ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HIF1α ve HIF1ß'nın Hipoksik Koşulda Akciğer Kanserinde Kolektif İnvazyona Etkisinin İncelenmesi

Mehmet Yağız ÇAPANOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Ağustos, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

HIF1α ve HIF1ß'nın Hipoksik Koşulda Akciğer Kanserinde Kolektif İnvazyona Etkisinin İncelenmesi

---

Mehmet Yağız ÇAPANOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 28/08/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER (Danışman) ……

: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ ……

: Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN ……

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: TYL-2022-15537

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ V
SİMGELER VE KISALTMALAR VI
1. GİRİŞ 1
1.1. Araştırma Yeri ve Araştırmanın Amacı 2
1.2. Araştırmanın Hipotezi 2
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 3
2.1. Akciğer Kanseri 3
2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi 3
2.1.2. Akciğer Kanserinde Kullanılan Tanı ve Tedavi Yöntemleri 3
2.1.3. siRNA teknolojisi ve Akciğer Kanserinde Kullanım Alanları 5
2.2. Kolektif İnvazyon 6
2.2.1. EMT 8
2.3. Hipoksi 9
2.3.1. Hipoksik Faktörlere Genel Bakış 9
2.3.2. Hipoksi ve Kanser İlişkisi 11
3. MATERYAL VE METOT 15
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler 15
3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler 18
3.2.1. Hücre Kültürü ve Hücre Hattının Çoğaltılması 18
3.2.2. Hücre Hattına Transfeksiyon Uygulanması 18
3.2.3. Yara Kapanma Uygulaması 19
3.2.4. Transfekte Hücre Hattına Hipoksik Koşulun Sağlanması 20
3.2.5. RNA İzolasyonu ve RNA Miktarlarının Ölçülmesi 20
3.2.6. Protein İzolasyonu ve BCA yöntemi ile Total Protein Miktarlarının Ölçülmesi 21
3.2.7. cDNA eldesi ve Real Time PCR deneyleri 23
3.2.8. SDS-PAGE ile Proteinlerin Jelde Yürütülmesi 25
3.2.9. Western Blot 26
3.2.10. İstatistiksel Analizler 27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 29
4.1. Hücre Kültürü 29

4.1.1. Akciğer kanserinde hipoksik ve normoksik koşullar altında HIF1α'nın susturulmasının kolektif invazyona etkisi 29
4.1.2. Hipoksik ve Normoksik koşullarda HIF1α ve HIF1ß genlerinin susturulmasının Western-Blot yöntemi ile kontrol edilmesi 30
4.2. Hipoksik ve Normoksik koşullarda HIF1α ve HIF1ß transfeksiyonu sonrası GLUT-1, HIF1α ve VEGF mRNA ekpresyon sonuçları 33
4.3. Tartışma 33
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 37
5.1. Sonuçlar 37
5.2. Öneriler 37
KAYNAKLAR 39
ÖZGEÇMİŞ 43
EKLER 45
Ek-1: Yarık oluşturulan platelerin, farklı saatlerde aynı yerden görüntü alınması için işaretlenmesi ve yarığın gösterimi 46
Ek-2: Hücrelerin hipoksi odacığına alınması 46

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HIF1α ve HIF1ß'nın Hipoksik Koşulda Akciğer Kanserinde Kolektif İnvazyona Etkisinin İncelenmesi

Mehmet Yağız ÇAPANOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Hipoksik koşul, hücrelerin yetersiz oksijen miktarına mahrum bırakılmasıyla oluşan bir mikroçevre koşuludur. Kanserli hücrelerde de, tümörün giderek büyümesiyle besin ve oksijenden eksik kalan merkezdeki hücreler hipoksiye maruz kalmış olur. Hipoksi-indüklenmiş faktörler (HIF'ler), olarak bilinen HIF1α ve HIF1ß özellikle hipoksik koşullar altında gen ekspresyonu üzerinde bir dizi düzenlemeye giderek tümör biyolojisini doğrudan etkilemektedir. Hipoksik ortamla birlikte, bu koşulun tümörler üzerinde progresyon ve metastazda kritik bir önem taşıdığı bilinmektedir. Primer tümör hücrelerinin hem yakın çevreye hem de uzak organlara yayılmasıyla ilgili süreç karmaşıktır. Bu alanda yapılan araştırmalar, kanser yayılımında hücrelerin epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sürecine girerek tek başına yayılabileceğini veya topluca bir grup halinde yayılabileceğini göstermiştir. Diğer bir yandan bu süreç hipoksi altında, toplu olarak göç eden hücreler, HIF-1a'ya bağımlı bir şekilde kolektiften amoeboid geçişe (CAT) de uğrayabilir. Bu bilgiler ışığında küçük hücre dışı A549 hücrelerinde siRNA transfekte edilerek HIF1α ve HIF1ß'nın hipoksik koşullardaki akciğer kanseri hücrelerinin bazı gen ve protein ekspresyonları ve ayrıca hücre göçüne olan etkisi incelenmiştir.

Normokside kolektif invazyonun, hücre-hücre bağlarının zayıfladığı hipoksiye oranla daha fazla olduğu gösterilmiş olup, 24. saatte hipokside HIF1α susturulmuş koşuldaki invazyonun, yine hipokside kontrole oranla daha fazla toplu hücre göçü olduğu gösterilmiştir. HIF1ß susturulduğunda HER2 ekspresyonu normoksik koşulda belirgin olarak azalırken, hipoksik koşulda yüksek artış göstermiştir. Hipoksik koşulda Glut-1 mRNA ifadesindeki artışla birlikte anijyiogenezi sağlayan VEGF ifadesinde de artış gözlemlenirken hipokside HIF1α susturulmuş koşulda hipoksi kontrole oranla azalma gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Hipoksi, Kolektif İnvazyon, HIF, EMG.

CUKUROVA UNIVERSITY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MSc THESIS

Investigation of the Effect of HIF1α and HIF1ß on Collective Invasion in Lung Cancer in Hypoxic Condition

Mehmet Yağız ÇAPANOĞLU

Advisor: Assoc. Prof. Yasemin SAYGIDEĞER

Department of Biotechnology

ABSTRACT

Hypoxic condition is a microenvironmental condition that occurs when cells are exposed to insufficient amounts of oxygen. In cancerous cells, as the tumor grows, the cells in the center, which are not exposed to nutrients and oxygen, are exposed to hypoxia. HIF1α and HIF1ß, known as hypoxia-induced factors (HIFs), directly affect tumor biology by making a series of regulations on gene expression, especially under hypoxic conditions. Together with the hypoxic environment, this condition is known to be of critical importance in the progression and metastasis of tumors. The process involved in the spread of primary tumor cells to both the immediate environment and distant organs is complex. Research in this field has shown that in cancer spread, cells can spread alone or collectively as a group by inducing the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. On the other hand, under hypoxia, collectively migrating cells may also undergo collective to amoeboid transition (CAT) in a HIF-1α-dependent manner. In the light of this information, the effects of HIF1α and HIF1ß on some gene and protein expressions and cell migration of lung cancer cells under hypoxic conditions were examined by transfecting siRNA in extracellular A549 cells.

It has been shown that collective invasion is greater in normoxia than in hypoxia, where cell-cell bonds are weakened, and at 24 hours in hypoxia, invasion in the HIF1α silenced condition has been shown to be more collective cell migration than in the control. When HIF1ß was silenced, HER2 expression decreased significantly in normoxic conditions and increased significantly in hypoxic conditions. In hypoxic conditions, along with the increase in Glut-1 mRNA expression, an increase in VEGF expression, which provides angiogenesis, was observed, while a decrease was observed in the HIF1α silenced condition in hypoxia compared to the hypoxia control.

Keywords: Cancer, Hypoxia, Collective İnvasion, HIF, EMT.

TEŞEKKÜR

Akademik ve akademik dışı hayatta, baştan sona her zaman yanımda olan şimdiye dek pek çok şey öğrendiğim ve öğrenmeye devam edeceğim Sayın Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER'e,

Çalışmalarım zor yola girdiğinde bana her zaman mutlaka bir çıkış yolu sunan, laboratuvar içi ve dışı hayatta, ufak da olsa birkaç cümle ile psikolojimi toparlayan Sayın Dr. Burcu SAYGIDEĞER DEMİR'e,

Değerli katkılarından dolayı Tez Jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN'e,

Kafa kafaya verdiğimizde laboratuvarın altını üstüne getirdiğimiz, her konuda akıl hocam olan 'lab arkadaşım' Aycan SEZAN'a,

Herhangi bir cihaz ya da ekipman bozulduğunda, sizi paniğe kaptırmayan, hadi tamir edelim, çözüm bulalım diye birbirimizi yediğimiz Lütfü Serkan SEVDİ'ye,

Real-Time PCR ve Western Blot deneylerimde yardımlarını esirgemeyen, saat ve zaman farketmeksizin sorularıma ışık tutan Hamide DOĞAN ve Taoufik ALLABABIDI'ye,

Laboratuvarda her şeyimizi paylaştığımız, tüm iyi ya da kötü zamanlarda yanımda hissettiğim Ezgi DERİNÖZ , Hamide AKSEL, Merve AKSOYLU, Mehmet ÖZERTEN , Meryem KÖSE, Burak BÜYÜKYÜCE, Eylem NAS, Özlem ERGÜN ve diğer tüm Göğüs Hastalıkları Moleküler Araştırma Laboratuvarı (SAYGIDEĞER LAB) üyelerine,

Bütün düzenleme ve toparlamada destek olan, bütün laboratuvar işlerine keskin bakışlarıyla koşturan Emre YELEKÇİ'ye

Kısacık bir süredir her şeyime destek olup yıllardır yanımdaymışçasına inandığım ve güvendiğim Deniz HERGÜNER'e,

Kimi zaman sarf malzeme kimi zaman fikir alışverişinde bulunduğumuz, Özbolat laboratuvar üyelerine,

Her gün güler yüzle karşılaştığımız bütün Biyoteknoloji ve Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Ve son olarak her zaman arkamda duran, hiçbir şeyin eksikliğini hissettirmeyen arada didişip durduğum ailem, canım annem Aynur ÇAPANOĞLU'na

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım..

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Amerika'da cinsiyete göre tahmini yeni kanser vakaları ve ölüm sayıları (Siegel et al., 2024) 3
Çizelge 2.2. Metastatik Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri için Sistematik Terapi (Duma et al., 2019) 4
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar, cihazların modelleri ve cihazların kullanım amaçları. 15
Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler, katalog bilgileri ve kullanım amaçları 16
Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan katı-sıvı kimyasallar ve kullanım amaçları 17
Çizelge 3.4. cDNA eldesi için gerekli sarflar ve miktarları 23
Çizelge 3.5. qPCR'da kullanılan primerler ve sekans bilgileri 23
Çizelge 3.6. Reaksiyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar 24
Çizelge 3.7. PCR çalışma programı 25
Çizelge 3.8. Alt Jel Hazırlamak İçin Gerekli Kimyasallar 25
Çizelge 3.9. Üst Jel Hazırlamak İçin Gerekli Kimyasallar 26
Çizelge 3.10. Western Blot deneylerinde kullanılan primer antikorlar 26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Küçük RNA tabanlı terapötiklerin genel etki mekanizmasının şeması..... 6
Şekil 2.2. Kısmi ve tam EMT'nin kanser hücre göçü ve HIF-1α ile kolektiften amoeboid geçişin (CAT) gösterimi (Saxena et al., 2020)..... 9
Şekil 2.3. HIF-1α ve HIF-2α domainlerinin şematize gösterimi (Wu et al., 2022)..... 10
Şekil 2.4. Tümör mikroçevresi ve kanser hücresinin PD-L1 ile immün sistemden kaçışı (Wu et al., 2022)..... 11
Şekil 3.1. Lipofektamin ile A549 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen transfeksiyonun protokolü..... 18
Şekil 3.2. A549 hücre hattında scrRNA, siHIF1α ve siHIF1ß(ARNT) tansfeksiyonun gösterimi ve yara kapanma deneyi..... 19
Şekil 3.3. Transfekte edilmiş hücre hatlarının hipoksiye alınması..... 20
Şekil 3.4. Sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan standartların BCA ölçüm sonucunda elde edilen eğri grafiği..... 23
Şekil 3.5. Normokside Kontrol (nc), HIF1α susturulmuş (nα), HIF1ß susturulmuş (nβ), Hipokside Kontrol (hc) HIF1α susturulmuş (nα), HIF1ß susturulmuş (nβ) koşulların plate üzerinde dağılımı..... 24
Şekil 4.1. Normoksik ve hipoksik koşul altında gen hedeflemeyen kontrol olan scramble (Scr) RNA ile transfeksiyonu yapılmış (Normoksi ScrRNA, Hipoksi ScrRNA) ve hipoksik koşul altında geçici olarak siHIF1α ile susturulmuş (Hipoksi HIF1α-) A549 hücrelerinin yara kapanma deneylerinde zamana bağlı hücrelerin açıklığına göçü, sınır ölçümü ile ImageJ programı üzerinde kolektif invazyon çizgisi gösterimi. 29
Şekil 4.2. ImageJ programının ölçüm sonuçlarına göre hipoksik koşullar altında kolektif invazyon düzeyi. 30
Şekil 4.3. İzole edilen proteinlerin BCA ile kolorimetrik ölçümü sonrası plateteki görüntüsü 30
Şekil 4.4. Western Blot sonuçlarına A549 hücre hattında koşullara göre HER2 (185kDa), Ezrin (80kDa), GLUT-1 (54kDa) ve ß-Aktin (43kDa) in bant görüntüleri gösterilmiştir..... 31
Şekil 4.5. Normoksik koşulda scrRNA'ya göre normalize edilmiş Ezrin ve HER2 protein ekspresyonu seviyeleri..... 31
Şekil 4.6. Hipoksik koşulda scrRNA'ya göre normalize edilmiş Ezrin ve HER2 protein ekspresyonu seviyeleri..... 32
Şekil 4.7. A549 hücrelerinde hipoksik ve normoksik koşullar altında HIF1α ve HIF1ß susturulmasının diğer gen ekspresyonlarına etkisi..... 33

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinaz
APS	: Amonyum Persülfat
BCA	: Bikinkoninik Asit
BRAF	: v-Raf Murin Sarkomu Viral Onkojen Homolog B
BSA	: Bovine Serum Albumin
CAT	: Kolektif-amoeboid Geçiş
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECAD	: E-Kadherin
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	: Epitelyal-mezenkimal Geçiş
FBS	: Fetal Bovine Serum
FN1	: Fibronektin 1
GLUT	: Glukoz Taşıyıcı Tip
HCl	: Hidrojen klorür
HIF	: Hipoksi-indüklenmiş faktörler
HIF1-α	: Hipoksi-indüklenmiş faktör 1 alpha
HIF1-β /ARNT	: Hipoksi-indüklenmiş faktör 1
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KRAS	: Kirsten sıçan sarkomu virüsü
MMP1	: Matrix Metalloproteinaz 1
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NCAD	: N-Kaderin
NTRK	: Nörotrofik Tirozin Kinaz Reseptörü
NLS	: nuclear localization signal,
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PD-L1	: Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı 1
pVHL	: von Hippel-Lindau protein
RNAi	: RNA Interferance
ROS1	: C-ros Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinaz
SDS	: Sodium Dodecyl Sulphate
SNAI1	: Snail Family Transcriptional Repressor 1

TEMED : Tetramethylethylenediamine

TKI : Tirozin Kinaz Inhibitörü

VIM : Vimentin

ZEB1 : Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

ZEB2 : Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2

ZO-1 : Zonula Occludens 1

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, dünya çapında bildirilen kanserle ilişkili ölümlerin başında gelir. Küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) akciğer kanser vakalarının %80-85'ini oluşturur. Bu hastaların %80'inin hastalık tanısı, erken tanıyı sağlayacak biyobelirteç eksikliği sebebiyle ileri evrede teşhisleri konulmuştur (Bray et al., 2018; Ramalingam et al., 2011). Erken teşhis ile 1. evredeki hastaların 5 yıllık sağkalım oranı %70ten fazla değildir, bu da hastaların yaklaşık %30'unun uzaktaki organlarda metastazın gerçekleştiği anlamına gelir (Feld et al., 1984; Harpole et al., 1995).

Metastatik kaskad karmaşık ve agresif yayılmayı sağladığından kansere bağlı ölümlerin azaltılması umuduyla yoğun araştırma altında olan ölümcül bir süreçtir. Karsinom hücreleri birincil tümörden yayılabilmesi için öncelikle göç yapmaya ve yayılmaya uygun halde farklılaşması gerekir. Tümör içinde meydana gelen çevresel faktörler farklılaşmayı hücre içi ve hücre dışı sinyaller aracılığıyla başlatır. Sonrasında bu hücrelerden bazıları damar yoluyla metastaz yapmayı başarır. Yayılmayı başarmış bu tümör hücrelerinin yeni mikroçevresine uyum sağlar ve metastazı destekleyici bir niş oluştururlar. Makro metastaz oluşturmak için göç modundan proliferasyon moduna geçerler. Sabit tümör hücrelerinin bu şekilde göç ve istila etmesinde kilit rol oynayan epidermal mezenkimal geçiş (EMT) programı, son 15 yılda metastaz araştırmalarında ön plana çıkmıştır. Kolektif hücrelerin ilk kez raporlanmasında, kanser hastasından alınan kan örneğinin hem tekli hem de toplu tümör hücreleri içerdiği belirlendi. Yapılan en son çalışmalarda, toplu hücre göçünün tek hücre göçünden daha etkili olduğu ve metastazı güçlendirdiği öne sürüldü (Quan et al., 2020).

Oksijenin ökaryotik canlıların hücresel metabolizmasında çok önemli bir yeri vardır. Canlı hücre ve dokulara taşınan oksijen oranının yetersizliğinde, hücre içerisinde homeostazi bozulduğundan hücrelerde strese neden olur. Dokudaki hücrelerin gerek damarlanmış yapıdan uzakta kalması gerek ortamdaki oksijenin kritik seviyelere düşmesi sonucu, bu hayati bileşikten yoksun kalması hücreyi hipoksik koşullarda hayatta kalmaya zorlar. Hipoksik koşuldaki hücreler anjiyogenez, glukoz metabolizması, demir metabolizması gibi hücre hayatta kalma ve proliferasyonu tetikleyen bir dizi genin aktifleşmesine ihtiyaç duyarlar. Tam da burada hipoksik koşula duyarlı bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi indüklenebilir faktörleri (HIF), bir dizi kaskad oluşturarak anjiyogenez ve aynı zamanda metastazın tetiklenmesine neden olmaktadır. HIF proteinleri birçok insan malign kanserinde (akciğer, yumurtalık, meme, kolon vb.) aşırı ifade olduğu immünokimyasal analizlerle gösterilmiştir (Semenza, 2001). HIF proteininin HIF1-α, HIF2-α ve HIF3-α olmak üzere 3 farklı tipi vardır. α ve β ünitelerinden oluşan HIF proteininin α ünitesi değişkenlik gösterebilir, ayrıca oksijen duyarlı bir yapısı vardır (Kierans and Taylor, 2021). HIF1-α hipoksi ile indüklenen genleri aktive eden ilk gendir. HIF2-α yapı bakımından HIF1-α ya benzese de ifadeleri ve fonksiyonları değişiklik göstermektedir. HIF3-α; kendi başına ya da HIF1-α ile bazı genleri aktive

edebildiğinden glikoz ya da apoptoz metabolizması üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir (Semenza, 2001).

Bu araştırmada; normoksik ve hipoksik koşullarda A549 hücre hattı üzerinde HIF1α ve HIF1ß'nın ekspresyonunlarını baskılayarak kolektif invazyona etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

1.1. Araştırma Yeri ve Araştırmanın Amacı

Bu araştırma Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Merkezi Saygıdeğer Laboratuvarında gerçekleşmiştir.

Araştırmanın amacı Hipoksi ile İndüklenebilir Faktörler'in toplu hücre göçüne etkisini araştırmaktır.

1.2. Araştırmanın Hipotezi

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde hipoksik yolak hücre-hücre etkileşimini zayıflattığından eğer hipoksik koşulda Hipoksi ile İndüklenebilir Faktörler (HIFs), RNAi yöntemi ile baskılanırsa toplu hücre göçünü azaltabilir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Akciğer Kanseri

2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri iki cinsiyeti de etkileyen, dünya çapında kanserle ilişkili ölümlerin başında gelmektedir (Jha et al., 2024). 2024'te yaklaşık 234.580 yeni akciğer kanseri vakası raporlanırken bunların 125.070 (65.790'sı erkek ve 59.280'sı kadın) bu hastalık yüzünden ölecektir. Bu hastaların 5 yıllık öngörülen sağ kalımları yaklaşık %25.4'tür (Jha et al., 2024).

Çizelge 2.1. Amerika'da cinsiyete göre tahmini yeni kanser vakaları ve ölüm sayıları (Siegel et al., 2024)

Kanser Türü	Tahmini yeni vaka sayısı		Tahmini ölüm sayısı	
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
Ağız Boşluğu & Yutak	41.510	16.940	8700	3530
Sindirim Sistemi	197.390	156.430	100.310	74.010
Akciğer ve Bronşlar	116.310	118.270	65.790	59.280
Kemik ve Eklemler	2270	1700	1100	950
Yumuşak Doku	7700	5890	2760	2440
Cilt	64.220	44.050	8700	4420
Meme	2790	310720	530	42250
Genital Bölge	310.870	116.930	36.250	33.850
Üriner sistem	118.330	51.030	22.360	9990
Endokrin	14.480	33.530	1580	1720
Lenfoma	49.220	30.970	12.330	8720
Lösemi	36.450	26.320	13.640	10.030

2.1.2. Akciğer Kanserinde Kullanılan Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Kanser türlerinde sağ kalım oranı genellikle kanserin ilerlemesiyle doğru orantılıdır ve bu sebeple erken teşhis hayati önem taşımaktadır. Kanserin mevcut evresine göre tedavi yöntemleri de kararlaştırılır. Ne yazık ki akciğer kanserinde de erken tanı konulması hala büyük bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Genellikle KHDAK ileri evreye gelene kadar saptanamamaktadır. Öksürük en sık görülen semptom olmakla birlikte, bunları göğüs ağrısı, nefes darlığı ve hemoptiz takip etmektedir. Erken teşhis için biyobelirteç kullanımı, düzenli tarama yapılması oldukça önem taşır. Özellikle akciğer kanserinde risk gruplarının taranması, erken teşhis ile tedavi edilebilir evrede saptanmasıyla sağ kalım oranını artırabilir. Düşük doz sarmal bilgisayarlı tomografi ve spiral bilgisayarlı tomografi tarama çeşileri arasında yaygın olanlardır.

Tanıda doğrulama için biyopsiye ihtiyaç vardır. Akciğer kanseri evrelemesinde tümör boyutu, lenf nodu ve metastaz durumlarının karşılaştırılması uygun tedavi seçeneklerine öncülük eder. Danimarka'da yapılan bir çalışmada BT ile PET taramanın birlikte kullanıldığı evreleme ile geleneksel invaziv evreleme (lenf nodu biyopsisi, mediastinoskopi ve ekoendoskopi) tekniği kıyaslanmıştır. (Duma et al., 2019)

Lobektomi, tek bir lobun cerrahi rezeksiyonu, genellikle erken evre NSCLC için en uygun prosedür olarak kabul edilir. Bununla birlikte, birkaç randomize olmayan çalışma, çapı 2 cm veya daha az olan periferik N0 akciğer kanserli hastalarda, özellikle histolojik incelemede bronşiyoloalveoler karsinom olanlarda, segmentektomi sonrası olumlu uzun dönem sağ kalım oranları bildirmiştir (Kodama et al., 2016). Diğer bir yandan neoadjuvan kemoterapi mikro metastazları inhibe etmesi, tümör evresini azaltması gibi potansiyel etkileri içinde barındırır. Büyük bir Fransız çalışması mitomisin, ifosfamid ve sisplatin ile uygulanan neoadjuvan kemoterapi ve yalnızca cerrahi müdahale arasında bir fark göstermemiştir. N0 ve N1 evreleri için sağkalım avantajı sağlarken N2 evresi için olmadığını iddia etmiştir (Depierre et al., 2002). Adjuvan kemoterapi ise özellikle cerrahi operasyonun zayıf sonlanmasının ardından uzak metastaza karşı etki etmek için kullanılır. Erken evre NSCLC tedavisinde moleküler hedefli ajanların ve immünoterapinin kullanımına olan ilgi giderek artmaktadır.

Çizelge 2.2. Metastatik Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri için Sistematik Terapi (Duma et al., 2019)

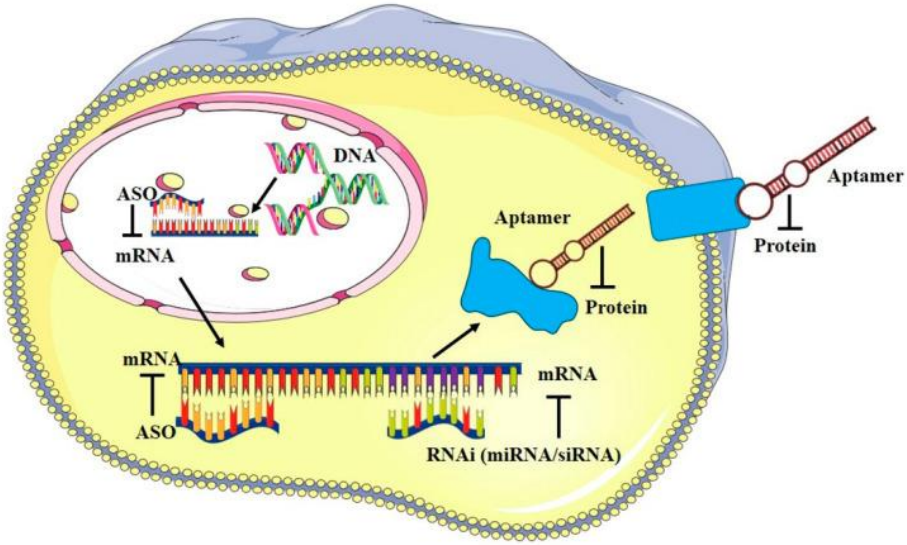
Terapi Sırası	Skuamöz Olmayan, Onkojenik Mutasyonlu	Skuamöz Olmayan, Onkojenik Mutasyon Yok	Skuamöz ve Skuamöz Olmayan, PD-L1>%50	Skuamöz,PD-L1<%50
İlk tedavi	EGFR+: osimertinib ALK/ROS1+: alectinib, crizotinib BRAF+: debrafenib/trametinib NTRK+: larotrectinib RET, MET, HER-2: specific TKI	Platinum/pemetrexed ile pembrolizumab ya da platinum doublet (carboplatin + taxane), atezolizumab ile bevacizumab	Pembrolizumab	Platinum ile paclitaxel veya nab-paclitaxel ile pembrolizumab

Sürdürme	TKI'ye devam	Pembrolizumab ile pemetrexed, atezolizumab ile bevacizumab, erlotinib ya da hiç	Varsa klinik deneme, aksi halde progresyona veya kabul edilemez toksisiteye kadar pembrolizumab'a devam edin.	Pembrolizumab
İkinci ve üçüncü tedavi	Birinci basamakta kullanılmazsa ikinci veya üçüncü nesil TKI (alectinib, osimertinib) Lorlatinib (ALK+) ardından kemoterapi	Klinik çalışma mümkünse, docetaxel ± ramucirumab. Tek ajan: gemcitabine veya necitumumab	Klinik çalışma mümkünse, docetaxel ± ramucirumab. Tek ajan: gemcitabine, erlotinib veya necitumumab	Klinik çalışma mümkünse, docetaxel ± ramucirumab. Tek ajan: gemcitabine, erlotinib veya necitumumab

2.1.3. siRNA teknolojisi ve Akciğer Kanserinde Kullanım Alanları

RNA Interferance (siRNA) teknolojisi, tüm akciğer kanseri tiplerini ve evrelerini tedavi etmek için araştırmacılar tarafından yeni nesil çözüm olarak düşünülen güçlü bir gen susturma aracıdır. RNA teknolojisinin gerçekleşmesi ise, haberci RNA'nın (mRNA) parçalanmasında önemli bir rol oynayan birçok küçük RNA türüne bağlıdır. Gelişmekte olan bu teknolojinin son yıllarda kanser tedavisinde önemli bir rol oynaması beklenmektedir. Ayrıca gen terapisi alanında da devrim niteliğinde bir gelişme olarak kabul edilmiştir. Özellikle akciğer kanserinin halen dünya çapında en ölümcül kanser türlerinden biri olması sebebiyle siRNA teknolojisi dahil bu tip teknolojilerin potansiyel kullanımına dair araştırmalar devam etmektedir (Guo et al., 2013; Itani & Al Faraj, 2019).

Bu bağlamda güncel şekilde, Antisense Oligonükleotidler (ASO'lar), mikroRNA'lar (miRNA'lar), kısa müdahaleci RNA'lar (siRNA'lar) ve aptamerler dahil olmak üzere küçük RNA bazlı terapötikler kanser tedavisinde tercih edilmektedirler (şekil1) . ASO'lar, miRNA'lar ve siRNA'lar, spesifik hedef mRNA'ları hedefleme ve inhibe etme fonksiyonu ile hareket etmektedirler (Ciccone et al., 2023)



Şekil 2.1. Küçük RNA tabanlı terapötiklerin genel etki mekanizmasının şeması

siRNA, gen susturmayı hedeflemekle görevli kısa çift sarmallı RNA molekülleri olarak bilinmektedir. siRNA'nın hücreye alımından sonra RNA interferans (RNAi) adı verilen bir süreç başlar. Bu süreçte, sitozole içselleştirildikten sonra siRNA, RNA kaynaklı susturma kompleksine dönüşür hücre içinde hedeflenen mRNA'ya bağlanarak yıkımını sağlamaktadır. Böylelikle ilgili proteinin sentezlenmesi inhibe edilmektedir. siRNA teknolojisinde, herhangi bir hastalığa neden olan genin ifadesi engellenerek güçlü bir tedavi aracı olarak tercih edilmektedir (Ma et al., 2022).

siRNA teknolojisinin kanseri tedavi etmek için büyük ve umut verici potansiyeline rağmen, çıplak siRNA yönetimi hala klinik kullanımının önünde duran birçok engelle karşı karşıya kalmaktadır. Hızlı enzimatik bozunma, kısa yarı ömür, negatif yükleri nedeniyle hücre membranlarına zayıf geçirgenlik, instabilite vb. gibi faktörlerin tümü, yerel olarak uygulanan siRNA ajanlarının kullanımını sınırlamaktadır (Guo et al., 2013). Bu nedenle, siRNA'nın spesifik olarak tasarlanmış, biyouyumlu taşıyıcılara konjugasyonu ve çoğu engelin üstesinden gelmek için kimyasal modifikasyonları, tedavinin başarı yüzdesi için önemli bir noktadır (Guo et al., 2013; Itani & Al Faraj, 2019). siRNA teknolojisi ve akciğer kanserinde kullanım alanları yaygınlaşmaya başlamıştır. Bunlar arasında ALK, EGFR ve KRAS gibi onkogenlerin hedeflenmesiyle tümör büyümesini engellemek, karşılaşılan en büyük problemlerden biri olan kemoterapi benzeri tedavilere karşı gelişen direnç mekanizmalarını hedef alarak tedaviye daha duyarlı kanser hücrelerine dönüştürmek, tümörün yeniden oluşumunda rol oynayan kanser kök hücrelerini hedeflemek ve kemoterapi, radyoterapi ya da immünoterapi gibi tedavilerle kombine edilerek tedavi etkinliğinin artırılması vardır.

2.2. Kolektif İnvazyon

Kanserden kaynaklanan ölümlerin, kanserin tanı ve tedavisinde karşılaşılan zorlukların en büyük sebeplerinden biri kuşkusuz kanserli hücrelerin yayılma yeteneği kazanmasıdır. Tümör

mikroçevresinde meydana gelen değişiklikler, gen ekspresyonu seviyelerinde değişiklik göstererek tümör dokusunu farklılaştırmaya ve dolayısıyla göç etmeye zorlayabilir. Bu durum metastaz olarak adlandırılır ve kanserli hücreler bir takım metastatik kaskad sonucunda primer tümör dokusundan vücudun yakın ya da daha uzak bölgelerine yayılırlar. Metastatik kaskad beş farklı aşamada incelenebilir bunlar; invazyon, intravazasyon, dolaşım, ektravazasyon ve kolonizasyondur (Maghfoor and Perry, 2005). Kanserli hücreler primer tümör ve çevresinde artış gösterir. Burada istilacı olarak bulunan kanser hücreleri kan damarlarına ya da lenfatik damarlara intravaze olarak dolaşım sistemi veya lenf sistemini kullanarak vücudun diğer bölümlerine yayılır. Bu yayılma sırasında vücudun herhangi bir dokusuna girer ve burada sekonder tümörü oluşturmak üzere çoğalmaya başlar. Burası primer tümörün metastaz yaptığı bölge olarak yeni bir tümör mikroçevresi oluşturur ve bu durum kanserin hem tanısını hem de tedavisini zor kılan sorunların başında gelir.

Amipsi hareket fokal adezyon ve hücre yapışkanlığı dahil olmadan hücrelerin yuvarlaklaşmış, elipsoid cisimcikleriyle karakterize edilmiştir. Buna blebby amipsi migrasyon denir ve örneğin bu embriyonik hücreler, ECM aracılı lökosit migrasyonu ya da belirli kanser türlerinde kullanılıyor. Amipsi migrasyonun ikinci formu, aktin zengin filopodia büyümesiyle ve hareketli nötrofil ve dendritik hücrelerin ya da tümör hücrelerinin zayıf substrat interaksiyonuyla karakterizedir (Kramer et al., 2013).

Mezenkimal migrasyon; ekstraselüler matrikse, sitoskeletal kasılmaya ve uzamış iğ benzeri hücreciklere güçlü fokal bağlantılar içermektedir. Epitelyal mezenkimal geçiş (EMG) geçiren fibroblastlar, sarkoma hücreleri ve oldukça dediferansiye tümör hücreleri; bu tip hareket biçimini kullanmaktadır. EMG, yalnızca birçok karsinoma hücrelerinde göç edici ve invaziv fenotipi kazandırmada anahtar rol oynadığı önerilmiyor ayrıca kanser kök hücre oranını arttırdığı tartışılıyor (Kramer et al., 2013). Öyleyse epitelyal hücreler EMG aracılığıyla kanser kök hücrelerine dediferansiye olabilirler. Bu, artan yapışan ve ifadesel değişimeler gösteren kanser tedevisinde kanser kök hücrelerini ve kanser olmayan kök hücreleri önemli sonuçlar sebep olabilir (Kramer et al., 2013).

Kollektif invazyon, mezenkimal ve ameboid invazyonu içeren tek hücre invazyonundan farklıdır. Mezenkimal invazyonda EMD gözlenen kanser hücreleri, mezenkimal benzeri fenotip, devamlı yüksek seviyede hücre-matriks invazyonu ve çevresini saran dokuda proteoliz özeliiği ile çevreyi saran dokuya kendi kortikal aktomiyosin kasılmalarıyla invazyon özelliği elde etmektedir (Loschke et al., 2016; Weber et al., 2012). Kolektif invazyon kanserin yayılmasında büyük rol oynarken diğer bir yandan yetişkinlerde dokunun yenilenmesi, yaraların iyileşmesi ve morfogenez ile doğrudan ilişkilidir (Mayor and Etienne-Manneville, 2016).

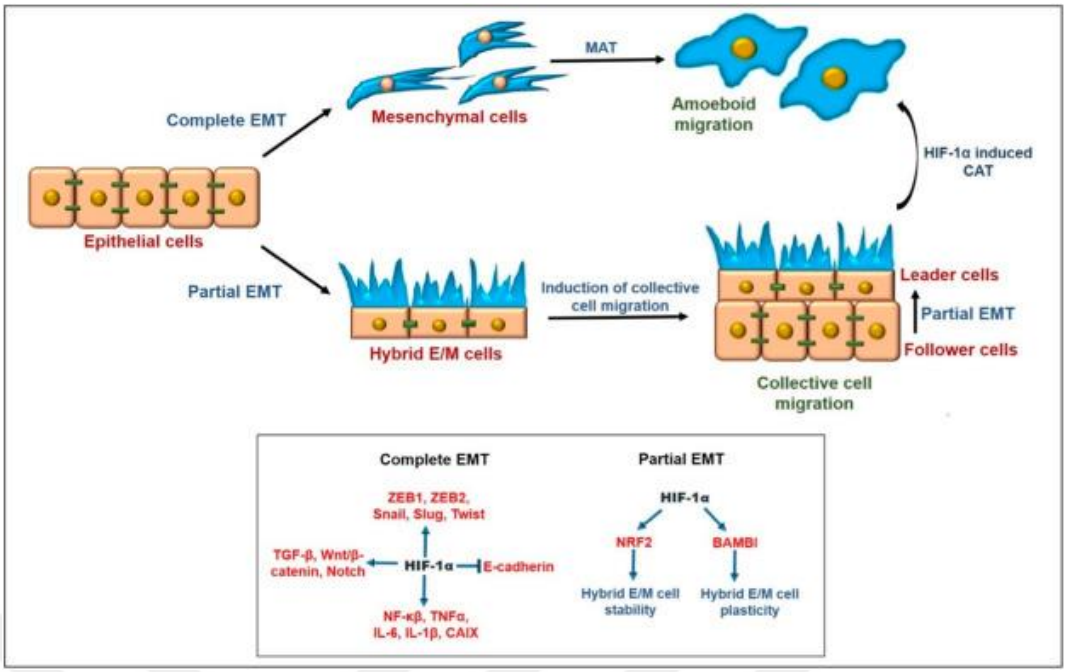
Yakın zamandaki araştırmalara göre kollektif invazyon, hücre tipine özgü mekanizmaya ve mikroçevre indüksiyonuna bağlı bir invazyon modelidir (Seltmann et al., 2013). Karsinogenez sürecinde, progresyonunda, metastazda; meme kanseri, akciğer kanseri, rabdomiyosarkoma ve oral

skuamoz hücre karsinomları gibi çeşitli karsinomlarda önemli bir rol oynamaktadır (Cheung et al., 2013; Sanz-Moreno and Marshall, 2010).

Kolektif invazyonda integrinler, kaderinler ve fibronektinler aracılığıyla bir arada kalıp birlikte hareket edebilirler. Matrix metalloproteinazlar ise ekstraselüler matriksin yıkımından sorumlu enzimeler olduklarından kolektif invaze olan hücrelerin dokuları geçmesinde önemli rol oynarlar. CDC42 ise hücre polarizasyonundan sorumlu olarak, hücre kasılma ve hareketinden sorumlu ROCK enzimi ile hücrelerin birlikteliğini ve hareket koordinasyonunun sağlanmasıyla kolektif invazyonu yönlendirir. EGF hücrelerde büyüme, farklılaşma ve proliferasyonun düzenlenmesinden sorumlu bir büyüme faktörü olmakla birlikte hücre migrasyonunda da büyük bir rol oynar. Sitokinler ise sinyal iletiminde rol oynadıkları için hücreler arası iletişimi sağlayarak hem kanserli hücrelerin birbirlerine tutunmasını sağlar hem de tümör mikroçevresinin bağışıklık sisteminden kurtulmasında kritik etkiye sahiptirler.

2.2.1. EMT

Epitelyal mezenkimal dönüşümde (EMD) epitelyal hücrenin kendi hücre-hücre adezyon özelliklerini kaybedip mezenkimal hale geçmesi uzun süredir tümör metastazında ve invazyonunda bilinen bir durumdur. (Kalluri and Weinberg, 2009; Yang et al., 2020; Ye et al., 2015). Günümüze kadar, araştırmacılar tarafından EMT'nin terminal E ve M durumlarına sahip olduğunu düşünülüyordu aynı zamanda daha önce yapılan çalışmalar EMT'yi yönlendiren altta yatan mekanizmalara odaklanıyordu. (Tian et al., 2013; Zhang et al., 2014). Ortaya çıkan kanıtlar gösteriyor ki epitelyal fenotipin sürdürülüp bununla beraber mezenkimal fenotipin kazanıldığı E ve M halleri arasında bir geçiş dönemi vardır. Şu anda kısmi EMD fenotipi epitelyal (ECAD, ZO-1) and mezenkimal markerların (VIM, SNAI1, β-catenin, ZEB1, FN1, MMP1, ZEB2, NCAD) beraber ekspresyonuyla karakterizedir (Aggarwal et al., 2021). Kısmi EMD fenotipi tömör heterojenitisine, hücre döngüsü düzenlenmesine, kollektif migrasyona, metastaza ve tedaviye dirence katkıda bulunur (Aggarwal et al., 2021).



Şekil 2.2. Kısmi ve tam EMT'nin kanser hücre göçü ve HIF-1α ile kolektiften amoeboid geçişin (CAT) gösterimi (Saxena et al., 2020)

Tam EMT, epitelyal kanser hücrelerinin mezenkimal göç gösterebilen veya mezenkimalden amoeboid geçişe (MAT) maruz kalarak amoeboid göçe yol açabilen mezenkimal hücrelere geçişine yol açar. Öte yandan, kısmi EMT, istilacı ön ve takipçi hücrelerde (epitelyalde) lider hücrelerin (hibrit E/M durumunda) varlığı ile karakterize edilen kolektif hücre göçüne yol açan hücre-hücre etkileşimi hüçlü epitelyal ve hareketlilik kabiliyeti yüksek olan mezenkimal özellikleri korur. Tümör kitlesinin büyük kısmını oluşturur. Ayrıca bu takipçi hücreler, besin eksikliği çekmesi gibi durumlarda muhtemelen kısmi EMT yoluyla lider hücrelere dönüşebilir. Hipoksi altında, toplu olarak göç eden hücreler, HIF-1a'ya bağımlı bir şekilde kolektiften amoeboid geçişe (CAT) de uğrayabilir (Saxena et al., 2020). (Şekil 2.2.)

2.3. Hipoksi

2.3.1. Hipoksik Faktörlere Genel Bakış

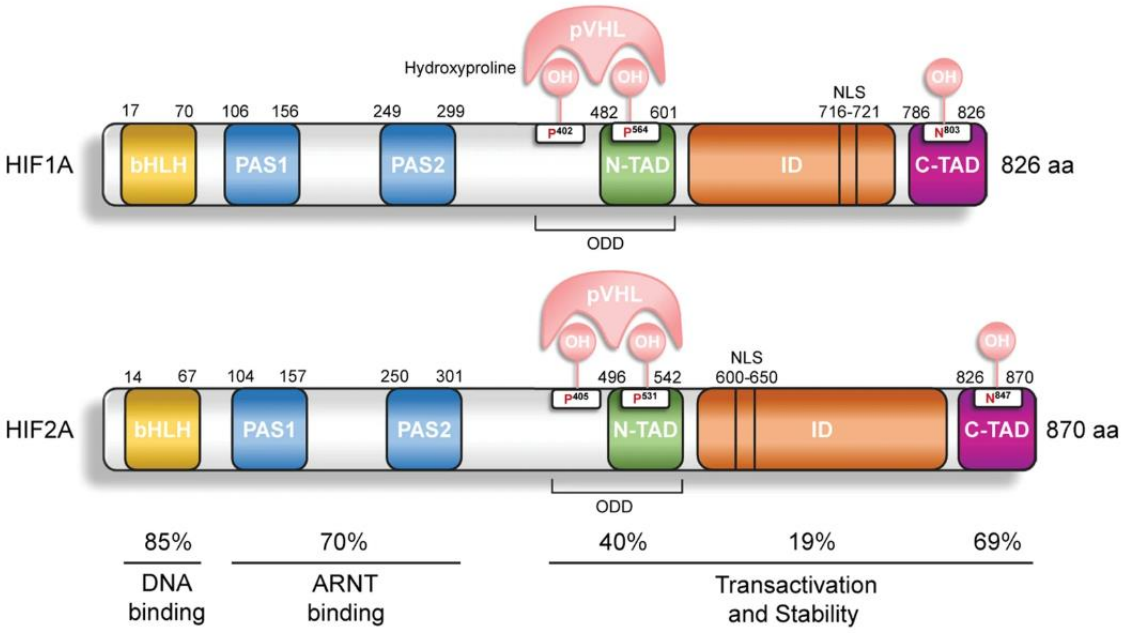
HIF, oksijen sensitif α alt birimi (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α) ve sürekli sabit hızda ekprese olan β alt biriminden oluşan heterodimer bir proteindir. Tanımlanan üç HIFα homoloğundan HIF1α hipoksik koşullardaki glikolizin düzenlenmesinde rol oynar (Kierans and Taylor, 2021), hücrenin hipoksik mikroçevresine adaptif cevaba aracılık eden, tümör anjiyogenezini teşvik eden, metabolik yeniden programlamayı regüle eden, eptelyal-mesenkimal geçişi hızlandıran, tedavide kullanılan radyoterapi ve kemoterapiye direnci artıran kritik bir transkripsiyonel düzenleyicidir (Kouvaras et al.; 2019; Semenza, 2019).

HIF-1α ve HIF-2α nın protein yapısında bazik sarmal-ilmek-sarmal (bHLH) ve Par-Arnt-SIM (PAS) transkripsiyon faktörleri bulunur. Bunlar aynı zamanda N/C-terminal transaktivasyon

bölgesi(N/C-TAD), inhibitör bölgesi(ID) ve oksijen-bağımlı yıkım bölgesine(*ODD*) sahiptirler. (Wu et al., 2022).

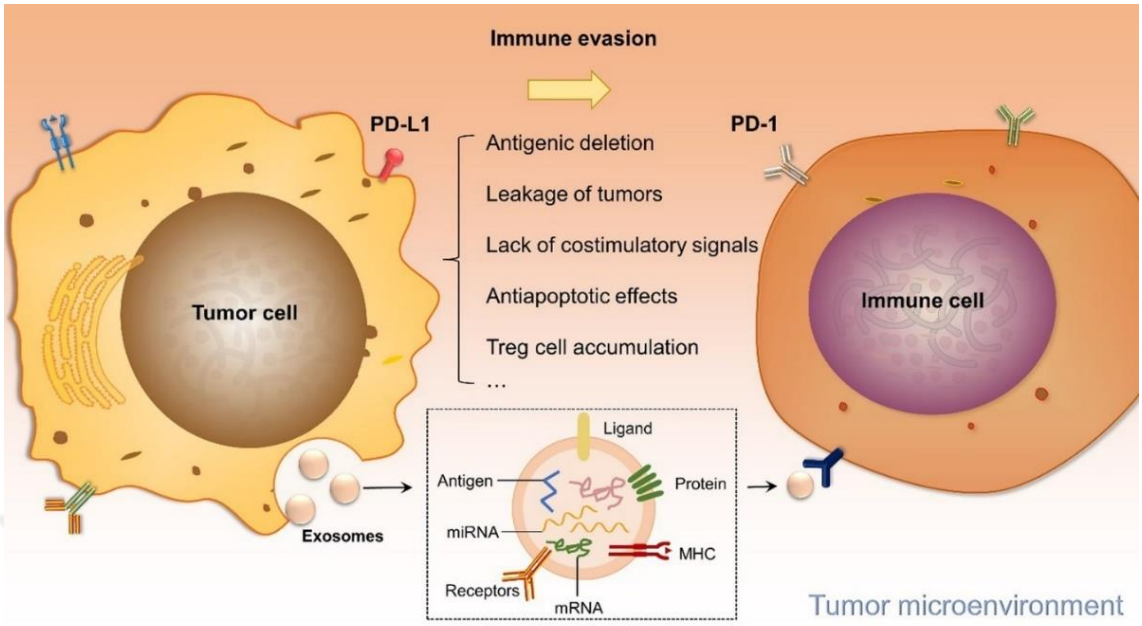
Yeterli oksijen seviyesinde (normoksi), HIF-1α yaklaşık 5-10 dakika gibi kısa bir yarı ömre sahiptir (Kierans and Taylor, 2021). Normoksi koşullarda HIF-1α proteini, oksijen bağımlı hidroksilasyon sonucu α alt birimin korunmuş prolin kalıntısına (Prolin 402 ve Prolin 564) hızlıca degrede olur (Kierans and Taylor, 2021). Bu hidroksilasyon, memeli hücrelerine özgü olan üç major izoformu olan prolil hidroksilaz (PHD) ailesi enzimleri tarafından gerçekleşmektedir. HIF-1α'nın hidroksillenmesi sonucu E3 ubikitin ligaz kompleksinin bir bileşeni olan tümör basılayıcı bir protein olan von Hippel-Lindau(VHL) tarafından tanınır. Bu bağlanma da poliübikitinasyona yani α alt biriminin proteozomal bozunmasına yol açar. Oksijen yokluğunda ise bu durum, hücre içerisinde oksijen eksikliğine dolayısıyla hipoksiyi inhibe edici faktörlerin ve prolil hidroksilaz enzimlerinin çalışmamasına sebep olur. Hidroksillenmesi inhibe edilen HIF-1α, VHL tarafından tanınamaz ve proteozomal yıkıma uğramadığı için sitozolde birikir. Kısaca yetersiz oksijen sonucu sitozelde biriken HIF-1α, HIF-1β/ARNT ile dimerize olacağı çekirdeğe lokalize olur ve burada heterodimer oluşturan HIF-1α ve HIF-1β hipoksi cevap elementlerine (HRE) bağlanır. Bu bağlanma hipoksiye adaptasyonu sağlayan genlerin transkripsiyonunu başlatır ve regüle eder (Kierans and Taylor, 2021).

Normoksik koşullarda ise HIF-1α koaktivatör siklik AMP cevap elementi bağlayıcı protein (CBP)/p300 ile bağlanmanın inhibisyonu yoluyla HIF'in transkripsiyonel aktivasyonunu daha da baskılamak için faktör inhibe edici HIF (FIH) tarafından C-terminal transkripsiyonel aktivasyon alanındaki asparagin kalıntısında (Asn 803) hidroksillenir (Kierans and Taylor, 2021). Bundan dolayı oksijen bağımlı hidroksilasyon, normoksik koşullarda HIF-1α'nın baskılanmasını sağlar.



Şekil 2.3. HIF-1α ve HIF-2α domainlerinin şematize gösterimi (Wu et al., 2022)

2.3.2. Hipoksi ve Kanser İlişkisi



Şekil 2.4. Tümör mikroçevresi ve kanser hücresinin PD-L1 ile immün sistemden kaçışı (Wu et al., 2022)

Çeşitli kanser türlerinde tümör mikroçevresinin ortak bir özelliği olan hipoksi, sitotoksik T hücresi işlevini zayıflatır ve düzenleyici T hücrelerinin toplanmasına neden olarak tümör immünojenitesini azaltır. Çalışmalar, hipoksinin ve hipoksiye neden olan faktörlerin (HIF'ler) 1 ve 2 alfa'nın (HIF1A ve HIF2A) tümör immün kaçışında rol oynadığını göstermiştir (Wu et al., 2022) .

Tümörün immün sistemden kaçışı antijenik delesyon, tümör hücresi sızması, tümör hücre yüzeyindeki eş sinyal eksikliği ve tümör hücrelerinin antiapoptotik etkisi ile ilişklendirilir. Tümör hücreleri PD-L1 sayesinde tümör filtreleyici lenfositlerin yüzeyinde bulunan PD-1'e bağlanır ve bu durum tümör mikroçevresinde immün sistemden kaçışına yardımcı olur. Tümör hücreleri ayrıca yüzeylerinde çokça PD-L1 bulunan eksozomlar salarak immün sistem hücrelerini inhibe eder ve immün sistem tarafından tanınmaktan kaçınır (Şekil 2.4) (Wu et al., 2022).

Çizelge 2.3. HIF-1 işlevini engelleyen ajanlar ve eylem mekanizmaları (Semenza, 2003)

HIF-1 işlevini engelleyen ajanlar	**Eylem Mekanizması**
Ketomin	HIF-1α'nın p300'e bağlanmasını bozmak
Antrasiklinler	DNA interkalatörü; DNA'ya HIF-1 bağlanmasını inhibe eder
Bortezomib	Proteazom inhibitörü; HIF-1α transaktivasyon alanını inhibe eder
HIF-1 ifadesini azaltan ajanlar	
HIF-1α antisens oligonükleotid	*HIF-1α* RNA'nın bölünmesi
HIF-1α siRNA	*HIF-1α*'ya karşı RNA paraziti
Topotekan	Topoizomeraz I inhibitörü; HIF-1α protein translasyonunu inhibe eder
Digoksin	HIF-1α protein translasyonunu inhibe etmek
PX-478	HIF-1α protein translasyonunu inhibe etmek
Temsirolimus	mTOR inhibitörü; HIF-1α protein translasyonunu inhibe eder
2-metoksiestradiol	Mikrotübül-depolimerize edici ajan; posttranskripsiyonel düzeyde HIF-1α'yı inhibe eder
17-AAG	Hsp90 inhibitörü; HIF-1α bozunmasını indükler
Hipoksi ile aktive edilmiş biyoredüktif ön ilaçlar	
Benzotrien di-*N*-oksitler	
Tirapazamin	Hipoksik sitotoksisite
Nitroaromatik	
- CB 1954	
- SN 23862	Hipoksik sitotoksisite
-PR-104	
Kinonlar	
- mitomisin C	Hipoksik sitotoksisite
RH-1	
Üçüncül amin *N*-oksitleri	
-AQ4N	Hipoksik sitotoksisite
Hipoksi hedefli gen terapisi	
HRE odaklı BAX	Hipoksi kaynaklı apoptoz
Gene yönelik enzim ön ilaç tedavisi	
HIF-1 İşlevini Engelleyen Ajanlar	
HRE tahrikli P450 redüktaz	Alkilleyici nitroimidazole karşı hipoksi kaynaklı duyarlılık
HRE-tasartılı HSV-timidin kinaz	Hipoksi kaynaklı gansiklovire duyarlılık
HRE tahrikli sitozin deaminaz	Hipoksi kaynaklı 5-florositozine duyarlılık

Büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak HIF-1α düzeylerindeki artış, hipoksiye yanıt olarak HIF-1α düzeylerindeki artıştan iki önemli açıdan farklıdır. Birincisi, hipoksi tüm hücre tiplerinde HIF-1α düzeylerini artırırken, büyüme faktörü uyarımı spesifik bir şekilde HIF-1α ekspresyonunu indükler. İkincisi, hipoksi HIF-1α'nın azalmış degradasyonuyla ilişkiliyken, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer sinyal molekülleri fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) veya mitogenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yollarının aktivasyonu yoluyla HIF-1α sentezini uyarır. HIF-1 işlevini engelleyen ajanlar ve eylem mekanizmaları yukarıdaki tabloda gösterilmiştir (Şekil 2.3).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar, cihazların modelleri ve cihazların kullanım amaçları

Cihaz Adı- Marka/Modeli	Kullanım Amacı
Hücre Kültürü Kabini (Miprolab MSAFE 1800)	Dışarıdan kontaminant girişini engelleyerek hücre kültürü çalışmalarını steril olarak yürütmek
CO2 inkübatörü (Thermo Electron Corporation,RS 485)	Hücre hatlarının sabit sıcaklık, nem ve gazlar altında inkübasyonu
Mikroskop (OLYMPUS, CKX53)	Hücrelerin morfolojik durumlarının gözlemlenmesi
+4°C dolap (UĞUR, Elektrolux ZANUSSİA)	Hücre kültürü sarf malzemelerinin saklanması
Thermal Cycler/Turbo Cycler (Blue-Ray Biotech, Model: TCLT9610 – TCLT9620)	İzole edilen RNAlardan cDNA sentezi
Quantus Floumeter (Promega, TM396)	İzole edilen RNA miktarlarının ölçümü
Thermal cycler (Applied Biosystem, Seri no:7500, Cat. No: 4377354)	Real-Time PCR
Hareketli shaker (IKA® KS 130 control, Model no: KS 130 C)	Deneysel örneklerin ilgili çözeltide homojen bir şekilde inkübasyonu
Hassas Terazi (Weightlab Instruments WSA-224 Analitik Terazi, Type: WSA-224)	Çözelti hazırlanması için kimyasal tartımı
Mini santrifuj (Hettich Zentrifugen, Mikro 120, Type: 1204)	Deneysel örnek santrifujü
SDS page güç cihazı (BIO-RAD, PowerPac™ Basic, Seri No: 041BR135381)	Elektroforez için enerji kaynağı
Buz Makinesi (Automatic Ice Marker, IMS 50)	Buz eldesi
-86°C Derin Dondurucu (Eppendorf (New Brunswick, U410 HEF)	Hücre hatları, protein ve RNA vb uzun süreli saklanması
-20°C Derin Dondurucu (Bosh, GSD1140NE)	Antikorlar, markerlar, cDNA vb sarfların ve ürünlerin uzun süreli saklanması
Basic Power Supply, (POWERFUL, Model No: PLD-3000)	Termal döngü cihazına elektrik kesintisi durumunda belli bir süre boyunca güç vermesi
pH-metre AZ86555	Deneylerde kullanılan tampon çözeltilerin pHının ayarlanması
ddH2O distile su cihazı(Thermomac, WB15)	Distile su eldesi
iBright™ CL1500 Imaging System (Cat. No: A44114)	Western blot deneyinde sonuçların görüntülenmesi
Soğutmalı santrifüj (Beckman (Allegra), 21R C Bio-Rad Vertical Power PAC	Protein eldesi, RNA eldesinde yüksek dönüş hızı ve sabit sıcaklık gerektiği için
Vorteks (VELP Scientifica, C17)	Örneklerin çözünmelerin ve karışmanın sağlanması
Termal mikser (Eppendorf™ Thermomixer™ R, Cat. No: 05-400-205)	Deneysel örneklere gerekli ısının uygulanarak reaksiyona girmesinin sağlanması
Microplate Okuyucu (Biochrom, EZ Read 400, Seri No: 134560)	BCA ve MTT deneylerinde kullanılan örneklerin absorbans değerlerinin ölçülmesi
Incubator Shaker (INNOVA, Cat. No: M1282-0000)	Deneysel örneklere gerekli ısının uygulanarak reaksiyona girmesinin sağlanması
Power Blot (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)	Proteinlerin jelden membrana aktarılması
Magnetic Stirrer (Thermomac, Model: TM-12)	Homojen çözelti hazırlanması

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler, katalog bilgileri ve kullanım amaçları

Malzeme Adı- Katalog Bilgileri	Kullanım Amacı
Mikropipet (0.2-2 µL) (Eppendorf research)	Farklı hacimlerde sıvıların ölçülmesi ve transfer edilmesi
Mikropipet (2-20 µL) (Eppendorf research)	Farklı hacimlerde sıvıların ölçülmesi ve transfer edilmesi
Mikropipet (20-200 µL) (Eppendorf research)	Farklı hacimlerde sıvıların ölçülmesi ve transfer edilmesi
Mikropipet (100-1000 µL) (Eppendorf research)	Farklı hacimlerde sıvıların ölçülmesi ve transfer edilmesi
T25 hücre kültürü flask (Nunc™ Cat. No: 163371)	Hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılması
T75 hücre kültürü flask (Home of tissue culture TPP®, Ürün No: 90076)	Hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılması
60 mm'lik plate (Corning®, Ürün No: 430166)	Hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılması
100 mm'lik plate (Greiner BIO-ONE, Ref. No: 664160)	Hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılması
Mikrosantrifuj tüpü (200 µL) Treff Lab, 96.09852.9.01	Real-Time ve Reverse-Transkriptaz PCR örnekleri ile çalışılması
Mikrosantrifuj tüpü (500 µL) BRAND, 781310	RNA ölçümlerinin gerçekleştirilmesi
Mikrosantrifuj tüpü (1,5 mL) (ISOLAB, Ref, No: S.078.03.002.500)	Küçük hacimlerde sıvıların saklanması, karıştırılması, santrifüjlenmesi ve taşınması
Falkon (15 mL) (Kırgen® Solution for Science, Ürün No: KG2621)	Hücre kültüründe kullanıldı
Falkon (50 mL) (Kırgen® Solution for Science, Ürün No: KG2821)	Hücre kültüründe kullanıldı
0,2 µm filtre (Schleicher & Schuell, FP 30/0,2 CA-S)	Filtreleme
RNA-DNAase free microsantrifüj tüp (500 µL) Neptune Tools for Life Science, 3737.x	Santrifüj için kullanıldı.
RNA-DNAase free microsantrifüj tüpü (1,5 mL) LP İtalianaspa, L111546	Santrifüj için kullanıldı.
BCA f bottom plate (SpectraPlate™ -96 TC)	Protein konsantrasyonunu ölçülmesi
96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems®, MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Ref. No: N8010560)	Applied-Biosystem Real-Time PCR Deneyleri
Seal film Biorad (Roche), MS131001	Real-Time PCR deneyleri
Hücre kazıyıcı (NEST Biotechnology Co., LTD, Model No: 710001)	Hücre kazınması
Thoma Lamı (Precicolor HBG Germany)	Hücre sayısının belirlenmesi
Jel dökme aparatı (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific SureCast™ Gel Handcast Station, Ref. No: HC1000)	Protein Elektroforezi için Jel Hazırlama
Transfer kağıdı ((Thermo Fisher Scientific)	Membranı ve jeli sabitleyerek düzgün bir transfer sağlanması
Filtre kağıdı (Thermo Fisher Scientific)	Membran ve jel arasında tampon çözeltisinin eşit dağılımının sağlanması
SDS page cihazı (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)	Poliakrilamid jelde akım yardımıyla proteinlerin yürütülmesi
Hipoksi chamber (Billups-Rothenberg$_{Inc.}$, Modular Incubator Chamber)	Hipoksik ortamlarda hücre kültürlerinin korunması
Sıvı azot tankı (Thermo Fisher Scientific, BioCane 47, Seri No: NPB2021240166V)	Hücrelerin ve/veya dokuların saklanması

Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan katı-sıvı kimyasallar ve kullanım amaçları

Kimyasal Adı	Kullanım Amacı
DMEM ortam	Hücre hattı besiyeri
Fetal Bovin Serum	Hücre hattı besiyeri
Penisilin-Streptomisin	Hücre hattı besiyeri
Steril PBS	Hücre hattı bakımı
Tripan mavisi	Hücre sayımı
PBS(katı)	Hücre kültürü dışındaki PBS hazırlanması
Tris-Base	Western blot, SDS page ve laemmli tamponu hazırlama
Süt tozu	Western blot bloklama ve antikor dilüsyonu
Glisin	Laemmli tamponu hazırlama
Bromofenol mavisi	Laemmli tamponu hazırlama
ß-merkaptoetanol	RNA izolasyonu ve Laemmli tamponu hazırlama
Sodyum Dodesil Sülfat	Western blot ve SDS page tamponları
SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Western blot cihazında görüntünün alınması
Amonyum Persülfat	SDS page jel içeriği
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine)	SDS page jel içeriği
Transfer Buffer (5X)	Western Blot transfer aşaması
EDTA	Western Blot çalışmaları
Akrilamid	SDS page jel içeriği
Bisakrilamid	SDS page jel içeriği
Etanol	Sterilizasyon
Metanol	Transfer tamponu hazırlama
İsopropil Alkol	SDS page jel içeriği
Hidrojen Klorür	pH ayarlaması
Sodyum Hidrooksit	pH ayarlaması
Optimem	Gen susturma
Nükleaz içermeyen su	Gen susturma
Scramble RNA	Gen susturma
siARNT	Gen susturma
siHIF1α	Gen susturma
Lipofektamin	Transfeksiyon

3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü ve Hücre Hattının Çoğaltılması

Bu tez çalışmasında kullanılan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) A549 hücre hattı Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Dr. Demet Taşdemir Kahraman'dan temin edilmiştir.

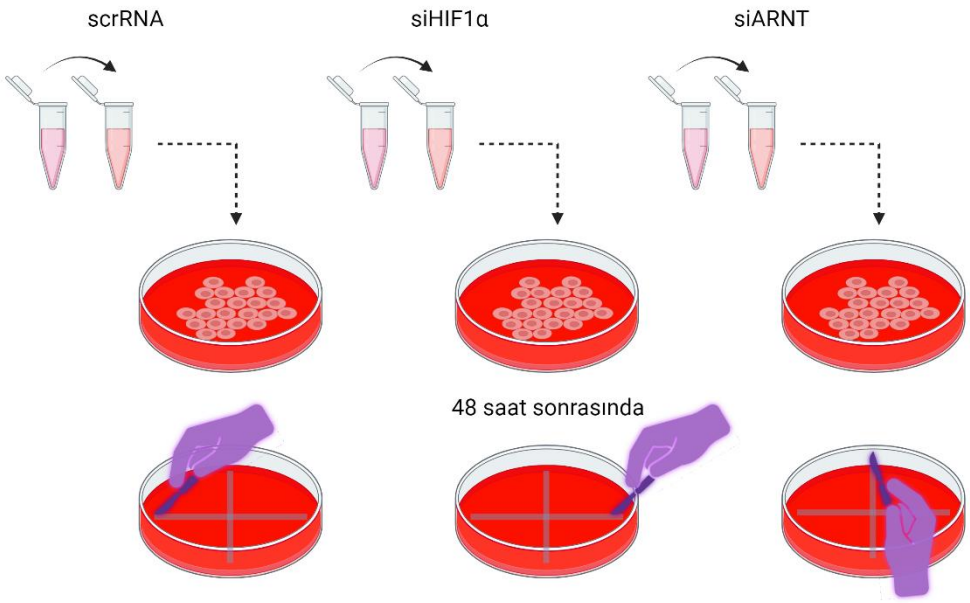
Çalışma Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde Saygıdeğer Hücre Kültür Laboratuvarı'nda steril şekilde yürütülmüştür. Sıvı azot tankında tutulan A549 hücre hattı açıldıktan sonra T75'lik flaskta %10FBS ve %1Penisilin-Streptomisin ile desteklenmiş DMEM besi yerinde ve 37°C, %5 CO_2, %80 bağıl nem koşullarında inkübe edilmiştir. Ortam değişimi gerektiğinde PBS ile yıkaması yapılan yapışkan hücreler, yaklaşık %80 doluluğa ulaştığında ise pasajlanması gereken hücreler PBS ile iki defa yıkanıp yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin-EDTA karışımı eklenip 4 dakika inkübatörde inkübe edildi. Sonrasında inkübatör dışına alınan flask hafifçe tokatlanarak, hücreler tamamen kaldırıldı ve mikroskop altında kontrol edildi. Kaldırılan hücrelerin tripsin maruziyetini azaltmak için, kullanılan tripsinin 4 katı hacimde %10 FBS ile desteklenmiş DMEM besi yeri ortamı eklendi. Thoma lam'ında sayılan hücreler, uygun yoğunlukta deney koşullarına göre petri kaplarına pasajlandı.

3.2.2. Hücre Hattına Transfeksiyon Uygulanması

HIF1α ve ARNT ekspresyonlarının susturulması için Ambion Silencer Negative Control siRNA (Cat. No: AM4611), HIF1α Silencer Select Validated siRNA (Cat. No: 4390824) ve ARNT silencer Select Pre-designed siRNA (Cat. No: 4392420) temin edildi. Transfeksiyonun uygulaması için İnvitrogen Lipofectamine 3000 Transfection Kit (Cat. No: 2533486) temin edildi ve protokoldeki aşamalar takip edildi (Şekil 3.1.).

Timeline		Steps	Procedure Details (Two Reaction Optimization)			
Day 0	1	Seed cells to be 70–90% confluent at transfection	Component	96-well	24-well	6-well
			Adherent cells	1–4 × 10^4	0.5–2 × 10^5	0.25–1 × 10^6
Day 1	2	Dilute Lipofectamine™ 3000 Reagent in Opti-MEM™ Medium (2 tubes) – Mix well	Opti-MEM™ Medium	5 µL × 2	25 µL × 2	125 µL × 2
			Lipofectamine™ 3000 Reagent	0.15 and 0.3 µL	0.75 and 1.5 µL	3.75 and 7.5 µL
	3	Prepare master mix of DNA by diluting DNA in Opti-MEM™ Medium, then add P3000™ Reagent – Mix well	Opti-MEM™ Medium	10 µL	50 µL	250 µL
			DNA (0.5–5 µg/µL)	0.2 µg	1 µg	5 µg
			P3000™ Reagent (2 µL/µg DNA)	0.4 µL	2 µL	10 µL
	4	Add Diluted DNA to each tube of Diluted Lipofectamine™ 3000 Reagent (1:1 ratio)	Diluted DNA (with P3000™ Reagent)	5 µL	25 µL	125 µL
			Diluted Lipofectamine™ 3000 Reagent	5 µL	25 µL	125 µL
	5	Incubate	Incubate for 10–15 minutes at room temperature.			
	6	Add DNA-lipid complex to cells	Component (per well)	96-well	24-well	6-well
			DNA-lipid complex	10 µL	50 µL	250 µL
			DNA amount	100 ng	500 ng	2500 ng
			P3000™ Reagent	0.2 µL	1 µL	5 µL
			Lipofectamine™ 3000 Reagent used	0.15 and 0.3 µL	0.75 and 1.5 µL	3.75 and 7.5 µL
Day 2–4	7	Visualize/analyze transfected cells	Incubate cells for 2–4 days at 37°C. Then, analyze transfected cells.			

Şekil 3.1. Lipofektamin ile A549 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen transfeksiyonun protokolü



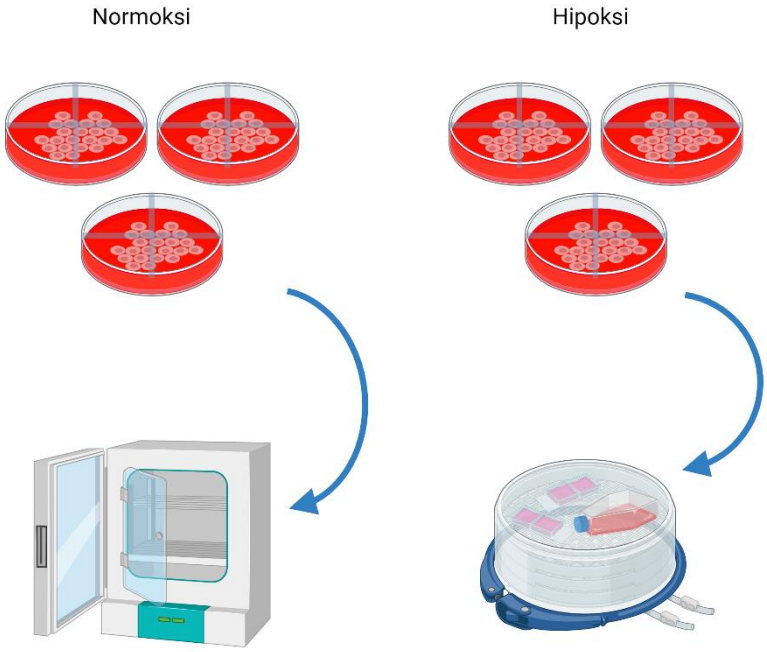
Şekil 3.2. A549 hücre hattında scrRNA, siHIF1α ve siHIF1ß(ARNT) tansfeksiyonun gösterimi ve yara kapanma deneyi.

Petri kaplarında bulunan A549 hücre hattı %80 doluluğa ulaşana kadar inkübe edildi. Her koşul için ependorflar ayarlandı ve içerisine eşit miktarda Optimem eklendi. Scramble RNA ve siRNAlar ependorfların içerisinde bulunan Optimemlerde dilüe edildi. Daha sonra siRNA-Optimem karışımı Lipofektamin-Optimem karışımının içerisine eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her bir karışım uygulanacağı koşula göre A549 hücre hattının bulunduğu petri kaplarına doğrudan eklendi ve hücreler homojen dağılımı sağlamak için rotasyon hareketi ile birlikte uygun koşullara aktarıldı (Şekil 3.2.).

3.2.3. Yara Kapanma Uygulaması

Tam doluluğa ulaşan hücreler mikropipet ucu yardımıyla (Şekil 3.2.) deki gibi artı işareti '+' şeklinde plate boyunca çizildi. Oluşan yarık mikroskopta gözlemlendikten sonra kalkan hücrelerin uzaklaştırılması için 3 defa PBS ile yıkama yapıldıktan sonra taze besiyeri eklendi.

3.2.4. Transfekte Hücre Hattına Hipoksik Koşulun Sağlanması



Şekil 3.3. Transfekte edilmiş hücre hatlarının hipoksiye alınması

Hipoksi odacığına alınan hücrelere, odacık hortumundan 10 dakika boyunca %1'lik oksijen içeren azot gazı verildi ve kilitleri sıkıca kapatıldı (Şekil 3.3). Yarık açılan hücre hatları 12. ve 24. saatlerde görüntü alınması amacıyla hipoksiden çıkarılıp geri alınmıştır.

3.2.5. RNA İzolasyonu ve RNA Miktarlarının Ölçülmesi

Hücreden RNA İzolasyonu

Hücreden RNA İzole edebilmek için GeneJET RNA Saflaştırma (Thermo Scıentıfıc, # K0731) kiti kullanıldı.

1. Her örnek için 1 mL Lizis Tamponuna 20 µL 14,3 M β-merkaptoetanol veya 2 M DTT eklendi.
2. Hücrelerin ortamı atıldı. Kalan ortamı uzaklaştırmak için hücreleri bir kez PBS ile yıkandı. PBS atıldı.
3. Hücreleri flasktan uygun hacimde PBS ile kazıyarak veya tripsinizasyon yaparak ayırdı. Hücreler bir mikro santrifüj tüpüne alındı.
4. 250 xg'de 5 dakika santrifüj ederek pelet haline getirildi. Süpernatant atıldı.
5. β-merkaptoetanol veya DTT ile desteklenmiş 600 µl Lizis Tamponu ile pelet yeniden süspanse edildi. İyice karışması için 10 saniye boyunca vortekslendi.
6. 360 µL etanol (%96-100) ekledni ve pipetleme yoluyla örnek karıştırıldı.
7. 700 µL lizat GeneJET RNA Saflaştırma Kolonuna aktarıldı. Kolon ≥12000 × g'de 1 dakika santrifüjleni. Akış atıldı.

8. Bu adım, lizatın tamamı kolona aktarılana ve santrifüjlenene kadar tekrarlandı. GeneJET RNA Saflaştırma Kolonunu yeni bir 2 mL toplama tüpüne yerleştirildi.
9. GeneJET RNA Saflaştırma Kolonuna 700 µL Yıkama Tamponu 1 (etanol ile desteklenmiş, eklendi.
10. 12000 × g'de 1 dakika santrifüj edildi. Akış atıldı ve saflaştırma kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
11. GeneJET RNA Saflaştırma Kolonuna 600 µL Yıkama Tamponu 2 (etanol ile desteklenmiş, eklendi.
12. 12000 × g'de 1 dakika santrifüj edildi. Akış atıldı ve saflaştırma kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
13. GeneJET RNA Saflaştırma Kolonuna 250 µL Yıkama Tamponu 2 eklendi.
14. 12000 × g'de 2 dakika santrifüj edildi.
15. Akış solüsyonunu içeren toplama tüpü atıldı. GeneJET RNA Saflaştırma Kolonu steril 1,5 mL RNase içermeyen bir mikro santrifüj tüpüne alındı.
16. GeneJET RNA Saflaştırma kolonuna 100 µL nükleaz içermeyen eklendi. RNA'yı elüe etmek için12000 × g'de 1 dakika santrifüjlendi.
17. Saflaştırılmış RNA -20°C ye kaldırıldı.

Koşullara göre ayrılan RNA miktarlarının ölçülmesi

İzole edilen RNA miktarları florometre (Promega, Quantus, # E6150) ile ölçüldü. Rna miktarlarının belirleneblimesi için RNA ölçüm kiti (Promega, Quantus # 72050) kullanıldı.

Cihaz kalibrasyonunda kullanılması için 20 X TE Buffer (Promega, QuantiFluor # E260A) nükleaz içermeyen su yardımıyla 1 X TE tampon çözeltiye seyreltildi. 1:400 (RNA dye :1X TE tampon çözelti) oranında çalışma reaktifi hazırlandı. Örneklerin ölçümünden önce cihazı kalibre etmek için Blank ve standart (Promega, QuantiFluor # E299A) solüsyonundan yararlanıldı. Her örnekten 2 µL alınarak 200 µL çalışma reaktifi ile karıştırıldı. Ölçüm için hazırlanan örnekler oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. 260 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı.

3.2.6. Protein İzolasyonu ve BCA yöntemi ile Total Protein Miktarlarının Ölçülmesi

Protein izolasyon protokolü

1. Non-steril 20X soğuk PBS 1X'e seyreltildi. Pipetaj yardımıyla homojen hale getirildi.
2. Her bir 10 cm'lik petri için bir ependorf tüpünde; 600 µL liziz buffer + 6 µL proteaz inhibitor kokteyl karıştırıldı.
3. Petrideki ortam buz üzerinde çekilip atıldı.
4. Petriye bir miktar soğuk 1X PBS eklendi. Buz üzerinde rotasyon hareketiyle yıkama yapıldı ve ardından PBS çekilip atıldı.

5. Yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı. Petri buz üzerinde 45 derecelik açıyla 3-5 dakika tutulur. Petrinin bir alanında toplanan PBS çekilip atıldı.
6. Petri içerisine proteaz inhibitor kokteyli ve liziz buffer bulunan karışımdan eklendi.
7. Hücreler hücre kazıyıcı ile kazınarak kendi kültür kaplarında parçalandı.
8. Elde edilen hücre süspansiyonu bir mikrosantrifüj (eppendorf) tüpüne alındı.
9. 5'er dakika aralıklarla vortekslenerek buz üzerinde 20 dakika inkübe edildi.
10. İnkübasyonun ardından hücre süspansiyonu, +4°C'de maksimum devirde 20 dakika santrifüjlendi.
11. Santifüj ile hücre süspansiyonu pelet ve süpernatant şeklinde ayrıldı.
12. Süpernatant kısmında bulunan proteinler yeni bir ependorfa alındı.
13. Proteinlerin bir kısmı BCA testi için ayrıldıktan sonra kalan proteniler ependrof içerisinde -80 ° e kaldırıldı.

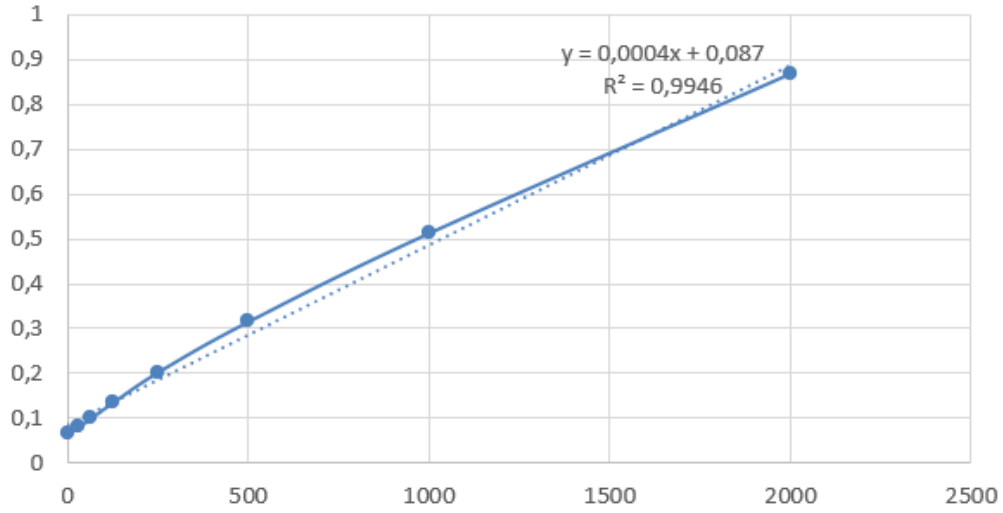
Bikinkoninik Asit (BCA) Protein Testi

Protein izolasyonu testi ile izole edilmiş protein örneklerinin konsantrasyonu BCA testi ile belirlendi. Öncelikle albümin BSA standartları hazırlandı. 1 mg/mL stok çözeltisi yapmak için 0 mg BSA, 10 mL %0,09 tuzlu distile suda çözüldü. 0 ile 2000µg/mL arasında değişen konsantrasyonlara sahip BSA standart çözeltisi hazırlandı. (2000µg/mL, 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL, 31,25µg/mL, 0µg/mL)

BCA Çalışma Reaktifi Hazırlama

Reaktif hazırlamak için A ve B reaktifleri kullanıldı (Thermo Scıentıfıc, # A55860). 1:50 oranında olan Reaktif A (Thermo Scıentıfıc, # 23228) ve Reaktif B (Thermo Scıentıfıc, # 1859078) ile çalışma çözeltisi hazırlandı.

Plate üzerine A sırasında 1. Kuyucuk ile 8. Kuyucuk arasına protein standartları sırasıyla 10 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi. Ardından protein örnekleri yavaşça pipetaj yapıldıktan sonra, 1:5 oranında distile su ile dilüe edilerek hazırlandı. Her kuyucuğa 10 µl protein örneği yüklendi. Örnekler iki tekrarlı olacak şekilde plate düzeni oluşturuldu. Her kuyucuğa hazırlanan çalışma reaktifinden 100 µl eklendi. Plate 37°C'de 30 dakika inkübe edildi (Incubator Shaker (INNOVA, Cat. No: M1282-0000). İnkübasyon süresinin sonuna gelindiğinde mikroplate okuyucuda (Biochrom, EZ Read 400, seri no: 134560) 562 nm'de absorbansı ölçüldü.



Şekil 3.4. Sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan standartların BCA ölçüm sonucunda elde edilen eğri grafiği

BSA standartlarının absorbans değerleri kullanılarak standart bir eğri elde edildi. Standart eğriyi kullanarak numunelerin protein konsantrasyonu hesaplandı (Şekil 3.4.).

3.2.7. cDNA eldesi ve Real Time PCR deneyleri

İzole edilen RNA'lardan cDNA eldesi için Abm One Script® cDNA Synthesis Kit (Cat. No: 6234) kullanıldı. Kitte belirtilen protokol takip edildi.

Çizelge 3.4. cDNA eldesi için gerekli sarflar ve miktarları

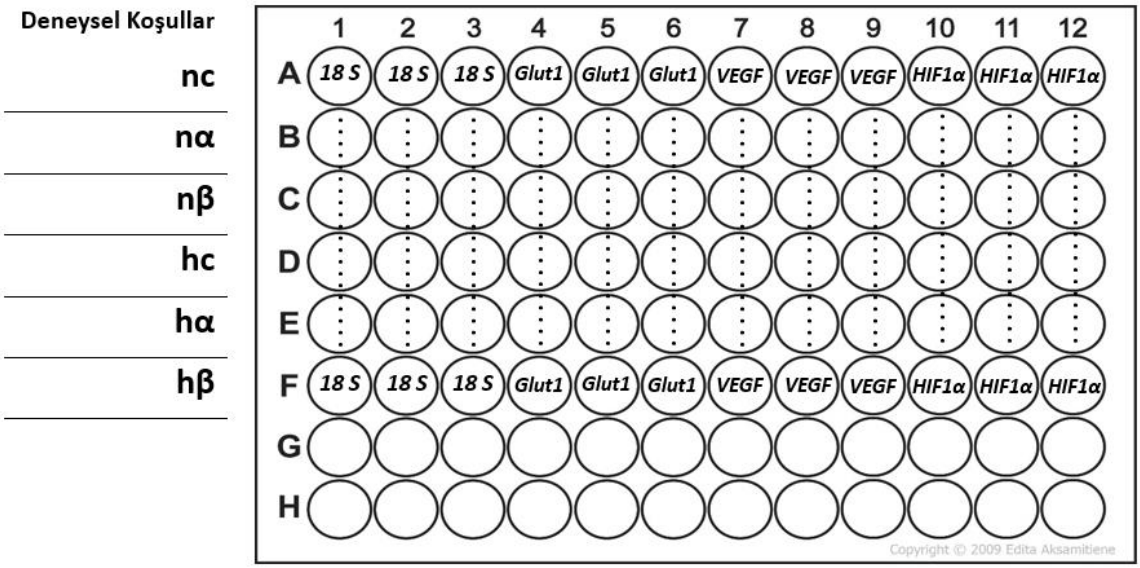
Ürün Bileşenleri	Miktar
OneScript Plus RTase	100 µl
5X RT Buffer	400 µl
Oligo (10µM)	100 µl
Random Primers (10µM)	100 µl
dNTP (10µM)	100 µl
Nuclease-Free H_2O	2 x 1,0 ml

Çizelge 3.5. qPCR'da kullanılan primerler ve sekans bilgileri

Primerler	Sekans Bilgileri
18S (R)	5'-ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA-3'
18S (F)	5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'
GLUT1 (R)	5'AGGAGGTGGGTGGAGTTAAT-3'
GLUT1 (F)	5'-GGACAGGCTCAAAGAGGTTATG-3'
HIF1α (R)	5'-CACCTCTTTTGGCAAGCATCCTG-3'
HIF1α (F)	5'-TATGAGCCAGAAGAACTTTTAGGC-3'
VEGF (R)	5'-ATTTACACGTCTGCGGATCTT-3'
VEGF (F)	5'-TGAGCTTCCTACAGCACAAC-3

18S – GLUT1 – VEGF – HIF1α GENLERİ İÇİN qPCR DENEYİ

Kit: Amplicon RealQ Plus 2x Master Mix Green Without ROX™ (Cat. No.: A323402)



Şekil 3.5. Normokside Kontrol (nc), HIF1α susturulmuş (nα), HIF1ß susturulmuş (nβ), Hipokside Kontrol (hc) HIF1α susturulmuş (nα), HIF1ß susturulmuş (nβ) koşulların plate üzerinde dağılımı.

- Deneyde kullanılacak cDNA molekülleri 10:200 oranında nükleaz içermeyen su ile seyreltildi. (9,09 µL cDNA + 190,91 µL Nükleaz İçermeyen Su)
- 18S – Glut1 – VEGF – HIF1α genlerinin ifadelenmesindeki değişim altı farklı koşulda (nc, nα, nβ, hc, hα, hβ) üçer tekrar olacak şekilde bakılacağı için ve herhangi bir pipetleme hatasına karşı, 20 örneklik RealQ Plus 2x Master Mix, forward primer and reverse primer içeren reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda karıştırılarak hazırlandı.

Çizelge 3.6. Reaksiyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
RealQ Plus 2x Master Mix	12,5 µL (1x)
Forward Primer	0,5 µL (0.2 µM)
Reverse Primer	0,5 µL (0.2 µM)
PCR grade H_2O	X µL
Template DNA	Y µL (10 ng)
Total Hacim/Miktar	25 µL

- Her bir gen için ayrı ayrı hazırlanan 270 µL'lik reaksiyon karışımından, 96 kuyucuk içeren plakanın her bir gen için ayrılmış kuyucuklarına 13,5 µL yüklendi.
- Her bir kuyucukta bulunması gereken miktar 25 µL olması gerektiğinden, seyreltilen cDNA moleküllerinden 11,5 µL deney planında belirtilen koşullara göre plakadaki kuyucuklara aktarıldı ve total hacim 25 µL'ye tamamlandı.
- Plaka "microAMP Clear Adhesive Film" ile kapatıldı.
- Plaka 500 g (RCF)'de 1 dakika sanrifüj edildi.
- Plaka "Applied Biosystem 7500 Real Time PCR System" cihazının tepsisine yerleştirildi ve PCR programı aşağıdaki koşullarda başlatıldı:

Çizelge 3.7. PCR çalışma programı

Döngü Sayısı	Döngü Süresi	Sıcaklık
40	15 saniye	95 °C
	30 saniye	60 °C
	30 saniye	72 °C

3.2.8. SDS-PAGE ile Proteinlerin Jelde Yürütülmesi

BCA ile total protein miktarı tayini sonuçlarına göre belirlenen protein konsantrasyonları SDS-PAGE'de her bir koşul için her kuyucuğa 30µg protein yüklenecek şekilde hesaplamalar yapıldı ve 4X laemmli buffer kullanılarak 95°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi. Alttaki tablolara göre hazırlanan alt ve üst jel hazır olduğunda, SDS-PAGE yürütme tamponu içerisine yerleştirilen jelin kuyucuklarına eşit miktarda örnekler yüklendi. Önce 40 dakika 50V, sonra 45 dakika 150V yürütüldü.

Çizelge 3.8. Alt Jel Hazırlamak İçin Gerekli Kimyasallar

Alt Jel (%10'luk)	Miktar
Distile Su	3,8 mL
%30 Akrilamid	3,4 mL
1.5M Tris-HCl Buffer pH: 8.8	2,6 mL
%10 SDS	100 µL
APS	100 µL
TEMED	10 µL

Çizelge 3.9. Üst Jel Hazırlamak İçin Gerekli Kimyasallar

Üst Jel (%5'lik)	Miktar
Distile Su	2,93 mL
%30 Akrilamid	0,67 mL
0.5M Tris-HCl Buffer pH: 6.8	1,3 mL
%10 SDS	50 µL
APS	50 µL
TEMED	5 µL

3.2.9. Western Blot

Transfer ve Bloklama

Yürütülen jel kasetle birlikte yürütme tankından çıkartıldı. Transfer buffer ile ıslatılan transfer kağıtları power blotter cihazı içerisinde zemine yerleştirildi. Üzerine metanolde bekletilmiş PVDF membran konuldu ve kasetten çıkarılan jel ile birlikte üstüne yine transfer kağıdı ile kapatıp hava kabarcığı kalmaması için roller ile üstünden hafifçe geçildi. 7 dakika transfer cihazında yarı-kuru olarak jelden membrana transfer gerçekleştirildi.

Membran, transferin ardından hızlıca %3 süt tozu içerisinde 60 dakika boyunca çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi.

Antikor İnkübasyonu

Çizelge 3.10. Western Blot deneylerinde kullanılan primer antikorlar

Primer Antikorlar / Dilüsyon Oranları	Molekül Ağırlıkları	Marka ve Katalog Numaraları
β- Actin	43kDa	Affinity (AF7018)
Anti-Ezrin	80kDa	Sigma Aldrich (E8897)
ARNT(HIF1ß)	87kDa	Cell Signalling (D28F3)
GLUT-1	45kDa	Proteintech (21829-1-AP)
HIF1α	93kDa	FineTest(FNab10340)
HER2	185kDa	Proteintech (18299-1-AP)

Primer antikorlar Çizelge 3.7'de belirtilen şekilde %3'lük süt tozu içerisinde seyreltildi ve 90 dakika boyunca çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonu ardından 3 defa 5'er dakika Running Buffer ile yıkanan membranlar, 1:10000 dilüsyon oranıyla uyumlu olduğu %3'lük süt tozunda seyreltilmiş sekonder antikor ile 60 dakika boyunca çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi.

Görüntüleme

Sekonder antikor inkübasyonu biten membranlar, 3 defa 5'er dakika Running Buffer ile çalkalayıcıda yıkandı. West Pico Plus'ın Luminol/Enhancer ve Stable Peroxide'ı 1:1 oranında karıştırıldı ardından membran yüzeyini kaplayacak kadar yavaşça üzerine bırakıldı ve karanlıkta 10 dakika boyunca inkübe edilen PVDF membra görüntülenmek üzere iBright™ CL1500 Imaging System (Cat. No: A44114) cihazına konuldu. Cihazdan alınan görüntülerde, bantlar daha sonra analiz edilmek üzere depolama birimine aktarıldı.

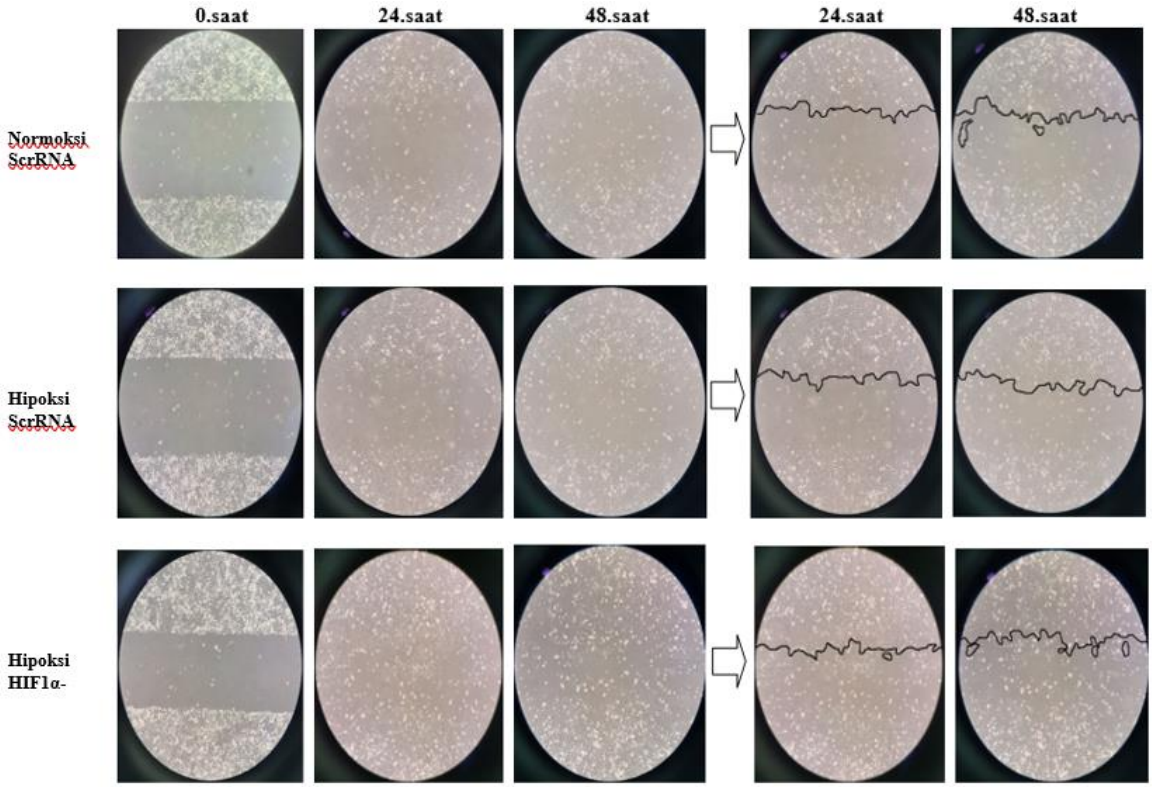
3.2.10. İstatistiksel Analizler

HIF1α ve HIF1ß susturulmuş A549 hücrelerinde kollektif invazyon, gen ekspresyon ve western blot sonuçlarının analizi verilerinin istatistiksel analizleri GraphPad Prism 8.4.3 programı kullanılarak Student T test ve One Way ANOVA testleri kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel önem sınırı 0,05 ve olarak alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

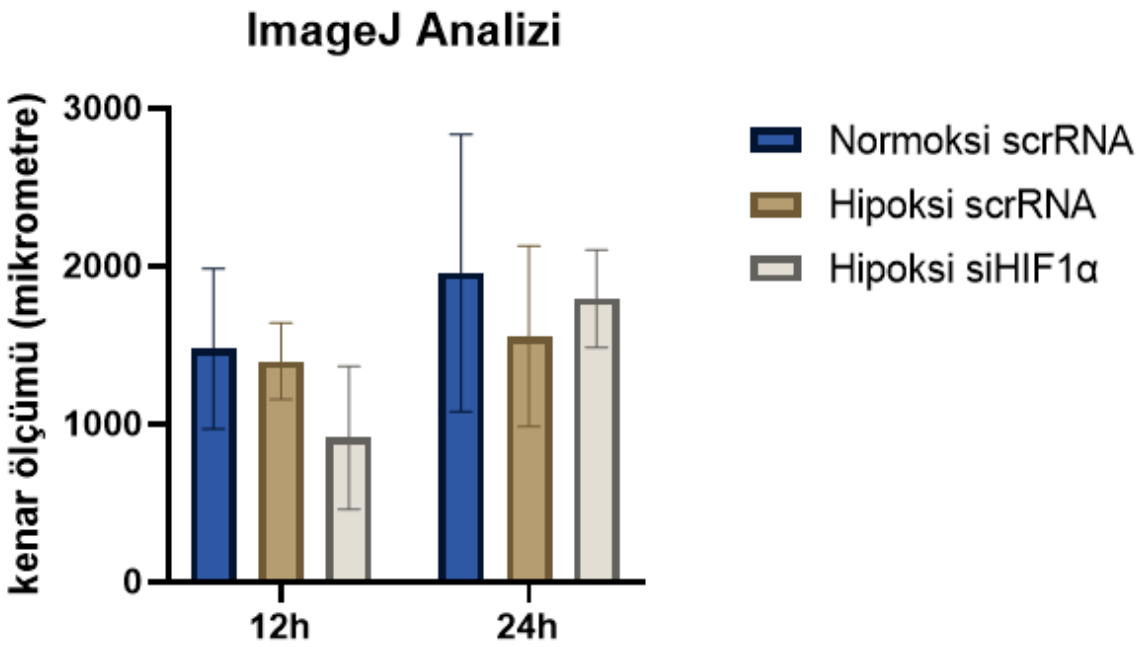
4.1. Hücre Kültürü

4.1.1. Akciğer kanserinde hipoksik ve normoksik koşullar altında HIF1α'nın susturulmasının kolektif invazyona etkisi



Şekil 4.1. Normoksik ve hipoksik koşul altında gen hedeflemeyen kontrol olan scramble (Scr) RNA ile transfeksiyonu yapılmış (Normoksi ScrRNA, Hipoksi ScrRNA) ve hipoksik koşul altında geçici olarak siHIF1α ile susturulmuş (Hipoksi HIF1α-) A549 hücrelerinin yara kapanma deneylerinde zamana bağlı hücrelerin açıklığına göçü, sınır ölçümü ile ImageJ programı üzerinde kolektif invazyon çizgisi gösterimi.

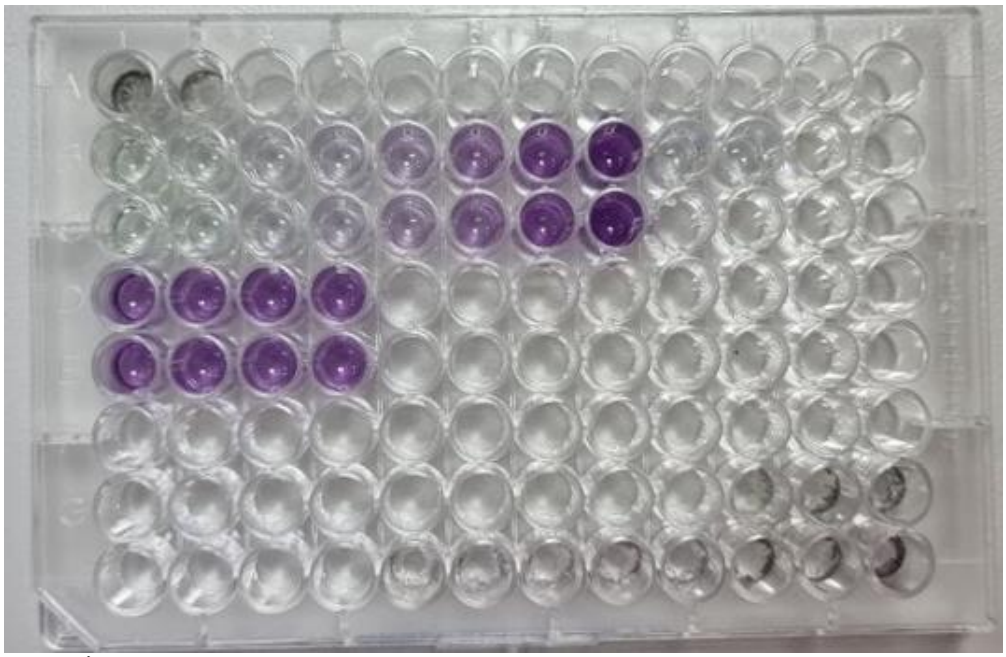
Yukarıda belirtilen koşullara göre başlangıç, 12. saat ve 24. saatlerde yarık açılan bölgelerin görüntüleri alınan A549 hücre hatlarındaki kolektif invazyon, ImageJ programında sınır uzunluk ölçümü yapılarak belirlendi (Şekil 4.1.). Elde edilen uzunluk verileri Graphpad programında grafiğe dönüştürüldü ve analizi yapıldı (Şekil 4.2.). Hipoksik koşulda 12. ve 24. saatlerde HIF1α'nın susturulmasıyla toplu hücre göçünün kontrole (Normoksi scrRNa) göre daha az olduğu görülmektedir.



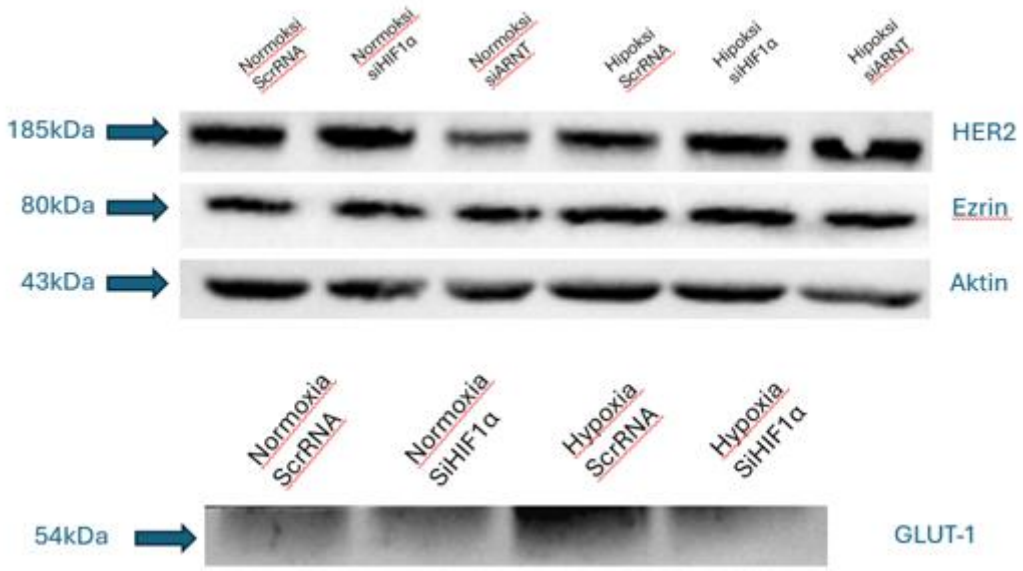
Şekil 4.2. ImageJ programının ölçüm sonuçlarına göre hipoksik koşullar altında kolektif invazyon düzeyi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldı

4.1.2. Hipoksik ve Normoksik koşullarda HIF1α ve HIF1ß genlerinin susturulmasının Western-Blot yöntemi ile kontrol edilmesi

Hipoksik ve normoksik koşulda transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerden 72. saat sonunda protein izole edildi. Elde edilen proteinlerin konsantrasyonları BCA yöntemiyle tayin edildi (Şekil 4.3).

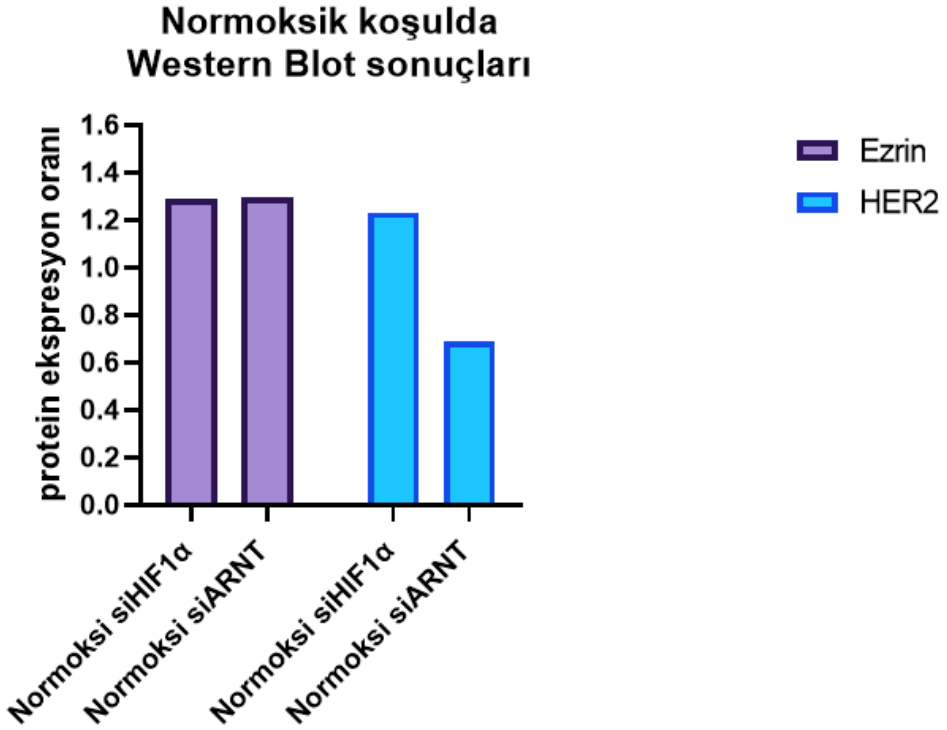


Şekil 4.3. İzole edilen proteinlerin BCA ile kolorimetrik ölçümü sonrası plateteki görüntüsü



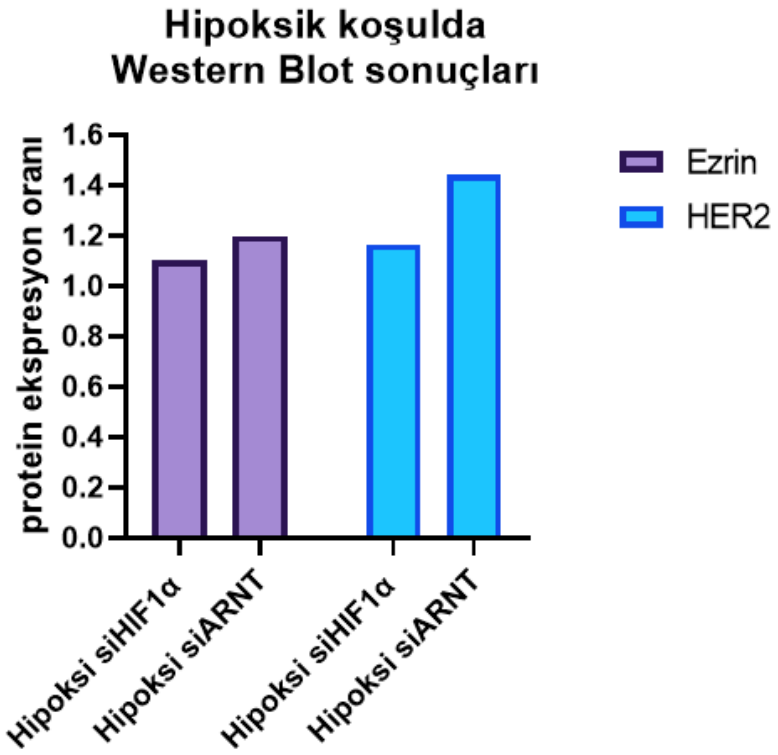
Şekil 4.4. Western Blot sonuçlarına A549 hücre hattında koşullara göre HER2 (185kDa), Ezrin (80kDa), GLUT-1 (54kDa) ve ß-Aktin (43kDa) in bant görüntüleri gösterilmiştir.

A549 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullar altında geçici olarak susturulan HIF1α ve HIF1ß, bu koşullardan elde edilen proteinler Western Blot yöntemiyle hipoksik yolak ya da kolektif invazyon ile ilişkili olduğu düşünülen antikorlar ile blotlaması yapılmıştır (Şekil 4.4.) ve elde edilen bant görüntüleri Graphpad programında bar grafiğine dönüştürülüp analizi yapılmıştır (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.).



Şekil 4.5. Normoksik koşulda scrRNA'ya göre normalize edilmiş Ezrin ve HER2 protein ekspresyonu seviyeleri

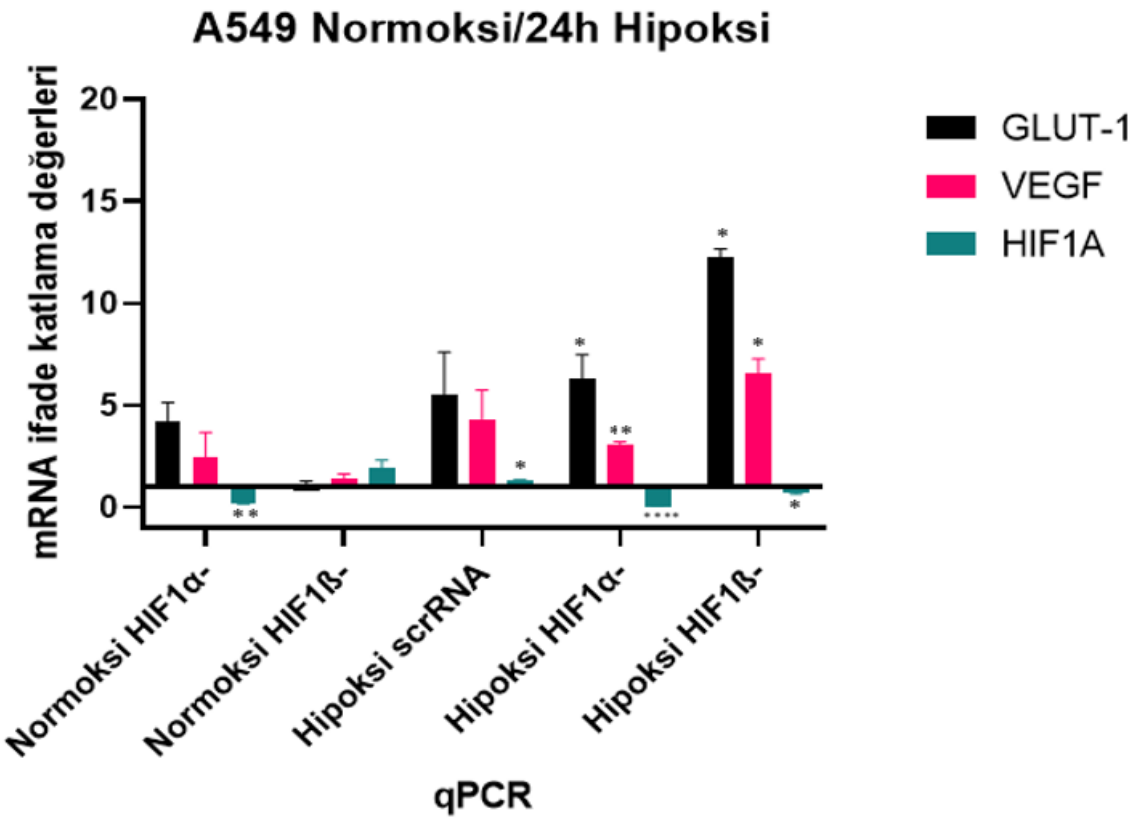
Normoksik koşulda HIF1α ve HIF1ß susturulmasıyla ezrin proteini ekspresyonu %29 artış gösterirken HER2, proteini ekspresyonu sırasıyla %23 artış ve %32 gibi belirgin bir azalış göstermiştir (Şekil 4.5.). Koşullar önce ß-actine göre normalize edilmiş olup daha sonra normoksik koşulda gen hedeflemeyen ve grubun kontrolü olan scramble rna (scrRNA)'ya göre normalize edilmiştir.



Şekil 4.6. Hipoksik koşulda scrRNA'ya göre normalize edilmiş Ezrin ve HER2 protein ekspresyonu seviyeleri

Hipoksik koşulda HIF1α ve HIF1ß susturulmasıyla ezrin proteini ekspresyonu sırasıyla %10 ve %20 artış gösterirken, HER2 protein ekspresyonu %16 ve %44 gibi belirgin bir artış göstermiştir (Şekil 4.6.). Koşullar önce ß-actine göre normalize edilmiş olup daha sonra hipoksik koşulda gen hedeflemeyen ve grubun kontrolü olan scramble rna (scrRNA)'ya göre normalize edilmiştir.

4.2. Hipoksik ve Normoksik koşullarda HIF1α ve HIF1ß transfeksiyonu sonrası GLUT-1, HIF1α ve VEGF mRNA ekpresyon sonuçları



Şekil 4.7. A549 hücrelerinde hipoksik ve normoksik koşullar altında HIF1α ve HIF1ß susturulmasının diğer gen ekspresyonlarına etkisi. Tüm koşullar 18s Normoksi scrRNA'ya göre normalize edilmiştir. ($p<0,05$)

Koşullara göre A549 hücre hattından izole edilen RNAlar, cDNA'ya dönüştürüldükten sonra Thermal cycler (Applied Biosystem, Seri no:7500, Cat. No: 4377354) cihazında qPCR analizi yapıldı. Alınan Ct (Cт) değerleri, delta Ct (ΔCт) ve delta delta Ct (ΔΔCт) olmak üzere hesaplandı. 2^- ΔΔCт formülüyle hesaplanan mRNA ifade katlama değerleri Graphpad programında anlamlı şekilde grafiğe döküldü (Şekil 4.7.). GLUT-1 ve VEGF'nin hipoksik koşuldaki mRNA ekspresyonlarında belirgin bir artış görülmektedir.

4.3. Tartışma

Çoğu kanser türünde lethal sonuçların ortaya çıkmasında kanserin ne kadar ilerlemiş olduğu ile doğru orantı vardır bu nedenle erken teşhis kanserin tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Kanserin hangi evrede olduğuna göre tedavi şekli kararlaştırılır ancak akciğer kanserinde de erken tanı konulabilmesi büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Çoğunlukla KHDAK son evrelere ulaşana kadar tespit edilememektedir. Başlangıç evrelerinde KHDAK teşhisi için biyobelirteç kullanılması ve devamlı olarak tarama yapılması çok önemlidir. Bilhassa akciğer kanserinde risk gruplarının taranarak erken teşhis ile tedavisi mümkün evrelerde tanısı konularak mortalite

oranını azaltılabilir. Akciğer kanserinde hedefe yönelik tanı ve tedavi arayışı günden güne önem kazanmaktadır.

Hem ülkemizde hem de Dünya'da görülme ve mortalite sıklığı en çok olan kanser türlerinin başında akciğer kanseri gelmektedir. Akciğer kanserinde sağ kalımı en çok etkileyen etkenlerin başında metastaz gelir. Kontrolsüz şekilde büyüyen tümör dokusu, kendisini besleyen damarlardan ve difüzyon yapacağı mikro çevreden maruz kalarak oksijensiz ve besinsiz kalır. Oksijen yokluğunda hücre içerisindeki Hipoksiyle İndüklenebilir Faktörler (HIF) aktive olur. Tanımlanmış olan üç HIFα homoloğundan biri olan HIF1α sitozolde birikerek dimerize olacağı HIF1ß ile nükleusa lokalize olur ve burada glukoz transportunu (GLUT), anjiyogenez mekanizmasını (VEGF) tetikler (Kierans and Taylor, 2021),. Aynı zamanda hipoksik kaskad sonucu Epidermal-Mezenkimal Geçiş (EMT) indüklenerek hücrelerin bulunduğu bölgeden amoeboid ya da kolektif olarak göçü başlatır. Tekli hücre göçünde hücrelerin tutunma şansı ve uyum sağlama şansı çoklu hücre göçüne göre bi hayli düşüktür. Bu sebeple çalışmada HIF1α ve HIF1ß'nın susturulmasıyla hipoksik koşul altında kolektif invazyona etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Hücre kültürü ortamı içerisinde spesifik kimyasallar kullanılarak hücreler üzerinde oluşacak olası hipoksi yanıtları tetiklenebilir. Örneğin, CoCl2 (Kobalt klorür) gibi ajanlar HIF-1α stabilize ederek hipoksi benzeri bir durumu simüle edebilir (Lu & Kang, 2010). Çalışmada hipoksik koşulda gerçekleştirilen transfeksiyonlarda ve oluşturulan yara kapanma modellerinde, kolektif invazyon ölçüm sonuçlarında net bir korelasyon görülmemiş olup bunun sebepleri arasında; yara görüntüsü almak için açılan hipoksi odacığı ile kısa süreli hipoksik koşulun bozulması, hipoksik koşulda hücre-hücre arası etkileşimin zayıflaması sonucu hücrelerin kolektiften ameboid geçişi ile toplu göç etmemesi, hipoksik koşula adapte olamayan hücrelerin kaybı, transfeksiyon uygulamalarında kullanılan lipid bazlı lipofektaminin toksisitesinin yüksek olması gibi nedenler yer alabilir.

HIF-1α, hipoksiden bağımsız sinyal yolları tarafından indüklenebildiğinden, mTOR, ERBB2 ve MAP/ERK kinaz (MEK) gibi yolları hedefleyen terapötik ajanlar da HIF-1α seviyesini düşürdü ve bu kısmen antitümör aktivitelerini açıklayabilir (Semenza, 2003).

HIF1α ve HIF1ß'nın normoksik ve hipoksik koşul altında susturulduğu açılan yara modelinde ImageJ programıyla sınır uzunluk ölçümü ile kolektif invazyon belirlenmiştir. HIF1α'nın susturulması ile 12. ve 24. saatte hücre göçünde azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$). Yapılan yara oluşturma modelinde hipoksik koşulda hücrelerde toplu hücre göçü gözlenmemiştir ($p>0,05$). Hipoksi, epitelyal kanser hücrelerinde kolektiften ameboid geçişine neden olduğu belirtilmiştir (Lehmann ve ark., 2017) .

Western Blot deneylerinde HIF1ß susturulduğunda HER2 ekspresyonu normoksik koşulda %32 azalırken, hipoksik koşulda %44 artış göstermiştir ($p<0,05$). MCF7'de HER2'nin aşırı ekspresyonu hipoksiyi arttırır, HIF-2α ve HIF hedef genlerinin upregülasyonunu sağlar (Jarman ve ark., 2019).

Ezrin proteinin A549 hücrelerinde kolektif invazyonla olan ilişkisi ezrinin susturulmasıyla kolektif invazyonun paralel olarak baskılanması önceki araştırmalarda gösterilmiştir (Derinöz, 2023). Bu çalışmada ise hem hipoksik hem de normoksik koşullar arasında ezrin ekspresyonunda belirgin bir fark görülememiştir ($p>0,05$).

GLUT-1 protein ekspresyonu smear görüntüden dolayı ImageJ programında anlamlı olarak nicel değere dönüştürülememiştir. Ancak normoksik koşulda kontrol olan scrRNA ve HIF1α susturulan koşul arasında GLUT-1 ekspresyon farkı görülmemişken; hipoksik koşulda kontrol olan scrRNA ve HIF1α susturulmuş koşul arasında, hipokside scrRNAda fazla glut ekspresyonu gözlenirken glukoz transportunu tetikleyen HIF1α susturulması sonucu GLUT-1 protein ekspresyonu seviyesinde azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$) Son çalışmalar, metastaz sürecinin ilk epitel-mezenkimal geçişten nihai organotropik kolonizasyona kadar her adımının potansiyel olarak hipoksi tarafından düzenlenebileceğini ve metastazda hipoksi ve HIF'lerin ana düzenleyici rolünü göstermektedir (Lu & Kang, 2010).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

a. Glut-1 ekspresyonunun hipoksik koşulda mRNA ve protein düzeyindeki artışı hipoksik koşulun hipoksi odacığıyla başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

b. Normokside kolektif invazyonun, hücre-hücre bağlarının zayıfladığı hipoksiye oranla daha fazla olduğu gösterilmiş olup, 24. saatte hipokside HIF1α susturulmuş koşuldaki invazyonun, yine hipokside kontrole oranla daha fazla toplu hücre göçü olduğu gösterilmiştir.

c. Hipoksik koşullar altında hücre-hücre matriks etkileşimleri azaldığından ve Gen susturma deneyleri ile desteklenen çalışmada, kullanılan ajanların toksisistesinden dolayı amoeboid göçün artmasıyla kolektif invazyonun gözlenmesi güçleşmiştir.

d. HIF1ß susturulduğunda HER2 ekspresyonu normoksik koşulda %32 azalırken, hipoksik koşulda %44 artış göstermiştir.

e. Hipoksik koşulda Glut-1 mRNA ifadesindeki artışla birlikte VEGF ifadesinde de artış gözlemlenmiştir. Hipokside HIF1α susturulmuş koşulda hipoksi kontrole oranla azalma gözlemlenmiştir.

5.2. Öneriler

a. Araştırmadan elde edilen bulgularla, benzer çalışmalar diğer KHDAK hücre hatlarında ve mümkünse primer hücre hatlarında da 2B (iki boyutlu) in-vitro olarak yapılmalı ve sonuçların karşılaştırılması gösterilmelidir.

b. Bu çalışmalarda 2B sonuçlar birbiriyle uyumlu olduğu anlaşılırsa, protein ya da gen düzeyinde deney 3B in-vitro hatta hayvan deneyleriyle in-vivo olarak desteklenebilir.

c. Hipoksik belirteçler, kolektif invazyona etki ettiği bilinen proteinler floresan boyama ile ya da immünohistokimya ile görsel olarak desteklenebilir.

d. Bütün bu bilgiler ışığında akciğer kanserinin hipoksideki agresifliğinin kolektif invazyon yönüyle daha iyi anlaşılması sağlanılarak alternatif biyobelirteçler üretilebilir.

KAYNAKLAR

Aggarwal, V., Montoya, C. A., Donnenberg, V. S., & Sant, S. (2021). Interplay between tumor microenvironment and partial EMT as the driver of tumor progression. *IScience*, *24*(2), 102113. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102113

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & 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*(6), 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Cheung, K. J., Gabrielson, E., Werb, Z., & Ewald, A. J. (2013). Collective Invasion in Breast Cancer Requires a Conserved Basal Epithelial Program. *Cell*, *155*(7), 1639–1651. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.029

Ciccone, G., Ibba, M. L., Coppola, G., Catuogno, S., & Esposito, C. L. (2023). The Small RNA Landscape in NSCLC: Current Therapeutic Applications and Progresses. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(7), 6121. https://doi.org/10.3390/ijms24076121

Depierre, A., Milleron, B., Moro-Sibilot, D., Chevret, S., Quoix, E., Lebeau, B., Braun, D., Breton, J.-L., Lemarié, E., Gouva, S., Paillot, N., Bréchot, J.-M., Janicot, H., Lebas, F.-X., Terrioux, P., Clavier, J., Foucher, P., Monchâtre, M., Coëtmeur, D., … Chastang, C. (2002). Preoperative Chemotherapy Followed by Surgery Compared With Primary Surgery in Resectable Stage I (Except T1N0), II, and IIIa Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *20*(1), 247–253. https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.1.247

Duma, N., Santana-Davila, R., & Molina, J. R. (2019). Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, *94*(8), 1623–1640. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013

Feld, R., Rubinstein, L. V, & Weisenberger, T. H. (1984). Sites of recurrence in resected stage I non-small-cell lung cancer: a guide for future studies. *Journal of Clinical Oncology*, *2*(12), 1352–1358. https://doi.org/10.1200/JCO.1984.2.12.1352

Guo, W., Chen, W., Yu, W., Huang, W., & Deng, W. (2013). Small interfering RNA-based molecular therapy of cancers. *Chinese Journal of Cancer*, *32*(9), 488–493. https://doi.org/10.5732/cjc.012.10280

Harpole, D. H., Herndon, J. E., Glenn Young, W., Wolfe, W. G., & Sabiston, D. C. (1995). *Stage I Nonsmall Cell Lung Cancer A Multivariate Analysis of Treatment Methods and Patterns of Recurrence*.

Itani, R., & Al Faraj, A. (2019). siRNA Conjugated Nanoparticles—A Next Generation Strategy to Treat Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23), 6088. https://doi.org/10.3390/ijms20236088

Jha, S. K., De Rubis, G., Devkota, S. R., Zhang, Y., Adhikari, R., Jha, L. A., Bhattacharya, K., Mehndiratta, S., Gupta, G., Singh, S. K., Panth, N., Dua, K., Hansbro, P. M., & Paudel, K. R. (2024). Cellular senescence in lung cancer: Molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Ageing Research Reviews*, *97*, 102315. https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102315

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1420–1428. https://doi.org/10.1172/JCI39104

Kierans, S. J., & Taylor, C. T. (2021). Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *The Journal of Physiology*, *599*(1), 23–37. https://doi.org/10.1113/JP280572

Kodama, K., Higashiyama, M., Okami, J., Tokunaga, T., Imamura, F., Nakayama, T., Inoue, A., & Kuriyama, K. (2016). Oncologic Outcomes of Segmentectomy Versus Lobectomy for Clinical T1a N0 M0 Non-Small Cell Lung Cancer. *The Annals of Thoracic Surgery*, *101*(2), 504–511. https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2015.08.063

Kouvaras, E., Christoni, Z., Siasios, I., Malizos, K., Koukoulis, G. K., & Ioannou, M. (2019). Hypoxia-inducible factor 1-alpha and vascular endothelial growth factor in cartilage tumors. *Biotechnic & Histochemistry*, *94*(4), 283–289. https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1556806

Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *752*(1), 10–24. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.08.001

Loschke, F., Homberg, M., & Magin, T. M. (2016). Keratin Isotypes Control Desmosome Stability and Dynamics through PKCα. *Journal of Investigative Dermatology*, *136*(1), 202–213. https://doi.org/10.1038/JID.2015.403

Lu, X., & Kang, Y. (2010). Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Metastasis. *Clinical Cancer Research*, *16*(24), 5928–5935. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1360

Ma, Z., Wong, S. W., Forgham, H., Esser, L., Lai, M., Leiske, M. N., Kempe, K., Sharbeen, G., Youkhana, J., Mansfeld, F., Quinn, J. F., Phillips, P. A., Davis, T. P., Kavallaris, M., & McCarroll, J. A. (2022). Aerosol delivery of star polymer-siRNA nanoparticles as a therapeutic strategy to inhibit lung tumor growth. *Biomaterials*, *285*, 121539. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121539

Maghfoor, I., & Perry, M. C. (2005). Lung Cancer. *Annals of Saudi Medicine*, *25*(1), 1–12. https://doi.org/10.5144/0256-4947.2005.1

Mayor, R., & Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(2), 97–109. https://doi.org/10.1038/nrm.2015.14

Quan, Q., Wang, X., Lu, C., Ma, W., Wang, Y., Xia, G., Wang, C., & Yang, G. (2020). Cancer stem-like cells with hybrid epithelial/mesenchymal phenotype leading the collective invasion. *Cancer Science*, *111*(2), 467–476. https://doi.org/10.1111/cas.14285

Ramalingam, S. S., Owonikoko, T. K., & Khuri, F. R. (2011). Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *61*(2), 91–112. https://doi.org/10.3322/caac.20102

Sanz-Moreno, V., & Marshall, C. J. (2010). The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(5), 690–696. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.020

Saxena, K., Jolly, M. K., & Balamurugan, K. (2020). Hypoxia, partial EMT and collective migration: Emerging culprits in metastasis. *Translational Oncology*, *13*(11), 100845. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100845

Seltmann, K., Roth, W., Kröger, C., Loschke, F., Lederer, M., Hüttelmaier, S., & Magin, T. M. (2013). Keratins Mediate Localization of Hemidesmosomes and Repress Cell Motility. *Journal of Investigative Dermatology*, *133*(1), 181–190. https://doi.org/10.1038/jid.2012.256

Semenza, G. L. (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology*, *13*(2), 167–171. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00194-0

Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *3*(10), 721–732. https://doi.org/10.1038/nrc1187

Semenza, G. L. (2019). Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *59*(1), 379–403. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021637

Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *74*(1), 12–49. https://doi.org/10.3322/caac.21820

Tian, X.-J., Zhang, H., & Xing, J. (2013). Coupled Reversible and Irreversible Bistable Switches Underlying TGFβ-induced Epithelial to Mesenchymal Transition. *Biophysical Journal*, *105*(4), 1079–1089. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.011

Weber, G. F., Bjerke, M. A., & DeSimone, D. W. (2012). A Mechanoresponsive Cadherin-Keratin Complex Directs Polarized Protrusive Behavior and Collective Cell Migration. *Developmental Cell*, *22*(1), 104–115. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.013

Wu, Q., You, L., Nepovimova, E., Heger, Z., Wu, W., Kuca, K., & Adam, V. (2022). Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape. *Journal of Hematology & Oncology*, *15*(1), 77. https://doi.org/10.1186/s13045-022-01292-6

Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A.-K., Huang, R. Y. J., Kalcheim, C., … Sheng, G. (2020).

Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(6), 341–352. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9

Ye, X., Tam, W. L., Shibue, T., Kaygusuz, Y., Reinhardt, F., Ng Eaton, E., & Weinberg, R. A. (2015). Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature*, *525*(7568), 256–260. https://doi.org/10.1038/nature14897

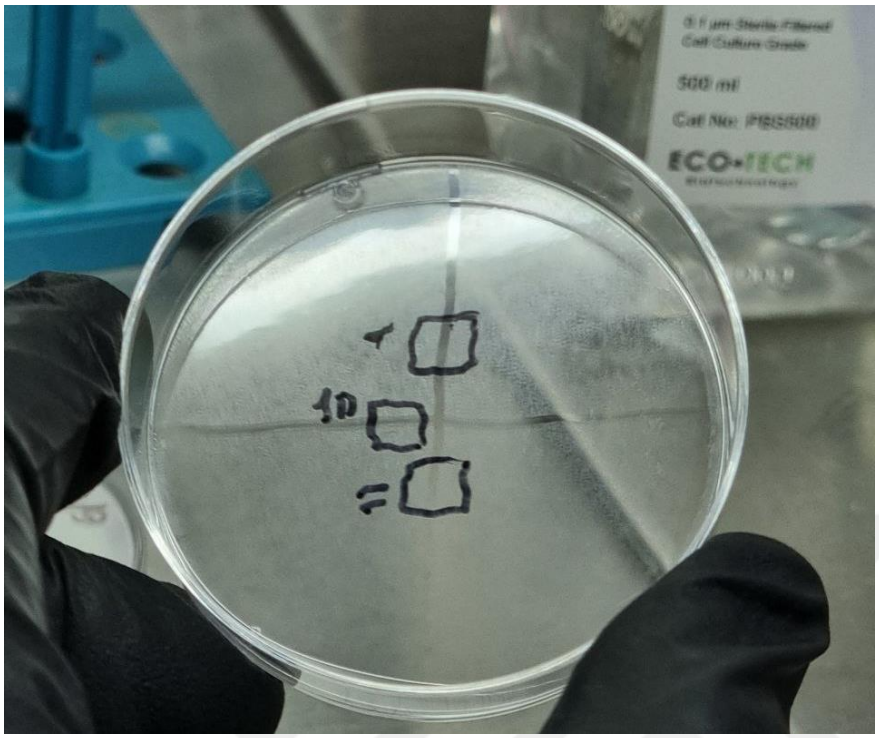
Zhang, J., Tian, X.-J., Zhang, H., Teng, Y., Li, R., Bai, F., Elankumaran, S., & Xing, J. (2014). TGF-β–induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. *Science Signaling*, *7*(345). https://doi.org/10.1126/scisignal.2005304

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Yağız ÇAPANOĞLU. İlk ve orta öğrenimini Adana'da tamamlamıştır. 2014 yılında İsmail Safa Özler Anadolu Lisesi'nden mezun olmuştur. 2019 yılında Üsküdar Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (İngilizce) programını tamamlamıştır. 2021 yılı Eylül ayında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına başladı ve öğrenimine devam etmektedir.

EKLER

Ek-1: Yarık oluşturulan platelerin, farklı saatlerde aynı yerden görüntü alınması için işaretlenmesi ve yarığın gösterimi.



Ek-2: Hücrelerin hipoksi odacığına alınması

