan grubu antijenlerinin oluşumundan sorumlu α -1,2-fukosiltransferazlardır (Abrantes et al. 2009; Blanas et al. 2018). *FUT 3–7* ve *FUT 9–11* α -1,3-fukosiltransferaz aktivitesine sahiptir. *FUT3* ve *FUT5*, α -1,4-fukosiltransferaz aktivitesine sahiptir. α -1,3-fukosiltransferaz olan *FUT3*, Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl Lewis^a ve sialyl Lewis^x antijenleri gibi çeşitli Lewis antijenlerinin sentezini katalize eder. *FUT3*'ün yüksek düzeyde ifadesi genellikle kanserin ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Meng et al. 2017; Zhan et al. 2018). *FUT8*, asparajin bağlı GlcNAc gruplarına fukoz ekleyerek N glikan çekirdek fukosilasyonundan sorumlu olan bir α -1,6-fukosiltransferazdır. Protein o-fukosiltransferaz 1 (*Pofut1*) ve Protein o-fukosiltransferaz 2 (*Pofut2*), fukoza doğrudan polipeptidlere ekleyen iki O-fukosiltransferazdır. Kanser ilerlemesinde rol oynayan onkojenik glikan epitoplarının oluşumundan sorumlu farklı *FUT*'lerin substrat özgüllüklerinin daha fazla araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Shan et al. 2019).

1.15. POFUT1

Proteinlerin glikozilasyonu, proteinlerde meydana gelen, proteinlerin yapı, işlevi ile fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilen en kritik transasyon sonrası modifikasyonlardan biridir (Dong et al. 2017; Du et al. 2018). Protein glikozilasyonu, fertilizasyon, embriyogenez, gelişim, hücreler arası farklılaşma, lenfositlerin hedeflenmesi, immün yanıtlar, inflamasyon ve tümör progresyonu gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreci düzenlemektedir (Miyoshi et al. 2012; Dong et al. 2017; Du et al. 2018). Fukosilasyon, proteinlere veya lipid konjuge oligosakkaritlere fukoz transferini içeren en yaygın memeli glikozilasyon türlerinden biridir (Miyoshi et al. 2012; Park et al. 2020). Diferansiyel protein fukosilasyonu, tümörögenез sırasında karakteristik bir değişiklik olarak kabul edilir ve birçok çalışma, anormal fukosilasyonun farklı kanser türlerinde önemli rol aldığını ortaya koymaktadır. Tümör oluşumu, prognoz, invazyon, anjiyogenez, metastaz ve immün sistemden kaçış gibi birçok malign transformasyon ile önemli derecede ilişkilidir (Miyoshi et al. 2012; Zheng et al. 2017; Park et al. 2020).

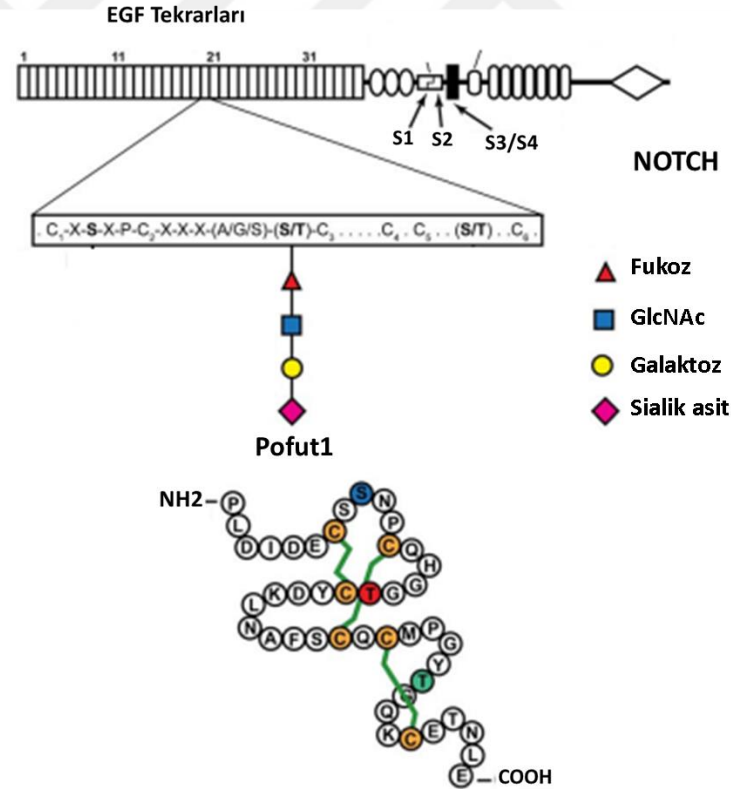
Fukosilasyon, N-fukosilasyon ve O-fukosilasyon olmak üzere iki formda sınıflandırılır (Zhang et al. 2019a). O-Fukosilasyon, fukozun serin veya treonin rezidüsünün hidroksil grubuna kovalent olarak eklendiği proteinlerin karbonhidratlar ile modifikasyonudur. O-Fukoz modifikasyonları ilk olarak epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri tekrarlarında, çok sayıda salgılanan ve transmembran proteinde bulunan sistein motiflerinde tanımlanmıştır. Daha yakın zamanlarda, O-fukoz, trombospodin tip 1 tekrarı olarak bilinen farklı bir sistein motifi üzerinde de tanımlanmasına rağmen mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Loriol et al. 2007). O-fukosilasyon, Protein O-fukosiltransferaz 1 (Pofut1) ve Protein O-fukosiltransferaz 2 (Pofut2) tarafından katalize edilen proteinlerin tipik bir translasyon sonrası modifikasyonudur (Chabanais et al. 2018).

Genel olarak, Pofut1 enzimleri korunmuş özelliklere sahiptir. ER’de proteinin ko-translasyonel translokasyonuna izin veren bir sinyal peptidi, α 1,2- ve α 1,6-fukosiltransferazlarda ortak olarak bulunan üç korunmuş peptid motifi (I, II ve III), enzimatik katalizde yer alan ve birçok glikoziltransferazın doğru işlevi için kritik olabilecek DXD motifi ve proteini ER’de tutan KDEL benzeri bir dizi içermektedir (Loriol et al. 2007). Pofut1’in en iyi bilinen substratları, Notch proteinlerinin hücre dışı alanında bulunan EGF tekrarlarıdır.

Pofut1 tarafından modifiye edilebilen yaklaşık 100 protein olmakla birlikte bu proteinlerden Notch reseptörleri Pofut1’in en iyi karakterize edilen hedeflerinden biridir (Schneider et al. 2017; Holdener and Haltiwanger 2019). Bu reseptörler, Notch sinyal yolağının önemli bir bileşeni olan transmembran proteinlerdir. Evrimsel olarak korunmuş Notch sinyal yolağı, hücreler arası iletişime aracılık etmekte ve çok sayıda gelişim sürecini düzenlemektedir. *NOTCH* genleri, *Delta* ve *Serrate* (memelilerde Jagged (Jag) olarak adlandırılır) genleri tarafından kodlanan, hücre yüzeyinde transmembran proteinler için reseptör görevi gören transmembran proteinlerini kodlamaktadır. Notch ve ligandları, hücre dışı alanlarında reseptör-ligand etkileşimi için kritik olan gene özgü sayıda EGF tekrarına sahiptir. Ligand bağlanması üzerine, Notch reseptörünün hücre içi kısmı proteolitik olarak salınır, çekirdeğe yer değiştirerek hedef genlerin transkripsiyonunu indükler. Notch, hücre kaderinin düzenlenmesi, çoğalma, apoptoz, farklılaşma ve migrasyon dahil olmak üzere birçok dokunun gelişimi sırasında temel rol oynayan zara bağlı bir sinyal reseptörüdür (Bray 2006). Notch reseptörünün hücre dışı

1. GİRİŞ

domaini, memelilerde 36 EGF tekrarı içerir, bu EGF tekrarlarından 23'ü birinci şekerin bir fukoz olduğu bir tetrasakarit birimi içerir ve 20'si birinci şekerin bir glikoz olduğu bir trisakarit birimi içerir (Lira-Navarrete et al. 2011). EGF tekrarları, üç disülfür köprüsü oluşturan altı korunmuş sistein içeren küçük (~40 amino asit) sistein açısından zengin motiflerdir (Appella et al. 1988; Davis 1990). Notch reseptörlerinde O-fukosilasyonun gerçekleşmesi için EGF benzeri tekrarlar, X'in herhangi bir amino asidi temsil edebileceği C2 ve C3, EGF-benzeri tekrarın ikinci ve üçüncü korunmuş sisteinleri olan C2-X-X-X-X-S/T-C3 konsensüs dizisine sahip olmalı veya EGF benzeri tekrarlar doğru bir şekilde katlanmalıdır (Şekil 1.8) (Wang and Spellman 1998; Shao and Haltiwanger 2003). EGF benzeri tekrarlar üzerine O-Fukoz eklenmesi, biyolojide, özellikle Notch reseptörleri ve ligandları arasındaki etkileşimde temel bir rol oynamaktadır. Bu bağlamda, Notch-ligand etkileşimleri, O-fukoz glikanların uzun formlarının hem varlığına hem de türüne bağlıdır (Loriol et al. 2007).



Şekil 1.8. Notch reseptörüne O-Fukoz eklenmesinin şematik gösterimi Jafar-Nejad et al. (2010)'den değiştirilerek alınmıştır.

Protein O-fukosiltransferaz 1 (insanlar için kısaltılmış POFUT1, *Drosophila* için OFUT1), EGF tekrarlarına O-fukoz eklenmesinden sorumludur (Wang and Spellman

1998; Wang et al. 2001). EGF tekrarlarındaki O-fukoz rezidüleri, Golgi'de bulunan Fringe (FNG) proteinleri, fukoz spesifik β 1,3 N-asetilglukosaminiltransferazlar tarafından da modifiye edilebilmektedir (Müller et al. 2014). Fringe tarafından yapılan Notch modifikasyonu, ligandların Notch reseptörlerine bağlanma aktivitesini etkilemektedir.

Ofut1 ifadesinin RNA interferans aracılı azalması veya Ofut1'deki mutasyonlar, *Drosophila*'da anormal Notch fenotipleri ile sonuçlanmaktadır (Luo et al. 2006). *Drosophila*'da embriyonik nörogenez sırasında Notch aktivasyonu için O-fukosilasyonun önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Sasamura et al. 2007). Ayrıca, fare Pofut1 geninin ifadesinin baskılanmasının, Notch1 eksikliğine benzer bir embriyonik öldürücü fenotipe neden olduğu belirlenmiştir (Shi and Stanley 2003). Fare Notch1 üzerindeki spesifik O-fukoz glikosilasyon bölgelerindeki mutasyonlar, Notch aktivitesini değiştirmektedir (Rampal et al. 2005). Ofut1'in ifadesinin azalmasıyla Notch reseptörü üzerindeki O-fukosilasyonun azalmasının, Notch reseptörü ve ligandları arasındaki bağlanmayı önemli ölçüde azalttığı, bunun da O-fukosilasyonun Notch reseptörü-ligand etkileşimlerinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Okajima et al. 2003). POFUT1'in Notch1 nakavt farelerin paraksiyal mezoderminde ER'de biriktiği bildirilmiştir (Okamura and Saga 2008). Yapılan bu çalışma normal Notch fonksiyonu için Pofut1'in gerekliliğini vurgulamaktadır. Yapılan son çalışmalar ayrıca *Drosophila* Ofut1'in bir şaperon olarak işlev görebileceğini ve Notch'un doğru katlanması ve hücre yüzeyi ifadesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmalar EGF tekrarlarının O-fukosiltransferaz 1 aracılığıyla O-fukoz modifikasyonlarının Notch reseptörünün fonksiyonunda önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (Luo et al. 2006). Ofut1, *Drosophila*'da ligandların katlanması veya işlevi için vazgeçilmez görünmektedir, ancak omurgalı ligandlarının aktivitesi ve lokalizasyonu için O-fukoz modifikasyonunun veya Pofut1'in fukosiltransferazlardan bağımsız rolü belirsizdir (Okajima and Irvine 2002). Kültürdeki memeli hücrelerinde ve farelerde hematopoietik kök hücrelerde POFUT1 ifadesinin baskılanmasının, Notch reseptörlerinin yüzey ifadesini engellememesine rağmen ligand bağlanmasının ve Notch aktivitesinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Müller et al. 2014).

POFUT1'in başlıca hücresel işlevleri, Notch reseptörü ile ligand bağlanmasının indüklenmesi, reseptör aktivasyonunun artırılması, proteolitik bölünmenin uyarılması ve Notch hücre içi domainin (NICD) salınması ile çekirdeğe giderek hedef proteinlerin ifadesinin düzenlenmesi olarak ortaya çıkarılmıştır (Okajima et al. 2003; McMillan et al. 2017; Yang et al. 2019). Yapılan son çalışmalar, POFUT1'in Dowling-Degos hastalığı, meme, kolorektal, karaciğer kanserleri ve hepatoselüler karsinom dahil olmak üzere çok sayıda patolojik durumla yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (McMillan et al. 2017; Chabanaïs et al. 2018; Du et al. 2018). Bununla birlikte, şimdiye kadar POFUT1'in baş ve boyun karsinogenezi sürecindeki rolünü ortaya koyan çalışma yapılmamıştır.

1.16. *POFUT1*'in Kanser Sürecinde Rolü

POFUT1 geni, kromozom üzerinde 20q11.21 bölgesine lokalizedir. 20q11.21 kromozomal bölgesinin, kötü prognoza sahip hepatoselüler karsinom, meme kanseri, mide kanseri, akut miyeloid lösemi ve kolorektal kanser gibi farklı kanser türlerinde sıklıkla amplifiye olduğu bilinmektedir (Wang et al. 2022). Kolorektal kanserde *POFUT1* ifadesi ile 20q11 amplikonunun kopya sayısı arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (Loo et al. 2013).

Evre I kolorektal kanser hastalarında, *POFUT1*'in yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiş ve bu hastalarda *POFUT1*'in yüksek ifadesi, metastatik süreç ile anlamlı derecede ilişkilendirilmiştir (Chabanaïs et al. 2018). Mide kanserinde, artan *POFUT1* ifadesinin, daha yüksek TNM evrelemesi ve tümör farklılaşması gibi bazı klinik özelliklerle ilişkili olduğu ortaya konularak *POFUT1*'in mide kanserinde potansiyel bir biyobelirteç olarak rol alabileceği gösterilmiştir (Dong et al. 2017). Özafagus kanseri tümör doku örneklerinde yapılan analiz *POFUT1*'in tümör dokularında sağlıklı kontrol dokularına kıyasla daha yüksek ifadesine sahip olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada adherent hücrelere kıyasla özafagus kanser kök hücrelerinde *POFUT1* ifadesinin arttığı ortaya konulmuştur (Sadeghzadeh et al. 2020). Düşük *POFUT1* mRNA ifadesi, radikal sistektomi ile tedavi edilen invaziv mesane kanseri hastalarında daha yüksek genel sağkalım ve daha düşük kanser ilişkili ölüm riski ile ilişkilendirilmiştir (Wahby et al. 2021). Ayrıca normal hücrelere kıyasla gliomalarda *POFUT1*'in daha yüksek düzeyde ifade edildiği de bildirilmiştir (Kroes et al. 2007). Kolorektal kanserde *POFUT1*

susturulmasının hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, hücre invazyonunu ve migrasyonunu azalttığı, hücre döngüsü ilerlemesini durdurduğu, kolorektal kanser hücrelerinin apoptozunu *in vitro* uyardığı ve kolorektal kanser tümör büyümesini *in vivo* baskıladığı gösterilmiştir (Komor et al. 2020). Ayrıca, kolorektal kanser vakalarında POFUT1 geninde mutasyon üzerine yapılan yapı ve işlev çalışmaları, nadiren POFUT1 geninde yanlış anlamlı mutasyonların tespit edildiği ve bu mutasyonların *in vitro* protein O-fukosiltransferaz aktivitesinde bir artışa yol açtığını göstermiştir (Deschuyter et al. 2020).

POFUT1'in de dahil olduğu Notch reseptörlerini modifiye eden glikoziltransferazlar, O-glikozilasyon için korunmuş dizi ile EGF tekrarları içeren proteinleri modifiye etmektedir. Bu nedenle POFUT1'in kanser hücrelerinin malign davranışı üzerindeki etkisine mutlaka Notch sinyali etki etmemesine rağmen şimdiye kadar, farklı kanser türlerinde POFUT1 ifade seviyesinin kanser hücrelerinde Notch sinyal yolağını aktive ettiği ve bunun kanser hücrelerinin malign davranışının değişmesine neden olduğu bildirilmiştir. Meme kanserinde, POFUT1'in yüksek düzeyde ifadesi ve aktif NOTCH1 sinyali, kötü prognozla ilişkili olan lenf nodu metastazı ve ileri tümör evresi ile ilişkilendirilmiştir (Wan et al. 2017). Hepatosellüler karsinom hücrelerinde, POFUT1 overekspresyonunun, Notch ligandı DLL1'in Notch reseptörüne bağlanmasını uyarıp Notch sinyal yolunu aktive ederek, anormal şekilde aktive olan POFUT1-Notch sinyal yolunun hepatosellüler karsinom ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Ma et al. 2016). Glioblastoma dokularında yüksek POFUT1 ifade seviyelerinin olduğu tespit edilmiş ve yüksek POFUT1 ifadesi olan glioblastoma hastalarının sağkalımının daha kısa olduğu belirlenmiştir. POFUT1'in overekspresyonunun, glioblastoma hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu artırırken, POFUT1 inhibisyonunun, glioblastoma hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bunun nedeni olarak, POFUT1'in susturulması ile Notch sinyal aktivasyonunun inhibisyonu ve HES1, HEY1 ifadelerinin azaldığı gösterilerek POFUT1'in Notch sinyalinin aktivasyonunu artırarak glioblastomada tümör indükleyicisi olarak rol oynadığı ortaya koyulmuştur (Li et al. 2021).

Şimdiye kadar POFUT1'in kanser prosesindeki rolü araştırılmasına rağmen oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte, POFUT1'in kanser

sürecinde aldığı rolün ve altında yatan moleküler mekanizmaların daha fazla araştırılması gerekmektedir.

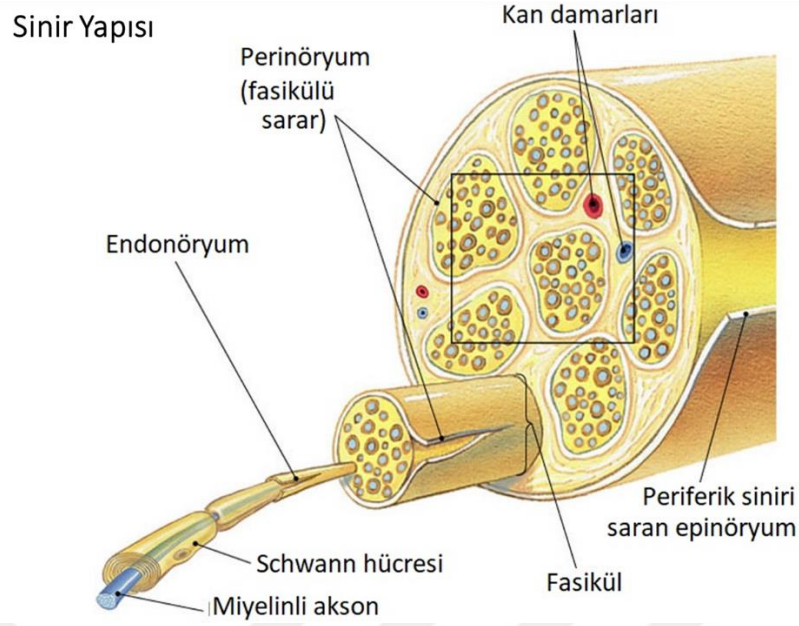
1.17. Perinöral İnvazyon

Malign hücrelerin önemli özelliklerinden biri, primer tümörden ayrılarak vasküler ve lenfatik kanallar aracılığıyla uzak bölgelere metastaz yapma yetenekleridir. Tümör hücrelerinin yayılım yolu olan metastaz, literatürde iyi karakterize edilmiştir ve tümör biyolojisi üzerine güncel araştırmaların büyük çoğununun odak noktasını oluşturmaktadır. Bununla birlikte, 1800'lerin ortalarından itibaren literatürde sinirlerin içerisinde veya sinirler boyunca meydana gelen başka bir tümör yayılım yolu perinöral invazyon (PNI) olarak tanımlanmıştır, ancak günümüze kadar nispeten oldukça az araştırma konusu olmuştur (Liebig et al. 2009). PNI, Avrupa literatüründe ilk olarak, kafatası fossaya doğru ilerlerken sinirler boyunca büyüme eğilimi gösteren baş ve boyun kanserlerini tanımlayan bilim adamları tarafından rapor edilmiştir (Lanska 2021). PNI tanımlandığı yıllardan günümüze kadar akciğer, pankreas, kolon ve rektum, prostat, safra yolları ve mide dahil olmak üzere çok sayıda kanser türünün anahtar patolojik özelliği olarak ortaya çıkmaktadır. PNI, malignitelerin büyük çoğunluğu için, kötü prognoz ve azalan sağkalım ile önemli derecede ilişkilidir (Ozaki et al. 1999; Duraker et al. 2003; Beard et al. 2004; Law and Chu 2004). PNI'nin klinik önemi yaygın olarak kabul edilmesine rağmen, patogenezinin altında yatan mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir ve sinir invazyonunu hedefleyen spesifik tedaviler bulunmamaktadır.

"Perinöral yayılım" veya "klinik PNI", manyetik rezonans görüntüleme ile yakalanan semptomatik nöral invazyonu tanımlarken, PNI mikroskopik asemptomatik bulguyu temsil etmektedir (Panizza 2016). İlk kez baş ve boyun kanserlerinde tanımlanan PNI sinirlerin "içine, etrafına ve içinden istila" olarak tanımlamıştır. Şu anda "sinire çok yakın olan ve çevresinin en az %33'ünü içeren tümör veya sinir kılıfının 3 katmanından herhangi biri içindeki tümör hücreleridir" tanımı yaygın olarak kabul edilmektedir (Liebig et al. 2009). Bu tanım kapsamlı bir tanım olmasına rağmen %33'lük tanımlama göreceli ve bireysel yoruma açık olabilmektedir. Bireysel algılar yorumlamayı etkilediğinden, patologlar arasında bile PNI'nin nasıl saptanacağı ve tanımlanacağı konusunda büyük farklılıklar vardır (Chi et al. 2016). Bu nedenle PNI için nesnel ve

yaygın olarak kabul edilen bir tanım formüle etmek oldukça zordur. Ayrıca, tüm kanser türlerinde tek bir PNI tanımının mı yoksa yüksek nörotropizmi olan tümörlerin, tümör-nöron etkileşimlerinin doğası hakkında daha fazla bilgi içeren tümöre özgü bir tanıma mı sahip olması gerektiği belirsizliğini korumaktadır (Schmitd et al. 2018).

Periferik sinirler, Schwann hücreleri, fibroblastlar ve kan damarları dahil olmak üzere akson, destekleyici hücre ve dokulardan oluşmaktadır. Schwann hücreleri miyelinli ve miyelinsiz aksonları korur ve onarır, periferik sinir sisteminde miyelin üretir. Periferik sinirler 3 tabakadan oluşmaktadır. Endonöryum, tek sinir liflerini ve onları miyelinleştiren Schwann hücrelerini çevreleyen en içteki tabakayı temsil eder (Olsson, 1990). Aksonlar ve kılcal damarlar kollajen, hücre dışı matriks ve fibroblastlardan oluşan endonöryum ile sarılır. Aksonlar ve endonöryum, bir veya daha fazla epitel benzeri hücre katmanına sahip olan perinöryum tarafından sinir demetleri halinde gruplandırılır. Hassas bir bağ dokusu tabakasından oluşan endonöryum, beyin veya omuriliğin yüzeyinden aksonun sinaps yaptığı bölgeye kadar uzanan kesintisiz bir kılıf oluşturur. Endonöryum içinde, tek tek lifler, beyin omurilik sıvısına benzer ve bir kan-beyin bariyeri oluşturmaya yardımcı olan endonöryal sıvı ile çevrilidir. Endonöryal hücreler ayrıca hassas aksonları destekleme ve koruma işlevi görür. Sinir demetleri, tüm siniri saran, sinirlere kan akışı sağlayan, ancak lenfatik damarlardan yoksun bir kılıf olan epinöryum tarafından gruplandırılır. Epinöryum, dışta gevşek bağ dokusu tabakasına, kollajen ve elastik lifler içeren bir iç tabakaya sahiptir. Bu tabaka sinirin damarsal kaynağını içerir. Bu tabakanın altında düz bir hücre tabakası, bir akson demeti etrafında tam bir kılıf oluşturan perinöryum bulunur. Geçirgen fakat seçici bir bariyer işlevi gören bu tabakayı bazal membranlara sahip sıkıca çevreleyen endotel hücreler oluşturur (Şekil 1.9) (Stolinski 1995; Bakst and Wong 2016). Sinir kılıfının üç katmanından herhangi biri içindeki kanser, PNI olarak tanımlanmaktadır. Birçok patolog ayrıca sinir hücrelerine temas halinde tümör hücrelerinin ve sinir çevresine en az üçte bir yakınlıkta olan tümör hücrelerinin varlığını PNI olarak sınıflandırmaktadır. Bununla birlikte, yakın tarihli bir çalışma, klinik olarak anlamlı olan intranöral invazyon olarak adlandırılan bu üç tabaka içinde invazyon olabileceğini de düşündürmektedir (Amit et al. 2015). Sinirler genellikle vücuttaki anatomik vasküler dağılımı takip ettiğinden, kan damarları sıklıkla perinöral niş içinde bulunur.



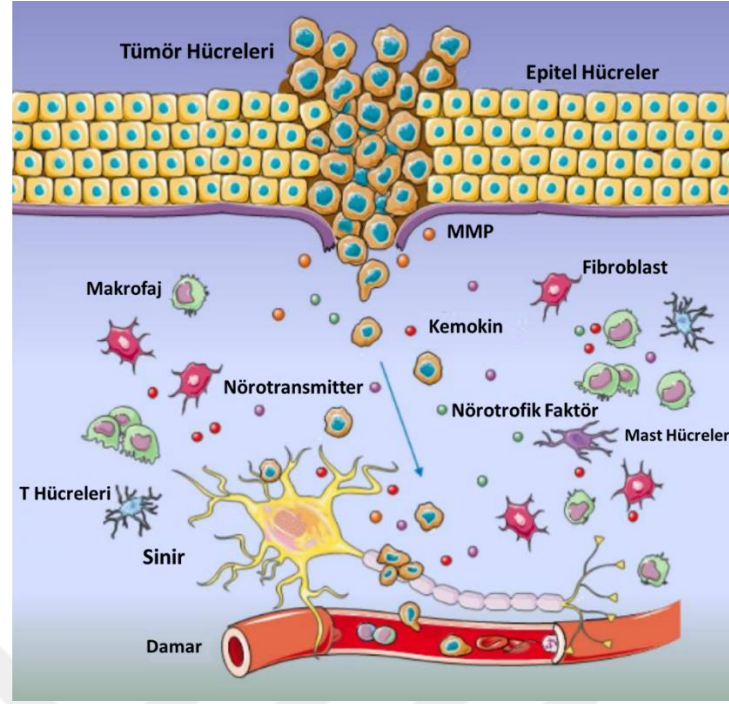
Şekil 1.9. Epinöryum, Perinöryum ve Endonöryum tabakalarından oluşan sinir anatomisi

PNI ilk olarak Drapiewski ve arkadaşları tarafından kanser hücrelerinin iyi bilinen çevre dokulara doğrudan invazyon, lenfatik metastaz, anjiyogenez ve vücut boşlukları boyunca yayılım yollarına ek olarak beşinci yayılım yolu olarak tanımlanmıştır. Tümörlerde PNI oluşumu sadece ilgili organlarda ağrı ve fonksiyon bozukluğuna neden olmakla kalmamakta, aynı zamanda güvenli sınırlar içinde cerrahi rezeksiyonu zorlaştırıp ve sinirlerin içinde veya çevresinde kalan tümör hücreleri, kötü klinik prognozla sonuçlanan lokal postoperatif nüksü, infiltrasyonu ve metastazı indükleyebilmektedir (Marchesi et al. 2008; Amit et al. 2015; Amit et al. 2016). Böylece, PNI'nin patogenezi aydınlatmak için çok sayıda araştırma başlatılmakta, son zamanlarda, tümöröenez ve tedavi direncini yönlendiren, sinirler ve kanser hücreleri arasındaki etkileşimin fenotiplerini ve moleküler temelini anlamaya yönelik artan ilgiyle birlikte PNI süreci ile ilişkili derinleşen bilgi birikimi vardır.

PNI'nin ilk hipotezi, tümör hücrelerinin sinirleri kaplayan bağ dokuları boyunca pasif olarak veya küçük sinir dalları ve sinir demetleri aracılığıyla yayıldığı "düşük dirençli kanal" hipotezidir (Batsakis 1985; Liang et al. 2016). Son zamanlarda, moleküler biyoloji tekniklerinin ve yeni invazyon modellerinin geliştirilmesi, oluşumu tek bir faktörün değil, malign hücreler, periferik sinirler ve perinöral niş içindeki stromal hücreler arasında sürekli, ayrıntılı ve aktif bir karşılıklı etkileşim süreci olan PNI algısını derinleştirmiştir. PNI sırasında çok sayıda protein ve hücresel süreç rol oynamaktadır.

Tümör hücreleri sinir hücrelerine doğru invaze olduğunda, burada tümör mikroçevresini oluştururlar. Tümör hücrelerinden salgılanan proteinler, tümör hücreleri ve sinir arasında çift yönlü bir iletişim başlatan, neoplastik yönelime doğru nörit büyümesini, yeniden şekillenmesini ve aksogenezi indüklemektedir. Bu süreçte, sinir hasarı ve onarımı sinir hücrelerini tümör istilasına karşı daha savunmasız hale getirmektedir. Hasar sonucu onarılamayan, ölen sinirler bir dizi nörotransmitterler (katekolaminler, asetilkolin ve nöropeptitler), membrana bağlı proteinler (MUC1 ve L1CAM), matriks metalloproteazlar (MMP'ler), kodlamayan RNA'lar (miRNA, lncRNA ve cirRNA), nörotrofik faktörler (GDNF, NGF, BDNF, NT3 ve CSF1), niş içerisine salınabilen veya tümör hücrelerinde eksprese edilen reseptörlerine (GFR α 1, TRKA, TRKA, TRKC, CSF1R, CXCR4, CCR2, CCR5 ve CX3CR1) spesifik olarak bağlanabilen kemokinler (CXCL12, CCL2, CCL5 ve CX3CL1) salgılayarak hem niş içerisindeki inflamatuvar yanıtı hem de tümörün sinire doğru yönelim hareketini desteklemektedir (Şekil 1.10). Nörotrofik faktörler, aksonların gelişiminin yanı sıra olgun nöronların korunmasını düzenleyen bir protein ailesidir. Nörotrofik faktörler temel olarak periferik ve merkezi sinir sisteminin gelişiminde rol almakla birlikte, son kanıtlar, hem kanser hücrelerinin hem de nöral hücrelerin, kanser hücrelerinin sinirler boyunca büyümesini ve sinirlere doğru yayılımını kolaylaştırabilecek nörotrofik faktörleri yukarı regüle ettiğini göstermektedir (Bakst and Wong, 2016). GDNF büyüme faktörleri ailesinin, birçok grup tarafından PNI'de önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. GDNF'nin hem sinirler hem de makrofajlar dahil destek hücreleri tarafından salgılandığı bilinmektedir (Cavel et al. 2012). GDNF ifadesinin azalmasının hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak sinirlere invazyonu azalttığı gösterilmiştir. PNI vakalarında sıklıkla adjuvan olarak uygulanan terapötik radyasyon, sadece kanser hücresi ölümünü indükleyerek değil, aynı zamanda GDNF seviyelerini de baskılayarak PNI'yi baskılayabilmektedir. Kanser motilitesi üzerindeki etkilere ek olarak, GDNF'nin insan oral skuamöz hücreli karsinomlarında daha invaziv bir kanser fenotipini destekleyebilen daha yüksek matriks metalloproteaz (MMP'ler) ifadesini indüklediği de gösterilmiştir (Bakst and Wong 2016). Kemokinler, yakındaki duyarlı hücrelerde kemotaksiyi indükleme kabiliyetine sahip bir sinyal proteini ailesidir. Kemokinlerin kanserin ilerlemesinde rol oynadığı uzun zamandır bilinmektedir; ancak, PNI sürecindeki rolü yakın zamanda araştırılmıştır (Murphy 2001). GDNF ve NGF tarafından eksprese edilen MMP'lerin PNI prevalansının yüksek olduğu karsinomlarda yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir (Okada et al. 2003; Okada et al. 2004). MMP'ler, PNI sürecinde önemli terapötik hedefler olarak düşünülmesine rağmen, geniş spektrumlu MMP

inhibitörlerinin, çeşitli klinik çalışmalarda PNI ve tümör gelişimi üzerinde önemli bir etki göstermediği ortaya konulmuştur (Overall and Kleinfeld 2006). Ayrıca tümör ilişkili inflamasyon ile fibroblastlar, makrofajlar, düzenleyici T hücreleri ve mast hücreleri gibi stromal hücreler tümör hücreleri ve sinir arasındaki etkileşim sırasında perinöral niş içerisine alınmaktadır (Gasparini et al. 2019; Jurcak and Zheng 2019; Zhang et al. 2021a). İlk teoriler, PNI'nin basitçe lenfatik metastazın bir uzantısı olduğunu öne sürmüştür. PNI patogenezi üzerine sonraki teoriler, tümör hücresi yayılması için düşük dirençli bir kanal görevi gören nöral kılıflara odaklanmıştır (Bakst and Wong 2016). Bununla birlikte, elektron mikroskobu ve diğer tekniklerle sinirlerin dikkatli bir şekilde incelenmesi, sinir kılıfının aslında birkaç kolajen katmanı ve eşmerkezli olarak düzenlenmiş endotel hücreleri ile daha yüksek dirençli bir yol olduğunu göstermiştir (Akert et al. 1976). Ayrıca yapılan çalışmalar PNI'nin bir zamanlar önerildiği gibi lenf metastazının uzantısı olmadığını, lenf kanallarının sinir kılıfının içerisine girmediğini ortaya koymaktadır. Son 40 yıldır, PNI patogenezinin arkasındaki baskın teori, tümör hücrelerinin, hücre göçü için nöral kılıflar boyunca yayılımıdır. PNI prosesinde, tümör hücreleri sinir kılıfı içerisine girdikten sonra, sinir kılıfını oluşturan kolajen ve bazal membran katmanları ile metastazı kolaylaştıran büyüme ortamı içerisine erişim sağlamaktadır. Bazı karsinomlar ileri evrede metastaz için PNI tercih ederken, diğer karsinomların metastaz yolu olarak PNI tercih etmemesinin altında yatan mekanizma ise henüz bilinmemektedir.



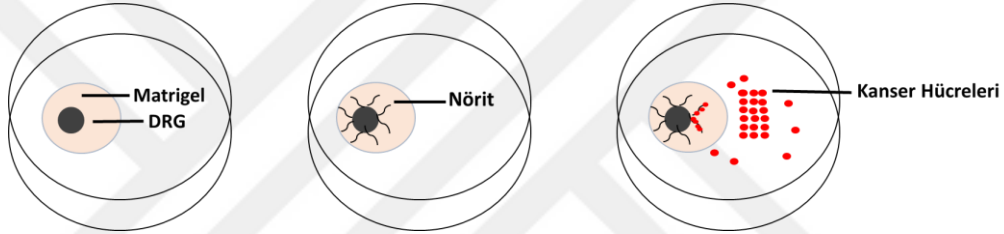
Şekil 1.10. PNI sürecinde perinöral nişin şematik gösterimi Zhang et al. (2021a)'dan değiştirilerek alınmıştır.

Daha yakın zamanlarda yapılan çalışmalar, PNI'nin tümör hücreleri ve sinirler arasındaki karşılıklı sinyal etkileşimlerini içerebileceğini ve invaze tümör hücrelerinin, periferik sinir ortamındaki proinvaziv sinyallere yanıt verme yeteneği kazanmış olabileceğini ortaya koymaktadır. Prostat kanseri hücreleri ile bir Matrigel matriksinde ko-kültür edilen fare dorsal root gangliyonlarını (DRG) kullanan bir PNI modelinde, Ayala ve arkadaşları, nöritler boyunca orijin gangliyonlarına doğru tümör hücresi göçünün yanı sıra nöritlerin kanser hücresi kolonilerine doğru odaklanmış yönlü büyümesini göstermiştir. Bu model, PNI sinyal mekanizmalarının tümör hücreleri, sinir hücreleri ve stromal hücreler dahil olmak üzere en az 3 farklı hücresel grubunu içerdiğini ve otokrin, parakrin mekanizmaları içerebileceğini düşündürmektedir.

Önceki *in vitro* çalışmalarda gösterilen sinir hücrelerinde artan nörit oluşumu ve hücrelerin bu nöritler üzerine olan göçü, aksonal göçün PNI sürecinin önemli bir unsuru olabileceğini göstermektedir. Aksonal büyüme, nörotropik büyüme faktörleri ve aksonal kılavuz moleküller gerektiren karmaşık bir süreçtir (Bakst and Wong 2016).

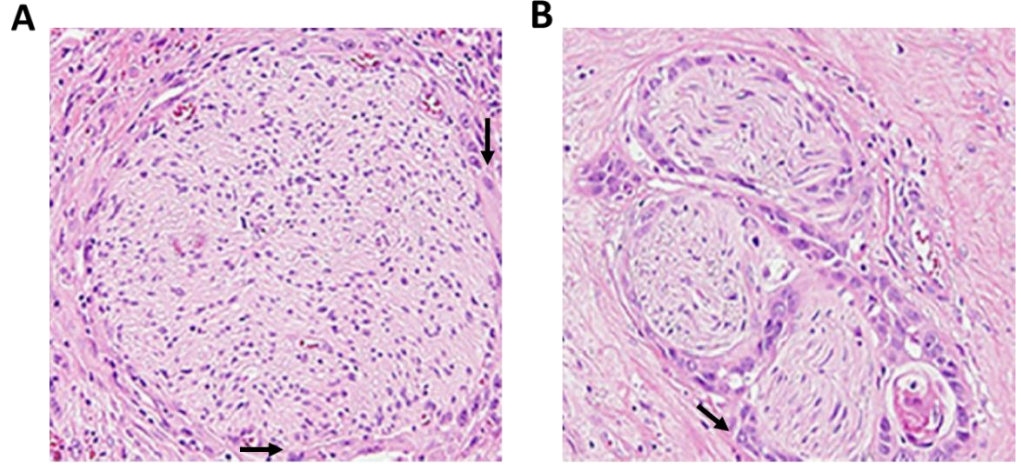
PNI sürecinin karmaşık olması nedeniyle *in vitro* modeller oldukça sınırlıdır. Bununla birlikte, *in vitro* modeller PNI'yi indükleyen faktörlerin daha iyi anlaşılmasına

yol açan yüksek düzeyde kontrollü bir deney ortamına izin vermektedir. İlk kez Ayala ve arkadaşları orijinal olarak Matrigel içerisinde fare DRG'lerinin prostat kanser hücreleri ile birlikte kültürlendiği bir *in vitro* sistem tanımladı (Ayala et al. 2001). DRG Matrigel içerisine alındığında, deneysel amaçlar için tek tek sinir liflerine benzeyen nörit uzantılarını oluşturmaktadır. Bu nöritler kanser hücre kolonilerine doğru büyürken aynı zamanda kanser hücreleri tarafından da istila edilir. Özellikle, bu modelde kanser hücreleri, PNI'nin tipik olarak merkezi olarak yayıldığı klinik gözlemini taklit eden merkezi gangliyonla doğru tek yönlü olarak göç etmektedir (Şekil 1.11). Bu modeli kullanan Ayala ve arkadaşları, DRG ve kanser hücreleri ko-kültür yapıldığında hem kanserin hem de sinirin büyüme avantajına sahip olduğu PNI'nin simbiyotik doğasını tanımlayan ilk kişilerdir (Dai et al. 2007; Bakst and Wong 2016).



Şekil 1.11. Perinöral invazyonun *in vitro* dorsal root ganglion (DRG) modeli Bakst and Wong (2016)'dan değiştirilerek alınmıştır.

PNI tanılanırken örnekler hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanmaktadır ve PNI varlığı uzman patologlar tarafından incelenmektedir. Sinir kılıfının üç katmanından herhangi birinde tümör hücreleri tanımlandığında, PNI'nin mevcut olduğu kabul edilmektedir. Tümör hücrelerinin sinir kılıfı içerisinde olmayıp perinöral ortama yakın olduğu durumlarda, PNI tanısı için kriter, sinir çevresinin en az %33'ü civarında tümör hücrelerinin tutulumu PNI pozitif vaka olarak kabul edilmektedir (Şekil 1.12) (Liebig et al. 2009; Chatterjee et al. 2012).



Şekil 1.12. Hematoksilen-eozin ile boyanan özofagus skuamöz hücreli karsinom örneğinde perinöral invazyon varlığı. (a) Sinir lifi kısmen tümör hücreleri ile çevrili PNI örneği (siyah ok). (b) Perinöryuma gömülü tümör hücreleri bulunan PNI örneği (siyah ok). Kim et al. (2021)’den değiştirilerek alınmıştır.

1.18. Baş ve Boyun Kanserlerinde Perinöral İnvazyon

Tümör hücrelerinin sinirleri istilasının histolojik bulgusu olan PNI, BBSHK’larda genellikle kötü prognozla ilişkili en belirgin patolojik özelliklerden biri olarak kabul edilmektedir (Bur et al. 2016). PNI, BBSHK’larda çok sık görülen bir prognostik faktördür ve BBSHK vakalarının yaklaşık olarak %90’ında bulunabilmektedir (Roh et al. 2015; Huyett et al. 2017; Schmitd et al. 2018; Chen et al. 2019). Baş ve boyun bölgesinde farklı anatomik bölgelerde başlayan tümörlerin farklı PNI geliştirme riskleri olmakla birlikte, oral kanserlerin nispeten daha yüksek PNI riski ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Zhang et al. 2019b). PNI-pozitif BBSHK tümörleri, daha yüksek lokal-bölgesel nüks ve uzak metastaz oranlarına sahiptir, bu da PNI olmayan BBSHK hastalarına kıyasla daha düşük genel sağkalım ile sonuçlanmaktadır (Woolgar and Scott 1995; Fagan et al. 1998; George et al. 1998; Tai et al. 2012; Huyett et al. 2017).

PNI gelişen hastaların tedavisi tipik olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulanarak en üst düzeye çıkarılsa da, bu hastaların genel sağkalım oranları, PNI olmayan hastalara kıyasla %40 kadar daha düşüktür (Huyett et al. 2017). Bu nedenle, mevcut tedavi yaklaşımlarının baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hastaları için, PNI ile ilişkili olumsuz prognozu iyileştirmede etkisiz olduğu belirgindir. PNI geliştiren baş

ve boyun skuamöz hücreli karsinom hastaları için hedefe yönelik tedavi yaklaşımları, bu süreci düzenleyen faktörlerin yeterince anlaşılmaması nedeniyle geliştirilememiştir. Bununla birlikte, erken evre BBSHK hastalarının sağkalımı PNI gelişiminden belirgin bir şekilde etkilenmezken, ileri evre baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hastalarında PNI'nin azalan genel sağkalım ile önemli derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang et al. 2019b). Bu sonuçlar ileri evre hastalarda PNI gelişimine daha fazla dikkat edilmesi gerektiğini ve bu tür hastaların tedavileri ile ilgili daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

BBSHK hastaları üzerinde yapılan yakın tarihli bir çalışmada, kanser tanısı konulduktan sonra halen sigara içen ve tanı konmadan önce sigara içen hastalarda, hayatı boyunca hiç sigara içmeyen ve BBSHK tanısı konan hastalara göre önemli ölçüde daha sık PNI geliştiğini göstermiştir. Yine aynı çalışmada, yaş, cinsiyet ve alkol tüketiminin BBSHK hastaları için PNI varlığı ile ilişkili önemli risk faktörleri olmadığı belirlenmiştir (Baumeister et al. 2018). HPV'nin PNI üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapılan bir diğer çalışmada, HPV pozitif BBSHK hastalarının, HPV negatif hastalar ile kıyaslandığında daha düşük PNI geliştirme olasılığına sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Mendelsohn et al. 2010).

Yapılan çalışmalar BBSHK hastalarında PNI'nin prognostik önemini ortaya koymuş olsa da, mevcut literatür, PNI ile ilişkili sinir-tümör etkileşimlerinin altında yatan patogenez, klinik özellikler ve mekanizmaların BBSHK'da belirsizliğini koruduğunu göstermektedir (Schmitd et al. 2019; Zhang et al. 2019b). PNI'nin önemini kabul eden birçok çalışma olmasına rağmen, şimdiye kadar yapılan çalışmalarda PNI'nin altında yatan mekanizmalar büyük oranda bilinmemektedir ve klinik PNI sırasında meydana gelen moleküler değişiklikler iyi araştırılmamıştır. BBSHK hastalarında PNI sürecinde genlerin rolünü araştıran yalnızca birkaç çalışma yapılmıştır (Zhang et al. 2019b). Bununla birlikte, perinöral invazyon geliştiren BBSHK hastaları için optimal tedavi yaklaşımı önemli bir tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, PNI ile ilişkili mekanizmaların açığa kavuşturulması, PNI'yi hedefleyen ve hasta sağkalımını, yaşam kalitesini artırmaya yardımcı olacak özgün tedavi stratejilerinin ve yeni terapötiklerin geliştirilmesini kolaylaştırmak için kritik öneme sahiptir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ma et al. (2016) hepatosellüler karsinom hücrelerinde yüksek düzeyde *POFUT1* ifadesinin, Notch ligandı Dll1'in Notch1 reseptörüne bağlanmasını indükleyebileceği ve Notch1 sinyal yolunu aktive edebileceği ortaya koyulmuştur. *POFUT1*'in *in vitro* hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu destekleyebileceği, *POFUT1*'in hepatosellüler karsinomda tümör indükleyici rolü olduğu gösterilmiştir. Yüksek düzeyde *POFUT1* ifadesinin, hepatosellüler karsinom hastalarında düşük sağkalım ve yüksek nüks oranları ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. *POFUT1*'in hepatosellüler karsinom dokularında ve hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edildiği ve *POFUT1*'in hepatosellüler karsinom hücrelerinde Notch sinyal yolağının aktivasyonu aracılığıyla malign davranışı önemli ölçüde desteklediği ortaya konulmuştur.

Li et al. (2021) yüksek *POFUT1* seviyelerine sahip glioblastoma hastalarının düşük *POFUT1* seviyelerine sahip hastalara kıyasla daha kısa bir sağkalım oranına sahip olduğu belirlenmiştir. *POFUT1*'in glioblastoma hücrelerinde susturulmasının, hücrelerin proliferatif, invaziv ve EMT potansiyelini belirgin bir şekilde azalttığı ortaya konulmuştur. *POFUT1*'in susturulmasının Notch sinyal yolağının aktivasyonunu inhibe ettiği, *HES1* ve *HEY1*'in ifadesinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, veriler *POFUT1*'in susturulmasının glioblastoma hücrelerinden oluşturulan ksenograft tümörlerinin *in vivo* büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir.

Du et al. (2018) kolorektal kanser hücrelerinde *POFUT1*'in susturulmasının hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, hücre invazyonunu ve göçünü azalttığı, hücre döngüsünün ilerlemesini durdurduğu ve *in vitro* kolorektal kanser hücre apoptozunu uyardığı ortaya koyulmuştur. TCGA veritabanında *POFUT1* ifade analizi, *POFUT1*'in kolorektal kanserde yüksek düzeyde ifade edildiğini göstermiştir. Ayrıca, *POFUT1*'in susturulmasının, *in vivo* tümörigenezi baskılayarak kolorektal kanser tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir.

Yao et al. (2011) farelerde indüklenebilir Pofut1 inaktivasyonunun miyeloid hiperplaziye ek olarak T lenfopoezinde ve B hücrelerinin üretiminde bir azalma ile lenfoid gelişimsel kusurlarına yol açtığı gösterilmiştir. Pofut1 eksikliğinin, Notch1 ve

Notch2'nin hücre yüzeyi ifadesini az miktarda azaltmasına rağmen, Notch reseptörlerinin Delta benzeri Notch ligandları ile bağlanmasını tamamen ortadan kaldırarak Notch hedeflerinin aktivasyonunu baskıladığı ortaya konulmuştur. Buna rağmen Notch sinyalinin aktivasyonunun, T lenfopoezi ve kemik iliği miyeloid hiperplazisini ortadan kaldırdığı bunun da Notch-ligand etkileşimlerinin modülasyonu yoluyla hematopoietik homeostazın Notch düzenlemesinde Pofut1'in önemli bir rolü olduğunu ortaya koyduğu gösterilmiştir.

Yokota et al. (2013) OSHK hastalarına ait doku örneklerinde ve OSHK hücre hatlarında yapılan *POFUT1* ifade analizi, *POFUT1*'in OSHK'da mRNA ve protein düzeyinde ifadesinin anlamlı derecede arttığını göstermektedir. OSHK hücrelerinde *POFUT1* susturulmasının, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu baskıladığı ortaya konulmuştur. *POFUT1* ifadesi ile OSHK'lı hastaların klinik davranışları arasındaki ilişki araştırıldığında, *POFUT1* ifadesinin, primer tümör boyutu ile önemli ölçüde korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Primer OSHK tümörlerindeki *POFUT1* protein ifadesinin immünohistokimyasal analizi, T3/T4 evre tümör örneklerinde *POFUT1* immünohistokimyasal skorlarının, T1/T2 evre tümör örneklerine kıyasla çok daha yüksek olduğunu ve *POFUT1* ile OSHK'nın ilerlemesi arasında güçlü bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur.

Leng et al. (2018) Akciğer kanseri hastalarının tümör dokularında ve plazma örneklerinde yüksek *POFUT1* mRNA ifadesi olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada *POFUT1*'in yüksek duyarlılık ve özgüllük ile akciğer kanserinin erken tanısı için akciğer kanseri hastalarında tümörün evresi, histolojik türü, hastaların yaşı ve cinsiyetinden bağımsız olarak yüksek tanısal performanslı biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Liu et al. (2017) *POFUT1*'in normal gebeliği olan kadınlara kıyasla düşük yapan hastaların trofoblastlarında ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Kürtaj hastalarından alınan trofoblast hücrelerinde normal hamile kadınlara kıyasla *POFUT1* seviyesinin azaldığı ve azalan *POFUT1* ifadesinin trofoblast hücre göçünü ve proliferasyonunu inhibe ettiği, *POFUT1* stimülasyonunun hücrelerin S-fazına geçişini indükleyerek hücre döngüsün ilerlemesini arttırdığı ve bu şekilde trofoblast hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği

ortaya konulmuştur. *POFUT1*'in *siklin D1*, *siklin E*, *CDK2*, *CDK4* ve *pRb*'nin ifadesini indükleyerek MAPK ve PI3K/Akt sinyal yollarının inhibitörleri p21 ve p27'nin ifadesini inhibe ederek trofoblast hücre proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir.

Wahby et al. (2021) Musküler invaziv mesane kanseri hastalarında çok değişkenli Cox regresyon analizine göre düşük *POFUT1* mRNA ifadesi olan hastaların, kanser spesifik ölüm oranı için daha fazla risk altında olduğu gösterilmiştir. Lenf nodu metastazı olmayan musküler invaziv mesane kanseri hastalarının alt grup analizi, düşük *POFUT1* ifadesinin azalan sağkalım ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Wan et al. (2017) Meme kanseri doku örneklerinde normal dokulara kıyasla *POFUT1*, *SLUG* ve *NICD* ifadesinin anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir. *POFUT1*, *SLUG* ve *NICD*'nin yüksek ifadesi, ileri evre tümör, yüksek histolojik grade ve lenf nodu metastazı gibi kötü prognostik faktörlerle anlamlı derecede ilişkilendirilmiştir. Yapılan web tabanlı analiz ile yüksek *POFUT1* ve *NOTCH1* mRNA ifadesinin meme kanseri hastalarında daha kötü sağkalım sonucu ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Meme kanserinde *POFUT1*'in Notch protein ifadesi ile pozitif bir korelasyonu olduğu gösterilmiş ve *POFUT1*'in meme kanserinde de Notch1 sinyal yolağının anormal aktivasyonundan sorumlu olabileceği belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez kapsamında kullanılan cihazlar Çizelge 3.1.'de, kullanılan sarf malzemeler, kimyasal maddeler ve kitler Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz	Marka	Kullanım Amacı
Derin Dondurucu (-20°C)	Templow	Kimyasal malzemeleri ve kitleri saklamak için kullanıldı.
Buzdolabı (4°C)	Edesa	Kimyasal malzemeleri ve kitleri saklamak için kullanıldı.
Derin Dondurucu (-80°C)	ESCO Lexicon®	Hücreleri, kimyasal malzemeleri ve kitleri saklamak için kullanıldı.
Epoch Spektrofotometre	BioTek EPOCH	RNA, protein konsantrasyonlarının ölçülmesi ve hücre canlılık testlerinde absorbans ölçümü için kullanıldı.
Laminar air-flow (Class II Safety Cabinet)	ESCO NordicSafe™	Hücre kültürü çalışmalarının steril ve izole bir ortamda gerçekleştirilmesi için kullanıldı.
CO ₂ İnkübatör	ESCO Celculture CO ₂ Incubator	Hücrelere uygun büyüme ortamı sağlamak amacıyla kullanıldı.

Çizelge 3.1. (Devam)

Mikropipet	Axypet	Deneylelerin tamamında kullanılacak sıvı malzemelerin miktarlarını hacimsel olarak doğru şekilde belirlemek amacıyla kullanıldı.
Mini Santrifüj	WiseSpin	Hücrelerin çöktürülmesi, RNA ve protein izolasyonunda kullanıldı.
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Hücrelerin çöktürülmesi, RNA ve protein izolasyonunda kullanıldı.
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10	Katı-Sıvı karışımları homojenize etmek amacıyla kullanıldı.
Otoklav	Tomy SX-500E	Deneylelerde kullanılan materyallerin tamamını sterilize etmek amacıyla kullanıldı.
İnvert Mikroskop	Leica	Hücrelerin görüntülenmesinde ve fotoğraflanmasında kullanıldı.
Su Banyosu	Wisd WiseBath	Kullanılacak solüsyonların belirli sıcaklıklara ısıtılması amacıyla kullanıldı.
Saf Su Cihazı-UV	Millipore Direct- Q-3	Hazırlanan çözeltilerin çözücüsü olarak kullanıldı.
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202	Kullanılacak materyallerin ısıtılması-soğutulması amacıyla kullanıldı.
Dikey Jel Yürütme Sistemi	Bio-Rad	Proteinlerin SDS-PAGE jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasında kullanıldı.

Çizelge 3.1. (Devam)

Yatay Jel Yürütme Sistemi	Bio-Rad	İzole edilen RNA'ların integritelerinin kontrol edilmesinde kullanıldı.
Jel Görüntüleme Sistemi	Bio-Rad ChemiDoc	Western Blot membranlarının, agaroz jellerin görüntülenmesinde kullanıldı.
Blotlama Cihazı	Bio-RadTrans-Blot® Turbo™	Western blot deneyinde proteinlerin jelden Membrana yarı-kuru transferi için kullanıldı.
Termal Döngü Cihazı	SensQuest Labcycler	cDNA'ların sentezlenmesinde kullanıldı.
Tissue Lyser LT	Qiagen	Protein izolasyonunda dokuları parçalamak amacıyla kullanıldı.
Rotor-Gene Q Real-Time PCR	Qiagen	Gen ifadelerinin mRNA düzeyinde kantitatif analizi için kullanıldı.
Çalkalamalı İnkübatör	ZHİCHENG ZHWY-2102C	Plazmitlerin bakteri hücrelerinde çoğaltılması amacıyla kullanıldı.
İnkübatör	Memmert	Transformasyon sonrasında bakterilerin petri kaplarında büyütülmesi amacıyla kullanıldı.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kitlerin, kimyasallar ve sarf malzemelerin listesi

Malzeme	Marka	Kullanım Amacı
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific®	Dokulardan ve hücrelerden izole edilen RNA’lardan cDNA sentezlenmesinde kullanıldı.
EvaGreen PCR Master Mix	Solis Biodyne	Gen ifadesinin mRNA düzeyinde kantitatif gerçek zamanlı PCR ile belirlenmesinde kullanıldı.
Aldehyde Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit	Sigma Aldrich	Hücrelerde ALDH aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanıldı.
Lipofectamine 3000 Transfection Reagent	Invitrogen	Hücrelere overekspresyon ve shRNA plazmitlerinin transfeksiyonu için kullanıldı.
EcoPURE Total RNA Kit	EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	Hücrelerden RNA izolasyonu için kullanıldı.
EcoSpin Plasmid Isolation Kit	EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	Çoğaltılan plazmitlerin sıvı bakteri kültürlerinden izolasyonu için kullanıldı.
ClearBand ECL Western Blot Substrat	EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	Peroksidaz enziminin substratı olarak antijen-antikor ilişkisinin ve miktarının belirlenmesinde ve görüntülenmesinde kullanıldı.
Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix High Concentration	Corning® (USA)	In vivo fare deneylerinde hücrelerin enjeksiyonunda kullanıldı.
Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix	Corning® (USA)	Perinöral invazyon deneylerinde dorsal root gangliaların kaplanması için kullanıldı.

Çizelge 3.2. (Devam)

TRIzol Reagent	Invitrogen	Dokudan RNA izolasyonunda hücrelerin parçalanması için kullanıldı.
POFUT1 primer antikor	Santa Cruz Biotechnology®	Western blot deneylerinde POFUT1 proteinlerini belirlemek amacıyla kullanıldı.
Ki-67 Rabbit Monoclonal antibody	Ventana Medikal Systems	İmmünohistokimya analizinde proliferatif marker olarak kullanıldı.
Rekombinant Epidermal Büyüme Faktör	PeproTech (USA)	In vitro kürecik oluşturma deneylerinde hücrelerin büyüme ortamı içerisinde kullanıldı.
Rekombinant Fibroblast Büyüme Faktör	PeproTech (USA)	<i>In vitro</i> kürecik oluşturma deneylerinde hücrelerin büyüme ortamı içerisinde kullanıldı.
Rekombinant İnsülin Büyüme Faktör	PeproTech (USA)	<i>In vitro</i> kürecik oluşturma deneylerinde hücrelerin büyüme ortamı içerisinde kullanıldı.
Sodyum Dodesil Sülfat	BioShop	Western blot deneylerinde SDS PAGE jeli ve yürütme tamponu içerisinde kullanıldı.
Corning BioCoat™ Matrigel Invasion Chamber	Corning® (USA)	İnvazyon deneylerinin gerçekleştirilmesinde kullanıldı.
Transwell® Permeable Supports Chamber	Corning® (USA)	Migrasyon deneylerinin gerçekleştirilmesinde kullanıldı.
Hydrocortisone	Sigma-Aldrich® (Germany)	SCC-9 hücrelerinin büyütülmesinde besiyeri içeriğinde kullanıldı.

Çizelge 3.2. (Devam)

Amonyum Persülfat	BioShop	SDS PAGE jelinin hazırlanmasında kullanıldı.
Etanol	Sigma-Aldrich® (Germany)	Sterilizasyon amacıyla kullanıldı.
Kloroform	Sigma-Aldrich® (Germany)	Dokudan RNA izolasyonunda kullanıldı.
Metanol	Sigma-Aldrich®	Hücreleri yüzeye sabitlemek (fiksasyon) için kullanıldı.
İzopropanol	Sigma-Aldrich®	SDS PAGE jelinin hazırlanmasında kullanıldı.
Dimetil sülfoksit (DMSO)	EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	Hücrelerin dondurma medyumunun içerisinde kullanıldı.
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamine (TEMED)	Sigma-Aldrich® (Germany)	Akrilamid-Bis akrilamidin polimerizasyonunu katalizlemek amacıyla kullanıldı.
Bis-akrilamid	Sigma-Aldrich® (Germany)	SDS PAGE jelinin polimerizasyonu için kullanıldı.
Akrilamid	BioShop	SDS PAGE jelinin polimerizasyonu için kullanıldı.
Trizma Base	Sigma-Aldrich® (Germany)	SDS PAGE jelinin hazırlanmasında kullanıldı.
Ponceau S	EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	Transfer aşamasından sonra membrandaki proteinleri görünür hale getirmek için kullanıldı.
Crystal Violet	Sigma-Aldrich®	Hücre migrasyon, invazyon ve tek hücre koloni testinde hücreleri boyamak için kullanıldı.

Çizelge 3.2. (Devam)

Proteaz İnhibitör Kokteyl	Thermo Scientific®	Protein izolasyonunda proteinleri parçalayan proteazları inhibe etmek amacıyla kullanıldı.
PMSF	Roche	Protein izolasyonu aşamasında hücre içinde proteinlerin serin proteazlar tarafından parçalanmasını önlemek amacıyla kullanıldı.
Süt Tozu	EcoTech Biotechnology ® (Türkiye)	Western Blot deneylerinde spesifik olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla membranı bloklamak için kullanıldı.
Laemli Sample Buffer 10x	EcoTech Biotechnology ® (Türkiye)	Protein örneklerinin hazırlanması için kullanıldı.
RIPA Lizis Buffer	EcoTech Biotechnology ® (Türkiye)	Protein izolasyonunda hücreleri parçalamak için kullanıldı.
L-Glutamin	Sigma-Aldrich®	Kültürdeki hücrelerin büyümesini destekleyici olarak kullanıldı.
Penisilin-Streptomisin	Gibco®	Hücreleri kontaminasyona karşı korumak amacıyla kullanıldı.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco®	Hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli büyüme faktörlerini içeren serum olarak kullanıldı.
Tripsin	Gibco®	Hücreleri pasajlama aşamasında bulundukları yüzeyden kaldırmak amacıyla kullanıldı.
DMEM F12 besi yeri	Gibco®	SCC-9 hücrelerinin büyütülmesi için besiyeri olarak kullanıldı.

Çizelge 3.2. (Devam)

RPMI 1640 besi yeri	EcoTech Biotechnology ® (Türkiye)	FaDu, Hep-2 ve Detroit-562 hücrelerinin büyütilmesi için kullanıldı.
Puromisin	BioShop	Memeli hücrelerine plazmitlerin transfeksiyonu sonrası hücrelerin seçilimi için kullanıldı.
Genetisin	BioShop	Memeli hücrelerine plazmitlerin transfeksiyonu sonrası hücrelerin seçilimi için kullanıldı.
Whatman Kâğıdı	Sigma-Aldrich®	Western Blot deneylerinde proteinlerin jelden membrana transferi aşamasında tampon akışını sağlamak için kullanıldı.
Nitroselüloz Membran	Sigma-Aldrich®	Proteinlerin jelden transferi için kullanıldı.
96 kuyucuklu plate	Corning® Costar®	Hücre canlılık testleri için hücrelerin kültüre edilmesi amacıyla kullanıldı.
6 kuyucuklu plate	Corning® Costar®	Tek hücre koloni testi için hücrelerin kültüre edilmesi amacıyla kullanıldı.
Steril serolojik pipetler	LP Italiana	Hücre kültürü çalışmalarında kullanıldı.
Falkon tüpleri	LP Italiana	Sıvı formda bulunan malzemelerin, kimyasalların ve besiyerlerinin saklanması, santrifüj işlemleri için kullanıldı.

Çizelge 3.2. (Devam)

96 well Ultra-Low Attachment Plate	Corning® (USA)	In vitro kürecik oluşturma deneylerinin gerçekleştirilmesinde kullanıldı.
Eppendorf tüpler (0,2-0,5-1,5 ml)	LP Italiana	Sıvı formda örneklerle çalışmak için kullanıldı.
Hücre kültürü flaskları	SPL (Korea)	Hücrelerin kültüre edilmesinde kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hastalar ve doku örnekleri

Baş ve boyun skuamöz hücreli tümör doku ve normal doku örnekleri Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan temin edilerek arşivlendi. Baş ve boyun kanseri tümör örneklerinin temini ve arşivlenme işlemi için öncelikle BBSHK hastalarından histopatolojik tanı için ameliyat ile biyopsi örnekleri alındı. Biyopsi sonucu skuamöz hücreli karsinom oldukları doğrulanan hastalar çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilmeden önce tüm hastalar bilgilendirildi ve tüm hastalardan yazılı bilgilendirilmiş onam alındı. Tümör dokularının ve eşleşen normal dokuların histolojik incelemeleri Atatürk Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Tümör doku örneklerinin klinik evrelemesi Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği TNM evreleme sistemine dayalı olarak yapıldı. Tüm doku örnekleri sıvı nitrojen içinde anında donduruldu ve kullanılıncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Doku örnekleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR; 30 tümör-normal doku çifti) analizlerinde, immünohistokimyasal analizlerde (55 tümör ve 27 normal doku örneği) ve western blot analizlerinde (15 tümör-normal doku çifti) kullanıldı. Çalışmanın etiği, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve onaylanmıştır (Onay No: B.30.2.ATA.0.01.00/407 ve B.30.2.ATA.0.01.00/129). Elde edilen tümör dokularının patoloji inceleme sonuçları ve hastalarla ilgili bilgiler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.3. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan temin edilen Larenks Kanseri tümör örneklerine ve hastalara ait bilgiler.

	Hasta Yaşı / Cinsiyeti	Ameliyat Türü	Tümör Tipi	TNM Evre	Histolojik Grade
C1	56 / E	DL-BX	Supraglottik	T4bN2cM0	IVB
C2	70 / E	Total Larenjektomi	Supraglottik	T4aN0M0	IVA
C3	61 / E	Total Larenjektomi	Supraglottik	T3N1M0	III
C4	54 / E	DL-BX	Supraglottik	T2N0M0	II
C5	57 / E	DL-BX	Glottik	T2N1M0	III
C6	70 / E	Parsiyel Larenjektomi	Supraglottik	T1N0M0	I
C7	44 / E	Total Larenjektomi	Glottik	T4aN2bM0	IVA
C8	63 / E	Total Larenjektomi	Glottik	T4aN0M0	IVA
C9	52 / E	Parsiyel Larenjektomi	Supraglottik	T2N0M0	II
C10	71 / E	Total Larenjektomi	Glottik	T4aN0M0	IV
C11	63 / E	Total Larenjektomi	Glottik	T4aN0M0	IVA
C12	75 / K	DL-BX	Glottik	T1N0M0	I
C13	52 / E	DL-BX	Glottik	T2N0M0	II
C14	66 / E	DL-BX	Glottik	T2N0M0	II
C15	55 / E	İNS-BX	Glottik	T4bN2M0	IVB
C16	52 / E	-	-	0	-
C17	55 / E	DL-BX	Supraglottik	T4bN1M0	IVB
C18	57 / E	Parsiyel Larenjektomi	Supraglottik	T3Nb2M0	IVA
C19	53/ E	DL-BX	Supraglottik	T4bN2bM0	IVB
C20	56 / E	Parsiyel Larenjektomi	Supraglottik	T2N0M0	II
C21	66 / E	Total Larenjektomi	Glottik	T4aN0M0	IVA
C22	30 / E	DL-BX	Glottik	T2N0M0	II
C23	58 / E	DL-BX	Glottik	T2N0M0	II
C24	51 / E	DL-BX	Supraglottik	T2N2bM0	IVA
C25	66 / E	Total Larenjektomi	Glottik	T3N2bM0	IVA
C26	68 / E	DL-BX	Supraglottik	T1N0M0	I
C27	60 / E	Total Larenjektomi	Glottik	T4aN2aM0	IVA
C28	67 / E	Total Larenjektomi	Glottik	T3N2cM0	IVA
C29	60 / E	Total Larenjektomi	Glottik	T4aN1M0	IVA
C30	77/ E	DL-BX	Glottik	T4aN0M0	IVA

3.2.2. *In Silico* analiz

POFUT1'in onkogenik potansiyelini ortaya koymak adına The Cancer Genome Atlas (TCGA) veritabanındaki veriler incelendi. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hastalarının tümör-normal doku örneklerinde POFUT1 mRNA ifadesi ile POFUT1 ifade seviyesinin klinik evreler ile ilişki verileri TCGA veritabanından elde edildi. POFUT1 gen mutasyonu ve gen ifade analizi cBioPortal veritabanında (<https://www.cbioportal.org>) bulunan TCGA örnekleri kullanılarak analiz edildi. Baş ve boyun tümör ve normal doku örneklerinde POFUT1 ifadesi ve kopya sayısı değişiklikleri Oncomine veritabanında (<https://www.oncomine.org>) depolanan Peng, Ginos ve Cromer verileri kullanılarak araştırıldı. POFUT1'in perinöral invazyonun olduğu veya olmadığı tümör doku örneklerindeki ifade analizi Gene Expression Omnibus (GEO) veritabanında depolanan halka açık GSE86544 veri seti kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.3. Hücreler ve kültür koşulları

İnsan hipofarenks skuamöz hücreli karsinom hücre hattı FaDu, insan dil skuamöz hücreli karsinom hücre hattı SCC-9 ve insan normal diş eti fibroblast hücre hattı HGF-1 hücreleri 2020-2022 yılları arasında ATCC® hücre kültür koleksiyonundan satın alındı. İnsan larenks skuamöz hücreli karsinom Hep-2 hücre hattı 2020 yılında ŞAP Enstitüsü'nden (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara, Türkiye) satın alındı. FaDu, Hep-2 ve Detroit-562 hücreleri, %10 fetal bovin serumu (FBS) (HyClone, Logan City, Utah, ABD), %1 penisilin-streptomisin (HyClone, Logan City, Utah, ABD) ve 2 mM L-glutamin (HyClone, Logan City, Utah, ABD) içeren, RPMI 1640 (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) besiyeri içerisinde büyütüldü. SCC-9 hücreleri, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-Glutamin ve 400 ng/ml Hidrokortizon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) içeren DMEM-F12 besiyeri içerisinde büyütüldü. HGF-1 hücreleri, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren DMEM (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) besiyeri içerisinde büyütüldü. Hücreler, 37°C %5 CO₂ içeren, nemlendirilmiş inkübatörde standart koşullar altında büyütüldü. Hücrelerin besiyeri 2-3 günde bir değiştirildi ve hücreler yaklaşık olarak %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlandı. Deneyler, hücreler çözüldükten sonra ilk 4-10 pasajdaki hücreler kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre hatları, mikoplazma

kontaminasyonu açısından rutin olarak test edildi ve deneylerin tamamında mikoplazma negatif hücreler kullanıldı.

3.2.4. Plazmitler ve hücrelere stabil transfeksiyonu

BBSHK hücre hatlarında POFUT1 overekspresyonu için POFUT1'in açık okuma çerçevesini içeren insan pCMV6-AC-GFP memeli ekspresyon vektörü (POFUT1 (NM015352) Human Tagged ORF Clone, Origene Technologies) ve kontrol plazmidi olarak pCMV6-AC-GFP (Origene Technologies, Inc.) memeli ekspresyon vektörü ticari olarak satın alındı.

BBSHK hücre hatlarında POFUT1 ifadesini inhibe etmek için POFUT1 shRNA plazmitleri kullanıldı. U6 promotörü kontrolü altında dört farklı POFUT1 shRNA dizisi ve kontrol shRNA dizisi içeren pGFP-V-RS plazmidleri (Origene Technologies, Inc.) ticari olarak satın alındı. POFUT1'i mRNA ve protein düzeyinde en etkili inhibe ettiği belirlenen iki shRNA sonraki deneylerde kullanılmak üzere seçildi.

Transfeksiyon işlemi Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (Invitrogen, San Diego, CA) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler 6 kuyucuklu platelere her kuyu için 80.000 hücre olacak şekilde ekildi. Birgün sonra transfeksiyon işlemi kısaca aşağıda tarif edildiği şekilde yapıldı.

6 kuyucuklu platelere her kuyu için 1 µl LP3000, 1,25 µl P3000 ve 625 ng plazmit kullanılarak transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. 125 µl OPTİMEM besiyeri ile LP3000 ve ayrı bir tüpte de 125 µl OPTİMEM besiyeri ile P3000 ve plazmit karıştırıldı. Daha sonra bu iki karışım birleştirildi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücreler bu transfeksiyon karışımı ile muamele edilerek 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

POFUT1 genini stabil yüksek düzeyde ifade eden, POFUT1 geninin stabil olarak susturulduğu hücreler ile kontrol hücreleri seçim sağlamak amacı ile 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültür edildi.

3.2.5. *POFUT1* genini yüksek düzeyde ifade eden veya *POFUT1* geninin susturulduğu hücre hatlarının oluşturulması

POFUT1 genini stabil şekilde yüksek düzeyde ifade eden Hep-2, FaDu hücreleri ve kontrol hücrelerinin seçilimini sağlamak amacıyla %10 FBS, %1 penicilin/streptomisin, %1 L-Glutamin ve 250 µg/ml Geneticin (Santa Cruz Biotechnology) eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besiyeri içerisinde, SCC-9 (SCC-9 *POFUT1*) hücreleri ve kontrol hücreleri ise seçim sağlamak amacıyla %10 FBS, %1 penicilin/streptomisin, %1 L-Glutamin, 400 ng/ml Hidrokortizon ve 62,5 µg/ml Geneticin (Santa Cruz Biotechnology) eklenerek hazırlanan DMEM F12 besiyeri içerisinde 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde ortalama 1 ay boyunca kültür edildi ve hücrelerin seçilimi tamamlandı. Seçilimi tamamlanan dirençli hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere çoğaltıldı.

POFUT1 geninin stabil olarak susturulduğu Hep-2, FaDu hücreleri ve kontrol hücrelerinin seçilimini sağlamak amacı ile %10 FBS, %1 penicilin/streptomisin, %1 L-Glutamin ve 0,5 µg/ml Puromisin eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besiyeri içerisinde 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde ortalama 1 ay boyunca kültür edildi ve hücrelerin seçilimi tamamlandı. Seçilimi tamamlanan dirençli hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere çoğaltıldı.

HGF-1 overekspresyon deneyleri stabil olmayan transfeksiyon ile gerçekleştirildi. Hücreler Lipofectamine 3000 Transfection Reagent kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek overekspresyon ve kontrol plazmidi ile transfekte edildi. Hücre transfeksiyonundan 24 saat sonra, transfeksiyon ajanına bağlı sitotoksiteyi önlemek için kuyulardaki besiyeri uzaklaştırıldı. Kuyulara taze besiyeri eklendi ve 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli inkübatör içerisinde kültür edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler toplandı, sayıldı ve sonraki deneyler için kullanıldı.

3.2.6. Doku örneklerinden protein izolasyonu

POFUT1'in normal ve tümör doku örneklerinde protein düzeyinde ifadesini değerlendirmek için doku örneklerinden protein izolasyonu gerçekleştirildi. -80°C'de

saklanan doku örnekleri öncelikle sıvı nitrojen içerisinde havanda dövülerek toz haline getirildi. Daha sonra doku örnekleri 10 mM PMSF ve 1x fosfataz inhibitörü içeren RIPA Lizis Tamponu (EcoTech Biotechnology) içerisinde iyice pipetaj yapıldı ve QIAGEN TissueLyser LT kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek doku örnekleri homojenize edildi. Homojenize edilen doku örnekleri 4°C’de 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında proteinlerin bulunduğu süpernatantlar yeni ependorf tüplere aktarıldı. Protein konsantrasyonları ölçüldü. Protein örnekleri 10x Laemmli Sample Buffer (EcoTech Biotechnology) ile 100°C’de 5 dakika kaynatıldı ve ardından buz üzerine alındı. Örnekler kullanılıncaya kadar -80°C derin dondurucu buzdolabında saklandı.

3.2.7. Hücrelerden protein izolasyonu

POFUT1’in stabil bir şekilde sürdürüldüğü ya da ifadesinin arttığı hücrelerde POFUT1’in protein düzeyinde ifadesini kontrol etmek için hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi. POFUT1’in stabil bir şekilde sürdürüldüğü ya da ifadesinin arttığı Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücreleri ile kontrol hücreleri eşit miktarda sayıldı. Daha sonra hücreler 10 mM PMSF ve 1x fosfataz inhibitörü içeren RIPA Lizis Tamponu (EcoTech Biotechnology, Türkiye) içerisinde süspanse edildi ve üç kez dondur-çöz yapılarak iyice parçalandı. Buz üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücre lizatları 4°C’de 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında proteinlerin bulunduğu süpernatantlar toplandı ve yeni ependorf tüplere aktarıldı. Protein konsantrasyonları ölçüldü. Protein örnekleri 10x Laemmli Sample Buffer (EcoTech Biotechnology) ile 100°C’de 5 dakika kaynatıldı ve hemen buz üzerine alındı. Örnekler kullanılıncaya kadar -80°C derin dondurucu buzdolabında saklandı.

3.2.8. Western blot analizi

Her protein örneğinden eşit miktarlarda kullanılarak proteinler % 10 SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak nitroselüloz membranlara aktarıldı.

Membranlar, $1 \times$ PBST tamponunda (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) hazırlanmış % 5 yağsız süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi. 4°C’de gece boyunca POFUT1 (1:500, Santa Cruz Biotechnology) ve β -aktin (1: 200, Santa Cruz Biotechnology) primer antikorları ile blotlandı. Membranlar PBST ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat HRP ile konjuge sekonder antikorla inkübasyona bırakıldı. Protein sinyalleri Clarity Max ECL Western Blot Substrate (BioRad, United States, Hercules, CA) veya ClearBand Western Blotting Substrate (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) kullanılarak görüntülendi. Spesifik protein bant yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak ölçüldü.

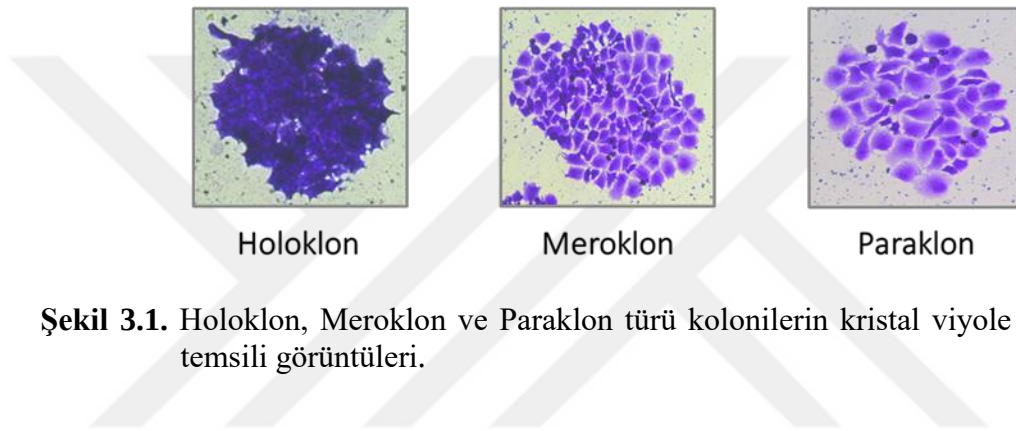
3.2.9. POFUT1’in Hep-2, FaDu, SCC-9 ve HGF-1 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması

POFUT1’in hücre canlılığı üzerine etkisi Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8, Ecotech Biotechnology, Erzurum, Turkey) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek araştırıldı. Kısaca, POFUT1’in stabil bir şekilde susturulduğu ya da ifadesinin arttığı hücrelerden FaDu ve Hep-2 hücreleri 96 kuyucuklu platelerin kuyularına kuyucuk başına $2,5 \times 10^3$ hücre düşecek şekilde ekilirken SCC-9 hücreleri 96 kuyucuklu platelerin kuyularına kuyucuk başına 3×10^3 hücre düşecek şekilde ekildi ve 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda kuyulardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve her kuyuya %10 CVDK-8 solüsyonu içeren besiyeri eklendi. Hücreler inkübatör içerisinde 37°C’de karanlıkta 3 saate kadar inkübe edildi. Hücre canlılığı Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA) ile 450 nm’de optik yoğunluk ölçülerek belirlendi. Hücre canlılık oranındaki değişiklikler, kontrol grupları referans alınarak hesaplandı. Deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.2.10. POFUT1’in Hep-2, FaDu, SCC-9 ve HGF-1 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkisinin araştırılması

POFUT1’in hücrelerin koloni oluşturma potansiyeli üzerine etkisi tek hücre koloni testi kullanılarak değerlendirildi. POFUT1’in stabil bir şekilde susturulduğu ya da ifadesinin arttığı FaDu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücreleri 6 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna 3.000 hücre olacak şekilde ekildi. Kuyulardaki besiyeri her 3-4 günde bir

değiştirildi. Hücreler yaklaşık olarak iki hafta boyunca inkübasyona bırakıldı. İki hafta sonunda yeterli büyüklüğe ulaşan koloniler %100 metanol ile sabitlendi ve 20 dakika boyunca %2 etanol ve %0,1 kristal viyole içeren solüsyon ile boyandı. Koloniler invert mikroskop yardımıyla sayıldı ve morfolojik olarak holoklon, meroklon ve paraklon koloni türlerine göre sınıflandırıldı. Sıkıca paketlenmiş küçük hücrelerden oluşan yuvarlak koloniler holoklonlar, iğ yapısında veya yassı görünüme sahip dağınık formda daha büyük hücrelerden oluşan koloniler paraklonlar, holoklon ve paraklon tipi kolonilerin ara özelliklerine sahip olan koloniler meroklonlar olarak adlandırıldı (Şekil 3.1).



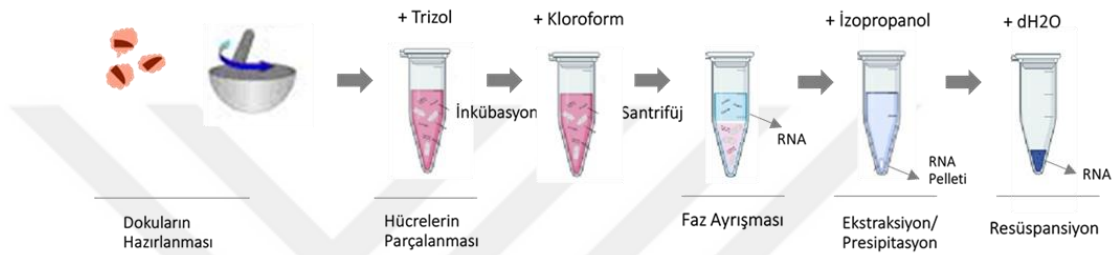
Şekil 3.1. Holoklon, Meroklon ve Paraklon türü kolonilerin kristal viyole ile boyanan temsili görüntüleri.

3.2.11. Dokudan RNA izolasyonu

-80°C’de saklanan tümör ve normal doku çiftlerinden eşit miktarda kullanılarak sıvı nitrojen içerisinde havanda dövülerek toz haline getirildi ve 500 µL TRIzol solüsyonu içerisinde pipet yardımıyla iyice homojenize edildi. Homojenize edilen dokular, dokuların iyice parçalanması ve nükleik asitlere bağlanan proteinlerin denatürasyonu için TRIzol solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Daha sonra örneklerin üzerine 200 µL kloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis-MO-USA) eklendi ve tüpler 5-6 kere ters düz edilerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 4°C’de 12.000g’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda organik faz, ara faz ve suda çözünen faz ayrımı gerçekleşti. RNA’ların bulunduğu en üstteki suda çözünen faz yeni bir tüpe aktarıldı. RNA presipitasyonu için üzerine eşit hacimde izopropanol eklendi ve örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 4°C’de 12.000g’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernatantlar uzaklaştırıldı ve tüpün altında beyaz renkte- renksiz çökelti şeklinde görülebilen RNA’lar

3. MATERYAL ve YÖNTEM

1 ml %75 etil alkolle (Sigma-Aldrich, St. Louis-MO–USA) yıkanarak 4°C’de 7.500g’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda etil alkol dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. RNA pelletleri oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı ve iyice kuruduktan sonra nükleaz içermeyen moleküler grade su içerisinde çözüldü (Şekil 3.2). RNA’ların konsantrasyonları ve saflığı Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA) cihazı ile 260/280 ve 260/230 nm’de absorbans ölçülerek belirlendi. RNA integriteleri jel elektroforez yardımıyla kontrol edildi. RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C’de saklandı.



Şekil 3.2. Dokudan RNA izolasyonu basamakları

3.2.12. Hücrelerden RNA izolasyonu

POFUT1’in stabil bir şekilde susturulduğu ya da ifadesinin arttığı hücrelerden RNA izolasyonu EcoPure Total RNA Kit (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Turkey) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. RNA’ların konsantrasyonları ve saflığı Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA) cihazı ile 260/230 ve 260/280 nm’de absorbans ölçülerek belirlendi. RNA integriteleri jel elektroforez yardımıyla kontrol edildi. RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C’de saklandı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.4. Larenks Kanseri tümör ve normal örneklerinden izole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyonları.

Örnek adı	Tümör Doku		Normal Doku	
	Kons. (ng/μl)	A260/A280	Kons. (ng/μl)	A260/A280
C1	616	2,0	703	1,9
C2	1.656	2,0	252	1,6
C3	1.717	1,9	276	1,7
C4	865	2,0	265	1,8
C5	1.357	2,0	373	1,9
C6	927	1,9	376	1,6
C7	877	1,9	340	1,7
C8	1.686	1,9	690	1,8
C9	370	1,8	151	1,6
C10	121	1,7	160	1,5
C11	823	1,8	407	1,9
C12	869	2,0	354	1,9
C13	1.548	1,8	142	1,9
C14	2.174	1,7	373	1,7
C15	1.098	1,9	516	1,6
C16	21	1,8	390	1,8
C17	199	1,7	60	1,8
C18	164	2,0	83	1,8
C19	634	2,0	640	2,0
C20	1.002	2,0	297	1,9
C21	579	2,0	360	1,9
C22	117	1,7	76	1,5
C23	761	1,9	1.379	1,8
C24	1.392	1,9	1.373	1,8
C25	1.660	1,8	218	1,6
C26	1.733	1,9	470	1,7
C27	1.577	2,0	648	2,0
C28	544	1,9	440	1,9
C29	638	1,9	407	1,9
C30	2.508	1,8	154	1,8

3.2.13. cDNA sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit' (Thermo, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. Kısaca, kitin içeriğindeki bileşenler kullanılarak 2x RT master mix hazırlandı ve 20 µL reaksiyon için 1.000 ng RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentez işlemleri SensQuest Labcycler termal döngü cihazı (PZR) ile sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika ve 85°C'de 5 dakika basamakları takip edilerek gerçekleştirildi.

3.2.14. Kantitatif gerçek zamanlı PZR

POFUT1'in normal ve tümör doku örneklerindeki ifadesi SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ile üretici firmanın protokolü takip edilerek Rotor-Gene qRT-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Şimdiye kadar çalışmaya dahil edilen hastaların normal ve tümör doku örneklerinde POFUT1'in rölatif ifade düzeyi, POFUT1'in stabil bir şekilde susturulduğu ya da ifadesinin arttığı Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinde POFUT1'in, EMT ve kök hücre işaretçilerinin rölatif ifade düzeyi değerlendirildi. Primerlerin özgünlüğü, erime eğrisi analizi ile doğrulandı. Gen ifadelerinin normalizasyonu için dokularda çok miktarda bulunan GAPDH internal kontrol olarak kullanıldı. Deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve rölatif kantitasyon analizi delta-delta-CT metodu kullanılarak yapıldı. Çalışma kapsamında kullanılan primerlerin dizisi Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Kantitatif gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primerler ve sekansları.

Gen	Sekans
GAPDH-F	5'-CCATCTTCCAGGAGCGAGATC-3'
GAPDH-R	5'-GGCATTGCTGATGATCTTGAGG-3'
POFUT1-F	5'-GGCCCATTCTGGGATCAGTT-3'
POFUT1-R	5'-TCCCGTCTTCACCATTTTCGTC-3'
SOX2-F	5'-CTCCGGGACATGATCAGC-3'
SOX2-R	5'-GGTAGTGCTGGGACATGTG-3'
KLF4-F	5'-CCCAATTACCCATCCTTCCTG-3'
KLF4-R	5'-GTCTTCCCCTCTTTGGCTTG-3'
OCT4-F	5'-CTGGAGAAGGAGAAGCTGGA-3'
OCT4-R	5'-CAAATTGCTCGAGTTCTTTCTG-3'
ABCG2-F	5'-AGCAGCAGGTCAGAGTGTGG-3'
ABCG2-R	5'-GATCGATGCCCTGCTTTACC-3'
E-Cad-F	5'-TGCCCAGAAAATGAAAAAGG-3'
E-Cad-R	5'-GTGTATGTGGCAATGCGTTC-3'
N-Cad-F	5'-ACAGTGGCCACCTACAAAGG-3'
N-Cad-R	5'-CCGAGATGGGGTTGATAATG-3'
SNAIL1-F	5'-AAGATGCACATCCGAAGCC-3'
SNAIL1-R	5'-CGCAGGTTGGAGCGGTCAGC-3'
SNAIL2-F	5'-ATACCACAACCAGAGATCCTCA-3'
SNAIL2-R	5'-GACTCACTCGCCCCAAAGATG-3'
ZEB1-F	5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3'
ZEB1-R	5'-ACAGCAGTGTCTTGTTGTTGTAG-3'
ZEB2-F	5'-AACAACGAGATTCTACAAGCCTC-3'
ZEB2-R	5'-TCGCGTTCCTCCAGTTTTCTT-3'
Vimentin-F	5'-GAGAACTTTGCCGTTGAAGC-3'
Vimentin-R	5'-GCTTCCTGTAGGTGGCAATC-3'

3.2.15. Transwell migrasyon testi

POFUT1'in hücre göçü üzerine etkileri Transwell insert testi ile Transwell® Permeable Supports (24-well insert, por çapı: 8.0- μ m; Corning, Tewksbury, MA, USA) kullanılarak değerlendirildi. POFUT1'in stabil bir şekilde susturulduğu ya da ifadesinin arttığı Hep-2 ve FaDu hücreleri (2.5×10^4 hücre) 250 μ L serum içermeyen RPMI-1640 besiyeri içerisinde, SCC-9 hücreleri (8×10^4 hücre) 250 μ L serum içermeyen DMEM-F12 besiyeri içerisinde ve HGF-1 hücreleri (7.5×10^4 hücre) ise 250 μ L serum içermeyen DMEM besiyeri içerisinde süspanse edildi ve üç tekrarlı olacak şekilde insertlerin içerisine eklendi. İnsertler, içerisinde kemoreaktan olarak %10 FBS içeren besiyeri bulunan 24 kuyucuklu plakaların kuyularına yerleştirildi. FaDu ve Hep-2 hücreleri 24 saat boyunca, SCC-9 ve HGF-1 hücreleri 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli inkübatör içerisinde kültür edildi. İnkübasyon süresi sonunda göç etmeyen hücreler pamuk swap yardımıyla chamberların üst tarafından kazındı ve filtrenin alt yüzeyine göç eden hücreler %100 metanol ile sabitlendi. Daha sonra chamberlar %2 etanol ve %0,1 kristal viyole içeren solüsyon içerisine bırakıldı ve 20 dakika boyunca boyandı. Boyayı uzaklaştırmak için chamberlar 1x PBS (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile 2-3 kez yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra membranlar slaytların üzerine sabitlendi, farklı bölgelerden hücre sayımı yapıldı ve invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) kullanılarak fotoğraflar çekildi.

3.2.16. Transwell matrigel invazyon testi

POFUT1'in hücrelerin invazyon potansiyeli üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 'Corning BioCoat™ Matrigel Invasion Chamber'lar kullanıldı. POFUT1'in stabil bir şekilde susturulduğu ya da ifadesinin arttığı Hep-2 ve FaDu hücreleri (5×10^4 hücre) 250 μ L serum içermeyen RPMI-1640 besiyeri içerisinde, SCC-9 hücreleri (10×10^4 hücre) 250 μ L serum içermeyen DMEM-F12 besiyeri içerisinde ve HGF-1 hücreleri (8×10^4 hücre) ise 250 μ L serum içermeyen DMEM besiyeri içerisinde süspanse edildi ve üç tekrarlı olacak şekilde insertlerin içerisine eklendi. İnsertler içerisinde kemoreaktan olarak %10 FBS içeren besiyeri bulunan 24 kuyucuklu plakaların kuyularına yerleştirildi. FaDu ve Hep-2 hücreleri 24 saat boyunca, SCC-9 ve HGF-1 hücreleri 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli inkübatör içerisinde kültür edildi. İnkübasyon süresi sonunda göç

etmeyen hücreler pamuk swap yardımıyla chamberların üst tarafından kazındı ve filtrenin alt yüzeyine göç eden hücreler %100 metanol ile sabitlendi. Daha sonra chamberlar %2 etanol ve %0,1 kristal viyole içeren solüsyon içerisine bırakıldı ve 20 dakika boyunca boyandı. Boyayı uzaklaştırmak için chamberlar 1x PBS (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile 2-3 kez yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra membranlar slaytların üzerine sabitlendi, farklı bölgelerden hücre sayımı yapıldı ve invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) kullanılarak fotoğraflar çekildi.

3.2.17. Kürecik oluşturma deneyi

POFUT1'in stabil bir şekilde susturulduğu ya da ifadesinin arttığı hücreler 100 µg/ml penicilin/streptomisin içeren 20 ng/ml rekombinant epidermal büyüme faktör (EGF) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), 10 ng/ml rekombinant fibroblast büyüme faktör (FGF) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) ve 5 µg/ml rekombinant insülin büyüme faktör (IGF) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) eklenmiş serumsuz besiyeri içerisinde 96 well ultra-low attachment plakaların (Corning, 3473, Kennebunk, ME, USA) herbir kuyusuna 1.000 hücre gelecek şekilde 3 tekrarlı olarak ekildi. Hücrelerin ekildiği ilk gün 0. gün olarak kabul edildi ve hücreler kürecik oluşturmak üzere 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli inkübatör içerisinde 7 gün boyunca kültür edildi. Besiyeri üç günde bir taze besiyeri ile değiştirildi. 7 gün sonra, her kuyudaki kürecikler (kürecik çapı $\geq 50 \mu\text{m}$) sayıldı ve her gruptan rastgele seçilen bölgelerin fotoğrafları invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) kullanılarak çekildi.

3.2.18. Immunohistokimya analizi

Tümör ve normal doku örnekleri, %10 paraformaldehit içerisinde oda sıcaklığında bir gece boyunca fikse edildi. Multiblok doku kesitleri 4 µm kalınlığında kesildi. Tüm immunohistokimya prosedürleri otomatize histostainer sistem (Benchmark ULTRA; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) kullanılarak gerçekleştirildi. Deparafinize, rehidrate edilen ve antijen ile muamele edilen slaytlar, %3 hidrojen peroksit ve %5 keçi serumu ile bloke edildi. POFUT1 ifadesi, POFUT1'e özgü ticari olarak satın alınan monoklonal antikor (Abcam, Cambridge, MA) kullanılarak değerlendirildi. Tümör hücrelerinin proliferatif indeksi, primer monoklonal Ki-67 antikoruna ile tespit edildi.

Formalinle fikse edilen ve parafine gömülen doku kesitleri, primer antikorlarla 36°C’de 40 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, UltraView Universal Detection Kit/760-700 (Ventana Medical Systems) kullanılarak boyama gerçekleştirildi. Son olarak kesitler hematoksilen ile boyandı, sonra dehidrate edilerek temizlendi ve değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyamanın yoğunluğu, tüm klinik bilgilere kör olan iki bağımsız patolog tarafından her doku için rastgele seçilen üç bölgeden analiz edildi. Görüntüler 400× büyütmede ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

3.2.19. Ksenograft fare modellerinin oluşturulması ve *in vivo* deneyler

6-8 haftalık erkek BALB/c-nu/nu (nude) fareler (20–30g) Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı’ndan satın alındı. Ksenograft fare modelleri POFUT1’in stabil bir şekilde susturulmuş olduğu shPOFUT1-1 FaDu hücreleri ve kontrol FaDu hücreleri kullanılarak oluşturuldu. Enjeksiyondan önce farelerin ağırlıkları ölçüldü, fareler rastgele ve eşit olarak iki gruba ayrıldı. POFUT1’in stabil bir şekilde susturulduğu shPOFUT1-1 FaDu hücreleri ve kontrol FaDu hücreleri logaritmik büyüme fazında toplandı ve hücreler sayıldı. Tümör oluşumunu indüklemek için her enjeksiyonda 1×10^6 hücre serum içermeyen besiyeri içerisinde süspanse edildi ve Matrigel ile karıştırıldıktan sonra 0,1 mL’lik hücre süspansiyonu farelerin deri altından çift taraflı olarak enjekte edildi. Her grupta üç fare kullanıldı ve tümörler enjeksiyondan sonra 21 gün boyunca gözlemlendi (Şekil 3.3). Tümör hücreleri enjekte edildikten sonra, farelerin genel durumu ve büyümesi yakından gözlemlendi. BALB/c-nu/nu (nude) fareler, patojen içermeyen koşullar altında, ad-libitum yiyecek ve su bulunan kafeslerde büyütüldü. Deney süresi boyunca kafesler, 22–28°C sabit sıcaklık ve %45-60 sabit nem içeren odalarda bulunduruldu. Oluşan tümörler kaliper kullanılarak 3 günde bir ölçüldü ve tümör hacimleri $ab^2/2$ (a: tümörün en uzun dikey çapı, b: tümörün en kısa dikey çapı) formülü kullanılarak hesaplandı. 21 gün sonra farelere servikal dislokasyon ile ötenazi yapıldı, tümörler daha ileri analizler için hızlı bir şekilde çıkarıldı. Tümörlerin hacimleri, ağırlıkları ölçüldü ve fotoğrafları çekildi. Daha sonra tümör dokuları immünohistokimyasal patolojik analiz için %4 formaldehit içerisine alınarak fikse edildi. Deneyler Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı’nda (Ankara, Türkiye) tamamlandı ve hayvanların bakımı, beslenmesi, ötenazi protokolleri Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Etik Kurulu (Ankara,

3. MATERYAL ve YÖNTEM

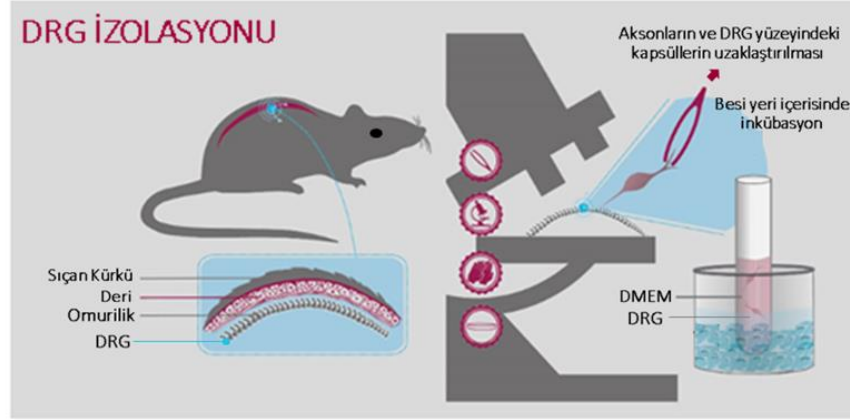
Türkiye) tarafından gözden geçirilerek onaylandı. Deneylerin tamamı uluslararası hayvan deneyleri yönetmeliğine uygun olarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. Ksenograft fare modellerinin oluşturulması ve *in vivo* deney aşamaları

3.2.20. Dorsal Root Ganglion (DRG) izolasyonu

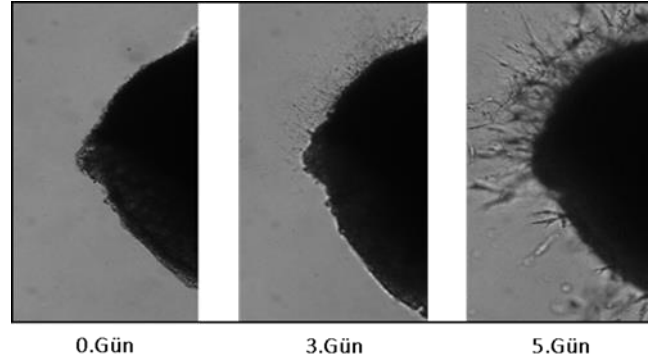
6-8 haftalık erkek Sprague Dawley sıçanları (yaklaşık 180-200g ağırlığında) Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarı'ndan temin edildi. Sıçanların beslenmesi, bakımı, kullanımı ve bu çalışma için sıçanlardan DRG izolasyon protokolü Atatürk Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından gözden geçirildi ve onaylandı (Onay Tarihi 27.01.2021, Onay Numarası: 77040475-641.04-E.2100022061). Kısaca, Sprague Dawley sıçanlarına CO₂ kabini kullanılarak ötenazi yapıldı. Sıçanların sırt yüzeyindeki tüyler traşlandı ve alkol ile sterilize edilerek sıçanlar DRG izolasyonu için hazırlandı. Daha sonra omuriliği ortaya çıkarmak için kuyruk kökünden sıçanın baş kısmına kadar omurga boyunca sıçanların mediodorsal derisi kesildi. DRG ve sinirler omurganın servikal, torasik ve lumbal bölümlerinden izole edildi ve soğuk PBS kullanılarak 2-3 kez yıkandı. İzole edilen DRG'ler steril koşullar altında antibiyotik içeren soğuk DMEM besi yeri içerisinde alındı ve buz üzerinde inkübe edildi. DRG'lerin etrafındaki aksonlar ve DRG yüzeyinde bulunan kapsül mikroskop altında DRG'lere hasar vermeden dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı (Şekil 3.4). İzolasyonu tamamlanan DRG'ler 4°C'de saklanarak aynı gün içerisinde *in vitro* perinöral invazyon deneyi için kullanıldı.



Şekil 3.4. Sprague Dawley sıçanlarından DRG izolasyonu

3.2.21. *In vitro* perinöral invazyon

İzole edilen DRG'ler 33 mm petri kaplarının ortasına yerleştirildi ve üzerine 20 µl büyüme faktörü azaltılmış Matrigel eklenerek DRG'lerin üzeri kaplandı. Üzeri Matrigel ile kaplanmış olan DRG'lerin kurummasına izin verilmeden Matrigel katılaşması için oda sıcaklığında yaklaşık olarak 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Matrigel katılaştıktan sonra, petri kaplarına %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamine içeren besi yeri eklendi. DRG'lerden nöral uzantıların oluşmasına izin vermek için inkübatör içerisinde 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.5). Daha sonra, her petri kabına 10.000 hücre ekildi ve kanser hücrelerinin perinöral invazyon potansiyelini *ex-vivo* araştırmak için 2 gün daha inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 7. gününde DRG'lerden oluşan nöral uzantılara göç eden hücreler invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Almanya) yardımıyla sayıldı ve fotoğraflar çekildi.



Şekil 3.5. DRG’lerden 0, 3 ve 5. günlerde oluşan uzantıların temsili görüntüsü (Huyett et al. 2017)’den değiştirilerek alınmıştır.

3.2.22. Aldehit dehidrogenaz aktivite analizi

Baş ve boyun kanseri hücrelerinde total ALDH enzim aktivitesi Aldehyde Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) ile üretici firmanın protokolü takip edilerek değerlendirildi. Kısaca, hücreler 200 μ L soğuk ALDH assay buffer içerisinde süspanse edildi ve 13.000 g’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernatantlar yeni tüplere toplandı. Daha sonra her örnekten 50 μ L, ALDH binding buffer, ALDH substrate ve asetaldehit ile karıştırıldı. Örnekler üç tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu platelerin kuyularına yüklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA) kullanılarak 450 nm’de absorbans ölçüldü. Kontrol örneklerinin absorbans okumaları en yüksek standartın absorbans okumasından daha yüksek oluncaya kadar her 2-3 dakikada bir ölçümler tekrarlandı. Her örneğin ALDH aktivitesi, üretici firmanın protokolü takip edilerek hesaplandı.

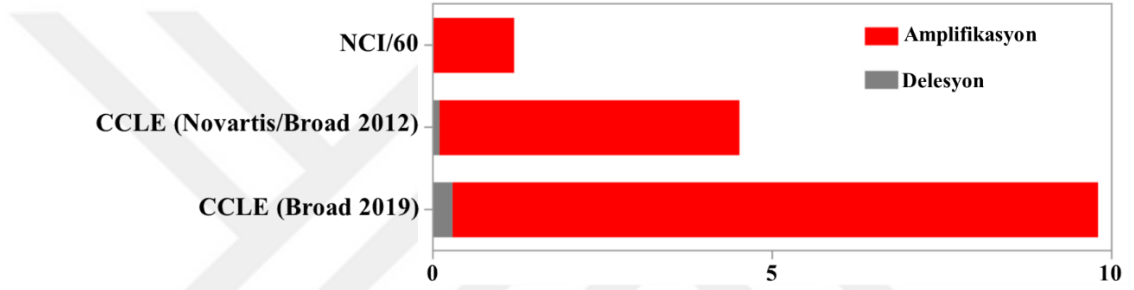
3.2.23. İstatistiksel analiz

Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, kontroller ile kıyaslanarak Mann-Whitney-U testi kullanılarak yapılmıştır. Figürler GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) ve Adobe Photoshop 21 kullanılarak oluşturulmuştur. Tüm istatistiksel analizler Student’s t test aracılığıyla gerçekleştirilmiştir ve 0,05’e eşit veya daha küçük değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Baş ve Boyun Kanseri Dokularında POFUT1 İfade Düzeyi Analizi

POFUT1'in onkogenik potansiyelini ortaya koymak adına The Cancer Genome Atlas (TCGA) veritabanındaki veriler incelendiğinde NCI/60, Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) 2012 ve CCLE 2019 hücre hattı kütüphanelerinde hücrelerin yaklaşık %10'unda POFUT1 genini de içine alan genomik bölgede amplifikasyon olduğu gösterildi (Şekil 4.1).



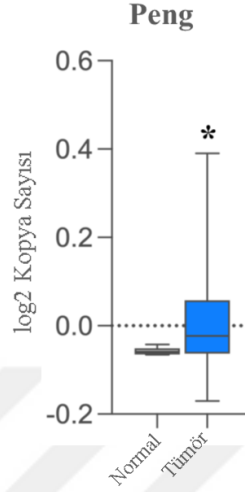
Şekil 4.1. NCI/60, Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) 2012 ve CCLE 2019 hücre hattı kütüphanelerinde POFUT1'i içerisine alan genomik bölgede değişim sıklığı.

cBioPortal online veri tabanı aracılığıyla yapılan analiz baş ve boyun kanserlerinde POFUT1'in yüksek sıklıkta amplifiye olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca yapılan bir diğer analiz neticesinde POFUT1 geni ile ilişkili genomik değişikliklerin sadece amplifikasyonlarla sınırlı olmadığını ve %20'ye yakın sıklıkla görülen mRNA düzeyinde ifade artışı şeklinde de görüldüğü tespit edildi (Şekil 4.2).



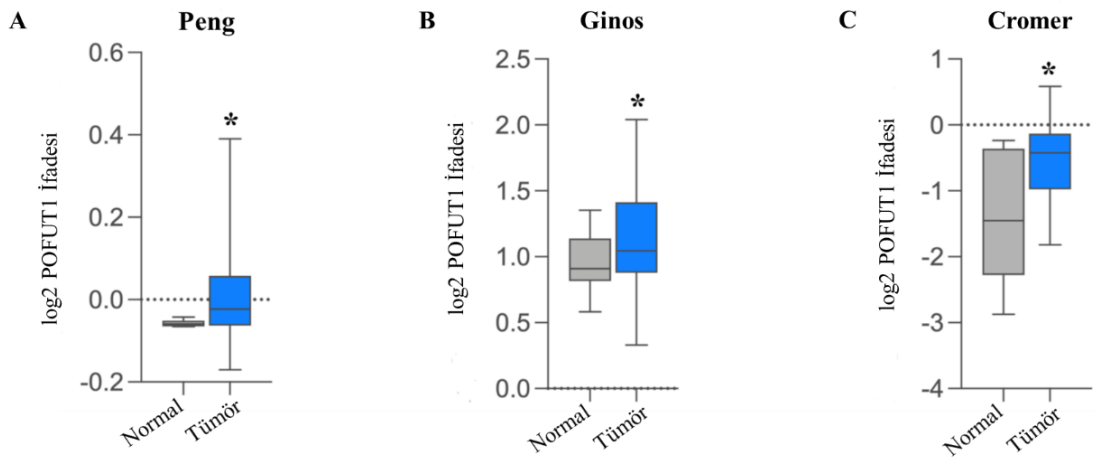
Şekil 4.2. Baş ve boyun kanseri doku örneklerinde POFUT1'in bulunduğu kromozomal bölgede saptanan genetik değişiklikler.

Oncomine veritabanında baş ve boyun kanserli hasta örneklerinin olduğu veri setleri incelendiğinde POFUT1'in BBSHK tümör dokularında artan kopya sayısına sahip olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Oncomine veri tabanında bulunan Peng veri setindeki POFUT1'in rölatif kopya sayısı.

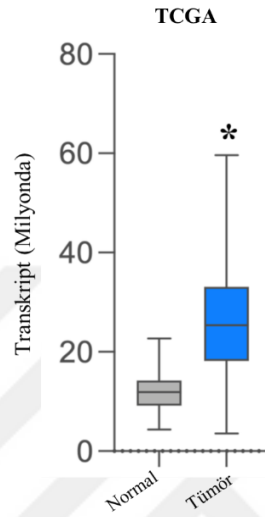
Oncomine veritabanındaki Peng, Ginos ve Cromer verileri incelendiğinde ise POFUT1 mRNA ifade seviyesinin normal dokular ile karşılaştırıldığında baş ve boyun kanseri tümör dokularında anlamlı derecede artmış olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Oncomine veri tabanında bulunan Peng, Ginos ve Cromer veri setindeki POFUT1'in rölatif mRNA ifade seviyesi.

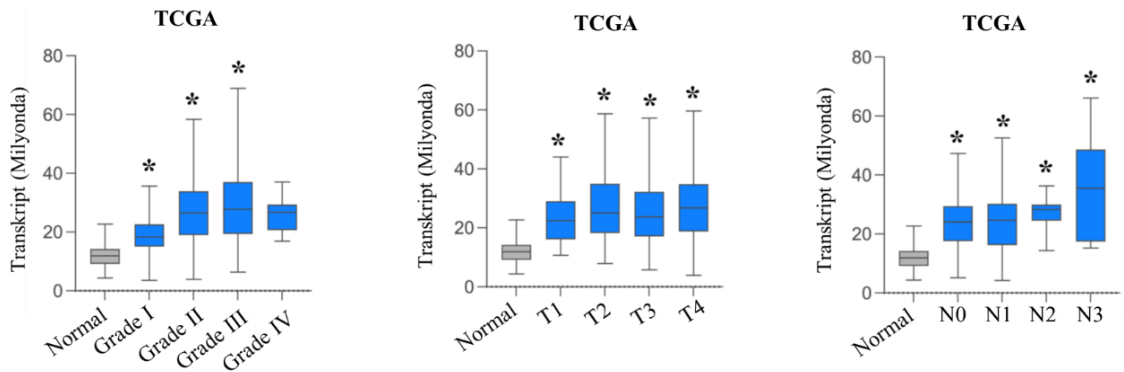
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Baş ve boyun kanseri oluşumu ile POFUT1'in ifade seviyesi arasındaki ilişkiyi doğrulamak için TCGA veri tabanında bulunan normalize edilmiş gen ifade verileri de kullanılmıştır. 519 baş ve boyun tümör dokusu ve 44 normal dokuda POFUT1 mRNA ifade seviyesi incelendiğinde POFUT1 ifade seviyesinin tümör dokularında normal dokulara göre önemli derecede artmış olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. TCGA veri tabanında bulunan baş ve boyun tümör doku örneklerinde rölatif POFUT1 ifadesi.

Ayrıca baş ve boyun kanseri hastalarında POFUT1 mRNA ifade seviyesinin artan tümör gradesi, T evresi ve N evresine paralel olarak artış gösterdiği de ortaya konulmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. TCGA veri tabanında bulunan klinik olarak farklı tümör grade, T evresi ve N evresine sahip baş ve boyun tümör doku örneklerinde rölatif POFUT1 ifade seviyesi.

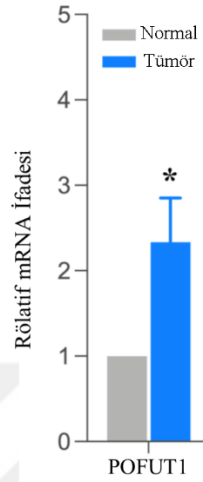
4.2. Baş ve Boyun Kanseri Doku Örneklerinde POFUT1 İfade Düzeyi Analizi

Baş ve boyun kanseri hastalarının normal ve tümör doku örneklerinde POFUT1'in rölatif ifade düzeyi kantitatif gerçek zamanlı PZR kullanılarak değerlendirilmiştir. Gen ifadelerinin normalizasyonu için GAPDH internal kontrol olarak kullanılmış ve rölatif kantitasyon analizi delta-delta-CT metodu kullanılarak yapıldı. Hastalara ait kliniko-patolojik veriler Çizelge 4.1'de paylaşılmıştır.

Çizelge 4.1. Larenks Kanserli hastalara ait klino-patolojik bilgiler

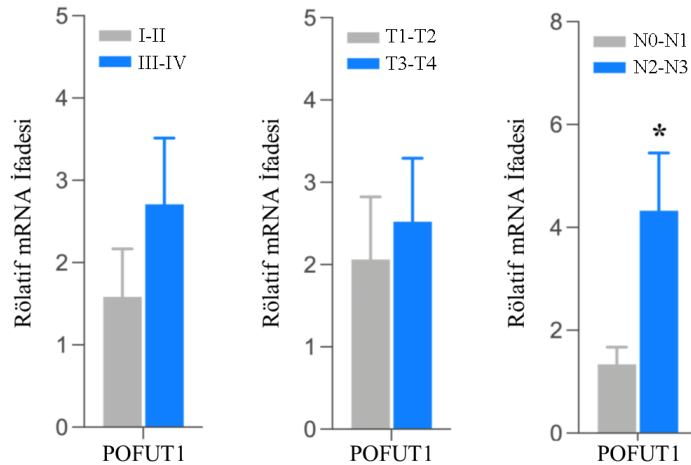
Larenks Kanserli Doku Örnekleri	
Yaş	
≤ 60	16
> 60	14
Cinsiyet	
Erkek	29
Kadın	1
Tümör Tipi	
Supraglottik	12
Subglottik	-
Glottik	18
TNM Evreleme	
T1 ve T2	13
T3 ve T4	17
Tümör Hacmi	
≤ 2 cm ³	19
> 2 cm ³	21
Histolojik Grade	
I	3
II	7
III	3
IV	17

Tümörlü larenks doku örneklerinde normal larenks doku örnekleri ile karşılaştırıldığında POFUT1 ifadesinin $2,33 \pm 0,52$ kat arttığı tespit edildi ($p < 0,01$; Şekil 4.7).



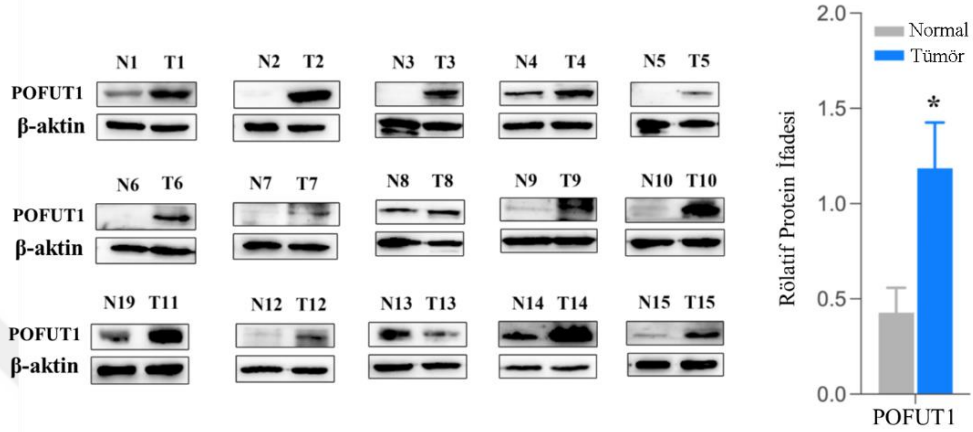
Şekil 4.7. Larenks tümör ve normal doku örneklerinde POFUT1 ifade seviyesi

Ayrıca POFUT1 ifadesi için T evresi, N evresi ve tümör grade'sine göre karşılaştırma yapıldığında da anlamlı olmamakla birlikte T3 ve T4 evre tümör dokularında T1 ve T2 evre dokularına göre, grade III ve IV tümör dokularında grade I ve II tümör dokularına göre yüksek POFUT1 ifadesi tespit edildi (Şekil 6). N evresine göre yapılan değerlendirmede ise N2 ve N3 evre tümör dokularında POFUT1 ifadesinin N0 ve N1 evre tümör doku örneklerine göre anlamlı olarak artmış olduğu gösterildi ($p < 0,01$; Şekil 4.8).



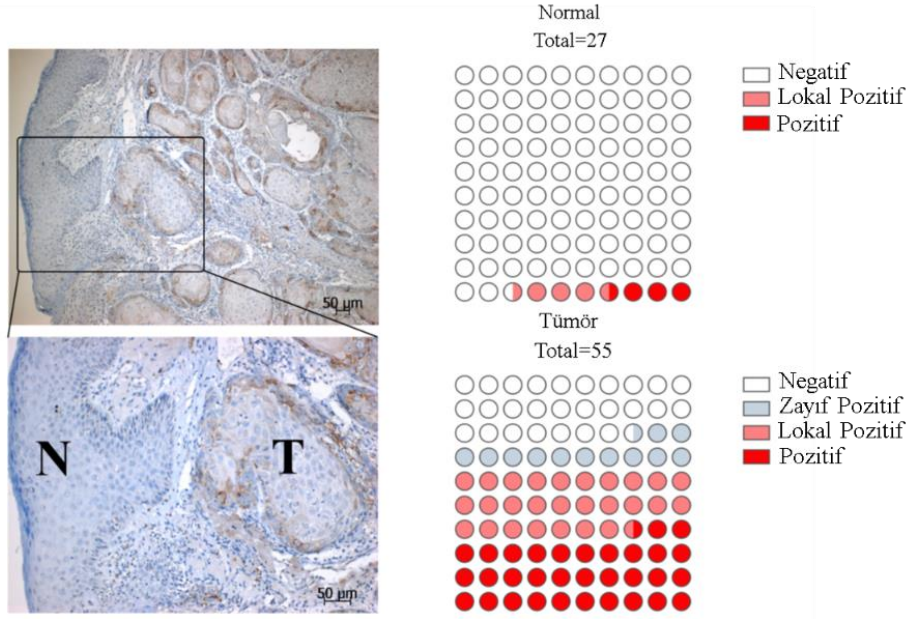
Şekil 4.8. Larenks tümör ve normal doku örneklerinde POFUT1 ifade seviyesi

Larenks kanseri hastalarına ait 15 çift normal ve tümör doku örneklerinde POFUT1 seviyesi protein düzeyinde western blot analizi ile değerlendirildiğinde de tümör doku örneklerinde POFUT1 ifade seviyesinin normal dokulara kıyasla belirgin bir şekilde artmış olduğu ortaya konuldu ($p<0.01$; Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Larenks kanseri normal ve tümör dokularında POFUT1'in protein düzeyinde ifade seviyesi.

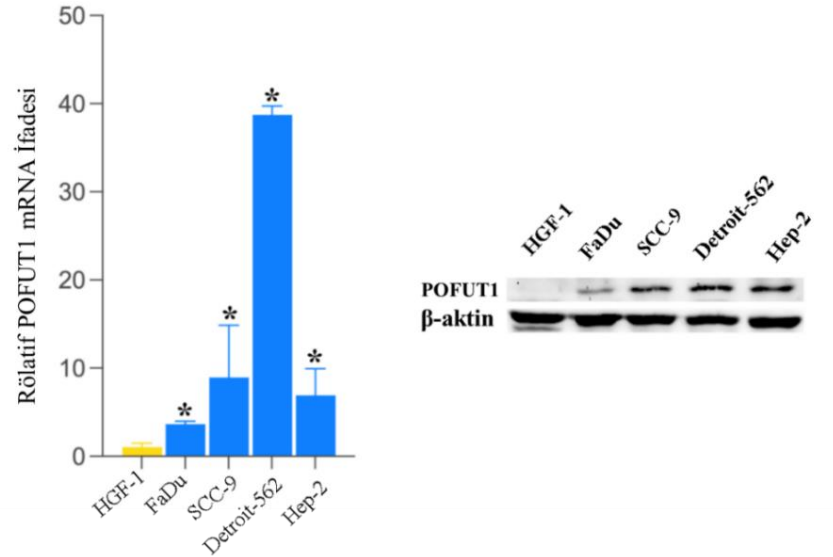
Ayrıca, 55 adet primer baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom ve 27 adet normal doku kullanılarak anti-POFUT1 protein poliklonal antikoru ile yapılan semi-kantitatif immünohistokimyasal analiz, normal dokuların yalnızca nadir bir grubunun POFUT1 ifadesi için pozitif olduğunu ortaya koymasına rağmen, tümör dokularının büyük çoğunluğunun POFUT1'i yüksek seviyelerde ifade ettiğini göstermiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Normal ve Tümör Doku örneklerin POFUT1 ifade düzeyinin immünohistokimyasal analizi.

4.3. Baş ve Boyun Kanseri Hücre Hatlarında POFUT1 İfade Düzeyi Analizi

POFUT1'in ifade seviyesi tümörojenik olmayan ağız içi fibroblast HGF-1 hücreleri ile FaDu, SCC-9, Hep-2 ve Detroit-562 hücre hatlarında mRNA seviyesinde kantitatif gerçek zamanlı PZR ile, protein düzeyinde ise western blot analizi ile araştırıldı. Şekil 20'de gösterildiği gibi BBSHK hücre hatlarının tamamında HGF-1 hücreleri ile karşılaştırıldığında hem mRNA hem de protein seviyesinde POFUT1 ifadesi artmıştır (Şekil 4.11).

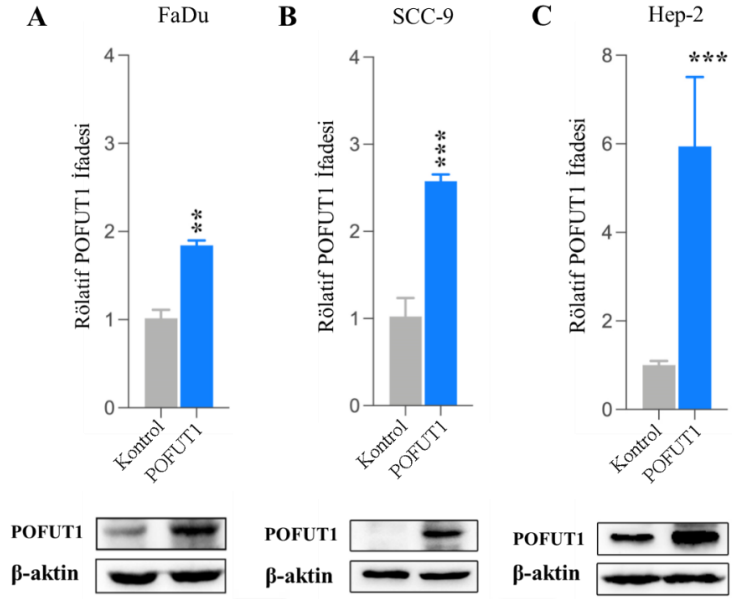


Şekil 4.11. Baş ve boyun kanseri hücre hatlarında POFUT1 mRNA ve protein ifade seviyesinin analizi.

Bulgularımız, POFUT1'in hem klinik tümör doku örneklerinde hem de baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hücre hatlarında önemli ölçüde yüksek düzeyde ifade edildiğini ve baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda POFUT1'in onkogenik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir.

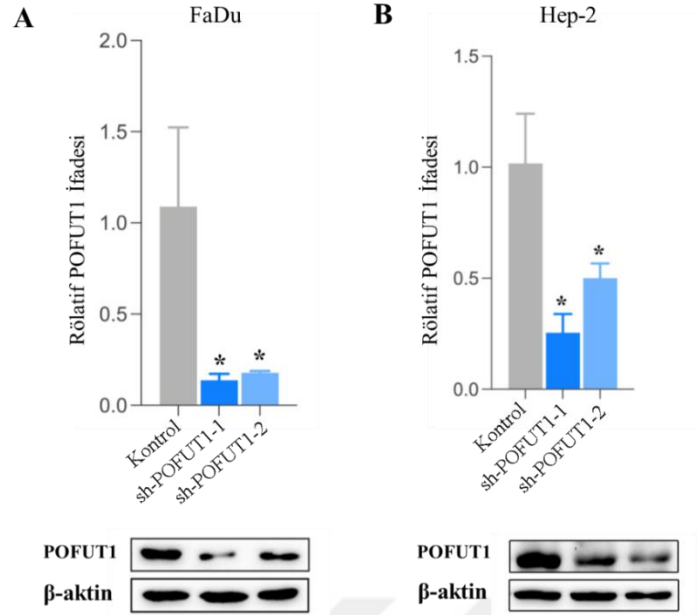
4.4. POFUT1 Overekspresyon ve shRNA Plazmitleri ile Transfekte Edilen Baş ve Boyun Kanserli Hücrelerinde POFUT1 İfade Düzeyi Analizi

POFUT1'in baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda fonksiyonel onkogenik rolünü *in vitro* araştırmak için POFUT1'in açık okuma çerçevesinin klonlandığı pCMV6-AC-GFP vektörü ticari olarak satın alınmıştır. Kontrol olarak pCMV6-AC-GFP vektörü kullanılmıştır. Plazmitler sonrasında çoğaltılarak transfeksiyon işlemleri için hazır hale getirildi. POFUT1'in overekspresyon plazmitleri FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerine transfekte edildi, hücrelerin seçilimi tamamlandı ve POFUT1 ifade artışı RNA ve protein düzeyinde doğrulandı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş A) FaDu, B) SCC-9 ve C) Hep-2 hücrelerinde POFUT1 mRNA ve protein ifade düzeyi.

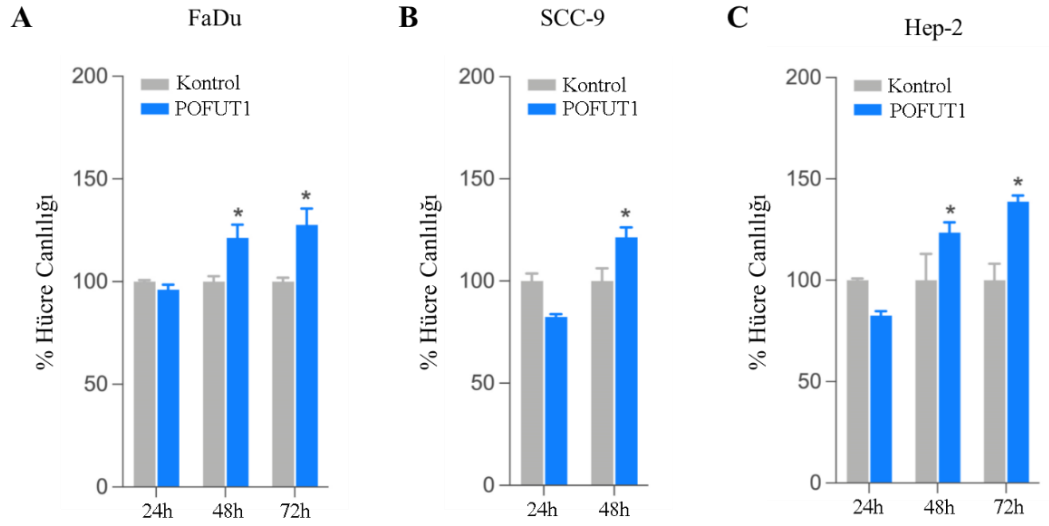
POFUT1'in baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda fonksiyonel onkogenik rolünü *in vitro* araştırmak için ayrıca POFUT1'in stabil şekilde susturulması için gerekli olan shRNA pGFP-V-RS plazmitleri ticari olarak satın alındı. Kontrol olarak pGFP-V-RS vektörü kullanıldı. Plazmitler sonrasında çoğaltılarak transfeksiyon işlemleri için hazır hale getirildi. POFUT1'in stabil şekilde susturulmasında kullanılacak shRNA'lar FaDu ve Hep-2 hücrelerine transfekte edildi, hücrelerin seçilimi tamamlandı, RNA ve protein düzeyinde susturma işleminin gerçekleştirildiği doğrulandı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş A) FaDu ve B) Hep-2 hücrelerinde POFUT1 mRNA ve protein ifade düzeyi.

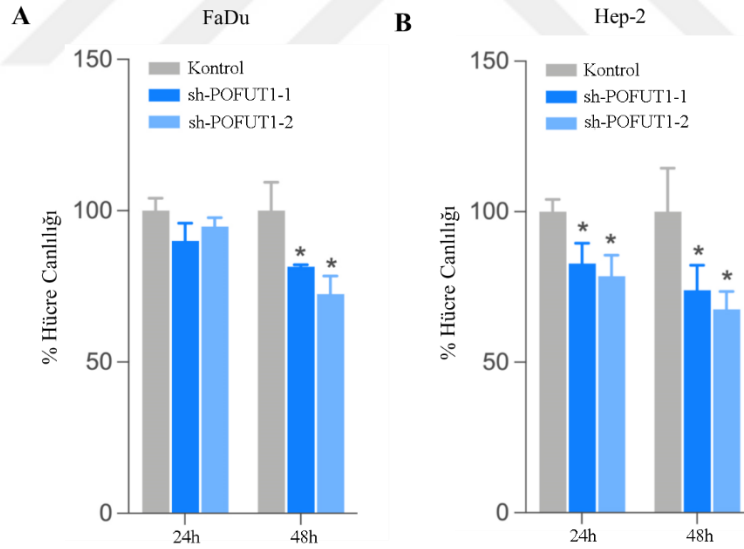
4.5. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

POFUT1'in FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8, EcoTech Biotechnology, Turkey) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek değerlendirildi. Bulgularımız artan POFUT1 ifadesinin FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde hücre canlılığını artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfeke edilmiş A) FaDu, B) SCC-9 ve C) Hep-2 hücrelerinde hücre canlılığı.

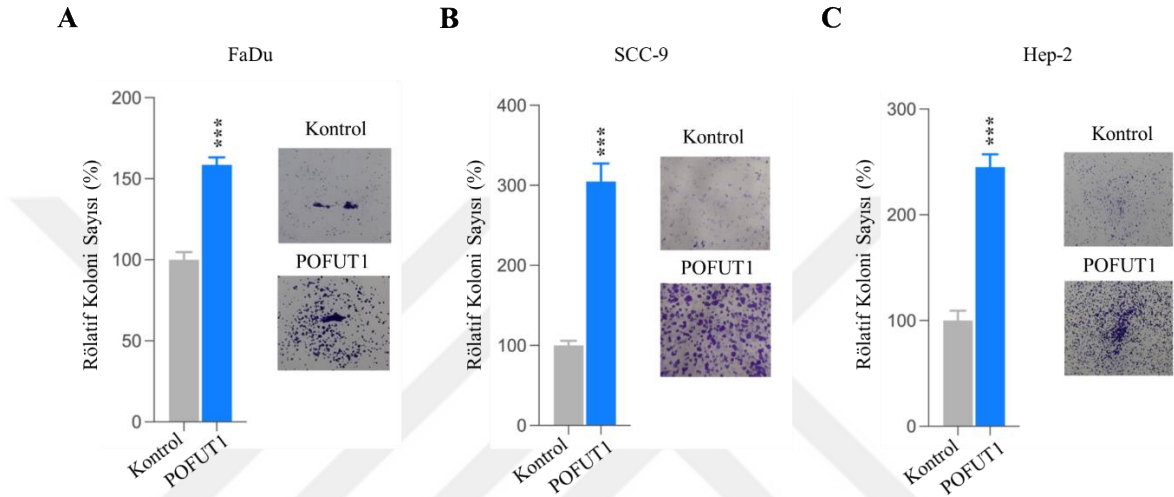
POFUT1'in susturulduğu FaDu ve Hep-2 hücrelerinde ise hücre canlılığının azaldığı ortaya konuldu (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. POFUT1 shRNA'lar ile transfeke edilmiş A) FaDu ve B) Hep-2 hücrelerinde hücre canlılığı.

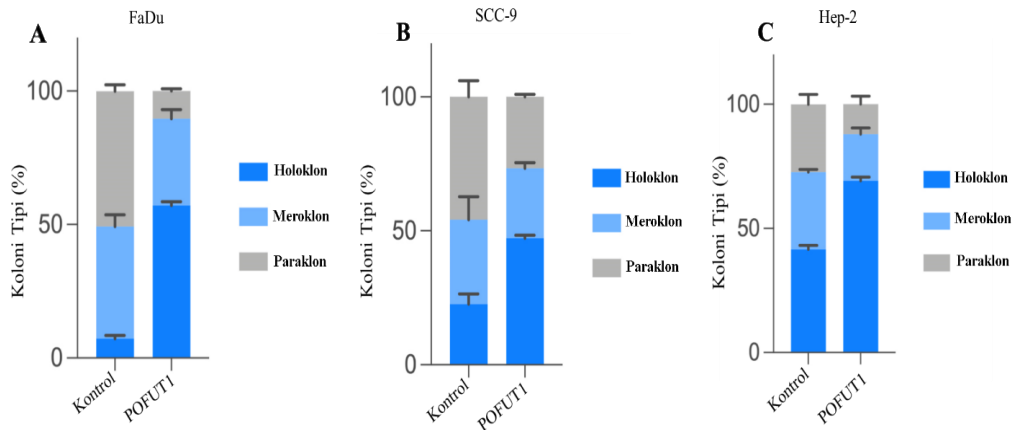
4.6. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

POFUT1'in koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkileri tek hücre koloni testi kullanılarak değerlendirildi. Bulgularımız, artan POFUT1 ifadesinin FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyelini artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş A) FaDu, B) SCC-9 ve C) Hep-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.

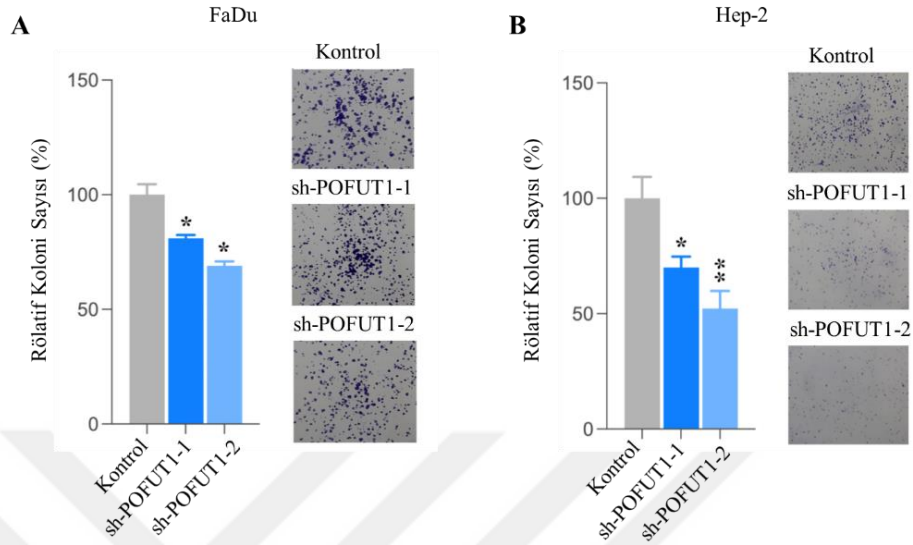
Ayrıca, artan POFUT1 ifadesinin FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde holoklon türü koloni sayılarını artırırken, meroklon ve paraklon türü koloni sayılarını azalttığı gösterildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş A) FaDu, B) SCC-9 ve C) Hep-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.

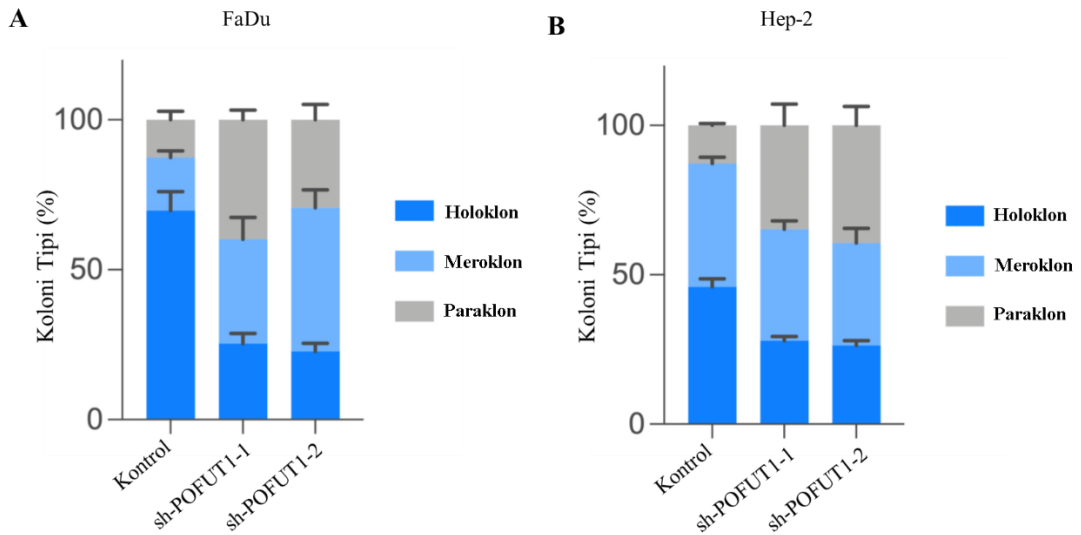
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

POFUT1'in susturulduğu FaDu ve Hep-2 hücrelerinde ise koloni oluşturma potansiyelinin azaldığı ortaya konuldu (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş A) FaDu ve B) Hep-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.

Ayrıca, susturulan POFUT1 ifadesinin FaDu ve Hep-2 hücrelerinde holoklon türü koloni sayılarını azaltırken, paraklon türü koloni sayılarını artırdığı gösterildi (Şekil 4.19).

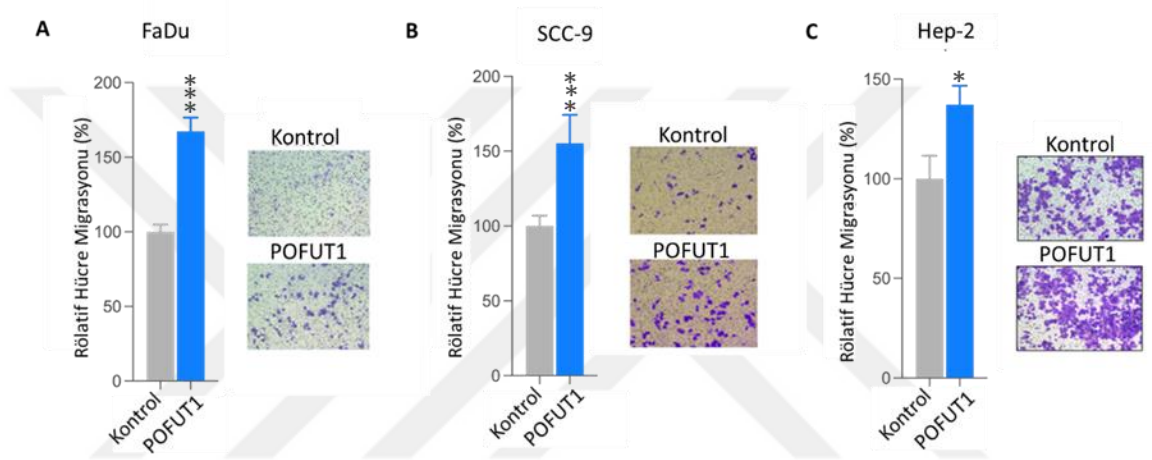


Şekil 4.19. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş A) FaDu ve B) Hep-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.

4.7. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Hücre Göçü Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

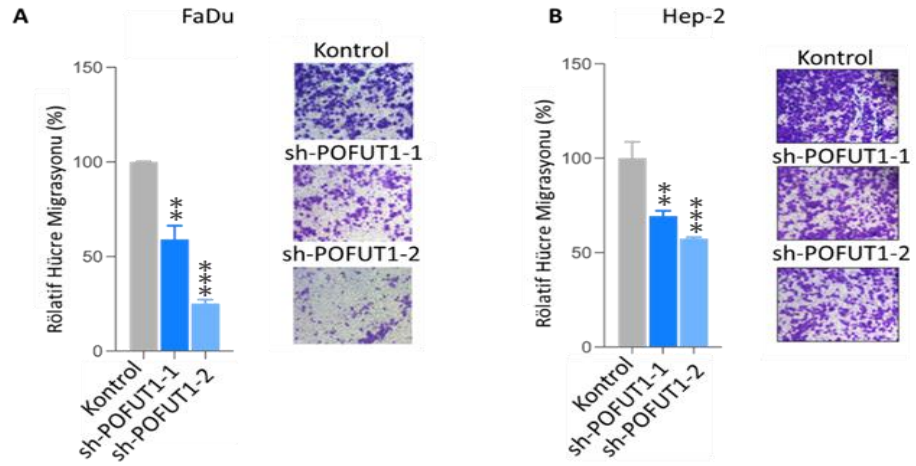
POFUT1'in baş ve boyun kanseri hücrelerinin hücre göçü üzerine etkileri Transwell insert testi kullanılarak değerlendirildi.

Bulgularımız artan POFUT1 ifadesinin FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde hücre göçünü artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş A) FaDu, B) SCC-9 ve C) Hep-2 hücrelerinin migrasyon potansiyeli.

POFUT1'in susturulduğu FaDu ve Hep-2 hücrelerinde ise hücre göçünün azaldığı ortaya konuldu (Şekil 4.21).

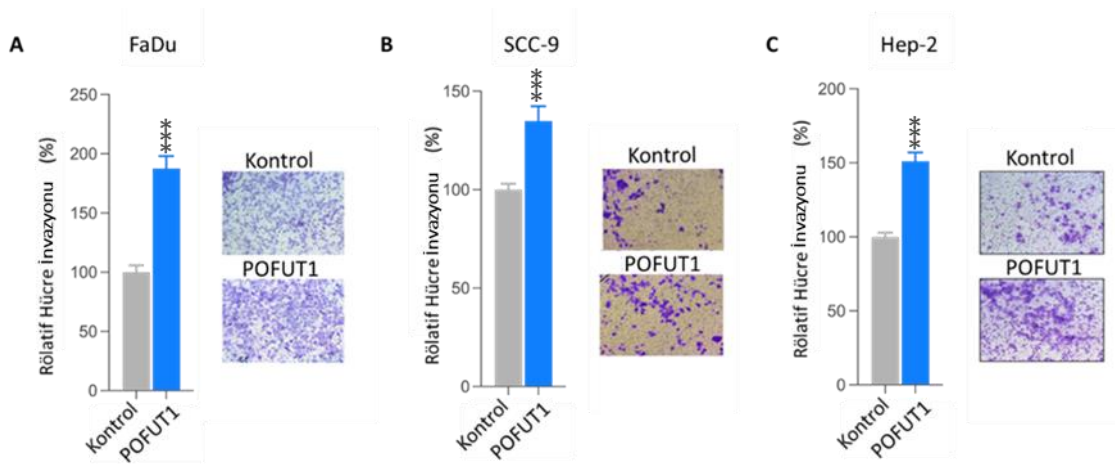


Şekil 4.21. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş A) FaDu ve B) Hep-2 hücrelerinin migrasyon potansiyeli.

4.8. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Hücre İnvazyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

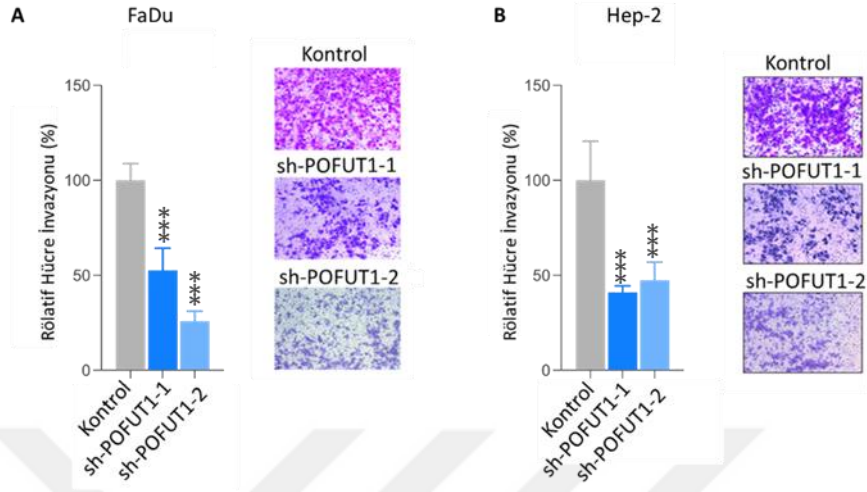
POFUT1'in hücrelerin invazyon potansiyeli üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 'Corning BioCoat™ Matrigel Invasion Chamberlar kullanıldı.

Bulgularımız artan POFUT1 ifadesinin FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde hücrelerin invaziv potansiyelini artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş A) FaDu, B) SCC-9 ve C) Hep-2 hücrelerinin invazyon potansiyeli.

POFUT1'in susturulduğu FaDu ve Hep-2 hücrelerinde ise hücrelerin invaziv potansiyelinin azaldığı tespit edildi (Şekil 4.23).

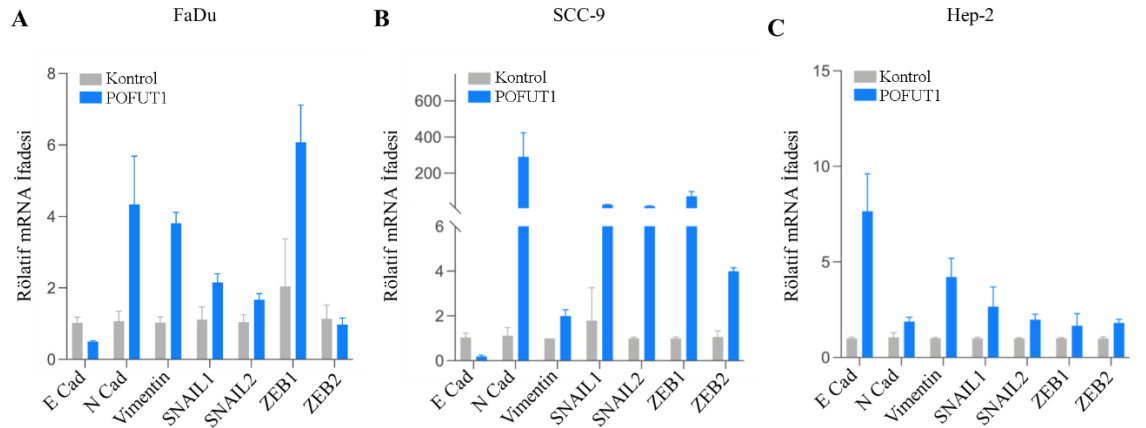


Şekil 4.23. POFUT1 shRNA'lar ile transfeke edilmiş A) FaDu ve B) Hep-2 hücrelerinin invazyon potansiyeli.

4.9. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerde EMT Genlerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

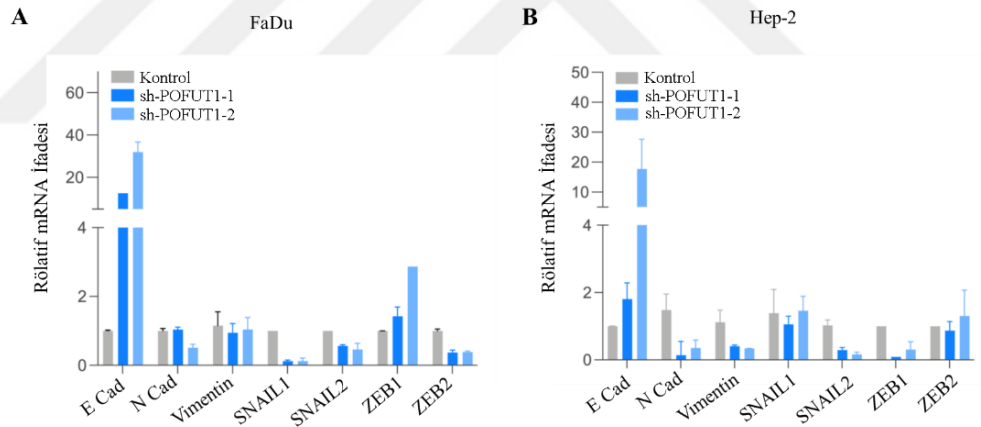
POFUT1'in FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinin migrasyon ve invazyon potansiyeli üzerindeki rolünün incelenmesinden sonra POFUT1'in stabil bir şekilde susturulduğu ya da ifadesinin arttığı baş ve boyun kanseri hücrelerinde E-Cadherin, N-Cadherin, SNAIL-1, SNAIL-2, ZEB-1, ZEB-2 ve Vimentin EMT işaretçilerinin ifadeleri mRNA düzeyinde qRT-PCR kullanılarak değerlendirildi.

Bulgularımız, artan POFUT1 ifadesinin Hep-2 hücrelerinde EMT genlerinin ifadelerinin artmasına yol açtığını ortaya koydu (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfeke edilmiş A) FaDu, B) SCC-9 ve C) Hep-2 hücrelerinde EMT genlerinin ifadeleri.

POFUT1'in susturulduğu Hep-2 hücrelerinde ise epitelyal işaretçi olan E-Cadherin ifadesi artarken, mezenkimal işaretçilerin büyük çoğunluğunun ifadeleri azaldı (Şekil 4.25).

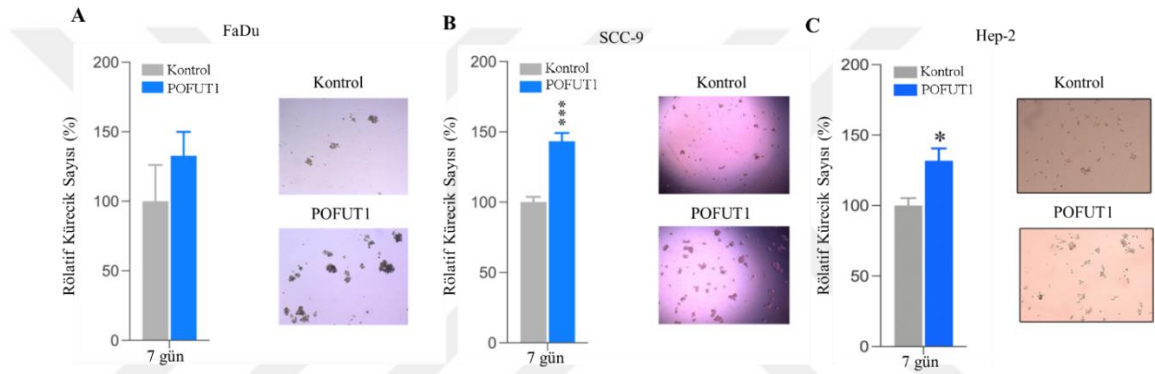


Şekil 4.25. POFUT1 shRNA'lar ile transfeke edilen A) FaDu ve B) Hep-2 hücrelerinde EMT genlerinin ifadeleri.

4.10. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Kürecik Oluşturma Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

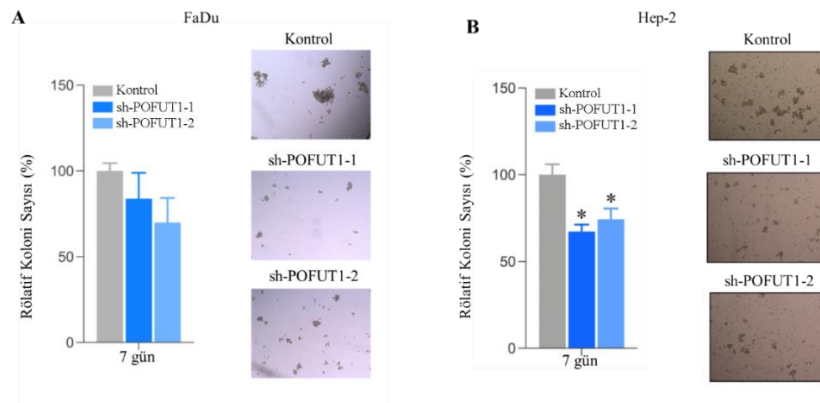
POFUT1'in baş ve boyun kanseri oluşumunda kök hücre karakteristiği ile ilişkisinin belirlenmesi için öncelikle küre oluşturma testi yapıldı.

Bulgularımız artan POFUT1 ifadesinin FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde kürecik oluşturma potansiyelini artırarak kök hücre potansiyelini artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen A) FaDu, B) SCC-9 ve C) Hep-2 hücrelerinde kürecik oluşturma potansiyeli.

POFUT1'in susturulduğu FaDu ve Hep-2 hücrelerinde kürelerin büyüklüğü ve sayısının azaldığı ortaya konuldu (Şekil 4.27).

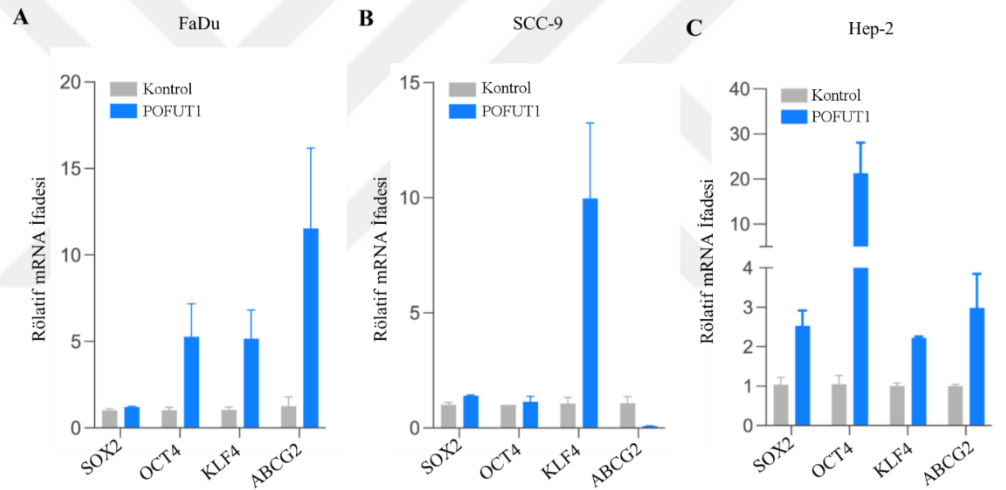


Şekil 4.27. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş A) FaDu ve B) Hep-2 hücrelerinde kürecik oluşturma potansiyeli.

4.11. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Kök Hücre İşaretçilerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

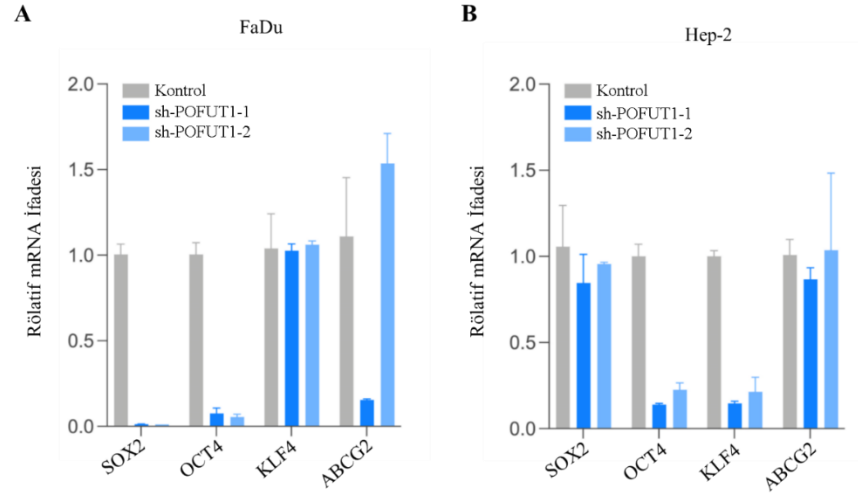
POFUT1'in FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinin kürecik oluşturma ve koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki rolünün incelenmesinden sonra POFUT1'in stabil bir şekilde susturulduğu ya da ifadesinin arttığı baş ve boyun kanseri hücrelerinde SOX2, KLF4, OCT4 ve ABCG2 kök hücre işaretçilerinin ifadeleri mRNA düzeyinde qRT-PZR kullanılarak değerlendirildi.

Bulgularımız, artan POFUT1 ifadesinin FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde kök hücre işaretçilerinin ifadelerinin artmasına yol açtığını ortaya koydu (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş A) FaDu, B) SCC-9 ve C) Hep-2 hücrelerinde kök hücre işaretçilerinin ifadeleri.

POFUT1'in susturulduğu FaDu ve Hep-2 hücrelerinde ise kök hücre işaretçilerinin ifadesinin azaldığı ortaya konuldu (Şekil 4.29).

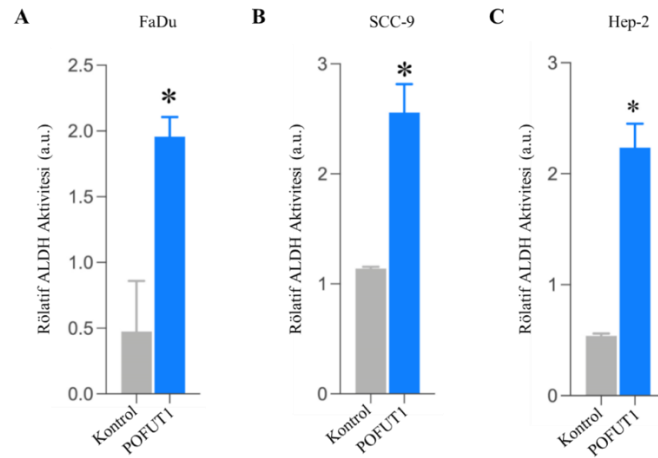


Şekil 4.29. POFUT1 shRNA'lar ile transfekte edilmiş A)FaDu ve B) Hep-2 hücrelerinde kök hücre işaretçilerinin ifadeleri.

4.12. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin ALDH Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

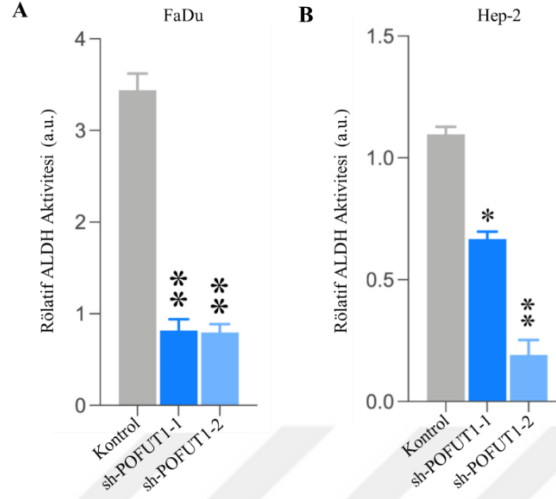
POFUT1'in kök hücre özelliklerinin kazanılmasındaki rolünü daha fazla araştırmak için, POFUT1'in stabil bir şekilde susturulduğu ya da ifadesinin arttığı baş ve boyun kanseri hücrelerinde ALDH aktivitesi incelendi.

Bulgularımız, artan POFUT1 ifadesinin FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde ALDH aktivitesini artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş A) FaDu, B) SCC-9 ve C) Hep-2 hücrelerinde ALDH aktivite analizi.

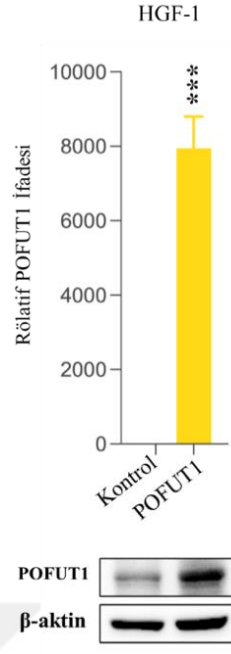
POFUT1'in susturulduğu Hep-2 hücrelerinde ise ALDH aktivitesinin azaldığı tespit edildi (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. POFUT1'in susturulduğu A) FaDu ve B) Hep-2 hücrelerinde ALDH aktivite analizi.

4.13. POFUT1 Overekspresyon Plazmiti ile Transfekte Edilen HGF-1 Hücrelerinde POFUT1 İfade Analizi

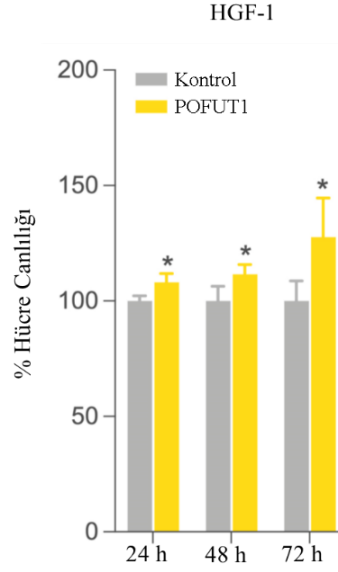
POFUT1'in HGF-1 hücrelerinde fonksiyonel onkogenik rolünü *in vitro* araştırmak için hücreler POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edildi ve 48 saat sonra hücreler toplanarak deneyler gerçekleştirildi. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde POFUT1 ifade artışı RNA ve protein düzeyinde gösterildi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde POFUT1 mRNA ve protein ifade düzeyi.

4.14. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

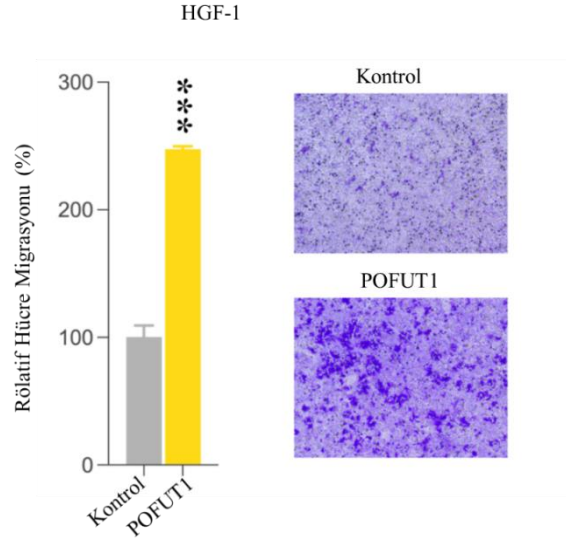
POFUT1'in HGF-1 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi CVDK-8 testi kullanılarak araştırıldı. Bulgularımız artan POFUT1 ifadesinin tümörojenik olmayan normal HGF-1 hücrelerinde baş ve boyun kanseri hücrelerine benzer şekilde hücre canlılığını artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.33).



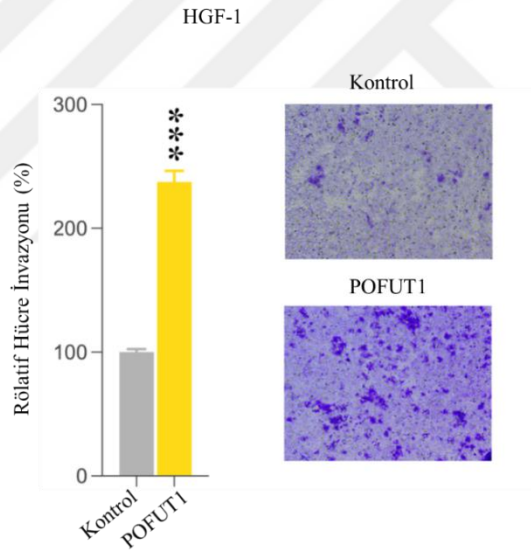
Şekil 4.33. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde hücre canlılığı.

4.15. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu ve İnvazyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

POFUT1'in HGF-1 hücrelerinin hücre migrasyonu ve invazyonu üzerindeki etkisi Transwell insert testleri kullanılarak değerlendirildi. Bulgularımız, HGF-1 hücrelerinde artan POFUT1 ifadesinin hücre migrasyonunu önemli ölçüde artırdığını ortaya koymaktadır. Ardından, POFUT1 ifadesi ile hücrelerin invazyon potansiyeli arasındaki ilişki araştırılmıştır. Beklendiği gibi, bulgularımız POFUT1'i yüksek düzeyde ifade eden HGF-1 hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla hücre hareketliliğinin (Şekil 4.34) ve hücrelerin invazyon potansiyelinin arttığını göstermektedir (Şekil 4.35).



Şekil 4.34. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde hücre göçü.

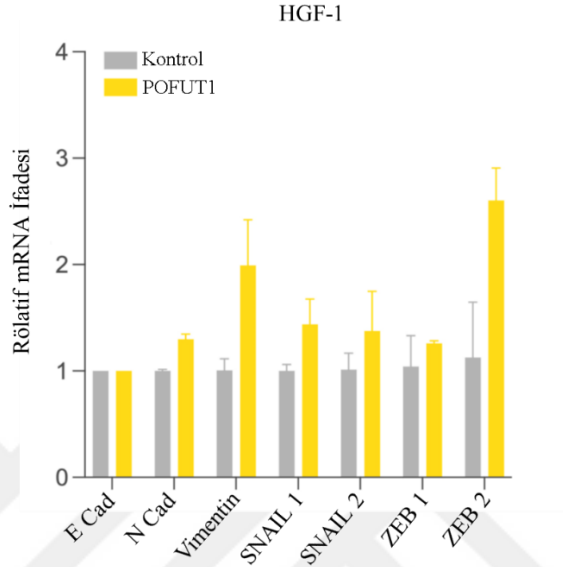


Şekil 4.35. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde hücre invazyonu.

4.16. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin EMT Genlerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

POFUT1'in HGF-1 hücrelerinde EMT üzerindeki indükleyici rolünün altında mekanizmayı araştırmak için EMT süreci ile ilişkili genlerin ifadeleri mRNA düzeyinde qRT-PZR kullanılarak değerlendirildi. Bulgularımız, POFUT1'i yüksek düzeyde ifade eden HGF-1 hücrelerinde epitel biyobelirtecini (E-Cadherin) ifadesinde belirgin bir

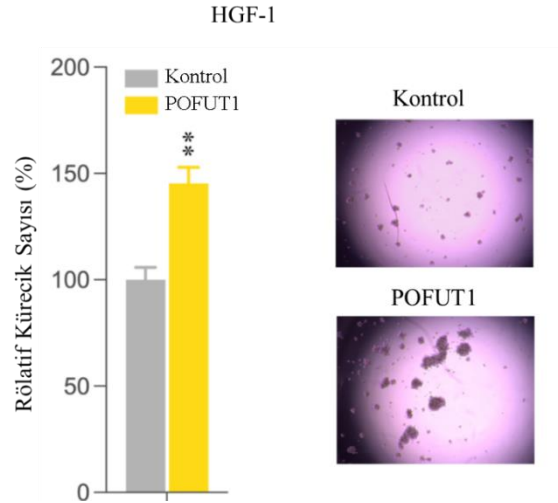
değişiklik olmadığını, mezenkimal biyobelirteçlerin (N-Cadherin, Vimentin, SNAIL 1, SNAIL 2, ZEB1 ve ZEB2) ifadesinin arttığını ve bu da artan POFUT1 ifadesinin HGF-1 hücrelerinde EMT ile ilişkili genlerin düzenlenmesi aracılığıyla hücrelerde EMT fenotipinin kazanımına yol açabileceğine işaret etmektedir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde EMT genlerinin ifadeleri.

4.17. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin Kürecik Oluşturma Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

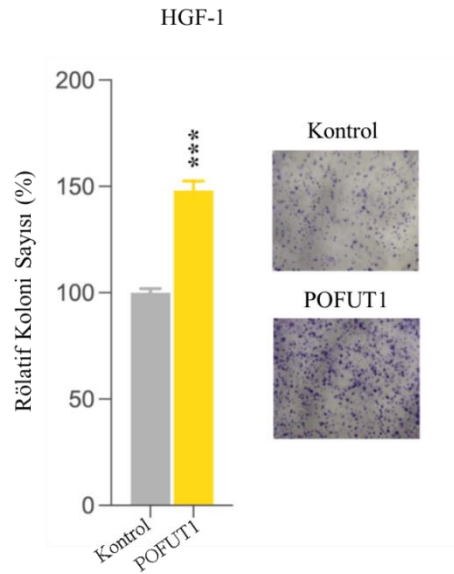
HGF-1 hücrelerinde yüksek düzeyde POFUT1 ifadesinin kök hücre potansiyeli ile ilişkisi kürecik oluşturma testi ile araştırıldı. Bulgularımız, POFUT1'i yüksek düzeyde ifade eden HGF-1 hücrelerinin kontrol hücrelere kıyasla daha büyük ve daha fazla sayıda kürecik oluşturduğunu, POFUT1'in HGF-1 hücrelerinde kürecik oluşumunu indüklediğini ortaya koydu (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde kürecik oluşturma potansiyeli.

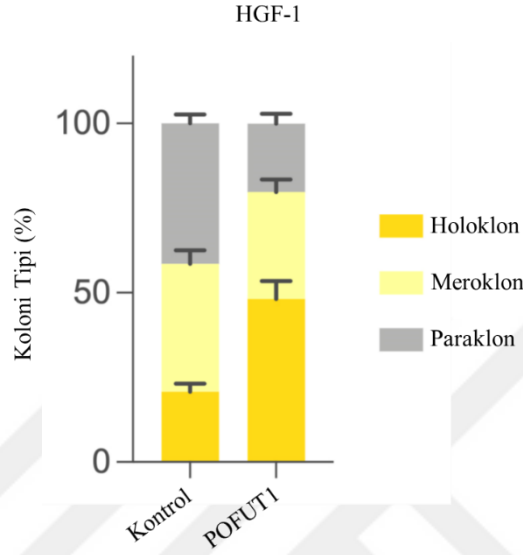
4.18. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

POFUT1'in HGF-1 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkisi tek hücre koloni testi kullanılarak değerlendirildi. Bulgularımız POFUT1'in HGF-1 hücrelerinde yüksek düzeyde ifadesinin koloni oluşturma potansiyelini indüklediğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.

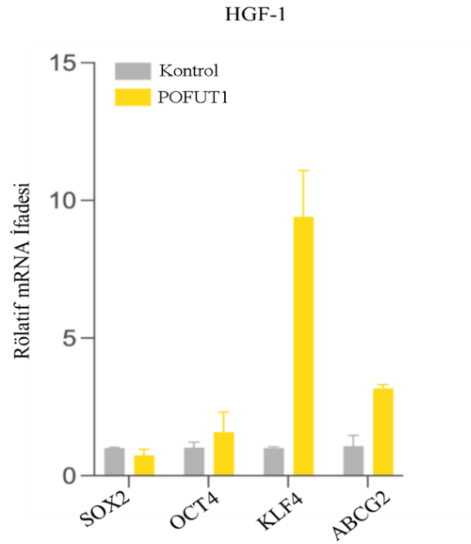
Ayrıca artan POFUT1 ifadesinin tümörojenik olmayan HGF-1 hücrelerinde kanser kök hücre özelliğine sahip hücrelerce zengin holoklon tipi kolonilerin oranını artırırken, çoğunlukla farklılaşmış hücrelerden oluşan paraklon tipi kolonilerin oranını azalttığı ortaya konuldu (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli.

4.19. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin Kök Hücre İşaretçilerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

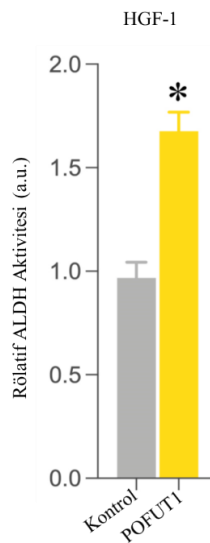
POFUT1'i yüksek düzeyde ifade eden HGF-1 hücrelerinde SOX2, KLF4, OCT4 ve ABCG2 kök hücre işaretçilerinin ifadeleri mRNA düzeyinde qRT-PCR kullanılarak değerlendirildi. Bulgularımız POFUT1'i yüksek düzeyde ifade eden HGF-1 hücrelerinde kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında kök hücre işaretçilerinin ifadesinin arttığını ortaya koymaktadır (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde kök hücre işaretçilerinin ifadeleri.

4.20. POFUT1'in HGF-1 Hücrelerinin ALDH Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

HGF-1 hücrelerinde kök hücre karakterinin kazanımında POFUT1'in rolünü daha fazla araştırmak için hücrelerde kök hücre işaretçisi olan ALDH aktivitesi analizi yapıldı. Bulgularımız POFUT1'i yüksek düzeyde ifade eden HGF-1 hücrelerinde kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında ALDH aktivitesinin önemli derecede arttığını ortaya koymaktadır (Şekil 4.41).

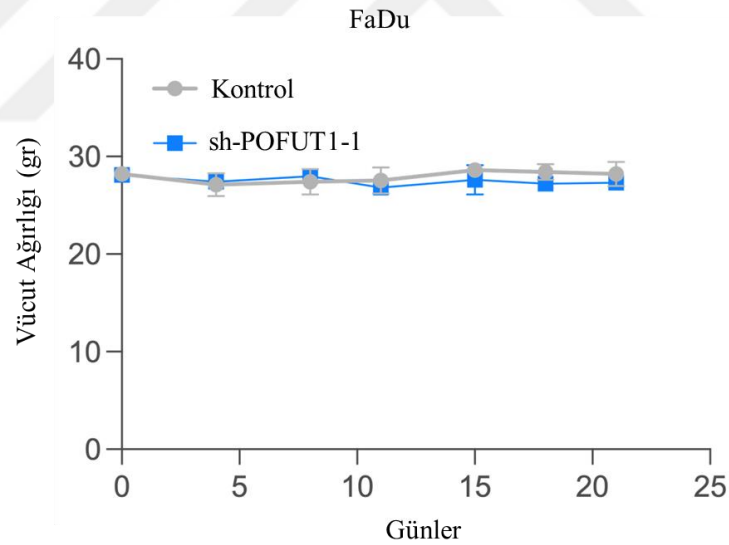


Şekil 4.41. POFUT1 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen HGF-1 hücrelerinde ALDH aktivitesi.

4.21. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanserinde Rolünün Ksenograft Modeller ile Araştırılması

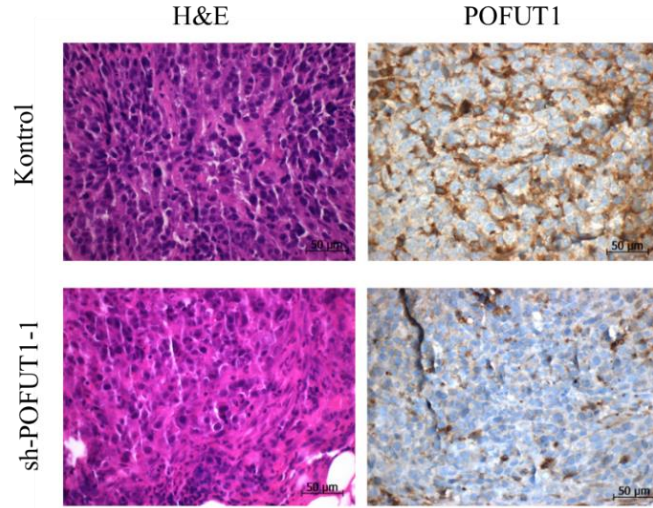
POFUT1'in baş ve boyun kanserinde *in vitro* fonksiyonel rolünü araştırdıktan sonra POFUT1'in baş ve boyun kanseri hücrelerinin tümörijenik rolünü *in vivo* olarak düzenleyip düzenleyemeyeceği ksenograft fare modelleri kullanılarak incelendi. POFUT1'in *in vivo* baş ve boyun kanseri hücrelerinin tümör büyümesi üzerindeki fonksiyonel rolünü araştırmak için, kontrol plazmiti veya sh-POFUT1-1 plazmiti ile stabil transfekte edilmiş FaDu hücreleri BALB/c-nu/nu (nude) farelere enjekte edilerek ksenograft tümörler oluşturuldu.

Farelerin tümör büyümesi ve vücut ağırlığı, 3 hafta boyunca her üç günde bir izlendi ve deney süresi boyunca önemli bir vücut ağırlığı değişikliği gözlenmedi (Şekil 4.42).



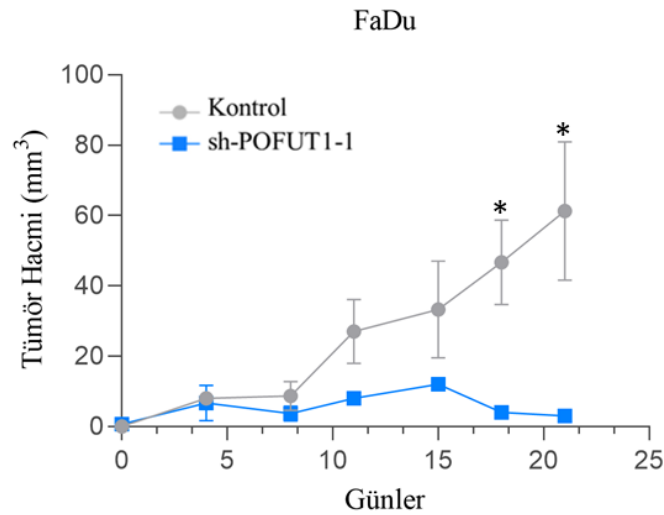
Şekil 4.42. FaDu kontrol ve FaDu-shPOFUT1-1 hücrelerinin enjekte edildiği farelerin vücut ağırlığı.

Deney sonunda tümörler çıkarıldı ve formaldehit içerisine alınarak immünohistokimyasal analiz ile POFUT1 ifadesi değerlendirildi. İmmünohistokimyasal analiz, kontrol grubuna kıyasla FaDu shPOFUT1-1 hücreleri tarafından oluşturulan ksenograft tümörlerde POFUT1 protein ifadesinin azaldığını doğruladı (Şekil 4.43).

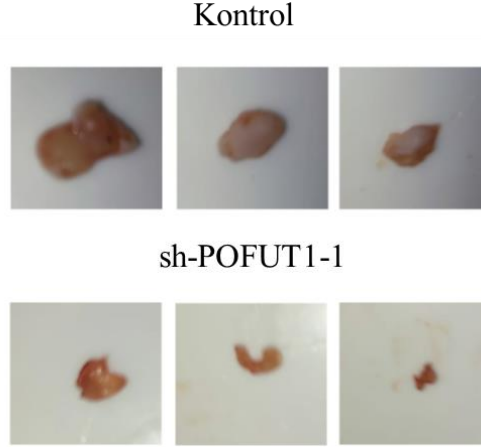


Şekil 4.43. Kontrol ve FaDu-POFUT1-1 hücrelerinin oluşturduğu ksenograft tümörlerde H&E boyaması.

Hücreler enjekte edildikten sonra 3 günde bir tümör hacimleri ölçüldü. Deney sonunda çıkarılan tümörler fotoğraflandı. Bulgularımız, *in vitro* bulgularımızla paralel olarak, POFUT1 ifadesinin baskılanmasının, kontrol grubuna kıyasla daha küçük boyutlu tümörlerin oluşumuna yol açtığını ortaya koydu (Şekil 4.44-Şekil 4.45).

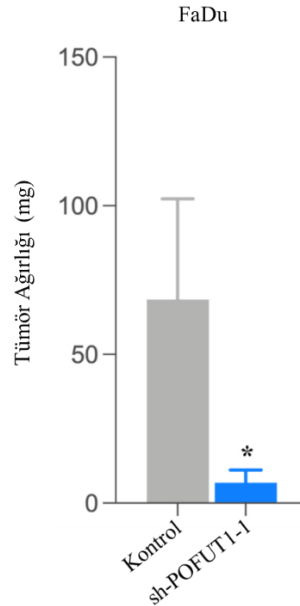


Şekil 4.44. Kontrol ve FaDu-POFUT1-1 hücrelerinin oluşturduğu ksenograft tümörlerin ölçülen hacimleri.



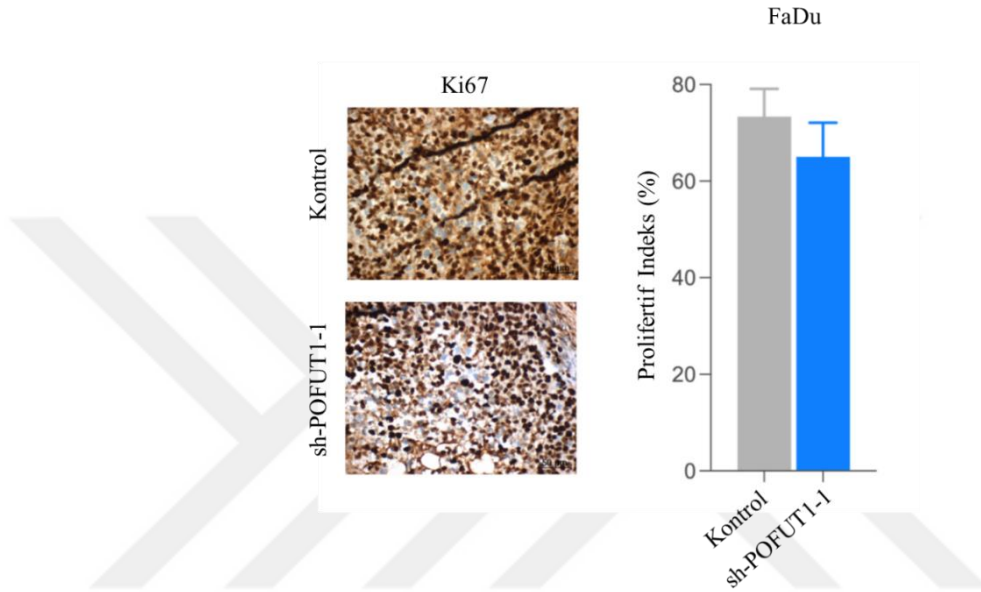
Şekil 4.45. Kontrol ve FaDu-POFUT1-1 hücrelerinin oluşturduğu ksenograft tümörlerin temsili görüntüleri.

Ayrıca hücreler enjekte edildikten 21 gün sonra fareler ötenazi yapıldı ve ksenograft tümörler çıkarılarak ağırlıkları ölçüldü. Gruplar arasında tümör büyümesindeki farklılık değerlendirildi. Bulgularımız, FaDu sh-POFUT1-1 grubu ksenograft tümörlerinin ortalama tümör ağırlığının, kontrol grubu ksenograft tümörleri ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde daha düşük olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. Deney sonunda Kontrol ve FaDu-POFUT1-1 hücrelerinin oluşturduğu ksenograft tümörlerin ölçülen ağırlığı.

Daha sonra, POFUT1'in susturulmasının anti-tümör etkilerini daha fazla doğrulamak için, ksenograft tümörlerde immünohistokimyasal analiz ile protein seviyesinde hücre proliferasyon markörü Ki-67'nin ifadesi incelendi. Şekil 4.47'de gösterildiği gibi immünohistokimyasal boyama, FaDu shPOFUT1-1 hücrelerinden oluşan ksenograft tümörlerde Ki-67 ifadesinde önemli bir azalma olduğunu doğruladı (Şekil 4.47).



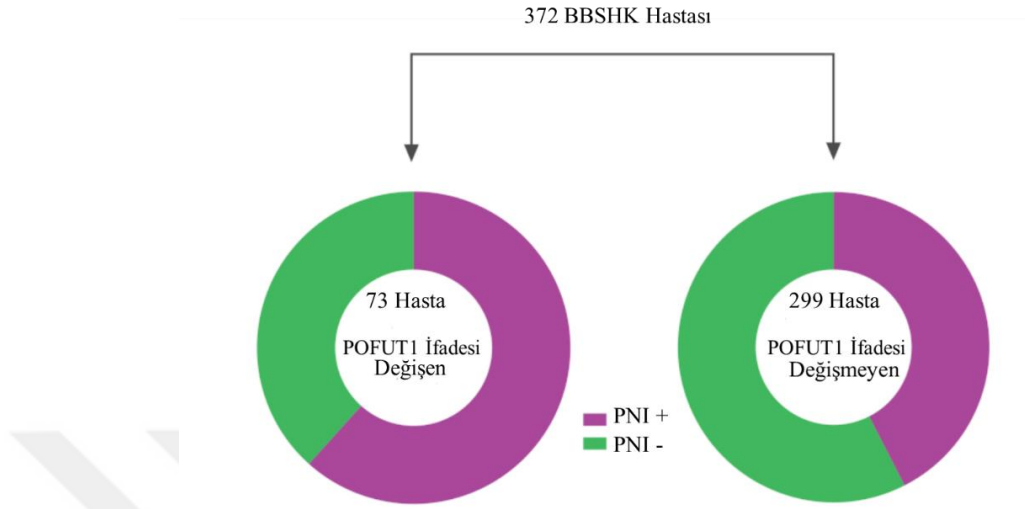
Şekil 4.47. Kontrol ve FaDu-POFUT1-1 hücrelerinin oluşturduğu ksenograft tümörlerde rölaf Ki67 seviyesi.

Bulgularımız, POFUT1'in yalnızca *in vitro* baş ve boyun kanserini indüklediğini, aynı zamanda ksenograft tümör modelinde *in vivo* tümörigenezi indüklediğini ortaya koymaktadır.

4.22. POFUT1'in Baş ve Boyun Kanserinin Perinöral İnvazyonu İle İlişkisinin Araştırılması

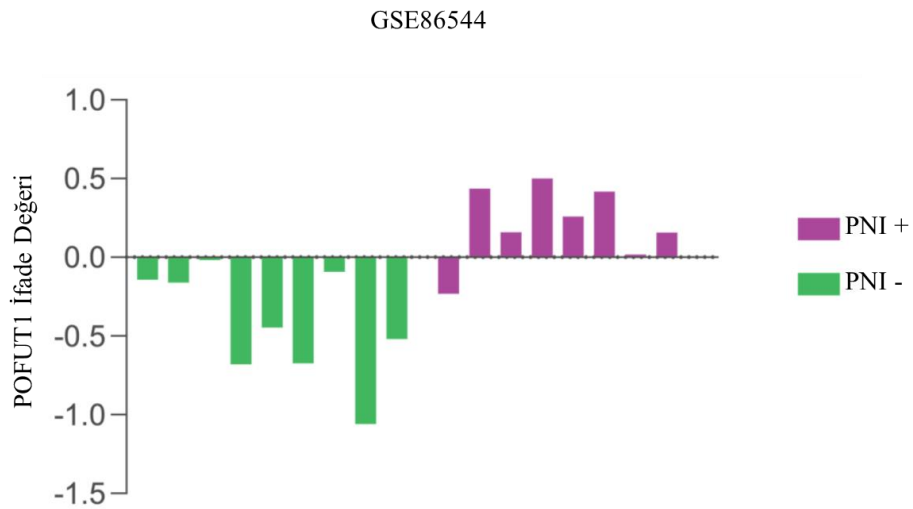
Baş ve boyun kanserinde POFUT1'in ifade seviyesi ve klinik özellikler arasındaki ilişki TCGA veritabanında bulunan veri seti kullanılarak araştırıldı. cBioPortal kullanılarak yapılan 372 baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hastasından oluşan TCGA veri setinin *in silico* analizi, POFUT1'in farklı ifadesi ile önemli ölçüde ilişkili

birkaç prognostik klinik özellikten birinin PNI olduğunu ortaya çıkarmaktadır (Şekil 4.48).



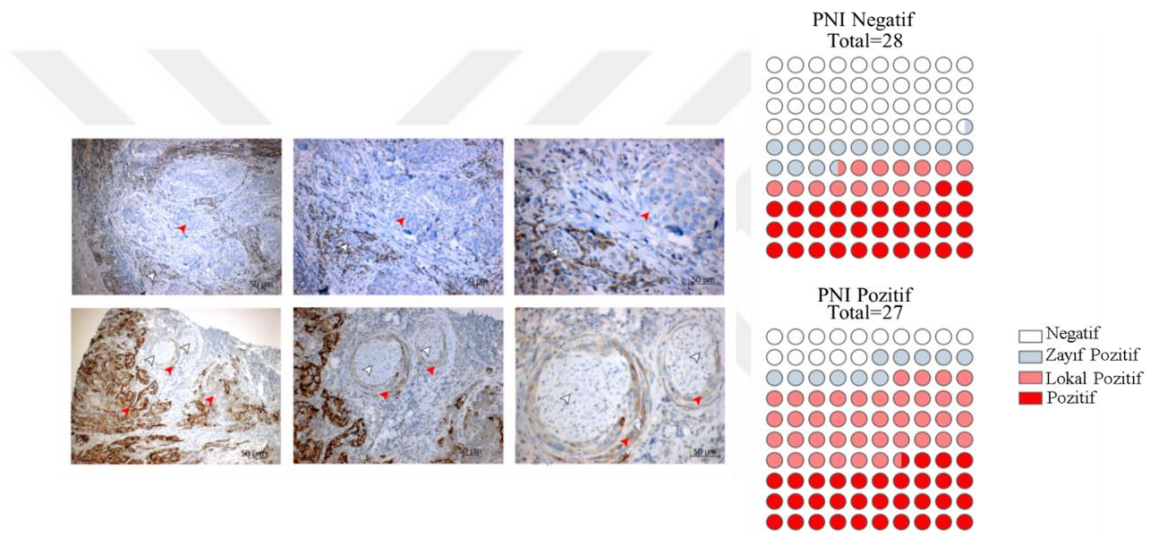
Şekil 4.48. TCGA veri tabanında bulunan baş ve boyun kanseri doku örneklerinde POFUT1 ifade değişiklikleri ve PNI arasındaki ilişki.

Daha sonra PNI invazyon olan ve PNI invazyon olmayan baş ve boyun kanseri doku örneklerinde POFUT1 ifadesi GEO veri tabanı kullanılarak araştırıldı. GEO veri tabanından elde edilen GSE86544 veri setinin incelenmesi neticesinde klinik PNI gelişmeyen hastalara kıyasla PNI gelişen baş ve boyun kanseri doku örneklerinde POFUT1'in yüksek seviyede ifade edildiği belirlendi (Şekil 4.49).



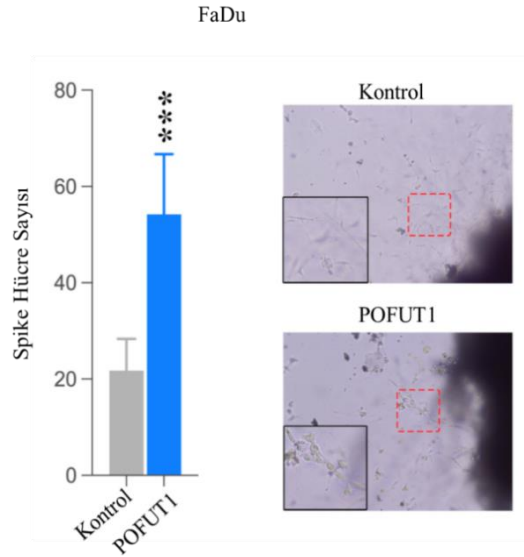
Şekil 4.49. GEO veri tabanında bulunan GSE86544 veri setinde PNI'li veya PNI'siz baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinde POFUT1'in diferansiyel ifadesi.

Ardından *in siliko* verilerimizi desteklemek amacıyla POFUT1'in baş ve boyun kanserindeki rolü immünohistokimyasal analiz ile daha fazla araştırıldı. 27 adet PNI-pozitif ve 28 adet PNI-negatif doku örneğinin dahil edildiği primer baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hastalarına ait tümör dokularından oluşan bir doku grubunun immünohistokimyasal analizi gerçekleştirildi. Bulgularımız POFUT1 ifadesinin, PNI'nin olmadığı tümör doku örneklerine kıyasla PNI'nin olduğu klinik tümör doku örneklerinde önemli ölçüde artmış olduğunu göstermektedir (Şekil 4.50). Elde edilen bulgular, POFUT1'in PNI süreci ile ilişkili olduğuna dair *in siliko* verileri destekleyici nitelikte önemli veriler ortaya koymaktadır.



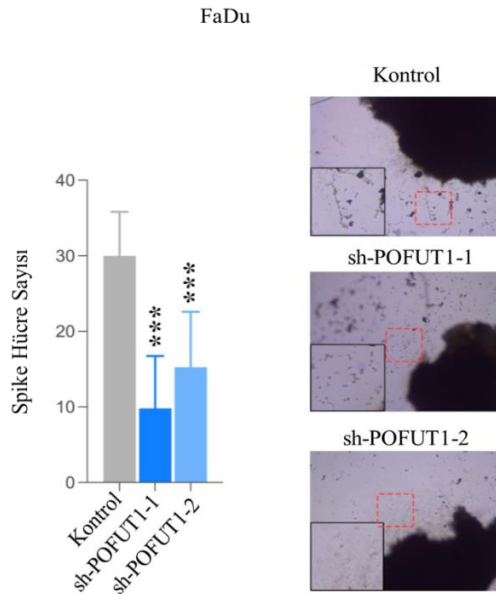
Şekil 4.50. A) PNI olan veya olmayan BBSHK dokularında POFUT1 ifadesini gösteren immünohistokimya bölümlerinin temsili görüntüleri (Beyaz ok sinir demetlerini ve kırmızı ok tümör hücrelerini göstermektedir) ve B) İmmünohistokimya bölümlerinde POFUT1 ifadesinin semi-kantitatif analizi.

Daha sonra POFUT1'in baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hücrelerinin PNI üzerindeki etkisi ko-kültür modeli kullanılarak *ex vivo* araştırıldı. Kanser hücresi- DRG *ex vivo* ko-kültür modeli POFUT1'in yüksek düzeyde ifade edildiği baş ve boyun kanseri hücrelerinde kontrole kıyasla hücrelerin DRG'lerden dışarı doğru uzanan nöral uzantılara etkili bir şekilde invaze olduğunu göstermektedir (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. POFUT1'i yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücrelerinin nöral uzantılara doğru invazyonunu gösteren temsili görüntüler ve bu *ex vivo* modelde DRG uzantılarına göç eden rölaf POFUT1'i yüksek düzeyde ifade eden hücre sayısı.

Ayrıca, POFUT1'in susturulduğu gruplarda DRG'lerin nöral uzantılarına invaze olan FaDu hücrelerinin sayısının, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı gösterildi (Şekil 4.52). Bulgularımız, POFUT1 ifadesinin baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hücrelerinin PNI potansiyelini önemli ölçüde desteklediğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.52. POFUT1'in susturulduğu FaDu hücrelerinin nöral uzantılara doğru invazyonunu gösteren temsili görüntüler ve bu *ex vivo* modelde DRG uzantılarına göç eden rölaf POFUT1'in susturulduğu hücre sayısı.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

POFUT1, bir dizi salgılanan glikoprotein ve hücre yüzey proteinlerinin EGF benzeri tekrarlarına O-fukoz modifikasyonu sağlayan glikoziltransferaz O-Fuc ailesinin bir üyesidir (Wang et al. 1996; Du et al. 2018). *POFUT1*, insan embriyonik kök hücrelerinde ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerde reküren fonksiyon kazanımı görülen 20q11.21 kromozomal bölgesinde bulunmaktadır (Martins-Taylor et al. 2011; Lund et al. 2012; Nguyen et al. 2013). 20q11.21 amplifikasyonunu insan embriyonik kök hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelini artırdığı ve hücre apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (Nguyen et al. 2014). İlginç bir şekilde 20q11.21 amplifikasyonu, insan embriyonik kök hücrelerinde kanserle ilintili çok sayıda genin zenginleşmesine neden olmuştur (Werbowsky-Ogilvie et al. 2009). Son çalışmalar, *POFUT1* geninin memeli embriyolarında anterior-posterior somit biçimini etkilediğini ve memelilerde miyeloid farklılaşmasını düzenlediğini bildirmiştir (Schuster-Gossler et al. 2009; Stanley and Guidos 2009). *POFUT1*'in overekspresyonu temel olarak kromozomal amplifikasyon ve gen kopya sayısı varyasyonları ile ilişkilendirilmiştir (Yokota et al. 2013; Deschuyter et al. 2020). *POFUT1* ifadesindeki düzensizlikler, ergenlik sonrası retikülat deri hiperpigmentasyonu ile karakterize edilen, nadir görülen bir genetik bozukluk olan Dowling-Degos hastalığı ile bağlantılıdır (Du et al. 2018; Wu et al. 2021b). Ayrıca birkaç çalışma, oral skuamöz hücreli karsinom, miyeloid displastik sendrom, akut miyeloid lösemi, glioblastoma ve kolorektal kanser dahil olmak üzere farklı malignitelerde anormal *POFUT1* ifadesi bildirmiştir (Mackinnon et al. 2010; Loo et al. 2013; Yokota et al. 2013).

Şimdiye kadar, yalnızca sınırlı sayıda çalışma, *POFUT1*'in tümör biyolojisi ve ilerlemesindeki rolünü araştırmıştır. *POFUT1* ifadesi, oral skuamöz hücreli karsinom hastalarında artan tümör boyutu ve ileri tümör evresi ile ilişkilendirilmiştir (Yokota et al. 2013). Diğer bir çalışmada, hem glioma hücre hatlarında, hem de primer insan beyin tümörü dokularında *POFUT1*'in yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir (Kroes et al. 2007). Meme kanserinde, *POFUT1*'in yüksek düzeyde ifadesi, ileri evre tümör, lenf nodu metastazı ve daha kısa sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Wan et al. 2017). *POFUT1* overekspresyonun, Notch sinyal yolağının aktivasyonu yoluyla hepatoselüler karsinomun ilerlemesini, hücre proliferasyonunu ve göçünü indüklediği gösterilmiştir (Ma et al. 2016). *POFUT1* geninin susturulmasının, ekstrasvillöz eksplant kültür modellerinde

trofoblast büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, *POFUT1*'in susturulmasının PI3K/Akt sinyal yolunu inhibe ettiği ve kültüre edilen trofoblast hücrelerinde EMT, hücre invazyonu ve migrasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Liu et al. 2014; Cui et al. 2020). Bu bulgular, *POFUT1*'in tümör patogenezinde ve tümör progresyonunda önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Bu tez kapsamında, *POFUT1* ifadesinin, baş ve boyun kanseri hastalarının tümör örneklerinde ve BBSHK hücre hatlarında, normal örneklerle kıyasla önemli ölçüde arttığı ortaya konulmuştur. Ayrıca, artan *POFUT1* ifadesinin, agresif tümör fenotipleri ile de belirgin şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir. *POFUT1*'in BBSHK'daki rolü işlevsel olarak araştırılmıştır. Bulgularımız, değişen *POFUT1* ifadesinin kanser agresifliği ile ilişkili fenotipleri hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak önemli ölçüde değiştirdiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen bu bulgular, BBSHK hücrelerinin birçok malign fenotipinin, yüksek düzeyde *POFUT1* ifadesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Perinöral invazyon (PNI), kanser hücrelerinin sinirler boyunca büyümesi için bir seçenek olan bu hücrelerin sinirlerin içerisine, çevresine veya sinirler boyunca invaze olduğu bir kanser ilerlemesi sürecidir. PNI prevalansı kanser türleri arasında önemli farklılıklar gösterse de BBSHK'de %30-82'ye kadar ulaştığı bildirilmektedir (Lin et al. 2017). Önemli bir kanser yayılım süreci olan PNI, primer BBSHK'li hastalarda yüksek risk faktörleri arasında kabul edilmiş ve kötü klinik sonuçlarla önemli derecede ilişkilendirilmiştir (Zhang et al. 2021b). PNI, artan lokal nüks ve servikal metastaz riski ile ilişkilidir (Mukherjee et al. 2020). Ayrıca PNI'li BBSHK hastalarında PNI gelişmeyen hastalara kıyasla hem nodal hem de uzak metastazda anlamlı artış olduğu gösterilmiştir (Goepfert et al. 1984). PNI'nin önemini kabul eden birçok çalışma olmasına rağmen, şimdiye kadar PNI'nin altında yatan mekanizmalar tam olarak tanımlanmamıştır. Tez kapsamında, *POFUT1*'in BBSHK hücrelerinin perinöral invazyonuna aracılık ettiği gösterilmektedir. Yapılan bu çalışma, BBSHK'de *POFUT1*'in onkogenik potansiyelini ortaya çıkaran ve BBSHK kanser hücrelerinin perinöral invazyonunda *POFUT1* geninin rolünü belirleyen ilk çalışmadır. Tez kapsamında, *POFUT1* geninin yüksek düzeyde ifadesine bağlı olan BBSHK hücrelerinin bir dizi onkogenik fenotipi tanımlanmaktadır.

Bulgularımız, *POFUT1* ifadesinin baş ve boyun kanserli hastalar için potansiyel bir prognostik belirteç olabileceğini ve BBSHK tedavisi için bir hedef olabilme potansiyelini göstermektedir. Bununla birlikte, baş boyun kanserleri ve diğer kanserlerin karsinogenezi sürecinde *POFUT1* geninin rolü hakkında daha fazla ayrıntıyı netleştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. *POFUT1*'in peri-nöral invazyonla ilgili fonksiyonlarını daha iyi tanımlamak için daha fazla moleküler araştırmanın yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Abrantes, J., Posada, D., Guillon, P., Esteves, P. J. and Le Pendu, J. 2009. Widespread gene conversion of alpha-2-fucosyltransferase genes in mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 69, 22-31.
- Ah-See, K. W., Cooke, T. G., Pickford, I. R., Soutar, D. and Balmain, A. 1994. An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Research*, 54, 1617-1621.
- Akert, K., Sandri, C., Weibel, E. R., Peper, K. and Moor, H. 1976. The fine structure of the perineural endothelium. *Cell Tissue Research*, 165, 281-295.
- Albertson, D. G. 2006. Gene amplification in cancer. *Trends in Genetics*, 22, 447-455.
- Allen, B. G., Bhatia, S. K., Buatti, J. M., Brandt, K. E., Lindholm, K. E., Button, A. M., Szweda, L. I., Smith, B. J., Spitz, D. R. and Fath, M. A. 2013. Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts. *Clinical Cancer Research*, 19, 3905-3913.
- Amit, M., Binenbaum, Y., Trejo-Leider, L., Sharma, K., Ramer, N., Ramer, I., Agbetoba, A., Miles, B., Yang, X., Lei, D., Bjørndal, K., Godballe, C., Mücke, T., Wolff, K. D., Eckardt, A. M., Copelli, C., Sesenna, E., Palmer, F., Ganly, I., Patel, S. and Gil, Z. 2015. International collaborative validation of intraneural invasion as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head & Neck*, 37(7), 1038-1045.
- Amit, M., Na'ara, S. and Gil, Z. 2016. Mechanisms of cancer dissemination along nerves. *Nature Reviews Cancer*, 16, 399-408.
- Ang, K. K., Zhang, Q., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tan, P. F., Sherman, E. J., Weber, R. S., Galvin, J. M., Bonner, J. A., Harris, J., El-Naggar, A. K., Gillison, M. L., Jordan, R. C., Konski, A. A., Thorstad, W. L., Trotti, A., Beitler, J. J., Garden, A. S., Spanos, W. J., Yom, S. S. and Axelrod, R. S. 2014. Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. *Journal of Clinical Oncology*, 32, 2940-2950.
- Anonymous 2010. Alcohol consumption and ethyl carbamate. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 96, 3-1383.
- Anonymous 2022a. Web Sitesi: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-orgresearch/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2022/>, Erişim Tarihi:12.01.2022.
- Anonymous, 2022b. Web Sitesi: <https://cancerprogressreport.aacr.org/progress/cpr22-contents/cpr22-preventing-cancer-identifying-risk-factors/contents/>, Erişim Tarihi: 14.01.2022.

- Anonymous, 2022c. Web Sitesi: <https://www.cdc.gov/cancer/headneck/index/>, Erişim Tarihi: 06.02.2022.
- Aparna, M., Rao, L., Kunhikatta, V. and Radhakrishnan, R. 2015. The role of MMP-2 and MMP-9 as prognostic markers in the early stages of tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 44, 345-352.
- Appella, E., Weber, I. T. and Blasi, F. 1988. Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Letters*, 231, 1-4.
- Archibald, S., Young, J. E. and Thoma, A. 2005. Pharyngo-cervical esophageal reconstruction. *Clinics in Plastic Surgery*, 32, 339-346.
- Argiris, A., Brockstein, B. E., Haraf, D. J., Stenson, K. M., Mittal, B. B., Kies, M. S., Rosen, F. R., Jovanovic, B. and Vokes, E. E. 2004. Competing causes of death and second primary tumors in patients with locoregionally advanced head and neck cancer treated with chemoradiotherapy. *Clinical Cancer Research*, 10, 1956-1962.
- Argiris, A. and Eng, C. 2003. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer Treatment and Research*, 114, 15-60.
- Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D. and Ferris, R. L. 2008. Head and neck cancer. *Lancet*, 371, 1695-1709.
- Ayala, G. E., Wheeler, T. M., Shine, H.D., Schmelz, M., Frolov, A., Chakraborty, S. and Rowley, D. 2001. In vitro dorsal root ganglia and human prostate cell line interaction: redefining perineural invasion in prostate cancer. *The Prostate*, 49, 213-223.
- Baker, S. R. and Latack, J. T. 1986. Magnetic resonance imaging of the head and neck. *Otolaryngology Head Neck Surgery*, 95, 82-90.
- Bakst, R. L. and Wong, R. J. 2016. Mechanisms of Perineural Invasion. *Journal of Neurological Surgery Part B Skull Base*, 77, 96-106.
- Bao, C., Yang, X., Xu, W., Luo, H., Xu, Z., Su, C. and Qi, X. 2013. Diabetes mellitus and incidence and mortality of kidney cancer: a meta-analysis. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 27, 357-364.
- Batsakis, J. G. 1985. Nerves and neurotropic carcinomas. *The Annals of Otology Rhinology and Laryngology*, 94, 426-427.
- Baumeister, P., Welz, C., Jacobi, C. and Reiter, M. 2018. Is perineural invasion of head and neck squamous cell carcinomas linked to tobacco consumption?. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 158, 878-881.
- Beard, C. J., Chen, M. H., Cote, K., Loffredo, M., Renshaw, A. A., Hurwitz, M. and D'Amico, A.V. 004. Perineural invasion is associated with increased relapse after

external beam radiotherapy for men with low-risk prostate cancer and may be a marker for occult, high-grade cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 58, 19-24.

Becker, D. J. and Lowe, J. B. 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, 13, 41R-53R.

Berenson, J.R., Yang, J. and Mickel, R. A. 1989. Frequent amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene*, 4, 1111-1116.

Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefèbvre, J.L., Greiner, R. H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., Cognetti, F., Bourhis, J., Kirkpatrick, A., van Glabbeke, M. 2004. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine*, 350, 1945-1952.

Birkeland, A. C., Ludwig, M. L., Spector, M. E. and Brenner, J. C. 2016. The potential for tumor suppressor gene therapy in head and neck cancer. *Discovery Medicine*, 21, 41-47.

Blanas, A., Sahasrabudhe, N. M., Rodríguez, E., van Kooyk, Y. and van Vliet, S.J. 2018. Fucosylated antigens in cancer: an alliance toward tumor progression, metastasis, and resistance to chemotherapy. *Frontiers in Oncology*, 8, 39.

Blanchard, P., Baujat, B., Holostenco, V., Bourredjem, A., Baey, C., Bourhis, J., Pignon, J. P. and group, M. C. 2011. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site. *Radiotherapy and Oncology*, 100, 33-40.

Boehm, A., Wichmann, G., Mozet, C. and Dietz, A. 2010. Current therapy options in recurrent head and neck cancer. *HNO*, 58, 762-769.

Boffetta, P., Hecht, S., Gray, N., Gupta, P. and Straif, K. 2008. Smokeless tobacco and cancer. *The Lancet Oncology*, 9, 667-675.

Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R. K., Raben, D., Baselga, J., Spencer, S. A., Zhu, J., Youssoufian, H., Rowinsky, E. K. and Ang, K. K. 2010. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *The Lancet Oncology*, 11, 21-28.

Bouchard, C., Staller, P. and Eilers, M. 1998. Control of cell proliferation by Myc. *Trends in Cell Biology*, 8, 202-206.

Bourhis, J., Lefebvre, J. L. and Vermorken, J. B. 2010. Cetuximab in the management of locoregionally advanced head and neck cancer: expanding the treatment options?. *European Journal of Cancer*, 46, 1979-1989.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

- worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394-424.
- Bray, S.J. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Molecular Cell Biology*, 7, 678-689.
- Browman, G.P., Wong, G., Hodson, I., Sathya, J., Russell, R., McAlpine, L., Skingley, P. and Levine, M.N. 1993. Influence of cigarette smoking on the efficacy of radiation therapy in head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine*, 328, 159-163.
- Brown, L. M., Check, D. P. and Devesa, S. S. 2011. Oropharyngeal cancer incidence trends: diminishing racial disparities. *Cancer Causes & Control: CCC*, 22, 753-763.
- Budach, W., Hehr, T., Budach, V., Belka, C. and Dietz, K. 2006. A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer*, 6, 28.
- Bur, A. M., Lin, A. and Weinstein, G. S. 2016. Adjuvant radiotherapy for early head and neck squamous cell carcinoma with perineural invasion: A systematic review. *Head & Neck*, 38(1), E2350-7.
- Carvalho, A. L., Nishimoto, I. N., Califano, J. A. and Kowalski, L. P. 2005. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *International Journal of Cancer*, 114, 806-816.
- Cavel, O., Shomron, O., Shabtay, A., Vital, J., Trejo-Leider, L., Weizman, N., Krelin, Y., Fong, Y., Wong, R. J., Amit, M. and Gil, Z. 2012. Endoneurial macrophages induce perineural invasion of pancreatic cancer cells by secretion of GDNF and activation of RET tyrosine kinase receptor. *Cancer Research*, 72, 5733-5743.
- Chabanaïs, J., Labrousse, F., Chaunavel, A., Germot, A. and Maftah, A. 2018. *POFUT1* as a promising novel biomarker of colorectal cancer. *Cancers (Basel)*, 10(11), 411.
- Chang, E. T., Liu, Z., Hildesheim, A., Liu, Q., Cai, Y., Zhang, Z., Chen, G., Xie, S. H., Cao, S. M., Shao, J. Y., Jia, W. H., Zheng, Y., Liao, J., Chen, Y., Lin, L., Ernberg, I., Vaughan, T. L., Adami, H. O., Huang, G., Zeng, Y., Zeng, Y. X. and Ye, W. 2017. Active and passive smoking and risk of nasopharyngeal carcinoma: A population-based case-control study in southern china. *American Journal of Epidemiology*, 185, 1272-1280.
- Chatterjee, D., Katz, M. H., Rashid, A., Wang, H., Iuga, A. C., Varadhachary, G. R., Wolff, R. A., Lee, J. E., Pisters, P. W., Crane, C. H., Gomez, H. F., Abbruzzese, J. L. and Fleming, J. B. 2012. Perineural and intraneural invasion in posttherapy pancreaticoduodenectomy specimens predicts poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 36, 409-417.

- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekruze, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S. and Gillison, M.L. 2011. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 4294-4301.
- Chen, S. H., Zhang, B. Y., Zhou, B., Zhu, C. Z., Sun, L. Q. and Feng, Y. J. 2019. Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche. *American Journal of Cancer Research*, 9, 1-21.
- Chi, A. C., Katabi, N., Chen, H. S. and Cheng, Y. L. 2016. Interobserver variation among pathologists in evaluating perineural invasion for oral squamous cell carcinoma. *Head and Neck Pathology*, 10, 451-464.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. and Pavletich, N. P. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science (New York, N.Y.)*, 265, 346-355.
- Chow, L.Q.M. 2020. Head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine*, 382, 60-72.
- Chu, P. Y. and Chang, S. Y. 2009. Reconstruction of the hypopharynx after surgical treatment of squamous cell carcinoma. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA*, 72, 351-355.
- Chua, M. L. K., Wee, J .T. S., Hui, E. P. and Chan, A.T.C. 2016. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*, 387, 1012-1024.
- Clinton, S. K., Giovannucci, E. L. and Hursting, S. D. 2020. The world cancer research fund/american institute for cancer research third expert report on diet, nutrition, physical activity, and cancer: impact and future directions. *The Journal of Nutrition*, 150, 663-671.
- Cohen, M. A., Weinstein, G. S., O'Malley, B. W., Feldman, M. and Quon, H. 2011. Transoral robotic surgery and human papillomavirus status: Oncologic results. *Head & Neck*, 33, 573-580.
- Cormie, P., Zopf, E. M., Zhang, X. and Schmitz, K. H. 2017. The impact of exercise on cancer mortality, recurrence, and treatment-related adverse effects. *Epidemiologic Reviews*, 39, 71-92.
- Craven, J. M., Pavelic, Z. P., Stambrook, P. J., Pavelic, L., Gapany, M., Kelley, D. J., Gapany, S. and Gluckman, J. L. 1992. Expression of c-erbB-2 gene in human head and neck carcinoma. *Anticancer Research*, 12, 2273-2276.
- Crozier, E. and Sumer, B. D. 2010. Head and neck cancer. *The Medical Clinics of North America*, 94, 1031-1046.

- Cui, X., Wang, H., Li, Y., Chen, T., Liu, S. and Yan, Q. 2020. Epiregulin promotes trophoblast epithelial-mesenchymal transition through poFUT1 and O-fucosylation by poFUT1 on uPA. *Cell Proliferation*, 53, e12745.
- D'Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Westra, W. H. and Gillison, M. L. 2007. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 356, 1944-1956.
- Dai, H., Li, R., Wheeler, T., Ozen, M., Ittmann, M., Anderson, M., Wang, Y., Rowley, D., Younes, M. and Ayala, G.E. 2007. Enhanced survival in perineural invasion of pancreatic cancer: an in vitro approach. *Human Pathology*, 38, 299-307.
- Davis, C. G. 1990. The many faces of epidermal growth factor repeats. *The New Biologist*, 2, 410-419.
- Deschuyter, M., Pennarubia, F., Pinault, E., Legardinier, S. and Maftah, A. 2020. Functional characterization of POFUT1 variants associated with colorectal cancer. *Cancers (Basel)*, 12, 1430.
- Dey, P., Arnold, D., Wight, R., MacKenzie, K., Kelly, C. and Wilson, J. 2002. Radiotherapy versus open surgery versus endolaryngeal surgery (with or without laser) for early laryngeal squamous cell cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD002027.
- Dong, S., Wang, Z., Huang, B., Zhang, J., Ge, Y. and Fan, Q. 2017. Bioinformatics insight into glycosyltransferase gene expression in gastric cancer: POFUT1 is a potential biomarker. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483, 171-177.
- Du, Y., Li, D., Li, N., Su, C., Yang, C., Lin, C., Chen, M., Wu, R., Li, X. and Hu, G. 2018. POFUT1 promotes colorectal cancer development through the activation of Notch1 signaling. *Cell Death & Disease*, 9, 995.
- Duraker, N., Sişman, S. and Can, G. 2003. The significance of perineural invasion as a prognostic factor in patients with gastric carcinoma. *Surgery Today*, 33, 95-100.
- Duvvuri, U., Simental, A. A., D'Angelo, G., Johnson, J. T., Ferris, R. L., Gooding, W. and Myers, E. N. 2004. Elective neck dissection and survival in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Laryngoscope*, 114, 2228-2234.
- Fagan, J. J., Collins, B., Barnes, L., D'Amico, F., Myers, E. N. and Johnson, J. T. 1998. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery*, 124, 637-640.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A. and Bray, F. 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144, 1941-1953.

- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127, 2893-2917.
- Field, J. K., Spandidos, D. A., Stell, P. M., Vaughan, E. D., Evan, G. I. and Moore, J. P. 1989. Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 4, 1463-1468.
- Fischbein, N. J., AAssar, O. S., Caputo, G. R., Kaplan, M. J., Singer, M. I., Price, D. C., Dillon, W. P. and Hawkins, R. A. 1998. Clinical utility of positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose in detecting residual/recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *AJNR American Journal of Neuroradiology*, 19, 1189-1196.
- Fung, S. Y., Lam, J. W. and Chan, K. C. 2016. Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma. *Chinese Clinical Oncology*, 5, 18.
- Galbiatti, A. L., Padovani-Junior, J. A., Maníglia, J. V., Rodrigues, C. D., Pavarino, É. and Goloni-Bertollo, E. M. 2013. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 79, 239-247.
- Gallo, O. and Bianchi, S. 1995. p53 expression: a potential biomarker for risk of multiple primary malignancies in the upper aerodigestive tract. *European Journal of Cancer. Oral Oncology*, 31B, 53-57.
- Gan, R. H., Wei, H., Xie, J., Zheng, D. P., Luo, E. L., Huang, X.Y., Zhao, Y., Ding, L. C., Su, B. H., Lin, L. S., Zheng, D. L. and Lu, Y. G. 2018. Notch1 regulates tongue cancer cells proliferation, apoptosis and invasion. *Cell Cycle*, 17, 216-224.
- Gasparini, G., Pellegatta, M., Crippa, S., Lena, M. S., Belfiori, G., Doglioni, C., Taveggia, C. and Falconi, M. 2019. Nerves and pancreatic cancer: new insights into a dangerous relationship. *Cancers (Basel)*, 11, 893.
- Gatta, G., Botta, L., Sánchez, M. J., Anderson, L. A., Pierannunzio, D., Licitra, L. and Group, E. W. 2015. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study. *European Journal of Cancer*, 51, 2130-2143.
- George, D. L., Falk, P. S., Umberto Meduri, G., Leeper, K. V., Wunderink, R. G., Steere, E. L., Nunnally, F. K., Beckford, N. and Mayhall, C. G. 1998. Nosocomial sinusitis in patients in the medical intensive care unit: a prospective epidemiological study. *Clinical Infectious Diseases*, 27, 463-470.
- Giovannucci, E., Harlan, D. M., Archer, M. C., Bergenstal, R. M., Gapstur, S. M., Habel, L. A., Pollak, M., Regensteiner, J. G. and Yee, D. 2010. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care*, 33, 1674-1685.
- Giralt, J., Trigo, J., Nuyts, S., Ozsahin, M., Skladowski, K., Hatoum, G., Daisne, J. F., Yunes Ancona, A. C., Cmelak, A., Mesía, R., Zhang, A., Oliner, K. S. and

- VanderWalde, A. 2015. Panitumumab plus radiotherapy versus chemoradiotherapy in patients with unresected, locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-2): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 16, 221-232.
- Goepfert, H., Dichtel, W. J., Medina, J. E., Lindberg, R. D. and Luna, M. D. 1984. Perineural invasion in squamous cell skin carcinoma of the head and neck. *American Journal of Surgery*, 148, 542-547.
- Gourin, C. G. and Terris, D. J. 2004. Carcinoma of the hypopharynx. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 13, 81-98.
- Groome, P. A., O'Sullivan, B., Irish, J. C., Rothwell, D. M., Schulze, K., Warde, P. R., Schneider, K. M., Mackenzie, R. G., Hodson, D. I., Hammond, J. A., Gulavita, S. P., Eapen, L. J., Dixon, P. F., Bissett, R. J. and Mackillop, W. J. 2003. Management and outcome differences in supraglottic cancer between Ontario, Canada, and the Surveillance, Epidemiology, and End Results areas of the United States. *Journal of Clinical Oncology*, 21, 496-505.
- Grosso, G., Bella, F., Godos, J., Sciacca, S., Del Rio, D., Ray, S., Galvano, F. and Giovannucci, E. L. 2017. Possible role of diet in cancer: systematic review and multiple meta-analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. *Nutrition Reviews*, 75, 405-419.
- Grégoire, V., Grau, C., Lapeyre, M. and Maingon, P. 2018. Target volume selection and delineation (T and N) for primary radiation treatment of oral cavity, oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 87, 131-137.
- Guan, W., Zhang, X., Wang, X., Lu, S., Yin, J. and Zhang, J. 2019. Employing parasite against cancer: a lesson from the canine tapeworm. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1137.
- Guardiola, E., Chaigneau, L., Villanueva, C. and Pivot, X. 2006. Is there still a role for triple endoscopy as part of staging for head and neck cancer? *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 14, 85-88.
- Ha, P. K., Hdeib, A., Goldenberg, D., Jacene, H., Patel, P., Koch, W., Califano, J., Cummings, C. W., Flint, P. W., Wahl, R. and Tufano, R. P. 2006. The role of positron emission tomography and computed tomography fusion in the management of early-stage and advanced-stage primary head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery*, 132, 12-16.
- Haddad, L., Kelly, D. L., Weglicki, L. S., Barnett, T. E., Ferrell, A. V. and Ghadban, R. 2016. A systematic review of effects of waterpipe smoking on cardiovascular and respiratory health outcomes. *Tobacco Use Insights*, 9, 13-28.
- Haque, R., Contreras, R., McNicoll, M. P., Eckberg, E. C. and Petitti, D. B. 2006. Surgical margins and survival after head and neck cancer surgery. *BMC Ear, Nose, and Throat Disorders*, 6, 2.

- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wünsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A. F., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D. M., Zaridze, D., Zatonski, W., Zhang, Z. F., Berthiller, J. and Boffetta, P. 2007. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 99, 777-789.
- Henley, S. J., Connell, C. J., Richter, P., Husten, C., Pechacek, T., Calle, E. E. and Thun, M. J. 2007. Tobacco-related disease mortality among men who switched from cigarettes to spit tobacco. *Tobacco Control*, 16, 22-28.
- Hoffman, H. T., Karnell, L. H., Shah, J. P., Ariyan, S., Brown, G. S., Fee, W. E., Glass, A. G., Goepfert, H., Ossoff, R. H. and Fremgen, A. M. 1997. Hypopharyngeal cancer patient care evaluation. *Laryngoscope*, 107, 1005-1017.
- Holdener, B. C. and Haltiwanger, R. S. 2019. Protein O-fucosylation: structure and function. *Current Opinion in Structural Biology*, 56, 78-86.
- Huang, Z., Huang, H., Li, H., Chen, W. and Pan, C. 2009. EMMPRIN expression in tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 38, 518-523.
- Hussain, S. P. and Harris, C. C. 1998. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Research*, 58, 4023-4037.
- Huyett, P., Gilbert, M., Liu, L., Ferris, R. L. and Kim, S. 2017. A Model for perineural invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Visualized Experiments*, 119, e55043.
- Hwa, J. S., Kwon, O. J., Park, J. J., Woo, S. H., Kim, J. P., Ko, G. H., Seo, J. H. and Kim, R.B. 2015. The prognostic value of immunohistochemical markers for oral tongue squamous cell carcinoma. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 272, 2953-2959.
- Islami, F., Goding Sauer, A., Miller, K. D., Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Jacobs, E. J., McCullough, M. L., Patel, A. V., Ma, J., Soerjomataram, I., Flanders, W. D., Brawley, O. W., Gapstur, S. M. and Jemal, A. 2018. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 31-54.
- Jacobs, E. J., Newton, C. C., Carter, B. D., Feskanich, D., Freedman, N. D., Prentice, R. L. and Flanders, W. D. 2015. What proportion of cancer deaths in the contemporary United States is attributable to cigarette smoking?. *Annals of Epidemiology*, 25, 179-182.

- Jafar-Nejad, H., Leonardi, J. and Fernandez-Valdivia, R. 2010. Role of glycans and glycosyltransferases in the regulation of Notch signaling. *Glycobiology*, 20, 931-949.
- Jham, B. C. and da Silva Freire, A. R. 2006. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 72, 704-708.
- Jia, L., Zhang, J., Ma, T., Guo, Y., Yu, Y. and Cui, J. 2018. The function of fucosylation in progression of lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 8, 565.
- Jiang, H., Livingston, M., Room, R., Gan, Y., English, D. and Chenhall, R. 2019. Can public health policies on alcohol and tobacco reduce a cancer epidemic? Australia's experience. *BMC Medicine*, 17, 213.
- Johnson, D. E., Burtneess, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E. and Grandis, J. R. 2020. Head and neck squamous cell carcinoma. *Disease Primers*, 6, 92.
- Jones, A. S., Fish, B., Fenton, J. E. and Husband, D. J. 2004. The treatment of early laryngeal cancers (T1-T2 N0): surgery or irradiation?. *Head & Neck*, 26, 127-135.
- Jurcak, N. and Zheng, L. 2019. Signaling in the microenvironment of pancreatic cancer: Transmitting along the nerve. *Pharmacology & Therapeutics*, 200, 126-134.
- Karatzanis, A. D., Psychogios, G., Waldfahrer, F., Zenk, J., Hornung, J., Velegrakis, G. A. and Iro, H. 2010a. T1 and T2 hypopharyngeal cancer treatment with laser microsurgery. *Journal of Surgical Oncology*, 102, 27-33.
- Karatzanis, A. D., Psychogios, G., Zenk, J., Waldfahrer, F., Hornung, J., Velegrakis, G. A. and Iro, H. 2010b. Evaluation of available surgical management options for early supraglottic cancer. *Head & Neck*, 32, 1048-1055.
- Khuri, F. R., Lee, J. J., Lippman, S. M., Kim, E. S., Cooper, J. S., Benner, S. E., Winn, R., Pajak, T. F., Williams, B., Shenouda, G., Hodson, I., Fu, K., Shin, D. M., Vokes, E. E., Feng, L., Goepfert, H. and Hong, W. K. 2006. Randomized phase III trial of low-dose isotretinoin for prevention of second primary tumors in stage I and II head and neck cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 441-450.
- Kim, H. E., Park, S. Y., Kim, H., Kim, D. J. and Kim, S. I. 2021. Prognostic effect of perineural invasion in surgically treated esophageal squamous cell carcinoma. *Thoracic Cancer*, 12, 1605-1612.
- Kim, L., King, T. and Agulnik, M. 2010. Head and neck cancer: changing epidemiology and public health implications. *Oncology (Williston Park)*, 24, 915-919, 924.
- Klement, R. J. 2014. Restricting carbohydrates to fight head and neck cancer-is this realistic?. *Cancer Biology & Medicine*, 11, 145-161.

- Kofler, B., Laban, S., Busch, C. J., Lörincz, B. and Knecht, R. 2014. New treatment strategies for HPV-positive head and neck cancer. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 271, 1861-1867.
- Komor, M. A., de Wit, M., van den Berg, J., Martens de Kemp, S. R., Delis-van Diemen, P. M., Bolijn, A. S., Tijssen, M., Schelfhorst, T., Piersma, S. R., Chiasserini, D., Sanders, J., Rausch, C., Hoogstrate, Y., Stubbs, A. P., de Jong, M., Jenster, G., Carvalho, B., Meijer, G. A., Jimenez, C. R., Fijneman, R. J. A. and Consortium, N. P. 2020. Molecular characterization of colorectal adenomas reveals POFUT1 as a candidate driver of tumor progression. *International Journal of Cancer*, 146, 1979-1992.
- Kroes, R. A., Dawson, G. and Moskal, J. R. 2007. Focused microarray analysis of glycogene expression in human glioblastomas. *Journal of Neurochemistry*, 103 (1), 14-24.
- Kuo, P., Chen, M. M., Decker, R. H., Yarbrough, W. G. and Judson, B. L. 2014. Hypopharyngeal cancer incidence, treatment, and survival: temporal trends in the United States. *Laryngoscope*, 124, 2064-2069.
- Laimer, K., Fong, D., Gastl, G., Obrist, P., Kloss, F., Tuli, T., Gassner, R., Rasse, M., Norer, B. and Spizzo, G. 2008. EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity: frequency and relationship to clinicopathologic features. *Oral Oncology*, 44, 72-77.
- Lanska, D. J. 2021. Cruveilhier's Unrecognized Case (c1831) of Dyke-Davidoff-Masson Syndrome. *European Neurology*, 84, 300-306.
- Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., Straif, K. 2016. Body fatness and cancer-viewpoint of the IARC working group. *The New England Journal of Medicine*, 375, 794-798.
- Law, W. L. and Chu, K. W. 2004. Anterior resection for rectal cancer with mesorectal excision: a prospective evaluation of 622 patients. *Annals of Surgery*, 240, 260-268.
- Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88, 323-331.
- Li, H. F., Liu, Y.Q., Shen, Z. J., Gan, X. F., Han, J. J., Liu, Y. Y., Li, H. G. and Huang, Z. Q. 2015. Downregulation of MACC1 inhibits invasion, migration and proliferation, attenuates cisplatin resistance and induces apoptosis in tongue squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 33, 651-660.
- Li, Q., Wang, J., Ma, X., Wang, M. and Zhou, L. 2021. POFUT1 acts as a tumor promoter in glioblastoma by enhancing the activation of Notch signaling. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 53, 621-632.

- Liang, D., Shi, S., Xu, J., Zhang, B., Qin, Y., Ji, S., Xu, W., Liu, J., Liu, L., Liu, C., Long, J., Ni, Q. and Yu, X. 2016. New insights into perineural invasion of pancreatic cancer: More than pain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1865, 111-122.
- Liebig, C., Ayala, G., Wilks, J. A., Berger, D. H. and Albo, D. 2009. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*, 115, 3379-3391.
- Liese, A. D., Krebs-Smith, S. M., Subar, A. F., George, S. M., Harmon, B. E., Neuhauser, M. L., Boushey, C.J., Schap, T.E. and Reedy, J. 2015. The dietary patterns methods project: synthesis of findings across cohorts and relevance to dietary guidance. *The Journal of Nutrition*, 145, 393-402.
- Lin, C., Cao, W., Ren, Z., Tang, Y., Zhang, C., Yang, R., Chen, Y., Liu, Z., Peng, C., Wang, L., Wang, X. and Ji, T. 2017. GDNF secreted by nerves enhances PD-L1 expression via JAK2-STAT1 signaling activation in HNSCC. *Oncoimmunology*, 6, e1353860.
- Lira-Navarrete, E., Valero-González, J., Villanueva, R., Martínez-Júlvez, M., Tejero, T., Merino, P., Panjikar, S. and Hurtado-Guerrero, R. 2011. Structural insights into the mechanism of protein O-fucosylation. *PLoS One*, 6, e25365.
- Liu, S., Wang, J., Qin, H. M., Yan, X. M., Yang, X. S., Liu, C. and Yan, Q. 2014. LIF upregulates poFUT1 expression and promotes trophoblast cell migration and invasion at the fetal-maternal interface. *Cell Death & Disease*, 5, e1396.
- Loo, L. W., Tiirikainen, M., Cheng, I., Lum-Jones, A., Seifried, A., Church, J. M., Gryfe, R., Weisenberger, D. J., Lindor, N. M., Gallinger, S., Haile, R. W., Duggan, D. J., Thibodeau, S. N., Casey, G. and Le Marchand, L. 2013. Integrated analysis of genome-wide copy number alterations and gene expression in microsatellite stable, CpG island methylator phenotype-negative colon cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 52, 450-466.
- Loriol, C., Audfray, A., Dupuy, F., Germot, A. and Maftah, A. 2007. The two N-glycans present on bovine Pofut1 are differently involved in its solubility and activity. *The FEBS Journal*, 274, 1202-1211.
- Lund, R. J., Närvä, E. and Lahesmaa, R. 2012. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nature Reviews Genetics*, 13, 732-744.
- Luo, Y., Nita-Lazar, A. and Haltiwanger, R. S. 2006. Two distinct pathways for O-fucosylation of epidermal growth factor-like or thrombospondin type 1 repeats. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 9385-9392.
- Lydiatt, W. M., Patel, S. G., O'Sullivan, B., Brandwein, M. S., Ridge, J. A., Migliacci, J. C., Loomis, A. M. and Shah, J. P. 2017. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67, 122-137.
- Ma, L., Dong, P., Liu, L., Gao, Q., Duan, M., Zhang, S., Chen, S., Xue, R. and Wang, X. 2016. Overexpression of protein O-fucosyltransferase 1 accelerates hepatocellular

- carcinoma progression via the Notch signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473, 503-510.
- Macfarlane, G. J., Zheng, T., Marshall, J. R., Boffetta, P., Niu, S., Brasure, J., Merletti, F. and Boyle, P. 1995. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *European Journal of Cancer Oral Oncology*, 31, 181-187.
- Mackinnon, R. N., Selan, C., Wall, M., Baker, E., Nandurkar, H. and Campbell, L. J. 2010. The paradox of 20q11.21 amplification in a subset of cases of myeloid malignancy with chromosome 20 deletion. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 49, 998-1013.
- Malhotra, J., Borron, C., Freedman, N. D., Abnet, C. C., van den Brandt, P. A., White, E., Milne, R. L., Giles, G. G. and Boffetta, P. 2017. Association between cigar or pipe smoking and cancer risk in Men: a pooled analysis of five cohort studies. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 10, 704-709.
- Marchesi, F., Piemonti, L., Fedele, G., Destro, A., Roncalli, M., Albarello, L., Doglioni, C., Anselmo, A., Doni, A., Bianchi, P., Laghi, L., Malesci, A., Cervo, L., Malosio, M., Reni, M., Zerbi, A., Di Carlo, V., Mantovani, A. and Allavena, P. 2008. The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Research*, 68, 9060-9069.
- Martins-Taylor, K., Nisler, B. S., Taapken, S. M., Compton, T., Crandall, L., Montgomery, K. D., Lalande, M. and Xu, R. H. 2011. Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 29, 488-491.
- Marur, S. and Forastiere, A. A. 2008. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 83, 489-501.
- Marur, S. and Forastiere, A. A. 2016. Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 91, 386-396.
- McGuirt, W. F., Greven, K., Williams, D., Keyes, J. W., Watson, N., Cappellari, J. O. and Geisinger, K. R. 1998. PET scanning in head and neck oncology: a review. *Head & Neck*, 20, 208-215.
- McMillan, B. J., Zimmerman, B., Egan, E. D., Lofgren, M., Xu, X., Hesser, A. and Blacklow, S. C. 2017. Structure of human POFUT1, its requirement in ligand-independent oncogenic Notch signaling, and functional effects of Dowling-Degos mutations. *Glycobiology*, 27, 777-786.
- Mehanna, H., Beech, T., Nicholson, T., El-Hariry, I., McConkey, C., Paleri, V. and Roberts, S. 2013. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & Neck*, 35, 747-755.

- Mendelsohn, A. H., Lai, C. K., Shintaku, I. P., Elashoff, D. A., Dubinett, S. M., Abemayor, E. and St John, M. A. 2010. Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC. *Laryngoscope*, 120, 1788-1794.
- Mendenhall, W. M., Morris, C. G., Amdur, R. J., Hinerman, R. W., Malyapa, R. S., Werning, J. W., Lansford, C. D. and Villaret, D. B. 2006. Definitive radiotherapy for tonsillar squamous cell carcinoma. *American Journal of Clinical Oncology*, 29, 290-297.
- Meng, L., Xu, L., Yang, Y., Zhou, L., Chang, Y., Shi, T., Tan, C., An, H., Zhu, Y. and Xu, J. 2017. High expression of FUT3 is linked to poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 8, 61036-61047.
- Merati, A. L. and Rieder, A. A. 2003. Normal endoscopic anatomy of the pharynx and larynx. *The American Journal of Medicine*, 115(3), 10-14.
- Mittelman, S. D. 2020. The role of diet in cancer prevention and chemotherapy efficacy. *Annual Review of Nutrition*, 40, 273-297.
- Miyaguchi, M., Olofsson, J. and Hellquist, H. B. 1990. Expression of epidermal growth factor receptor in laryngeal dysplasia and carcinoma. *Acta Otolaryngologica*, 110, 309-313.
- Miyoshi, E., Moriwaki, K., Terao, N., Tan, C. C., Terao, M., Nakagawa, T., Matsumoto, H., Shinzaki, S. and Kamada, Y. 2012. Fucosylation is a promising target for cancer diagnosis and therapy. *Biomolecules*, 2, 34-45.
- Mohideen, K., Krithika, C., Jeddy, N., Bharathi, R., Thayumanavan, B. and Sankari, S.L. 2019. Meta-analysis on risk factors of squamous cell carcinoma of the tongue in young adults. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology:JOMFP*, 23, 450-457.
- Montazeri, Z., Nyiraneza, C., El-Katerji, H. and Little, J. 2017. Waterpipe smoking and cancer: systematic review and meta-analysis. *Tobacco Control*, 26, 92-97.
- Montero, P. H. and Patel, S. G. 2015. Cancer of the oral cavity. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 24, 491-508.
- Morze, J., Danielewicz, A., Hoffmann, G. and Schwingshackl, L. 2020. Diet quality as assessed by the healthy eating index, alternate healthy eating index, dietary approaches to stop hypertension score, and health outcomes: a second update of a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 120, 1998-2031.
- Mukherjee, P., Cintra, M., Huang, C., Zhou, M., Zhu, S., Colevas, A. D., Fischbein, N. and Gevaert, O. 2020. CT-based radiomic signatures for predicting histopathologic features in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiology Imaging Cancer*, 2(3), e190039.
- Muller, D., Millon, R., Velten, M., Bronner, G., Jung, G., Engelmann, A., Flesch, H., Eber, M., Methlin, G. and Abecassis, J. 1997. Amplification of 11q13 DNA

- markers in head and neck squamous cell carcinomas: correlation with clinical outcome. *European Journal of Cancer*, 33, 2203-2210.
- Murphy, P. M. 2001. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *The New England Journal of Medicine*, 345, 833-835.
- Müller, J., Rana, N. A., Serth, K., Kakuda, S., Haltiwanger, R. S. and Gossler, A. 2014. O-fucosylation of the notch ligand mDLL1 by POFUT1 is dispensable for ligand function. *PLoS One*, 9(2), e88571.
- Nagai, M. A. 1999. Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 897-904.
- Nakamura, K., Shioyama, Y., Kawashima, M., Saito, Y., Nakamura, N., Nakata, K., Hareyama, M., Takada, T., Karasawa, K., Watanabe, T., Yorozu, A., Tachibana, H., Suzuki, G., Hayabuchi, N., Toba, T. and Yamada, S. 2006. Multi-institutional analysis of early squamous cell carcinoma of the hypopharynx treated with radical radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 65, 1045-1050.
- Newman, J. R., Connolly, T. M., Illing, E. A., Kilgore, M. L., Locher, J. L. and Carroll, W. R. 2015. Survival trends in hypopharyngeal cancer: a population-based review. *Laryngoscope*, 125, 624-629.
- Nguyen, H. T., Geens, M., Mertzaniidou, A., Jacobs, K., Heirman, C., Breckpot, K. and Spits, C. 2014. Gain of 20q11.21 in human embryonic stem cells improves cell survival by increased expression of Bcl-xL. *Molecular Human Reproduction*, 20, 168-177.
- Nguyen, H. T., Geens, M. and Spits, C. 2013. Genetic and epigenetic instability in human pluripotent stem cells. *Human Reproduction Update*, 19, 187-205.
- Nguyen-Tan, P. F., Zhang, Q., Ang, K. K., Weber, R. S., Rosenthal, D. I., Soulieres, D., Kim, H., Silverman, C., Raben, A., Galloway, T.J., Fortin, A., Gore, E., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Gillison, M. L., List, M. and Le, Q. T. 2014. Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial: long-term report of efficacy and toxicity. *Journal of Clinical Oncology*, 32, 3858-3866.
- O'Malley, M., King, A. N., Conte, M., Ellingrod, V. L. and Ramnath, N. 2014. Effects of cigarette smoking on metabolism and effectiveness of systemic therapy for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 9, 917-926.
- Obid, R., Redlich, M. and Tomeh, C. 2019. The Treatment of laryngeal cancer. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 31, 1-11.
- Okada, Y., Eibl, G., Duffy, J. P., Reber, H. A. and Hines, O. J. 2003. Glial cell-derived neurotrophic factor upregulates the expression and activation of matrix metalloproteinase-9 in human pancreatic cancer. *Surgery*, 134, 293-299.

- Okada, Y., Eibl, G., Guha, S., Duffy, J. P., Reber, H. A. and Hines, O. J. 2004. Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 21, 285-292.
- Okajima, T., Xu, A. and Irvine, K. D. 2003. Modulation of notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 42340-42345.
- Osborne, C., Wilson, P. and Tripathy, D. 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist*, 9, 361-377.
- Overall, C. M. and Kleinfeld, O. 2006. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 6, 227-239.
- Ozaki, H., Hiraoka, T., Mizumoto, R., Matsuno, S., Matsumoto, Y., Nakayama, T., Tsunoda, T., Suzuki, T., Monden, M., Saitoh, Y., Yamauchi, H. and Ogata, Y. 1999. The prognostic significance of lymph node metastasis and intrapancreatic perineural invasion in pancreatic cancer after curative resection. *Surgery Today*, 29, 16-22.
- Panizza, B. J. 2016. An overview of head and neck malignancy with perineural spread. *Journal of Neurological Surgery Part B Skull Base*, 77, 81-85.
- Park, S., Lim, J. M., Chun, J. N., Lee, S., Kim, T. M., Kim, D. W., Kim, S. Y., Bae, D. J., Bae, S. M., So, I., Kim, H. G., Choi, J. Y. and Jeon, J. H. 2020. Altered expression of fucosylation pathway genes is associated with poor prognosis and tumor metastasis in non-small cell lung cancer. *International Journal of Oncology*, 56, 559-567.
- Patel, A. V., Friedenreich, C. M., Moore, S. C., Hayes, S. C., Silver, J. K., Campbell, K. L., Winters-Stone, K., Gerber, L. H., George, S. M., Fulton, J. E., Denlinger, C., Morris, G. S., Hue, T., Schmitz, K. H. and Matthews, C. E. 2019. American college of sports medicine roundtable report on physical activity, sedentary behavior, and cancer prevention and control. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 51, 2391-2402.
- Peppone, L. J., Mustian, K. M., Morrow, G. R., Dozier, A. M., Ossip, D. J., Janelins, M. C., Sprod, L. K. and McIntosh, S. 2011. The effect of cigarette smoking on cancer treatment-related side effects. *The Oncologist*, 16, 1784-1792.
- Petersen, J. F., Timmermans, A. J., van Dijk, B. A. C., Overbeek, L. I. H., Smit, L. A., Hilgers, F. J. M., Stuiver, M. M. and van den Brekel, M. W. M. 2018. Trends in treatment, incidence and survival of hypopharynx cancer: a 20-year population-based study in the Netherlands. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 275, 181-189.

- Petros, W. P., Younis, I. R., Ford, J. N. and Weed, S. A. 2012. Effects of tobacco smoking and nicotine on cancer treatment. *Pharmacotherapy*, 32, 920-931.
- Pfister, D. G., Ang, K. K., Brizel, D. M., Burtness, B. A., Busse, P. M., Caudell, J. J., Cmelak, A. J., Colevas, A. D., Dunphy, F., Eisele, D. W., Gilbert, J., Gillison, M. L., Haddad, R. I., Haughey, B. H., Hicks, W. L., Hitchcock, Y. J., Kies, M. S., Lydiatt, W. M., Maghami, E., Martins, R., McCaffrey, T., Mittal, B. B., Pinto, H. A., Ridge, J. A., Samant, S., Schuller, D. E., Shah, J. P., Spencer, S., Weber, R.S., Wolf, G. T., Worden, F., Yom, S. S., McMillian, N. R., Hughes, M. and Network, N. C. C. 2013. Head and neck cancers, version 2.2013. Featured updates to the NCCN guidelines. *Journal of National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 11, 917-923.
- Pignon, J. P., Bourhis, J., Domenge, C. and Designé, L. 2000. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet*, 355, 949-955.
- Pinho, S. S. and Reis, C. A. 2015. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15, 540-555.
- Porter, M. J., Field, J. K., Leung, S. F., Lo, D., Lee, J. C., Spandidos, D. A. and van Hasselt, C. A. 1994. The detection of the c-myc and ras oncogenes in nasopharyngeal carcinoma by immunohistochemistry. *Acta Otolaryngologica*, 114, 105-109.
- Posner, M. R. 2005. Paradigm shift in the treatment of head and neck cancer: the role of neoadjuvant chemotherapy. *The Oncologist*, 10, 11-19.
- Press, M. F., Pike, M. C., Hung, G., Zhou, J. Y., Ma, Y., George, J., Dietz-Band, J., James, W., Slamon, D. J. and Batsakis, J. G. 1994. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Research*, 54, 5675-5682.
- Rampal, R., Arboleda-Velasquez, J. F., Nita-Lazar, A., Kosik, K. S. and Haltiwanger, R. S. 2005. Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 32133-32140.
- Rees-Punia, E., Evans, E. M., Schmidt, M. D., Gay, J. L., Matthews, C. E., Gapstur, S. M. and Patel, A. V. 2019. Mortality risk reductions for replacing sedentary time with physical activities. *American Journal of Preventive Medicine*, 56, 736-741.
- Rivera, C. 2015. Essentials of oral cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8, 11884-11894.
- Rodrigo, J. P., Lazo, P. S., Ramos, S., Alvarez, I. and Suárez, C. 1996. MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery*, 122, 504-507.

- Roh, J., Muelleman, T., Tawfik, O. and Thomas, S. M. 2015. Perineural growth in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Oral Oncology*, 51, 16-23.
- Sadeghzadeh, Z., Khosravi, A., Jazi, M. S. and Asadi, J. 2020. Upregulation of Fucosyltransferase 3, 8 and protein O-Fucosyltransferase 1, 2 genes in esophageal cancer stem-like cells (CSLCs). *Glycoconjugate Journal*, 37, 319-327.
- Santos, R. C., Dias, R. S., Giordani, A. J., Segreto, R. A. and Segreto, H.R. 2011. Mucositis in head and neck cancer patients undergoing radiochemotherapy. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 45, 1338-1344.
- Schechter, A. L., Stern, D. F., Vaidyanathan, L., Decker, S. J., Drebin, J. A., Greene, M. I. and Weinberg, R. A. 1984. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 312, 513-516.
- Schmitd, L. B., Liu, M., Scanlon, C. S., Banerjee, R. and D'Silva, N. J. 2019. The chick chorioallantoic membrane in vivo model to assess perineural invasion in head and neck cancer. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 148, e59296.
- Schmitd, L. B., Scanlon, C. S. and D'Silva, N. J. 2018. Perineural invasion in head and neck cancer. *Journal of Dental Research*, 97, 742-750.
- Schneider, M., Al-Shareffi, E. and Haltiwanger, R. S. 2017. Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology*, 27, 601-618.
- Schuster-Gossler, K., Harris, B., Johnson, K. R., Serth, J. and Gossler, A. 2009. Notch signalling in the paraxial mesoderm is most sensitive to reduced Pofut1 levels during early mouse development. *BMC Developmental Biology*, 9, 6.
- Schuuring, E., Verhoeven, E., Litvinov, S. and Michalides, R. J. 1993. The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Molecular and Cellular Biology*, 13, 2891-2898.
- Secretan, B., Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Coglian, V. 2009. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncology*, 10(11), 1033-1034.
- Serrano, M., Hannon, G. J. and Beach, D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366, 704-707.
- Sessions, D. G., Spector, G. J., Lenox, J., Parriott, S., Haughey, B., Chao, C., Marks, J. and Perez, C. 2000. Analysis of treatment results for floor-of-mouth cancer. *Laryngoscope*, 110, 1764-1772.
- Shan, M., Yang, D., Dou, H. and Zhang, L. 2019. Fucosylation in cancer biology and its clinical applications. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 162, 93-119.

- Shao, L. and Haltiwanger, R. S. 2003. O-fucose modifications of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type 1 repeats: unusual modifications in unusual places. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 60, 241-250.
- Sharma, A., Rath, G. K., Chaudhary, S. P., Thakar, A., Mohanti, B. K. and Bahadur, S. 2012. Lactobacillus brevis CD2 lozenges reduce radiation- and chemotherapy-induced mucositis in patients with head and neck cancer: a randomized double-blind placebo-controlled study. *European Journal of Cancer*, 48, 875-881.
- Sharma, A., Tilak, T., Bakhshi, S., Raina, V., Kumar, L., Chaudhary, S., Sahoo, R., Gupta, R. and Thulkar, S. 2016. CD2 lozenges prevent oral mucositis in patients undergoing high dose chemotherapy followed by haematopoietic stem cell transplantation. *ESMO Open*, 1, e000138.
- Shi, S. and Stanley, P. 2003. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 5234-5239.
- Shin, D. M. and Khuri, F. R. 2013. Advances in the management of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & Neck*, 35, 443-453.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. and Jemal, A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64, 9-29.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. and Jemal, A. 2022. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72, 7-33.
- Skinner, H. D., Holsinger, F. C. and Beadle, B. M. 2012. Oropharynx cancer. *Current Problems in Cancer*, 36, 334-415.
- Stanley, P. and Guidos, C. J. 2009. Regulation of Notch signaling during T- and B-cell development by O-fucose glycans. *Immunological Reviews*, 230, 201-215.
- Steuer, C. E., El-Deiry, M., Parks, J. R., Higgins, K. A. and Saba, N. F. 2017. An update on larynx cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67, 31-50.
- Stoeckli, S. J., Zimmermann, R. and Schmid, S. 2001. Role of routine panendoscopy in cancer of the upper aerodigestive tract. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 124, 208-212.
- Stolinski, C. 1995. Structure and composition of the outer connective tissue sheaths of peripheral nerve. *Journal of Anatomy*, 186, 123-130.
- Sun, W. and Yang, J. 2010. Functional mechanisms for human tumor suppressors. *Journal of Cancer*, 1, 136-140.
- Tai, S. K., Li, W. Y., Yang, M. H., Chang, S. Y., Chu, P. Y., Tsai, T. L., Wang, Y. F. and Chang, P. M. 2012. Treatment for T1-2 oral squamous cell carcinoma with or without perineural invasion: neck dissection and postoperative adjuvant therapy. *Annals of Surgical Oncology*, 19, 1995-2002.

- Teras, L. R., Patel, A. V., Wang, M., Yaun, S. S., Anderson, K., Brathwaite, R., Caan, B. J., Chen, Y., Connor, A. E., Eliassen, A. H., Gapstur, S. M., Gaudet, M. M., Genkinger, J. M., Giles, G. G., Lee, I. M., Milne, R. L., Robien, K., Sawada, N., Sesso, H. D., Stampfer, M. J., Tamimi, R. M., Thomson, C. A., Tsugane, S., Visvanathan, K., Willett, W. C., Zeleniuch-Jacquotte, A. and Smith-Warner, S. A. 2020. Sustained weight loss and risk of breast cancer in women 50 years and older: A pooled analysis of prospective data. *Journal of the National Cancer Institute*, 112, 929-937.
- Tonetti, M., Sturla, L., Bisso, A., Benatti, U. and De Flora, A. 1996. Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 27274-27279.
- Tumban, E. 2019. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses*, 11(10), 922.
- Urbain, J.L. 1999. Oncogenes, cancer and imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 40, 498-504.
- Van den Brekel, M. W., Castelijns, J. A. and Snow, G. B. 1994. The role of modern imaging studies in staging and therapy of head and neck neoplasms. *Seminars in Oncology*, 21, 340-348.
- Vlacich, G., Spratt, D. E., Diaz, R., Phillips, J. G., Crass, J., Li, C. I., Shyr, Y. and Cmelak, A. J. 2014. Dose to the inferior pharyngeal constrictor predicts prolonged gastrostomy tube dependence with concurrent intensity-modulated radiation therapy and chemotherapy for locally-advanced head and neck cancer. *Radiotherapy and Oncology*, 110, 435-440.
- Vučičević Boras, V., Fučić, A., Baranović, S., Blivajs, I., Milenović, M., Bišof, V., Rakušić, Z., Ceppi, M. and Bruzzzone, M. 2019. Environmental and behavioural head and neck cancer risk factors. *Central European Journal of Public Health*, 27, 106-109.
- Wahby, S., Jarczyk, J., Fierek, A., Heinkele, J., Weis, C.A., Eckstein, M., Martini, T., Porubsky, S., Hafner, M. and Erben, P. 2021. POFUT1 mRNA expression as an independent prognostic parameter in muscle-invasive bladder cancer. *Translational Oncology*, 14, 100900.
- Wan, G., Tian, L., Yu, Y., Li, F., Wang, X., Li, C., Deng, S., Yu, X., Cai, X., Zuo, Z. and Cao, F. 2017. Overexpression of Pofut1 and activated Notch1 may be associated with poor prognosis in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491, 104-111.
- Wang, L., Zhang, J., Wang, B. and Liu, H. 2017. Association between diabetes mellitus and subsequent ovarian cancer in women: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Medicine (Baltimore)*, 96, e6396.

- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N. and Shin, Y. K. 2018. Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: an overview. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 51, 2647-2693.
- Wang, W., Okajima, T. and Takeuchi, H. 2022. Significant roles of Notch O-Glycosylation in cancer. *Molecules*, 27, 1783.
- Wang, Y., Lee, G. F., Kelley, R. F. and Spellman, M. W. 1996. Identification of a GDP-L-fucose:polypeptide fucosyltransferase and enzymatic addition of O-linked fucose to EGF domains. *Glycobiology*, 6, 837-842.
- Wang, Y., Shao, L., Shi, S., Harris, R. J., Spellman, M. W., Stanley, P. and Haltiwanger, R. S. 2001. Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 40338-40345.
- Wang, Y. and Spellman, M. W. 1998. Purification and characterization of a GDP-fucose:polypeptide fucosyltransferase from Chinese hamster ovary cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 8112-8118.
- Warnakulasuriya, S. 2009. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, 45, 309-316.
- Waziry, R., Jawad, M., Ballout, R. A., Al Akel, M. and Akl, E. A. 2017. The effects of waterpipe tobacco smoking on health outcomes: an updated systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, 46, 32-43.
- Wee, J. T., Ha, T. C., Loong, S. L. and Qian, C. N. 2010. Is nasopharyngeal cancer really a "Cantonese cancer"? *Chinese Journal of Cancer*, 29, 517-526.
- Werbowsky-Ogilvie, T. E., Bossé, M., Stewart, M., Schnerch, A., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Wynder, T., Smith, M. J., Dingwall, S., Carter, T., Williams, C., Harris, C., Dolling, J., Wynder, C., Boreham, D. and Bhatia, M. 2009. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nature Biotechnology*, 27, 91-97.
- Wendon, M. J., D'Souza, G., Rettig, E. M., Westra, W. H., van Zante, A., Wang, S. J., Ryan, W. R., Mydlarz, W. K., Ha, P. K., Miles, B. A., Koch, W., Gourin, C., Eisele, D. W. and Fakhry, C. 2018. Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer*, 124, 2993-2999.
- Woolgar, J. A. and Scott, J. 1995. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head & Neck*, 17, 463-472.
- Wu, P., Fang, X., Liu, Y., Tang, Y., Wang, W., Li, X. and Fan, Y. 2021. N6-methyladenosine modification of circCUX1 confers radioresistance of

- hypopharyngeal squamous cell carcinoma through caspase1 pathway. *Cell Death & Disease*, 12, 298.
- Wu, Y., Zhang, W., Wu, J., Ma, Y., Cui, P. and Li, C. 2021b. Middle of the breasts pigmentation in a pedigree with POFUT1-related Dowling-Degos disease, expansion of the phenotype. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 38, 526-527.
- Yan, J., Jiang, Y., Ye, M., Liu, W. and Feng, L. 2014. The clinical value of lymphatic vessel density, intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 expression in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Journal Cancer Research and Therapeutics*, 10(2), C125-C130.
- Yang, Y., Zhang, D., Qin, H., Liu, S. and Yan, Q. 2019. poFUT1 promotes endometrial decidualization by enhancing the O-fucosylation of Notch1. *EBioMedicine*, 44, 563-573.
- Yokota, S., Ogawara, K., Kimura, R., Shimizu, F., Baba, T., Minakawa, Y., Higo, M., Kasamatsu, A., Endo-Sakamoto, Y., Shiiba, M., Tanzawa, H. and Uzawa, K. 2013. Protein O-fucosyltransferase 1: a potential diagnostic marker and therapeutic target for human oral cancer. *International Journal of Oncology*, 43, 1864-1870.
- Yu, X. and Li, Z. 2016. MicroRNA expression and its implications for diagnosis and therapy of tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20, 10-16.
- Yurchenco, P. D. and Atkinson, P. H. 1977. Equilibration of fucosyl glycoprotein pools in HeLa cells. *Biochemistry*, 16, 944-953.
- Zanoni, D. K., Patel, S. G. and Shah, J. P. 2019. Changes in the 8th edition of the american joint committee on cancer (AJCC) staging of head and neck cancer: Rationale and Implications. *Current Oncology Reports*, 21, 52.
- Zhan, L., Chen, L. and Chen, Z. 2018. Knockdown of FUT3 disrupts the proliferation, migration, tumorigenesis and TGF- β induced EMT in pancreatic cancer cells. *Oncology Letters*, 16, 924-930.
- Zhang, D., Yang, Y., Liang, C., Liu, J., Wang, H., Liu, S. and Yan, Q. 2019a. poFUT1 promotes uterine angiogenesis and vascular remodeling via enhancing the O-fucosylation on uPA. *Cell Death & Disease*, 10, 775.
- Zhang, Z., Liu, R., Jin, R., Fan, Y., Li, T., Shuai, Y., Li, X., Wang, X. and Luo, J. 2019b. Integrating Clinical and Genetic Analysis of Perineural Invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 9, 434.
- Zhang, K. and Wang, H. 2016. Role of Fucosylation in Cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 19, 760-765.

- Zhang, M., Xian, H. C., Dai, L., Tang, Y. L. and Liang, X. H. 2021a. MicroRNAs: emerging driver of cancer perineural invasion. *Cell & Bioscience*, 11, 117.
- Zhang, Z., Wang, Y., Wang, C., Shuai, Y., Luo, J. and Liu, R. 2021b. BCAR3 promotes head and neck cancer growth and is associated with poor prognosis. *Cell Death Discovery*, 7, 316.
- Zheng, Q., Cui, X., Zhang, D., Yang, Y., Yan, X., Liu, M., Niang, B., Aziz, F., Liu, S., Yan, Q. and Liu, J. 2017. miR-200b inhibits proliferation and metastasis of breast cancer by targeting fucosyltransferase IV and α 1,3-fucosylated glycans. *Oncogenesis*, 6, e358.

