



**BAŞ-BOYUN KANSERİ HÜCRELERİNDE SALL4
GENİNİN DİRENÇ GENLERİ İLE OLAN
İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arzugöl TANAS YILMAZ

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Adem KARA**

**2025
Her hakkı saklıdır.**



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**BAŞ-BOYUN KANSER HÜCLERİNDE SALL4 GENİNİN DİRENÇ GENLERİ
İLE OLAN İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arzugöl TANAS YILMAZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adem KARA

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2025

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**BAŞ-BOYUN KANSER HÜCLERİNDE SALL4 GENİNİN DİRENÇ GENLERİ
İLE OLAN İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Adem KARA danışmanlığında, Arzugül TANAS YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 11 / 09 / 2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **Oy birliği ile (5/5)** kabul edilmiştir.

Başkan	: Doç. Dr. Seçkin ÖZKANLAR	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. Adem KARA	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Kübra SOLAK	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ
Enstitü Müdürü

*Bu tez çalışması TUBİTAK tarafından 124Z890 nolu proje ile desteklenmiştir.

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.

11 / 09 / 2025

İmzası

Arzugül TANAS YILMAZ

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BAŞ-BOYUN KANSER HÜCLERİNDE SALL4 GENİNİN DİRENÇ GENLERİ İLE OLAN İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Arzugöl TANAS YILMAZ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Adem KARA

Sal benzeri protein 4 (SALL4), embriyonik kök hücrelerinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür ancak baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlar da (BBSHK) dahil olmak üzere kanser hücrelerinde aşırı ifade edildiği ve kanser gelişimi, ilerlemesi ve metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu tez çalışmasında SALL4 geninin BBSHK’de ilaç direnci gelişimi veya direnç geliştirilmiş hücreler üzerindeki etkilerinin aydınlatılması hedeflenmiştir. Çalışmamızda FaDu hücreleri normal ve ilaç direnci geliştirilmiş formlarda kullanılmış ve deneyler pozitif kontrol grubu, inhibisyon grubu, PTX uygulanan grup, hem inhibisyon hem de ilaç uygulaması yapılan grup ve negatif kontrol grubu olmak üzere 6 grup üzerinden yürütülmüştür. Hem normal hem de ilaç direnci geliştirilmiş hücrelerde SALL4 inhibisyonu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) ve Western Blot (WB) ile kontrol edilmiş ardından SALL4 geninin direnç genleriyle olan ilişkisi moleküler genetik analizler ile detaylandırılmış. Daha sonra hücre hatlarında hücre döngüsü, hücre migrasyonu ve apoptotik durum incelenmiştir. Analiz sonuçlarında SALL4’ün her iki hücre hattında da başarıyla inhibe edildiği ayrıca, SALL4 baskılanmasının PTX’in apoptozu artırıcı etkisini güçlendirdiği, hücre döngüsü üzerine antiproliferatif etki yaptığı ve özellikle dirençli hücrelerde PTX ile birlikte uygulandığında sinerjik etki oluşturduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulguların, BBSHK’de yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine ve hastaların tedaviye daha iyi yanıt vermesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

2025, 105 sayfa

Anahtar Kelimeler: Baş-boyun kanseri, SALL4 geni, İlaç direnci, Kemoterapi.

ABSTRACT

Ph.D

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIPS OF THE SALL4 GENE WITH RESISTANCE GENES IN HEAD AND NECK CANCER CELLS

Arzugül TANAS YILMAZ

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

Supervisor: Prof. Dr. Adem KARA

Sal-like protein 4 (SALL4) is a transcription factor found in embryonic stem cells, but it has been shown to be overexpressed in cancer cells, including head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), and is associated with cancer development, progression, and metastasis. Therefore, this thesis study aimed to elucidate the effects of the SALL4 gene on drug resistance development or resistance-developed cells in HNSCC. In our study, FaDU cells were used in normal and drug-resistant forms, and experiments were conducted on 6 groups, namely positive control group, inhibition group, PTX-applied group, both inhibition and drug-applied group, and negative control group. SALL4 inhibition in both normal and drug-resistant cells was checked with real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western Blot (WB), and then the relationship between the SALL4 gene and resistance genes was detailed with molecular genetic analyses. Then, cell cycle, cell migration, and apoptotic status were examined in cell lines. The analysis results showed that SALL4 was successfully inhibited in both cell lines, and that SALL4 suppression strengthened the apoptosis-increasing effect of PTX; had an antiproliferative effect on the cell cycle, and created a synergistic effect when applied together with PTX, especially in resistant cells. It is thought that the findings obtained may help develop new therapeutic strategies in HNSCC and help patients respond better to treatment.

2025, 105 Page

Keywords: Head and neck cancer, SALL4 gene, drug resistance, chemotherapy.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam için bana daima yardımcı olan ve yol gösteren, desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Adem KARA'ya ve çalışma grubuna,

Eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen bütün Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Lisansüstü eğitimim boyunca hoşgörü ve sabırla her konuda bana destek olan, dostluğu ve yardımseverliği ile her zaman yanımda olan Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı doktora öğrencisi Tuğba GEZMİŞ'e

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, desteklerini ve sevgilerini benden esirgemeyen aileme ve sevgili eşim Yunus Emre YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arzugül TANAS YILMAZ
Ağustos 2025

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.2. Baş-Boyun Kanserleri	2
1.2.1. Baş-boyun kanserlerinin epidemiyolojisi	4
1.2.2. Baş-boyun kanserlerinde bazı risk faktörleri	5
1.2.3. Baş-boyun kanserlerinin klinik belirtileri	7
1.2.4. Baş-boyun kanserlerinin genetik yapısı	8
1.2.5. Baş-boyun kanserlerinde tedavi	10
1.2.6. Baş-boyun kanserlerinde ilaç direnç mekanizması	11
1.3. SALL4 (Sal Benzeri Protein 4) Geni	13
1.3.1. SALL4 geninin kanserdeki rolü	16
1.4. RNA İnterferaz	21
1.5. Paklitaksel (PTX)	22
2. KAYNAK ÖZETLERİ	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM	29
3.1. Materyaller	29
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Hücre kültürü	31
3.2.2. Doz ayarlaması	32
3.2.3. Direnç oluşturma	33
3.2.4. Gen baskılanması	33
3.2.5. Sitotoksosite testi	34
3.2.6. Apoptoz	35

3.2.7. Hücre döngüsü	35
3.2.8. Hücrelerin göç yeteneklerinin değerlendirilmesi	36
3.2.9. Moleküler analizler	37
3.2.10. Western blot	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	45
4.1. Hücrelerin Göç Yeteneklerinin Değerlendirilmesi	45
4.1.1. Normal FaDu hücre hattında göç yeteneği.....	45
4.1.2 Dirençli FaDu hücre hattında göç yeteneği.....	48
4.2 MTT Analizi.....	51
4.3 Apoptoz Analizi	52
4.4. Hücre Döngüsü Analizi.....	55
4.5 Moleküler Genetik Yanıtlar	57
4.3. Western Blotlama Analizi	82
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	86
KAYNAKLAR	92

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

°	Derece
C	Çevrim zamanı (dakika)
EB_{ij}	İşlemin en erken başlama zamanı
g	Yerçekimi ivmesi
K	Kelvin
m	Metre
P	Basınç

Kısaltmalar

BBSHK	Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom
SHK	Skuamöz Hücreli Karsinom
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
EBV	Epstein Barr Virüsü
HCV	Hepatit C Virüsü
Rb	Retinoblastoma
LOH	Heterozigotluk Kaybı
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
PTEN	Protein Tirozin Fosfotaz ve Tensinhomoloğu
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
OSHK	Oral Skuamöz Hücreli Karsinom
SALL4	Sal Benzeri Protein 4
EKH	Embriyonik Kök Hücrelerin
iPC	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
RNAi	RNA İnterferans
RISC	RNA kaynaklı susturma kompleksi
siRNA	Küçük İnterferans RNA
PTX	Paklitaksel
FaDu	Farinks Kanseri Hücre Hattı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.2. Baş-boyun kanserlerinin bölgeleri (Ekizoğlu Eratak 2016)	3
Şekil 1.3. SALL4 geninin izoformları (Tatetsu vd. 2016).....	14
Şekil 1.4. SALL4 geninin PTEN/PI3K/AKT sinyal yolundaki mekanizması (Sun vd. 2022).	18
Şekil 1.5. SALL4 geninin Wnt/ β -katenin sinyal yolundaki mekanizması (Sun vd. 2022).	19
Şekil 1.6. siRNA aracılı RNAi mekanizması (Raja vd. 2019)	22
Şekil 1.7. PTX (Şener 2000)	23
Şekil 3.1. Normal hat FaDu hücreleri (10x)	31
Şekil 3.2. PTX Direnci oluşturulmuş FaDu hücreleri (10x)	32
Şekil 4.1. Şekil FaDu hücre hattı kontrol grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.....	45
Şekil 4.2. FaDu hücre hattı siRNA grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.	45
Şekil 4.3. FaDu hücre hattı siRNA kontrol grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.	46
Şekil 4.4. FaDu hücre hattı PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.	46
Şekil 4.5. FaDu hücre hattı siRNA+PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.....	46

Şekil 4.6. FaDu hücre hattı siRNA kontrol +PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.	47
Şekil 4.7 Normal FaDu hücre hattında göç hızı (%).	47
Şekil 4.8. Şekil FaDu hücre hattı kontrol grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.	48
Şekil 4.9. FaDu hücre hattı siRNA grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.	49
Şekil 4.10. FaDu hücre hattı siRNA kontrol grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.	49
Şekil 4.11. FaDu hücre hattı PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.	49
Şekil 4.12. FaDu hücre hattı siRNA+PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.	50
Şekil 4.13. FaDu hücre hattı siRNA Kontrol +PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.	50
Şekil 4.15. FaDu hücre hattında SALL4 Gen inhibisyonunun sitotoksik etkisi.....	51
Şekil 4.16. Dirençli FaDu hücre hattında SALL4 gen inhibisyonunun sitotoksik etkisi	52
Şekil 4.17. Normal FaDu hücre hattında apoptoz analizi	53
Şekil 4.18. Dirençli FaDu hücre hattında apoptoz analizi	54
Şekil 4.19. normal fadu hücre hattında hücre döngüsü analizi	56

Şekil 4.20. Dirençli FaDu hücre hattında hücre döngüsü analizi	56
Şekil 4.21. FaDu hücre hattında SALL4 geninin ekspresyon düzeyi	58
Şekil 4.22. PTX dirençli FaDu hücre hattında SALL4 geninin ekspresyon düzeyi	59
Şekil 4.23. FaDu hücre hattında MDR1 geninin ekspresyon düzeyi.....	60
Şekil 4.24. PTX dirençli FaDu hücre hattında MDR1 geninin ekspresyon düzeyi	61
Şekil 4.25. FaDu HÜCRE HATTINDA LRP1 geninin ekspresyon düzeyi	62
Şekil 4.26. PTX dirençli FaDu hücre hattında lrp1 geninin ekspresyon düzeyi.....	63
Şekil 4.27. FaDu hücre hattında cMOAT geninin ekspresyon düzeyi	64
Şekil 4.28. PTX Dirençli FaDu hücre hattında cMOAT geninin ekspresyon düzeyi.....	65
Şekil 4.29. FaDu hücre hattında mTOR geninin ekspresyon düzeyi.....	66
Şekil 4.30. PTX dirençli FaDu hücre hattında mTOR geninin ekspresyon düzeyi	67
Şekil 4.32. PTX dirençli FaDu hücre hattında PIK3CA geninin ekspresyon düzeyi	69
Şekil 4.33. FaDu hücre hattında AKT3 geninin ekspresyon düzeyi.....	70
Şekil 4.36. PTX dirençli FaDu hücre hattında EGFR geninin ekspresyon düzeyi	73
Şekil 4.37. FaDu hücre hattında PTEN geninin ekspresyon düzeyi.....	74
Şekil 4.38. PTX Dirençli FaDu hücre hattında PTEN geninin ekspresyon düzeyi	75
Şekil 4.39. FaDu hücre hattında PARP1 geninin ekspresyon düzeyi.....	76
Şekil 4.40. PTX dirençli FaDu hücre hattında PARP1 geninin ekspresyon düzeyi	77
Şekil 4.41. FaDu hücre hattında CDK2 geninin ekspresyon düzeyi	78
Şekil 4.42. PTX dirençli FaDu hücre hattında CDK2 geninin ekspresyon düzeyi.....	79
Şekil 4.43. FaDu hücre hattında CDK4 geninin ekspresyon düzeyi	80
Şekil 4.44. PTX dirençli FaDu hücre hattında CDK4 geninin ekspresyon düzeyi.....	81
Şekil 4.45. FaDu hücre hattında SALL4 ve MDR1 protein ifadeleri. Normal FaDu hücrelerinde uygulamalar sonrasında MDR1 ve SALL4 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri, western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Bant yoğunlukları kantitatif olarak analiz edilmiş ve istatistiksel değerlendirme One-Way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapılmıştır. *P < 0.05, **P < 0.01, ns: istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiştir.	82
Şekil 4.46. PTX Dirençli FaDu hücre hattında SALL4 ve MDR1 protein ifadeleri. dirençli FaDu hücrelerinde uygulamalar sonrasında MDR1 ve SALL4 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri, western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Bant yoğunlukları kantitatif olarak analiz edilmiş ve istatistiksel değerlendirme One-Way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile	

yapılmıştır. *P < 0.05, **P < 0.01, ns: istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiştir.....84



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Baş ve boyun kanserleri için muhtemel risk faktörleri.....	5
Çizelge 1.2. Baş ve boyun kanseri belirtileri	8
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan kit ve kimyasal listesi.....	29
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan cihaz listesi	30
Çizelge 3.3. Çalışma grupları.....	32
Çizelge 3.4. Mix karışım hacimleri	33
Çizelge 3.5. Çalışmada hedef alınan genler	40
Çizelge 3.6. Ayırma jeli hazırlanması.....	42
Çizelge 3.7. Yürütme jeli hazırlanması.....	42

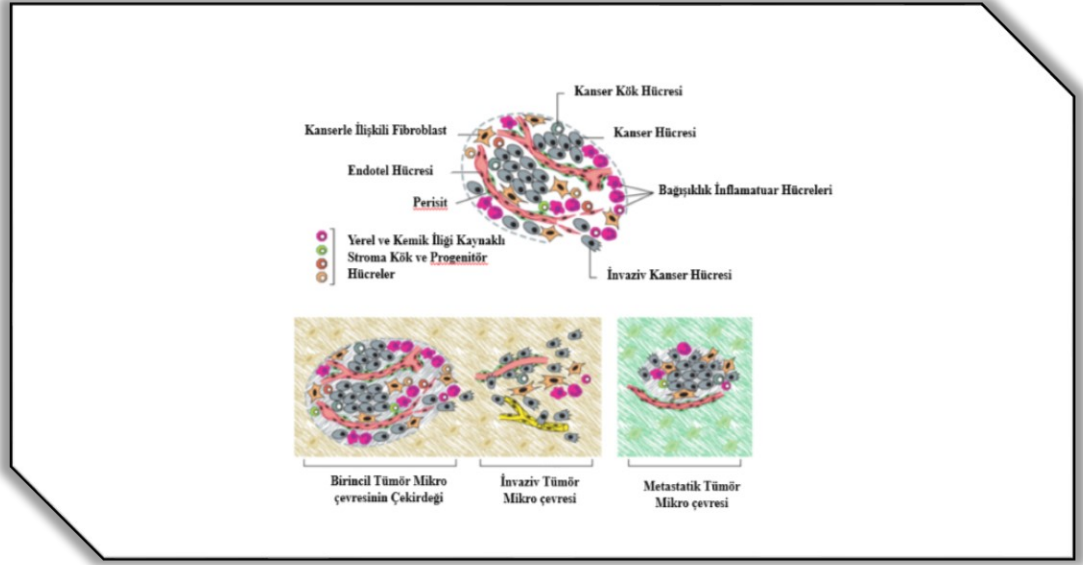
1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser genellikle yaşamı tehdit eden, başlangıcı ve kontrol edilemeyen yapısıyla daha da kötüleşen travmatik bir hastalık olarak algılanmaktadır (Bergerot vd. 2015). Birçok kanser hastası için, kanser tanısı almak ve tedavi görmek, duygusal sıkıntı, depresyon, anksiyete, uyku sorunları, yorgunluk ve yaşam kalitesinin bozulması gibi uzun süreli olumsuz psikolojik sonuçlara neden olan son derece stresli bir dönemdir.

Kanser insidansı ve ölüm oranı dünya çapında hızla artmaktadır; bu hem nüfusun yaşlanmasını ve büyümesini hem de kanser için ana risk faktörlerinin örneğin sosyoekonomik değişiklikler gibi nedenlerin yaygınlığındaki ve dağılımındaki değişiklikleri yansıtmaktadır (Gersten ve Wilmoth 2002). Kanser, dünyanın her ülkesinde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre, 183 ülkenin 112'sinde 70 yaşından önce ölümün birinci veya ikinci önde gelen sebebi iken 23 ülkede üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır (Sung vd. 2021).

Normalde hücreler, hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki dengeyi korumak için komşu hücrelerle iletişim kurarken kanser durumunda denge bozulmakta ve hücre herhangi bir kontrol olmaksızın büyümeye başlamaktadır. Yapılan birçok araştırma ile kanserdeki kontrolsüz büyümeden genetik hasarların sorumlu olduğu ortaya konulmuştur. Genetik mutasyonlar nedeniyle, normal hücre bölünmesi, apoptoz ve çoğalma hızını kontrol eden birçok düzenleyici sistem anormal şekilde hareket etmeye başlamakta ve düzenleyicilerin anormal işlevi, kontrolsüz çoğalmaya neden olan birçok diğer genin ifadesine neden olmaktadır (Nenclares ve Harrington 2020). Çoklu stromal hücre tipleri, tümörler normal dokuyu istila edip daha sonra uzak dokulara yerleşip kolonileştikçe değişen bir tümör mikro ortamları dizisini oluşturmaktadır. Birincil ve metastatik bölgelerin çevresindeki normal hücreler, muhtemelen çeşitli neoplastik mikro ortamların (Şekil 1.1) karakterini de etkilemektedir (Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 1.1. Tümör Mikroçevresinin Hücreleri (Hanahan ve Weinberg 2011)

Kanserin önlenmesi için çeşitli tanı ve tedavi yöntemleri geliştirilmiş olsa da, tümör hücrelerinin antikanser ilaçlarına direnci de evrimleşmiş ve tümörlerin zor genetik ve epigenetik profili immünoterapiye direnç oluşturmaktadır (E. S. Ali vd. 2021). Geleneksel kemoterapi kanser tedavisinde bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmiştir, ancak bazı sınırlamalar son yıllarda yeni yöntemlerin araştırılmasını gerektirmektedir (Zugazagoitia vd. 2016; Farran vd. 2019). Özellikle kanser hücrelerindeki çoklu mekanizmaları hedef alan bu terapiler arasında proliferasyonun inhibisyonu, apoptozis indüksiyonu, metastaz ve anjiyogenezisin sınırlandırılması, bağışıklık fonksiyonunun düzenlenmesi ve çoklu ilaç direncinin tersine çevrilmesi yer almaktadır (Giodini vd. 2017; Whittaker vd. 2017). Ancak kanser tedavisindeki başlıca engeller tümör heterojenliğinden, ilaç direncinden ve sistemik toksisitelerden kaynaklanmaktadır (Krishnaswamy ve Orsat 2017). Yeni kemoterapötik rejimler de dahil olmak üzere teşhis ve tedavideki araştırmaların ilerlemesine rağmen kanser ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir.

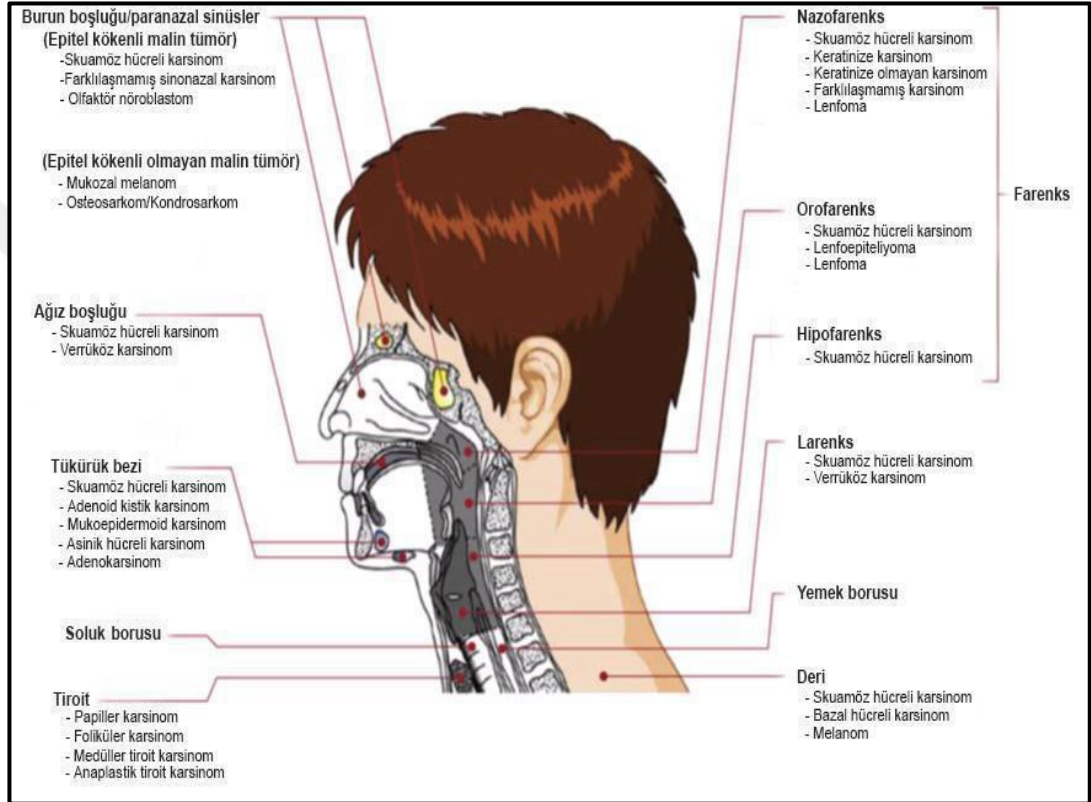
1.2. Baş-Boyun Kanseri

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlar (BBSHK) genellikle ağız, dudaklar, burun, sinüsler, gırtlak ve boğazı etkileyen (Şekil 1.2) hem genetik hem de epigenetik olayları içeren heterojen ve çok faktörlü bir hastalıktır (Boscolo-Rizzo vd. 2016;

1. GİRİŞ

Nakagawa vd. 2017). Dünya genelinde en sık karşılaşılan kanser türleri sıralamasında altıncı sırada yer alan baş-boyun kanserleri, yaklaşık %90'ı epitel dokudan kaynaklanan skuamöz hücreli karsinomlardır (Stadler vd. 2008; Yakicier 2010).

BBSHK'nin en yaygın türü, üst solunum-sindirim sisteminin (yani ağız boşluğu, farenks ve gırtlak) epitelyal hücre astarında gelişen, sıklıkla ölümcül olan formudur (Leemans vd. 2011).



Şekil 1.2. Baş-boyun kanserlerinin bölgeleri (Ekizoğlu Eratak 2016)

İşlevsel olarak baş-boyun bölgesi yapıları, beslenme ve solunum gibi hayati öneme sahip olmalarının yanı sıra, kişinin dış dünyayı algılamasını ve sosyal yaşamını sürdürmesini de sağlamaktadır. Ayrıca hem tümörün bölgesel yayılımı hem de uygulanan tedavilerinin oluşturabileceği istenmeyen etkiler hastaların günlük hayatlarında aksaklıklar ortaya çıkarabilmekte ve yaşam kalitesini düşürmektedir.

1.2.1. Baş-boyun kanserlerinin epidemiyolojisi

Baş-boyun kanserleri tüm kanserlerin %6'sını oluşturmaktadır ve kanser nedenli ölümlerin %1-2'sidir (Torre vd. 2015). Dünya genelinde 2018 yılında baş ve boyun kanseri 890,000 yeni teşhis ve 450,000 ölüm ile sonuçlanan vaka bildirilmiştir (Bray vd. 2018). Ağız boşluğu ve farenks neoplazmaları (ağız, orofarenks, nazofarenks, hipofarenks ve belirtilmemiş farenks kanserleri dahil) dünya çapında 7. en sık görülen kanser çeşidi ve kanserli ölümlerin 9. nedeni olduğu bildirilmiştir. Ağız boşluğu ve farenks kanserlerinin yılda yaklaşık 710.000 yeni vaka ve 359.000 ölüme neden olduğu bilinmektedir (Bosetti vd. 2020). Baş ve boyun kanserleri arasında olan laringeal skuamöz hücreli karsinom ise dünya çapında yılda 211.000 yeni vaka ve 126.000 ölüme neden olan 2. en yaygın karsinom olduğu bildirilmiştir (Bradley 2016; Aupérin 2020).

Diğer kanser çeşitleri arasında, bölgelere göre %5 ile 40 arasında farklılık göstermekte olup, Hindistan ve Sri Lanka en sık tanının konulduğu bölgelerdir (Ajayi vd. 2007). Avrupa'da ise ağız kanseri riskinin en yüksek olduğu ülkeler Fransa ve Macaristan, en düşük risk oranları ise Yunanistan ve Kıbrıs'tadır (Warnakulasuriya 2009). Dünya genelinde baş-boyun kanserlerinin görülme riski ve anatomik dağılımındaki bu farklılığın coğrafi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı ve bu duruma demografik özelliklerin farklı olmasının neden olduğu düşünülmektedir (Üçebakan ve Alim 2021).

Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm kanserlerin yaklaşık %3'ünü baş-boyun kanserleri oluşturmaktadır ve erkeklerde kadınlara oranla yaklaşık 2 kat daha fazla görülmektedir. Amerikan Klinik Onkoloji Derneğinin 2019 kanser istatistik verilerine göre yeni tanı alan oral kavite kanserli hasta sayısının yaklaşık 35000, larinks hastalarının ise bunun yaklaşık üçte biri kadar olduğu bildirilmiştir. Batı toplumlarında larinks kanser sıklığı düşme eğiliminde iken orofarinks kanseri artmaktadır (Jemal vd. 2010).

Türkiye'de ise baş-boyun kanserleri içinde en sık larenks kanserine rastlanmaktadır ve baş-boyun kanserleri daha çok erkeklerde görülmektedir. Ölümle sonuçlanan seyri nedeniyle larenks ve ağız boşluğu kanserleri önem taşımaktadır. Türkiye'deki larenks kanseri sıklığının oranı % 2,7 ve mortalite oranı %1,9, ağız boşluğu kanseri oranı %1,7 ve mortalite oranı %1, nazofarenks kanseri insidans oranı %0,6 ve

1. GİRİŞ

mortalite oranı %0,5, hipofarenks kanserinde ise sıklık %0,3 ve mortalite oranı %0,3 olarak bildirilmektedir (Ferlay vd. 2004; 2010).

1.2.2. Baş-boyun kanserlerinde bazı risk faktörleri

Baş-boyun kanserleri, genel olarak genetik yatkınlık ve yaşam tarzı nedeniyle karsinojenlere maruz kalma sonucunda çevresel faktörlerin de oluşturduğu birçok kombinasyon sonucu meydana gelmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Baş ve boyun kanserleri için muhtemel risk faktörleri

Genetik	Fiziksel Etkenler
Cinsiyet	Hormonal Faktörler
Sigara	Kronik Burun Enfeksiyonları
Beslenme	Güneş Işınları
Viral Enfeksiyonlar	Aile öyküsü
Ağız Sağlığı	Toksik Gazlar
Radyasyon	Tütün Çiğneme
Alkol Alışkanlığı	Uyumsuz Protez Kullanımı
İleri yaş	Mesleki Maruziyet

Sigara ve Alkol

Baş-boyun kanserleri için en önemli risk faktörlerinin başında alkol ve sigara kullanımı gelmektedir çünkü özellikle ağız boşluğu, orofarenks, hipofarenks ve larenks kanserlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Blot vd. 1988; Boffetta vd. 2008; Gandini vd. 2008). Ayrıca sigara ve alkolün birlikte kullanımının daha büyük bir risk oluşturduğu, kanser olasılığının 5 kat arttığı belirtilmiştir (Benito vd. 2019). Baş-boyun kanserli kişiler tütün ya da alkol içmeye devam ettiklerinde tedaviye yanıtın azaldığı, yaşam sürelerinin kısaldığı ve hayat kalitesinin düştüğü rapor edilmiştir (Stevens vd. 1983). Ayrıca bu risk faktörlerinin kullanımının devam ettiği kanser hastalarında ikinci bir primer kanser gelişiminin ortaya çıkma riski daha yüksektir (Do vd. 2003).

Yaş

1. GİRİŞ

Tüm kanser olgularında olduğu gibi baş-boyun kanserlerinde de yaşla görülme sıklığı artmaktadır ve hastaların büyük çoğunluğu 50 yaşın üstündedir. 2016 TÜİK Kanser verilerine göre erkeklerde 50-54 yaşlarda ağız ve farenks kanseri görülme sıklığı 45-49 yaş aralığına göre yaklaşık 2 kat artış göstermektedir. Ayrıca hem kadınlarda hem de erkeklerde yaş arttıkça ağız ve farenks kanser riski de artma eğilimindedir (Üçebakan ve Alim 2021)

Viral Enfeksiyonlar

Epstein Barr virüsü (EBV), insan papilloma virüsü (HPV) ve hepatit C virüsü (HCV) baş-boyun kanserine neden olan temel virüslerdir. EBV, dünyada yetişkinlerin çoğunda ağız boşluğunda ömür boyu kalıcı enfeksiyonlara neden olan, tükürük yoluyla bulaşan bir gama-herpes virüsüdür (Cohen 2000). HPV kaynaklı BBSHK'nin prevalansı ise gelişmiş ülkelerde artmakta olup, ağırlıklı olarak tütün ve alkolle ilişkili karsinomları olanlara göre daha genç yaştaki erkekleri etkilemektedir ve farklı coğrafi bölgelerde önemli ölçüde değişmektedir (Chaturvedi vd. 2013; Baboci vd. 2016). Tütün kullanımı ve ağır alkol tüketimi ile güçlü bir şekilde ilişkili olmasına rağmen, son yirmi yılda yüksek riskli alfa insan papillomavirüsleri, orofarinksten kaynaklanan BBSHK'nin bir alt kümesi için önemli bir etiyolojik faktör olarak ortaya çıkmıştır (Snijders vd. 1992; Gillison vd. 2000). Oral ve orofaringeal kanserleri hakkında yapılan bir araştırmada ise HPV16 türünün varlığının baş-boyun kanser riskini arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca baş-boyun kanserlerinin yaklaşık %25'inin HPV ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Herrero vd. 2003). Ek olarak analizlerden elde edilen sonuçlara göre HCV ile de hem oral hem de orofaringeal kanser arasında anlamlı bir ilişki olduğu ortaya çıkarılmıştır. HCV ile enfekte vakalarda baş-boyun kanserlerinin gelişme riskinin devamlı olarak arttığını da belirtmiştir (Borsetto vd. 2020).

Ağız Sağlığı ve Beslenme

Diş fırçalama, düzenli olarak diş hekimi kontrolü, gargara yapma, diş ipi kullanımı, takma diş, eksik veya kırık dişler ve diş eti kanaması gibi ağız sağlığını etkileyen olguların ağız sağlığını etkilediği, kötü ağız sağlığının özellikle ağız kanseri

riskini yükselttiği bildirilmiştir (Rosenquist vd. 2005; Chang vd. 2013; Javed ve Warnakulasuriya 2016).

Yapılan araştırmalar ile özel bir meyve ve sebze tüketimini içeren diyet yerine genel olarak meyve ve sebze çeşitliliğinden zengin bir beslenmenin larenks kanseri riskini düşürdüğü bildirilmiştir (Garavello vd. 2009). Örneğin Akdeniz diyeti ile ağız boşluğu kanser risk oranının %23, farenks kanseri risk oranının ise %29 azalma gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Bosetti vd. 2003). Ayrıca β - karoten içeren sebzelerin, örneğin havuç, balkabağı, tatlı patates, mısır gibi, lahana ve karnabahar gibi turpgillerin, portakal, limon ve greyfurt gibi turunçgillerin düzenli olarak diyetle eklenmesinin ağız kanserinde koruyucu etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Gupta vd. 2017). Ek olarak yağda kızarmış yiyeceklerin larengeal kanser ihtimalini arttırdığı bildirilmiştir (Bosetti vd. 2002).

1.2.3. Baş-boyun kanserlerinin klinik belirtileri

Baş boyun bölgesinde kitle veya iyileşmeyen bir yara, geçmeyen bir boğaz ağrısı, yutma güçlüğü ve kişinin sesinde bir değişiklik ya da ses kısıklığı baş-boyun kanserlerinde başlıca fiziksel semptomları oluşturmaktadır. Diş eti, dil ya da ağız yüzeyinde oluşan lezyonlar, çenede şişlik, nefes alma zorluğu, yutma sırasında ağrı, sık baş ağrısı, kulakta çınlama veya ağrı, kronik sinüzitler, burun içi kanamalar, gözlerde şişme, spesifik olarak baş-boyun kanserlerinde meydana gelen olumsuz belirtileri işaret etmektedir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Baş ve boyun kanseri belirtileri

Tekrarlayan Boğaz Ağrısı	Çenede Şişlik
Ses kısıklığı	Göz Çevresinde Şişlik
Dişlerde Ağrı	Tekrarlayan Kulak Enfeksiyonu
Geçmeyen Boyun Ağrısı	Konuşmakta Zorluk
Boğazda, Ağızda, Boyunda Kitle	İyileşmeyen Ağız Yaraları
Kanlı Tükürük veya Balgam	Ağız İçinde Lekeler
Sinüs Enfeksiyonu	Geçmeyen Burun Tıkanıklığı
Tekrarlayan Bağ Ağrısı	Görme Bozuklukları
Yüzde His Kaybı	Nefes Almakta Zorluk
Burun Kanaması	Ensede Kitle

1.2.4. Baş-boyun kanserlerinin genetik yapısı

BBSHK hastalarında tümör hücrelerinin tespitini başarılı bir şekilde yapabilmek için, az sayıda tümör hücresini tespit edebilecek kadar hassas olan moleküler belirteçlerden yararlanılabilmektedir. Çünkü rezeksiyon sınırlarında skuamöz kanser hücrelerinin tespiti, özellikle normal epitel hücrelerinin varlığı nedeniyle engellenmekte; bu da skuamöz farklılaşma belirteçlerinin kullanımını zorlaştırmaktadır ve tümöre özgü belirteçlerin kullanılması gerekmektedir.

Kanserin onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen genetik değişikliklerin birikmesi sonucu ortaya çıktığı genel olarak kabul görmektedir (Califano vd. 1996). Bu genetik değişikliklerin birçoğunun, örneğin p53 tümör baskılayıcı genindeki mutasyonların tanımlanması, bunların moleküler belirteçler olarak kullanılmasını sağlamıştır.

p53 genindeki mutasyonlar birçok kanser türünde sıklıkla görüldüğü gibi baş-boyun kanserlerinin %50-60'ında da bulunmaktadır. TP53 yolağı, hücre döngüsü ve apoptoz yoluyla strese verilen yanıtları düzenlenemekte ve hücre büyümesini kontrol etmektedir. BBSHK'lerin %50'sinden fazlasında TP53 geninin bulunduğu yer olan 17p'de kromozomal kayıp olduğu gösterilmiştir (Gonzalez vd. 1995; Poeta vd. 2007). TP53 ve

1. GİRİŞ

retinoblastoma (Rb) yolları BBSHK'lerin neredeyse tüm çeşitlerinde bozulmuştur ve bu da bu yolların baş ve boyun tümör oluşumundaki önemine dikkat çekmektedir.

Rb yolunun ana hedef bileşeni p16INK4A tümör baskılayıcı genidir. Gen ürünü, siklin bağımlı kinazlar 4 ve 6'yı inhibe ederek hücrelerin hücre döngüsüne girmesini engellemektedir. p16INK4A geninin inaktivasyonu, promotör hipermetilasyonu, gen mutasyonu ve heterozigotluk kaybının herhangi bir kombinasyonu ile meydana gelebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, BBSHK 'lerin %80'ini kadarında 9p21'deki kromozomal bölgede yani p16INK4A'nın bulunduğu yerde LOH (Heterozigotluk Kaybı) meydana geldiği tespit edilmiştir (Pai ve Westra 2009).

Hücre büyümesinden sorumlu genlerden birisi olan EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) geninde oluşan mutasyonlar, gen kopya sayısının artmasına neden olmaktadır. BBSHK'lerin %90'ından fazlası EGFR genini aşırı eksprese etmektedir (Kalyankrishna ve Grandis 2006) ve BBSHK'de bu aşırı EGFR ekspresyonu yüksek lokal tekrarlama oranı ve zayıf sağ kalımla ilişkilendirilmiştir (Grandis vd. 1998; Psyrri vd. 2005).

Hücre büyümesi, proliferasyon ve migrasyon gibi birçok hücre fonksiyonu düzenleyen, kromozomun 10q23 bölgesinde lokalize olan protein tirozin fosfotaz ve tensinhomoloğu (PTEN) bir tümör baskılayıcı gendir. PTEN genindeki ekspresyon kaybının, sinyal proteinlerinin kalıcı aktivasyonuna yol açtığı ve hücrelere çoğalma açısından önemli bir avantaj sağladığı bilinmektedir. BBSHK tümörlerinde, PTEN ekspresyonunun kaybı vakaların %10-30'unda görülmektedir (I. U. Ali vd. 1999; Lee vd. 2001).

Baş boyun kanserleri için diğer bir önemli gen olan insan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), sadece embriyonik gelişim sırasında yeni kan damarlarının oluşmasını sağlamaz aynı zamanda kan damarı hasarı sonrasında da damar oluşumunu yapmaktadır. Bu nedenle VEGF, endotel hücrelerini fizyolojik ve patolojik olarak etkileyen güçlü anjiyogenik moleküldür. Yapılan araştırmalarda VEGF geninin, baş-boyun kanserlerinin %90'ında aşırı eksprese olduğu tespit edilmiştir. Özellikle VEGF geni

yeni damar oluşumu sağladığı için baş ve boyun bölgelerindeki spesifik özelliklerden dolayı metastazda etkin rol oynamaktadır (Mineta vd. 2000; Kyzas vd. 2005).

1.2.5. Baş-boyun kanserlerinde tedavi

Tüm kanser çeşitlerinde olduğu gibi baş-boyun kanserlerinin tedavisinde de hastalar, cerrahi, radyasyon terapisi, kemoterapi ve/veya hedefe yönelik tedaviyi içeren multimodal tedaviye ihtiyaç duymaktadırlar (Migden vd. 2018; Roy vd. 2018). Fakat terapötik yaklaşımlardaki son gelişmelere rağmen, hayatta kalma konusunda sadece küçük iyileştirmeler yapılabilmektedir (Budach ve Tinhofer 2019; Hur vd. 2019).

Başlangıçta lokal bölgesel bir hastalık olan BBSHK sıklıkla boyundaki lenf düğümlerine yayılmakta; bu olay genellikle uzak organlara metastaz yapmadan önce meydana gelmektedir. Hastaların yaklaşık üçte birinde erken evre skuamöz hücreli karsinom (SHK) (lenf nodu metastazı kanıtı olmayan küçük primer tümörler) bulunmaktadır. Prognostik olarak tercih edilen bu alt grup genellikle yalnızca cerrahi veya radyoterapiden oluşan tek yöntemli bir yaklaşımla tedavi edilmektedir (Suh vd. 2014). Bununla birlikte, BBSHK'lerin çoğu ileri bir aşamada ortaya çıkmakta; hastaların çoğunluğu, cerrahiye takiben adjuvan radyo-kemoterapi veya yanıt vermeyenlerde cerrahi müdahale ile birlikte ön kemoradyoterapiden oluşan kombine tedavi yöntemiyle karşı karşıya kalmaktadır (Boscolo-Rizzo vd. 2016).

Kemoterapi, ileri veya tekrarlayan oral skuamöz hücreli karsinom (OSHK) hastalarında tedavi seçeneği olarak en sık kullanılan yöntemdir. İleri BBSHK'li hastaların genel 5 yıllık sağ kalım oranı, son 30 yılda erken teşhis, çoklu ilaç tedavileri ve cerrahi müdahalelerdeki gelişmelere rağmen, %25 kadar olduğu bildirilmiştir. Bu düşük orana hastalarda ilaç direncinin gelişmesinin yol açtığı bilinmektedir (Watts vd. 2016). Lokal ileri evre baş boyun kanserlerinde, tedavi sonrası yaklaşık iki yıl içerisinde %50-60 oranında lokal nüks olduğu ve %20-30 oranında da uzak metastaz gözlemlendiği bildirilmiştir (A. Forastiere vd. 2001; Posner vd. 2004).

Oral kavite ve orofarinks kanserinde, eğer hastalar erken evrede ise cerrahi müdahaleler ya da radyoterapi kullanılabilmektedir fakat ileri evrede olan hastalar için

hem cerrahi operasyon hem de radyoterapi yapılmaktadır. Benzer durum hipofarinks, larinks ve dudak kanseri olan hastaların tedavisi için de uygulanmaktadır (Bailey 2006).

1.2.6. Baş-boyun kanserlerinde ilaç direnç mekanizması

BBSHK dünya çapında görülme sıklığı yılda yaklaşık 600.000 vaka olduğu ve bu vakaların yaklaşık yarısının ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (Ferlay vd. 2010; Gad 1 2 vd. 2015). Bu kadar yüksek ölüm oranının olmasının bir nedeni de etkili tedavinin olmamasıdır. EGFR genini hedef alan bir monoklonal antikor olan setuksimab, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından BBSHK'de kullanım için onaylanan birkaç ilaçtan biri olmasına rağmen tek başına kullanıldığında tedaviye yanıt oranının sadece %13 olduğu bildirilmiştir (Vermorken vd. 2007). Ayrıca hücre bölünmesini etkileyen sisplatin veya 5 florourasil gibi platin bazlı ajanlar genellikle setuksimab ile birlikte kullanılmakta ve yanıt oranlarını %36'ya kadar yükseltmekte olduğu bildirilmiştir. Ancak, BBSHK genellikle tedaviye ilk yanıt verdikten sonra tekrarlamaktadır (Vermorken vd. 2008).

Hastalarda meydana gelen içsel direnç, tedaviden sonra tümör gerilemesinin olmaması anlamına gelmektedir ve tedavinin başlatılmasından önce hastada bulunan mekanizmaların sonucu olduğu düşünülmektedir (J. Wang vd. 2016). Edinilmiş direnç ise, alınan tedaviden sonra gözlemlenen bir yanıtın ortadan kalkması anlamına gelmektedir (Jackman vd. 2010). Her iki direnç türü de BBSHK'de yaygındır ve her birinin spesifik mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Mevcut birkaç tedavi seçeneğine yanıtı iyileştirmek için bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

AKT/PI3K Yolu

Büyüme faktörleri veya sitokinler tarafından verilen sinyal, fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K) tarafından fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfatın (PIP3) katalitik aktivasyonu ile hücre içine iletilmektedir. PIP3 daha sonra hücre döngüsü ilerlemesi, hayatta kalma ve büyüme dahil olmak üzere çeşitli hücre süreçlerinde yer alan bir dizi başka proteini fosforile eden Protein Kinaz B'yi (PKB), AKT olarak da bilinmektedir, aktive etmektedir (Cai vd. 2017).

Edinilmiş direnci araştıran bir çok çalışmada setuksimab dirençli hücrelerde AKT sinyalleşmesinin arttığını ortaya çıkarılmıştır (Wheeler vd. 2008; Silva-Oliveira vd. 2017). Daha spesifik olarak araştırılan başka bir çalışmada, EBFR'nin ekstraselüler alanındaki mutasyonlarının epidermal büyüme faktöründen (EBF) bağımsız sinyalleşmeye neden olabileceği ve bunun da sürekli AKT sinyalleşmesine ve setuksimaba karşı dirence yol açabileceği tespit edilmiştir (Nair vd. 2020). EBFR ile aynı aileden RTK insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 3'ün araştırıldığı bir çalışmada ise bir ligandı olan heregulin incelenmiştir. Heregulin, edinilmiş setuksimab direnci olan BBSHK hücrelerinde upregüle olarak düzenlendiği ve AKT sinyalleşmesi yoluyla hayatta kalma sağladığı bildirilmiştir (Picon ve Guddati 2020).

RAS/RAF/MEK/ERK yolu

Bu yol için bir diğer yaygın isim, mitogenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yoludur. Bu yolak, hücre proliferasyonu, apoptotik aktivite ve inflamasyon gibi hücre fonksiyonları düzenlemektedir. Hücreye gelen bir sinyal molekülü RTK (Reseptör Trizon Kinaz)'yı aktive ederek yolağı başlatmaktadır. Yolağın aktivasyonunda Ras/Raf/Mek/Erk molekülleri görev almaktadır. Yolakta görevli bu proteinlerde meydana gelen mutasyon, yolağın hep açık kalmasına bu da hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olmaktadır (Samatar ve Poulikakos 2014).

Bu yolak, özellikle anti-EBFR tedavisi ile BBSHK direnci konusunda en iyi çalışılmış yollardan biridir. Füzyon proteini olan FBFR3 (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3)-TACC3 (Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3)'ün, BBSHK hücrelerinde RAS/RAF/MEK/ERK yolunu aktive ederek anti-EBFR ve anti-HER3 kombinasyon tedavisine karşı edinilmiş direnci yönlendirdiği bulunmuştur (Daly vd. 2017).

Yapılan bir çalışma, sisplatin ve afatinib dahil olmak üzere 5 farklı inhibitöre karşı edinilmiş dirence sahip BBSHK hücrelerinin ERK1/2 aracılığıyla sinyal verdiğini ortaya çıkarmıştır (Schulz vd. 2016). İlave olarak setuksimab dirençli hücrelerde hassas hücrelere kıyasla önemli ölçüde daha fazla ERK1/2 fosforilasyonunun bulunduğu ve setuksimab dirençli hücrelerde ERK1/2 inhibe edildiğinde hücre büyümesinin azaldı

bildirilmiştir (Boeckx vd. 2014). Ayrıca GTPazların Ras alt ailesinde bulunan küçük bir G proteini olan HRAS mutasyonlarının %9,44 oranla BBSHK 'de oldukça yaygın olduğunu ve setuksimab tedavisine daha az yanıtla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Rampias vd. 2014).

JAK/STAT yolu

Sitokinlerin veya büyüme faktörlerinin, STAT (Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü) bağlanmasına ve fosforilasyonuna izin veren transfosforilasyon yoluyla JAK (Jak Kinaz) aktivasyonu için hücre dışı bir uyarıcı sağladığı ve böylece fosforile edilmiş STAT'lar dimerize olmasıyla hücre büyümesi, gelişimi, farklılaşması ve hayatta kalmasıyla ilgili süreçler için gen transkripsiyonunu etkiledikleri bilinmektedir (Lai ve Johnson 2010).

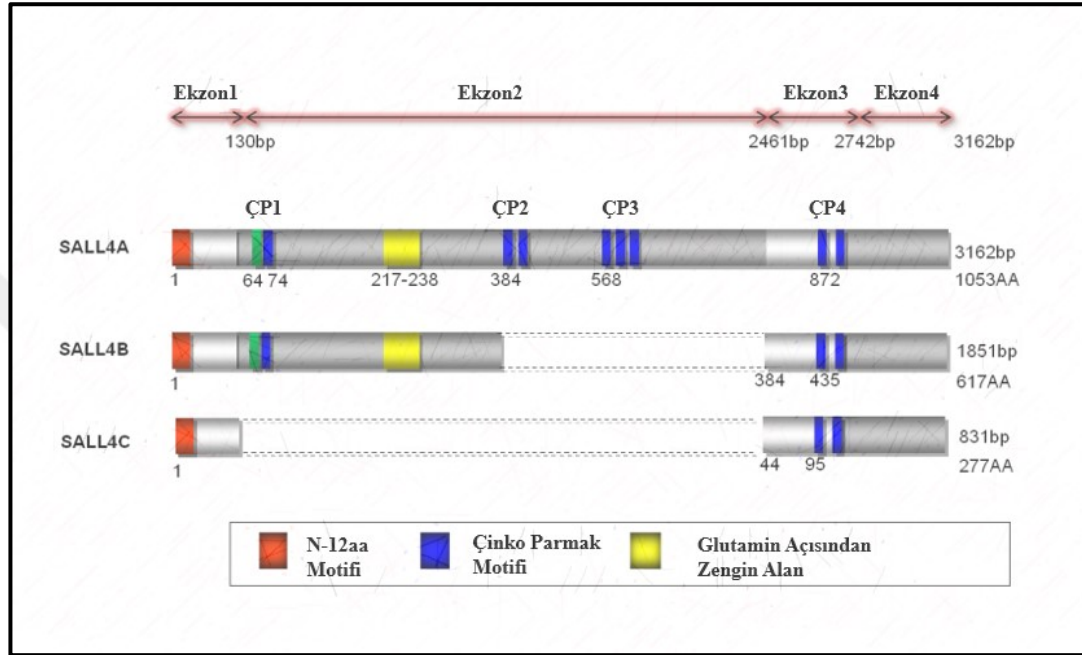
Yapılan araştırmalar, setuksimab tedavisinden sonra nüks eden BBSHK hasta tümörlerinde, tedavi görmeyenlere kıyasla daha yüksek STAT3 olduğunu göstermiştir ve STAT3 inhibisyonunun, anti-EBFR tedavisine karşı içsel veya edinilmiş dirence sahip hücre hatlarında hücre büyümesini azaltabileceği bildirilmiştir (Sen vd. 2012). Ek olarak, farklı bir çalışmada iki setuksimab dirençli BBSHK hücre hattında artan fosforilasyonu ve toplam ekspresyonu göz önüne alındığında, STAT3'ün setuksimab direncinde muhtemel bir rolü olduğu belirtilmiştir (Willey vd. 2019). Ayrıca setuksimab direnci kazanmış BBSHK hücrelerine karşı setuksimab duyarlılığını geri kazandıran moleküler mekanizmaların JAK/STAT yolunu inhibe etmek için JAK2(Janus Kinaz 2)'yi doğrudan bloke ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Wu vd. 2018).

1.3. SALL4 (Sal Benzeri Protein 4) Geni

Sal benzeri protein 4 (SALL4), embriyonik gelişim ve pluripotens için gerekli olduğu bildirilen bir transkripsiyon faktörüdür (Kohlhase vd. 1996). SALL4, Drosophila'nın homeotik gen spaltının memeli homologlarının bir üyesi olarak tanımlanmaktadır (Al-Baradie vd. 2002). İnsan SALL4 geni, dört kodlama ekzonundan ve 3162 bp kodlama dizisinden oluşan kromozom 20.q13.2 üzerinde bulunmaktadır (Deloukas vd. 2001; Kohlhase vd. 2002). SALL4, ekzon 2'deki farklı dahili ekleme

1. GİRİŞ

nedeniyle SALL4A ve SALL4B olmak üzere iki izoforma (Uez vd. 2008) ve mRNA'da ekzon 2'nin ayrılması ile de SALL4C izoformuna sahiptir (Kohlhase vd. 2005) (Şekil 1.3). SALL4A ve SALL4B, spesifik DNA bağlanma bölgelerine sahip homodimerler veya heterodimerler oluşturmakta ve erken embriyogenezde önemli roller oynamaktadırlar (Rao vd. 2010).



Şekil 1.3. SALL4 geninin izoformları (Tatetsu vd. 2016)

Duane-radyal ışın sendromu olarak da bilinen Okihiro sendromu, doğuştan gelen bir göz hareketliliği bozukluğu ile başlayan daha sonra kol ve eldeki kemiklerde de anormalliklere neden olan nadir bir otozomal dominant bozukluktur. SALL gen ailesi, insan malformasyon sendromlarında önemli olduğu bilinen çinko parmak transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır. Örneğin SALL1 lokusunda meydana gelen mutasyonlar polidaktili, kulak anomalileri, işitme kaybı, böbrek, kalp ve ürogenital sistem anomalileri ile karakterize olan Townes-Brocks sendromuna neden olmaktadır (Kohlhase vd. 1998). SALL1 mutasyonları olan hastalarda Okihiro sendromunun ara sıra görülen Duane anomalisi, analstenoz, sağırılık ve dış kulak anomalileri gibi klinik özelliklerinin gözlemlenmesi bu sendromun da insan SALL genindeki mutasyonların sonucu olabileceği düşünülmüştür. SALL4'ün tanımlanması ve bu genin 20. kromozom üzerinde bulunması ve bu kromozom üzerindeki delesyonların sonucu olarak hastalarda uzuv

malformasyonlarının gözlemlenmesi Okihiro sendromundan SALL4 gen mutasyonunun sorumlu olduğunu ortaya çıkarmıştır. (Kohlhase vd. 2002).

Ayrıca OCT4, SOX2 ve Nanog gibi pluripotenside görevli transkripsiyon faktörleri ile etkileşime giren SALL4, embriyonik kök hücrelerin (EKH'ler) kendini yenilemesini ve çok yönlülüğünü düzenlemektedir (J. Zhang vd. 2006; Tatetsu vd. 2016). Yetişkin insan dokusunda SALL4 ekspresyonu testis ve yumurtalıkla sınırlı olmasına rağmen bu ekspresyon seviyesinin bir istisnası insan CD34+ hematopoietik kök/progenitor hücreleri olduğu bildirilmiştir (Gao vd. 2013). SALL4, testis, EKH'ler ve fetal karaciğer hücrelerinde izoform-spesifik gen ekspresyon örüntüsüne sahiptir. Sall4a, doğum sonrası 7. günde testis hücrelerinde ifade edilirken, Sall4b'nin doğumdan itibaren ifade edildiği bilinmektedir (Gassei ve Orwig 2013). Ayrıca birkaç insan hepatosellüler karsinom (HCC) hücre hattının hem SALL4A hem de SALL4B'yi ifade ettiği gözlemlenmiştir (Oikawa vd. 2009).

Buna ek olarak son çalışmalar SALL4 geninin aynı zamanda epigenetik düzenleyici olarak da görev yapabileceğini (J. Yang vd. 2012) ve aşırı ekspresyonunun, hedef genlerin promotör bölgelerinin hipermetilasyonunu indükleyebileceğini ortaya çıkarmıştır (Xiong vd. 2016). Aslında, SALL4 hipometiledir ve farklılaşmış hücelere kıyasla indüklenmiş pluripotent kök (iPS) hücrelerinde ve EKH'lerde yüksek oranda ifade edilmektedir. (Nishino vd. 2010; Amabile vd. 2015).

İnsanlarda SALL4 geninde homozigot mutasyon vakaları bildirilmemiştir ve bunun nedeni olarak muhtemelen bu mutasyonların erken embriyonik ölümle sonuçlanması olduğu düşünülmektedir. Bildirilen tüm SALL4 mutasyonlarının heterozigot olduğu ve bunların anlamsız mutasyonlar, kısa duplikasyonlar veya delesyonlar olduğu ifade edilmiştir (Miertus vd. 2006, 200; Diehl vd. 2015).

Kanser hücrelerinin, EKH'ler ile birçok benzerliği paylaştığını destekleyen ve giderek artan veriler bulunmaktadır. EKH genleri çoğu yetişkin dokuda bulunmadığından, kansere özgü tanı ve tedavi için ideal hedefler olabilmektedirler. Fakat bu modeli test etmenin en büyük engeli, EKH'ler içindeki kanser fenotipinden sorumlu olan temel faktörleri/yolları belirlemektir. SALL4, bu bağlantıyı kurabilen birkaç genden

biridir. Çinko parmak proteini SALL4, EKH'leri, gelişimi ve kanseri birbirine bağlamada önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir çünkü SALL4, çeşitli epigenetik modülatörler ve diziye özgü transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerek hedef gen ifadesini etkilemektedir. Bu durum SALL4 genini önemli bir hücre kaderi düzenleyicisi haline getirmektedir (Tatetsu vd. 2016). Bu nedenle, kanserli dokuları hedeflemek ve doku rejenerasyonu için kök hücreyle ilgili uygulamalar oluşturmak için, yeni terapötik yaklaşımlara yol açmak amacıyla, çeşitli hücre tiplerinde SALL4 işlevlerinin moleküler mekanizmasına ışık tutmak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

1.3.1. SALL4 geninin kanserdeki rolü

SALL4'ün kök hücreler ve malign hücreler arasında genetik bir köprü gibi olduğu çalışmalar ile tespit edilmiştir (L. Yang vd. 2017). Yetişkin dokuların çoğunda SALL4 seviyesi downregüle olarak düzenlenmiş veya mevcut olmasa da çeşitli insan tümörlerinde yüksek düzeyde eksprese edildiği ve bu nedenle yeterli duyarlılığa sahip bir teşhis belirteci olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Mei vd. 2009; Tatetsu vd. 2016). Örneğin sindirim sistemi kanserlerinde yüksek SALL4 ifadesinin daha kötü prognozla ilişkili olduğunu işaret etmektedir (Yong vd. 2013).

Ayrıca bu bilgiler ışığında yapılan son zamanlardaki araştırmalar ile akciğer kanseri, hepatoselüler karsinom, meme kanseri, mide kanseri, kolorektal kanser, osteosarkom, akut miyeloid lösemi, yumurtalık kanseri ve glioma dahil olmak üzere birçok malign kanserlerde SALL4 geninin aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir.

SALL4 geninin ifadesinin baskılanması, epitel-mezenkimal geçişi inhibe ederek meme kanseri hücrelerinin tümör oluşumunu ve akciğer kolonizasyonunu baskılamak, SALL4 geninin aşırı ekspresyonu doğrudan promotörüne bağlanarak vimentin gibi mezenkimal belirteçleri indükleyerek meme kanserinde tümör ilerlemesini desteklediği bildirilmiştir (T. Chen vd. 2020). Ayrıca baskılanmış SALL4 geninin, endometriyal ve osteosarkom kanser hücrelerinin göçünü ve invazyonunu etkili bir şekilde engellediği belirtilmiştir (Li vd. 2015; D. Zhang vd. 2017).

SALL4 geni aynı zamanda hücre apoptozunun ve hücre döngüsü geçişinin önemli bir düzenleyicisidir. SALL4, sırasıyla hücre döngüsü ilerleme faktörleri siklin D1 ve D2'yi kodlayan CCND1 ve CCND2 ifadesini pozitif olarak düzenlemektedir (Oikawa vd. 2013; Toi 2014). İnhibe edilmiş SALL4, meme, kolorektal, akciğer ve mide kanserinde Bcl-2 (Bcl-2: B-cell lymphoma 2)'nin protein ekspresyonunu azaltarak G1/erken S fazında hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoz yoluyla proliferasyonun inhibisyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kobayashi vd. 2011; L. Zhang vd. 2014; Hesari vd. 2019).

SALL4 geni ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu

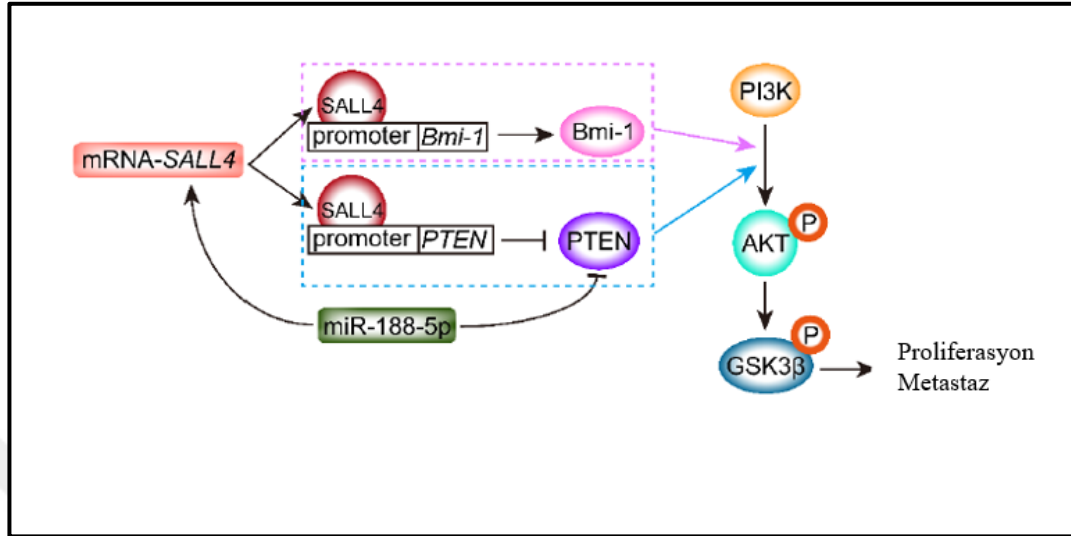
Yüksek SALL4 ekspresyonun, PI3K/AKT/mTOR sinyallemesinin aktivasyonu yoluyla akciğer kanserinde proliferatif, invazif ve antiapoptotik etkilere yol açtığı gösterilmiştir (Jiang ve Liu 2018). Diğer çalışmalar ile SALL4 geninin susturulması, PI3K/AKT sinyalini inhibe eden PTEN geninin upregüle olması ile sonuçlanmıştır ve bu, PTEN'in, tümör gelişiminde SALL4'ün kritik bir fonksiyonel hedefi olduğunu göstermektedir (J. Yang vd. 2007).

BKP-1 (Polycomb Kompleks Proteini) onkogeni, polietilen grup gen ailesinin bir üyesidir ve bir transkripsiyonel baskılayıcıdır. BKP-1'in aşırı ekspresyonu, çeşitli insan kanser dokularında tanımlanmıştır ve kanser hücresi proliferasyonu, hücre istilası, metastaz, kemosenitivite ve hastanın hayatta kalmasıyla ilgili olduğu bilinmektedir (Gavrilescu vd. 2012) SALL4, PTEN ekspresyonunu negatif olarak düzenledikten sonra promotörlerini bağlayarak BKP-1 ekspresyonunun artışına neden olmakta ve ardından hematolojik tümörlerde PI3K/AKT sinyal yolunu aktive etmektedir (Deng vd. 2016) (Şekil 1.4). Ek bir rapor ile SALL4 yıkımının PTEN ekspresyonunu arttırdığını, AKT ve GSK3 (Glikojen Sentaz Kinaz 3)'ün upregüle yönde ara fosforilasyonunu inhibe ettiğini ve berrak hücreli renal hücreli karsinomda VEBFA ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Sun vd. 2020).

Yakın zamanda yapılan bir çalışma, miR-188-5p'nin, PTEN ekspresyonunu ve SALL4'ün transkripsiyonel upregülasyonunu baskılayarak GC hücre çoğalmasını ve göçünü desteklediğini bulmuştur (M. Wang vd. 2019). Ek olarak, pozitif SALL4 ve yüksek histon deasetilaz 1/2 ekspresyonu, hepatoselüler karsinomu olan hastalarda düşük

1. GİRİŞ

PTEN ekspresyonu ve kötü prognoz ile korele olduğu gösterilmiştir (H. Wang vd. 2017). Tüm bu çalışmalar doğrultusunda SALL4'ün tümör ilerlemesinde işlevsel olarak kritik olduğuna ve bir ilaç hedefi olarak kabul edilebileceği sonucuna varılmaktadır.



Şekil 1.4. SALL4 geninin PTEN/PI3K/AKT sinyal yolundaki mekanizması (Sun vd. 2022).

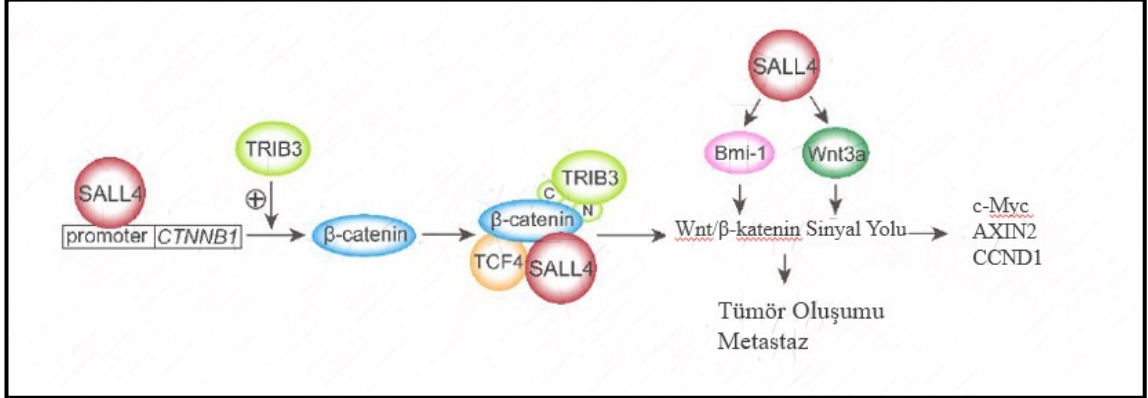
SALL4 Geni ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu

Çeşitli çalışmalar, SALL4 geninin kanser hücrelerinde Wnt/-katenin sinyal yolunu önemli ölçüde düzensizleştirdiğini göstermiştir. SALL4 ifadesinin, GC'deki tribbles pseudokinaz 3 (TRIB3) ifadesiyle pozitif olarak ilişkili olduğu bulunmuştur, bu da SALL4 geninin Wnt/-katenin sinyallemesini -katenin-TCF4 (Transkripsiyon Faktörü 4) kompleksiyle etkileşime girerek aktive etmesiyle sonuçlanmıştır (Y. Yang vd. 2021) (Şekil 1.5). Ek olarak SALL4 geni, TRIB3'teki kinaz benzeri alanın C-terminal ve N-terminal bölgeleri aracılığıyla Wnt/-katenin sinyal yolunu aktive etmiş ve kolorektal kanserlerde doğrudan -katenin'e bağlandığı bildirilmiştir (Hua vd. 2019). Bu nedenle SALL4 tarafından Wnt/-katenin sinyallemesinin aktive edilmesinin TRIB3 ifadesini gerektirebileceğini göstermektedir.

Ayrıca, TRIB3 baskılaması -katenin ekspresyonunu azalttığı ve c-Myc, eksen inhibisyon proteini ve siklin D1'in downregülasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Hua vd. 2019). Ek olarak, serviks kanserinde SALL4 geninin, CTNNB1 promotör bölgesini bir transkripsiyon aktivatörü olarak tanıdığı ve bağlandığı belirtilmiştir. Böylece -katenin ekspresyonunu hızlandırarak c-Myc ve CCND1 gibi genlerin aktivasyonunu

1. GİRİŞ

düzenlemekte ve serviks kanseri hücrelerinde, hücre çoğalmasını ve tümör büyümesini teşvik etmekte olduğu bildirilmiştir (M. Chen vd. 2019).



Şekil 1.5. SALL4 geninin Wnt/β-katenin sinyal yolundaki mekanizması (Sun vd. 2022).

SALL4 geninin ayrıca Wnt3a/-katenin sinyal yolu ile meme kanserlerinde tümör oluşumunu düzenlediği bildirilmiştir (C. Liu vd. 2020). Dahası SALL4 geninin bu sinyal yolunu düzenlenmesinin HCC'de tümör farklılaşmasıyla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada ayrıca SALL4 geninin, Wnt/-katenin sinyal yolunu aktive etmesinin intrahepatik kolanjiokarsinom hücre çoğalmasını teşvik ettiği bildirilmiştir (J. Wang vd. 2019).

SALL4, yalnızca Wnt/-katenin ve PTEN/PI3K/AKT yolları gibi hücre büyümesini düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda kaspazla ilişkili moleküler mekanizmalarla hücre apoptozunu da etkilemektedir (L. Yang vd. 2017; Y. Yang vd. 2021). Ayrıca SALL4'ün inhibisyonu ile, CARD9, CARD11, TNF (Tümör nekroz faktörü), ATF3, TP53 ve PTEN dahil olmak üzere apoptotik genlerin upregüle olduğu fakat Bmi-1 ve Bcl-2 dahil birçok antiapoptotik genin downregüle olduğu bildirilmiştir (Ueno vd. 2014).

Kanser tedavisine dirençte SALL4 geninin rolü

Çoklu ilaç direncinin hemen hemen tüm kanser tiplerinde yaygın bir olgu olduğu ve başarılı kemoterapinin önünde büyük bir engel oluşturduğu bilinmektedir. İlaç direncinin ana mekanizmaları, aktive edilen ATP bağlayıcı kaset (ABC) çoklu ilaç taşıyıcıları ile yakından ilişkilidir. ABCB1, ABCC1 ve ABCG2 gibi ABC çoklu ilaç

taşıyıcılarının, insan kanserindeki ilaç akışının çoğunluğundan sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Gottesman vd. 2002; Robey vd. 2009).

ABC taşıyıcılarının ekspresyonundaki artışın birçok kanser türünde kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Örneğin MDR1 olarak da adlandırılan ABCB1, tanımlanan en eski ABC taşıyıcılarından biridir ve endometrial kanser olgularında ABCB1'in yüksek ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir (Terek vd. 2003). Bu bilgi ışığında yapılan bir çalışmada, SALL4 ekspresyonunun artmasının, endometriyal kanser hücrelerinde ABCB1'in modüle edilmesi yoluyla kemoterapi direncinin yanı sıra EMT işlemiyle metastazı desteklediği, c-Myc geninin SALL4'ün doğrudan hedef geni olarak görev yaptığını ve ABCB1 ekspresyonunu düzenleyerek SALL4 kaynaklı ilaç direncinde yer aldığını da belirtmişlerdir (Liu vd. 2015).

Ayrıca farklı çalışmalarda SALL4'ün lösemide ABC ilaç taşıyıcısını düzenleyerek kemosenesitivitenin korunmasına katıldığı gösterilmiştir (Ma vd. 2006; Jeong vd. 2011). SALL4'ün, OSHK'nin başlangıcı ve gelişimindeki rolünü ortaya koymak için yapılan bir çalışmada ise SALL4 ekspresyonunun OSHK'de upregüle edildiği ve kanser kök hücresi benzeri hücre fenotipi ile radyo direncini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak desteklediği ortaya konulmuştur. Ayrıca bu çalışmada Wnt sinyal yolunun aktivasyonunun ve ardından OSHK'de radyo direncinin, SALL4 ekspresyonundaki bir artıştan ve β -katenin nükleer transferinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Huang vd. 2024).

Akciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada, SALL4 baskılanmasının kanser hücresi çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu engellediğini ve erlotinib kaynaklı apoptozu artırdığı bildirilmiştir (Du vd. 2018). Ek olarak, SALL4'ün downregülasyonu, sisplatin dirençli küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunda ilaç dirençli belirteçlerinin ifade düzeylerini azalttığı ve AKT/mTOR sinyallemesini inaktive ederek sisplatin kaynaklı apoptozu artırdığı bildirilmiştir (Jiang ve Liu 2018).

SALL4'ün inhibisyonun aynı zamanda mide kanseri hücrelerini sisplatin tedavisine duyarlı hale getirdiği ve hücre apoptozunu indüklediği bildirilmiştir (He vd. 2016; Yuan vd. 2016). SALL4'ün aşırı ekspresyonu ise karboplatin direncine katkıda

bulunduğu ve hücreleri endometriyal kanserde apoptozdan koruduğu tespit edilmiştir (Li vd. 2015).

Kemorezistanstaki rolüne ek olarak SALL4 ayrıca kanser ilerlemesini desteklemek için radyorezistansa da katkıda bulunduğu belirtilmiştir. SALL4, ATM/Chk2/p53 eksenini düzenleyerek nazofarenks karsinomunda radyo-direncinde rol oynamaktadır. SALL4'ün baskılanması radyasyon kaynaklı DNA hasarını artırmakta ve pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu upregüle olarak düzenlerken p-ATM, p-Chk2, p-p53 ve Bcl-2 ekspresyonunu bozmakta ve böylece NPC hücrelerini *in vitro* ve *in vivo* radyasyona karşı yeniden hassaslaştırmaktadır (Nie vd. 2019).

1.4. RNA İnterferaz

RNA interferans (RNAi) terimi, çift sarmallı RNA (dsRNA)'nın komplementer mRNA (mesajcı RNA) dizisini parçalanması anlamına gelen transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır. RNAi'nin keşfi, hücrelerin genomlarını nasıl koruduğuna dair yeni perspektifler sağlamış ve gen işlevini engellemek için yeni stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır böylece insan hastalıklarını tedavi etmek için RNA tabanlı ilaçlar üretilmiştir (Zamore 2001).

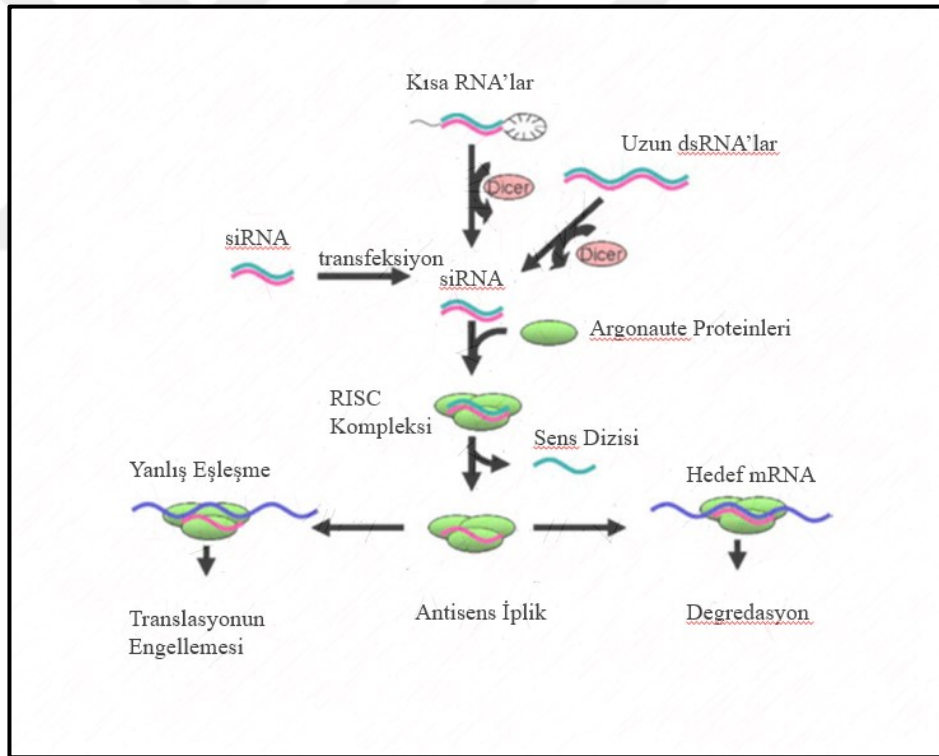
Hücre içinde doğal bir işlem olan RNAi, genomu virüslerden, biyolojik fonksiyonlar sonucu oluşan mekanizmalardan ya da transpozonlar gibi hareketli genetik elementlerden koruyan bir savunma mekanizmasıdır. Ayrıca ökaryotik organizmalarda gen regülasyonu için transkripsiyon sonrası susturma işlemidir (Zeng ve Cullen 2002; Agrawal vd. 2003; Reddy vd. 2007).

Hem bitkilerde hem de hayvanlarda RNAi, baskılanan genle homolog olan yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki RNA'ların varlığıyla karakterize edilmiştir (Hamilton ve Baulcombe 1999; Hammond vd. 2000; Zamore 2001). Bu 22 nükleotid dizileri, RISC (RNA kaynaklı susturma kompleksi) enziminin hedef mRNA'ları yok etmesi talimatını veren kılavuz diziler olarak rol almaktadır (Hammond vd. 2000). Bu kılavuz RNA'ları üretebilen bir enzim olan Dicer, çift sarmallı RNA'ları özel olarak kesen RNase III nükleaz ailesinin bir üyesidir ve bu enzim, bir helikaz alanı ve çift RNase III

1. GİRİŞ

motifleri içeren bir yapıya sahiptir (Bernstein vd. 2001). Bu şekilde oluşan ve 22 nükleotid uzunluğundaki küçük RNA parçalarına siRNA (Küçük İnterferans RNA) denmektedir.

Sonuç olarak, RNAi mekanizması, RISC kompleksi tarafından düzenlenen, hücrenin sitoplazmasında meydana gelen RNA bağımlı bir gen susturma işlemidir. siRNA'ların RISC kompleksine bağlanmaları için gerekli olan bir diğer faktör ise Argonaute proteinleridir. Küçük RNA'lar, Argonaute proteinlerini baz eşleşmesi ile belirli hedeflerine yönlendirmekte bu da daha sonra mRNA molekülünün kesilmesine, translasyon inhibisyonuna ve/veya mRNA bozunmasının başlatılmasına yol açmaktadır (Jonas ve Izaurralde 2015). Böylece siRNA'lar mRNA'yı tamamen parçalayarak gen susturulması işlemini tamamlarlar (Şekil 1.6).



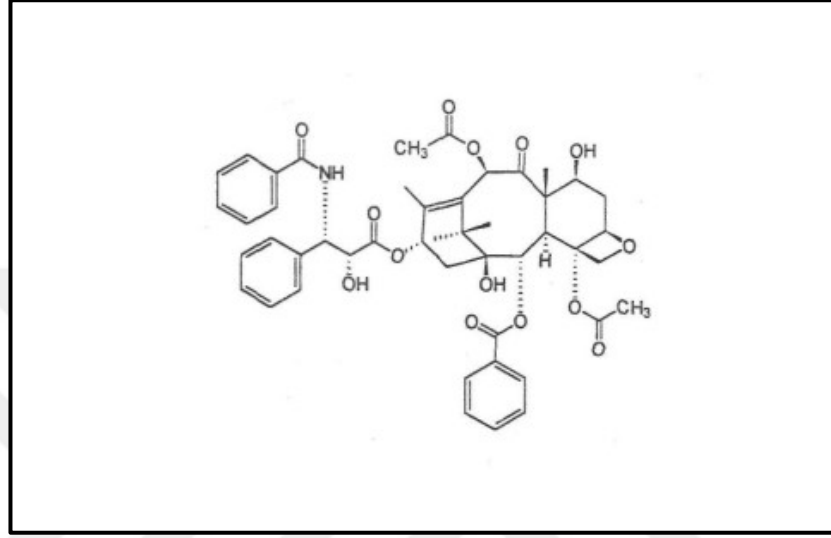
Şekil 1.6. siRNA aracılı RNAi mekanizması (Raja vd. 2019)

1.5. Paklitaksel (PTX)

Paklitaksel (PTX), yumurtalık kanseri, yemek borusu kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri, rahim ağzı kanseri ve pankreas kanseri dahil olmak üzere birçok

1. GİRİŞ

kanser türünün tedavisinde kullanılan, taksan grubuna dahil edilen kemoterapi ilacıdır (Şekil 1.7). Hücre bölünmesi sırasında mikrotübüllerin normal işlevine etki ederek çalışma mekanizması olan ilaç (Ringel ve Horwitz 1991), saç dökülmesi, alerjik reaksiyonlar, kas ağrıları, kalp problemleri, ishal ve akciğer iltihabı gibi yan etkileri de sahiptir.



Şekil 1.7. PTX (Şener 2000)

Yapılan bir çalışmada, tekrarlayan baş ve boyun kanseri hastalarında yüksek doz paklitaksel (24 saatlik sürekli infüzyonla 250 mg/m²) ve granülosit koloni uyarıcı faktör desteğiyle %40 genel yanıt oranıyla sonuçlandığı bildirilmiştir. Ayrıca daha önce ışınlanmış hastalık bölgelerinde ve uzak metastazlarda da yanıt gözlemlendiği belirtilmiştir. Fakat tedavi edilen hastaların %91'inde görülen kısa dereceli nötropeni, %39'unda periferik nöropati ve %39'unda artralji/miyaljilerde gelişmesi ilacın başlıca toksik etkisi olmuştur. Daha düşük dozlar ve 3 saatten 10 güne kadar değişen alternatif infüzyon programları baş ve boyun kanserinde değerlendirilen çalışma basamaklarıdır. Paklitaksel ve radyoterapiyi birleştiren çalışmalar da incelenmektedir (Forastiere 1994).

Bahsedilen literatür bilgilerinden hareketle bu tez çalışmasında baş ve boyun kanserlerinde tedavi oranının düşük ve hastalığın farklı dokulara da yayılarak seyrinin kötü olmasının en büyük nedeni olan ilaç direnç mekanizması hedef alınmaktadır. SALL4 transkripsiyon faktörünün BBSHK prognozundaki rolünü belirlemek ve kemoterapiye karşı çoklu ilaç direnci gelişimindeki olası etkilerini araştırmak için, SALL4 geninin hücre canlılığı, apoptoz ve ilaç direnç genleri üzerindeki etkileri moleküler genetik

1. GİRİŞ

parametreler ile ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu sayede baş ve boyun kanserleri için yeni ve daha etkili bir terapötik yaklaşım hedeflenmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Abolfazl Rad vd (2016), çalışmada SOX1 ekspresyonunu ve bu genin ESCC'deki kanser kök hücre belirteçleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. SOX1, bir tümör baskılayıcı olarak, farklı hücrelerde anti-tümör oluşumu rolü oynamakta ve ekspresyonu çeşitli kanserlerde inhibe edilmektedir. Çalışmada SOX1'in düşük ekspresyonun, SALL4 geninin aşırı ekspresyonuyla önemli ölçüde ilişkili olduğunu ifade etmektedir. Araştırma, SOX1 ve SALL4'ün korelasyonu, ESCC ilerlemesinin ileri evrelerinde ve yüksek invaziv ve agresif tümör dokularında tespit edildiğinden, SOX1 ekspresyonunun özellikle hastalığın ileri evrelerinde ESCC invazivliğini ve agresifliğini engellemede kritik bir rol oynayabileceğini bildirmiştir.

LIU Si-qiang (2016), OSHK dokusunda SALL4 ekspresyonun araştırıldığı farklı bir çalışmada ise, bitişik normal dokuyla karşılaştırıldığında hem mRNA hem de protein seviyelerinde SALL4 ekspresyonunun kanserli hücrelerde arttığı gösterilmiştir. İmmünohistokimya ile SALL4 proteininin pozitif çekirdek boyamasını tespit edilmiş ve SALL4 ekspresyonu, OSHK evrelemesi ve lenf nodu metastazı ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir. SALL4, OSHK için son derece yararlı bir tanı belirteci olabileceği ve ayrıca SALL4'ün OSHK metastazında önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir.

Misawa vd (2020), yaptıkları çalışma ile BBSHK hücrelerinde siRNA kullanarak SALL4 genini inhibe ettikleri zaman tümör büyümesinde ve DNA metiltransferaz 3 alfa (DNMT3A) ekspresyonunda azalma olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca SALL4 geninin aşırı ekspresyonunun hastalığın tekrarlama sıklığına neden olduğunu ve bunun SALL4 metilasyon durumuyla önemli ölçüde ilişkili olduğu belirtmişlerdir. SALL4'ün yüksek ekspresyon seviyelerinin hastalıksız sağkalım oranlarındaki azalmalarla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Abderrahman Ouban (2021), SALL4 genini birçok insan kanseri türünde kök hücre belirteci olmasını hedef alarak çalışmasını yapmıştır. Çalışmada, SALL4 ifadesi immünohistokimya kullanılarak OSHK'lerde analiz edilmiştir. Hastalarının klinik ve patolojik özellikleriyle SALL4 gen ifadesi ilişkilendirilmiştir. OSHK'lerin dokularının önemli bir çoğunluğunun sitoplazmalarında ve çekirdeklerinde Sall4 proteininin pozitif

olarak ifade edildiği gösterilmiştir. Bu ifadenin, tümör derecesi ve ağız boşluğu içindeki tümör konumu ile pozitif olarak ilişkili olduğu bildirilmiştir. Dahası çalışmada, SALL4 ifadesinin OSHK'lerde β -Katenin'in anormal ekspresyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma SALL4 proteininin OSHK gelişimi ve ilerlemede olası bir rol oynadığını ortaya koymuş ve bu rol hakkında daha fazla çalışma yapılması gerektiğini ileri sürmüştür.

Abderrahman Ouban (2021), farklı bir çalışmada ise larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarının yüksek oranda tekrarlama ve metastatik nedenlerinin üzerine yoğunlaşmıştır. SALL4 geninin, yüksek oranda ifade edilmesi ve çeşitli kötü huylu tümörlerde onkogeneze ve ilerlemede rol oynayan bir embriyonik kök hücre faktörü olması özelliğinden yola çıkarak larenks kanserinde SALL4 gen ifadesini araştırmıştır. Çalışmada, aynı tümör hücrelerinde ikinci bir kök hücrelilik ajanı olan CD 44 ile pozitif korelasyonla birlikte, Sall4 proteininin larenks kanseri hücrelerinde pozitif ifadesinin kanıtını sağlamıştır. Dahası çalışma Wnt yolunu ve kök hücrelilik fenomenini tartışır; ve Sall4 proteininin larenks skuamöz hücreli karsinomdaki rolünü araştırmaktadır.

Rafaela de Albuquerque Dias vd (2023), çalışmada epitelyal kökenli odontojenik tümörler olan ameloblastomaların altında yatan moleküler mekanizmaları kök hücre biyobelirteçlerinin ifadesi yoluyla anlamak, bu hücrelerin bu tümörün etiyopatogenezi içindeki rolünün açıklığa kavuşturulması amaçlanmıştır. Bu nedenle, mevcut çalışma, ameloblastomada kök hücre belirteçleri olarak SALL4 genini hedef almıştır. Çünkü SALL4'ün, embriyonik kendini yenilemenin temel düzenleyicileri olarak hareket eden, tümör ilerlemesini ve farklılaşmasına aracılık edebilen bir gen olduğu bilinmektedir. Ameloblastoma hücrelerinin, dış laminasında bulunan odontojenik kök hücrelerden kaynaklandığı ve tümörlerin muhtemelen kanser kök hücrelerinin sürekli bir azınlığını içeren normal kök hücrelerde başlatıldığı bildirilmiştir. Bu nedenle de SALL4 geni bu çalışmada bir biyobelirteç olarak kullanılmıştır. Ameloblastoma hücrelerinde SALL4 geninin transkripsiyonel aktivitesinin olduğu ve bu aktivitenin, kök hücre farklılaşmasını önleyen ve farklılaşmamış hücrelerin çoğalmasını artıran transkripsiyonel baskılama mekanizmalarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, bir kök hücre belirteci olan SALL4 geninin, ameloblastoma neoplastik hücrelerinde

ekspresyonunu doğrulayarak, kök hücrelerin bu tümörün kökeninde, ilerlemesinde ve tekrarında olası bir rol oynadığını işaret etmektedir.

Junhong Huang vd (2024) tümör tekrarını azaltmada ve OSHK vakalarında klinik prognozunu iyileştirmede büyük bir zorluk oluşturan radyodirenci üzerine araştırma yapmışlardır. OSHK'nin, CSC özellikleri gösteren ve kötü huylu tümör fenotipi ile radyodirencinde rol oynayan CD44(+) hücrelerinin bir alt popülasyonunu barındırmasının nedenini moleküler seviyede araştırmışlardır. SALL4 geninin, CSC'lerin özelliklerinin korunmasında rol oynadığını ve SALL4'ün CD44(+)-OSHK hücrelerinde aşırı ifadesinin radyodirenç oluşturduğunu buna karşılık, SALL4'ün susturulmasının OSHK hücrelerini radyasyon tedavisine duyarlı hale getirdiğini bildirmişlerdir. SALL4'ün transkripsiyon aktivasyonunun, Wnt/ β -katenin yolunu aktive ederek CSC'lerin fenotipini etkili bir şekilde geliştirdiğini ve radyodirenç oluşturduğunu göstermişlerdir.

Cristian Ion Mot vd (2025) baş ve boyun kanseri hastalarında D vitamini eksikliğinin ne kadar yaygın ve önemli olduğunu vurgulayarak kanser riski, prognoz, sağkalım, tedaviyle ilişkili yan etkiler, yetersiz beslenme ve ameliyat sonrası komplikasyonlardaki olası rolünü araştırmışlardır. Sonuçlar, daha yüksek D vitamini seviyelerinin daha iyi sağkalım ve daha az tedaviyle ilişkili sorunlarla bağlantılı olmasına rağmen, faydaların belirli bir noktadan sonra sabitlendiği ve daha karmaşık bir ilişki olduğunu göstermektedir. Ek olarak, D vitamini takviyesinin mukozit, cilt toksisitesi, disfaji ve ağrı gibi kemoradyoterapi yan etkilerini azaltmaya yardımcı olduğu ve sonuç olarak hastaların tedavi sırasında yaşam kalitesini iyileştirdiği görülmektedir.

Sharon Pei Yi Chan vd (2025) çalışmalarında, baş ve boyun kanserinde radyoterapiye dirençli hücrelerin moleküler düzeydeki zayıf noktalarını araştırmışlardır. Araştırmacılar, özellikle HDAC6 (Histon Deasetilaz 6) adlı enzimin bu radyo dirençli hücrelerde kritik bir rol oynadığını keşfetmişlerdir. HDAC6'nın inhibe edilmesi, bu hücrelerin radyoterapiye karşı daha duyarlı hale gelmesini sağlamıştır. Bu bulgular, HDAC6'nın hedeflenmesinin, radyo dirençli baş ve boyun kanseri tedavisinde yeni bir strateji olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, çalışma sistematik bir fonksiyonel analizle farklı genlerin birlikte incelenmesini sağlayarak, kanser hücrelerinin hayatta kalma mekanizmalarını daha iyi anlamaya yardımcı olmuştur.

Jessie Reyes-Carmona (2025) baş ve boyun kanserlerinde önemli bir onkogen olan Bmi-1'in terapötik hedef olarak potansiyeli incelemiştir. Baş ve boyun kanserlerinde yüksek Bmi-1 ekspresyonu, kötü prognozla ve tedaviye dirençle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, Bmi-1'i baskılayan küçük moleküllerin, kanser hücrelerinin büyümesini durdurduğu ve tedaviye duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca Bmi-1 inhibisyonunun, özellikle kanser kök hücrelerini hedefleyerek metastaz ve nüks riskini azaltabileceği vurgulanmıştır. Bu nedenle, Bmi-1'in hedeflenmesi, baş ve boyun kanserlerinin daha etkili ve uzun vadeli kontrolü için umut vadeden bir strateji olarak öne çıkmaktadır.

Hong-Shuai Li vd (2025) BBSHK'de radyoterapiye dirençli tümörlerin tedavisinde ultra yüksek doz oranlı radyoterapinin (UHDR-RT) etkinliğini ve moleküler mekanizmalarını araştırmıştır. Yüksek enerjili X-ışınları kullanılarak gerçekleştirilen UHDR-RT, radyoterapiye dirençli BBSHK hücrelerinde tümör büyümesini ve invazyonunu baskıladığı ve apoptozu artırdığı gösterilmiştir. UHDR-RT, CD8⁺ T hücrelerini aktive ederek M1 tipi makrofajları IFN- γ aracılığıyla uyarmakta ve bu süreçte M1 makrofajları CXCL9 salgılayarak CD8⁺ T hücrelerini yeniden aktive etmektedir. UHDR-RT, hem doğrudan DNA hasarı yoluyla hem de bağışıklık mikroçevresini modüle ederek radyoterapiye dirençli BBSHK tedavisinde umut vadeden bir yaklaşım sunabileceği ortaya konulmuştur.

Shiming Tan vd (2025), Skp2-Survivin ekseninin hedeflenmesinin OSHK'de radyoterapi duyarlılığı için umut verici bir potansiyel terapötik hedef olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada, S-faz kinaz ilişkili protein 2'nin (Skp2) OSHK hücrelerinde ve dokularında aşırı ifade edildiği bulunmuştur. Skp2'nin devre dışı bırakılması, OSHK hücrelerinin radyoterapi duyarlılığını önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir. Diğer olası mekanizmalar, OSHK hücrelerinde Skp2 eksikliğunun radyoterapi duyarlılığının restorasyonunun, Survivin fosforilasyonunu inhibe eden ve FBXL7 tarafından ubiquitinasyonunu ve bozunmasını destekleyen Akt/Wee1/CDK1 ekseninin inhibisyonu yoluyla içsel apoptozu indükleyebileceğini öne sürdüğü belirtilmiştir. Klinikopatolojik histolojik analiz, Skp2'nin OSHK dokularında p-Akt ve Survivin ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca Skp2'nin devre dışı bırakılması veya inhibisyonu, OSHK hücrelerinin radyoterapi direncini aştığı gözlemlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

Tez çalışmasında kullanılan kitler ile kimyasal madde ve malzemeler Çizelge 3.1’de, cihazlar ise Çizelge 3.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan kit ve kimyasal listesi

Kitler ve Kimyasallar	Temin Edildiği Firmalar
Apoptoz Tespiti	BioLegend
Anti-Mouse ve Anti-Rabbit SekonderAntikor	Elabscience, ABclonal
cDNA Sentez Kiti	iNtRON Biotechnology
ClearBand Nitroselüloz Membran	
ClearBand ECL Western BlotSubstrat	
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco®
Gen Baskılama Kiti	EcoTech Biotechnology
Hücre Döngüsü Tespiti	EcoTech Biotechnology
L-Glutamin	Gibco®
PBS	Sigma-Aldrich®
Penisilin-Streptomisin	Gibco®
EcoPURE Total RNA Kit	EcoTech Biotechnology
Protein İzolasyonu	İNtRON Biotechnology
Primer Antikor	Affinity, ELABscience, BT Lab, Santa Cruz Biotechnology
RIPA Lysis Buffer	EcoTech Biotechnology
RPMI	Gibco®
Sitotoksisite (CVDK-8) Kiti	EcoTech Biotechnology
Sybr Green Master Mix	EcoTech Biotechnology
Tripan Blue	Sigma-Aldrich®
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich®
10x Laemmli Sample Buffer	EcoTech Biotechnology

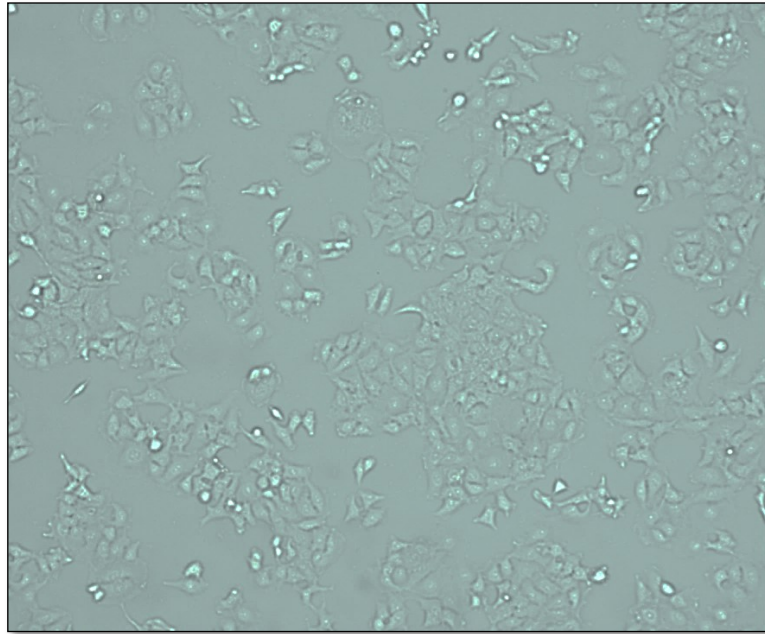
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan cihaz listesi

Kullanılan Cihazın Adı	Kullanılan Cihazın Modeli
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
+4 Soğutucu	J.P. Selecta
Analitik Terazı (0,0001)	Shimadzu ATX 224
Akış Sitometrisi	Beckman Coulter, USA
Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
Blotlama Cihazı	BIO-RAD Trans-Blot Turbo
CO2'li İnkübatör	ESCO Celculture
Derin dondurucu – 86	Esco, uus-439b
Dijital Mikrobiyolojik Emniyet Kabini	ESCO, AC2-4E8M
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Jel Görüntüleme Cihazı	BIO-RAD
Masaüstü pH Metre	Adwa, AD1000
Otoklav	JSR, JSAC-60
PZR Cihazı	SensoQuest
Real-time PZR Cihazı	Qiagen Rotor-Gene Q
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
SDS-PAGE elektroforez	-
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Spektrofotometre	Biotek EPOCH
Su Banyosu	Daihan
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10

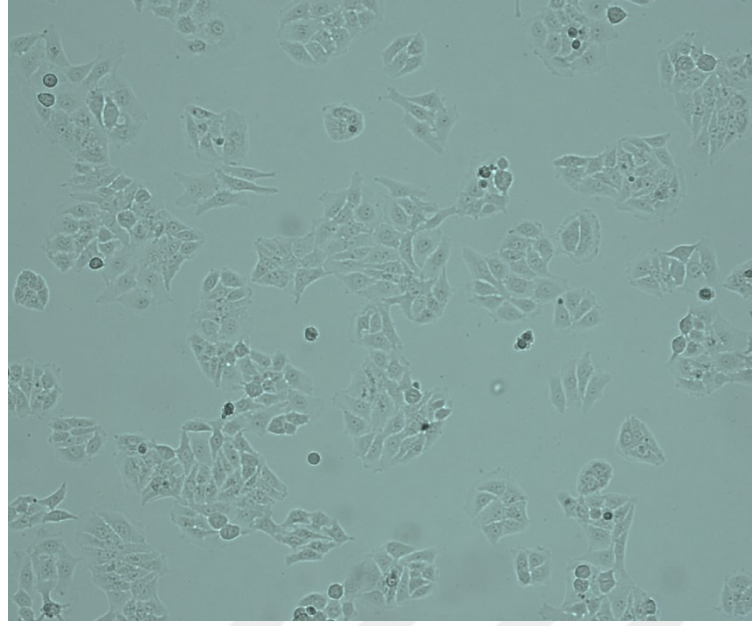
3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

Tez çalışması kapsamında skuamöz hücreli karsinomlu hastadan elde edilen ve epitel morfolojili bir hücre hattı olan normal FaDu (Farinks Kanseri Hücre Hattı) hücreleri ile PTX direnci oluşturulmuş FaDu hücreleri kullanılmıştır. (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2) Hücreler, içerisinde indirgeyici madde glutatyonun yanı sıra biyotin, B12 ve PABA vitamini, yüksek konsantrasyonlarda inositol ve kolin vitaminleri içeren ve %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş RPMI besiyerinde flasklar içinde büyütülmüştür. 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatör cihazında çalışma boyunca hücrelerin bulunduğu flasklar inkübe edilmiştir. Flask yüzeyini %70-80 oranında kapsayan ve çoğalan hücreler haftada en az iki kere olmak üzere tripsin ile muamele edilerek toplanmış ve pasajlanmıştır. Normal FaDu hücreleri için RPMI besiyeri kullanırken direnç oluşturulmuş FaDu hücreleri için belirlenen konsantrasyonda ilaç ile birlikte RPMI besiyeri verilmiştir. Hücreler Çizelge 3.3'deki gibi gruplandırılarak deneyler yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Normal hat FaDu hücreleri (10x)



Şekil 3.2. PTX Direnci oluşturulmuş FaDu hücreleri (10x)

Çizelge 3.3. Çalışma grupları

Normal Hat	Dirençli Hat
Kontrol (Muamelesiz)	Kontrol (Muamelesiz)
siRNA (Baskılanmış)	siRNA (Baskılanmış)
siRNAkontrol	siRNAkontrol
PTX	PTX
PTX+siRNA	PTX+siRNA
PTX+siRNAkontrol	PTX+siRNAkontrol

3.2.2. Doz ayarlaması

96 kuyulu hücre kültürü kaplarına normal FaDu hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Çalışmamızda model ilaç olarak PTX kullanılmıştır. Literatür doğrultusunda belirlenen 1-50 nM doz aralığında PTX uygulanmış ve bu uygulamadan 24 saat sonra CVDK-8 kiti ile canlılık analizi, firmanın protokolü doğrultusunda kolorimetrik olarak yapılmıştır. Elde edilen verilerden hücre canlılığı değerlendirilirken, IC₅₀ değerleri OriginPro yazılımı ile hesaplanmıştır. Buradan alınacak sonuçlar doğrultusunda çalışma analizlerinde uygulaması yapılacak olan PTX etkin dozu belirlenmiştir.

3.2.3. Direnç oluşturma

FaDu hücre hattında taksol direnci oluşturulmasına ilişkin literatürde yer alan yöntem takip edilmiş olup bu protokole bildirildiği şekliyle normal hücre hatlarına IC50 dozlarına kadar kademeli ilaç verilmiştir. Bu doz artışı 32 nM taksol dozunda sabit kalacak şekilde tamamlanmış olup böylelikle dirençli FaDu hücre hatları elde edilmiştir (Xu vd. 2013).

3.2.4. Gen baskılanması

Çalışmamızda 24 saatlik gen inhibisyonu hedeflenmiş ve bu amaçla siRNA uygulamalarının çalışma kapsamında yeterli olduğu düşünülmüştür. siRNA-SALL4 gen baskılama protokolü, Ecotech Bio tech tarafından sağlanan EndoGenius Suppressor Assay kiti (Ecotech Biotech, EndoGenius Suppressor Assay kiti, Cat No: EGS50) kullanılarak uygulanmıştır. Bu protokole göre;

- 6 tane kuyusu olan kapların her bir kuyusuna $3,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat geçtikten sonra hücrelerin %40-50 konfluense ulaşması ile gen susturma basamağına geçilmiştir.
- Çizelge 3.4’de belirtilen hacimlerde karışımlar hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Mix karışım hacimleri

	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4
Active Mix	-	-	1 µl	-
Control Mix	1 µl	-	-	-
2x Reaction Buffer	1 µl	-	1 µl	-
Dilution Buffer	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
Encapsulation Buffer	-	1 µl	-	1 µl

- Mix 1 ve Mix 2 bir mikrosantrifüj tüpü içerisinde karıştırılmış ve suppressor-control olarak etiketlenmiştir.

- Mix 3 ve Mix 4 bir mikrosantrifüj tüpü içerisinde karıştırılmış ve suppressor olarak etiketlenmiştir.
- Hazırlanan suppressor-control ve suppressor karışımları oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında karışımlar suppressor-control (siRNAkontrol ve PTX+siRNAkontrol grupları) ve suppressor gruplarına (siRNA ve PTX+siRNA grupları) her bir kuyuya 300 µl olacak şekilde verilmiştir.

3.2.5. Sitotoksosite testi

İlaç olma ihtimali değerlendirilen ya da toksik sonuçları bilinmeyen maddelerin etkileri hakkında bilgi edinmek ve daha sonraki adım olan klinik denemelere temel oluşturmak için sitotoksosite testleri yapılmaktadır.

Çalışmamızda bu amaç doğrultusunda tetrazolyum tuzu sınıfına ait olan WST-8 analizi yapmak için ticari olarak satılan Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8, Ecotech Biotechnology) hücre canlılığı tespit kiti kullanılmıştır. WST-8 [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu], bir elektron varlığında indirgendiğinde suda çözünen bir formazan boyası üretmektedir. Bu nedenle tetrazolyum halkasını sadece aktif halde olan mitokondri kırabildiği için renk değişimi yalnızca canlı hücrelerde meydana gelecek ve ölü hücreler bileşiği indirgeme kabiliyetini kaybettiği için renk değişimi olmayacaktır (Riss ve Moravec 2004). Sonuçta ortamdaki formazan boyasının miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olacaktır. Bu hedef doğrultusunda çalışılan kitin prosedürüne göre;

- 96 kuyulu hücre kültürü kaplarına, her bir örnek grubu için 6 tekrar olacak şekilde, normal ve ilaç direnci geliştirilmiş FaDu hücreleri her kuyuya 3000 hücre olacak şekilde ekilmiştir.
- 24 saat sonra %40-50 konfluense ulaşmış hücrelere gen susturma protokolü uygulanmıştır.
- Hücreler inkübatörde 24 saat bekletildikten sonra ilaç gruplarına PTX uygulaması yapılmıştır.

- İlaç uygulamasından sonra hücreler 24 saat inkübe edilmiş ve kitte belirtilen esaslara göre canlılık belirlenmiştir.
- Deney tamamlandıktan 1,5 saat sonra ilk ölçüm, ilk ölçümden 1 saat sonra 2. ölçüm alınmış ve % canlılık oranları hesaplanmıştır.

3.2.6. Apoptoz

Gen susturma sonrası hücrenin canlılığı, erken-geç apoptozis yeteneği ve nekroz miktarı belirlenmesi için araştırmamızda PI ile Annexin V-FITC Apoptozis Tespit Kiti kullanılmıştır. Bunun için 6 tane kuyusu olan hücre kültür kaplarına her bir kuyuda $3,5 \times 10^5$ oranı olacak şekilde hücreler ekilmiş, 24 saat sonra gen susturma protokolü uygulanmış ve gen susturma protokolünden sonra 24 saat inkübe edilen ilaç grubu hücrelerine PTX uygulaması yapılmıştır. İlaçtan 24 saat sonra hücreler toplanmış ve kit protokolüne göre boyanmıştır. Bu protokole göre;

- Tüplere toplanan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Oluşan pellet 150 µl Annexin Binding Buffer ile çözündürülmüştür.
- 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kontrol grubunun pelletine 75 µl Annexin Binding Buffer eklenmiş, pipetaj yapılmış ve 25 µl alınarak farklı bir tüp içinde 100 µl Buffer ile karıştırılarak ölçüm esnasında referans olarak kullanılacak olan gating hazırlanmıştır.
- Her bir örnek için 100 µl Annexin Binding Buffer, 5 µl Annexin V ve 10 µl propidyum iyodür karıştırılarak mix hazırlanmıştır.
- Hazırlanan karışımdan her bir örneğe 115 µl eklenerek pelletler çözülmüştür.
- Karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.
- 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir örnekten 115 µl yüklenmiş ve akış sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.7. Hücre döngüsü

Hücrelerin hücre döngüsü evrelerini belirlemek için Cell Cycle Assay Kit kullanılmıştır. Bunun için 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her kuyuda $3,5 \times 10^5$ olacak

şekilde hücreler ekilmiş, 24 saat sonra gen susturma protokolü uygulanmış ve bu protokolden 24 saat sonra inkübe edilen hücrelere ilaç uygulaması yapılmıştır. İlahtan 24 saat sonra hücreler toplanmış ve kit protokolüne göre boyanmıştır. Bu döngü protokole göre;

- Tüplere toplanan hücreler 5 dakika ve 3500 rpm’de santrifüj edilmiş, bu süre sonunda süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır.
- Pellet 500 µl PBS ile çözülmüştür.
- 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Pellet 750 µl %70 etanol ile çözülmüştür.
- Tüpler 1 saat -20 °C soğutucuda inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonucunda 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Pellet 500 µl PBS ile çözülmüştür.
- Tüpler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonucunda 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Oluşan pellet 100 µl RNase A Reagent ile çözülmüştür.
- Hücreler 30 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonucunda 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant kısmı pipet ile uzaklaştırıldıktan sonra pellet 200 µl PI Staining Solution ile çözülmüştür.
- Hücreler 4-8 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonucunda 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Pellet 200 µl 1xPBS ile çözülmüştür.
- 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir örnekten 200 µl yüklenmiş ve akış sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.8. Hücrelerin göç yeteneklerinin değerlendirilmesi

Embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesi ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşması sırasında önemli bir rol oynayan SALL4, kanser hücrelerinde proliferasyonu ve tümör oluşumunu teşvik ettiği gibi kanser kök hücrelerinde de yüksek düzeyde ifade edilir. SALL4, kanser kök hücrelerinin kendini yenileme kabiliyetini

sürdürmesine ve tümörün devamlılığını sağlamasına yardımcı olur. Bu amaçla çalışmamızda hedef hücrelerin kendini yenileme ve göç yetenekleri Scratch (çizik) testi yoluyla incelenmiştir. Çizik testi, hücrelerin yara iyileşme sürecini ve migrasyon kapasitesini modellemek için kullanılmaktadır.

Bu adımda hücre grupları 6 kuyulu kültür kaplarında hazırlanmıştır. Bunun için 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her kuyuda $3,5 \times 10^5$ olacak şekilde hücreler ekilmiş, 24 saat sonra 200 µl pipet uçları kullanılarak tek tip çizikler oluşturulmuştur ve gen susturma protokolü uygulanmıştır. Protokolden 24 saat sonra inkübe edilen hücrelere ilaç uygulaması yapılmıştır. Hücrelerin migrasyon potansiyelindeki değişiklikler için ilaç uygulamasından 24 saat sonra yara kapanmasının boyutu ölçülerek analiz edilmiş ve hücre görüntüleri invert mikroskopla yakalanmıştır.

3.2.9. Moleküler analizler

Hücreden RNA İzolasyonu

Normal ve dirençli FaDu hücrelerinin 6 kuyulu kaplara her bir kuyuya $3,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. 24 saat sonra gen susturma protokolü uygulanmış ve 1 saat inkübe edilen hücrelerin ilaç gruplarına bu süre sonunda PTX ilacı verilmiştir. İlaçtan 24 saat sonra hücrelerden RNA izolasyonu Ecotech Biotechnology firmasının total RNA kiti kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen RNA'nın saflık ve konsantrasyonu nanodrop cihazında (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ölçülmüştür. Kitin protokolüne göre;

- Gen baskılaması yapılmış ve ilaç verilmiş hücreler 24 saatin sonunda tripsin muamelesi ile toplanmış ve tüplere alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Her bir grup için 400 µl EcoPURE Lizis/Bağlayıcı Tamponu ve 4 µl β-merkaptoetanol karıştırılmış ve buffer pelletlenmiş hücrelere eklenmiştir. Pellet çözülene kadar 10 saniye boyunca vorteks yapılmıştır.
- Lizata 400 µl mutlak (96-100%) etanol eklenmiş ve 10 saniye boyunca vorteksleyerek iyice karıştırılmıştır.

- Bir toplama tüpüne bir EcoPURE kolonu yerleştirilmiş ve yukarıdaki adımdan elde edilen karışım her bir gruba 700 µl eklenmiştir. 30 saniye, oda sıcaklığında mikro santrifüjde maksimum hızda santrifüj yapılmıştır.
- Kolonun altında kalan sıvı dökülmüş ve kolona 400 µl EcoPURE Yıkama Tamponu 1 eklenmiştir. 30 saniye, oda sıcaklığında mikro santrifüjde maksimum hızda santrifüj yapılmıştır.
- Kolonun altında kalan sıvı dökülmüş ve kolona 500 µl EcoPURE Yıkama Tamponu 2 eklenmiştir. 30 saniye, oda sıcaklığında mikro santrifüjde maksimum hızda santrifüj yapılmıştır.
- Kolonun altında kalan sıvı dökülmüş ve kolona 200 µl EcoPURE Yıkama Tamponu 2 eklenmiştir. 2 dakika, oda sıcaklığında mikro santrifüjde maksimum hızda santrifüj yapılmıştır.
- Kolon temiz ve RNase içermeyen 1,5 mL mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Kolon membranının merkezine 50 µL EcoPURE Elüsyon Tamponu eklenmiş, kolon oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiş ve bu süre sonunda 30 saniye, oda sıcaklığında mikro santrifüjde maksimum hızda santrifüj edilmiştir.
- Epoch cihazı kullanılarak hücrelerden izole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı belirlenmiştir.
- Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi için iNtRON Biotechnology firmasının Maxime RT PreMix (Random Primer) kiti kullanılmıştır. RNA miktarları µg/ml olarak ölçülmüş ve her grupta eşit derişimde RNA kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır.

Protokolde firmanın önerisi takip edilmiş ve elde edilen cDNA örnekleri, deney basamaklarında kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Protokole göre; kit içinden çıkan Maxime RT PreMix tüpleri içerisine 3 µL RNA örnekleri ve 17 µL Nükleaz free eklenmiştir. RNA örneklerini içeren bu mixler termal döngü cihazına yerleştirilerek;

- 45 °C’de 60 dakika
- 95 °C’de 5 dakika
- 4°C’de ∞ olacak şekilde adımlar programlanmış ve cDNA elde edilmiştir.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

İzole edilen cDNA örnekleri, SYBR™ Green PCR Master Mix (Ampigene, ENZ-NUC103) kiti kullanılarak seçili genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Protokolde firmanın önerisi takip edilmiştir. Genlerin amplifikasyonu ile kantifikasyonu Qiagen Rotor Gene 5 cihazında gerçekleştirilmiş, referans gen olarak ACTB (Beta-actin) kullanılmış ve gen ekspresyonlarının kat artışı $2^{\Delta\Delta CT}$ ’den hesaplanmıştır. Çalışmada Çizelge 3.5’de verilen genlere ait primerler kullanılmıştır. Protokole göre her bir örnek için;

- 10 µL Sybr Green
- 0,6 µL Primer 1
- 0,6 µL Primer 2
- 4,8 µL ddH₂O

Karışımı hazırlanmış ve PCR tüplerine bu karışımdan 18 µL verilmiştir. Mix verildikten sonra her grubun cDNA örneği tüpe 2 µL olacak şekilde eklenmiştir. Bu adımlar buz üzerinde yapılmış, hazırlanan karışımlar mini spin cihazında 1 dakika süreyle santrifüj edilmiştir ve son hacim 10 µL olacak şekilde tüpler cihaza yerleştirilmiştir. Cihazda;

- 95°C’de 10 dakika X 40 döngü
- 60°C’de 30 dakika
- 72°C’de 30 dakika olacak şekilde basamaklar ayarlanmıştır.

Çizelge 3.5. Çalışmada hedef alınan genler

Gen	Amaç	Primer Dizisi	Antikor Kodu
SALL4*	Çalışmanın hedef geni	F: ACACTGGAGAGAGACCCTTC R: TGCCCTTGGTGGTGAAGC	Santa Cruz, sc-101147
MDR1*	Çalışmada hedeflenen Direnç geni	F: TGCTCAGACAGGATGTGAGTTG R: TAGCCCCTTTAACTTGAGCAGC	Santa Cruz, sc-55510
CMOAT	Çalışmanın hedeflenen Direnç geni	F: CAAACTCTATCTTGCTAAGCAGG R: TGAGTACAAGGGCCAGCTCTA	-
LRP1	Çalışmanın hedeflenen Direnç geni	F: GACCAGGTGTTGGACACAGATG R: AGTCGTTGTCTCCGTCACACTTC	-
PTEN	Hücre büyümesi, proliferasyon ve migrasyon analizi	F: AGGGACGAACTGGTGTAAATGA R: CTGGTCCTTACTTCCCCATAGAA	-
CDK2	Hücre Döngüsü	F: AAAGCCAGAAACAAGTTGACG R: GAGATCTCTCGGATGGCAGT	-
CDK4	Çalışmanın Hücre döngüsünde analizi	F: ATGGCTACCTCTCGATATGAGC R: CATTGGGGACTCTCACACTCT	-
PARP1	Çalışmanın DNA onarımı	F: AAGGCGAATGCCAGCGTTAC R: GCACTCTTGAGACCATGTCA	-
EGFR	Çalışmanın Hücre proliferasyonu	F: CAGCGCTACCTTGTCATTTCAG R: TCATACTATCCTCCGTGGTCA	-
PIK3CA	Çalışmada hedeflenen Direnç geni	F: R:	Santa Cruz sc-515646
mTOR*	Çalışmanın Hücre büyümesi ve proliferasyonu	F: GTCAGTGGGACAGCATGGAAG R: CCCATATGCCCCGACTGTAACTC	Santa Cruz, sc-517464
Akt3*	Çalışmanın Hücre büyümesi ve proliferasyonu	F: GGAAGAATGGACAGAAGCTATCCA R: TCCACTTGCCTTCTCTCGAAC	Santa Cruz, sc-377556
Actin*	İnternal Kontrol	F: TCCCTGGAGAAGAGCTACG R: GTAGTTTCGTGGATGCCACA	Santa Cruz, sc-8432

3.2.10. Western blot

Protein izolasyonu

Protein izolasyonu yapabilmek amacıyla 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir kuyuda $3,5 \times 10^5$ olacak şekilde hücreler ekilmiş, 24 saat sonra gen susturma protokolü uygulanmış ve 1 saat inkübe edilen hücrelere PTX uygulaması yapılmıştır. İlaçtan 24 saat sonra;

- Hücrelere 250 µL Lizis Buffer (%1 PMSF, %1 Proteaz inhibitörü ve %98 1xRIPA içeren karışım) eklenerek scraper yardımı ile kazıma işlemi yapılmıştır.
- Kazıma sonrası hücreler tüplere alınarak azot tankında 3 kez dondurma çözme işlemi yapılmış böylece hücre zarı parçalanmıştır.
- Tüpler 4°C’de 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar ayrı bir tüpe alınmış.

Protein miktar tayini

Elektroforez işleminden önce protein miktarı BCA Protein Assay kiti ile ölçülmüş ve çıkan sonuçlara göre proteinlerin jele yükleme oranları belirlenmiştir. Daha sonra santrifüj yapılarak ayrıştırılan protein ekstraktları 10x Laemmli Sample Buffer ile 100 °C’de 5 dakika kaynatılmıştır. Protein örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Jel hazırlama

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) kullanılarak proteinlerin negatif yüklenmesi sağlanmış ve proteinler poliakrilamid jel üzerine yüklenmiştir. Bilindiği üzere SDS ayrıca proteinleri denatüre ederek lineer hale getirmekte, böylece proteinler boyutlarına göre hareket etmektedirler. Bu amaçla ayırma jeli ve yürütme jeli aşağıda toblolar halinde gösterildiği gibi hazırlanmıştır (Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7).

Çizelge 3.6. Ayırma jeli hazırlanması

Ayırma Jeli Kimyasalları	Hacim
ddH ₂ O	2 mL
Resolving	1,30 mL
SDS	50 µL
Akrilamid	1,68 mL
Aps	25 µL
Temed	1,68 µL

Ayırma jeli hazırlandıktan sonra iki cam plaka arasına dökülmüş ve üzerine izopropanol eklenerek 45 dakika beklenmiş ve jelin polimerize olması sağlanmıştır. Polimerize olan jelden izopropanol uzaklaştırılmıştır.

Çizelge 3.7. Yürütme jeli hazırlanması

Yürütme Jeli Kimyasalları	Hacim
ddH ₂ O	1,4 mL
Stacking	553 µL
SDS	22 µL
Akrilamid	294 µL
Aps	11,13 µL
Temed	1,1 µL

Yürütme jeli hazırlandıktan sonra cam plakalar arasına dökülerek örneklerin yükleneceği kuyuların oluşturulması için tarak yerleştirilmiştir. Jelin polimerize olması için 35 dakika inkübasyona bırakılmış ve polimerize olan jelden tarak çıkarılarak yürütme tamponu içeren tankın içine yerleştirilmiştir.

Jel elektroforez

Elektroforez işlemini gerçekleştirmek için 1 mm kalınlığında, 8x7 cm boyutlarında ve içerisinde 10 adet kuyu bulunan hazır jeller kullanılmıştır. SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına bir moleküler ağırlık belirteci ile birlikte eşit miktarda protein (10

μ L, 40 μ g toplam protein) yüklenmiştir. Numunelerin uygulanacakları kuyucuklar 3 defa tris-glisin elektrod tamponuyla (pH 8,3, 1,515 g tris, 7,2 g glisin ve 0,25 g sodyum dodesil sülfat (SDS)) yıkanmış ve 1/20 sample buffer ile sulandırılmış örnekler yüklenmiştir. 20 mA/jel sabit akımda yaklaşık 1 saat süreyle elektroforez gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan Sample buffer;

- 4 ml distile su
- 1 ml 0,5 mol tris-HCl (pH 6,8) (stacking jel tamponu)
- 0,8 ml gliserol
- 1,6 ml %10 SDS
- 0,4 ml 2- β -merkaptoetanol
- 0,2 ml %0,05 bromfenol blue içermektedir.

Proteinlerin membrana transferi (Blotting)

Jelde ayrılmış olan proteinlerin bir nitroselüloz veya PVDF membrana transfer edildiği basamaktır. Çalışmamızda human ile spesifik reaktiviteye sahip antikorlar kullanılmıştır. Elektrik ortamında yürütülen proteinlerin PVDF membrana transferi yapılmıştır. Bunun için öncelikle 8'li filtre kâğıdı yığını 0,2 μ m por büyüklüğüne sahip semi-dry "Turbo blotter" transfer bloğunun alt kısmına yani PVDF membran üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra PVDF membranın üzerine SDS-PAGE jeli yerleştirilmiş ve jel ile membran ya da filtre kağıtları arasında oluşabilecek hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. Son olarak jel üzerine 8'li filtre kâğıdı yığını konup Turbo blotter kasetinin kapağı kapatılmış ve cihaza yerleştirilmiştir. 1,3 A, 25 V'ta 10 dakika süreyle blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir ve bu işlem sonunda PVDF membran 60 dakika süreyle bloklama tamponu ile inkübe edilmiştir.

Antikor inkübasyonu

PVDF membran 60 dakika süreyle bloklama tamponu ile inkübe edildikten sonra membran üzerine 5 μ g/ml konsantrasyonda ve blotlama tamponu içerisinde hazırlanmış primer antikor eklenmiş daha sonra buzdolabında, orbital karıştırıcı üzerinde, gece boyu inkübe edilmiştir. Birincil antikor inkübasyonu sona erdiğinde, membran her 5 dakikada

bir toplam 5 defa olacak şekilde PBS-T ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 µg/ml konsantrasyonda ve blotlama tamponu içerisinde hazırlanmış sekonder antikor eklenmiş, oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyon sonucunda membran her 5 dakikada bir toplam 5 defa olacak şekilde PBS-T ile yıkanmıştır. Son adım olarak membran üzerine üretici protokollerine göre hazırlanmış olan kemilüminesans HRP substratı eklenmiş ve blotların jel görüntüleme sistemi ile (Bio-Rad) kemilüminesans modunda fotoğrafları çekilmiştir.

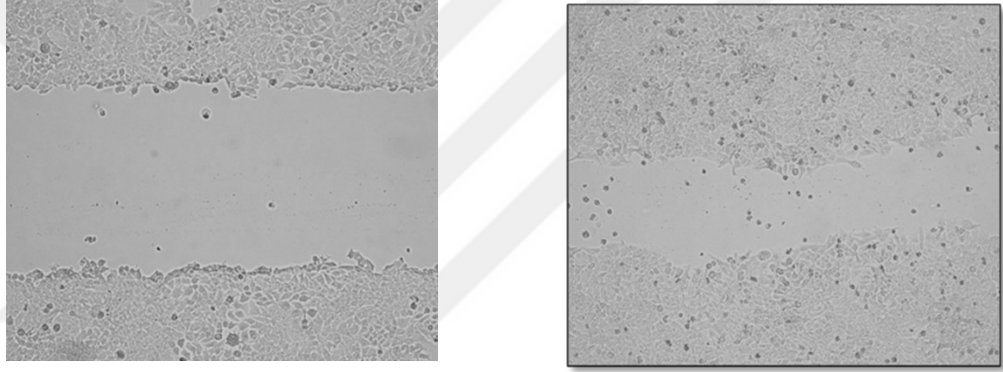


4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

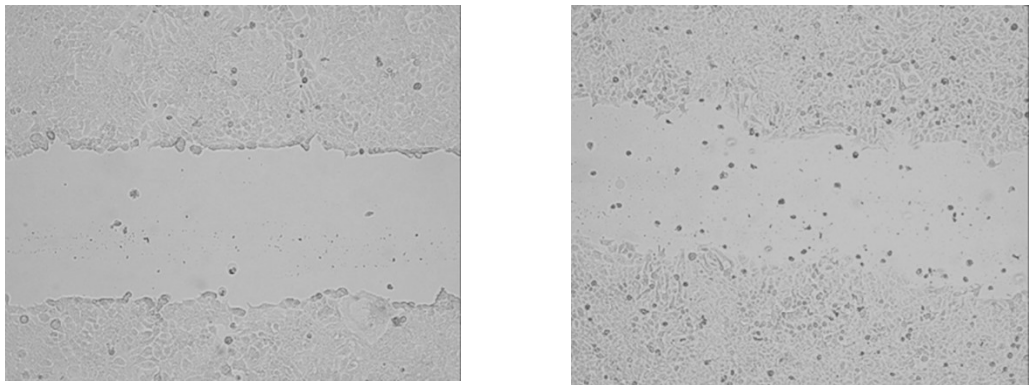
4.1. Hücrelerin Göç Yeteneklerinin Değerlendirilmesi

4.1.1. Normal FaDu hücre hattında göç yeteneği

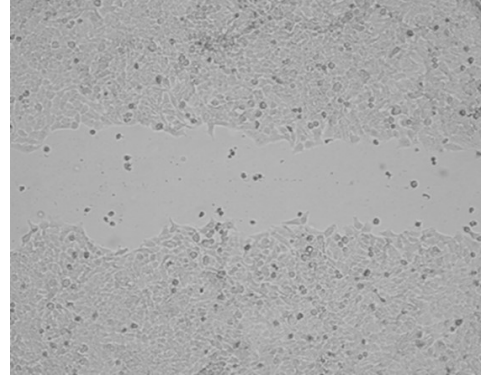
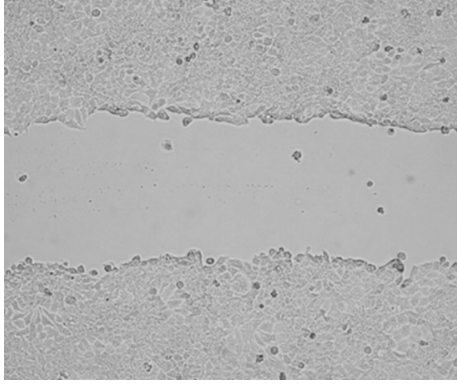
Hücrelerin migrasyon potansiyelindeki değişiklikler için gen susturma ve ilaç uygulamalarından 24 saat sonra yara kapanmasının boyutu ölçülmüştür ve Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da invert mikroskop ile alınan hücre görüntüleri değerlendirilmiştir.



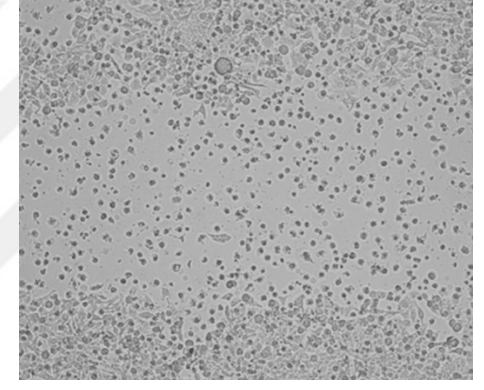
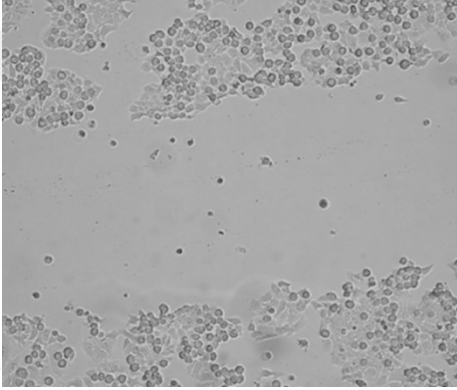
Şekil 4.1. Şekil FaDu hücre hattı kontrol grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.



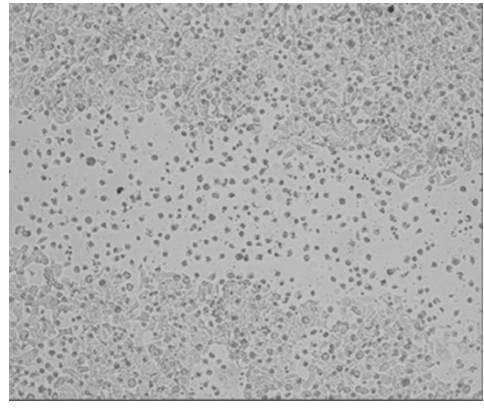
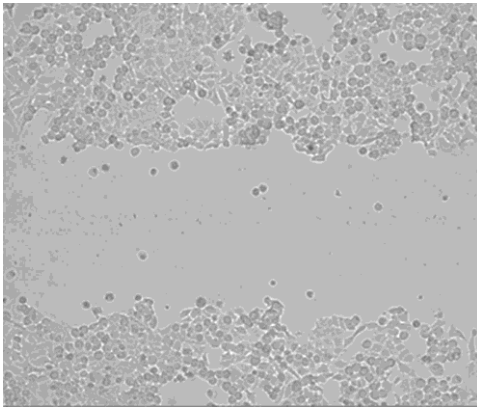
Şekil 4.2. FaDu hücre hattı siRNA grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.



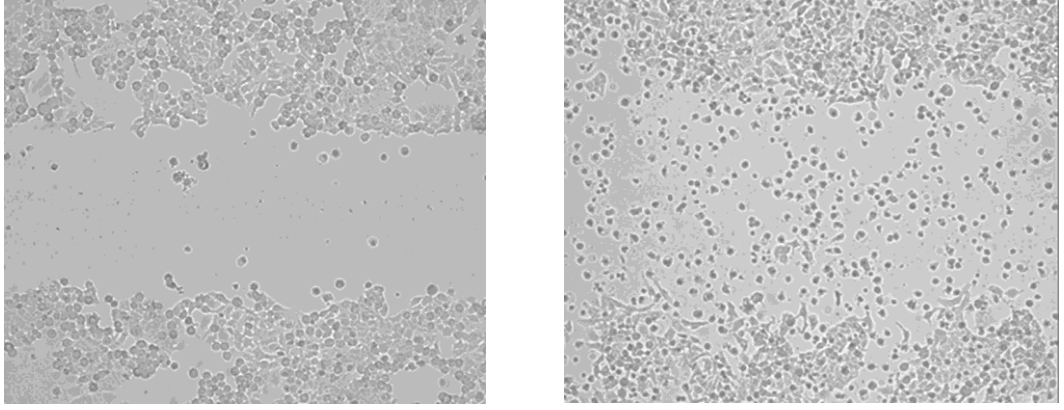
Şekil 4.3. FaDu hücre hattı siRNA kontrol grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.



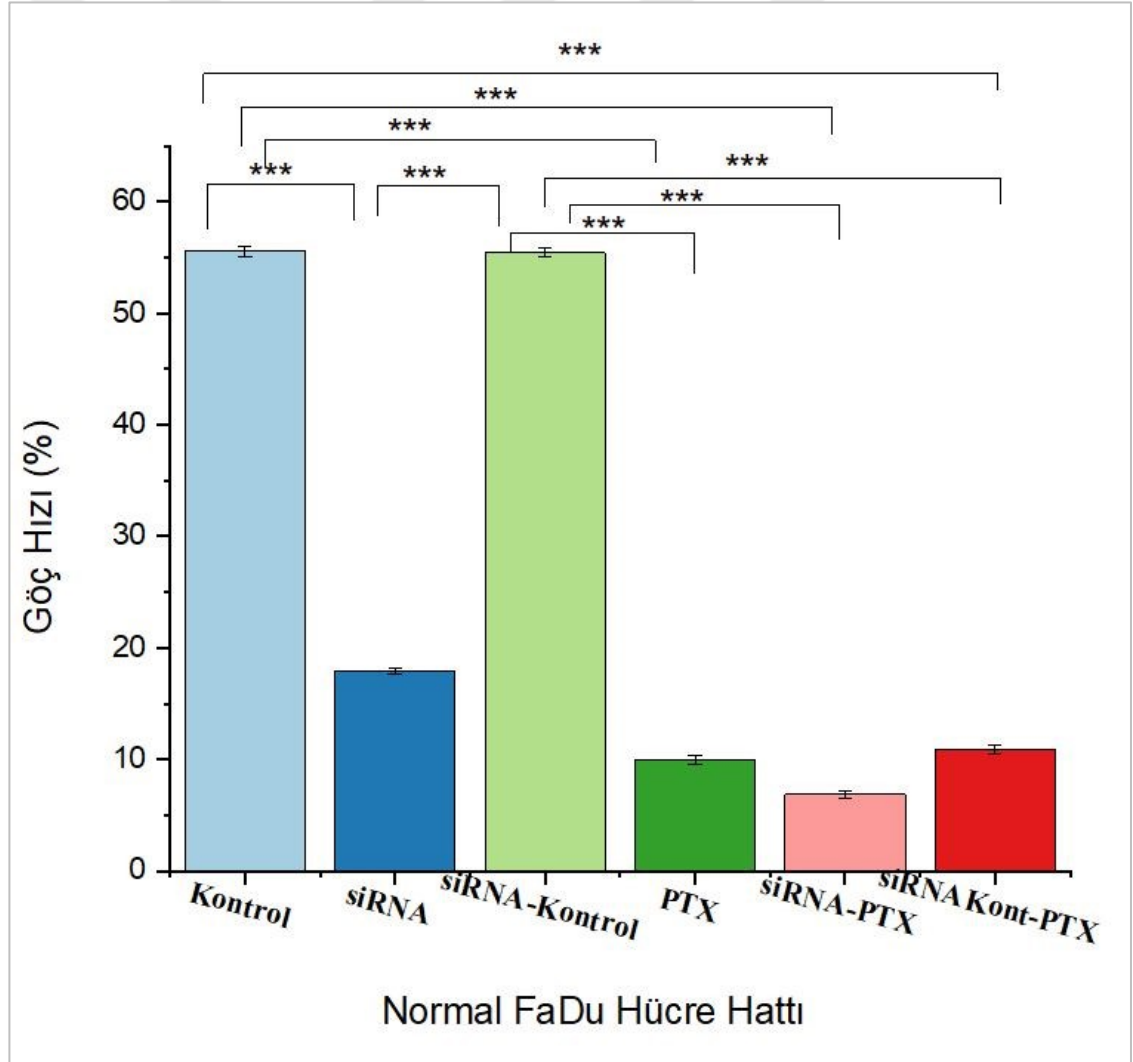
Şekil 4.4. FaDu hücre hattı PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.



Şekil 4.5. FaDu hücre hattı siRNA+PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.



Şekil 4.6. FaDu hücre hattı siRNA kontrol +PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.

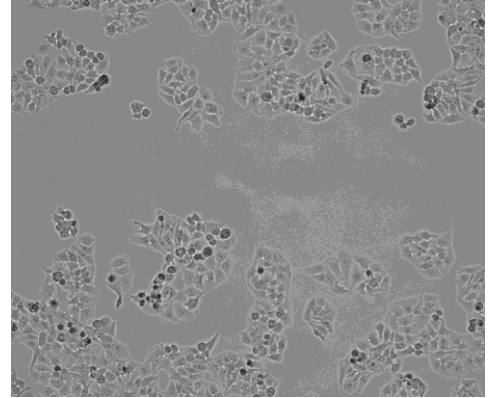
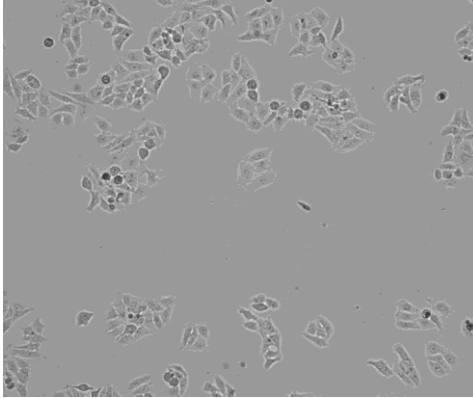


Şekil 4.7 Normal FaDu hücre hattında göç hızı (%)

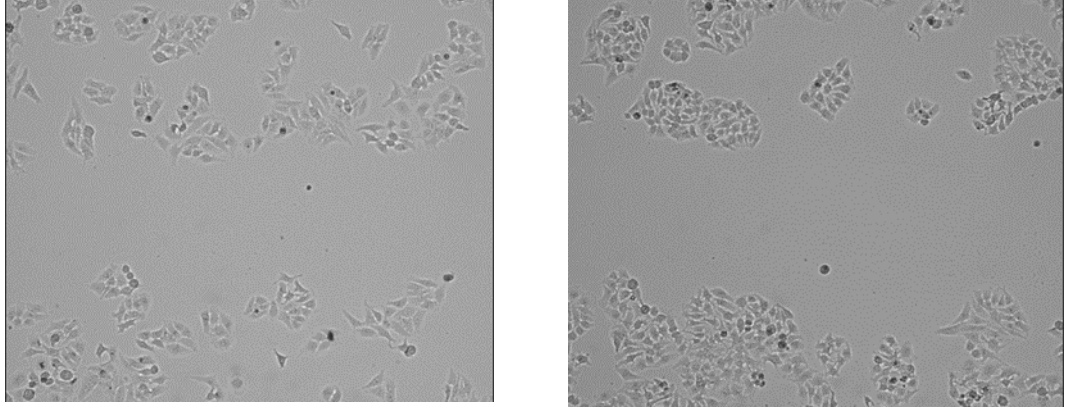
FaDu hücre hattında gerçekleştirilen çizik deneyi ile hücre göçü üzerindeki etkiler değerlendirilmiştir. Deney sonunda, kontrol grubunda 24. saatte hücre göç yüzdesi SALL4 geninin siRNA aracılığıyla inhibe edildiği grupta belirgin şekilde azalmıştır. Tek başına PTX uygulaması yapılan grupta ise göç oranı oldukça düşük bir seviyede seyretmiştir. Hem SALL4 inhibisyonu hem de PTX tedavisi uygulanan grupta ise göç oranı sadece PTX uygulanan ve gen inhibisyonu yapılan gruplara göre de azalmıştır. Bu sonuçlar, hem SALL4 geninin baskılanmasının hem de PTX tedavisinin FaDu hücrelerinin göç yeteneğini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Özellikle PTX'in tek başına uygulandığında hücre göçünü baskılamada en etkili etken olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, SALL4 geninin inhibisyonu ile kombine edilen PTX tedavisinin de göçü azaltıcı etkisi devam etmiştir.

4.1.2 Dirençli FaDu hücre hattında göç yeteneği

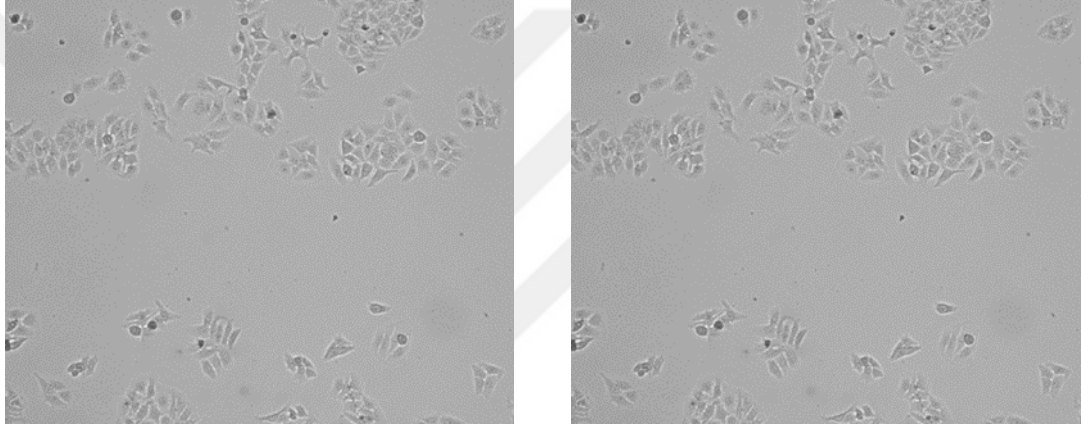
Hücrelerin migrasyon potansiyelindeki değişiklikler için gen susturma ve ilaç uygulamalarından 24 saat sonra yara kapanmasının boyutu ölçülmüştür ve Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de invert mikroskop ile alınan hücre görüntüleri değerlendirilmiştir.



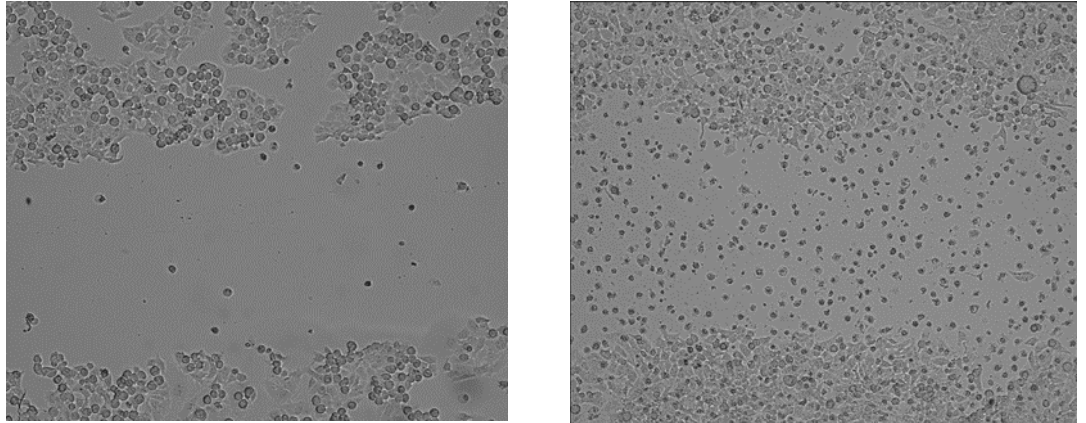
Şekil 4.8. Şekil FaDu hücre hattı kontrol grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.



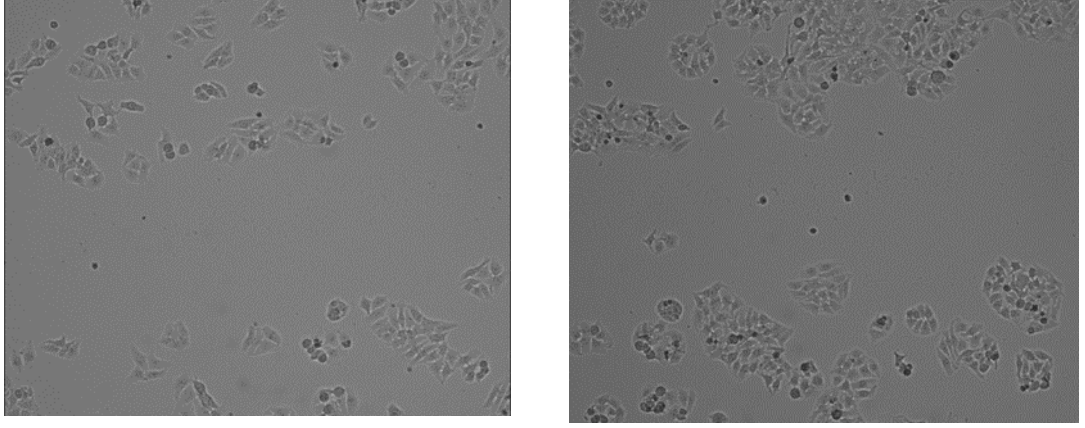
Şekil 4.9. FaDu hücre hattı siRNA grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.



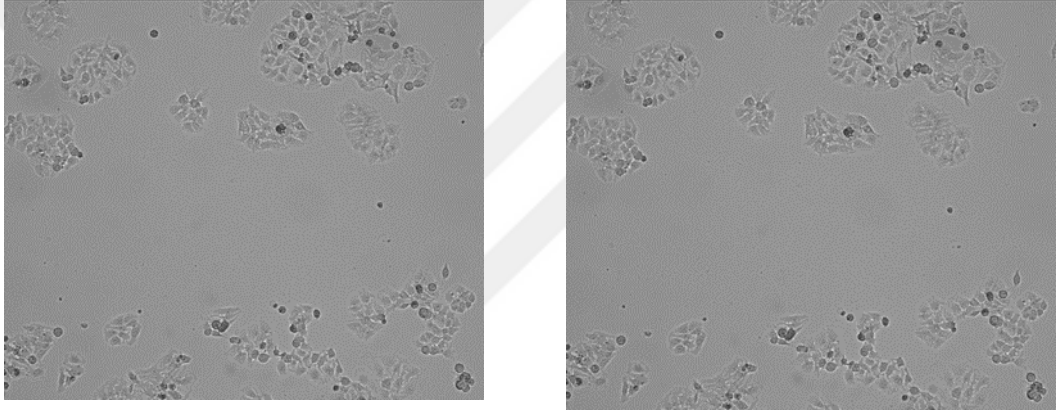
Şekil 4.10. FaDu hücre hattı siRNA kontrol grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.



Şekil 4.11. FaDu hücre hattı PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.



Şekil 4.12. FaDu hücre hattı siRNA+PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.

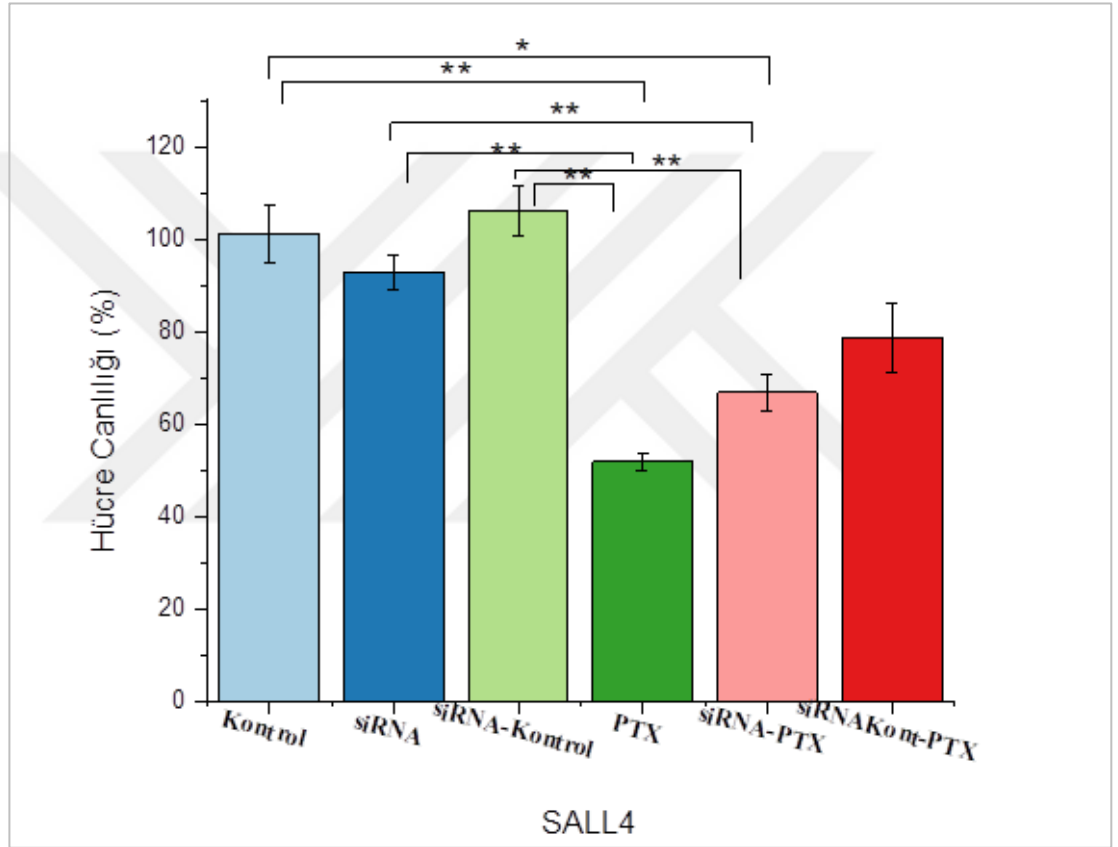


Şekil 4.13. FaDu hücre hattı siRNA Kontrol +PTX grubunda göç yeteneklerinin değerlendirilmesi. Solda çizimden hemen sonra çekilen görüntü (10x). Sağda ise 24 saatlik inkübasyon sonrası 10x objektif kullanılarak inverted mikroskop ile elde edilen görüntü.

PTX direnci kazandırılmış hücre hattında gerçekleştirilen hücre göçü analizlerinde, kontrol grubuna kıyasla SALL4 gen ekspresyonunun inhibe edildiği grupta anlamlı düzeyde azalma gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, yalnızca PTX uygulanan grupta ve hem SALL4 inhibisyonu hem de PTX uygulamasının birlikte gerçekleştirildiği grupta da hücre göç hızı anlamlı biçimde düşmüştür. Bu bulgular, SALL4 geninin hücre göçünde önemli bir rol oynadığını ve bu genin inhibisyonunun PTX'in hücre göçü üzerindeki etkisini potansiyel olarak artırabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bu veriler SALL4'ün kemoterapi direncine katkıda bulunmasının yanı sıra metastatik potansiyelin düzenlenmesinde de rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

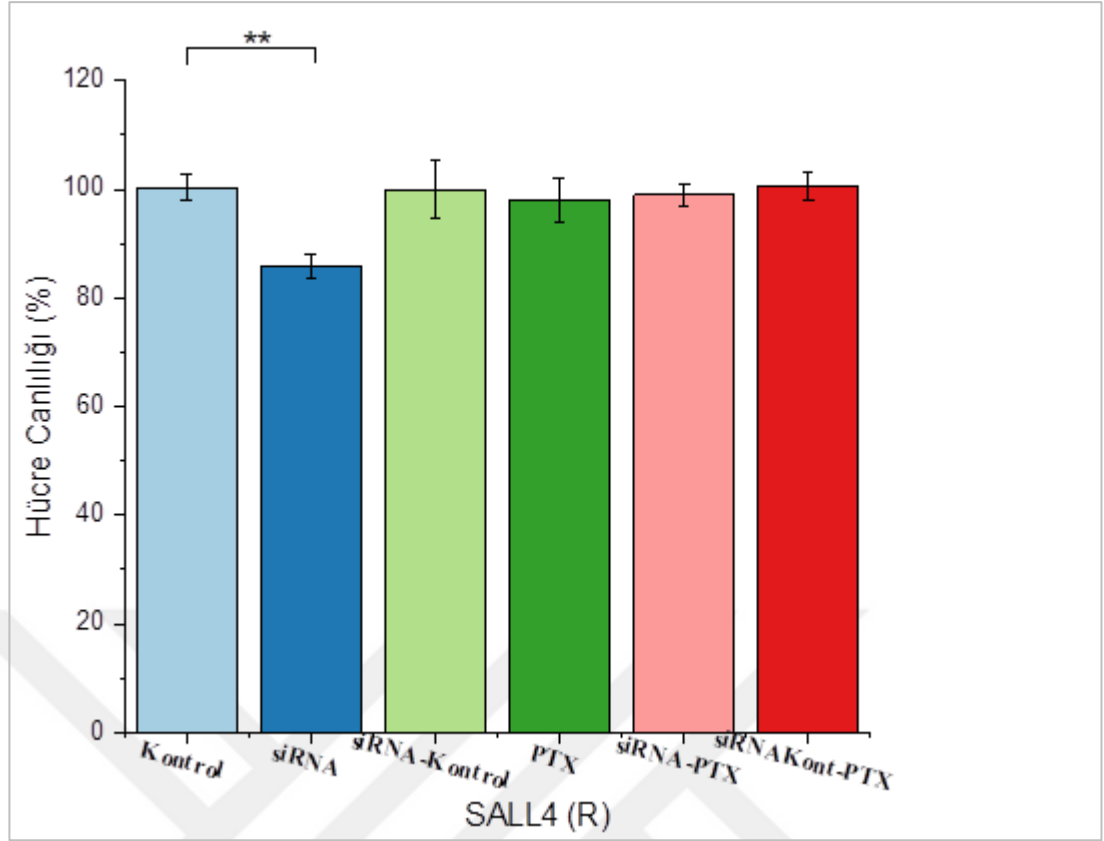
4.2 MTT Analizi

Çalışmamızda, normal FaDu hücre hattı ve PTX dirençli FaDu hücre hattında SALL4 geninin ekspresyonunun inhibe edilmesinin hücre metabolizması üzerinde oluşturduğu değişiklikleri değerlendirmek amacıyla MTT analizi uygulanmıştır ve hücresel canlılık ile SALL4 geninin bu iki hat üzerinde inhibe edilmesinin hücre sitotoksitesi tespit edilmiştir.



Şekil 4.15 FaDu hücre hattında SALL4 Gen inhibisyonunun sitotoksik etkisi

Yapılan analiz sonucunda normal FaDu hücre hattında kontrol grubu ile sadece PTX uygulanan grup arasında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, hem SALL4 gen ekspresyonu inhibe edilen hem de PTX uygulanan grupta da kontrol grubuna göre anlamlı düşüş olmuştur. Ayrıca, yalnızca SALL4 geninin inhibe edildiği grup ile hem SALL4 geninin inhibe edildiği hem de PTX uygulanan grup arasında da anlamlı düşüş meydana gelmiştir. Bu nedenle, SALL4 geninin inhibe edilmesinin PTX'in sitotoksik etkisini artırdığı ve bu genin kemoterapi yanıtında etkili olabileceğini işaret etmektedir.

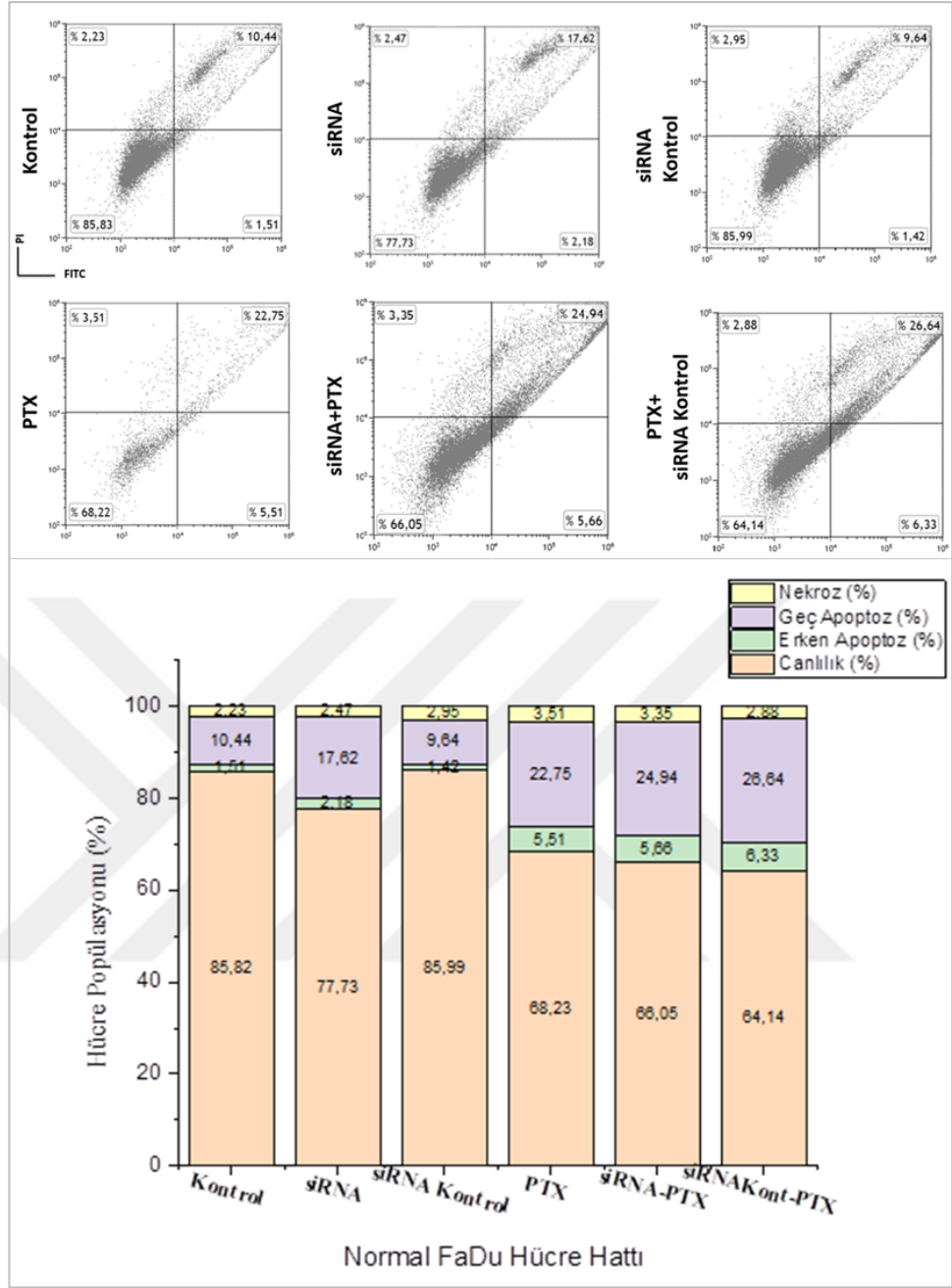


Şekil 4.16. Dirençli FaDu hücre hattında SALL4 gen inhibisyonunun sitotoksik etkisi

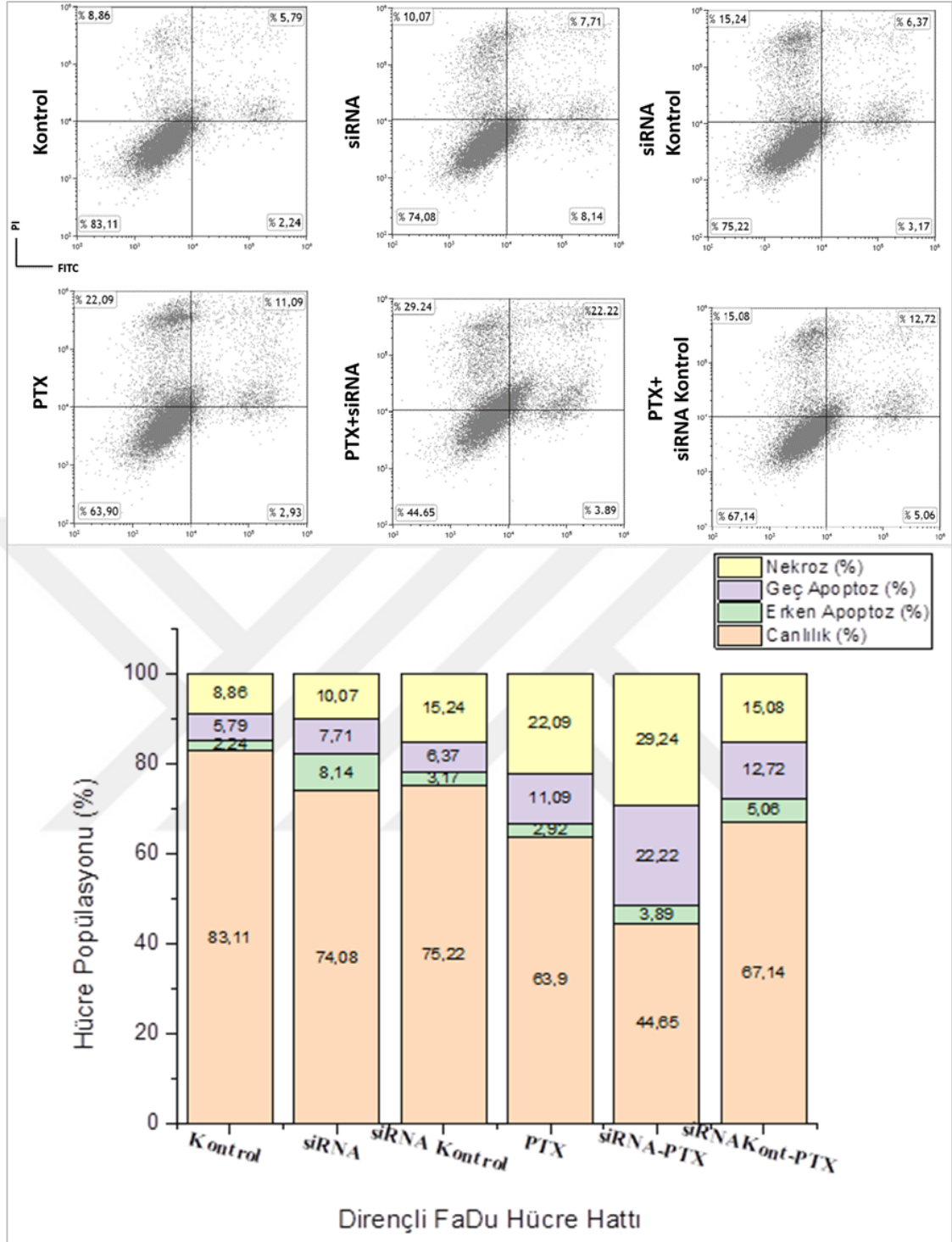
PTX direnci kazandırılmış FaDu hücre hattında ise elde edilen sonuçlar farklılık göstermiştir. Bu hücre hattında yalnızca SALL4 geninin inhibe edildiği grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir. Ancak PTX uygulanan ve hem PTX uygulanıp hem de SALL4 geninin inhibe edildiği gruplarda kontrol grubuna göre oluşan değişiklik anlamlı düzeyde değildir. Bu durum, dirençli hat üzerinde PTX uygulanmasının ek bir etki oluşturmadığını ve sadece gen inhibisyonunun belirgin sitotoksik etki oluşturduğunu belirtmektedir. Bu nedenle, SALL4 inhibisyonun PTX'e karşı dirençli hücrelerde tek başına bile proliferasyonu etkileyebildiğini ve bu genin ilaç direncinin aşılması açısından potansiyel bir hedef olabileceğini göstermektedir.

4.3 Apoptoz Analizi

Normal ve dirençli FaDu hücre hatlarından SALL4 gen inhibisyonunun hücre canlılığı, apoptoz ve nekroz oranları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Normal FaDu hücre hattında apoptoz analizi



Şekil 4.18. Dirençli FaDu hücre hattında apoptoz analizi

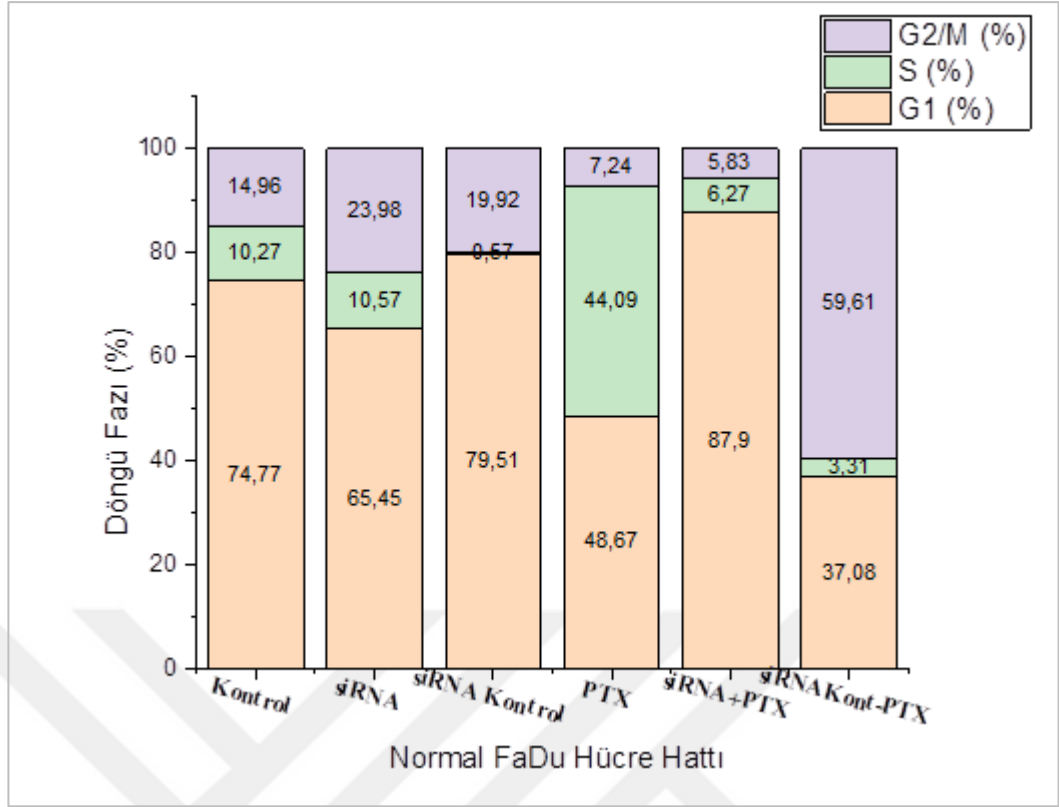
Duyarlı FaDu hücre hattında kontrol grubunda erken apoptoz oranı %1,51 ve geç apoptoz oranı %10,44 iken SALL4 gen inhibisyonu yapılan grupta erken apoptoz oranı %2,18'e, geç apoptoz oranı ise %17,62'ye yükselmiştir. Bu sonuçlar, SALL4 geninin baskılanmasının, özellikle geç apoptoz oranında bir artışa neden olduğunu göstermektedir. PTX uygulanan grupta ise erken apoptoz oranı %5,51, geç apoptoz oranı

ise %22,75 olarak ölçülmüştür. Bu durum, PTX'in apoptoz indükleyici etkisini ortaya koymaktadır. SALL4 geninin inhibe edildiği ve aynı zamanda PTX uygulaması yapılan grupta ise erken apoptoz oranı %5,66, geç apoptoz oranı %24,94 olarak belirlenmiştir. Kombine uygulama sonucunda, hem erken hem de geç apoptoz oranlarında en yüksek artışın meydana geldiği gözlenmiştir. Bu bulgular, SALL4 gen inhibisyonunun PTX'in apoptozu artırıcı etkisini potansiyel olarak güçlendirebileceğini işaret etmektedir.

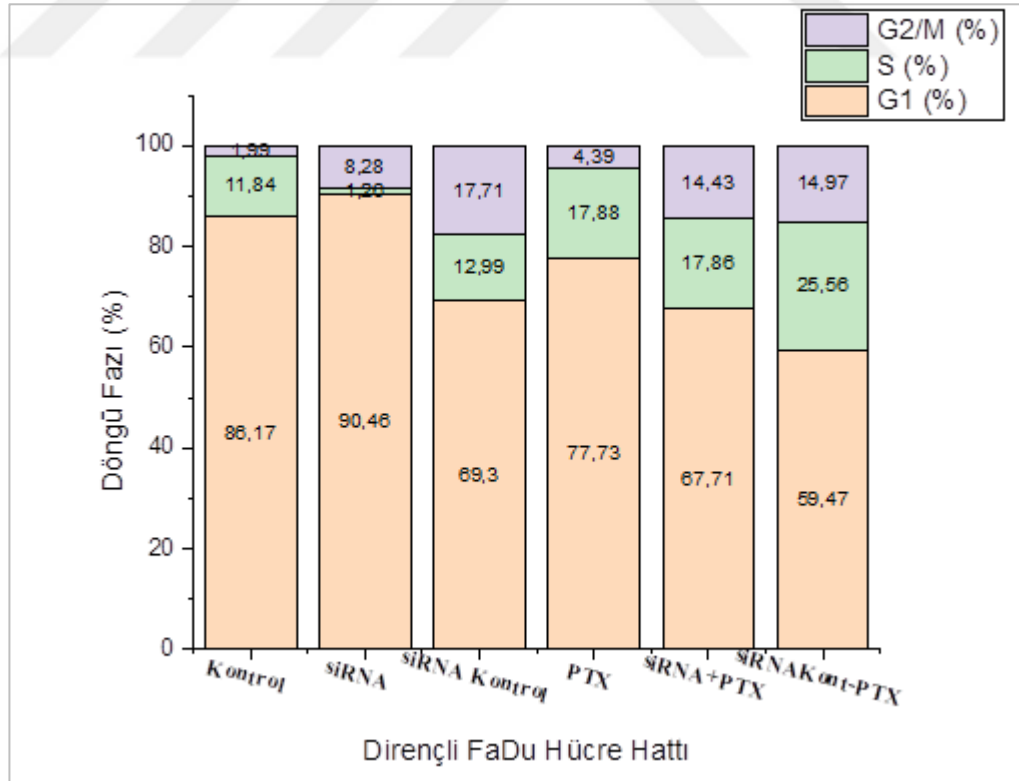
Dirençli FaDu hücre hattında ise kontrol grubunda erken apoptoz oranı %2,24, geç apoptoz oranı ise %5,79 olarak tespit edilmiş iken SALL4 geninin inhibe edildiği grupta erken apoptoz oranı %8,14'e, geç apoptoz oranı ise %7,71'e yükselmiştir. Bu sonuç, SALL4 gen baskılanmasının erken apoptozu artırdığını, geç apoptoz üzerinde ise sınırlı bir artış sağladığını göstermektedir. PTX uygulaması yapılan grupta ise erken apoptoz oranı %2,93, geç apoptoz oranı ise %11,09 olarak ölçülmüştür. Bu durum, dirençli hücre hattında PTX'in tek başına sınırlı düzeyde apoptozu indüklediğini göstermektedir. SALL4 gen inhibisyonu ile birlikte PTX uygulamasının yapıldığı grupta erken apoptoz oranı %3,89, geç apoptoz oranı ise %22,22 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, özellikle geç apoptoz oranındaki belirgin artış ile, SALL4 inhibisyonunun PTX ile birlikte uygulandığında apoptozu artırıcı etkisini güçlendirdiğini ve ilaç direnç engelinin aşılmasında potansiyel bir hedef stratejisi oluşturabileceğini göstermektedir.

4.4. Hücre Döngüsü Analizi

Normal ve dirençli FaDu hücre hatlarından SALL4 gen inhibisyonunun hücre döngüsü fazlarının oranları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).



Şekil 4.19. normal fadu hücre hattında hücre döngüsü analizi



Şekil 4.20. Dirençli FaDu hücre hattında hücre döngüsü analizi

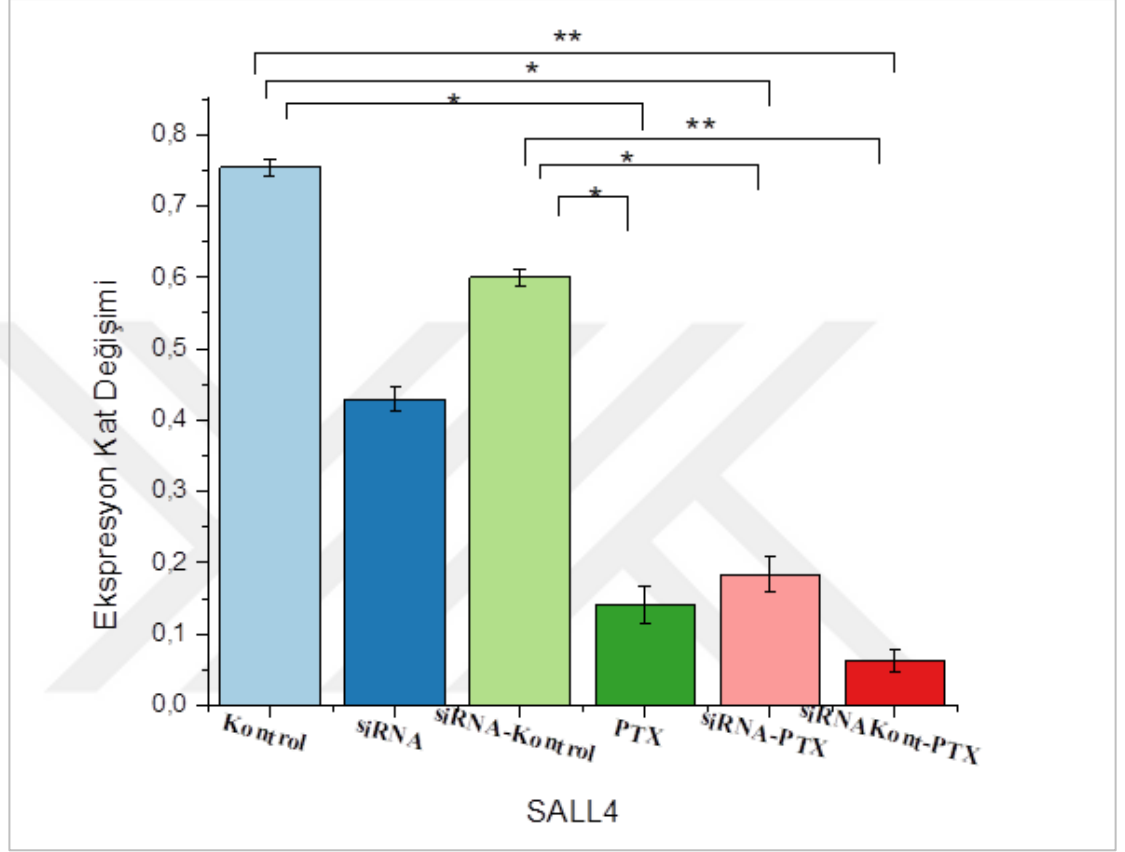
Normal FaDu hücre hattında yapılan hücre döngüsü analizine göre, kontrol grubundaki hücrelerin %74,77'si G1 fazında, %10,27'si S fazında ve %14,96'sı G2/M fazında iken SALL4 geninin siRNA ile inhibisyonu, G1 fazında azalmaya (%65,45) ve G2/M fazında belirgin artışa (%23,98) yol açmış, bu da gen inhibisyonunun hücreleri mitoz öncesi fazda durdurduğunu düşündürmüştür. PTX uygulaması, hücreleri S fazında (%44,09) biriktirerek replikasyon aşamasında etkili olduğunu göstermiştir. En dikkat çekici sonuç ise, hem SALL4 inhibisyonu hem de PTX uygulanan grupta hücrelerin büyük çoğunluğunun G1 fazında (%87,90) bulunmasıdır. Bu durum, SALL4'ün susturulmasının PTX'in replikatif baskılayıcı etkisini değiştirerek hücre döngüsünün daha erken bir evresinde (G1 fazında) blokaj oluşturduğunu ve proliferasyonu baskıladığını göstermektedir. Sonuçlar, SALL4 inhibisyonunun PTX'e duyarlı hücrelerde PTX'in anti-proliferatif etkinliği artırabileceğini düşündürmektedir.

Dirençli FaDu hücre hattında hücre döngüsü analizi sonuçları incelendiğinde ise, kontrol grubundaki hücrelerin büyük çoğunluğunun G1 fazında (%86,17) bulunduğu, S (%11,84) ve G2/M (%1,99) fazlarında ise daha düşük oranlarda dağıldığı gözlenmiştir. SALL4 geninin inhibe edildiği grupta G1 fazındaki hücre oranı %90,46'ya yükselirken, S fazındaki oran %1,26'ya düşmüştür. Bu durum, SALL4 geninin proliferasyonu destekleyici rolünü doğrulamakta ve inhibisyonunun hücreleri G1 fazında duraklattığını (G1 arrest) göstermektedir. PTX uygulanan grupta ise G1 fazındaki hücre oranı %77,73'e düşerken S fazı %17,88'e yükselmiş; bu durum PTX'e direnç geliştirilmiş hücrelerde ilaca rağmen hücre döngüsünün devam ettiğini ve DNA sentezinin devam ettiğini ortaya koymuştur. SALL4 geninin inhibe edilmesinin ardından PTX uygulanan grupta ise G1 fazı %67,71'e düşerken, G2/M fazı %14,43'e kadar yükselmiştir. Bu bulgular, SALL4 inhibisyonunun PTX'e karşı olan hücresel direnci kırabileceğini ve hücrelerin mitoz öncesi fazda (G2/M) birikerek çoğalamadığını göstermektedir. Sonuç olarak, SALL4 inhibisyonunun PTX ile birlikte uygulanmasının, PTX'e dirençli FaDu hücre hattında hücre döngüsünü bozarak sinerjik bir etki oluşturabileceği düşünülmektedir.

4.5 Moleküler Genetik Yanıtlar

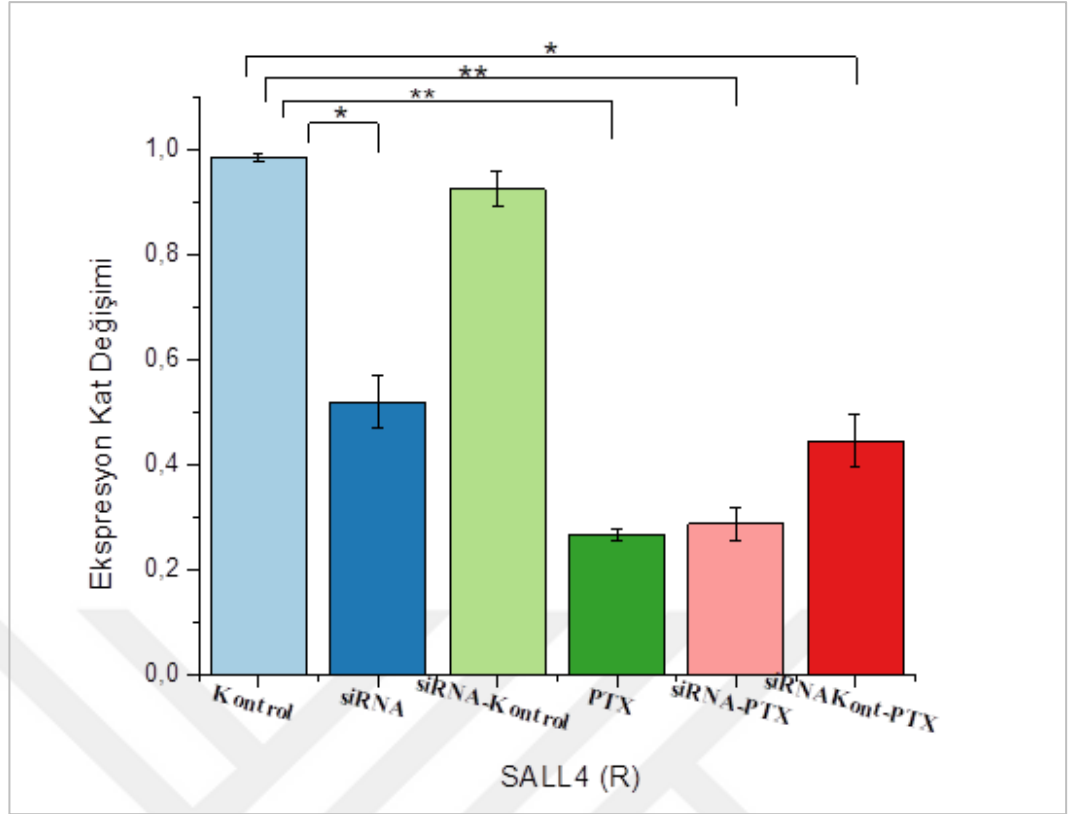
Çalışmamızda yapılan analizlere göre SALL4 geni inhibe edilen FaDu ve PTX direnci kazandırılmış FaDu hücre hattında SALL4 geninin, HNSCC'lerde oluşan ilaç

direncinin altında yatan moleküler mekanizma ile olan ilişkisini aydınlatabilmek için 12 adet genin ekspresyon seviyesine bakılmıştır. Bu amaçla her gruptaki hücrelerden RNA izole edilmiş, cDNA sentezlenmiş ve belirlenen genlere ait primerler ile kantitatif analiz yapılmıştır.



Şekil 4.21. FaDu hücre hattında SALL4 geninin ekspresyon düzeyi

Araştırmamızın hedef geni olan SALL4 gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre siRNA uyguladığımız grupta düşüş olması genin inhibe edildiğini göstermektedir. Ayrıca SALL4 gen ekspresyon seviyesi, normal FaDu hattında kontrol grubumuz ile PTX uygulanan grup arasında anlamlı bir şekilde azalmıştır. Aynı zamanda bu hücre hattında kontrol grubumuz ile hem PTX uyguladığımız hem de SALL4 genini inhibe ettiğimiz grup arasında da anlamlı değişiklik tespit edilmiştir. Bu nedenle, SALL4 geninin PTX tedavisine yanıt olarak düzenlenen genetik yollarda rol oynayabileceğini ve bu genin ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin tedavi yanıtı ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir.

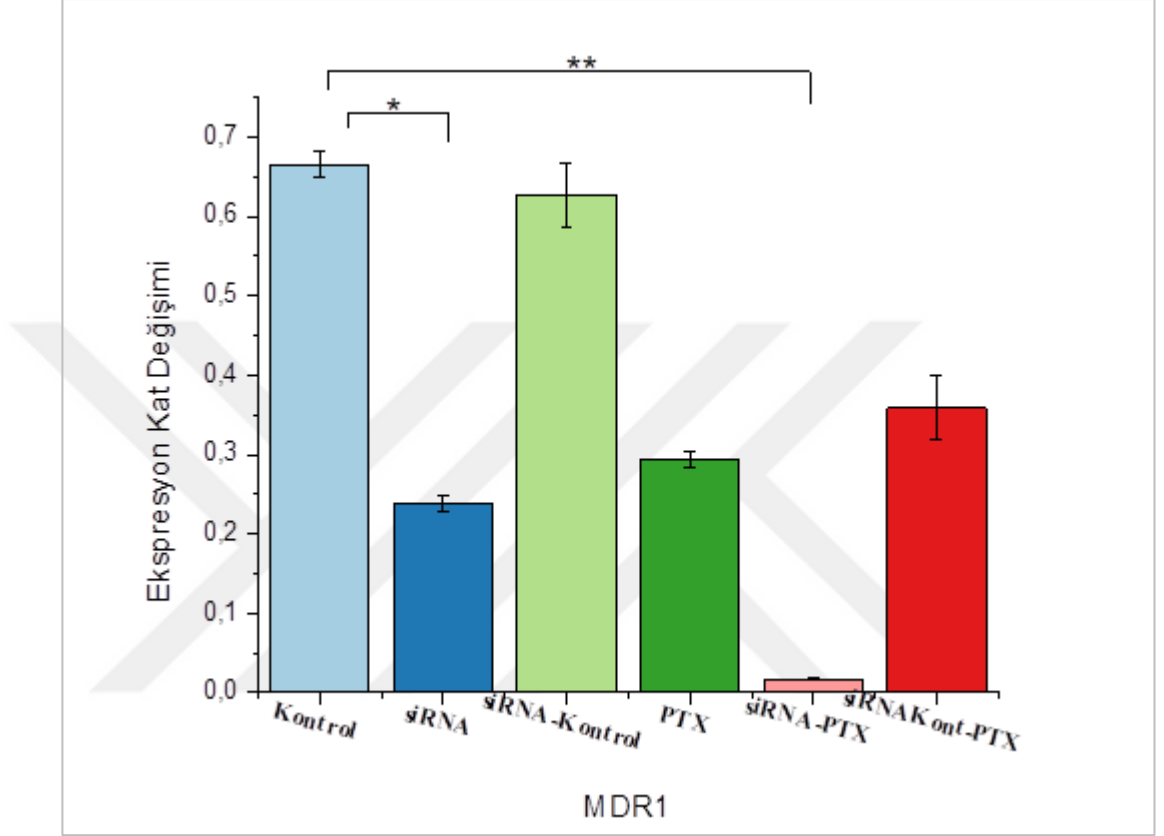


Şekil 4.22. PTX dirençli FaDu hücre hattında SALL4 geninin ekspresyon düzeyi

Çalışmamızda PTX direnci kazandırılmış FaDu hücre hattında bir transkripsiyon faktörü olan SALL4 geninin ekspresyon seviyesi değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, siRNA uygulanan grubumuzda SALL4 gen ekspresyonunda anlamlı bir düşüş olmuştur. Bu nedenle PTX direnci kazandırılan hücre hattında siRNA uygulaması ile SALL4 genini inhibe ettiğimiz sonucuna varmaktayız. Ayrıca hem sadece PTX uyguladığımız hem de gen inhibisyonu ile kemoterapi ajanını birlikte uyguladığımız grubumuz ile kontrol grubumuz arasında da anlamlı düşüş olması, PTX ilacının bu hücre hattında SALL4 ile ilişkili bir sinyal yolunu etkilemekte olduğunu ve böylece genin ekspresyon seviyesini daha da düşürdüğünü göstermektedir.

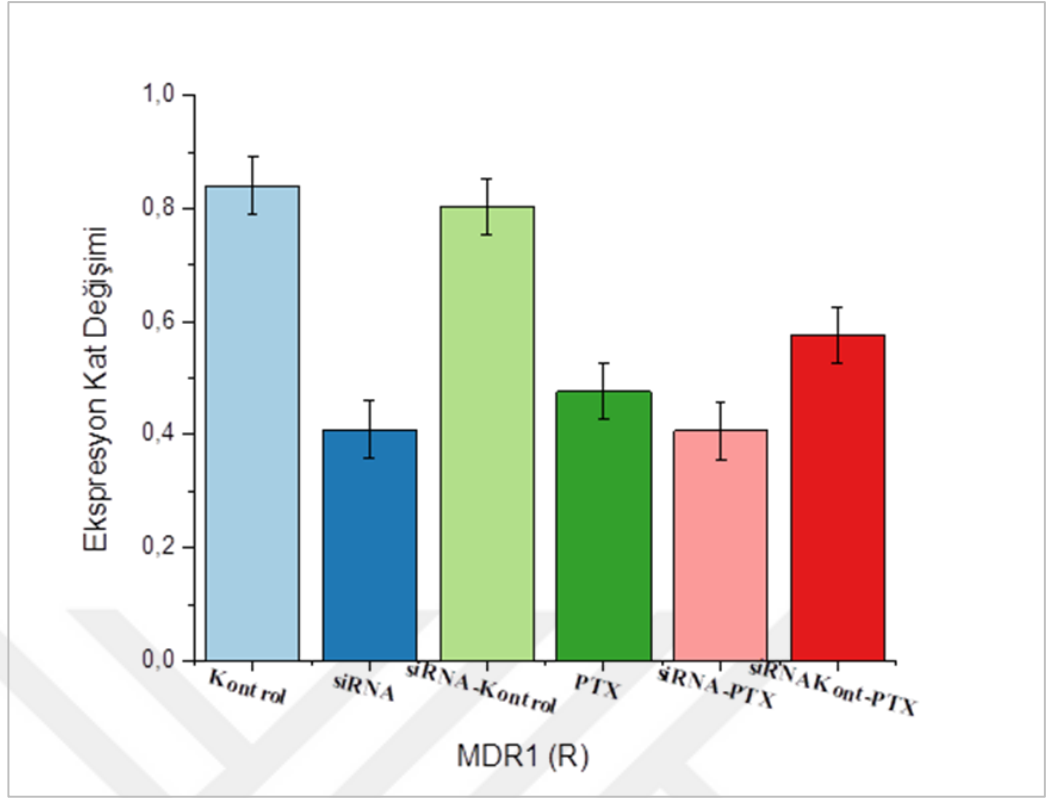
Kemoterapötik direnç veya çoklu ilaç direnci (MDR), kanser hücrelerinin birçok antikanser ilacına ve etki mekanizmalarına verdiği yanıt ile ilişkilidir (X. Zhang vd. 2010). PTX, kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçları yenmesini sağlayan MDR geninin upregülasyonu yoluyla kanser tedavisine karşı direnç geliştirmektedir (Perez 2009). MDR, kemoterapötik ilaçların farmakokinetiğini değiştirebilir, tümör mikro ortamını değiştirebilir ya da kanser hücreleri içinde değişikliklere neden olarak etki mekanizması uygulamaktadır (Alalawy 2024). Dahası, MDR1 geni, kanser hücrelerinin hücre zarlar

aracılığıyla ihtiyaç duydukları substratları iletmesini sağlayan bir dışarı akış pompası işlevi gören P-glikoprotein (P-gp) dahil olmak üzere ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarını etkilemektedir. Bu ilaç dışarı akışı, paklitaksel kemorezistansından sorumlu olan önemli bir strateji olduğu bilinmektedir (Gottesman vd. 2002).



Şekil 4.23. FaDu hücre hattında MDR1 geninin ekspresyon düzeyi

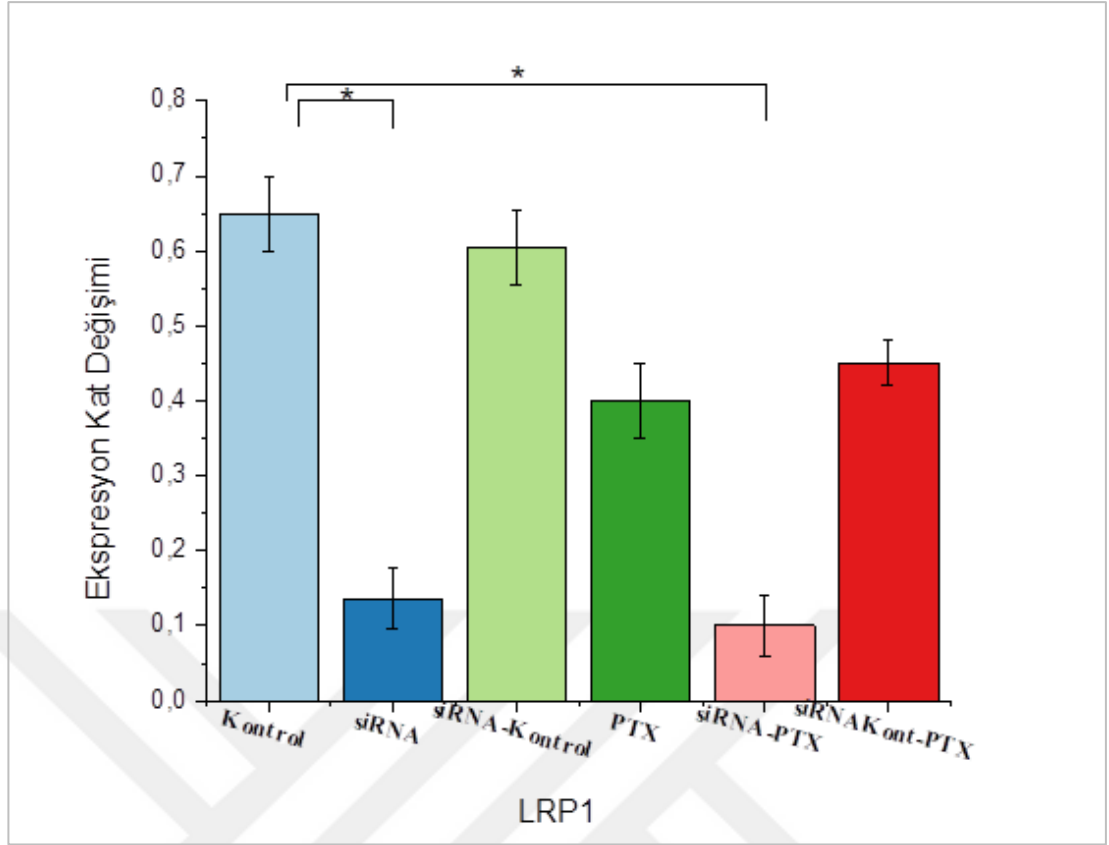
FaDu hücre hattı üzerinde yaptığımız çalışmamızda, MDR1 gen ekspresyonunun, kontrol grubuna kıyasla hem PTX hem de SALL4 gen inhibisyonu yapılan grupta anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, SALL4 geninin MDR1'in transkripsiyonel regülasyonunda rol oynayabileceğini ve SALL4 inhibisyonunun PTX ile sinerjik etki göstererek hücrelerin ilaç direncini azaltabileceğini işaret etmektedir. SALL4 inhibisyonunun PTX ile birlikte uygulanması MDR gen ekspresyonunun baskılanması yoluyla FaDu hücrelerinde ilaç duyarlılığını artırabilir. Bu sonuç, hedefe yönelik tedavi stratejileri açısından yeni bir bakış açısı sunmaktadır.



Şekil 4.24. PTX dirençli FaDu hücre hattında MDR1 geninin ekspresyon düzeyi

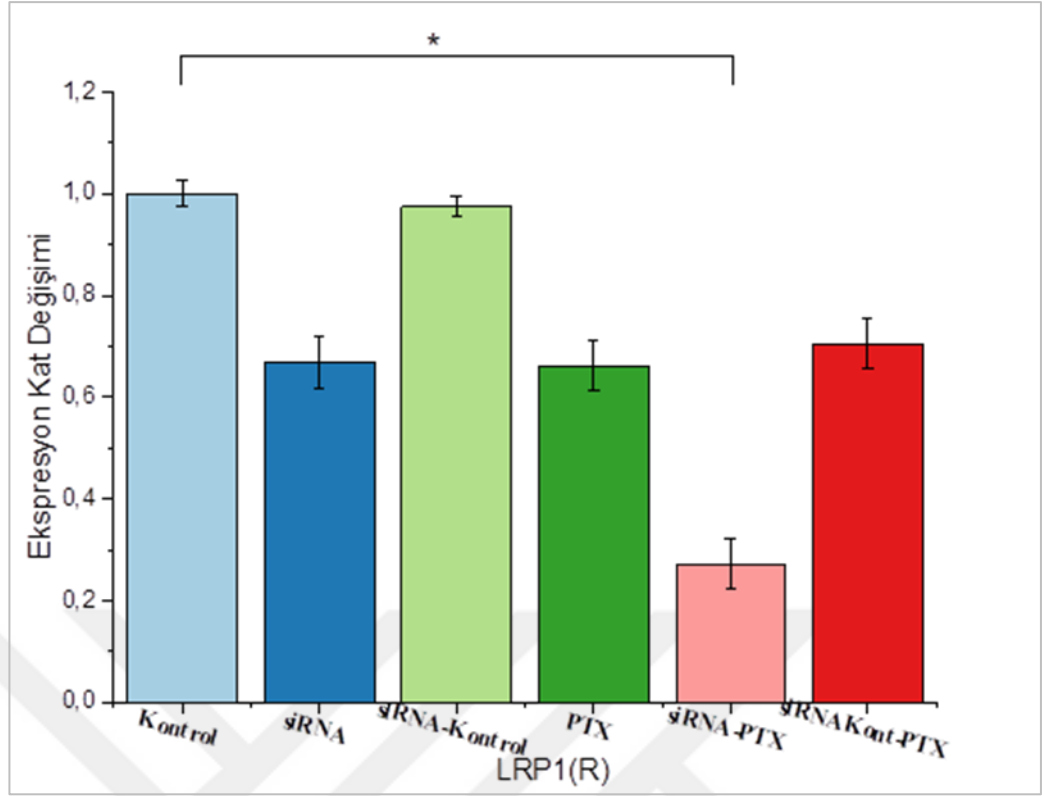
Aynı deneysel bakış açısı PTX dirençli FaDu hücre hattında da uygulandığında farklı bir sonuç gözlemlenmiştir. Bu hücre hattında sadece SALL4 geninin inhibe edildiği grup, sadece PTX uygulanan grup ve her iki uygulamanın birlikte yapıldığı grup ile kontrol grubu arasında bir düşüş olmasına rağmen bu azalış istatistiksel olarak anlamlı seviyede bulunmamıştır. Bu durum, PTX dirençli hücrelerde MDR1 ekspresyonunun daha kompleks ya da alternatif düzenleyici mekanizmalarla kontrol ediliyor olabileceğini işaret etmektedir. Dolayısıyla, SALL4'ün MDR1 üzerindeki etkisi, PTX'e duyarlı ve dirençli FaDu hücreleri arasında farklılık göstermektedir. Bu farklılık, ilaç direncinin kazanılması sürecinde meydana gelen genetik ve epigenetik değişimlerin, hücrelerin yanıt verme biçimini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüyle ilişkili protein 1B (LRP1B), HNSCC dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanan LDL reseptör ailesinin bir üyesi olduğu bilinmektedir ve LRP1B'deki fonksiyon kaybı mutasyonları tümör oluşumu, metastaz, kemoterapi ve radyoterapiye dirençle ilişkilendirilmiştir (Arumugam vd. 2024).



Şekil 4.25. FaDu HÜCRE HATTINDA LRP1 geninin ekspresyon düzeyi

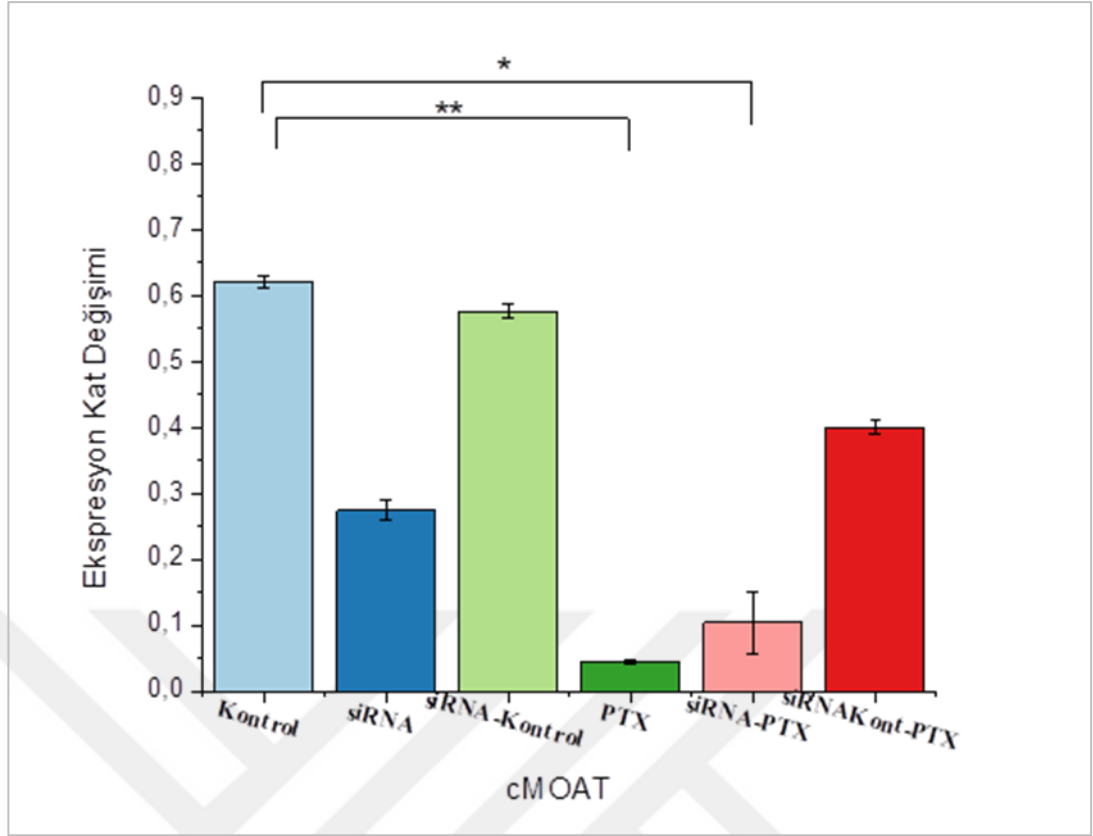
FaDu hücre hattında LRP1 gen ekspresyon düzeyi, SALL4 geninin inhibe edildiği grupta ve hem SALL4 geninin susturulduğu hem de PTX tedavisi uygulanan grupta, kontrol grubuna kıyasla azalmış ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı seviyededir. Öte yandan, sadece PTX uygulanan grupta LRP1 gen ekspresyon düzeyi SALL4 geninin inhibe edildiği her iki gruba göre bir miktar artış göstermiştir. Fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmaması ya PTX'in LRP1 geni üzerine etkisinin sınırlı olduğunu ya da deneysel koşullardan kaynaklandığını göstermektedir. Bu nedenle, FaDu hücre hattında LRP1 geninin düzenlenmesinde SALL4 gen ekspresyonunun ve PTX uygulamasının potansiyel etkisi için ileri analizlerle desteklenmesi gerekmektedir.



Şekil 4.26. PTX dirençli FaDu hücre hattında lrp1 geninin ekspresyon düzeyi

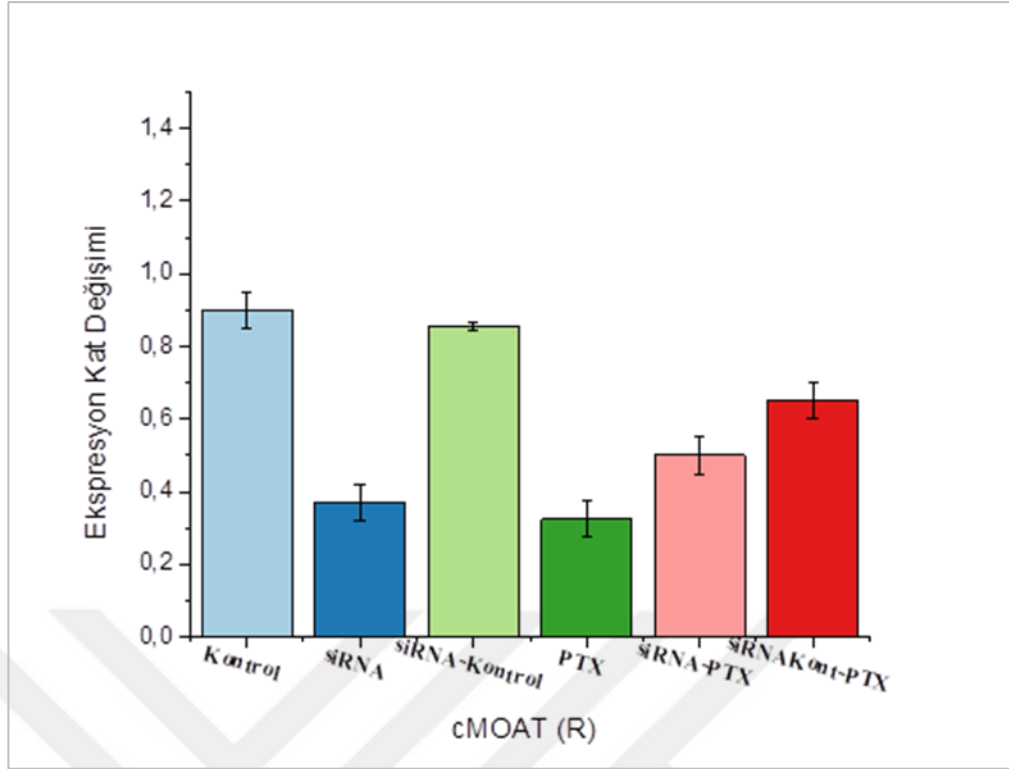
PTX direnci kazandırılmış FaDu hücre hattında ise LRP1 gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla hem PTX uygulanan hem de SALL4 geni inhibe edilen grupta anlamlı seviyede azalmıştır. Bu durum, PTX dirençli hücrelerde PTX tedavisine ek olarak SALL4 geninin inhibe edilmesinin baskılayıcı bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Bu etki LRP1 geninin ilaç direncine sahip hücrelerde farklı regülasyon mekanizmalarına sahip olabileceğini ve SALL4 geninin bu mekanizmalar rol oynayabileceğini göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar, özellikle ilaç direncinin moleküler düzeyde anlaşılması ve hedef alınması için farklı bakış açısı sunmaktadır.

İnsan kanalikül multispesifik organik anyon taşıyıcısı (cMOAT) geni, ABC taşıyıcı süper ailesinin yeni keşfedilen bir üyesidir ve ilaç taşınmasında rol oynadığı öne sürülmektedir (Taniguchi vd. 1996). MDR1 ve LRP genleri gibi cMOAT geninin de antikanser ilaçlarına karşı direnç oluşmasında rol aldığı bilinmektedir (Germann 1996).



Şekil 4.27. FaDu hücre hattında cMOAT geninin ekspresyon düzeyi

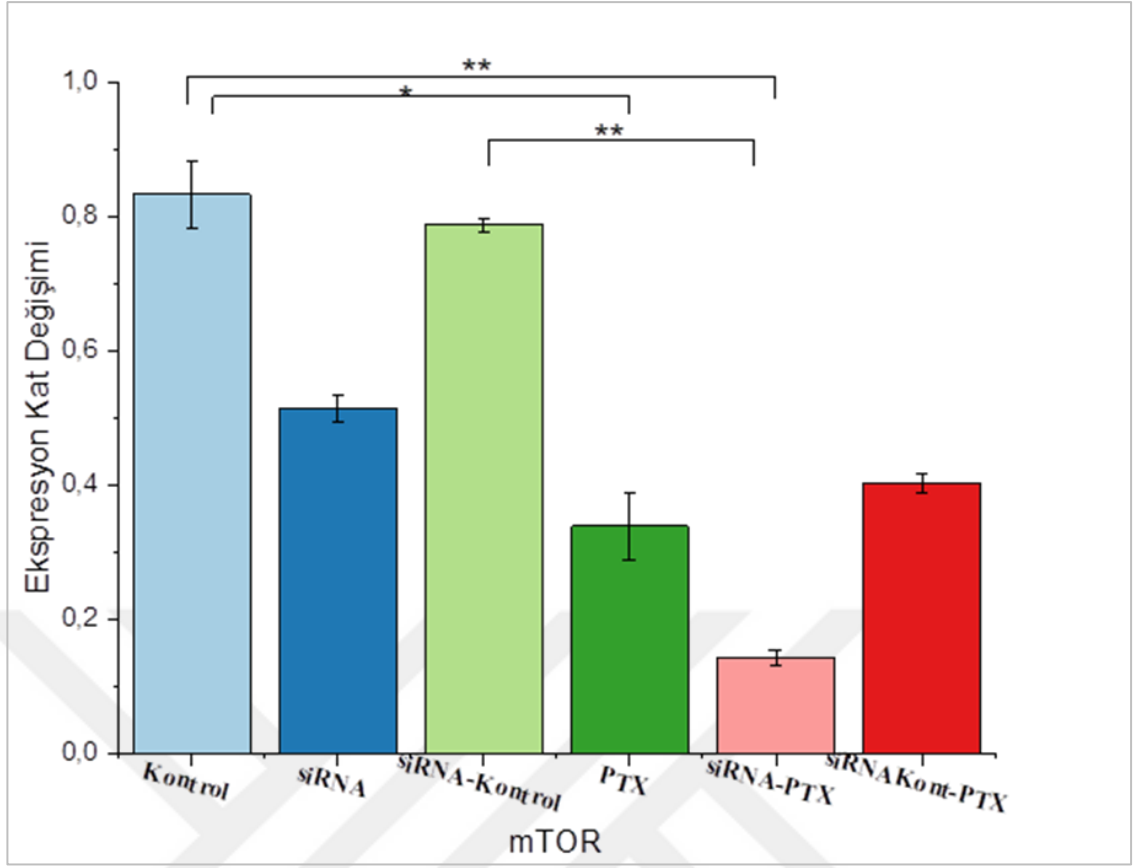
cMOAT gen ekspresyon seviyesi FaDu hücre hattında, kontrol grubuna kıyasla PTX uyguladığımız ve hem PTX uygulayıp hem de SALL4 genini inhibe ettiğimiz grupta istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalış göstermiştir. Bu veri, PTX uygulamasının cMOAT gen ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etki oluşturduğunu göstermektedir ve SALL4 geninin inhibe edilmesiyle bu etkinin korunması, SALL4'ün cMOAT geninin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini işaret etmektedir.



Şekil 4.28. PTX Dirençli FaDu hücre hattında cMOAT geninin ekspresyon düzeyi

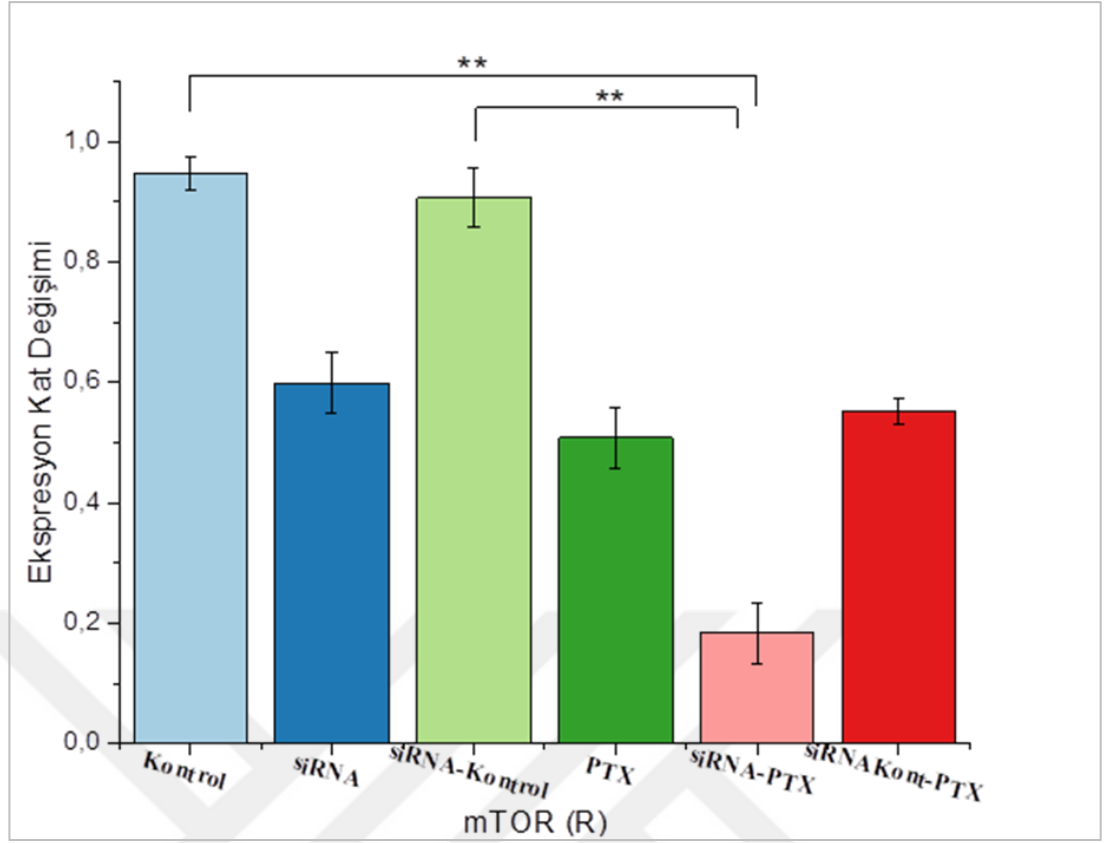
PTX direnci kazandırılmış hücre hattında ise kontrol grubuna kıyasla SALL4 geninin inhibe edilmesi ve hem inhibisyonun olduğu hem de PTX uygulanan gruplarda düşüş istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildir. Bu durum dirençli hücrelerde SALL4 inhibisyonun cMOAT geni üzerine etkisinin sınırlı olabileceğini göstermektedir ve cMOAT geninin ilaç direnci oluşmasıyla birlikte farklı düzenleme mekanizmalarına geçtiğini ortaya koymaktadır.

Memeli rapamisin hedefi (mTOR) sinyal yolu, tüm hücrelerde metabolizmanın merkezi bir düzenleyicisi olduğu bilinmektedir. Hücre içi ve hücre dışı sinyalleri ile besin seviyelerini algılamakta hücre büyümesi, hayatta kalması ve çoğalması için metabolik gereksinimleri koordine etmektedir. mTOR sinyalleşmesinin düzensizleşmesine neden olan genetik değişiklikler metabolik yeniden programlamaya yol açarak, baş ve boyun kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişmesine neden olduğu bilinmektedir (Tan vd. 2019). Ayrıca, HNSCC'deki mTOR düzensizliği, lezyonların %10'undan daha azında mutasyon barındıran JAK/STAT ve MAPK gibi diğer bilinen yollara kıyasla, anormal mitojenik sinyallemede yer alan en sık görülen genomik değişiklik olduğu bildirilmiştir.



Şekil 4.29. FaDu hücre hattında mTOR geninin ekspresyon düzeyi

mTOR geninin ekspresyon seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PTX uygulanan ve hem PTX uygulayıp hem de SALL4 genini inhibe ettiğimiz grupta istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir. mTOR yolları hücre proliferasyonu, büyüme ve hayatta kalma gibi süreçlerde kritik rol oynadığından, PTX etkisi sonucu düşüş olması PTX'in antitümör etkisinin moleküler mekanizmalarından biri olarak değerlendirilebilir. PTX'in mTOR sinyal yolları üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturduğu ve SALL4 inhibisyonunun bu etkiyi potansiyel olarak artırabileceği işaret edilmektedir. Bu inhibisyonun ekspresyon üzerine olan etkisi SALL4 geninin mTOR ile olası regülasyon ilişkisini göstermektedir.

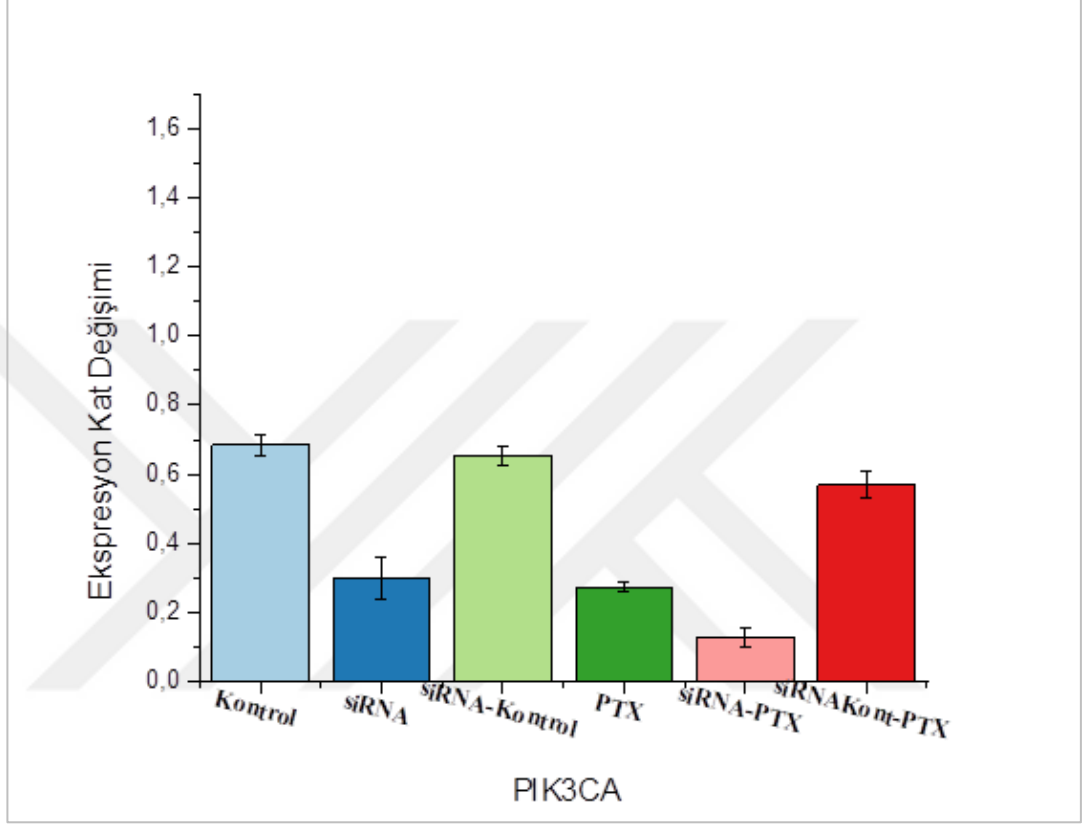


Şekil 4.30. PTX dirençli FaDu hücre hattında mTOR geninin ekspresyon düzeyi

Dirençli FaDu hücre hattında mTOR gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, kontrol grubuna kıyasla yalnızca SALL4 geninin siRNA ile inhibe edildiği grupta ve sadece PTX uygulanan grupta bir düşüş gözlenmiştir fakat bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak, kontrol grubu ile hem SALL4 inhibisyonu hem de PTX uygulaması yapılan grupta mTOR gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı düzeyde bir düşüş olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, SALL4 inhibisyonunun PTX tedavisi ile birlikte uygulandığında mTOR sinyal yolları üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturabileceğini göstermektedir.

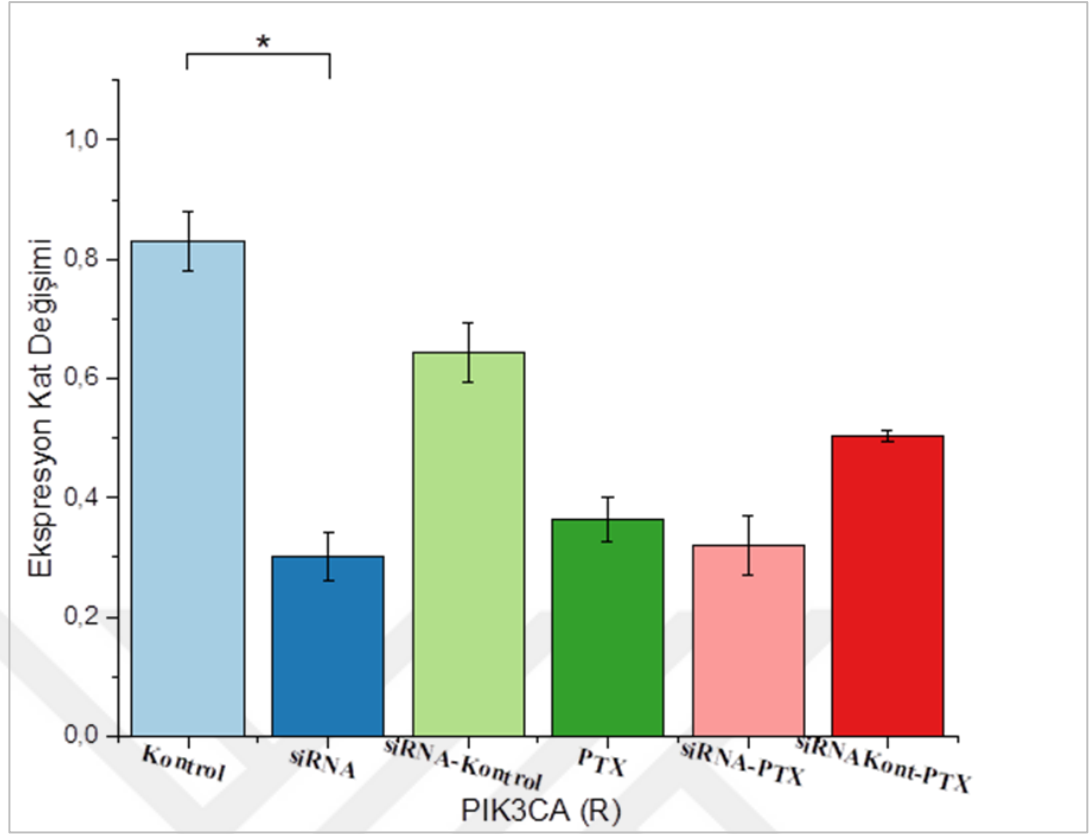
PI3-K/AKT sinyalizasyonu, çoğalma, invazyon, apoptoz ve hipoksi ile ilişkili proteinlerin hücresel süreçleri düzenlemektedir ve bu sinyal iletim yolunun izlenmesi ve manipülasyonu, baş ve boyun kanseri için önemli sonuçlar doğurabilir çünkü PI3-K/AKT yolunun aktivasyonu bu tümörlerde sık görülen bir olaydır. PI3-K/AKT sinyalizasyon yolunun aktivasyonu, EGFR gibi reseptör tirozin kinazlarının uyarılmasıyla meydana gelebilmektedir. Bu nedenle, bu yolun aktivasyon durumu, tedavi yanıtının tahmini ve baş ve boyun kanserinde terapötik hedefleme için önemli bir unsur olacağı

düşünülmektedir (Bussink vd. 2008). HNSCC'li hastaların %90'ından fazlasında PI3K/AKT/mTOR sinyalleme sisteminin, EGFR aktivasyonu (%47), PIK3CA mutasyonları (%8,6), PIK3CA amplifikasyonları (%14,2) ve PTEN mutasyonu (%10-15) sonucunda aktif olduğu bilinmektedir (Marquard ve Jücker 2020).



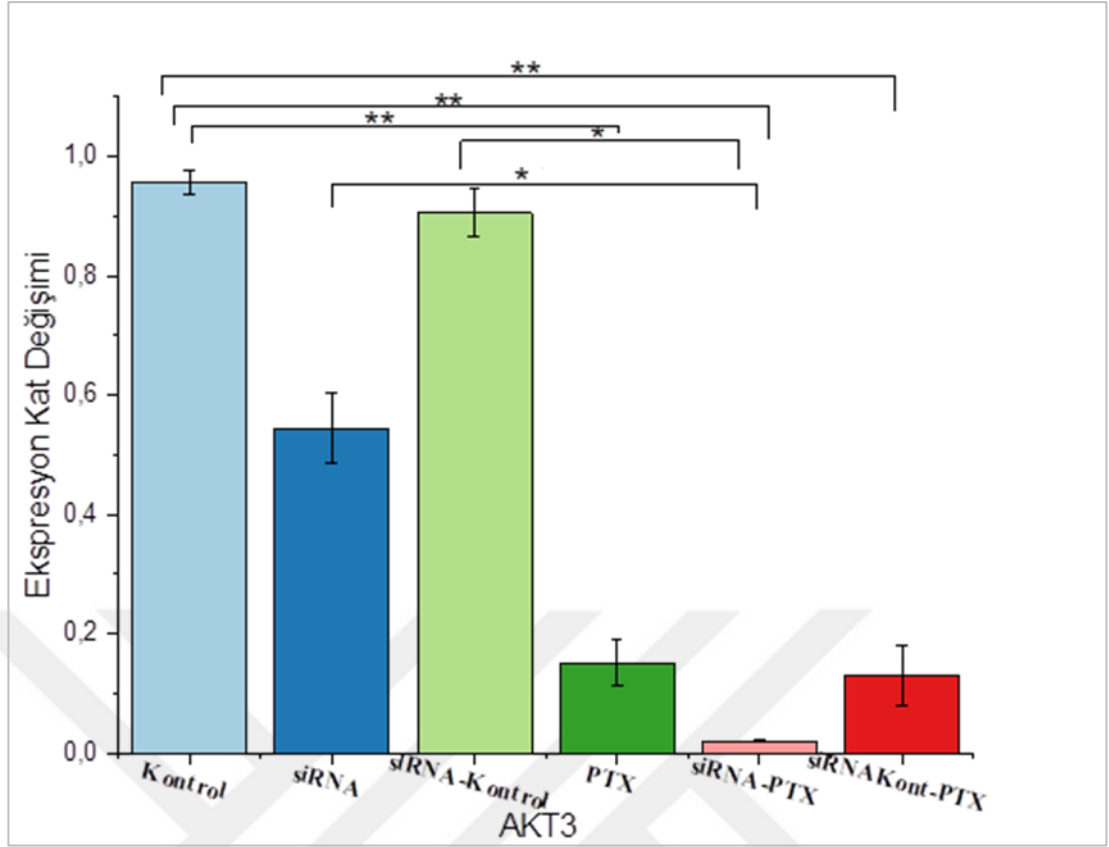
Şekil 4.31. FaDu hücre hattında PIK3CA geninin ekspresyon düzeyi

FaDu hücre hattında gerçekleştirilen PIK3CA gen ekspresyon analizinde, kontrol grubuna kıyasla yalnızca SALL4 geninin inhibe edildiği grupta ve kombinasyon grubunda PIK3CA ekspresyon düzeyinde bir azalma olmasına rağmen bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu veriler, SALL4 inhibisyonunun PIK3CA ekspresyonu üzerinde baskılayıcı yönde bir eğilim gösterebileceğini fakat bu etkinin tek başına ya da PTX ile birlikte uygulandığında belirgin bir düzeye ulaşmadığını göstermektedir.



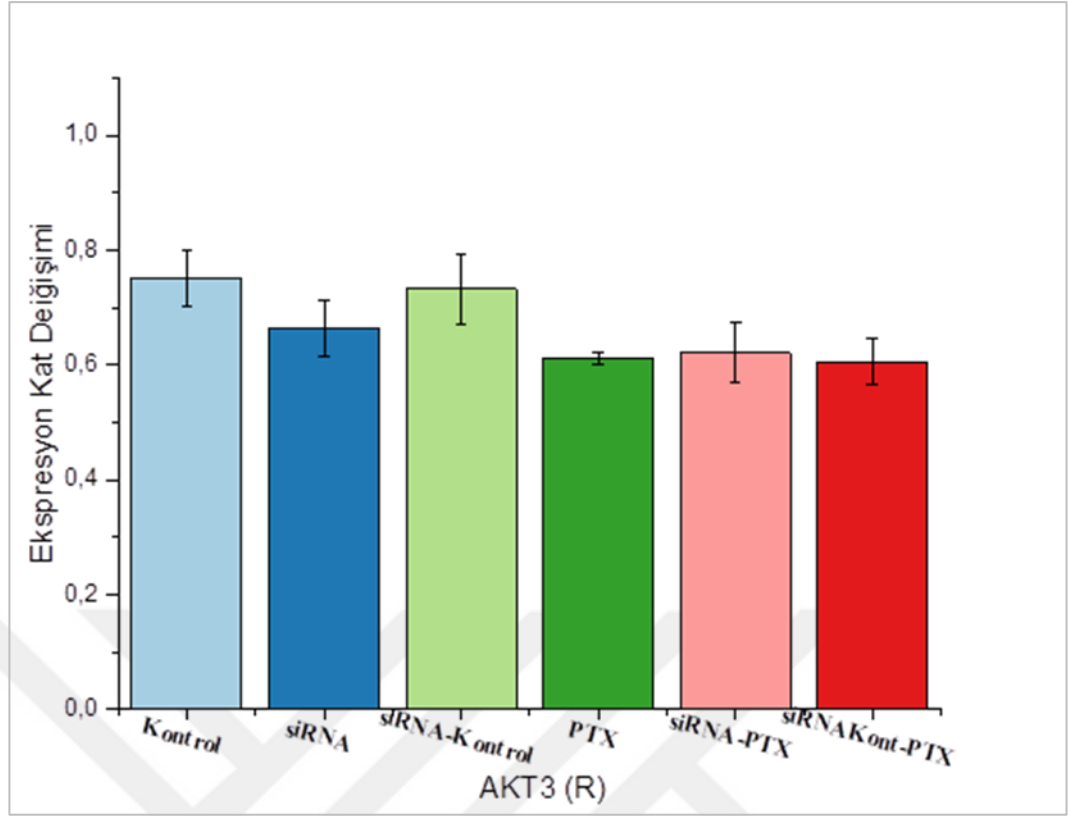
Şekil 4.32. PTX dirençli FaDu hücre hattında PIK3CA geninin ekspresyon düzeyi

PTX'ye dirençli FaDu hücre hattında ise PIK3CA gen ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla SALL4 geninin inhibe edildiği grupta anlamlı bir şekilde düşüş gözlemlenmiştir. PTX uygulanan grupta ve hem SALL4 inhibisyonu hem de PTX uygulaması yapılan grupta azalma gözlemlenmesine rağmen bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. Bu veriler, PTX direnci gelişmiş hücrelerde uygulanan tedavi stratejilerinin PIK3CA gen ekspresyonunu baskılayıcı bir eğilim gösterse de bu etkinin anlamlı düzeye ulaşmadığını göstermektedir.



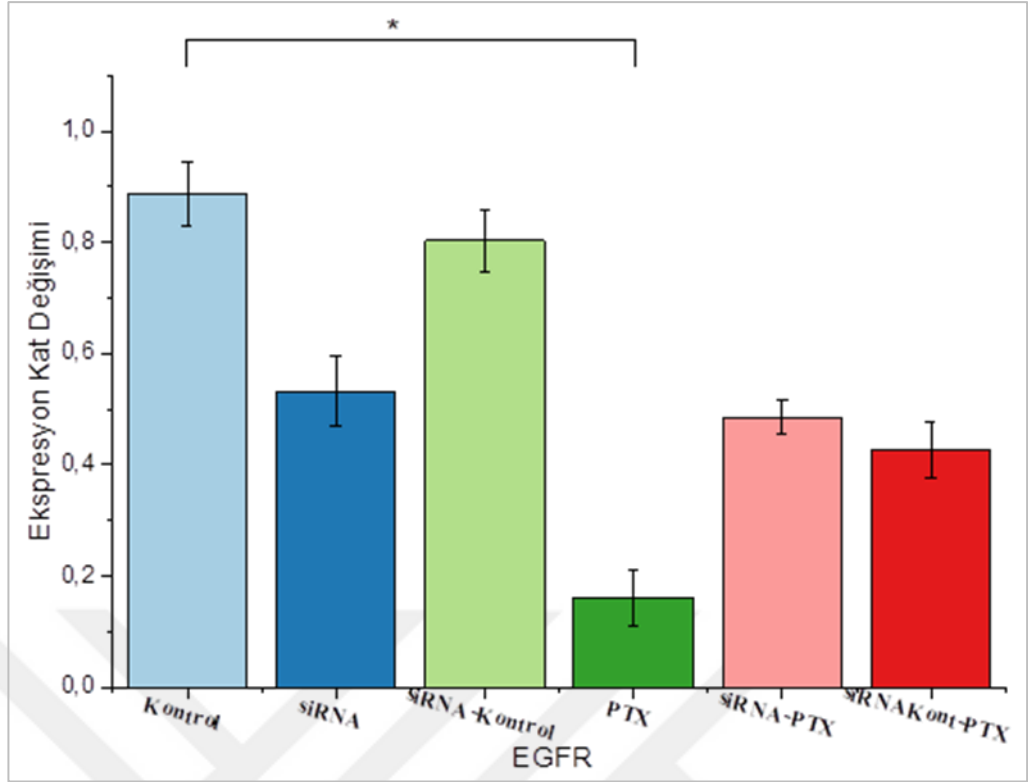
Şekil 4.33. FaDu hücre hattında AKT3 geninin ekspresyon düzeyi

Duyarlı FaDu hücre hattında gerçekleştirilen AKT3 gen ekspresyon analizi sonucunda, kontrol grubuna kıyasla yalnızca PTX uygulanan grupta ve hem SALL4 inhibisyonu hem de PTX tedavisinin birlikte uygulandığı grupta ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmış ayrıca yalnızca SALL4 geninin inhibe edildiği grup ile kombinasyon grubu karşılaştırıldığında da AKT3 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, SALL4 inhibisyonunun PTX ile birlikte uygulandığında AKT3 gen ekspresyonu üzerinde sinerjik bir baskılayıcı etki oluşturabileceğini göstermektedir.



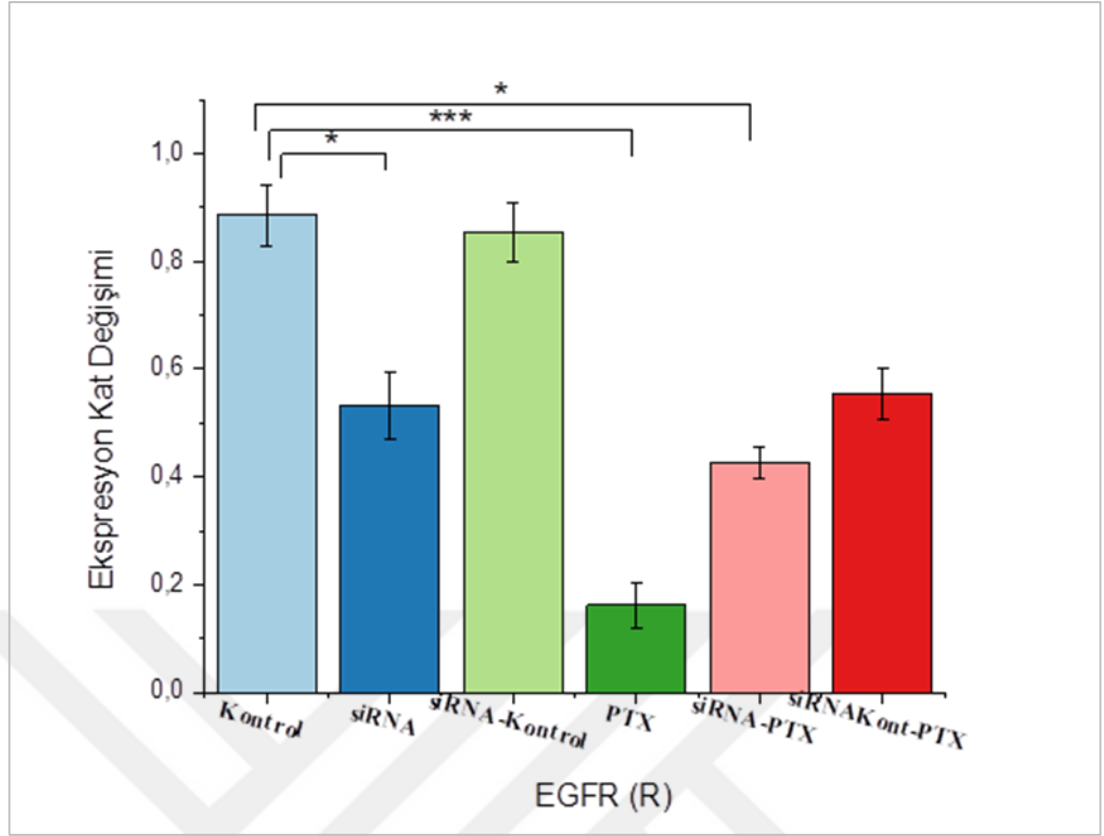
Şekil 4.34. PTX dirençli FaDu hücre hattında AKT3 geninin ekspresyon düzeyi

Dirençli FaDu hücre hattında yapılan AKT3 gen ekspresyon analizinde ise yalnızca SALL4 geninin inhibe edildiği grup ve SALL4 inhibisyonu ve PTX uygulamasının birlikte olduğu ile kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyinde hemen hemen bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlara göre, PTX dirençli gelişmiş FaDu hücrelerinde uygulanan kombinasyon tedavisinin AKT3 gen ekspresyonunu belirgin biçimde etkilemediği söylenebilmektedir.



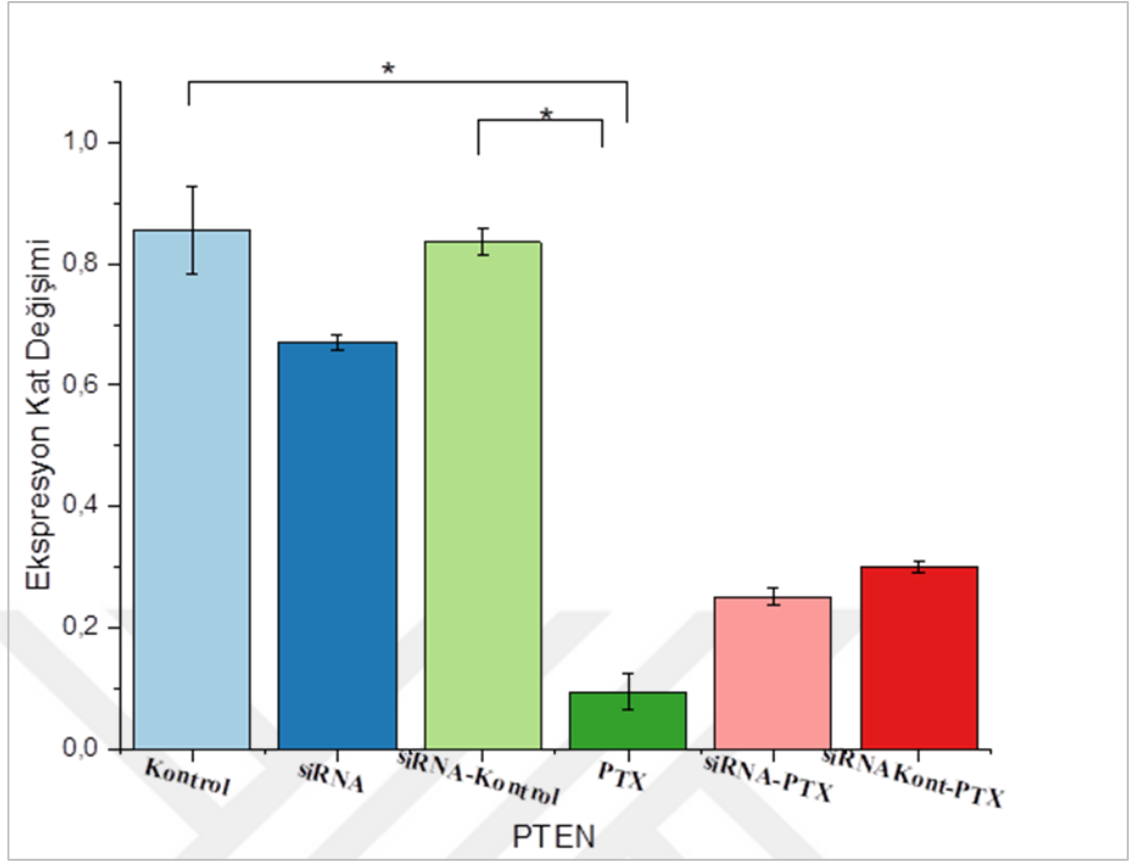
Şekil 4.35. FaDu hücre hattında EGFR geninin ekspresyon düzeyi

FaDu hücre hattında kontrol grubuna kıyasla yalnızca PTX uygulanan grupta EGFR ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. SALL4 geninin inhibe edildiği grup ile hem SALL4 inhibisyonu hem de PTX uygulaması yapılan gruplarda ise EGFR ekspresyon seviyelerinde düşüş gözlemlenmiş fakat bu azalmalar istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. Bu bulgular, PTX tedavisinin EGFR ekspresyonu üzerinde belirgin bir baskılayıcı etki oluşturduğunu ancak SALL4 inhibisyonunun bu etkiyi tek başına ya da kombinasyon şeklinde anlamlı düzeyde artırmadığını göstermektedir.



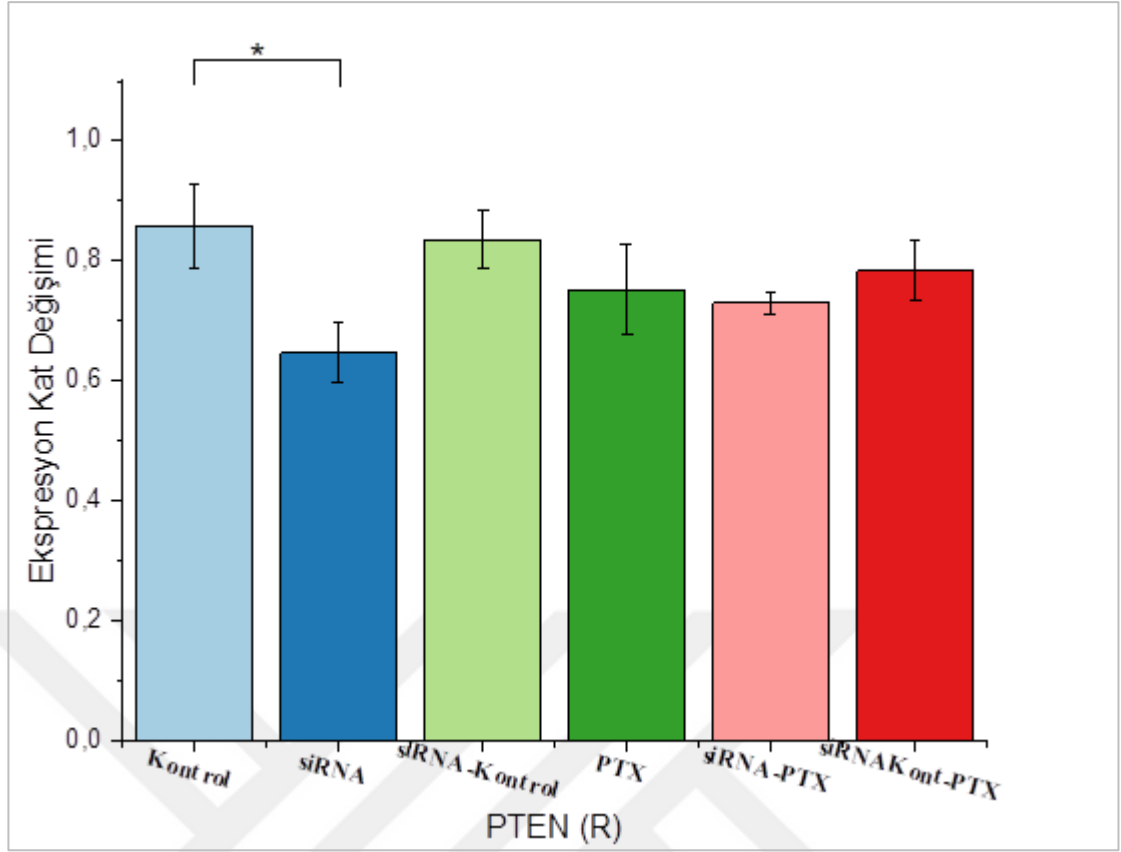
Şekil 4.36. PTX dirençli FaDu hücre hattında EGFR geninin ekspresyon düzeyi

PTX direnci kazandırılmış FaDu hücre hattında kontrol grubuna kıyasla yalnızca PTX uygulanan grupta EGFR ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. Ayrıca SALL4 geninin inhibe edildiği grup ile hem SALL4 inhibisyonu hem de PTX uygulaması yapılan gruplarda da EGFR ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş düzeyine ulaşmıştır. Bu bulgular, PTX tedavisinin EGFR ekspresyonu üzerinde belirgin bir baskılayıcı etki oluşturduğunu ve SALL4 inhibisyonunun bu etkiyi tek başına ya da kombinasyon şeklinde anlamlı düzeyde artırdığını göstermektedir.



Şekil 4.37. FaDu hücre hattında PTEN geninin ekspresyon düzeyi

PTEN gen ekspresyonu analizlerinde, kontrol grubuna kıyasla yalnızca PTX tedavisi uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı seviyede bir azalma saptanmıştır. Bu durum, PTX'in PTEN ekspresyonunu doğrudan baskılayıcı bir etkisinin olabileceğini göstermektedir fakat yalnızca SALL4 geninin inhibe edildiği grupta ve hem SALL4 inhibisyonunun hem de PTX uygulamasının birlikte gerçekleştirildiği grupta PTEN düzeylerinde düşüş gözlemlenmiş olmasına rağmen bu ekspresyon düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgular, iki uygulamanın ortak bir etki oluşturmadığını ve PTEN'in ekspresyon düzeylerinin düzenlenmesinde SALL4'ten farklı veya daha karmaşık sinyal yollarının da rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

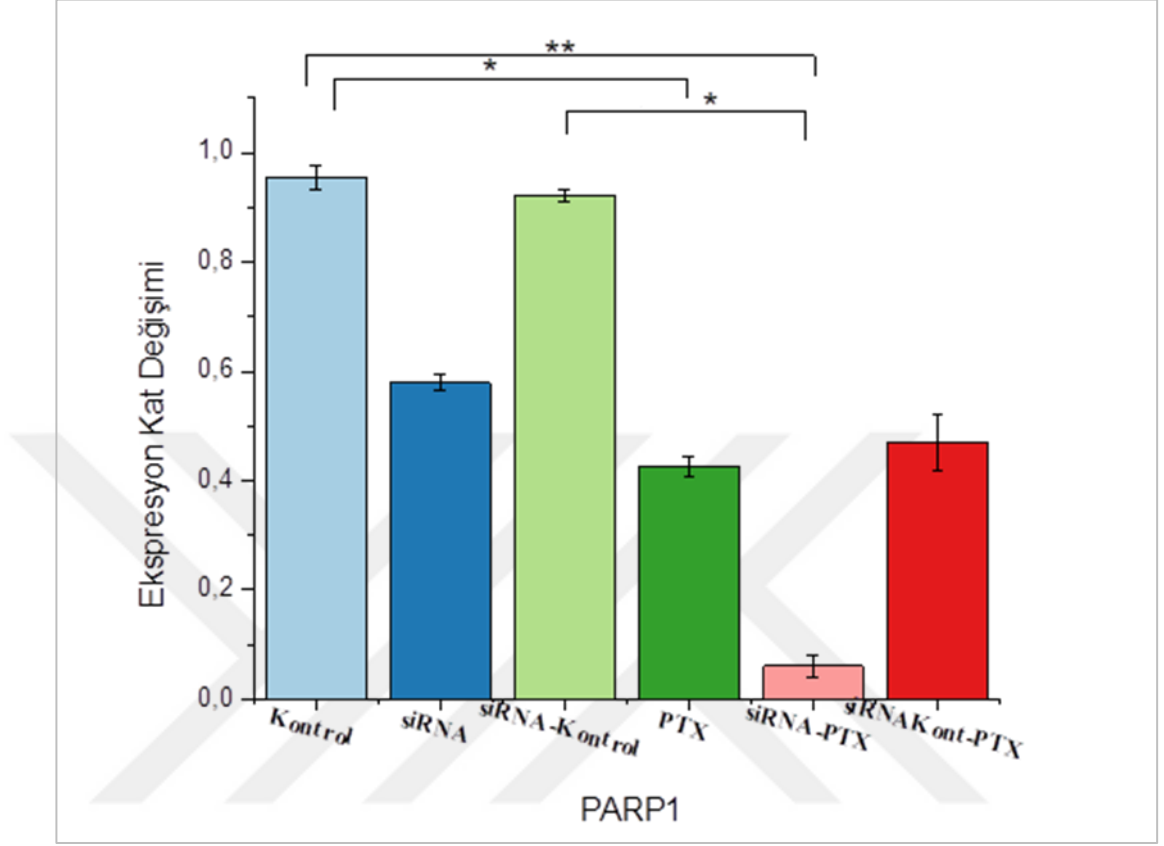


Şekil 4.38. PTX Dirençli FaDu hücre hattında PTEN geninin ekspresyon düzeyi

Çalışmamızda, PTX direnci kazandırılmış hücre hattında, PTEN gen ekspresyon düzeyleri sonucunda sadece SALL4 genine özgü siRNA uygulanmış grupta, kontrol grubuna kıyasla PTEN gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Buna karşılık, yalnızca PTX uygulanan grup ile hem PTX uygulanıp hem de olarak SALL4 geninin inhibe edildiği gruplarda, PTEN ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu bulgular, SALL4 inhibisyonunun tek başına PTEN ekspresyonunu negatif yönde etkilediğini ancak bu etkinin PTX uygulaması ile değişmediğini veya PTX'in PTEN üzerindeki düzenleyici etkilerinin, SALL4 inhibisyonuna bağlı ekspresyon değişikliğini dengelediğini düşündürmektedir. Ayrıca bu sonuçlar, PTX direnci kazanmış hücrelerde PTEN geninin regülasyonunun, SALL4'ten bağımsız ek mekanizmalar tarafından da kontrol edilebileceğine işaret etmektedir.

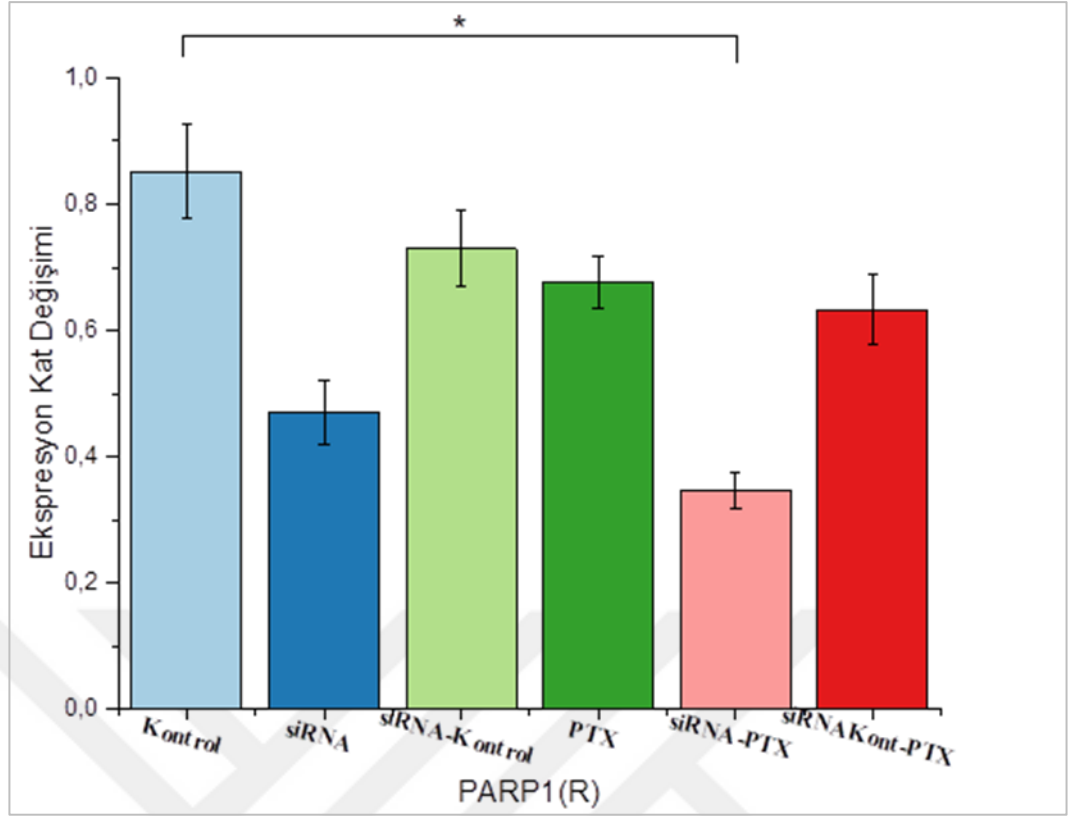
PARP1, DNA hasarı olduğu zama aktifleşen ve DNA tamiri sürecinde kritik rol oynayan poly (ADP-ribose) polymerase 1'i kodlamaktadır ve tek zincirli DNA kırıklarının tamirinde görev almaktadır. Aşırı DNA hasarı durumunda PARP1'in aşırı

aktivasyonu nekroz ya da apoptoza yol açabilir ve bu durum özellikle kanser tedavisinde hedef alınan bir mekanizma olduğu bilinmektedir (Nilov vd. 2020).



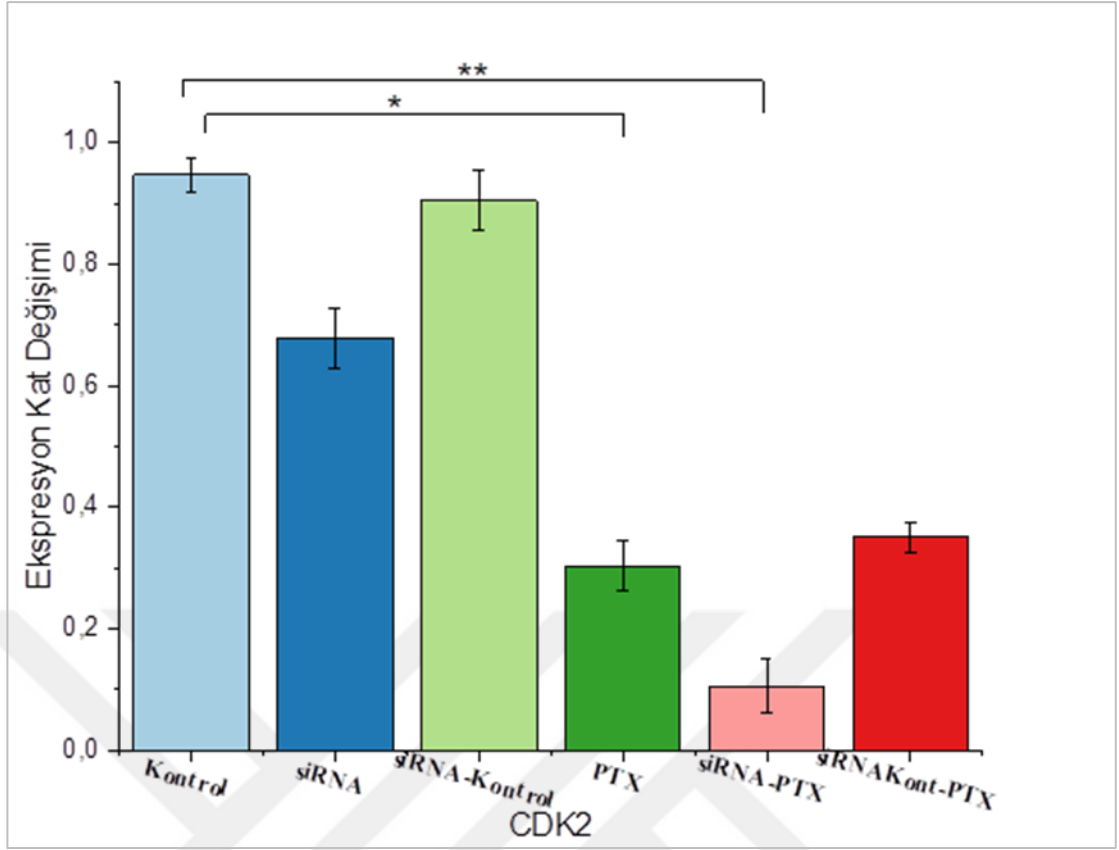
Şekil 4.39. FaDu hücre hattında PARP1 geninin ekspresyon düzeyi

FaDu hücre hattında PARP1 gen ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla yalnızca PTX uygulanan grupta ve hem PTX uygulanıp hem de SALL4 geninin inhibe edildiği grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptanmış olmasına rağmen yalnızca SALL4 geninin susturulduğu grupta da ekspresyon düzeylerinde düşüş gözlemlenmiş fakat bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgular, PTX'in PARP1 gen ekspresyonu üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin SALL4 gen inhibisyonu ile birlikte uygulandığında da devam ettiğini göstermektedir fakat SALL4 geninin tek başına inhibisyonunun, PARP1 ekspresyonu üzerinde sınırlı bir etki oluşturması PARP1 geninin regülasyonunda PTX'in daha baskın bir role sahip olduğunu ve SALL4 inhibisyonunun ise bu baskıyı artırıcı yönde katkı sağlamadığını veya bu hücre hattında sınırlı kaldığını işaret etmektedir. Bu veriler, PTX tedavisinin PARP1'in DNA hasar yanıtı ve tamir mekanizmalarındaki rolü üzerinde doğrudan etkili olabileceğini, SALL4'ün ise bu süreçte dolaylı bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.



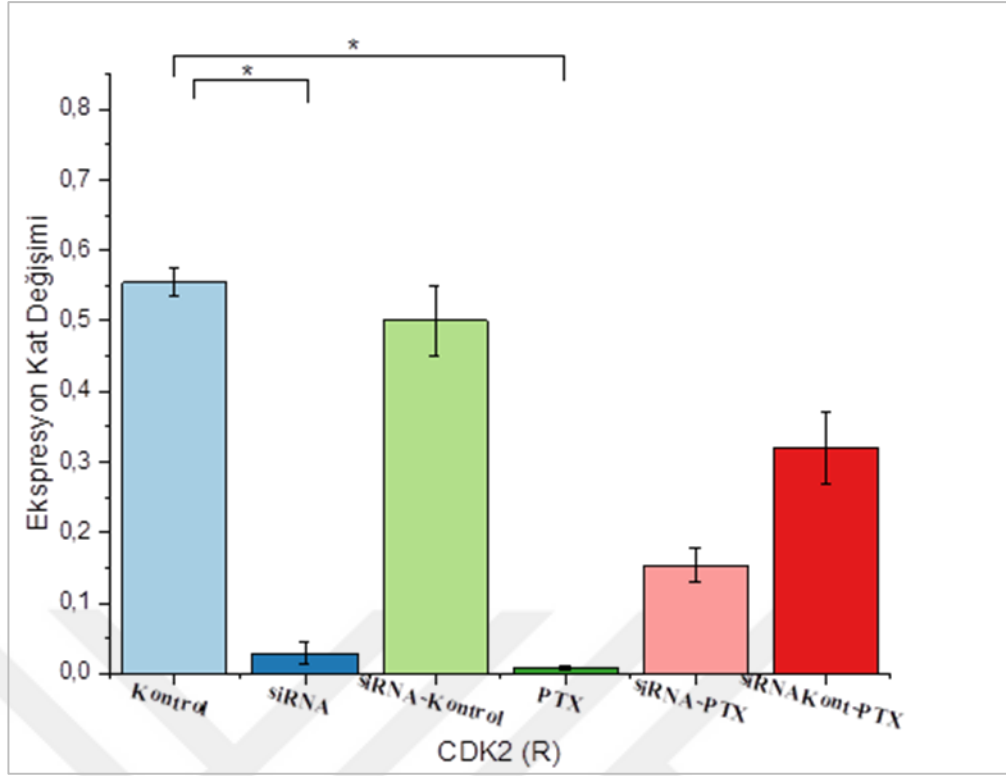
Şekil 4.40. PTX dirençli FaDu hücre hattında PARP1 geninin ekspresyon düzeyi

PTX direnci kazandırılmış FaDu hücre hattında yapılan analizlerde ise, kontrol grubuna kıyasla yalnızca PTX uygulanan ve yalnızca SALL4 geninin inhibe edildiği gruplarda PARP1 gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş gözlemlenmiştir. Buna karşılık, hem SALL4 geninin inhibe edildiği hem de PTX uygulamasının kombine uygulandığı grupta PARP1 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu nedenle PTX'e dirençli hücrelerde PARP1 ekspresyonunun baskılanmasında SALL4 inhibisyonunun ya da PTX uygulanmasının tek başına yeterli olmadığı ancak ortak uygulamada bir etki oluşturabileceği sonucuna varılmaktadır. Bu veriler DNA onarım mekanizmasıyla ilişkili olan PARP1 geni üzerinde SALL4'ün direnç kazanmış hücrelerde dolaylı bir düzenleyici role sahip olabileceğine işaret etmektedir. PTX ile kombine şekilde uygulandığında bu etkinin daha belirgin hale gelmesi ise SALL4 geninin kemoterapi direncinin etkilenmesi açısından potansiyel bir hedef olabileceğini göstermektedir.



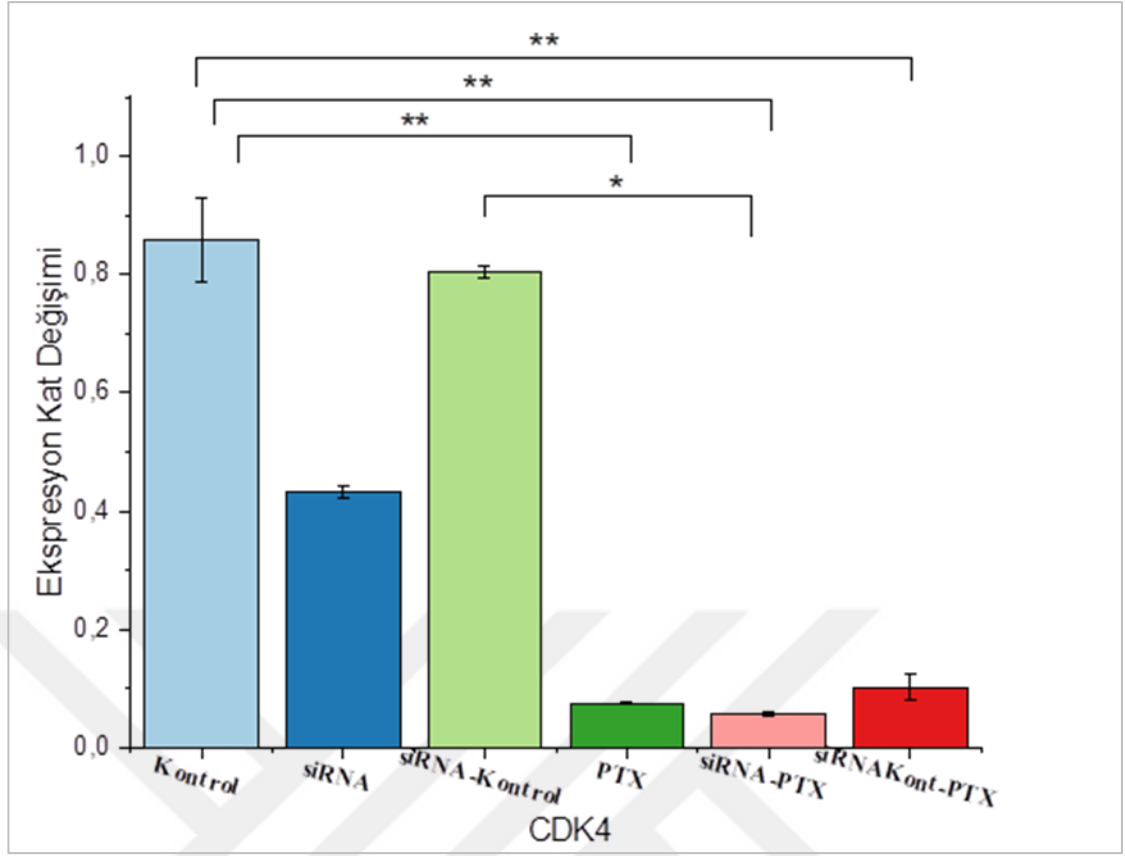
Şekil 4.41. FaDu hücre hattında CDK2 geninin ekspresyon düzeyi

Yapılan çalışmada, CDK2 gen ekspresyon düzeyi kontrol grubuna kıyasla, yalnızca SALL4 gen ekspresyonunun inhibe edildiği grupta azalma göstermiştir fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak sadece PTX uygulanan ve hem PTX uygulanan hem de SALL4 geni aynı anda inhibe edilen grupta CDK2 ekspresyonunda anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, SALL4 geninin CDK2 ekspresyonu üzerindeki düzenleyici rolünü ortaya çıkarmakta ve PTX ile birlikte uygulamanın sinerjik bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Özellikle her iki uygulamanın bir arada yapılmasının CDK2 ekspresyonunu baskılamada tek başına uygulamalardan daha etkili olduğunun görülmesi SALL4 inhibisyonunun, PTX'in antiproliferatif etkisini güçlendirebileceği ve hücre döngüsünü düzenleyen genler üzerinden terapötik etkinin artırılabilirliği yönünde bir bakış açısı sunmaktadır.



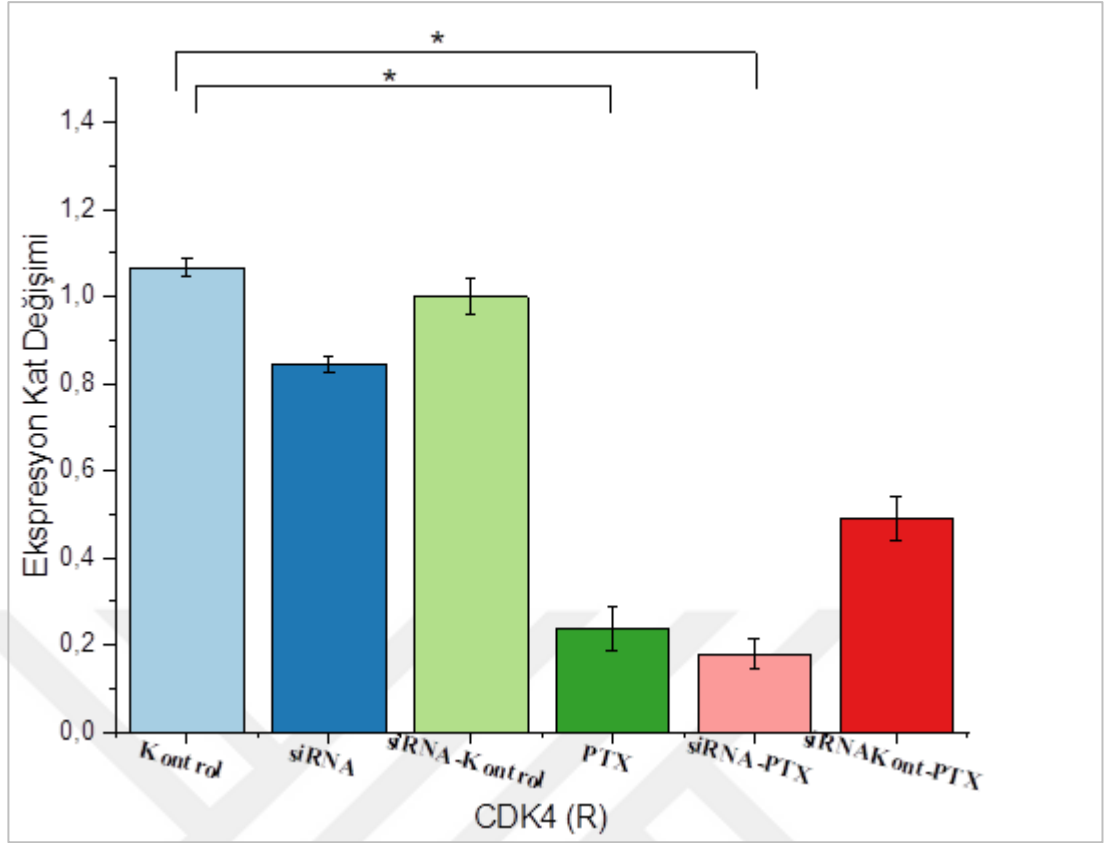
Şekil 4.42. PTX dirençli FaDu hücre hattında CDK2 geninin ekspresyon düzeyi

PTX direnci kazandırılmış hücre hatlarında yapılan analizlerde ise kontrol grubuna kıyasla, yalnızca PTX tedavisi uygulanan grupta ve SALL4 geninin inhibe edildiği grupta CDK2 gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir. Bu veri hem PTX uygulamasının hem de SALL4 gen inhibisyonunun, dirençli hücrelerde CDK2 ekspresyonunu baskılayabildiğini göstermektedir. Bu sonuçlar ile PTX'e dirençli hücrelerde bile SALL4 inhibisyonunun hücre döngüsü düzenleyici genleri üzerinde etkili olduğunu ve CDK2 ekspresyon seviyelerini azalttığı değerlendirilebilmektedir. Bu durum, SALL4'ün kemoterapi direnci ile ilişkili moleküler yollar üzerinde düzenleyici bir rolü olabileceği perspektifine destekleyici olmaktadır. Ancak her iki uygulamanın bir arada yapıldığında bu etkilerin birbirini dengelemiş veya hücre içinde farklı kompleks mekanizmaların devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle hücrenin proliferasyon ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerden biri olan CDK2'nin bu şekilde yanıt vermesi, PTX direnci bağlamında SALL4-CDK2 ilişkisinin karmaşık bir düzenleme ağına sahip olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.43. FaDu hücre hattında CDK4 geninin ekspresyon düzeyi

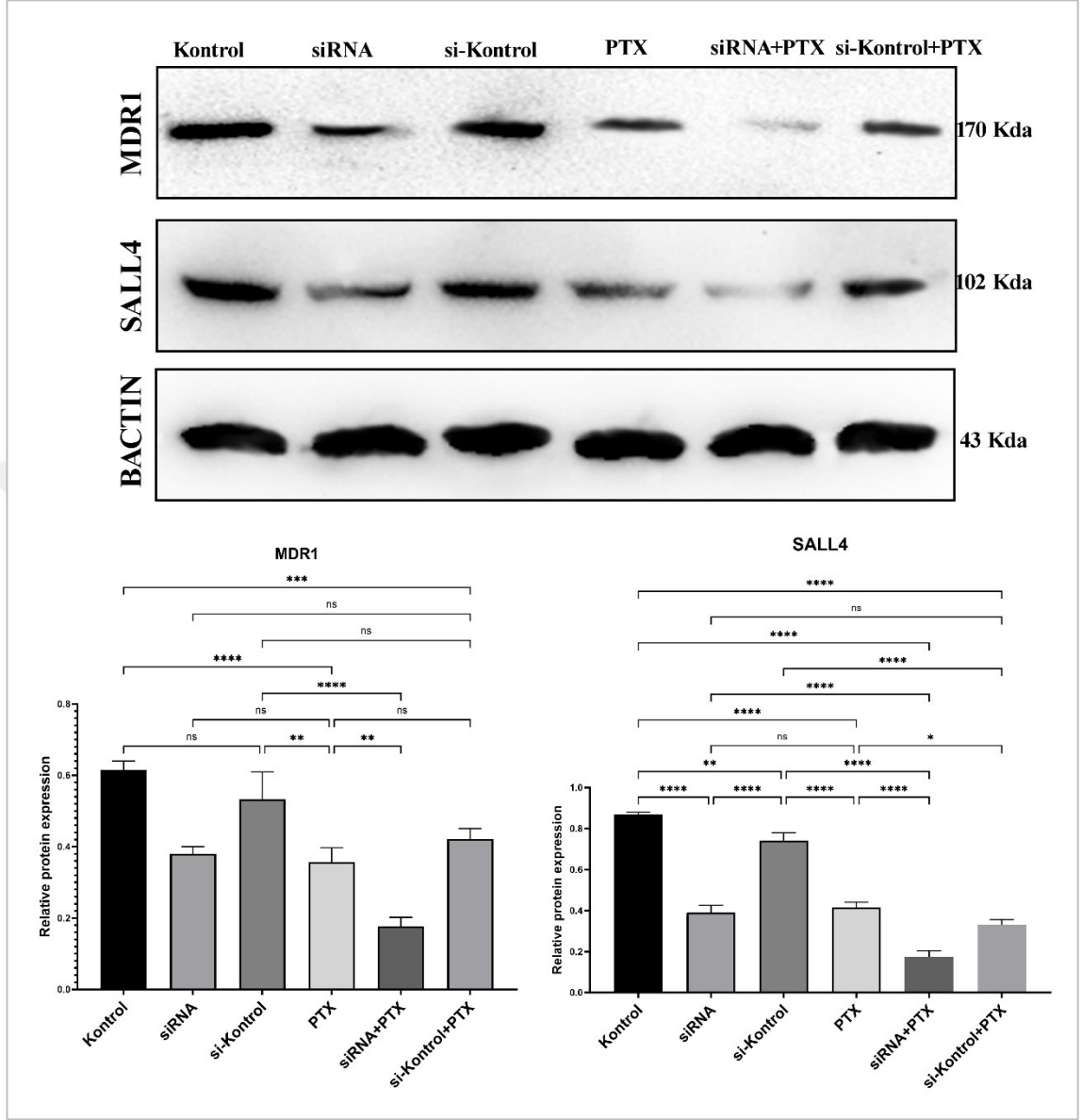
FaDu hücre hattında tespit edilen CDK4 gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla yalnızca PTX uygulanan grupta ve hem PTX uygulanıp hem de SALL4 geninin inhibe edildiği grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu durum, PTX'in CDK4 gen ekspresyonunu baskılayıcı etkisinin, SALL4 gen susturulmasıyla birlikte daha da arttığını ortaya koymaktadır. Sadece SALL4 geninin inhibe edildiği grupta ise kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamış olması CDK4 gen ekspresyonunun doğrudan SALL4 baskılanmasından ziyade, PTX uygulamasıyla ilişkili olarak azaldığını ancak SALL4 susturulmasının PTX'in bu etkisini güçlendirebileceğini işaret etmektedir.



Şekil 4.44. PTX dirençli FaDu hücre hattında CDK4 geninin ekspresyon düzeyi

PTX dirençli FaDu hücre hattında yapılan analizde ise CDK4 gen ekspresyon seviyeleri yalnızca PTX uygulanan grupta ve PTX uygulaması ile birlikte SALL4 geninin inhibe edildiği grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olmuş fakat yalnızca SALL4 geninin susturulduğu grupta CDK4 gen ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu veriler, PTX'e karşı direnç geliştirmiş hücrelerde CDK4 ekspresyonunun azalmasında PTX uygulamasının temel etkisinin olduğunu, SALL4 inhibisyonunun ise tek başına belirgin bir etki göstermediğini ancak kombinasyon grubunda gözlemlenen düşüşün PTX grubuna göre daha belirgin olması, SALL4 susturulmasının PTX'in etkisini destekleyici bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır.

4.3. Western Blotlama Analizi

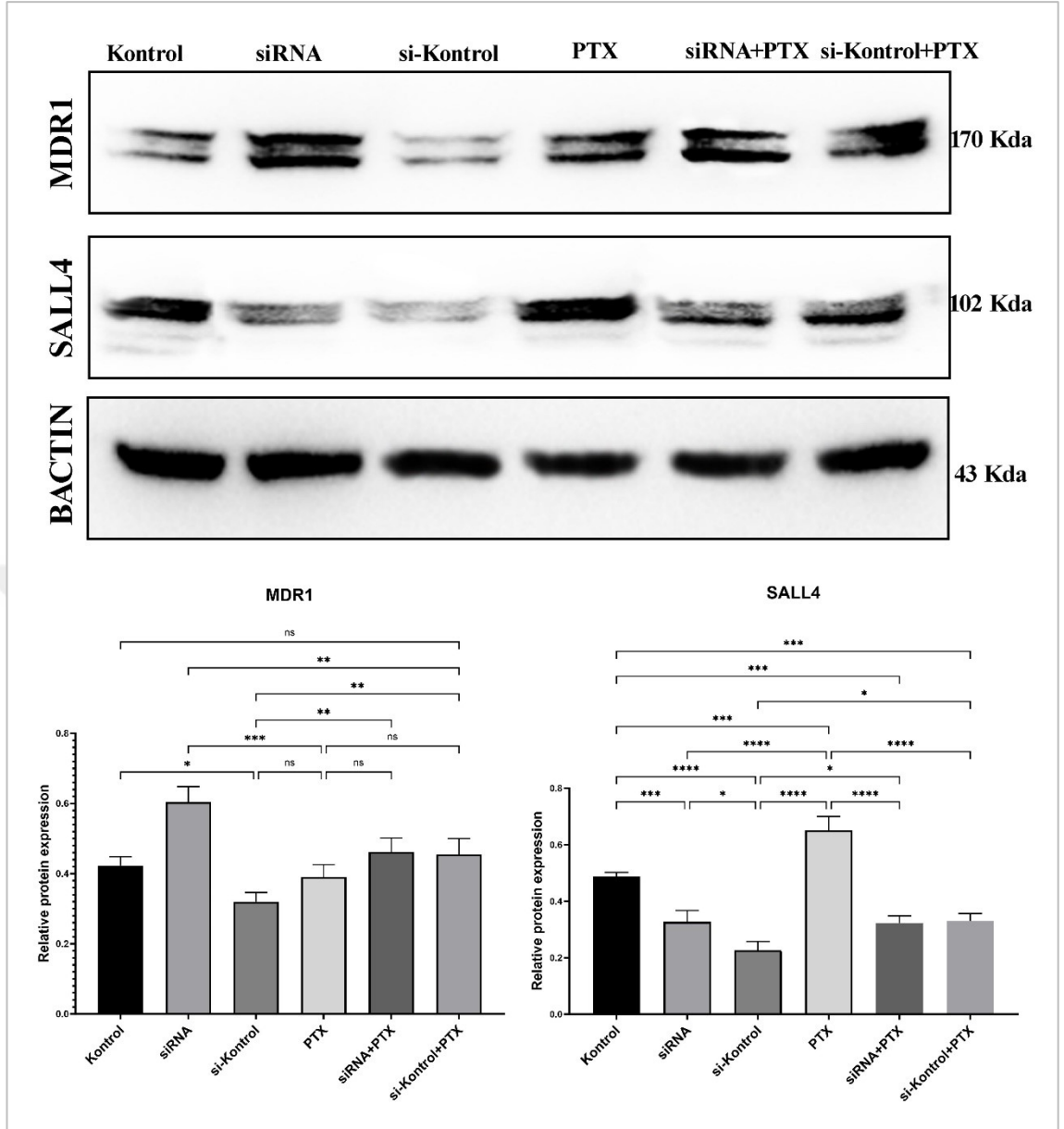


Şekil 4.45. FaDu hücre hattında SALL4 ve MDR1 protein ifadeleri. Normal FaDu hücrelerinde uygulamalar sonrasında MDR1 ve SALL4 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri, western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Bant yoğunlukları kantitatif olarak analiz edilmiş ve istatistiksel değerlendirme One-Way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapılmıştır. *P < 0.05, **P < 0.01, ns: istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiştir.

FaDu hücre hattında yaptığımız western blot analizi sonucunda siRNA uygulaması ile SALL4 mRNA'sının translasyonu baskılanmış yani SALL4 protein düzeylerinin azalmasına neden olmuştur. Bu veri SALL4 inhibisyonu işleminizin başarılı olduğunu göstermektedir. PTX uygulaması sonucunda SALL4 protein düzeylerinde

azalma gözlemlenmesi, PTX'in hücrede SALL4 ekspresyonunu dolaylı yoldan baskılayabileceğini göstermektedir. Hem siRNA uygulaması hem de PTX uygulaması yaptığımız kombinasyon grubumuzda bant seviyesinin diğer iki gruba göre daha da azalmış olması ikili tedavinin sinerjik bir etkisi olabileceğini işaret etmektedir. Bu sonuç SALL4'ün PTX'e karşı hücre direncinde rol oynadığını göstermektedir ve bu durumda SALL4 inhibisyonu, hücreleri PTX'e daha duyarlı hale getirmiş olabileceği değerlendirilmiştir.

FaDu hücre hattında MDR1 protein düzeyleri ise, kontrol grubuna kıyasla hem SALL4 gen ekspresyonunun siRNA ile baskılandığı grupta hem de yalnızca PTX uygulanan grupta azaldığı gözlemlenmiştir. En belirgin azalma ise hem PTX uygulanan hem de SALL4 inhibisyonu yapılan kombinasyon grubunda saptanmıştır. Bu sonuçlar, SALL4 geninin FaDu hücrelerinde MDR1 protein ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. SALL4 inhibisyonu ile MDR1 düzeylerinde meydana gelen azalma, bu genin çoklu ilaç direnci oluşumunda potansiyel bir düzenleyici olabileceğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, PTX uygulamasının da MDR1 düzeylerini baskılaması, kemoterapötik stresin MDR1 ekspresyonunu etkileyebileceğine işaret etmektedir. Her iki müdahalenin bir arada uygulandığı kombinasyon grubunda MDR1 protein düzeylerinin daha da düşmesi, SALL4 inhibisyonunun PTX'e karşı hücre yanıtını artırabileceğini ve bu yolla MDR1 düzeylerinde sinerjik bir azalmaya neden olabileceğini göstermektedir. Bu durum, SALL4'ün MDR1 üzerinden hücredeki ilaç taşıma ve direnç mekanizmalarında etkili olabileceği hipotezini desteklemektedir.



Şekil 4.46. PTX Dirençli FaDu hücre hattında SALL4 ve MDR1 protein ifadeleri. dirençli FaDu hücrelerinde uygulamalar sonrasında MDR1 ve SALL4 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri, western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Bant yoğunlukları kantitatif olarak analiz edilmiş ve istatistiksel değerlendirme One-Way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapılmıştır. *P < 0.05, **P < 0.01, ns: istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiştir.

PTX direnci geliştirilmiş FaDu hücrelerinde yapılan western blot analizinde ise, SALL4 protein düzeyinin siRNA ile inhibe edilen grupta ve özellikle PTX ile birlikte uygulandığı kombinasyon grubunda belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır. Bu bulgular, SALL4'ün PTX direncine sahip hücrelerde de ekspresyonunun devam ettiğini ve bu proteinin susturulmasının, dirençli hücrelerde bile başarılı bir şekilde gerçekleştiğini

göstermektedir. Özellikle kombinasyon grubunda gözlenen daha güçlü azalma, SALL4 inhibisyonunun PTX tedavisinin etkinliğini artırabileceğini ve bu genin ilaç direnci gelişiminde rol alabileceğini düşündürmektedir. SALL4'ün hücre proliferasyonu, kök hücre benzeri özellikler ve ilaç direnciyle ilişkili sinyal yollarında yer aldığı göz önünde bulundurulduğunda, bu proteinin susturulması, PTX gibi kemoterapötik ajanlara direnç geliştirmiş hücrelerin yeniden duyarlı hale getirilmesinde etkili bir strateji olabileceğini işaret etmektedir.

PTX direnci kazandırılmış FaDu hücre hattında MDR1 protein düzeyleri ise, kontrol grubuna kıyasla ne SALL4 inhibisyonu ne de PTX uygulaması sonrasında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu durum, dirençli hücre hattında MDR1 ekspresyonunun stabil bir şekilde sürdürüldüğünü ve uygulanan müdahalelerin bu düzeyi değiştirmedığını göstermektedir. MDR1'in sabit yüksek düzeyi, kazanılmış ilaca direncin korunmasında önemli bir rol oynayabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca, bu bulgu, PTX'e duyarlı hücrelere kıyasla dirençli hücrelerde SALL4 ile MDR1 arasındaki regülasyonel ilişkinin zayıflamış olabileceğini düşündürmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmamızda baş ve boyun kanserlerinde tedavi oranının düşük ve hastalığın farklı dokulara da yayılarak seyrinin kötü olmasının en büyük nedeni olan ilaç direnç mekanizması hedef alınmıştır. Verilerimiz ile SALL4 geninin, hem PTX duyarlılığının düzenlenmesinde hem de baş boyun kanseri hücrelerinde proliferasyon ve migrasyon gibi tümör gelişimiyle ilişkili temel biyolojik süreçlerde kritik bir rol üstlendiği tespit edilmiştir. Bu nedenle SALL4 geninin terapötik hedef olarak değerlendirilmesi, özellikle kemoterapiye dirençli baş-boyun kanserlerinin tedavisinde yeni ve hedefe yönelik stratejik yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir. Çalışmamızda SALL4 geninin hücresel döngü ve apoptoz ile ilişkileri ortaya konularak, çoklu ilaç direnci ile ilgili mekanizmaların çalışıldığı tanımlayıcı bir çalışma olmuştur. Kanser hücrelerinde kemoterapinin ana terapötik etkileri DNA hasarı ve hücresel apoptoz olmasına rağmen, SALL4 ile ilaç direnci arasındaki korelasyon belirsizliğini korumakta ve altta yatan mekanizmalar çalışmamız verileri ile aydınlatılmıştır.

PTX'e duyarlı FaDu hücre hattında, SALL4 inhibisyonu ile uygulanan kombine PTX tedavisinin hücre migrasyonu üzerinde anlamlı bir azalma oluşturmaması SALL4'ün hücre hareketliliği ve olasılıkla epitel-mezenkimal geçiş (EMT) süreçleri üzerinde düzenleyici bir rol üstlendiğine işaret etmektedir. PTX'e dirençli FaDu hücre hattında ise, hem yalnızca SALL4'ün baskılandığı grupta hem de SALL4 inhibisyonu ile PTX tedavisinin birlikte uygulandığı grupta hücre göç hızında azalma gözlemlenmesi SALL4'ün kemoterapi direncine eşlik eden hücresel süreçlerde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

MTT analizleri sonucunda PTX'e duyarlı hücre hattında SALL4 inhibisyonun tek başına ve PTX ile kombine edildiğinde hücre proliferasyonunda azalma izlenmesi SALL4'ün hücre canlılığı ve bölünme kapasitesinin korunmasında önemli bir role sahip olabileceğini göstermektedir. Dirençli hücre hattında ise yalnızca SALL4 ekspresyonunun baskılandığı grupta proliferasyon düzeyinde anlamlı bir azalma gözlemlenmesi SALL4'ün dirençli hücrelerde bağımsız bir proliferatif sinyal regülatörü olabileceğini ortaya koymaktadır.

Apoptoz analizleri sonucunda SALL4 gen ekspresyonunun baş-boyun kanser hücrelerindeki hücresel ölüm mekanizmaları üzerindeki etkisine dair önemli bulgular elde edilmiştir. PTX'e duyarlı FaDu hücre hattında, SALL4 gen inhibisyonu ile birlikte uygulanan PTX tedavisinin, hem erken hem de geç apoptoz oranlarında anlamlı düzeyde artışa neden olduğu gözlemlenmesi SALL4 inhibisyonunun kemoterapötik ajanlara karşı hücrelerin apoptoza yönelmesini artırıcı bir etkisi olabileceğini ve sinerjik bir yanıt geliştirebileceğini göstermektedir. PTX'e dirençli FaDu hücre hattında, yalnızca SALL4 gen ekspresyonunun baskılandığı grupta erken apoptoz oranında artış izlenirken, SALL4 inhibisyonu ile kombine edilen PTX uygulamasında ise özellikle geç apoptoz oranında artış tespit edilmesi SALL4'ün dirençli hücrelerde apoptozun farklı evrelerini regüle eden bir faktör olabileceğini düşündürmektedir.

Hücre döngüsü analiz verileri ile SALL4'ün baş ve boyun kanseri hücrelerinde hücre siklusu üzerinde düzenleyici bir rolü olduğu ortaya koyulmuştur. Duyarlı hücre hattında, SALL4 inhibisyonu ve PTX uygulamasının birlikte gerçekleştirildiği grupta, hücrelerin büyük oranda G1 fazında kalması tedavinin hücre döngüsünü erken fazda duraklatarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını göstermektedir. Dirençli FaDu hücre hattında ise, SALL4 gen ekspresyonunun inhibisyonunun ardından uygulanan PTX tedavisiyle hücrelerin mitotik bölünme öncesi fazda biriktiğinin gözlemlenmesi SALL4 inhibisyonunun hücre döngüsü ilerleyişini durdurabileceğini ve PTX'in mitoz öncesi fazda etkili olmasının bu durumla ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen PCR ve Western blot analizleri, SALL4 gen ekspresyonunun hem transkript düzeyinde hem de protein düzeyinde düzenlenmesini ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili MDR1 gen/protein ekspresyonu üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. Duyarlı FaDu hücre hattında, SALL4 geninin inhibe edildiği grupta ve PTX ile kombinasyon halinde uygulandığı grupta SALL4 mRNA düzeylerinde belirgin bir azalma tespit edilmesi ayrıca bu gruplarda MDR1 gen ekspresyonu da anlamlı düzeyde azalması SALL4 inhibisyonunun yalnızca kendi ekspresyonunu değil, aynı zamanda ilaç direnciyle yakından ilişkili MDR1 genini de baskılayıcı bir etkide bulunduğunu göstermektedir. Dirençli FaDu hücre hattında da benzer şekilde, hem SALL4 inhibisyonu yapılan grupta hem de kombinasyon tedavisi uygulanan grupta SALL4 ve MDR1 gen

ekspresyon düzeylerinde azalma olması SALL4'ün dirençli fenotiplerde de MDR1 regülasyonunda rol oynayabileceğini ortaya koymuştur.

Western blot analizleri doğrultusunda, duyarlı hücre hattında SALL4 geninin baskılandığı ve MDR1 protein düzeylerinde de düşüş izlenmesi özellikle kombinasyon grubunda MDR1 protein ekspresyonunun baskılanması SALL4 inhibisyonunun PTX'e karşı hücre yanıtını artırabileceğini ve SALL4'ün MDR1 üzerinden hücredeki ilaç taşıma ve direnç mekanizmalarında etkili olabileceği göstermektedir. Dirençli hücre hattında ise SALL4 protein ekspresyonu, hem inhibisyon grubu hem de kombinasyon grubunda azalırken, MDR1 protein düzeyinde anlamlı bir azalma gözlemlenmemesi dirençli hücrelerde MDR1 proteinin post-transkripsiyonel düzeyde farklı regülasyon mekanizmalarına sahip olabileceğini ve SALL4 baskılanmasına karşı daha farklı bir dirençli yapıda olabileceğini işaret etmektedir. Gen ve protein düzeyindeki bu sonuçlar, SALL4 geninin baş-boyun kanserlerinde sadece hücresel davranışları değil, aynı zamanda çoklu ilaç direnci gelişiminde de düzenleyici bir rol üstlendiğini desteklemektedir. Analiz sonuçları, SALL4 inhibisyonu, MDR1 ekspresyonunu baskılayarak kemoterapötik ajanlara karşı hücre ilaç duyarlılığını artırabilecek potansiyel bir strateji olduğunu işaret etmektedir.

qRT-PCR analizleri, SALL4 gen ekspresyonunun baskılanmasının baş-boyun kanseri hücrelerinde çeşitli sinyal yolları ve ilaç direnciyle ilişkili genlerin transkripsiyon düzeyinde nasıl etkilendiğine dair önemli sonuçlar elde edilmiştir. LRP1 gen ekspresyonu, hem duyarlı hem de dirençli FaDu hücre hattında SALL4 inhibisyonu yapılan ve PTX ile kombine edilen gruplarda anlamlı azalmıştır. LRP1, hücre dışı matriks etkileşimleri ve sinyal iletiminde rol oynayan bir reseptör olduğundan bu azalma seviyesi hücrelerin tümör mikroçevresine verdiği yanıtların baskılandığını işaret etmektedir. CMOAT gen ekspresyonu da aynı azalma durumu gözlemlenmiştir. Bu veri, SALL4 inhibisyonu ile ilaç taşıyıcı proteinlerin transkripsiyonel regülasyonunun etkilenebileceğini göstermektedir. mTOR, PIK3CA ve EGFR genlerinde de hem PTX'e duyarlı hem de dirençli hücre hatlarında SALL4 inhibisyonu ve inhibisyon ile birlikte PTX uygulanan gruplarda ekspresyon düzeylerinde azalma olduğunun saptanması SALL4'ün PI3K/AKT/mTOR ve EGFR yollarını transkripsiyon düzeyinde up regüle ettiğini ve bu yolların inhibisyonla baskılandığını göstermektedir. Bu nedenle PTX

ilacının SALL4 inhibisyonu ile birlikte uygulanmasının tümör hücrelerinin proliferatif ve metabolik sinyallerinde bozulmalara yol açabileceği düşünülebilmektedir. AKT3 gen ekspresyonunda ise PTX'e duyarlı hücre hattında inhibisyon ve kombinasyon gruplarında azalma olurken dirençli hücre hattında değişiklik gözlenmemiş olması AKT3 ekspresyonunun dirençli hücrelerde farklı regülasyon mekanizmaları ile kontrol edildiğini göstermektedir. EGFR geninin ise kanser hücrelerinde proliferasyon, invazyon ve ilaç direnci mekanizmalarında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. EGFR gen ekspresyon düzeylerinin, SALL4 inhibisyonu ve kombinasyon tedavi uygulamaları sonrasında azalma göstermiş olması SALL4 inhibisyonunun EGFR düzeylerini azaltarak kemoterapiye duyarlılığı artırabileceği işaret etmektedir. PTEN geni tümör baskılayıcı bir gendir. SALL4 inhibisyonu sonucunda farklı hücre hatlarında farklı gruplarda ekspresyon seviyesinde azalma olması SALL4'ün PTEN üzerinden etkisinin direnç durumuna ve tedavi kombinasyonuna göre farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır. DNA onarımı (PARP1) ve hücre döngüsü düzenleyicileri (CDK2/4) gibi proliferasyonla ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin hem duyarlı hem de dirençli hat üzerinde inhibisyon ve kombinasyon gruplarında azalma göstermesi SALL4 bu genleri up regüle ettiğini ve SALL4 inhibisyonunun bu genler üzerinden hücre siklusunun durdurulmasında etkili olabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar döngü analizi ile elde edilen veriler ile paralel şekilde yorumlanmıştır.

Literatür araştırmamız sonucunda, SALL4 geninin baş ve boyun kanseri hücrelerinde ilaç direnci gelişiminde rol oynayan diğer genlerle etkileşimi veya ilaç direnci geliştiren hücreler üzerindeki etkilerini inceleyen kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle tez çalışmamızın bu alandaki eksikliğe katkı sağlayarak baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak geliştireceğini düşünmekteyiz. Çalışmamız ile baş ve boyun kanseri hücrelerinde ilaç direnci gelişmesinin altında yatan moleküler mekanizmalar hedef alınmıştır. Bu nedenle verilerimizin, kanser hücrelerine karşı daha etkili ve daha hedefe yönelik tedavi stratejilerinin belirlenmesine yardımcı olacağı ayrıca kanser prognozunun daha doğru bir şekilde belirlenmesini sağlayacağını düşünmekteyiz.

Elde edilen *in vitro* sonuçların güvenilirliğinin artırılması amacıyla, hayvan modelleri üzerinde *in vivo* çalışmalarının yapılmasının SALL4 inhibisyonunun toksisite

profili ve tedaviye yanıt üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinin önemli olduğunu düşünülmektedir. Çünkü bu tür çalışmalar, elde edilen sonuçların klinik uygulamalara taşınabilirliğini ortaya çıkarmak için kritik veriler sağlayacaktır. Ayrıca çalışmamızda PTX ilacı kullanılmıştır fakat baş-boyun kanserlerin tedavisinde kullanılan cisplatin, 5-FU, docetaxel gibi farklı ajanlarla da SALL4 inhibisyonunun kombinasyonu analiz edilebilir ve tedaviye yanıt farklılıklarının değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamız ile, SALL4 gen inhibisyonunun, kemoterapötik ajanlara karşı hücre yanıtını artırdığı gözlemlenmiştir bu nedenle, SALL4'ü hedef alan küçük moleküllü inhibitörlerin veya RNA tabanlı terapötik ajanların geliştirilmesinin baş-boyun kanserlerinde hedefe yönelik tedavi yaklaşımları için umut vadedeceği düşünülmektedir.

Elde ettiğimiz veriler ile SALL4 gen ve protein düzeylerinde gözlemlenen değişikliklerin bu genin yalnızca terapötik hedef değil, aynı zamanda potansiyel bir prognostik biyobelirteç olarak da kullanılabileceğini işaret etmektedir. Bu nedenle klinik teşhis için bu bilginin fayda sağlayabileceği ön görülmektedir. Ayrıca RNA dizileme analizi ile SALL4 geninin yalnızca tek başına değil diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşim halinde olup olmadığı ve bu sayede SALL4'ün bağlandığı promotor bölgeler ve hedef genler belirlenerek, gen düzenleme mekanizmalarının daha tamamlayıcı bir şekilde anlaşılabilmesi düşünülmektedir.

SALL4'ün metastatik potansiyeli için hücre göçü ve EMT süreçlerine dair yapılacak gözlemlerin EMT belirteçlerinin (örneğin: E-cadherin, N-cadherin, vimentin) ekspresyon düzeylerinin SALL4 inhibisyonu sonrasında detaylı olarak analiz edilmesini daha net bir şekilde ortaya koyabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamız ile SALL4'ün ilaç direnciyle olan ilişkisi hedef alınmıştır fakat bu genin kanser kök hücresi özellikleri, anjiyogenez ve immün yanıt baskılanması gibi süreçlerdeki rolü de araştırılmalıdır. Bu veriler yardımıyla SALL4 geninin tümör mikroçevresi üzerindeki etkileri immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilebilir.

Sonuç olarak, SALL4 geninin baş ve boyun kanserlerinde hücrenin migrasyonu, proliferasyonu, ilaç direnci mekanizmaları ve apoptoz gibi kanser biyolojisinde önemli olan süreçlerde kritik ve regüle edici bir rol üstlendiği ortaya konmuştur. SALL4 inhibisyonunun, kemoterapötik ajanlara karşı duyarlılığı artırdığı ve çoklu ilaç direnci

mekanizmalarını zayıflattığı yönünde elde edilen bulgular ışığında SALL4 geninin hedeflenmesinin baş-boyun kanserlerinde etkili bir tedavi olanağı sunacağı öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

- Agrawal, Neema, P. V. N. Dasaradhi, Asif Mohammed, Pawan Malhotra, Raj K. Bhatnagar, ve Sunil K. Mukherjee. 2003. "RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (4): 657-85. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003>.
- Ajayi, O. F., W. L. Adeyemo, A. L. Ladeinde, vd. 2007. "Primary malignant neoplasms of orofacial origin: a retrospective review of 256 cases in a Nigerian tertiary hospital". *International journal of oral and maxillofacial surgery* 36 (5): 403-8.
- Alalawy, Adel I. 2024. "Key Genes and Molecular Mechanisms Related to Paclitaxel Resistance". *Cancer Cell International* 24 (1): 244. <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03415-0>.
- Al-Baradie, Raidah, Koki Yamada, Cynthia St Hilaire, vd. 2002. "Duane radial ray syndrome (Okiihiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family". *The American Journal of Human Genetics* 71 (5): 1195-99.
- Ali, Eunus S., Shazid Md. Sharker, Muhammad Torequl Islam, vd. 2021. "Targeting cancer cells with nanotherapeutics and nanodiagnostics: Current status and future perspectives". *Seminars in Cancer Biology*, Cancer Nanotherapeutics: Targeted medicine, therapeutic vaccination and Challenges with cancer nanomedicines, c. 69 (Şubat): 52-68. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.01.011>.
- Ali, Iqbal Unnisa, Lynn M. Schriml, ve Michael Dean. 1999. "Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity". *Journal of the national cancer institute* 91 (22): 1922-32.
- Amabile, Giovanni, Annalisa Di Ruscio, Fabian Müller, vd. 2015. "Dissecting the role of aberrant DNA methylation in human leukaemia". *Nature communications* 6 (1): 7091.
- Arumugam, Paramasivam, Senthil Murugan M, ve Vijayashree Priyadharsini Jayaseelan. 2024. "Pathogenic loss-of-function mutations in *LRP1B* are associated with poor survival in head and neck cancer patients". *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery* 125 (5, Supplement 2): 101971. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2024.101971>.
- Aupérin, Anne. 2020. "Epidemiology of head and neck cancers: an update". *Current opinion in oncology* 32 (3): 178-86.
- Baboci, Lorena, Dana Holzinger, Paolo Boscolo-Rizzo, vd. 2016. "Low prevalence of HPV-driven head and neck squamous cell carcinoma in North-East Italy". *Papillomavirus Research* 2: 133-40.
- Bailey, B. J. 2006. *Head and neck surgery-otolaryngology*. Lippincott Williams & Wilkins. <https://books.google.com/books?hl=tr&lr=&id=u5o3illp9CUC&oi=fnd&pg=PR>

3&dq=Levine+PA,+S.D.,+Neoplasms+of+the+oral+cavity.+Bailey+BJ+(ed)+Head+and+Neck+Surgery+%E2%80%93+Otolaryngology,+1998:+p.+pp+1523%E2%80%931539&ots=nc0jVvxfLi&sig=SqEGpbWtAOw_CjkyFPnjW-r-S4Y.

- Benito, Adriana Salvatore, M. Ángeles Valero Zanut, Marina Alarza Cano, vd. 2019. “Adherence to Mediterranean diet: A comparison of patients with head and neck cancer and healthy population”. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición (English ed.)* 66 (7): 417-24.
- Bergerot, Cristiane Decat, Karen Lynn Clark, Alexandre Nonino, Sarah Waliany, Marco Murilo Buso, ve Matthew Loscalzo. 2015. “Course of distress, anxiety, and depression in hematological cancer patients: Association between gender and grade of neoplasm”. *Palliative & supportive care* 13 (2): 115-23.
- Bernstein, Emily, Amy A. Caudy, Scott M. Hammond, ve Gregory J. Hannon. 2001. “Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference”. *Nature* 409 (6818): 363-66.
- Blot, William J., Joseph K. McLaughlin, Deborah M. Winn, vd. 1988. “Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer”. *Cancer research* 48 (11): 3282-87.
- Boeckx, Carolien, Ken Op de Beeck, An Wouters, vd. 2014. “Overcoming cetuximab resistance in HNSCC: the role of AURKB and DUSP proteins”. *Cancer letters* 354 (2): 365-77.
- Boffetta, Paolo, Stephen Hecht, Nigel Gray, Prakash Gupta, ve Kurt Straif. 2008. “Smokeless tobacco and cancer”. *The lancet oncology* 9 (7): 667-75.
- Borsetto, Daniele, Jonathan Fussey, Luca Fabris, vd. 2020. “HCV infection and the risk of head and neck cancer: A meta-analysis”. *Oral Oncology* 109: 104869.
- Boscolo-Rizzo, Paolo, Maria Cristina Da Mosto, Enrica Rampazzo, vd. 2016. “Telomeres and Telomerase in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: From Pathogenesis to Clinical Implications”. *Cancer and Metastasis Reviews* 35 (3): 457-74. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9633-1>.
- Bosetti, Cristina, Greta Carioli, Claudia Santucci, vd. 2020. “Global Trends in Oral and Pharyngeal Cancer Incidence and Mortality”. *International Journal of Cancer* 147 (4): 1040-49. <https://doi.org/10.1002/ijc.32871>.
- Bosetti, Cristina, Silvano Gallus, Antonia Trichopoulou, vd. 2003. “Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract”. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 12 (10): 1091-94.
- Bosetti, Cristina, Carlo La Vecchia, Renato Talamini, vd. 2002. “Food Groups and Laryngeal Cancer Risk: A Case-control Study from Italy and Switzerland”. *International Journal of Cancer* 100 (3): 355-60. <https://doi.org/10.1002/ijc.10485>.

- Bradley, Patrick J. 2016. "Laryngeal cancer in nondrinker nonsmoker young patients: a distinct pathological entity?" *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery* 24 (2): 140-47.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, ve Ahmedin Jemal. 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>.
- Budach, Volker, ve Ingeborg Tinhofer. 2019. "Novel prognostic clinical factors and biomarkers for outcome prediction in head and neck cancer: a systematic review". *The Lancet Oncology* 20 (6): e313-26.
- Bussink, Johan, Albert J. van der Kogel, ve Johannes HAM Kaanders. 2008. "Activation of the PI3-K/AKT Pathway and Implications for Radioresistance Mechanisms in Head and Neck Cancer". *The Lancet Oncology* 9 (3): 288-96. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70073-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70073-1).
- Cai, Yi, Sonam Dodhia, ve Gloria H. Su. 2017. "Dysregulations in the PI3K pathway and targeted therapies for head and neck squamous cell carcinoma". *Oncotarget* 8 (13): 22203.
- Califano, Joseph, Peter Van Der Riet, William Westra, vd. 1996. "Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization". *Cancer research* 56 (11): 2488-92.
- Chang, Jeffrey S., Hung-I. Lo, Tung-Yiu Wong, vd. 2013. "Investigating the association between oral hygiene and head and neck cancer". *Oral oncology* 49 (10): 1010-17.
- Chaturvedi, Anil K., William F. Anderson, Joannie Lortet-Tieulent, vd. 2013. "Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers". *Journal of clinical oncology* 31 (36): 4550.
- Chen, Mei, Lu Li, ve Peng-Sheng Zheng. 2019. "SALL4 Promotes the Tumorigenicity of Cervical Cancer Cells through Activation of the Wnt/B-catenin Pathway via CTNNB1". *Cancer Science* 110 (9): 2794-805. <https://doi.org/10.1111/cas.14140>.
- Chen, Teng, Julia Y. S. Tsang, Xiao-Chun Su, vd. 2020. "SALL4 Promotes Tumor Progression in Breast Cancer by Targeting EMT". *Molecular Carcinogenesis* 59 (10): 1209-26. <https://doi.org/10.1002/mc.23250>.
- Cohen, Jeffrey I. 2000. "Epstein-Barr Virus Infection". *New England Journal of Medicine* 343 (7): 481-92. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008173430707>.
- Daly, C., C. Castanaro, W. Zhang, vd. 2017. "FGFR3-TACC3 fusion proteins act as naturally occurring drivers of tumor resistance by functionally substituting for EGFR/ERK signaling". *Oncogene* 36 (4): 471-81.

- Deloukas, P., L. H. Matthews, J. Ashurst, vd. 2001. "The DNA Sequence and Comparative Analysis of Human Chromosome 20". *Nature* 414 (6866): 865-71. <https://doi.org/10.1038/414865a>.
- Deng, Gang, Lei Zhu, Feizhou Huang, vd. 2016. "Knockdown of Sall4 Inhibits Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cell Migration and Invasion in ICC-9810 Cells". *OncoTargets and Therapy* Volume 9 (Ağustos): 5297-305. <https://doi.org/10.2147/OTT.S107214>.
- Diehl, Adam, Weiyi Mu, Denise Batista, ve Meral Gunay-Aygun. 2015. "An Atypical 0.73 MB Microduplication of 22q11.21 and a Novel *SALL4* Missense Mutation Associated with Thumb Agenesis and Radioulnar Synostosis". *American Journal of Medical Genetics Part A* 167 (7): 1644-49. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37066>.
- Do, Kim-Anh, Marcella M. Johnson, Dorota A. Doherty, vd. 2003. "[No title found]". *Cancer Causes and Control* 14 (2): 131-38. <https://doi.org/10.1023/A:1023060315781>.
- Du, Wenjing, Lan Ni, Baojun Liu, vd. 2018. "Upregulation of SALL4 by EGFR activation regulates the stemness of CD44-positive lung cancer". *Oncogenesis* 7 (4): 36.
- Farran, Batoul, Eluri Pavitra, Prameswari Kasa, Sujatha Peela, Ganji Seeta Rama Raju, ve Ganji Purnachandra Nagaraju. 2019. "Folate-targeted immunotherapies: Passive and active strategies for cancer". *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Special Issue: Cytokine Modulation of Autoimmune and Inflammatory Disorders, c. 45 (Şubat): 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.02.001>.
- Ferlay, Jacques, F. Bray, P. Pisani, ve D. M. Parkin. 2004. "GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide". *IARC cancerbase* 5 (2.0). https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/723902.
- Ferlay, Jacques, Hai-Rim Shin, Freddie Bray, David Forman, Colin Mathers, ve Donald Maxwell Parkin. 2010. "Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008". *International Journal of Cancer* 127 (12): 2893-917. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>.
- Forastiere, A. A. 1994. "Current and future trials of Taxol (paclitaxel) in head and neck cancer." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 5: S51-4.
- Forastiere, Arlene, Wayne Koch, Andrew Trotti, ve David Sidransky. 2001. "Head and Neck Cancer". *New England Journal of Medicine* 345 (26): 1890-900. <https://doi.org/10.1056/NEJMra001375>.
- Gad 1 2, Cancer Genome Atlas Network Genome sequencing centre: Broad Institute Lawrence Michael S. 1 Sougnez Carrie 1 Lichtenstein Lee 1 Cibulskis Kristian 1 Lander Eric 1 Gabriel Stacey B. 1 Getz, University of Texas MD Anderson Cancer Center Akbani Rehan 4 Casasent Tod 4 Liu Wenbin 4 Lu Yiling 4 Mills Gordon 4 Motter Thomas 4 Weinstein John 4 Diao Lixia 4 Wang Jing 4 Hong Fan You 4, University of Kentucky Liu Jinze 8 Wang Kai 8, Baylor College of Medicine

- Muzny Donna 12 Doddapaneni HarshaVardhan 12 Kovar Christie 12 Reid Jeff 12 Morton Donna 12 Han Yi 12 Hale Walker 12 Chao Hsu 12 Chang Kyle 12 Drummond Jennifer A. 12 Gibbs Richard A. 12 Kakkar Nipun 12 Wheeler David 12 Xi Liu 12, ve University of California Santa Cruz/Buck Institute Stuart Joshua 14 Benz Stephen 14 Ng Sam 14 Benz Christopher 14 Yau Christina 14. 2015. "Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas". *Nature* 517 (7536): 576-82.
- Gandini, Sara, Edoardo Botteri, Simona Iodice, vd. 2008. "Tobacco Smoking and Cancer: A Meta-analysis". *International Journal of Cancer* 122 (1): 155-64. <https://doi.org/10.1002/ijc.23033>.
- Gao, Chong, Nikki R. Kong, Ailing Li, vd. 2013. "SALL4 Is a Key Transcription Regulator in Normal Human Hematopoiesis". *Transfusion* 53 (5): 1037-49. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03888.x>.
- Garavello, Werner, Ersilia Lucenteforte, Cristina Bosetti, vd. 2009. "Diet diversity and the risk of laryngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland". *Oral oncology* 45 (1): 85-89.
- Gassei, Kathrin, ve Kyle E. Orwig. 2013. "SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes". *PloS one* 8 (1): e53976.
- Gavrilescu, Mihaela-Madalina, Ana-Maria Todosi, Maria-Gabriela ANITEI, B. Filip, ve V. Scripcariu. 2012. "Expression of bmi-1 protein in cervical, breast and ovarian cancer". *The Medical-Surgical Journal* 116 (4): 1112-17.
- Germann, U. A. 1996. "P-glycoprotein—A mediator of multidrug resistance in tumour cells". *European Journal of Cancer, Multidrug Resistance in Cancer*, c. 32 (6): 927-44. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(96\)00057-3](https://doi.org/10.1016/0959-8049(96)00057-3).
- Gersten, Omer, ve John R. Wilmoth. 2002. "The cancer transition in Japan since 1951". *Demographic Research* 7: 271-306.
- Gillison, Maura L., Wayne M. Koch, Randolph B. Capone, vd. 2000. "Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers". *Journal of the National Cancer Institute* 92 (9): 709-20.
- Giodini, Luciana, Francesco Lo Re, Davide Campagnol, vd. 2017. "Nanocarriers in cancer clinical practice: a pharmacokinetic issue". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 13 (2): 583-99. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.07.012>.
- Gonzalez, Maria Victoria, Marta F. Pello, Carlos López-Larrea, Carlos Suárez, Maria J. Menéndez, ve Eliecer Coto. 1995. "Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck." *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 1 (9): 1043-49.
- Gottesman, Michael M., Tito Fojo, ve Susan E. Bates. 2002. "Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-Dependent Transporters". *Nature Reviews Cancer* 2 (1): 48-58. <https://doi.org/10.1038/nrc706>.

- Grandis, Jennifer Rubin, Mona F. Melhem, William E. Gooding, vd. 1998. "Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival". *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 90 (11): 824-32.
- Gupta, Bhawna, Freddie Bray, Narinder Kumar, ve Newell W. Johnson. 2017. "Associations between oral hygiene habits, diet, tobacco and alcohol and risk of oral cancer: A case-control study from India". *Cancer epidemiology* 51: 7-14.
- Hamilton, Andrew J., ve David C. Baulcombe. 1999. "A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants". *Science* 286 (5441): 950-52. <https://doi.org/10.1126/science.286.5441.950>.
- Hammond, Scott M., Emily Bernstein, David Beach, ve Gregory J. Hannon. 2000. "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells". *Nature* 404 (6775): 293-96.
- Hanahan, Douglas, ve Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation". *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- He, Jing, Mingxia Zhou, Xinfeng Chen, vd. 2016. "Inhibition of SALL4 Reduces Tumorigenicity Involving Epithelial-Mesenchymal Transition via Wnt/ β -Catenin Pathway in Esophageal Squamous Cell Carcinoma". *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 35 (1): 98. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0378-z>.
- Herrero, Rolando, Xavier Castellsagué, Michael Pawlita, vd. 2003. "Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study". *Journal of the National Cancer Institute* 95 (23): 1772-83.
- Hesari, Amireza, Ali Arash Anoshiravani, Samaneh Talebi, vd. 2019. "Knockdown of Sal-like 4 Expression by Small Interfering RNA Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells". *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (6): 9392-99. <https://doi.org/10.1002/jcb.28214>.
- Hua, Fang, Shuang Shang, Yu-wei Yang, vd. 2019. "TRIB3 interacts with β -catenin and TCF4 to increase stem cell features of colorectal cancer stem cells and tumorigenesis". *Gastroenterology* 156 (3): 708-21.
- Huang, Junhong, Huan Li, Zihui Yang, vd. 2024. "SALL4 Promotes Cancer Stem-like Cell Phenotype and Radioresistance in Oral Squamous Cell Carcinomas via Methyltransferase-like 3-Mediated m6A Modification". *Cell Death & Disease* 15 (2): 139. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06533-9>.
- Hur, Jae Young, Hyeong Ryul Kim, Jung Yeon Lee, vd. 2019. "CDK7 Inhibition as a Promising Therapeutic Strategy for Lung Squamous Cell Carcinomas with a SOX2 Amplification". *Cellular Oncology* 42 (4): 449-58. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00434-2>.
- Jackman, David, William Pao, Gregory J. Riely, vd. 2010. "Clinical Definition of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer". *Journal of Clinical Oncology* 28 (2): 357-60. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.7049>.

- Javed, Fawad, ve Saman Warnakulasuriya. 2016. "Is there a relationship between periodontal disease and oral cancer? A systematic review of currently available evidence". *Critical reviews in oncology/hematology* 97: 197-205.
- Jemal, A., R. Siegel, J. Xu, ve E. Ward. 2010. "Cancer Statistics, 2010". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 60 (5): 277-300. <https://doi.org/10.3322/caac.20073>.
- Jeong, Ha-Won, Wei Cui, Youyang Yang, vd. 2011. "SALL4, a stem cell factor, affects the side population by regulation of the ATP-binding cassette drug transport genes". *PloS one* 6 (4): e18372.
- Jiang, Gang, ve Chen-Tao Liu. 2018. "Knockdown of SALL4 overcomes cisplatin-resistance through AKT/mTOR signaling in lung cancer cells". *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 11 (2): 634.
- Jonas, Stefanie, ve Elisa Izaurralde. 2015. "Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing". *Nature reviews genetics* 16 (7): 421-33.
- Kalyankrishna, Shailaja, ve Jennifer R. Grandis. 2006. "Epidermal Growth Factor Receptor Biology in Head and Neck Cancer". *Journal of Clinical Oncology* 24 (17): 2666-72. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.8306>.
- Kobayashi, Daisuke, Kageaki Kuribayashi, Maki Tanaka, ve Naoki Watanabe. 2011. "SALL4 is essential for cancer cell proliferation and is overexpressed at early clinical stages in breast cancer". *International journal of oncology* 38 (4): 933-39.
- Kohlhase, Jürgen, David Chitayat, Dieter Kotzot, vd. 2005. "SALL4 Mutations in Okihiro Syndrome (Duane-Radial Ray Syndrome), Acro-Renal-Ocular Syndrome, and Related Disorders". *Human Mutation* 26 (3): 176-83. <https://doi.org/10.1002/humu.20215>.
- Kohlhase, Jürgen, Marielle Heinrich, Lucia Schubert, vd. 2002. "Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations". *Human molecular genetics* 11 (23): 2979-87.
- Kohlhase, Jürgen, Reinhard Schuh, Gordon Dowe, vd. 1996. "Isolation, Characterization, and Organ-Specific Expression of Two Novel Human Zinc Finger Genes Related to the Drosophila Genes *spalt*". *Genomics* 38 (3): 291-98.
- Kohlhase, Jürgen, Annegret Wischermann, Herbert Reichenbach, Ursula Froster, ve Wolfgang Engel. 1998. "Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome". *Nature genetics* 18 (1): 81-83.
- Krishnaswamy, Kiruba, ve Valérie Orsat. 2017. "Chapter 2 - Sustainable Delivery Systems Through Green Nanotechnology". İçinde *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*, editör Alexandru Mihai Grumezescu. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9.00002-9>.
- Kyzas, Panayiotis A, Dimitrios Stefanou, Anna Batistatou, ve Niki J Agnantis. 2005. "Prognostic Significance of VEGF Immunohistochemical Expression and Tumor Angiogenesis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma". *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 131 (9): 624-30. <https://doi.org/10.1007/s00432-005-0003-6>.

- Lai, Stephen Y., ve Faye M. Johnson. 2010. "Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: implications for future therapeutic approaches". *Drug Resistance Updates* 13 (3): 67-78.
- Lee, Janet I., Jean-Charles Soria, Khaled A. Hassan, vd. 2001. "Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer". *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 127 (12): 1441-45.
- Leemans, C. René, Boudewijn JM Braakhuis, ve Ruud H. Brakenhoff. 2011. "The molecular biology of head and neck cancer". *Nature reviews cancer* 11 (1): 9-22.
- Li, Ailing, Yisheng Jiao, Kol Jia Yong, vd. 2015. "SALL4 is a new target in endometrial cancer". *Oncogene* 34 (1): 63-72.
- Liu, Chong, Fan Yao, Xiaoyun Mao, Wanming Li, ve Hang Chen. 2020. "Effect of SALL4 on the Proliferation, Invasion and Apoptosis of Breast Cancer Cells". *Technology in Cancer Research & Treatment* 19 (Ocak): 153303382098007. <https://doi.org/10.1177/1533033820980074>.
- Liu, Lei, Jing Zhang, Xiaoming Yang, Chi Fang, Huali Xu, ve Xiaowei Xi. 2015. "SALL4 as an Epithelial-Mesenchymal Transition and Drug Resistance Inducer through the Regulation of c-Myc in Endometrial Cancer". *PLOS ONE* 10 (9): e0138515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138515>.
- Ma, Yupo, Wei Cui, Jianchang Yang, vd. 2006. "SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice". *Blood* 108 (8): 2726-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-001594>.
- Marquard, Franziska E., ve Manfred Jücker. 2020. "PI3K/AKT/mTOR signaling as a molecular target in head and neck cancer". *Biochemical Pharmacology* 172 (Şubat): 113729. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113729>.
- Mei, Kaiyong, Aijun Liu, Robert W. Allan, vd. 2009. "Diagnostic utility of SALL4 in primary germ cell tumors of the central nervous system: a study of 77 cases". *Modern pathology* 22 (12): 1628-36.
- Miertus, Jan, Wiktor Borozdin, Vladimir Frece, vd. 2006. "A SALL4 Zinc Finger Missense Mutation Predicted to Result in Increased DNA Binding Affinity Is Associated with Cranial Midline Defects and Mild Features of Okhiro Syndrome". *Human Genetics* 119 (1-2): 154-61. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-0124-7>.
- Migden, Michael R., Danny Rischin, Chrysalyne D. Schmults, vd. 2018. "PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma". *New England Journal of Medicine* 379 (4): 341-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805131>.
- Mineta, H., K. Miura, T. Ogino, vd. 2000. "Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas". *British journal of cancer* 83 (6): 775-81.

- Nair, Sindhu, Hoa Q. Trummell, Rajani Rajbhandari, vd. 2020. "Novel EGFR ectodomain mutations associated with ligand-independent activation and cetuximab resistance in head and neck cancer". *PLoS One* 15 (2): e0229077.
- Nakagawa, Takuya, Keisuke Matsusaka, Kiyoshi Misawa, vd. 2017. "Frequent promoter hypermethylation associated with human papillomavirus infection in pharyngeal cancer". *Cancer letters* 407: 21-31.
- Nenclares, P., ve K. J. Harrington. 2020. "The biology of cancer". *Medicine* 48 (2): 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.mpmmed.2019.11.001>.
- Nie, Xin, Ergang Guo, Cheng Wu, vd. 2019. "SALL 4 Induces Radioresistance in Nasopharyngeal Carcinoma via the ATM /Chk2/P53 Pathway". *Cancer Medicine* 8 (4): 1779-92. <https://doi.org/10.1002/cam4.2056>.
- Nilov, D. K., S. V. Pushkarev, I. V. Gushchina, G. A. Manasaryan, K. I. Kirsanov, ve V. K. Švedas. 2020. "Modeling of the Enzyme—Substrate Complexes of Human Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1". *Biochemistry (Moscow)* 85 (1): 99-107. <https://doi.org/10.1134/S0006297920010095>.
- Nishino, Koichiro, Masashi Toyoda, Mayu Yamazaki-Inoue, vd. 2010. "Defining hypomethylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts". *PloS one* 5 (9): e13017.
- Oikawa, Tsunekazu, Akihide Kamiya, Sei Kakinuma, vd. 2009. "Sall4 regulates cell fate decision in fetal hepatic stem/progenitor cells". *Gastroenterology* 136 (3): 1000-1011.
- Oikawa, Tsunekazu, Akihide Kamiya, Mikio Zeniya, vd. 2013. "Sal-like Protein 4 (SALL4), a Stem Cell Biomarker in Liver Cancers". *Hepatology* 57 (4): 1469-83. <https://doi.org/10.1002/hep.26159>.
- Pai, Sara I., ve William H. Westra. 2009. "Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment". *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 4 (1): 49-70. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158>.
- Perez, Edith A. 2009. "Impact, Mechanisms, and Novel Chemotherapy Strategies for Overcoming Resistance to Anthracyclines and Taxanes in Metastatic Breast Cancer". *Breast Cancer Research and Treatment* 114 (2): 195-201. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0005-6>.
- Picon, Hector, ve Achuta Kumar Guddati. 2020. "Mechanisms of resistance in head and neck cancer". *American Journal of Cancer Research* 10 (9): 2742-51.
- Poeta, M. Luana, Judith Manola, Meredith A. Goldwasser, vd. 2007. "TP53 Mutations and Survival in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck". *New England Journal of Medicine* 357 (25): 2552-61. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa073770>.
- Posner, Marshall R., Robert I. Haddad, Lori Wirth, vd. 2004. "Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell cancer of the head and neck: evolution of the

- sequential treatment approach". *Seminars in oncology* 31 (6): 778-85. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009377540400404X>.
- Psyrrri, Amanda, Ziwei Yu, Paul M. Weinberger, vd. 2005. "Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis". *Clinical Cancer Research* 11 (16): 5856-62.
- Rampias, T., A. Giagini, S. Siolos, vd. 2014. "RAS/PI3K crosstalk and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma". *Clinical Cancer Research* 20 (11): 2933-46.
- Rao, Sridhar, Shao Zhen, Sergei Roumiantsev, Lindsay T. McDonald, Guo-Cheng Yuan, ve Stuart H. Orkin. 2010. "Differential Roles of Sall4 Isoforms in Embryonic Stem Cell Pluripotency". *Molecular and Cellular Biology* 30 (22): 5364-80. <https://doi.org/10.1128/MCB.00419-10>.
- Reddy, L. Sudarsana, V. Sarojamma, ve V. Ramakrishna. 2007. "Future of RNAi in medicine: a review". *World Journal of Medical Sciences* 2 (1): 01-14.
- Ringel, Israel, ve Susan Band Horwitz. 1991. "Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol". *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 83 (4): 288-91.
- Riss, Terry L., ve Richard A. Moravec. 2004. "Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays". *ASSAY and Drug Development Technologies* 2 (1): 51-62. <https://doi.org/10.1089/154065804322966315>.
- Robey, Robert W., Kenneth K. K. To, Orsolya Polgar, vd. 2009. "ABCG2: A perspective". *Advanced Drug Delivery Reviews*, The Role of Human ABC Transporter ABCG2 (BCRP) in Pharmacotherapy, c. 61 (1): 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.003>.
- Rosenquist, Kerstin, Johan Wennerberg, Elsy-Britt Schildt, Anna Bladström, Bengt Göran Hansson, ve Gunilla Andersson. 2005. "Oral Status, Oral Infections and Some Lifestyle Factors as Risk Factors for Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. A Population-Based Case-Control Study in Southern Sweden". *Acta Oto-Laryngologica* 125 (12): 1327-36. <https://doi.org/10.1080/00016480510012273>.
- Roy, Souvick, Madhabananda Kar, Shomereeta Roy, Arka Saha, Swatishree Padhi, ve Birendranath Banerjee. 2018. "Role of β -Catenin in Cisplatin Resistance, Relapse and Prognosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma". *Cellular Oncology* 41 (2): 185-200. <https://doi.org/10.1007/s13402-017-0365-1>.
- Samatar, Ahmed A., ve Poulidakos I. Poulidakos. 2014. "Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges". *Nature reviews Drug discovery* 13 (12): 928-42.

- Schulz, Dominik, Markus Wirth, Guido Piontek, vd. 2016. "HNSCC cells resistant to EGFR pathway inhibitors are hypermutated and sensitive to DNA damaging substances". *American journal of cancer research* 6 (9): 1963.
- Sen, Malabika, Sonali Joyce, Mary Panahandeh, vd. 2012. "Targeting Stat3 abrogates EGFR inhibitor resistance in cancer". *Clinical cancer research* 18 (18): 4986-96.
- Silva-Oliveira, Renato José, Matias Melendez, Olga Martinho, vd. 2017. "AKT can modulate the in vitro response of HNSCC cell to irreversible EGFR inhibitors". *Cancer Research* 77 (13_Supplement): 4091-4091.
- Snijders, Peter J. F., Frans V. Cromme, Adriaan J. C. Den Van Brule, vd. 1992. "Prevalence and Expression of Human Papillomavirus in Tonsillar Carcinomas, Indicating a Possible Viral Etiology". *International Journal of Cancer* 51 (6): 845-50. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910510602>.
- Stadler, Michael E., Mihir R. Patel, Marion E. Couch, ve David Neil Hayes. 2008. "Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways". *Hematology/oncology clinics of North America* 22 (6): 1099-124.
- Stevens, Michael H., John W. Gardner, James L. Parkin, ve Leland P. Johnson. 1983. "Head and neck cancer survival and life-style change". *Archives of Otolaryngology* 109 (11): 746-49.
- Suh, Y., Ivano Amelio, Teresa Guerrero Urbano, ve Mahvash Tavassoli. 2014. "Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer". *Cell death & disease* 5 (1): e1018-e1018.
- Sun, Jinbo, Qisheng Tang, Yongheng Gao, vd. 2020. "VHL Mutation-Mediated SALL4 Overexpression Promotes Tumorigenesis and Vascularization of Clear Cell Renal Cell Carcinoma via Akt/GSK-3 β Signaling". *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 39 (1): 104. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01609-8>.
- Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, vd. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71 (3): 209-49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Tan, Fiona H., Yuchen Bai, Pierre Saintigny, ve Charbel Darido. 2019. "mTOR Signalling in Head and Neck Cancer: Heads Up". *Cells* 8 (4): 4. <https://doi.org/10.3390/cells8040333>.
- Taniguchi, Ken, Morimasa Wada, Kimitoshi Kohno, vd. 1996. "A Human Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter (cMOAT) Gene Is Overexpressed in Cisplatin-resistant Human Cancer Cell Lines with Decreased Drug Accumulation¹". *Cancer Research* 56 (18): 4124-29.
- Tatetsu, Hiro, Nikki R. Kong, Gao Chong, Giovanni Amabile, Daniel G. Tenen, ve Li Chai. 2016. "SALL4, the missing link between stem cells, development and cancer". *Gene* 584 (2): 111-19.

- Terek, M. C., O. Zekioglu, F. Sendag, F. Akercan, A. Ozsaran, ve Y. Erhan. 2003. "MDR1 Gene Expression in Endometrial Carcinoma". *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* 13 (5): 673-77. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1438.2003.13324.x>.
- Toi, Junji Itou Masakazu. 2014. "Function of the developmental transcription factor SALL4 in cancer". *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis* 5 (02). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1360285714941408000>.
- Torre, Lindsey A., Freddie Bray, Rebecca L. Siegel, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-Tieulent, ve Ahmedin Jemal. 2015. "Global Cancer Statistics, 2012". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65 (2): 87-108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Ueno, Shikiko, Jiayun Lu, Jie He, vd. 2014. "Aberrant expression of SALL4 in acute B cell lymphoblastic leukemia: mechanism, function, and implication for a potential novel therapeutic target". *Experimental hematology* 42 (4): 307-16.
- Uez, Nikolas, Heiko Lickert, Jürgen Kohlhase, vd. 2008. "Sall4 Isoforms Act during Proximal–Distal and Anterior–Posterior Axis Formation in the Mouse Embryo". *Genesis* 46 (9): 463-77. <https://doi.org/10.1002/dvg.20421>.
- Üçebakan, Nisa Nur, ve Nural Erzurum Alim. 2021. "Baş ve Boyun Kanserlerinde Risk Faktörleri ve Beslenme". *Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 1 (1): 54-66.
- Vermorken, Jan B., Ricard Mesia, Fernando Rivera, vd. 2008. "Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer". *New England Journal of Medicine* 359 (11): 1116-27.
- Vermorken, Jan B., José Trigo, Ricardo Hitt, vd. 2007. "Open-Label, Uncontrolled, Multicenter Phase II Study to Evaluate the Efficacy and Toxicity of Cetuximab As a Single Agent in Patients With Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Who Failed to Respond to Platinum-Based Therapy". *Journal of Clinical Oncology* 25 (16): 2171-77. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.7447>.
- Wang, Huanlin, Kenichi Kohashi, Tomoharu Yoshizumi, vd. 2017. "Coexpression of SALL4 with HDAC1 and/or HDAC2 is associated with underexpression of PTEN and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma". *Human Pathology* 64: 69-75.
- Wang, Jianjun, Jiaxin Huang, Qianfeng Ma, ve Guanghui Liu. 2019. "Association between Quantitative Parameters of CEUS and Sall4/Wnt/β-Catenin Signaling in Patients with Hepatocellular Carcinoma". *Cancer Management and Research* Volume 11 (Nisan): 3339-47. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S199968>.
- Wang, Jun, Baocheng Wang, Huili Chu, ve Yunfeng Yao. 2016. "Intrinsic Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer with Activating EGFR Mutations". *OncoTargets and Therapy*, Haziran, 3711. <https://doi.org/10.2147/OTT.S106399>.

- Wang, Mei, Rong Qiu, Zheng Gong, vd. 2019. "miR-188-5p Emerges as an oncomiRNA to Promote Gastric Cancer Cell Proliferation and Migration via Upregulation of SALL4". *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (9): 15027-37. <https://doi.org/10.1002/jcb.28764>.
- Warnakulasuriya, Saman. 2009. "Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer". *Oral oncology* 45 (4-5): 309-16.
- Watts, Tammara L., Ruwen Cui, Peter Szaniszló, Vicente A. Resto, Don W. Powell, ve Irina V. Pinchuk. 2016. "PDGF-AA Mediates Mesenchymal Stromal Cell Chemotaxis to the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumor Microenvironment". *Journal of Translational Medicine* 14 (1): 337. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1091-6>.
- Wheeler, Deric L., Shyhmin Huang, Tim J. Kruser, vd. 2008. "Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members". *Oncogene* 27 (28): 3944-56.
- Whittaker, Steven R., Aurélie Mallinger, Paul Workman, ve Paul A. Clarke. 2017. "Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics". *Pharmacology & Therapeutics* 173 (Mayıs): 83-105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.008>.
- Wiley, Christopher D., Joshua C. Anderson, Hoa Q. Trummell, vd. 2019. "Differential escape mechanisms in cetuximab-resistant head and neck cancer cells". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 517 (1): 36-42.
- Wu, Qingwei, Yingying Zhao, ve Peihua Wang. 2018. "miR-204 inhibits angiogenesis and promotes sensitivity to cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking JAK2-STAT3 signaling". *Biomedicine & Pharmacotherapy* 99: 278-85.
- Xiong, Jun, Zhuqiang Zhang, Jiayu Chen, vd. 2016. "Cooperative action between SALL4A and TET proteins in stepwise oxidation of 5-methylcytosine". *Molecular cell* 64 (5): 913-25.
- Xu, Cheng-Zhi, Run-Jie Shi, Dong Chen, vd. 2013. "Potential biomarkers for paclitaxel sensitivity in hypopharynx cancer cell". *International journal of clinical and experimental pathology* 6 (12): 2745.
- Yakicier, Dr M. Cengiz. 2010. "Baş-Boyun Kanserlerinin Moleküler Biyoloji ve Karsinogenezi". *Türkiye Klinikleri Medical Oncology - Special Topics* 3 (1): 1-6.
- Yang, Jianchang, Li Chai, Fang Liu, vd. 2007. "Bmi-1 Is a Target Gene for SALL4 in Hematopoietic and Leukemic Cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (25): 10494-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704001104>.
- Yang, Jianchang, Tyler R. Corsello, ve Yupo Ma. 2012. "Stem cell gene SALL4 suppresses transcription through recruitment of DNA methyltransferases". *Journal of Biological Chemistry* 287 (3): 1996-2005.

- Yang, Lina, Li Liu, Hong Gao, vd. 2017. "The Stem Cell Factor SALL4 Is an Essential Transcriptional Regulator in Mixed Lineage Leukemia-Rearranged Leukemogenesis". *Journal of Hematology & Oncology* 10 (1): 159. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0531-y>.
- Yang, Yang, Xiaohong Wang, Yiqiang Liu, vd. 2021. "Up-regulation of SALL4 is associated with survival and progression via putative WNT pathway in gastric cancer". *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9: 600344.
- Yong, Kol Jia, Chong Gao, Joline S.J. Lim, vd. 2013. "Oncofetal Gene *SALL4* in Aggressive Hepatocellular Carcinoma". *New England Journal of Medicine* 368 (24): 2266-76. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300297>.
- Yuan, X., X. Zhang, W. Zhang, vd. 2016. "SALL4 promotes gastric cancer progression through activating CD44 expression". *Oncogenesis* 5 (11): e268-e268.
- Zamore, Phillip D. 2001. "RNA interference: listening to the sound of silence". *Nature structural biology* 8 (9): 746-50.
- Zeng, Yan, ve Bryan R. Cullen. 2002. "RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm." *Rna* 8 (7): 855-60.
- Zhang, Dengfeng, Feng Jiang, Xiao Wang, ve Guojun Li. 2017. "Knockdown of SALL4 inhibits proliferation, migration, and invasion in osteosarcoma cells". *Oncology Research* 25 (5): 763.
- Zhang, Jinqiu, Wai-Leong Tam, Guo Qing Tong, vd. 2006. "Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1". *Nature cell biology* 8 (10): 1114-23.
- Zhang, L., Z. Xu, X. Xu, vd. 2014. "SALL4, a novel marker for human gastric carcinogenesis and metastasis". *Oncogene* 33 (48): 5491-500.
- Zhang, Xiaotian, Masakazu Yashiro, Hong Qiu, Takafumi Nishii, Taro Matsuzaki, ve Kosei Hirakawa. 2010. "Establishment and characterization of multidrug-resistant gastric cancer cell lines". *Anticancer research* 30 (3): 915-21.
- Zugazagoitia, Jon, Cristiano Guedes, Santiago Ponce, Irene Ferrer, Sonia Molina-Pinelo, ve Luis Paz-Ares. 2016. "Current Challenges in Cancer Treatment". *Clinical Therapeutics* 38 (7): 1551-66. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>.