

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

KLOTHO PROTEİNİNİN DERİ KANSERİ (MELANOMA HÜCRELERİ)
ÜZERİNDE ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba ÇIĞŞAR

EKİM 2025

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**KLOTHO PROTEİNİNİN DERİ KANSERİ (MELANOMA HÜCRELERİ)
ÜZERİNDE ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuğba ÇIĞŞAR

ORCID :

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce
"YÜKSEK LİSANS (MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 19 / 09 / 2025

Tezin Savunma Tarihi : 31 / 10 / 2025

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Uğur UZUNER

ORCID :

Trabzon 2025

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında
Tuğba ÇIĞŞAR Tarafından Hazırlanan**

**KLOTHO PROTEİNİNİN DERİ KANSERİ (MELANOMA HÜCRELERİ) ÜZERİNDE
ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 02 / 10 / 2025 gün ve 2122 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Hacer MURATOĞLU

Üye : Doç. Dr. Uğur UZUNER

Üye : Doç. Dr. Hatice SEVİM NALKIRAN

**Prof. Dr. Asim KADIOĞLU
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

“Klotho Proteininin Deri Kanseri (Melanoma Hücreleri) Üzerinde Antitümör Etkilerinin Araştırılması” isimli bu tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı’nda hazırlanmıştır. Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası FYL-2024-11099).

Tez çalışmam boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen ve bilim insanı olma yolundaki ilk adımlarımı atarken kıymetli bilgileriyle ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Uğur UZUNER’e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, yapıcı eleştirileri ve önerileri ile tezime büyük katkıları bulunan, laboratuvarını açarak tez çalışmama olanak sağlayan saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Selcen Çelik UZUNER’e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışması süresinde hiçbir yardımdan kaçınmayan, bilgi ve tecrübeleriyle destek olan sayın Sinan TETİKOĞLU’na teşekkür ederim.

Tez çalışması sürecinde benden desteklerini esirgemeyen birlikle yüksek lisans yaptığım değerli arkadaşlarım Ceren Elif YETİM ve Naile TURHAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, doğduğum günden beri elimi hiç bırakmayan, hayatım boyunca aldığım tüm kararlarda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve her kararında arkamda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan annem, babam, abim ve ablama teşekkür eder, minnettarlığımı sunarım.

Bu tez çalışmasının bundan sonraki çalışmalara katkı sağlamasını temenni ederim.

Tuğba ÇIĞŞAR

Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Klotho Proteininin Deri Kanseri (Melanoma Hücreleri) Üzerinde Antitümör Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Uğur UZUNER’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 31/10/2025

Tuğba ÇIĞŞAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Klotho	1
1.1.1. α -Klotho Proteini Moleküler Fonksiyonları ve Antikanser Potansiyeli.....	2
1.2. Kanser.....	4
1.2.1. Hücre Döngüsü.....	5
1.3. Cilt Kanseri	6
1.3.1. Melanom Dışı Cilt Kanseri	7
1.3.2. Melanoma Kanseri	8
1.4. Cilt Kanseri İlerlemesinin Mekanizması	9
1.4.1. UV Işınları	9
1.4.2. Ten Rengi.....	9
1.4.3. İmmünojenik Morbidite.....	10
1.4.4. Kapalı Alanda Bronzlaşma	10
1.4.5. Yaş.....	10
1.5. Melanoma Kanseri Genetik Temeli	11
1.5.1. Melanoma Kanseri Tedavi Yöntemleri	13
1.6. Salgılanan Klotho ve Kanser Hücresinde Etkilediği Gen Yolakları	14
1.7. Klotho ve Melanoma Kanseri	16
1.8. Çalışmanın Amacı.....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	17
2.1. Deri Hücre Hatlarının Sıvı Azottan Çıkarılarak Kültür Edilmesi.....	17
2.2. Hücrelerin Pasajlanması	18

2.3. Hücrelerin Dondurulması	19
2.4. Rekombinant α -Klotho Proteininin Hazırlanması.....	19
2.5. hKL Proteininin VMM917 ve HaCaT Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin MTT Hücre Canlılık Testi ile Değerlendirilmesi	20
2.6. MTT Sonuçlarının SPSS Analizi	21
2.7. hKL Proteininin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Analizi	21
2.7.1. Akım Sitometrisi Verilerinin Analizi	22
2.8. Toplam RNA İzolasyonu	23
2.8.1. RNA Kalite ve Konsantrasyon Analizi	24
2.9. cDNA Sentezi	24
2.10. Gerçek Zamanlı PCR ile Gen Ekspresyon Analizi.....	25
2.10.1. Kullanılan Primerler	26
2.10.2. Reaksiyon Koşulları	27
2.10.3. Termal Döngü Koşulları.....	27
3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	28
3.1. VMM917 ve HaCaT Hücre Hatlarının Kültür Edilmesi	28
3.2. Sitotoksik Etkinin MTT Aracılı SPSS Analizi İle Değerlendirilmesi.....	29
3.3. hKL Proteininin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Akım Sitometresi ile Değerlendirilmesi	35
3.4. qPCR Analiz Verileri	40
4. SONUÇLAR	42
5. ÖNERİLER.....	44
5.1. Daha Geniş Doz Aralıkları ile Çalışmalar	44
5.2. Zaman Bağımlı Etki ve Klotho Temini	44
5.3. Farklı Hücre Hatları.....	44
5.4. Kombinasyon Tedavileri	45
5.5. <i>In vivo</i> Çalışmalar.....	45
5.6. Farklı Genlerin Etkisi	45
5.7. Protein ve Fosfo-Protein Doğrulama Çalışmaları	45
6. KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

KLOTHO PROTEİNİNİN DERİ KANSERİ (MELANOMA HÜCRELERİ) ÜZERİNDE ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuğba ÇIĞŞAR

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Uğur UZUNER
2025, 51 Sayfa

Klotho geni, ilk kez 1997 yılında Makoto Kuro-o ve arkadaşlarının farelerde yaptığı bir çalışmada yaşlanma karşıtı bir faktör olarak keşfedilmiştir. Bu gen, iki farklı formda *klotho* (KL) proteini üretir: Birincisi membrana entegre olarak görev yaparken, diğeri salgılanarak dolaşıma katılır. *Klotho* proteini en yoğun olarak böbrek üstü bezlerinin distal tübüllerinde üretilse de, beyin, akciğer, karaciğer, yumurtalıklar ve diğer organlarda da düşük miktarlarda bulunmaktadır. Membrandan serbest bırakılan ve salgılanan KL proteini (s-KL), kan, beyin, omurilik sıvısı ve idrarda bulunur. KL protein miktarı, yaşlanmayla birlikte vücutta azalırken, Alzheimer, kanser, kemik erimesi, böbrek yetmezliği ve kronik akciğer hastalığı gibi hastalıklar ile birlikte KL proteininin ekspresyonunun artırılması, yaş ömrünü uzatmak ve hastalıkların seyrini iyileştirmek konusunda umut verici sonuçlar doğurmuştur.

Bu tez, rekombinant insan *Klotho* (hKL) proteininin antikanserojenik potansiyelini insan deri kanseri hücre hattı VMM917 üzerinde araştırmayı amaçlamaktadır. hKL proteininin melanoma kanserine karşı olası etkileri, farklı hKL konsantrasyonları ile yapılan testler, MTT sitotoksosite analizi, hücre döngüsü analizi ve melanoma gelişiminde rol oynayan genlerin ekspresyon seviyelerinin qPCR ile incelenmesi yoluyla kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, hKL proteini muamelesine karşı VMM917 hücre hattının nispeten direnç gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Klotho* Proteini, Antikanser, VMM917

Master Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE ANTITUMOR EFFECTS OF KLOTHO PROTEIN IN MELANOMA CELLS

Tuğba ÇİĞŞAR

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology and Genetics Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Uğur UZUNER
2025, 51 Pages

The *Klotho* gene was first discovered in 1997 by Makoto Kuro-o and his colleagues during a study conducted on mice, where it was identified as an anti-aging factor. This gene encodes two different forms of Klotho (KL) protein: one is membrane-bound, while the other (s-KL) is secreted into the circulation. Although KL protein is predominantly expressed in the distal tubules of the kidneys, it is also present in lower amounts in the brain, lungs, liver, ovaries, and other organs. s-KL might be available in blood, cerebrospinal fluid, and urine. The level of s-KL protein decreases with aging and has been associated with several age-related diseases such as Alzheimer's disease, cancer, osteoporosis, kidney failure, and chronic lung diseases. Increasing KL expression has shown promising potential for extending lifespan and improving the progression of these diseases.

This thesis aimed to investigate the anticancer potential of recombinant human Klotho (hKL) protein on a human skin cancer cell line VMM917. The possible effects of hKL on melanoma were comprehensively examined through experiments using various hKL concentrations, MTT cytotoxicity assay, cell cycle analysis, and qPCR analysis of gene expression levels involved in melanoma development. As a result, it was determined that the VMM917 cell line exhibited resistance to hKL protein.

Key Words: Klotho Protein, Anticancer, VMM917

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. s-KL etkilediği sinyal yolakları (Prud'homme vd., 2022)	3
Şekil 2. Hücre döngüsü aşamaları (Molnar & Gair, 2015)	5
Şekil 3. Cilt kanseri türleri (Hossain vd., 2025)	7
Şekil 4. Melanomada rol oynayan 3 önemli sinyal yolağı; MAPK yolu (turuncu), PI3K/AKT yolu (yeşil) ve CDK4/6-p53 (kahverengi)	13
Şekil 5. α -Klotho proteininin etkilediği sinyal yolakları (Sachdeva vd., 2020)	15
Şekil 6. VMM917 hücre hattı 40X mikroskop görüntüleri	18
Şekil 7. HaCaT hücre hattı 10X mikroskop görüntüleri	18
Şekil 8. VMM917 hücre hattının kültürdeki morfolojisi (Inverted mikroskop, 10X ve 5X)	28
Şekil 9. HaCaT hücre hattının kültürdeki morfolojisi (Inverted mikroskop, 10X ve 5X)	28
Şekil 10. VMM917 hücre hattı 48. ve 72. saat doza bağımlı % hücre canlılığını gösteren grafikler. A) Excel grafiği, B) SPSS grafiği	30
Şekil 11. HaCaT hücre hattı 48. ve 72. saat doza bağımlı % hücre canlılığını gösteren grafikler. A) Excel grafiği, B) SPSS grafiği	31
Şekil 12. VMM917 hücre hattı hKL muamelesi öncesi ve muamele sonrası mikroskop görüntüleri (5X)	36
Şekil 13. HaCaT hücre hattı hKL muamele öncesi ve muamele sonrası mikroskop	37
Şekil 14. VMM917 hücre hattının hKL proteini ile 72. saat muamelesi sonucu hücre döngüsü analiz grafiği. A) Kontrol, B) 800 ng/mL	39
Şekil 15. HaCaT hücre hattının klotho proteini ile 72 saat muamelesi sonucu hücre döngüsü analiz grafiği. A) Kontrol, B) 800 ng/mL	39
Şekil 16. VMM917 hücre hattında hKL muamelesi sonrası kontrol grubuna göre <i>BRAF</i> , <i>CDK4</i> , <i>MITF</i> , <i>NF1</i> , <i>NRAS</i> ve <i>TP53</i> genlerinin qPCR analizi grafiği	41
Şekil 17. HaCaT hücre hattında hKL muamelesi sonrası kontrol grubuna göre <i>BRAF</i> , <i>CDK4</i> , <i>MITF</i> , <i>NF1</i> , <i>NRAS</i> ve <i>TP53</i> genlerinin qPCR analizi grafiği	41

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Hücre hatları için besiyeri içeriği	17
Tablo 2. Hücre dondurma medyası içeriği.....	19
Tablo 3. cDNA sentez reaksiyon içeriği.....	24
Tablo 4. cDNA sentezi 2. adımda eklenen bileşenler.....	25
Tablo 5. PCR koşulları	25
Tablo 6. qPCR analizinde kullanılan primer dizileri.....	26
Tablo 7. qPCR reaksiyon koşulları.....	27
Tablo 8. qPCR sentezi termal döngü programı	27
Tablo 9. HaCaT hücre hattında hKL muamelesi sonrası çoklu karşılaştırma analizi (LSD testi).....	32
Tablo 10. VMM917 hücre hattında hKL muamelesi sonrası çoklu karşılaştırma analizi (LSD testi).....	34
Tablo 11. VMM917 ve HaCaT hücre hatları için hücre döngüsü analiz verileri	37

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
+/-SE	: Standart Error (Standart Hata)
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat
μ	: Mikro
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
AKT	: Protein Kinaz B
BCC	: Bazal Hücreli Karsinom
BCC	: Bazal Hücreli Karsinom
BSA	: Bovine Serum Albumin
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDKN2A	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CO_2	: Karbondioksit
CTLA-4	: Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen 4
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DTT	: Dithiothreitol
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
g	: Yer Çekimi Birimi
GTP	: Guanozin Trifosfat
HaCaT	: İnsan Keratinosit Hücre Hattı
hKL	: Human Klotho Proteini
IFN-alfa2b	: İnterferon alfa-2b

IL-2	: İnterlökin 2
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MITF	: Melanosit İndükleyici Transkripsiyon Faktörü
mL	: mililitre
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MSC	: Melanom Cilt Kanseri
ng	: nanogram
nm	: nanomolar
NMSC	: Melanom Dışı Cilt Kanseri
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PD1	: Programlanmış Hücre Ölümü Proteini 1
PI	: Propidium Iodide
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PS	: Penicillin-Streptomycin
qPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: revolutions per minute
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute (Medya)
SCC	: Skuamöz Hücreli Karsinom
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
U	: Unite (Enzim Birimi)
UV	: Ultraviyole
VMM917	: Melanoma Hücre Hattı

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Klotho

Klotho geni, ilk kez 1997 yılında Makoto Kuro-o ve çalışma arkadaşları tarafından fare modellerinde yürütülen bir çalışmada tanımlanmıştır. Bu tarihten itibaren Klotho proteini; kanser, diyabet, böbrek yetmezliği ve nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere çeşitli kronik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. *Klotho* geninin alternatif mRNA işlenmesi sonucunda, transmembran ve salgılanabilir olmak üzere iki farklı protein izoformu oluşmaktadır (Hajare vd., 2025). α -*Klotho* geni, insan, fare ve sıçan gibi türlerde yüksek oranda korunmuştur. Özellikle insan ve fare α -Klotho proteinleri arasında yaklaşık %98 oranında dizilim benzerliği bulunmaktadır (Y. Xu & Sun, 2015). Salgılanabilir α -Klotho (α -KL) proteini, insanlarda 1650 nükleotid, farelerde ise 1647 nükleotid uzunluğundaki mRNA dizilerinden sentezlenmektedir (Y. Xu & Sun, 2015).

Yaşlanmayla birlikte dolaşım sistemindeki α -Klotho protein düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (Arroyo vd., 2023). Ayrıca böbrek yetmezliği, nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli kanser türlerinde de α -Klotho ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Buna karşın, α -Klotho artırılmasının hastalıkların ilerleyişinde yavaşlamaya ve bazı olgularda klinik iyileşmeye yol açtığı tespit edilmiştir. Güncel çalışmalar, α -Klotho proteinin; meme, akciğer, mide, kolorektal ve karaciğer kanseri gibi farklı tümör tiplerinde tümör baskılayıcı (tümör süpresör) özellikler sergilediğini ortaya koymaktadır (Prud'homme vd., 2022).

Klotho proteini başlıca böbrek üstü bezleri, beyin, iskelet kasları, hipofiz bezi, kolon ve paratiroid bezlerinde eksprese edilmektedir. *Klotho* geninin aşırı ekspresyonunun, farelerde yaşam süresini yaklaşık %30 oranında uzattığı gösterilmiştir (Bittmann, 2023). Transmembran bölgenin ötesinde, Klotho proteini fibronektin tip III benzeri yapılar içeren hücre dışı iki ardışık tekrar domainine sahiptir. α -Klotho ve β -Klotho izoformları, fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR'ler) ile etkileşime girerek bu reseptörlerin özgüllüğünü ve etkinliğini artırmakta, böylece FGF sinyal yollarının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Chen vd., 2023).

Transmembran formdan proteolitik kesim yoluyla serbestleştirilen salgılanabilir α -Klotho (sKL) proteini, sistemik dolaşıma katılarak endokrin hormon benzeri bir işlev

üstlenir (Dalton vd., 2017). sKL; Wnt sinyal yolları, insülin/IGF-1 sinyalleme, FGF aracılı hücreler, mineral dengesi, bilişsel homeostaz, N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) fonksiyonları ve yaşlanma mekanizmaları başta olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde kritik roller üstlendiği bildirilmiştir (Dalton vd., 2017; Hanson vd., 2021).

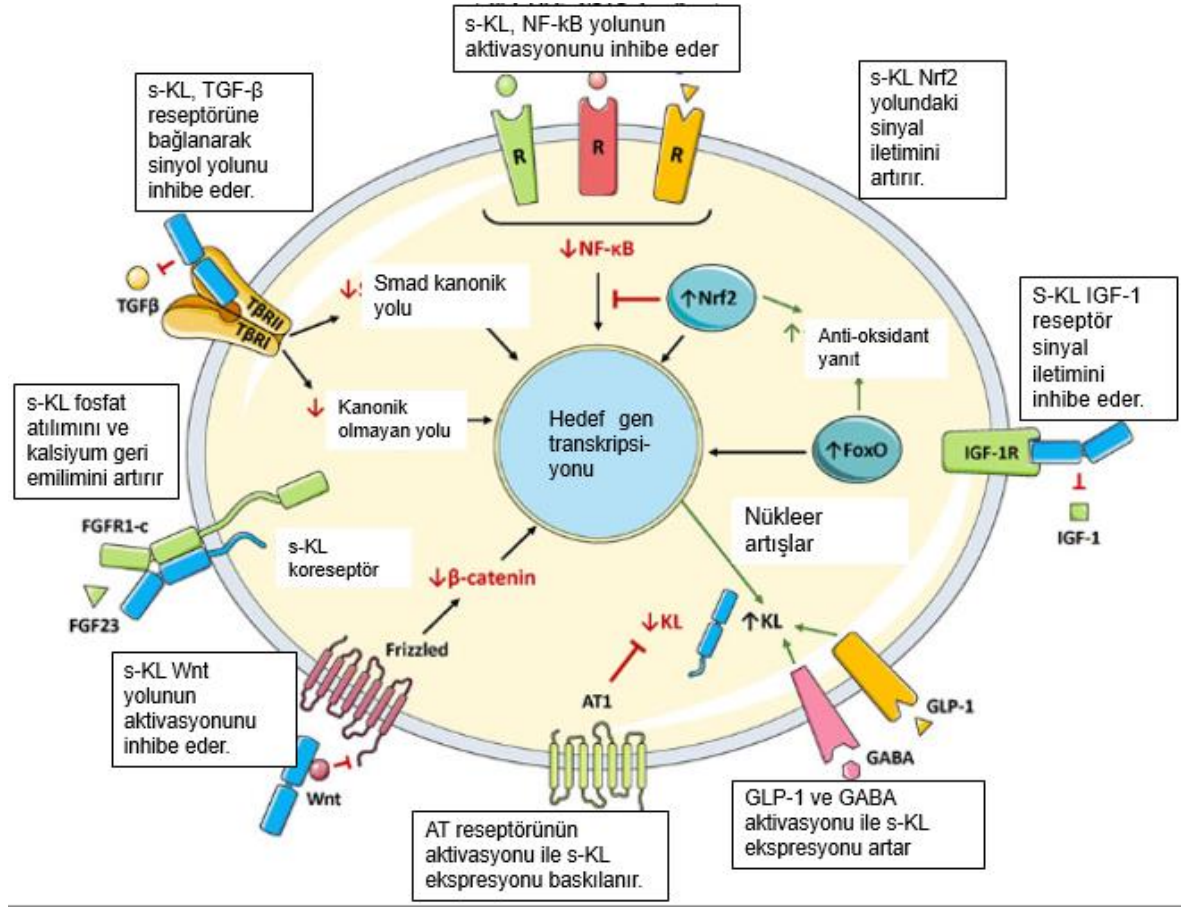
1.1.1. α -Klotho Proteini Moleküler Fonksiyonları ve Antikanser Potansiyeli

α -KL, en kapsamlı şekilde incelenmiş Klotho izoformudur ve başlıca beyin ve böbreklerin distal tübül hücrelerinde eksprese edilmektedir. Bu bölgelerde α -KL, fosfat (Pi) emiliminin ve 1-25-dihidroksivitamin D₃ (aktif D vitamini) sentezinin düzenlenmesinde görev almaktadır. α -KL, fosfat ve D vitamini metabolizmasının temel düzenleyicilerinden biri olan fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) için yardımcı reseptör olarak işlev görür (Haussler vd., 2012). α -KL ve FGF23 arasındaki etkileşim, böbreklerden fosfat yeniden emilimi ile ciltteki D vitamini biyosentezinin dengelenmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, Klotho proteini FGF23'ten bağımsız çeşitli biyolojik işlevlere de sahiptir (Mencke vd., 2017).

Transmembran formdan proteolitik yolla ayrılarak dolaşıma katılan salgılanabilir Klotho (sKL), endokrin sistemde hormon benzeri bir rol üstlenir. sKL, hücre büyümesi, hareketliliği, hayatta kalma, metabolizma ve anjiyogenez gibi hücreler süreçlerinin düzenlenmesinde yer alan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu inhibe edebilme kapasitesine sahiptir. Bu nedenle, potansiyel bir tümör baskılayıcı molekül olarak değerlendirilmektedir (H. Zhou vd., 2021). Bununla birlikte, PI3K/AKT/mTOR yolunun aşırı aktivasyonu, böbreklerdeki sKL düzeylerini baskılamaktadır. sKL ayrıca iyon kanallarının organizasyonu, kalsiyum-fosfat metabolizması, mitokondriyal fonksiyonların sürdürülmesi ve oksidatif stresin azaltılmasında da rol oynamaktadır (Dalton vd., 2017; Donate-Correa vd., 2023; Huang, 2010; Y. Xu vd., 2025). Bunun yanında, sKL, hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan antioksidan sisteminin düzenlenmesine de katkı sağlamaktadır (Şekil 1). (Donate-Correa vd., 2023).

Klotho proteininin bir diğer önemli özelliği, hücre çoğalması ve farklılaşmasında kritik rol oynayan Wnt sinyal yolunun negatif düzenleyicisi olmasıdır (Dalton vd., 2017). sKL, Wnt ligandına bağlanarak bu ligandın hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmasını engeller. Wnt sinyal yolunun geçici aktivasyonu kök hücrelerin çoğalması ve sağkalımı açısından

önemli olsa da; bu yolun sürekli aktivasyonu kök hücrelerin yaşlanmasına ve tükenmesine yol açabilir. Nitekim, *Kl* geninin eksik olduğu farelerde, deri ve kıl foliküllerinde epidermal kök hücre sayısının belirgin şekilde azaldığı, buna bağlı olarak da yara iyileşmesinde gecikme görüldüğü bildirilmiştir (Kuro-o, 2009). Bu durum, Wnt yolunun kronik aktivasyonunun kök hücre işlev bozukluklarına ve yaşlanma süreçlerinin hızlanmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 1. s-KL etkilediği sinyal yolları (Prud'homme vd., 2022)

Düşük sKL seviyeleri; kanser, kardiyovasküler hastalıklar, ateroskleroz, vasküler disfonksiyon, kronik böbrek hastalığı (KBH), diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve bilişsel gerileme gibi yaşa bağlı patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir (Buchanan vd., 2020; Prud'homme vd., 2022; H. Zhou vd., 2021). Ayrıca, sKL ekspresyonundaki azalma; özafagus, mide, meme, akciğer, hepatoselüler, pankreas, kolorektal, yumurtalık ve böbrek

tümörleri dahil olmak üzere birçok kanser türünün gelişimi ve metastatik yayılımı ile ilişkilidir (Kuro-o, 2010).

sKL'nin antikanserojenik etkilerinin; hücre proliferasyonunun ve apoptozun düzenlenmesi, DNA hasar onarımının desteklenmesi gibi mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıktığı öne sürülmektedir. Sağlık üzerinde geniş kapsamlı etkileri göz önünde bulundurulduğunda, rekombinant sKL proteini; kanser, bilişsel bozukluklar, Alzheimer hastalığı, kronik böbrek hastalıkları, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve diğer bağışıklık sistemi baskılanmış hastalıklar için potansiyel bir farmasötik ajan olarak değerlendirilmektedir (Abraham vd., 2012; Sachdeva vd., 2020). Bu bağlamda, insan sKL proteinine yüksek sekans benzerliği gösteren fare sKL proteininin (%79,61 amino asit sekans benzerliği) model mikroalg *Chlamydomonas reinhardtii* konaklarında ekstrasellüler ve fotosentetik olarak rekombinant üretimi ilk kez gerçekleştirilmiştir (Çakmak & Uzuner, 2024). Çalışma sonunda rekombinant protein başarıyla mikroalg kültür sıvılarından saflaştırılmış ve ilgili rekombinant proteinin fonksiyonel olarak antitümör etkisi, iki farklı kanser hücre hattında test edilmek suretiyle doğrulanmıştır (Çakmak, 2021). Özellikle kanser hastalarında düşük sKL düzeylerinin yeniden dengelenmesi, immün sistemi baskılanmış bireylerde kanser gelişimini önleyici bir strateji olarak önem taşımaktadır. Nitekim sKL'nin immün bağışıklığı modüle edici özellikler taşıdığı ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde etkili olabileceğine dair bulgular giderek artmaktadır.

1.2. Kanser

Kanser, vücudun herhangi bir doku veya organında, bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, büyümesi ve köken aldığı dokudan komşu dokulara invazyon göstermesiyle karakterize edilen kompleks bir hastalık grubudur. Bu anormal hücreler, zamanla uzak organlara metastaz yapabilme yeteneğine de sahiptir (Hesketh, 2023).

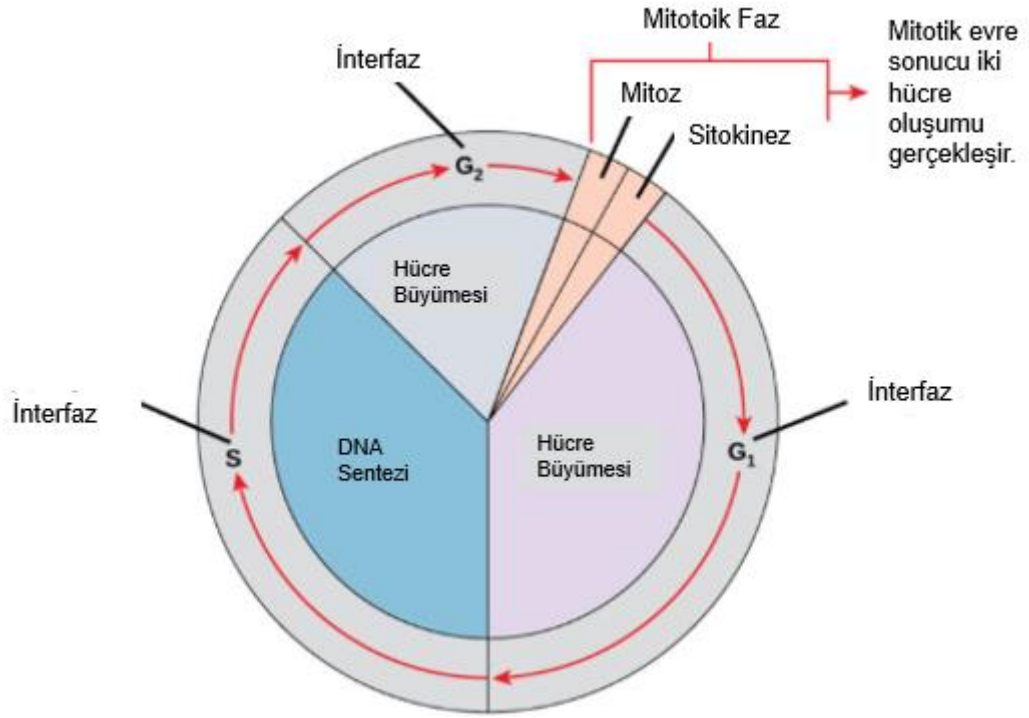
Dünya Sağlık Örgütüne göre kanser, dünya genelinde en önde gelen ölüm nedenlerinden biri olup, toplum sağlığı açısından önemli bir küresel yük oluşturmaktadır. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 20 milyon kanser vakası rapor edilmiştir ve yaklaşık 10 milyon insan kansere bağlı nedenlerle yaşamını yitirmiştir (URL-1, 2024).

En sık görülen kanser türleri arasında meme kanseri (2,26 milyon vaka), akciğer kanseri (2,2 milyon vaka), kolon kanseri (1,9 milyon vaka), prostat kanseri (1,4 milyon vaka), cilt kanseri (1,2 milyon vaka) ve mide kanseri (1,1 milyon vaka) yer almaktadır (URL-

2, 2025). Gelişen tanı yöntemleri ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına rağmen, kanser hala en yaygın ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir.

1.2.1. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, bir hücrenin büyüme, DNA replikasyonu ve bölünme süreçlerini kapsayan, düzenli olarak tekrarlanan bir olaylar dizisidir. Bu süreç, doku yenilenmesi, büyüme ve homeostazın sürdürülmesi açısından temel öneme sahiptir. Hücre döngüsünün iki ana aşaması vardır: interfaz ve mitototik aşama. İnterfaz, G₁ (Gap 1), S (Sentez) ve G₂ (Gap 2) olmak üzere üç aşamaya, mitototik faz ise mitoz ve sitokinez olmak üzere iki aşamaya sahiptir (Şekil 2) (Matthews, Bertoli, vd. Bruin 2022).



Şekil 2. Hücre döngüsü aşamaları (Molnar & Gair, 2015)

G₁ fazı sırasında hücre, DNA replikasyonuna hazırlanır; protein sentezi, RNA üretimi ve organel artışı gerçekleşmektedir. Hücre, dış ortamdan gelen büyüme faktörleri aracılığıyla bu evrede ilerleyip ilerlememeye karar vermektedir. S fazında DNA replikasyonu gerçekleşir G₂ fazında ise hücre, mitoz için gerekli mikrotübül proteinlerini

sentezleyerek bölünmeye hazırlanır. Son olarak mitoz fazında kardeş kromatidler ayrılır, sitokinez fazında ise hücre ikiye bölünür (Gomez-Raya-Vilanova vd., 2025).

Hücre döngüsü boyunca genomik bütünlüğün korunması, iki temel kontrol noktası aracılığıyla sağlanmaktadır.

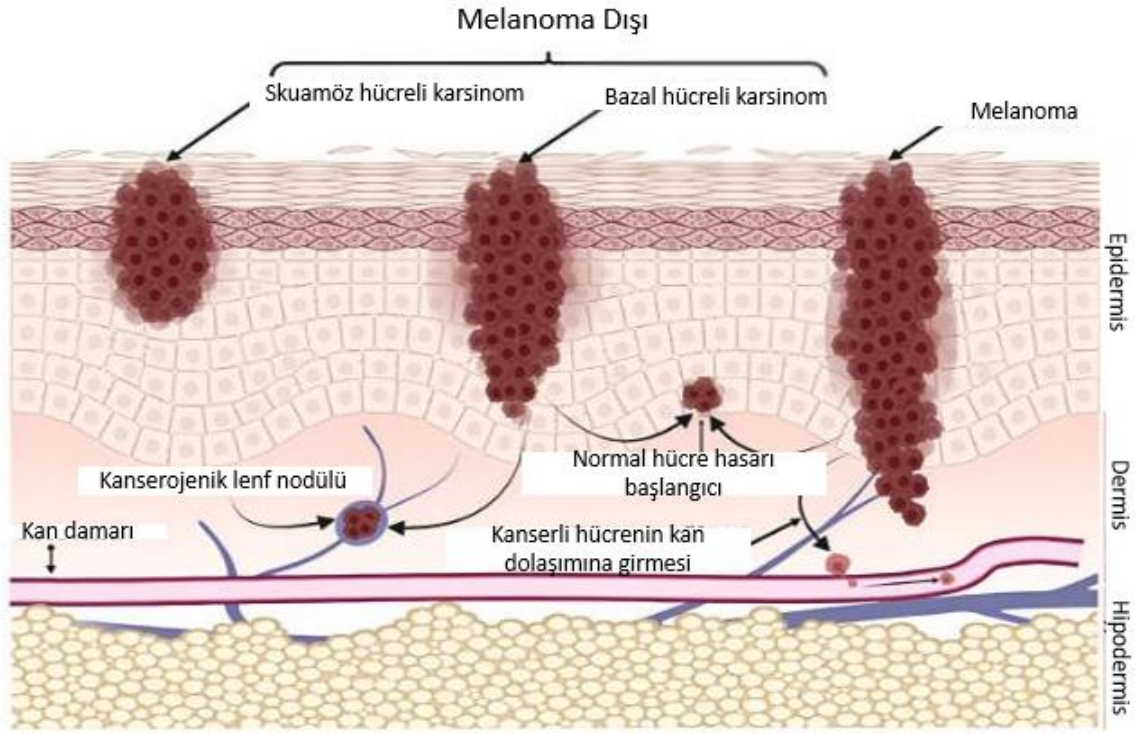
- G1/S kontrol noktası, DNA hasarına yanıt olarak, hücre döngüsünün durmasına neden olur; bu sayede hasar onarılmadan replikasyona geçiş engellenir.
- G2/M kontrol noktası, DNA replikasyonundaki hatalar sebebi ile mitotik faza geçişi engeller.

Bu kontrol noktaları siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar) ve CDK inhibitörleri tarafından düzenlenmektedir (Y. Xu vd., 2024).

Hücre döngüsü kontrol noktalarında meydana gelen mutasyonlar, kontrolsüz hücre proliferasyonuna yol açarak kanser gelişiminde kritik rol oynamaktadır. Özellikle *CDK4/6* aktivasyonunun artışı, *p53* mutasyonları kanser hücrelerinde sık gözlenen olaylardır (Deshpande vd., 2005).

1.3. Cilt Kanseri

Yaklaşık beş kişiden biri hayatının bir döneminde cilt kanserinden musdariptir. Erken teşhis ve uygun tedavi sayesinde düşük ölüm oranları gözlemlenmiştir. Melanom dışı cilt kanseri (NMSC) ve melanom cilt kanseri (MSC) olarak belirtilen iki ana cilt kanseri türü vardır (Şekil 3). Bu kanserler tüm cilt kanserlerinin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır (Roky vd., 2025).



Şekil 3. Cilt kanseri türleri (Hossain vd., 2025)

1.3.1. Melanom Dışı Cilt Kanseri

Avustralya ve Kuzey Amerika'nın en yüksek NMSC sıklığına sahip bölgeler olduğu bildirilmiştir (Perera vd., 2015). NMSC, melanom hücreleri dışında kalan epidermal hücrelerin malign transformasyonu sonucu gelişen cilt kanseri türlerini kapsamaktadır. NMSC oluşumunda en önemli etiyolojik faktör, ultraviyole (UV) ışınlarına kronik maruziyet olup özellikle açık tenli bireylerde risk belirgin şekilde yükselmektedir (L. Zhou vd., 2025). Bunun yanı sıra, *TP53* gen ailesindeki mutasyonlar başta olmak üzere çeşitli genetik değişiklikler de NMSC gelişimine katkıda bulunmaktadır. Başlıca iki tipi vardır (Şekil 3); bazal hücreli karsinom (BCC), skuamöz hücreli karsinom (SCC) (Zambrano-Román vd., 2022). NMSC'nin %99'unu BCC ve SCC oluşturmaktadır.

BCC, insanlarda bulunan en yaygın cilt malignitesidir. Epidermis tabakasının bazal hücrelerinden gelişir (Roky vd., 2025). En büyük risk, aşırı güneş ışığına maruz kalmaktır. Skuamöz hücreli karsinoma göre düşük ölüm oranına sahiptir ancak dokuların lokal yıkımı nedeni ile morbidite oranı yüksektir. Ciltte yumru veya pembemsi leke olarak görünür (Lai vd., 2018).

SSC, ikinci en yaygın NMSC türüdür ve skuamöz ve skuamöz olmayan epitel dokular dahil olmak üzere epidermal keratinositlerden kaynaklanmaktadır (Roky vd., 2025). Pullu kırmızı ve sert yumru şeklinde ciltte belirginleşir (Ciążyńska vd., 2020). SSC oluşumundan sorumlu birkaç faktör vardır; açık ten rengi, yaşlanma, yanık izleri, bağışıklık baskılanması, kimyasal karsinojenler, UV ışınları ve genetik mutasyonlar en belirgin nedenleri arasında yer almaktadır (Samarasinghe & Madan, 2012).

1.3.2. Melanoma Kanseri

Melanom, melanositlerin malign transformasyonundan kaynaklanan agresif bir cilt kanseri türüdür. Melanositler epidermin bazal tabakasında bulunur. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 100.000 yeni vaka ile teşhis edilmektedir ve 8.000'den fazlası ölümle sonuçlanarak cilt kanserleri arasında en yüksek mortalite oranına sahiptir (Liguori vd., 2025). Son yıllarda melanom insidansı dünya genelinde belirgin bir artış göstermiş olup, bu durum küresel bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir (Ahmed vd., 2020).

Melanom, dünya genelinde tüm yeni tanı alan primer malignitelerin yaklaşık %1,7'sini oluşturmakta ve melanom kaynaklı ölümler tüm kanser mortalitesinin yaklaşık %0,7'sine karşılık gelmektedir (Guo vd., 2021). Tüm cilt kanseri hastalarında ölüm vakalarının %75'i tek başına kötü huylu melanomdan kaynaklanmaktadır (Hong vd., 2008). Melanomun alt tiplerinin dağılımı ve patogenezi mekanizmaları, etnik köken ve coğrafi faktörlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Özellikle açık ten rengine sahip bireylerde melanom insidansı koyu tenli bireylere göre anlamlı derecede yüksektir. Melanom gelişiminde rol oynayan başlıca risk faktörleri arasında ultraviyole (UV) ışınlarına maruziyet, vücutta bulunan ben sayısı, açık ten fenotipi ve aile öyküsünde melanom bulunması yer almaktadır. Güneş ışınlarına yoğun maruziyet, özellikle DNA hasarı, genetik mutasyonlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi ve oksidatif stres aracılığıyla melanom gelişimi tetiklenmektedir. Nitekim UV'ye bağlı genetik bozulmalar arasında en sık gözlemlenenler, *BRAF* ve *NRAS* gen mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar, hücrel profilerasyonun düzensizliğine ve malign transformasyona neden olarak melanomun patogeneziye katkı sağlar (Guo vd., 2021).

1.4. Cilt Kanseri İlerlemesinin Mekanizması

Cilt kanserinin gelişimi; normal cilt hücrelerinin kanserli hücrelere dönüşmesine yol açan genetik, moleküler ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Bu durum, cildin açıkta kalan bölgelerinin doğrudan UV radyasyonuna maruz kalması, immünojenik cilt sorunları, çeşitli nedenlerle oluşan DNA hasarı, cilt rengi, solaryum ve daha birçok nedenden kaynaklanabilir. Cilt kanserlerine neden olan çeşitli etiyolojik etkenler aşağıda detaylandırılmıştır.

1.4.1. UV Işınları

UV ışınları cilt kanserinin baskın temel nedenidir. Cilt kanseri vakalarının %80'inden fazlasından sorumludur (Jones vd., 2020). Üç tür UV radyasyonu vardır: UV-A, UV-B ve UV-C. UV-A ve UV-B, güneş ışığının bileşenlerinin çoğunluğunu oluşturur. UV-A diğer tiplere göre daha uzun bir dalga boyuna (320-400 nm) sahip olduğundan, dermise girebilir ve orada serbest radikaller üretebilir. Daha kısa bir dalga boyuna (290-320 nm) sahip olan UV-B epidermise girerek timin dimerlerinin sentezini indükleyebilmektedir. Hem UV-A hem de UV-B kanser gelişimini etkilemektedir, ancak UV-A kanser oluşumunda daha etkindir. UV ışınları apoptozu indükleyerek ve DNA onarım süreçlerini engellemek suretiyle DNA mutasyonlarına neden olmaktadır (Narayanan vd., 2010).

1.4.2. Ten Rengi

Cilt kanseri, farklı etnik gruplarda değişen oranlarda karşımıza çıkmaktadır. Kafkasyalılarda tüm neoplazmların yaklaşık %35-45'ini, Asyalılarda %2-4'ünü ve siyahilerde %1-2'sini oluşturmaktadır (Gloster & Neal, 2006). Epidermisteki melanin miktarı bu farklılığın temel nedenlerinden biridir. Beyaz Kafkasyalı cildi, hem melanom hem de melanom dışı cilt kanserleri açısından pigmentli ciltlere göre daha yüksek risk taşımaktadır. Bunun temelinde koyu tenli bireylerin epidermisinde yer alan daha büyük ve yoğun melanin içerikli melanozomların UV ışınlarını Kafkasyalıların daha küçük melanozomlarına kıyasla daha verimli absorbe etmesi ve dağıtması yatmaktadır. Bununla birlikte, tüm etnik gruplar genellikle benzer tedavi yaklaşımlarından faydalanmaktadır (Gloster & Neal, 2006).

1.4.3. İmmünojenik Morbidite

Bağıışıklık sisteminin baskılanması, günümüzde özellikle melanoma dışı cilt kanserleri için önemli bir predispozan faktördür (Howard vd., 2018). Organ nakli yapılan bireyler immün baskılayıcı tedavilere bağılı olarak genel popölasyona kıyasla yaklaşık %50 daha yüksek oranda cilt kanseri geliştirmekte ve daha agresif seyretmektedir (Howard vd., 2018). Bağıışıklık baskılayıcı ilaçların cilt karsinogenezini hızlandırdığı bilinmektedir (Schrom vd., 2020). Bu artışta, özellikle immün baskılayıcı tedavilerin T hücresi süpresyonu kritik rol oynamaktadır. Melanom hücreleri, bağıışıklık sistemi ile etkileşim halinde olup, proliferasyon ve metastaz süreçleri büyük ölçüde tümör mikroçevresi içerisindeki bağıışıklık hücrelerinin yanıtına bağılıdır. Tümörle ilişkili lenfositlerin sayısı, dağılımı ve bileşimi, metastaz riskini ve sağkalımını etkileyen önemli faktörlerdir (Fridman vd., 2012). Bu bağlamda, özellikle CD8+ ve CD4+ T hücrelerinin tümör çevresinde baskın olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, p16 ekspresyonunun azalması, makrofajların M2/M1 polarizasyon dengesi ve bağıışıklık kontrol noktaları gibi moleküller de prognozla ilişkili bulunmuştur (Madonna vd., 2018).

1.4.4. Kapalı Alanda Bronzlaşma

Kapalı alanda bronzlaşma, günümüzde yapay UV radyasyonunun en önemli kaynağıdır ve bu uygulamanın artan kullanımı hem melanom hem de melanom dışı cilt kanserlerinin gelişiminde önemli bir risk faktörü olarak öne çıkmaktadır (Schulman & Fisher, 2009). Gençler arasında solaryumun yaygınlaşması ise melanom vakalarının ve göz sağlığı sorunlarının artmasına neden olmaktadır (Seidenberg vd., 2015).

1.4.5. Yaş

Yaş, cilt kanseri oluşumunda en önemli belirleyici faktörlerden biridir. İleri yaş grubundaki bireylerin cilt kanserine yakalanma riski, genç ve orta yaş grubundaki kişilere kıyasla belirgin şekilde daha yüksektir. Yaşlanma, insanlarda zaman içerisinde ortaya çıkan psikolojik sosyal ve fiziksel değışikliklerin yanı sıra; biyolojik düzeyde de birikimsel etkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle yaşlanma, kanser dahil olmak üzere birçok hastalık için en güçlü risk faktörlerinden biri olarak tanımlanmaktadır.

Moleküler düzeyde, hücreler birkaç nesil replikasyonun ardından giderek daha fazla somatik mutasyon biriktirme eğilimindedir. Bu birikim, DNA tamir mekanizmalarının zayıflamasıyla birleştiğinde, hücrelerin kontrolsüz büyümesine ve malign transformasyona yol açabilmektedir (Ribero vd., 2018).

1.5. Melanoma Kanseri Genetik Temeli

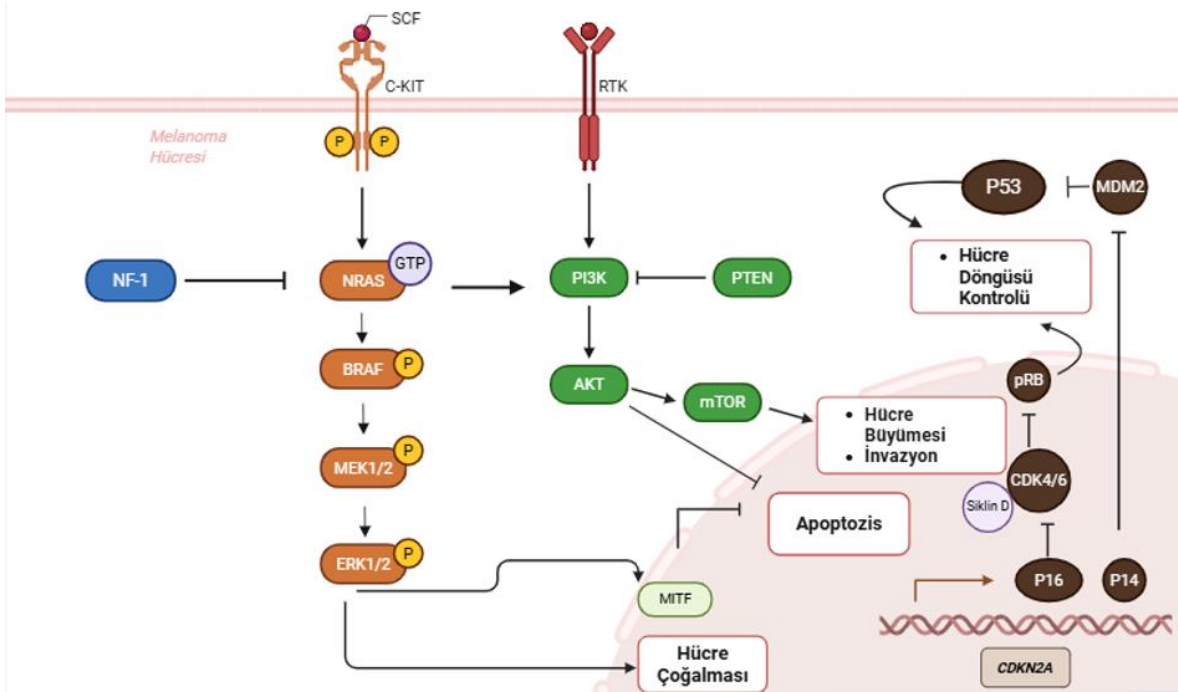
Melanom karsinogenezinin gelişimi ile alakalı olarak; mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolu, protein kinaz B (AKT) yolu, p53 yolu, hücre döngüsü düzenleyici mekanizmalar ve epigenetik faktörler dahil olmak üzere birçok sinyal yolağı ile ilişkili gen mutasyonları tanımlanmıştır (Şekil 4) (Diazzi vd., 2023; Guo vd., 2021). Bu sinyal yolları, hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma ve genetik stabilite gibi temel biyolojik süreçleri düzenlemektedir. Özellikle MAPK yolu, melanom dahil pek çok kanser türünde, tümör hücresinin hızlı ve kontrolsüz proliferasyonunu desteklemek amacıyla sıkça aktive edilir. Melanomda bu yolun aktifleşmesinde rol alan başlıca genler *BRAF*, *NRAS*, *NF1* ve *KIT* olarak tanımlanmıştır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, MAPK sinyal yolunun hiperaktivasyonu ile sonuçlanmakta ve tümör hücrelerinin büyümesini tetiklemektedir. Melanom hastalarının yaklaşık %50'sinde *BRAF*, %25'inde ise *NRAS* mutasyonları tespit edilmiştir (Wellbrock & Arozarena, 2016). *BRAF*, Raf kinaz ailesine ait bir serin/treonin kinaz olup, MAPK yolundaki sinyal iletiminde önemli bir role sahiptir. Diğer yandan *NRAS*, Ras ailesine ait GTP bağlayıcı bir onkogen olup, hücre içi sinyal iletiminde anahtar görev görmektedir (Diazzi vd., 2023; Guo vd., 2021).

NF1 (Neurofibromin 1) ise bir tümör baskılayıcı gen olup, melanom hastalarının %12-30'unda mutasyona uğramaktadır. Bu oranlar, *NF1*'i melanomda *BRAF* ve *NRAS*'tan sonra en sık mutasyona uğrayan üçüncü gen konumuna getirmektedir. NF1 proteini, NRAS aktivitesini negatif yönde düzenleyerek MAPK yolunun aşırı aktivasyonunu baskılayan bir tümör baskılayıcı mekanizma görevi görür (Kiuru & Busam, 2017; Olbryt, 2022).

Melanom gelişiminde en belirgin biyolojik özelliklerden biri, hücre döngüsünün kontrolsüz şekilde ilerlemesidir. Özellikle siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A), retinoblastoma ile ilişkili protein (RB) ve siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK4/6) gibi hücre döngüsünü düzenleyen genlerin mutasyona uğraması, melanom karsinogenezinde sık karşılaşılan bir durumdur. *CDKN2A*, hücre döngüsünde G1/S geçişini kontrol eden p16INK4a ve p14ARF proteinlerini kodlayarak hem RB hem de p53 yollarını regüle

etmektedir. CDKN2A'nın işlev kaybı, hücre döngüsünün durdurulamamasına neden olarak hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına zemin hazırlar (L. Xu vd., 2019). Hücre döngüsü düzenlenmesinde rol olan diğer bir faktör mikrofalmlı ile ilişkili transkripsiyon faktörüdür (MITF). MITF, melanositlerin gelişimi ve çoğalmasında rol alan önemli bir düzenleyicidir. *MITF* genindeki mutasyon melanom hücrelerinin kötü huylu gelişmesinde büyük ölçüde rol oynamaktadır (Guo vd., 2021; Vidwans vd., 2011). Benzer şekilde, tümör baskılayıcı gen olan *TP53* tarafından kodlanan p53 proteini, DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünü durdurarak tamir mekanizmalarına zaman kazandırır veya apoptoz mekanizmalarını aktive eder. Ancak melanomda, p53 yolunun ekspresyon seviyesinin azalarak hücre döngüsünün kontrolsüz ilerlemesine katkı sağladığı gösterilmiştir (Guo vd., 2021).

Melanom karsinogenezinde aynı zamanda transkripsiyonel sinyal yollarının bozulması da tümör gelişimi ve metastaz sürecine önemli katkı sağlamaktadır. Bu bağlamda özellikle dikkat çeken yollardan biri, evrimsel olarak oldukça korunmuş olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağıdır. Wnt sinyali embriyonik gelişim, doku rejenerasyonu, proliferasyon, farklılaşma ve homeostaz gibi temel biyolojik süreçlerde kritik rol oynar. Melanomda, Wnt/ β -katenin yolunun sürekli ve düzensiz aktivasyonu, hücre proliferasyonunun artmasına, farklılaşma süreçlerinin bozulmasına ve özellikle tümör hücrelerinin invaziv metastatik kapasitesinin artmasına neden olmaktadır (Gajos-Michniewicz & Czyz, 2020; Zhan vd., 2017).



Şekil 4. Melanomada rol oynayan 3 önemli sinyal yolağı; MAPK yolu (turuncu), PI3K/AKT yolu (yeşil) ve CDK4/6-p53 (kahverengi)

1.5.1. Melanoma Kanseri Tedavi Yöntemleri

Metastatik melanom tedavisinde, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan başlıca tedavi ajanları; dakarbazin temelli kemoterapiler ile yüksek doz interlökin-2 (IL-2) uygulamalarıdır. Bununla birlikte, adjuvan tedavi amacıyla interferon alfa-2b (IFN- α 2b) de klinik kullanıma sunulmuştur. Ancak bu ajanların ciddi sistemik toksisiteleri, sınırlı klinik etkinlikleri ve tedaviye düşük yanıt oranları nedeniyle kullanımları zamanla azalmış ve yerlerini daha hedefli tedavi yaklaşımlarına bırakmıştır (Di Trollo vd., 2015; Guo vd., 2021).

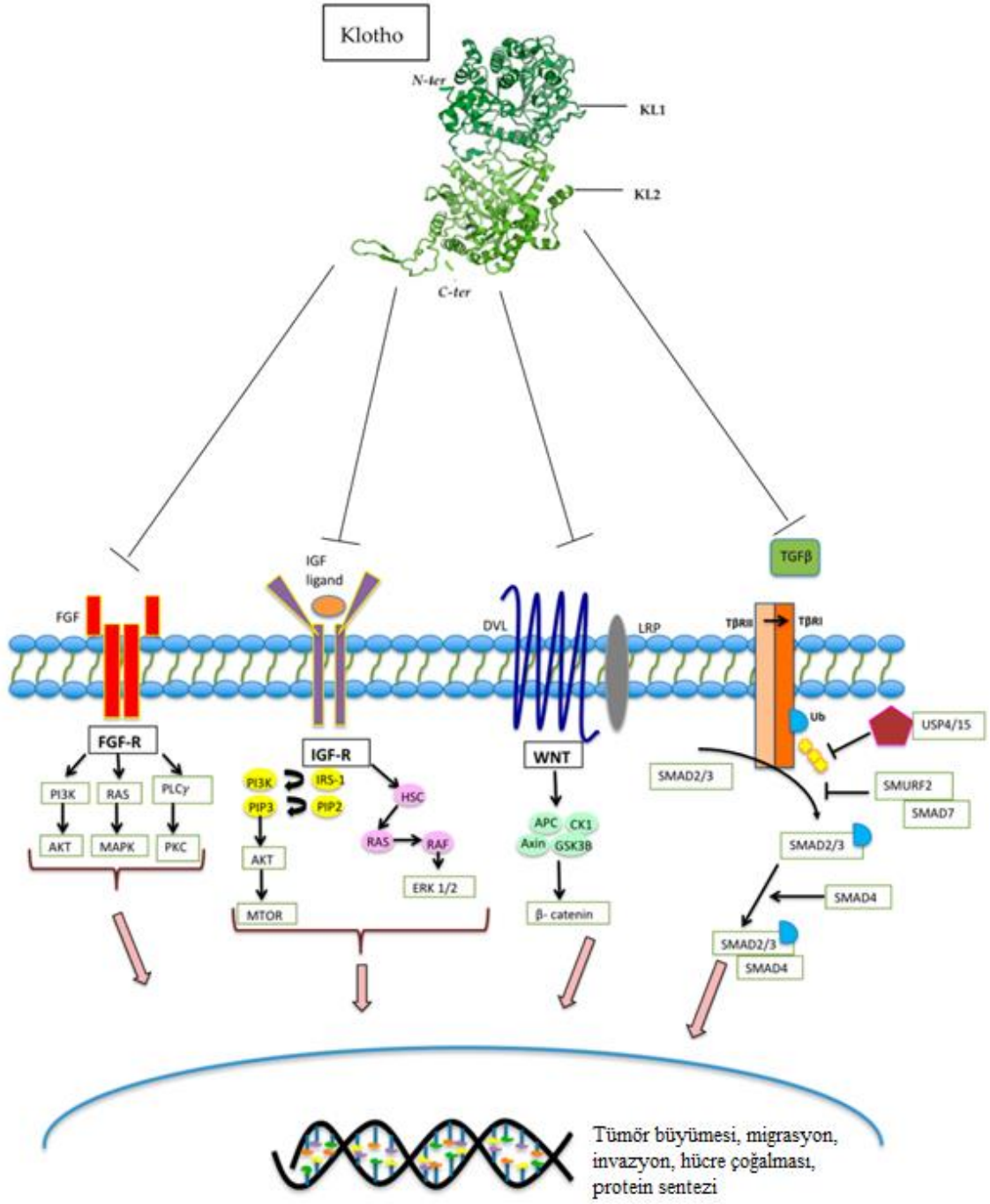
Melanom tedavisinde 2010 yılından itibaren devrim niteliğinde gelişmeler yaşanmış ve FDA tarafından bir dizi immünoterapötik ve hedefe yönelik ajan onaylanmıştır. Bu ajanlar arasında; sitotoksik T-lenfosit protein-4 (CTLA-4) inhibitörü ipilimumab, antimetastatik programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1) inhibitörleri olan nivolumab ve pembrolizumab gibi immün kontrol noktası inhibitörleri öne çıkmıştır. CD152 olarak bilinen CTLA-4, aktive olmuş T hücrelerinin yüzeyinde bulunan ve B7'nin CD28'e bağlanmasını engelleyen bir inhibitör moleküldür. CTLA-4, lenf düğümlerindeki naif T hücresi aktivasyonunun başlangıç aşamasını durdurma işlevi görür ve T hücresi yanıtlarının azalmasında etkilidir. İpilimumab gibi Anti-CTLA-4 antikorları, CTLA-4 bağlanmasını

bloke etmek ve T hücresi fonksiyonunun inhibisyonunu önlemek üzere tasarlanmıştır (Sivanandam vd., 2019). Ayrıca, ipilimumab ile nivolumab kombinasyonları, daha yüksek yanıt oranları sunması nedeniyle ileri evre melanom tedavisinde tercih edilen protokoller arasına girmiştir (Guo vd., 2021; Muto vd., 2025).

Hedefe yönelik tedaviler kapsamında ise, özellikle BRAF V600E mutasyonlarına sahip melanom hastalarında etkili olduğu gösterilen BRAF inhibitörleri (vemurafenib, dabrafenib) ve MEK (mitogenle aktive edilen protein kinaz kinaz-MAPKK) inhibitörü trametinib gibi ajanlar klinik kullanıma girmiştir. Bu modern terapötik ajanlar, melanom hastalarının sağkalım süresini anlamlı düzeyde artırmış ve tümör kontrolünde olumlu sonuçlar vermiştir. Ancak tüm bu gelişmelere rağmen, düşük yanıt oranları ve zaman içinde gelişen tedavi direnci, hastaların uzun vadeli iyileşme potansiyelini sınırlamaktadır. Bu nedenle, mevcut tedavi yaklaşımlarının optimize edilmesi, yeni terapötik kombinasyonların geliştirilmesi ve alternatif tedavi hedeflerinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir (Guo vd., 2021).

1.6. Salgılanan Klotho ve Kanser Hücresinde Etkilediği Gen Yolakları

Yapılan çeşitli çalışmalar, *Klotho* gen ekspresyonunun birçok malign tümör tipinde anlamlı düzeyde azaldığını ortaya koymuştur. Özellikle akciğer, kolorektal, pankreas, meme ve yumurtalık kanserlerinde, malign doku örneklerinde *Klotho* ekspresyonunun, sağlıklı dokuya kıyasla belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir (Sachdeva vd., 2020). Bu durum, *Klotho*'nun tümör baskılayıcı özelliklerini desteklemektedir (Şekil 5) (Sachdeva vd., 2020).



Şekil 5. α -Klotho proteininin etkilediği sinyal yolları (Sachdeva vd., 2020)

1.7. Klotho ve Melanoma Kanseri

Camilli ve arkadaşlarının yamış oldukları bir çalışmada, UACC903, M93-047 ve G361 melanoma hücre hatları kullanılarak rekombinant klotho proteininin etkileri araştırılmıştır. Bahsi geçen çalışmada, melanoma hücrelerine rekombinant klotho proteini uygulanması sonucunda WNT-5A protein ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığı ve buna bağlı olarak Wnt sinyal yolunun aktivitesinin baskılandığı gösterilmiştir (Camilli vd., 2011).

Ayrıca, bu üç farklı hücre hattında *Kl* gen ekspresyon seviyeleri kantitatif PCR (qPCR) yöntemi ile analiz edilmiştir. Klotho mRNA düzeylerinin, hem UACC903 hem de M93-047 hücrelerinde, G361 hücre hattına kıyasla daha düşük seviyede olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, klotho proteininin melanoma hücrelerinde normal hücrelere kıyasla daha az ifade edildiğini ve ekspresyon seviyelerinin WNT-5A ekspresyonu ile ters orantılı olduğunu ortaya koymuştur (Camilli vd., 2011).

1.8. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, çeşitli kanser türleri için antikanserojenik etkileri literatürde tanımlanmış insan Klotho (hKL) proteininin, insan malign melanom hücre hattı (VMM917) üzerindeki potansiyel antitümör etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Klotho proteininin, melanoma hücrelerinin proliferasyonu, canlılığı ve hücre döngüsü üzerindeki olası düzenleyici etkilerinin *in vitro* koşullarda değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada elde edilen verilerin güvenilirliğini ve biyolojik anlamlılığını artırmak amacıyla, sağlıklı insan epidermal keratinosit hücre hattı HaCaT, kontrol hücre modeli olarak kullanılmıştır. Bu sayede, hKL proteininin kanserli ve sağlıklı hücreler üzerindeki farklı etkileri karşılaştırılmalı olarak incelenerek hücreye özgü yanıt profillerinin ortaya konması hedeflenmiştir.

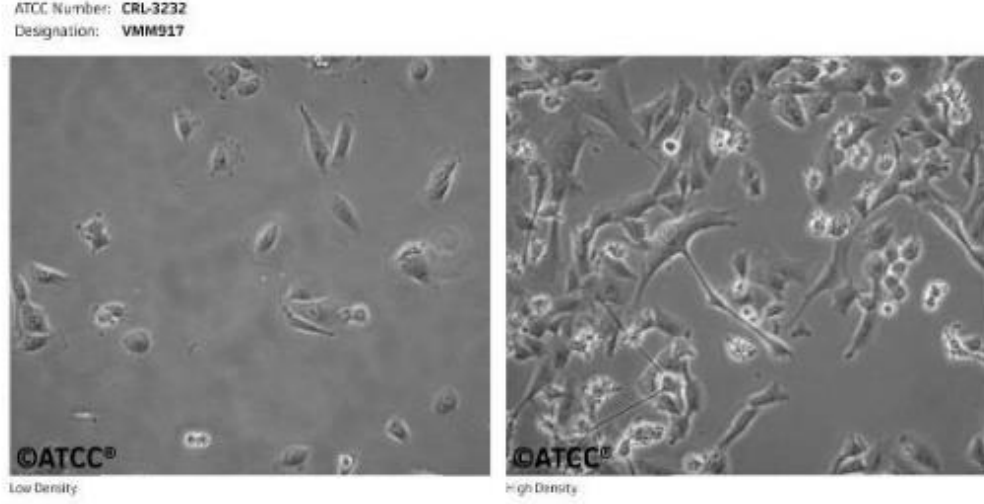
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Deri Hücre Hatlarının Sıvı Azottan Çıkartılarak Kültür Edilmesi

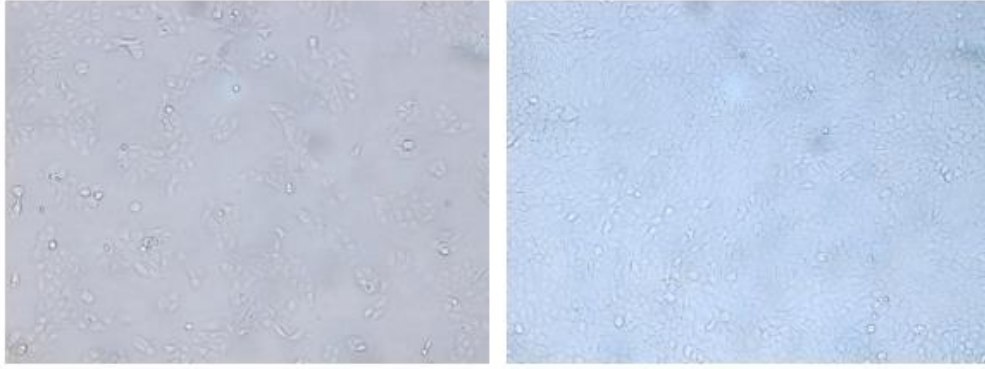
Çalışmanın amacına hizmet edecek deneysel süreçler için, sıvı azot içerisinde muhafaza edilen VMM917 ve HaCaT hücre hatları kullanılmıştır (Şekil 5 ve Şekil 6). VMM917 hücre hattı Karadeniz Teknik Üniversitesi Maçka Meslek Yüksekokulunda görev yapmakta olan Doç. Dr. Elif Ayazoğlu'dan; HaCaT hücre hattı ise Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalında görev yapmakta olan Doç. Dr. Tuba Dinçer'den temin edilmiştir. Çalışmaların başlangıcında, VMM917 ve HaCaT hücreleri, 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürülmüştür. Çözünmenin hemen sonrasında hücre süspansiyonuna, 4 mL taze besiyeri (Tablo 1) ilave edilerek homojenize edilmiş ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış ve elde edilen hücre peleti 1 ml besiyeri ile çözülerek T75 yüzey alanına sahip kültür kabına aktarılmıştır. Son hacim besiyeri ile 10 mL'ye tamamlanarak kültür ortamı hazırlanmıştır. Hücreler, %5 CO₂ içeren 37 °C'deki etüvde inkübe edilmiştir. Hücre morfolojileri belirli aralıklarla ters (inverted) mikroskop altında gözlemlenmiştir (Şekil 6 ve Şekil 7).

Tablo 1. Hücre hatları için besiyeri içeriği

VMM917	HaCaT
%79 RPMI	%79 DMEM
%20 FBS	%20 FBS
%1 PS	%1 PS



Şekil 6. VMM917 hücre hattı 40X mikroskop görüntüleri



Şekil 7. HaCaT hücre hattı 10X mikroskop görüntüleri

2.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin proliferasyonunun maksimum oranda gerçekleştiği durumda, T75 kültür kabının yüzeyini tamamen kaplaması ile birlikte, hücreler arasındaki temas artar ve kontakt inhibisyon nedeniyle çoğalma hızları azalmaya başlar. Bu durum hücrelerin strese girmesine ve ölümlerinin başlamasına yol açar. Bu nedenle, hücrelerin sağlıklı büyüme ortamlarının korunabilmesi amacıyla belirli aralıklarla yeni kültür kaplarına aktarılması (pasajlanması) gerekmektedir.

Bu bağlamda pasajlama işlemi için öncelikle hücrelerin bulunduğu kültür ortamındaki besiyeri dikkatlice uzaklaştırılmış, ardından hücre kalıntılarının temizlenmesi ve enzimatik ayrışmanın daha etkin olması için hücreler, 4 mL PBS (fosfat tamponlu salin) solüsyonu ile

yıkanmıştır. Daha sonra kültür kabı tabanına tutunmuş hücrelerin ayrıştırılabilmesi amacıyla 1 mL 1×Trypsin-EDTA çözeltisi hücrelerin üzerine eklenmiş ve hücreler 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren inkübatörde 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, hücrelerin tabandan ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskop altında gözlemlenmiş; hücrelerin yüzeyden tamamen ayrıldığı tespit edildikten sonra 2 mL FBS içeren besiyeri eklenerek trypsin inaktive edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, 230 xg’de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pelleti, 1 mL taze besiyeri ile çözölmüş ve homojen hale getirilen süspansiyon, Thoma lamı kullanılarak sayılmıştır. Elde edilen hücre sayısı doğrultusunda 300.000 hücre yeni kültür kabına ekilmiştir. Bu işlemler, hücrelerin sağlıklı proliferasyonunun devam ettirilmesi ve deneysel uygulamalarda kullanılabilir durumda olmalarının sağlanması amacıyla düzenli olarak tekrarlanmıştır.

2.3. Hücrelerin Dondurulması

Deneysel uygulamaların sürdürülebilirliği amacıyla elde edilen hücrelerin bir kısmı stoklanmıştır. Bunun için hücreler, dondurma medyası ile süspanse edilmiştir (Tablo 2). Steril kriyojenik tüplere aktarılan hücreler, önce -80 °C dondurucuda kademeli olarak soğutularak, daha sonra uzun süreli saklama amacıyla sıvı azot tankına transfer edilerek depolanmıştır.

Tablo 2. Hücre dondurma medyası içeriği

VMM917	HaCaT
%49 RPMI	%49 DMEM
%40 FBS	%40 FBS
%10 DMSO	%10 DMSO
%1 PS	%1 PS

2.4. Rekombinant α -Klotho Proteininin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılacak olan rekombinant insan α -Klotho proteini ticari olarak temin edilmiş (PEPROTECH, Cat No:100-53) ve üretici firmanın önerdiği protokol

doğrultusunda hazırlanarak 1 µg/mL ana stok oluşturulmuştur. Hazırlama işlemi sırasında, proteinin stabilitesini ve biyolojik aktivitesini koruyabilmek amacıyla %0,1 oranında Bovine Serum Albumin (BSA) içeren çözeltiden faydalanılmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler, kontaminasyon riskine karşı steril şartlar altında hazırlanarak, ileride yapılacak dozaj uygulamalarında kullanılmak üzere -20 °C’de saklanılmıştır.

2.5. hKL Proteininin VMM917 ve HaCaT Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin MTT Hücre Canlılık Testi ile Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, rekombinant insan klotho (hKL) proteininin melanoma hücre hattı (VMM917) ve normal insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) üzerindeki olası sitotoksik etkisi, hücre canlılık oranını ölçmeye yönelik olarak yaygın şekilde kullanılan MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi ile değerlendirilmiştir. MTT testi, hücrelerdeki mitokondriyal aktiviteyi temel alarak hücre canlılık oranını belirlemede etkin bir yöntemdir. Canlı hücreler MTT’yi çözünmeyen formazana dönüştürür, bu da spektrofotometrik olarak ölçülebilir bir renk değişimini tetikler.

hKL proteini, farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 ng/mL) VMM917 ve HaCaT hücrelerine uygulanarak hücre canlılık üzerindeki etkisi test edilmiştir.

- Deneyler her bir hücre hattı (VMM917 ve HaCaT) için üç deney içi tekrar olacak şekilde ve iki farklı inkübasyon süresi (48 saat ve 72 saat) dikkate alınarak 96 kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir.
- Her kuyucuğa 15.000 hücre içeren 200 µL hücre süspansiyonu eklenmiştir.
- Hücrelerin tabana tutunmaları ve adezyonlarının sağlanabilmesi amacıyla kültür kapları, %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin yaklaşık %80 konfluent olması beklenmiştir.
- Hücreler %80 konflüente ulaştığında, her kuyucuğa artan dozlarda hKL proteini (0, 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 ng/ml) içeren besiyeri eklenmiştir.
- Uygulama sonrası hücre morfolojileri inverted mikroskop ile gözlemlenmiş ve her kuyucuk fotoğraf ile belgelenmiştir.
- Kültür kapları 48 ve 72 saat boyunca 37 °C’de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

- 72 saatlik inkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyalar uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa 130 µL taze besiyeri + 10 µL 5 mg/mL MTT çözeltisi içeren besiyeri karışımı eklenmiştir.
- Hücreler 4 saat 37 °C’de inkübe edildikten sonra MTT içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 200 µL DMSO eklenmiştir.
- Hücre plakaları oda sıcaklığında, gece boyunca 120 rpm’de çalkalanan sallayıcıya yerleştirilmiştir.
- Ertesi gün, mikropleyt kuyucuklarında oluşan renk değişimlerinin 590 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiş ve absorbans değerleri kaydedilmiştir.
- Elde edilen absorbans değerleri normalize edilerek % hücre canlılığı hesaplanmıştır.

2.6. MTT Sonuçlarının SPSS Analizi

Elde edilen hücre canlılığı verileri, istatistiksel analiz için SPSS yazılımına aktarılmıştır. hKL proteininin farklı dozlar ve inkübasyon süreleri boyunca hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek amacıyla tek yönlü varyans analizi (UNIANOVA) testi uygulanmıştır. Bu analizle hem bağımsız değişkenlerin (doz ve zaman) hem de bu değişkenler arası etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir.

2.7. hKL Proteininin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Analizi

Bu deney kapsamında, hKL proteininin VMM917 ve HaCaT hücre hatlarında hücre döngüsü üzerindeki etkisi Propidium Iodide (PI) (Elabscience Ref #E-CK-A161) boyama yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu bağlamda, hKL muamelesi sonrası deri hücrelerinin belirli fazlarda (G0/G1, S, G2/M) nasıl konumlandığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için hücre döngüsü analizleri, BD Accuri C6 Plus Sitometri (BD Biosciences) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneysel analiz için, MTT analizi sonuçlarına göre sitotoksik etkinin en yüksek olduğu 72. saat, 800 ng/mL doz hKL muamelesi örnekleri kullanılmıştır. İlgili deneysel süreçlerin detayları aşağıda listelenmiştir:

- VMM917 ve HaCaT hücre hatları T-25 kültür kaplarına her biri için 1.5×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir.

- Hücreler 24 saat boyunca 37 °C’de inkübe edilerek tabana tutunmaları ve çoğalmaları sağlanmıştır.
- İnkübasyon sonrası, kültür kaplarındaki eski kültür besiyeri uzaklaştırılmış ve 3 mL PBS ile yıkanmıştır.
- Yıkama işleminin ardından, hücreler 800 ng/mL hKL proteini içeren 2 mL taze besiyeri ile muamele edilerek 72 saat inkübe edilmiştir.
- Kontrol grubu ise, hKL içermeyen besiyeri ile aynı koşullarda inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda hücreler tripsin-EDTA çözeltisi ile tripsinize edilmiş, hücre süspansiyonları 15 mL’lik steril santrifüj tüplere aktarılmıştır.
- Her tüpe 3 mL PBS eklenmiş ve 230 xg’de 5 dk santrifüj edilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Elde edilen hücre pelletleri 500 µL soğuk %70 etanol ile karıştırılarak 4 °C’de gece boyunca fikse edilmiştir.
- Ertesi gün, hücreler 1000 rpm’de 15 dk santrifüj edilerek etanol ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Hücre pelletleri 500 µL PBS ile yıkanmış ve 700 rpm’de 15 dk santrifüj edilerek PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Pelletler, 50 µL RNaz A (100 µg/ml) ile muamele edilerek 30 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir.
- RNaz uygulaması sonrası hücreler tekrar 700 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Her bir örnek tüpe, 50 µL PI (50 µg/ml) çözeltisi ilave edilerek hücreler 4 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Boyama sonrası hücreler 700 rpm’de santrifüj edilmiş ve 500 µL PBS ile yıkanmıştır.
- Yıkama işlemi yapıldıktan sonra tekrar 500 µL PBS ile süspanse edilmiştir.
- Boyanan hücre süspansiyonları akım sitometri cihazına yüklenmiş ve her örnek için minimum 10.000 hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

2.7.1. Akım Sitometrisi Verilerinin Analizi

Elde edilen hücre döngüsü verileri Modfit Verity (Version 6.0) yazılımına aktararak, kantitatif analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.8. Toplam RNA İzolasyonu

Bu çalışmada, VMM917 ve HaCaT hücrelerinden toplam RNA izolasyonu, TRIzol reaktifi (*Thermo Scientific, Inc*, Katolog No: 15596-026) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonunda RNA'nın bütünlüğünü korumaya yönelik olarak izolasyon süreçleri, yüksek sanitasyon ve hassasiyet gözetilerek yürütülmüştür.

- RNA izolasyonuna başlanmadan önce, ilgili hücre hatları, hücre döngüsü analizinde uygulanan kültür koşullarına benzer şekilde T-25 kültür kaplarında kültüre edilmiş ve 37 °C, %5 CO₂ içeren etüvde 72 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda, hücreler tripsinize edilerek kültür kabı yüzeyinden ayrılmış ve 15 ml'lik steril tüplere aktarılmıştır.
- Hücre süspansiyonları, 230 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve kirli süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Hücre pelletlerinin üzerine 3 mL PBS eklenerek hücreler yıkanmış, ardından tekrar 230 xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Üst faz (süpernatant) dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra, hücre pelletinin üzerine 1 mL TRIzol reaktifi eklenmiş ve pipetaj ile hücrelerin tamamen lizis olması sağlanmıştır.
- Elde edilen lizat, RNA izolasyonu işlemi için 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- TRIzol ile lizis edilen hücre süspansiyonlarının her birine 200 µL saf kloroform ilave edilmiş, tüpler 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalanmış ve oda sıcaklığında 3 dk bekletilmiştir.
- Ardından tüpler 16.0000 xg'de 15 dakika, 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- Bu işlem sonucunda RNA'yı içeren üst faz dikkatlice pipetlenerek yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- RNA'nın çöktürülmesi amacıyla 500 µL %100 izopropanol eklenmiş ve 1 saat -20 °C'de bekletilmiştir.
- Ardından, örnekler 16.000 xg'de 20 dakika 4 °C'de santrifüj edilerek RNA'ların çöktürülmesi indüklenmiştir.
- Üst faz atılmış ve RNA pelleti üzerine 1 mL %75 etanol eklenerek yıkamaları gerçekleştirilmiş ve alt-üst yapılarak karıştırılmıştır.

- Tüpler, 16.000 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır.
- Yıkama işlemi sonrası, tüpler kısa süre ters çevrilerek ağzı açık şekilde 37 °C'ye kaldırılmış ve etanolün buharlaşması sağlanmıştır.
- Kurutulan RNA pelletleri, 10 µL RNAaz içermeyen su ile çözülmüştür.
- Elde edilen toplam RNA örnekleri, -20 °C'de saklanmak üzere etiketlenmiş ve stoklanmıştır.

2.8.1. RNA Kalite ve Konsantrasyon Analizi

- İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, NanoDrop spektrofotometresi (*Thermo Scientific*TM) ile 260/280 nm ve 260/230 nm oranlarında ölçülmüştür.
- 260/280 oranı 1,8-2,0 aralığında olan örnekler yüksek saflıkta kabul edilerek %1 agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır.

2.9. cDNA Sentezi

Toplam RNA izolasyonunun ardından, örneklerdeki gen ekspresyonu analizi için komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem üretici firmanın protokolüne uygun olarak yüksek verimli ters transkriptaz enzimi içeren ticari bir cDNA sentez kiti (A.B.T, Katolog No #C01-01-20) kullanılarak yürütülmüştür.

- Her bir örnek için reaksiyon karışımı Tablo 3'te belirtilmiştir.

Tablo 3. cDNA sentez reaksiyon içeriği

Bileşen	Miktar
Total RNA	4 µg olacak şekilde hesaplanıp eklenmiştir.
Oligo dT primer (50 µM)	1,0 µL
dNTP karışımı (2,5 mM)	1,0 µL
RNaz içermeyen su	Toplam hacim 10 µL olacak şekilde eklenmiştir.

- Tüpler 65 °C'de 5 dakika ısıtılarak RNA'nın ikincil yapıları denatüre edilmiş ve ardından hızlıca buz üzerinde soğutulmuştur.

- Soğutulan karışıma Tablo 4'te yer alan bileşenler ilave edilmiştir.

Tablo 4. cDNA sentezi 2. adımda eklenen bileşenler

Eklenen Reaktif	Miktar
10X Reaksiyon Tamponu	2 µL
RNaz İnhibitörü (40 U/µL)	0,5 µL
Ters Transkriptaz Enzimi (200 U/µL)	1,0 µL
DTT (100 mM)	1,0 µL
RNaz içermeyen su	Toplam hacim 20 µL olacak şekilde eklenmiştir.

Reaksiyon tüpleri Tablo 5'te belirtilen koşullarda PCR cihazına yerleştirilmiştir.

Tablo 5. PCR koşulları

Adım	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	42 °C	60 dk
2	1	70 °C	10 dk
3	41	4 °C	∞

- İnkübasyon süreci sonunda elde edilmiş cDNA'lar, sonraki qPCR analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de stoklanmıştır.

2.10. Gerçek Zamanlı PCR ile Gen Ekspresyon Analizi

Bu aşamada, hKL proteini ile muamele edilmiş VMM917 ve HaCaT hücre hatlarında belirli genlerin ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı kantitatif PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu deney için GoTaq Master Mix (Katolog No#A6001, *Promega Inc*) ve CFX Connect™ real-time cihazı (*BIORAD, Inc*) kullanılmıştır. Deney kapsamında, 72. Saat, 800 ng/mL doz hKL uygulaması sonrası hücreler kullanılmıştır.

2.10.1. Kullanılan Primerler

qPCR analizi esnasında, hKL uygulaması sonrası belirli genlerin ekspresyon analizini hedefleyen çalışma kapsamında kullanılacak hedef genler, *BRAF*, *NRAS*, *NF-1*, *CDK4*, *TP53* ve *MITF* olarak belirlenmiştir. Referans gen olarak β -Aktin geni kontrol grubu olarak kullanılmıştır. qPCR analizi için belirlenmiş hedef genlere özgü olarak dizayn edilmiş ve akabinde sentezlenmiş olan gen-spesifik primer dizileri Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. qPCR analizinde kullanılan primer dizileri

Gen Adı	Primer Dizisi (5'→3')
<i>BRAF</i>	F: TGAAAACACTTGGTAGACGGG
<i>BRAF</i>	R: CATTTCCTACTGCCACATCACC
<i>NRAS</i>	F: AATACATGAGGACAGGCGAAG
<i>NRAS</i>	R: GTTTCCTACTAGCACCATAGG
<i>NF-1</i>	F: TCCCACATCTCCTTACCCTC
<i>NF-1</i>	R: GTTCTCCTTGTCGATTCCTGG
<i>MITF</i>	F: AGAGTGTGGATTCATTTTCAGGG
<i>MITF</i>	R: ACCCCGAGTTACAATTCTGC
<i>CDK4</i>	F: TTCGTGAGGTGGCTTTACTG
<i>CDK4</i>	R: TCTACATGCTCAAACACCAGG
<i>TP53</i>	F: CCAGCCAAAGAAGAAACCAC
<i>TP53</i>	R: TGAGTTCCAAGGCCTCATTC

2.10.2. Reaksiyon Koşulları

qPCR deneysel süreçlerini her bir örnek için tatbik etmek maksadıyla, Tablo 7’de belirtilmiş reaksiyon karışımları oluşturulmuştur.

Tablo 7. qPCR reaksiyon koşulları

Eklenen Reaktif	Miktar (µL)
qPCR Master Mix	10 µL
Forward Primer	1 µL (500 µM)
Revers Primer	1 µL (500 µM)
cDNA Örneği	0,5 µL (100 ng)
Nükleaz İçermeyen Su	7,5 µL

2.10.3. Termal Döngü Koşulları

PCR reaksiyon karışımları oluşturulduktan sonra, reaksiyon pleytinin üzeri yapışkan plastik membran kapatılarak mühürlenmiş ve aşağıda detayları belirtilmiş koşullar altında qPCR reaksiyon analizleri tatbik edilmiştir (Tablo 8).

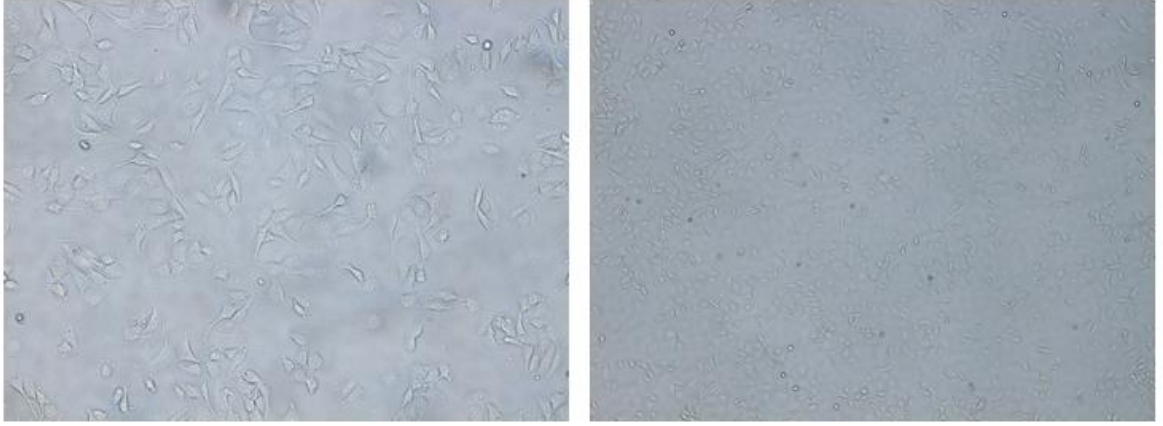
Tablo 8. qPCR sentezi termal döngü programı

Adım	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Polimeraz Enzim Aktivasyonu	1	95 °C	2 dk
Denatürasyon	40	95 °C	15 sn
Bağlanma ve Uzama	40	60 °C	1 sn

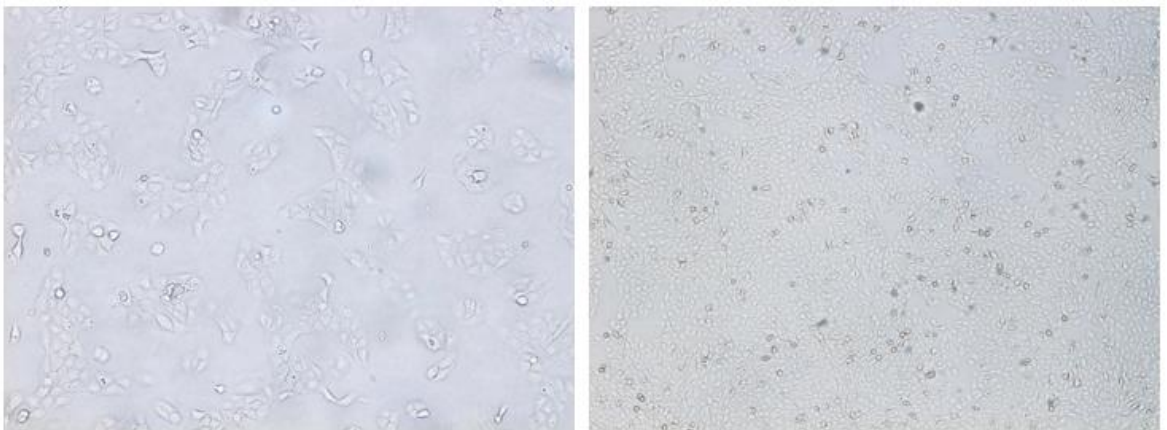
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. VMM917 ve HaCaT Hücre Hatlarının Kültür Edilmesi

Çalışmada, laboratuvar stoklarında sıvı azot içerisinde muhafazası gerçekleştirilmiş VMM917 ve HaCaT hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücreler, tüm deneysel uygulamalarda kullanılmak üzere pasajlanmış ve kültür süreci boyunca morfolojik özellikleri inverted mikroskop altında düzenli olarak gözlemlenmiştir (Şekil 8 ve 9)



Şekil 8. VMM917 hücre hattının kültürdeki morfolojisi (Inverted mikroskop, 10X ve 5X)



Şekil 9. HaCaT hücre hattının kültürdeki morfolojisi (Inverted mikroskop, 10X ve 5X)

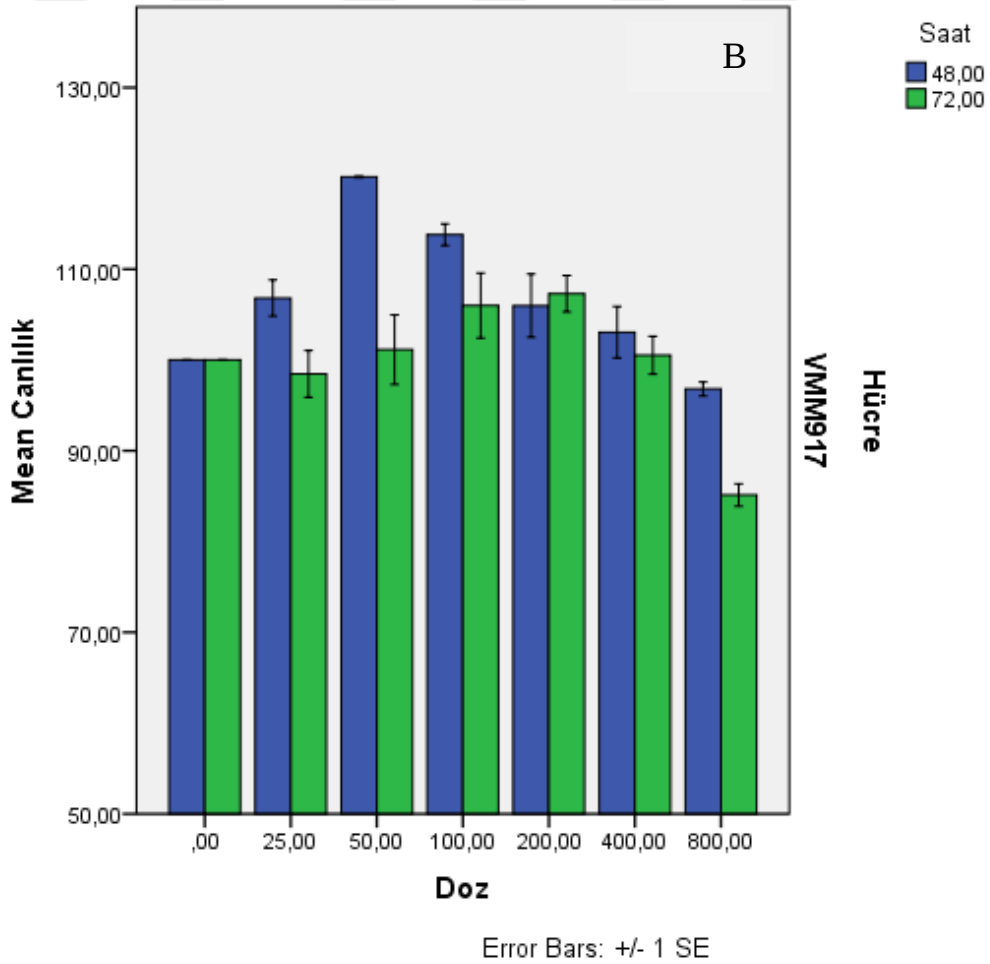
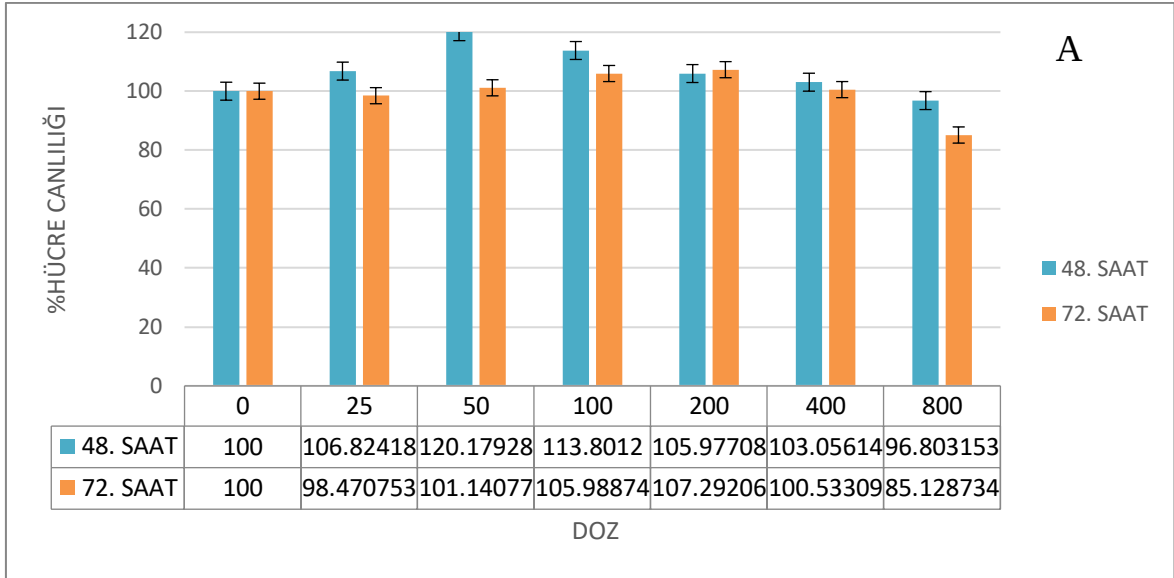
3.2. Sitotoksik Etkinin MTT Aracılı SPSS Analizi ile Değerlendirilmesi

Klotho proteininin hücrelerdeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla, bölüm 2.5'te belirtilmiş şartlar altında insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) ve insan malign melanom hücre hattı (VMM917) farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 ng/ml) hazırlanmış hKL proteinine maruz bırakılmış; hücre canlılıkları MTT testi ile 48. ve 72. saatlerde değerlendirilmiştir. Her bir grup için 3 deney içi tekrar ile analizler gerçekleştirilmiştir.

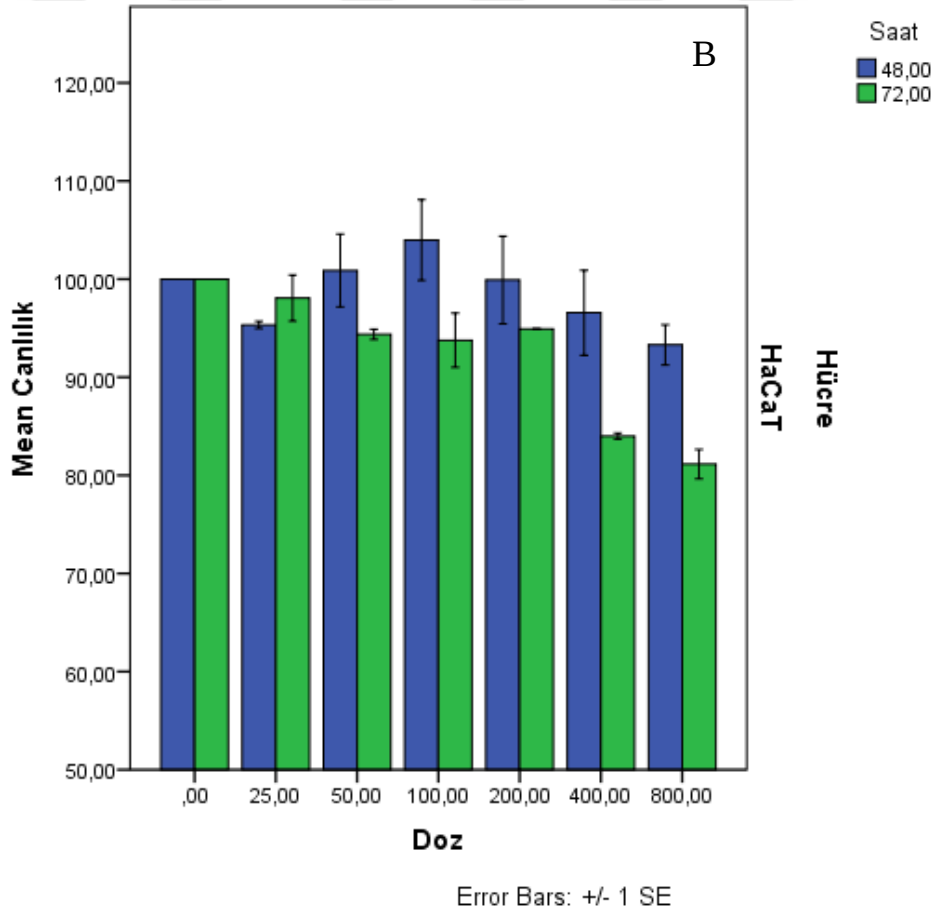
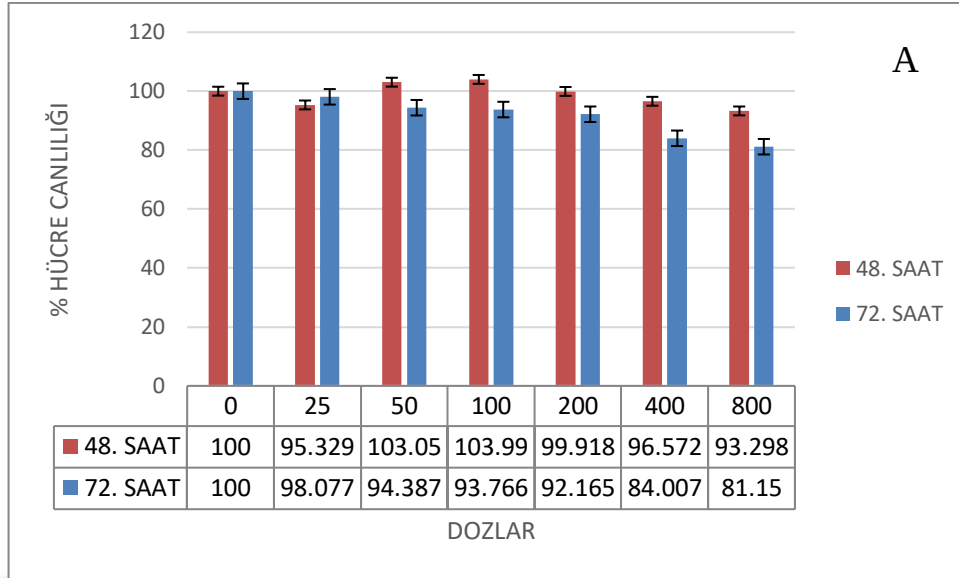
Elde edilen verilere göre; hKL proteininin HaCaT hücre hattındaki sitotoksik etkisinin zamana ve doza bağlı olarak değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Kısa süreli inkübasyon (48. saat) sonunda; düşük ve orta hKL konsantrasyonlarında (25-400 ng/mL) hücre canlılığının %95'in üzerinde seyrettiği ve hatta bazı dozlarda hafif artışların gözleendiği tespit edilmiştir (Şekil 11). Bu durum, hKL proteininin kısa süreli uygulamalarda bir sitotoksosite oluşturmadığını düşündürmektedir. Ancak 72. saat verileri incelendiğinde, özellikle 400 ve 800 ng/mL konsantrasyonlarında hücre canlılığında kontrol grubuna kıyasla bir azalma gözlenmiştir. En belirgin düşüş 800 ng/mL dozunda olup, hücre canlılığı %81,15 seviyesine gerilemiştir. Düşük dozlarda canlılığın artış eğiliminde olması, olası bir proliferatif yanıt veya adaptif mekanizmalarla ilişkili olabileceğini düşündürürken; yüksek dozda gözlenen azalma, hücrelerin inkübasyon süresine bağlı bir yanıt geliştirdiğini düşündürmektedir.

Buna karşılık, VMM917 hücre hattında hKL proteini uygulamaları sonrasında 48. saatte 50 ve 100 ng/mL dozlarında belirgin bir proliferatif etki gözlenmiş; hücre canlılığı %120,18 ve %113,80 olarak ölçülmüştür (Şekil 10). Bu etki 72. saatte azalarak %105,99-101,14 seviyelerinde kalmış, ancak genel canlılık seviyesi yüksek seyretmiştir. Önemli olarak 800 ng/ml dozda 72. saatte hücre canlılığı %85,12'ye düşmüş olup, HaCaT hücre hattında aynı dozda gözlenen daha belirgin düşüşe kıyasla, VMM917 hücrelerinin hKL'ye karşı nispeten daha dirençli bir yanıt oluşturdıkları tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, literatürde bildirilen bazı beklentilerin aksine, HaCaT hücrelerinin yüksek doz hKL uygulamasına karşı VMM917'ye kıyasla daha duyarlı olabileceğini ve bu farklılığın hücresel yanıt mekanizmaları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Deneyin ilerleyen aşamalarında 800 ng/mL dozun seçilmesinin gerekçesi, bu dozda VMM917 hücre hattında bu direncin seçici etki potansiyelini değerlendirme gerekliliğidir.



Şekil 10. VMM917 hücre hattı 48. ve 72. saat doza bağımlı % hücre canlılığını gösteren grafikler. A) Excel grafiği, B) SPSS grafiği



Şekil 11. HaCaT hücre hattı 48. ve 72. saat doza bağımlı % hücre canlılığını gösteren grafikler. A) Excel grafiği, B) SPSS grafiği

MTT analizlerinden elde edilmiş bulgular, SPSS analizi ile istatistiki değerlendirmelere tabi tutulmuştur. Ulaşılmış istatistiki veriler incelendiğinde; 400 ng/mL ve 800 ng/mL hKL konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla HaCaT hücre canlılığında anlamlı azalma saptanmıştır ($p<0,05$) (Tablo 9).

Tablo 9. HaCaT hücre hattında hKL muamelesi sonrası çoklu karşılaştırma analizi (LSD testi)

Bağımlı Değişken: Canlılık

LSD

(I) Doz	(J) Doz	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
,00	25,00	3,3000	3,97468	,416	-4,9658	11,5658
	50,00	2,3725	3,97468	,557	-5,8933	10,6383
	100,00	1,1275	3,97468	,779	-7,1383	9,3933
	200,00	2,5825	3,97468	,523	-5,6833	10,8483
	400,00	9,7150*	3,97468	,023	1,4492	17,9808
	800,00	12,7800*	3,97468	,004	4,5142	21,0458
25,00	,00	-3,3000	3,97468	,416	-11,5658	4,9658
	50,00	-,9275	3,97468	,818	-9,1933	7,3383
	100,00	-2,1725	3,97468	,590	-10,4383	6,0933
	200,00	-,7175	3,97468	,858	-8,9833	7,5483
	400,00	6,4150	3,97468	,121	-1,8508	14,6808
	800,00	9,4800*	3,97468	,027	1,2142	17,7458
50,00	,00	-2,3725	3,97468	,557	-10,6383	5,8933
	25,00	,9275	3,97468	,818	-7,3383	9,1933
	100,00	-1,2450	3,97468	,757	-9,5108	7,0208
	200,00	,2100	3,97468	,958	-8,0558	8,4758
	400,00	7,3425	3,97468	,079	-,9233	15,6083
	800,00	10,4075*	3,97468	,016	2,1417	18,6733
100,00	,00	-1,1275	3,97468	,779	-9,3933	7,1383
	25,00	2,1725	3,97468	,590	-6,0933	10,4383
	50,00	1,2450	3,97468	,757	-7,0208	9,5108
	200,00	1,4550	3,97468	,718	-6,8108	9,7208
	400,00	8,5875*	3,97468	,042	,3217	16,8533
	800,00	11,6525*	3,97468	,008	3,3867	19,9183
200,00	,00	-2,5825	3,97468	,523	-10,8483	5,6833
	25,00	,7175	3,97468	,858	-7,5483	8,9833
	50,00	-,2100	3,97468	,958	-8,4758	8,0558

Tablo 9'un devamı

100,00	-1,4550	3,97468	,718	-9,7208	6,8108
400,00	7,1325	3,97468	,087	-1,1333	15,3983
800,00	10,1975*	3,97468	,018	1,9317	18,4633
400,00 ,00	-9,7150*	3,97468	,023	-17,9808	-1,4492
25,00	-6,4150	3,97468	,121	-14,6808	1,8508
50,00	-7,3425	3,97468	,079	-15,6083	,9233
100,00	-8,5875*	3,97468	,042	-16,8533	-,3217
200,00	-7,1325	3,97468	,087	-15,3983	1,1333
800,00	3,0650	3,97468	,449	-5,2008	11,3308
800,00 ,00	-12,7800*	3,97468	,004	-21,0458	-4,5142
25,00	-9,4800*	3,97468	,027	-17,7458	-1,2142
50,00	-10,4075*	3,97468	,016	-18,6733	-2,1417
100,00	-11,6525*	3,97468	,008	-19,9183	-3,3867
200,00	-10,1975*	3,97468	,018	-18,4633	-1,9317
400,00	-3,0650	3,97468	,449	-11,3308	5,2008

*p< 0,05

MTT analizlerinden elde edilmiş bulgular, SPSS analizi ile istatistiki değerlendirmelere tabi tutulmuştur. Ulaşılmış istatistiki veriler incelendiğinde; 800 ng/mL hKL uygulamasının, tek başına VMM917 hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisinin olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Zaman faktörünün (48. ve 72. saat) hücre canlılığı üzerinde anlamlı farklılıklar oluşturduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Ayrıca doz x zaman etkileşimi de anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$), bu da artan dozların zaman ilerledikçe daha belirgin sitotoksik/antikarsinojenik etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Tablo 10).

Tablo 10. VMM917 hücre hattında hKL muamelesi sonrası çoklu karşılaştırma analizi
(LSD testi)

Bağımlı Değişken: Canlılık

LSD

(I) Doz	(J) Doz	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
,00	25,00	-2,6425	4,30324	,546	-11,5916	6,3066
	50,00	-10,6525*	4,30324	,022	-19,6016	-1,7034
	100,00	-9,8925*	4,30324	,032	-18,8416	-,9434
	200,00	-6,6325	4,30324	,138	-15,5816	2,3166
	400,00	-1,7925	4,30324	,681	-10,7416	7,1566
	800,00	9,0400*	4,30324	,048	,0909	17,9891
25,00	,00	2,6425	4,30324	,546	-6,3066	11,5916
	50,00	-8,0100	4,30324	,077	-16,9591	,9391
	100,00	-7,2500	4,30324	,107	-16,1991	1,6991
	200,00	-3,9900	4,30324	,364	-12,9391	4,9591
	400,00	,8500	4,30324	,845	-8,0991	9,7991
	800,00	11,6825*	4,30324	,013	2,7334	20,6316
50,00	,00	10,6525*	4,30324	,022	1,7034	19,6016
	25,00	8,0100	4,30324	,077	-,9391	16,9591
	100,00	,7600	4,30324	,862	-8,1891	9,7091
	200,00	4,0200	4,30324	,361	-4,9291	12,9691
	400,00	8,8600	4,30324	,052	-,0891	17,8091
	800,00	19,6925*	4,30324	,000	10,7434	28,6416
100,00	,00	9,8925*	4,30324	,032	,9434	18,8416
	25,00	7,2500	4,30324	,107	-1,6991	16,1991
	50,00	-,7600	4,30324	,862	-9,7091	8,1891
	200,00	3,2600	4,30324	,457	-5,6891	12,2091
	400,00	8,1000	4,30324	,074	-,8491	17,0491
	800,00	18,9325*	4,30324	,000	9,9834	27,8816
200,00	,00	6,6325	4,30324	,138	-2,3166	15,5816
	25,00	3,9900	4,30324	,364	-4,9591	12,9391
	50,00	-4,0200	4,30324	,361	-12,9691	4,9291
	100,00	-3,2600	4,30324	,457	-12,2091	5,6891
	400,00	4,8400	4,30324	,273	-4,1091	13,7891
	800,00	15,6725*	4,30324	,002	6,7234	24,6216
400,00	,00	1,7925	4,30324	,681	-7,1566	10,7416
	25,00	-,8500	4,30324	,845	-9,7991	8,0991
	50,00	-8,8600	4,30324	,052	-17,8091	,0891

Tablo 10'un devamı

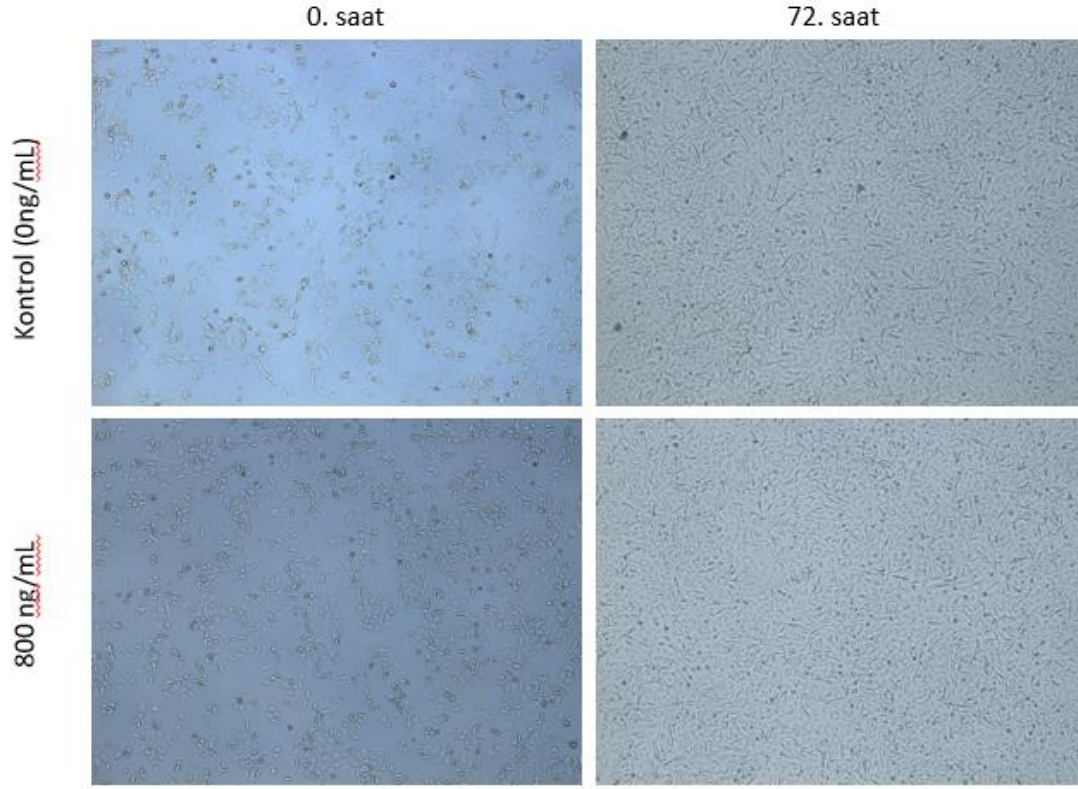
100,00	-8,1000	4,30324	,074	-17,0491	,8491
200,00	-4,8400	4,30324	,273	-13,7891	4,1091
800,00	10,8325*	4,30324	,020	1,8834	19,7816
800,00 ,00	-9,0400*	4,30324	,048	-17,9891	-,0909
25,00	-11,6825*	4,30324	,013	-20,6316	-2,7334
50,00	-19,6925*	4,30324	,000	-28,6416	-10,7434
100,00	-18,9325*	4,30324	,000	-27,8816	-9,9834
200,00	-15,6725*	4,30324	,002	-24,6216	-6,7234
400,00	-10,8325*	4,30324	,020	-19,7816	-1,8834

*p< 0,05

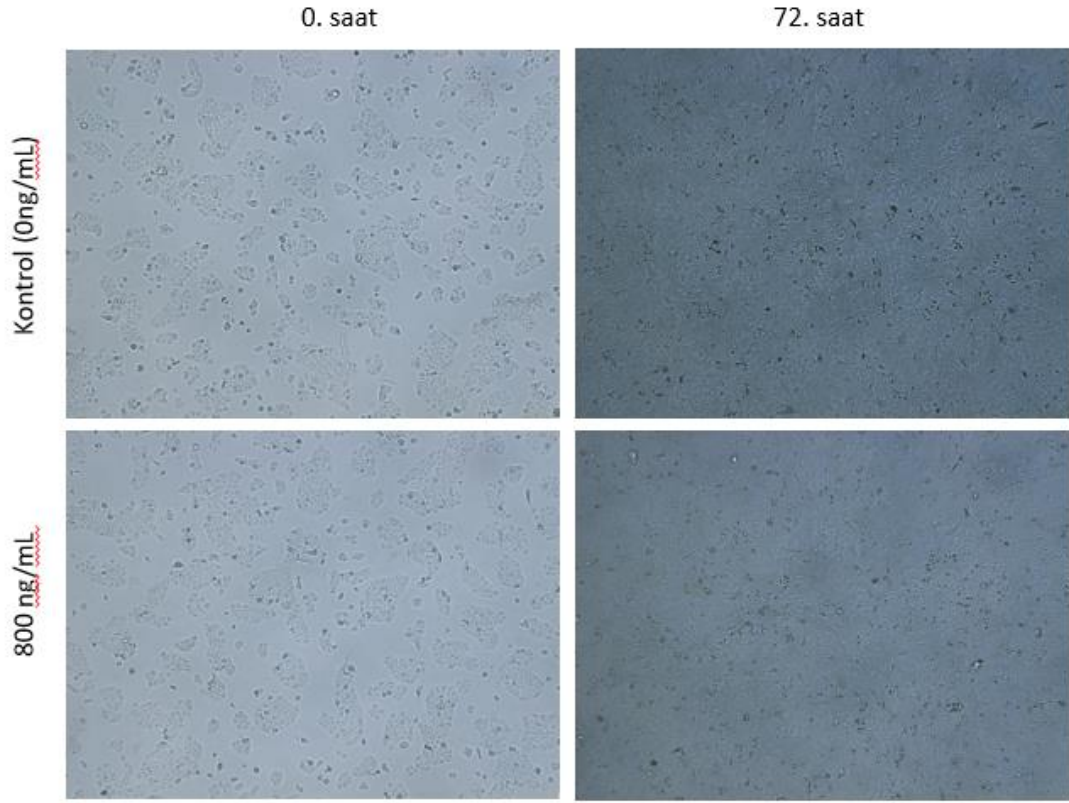
3.3. hKL Proteininin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Akım Sitometresi ile Değerlendirilmesi

Klotho proteininin VMM917 ve HaCaT hücre hatlarında hücre döngüsü üzerindeki etkisi, akım sitometri analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz 800 ng/mL konsantrasyon ve 72. saat için değerlendirilmiştir.

İnkübasyon öncesi ve sonrası hücre görüntüleri, Şekil 12 ve Şekil 13'te yer almaktadır.



Şekil 12. VMM917 hücre hattı hKL muamelesi öncesi ve muamele sonrası mikroskop görüntüleri (5X)



Şekil 13. HaCaT hücre hattı hKL muamele öncesi ve muamele sonrası mikroskop

Hücre döngüsü analiz sonuçları ise; Modfit 6.0 Verity programı kullanılarak analiz edilmiş ve sonuçları Şekil 14 ve 15’te verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre elde edilen veriler Tablo 11’de belirtilmiştir.

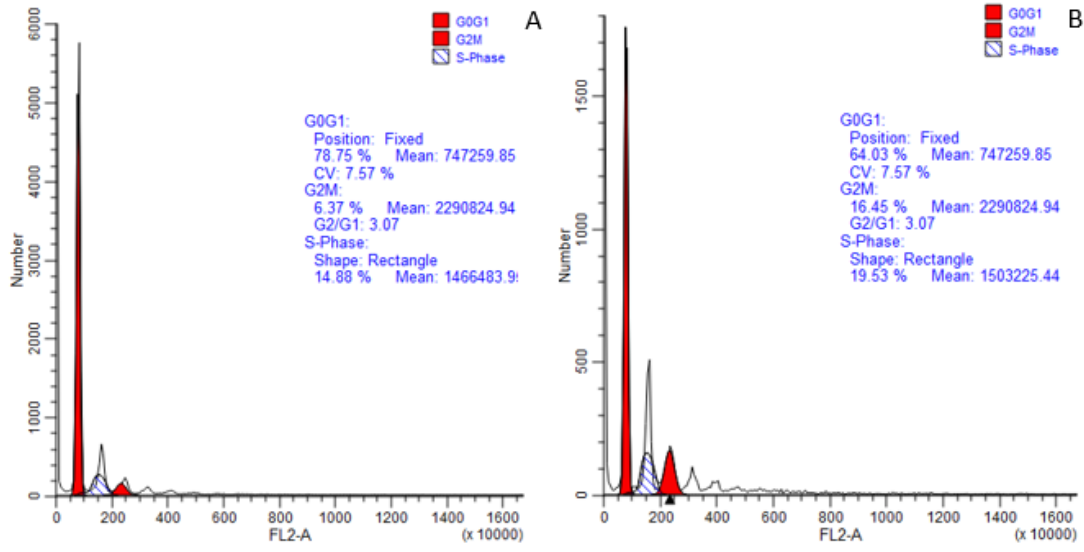
Tablo 11. VMM917 ve HaCaT hücre hatları için hücre döngüsü analiz verileri

		Kontrol	800 ng/mL
VMM917	G0/1 Evresi	%78,75	%64,03
	S Evresi	%6,37	%16,45
	G2/M Evresi	%14,88	%19,53
HaCaT	G0/1 Evresi	%57,28	%60,22
	S Evresi	%28,56	%9,50
	G2/M Evresi	%14,16	%30,28

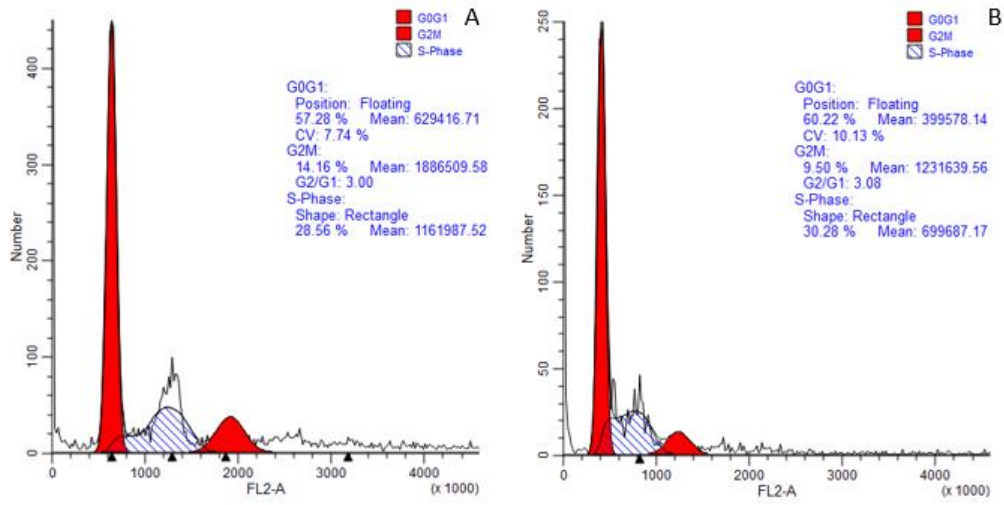
Elde edilen hücre siklusu analiz verileri, hKL proteininin deri kanseri (VMM917) ve normal deri (HaCaT) hücre hatlarının hücre döngüsü dinamiklerini farklı şekillerde etkilediğini ortaya koymuştur.

VMM917 hücre hattı kontrol grubunda; hücrelerin %78,75'i G0/G1 fazında, %6,37'si S fazında ve %14,88'i G2/M fazında belirlenmiştir. 800 ng/mL hKL uygulaması sonrası G0/G1 oranı azalarak %64,03'e düşmüş, buna karşılık S fazı %16,45'e, G2/M fazı ise %19,53'e yükselmiştir. Kontrol grubunda baskın olan G0/G1 oranı, hKL varlığında azalmış ve hücrelerin önemli bir kısmı S ve G2/M fazına kaymıştır. Bu durum, hKL muamelesinin hücre döngüsünü regüle ederek DNA replikasyonu fazında ve mitototik S fazında birikimini tetiklemiş olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 14 ve Tablo 11).

HaCaT hücre hattında ise; kontrol grubunda %57,28 olan G0/G1 oranı hKL uygulaması ile %60,22'ye yükselmiştir, S fazı %28,56'dan %9,50'ye düşmüş, G2/M fazı ise %14,16'dan %30,28'e çıkmıştır. Buna göre hKL uygulaması HaCaT hücrelerinde DNA sentez fazını baskılamış ve hücrelerin G2/M fazında yoğunlaşmasına neden olmuştur (Şekil 15 ve Tablo 11). Literatürde Klotho proteininin Wnt ve PI3K/AKT/mTOR yollarını negatif düzenleyerek hücre proliferasyonunu baskıladığı bildirilmektedir (Camilli vd., 2011) (Sachdeva vd., 2020). Ancak bizim bulgumuzda görülen S ve G2/M artışı, Klotho'nun melanoma hücrelerinde farklı bir mekanizma ile hücre döngüsü ilerlemesine etki edebileceğini düşündürmektedir. Bu farklılık, hücre tipine özgü sinyal yollarının hKL tarafından farklı şekillerde uyarılmış olmasıyla ilişkili olabilir.



Şekil 14. VMM917 hücre hattının hKL proteinini ile 72. saat muamelesi sonucu hücre döngüsü analiz grafiği. A) Kontrol, B) 800 ng/mL



Şekil 15. HaCaT hücre hattının klotho proteinini ile 72 saat muamelesi sonucu hücre döngüsü analiz grafiği. A) Kontrol, B) 800 ng/mL

3.4. qPCR Analiz Verileri

Yapılan qPCR analizi sonucunda elde edilmiş veriler Excel'e aktarılmış ve her örnek için Livak yöntemine dayalı $\Delta\Delta C_t$ değeri hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. $\Delta\Delta C_t$ değerleri (-) ile çarpılarak $\log_2 FC$ dönüşümü uygulanmıştır.

VMM917 hücre hattında klotho proteini uygulanmış hücrelerdeki belirli genlerin ifadesinin sorgulanması kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 16). Ulaşılmış veriler ışığında; gen ekspresyon seviyesindeki değişimler $\log_2 FC$ formatında şu şekilde elde edilmiştir: *BRAF* geninde -0,41 kat azalış, *CDK4* geninde -0,84 kat azalış, *MITF* geninde -1,35 kat azalış, *NF1* geninde -0,45 kat azalış, *NRAS* geninde değişim yok denecek kadar az (-0,02 kat azalış) ve *TP53* geninde -0,76 kat azalış tespit edilmiştir.

Gen ekspresyon seviyelerinde belirlenmiş varyasyonlar, VMM917 hücre hattında hKL proteini muamelesi sonrasında *MITF*, *CDK4*, *TP53*, *BRAF* ve *NF1* genleri üzerinde transkripsiyonel bir baskılanmanın gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. *NF1*, *CDK4* ve *BRAF*'taki azalış *MAPK* aktivitesini artırma potansiyelini düşündürse de; *NRAS* geninde anlamlı bir değişimin gerçekleşmemiş olması; sadece mRNA verileri ışığında kesin bir yargıya varmayı zorlaştırmaktadır.

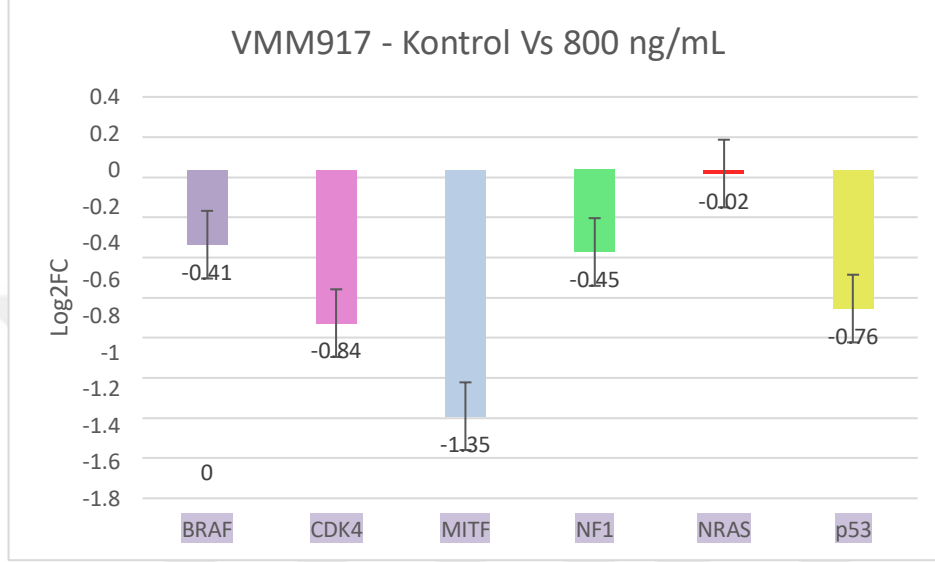
qPCR verileri ışığında, HaCaT hücre hattında Klotho uygulanan grubun kontrol ile karşılaştırılması çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 17). Bu veriler ışığında; *BRAF* geninde +0,32 kat artış, *CDK4* geninde değişim yok denecek kadar az (+0,07 kat artış), *MITF* geninde değişim yok denecek kadar azalış (-0,10 kat azalış), *NF1* geninde -0,31 kat azalış, *NRAS* geninde +0,79 kat artış ve *TP53* geninde +0,54 kat artış tespit edilmiştir.

HaCaT hücre hattında hKL muamelesi sonrası gen ekspresyonunda gözlenen durum, *MAPK* ekseninde yukarı yönlü bir artış olasılığını düşündürmektedir. Özellikle *NRAS*'taki artış ve *NF1*'deki azalma birlikte değerlendirildiğinde, *RAS* aktivitesinin artabileceğine işaret eder. *BRAF*'taki hafif artış bu tabloyla aynı yöne işaret etse de; sonuç sınırlıdır; üstelik proteomiks analizi verileri olmadan sadece tespit edilmiş mRNA artışına dayalı olarak aktivasyonunun gerçekleştiğine dair varsayımlar ve bu yöndeki çıkarsamalar yanlış yorumlamalar doğurabilir. Bu nedenle ekstra analizlerle ilgili durumun teyit edilmesi ileriki çalışmaların konusu olmaya adaydır.

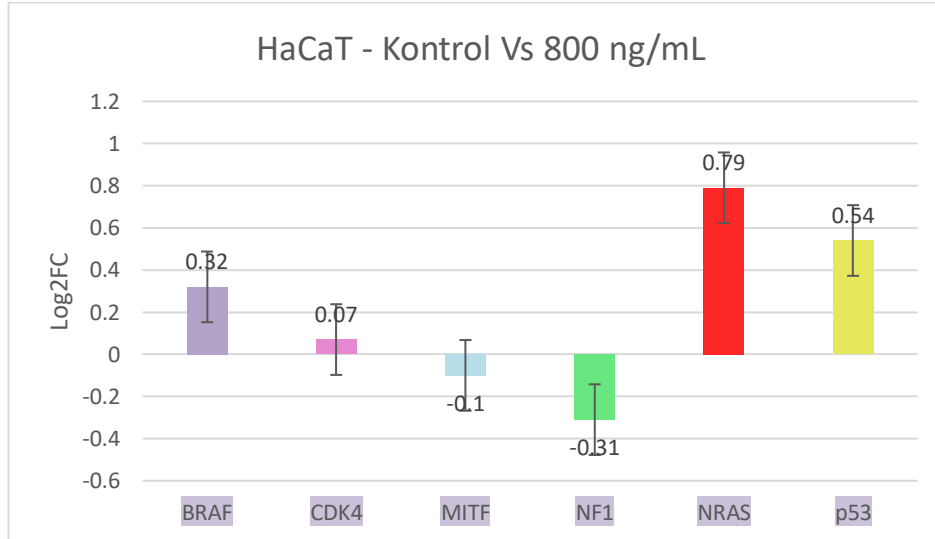
TP53 transkriptlerinde belirlenmiş artış, hKL muamelesi sonrası oluşan bir stres yanıtının veya hücre döngüsü sınırlamaya yönelik bir yaklaşımın göstergesi olabilir ancak

kesin kanıt sunmaz. Yapılan istatistiki analizler *CDK4* ve *MITF* ekspresyon seviyelerindeki küçük değişimlerin anlamlı olmadığını ortaya koymuştur.

Genel olarak, HaCaT ve VMM917’de gözlenen bu karma sonuç Klotho’nun hücre tipine özgü etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir.



Şekil 16. VMM917 hücre hattında hKL muamelesi sonrası kontrol grubuna göre *BRAF*, *CDK4*, *MITF*, *NF1*, *NRAS* ve *TP53* genlerinin qPCR analizi grafiği



Şekil 17. HaCaT hücre hattında hKL muamelesi sonrası kontrol grubuna göre *BRAF*, *CDK4*, *MITF*, *NF1*, *NRAS* ve *TP53* genlerinin qPCR analizi grafiği

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) ve insan malign melanoma hücre hattı (VMM917) üzerinde hKL proteininin sitotoksik etkisi, hücre döngüsüne etkisi ve transkripsiyonel düzeydeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, hKL proteininin hücrel yanıtlarının hem doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

MTT sonuçlarında; HaCaT hücrelerinde düşük ve orta dozlarda (25-400 ng/mL) hücre canlılığında anlamlı bir azalma saptanmazken, yüksek dozda (800 ng/mL) özellikle 72. saatte kontrol grubuna kıyasla bir düşüş (%81,15) gözlenmiştir. Ancak bu düşüş literatür ile kıyaslandığında düşük sitotoksikite olarak değerlendirilmiştir. (Zhu vd., 2022). Buna karşın, VMM917 hücre hattında 48 ve 72 saatlik muameleler sonrasında canlılık değerlerinin maksimum %85,12'ye kadar düştüğü, dolayısıyla hKL proteininin bu hücre hattında kontrol grubuna ve HaCaT hücre hattına kıyasla belirgin bir sitotoksik etki oluşturmadığı belirlenmiştir.

Hücre döngüsü analizinde; VMM917 hücrelerinde 800 ng/mL hKL uygulaması, G0/G1 fazındaki hücre oranını azaltırken, S ve G2/M fazındaki oranları artırmıştır. HaCaT hücre hattında ise 800 ng/mL hKL uygulaması, hücre döngüsünde S fazını baskılamış ve hücrelerin G2/M fazında belirgin bir şekilde birikmesine yol açmıştır. Bu sonuçlar, Klotho proteininin her iki hücre hattında G2/M fazını düzenleyerek hücre bölünmesini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

qPCR analizinde elde edilen çıktılar değerlendirildiğinde VMM917 hücre hattı için klotho uygulaması sonrası tüm genlerde bir azalma gözlenmiştir. Ancak NRAS geni transkripsiyon seviyelerindeki değişim yok denecek kadar azdır. Bu tablo, VMM917 hücre hattında Klotho'nun direkt olarak NRAS üzerinden değil de; BRAF, MITF ve CDK4 genleri üzerinden hücre proliferasyonunu baskılamış olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu sonuçlar mRNA düzeyine dayalıdır, kesin biyolojik çıkarımlar için protein/fosfo-protein doğrulamaları ile mevcut bulguların desteklenmesine yönelik gelecek çalışmalar daha sağlıklı yorumlamalara zemin oluşturabilir.

Sonuç olarak, hKL proteininin VMM917 hücrelerinde yüksek dozda (800 ng/mL) HaCaT hücrelerine kıyasla daha düşük sitotoksikite gösterebildiği belirlenmiştir. Bu farklılık, VMM917 hücre hatlarında mevcut NRAS mutasyonlarının olası hKL antikanserojenik

etkisini ortaya koymada etkisiz kalmasına yol açmış olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca literatürde hKL'nin tümör baskılayıcı rolüne işaret eden çalışmalarla kıyaslandığında, elde edilen veriler MTT analizi, Hücre döngüsü analizi ve *NF1* ve *TP53*'deki gen ekspresyon değişimi beklenenden farklı bir yanıt ortaya koymuştur. Bu durum hKL proteininin biyolojik etkilerinin hücresel mikroçevre, sinyal yolları ve doz-zaman parametrelerine göre farklılık gösterebileceğini vurgulamaktadır.

Diğer taraftan, küçük GTPaz NRAS mutasyonları, kutanöz melanomda ikinci en yaygın onkojenik faktördür ve vakaların %15-20'sinde görülür. Melanomdaki en yaygın NRAS mutasyonları (%80'den fazlasını oluşturur) 61. kodonda (Q61R, Q61L ve Q61K) bulunur ve GTPaz aktivitesini bozarak geni kalıcı olarak AÇIK pozisyonunda kilitler (Phadke & Smalley, 2023). Buna paralel olarak VMM917 hücre hattı genetik altyapısının Q61L Q61R ve CDKN2A: R80 mutasyonlarını içerdği bildirilmiştir (<https://www.atcc.org/products/crl-3232>).

Bugüne kadar, NRAS mutant melanom için hedefli tedavi stratejileri geliştirmede çok az ilerleme kaydedilmiştir ve çoğu hasta, anti-programlanmış hücre ölümü proteinleri gibi bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri (ICI) ile tedavi edilmektedir. ICI'lere yanıt vermeyen veya daha sonra direnç geliştiren NRAS mutant melanomlu bireylerin ise başka tedavi seçeneği olmadığı bildirilmiştir (Phadke & Smalley, 2023). İlgili öncü çalışmalar VMM917 melanoma hücre hatlarının bu bağlamda oldukça dirençli deri kanseri türleri olduğuna işaret etmektedir. Bu durum, mevcut çalışma kapsamında hKL proteini muamelesi ile ulaşılmış sonuçlarda çok köklü antikanserojenik yanıtlar gözlemlenememiş olmasını nispeten açıklamaktadır.

Daha önce de belirtildiği üzere melanom agresif yapısı ve metastaz geliştirme eğilimi nedeni ile tedavide önemli bir zorluk gerçekleştirmektedir (Valdez-Salazar vd., 2024). Bu bağlamda çalışmanın genel çıktıları, hKL proteininin melanoma üzerinde antitümör potansiyelini anlamak için daha ileri düzeyde *in vitro* ve *in vivo* araştırmalara ihtiyaç olduğunu ve özellikle farklı melanoma alt tipleri ile normal hücre hatlarının karşılaştırmalı olarak incelenmesinin önem taşıdığını ortaya koymaktadır.

5. ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında insan keratinosit (HaCaT) ve melanoma (VMM917) hücre hatlarında hKL proteininin etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, Klotho'nun melanoma hücre hattında anikanser potansiyel rolünün daha kapsamlı biçimde anlaşılabilmesi için aşağıdaki öneriler sunulmaktadır:

5.1. Daha Geniş Doz Aralıkları ile Çalışmalar

Mevcut çalışma sonucunda, hKL proteininin VMM917 hücre hattında, düşük dozda kontrol grubuna kıyasla proliferatif etki, yüksek dozlarda kontrol grubuna kıyasla sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Ancak kontrol hücre hattı olarak kullanılmış HaCaT hücre hattı verileri ile kıyaslandığında; VMM917 hücre hattının 72. saat muamelesi esnasında hKL'ye karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bu çift yönlü etkinin, ilgili gen yolları üzerinde nasıl ortaya çıktığını kesin olarak belirleyebilmek için, daha geniş bir doz aralıklarında ve daha uzun inkübasyon süreleri boyunca hKL muamelesinin takip edilmesi ve optimum antitümör etkinin hangi koşullar altında oluştuğunun belirlenebilmesi adına daha kapsamlı çalışmalar yürütülebilir.

5.2. Zaman Bağımlı Etki ve Klotho Temini

DeneySEL bulgular sadece 48. ve 72. saatler için değerlendirilebilmiştir. Klotho proteininin erken (12 ve 24. saat) ve geç dönem (96 ve 120. saat) etkilerinin de incelenmesi, zaman bağımlı farklılıkların ortaya konmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca ticari klotho proteininin nispeten pahalı oluşu; deneySEL koşulların optimizasyonuna yönelik planlamaları kısıtlandırmıştır. Bu nedenle, klotho proteininin rekombinant olarak üretiminin yapılıp, hücre kültürü çalışmalarının daha kapsamlı olarak ele alınması, hKL'nin antimelanom etkilerine ilişkin daha sağlıklı verilere ulaşılmasını kolaylaştırabilir.

5.3. Farklı Hücre Hatları

Bulguların yalnızca HaCaT ve VMM917 hücre hatlarında incelenmiş olması sınırlayıcıdır. Farklı melanoma alt tipleri ve diğer deri kanseri hücre hatlarında da Klotho

proteininin etkinliğinin test edilmesi; hKL proteininin dışsal uygulamalar sonucu antimelanom etki oluşturma potansiyellerini keşfetme açısından oldukça değerlidir.

5.4. Kombinasyon Tedavileri

Klotho proteininin tek başına uygulanmasının yerine, mevcut kemoterapötikler (ör. Dacarbazine, vemurafenib) ile kombine edilerek değerlendirilmesi iyileşme oranlarında gelişme elde etmek açısından faydalı olabilir. Böylece olası sinerjistik veya antagonistik etkileri belirlemek mümkün olabilecektir.

5.5. *İn vivo* Çalışmalar

Hücre kültürü modelleri, biyolojik sistemlerin tüm karmaşıklığını yansıtmamaktadır. Bu nedenle, elde edilen bulguların doğrulanması amacıyla hayvan modellerinde tümör gelişimi ve tedavi etkinliğini sorgulamaya yönelik farklı hKL uygulamalarının yapılması daha somut verilere ulaşılmasına katkı sağlayacaktır.

5.6. Farklı Genlerin Etkisi

Çalışmada değerlendirilen genlere; hücre proliferasyonu, apoptoz, metastaz ve hücresel stres yanıtı gibi kritik yollara ait genlerin eklenmesi, Klotho'nun melanom hücrelerinde etkilediği moleküler ağların daha kapsamlı olarak ortaya konmasına katkı sunacaktır.

5.7. Protein ve Fosfo-Protein Doğrulama Çalışmaları

qPCR sonuçlarının desteklenmesi amacıyla Western blot ve fosfo-protein analizleri gibi yöntemlerle protein ekspresyonu ve protein aktivitesi değerlendirilebilir. Bu yöntemler, Klotho'nun melanom hücrelerinde hangi sinyal yollarını modüle ettiğinin daha net anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abraham, C. R., Chen, C., Cuny, G. D., Glicksman, M. A., & Zeldich, E. (2012). Small-molecule Klotho enhancers as novel treatment of neurodegeneration. *Future medicinal chemistry*, 4(13), 1671.
- Ahmed, B., Qadir, M. I., & Ghafoor, S. (2020). Malignant Melanoma: Skin Cancer−Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 30(4).
- Arroyo, E., Leber, C. A., Burney, H. N., Narayanan, G., Moorthi, R., Avin, K. G., Warden, S. J., Moe, S. M., & Lim, K. (2023). Relationship between klotho and physical function in healthy aging. *Scientific Reports*, 13(1), 1-9.
- Bittmann, S. (2023). The Role of Klotho in Pediatric Diseases and Aging. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 19(3), 355.
- Buchanan, S., Combet, E., Stenvinkel, P., & Shiels, P. G. (2020). Klotho, Aging, and the Failing Kidney. *Frontiers in Endocrinology*, 11.
- Camilli, T. C., Xu, M., O'Connell, M. P., Chien, B., Frank, B. P., Subaran, S., Indig, F. E., Morin, P. J., Hewitt, S. M., & Weeraratna, A. T. (2011). Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24(1), 175-186.
- Chen, L., Fu, L., Sun, J., Huang, Z., Fang, M., Zinkle, A., Liu, X., Lu, J., Pan, Z., Wang, Y., Liang, G., Li, X., Chen, G., & Mohammadi, M. (2023). Structural basis for FGF hormone signalling. *Nature*, 618(7966), 862-870.
- Ciążyńska, M., Sławińska, M., Kamińska-Winciorek, G., Lange, D., Lewandowski, B., Reich, A., Pabianek, M., Szczepaniak, K., Hankiewicz, A., Ułańska, M., Morawiec, J., Błasińska-Morawiec, M., Morawiec, Z., Piekarski, J., Brodowski, R., Zaryczńska, A., Sobjanek, M., Owczarek, W., Słowińska, M., ... Lesiak, A. (2020). Clinical and epidemiological analysis of basosquamous carcinoma: Results of the multicenter study. *Scientific Reports*, 10(1), 18475.
- Çakmak R. (2021). *Heterologous Expression of Mouse Alpha Klotho Protein in Photosynthetic Microalga Chlamydomonas reinhardtii*. Yüske Lisans Tezi (Tez No: 659924).
- Çakmak, R., & Uzuner, U. (2024). Functional and Extracellular Production and Antitumor Activity of Mouse Alpha Klotho in Model Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemistry & Biodiversity*, 21(1), e202301255.

- Dalton, G. D., Xie, J., An, S.-W., & Huang, C.-L. (2017). New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 323.
- Deshpande, A., Sicinski, P., & Hinds, P. W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: A perspective. *Oncogene*, 24(17), 2909-2915.
- Di Trollo, R., Simeone, E., Di Lorenzo, G., Buonerba, C., & Ascierto, P. A. (2015). The use of interferon in melanoma patients: A systematic review. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 26(2), 203-212.
- Diazzi, S., Tartare-Deckert, S., & Deckert, M. (2023). The mechanical phenotypic plasticity of melanoma cell: An emerging driver of therapy cross-resistance. *Oncogenesis*, 12(1), Article 1.
- Donate-Correa, J., Martín-Carro, B., Cannata-Andía, J. B., Mora-Fernández, C., & Navarro-González, J. F. (2023). Klotho, Oxidative Stress, and Mitochondrial Damage in Kidney Disease. *Antioxidants*, 12(2), 239.
- Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 298-306.
- Gajos-Michniewicz, A., & Czyz, M. (2020). WNT Signaling in Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 4852.
- Gloster, H. M., & Neal, K. (2006). Skin cancer in skin of color. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 55(5), 741-760; quiz 761-764.
- Gomez-Raya-Vilanova, M. V., Teulière, J., Medvedeva, S., Dai, Y., Corel, E., Lopez, P., Lapointe, F.-J., Bhattacharya, D., Haraoui, L.-P., Turc, E., Monot, M., Cvirkaite-Krupovic, V., Baptiste, E., & Krupovic, M. (2025). Transcriptional landscape of the cell cycle in a model thermoacidophilic archaeon reveals similarities to eukaryotes. *Nature Communications*, 16(1), 5697.
- Guo, W., Wang, H., & Li, C. (2021). Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), Article 1.
- Hajare, A. D., Dagar, N., & Gaikwad, A. B. (2025). Klotho antiaging protein: Molecular mechanisms and therapeutic potential in diseases. *Molecular Biomedicine*, 6, 19.
- Hanson, K., Fisher, K., & Hooper, N. M. (2021). Exploiting the neuroprotective effects of α -klotho to tackle ageing- and neurodegeneration-related cognitive dysfunction. *Neuronal Signaling*, 5(2), NS20200101.
- Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Kaneko, I., Forster, R., Saini, R., Hsieh, J.-C., Haussler, C. A., & Jurutka, P. W. (2012). The Role of Vitamin D in the FGF23, Klotho, and Phosphate Bone-Kidney Endocrine Axis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 13(1), 57.

- Hesketh, R. (2023). *Introduction to Cancer Biology*. Cambridge University Press.
- Hong, H., Sun, J., & Cai, W. (2008). Anatomical and molecular imaging of skin cancer. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*.
- Hossain, R. A., Murshedul, I. M., Fuad, A. A. M., Saqline, M. M., Zihad, M. M., Nurul, A. M., & Ashiq, M. M. (2025). Overview of skin cancer types and prevalence rates across continents. *Cancer Pathogenesis and Therapy*.
- Howard, M. D., Su, J. C., & Chong, A. H. (2018). Skin Cancer Following Solid Organ Transplantation: A Review of Risk Factors and Models of Care. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(4), 585-597.
- Huang, C.-L. (2010). Regulation of ion channels by secreted Klotho: Mechanisms and implications. *Kidney International*, 77(10), 855-860.
- Jones, O. T., Ranmuthu, C. K. I., Hall, P. N., Funston, G., & Walter, F. M. (2020). Recognising Skin Cancer in Primary Care. *Advances in Therapy*, 37(1), 603-616.
- Kiuru, M., & Busam, K. J. (2017). The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory Investigation*, 97(2), 146-157.
- Kuro-o, M. (2010). Klotho. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 459(2), 333-343.
- Lai, V., Cranwell, W., & Sinclair, R. (2018). Epidemiology of skin cancer in the mature patient. *Clinics in Dermatology*, 36(2), 167-176.
- Liguori, L., Luciano, A., Pagliara, V., Polcaro, G., De Feo, R., Viggiano, A., Salomone, F., Avanzo, A., Vitale, F., D'ambrosio, S., Servetto, A., Ferrone, C. R., Pepe, S., & Sabbatino, F. (2025). Epigenetic modifiers to enhance the efficacy of immune checkpoint inhibitors for the treatment of melanoma. *Translational Oncology*, 59, 102452.
- Madonna, G., Ballesteros-Merino, C., Feng, Z., Bifulco, C., Capone, M., Giannarelli, D., Mallardo, D., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Caracò, C., Botti, G., Fox, B. A., & Ascierto, P. A. (2018). PD-L1 expression with immune-infiltrate evaluation and outcome prediction in melanoma patients treated with ipilimumab. *Oncoimmunology*, 7(12), e1405206.
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88.
- Mencke, R., Olauson, H., & Hillebrands, J.-L. (2017). Effects of Klotho on fibrosis and cancer: A renal focus on mechanisms and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121, 85-100.
- Molnar, C., & Gair, J. (2015). 6.2 *The Cell Cycle*. <https://opentextbc.ca/biology/chapter/6-2-the-cell-cycle/>

- Muto, Y., Fujimura, T., & Asano, Y. (2025). Recent Advances in Immunotherapy for Melanoma: Perspectives on the Development of Novel Treatments: A Mini Review. *Cancers*, 17(13), 2265.
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. (2010). Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, 49(9), 978-986.
- Olbryt, M. (2022). Potential Biomarkers of Skin Melanoma Resistance to Targeted Therapy—Present State and Perspectives. *Cancers*, 14(9), Article 9.
- Perera, E., Gnaneswaran, N., Staines, C., Win, A. K., & Sinclair, R. (2015). Incidence and prevalence of non-melanoma skin cancer in Australia: A systematic review. *Australasian Journal of Dermatology*, 56(4), 258-267.
- Phadke, M. S., & Smalley, K. S. M. (2023). Targeting NRAS Mutations in Advanced Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 41(14), 2661-2664.
- Prud'homme, G. J., Kurt, M., & Wang, Q. (2022). Pathobiology of the Klotho Antiaging Protein and Therapeutic Considerations. *Frontiers in Aging*, 3, 931331.
- Ribero, S., Stucci, L. S., Marra, E., Marconcini, R., Spagnolo, F., Orgiano, L., Picasso, V., Queirolo, P., Palmieri, G., Quaglino, P., & Bataille, V. (2018). Effect of Age on Melanoma Risk, Prognosis and Treatment Response. *Acta Dermato-Venereologica*, 98(7), 624-629.
- Roky, A. H., Islam, M. M., Ahasan, A. M. F., Mostaq, M. S., Mahmud, M. Z., Amin, M. N., & Mahmud, M. A. (2025). Overview of skin cancer types and prevalence rates across continents. *Cancer Pathogenesis and Therapy*, 3(2), 89-100.
- Sachdeva, A., Gouge, J., Kontovounisios, C., Nikolaou, S., Ashworth, A., Lim, K., & Chong, I. (2020). Klotho and the Treatment of Human Malignancies. *Cancers*, 12(6), 1665.
- Samarasinghe, V., & Madan, V. (2012). Nonmelanoma Skin Cancer. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 5(1), 3.
- Schrom, K. P., Kim, I., & Baron, E. D. (2020). The Immune System and Pathogenesis of Melanoma and Non-melanoma Skin Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1268, 211-226.
- Schulman, J. M., & Fisher, D. E. (2009). Indoor UV tanning and skin cancer: Health risks and opportunities. *Current opinion in oncology*, 21(2), 144-149.
- Seidenberg, A. B., Mahalingam-Dhingra, A., Weinstock, M. A., Sinclair, C., & Geller, A. C. (2015). Youth indoor tanning and skin cancer prevention: Lessons from tobacco control. *American Journal of Preventive Medicine*, 48(2), 188-194.

- Sivanandam, V., LaRocca, C. J., Chen, N. G., Fong, Y., & Warner, S. G. (2019). Oncolytic Viruses and Immune Checkpoint Inhibition: The Best of Both Worlds. *Molecular Therapy Oncolytics*, 13, 93.
- Valdez-Salazar, F., Jiménez-Del Rio, L. A., Padilla-Gutiérrez, J. R., Valle, Y., Muñoz-Valle, J. F., & Valdés-Alvarado, E. (2024). Advances in Melanoma: From Genetic Insights to Therapeutic Innovations. *Biomedicines*, 12(8), 1851.
- Vidwans, S. J., Flaherty, K. T., Fisher, D. E., Tenenbaum, J. M., Travers, M. D., & Shrager, J. (2011). A Melanoma Molecular Disease Model. *PLOS ONE*, 6(3), e18257.
- Wellbrock, C., & Arozarena, I. (2016). The Complexity of the ERK/MAP-Kinase Pathway and the Treatment of Melanoma Skin Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4.
- Xu, L., Cheng, Z., Cui, C., Wu, X., Yu, H., Guo, J., & Kong, Y. (2019). Frequent genetic aberrations in the cell cycle related genes in mucosal melanoma indicate the potential for targeted therapy. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 245.
- Xu, Y., Jiao, Y., Liu, C., Miao, R., Liu, C., Wang, Y., Ma, C., & Liu, J. (2024). R-loop and diseases: The cell cycle matters. *Molecular Cancer*, 23(1), 84.
- Xu, Y., & Sun, Z. (2015). Molecular Basis of Klotho: From Gene to Function in Aging. *Endocrine Reviews*, 36(2), 174-193.
- Xu, Y., You, J., Yao, J., Hou, B., Wang, W., & Hao, Z. (2025). Klotho alleviates oxidative stress and mitochondrial dysfunction through the Nrf2/HO-1 pathway, thereby reducing renal senescence induced by calcium oxalate crystals. *Urolithiasis*, 53(1), 1-19.
- Zambrano-Román, M., Padilla-Gutiérrez, J. R., Valle, Y., Muñoz-Valle, J. F., & Valdés-Alvarado, E. (2022). Non-Melanoma Skin Cancer: A Genetic Update and Future Perspectives. *Cancers*, 14(10), 2371.
- Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461-1473.
- Zhou, H., Pu, S., Zhou, H., & Guo, Y. (2021). Klotho as Potential Autophagy Regulator and Therapeutic Target. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 755366.
- Zhou, L., Zhong, Y., Han, L., Xie, Y., & Wan, M. (2025). Global, regional, and national trends in the burden of melanoma and non-melanoma skin cancer: Insights from the global burden of disease study 1990–2021. *Scientific Reports*, 15(1), 5996.
- Zhu, L., Yang, Q., Hu, R., Li, Y., Peng, Y., Liu, H., Ye, M., Zhang, B., Zhang, P., Liu-Smith, F., Li, H., & Liu, J. (2022). Novel therapeutic strategy for melanoma based on albendazole and the CDK4/6 inhibitor palbociclib. *Scientific Reports*, 12(1), 1-10.

URL-1. (2024, Şubat 1). DSÖ: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services> adresinden alınmıştır.

URL-2. (2025, Şubat 3). DSÖ: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> adresinden alınmıştır.



ÖZGEÇMİŞ

İlköğrenimini 100. Yıl İlköğretim Okulu'nda bitirdikten sonra lise eğitimini 2016 yılında Kadirli Atatürk Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2017-2018 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimine başladı. 2021 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında tezli yüksek lisans programına başladı.

