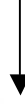


Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( DOKTORA TEZİ )**

**MİTOKONDRIYAL DİNAMİĞİN DÜZENLENMESİNDE  
ROL OYNAYAN MEKANİZMALAR**

**FULYA DAL YÖNTEM**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. HANDAN AKÇAKAYA**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI  
BİYOFİZİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2017**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Programında Doktora öğrencisi Fulya Dal tarafından Doç.Dr.Handan AKÇAKAYA'nın danışmanlığında hazırlanan "Mitokondriyal Dinamiğin Düzenlenmesinde Rol Oynayan Mekanizmalar" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 17/02/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



**Jüri Başkanı**  
Prof.Dr.Rüstem NURTEN  
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi



**Jüri-Danışman**  
Doç.Dr.Handan AKÇAKAYA  
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi



**Jüri**  
Prof.Dr.Muhammet BEKTAŞ  
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Başkanı



**Jüri**  
Doç.Dr.Hülya CABADAK  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi



**Jüri**  
Doç.Dr.Oya ORUN  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Fulya DAL YÖNTEM



## İTHAF

Safiye Yıldırım'a ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde bana destek olan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Handan Akçakaya'ya, Prof. Dr. Rüstem Nurten'e, U.T. MD Anderson Cancer Center, Melanoma Medical Oncology Departmanı'ndan sayın Prof. Dr. Sühendan Ekmekçioğlu'na, sayın Prof. Dr. Elizabeth Grimm'e ve tüm Grimm Lab çalıŐanlarına, çalıŐmalarımnda benden desteklerini esirgemeyen aileme, eŐim Bora Yöntem ve ailesine ve tüm İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı çalıŐanlarına teŐekkürü bir borç bilirim.

Bu alıŐma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 51467

Bu alıŐma TÜBİTAK-BİDEB 2214-A Doktora Sırası Yurt Dışı Araştırma Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
ÖZET .....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Mitokondri .....	3
2.1.1. Mitokondrinin Yapısal ve İşlevsel Özellikleri .....	3
2.1.2. Mitokondri Morfolojisinin Dinamikleri .....	8
2.1.2.1. Mitokondriyal Fizyon.....	9
2.1.2.2. Mitokondriyal Füzyon.....	10
2.1.2.3. Mitokondriyal Dinamikler ve Hücre Döngüsü.....	11
2.1.2.4. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin Görüntülenmesi ve Sayısallaştırılması.....	12
2.1.3. Mitokondriyal Elektron Transferi ve Oksidatif Fosforilasyon.....	13
2.1.3.1. Respirometre ile Oksidatif Fosforilasyonun Fonksiyonel Analizi.....	14
2.1.3.2. Oksidatif Fosforilasyon Bozuklukları ve Kanser .....	15
2.2. Melanositlerin Kökeni ve Gelişimi .....	17
2.2.1. Melanositlerde UV Radyasyonla İndüklenmiş DNA Hasarı .....	18
2.3. Melanoma.....	19
2.3.1. Melanoma Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri .....	19
2.3.2. Melanomanın Klinik Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	20
2.3.2.1. Kütanöz Tümörler .....	20
2.3.2.2. Kütanöz Olmayan Tümörler.....	22

2.3.3. Melanomanın Gelişiminde Rol Alan Moleküler Mekanizmalar.....	23
2.3.3.1. RAS/RAF/MEK/ERK Sinyal Yolağı.....	23
2.3.3.2. Hücre Döngüsü.....	24
2.4. Mitokondri ve Kanser .....	25
2.4.1. Mitokondriyal Fonksiyon Bozuklukları ve Kanser.....	25
2.4.2. Mitokondriyal Enerji Metabolizmasındaki Bozukluklar ve Kanser .....	26
2.4.3. Mitokondriyal Biyogenez ve Tümör Oluşumu .....	27
2.4.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Değişiklikleri ve Kanser .....	28
2.4.5. Mitokondriyal Dinamiklerin Kanser Gelişimi ve İlerleyişindeki Rolü.....	29
2.4.6. Ca <sup>2+</sup> Sinyalizasyonu ve Kanser Hücre Göçü .....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. GEREÇLER.....	32
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	32
3.1.2. Kitler .....	33
3.1.3. Cihazlar .....	33
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Eriyikler.....	34
3.2. YÖNTEMLER.....	37
3.2.1. Hücre Kültür Çalışmaları .....	37
3.2.1.1. Hücrelerin Çoğaltılması .....	37
3.2.1.2. Hücrelerin Dondurulması.....	37
3.2.2. Hücrelerin Mdivi-1 ile Muamele Edilmesi .....	37
3.2.2.1. Hücre Sayısı ve Canlılığın Belirlenmesi .....	37
3.2.2.2. Mitokondri Morfoloji Değişimlerinin Konfokal Mikroskobu ile İncelenmesi .....	38
3.2.3. Protein İfadesindeki Değişimlerin Belirlenmesi .....	39
3.2.3.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması .....	39
3.2.3.2. Protein Konsantrasyonunun Bradford Yöntemi İle Belirlenmesi .....	39
3.2.3.3. Proteinlerin SDS-PAGE Yöntemi İle Ayrıştırılması Ve İfadelerinin Western Blot Yöntemi İle Görüntülenmesi.....	39
3.2.4. siRNA Transfeksiyonu İle Mitokondriyal Dinamiklerle İlgili Protein Anlatımlarının Susturulması .....	40
3.2.5. Mitokondri Membran Potansiyelinin Belirlenmesi.....	40
3.2.6. Hücre Döngüsü Analizleri.....	41



3.2.7. Hücre Göç Analizleri .....	41
3.2.8. Mitokondri Dinamikleriyle İlişkili Gen İfadelerinin qPCR İle Belirlenmesi ...	42
3.2.8.1. RNA İzolasyonu .....	42
3.2.8.2. Ters Transkripsiyon PCR (RT PCR).....	42
3.2.8.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR).....	42
3.2.9. Oksijen Tüketim Ve Ekstraselüler Asidifikasyon Oranlarının Belirlenmesi ...	43
3.2.9.1. Hücrelerin 96 kuyulu XF96 Hücre Kültürü Platlerine Ekimi .....	43
3.2.9.2. Sensör Kartuşunun Hidratlanması ve Cihaza Yerleştirilmesi .....	44
3.2.10. Hücre İçi Kalsiyum Miktarlarının FURA-2 AM İle Belirlenmesi.....	44
3.2.11. İstatistiksel Analizler.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. Melanoma ve Normal Hücrelerde Mitokondriyal Dinamiklerle İlişkili Protein İfadelerinin Belirlenmesi.....	45
4.2. Melanoma ve Normal Hücrelerde Mitokondriyal Dinamiklerle İlişkili Gen İfadelerinin Belirlenmesi.....	46
4.3. Normoksik ve Hipoksik Koşullardaki Melanoma ve Keratinosit Hücrelerinde mdivi-1'in Mitokondriyal Dinamikler Üzerine Etkisi .....	47
4.4. Melanoma ve Normal Hücrelerin Drp-1 ve Mfn 2 Protein İfadelerinin Susturulmasının Mitokondriyal Dinamikler Üzerine Etkisi .....	50
4.5. Mdivi-1'in Melanoma Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi .....	54
4.6. Drp-1 ve Mfn 2 siRNA Transfeksiyonunun Melanoma ve Keratinosit Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	54
4.7. Mdivi-1'in Hücre Göçü Üzerine Etkisi.....	56
4.8. Drp-1 ve Mfn 2 siRNA Transfeksiyonunun Hücre Göçü Üzerine Etkisi .....	60
4.9. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi .....	62
4.10. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin Oksijen Tüketim Oranına Etkisi .....	63
4.11. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin Ekstraselüler Asidifikasyon Oranına Etkisi .....	64
4.12. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin Hücre İçi Kalsiyum Miktarına Etkisi ...	65
4.13. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin AMPK Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi ...	67
4.14. Mdivi-1'in Melanoma Hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi.....	71
5. TARTIŞMA .....	73
KAYNAKLAR .....	79

ÖZGEÇMİŞ .....95



**TABLolar LİSTESİ**

Tablo 2-1 Mitokondriyi oluşturan bölümler ve fonksiyonları.....	7
Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan siRNA dizileri .....	40
Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan primer dizileri.....	43



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Mitokondri'nin yapısı.....	3
Şekil 2-2: Farklı hücre tiplerinde mitokondri şekilleri. ....	6
Şekil 2-3: Mitokondriyal solunum zinciri.....	14
Şekil 2-4: Mitokondriyal fonksiyonların intakt hücrelerde belirlenmesi.....	15
Şekil 4-1: Farklı melanoma hücreleri ve keratinosit hücrelerinde mitokondriyal dinamiklerle ilişkili protein anlatımları. ....	45
Şekil 4-2: Melanoma ve normal hücrelerde mitokondriyal dinamiklerle ilişkili gen anlatımları. ....	46
Şekil 4-3: Normoksik ortamda mdivi-1 ile işlem görmüş melanoma ve keratinosit hücrelerinde mitokondriyal değişimlerin konfokal mikroskobu ile incelenmesi. ....	48
Şekil 4-4: Hipoksik ortamda mdivi-1 ile işlem görmüş melanoma ve keratinosit hücrelerinde mitokondriyal değişimlerin konfokal mikroskobu ile incelenmesi. ....	49
Şekil 4-5: Farklı konsantrasyonlarda iki farklı Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş MeWo hücresinde Drp-1 ve Mfn 2 protein anlatımlarının belirlenmesi.....	50
Şekil 4-6: Drp-1(1) ve Drp-1 (2) siRNA ile muamele edilmiş melanoma (A375, MeWo, WM793) ve keratinositlerde (HaCaT) Drp-1 protein anlatımının western blot analizi..	51
Şekil 4-7: Mfn 2 (1) ve Mfn 2 (2) siRNA ile muamele edilmiş melanoma (A375, MeWo, WM793) ve keratinositlerde (HaCaT) Drp-1 protein anlatımının western blot analizi.....	51
Şekil 4-8: Drp-1 (1) siRNA ile işlem görmüş melanoma ve keratinosit hücrelerinde mitokondriyal değişimlerin konfokal mikroskobu ile incelenmesi. ....	52
Şekil 4-9: Mfn 2 (1) siRNA ile işlem görmüş melanoma ve keratinosit hücrelerinde mitokondriyal değişimlerin konfokal mikroskobu ile incelenmesi. ....	53
Şekil 4-10: Mdivi-1 ile inkübe edilmiş melanoma (A375, MeWo ve WM793) ve keratinosit (HaCaT) hücrelerindeki canlılık oranları.....	54
Şekil 4-11: Farklı sekanslara sahip iki Drp-1 siRNA ile transfekte edilmiş melanoma ve normal hücrelerdeki hücre canlılık oranları.....	55
Şekil 4-12: Farklı sekanslara sahip iki Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş melanoma ve normal hücrelerdeki hücre canlılık oranları.....	56
Şekil 4-13: Mdivi-1 ile muamele edilmiş melanoma hücrelerinde göç analizi. ....	57
Şekil 4-14: Mdivi-1 ile muamele edilmiş MeWo hücrelerinde yara çizgisi analizi. ....	58

Şekil 4-15: Mdivi-1 ile muamele edilmiş A375 hücrelerinde yara çizgisi analizi. ....	59
Şekil 4-16: Mdivi-1 ile muamele edilmiş WM793 hücrelerinde yara çizgisi analizi. ....	59
Şekil 4-17: Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş MeWo hücrelerinde yara çizgisi analizi. ....	60
Şekil 4-18: Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş A375 hücrelerinde yara çizgisi analizi. ....	61
Şekil 4-19: Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş WM793 hücrelerinde yara çizgisi analizi. ....	61
Şekil 4-20: Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde mitokondri membran potansiyeli analizi. ....	62
Şekil 4-21: Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde mitokondri membran potansiyeli analizi. ....	63
Şekil 4-22: Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde oksijen tüketim oranının belirlenmesi. ....	64
Şekil 4-23: Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde oksijen tüketim oranlarının belirlenmesi. ....	64
Şekil 4-24: Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde ekstraselüler asidifikasyon oranlarının belirlenmesi. ....	65
Şekil 4-25: Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde ekstraselüler asidifikasyon oranlarının belirlenmesi. ....	65
Şekil 4-26: Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde hücre içi kalsiyum miktarının belirlenmesi. ....	66
Şekil 4-27: Mfn 2 siRNA transfekte edilmiş hücrelerde hücre içi kalsiyum miktarının belirlenmesi. ....	66
Şekil 4-28: Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$ ve PGC1 $\alpha$ protein anlatımlarının belirlenmesi. ....	68
Şekil 4-29: Drp-1 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$ ve PGC1 $\alpha$ protein anlatımlarının belirlenmesi. ....	69
Şekil 4-30: Mfn2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$ ve PGC1 $\alpha$ protein anlatımlarının belirlenmesi. ....	70
Şekil 4-31: Normoksik ortamda Mdivi-1 ile inkübe edilmiş melanoma ve normal hücrelerin hücre döngüsü analizleri. ....	71

Şekil 4-32: Hipoksik ortamda Mdivi-1 ile inkübe edilmiş melanoma ve normal hücrelerin hücre döngüsü analizleri..... 72



## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACC1	Asetil-CoA karboksilaz 1
AMPK	AMP aktive edilmiş protein kinaz
BRN-2	POU domain sınıf 3 transkripsiyon faktörü
CamKK $\beta$	Kalmodulin bağımlı protein kinaz kinaz $\beta$
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CTCs	Dolaşan tümör hücreleri
DASPMI	Dimetilaminositrimetilpiridiniumiodine
Dnm11	Dynamine 1 benzer
Drp1	Dynamine-ilişkili protein 1
FCCP	Karbonil siyanid p-triflurometoksi fenilhidrazon
HIF1 $\alpha$	Hipoksi indüklenbilir faktör 1 $\alpha$
IA-YFP	Işıkla aktive olan yeşil floresan proteini
IP3R	İnositol-1,4,5-trifosfat reseptör
LDH-A	Laktat dehidrogenaz A
MAPK	Mitojen aktive edilmiş protein kinaz
Mdivi-1	Mitokondriyal bölünme inhibitörü 1 (mitochondrial division inhibitor-1)
Mff	Mitokondriyal fizyon faktörü
Mfn1/2	Mitofusin 1 ve 2
MITF	Mikrophthalmia ilişkili transkripsiyon faktörü
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MTR	Mitotracker red
OPA1	Optik atrophy 1
OTH	Oksijen tüketim hızı
PGC1 $\alpha$	Peroksizom proliferatör-aktive edilmiş gamma ko-aktivatör 1 $\alpha$
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
ROT	Reaktif oksijen türleri
RTK	Reseptör tirozin kinaz
RYR	Ryanodine reseptörü

siRNA	Küçük müdahil ribonükleik asit (small interfering ribonucleic acid)
TAK1	Aktive edilmiş kinaz 1
TGF $\beta$	Dönüştürücü büyüme faktörü $\beta$
TMRME	Tetrametilrhodamine metil ester
UV	Ultraviyole
VBAK	Voltaj bağımlı anyon kanalları
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
$\Delta p$	Proton güdümlü güç
$\Delta\Psi_m$	Mitokondri membran potansiyeli





## ÖZET

Dal Yöntem, F. (2017). Mitokondriyal dinamiğin düzenlenmesinde rol oynayan mekanizmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Mitokondri, hücrel strese karşı toplam kütle, hücre içi bağlantılar ve hücre altı lokalizasyon değişiklikleri ile cevap veren oldukça dinamik bir organeldir. Mitokondriyal kütledeki toplam değişim, mitokondriyal biyogenez (mitokondriye eklenen artmış protein kütleyle birlikte mitokondriyal genom katlanması) ve mitofaji arasındaki değişen dengeye etki etmektedir. Ek olarak, mitokondriyal kendi içinde bağlantılı bir şekilde uzamış halde bulunmaları mitokondriyal füzyon mekanizması ile açıklanırken, daha küçük çapta fragmente halde bulunan mitokondriyal füzyon mekanizmasıyla oluşur. Mitokondriyal fonksiyonlar ve mitokondriyal dinamikler (füzyon ve füzyon), apoptoz ve yaşlanma gibi biyolojik süreçlerin ve kanser başta olmak üzere birçok hastalığın moleküler mekanizmasının anlaşılmasında önemli role sahiptir. Mitokondriyal biyosentez ve degradasyon oranları tümör gelişiminin farklı aşamalarını etkileyebilir. Mitokondri, melanomagenезде de rol alan reaktif oksijen türlerinin (ROT) birincil üreticisidir ancak melanomageněz sürecindeki rolü hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Dolayısıyla kanser hücrelerinin değişken metabolizmasını hedef alan yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için bu mekanizmaların ayrıntılı bir şekilde açıklanması gerekmektedir. Bu noktadan yola çıkarak bu çalışmada melanoma hücrelerinde mitokondriyal dinamik değişimlerinin, hücrel enerji mekanizmaları üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu bağlamda mitokondriyal füzyon mekanizması, mitokondriyal füzyonu arttırmak amacıyla, mitokondriyal bölünme inhibitörü-1 (mdivi-1) ve Drp-1 siRNA kullanılarak inhibe edilmiştir. Daha sonra hücre ve mitokondriyal fonksiyon analizleri ve mitokondriyal biyogenezde rol alan proteinlerin ifadelerindeki değişimler western blot analizleri ile belirlenmiş ve değiştirilmiş mitokondriyal dinamiklerin melanoma tümör gelişimi üzerindeki etkileri ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: mitokondri dinamikleri, kanser, melanoma, füzyon, füzyon

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) 2214/A-Yurt Dışı Araştırma Burs Programı ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 51467

## ABSTRACT

Dal Yöntem, F. (2017). Mechanisms acting on regulation of mitochondrial dynamics. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Biophysics. PhD Thesis. İstanbul.

Mitochondria are highly dynamic organelles responding to cellular stress through changes in overall mass, interconnectedness, and sub-cellular localization. Change in overall mitochondrial mass reflects an altered balance between mitochondrial biogenesis (increased mitochondrial genome duplication combined with increased protein mass added to mitochondria) and rates of mitophagy. In addition, the extent to which mitochondria are interconnected to each other as a single continuous mitochondrial reticulum is determined by the extent of mitochondrial fusion while conversely, mitochondrial fission results in fragmented mitochondria of smaller overall dimensions. Research on mitochondrial fusion and fission (collectively termed mitochondrial dynamics) gained much attention in recent years, as it is important for our understanding of many biological processes, including the maintenance of mitochondrial functions, apoptosis and ageing. The rate of mitochondrial biosynthesis and degradation can affect various aspects of tumor progression. Mitochondria are the primary producers of reactive oxygen species, which are involved in melanomagenesis. However, the role of mitochondrial dynamics on melanomagenesis remains controversial and requires mechanistic understanding to target the altered metabolism of cancer cells. From this point of view in this study we investigated the effect of mitochondrial dynamic changes on cellular energy mechanisms at melanoma cells. In this context mitochondrial fission mechanism is inhibited with mitochondrial division inhibitor (mdivi-1) and knockdown with Drp-1 siRNA to induce mitochondrial fusion. Afterwards cellular and mitochondrial function analyses and changes in protein expressions related to mitochondrial biogenesis were determined with western blot analysis and effects of altered mitochondrial dynamics on melanoma tumor progression were revealed.

**Key Words:** mitochondrial dynamics, cancer, melanoma, fission, fusion.

The present work was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Department of Science Fellowships and Grants Program 2214/A International Research Programme and Research Fund of İstanbul University. Project No. 51467

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

1990’larda mitokondri hedefli floresan proteinler ve boyalar kullanılarak yapılan analizlerde canlı hücrelerdeki (mayalardan hepatositlere kadar), mitokondri şekil değişiklikleri ve füzyon olaylarıyla ilgili yapısal düzenlenmelerin detaylı ve dinamik görüntüleri elde edilmiştir. Dahası, elektron tomografi analizleri ile krista kavşakları ve bunların dinamik düzenlenişi gibi iç membran yapılarının da aydınlatılması sağlanmıştır. Füzyon ve fizyon proteinleri ile ilgili yapılan çalışmalarda ise, bu proteinlerin aktivitesindeki değişimlerin mitokondri yapısında değişikliklere neden olduğu ortaya konmuştur. Bu proteinler düzenlenerek hem füzyon hem de fizyon inhibe edildiğinde, mitokondri morfolojisi bazal durumdaki yapıya benzer bir şekil alır ve böylece bazal yapının bu iki süreç arasındaki dengenin bir sonucu olduğu ortaya çıkar. Her ne kadar birçok durumda mitokondrilerin şekil değişikliği, fizyon/füzyon dengesi açısından belirleyici olsa da füzyon ya da fizyon oranlarındaki artış hakkında karar verebilmek açısından kesin bir parametre değildir. Ayrıca mitokondri morfolojisinin yalnızca mitokondriyal dinamik bileşenlerine değil (mitokondriyal fizyon ve füzyonu düzenleyen proteinler) aynı zamanda mitokondrinin hücre içinde hareket etmek için kullandığı hücre iskeleti proteinlerine ya da bilinmeyen hücrel bileşenlere de bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda mitokondriyal füzyon proteinlerinin anlatımındaki bir değişim, mitokondrinin şekli dışında ayrıca bu organelin dağılımı ve hareketini de değiştirecektir. Bu gözlemler, hücre iskeleti bileşenleri ve/veya bilinmeyen hücrel bileşenler ile mitokondriyal füzyon proteinleri arasında bir ilişki olduğunu sezindirmektedir.

Mitokondriyal füzyon, dış ve iç membranın ayrı bir şekilde birleştiği iki aşamalı bir süreçtir. Bu süreç memeli mitokondriyal füzyonunda yer alan ilgili proteinlerin farklı alt lokalizasyonları ile açıklanabilir. Mitokondri dış membranında bulunan mitofusin 1 ve 2 (Mfn1 ve Mfn2) dış membran füzyonunda, mitokondri iç membranında bulunan OPA1 ise iç membran füzyonunda görev almaktadır. Ancak iç ve dış membranın koordine bir şekilde nasıl birleştiğini gösteren bir mekanizma henüz keşfedilmemiştir. Mitokondriyal fizyonu kontrol eden ana proteinler ayrıca peroksizomal fizyonu da düzenlemektedir. Ancak bu iki organelin fizyonunun paralel yürüyüp yürümediği bilinmemektedir. Dolayısıyla fizyon mekanizmasının

bileşenlerinin modülasyonu veya düzenlenmesinin fizyolojik sonuçlarının mitokondriyal morfoloji modülasyonundan mı, peroksizom dinamiklerinden mi yoksa her ikisinin ortak düzenlenmesinden mi olduğu sorusu da cevap beklemektedir. Mitokondriyal fizyon ile ilişkili ve ayrıca peroksizomlarda da bulunan en çok çalışılmış proteinler, mitokondri dış membranında bulunan dynamin-ilişkili protein 1/dynamin 1 benzeri (Drp1/Dnm1) ve fizyon protein 1 homolog (Fis1)'dur. Ancak halen iç membran fizyon mekanizmasının ayrıntıları bilinmemekte ve aydınlatılması gerekmektedir. Mayada iç membran fizyon mekanizması için tanımlanmış bir protein bulunsa da (Mdm33) bu proteinin herhangi bir memeli homologu tanımlanmamıştır. Her ne kadar mitokondri dinamiğiyle ilgili mekanizmalar yeteri kadar anlaşılmamış olsa da bu mekanizmada yer alan bazı proteinlerin hücrel metabolizma, apoptoz veya mitokondriyal DNA'nın korunması gibi çok temel biyolojik süreçlerde yer aldığı bilinmektedir. Mitokondriyal işlev bozukluklarının, obezite, tip 1 ve tip 2 diyabet, kanser, Parkinson hastalığı ve Alzheimer gibi çeşitli kompleks hastalıklarda rol aldığı bilinmektedir.

Deri kanserinin en ölümcül tipi olan melanoma insidans oranlarının gün geçtikçe arttığı belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile melanoma oluşumunun altında yatan temel biyolojik etkenlerin araştırılması ve yeni tedavilerin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu araştırma alanlarından biri belki de en önemlisi melanoma oluşumu sırasında mitokondride gerçekleşen değişimlerle ilgilidir. Bu tez çalışması, mitokondriyal dinamikleri düzenleyen mekanizmaları, özellikle mitokondri fizyon ve füzyonu bağlamında araştırarak melanoma ile ilişkisinin aydınlatılmasını ve böylece literatürdeki eksikliklerin tamamlanması hedeflenmektedir.

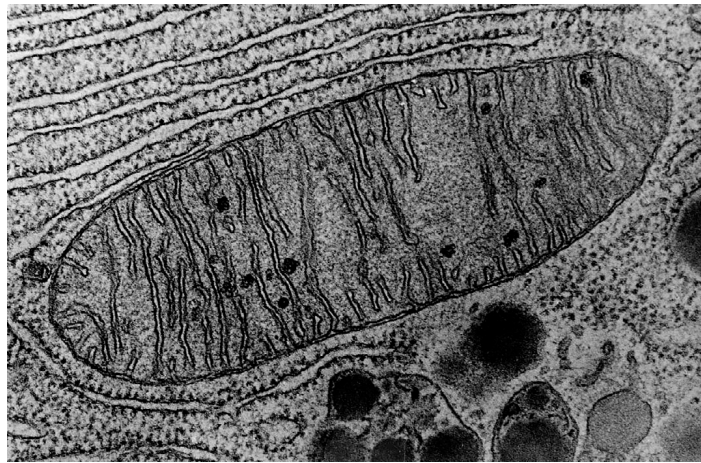
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mitokondri

Mitokondri hücrenin güç merkezi veya güç kaynağı olarak adlandırılan organeldir. Mitokondriler oksidatif reaksiyonlar sonucu oluşan enerjiyi yüksek enerjili ATP şeklinde saklar. Bu mekanizma oksidatif fosforilasyon adı verilen süreçte  $F_1F_0$ ATPaz üzerinden ATP'nin sentezlenmesi şeklinde işler. Mitokondrinin ATP sentezi dışında yağ asidi oksidasyonu ve sitrik asit döngüsünde görev aldığı ve ayrıca glukoneogenez ve üre sentezinin de bu bölgede başladığı bilinmektedir. Ayrıca mitokondri apoptozda da rol oynamaktadır. Bu nedenle mitokondri hücre yaşam ve ölüm süreçlerini kontrol eden hayati bir organeldir ve hücrelerin normal fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için uygun mitokondriyal kalite ve sayısının devamlılığını sağlamaları gerekir (1).

#### 2.1.1. Mitokondrinin Yapısal ve İşlevsel Özellikleri

Tipik bir mitokondri 0.5  $\mu\text{m}$  çapında ve 0.5  $\mu\text{m}$ 'den birkaç mikrona kadar değişebilen uzunluktadır (Şekil 2-1) (2). Basit bir benzetimle, mitokondri yaklaşık olarak bir bakteri büyüklüğündedir. Mitokondrinin şekli ise hücre tipine ve hücrenin metabolik aktivitesine göre değişir (Şekil 2-2) (3). Karaciğerde mitokondriler genel olarak uzun iplikler şeklindedir ancak aynı hücrelerde kısa çubuk şeklinde mitokondriler de gözlenir. Adipoz hücrelerindeki mitokondriler ise genellikle yuvarlak şeklindedir.



**Şekil 2-1: Mitokondri'nin yapısı.**

Yarasa pankreasından uzunlamasına bir mitokondri kesiti.

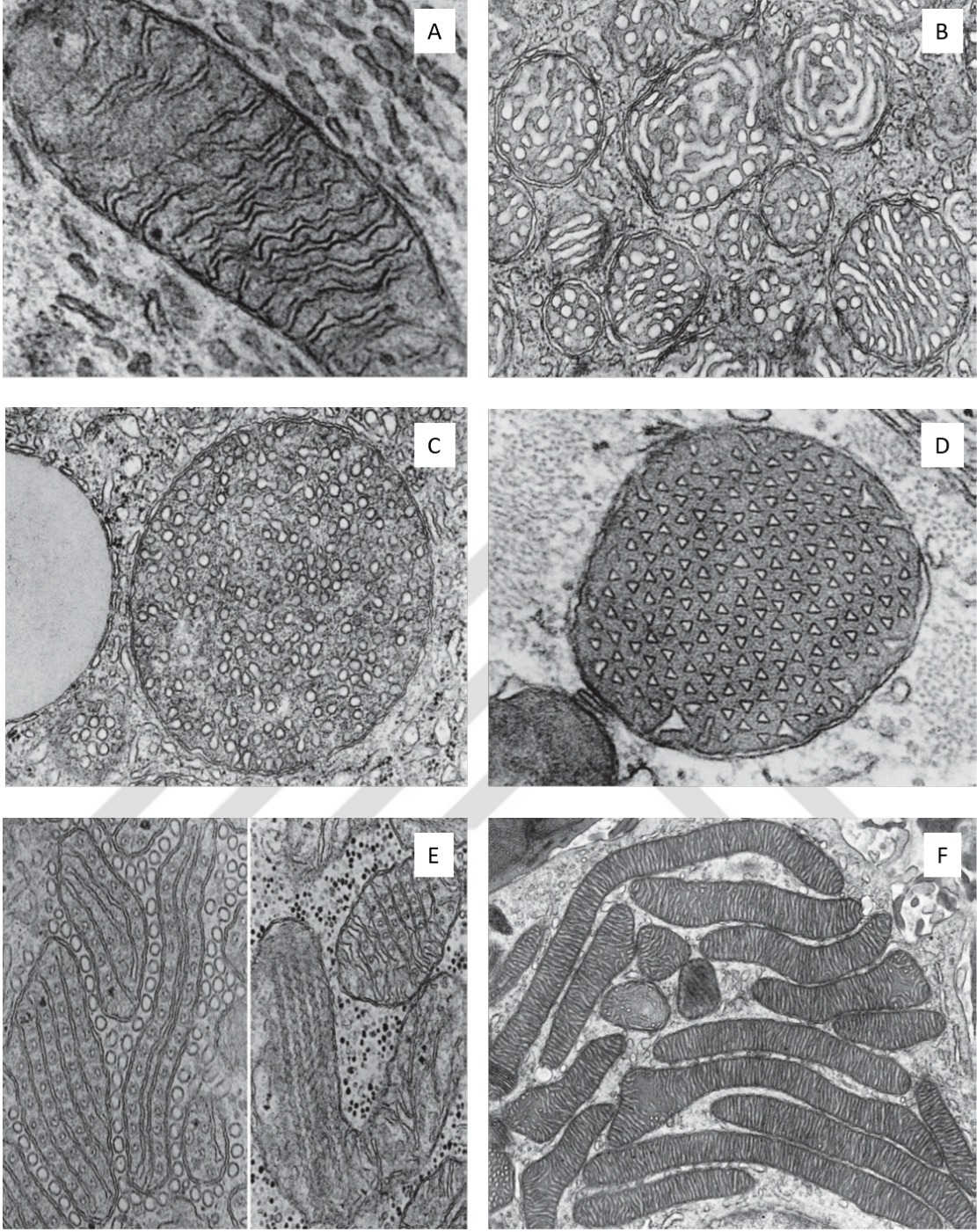
Mitokondri, dış membran, iç membran, iç ve dış membran arası bölge ve matriksten oluşur. Bu bölümlerin her birinin farklı görevleri bulunmaktadır (Tablo 2-1). İç ve dış membranın kompozisyonu ve şekli önemli ölçüde farklıdır. Membranların yapıları temel olarak proteinler ve fosfolipidlerden oluşmuştur. Ancak özellikle fosfolipidler, yapılarındaki yağ asitlerinin kompozisyonu açısından farklılıklar gösterir. İç membrandaki fosfolipidler doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır. İç membrandaki fosfolipidlerin yaklaşık %19'u kardiolipin, %4'ü fosfatidilinositol şeklinde bulunurken bu oran dış membranda sırasıyla %4 ve %14 civarındadır. Kardiolipin, membran çalışmalarında, mitokondri membran kesimlerinin belirtiminde kullanılan bir belirteçtir. Mitokondride bulunan fosfolipidlerin bazılarının *in situ* sentezinde mitokondriyal kompartmanlarda bulunan enzimler görev alır. Ancak fosfolipidlerin bazıları mitokondri dışında sentezlenerek mitokondri içine alınır (4). Pürüzsüz bir yapısı olan dış membran organelin şeklini korumada görevlidir ve % 30-40 oranında lipid ve % 60-70 oranında protein içerir (5). Dış membranda bulunan proteinler yoğun olarak beta katlanmaları içeren porin-a proteini bakımından zengindir. Bu katlanmalar membran üzerinde geniş kanallar oluşturur ve böylece molekül ağırlığı 10.000'den küçük moleküllerin serbest difüzyonuna olanak tanır. Bu kanallar voltaj bağımlı anyon kanalları (VBAK) olup 5 kDa ağırlığına kadar olan çözünmüş maddelere (solute) karşı geçirgendir. ADP ve ATP gibi küçük moleküller böylelikle dış membrandan kolayca geçer. Ancak dış membrandan iyon taşınımı çoğunlukla iyonun yüküne bağlıdır bu nedenle NAD ve NADH<sup>+</sup> bu membranlar üzerinden mitokondriye giremez.

Mitokondrinin iç membranının matrikse doğru birçok kıvrımı bulunur ve bu kıvrımlar metabolik aktiviteler için yüzey alanının arttırılmasında görev alır. İç membrandaki bu kıvrımlar krista adı verilen lamellar yapıları oluşturur. İç membranın matrikse dönük bölümünde kristalar üzerinde ATP sentazın multi-alt ünitesi veya F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPaz ile ilişkili birçok küçük küresel yapı bulunur. İç membran yalnızca su, oksijen ve karbondioksit karşı geçirgendir ve bu nedenle birçok molekül ve iyonun mitokondri iç membranından geçişi için özel taşıyıcılara ihtiyacı bulunur.

Mitokondri yapı ve fonksiyonları açısından türler arasında önemli benzerlikler göstermektedir (6). Ancak bir canlıdaki mitokondri sayısı ve şekli hücreden hücreye değişmektedir. Karaciğer hücresi yaklaşık 800 mitokondri içerirken kemik hücreleri 400'den az, eritrositler ise hiç mitokondri içermemektedir. Buna karşın ovum 2000 ile

20000 arası mitokondri içermektedir. Mitokondriler sitoplazma içerisinde sito-iskelet motorları tarafından düzenli bir şekilde dağıtılmıştır (7, 8). Yüksek enerjiye ihtiyaç duyan hücrelerde mitokondriler enerji ihtiyacının yüksek olduğu bölgelerde konumlanır. Örnek olarak kas hücrelerinde mitokondriler kasılan kas lifleri civarında bulunma eğilimi gösterir. Kas kasılması, mitokondride sentezlenen kreatin fosfat ve ATP tarafından karşılanan enerjiyle gerçekleşir. Aynı şekilde hızlı bölünen hücrelerde *de novo* protein sentezi ATP tarafından sağlanan enerjiye bağımlı olduğu için, mitokondriler nukleus ve ribozomlara yakın bulunur. Sinir hücrelerinde ise mitokondriler sinir iletiminin gerçekleştiği yerlere yakın olarak bulunur. Bu nedenle ATP üretimi veya erişebilirliğindeki herhangi bir kısıntı merkezi ve periferik sinir sisteminin fonksiyonunu etkiler.





**Şekil 2-2: Farklı hücre tiplerinde mitokondri şekilleri.**

(A) Ventriküler kardiyak kasında köşeli kristalları bulunan mitokondri. (B) Amipte tübüler kristallı mitokondri. (C) Adrenal kortekste bulunan mitokondri. (D) Astrositlerde bulunan mitokondri. (E) Balık psödokolunda bulunan mitokondriler. (F) Adrenal kortekste bulunan mitokondri (Steroid salgılayan hücrelerde).



**Tablo 2-1 Mitokondriyi oluşturan bölümler ve fonksiyonları.**

<b>Bölüm</b>	<b>Fonksiyon</b>
Dış membran	Nöroaktif aromatik aminlerin oksidasyonu Kardiolipin sentezi Sitoplazmada sentezlenen proteinlerin alımı İyon transferi
İç-dış membran arası bölge	Adenin nükleotid dengesinin korunması Kreatin kinaz ve bu bölgede konumlanan adenilat kinaz Solunum zincirinde kompleks III'ten kompleks IV'e elektron transferi Mitokondriye alınan proteinlerin işlenmesi
İç membran	Oksidatif fosforilasyon Piridin nükleotidlerinin transferi Kalsiyum iyon transferi Metabolitlerin taşınımı (piruvat, $H_2PO_4^-/OH^-$ , dikaboksilatlar, sitrat/malat, karnitin/asilkarnitin)
Matriks	Piruvatın asetil CoA'ya oksidasyonu Keton cisimlerinin oksidasyonu Amino asitlerin oksidasyonu Üre döngüsünün başlatılması Yağ asidi oksidasyonu Mn-SOD üzerinden serbest radikal hasarının baskılanması Alınan proteinlerin işlenmesi Oksidatif fosforilasyonun 13 bileşeninin sentezi

### 2.1.2. Mitokondri Morfolojisinin Dinamikleri

İç mitokondriyal hareketler uzun süreli gözlem gerektirdiğinden, sitoplazmik akışı bulunmayan hayvan hücreleri, fungal iplikçikler, alg hücreleri ve bitki hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenmiştir (9). Hareket halindeki mitokondrilerin uzun eksenleri doğrultusunda dakikada 2-30 µm yer değiştirme özelliklerinin olduğu belirlenmiştir. Bu yer değiştirme, mitokondrinin şeklinde de eksen üzerinde hafif kalınlaşmalar ve büzölmeler şeklinde kristanın bölgesel iç düzenlenmesini yansıtan değişimlere yol açmaktadır. Mitokondride gözlemlenen bu iç dinamik değişimleri mitokondriyal füzyon ve fizyon olarak adlandırılır (10-13). Mitokondri dinamikleriyle ilgili çalışmalara ilk olarak 1915 yılında başlanmış ve 1990'lı yıllara kadar transmisyon elektron mikroskopunda gözlenen mitokondriler genellikle fasulye şeklinde çift membranlı organeller olarak belirtilmiştir. 1990'lı yıllarda ışık mikroskopunun ve floresan işaretçilerin gelişmesi ile birlikte canlı hücrelerdeki mitokondri dinamikleri gözlenebilmiştir (14). Işıkla aktive olan yeşil floresan proteininin (IA-YFP) geliştirilmesi ile birlikte tek bir mitokondrinin dinamik değişimlerinin izlenmesi mümkün hale gelmiştir (15). Mitokondriyal füzyon ve fizyon birçok organizma ve hücre tipinde gözlenmiş olsa da mitokondriyal dinamiklerle ilişkili genlerin anlatımı ilk olarak Hales ve arkadaşları tarafından 1997 yılında *Drosophila*'da tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (16). *Drosophila*'da bulunan fuzzy onions (Fzo) geni *Drosophila* spermatidlerinde mitokondriyal füzyonun gerçekleşmesinde görevlidir. Fzo genindeki mutasyonların abnormal sperm gelişimi ve kısırlıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir. *Drosophila*'da bulunan Fzo genine benzer mitokondri füzyonunda görevli genler bu çalışmadan sonra *C.elegans* (Fzo-1), *S. cerevisiae* (Fzo1) ve memeliler (Mitofusin 1 ve 2) gibi birçok farklı organizmada da belirlenmiştir (17-19). *S. cerevisiae* ve *C. elegans*'da yapılan mutasyon analizleri mitokondriyal dinamikleri ile ilişkili ikinci bir bileşeni ortaya çıkarmıştır. Mayada bulunan Dnm1 ve solucandaki homologu Drp-1 eş zamanlı olarak tanımlanmış ve her ikisinin de mitokondriyal fizyon için gerekli faktörler oldukları belirlenmiştir (20, 21).

### 2.1.2.1. Mitokondriyal Fizyon

Mitokondriyal fizyon bir organizmadan diğerine az oranda değişiklikler gösterse de ana bileşenleri korunmuştur. Genel olarak mitokondriyal fizyonda Fis1 ve dinamin-ilişkili protein Dnm1/Drp1 görev almaktadır (20, 22, 23). Mayada bulunan Dnm1 sitozolde ve mitokondri dış membranı üzerinde nokta şeklinde yapılar halinde bulunurken, memelilerde bulunan Drp1 genellikle sitozole dağılmış olarak bir kısmı da mitokondri dış membranında nokta şeklinde bulunmaktadır (24, 25). Dağılımlarındaki farklılıklara rağmen Dnm1/Drp1 mayada, solucanlarda ve memelilerde mitokondriyal fizyonda, mitokondrinin bölünmesinde görevli proteinler olarak dış membranda konumlanırlar (26). Dnm1/Drp1, dimer/tetramer yapıları oluşturmalarının yanı sıra halka-şeklinde yapılar halinde de organize olur (27). Mitokondriyal fizyonda görev alan proteinlerin birçoğu dinamin GTPaz protein ailesinin üyesidir ve endositik formlarına benzer şekilde etki gösterirler. Fizyon sırasında dinamin homologları Dnm1/Drp1 dış membran boğum bölgesine aracı proteinler tarafından taşınır ve bu bölgede mitokondriyi sarmal şeklinde saran büyük homomultimetrik yapılar oluştururlar. Dnm1/Drp1'in mitokondriye taşınmasında görevli proteinler ilk olarak mayada yapılan genetik taramalar sonucunda keşfedilmiştir. Fis1p, mitokondri dış membranında bulunan ve mitokondriye C-terminal transmembran domain ile bağlı bir proteindir (22). Fis1p'nin sitozele dönük kısmı dinamin ile bir tetratrikopeptid tekrarı domaini üzerinden etkinleşerek fizyonu başlatır. Fis1 proteininin memelilerde susturulması ile mitokondriyal tübüllerin bağlanmasında bir artış gözlemlenirken, Fis1'in fazla anlatımı ile mitokondriyal fragmentasyonun arttığı belirlenmiştir (28). Son yapılan çalışmalarda mitokondriyal bölünmede görevli ikinci bir dış membran proteini, mitokondriyal fizyon faktörü (Mff), belirlenmiştir (29). Dnm1/Drp1 ve Fis1 mitokondriyal fizyonda en iyi karakterize edilmiş proteinlerdir ancak mayalar ve solucanlarda yapılan çalışmalar bu proteinlerin yalnızca dış membran fizyonunda görevli olabileceğini düşündürmektedir. *C.elegans*'da Drp-1'in mutant formlarının anlatımının olduğu mitokondrilerde iç membran fizyonu gerçekleşirken, Drp-1'in dış membrana ince tübüller ile bağlı olduğu belirlenmiştir (21). Benzer şekilde mayalarda *Adnm1* mutantlarının matrikslerinin ayrılmasına rağmen mitokondriyal fizyonu tamamlayamadıkları belirlenmiştir (30). Bu bulguların ışığında Dnm1/Drp1 ve Fis1'in iç membran fizyonu için gerekli olmadığı ve bu süreci başka bileşenlerin yürüttüğü belirlenmiştir.

### 2.1.2.2. Mitokondriyal Füzyon

Mitokondriyal füzyonun karşıtı olan mitokondriyal füzyon, iki veya daha fazla mitokondrinin bir araya gelerek tek bir büyük mitokondri oluşturması olarak tanımlanmaktadır. Karmaşık bir süreç olan mitokondriyal füzyon, iki komşu organelin birbirine bağlanması ve iki bağımsız membranın (mitokondri iç ve dış membranları) hücreyi ölüme sürükleyebilecek önemli herhangi bir mitokondriyal protein kaybı olmaksızın (örn. sitokrom c) uyum içerisinde kaynaşması şeklinde gerçekleşmektedir. Mitokondriyal füzyonla ilişkili ilk genetik bileşen *Drosophila* spermatogenezinde yapılan çalışmalarda mayozun devamındaki süreçte hücredeki mitokondri popölasyonunun tamamının Nebenkern adı verilen iki organel şeklinde birleşmesi ile keşfedilmiştir. Nebenkern'in memelilerdeki homologları olan Mfn1 (mitofusin 1) ve Mfn2 (mitofusin 2) ve mayadaki homologu Fzo1p dış membran füzyonunda görevlidir (18, 31). Her ne kadar Mfn1 ve Mfn2 kendi içinde %80 benzerlik gösterse de yapılan çalışmalar fonksiyonel farklılıklarının bulunduğunu göstermektedir. İki transmembran domaini ile dış membrana bağlı olan Fzo-benzeri proteinlerin, bir GTPaz domaini ve sitozele bakan iki eş sarmal bölgeleri bulunmaktadır. İki eş sarmal domain, Fzo-benzeri proteinler ile komşu mitokondri arasında homotipik bağlanmaya aracılık ederler ve organellerin bu şekilde bağlanması ile dış membran füzyonu başlar (32). İ membran füzyonu, mayada Mgm1p, memelilerde ise OPA1 adı verilen ve iç membran bölgesinde bulunan dinamin benzeri bir GTPaz ile kontrol edilmektedir (33, 34). OPA1'in insan hücrelerinde tek bir genin farklı transkripsiyon kesimleri (transkript splicing) ile oluşmuş sekiz adet varyantı bulunmaktadır (35). Benzer bir süreç OPA1'in mayada bulunan homologu Mgm1p'de de gerçekleşmektedir. Hem OPA1 hem de Mgm1p'nin uzun ve kısa izoformlarının kombinasyonu ise mitokondri iç membran füzyonu için gerekmektedir. Mayada yapılan *in vitro* alışmalar iç ve dış membran füzyonlarının mekanik olarak birbirinden farklı olduğunu göstermektedir (36). Ancak dış membranda bulunan Fzo1p ile iç membranda bulunan Mgm1p arasında adaptör bir protein olan Ugo1p tarafından aracılık edilen bir etkileşim bulunmaktadır (37). İnsan hücrelerinde ise Fzo1p ve Mgm1p'nin homologları olan Mfn1 ve OPA1 arasında direk bir etkileşim olabileceği ve Ugo1p'nin herhangi bir homologunun olmadığı bildirilmiştir (38). Hem iç hem de dış membran füzyonu için enerji gerekmektedir ve bu enerji GTP hidrolizinden sağlanmaktadır ancak iç membran için ayrıca elektrokimyasal membran potansiyelinin de sürdürölmesi gerekmektedir (36).

### 2.1.2.3. Mitokondriyal Dinamikler ve Hücre Döngüsü

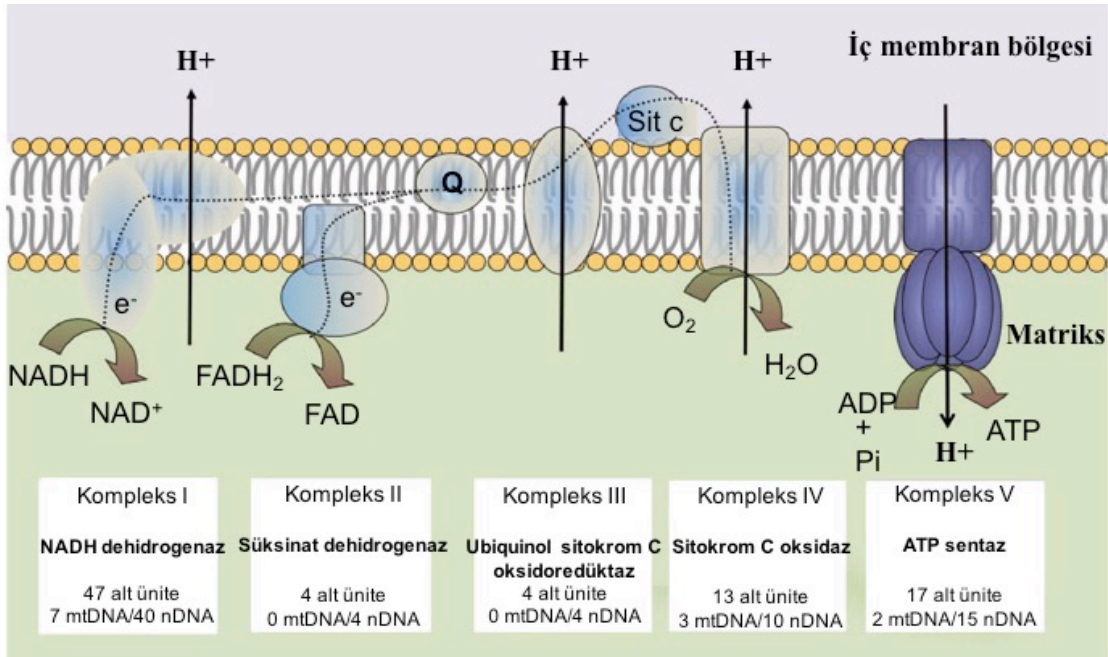
Mitokondriler hücre bölünmesi sürecinde ana hücrelerden kalıtsal olarak aktarılmakta ve var olan organellerin bölünmesi ile *de novo* sentezlenmektedirler. Hücre döngüsü boyunca mitokondriler aralıksız bir şekilde büyür ve mitokondriyal ağ hücre döngüsünün farklı fazları arasında çok yönlü bir biçimde kontrol edilir. G1/S geçişinde mitokondri tek, büyük bir tübüler ağ oluşturur (39). Hücre döngüsünün bu fazında bulunan mitokondriler, oldukça enerji harcanan bir aşama olan DNA sentezinin başlatılması için hiperpolarize bir şekilde bulunurlar (39). Ayrıca bu gibi mitokondriyal hiperfüzyonlar hücre içerisinde homojen bir mitokondriyal ağ oluşturabilmek adına komşu mitokondriler arasında mitokondriyal DNA yanısıra mitokondriyal bileşenlerin de eşit bir şekilde dağılımına da olanak sağlar. G1/S geçişinde görülen hiperfüze mitokondrilerin bu durumu geçicidir. Devam eden S, G2 ve M fazlarında hiperfüze mitokondriyal ağ birbirinden ayrılarak artan bir şekilde fragmente hale geçmektedir. Yapılan çalışmalar G1/S geçişinden sonra hücre döngüsünün sorunsuz bir şekilde devam edebilmesi için Drp-1 aracılıklı mitokondriyal fizyonunun gerektiğini göstermiştir (40). Mitokondriyal ağın kapsamlı fragmentasyonu, mitozda kardeş hücrelere eşit oranda mitokondriyal bileşenin dağıtılabilmesi için gerçekleşmektedir. Mitotik mitokondriyal fizyonlar mitozla ilişkili kinazlar tarafından direkt olarak düzenlenmektedirler. Mitotik kinaz Aurora A tarafından fosforillenme, efektör RalBP1'i toplayan RalA'nın mitokondriyal membranlarda yeniden konumlanmasını kolaylaştırmaktadır. RalBP1, mitokondriyal fizyon ile sonuçlanan Drp1'in Ser616 fosforillenmesini arttıran siklin B/siklin bağımlı kinaz 1 (cdk1) için bir iskele olarak işlev göstermektedir (41). G1/S geçişinin ötesinde devam eden mitokondriyal hiperfüzyon replikasyon stresini indükleyerek ATM (Ataxia-telangiectasia mutasyonuna sahip) bağımlı G2/M gecikmesine ve mitoz boyunca kromozomal dengesizliğe sebep olmaktadır (40). Replikasyon stresinin hiperfüze mitokondriler tarafından oluşturulan sabit replikasyona başlama sinyalinden kaynaklandığı belirlenmiştir (39, 40). Devam eden bir mitokondriyal füzyon ayrıca kardeş hücreler arasında mitokondriyal köprülerin kurulmasına yol açarak hatalı sitokinez, mitokondrinin eşit olmayan dağılımı ve anaploidiyle sonuçlanan kromozomların yanlış ayrılması gibi durumlara da yol açmaktadır.

#### 2.1.2.4. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin Görüntülenmesi ve Sayısallaştırılması

Günümüzde canlı hücrelerde mitokondrilerin görüntülenmesi, bu organellerin ya seçici olarak küçük florokromlarla ya da floresan proteinlerle işaretlenmesi ile oldukça basit bir hale gelmiştir (42). Rhodamine 123, Tetrametilrhodamine metil ester (TMRME), Dimetilaminositrillmetilpiridiniumiodine (DASPMI), JC-1, JC-4 ve Mitotracker Red (MTR) gibi küçük florokrom moleküllerin işlevsellikleri büyük oranda mitokondri membran potansiyeline ( $\Delta\Psi_m$ ) bağlıdır. Mitokondri tarafından alınımı  $\Delta\Psi_m$  bağlı olan MTR'nin proteinlere kovalent olarak bağlanması boyanın birleşmesini sabit kılar ve böylece kimyasal bir fiksasyona ihtiyaç duyulmaz. Mitokondriler kendileri de floresan yapıdadır; flavoproteinler ve NADH floresanı redoks durumunu belirtmekte ve böylece sayısallaştırılabilmektedir (43, 44). Mitokondriyi hedef alan floresan proteinler yalnızca matrikse özel olmadığından solunum zincirinin her bir kompleksi,  $F_1F_0$ -ATP-sentaz ve dış membran proteinlerinin işaretlenmesinde de kullanılmaktadır. Çok sayıda proteinin işaretlenmesi ya birden fazla floresan proteinin transfeksiyonu ya da floresan protein işaretlemesinin  $\Delta\Psi_m$  duyarlı boyalarla kombine edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Mitokondriyal floresan protein vektörlerinin tamamı mitokondriyal matriksi belirlemek için sitokrom c oksidaz alt ünite VIII sekansını hedef almaktadır (45). Mitokondriyal dinamik değişimlerinin yaşlanma da dahil birçok hastalık için önemi keşfedildikten sonra farklı fizyolojik ve patolojik süreçlerde bu değişimlerin izlenmesi ve sayısallaştırılması için istatistiksel metotlarla da değerlendirmeler yapılmaktadır. Şekil değişiklikleri, hücre içi trafiğin izlenmesi ve membran potansiyeli için yapılan düzenlenmeler sayısallaştırma işlemi için temel oluşturmaktadır. Fragmente/küresel, şişkin, uzamış veya birbirine bağlanmış gibi sınıflandırmalar mitokondri şeklinin karakterize edilebilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (46, 47).

### 2.1.3. Mitokondriyal Elektron Transferi ve Oksidatif Fosforilasyon

Oksidatif fosforilasyon elektron donörleri (NADH ve protein bağlı  $\text{FADH}_2$ ) ile elektron taşıyıcılarının (ubiquinone ve sitokrom c) yardımıyla, beş multimerik enzim kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir (Şekil 2-3). Oksidatif fosforilasyon kompleksleri; NADH-ubiquinone oksidoredüktaz (Kompleks I), süksinat-ubiquinone oksidoredüktaz (Kompleks II), ubiquinol-sitokrom c oksidoredüktaz veya sitokrom  $\text{bc}_1$  kompleksi (Kompleks III), sitokrom c oksidaz (Kompleks IV) ve  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP sentaz'dır (Kompleks V). Elektron transfer zincirini/sistemini (solunum zinciri) kompleks I-IV oluşturmaktadır. Elektron transfer zincirinin temel görevi iç mitokondriyal membranda (IMM) bir  $\text{H}^+$  gradiyenti oluşturmaktır. Oluşan bu  $\text{H}^+$  gradiyenti,  $\text{H}^+$  akışına da olanak sağlayarak ATP sentezini yürüttüğü için ayrıca proton güdümlü güç ( $\Delta p$ ) olarak da tanımlanmaktadır.  $\Delta p$ 'nin,  $\Delta\Psi_m$  ve pH gradiyenti olmak üzere iki bileşeni bulunmaktadır (48) ve  $\text{H}^+$ 'nin mitokondri iç membran bölgesinden matrikse doğru akışını kompleks V üzerinden yürütmektedir (49).  $\text{H}^+$ 'nin, kompleks V üzerinden matrikse akışı,  $\Delta p$ 'nin potansiyel enerjisini ADP ve inorganik fosfatı (Pi) ATP'ye dönüştürmek üzere kinetik enerjiye çevirir. Kompleks V döngü başına 2.7  $\text{H}^+$ /ATP kullanarak 3 ATP yapmaktadır (50). Sırasıyla dışarıya 4, 4 ve 2  $\text{H}^+$  pompalayan kompleks I, III ve IV  $\Delta p$ 'nin oluşumuna katkıda bulunur ve  $\text{H}^+$  pompalanması sırasında NADH ve  $\text{FADH}_2$  oksidasyonları sonucu serbest kalan elektronları ( $e^-$ ) eş zamanlı olarak transfer ederler (Şekil 2-3). Elektronların transferi kompleks I ve II'den kompleks III'e ubiquinone ( $\text{CoQ}_{10}$ ), kompleks III'ten kompleks IV'e ise sitokrom c tarafından gerçekleştirilir. Kompleks IV sitokrom c'den gelen 2 elektronu kullanarak moleküler oksijeni ( $\text{O}_2$ ) suya ( $\text{H}_2\text{O}$ ) redükler. Bu nedenle oksijen tüketim oranının belirlenmesi solunum zinciri fonksiyonlarının denetlenmesi için uygun bir ölçek olmaktadır.



**Şekil 2-3: Mitokondriyal solunum zinciri.**

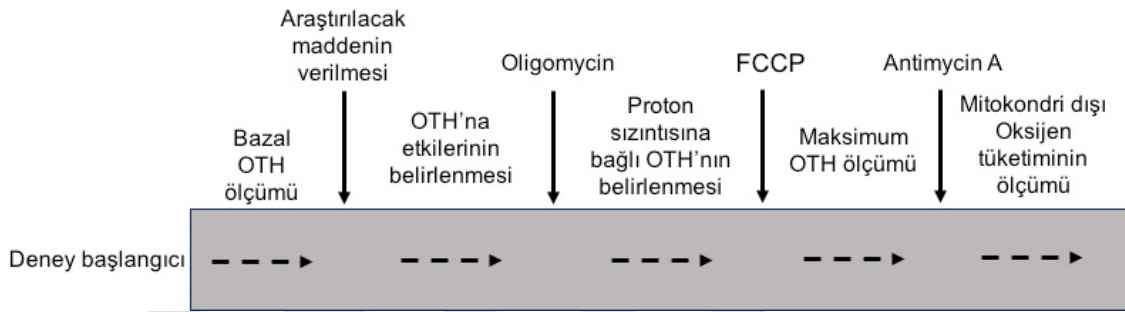
Memelilerde solunum zinciri dört enzim kompleksi (kompleks I-IV) ve iki ara substratı (koenzim Q ve sitokrom c) içermektedir. Ara metabolizma tarafından oluşan  $\text{NADH}^+$ ,  $\text{H}^+$  ve  $\text{FADH}_2$  mitokondriyal solunum zincirinde protonların elektrokimyasal gradientini oluşturmak üzere oksitlenerek ATP üretmek için F1F0-ATP sentaz (kompleks V) tarafından kullanılır.

### 2.1.3.1. Respirometre ile Oksidatif Fosforilasyonun Fonksiyonel Analizi

Fizyolojik koşullar altında sağlıklı hücreler için kullanılan respirometre özellikle oksidatif fosforilasyonla ilgili bilgi elde etmek için kullanılmaktadır. Rotenone ve antimycin A gibi inhibitörler kullanarak mitokondriyal ve mitokondriyal olmayan solunumu belirlemek mümkündür (Şekil 2-4). Mitokondri iç membranı  $\text{H}^+$ 'ya karşı tamamen geçirimsiz olmadığı için  $\text{H}^+$ 'lar kompleks V'e ihtiyaç duymadan da tekrar matrikse geçebilirler. Bu nedenle  $\text{H}^+$  sızıntısı ile yürütülen solunum aktivitesi ATP sentezi ile bağdaştırılmamaktadır.  $\text{H}^+$  sızıntısı oligomycin'e karşı duyarlı olmadığı için oligomycin duyarlılık testi ATP-dönüşümünü destekleyen solunum aktiviteleri ve  $\text{H}^+$  sızıntısı hakkında ölçüm yapılmasını olanaklı kılmaktadır (51). Her hücre tipinin karbonil siyanid p-triflurometoksi-fenilhidrazon (FCCP) gibi bir ayrıştırıcı (uncoupler) ile belirlenebilen bir rezerve solunum kapasitesi bulunmaktadır (Şekil 2-4). Ayrıca solunum kapasitesi kullanılan karbon bileşenlerine (örn. glukoz, piruvat, glutamin) ve oligomycin varlığına göre de değişebilmektedir.



Plazma membranı ADP'ye karşı geçirimsiz olduğu için sağlıklı hücreler kullanılarak oksidatif fosforilasyon kapasitesi (maksimal ADP-uyarımlı solunum) belirlenmemektedir (52-54). Bu nedenle aynı koşullardaki sağlıklı ve geçirgenliği arttırılmış hücrelerle yapılan seri ölçümler gerekmektedir. Bu tür seri ölçümlerle oksidatif fosforilasyon ve solunum kapasiteleri ile ilgili elde edilen veriler, ilaçların oksidatif fosforilasyon üzerindeki direkt ve indirekt etkilerinin araştırılmasına da olanak sağlamaktadır.



**şekil 2-4: Mitokondriyal fonksiyonların intakt hücrelerde belirlenmesi.**

OTH; oksijen tüketim oranı, FCCP; karbonil siyanid p-triflurometoksi-fenilhidrazon.

### 2.1.3.2. Oksidatif Fosforilasyon Bozuklukları ve Kanser

Tümör oluşumu, başlangıç, yükselme ve ilerleme süreçlerini kapsayan çok aşamalı bir süreçtir. Tümör oluşumunu baskılayan genlerin fonksiyonlarını bozan genetik ve epigenetik değişiklikler (örn. p53, p16, pRB, PTEN) hücrelere ölümsüzlük kazandırarak tümör oluşumunu desteklemektedir. Aynı koşullar onkogenlerin (Ras, Myc, AKT1) fonksiyonlarını da direkt veya indirekt olarak etkileyebilmektedir (55). Onkogenlerin aktivasyonu ile ölümsüzleşmiş hücreler, tümör oluşum sürecinde kritik bir aşama olan kontrolsüz büyüme potansiyelini kazanmış olur. Bu durum hücrelerin sınırlı besin kaynağında gelişimi için adaptasyonu, gelişimi desteklemek için makro moleküllere (protein, lipid ve nükleotid) olan ihtiyacın artışı ve sınırlı oksijen kaynağı nedeniyle hipoksik koşullara adaptasyon gibi özelliklerini ortaya çıkmasını sağlar (56). Anabolik süreçleri desteklemek için metabolik değişim ve oksijenin varlığına olan ihtiyacın azaltılması, tümör hücrelerinin hipoksik koşullarla başa çıkabilmesi için verdiği temel fizyolojik cevaplardır. Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1  $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) hipoksik koşullarla adaptasyonda rol alan anahtar proteindir (56, 57). Sirt3 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-3), CHCHD4 (Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 4) ve NDUFA4L2 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha

subcomplex, 4-like 2) gibi mitokondride lokalize olan proteinler ise oksidatif fosforilasyon aktivitesini direkt olarak hipoksik cevap ve kanser gelişimine bağlı olarak göstermektedir.

Normal koşullarda glikoliz süreci sitoplazmada gerçekleşmekte ve sonucunda iki ATP elde edilmektedir. Glikolizin son ürünü olan piruvat oksidatif fosforilasyon için yakıt olarak kullanılmaktadır. Aerobik koşullar altında piruvat mitokondriye girerek, trikarboksilik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyonu başlatan oksoloasetat ile birleşen asetil CoA'ya oksitlenmektedir. Anaerobik koşullarda ise piruvat sitoplazmada laktat dehidrogenaz A (LDH-A) varlığında laktata redüklenmektedir. Kanser gelişiminde oksidatif fosforilasyonun kısmi geri dönüşümsüz hasarı 1956 yılında Otto Warburg tarafından keşfedilmiştir (58). Aerobik glikoliz (Warburg etkisi) olarak bilinen bu durum, normal dokulara göre kanserli hücrelerde yeterli oksijen varlığında bile glukoz başına daha fazla laktat üretimine dayanmaktadır. Tek bir glukoz molekülünden glikoliz sonucunda elde edilen ATP, oksidatif fosforilasyon sonucunda elde edilenden 15 kat daha düşük olmasına rağmen, glikoliz tek başına ciddi solunum eksikliği olan hücrelerde proliferasyonu desteklemek için yeterli olmaktadır (59). Kanser hücrelerinin farklı kökenlerden oluştuğu göz önüne alındığında, bu hücrelerde ATP sentezini her zaman glikoliz üzerinden gerçekleştmediği görülmektedir. Dahası kanser hücrelerinin glikolizi birincil ATP üretim kaynağı olarak kullanım oranları % 1-64 arasında değişmektedir (60). Warburg kanser hücrelerindeki aerobik glikolizin, mitokondriyal fonksiyonu geri dönüşümsüz olarak bozduğunu öngörmüştür. Ancak bu görüş son yıllarda yapılan çalışmalarda birçok kanser hücresinde mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun sağlıklı bir şekilde yürütüldüğünün gösterilmesi ile çürütülmüştür (61). Böylelikle kanser hücrelerinde görülen glikolitik fenotipin, mitokondriyal fonksiyonlardaki hasar yerine oksidatif fosforilasyonun aktif glikoliz ile baskılanması şeklinde gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Oksidatif fosforilasyon eksikliğinin altında yatan mekanizma henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır (62-64).

## 2.2. Melanositlerin Kökeni ve Gelişimi

Melanositler, deriye ve kıllara ayırt edici rengini veren melanin pigmentini sentezlemek üzere özelleşmiş hücrelerdir. İnsanlarda melanositlerin büyük çoğunluğu epidermiste, kıl foliküllerinde ve bir kısmı da göz ve iç kulakta bulunmaktadır. Günümüzde insanlarda gerçekleşen pigmentasyonun düzenlenmesi ile ilgili bilginin büyük çoğunluğu ya insan epidermal melanositlerinden ya da diğer memelilerde foliküler melanositlerle yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Genel olarak epidermal ve foliküler melanositler düzenlenmeleri açısından değerlendirildiklerinde benzer olarak kabul edilir. Ancak bu iki melanosit popülasyonu yaşam döngüleri, çevredeki epitel ve mezenkimal hücrelerle ilişkileri ve çevresel faktörlere verdikleri cevaplar (özellikle ultraviyole (UV) radyasyon) açısından farklılıklar gösterirler. İnsanlarda deri pigmentasyonu, melaninin epidermal melanositler tarafından sentezi ve çevresindeki keratinositlere dağılımı sonucunda oluşmaktadır (65). İnsan epidermisinde ana yapısal hücreler olarak keratinositler bulunurken, melanositler toplam epidermal hücre popülasyonunun %10'undan azını oluşturmaktadır. Melanositler dendritleri üzerinden komşu keratinositlerle fiziksel olarak etkileşirler. Melanin içeren melanosomların keratinositlere melanositlerin dendritleri üzerinden taşınması normal deri pigmentasyonu için oldukça önemlidir (66). Keratinositlerin yüksek kapasitede kendilerini yenileme özellikleri ve apoptotik hücre ölümüne benzer şekilde sonuçlanan iyi tanımlanmış bir farklılaşma programı bulunmaktadır (67). Buna karşın epidermiste bulunan melanositler yüksek derecede farklılaşmış, yavaş çoğalan ve düşük seviyede kendilerini yenileme özelliğine sahip hücrelerdir. Melanositlerin en önemli özelliği ise UV radyasyonun zararlı etkilerinden deriyi korumasıdır (68).

İnsanlarda deri rengi çeşitliliği, yapısal pigmentasyonun geniş çaplı varyasyonu ile oluşmakta ve üç ana faktöre göre belirlenmektedir. Bu faktörler; melaninin melanositler tarafından sentezlenme hızı, melanositler tarafından sentezlenen eumelanin (kahverengi-siyah pigment) ve pheomelanin (kırmızı-sarı pigment) miktarları arasındaki ilişki ve melanosomların sayısı, büyüklüğü ve keratinositlere transfer hızlarıdır (65, 69). Koyu renkli deride melanosomlar açık renkli deriye göre hem daha büyük hem de sayıca daha fazladır. Bunun yanında melanosomlar koyu renkli deride melanositlerden keratinositlere tek tek transfer edilirken açık renkli deride kümeler halinde transfer edilmektedir (65, 70). Keratinositler ayrıca melanositlerin sağ kalım,

fonksiyon ve proliferasyonlarını düzenleyen biyokimyasal araçların sentezlenmesinde de rol oynamaktadır (71, 72).

Melaninin keratinositlere transferi ile birlikte epidermisin tamamı inflamasyon ve solar UV radyasyon gibi sırasıyla iç ve dış etkilerle oluşan hasarlardan korunmuş olur (73). Melanositler tarafından sentezlenen melanin seviyesinin artması ise DNA hasarı ile indüklenmiş stres cevabının bir parçası olarak düşünülmektedir. Melanin, (özellikle eumelanin), inflamasyon veya UV radyasyona maruz kalma süreçleri sırasında oluşan reaktif oksijen türlerini uzaklaştırmada etkilidir (74).

### **2.2.1. Melanositlerde UV Radyasyonla İndüklenmiş DNA Hasarı**

UV radyasyonun deri üzerinde çok çeşitli akut ve gecikmeli olumsuz etkileri bulunmakta ve özellikle açık tenlilerde fotokarsinogenez ile sonuçlanabilmektedir (75, 76). Amerika Birleşik Devletlerinde bazal/skuamöz hücre karsinomaları ve malign melanoma oranları beyazlarda, zenciler veya Afrikalı Amerikalılara oranla sırasıyla 50 ve 13 kat daha fazladır (77). UV radyasyona maruz kalmış farklı deri tiplerinde yapılan melanosit ve keratinosit karakterizasyon çalışmaları, melanin içeriği ve UV radyasyon tarafından indüklenmiş DNA hasarı arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir (78). Bir MED (minimal erythemal dose) UV verilmeden önce, 7 dakika, 1 gün ve 1 hafta sonra biyopsileri alınarak analiz edilen farklı kişilerin derilerinde DNA hasarı ve onarım hızlarının geniş bir çeşitlilik gösterdiği bulunmuştur. Epidermiste bulunan ve UV radyasyona maruz kalmış hasarlı hücreler genellikle apoptoz sürecine girmektedir (79). Böylece önemli derecede DNA hasarına maruz kalmış (potansiyel olarak mutasyon riski taşıyan) hücrelerin çoğalmasını engellenmektedir. Sabit dozda 180-200 J/m<sup>2</sup> UV radyasyona maruz kalmış farklı gruplar arasında yapılan çalışmalar koyu tenlilerde açık tenli kişilere göre 7 kat daha fazla apoptotik hücre olduğunu göstermiştir (80).

## 2.3. Melanoma

### 2.3.1. Melanoma Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Melanositlerden gelişerek agresif tümör yapısı kazanan melanoma, açık tenli kişiler arasında en hızlı yayılan malignant deri hastalığıdır (81). 1930'lu yıllarda nadir görülen bir hastalık olarak kabul edilen ve görülme sıklığı 1,500 kişide 1 iken günümüzde bu oran Amerika Birleşik Devletlerinde 60 kişide 1 olarak artmıştır (82). Amerika Kanser Birliğinin yayınladığı rapora göre 2016 yılında Amerika'da, 76,380 kişiye melanoma teşhisi konulması ve 10,130 kişinin de melanoma yüzünden öleceği beklenmektedir. Dünyada melanoma görülme sıklıkları oldukça değişkendir. Hindistan'da her 1,000,000 kadından 2'sinde melanoma görülürken bu oran Avusturalya'da her 1,000,000 erkekten 558'inde olacak şekilde artmaktadır. Melanoma beyaz tenli kişiler dışındaki ırk/etnik gruplarda genellikle daha derin bir Breslow kalınlığında (tümörün yüzeyinden dermis içindeki en derin noktası arasındaki oküler mikrometre ile yapılan ölçüm) ve daha ileri bir aşamada teşhis edilmektedir. Bu durum genellikle melanoma farkındalığının az olmasından kaynaklanmaktadır. Melanoma'dan gerçekleşen ölüm oranları 1966-1999 yılları arasında 65 yaş ve üstü erkeklerde %157 oranında artış göstermiştir (83). Yaşa bağlı vaka oranları analizlerinde 54 ve 74 yaşlarında sırasıyla trunkal melanoma ve yüz ve kulaklarda oluşan melanomaların arttığı gözlemlenmiştir. Melanoma teşhisinin ortalama yaş aralığı 57-62 yaşları arasındadır. Ancak Amerika Birleşik Devletlerinde 15-24 yaşları arasındaki genç kadınlarda melanoma görülme sıklığının son yıllarda arttığı belirlenmiştir (84).

Güneş ışınlarına maruz kalmak melanoma'nın oluşmasındaki en önemli dış etkidir ve Avusturalya, Kanada, İskandinav ülkeleri İsviçre ve Amerika'daki melanoma vakalarının %90'ından fazlası bu şekilde gelişmektedir (85-87). Güneş ışığına maruz kalma şekilleri yaygın olarak; aralıklı (güneşlenme, dış aktiviteler, güneşli bölgelerde geçirilen tatiller gibi kısa süreli ancak yoğun), kronik (daha sık, birincil olarak iş ile ilgili güneş ışınlarına maruz kalma), toplam güneş ışınlarına maruz kalma (aralıklı ve daha sık maruz kalmanın birleşimi) olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Yapılan araştırmalar kronik güneş ışığına maruz kalmanın melanoma gelişimi üzerinde çok az veya hiç etkisinin olmadığını, toplam güneş ışınlarına maruz kalmanın melanoma oluşum riskiyle pozitif ilişkili olduğunu, aralıklı güneş ışığına maruz kalmanın ise melanoma riskini arttırdığını göstermiştir (88-90).

Melanomanın oluşmasında doğuştan ya da sonradan kazanılmış yaygın ve atipikal ben sayısı oldukça önemli bir risk faktörüdür (91). Atipikal ben terimi genellikle klinik olarak displaziye işaret eden benler için kullanılmaktadır. En az beş atipikal bene sahip kişilerde, atipikal beni olmayan kişilere göre 6 kat daha fazla melanoma gelişme durumu gözlenmiştir (92). Ben sayısının veya şeklinin yanı sıra melanoma risk faktörlerinden bir diğeri de ailesel geçmiştir. Ailesel melanoma toplam melanoma vakalarının %5-10'unu oluşturmaktadır. Melanoma hastalarının birincil dereceden yakınlarında melanoma oluşması, ailesinde melanoma olmayan bireylere göre çok daha yüksektir (93). Ailesel ve ailesel olmayan melanomayı birbirinden ayıran karakteristik durumlar; ilk teşhisin erken yaşta yapılması, daha iyi bir sağ kalım, daha ince lezyonlar, çoklu primer lezyonlar ve melanoma olmayan kanserlerin oluşumunda artışı içermektedir (94).

Hümorale ve hücre aracıklıklı bağışıklık cevabı, anti-tümör bağışıklığında son derece önemli olan iki bileşendir (95). Tümör hücrelerinin yok edilmesinde görev alan en önemli mekanizma sitotoksik CD8+ T lenfositleridir. Ancak kanser hücrelerinin immünolojik yolları ve etkileşimleri kendi avantajlarına ve sağ kalımlarına çevirebilmek için modifiye ettikleri bilinmektedir (95). Yapılan son çalışmalarda organ nakli ve immün-baskılayıcı terapilerden sonra melanoma sıklığının ve agresifliğinin arttığı belirlenmiştir (96, 97). Ayrıca UV radyasyona maruz kalımdan sonra immün reaksiyonların deride lokal bir şekilde arttığı da belirlenmiştir (98, 99).

### **2.3.2. Melanomanın Klinik Özellikleri ve Sınıflandırılması**

#### **2.3.2.1. Kütanöz Tümörler**

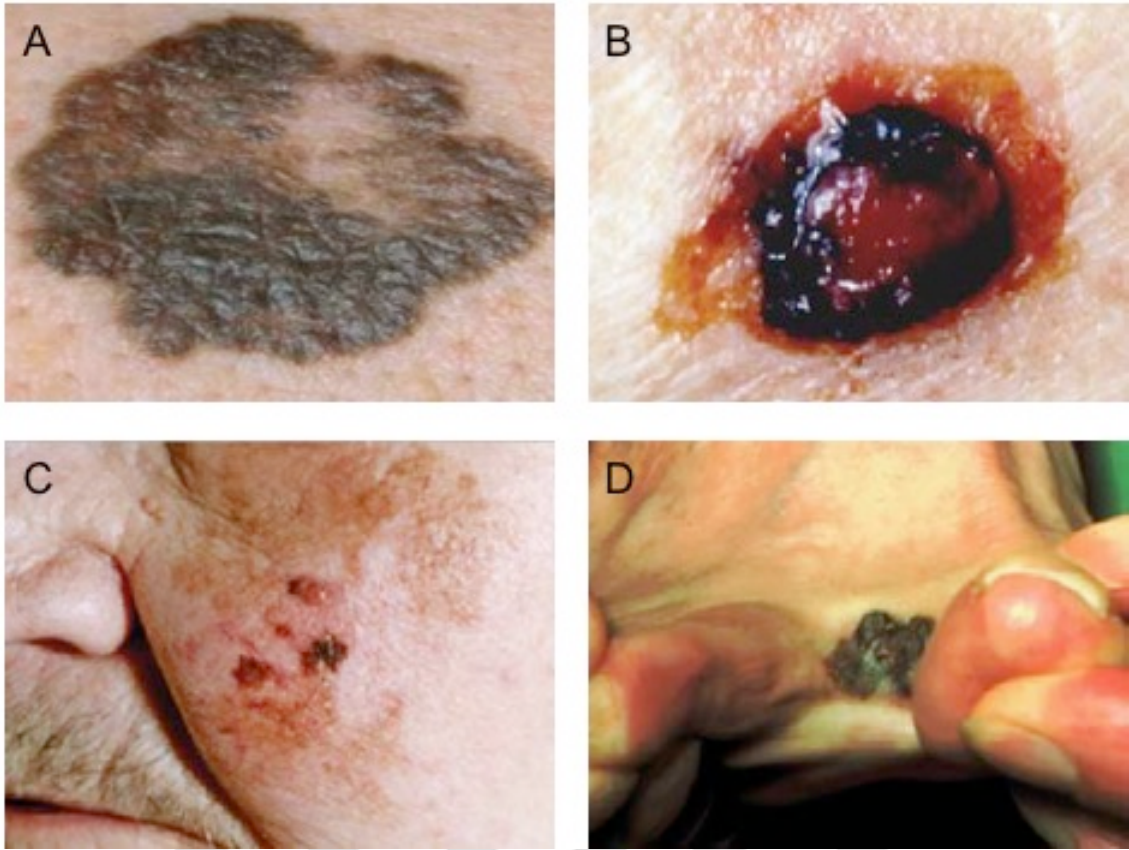
Melanomanın klinik ve histolojik özelliklerine göre alt sınıflara ayrılması Clark ve arkadaşları tarafından 1969 yılında ortaya atılmıştır (100). Kütanöz melanomalar gelişme modellerine göre yüzeysel yayılan, nodüler, lentigo malignan ve akral lentigo olmak üzere dört alt gruba ayrılmaktadır (Şekil 2-5) (100, 101). Melanoma alt grupları arasında yüzeysel yayılan melanoma en sık görülendir. Genellikle 40 - 60 yaş arasındaki kişilerde, erkeklerin gövdelerinde kadınların ise alt ekstremitelerinde görülmektedir. Yayılan yüzeysel melanoma klasik olarak asimetrik, düzensiz oyuklu bir leke veya farklı renklerde 5 mm'den küçük ve merkezinde kabarıklık olan bir papül olarak başlar. Zamanla lezyonlar önemli derecede büyür. Başlangıçta lezyonlar yavaş bir şekilde epidermiste veya yüzeysel papiller dermiste çoğalırken bilinmeyen bir nedenle

malignant melanositler dermis tabakasını işgal eder ve sonucunda nodül oluşan çok daha hızlı dikey büyüme fazı ortaya çıkmaktadır.

Nodüler melanoma ikinci en sık görülen melanoma alt tipidir. Yaygın olarak erkeklerin gövde, baş veya boyun bölgelerinde gözlenir. Bu alt tipin haftalar-aylar süresinde çok fazla radyal gelişim fazı göstermeden dikey bir biçimde *de novo* olarak geliştiği düşünülmektedir. Bu nedenle çok daha ileri bir aşamada teşhis edilmektedirler (102). Başlangıçta lezyon düzgün sınırları olan asimetric mavi veya siyah bir nodül olarak görülmektedir. Ancak bu gibi tümörlerin %2-8'i pembe ya da kırmızı olarak da görüldüğünden "amelanotik" olarak da adlandırılmaktadır (103). Amelanotik tümörlerde görülen pigment eksikliği ve genellikle çok daha küçük boyutlara sahip olmalarından ötürü yapılan teşhislerin %70'inde ilk olarak melanoma düşünülmemektedir (104).

Bazal membrana nüfuz etme özelliği bulunmayan ancak melanomaya dönüşmeye yüksek eğilimi olan öncül lezyonlar "melanoma in situ" veya "lentigo malignant" olarak isimlendirilir. Kütanöz melanomalar içerisinde görülme sıklığı %9 olan lentigo malignant melanoma, genellikle güneş yanığı oluşmuş deride (yaşlı insanların baş ve boyun bölgelerinde) ortaya çıkar. Diğer alt gruplarla karşılaştırıldığında lentigo malignant melanomanın aralıklı güneş hasarı yerine kümülatif güneş hasarıyla oluştuğu düşünülmektedir. Lentigo malignant melanoma açık tenli bireylerde sık görülür ve ben sayısı ile bir ilişkisi yoktur (105). Lentigo malignant melanomanın öncül lezyonları in situ melanomanın lentigo maligna adı verilen bir çeşittir. Lezyonlar başlangıçta genellikle yavaş ilerleyen, asimetric kahverengi-siyah renk çeşitliliğinde olan düzensiz girintili lekeler olarak görülmektedir. Dermoskopide bu bölgeler dairesel granüler bir desende düzenlenmiş düzensiz pigmente noktaların kapladığı hiper pigmente foliküler açıklıklar olarak görülmektedir (106, 107).

Akral lentigo melanoma ise beyaz tenlilerde nadir olarak görülürken diğer ırklarda (Zenciler, Asyalılar ve Pasifik adalılar) görülme sıklığı artmaktadır. Kütanöz melanoma alt grupları içerisinde görülme oranı %5'tir. Avuç içleri, ayak tabanları tırnak dipleri ve tırnak içleri gibi vücudun akral bölgelerinde görülmektedir.



**Şekil 2-5: Melanoma alt grupları.**

(A)Yüzeysel yayılan melanoma, (B) Nodüler melanoma, (C) Lentigo malignant melnaoma ve (D) Akral lentigo melanoma.

### **2.3.2.2. Kütanöz Olmayan Tümörler**

Normal melanomalar ağız içi, özefagus, burun içi, sinüsler, genital bölge ve anüs gibi mukozal bölgeler ve gözü de içeren kütanöz olmayan bölgelerde de bulunabilir. Melanomanın bu alt grupları kütanöz melanomaya göre çok daha nadir görülmektedir.

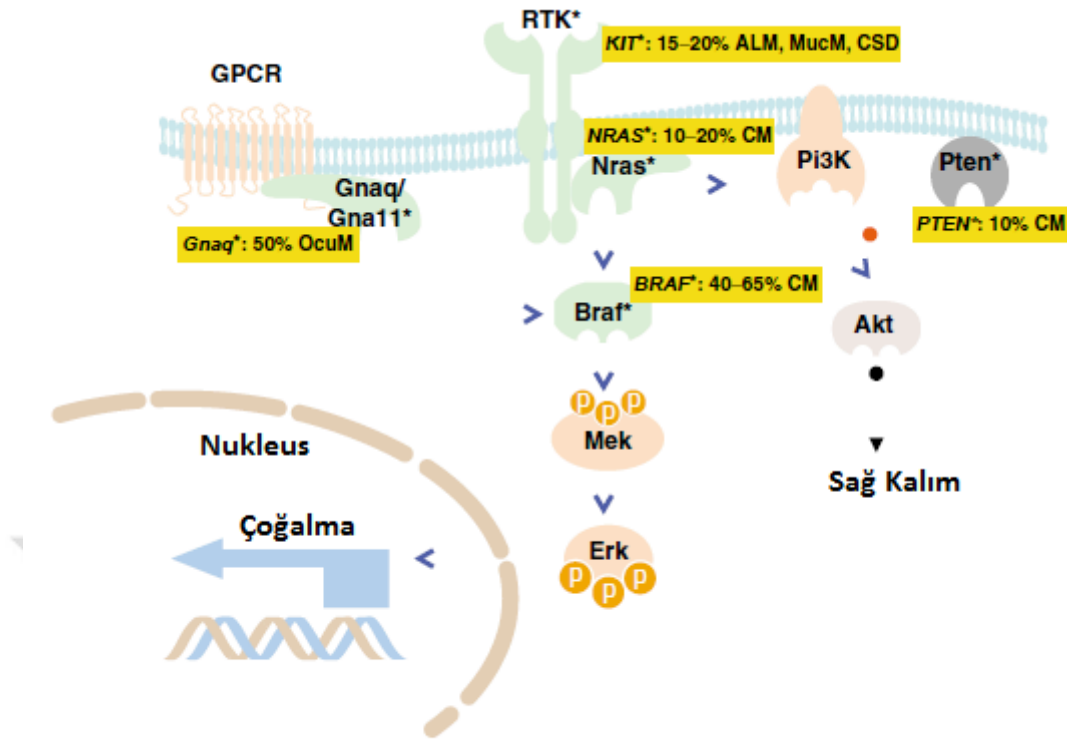


### 2.3.3. Melanomanın Gelişiminde Rol Alan Moleküler Mekanizmalar

#### 2.3.3.1. RAS/RAF/MEK/ERK Sinyal Yolağı

RAS ve BRAF, hücre büyümesi, sağ kalımı ve invazyonunu kontrol eden mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) sinyal transdüksiyon yolağında rol alan iki önemli moleküldür. MAPK sinyalizasyonu hücre membranında reseptör tirozin kinazların (RTK) ligandlara bağlanması veya hücre membranının iç yüzeyinde bulunan RAS-GTPaz üzerinden aktivasyon sinyallerinin iletim ile integrinin ekstraselüler matrikse adhezyonu ile başlar. GTP-bağlı aktive edilmiş RAS, RAF serine-threonin kinaz veya fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) gibi efektör proteinlere bağlanır (108, 109). Bu yolağın en çok mutasyona uğrayan bileşeni üç insan RAF geninden biri olan BRAF'tir. BRAF genindeki en yaygın mutasyon (vakaların ~%90) 600. pozüsyonundaki valinin glutamik asit ile yer değiştirmesi sonucu meydana gelmektedir (V600E) (110). BRAF<sup>V600E</sup>, tümörün büyümesinde ve fonksiyonlarını sürdürmesinde yardımcı proliferasyon ve sağ kalımı düzenleyen ERK sinyalizasyonunu indükler (111). BRAF<sup>V600E</sup> ayrıca otokrin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salınımını uyararak neoanjiyogeneze de katkıda bulunur (112). Melanomada BRAF'in aşağı yönde düzenlenmesinde (downstream), mikrophthalmia - ilişkili transkripsiyon faktörü (MITF) (113) ve POU domain sınıf 3 transkripsiyon faktör (BRN-2) (111) transkripsiyon faktörleri; hücre döngüsü düzenleyicileri siklin D1 (114) ve p16<sup>CDKN2A</sup> (115); ve matriks metalloproteinaz-1 (116) ve indüklenebilir nitrik oksit sentez (49) (117) gibi tümör onarım enzimleri de işlev göstermektedir. Her ne kadar BRAF mutasyonu melanositik tümörlerin gelişiminde erken ve önemli bir faktör olarak görülse de malignant transformasyon için tek başına bulunması yeterli değildir. Buna bağlı olarak benign melanotik benlerin %80'inde BRAF mutasyonu görülebilmektedir (Şekil 2-6).

MAPK yolağının diğer bir düzenleyicisi olan NRAS'in de melanoma da mutasyona uğradığı belirlenmiştir. Toplamda melanoma vakalarının %15-30'unda büyük çoğunluğu ekzon 1 (kodon 12 ve 13) veya ekzon 2'de (kodon 59 ve 61) konumlanmış NRAS mutasyonları görülmektedir (118). NRAS mutasyonları kronik olmayan güneş yanığı oluşmuş kişilerin %22'sinde, akril lentigo melanomaların %10'unda, mukozal melanomaların %5'inde ve kronik güneş ışığı hasarı oluşmuş kişilerin %15'inde görülmektedir (119).



**Şekil 2-6: Melanomada Görev Alan Sinyal Yolakları (120).**

Genler italik, aktive edici mutasyonlar yeşil, inaktive edici mutasyonlar gri ve yıldız imi ile mutasyonlar belirtilmiştir. Sarı kutular içerisinde verilen oranlar mutasyonların tekrarlama sıklıklarını göstermektedir (RTK, reseptör tirozin kinaz; GPCR, G-protein bağlı reseptör; ALM, akral lentigo melanoma; MucM, mukozal melanoma; CSD, kronik güneş ışınlarıyla gelişen melanoma; OcuM, oküler melanoma; CM, kütanöz melanoma).

### 2.3.3.2. Hücre Döngüsü

Malign melanoma tümörleri genellikle genomik dengesizlik gösteren çoğalmaya yatkın hücrelerdir (121-123). Bunun gibi agresif çoğalma durumu, transforme hücrelerin normal replikatif yaşlanma ve apoptotik sinyali kısıtlayarak çoğalmayı indükleyici dengesiz sinyal transdüksiyonunu kazanması sonucu oluşmaktadır (124). Bu nedenle normal deri hücrelerinde hücre çoğalmasını kontrol eden hücre döngüsü düzenleyici mekanizmalar melanoma gelişiminde sıklıkla bozulmaktadır. Örnek olarak hücre döngüsü ilerleyişini sınırlandıran G1/S geçişi melanomada da görülmemektedir (125). Ailesel melanomadan muzdarip hastalarda yaygın olarak, hücre döngüsü kontrolünü etkisizleştiren kromozomal lokus 9p21 mutasyonu görülmektedir. Kromozomal lokus 9p21, hücre döngüsü ilerleyişini negatif yönde düzenleyen ve siklin D ve E ve transkripsiyon faktör E2F1 gibi hücre döngüsünü ilerletici proteinleri kontrol

ederek yaşlanmaya katkıda bulunan p16INK4A ve alternatif okunma çerçevesi p14ARF'ı kodlayan CDK2NA'yı içermektedir (126, 127). Dahası p16INK4A hücre döngüsü ilerletici kinaz, CDK4'e bağlanıp onu inhibe ederek hücre döngüsünde E2F'yi kontrol etmektedir. Melanomada da artan CDK4-aracılıklı sinyalizasyon ve bunun sonucunda normal hücre döngüsü ilerleyişinin bozulması olarak ortaya çıkan CDK2NA'da germ hattı mutasyonları görülmektedir (127-129). Hücre döngüsünün ilerleyişinde meydana gelen bu bozulmalar melanoma hücrelerinin yaşlanmasını engellemektedir (130). Genetik mutasyonların yanında çekirdek hücre döngüsü ve çoğalma genlerinin düzenlenmesinde rol alan epigenetik faktörlerin değişimi de melanoma gelişimi ve ilerleyişine katkıda bulunmaktadır. Anormal promotör hipermetilasyonu gibi kromatin yapısının direkt modifikasyonu, farklı melanoma tiplerinde görülen CDK2NA susturulmasıyla ilişkilendirilmektedir (131).

## **2.4. Mitokondri ve Kanser**

### **2.4.1. Mitokondriyal Fonksiyon Bozuklukları ve Kanser**

Hanahan ve Weinberg kanserin karakteristik özelliklerini; çoğalma sinyallerine sürekli cevap vermek, büyüme baskılayıcılarını ortadan kaldırmak, hücre ölümüne karşı koymak, hücre ölümsüzlüğüne olanak sağlamak, anjiyogenezi indüklemek ve invazyon ve metastazı aktive etmek olarak belirlemiştir (132). Yapılan araştırmalar kanserin 6 karakteristik özelliğinin düzenlenmesinde mitokondriyal fonksiyonların önemini ortaya koymuştur (133). Mitokondriyal fonksiyon bozuklukları transforme olmuş kanser hücrelerinin karakterize özelliklerinden olup, primer ve sekonder fonksiyon bozuklukları olarak kategorize edilmektedir (134). Direkt mitokondriyi etkileyen primer fonksiyon bozuklukları, mitokondriyal DNA (mtDNA) veya mitokondriyal proteinleri kodlayan nükleer genlerdeki mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Sekonder mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ise mitokondri dışında gelişen sinyal etkinlikleri ile gerçekleşerek mitokondriyal fonksiyonları indirekt olarak etkilerler. Kanser hücrelerindeki mitokondriyal fonksiyon bozuklukları tümör sağ kalımı ve çoğalmasını arttıran metabolik yeniden programlanmaya yol açmaktadır. Bunun yanında mitokondriyal fonksiyon bozuklukları hücre çoğalmasını da düzenleyebilen reaktif oksijen türlerinin (ROT) artışına katkıda bulunmakta ve kanser oluşumu ve gelişimine yol açan DNA hasarı ve genetik kararsızlığı indükleyen mutajenlerin daimi kaynağı olarak da fonksiyon göstermektedir (135).

#### 2.4.2. Mitokondriyal Enerji Metabolizmasındaki Bozukluklar ve Kanser

Kanser hücrelerinde görülen yüksek glukoz alımının yaygın olması fonksiyon bozukluğuna sahip mitokondrilerin kanserin kökeni olduğuna dair hipotezin oluşmasına yol açmıştır (63). Ancak kanser hücrelerin neden aerobik glikolize bağımlı oldukları ve bunun altında yatan moleküler mekanizma hala aydınlatılamamıştır. Yapılan son çalışmalar karsinogenezde dört farklı metabolik düzenlenme aşamasının olduğu hipotezini ortaya atmıştır. Buna göre ilk aşamada onkogen-aracılıklı sinyallere bağlı olarak kanser kök hücre transformasyonu oluşmaktadır. İkinci aşama, hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF), AMP aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) ve NF- $\kappa$ B sinyalizasyonunun hipoksi ile indüklenmesidir. Birinci ve ikinci aşamalarda hücre metabolizması, gen programlanması onkojenik ve hipoksik kontroller altında olduğu için, oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek glikolizi indüklemektedir. Üçüncü aşamada malignite sırasında yüksek proliferasyon hızından dolayı besin eksikliği ortaya çıkmaktadır. Bu aşamada mitokondriyal oksidatif fosforilasyon fonksiyonları, LKB1-AMPK-p53 ve/veya PI3K-Akt-mTOR yolları üzerinden gen düzenlenmesi ile kısmen geri kazanılmaktadır. Myc-aracılıklı glutaminolizis de bu süreçte gerçekleşmektedir. Son aşamada ise mitokondri yeniden fonksiyon kazanmaktadır (136). Bu nedenle kanser hücrelerini yok etmek için tek bir enerji metabolizmasının bloke edilmesi yeterli olmamaktadır (137). Çoğalan tümör hücrelerindeki katabolik ve anabolik gereksinimler ele alındığında mitokondriyal bozukluklar kanser hücrelerinin sağ kalımı için bir dezavantaj oluşturmaktadır (138). Yine de normal hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerindeki yüksek glikolitik aktivitenin bazı metabolik avantajları sağladığı belirlenmiştir. İlk olarak aktif glikoliz, kanser hücrelerine hipoksik ortamlar gibi zor mikro çevrelerde sağ kalım özelliği kazandırmaktadır (139). İkinci olarak glikoliz sonucu ortaya çıkan metabolik ara ürünler, hücre çoğalması ve redoks dengesinin sağlanmasında önemli rollere sahip nükleotid, lipid ve NADPH'in biyosentezi için gerekli öncül maddelerin önemli bir kaynağıdır (140). Üçüncü olarak ise, glikoliz süresince laktat üretiminden ötürü oluşan mikro çevre asidifikasyonu tümör invazyonu ve metastazına olanak sağlamaktadır (141, 142).

Kontrol edilemeyen çoğalmanın etkisiyle artan metabolik potansiyel, tümör hücreleri için birtakım zorlukların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Gelişmekte olan bir tümör hücresi besin stoğunu tükettiğinde hücre biyoenerjiyi koruyabilmek için stratejiler geliştirmek zorundadır. AMPK, hücre enerji homeostazının

düzenlenmesinde anahtar rol oynayan oldukça korunmuş heterotrimerik bir proteindir (143). AMPK başlangıçta allosterik olarak AMP tarafından düzenlenen ve bir katalitik  $\alpha$ -alt ünitesi ve iki düzenleyici  $\beta$  ve  $\gamma$  alt ünitelerinden oluşan bir protein kinazdır (144). Hücrel AMP/ATP oranlarındaki değişimlere duyarlı olan AMPK, ATP tüketimi veya ATP üretiminin kısıtlanmasını düzenleyen hücrel streslere yanıt olarak aktive olur (144). AMP'nin  $\gamma$  alt ünitesine bağlanması,  $\alpha$ -alt ünitesinin kinaz aktivitesini ve upstream kinazlar tarafından Thr-172'de fosforilasyonu arttırmaktadır (145). Günümüzde tanımlanmış üç adet AMPK upstream kinaz bulunmaktadır; tümör baskılayıcı LKB1, kalmodulin bağımlı protein kinaz kinaz  $\beta$  (CamKK $\beta$ ) ve dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (TGF $\beta$ ) – aktive edilmiş kinaz 1 (TAK1) (146-149). LKB1, glukoz azalması gibi biyoenerjetik stres koşullarında AMPK'nin aktivasyonu için gereklidir (150). AMPK'nin metabolik adaptasyondaki downstream etkilerinin bazıları p53 tümör baskılayıcısının AMPK-bağımlı aktivasyonuna dayanmaktadır. AMPK p53'ü Ser-15'te fosforilleyerek hem transkripsiyonel aktivitesini düzenler hem de metabolik hücre döngüsü kontrol noktasını başlatır (151). AMPK-bağımlı metabolik kontrolün diğer downstream hedeflerini de Foxo3 ve PGC1 $\alpha$  oluşturmaktadır (152, 153). AMPK'nin LKB1 ve p53 gibi hem downstream hem de upstreaminde yer alan tanımlanmış tümör baskılayıcıları, AMPK'nin da bir tümör baskılayıcı olarak görev alabileceğini önermektedir. Ancak AMPK'nin tümör gelişimindeki rolü tam olarak henüz belirlenmemiştir.

#### **2.4.3. Mitokondriyal Biyogenez ve Tümör Oluşumu**

Mitokondriyal kütle iki karşıt yolak olan biyogenez ve dönüşüm ile belirlenmekte ve bu yollar tümör oluşumunda hem pozitif hem de negatif düzenleyiciler olarak rol oynamaktadır. Mitokondriyal biyogenezin kanserdeki rolü, metabolik durum, tümör heterojenliği, doku tipi, mikro çevre ve tümörün seviyesi gibi birçok faktör tarafından düzenlenmektedir. Buna ek olarak mitokondriyal dönüşümün seçici otofajik yolağı olan mitofaji ise, sağlıklı mitokondriyal popülasyonunun korunmasında görev almaktadır.

Mitokondriyal biyogenez, mitokondriyal proteinleri kodlayan hem mitokondri hem de nükleer kökenli genlerin indüklenmesini koordine eden transkripsiyonel programlar tarafından düzenlenmektedir. Transkripsiyonel ko-aktivatör olan peroksizom proliferasyonu ile aktive edilmiş reseptör gamma ko-aktivatör-1 alfa

(PGC1 $\alpha$ ), mitokondriyal biyogenezin merkezi düzenleyicisidir (154). PGC1 $\alpha$  seviyeleri genellikle tümörün mitokondriyal kütleyle ne derecede bağımlı olduğunun bir göstergesidir. Yüksek PGC1 $\alpha$  anlatımı ise mitokondriyal solunuma bağımlılığın bir belirteci olarak değerlendirilmektedir (154). Ayrıca farklı kanser tiplerinde PGC1 $\alpha$ 'nın fazla anlatımı apoptozu indüklemekte ve bu nedenle PGC1 $\alpha$ 'nın bir tümör baskılayıcı olarak da görev aldığı da düşünülmektedir (154). Ek olarak HIF1 $\alpha$ -aktive edilmiş renal hücre karsinomalarında, PGC1 $\alpha$  azalmakta ve böylece düşük oksijen koşullarında glikolitik metabolizmaya geçişi desteklemektedir (155). Bu nedenle tümör canlılığında PGC1 $\alpha$ 'nın iki yönlü etkisine de katkıda bulunan faktörlerin araştırılması önem kazanmaktadır. PGC1 $\alpha$ -bağımlı mitokondriyal biyogenez ayrıca metastazda önemli bir aşama olan yüzeye bağımlı olmayan kanser hücre büyümesine de katkı sağlamaktadır. Proteomik analizler metabolizma ve biyogenezde rol alan mitokondriyal proteinlerin düşük tutunma özelliklerine sahip kültür koşullarında arttığını belirlemiştir (156). Buna ek olarak hastalardan elde edilen meme kanseri hatlarında, artan mitokondriyal kütlelerin tümör başlangıç aktivitesini zengileştirdiği ve PGC1 $\alpha$  inhibisyonu ile de aktivasyonun engellendiği ortaya konmuştur (157). Primer ortotopik meme tümörlerinden *in vivo* ortamda gelişmiş dolaşan tümör hücrelerinde (CTCs) de mitokondriyal biyogenez ve solunumun arttığı ve PGC1 $\alpha$ 'nın susturulması ile CTCs'lerin ve metastazın azaldığı belirlenmiştir (158).

#### 2.4.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Değişiklikleri ve Kanser

ATP sentezi, iyon homeostazı, metabolitlerin taşınması, ROT üretimi ve hücre ölümü gibi kritik mitokondriyal fonksiyonlar, fiziko-kimyasal parametrelere (örn; transmembran elektriksel potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ )) bağlıdır (159). Normal hücrelerde normoksik koşullar altında  $\Delta\Psi_m$ , başlıca ATP sentezlenebilmesi için solunum zinciri tarafından oluşturulur. Anoksi veya şiddetli hipoksik durumlarda ise  $\Delta\Psi_m$ , ATP sentez kompleksinin hidrolitik aktivitesi ve adenin nükleotid translokator aktivitesiyle işletilen sitozolden matrikse ADP karşılığında geçen ATP'nin elektrogenik transferi ile meydana gelmektedir (160). Ek olarak  $\Delta\Psi_m$ , neoplastik dönüşüm sırasında, stres uyaranlarına karşı duyarlılığın belirlenmesinde kritik role sahip mitokondriyal geçirgenlik transisyon porlarının kontrolünde de görev almaktadır (161). Por açıklıklarının düzensizliği tümör hücrelerinin hücre ölümünden kaçmak için kullandıkları bir strateji olarak düşünülmektedir. Dahası yapılan çalışmalarda farklı kanser hücrelerinin

mitokondrilerinde ERK aktivasyonunun arttığı ve böylelikle CyP-D'in glikojen sentez 3-kinaz bağımlı fosforilasyonunun inhibe olmasıyla hücre ölümüne karşı daha dirençli oldukları belirlenmiştir (162). Bunun dışında mitokondri iç membranında bulunan ikinci bir ayrıştırıcı protein olan UCP2 de  $\Delta\Psi_m$  düzenlenmesinde görev almaktadır. Son yapılan çalışmalarda UCP2'nin anlatımının farklı kemo-dirençli kanser hücrelerde arttığı belirlenmiştir. UCP2'deki bu artış ayrıca apoptoz eşiğinin artması ile de ilişkilidir (163).

#### 2.4.5. Mitokondriyal Dinamiklerin Kanser Gelişimi ve İlerleyişindeki Rolü

Hücre ölüm sinyallerinden kaçış, tümör hücrelerinin belirgin karakteristik özelliklerinden biridir. Hücresel yaşam ve ölüm sinyallerinin düzenlenmesi, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından yürütülen ve mitokondride yoğunlaşan önemli bir süreçtir. Bcl-2 ailesi proteinleri ayrıca mitokondri morfoloji değişimlerinin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Genellikle öncül sağkalım sinyalleri, uzamış (elongated) mitokondriler ile ilişkilendirilmekte, hücre ölümü ise mitokondriyal fraksiyonlarla beraber görülmektedir. Bcl-2'nin fazla anlatımı lenfomada hücre ölümüne katkı sağlamakta ve bu nedenle bir tümör belirteci olarak kullanılmaktadır (164-166). *C.elegans*'daki BCL-2'nin homologu olan CED-9'un, mitokondriyal füzyonu MFN2 ile etkileşim kurarak indüklediği belirlenmiştir (167). Buna karşın Bcl-X<sub>L</sub>'in de Drp1 GTPaz aktivitesini düzenleyerek mitokondriyal fizyonu arttırdığı bildirilmiştir (168). Proapoptotik Bak ve Bax, Drp1'i mitokondriyal fizyonu arttırmak üzere dengede tutmakta (stabilize) ve ayrıca Bak<sup>-/-</sup> Bax<sup>-/-</sup> hücrelerde de uzamış mitokondriyal ağlar görülmektedir (169). İlginç olarak Bax, fizyon bölgelerinde Drp1 ve Mfn2 ile kolokalize olarak mitokondriyal membran permeabiliasyonunu teşvik etmektedir (170). Tümör hücrelerinin diğer bir özelliği de 2.4.2 başlığında behsedildiği gibi ATP üretiminin oksidatif fosforilasyondan glikolize doğru kaymasıdır (55). Oksidatif fosforilasyon yapan hücrelerde mitokondrilerin daha uzamış halde oldukları, glikolitik hücrelerde ise daha fragmente durumda buldukları belirlenmiştir (171, 172). Bu dinamik değişikliklerin altında yatan moleküler mekanizma, füzyon proteinlerinden Mfn1, Mfn2 veya OPA1'in seviyelerinin azalması ile birlikte TCA döngüsünün inhibisyonu, oksidatif fosforilasyonun azalması ve glikoliz ve laktik fermentasyonun artışı ile açıklanmaktadır (13, 173). Bunun yanında tümör kütlelerinde HIF1'e bağlı olarak hipoksik koşullara karşı gelişen hücresel cevaplar mitokondriyal uzamayı

tetikleyerek apoptotik uyarılara karşı direnci arttırmaktadır (174). Diğer bir taraftan mitokondriyal füzyon için efektif oksidatif fosforilasyon ve uygun bir mitokondri membran potansiyeli gereklidir (175).

Tümör hücrelerinin bir diğer özelliği de hücre döngüsü kontrol noktalarını aşarak çoğalmalarıdır. Mitokondrilerin hücre döngüsünün S ve M fazlarında, fragmente halde bulunmaları oksidatif fosforilasyonda geçici bir azalma oluşturmakta (reaktif oksijen türlerinin ana kaynağı olduğundan) ve böylece DNA replikasyonu sırasındaki mutasyon olasılığı azalmaktadır. Hücre döngüsü sırasında görülen mitokondriyal fragmentasyon ayrıca mitokondrinin kardeş hücrelere eşit dağılımı için de gereklidir (176, 177). Bu süreç, S fazı başlangıcında Drp'i fosforilleyen CDK1/Siklin B kompleksi tarafından düzenlenmekte ve Drp'in mitokondride toplanması ve sonrasında mitokondriyal fragmentasyon ile sonuçlanmaktadır. Ancak tümör hücrelerinde hücre döngüsü işleyişi ve CDK1 aktivitesi bozulduğundan bu durumun mitokondri morfolojisi üzerine etkisinin de araştırılması gerekmektedir.

#### **2.4.6. Ca<sup>2+</sup> Sinyalizasyonu ve Kanser Hücre Göçü**

İkincil haberci olan Ca<sup>2+</sup>, hücre döngüsü kontrolü, sağ kalım, apoptoz, hücre göçü ve gen ekspresyonu gibi temel fizyolojik fonksiyonlar için önemli bir sinyalcidir (178). Hücre içi Ca<sup>2+</sup> dengesinin düzenlenmesi, hem hücre dışından Ca<sup>2+</sup> girişi hem de endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi hücre içi kaynaklardan sağlanmaktadır (179). Hücre dışı ortamda Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu 1-2 mM civarındayken dinlenme durumunda hücre içi Ca<sup>2+</sup> miktarı oranı 100 nM olarak belirlenmiştir (180). Özelleşmiş kalsiyum pompaları, kanalları ve kalsiyum bağlayan proteinler, hücreler tarafından hücresel dengeyi korumak ve belirli hücresel fonksiyonları sürdürmek için kalsiyum sinyalizasyonunda kullanılmaktadır (178). Sitolitik serbest Ca<sup>2+</sup> değişiklikleri; geçici, uzun süreli veya kalsiyum kıvılcımları (sparks) gibi oldukça sınırlı bir bölgede etkili genel Ca<sup>2+</sup> artışı olmak üzere üç farklı şekilde meydana gelmektedir (181). Kalsiyum sinyalizasyonundaki bu karmaşıklık, kalsiyum sinyalindeki deregülasyonların kanseri de içeren çeşitli patolojik süreçlerin bir özelliği olabileceği şeklinde yorumlanmaktadır (181). Kalsiyum sinyalizasyonunu kanserde araştıran birçok çalışma sitoplazmik serbest Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonlarını düzenleyen proteinlerin anlatım seviyelerini belirleme odaklıdır. Ca<sup>2+</sup> duyarlı belirteçlerin geliştirilmesi, Fura-2 ve Fluo-4 gibi floresan boyalar gibi, ve genetik olarak dizilenmiş Ca<sup>2+</sup> belirteçleri sitoplazma ve alt hücresel



organellerdeki  $Ca^{2+}$ 'un sayısallaştırılmasına olanak sağlamıştır (182, 183). Düzensiz bir biçimde çalışan kalsiyum kanalları ve pompalarının belirlenmesinden sonra yapılan araştırmalarda gen susturma yaklaşımları ve/veya kimyasal inhibitörler/aktivatörler kullanılarak kalsiyum sinyali ve kanser ilişkili süreçler (çoğalma ve hücre göçü) arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır. Hücre göçü ve invazyon, tümör metastazı için gerekli iki koşuldur. Göç yeteneği kanserli hücelere, birincil kaynak bölgelerinden kaçmalarına ve yayılmalarına olanak sağlayan bir özelliktir. Hücre-substrat adhezyonunun konumsal ve zamansal koordinasyonu, aktin sitoskeleti, kas olmayan miyozin II aracılıklı kasılma ve hücre-substrat kopması hücre göçü için gereklidir (184, 185). Hücre dışı kemo-çekici uyarıların dışında hücre göçü konum ve zamana bağlı olarak hücre içi  $Ca^{2+}$  sinyalizasyonu ile de koordine edilmektedir (186). Hücre göçü sırasında  $Ca^{2+}$  sinyalizasyonunun, yön algılama, sitoskelet dağılımı, çekme gücü oluşumu ve merkezi adhezyonların yer değişimi gibi çok işlevli bir rolü bulunmaktadır (187). Kutuplaşmış, göç eden hücrelerde, hücrenin arka kısmında yüksek konsantrasyonda olmak üzere, arka kısmın büzülmesinden sorumlu olduğu düşünülen ve arkadan-öne doğru azalan bir  $[Ca^{2+}]_i$  gradiyenti oluşmaktadır (188).  $Ca^{2+}$  konsantrasyonlarının artışı plazma membranından  $Ca^{2+}$ -geçirgen kanallar veya endoplazmik retikulum gibi iç kaynaklardan  $Ca^{2+}$ 'un ryanodine reseptörü (RYR) ve/veya inositol-1,4,5-trifosfat reseptör (IP3R) kanalları ile taşınımı üzerinden gerçekleşmektedir (189). Bunun yanında düzensiz mitokondriyal  $Ca^{2+}$  akar dengesinin (homeostasis) de tümör oluşumundaki rolü son yapılan çalışmalar ile dikkat çekmektedir (190). Kanser hücrelerinde görülen mitokondriyal  $Ca^{2+}$  alımındaki azalmanın, mitokondriyal iç apoptotik yolak aktivasyonunu azaltacağı ve böylece metastaza katkıda bulunacağı öngörülmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇLER

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

Mdivi-1 (Selleck Chem)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Lonza)

MCDB 153 Medyum (BioScience)

Leibovitz L-15 Medyum (BioScience)

Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (Lonza)

Trypsin-EDTA (%0.25) (Gibco)

FBS (Fetal Bovine Serumu) (Gibco)

Penicillin-Streptomycin (Gibco)

Rhodamin 123 (Santa Cruz)

MitoTracker Red (Life Technologies)

Drp-1 Primer Antikor (Santa Cruz)

Mfn-1 Primer Antikor (Santa Cruz)

Mfn-2 Primer Antikor (Santa Cruz)

OPA-1 Primer Antikor (Santa Cruz)

Aktin Primer Antikor (Santa Cruz)

AMPK $\alpha$  Primer Antikor (Cell Signalling)

pAMPK $\alpha$  Primer Antikor (Cell Signalling)

PGC1- $\alpha$  Primer Antikor (CalBioChem)

Presto Blue (Life Technologies)

Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (D-PBS) (Corning)

Drp-1 siRNA (Sigma)

Mfn-2 siRNA (Sigma)

Opti-MEM (Life Technologies)

DNM1L primer (Forward-Reverse) (Sigma)

MFN1 primer (Forward-Reverse) (Sigma)

MFN2 primer (Forward-Reverse) (Sigma)

OPA1 primer (Forward-Reverse) (Sigma)

Lipofectamine RNAimax (Life Technologies)

iScript Reverse Transkripsiyon Supermix (Biorad)

SYBR Green Master Mix (ABI)

Propidium Iodide (Sigma)

Ribonükleaz A (Sigma)

RIPA Buffer (Thermo)

Bradford Assay Reagent (Bio-RAD)

XF Media ve Kalibre edici Buffer (Seahorse Bioscience)

Tris, Tween-20, metanol, etanol, HCl, NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub> ve diğer tüm kimyasal malzemeler Sigma ve Merck firmasından sağlandı.

### **3.1.2. Kitleler**

FITC Annexin V Apoptoz Belirleme Kiti (BD Pharmingen)

XF 96 Hücre kültür microplate (Seahorse Bioscience)

RNeasy mini kit (QIAGEN)

Boyden Chamber Inserts 24 kuyulu plate (8 µm)

### **3.1.3. Cihazlar**

Buz Makinası (Hoshizaki)

Derin Dondurucu (-80°C) (NUAIRE)

Distile Su Cihazı (GFL)

Etüv (Sanyo)

FACS Flow Cihazı (Becton Dickinson)

Laminar Hava Akım Cihazı ELB 2472 (Heraus)

Manyetik Çalkalayıcı (BioSan)

Otoklav (HIRAYAMA)

pH metre

Santrifüj (Hettich)

Sıvı Azot Tankı (34 XT Taylor-Wharton)

Synergy HTX plate okuyucu (BioTek)

Luminesans Spektrometresi (LS45-Perkin Elmer)

NanoDrop (Thermo)

PCR cihazı (Mastercycler ep realplex-Eppendorf)

Ters Mikroskop (Olympus)

Vorteks (Biosan)

XF Extra Cellular Flux Analiz Cihazı (Seahorse Bioscience)

Konfokal Mikroskopu (OLYMPUS FV1000)

### **3.1.4. Çalışmada Kullanılan Eriyikler**

#### **Phosphate Buffer Saline (PBS)**

1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

0,2 g  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

800 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  ile çözülerek pH 1 M HCl ile 7,4 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 1 lt'ye tamamlandı.

#### **Tris Buffer Saline (TBS)**

6,05 g Tris

8,76 g NaCl

800 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  ile çözülerek pH 1 M HCl ile 7,5 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 1 lt'ye tamamlandı.

**TBS-T (%0.05)**

10 mM Tris-HCl (pH: 8.0)

150 mM NaCl

%0.05 Tween 20

**Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Lizis Tamponu**

965 µl RIPA tamponu

10 µl PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)

10 µl SOD (sodium orthovanadate)

15 µl Proteaz inhibitörü

**Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) Alt Jeli (%12)**

3,22 ml Akrilamid/bisaskrilamid (30:0,8)

2 ml Tris-HCl (1,5 M pH: 8.8)

2,72 ml dH<sub>2</sub>O

0,075 ml %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)

30 µl %10 Amonyum per sülfat (APS)

15 µl TEMED

**PAGE Üst Jeli (%5)**

0,42 ml Akrilamid/bisaskrilamid (30:0,8)

0,625 ml Tris-HCl (1M pH: 6.8)

1,46 ml dH<sub>2</sub>O

25 µl %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)

10 µl %10 Amonyum per sülfat (APS)

5 µl TEMED

**PAGE Yükleme Tamponu (5x)**

10 mM  $\beta$ -merkapto-etanol

%10 SDS

%20 Gliserol

0.2 M Tris-HCl pH:6.8

%0.05 Bromfenol mavisi

**Tris-Glisin-SDS PAGE Yürütme Tamponu**

30 g Tris-Base

144 g Glisin

10 g SDS

1000 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

**XF Hücre Mito Stres Test Deney Medyumu**

25 mM Glukoz

2 mM Sodyum Piruvat

2 mM L-glutamine

100 ml XF Base Medyumunda pH 7.4 olacak şekilde ayarlanarak kullanıma hazır hale getirildi.

## **3.2. YÖNTEMLER**

### **3.2.1. Hücre Kültür Çalışmaları**

#### **3.2.1.1. Hücrelerin Çoğaltılması**

Çalışmada kullanılan, A375 (İnsan Melanoma Hücresi), ve HaCaT (İnsan Keratinosit Hücresi) hücreleri standart kültür koşullarında, % 10 FBS ve % 1 antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren DMEM içerisinde, MeWo hücreleri (İnsan Melanoma Hücresi) % 10 FBS ve % 1 antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren EMEM içerisinde ve WM793 hücreleri (İnsan Melanoma Hücresi) %80 MCDB153, %20 Leibovitz's L-15, %1 FBS, % 1 antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin), 5 µg/ml insülin ve 1.68 mM CaCl<sub>2</sub> içeren medyum içerisinde kültür şişelerine (flask) ekilerek 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde çoğaltıldı. Ters mikroskopta 2-3 günde bir kontrol edilen hücreler semikonfluent duruma geldiğinde hücre kazıyıcısı ile yüzeyden kaldırılarak 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve pelet 1-2 ml taze medyumda çözüldü. Hücreler her yeni pasajda 1-2 x 10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde taze medyum içeren kültür şişelerine eklendi ve çoğalmaya bırakıldı. Bu şekilde 2-3 günde bir kontrol edilen hücrelerin, belirli aralıklarla yeni pasajları yapıldı.

#### **3.2.1.2. Hücrelerin Dondurulması**

Hücre kazıyıcısı ile kültür şişesi yüzeyinden kazınan hücreler, 15 ml'lik santrifüj tüplerinde 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvıları atıldı. Tüp içerisindeki hücre sayısı 5 x 10<sup>6</sup> olacak şekilde ayarlandı. 1/9 oranında DMSO/FBS içinde soğuğa dayanıklı kriotüplere alınan hücreler 24 saat -80°C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına (-196 °C) aktarıldı.

### **3.2.2. Hücrelerin Mdivi-1 ile Muamele Edilmesi**

#### **3.2.2.1. Hücre Sayısı ve Canlılığın Belirlenmesi**

Melanoma hücreleri (A375, MeWo ve WM793) ve keratinosit hücreleri (HaCaT) 96 kuyulu düz tabanlı platalere her kuyuda 3 x 10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 20 µM mitokondriyal fizyon inhibitörü (Mdivi-1) ile 72 saat inkübe edildi. Hücre canlılığı presto blue canlılık analizi ile yürütüldü. Mdivi-1 ile 72 saat inkübasyon sonunda hücrelere presto blue ajanı eklenerek 37°C %5 CO<sub>2</sub>'de 30 dakika bekletildi.

Absorbanslar BioTek Synergy HTX marka plate okuyucuda ex 560 nm - em 590 nm aralığında okutuldu. Üç farklı deneyden elde edilen hücre canlılığındaki değişimler, mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerin kontrol hücrelerine oranlanması ile bağlı olarak değerlendirildi.

$$(Mdivi-1 \text{ ile muamele edilmiş hücre canlılığı/kontrol hücresi canlılığı}) \times 100$$

siRNA ile gece boyunca inkübe edilmiş melanoma hücreleri (A375, MeWo ve WM793) ve keratinosit hücrelerinin (HaCaT) hücre canlılıkları ise hücreler normal medyuma geçirildikten sonra 24 saatte bir olmak üzere 120 saat boyunca presto blue analizi ile yürütüldü. Hücre canlılıkları, üç farklı deneyden alınan verilerin ortalamaları hesaplanarak değerlendirildi.

### **3.2.2.2. Mitokondri Morfoloji Değişimlerinin Konfokal Mikroskobu ile İncelenmesi**

Melanoma hücreleri (A375, MeWo ve WM793) ve keratinosit hücreleri (HaCaT) 6 kuyulu micro-slide'lara (ibidi) kuyu başına  $3 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde ekildi. Hücreler 20  $\mu$ M Mdivi-1 ile 37°C %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C %1 O<sub>2</sub>'li ortamda her iki koşulda da 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler soğuk DPBS ile iki kez yıkandıktan sonra 25 nM Mitotracker Red Boyama solüsyonunda 20 dakika 37°C %5 CO<sub>2</sub> bulunan etüvde inkübe edildi. Hücrelerin mitokondri morfolojisindeki değişimler OLYMPUS FV1000 lazer konfokal mikroskobunda 60x büyütme ile gözlemlendi. Mitokondri morfolojisindeki değişimler ImageJ programında filtreleme (medyan), eşik değeri (thresholding), veri çiftleme (binarization) ve partikül analizi kullanılarak,

$$(partikül sayısı \times 10000)/toplamlar mitokondriyal piksel$$

formülüne göre, üç farklı deneyden elde edilen görüntülerden rastgele seçim yapılarak değerlendirildi.



### 3.2.3. Protein İfadesindeki Değişimlerin Belirlenmesi

#### 3.2.3.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Mdivi-1 ile 72 saat inkübe edilen hücreler kuyulardan hücre kazıyıcısı yardımı ile toplandı. 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra hücrelerin üzerine RIPA hücre lizis tamponu eklenerek 20 dakika +4°C ortamda bulunan dönen platform üzerinde bekletildi. Hücreler bu işlemin ardından 15 dakika +4°C santrifüjde 14000 RPM'de santrifüj edildi. Süpernatantlar toplanarak -20°C' de saklandı.

#### 3.2.3.2. Protein Konsantrasyonunun Bradford Yöntemi İle Belirlenmesi

Elde edilen hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendi. 5x Bradford solüsyonu dH<sub>2</sub>O ile 1x' e sulandırıldı. Blank, standartlar ve her bir örnek için test tüplerine 1 ml bradford solüsyonu eklendi. Standartlar için ayrılan tüplere 1, 2, 4, 10 ve 20 µg/ml BSA, örnekler için ayrılan tüplere ise 2 µl hücre lizati eklendi. 96 kuyulu plate'e blank, standart ve hücre lizatları ikiyeşerli tekrarlar halinde eklendi ve absorbanslar 590 nm de okutuldu. Çıkan sonuçlara göre standart eğri hazırlanarak örneklerin protein konsantrasyonu belirlendi.

#### 3.2.3.3. Proteinlerin SDS-PAGE Yöntemi İle Ayrıştırılması Ve İfadelerinin Western Blot Yöntemi İle Görüntülenmesi

Konsantrasyonları belirlenen örneklere yükleme tamponu eklenerek 100 °C'de 10 dakika denatüre edildi. Örnekler, % 4-12 lik jellere, kuyu başına 40 µg olacak şekilde yüklendi. 140 mV akımda 45 dakika sürdürülen elektroforez işlemiyle proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrıştırıldıktan sonra kuru aktarım ile nitroselüloz membrana aktarıldı. Membran 1 saat %5 BSA içeren TBS-T (% 0.1 Tween-20) solüsyonunda oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 3 kez 10'ar dakika TBS-T ile yıkandı. Membran, %5 BSA içeren TBS-T ile uygun konsantrasyonlarda hazırlanmış primer antikolar (Drp-1, Mfn2, Mfn1, OPA1, PGC1α, Aktin, AMPKa, phospo-AMPK) ile +4°C'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membran 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkandı. Membran, %5 BSA'lı TBS-T ile 1:3000 sulandırılan HRP işaretli sekonder antikor (kullanılan primer antikora uygun kaynaklı) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra kromojenik bir substrat olan TMB ile karanlıkta bantlar görünür hale gelene kadar bekletildi. Reaksiyon membranın dH<sub>2</sub>O ile yıkanmasıyla sonlandırıldı.

### 3.2.4. siRNA Transfeksiyonu İle Mitokondriyal Dinamiklerle İlgili Protein Anlatımlarının Susturulması

Mitokondriyal fizyon ve füzyonda görevli sırasıyla Drp-1 ve Mfn-2 proteinlerinin anlatımlarının susturulması için siRNA transfeksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 3-1). Bu işlem için melanoma ve keratinosit hücreleri 6 kuyulu platalere  $2 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde ekildi. Transfeksiyon işleminden önce ortamdan medyumlar uzaklaştırılarak bunun yerine 1 ml OPTI-MEM eklendi. Farklı konsantrasyonlardaki siRNA'ler (10, 25, 50 ve 100 nM) kuyu başına 6  $\mu$ l Lipofectamine RNAmix kullanılarak ortama eklendi ve hücreler gece boyu  $37^\circ\text{C}$  %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda siRNA'li ortam uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine tekrar complete-medyum eklendi ve 48 saat daha  $37^\circ\text{C}$  %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda siRNA etkinliğinin saptanabilmesi için örneklerin protein anlatımları yöntemler kısmının 3.2.3.3 başlığındaki western blot analizi ile belirlendi.

**Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan siRNA dizileri**

Primer Adı	Dizi (5'-3')
Drp-1 siRNA (1)	GUAAUACUGAGACUUUGUU[dT] [dT]
Drp-1 siRNA (2)	CUGAUUCAAUCCGUGAUGA[dT] [dT]
Mfn 2 siRNA (1)	GUGAUGUGGCCCAACUCUA[dT] [dT]
Mfn 2 siRNA (2)	GUGAUCAAUGCCAUGCUCU[dT] [dT]

### 3.2.5. Mitokondri Membran Potansiyelinin Belirlenmesi

Mdivi-1 ve Drp-1 ve Mfn2 siRNA ile muamele edilmiş melanoma hücrelerinin mitokondri membran potansiyellerinin belirlenebilmesi için, inkübasyon süreleri sonunda hücreler kuyulardan toplanarak FACS tüplerine alındı. 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edilen hücrelerin üst sıvıları uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 2 ml serumsuz medyum eklendi ve tüpler karıştırıldı. Kontrol hariç diğer tüplere, 1  $\mu$ l/ml rhodamin 123 eklendi ve tüpler karıştırıldı. 15 dakika karanlıkta  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıları

uzaklaştırıldı ve her tüpe 2,5 ml PBS eklendi. 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıları uzaklaştırıldı, her tüp üzerine 500 µl PBS eklendi. Örnekler akım sitometri cihazından geçirildi ve analizleri yapıldı.

### 3.2.6. Hücre Döngüsü Analizleri

Melanoma ve keratinosit hücreleri 6 kuyulu platelere  $2 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde ekildi. Mdivi-1 ve Drp-1 ve Mfn-2 siRNA ile işlem görmüş hücreler kuyulardan tripsin-EDTA ile kaldırılarak 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Hücreler 15 ml falkon tüplere alınarak 5 ml %95 etanolde gece boyunca  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de fikse edildi. Fiksasyon sonunda hücrelerden etanol santrifüj işlemi ile uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine propidium iodide (50 µg/ml) ve 100 µg/ml Ribonükleaz A eklendi ve 30 dakika  $37^{\circ}\text{C}$  %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler flow sitometri cihazında analiz edildi.

### 3.2.7. Hücre Göç Analizleri

Melanoma hücreleri 6 kuyulu platelere  $2 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde ekildi. Mdivi-1 ile işlem görmüş hücreler kuyulardan tripsin-EDTA ile kaldırılarak 2 kez PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra hücreler sayılarak göç analizleri için özel tasarlanmış 8 µm por büyüklüğüne sahip Boyden haznelere  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde ekildi. Hazneler FBS'li medyum içerisine yerleştirilerek gece boyunca  $37^{\circ}\text{C}$  %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hazneler içerisindeki üst sıvı dökülerek membran üzerindeki hücreler bir kulak temizleyicisi ile toplandı. Hazneler sırasıyla fiksatif ve boyaya batırıldıktan sonra, fazla boya son aşamada suya batırılarak uzaklaştırıldı. Hazneler kurutulduktan sonra mikroskop altında göç etmiş hücreler boyalı göç etmemiş hücreler ise boyanmamış olarak belirlendi ve görüntüledi. Daha sonra üç farklı deneyden elde edilen rastgele seçilmiş görüntülerde hücrelerin sayımı yapıldı.

Boyden haznesinin yanı sıra hücre göçü kimyasal çekici bir madde kullanmaksızın yara çizgisi (wound scratch) yöntemi ile de değerlendirildi. Hücreler 6 kuyulu platelere  $2 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde ekildi. Mdivi-1, Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile işlem gören hücrelere inkübasyon süreleri sonunda kuyuların tam ortasından geçecek şekilde 200 µl'lik pipet ucu yardımıyla ince bir hat çizildi. Plate tabanından ayrılan hücreler kuyulardan bir kez PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine uygun complete medyum eklendi. 24 ve 48 saat sonra hücreler mikroskop yardımı ile

görüntülendi. Üç farklı deneyden elde edilen görüntüler ImageJ programının MRI Wound Healing Tool yaması kullanılarak değerlendirildi.

### **3.2.8. Mitokondri Dinamikleriyle İlişkili Gen İfadelerinin qPCR İle Belirlenmesi**

#### **3.2.8.1. RNA İzolasyonu**

10 cm'lik petri kaplarına ekilen melanoma ve keratinosit hücreleri hücre kazıyıcısı ile petri kaplarından kaldırılarak iki kez soğuk PBS ile yıkandı. Hücrelerin RNA izolasyonu RNeasy mini kit (QIAGEN) ile yapıldı. Pelet üzerine kit içerisinde bulunan Buffer RLT'den 350 µl eklenerek vortekslendi. Bu solüsyonun üzerine 1:1 oranında %70 etanol eklenerek pipetaj yöntemi ile karıştırıldı. Kit içeriğinde bulunan kolon içerisine solüsyon aktarılarak 30 saniye 8000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı ortamdan uzaklaştırıldı. Kolon üzerine 700 µl Buffer RW1 eklenerek 30 saniye 8000 rpm'de santrifüj edildi. Üst sıvı ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kolona 500 µl Buffer RPE eklenerek tekrar 30 saniye 8000 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlem aynı şekilde santrifüj süresi 2 dakika olacak şekilde tekrar edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolonda kalan sıvıyı uzaklaştırabilmek için örnekler tekrar 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonlar yeni 1.5 ml ependorf tüplere alınarak üzerlerine 30 µl RNase-free su eklendi ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen örnekler -80°C'de saklandı.

#### **3.2.8.2. Ters Transkripsiyon PCR (RT PCR)**

Hücrelerden izole edilen RNA konsantrasyonu NanoDrop cihazı ile ölçüldü. Her bir reaksiyon için 20 µl hacim içerisinde 3 µg RNA, 4 µl RT (ters transkripsiyon) mix ve RNase free su kullanıldı. Her bir örnek için 3 tekrar yapıldı. Reaksiyon protokolü; 25°C'de 5 dakika başlangıç (priming), 42°C'de 30 dakika ters transkripsiyon ve 85°C'de 5 dakika ters transkriptaz etkisizleştirme olacak şekilde gerçekleştirildi.

#### **3.2.8.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)**

PCR sonunda elde edilen cDNA'ler qPCR işlemi uygulanana kadar -20°C'de saklandı. 96 kuyulu PCR platelerine kuyu başına toplam hacim 20 µl olacak şekilde, 10 µl SYBR Mix, 5 µl cDNA, 1 µl primer ve 4 µl dH<sub>2</sub>O eklendi. Kullanılan primerler; DNM1L, MFN-1, MFN-2, OPA-1 ve β -Aktin olarak seçildi (Tablo 3-2). Cihazdan uygun program seçilerek örnekler 1 saat boyunca yürütüldü. Çıkan sonuçlar ΔΔCt hesaplamasına göre değerlendirildi.

$$\Delta C_t = C_t^{\text{araştırılan gen}} - C_t^{\text{housekeeping gen}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t^{\text{deney grubu}} - \Delta C_t^{\text{kontrol}}$$

$$RQ \text{ (Rölatif sayısallaştırma)} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

**Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan primer dizileri**

Primer Adı	Dizi (5'-3')
DNM1L - Forward	CTGATTCAATCCGTGATGAG
DNM1L - Reverse	AACCTGTTTAGAGTCCTAGC
OPA 1 - Forward	TGAGTTGGAATGCAATGATG
OPA 1 - Reverse	GTTGCCTTAAAGTATTTGCG
MFN 1 - Forward	ATCTTTGAGGAGTGTATCTCG
MFN 1 - Reverse	GTAGCTAGTATCTGTTTAGCTC
MFN 2 - Forward	CTTCTTTGTGTCTGCTAAGG
MFN 2 - Reverse	CTGAAACTCAAACATCCTCAC
$\beta$ -Aktin - Forward	TTCTACAATGAGCTGCGTGTG
$\beta$ -Aktin - Reverse	GGGGTGTTGAAGGTCTCAA

### 3.2.9. Oksijen Tüketim Ve Ekstraselüler Asidifikasyon Oranlarının Belirlenmesi

#### 3.2.9.1. Hücrelerin 96 kuyulu XF96 Hücre Kültürü Platlerine Ekimi

Cihaza uygun 96 kuyulu platelere her kuyuda 10.000 hücre ve her bir örnek için 3 tekrar olacak şekilde hücre ekildi. Plate köşelerindeki kuyular (A1, A12, H1, H12) arka plan düzeltme kuyuları olduğu için bu kuyulara yalnızca medyum eklendi. Hücre kültür kabini içerisinde ekim yapılan plate inkübatöre taşınmadan önce 1 saat bekletildi.

Böylelikle hücrelerin kuyuların kenarlarında yoğunlaşması engellendi. Gece boyu inkübasyondan sonra hücrelere uygun derişimlerde mdivi-1 verildi.

### **3.2.9.2. Sensör Kartuşunun Hidratlanması ve Cihaza Yerleştirilmesi**

Kit içerisinde bulunan utility plate'inin her bir kuyusuna 200 µl Seahorse XF kalibratör solüsyonundan eklendi. Sensör kartuşu utility plate'inin içerisinde batırıldı. Solüsyon içerisindeki kartuş CO<sub>2</sub>'siz 37°C inkübatörde gece boyu inkübe edildi. XF kalibratörünün buharlaşmasını engellemek için inkübatörün içerisine bir kap dH<sub>2</sub>O konuldu. Önceden hazırlanan deney medyumunu ısıtıldı ve her bir kuyudaki hücreler bu medyum ile 2 kez yıkandı. Hücrelerin üzerine kuyu başına 175 µl deney medyumunu eklendi ve CO<sub>2</sub>'siz 37°C inkübatörde analizden önce 1 saat bekletildi. Hücreleri içeren sensör kartuşu cihaza yüklendi ve uygun program seçilerek analiz başlatıldı.

### **3.2.10. Hücre İçi Kalsiyum Miktarlarının FURA-2 AM İle Belirlenmesi**

Melanoma hücreleri ve keratinositler mdivi-1 ile 72 saat 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edildikten sonra 2 kez kalsiyum ve magnezyum içermeyen HBSS solüsyonu (HBSS, 20 mM HEPES, 2 g/L D-glucose, pH 7.4) ile yıkandı. 1 ml HBSS solüsyonu içerisinde süspansiyon hale getirilen hücrelerin üzerine 1 µM FURA 2-AM ve 1/1.5 (hacim/hacim) oranında F-127 Pluronic asit eklenerek oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. İnkübasyon sonunda hücreler 1 kez HBSS solüsyonu ile yıkandı ve 0.5 ml HBSS solüsyonu içerisinde çözülerek floresans spektroskopisinde ölçümler 340/380 nm eskitasyon oranlarına ve 510 nm emisyon değerlerine göre yapıldı.

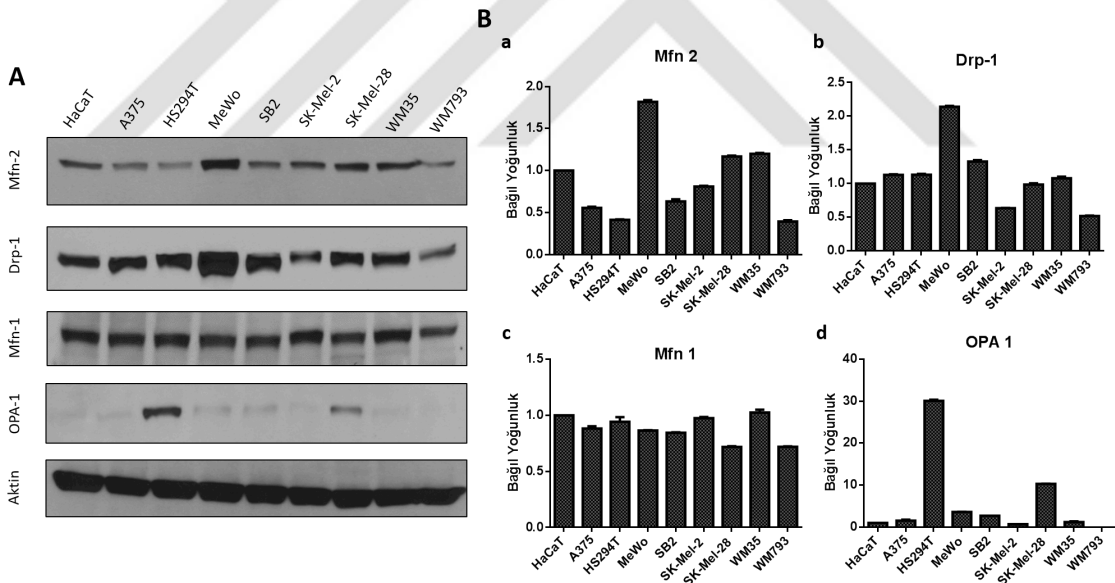
### **3.2.11. İstatistiksel Analizler**

DeneySEL verilerin istatistiksel analizinde *GraphPad Prism 6* programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık p<0.05 düzeyinde yapıldı. Tezde kullanılan verilerin homojenitelerine bakıldıktan sonra, verilerin homojen dağılım gösterdiği yerlerde Bonferonni, olmadığı yerlerde Games-Howell testleri uygulanarak sonuçlar yorumlandı. Verilerin değerlendirilmesinde student's t-test ve one-way ANOVA testleri kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Melanoma ve Normal Hücrelerde Mitokondriyal Dinamiklerle İlişkili Protein İfadelerinin Belirlenmesi

Farklı melanoma hücreleri (A375, HS294T, MeWo, SB2, SK-Mel-2, SK-Mel-28, WM35, WM793) ve keratinosit hücrelerinde (HaCaT), mitokondriyal dinamikler füzyon (Mfn1, Mfn2 ve OPA1) ve fizyon (Drp1) ile ilişkili proteinlerin anlatımları western blot yöntemi ile değerlendirildi (Şekil 4-1 A ve B). Elde edilen sonuçlara göre mitokondriyal fizyon ve füzyonda görevli Drp-1 ve Mfn 2 protein anlatım seviyeleri farklı melanoma hücreleri (SB2, MeWo ve WM793), ve keratinosit hücreleri (HaCaT) hücre döngüsü ve qPCR analizlerinde ve A375, MeWo ve WM793 hücreleri ve HaCaT hücreleri ise hücre canlılığı, konfokal mikroskop, siRNA transfeksiyonu, hücre göçü, yara çizgisi, membran potansiyeli, oksijen tüketim ve ekstraselüler asidifikasyon oranları ve western blot analizlerinde kullanılmak üzere seçildi.

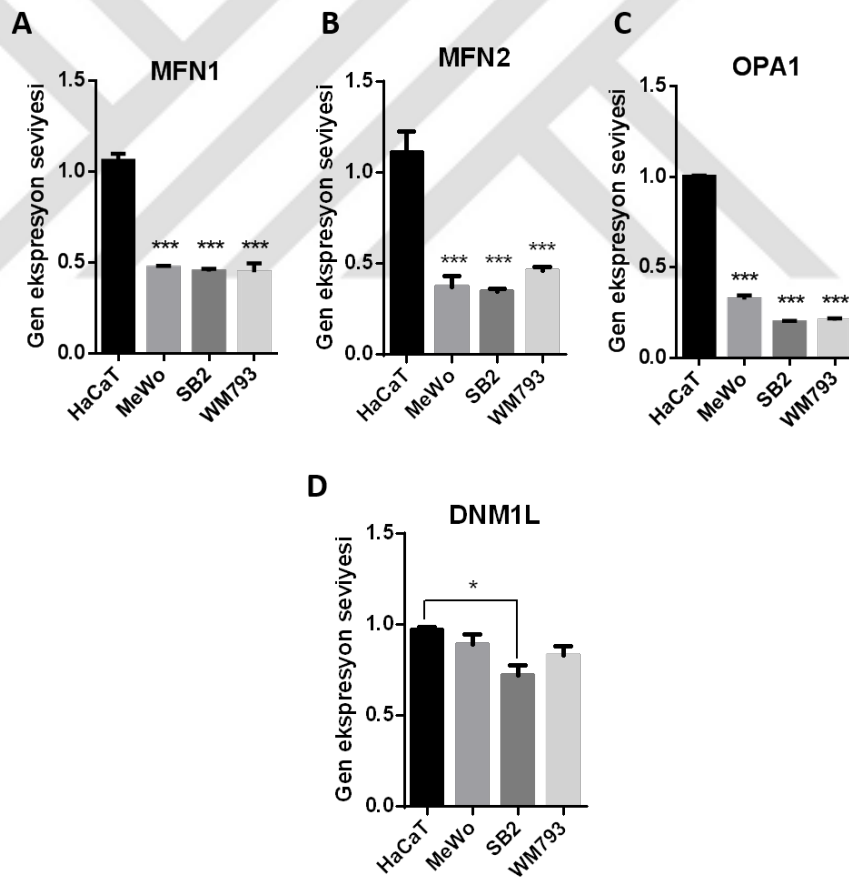


**Şekil 4-1: Farklı melanoma hücreleri ve keratinosit hücrelerinde mitokondriyal dinamiklerle ilişkili protein anlatımları.**

(A) Farklı melanoma hücrelerinde Mfn 2, Drp-1, Mfn 1, OPA 1 ve Aktin protein anlatımları western blot analizi ile belirlendi. (B) Bant yoğunluklarının Image J programı ile sayısallaştırılarak bar grafik gösterimi.

#### 4.2. Melanoma ve Normal Hücrelerde Mitokondriyal Dinamiklerle İlişkili Gen İfadelerinin Belirlenmesi

Farklı melanoma hücreleri (MeWo, SB2, WM793) ve keratinosit hücrelerinde (HaCaT) mitokondriyal dinamikler ile ilişkili genlerin (DNM1L, MFN1, MFN2 ve OPA1) anlatımları qPCR yöntemi ile belirlendi (sırasıyla Şekil 4-2 A, B, C ve D). RNA'ları izole edilen hücrelerden cDNA elde edildi. Sonrasında ise uygun primerler kullanılarak qPCR işlemine devam edildi. Elde edilen sonuçlar  $\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct$  ve rölatif sayısallaştırma (RQ) hesaplamasına göre düzenlendi. Melanoma hücrelerinde mitokondriyal füzyon ile ilişkili gen anlatımlarının (MFN1, MFN2 ve OPA1) keratinositler ile karşılaştırıldığında önemli derecede azaldığı, füzyon ile ilişkili DNM1L geni keratinositlerle karşılaştırıldığında ise SB2 hücrelerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi.



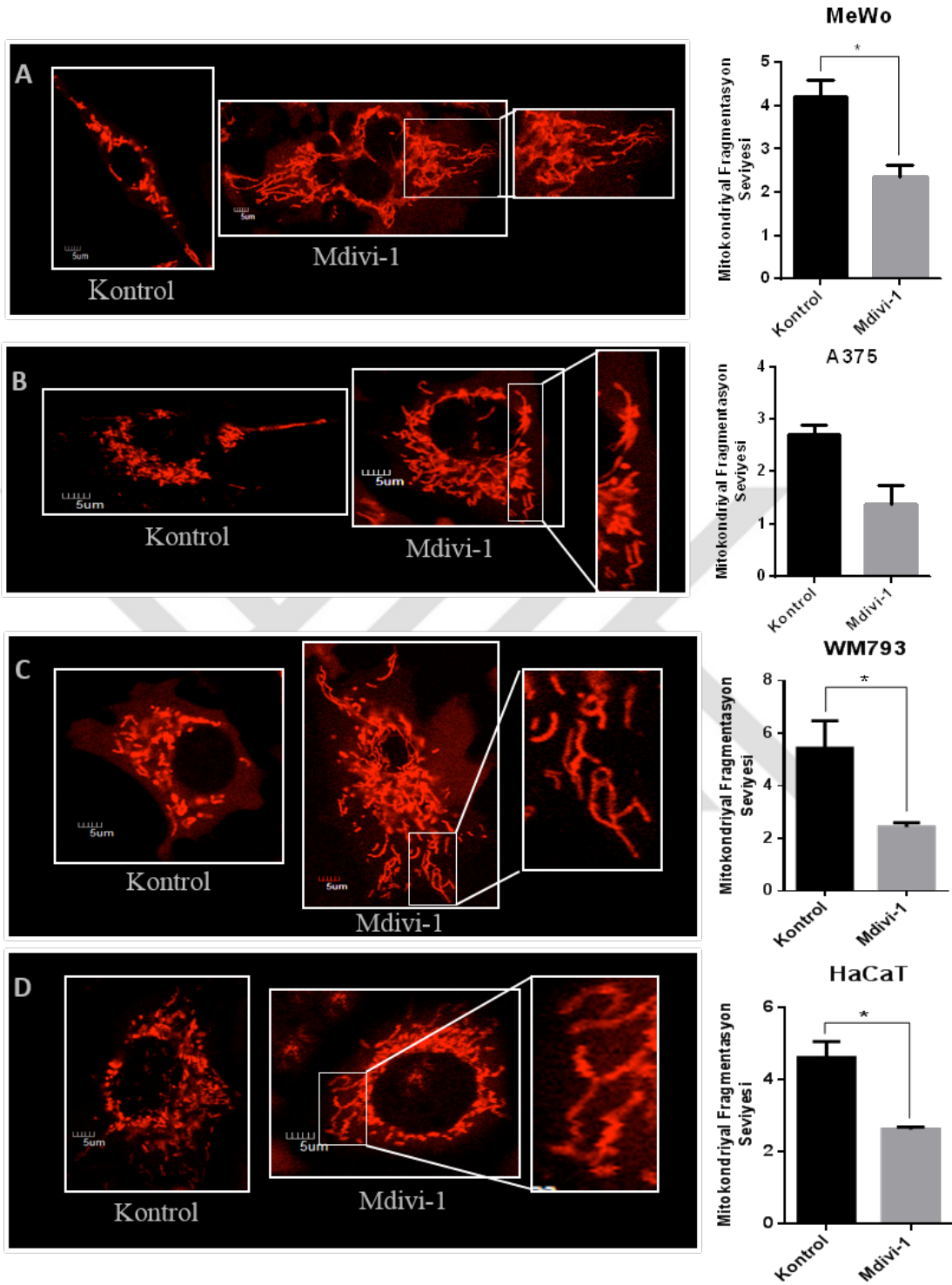
**Şekil 4-2: Melanoma ve normal hücrelerde mitokondriyal dinamiklerle ilişkili gen anlatımları.**

(A) MFN1, (B) MFN2, (C) OPA1 ve (D) DNM1L gen ekspresyon seviyeleri. Hata barları; standart hata (SEM),  $p < 0,05$  (\*) ve  $p < 0,001$  (\*\*\*) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



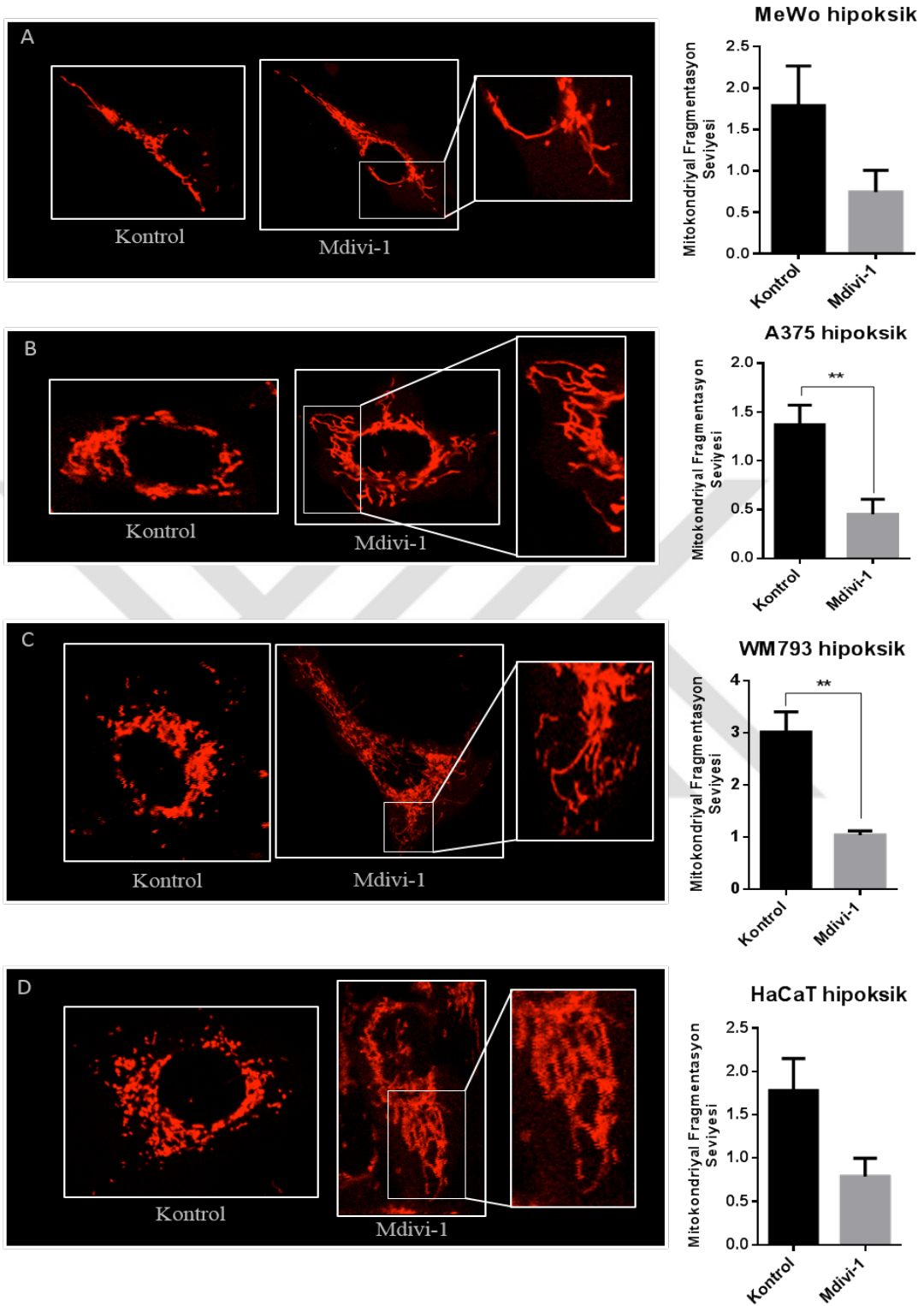
### **4.3. Normoksik ve Hipoksik Koşullardaki Melanoma ve Keratinosit Hücrelerinde mdivi-1'in Mitokondriyal Dinamikler Üzerine Etkisi**

Melanoma hücreleri (A375, MeWo ve WM793) ve keratinositler (HaCaT) 20  $\mu\text{M}$  mdivi-1 ile 37°C'de %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde (normoksik koşullarda) 72 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin mitokondrileri MitoTracker Red kullanılarak işaretlendi. Mdivi-1 uygulanmış A375, MeWo, WM793 ve HaCaT hücrelerinin (melanoma ve keratinositler) mitokondrilerinin fragmente yapıdan (fizyon) ağsı yapıya (füzyon) geçtiği gözlemlendi (Şekil 4-3 A, B, C ve D). Kanser hücrelerinin hipoksik ortamda da çoğaldığı bilindiğinden melanoma hücreleri ve keratinositler 20  $\mu\text{M}$  mdivi-1 ile 37°C'de %1  $\text{O}_2$ 'li inkübatörde (hipoksik koşullarda) 72 saat inkübe edildikten sonra mitokondriler normoksik ortamdaki gibi MitoTracker Red kullanılarak işaretlendi (Şekil 4-4 A, B, C ve D). Mitokondri dinamiklerindeki değişimler ise Image J programı kullanılarak konfokal mikroskopuyla alınan görüntülerdeki partikül sayısının toplam mitokondriyal piksele oranlanması ile elde edildi. Mdivi-1 ile mitokondriyal fizyonunun inhibe edildiği hipoksik koşullar altındaki hücrelerde, normoksik koşullara göre fizyonun daha çok baskılandığı ve ağsı mitokondrilerin (füzyon) oluşumunun arttığı belirlendi (Şekil 4-3 ve 4-4 A, B, C ve D).



**Şekil 4-3: Normoksik ortamda mdivi-1 ile işlem görmüş melanoma ve keratinosit hücrelerinde mitokondriyal değişimlerin konfokal mikroskobu ile incelenmesi.**

(A) MeWo, (B) A375, (C) WM793 ve (D) HaCaT hücreleri. Mitokondriyal fragmentasyon sevipleri 3 ayrı deneyden elde edilen rastgele seçilmiş hücrelerden elde edilmiştir. Büyütme 60x, hata barları; standart hata,  $p < 0,05$  (\*) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

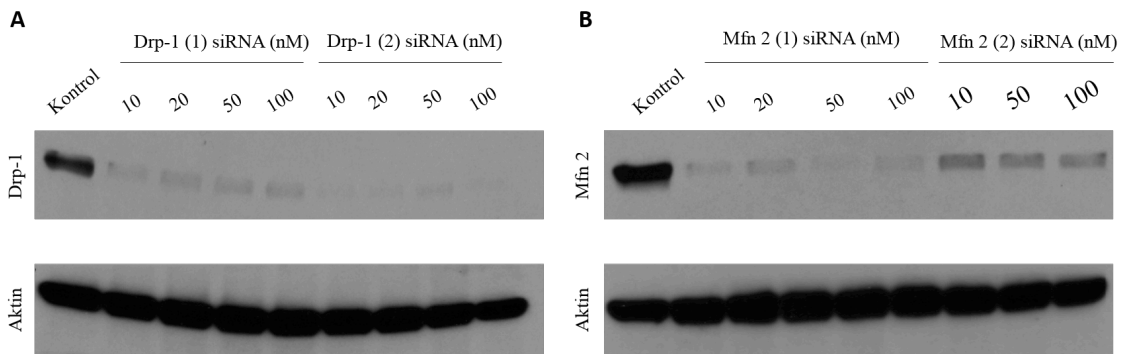


**Şekil 4-4: Hipoksik ortamda mdivi-1 ile işlem görmüş melanoma ve keratinosit hücrelerinde mitokondriyal değişimlerin konfokal mikroskobu ile incelenmesi.**

(A) MeWo, (B) A375, (C) WM793 ve (D) HaCaT hücreleri. Mitokondriyal fragmentasyon sevipleri 3 ayrı deneyden elde edilen rastgele seçilmiş hücrelerden elde edilmiştir. Büyütme 60 x, hata barları; standart hata,  $p < 0,05$  (\*) ve  $p < 0,01$  (\*\*) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

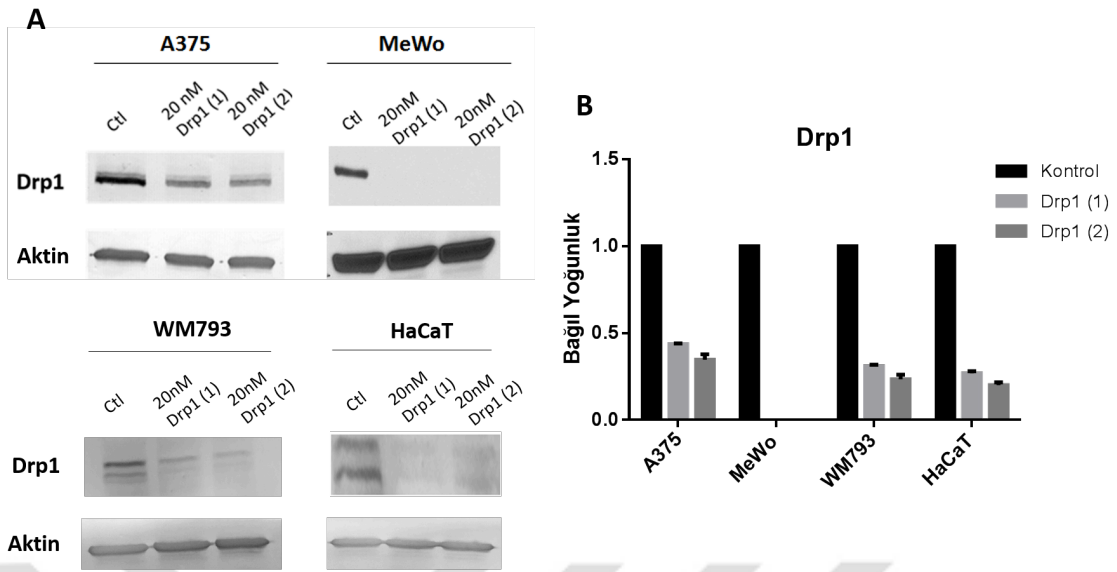
#### 4.4. Melanoma ve Normal Hücrelerin Drp-1 ve Mfn 2 Protein İfadelerinin Susturulmasının Mitokondriyal Dinamikler Üzerine Etkisi

Şekli 4-1'de elde edilen farklı melanoma hücrelerindeki Drp-1 ve Mfn2 protein anlatımlarından yola çıkılarak her iki proteinde de en yüksek anlatıma sahip MeWo hücreleri farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50 ve 100 nM) Drp 1 ve Mfn 2 siRNA'ler (Tablo 2) ile gece boyu inkübe edildikten sonra normal complete medyuma geçirilerek 48 saat daha 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyulardan toplanan hücrelerden lizatlar elde edildi. Protein miktarları Bradford yöntemi ile değerlendirildi ve her kuyuya 20 µg protein yüklenerek SDS-PAGE yapıldı. siRNA transfeksiyonu, Drp-1 ve Mfn 2'ye karşı kullanılan antikorlarla western blot yöntemiyle doğrulandı (Şekil 4-5). MeWo ile yapılan transfeksiyon deneyleri sonrasında kullanılan konsantrasyon aralığından 20 nM seçilerek, A375, WM793 ve HaCaT hücrelerinin de Drp-1 ve Mfn 2 siRNA transfeksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 4-6 ve 4-7 sırasıyla). Her iki siRNA transfeksiyonunda da hücrelerde protein anlatımlarının %50'nin üzerinde 1 numaralı siRNA (Drp-1 (1) ve Mfn 2 (1)) ile susturulduğu Image J analizleri ile belirlendi. Drp-1 ve Mfn 2 için kullanılan siRNA'lerden konfokal mikroskop analizleri için hücreler 20 nM Drp-1(1) ve Mfn 2 (1) siRNA'leri ile inkübe edildi. Mitokondrilerin boyanması ve konfokal analizleri yöntemler 3.2.2.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (Şekil 4-8 ve 4-9).



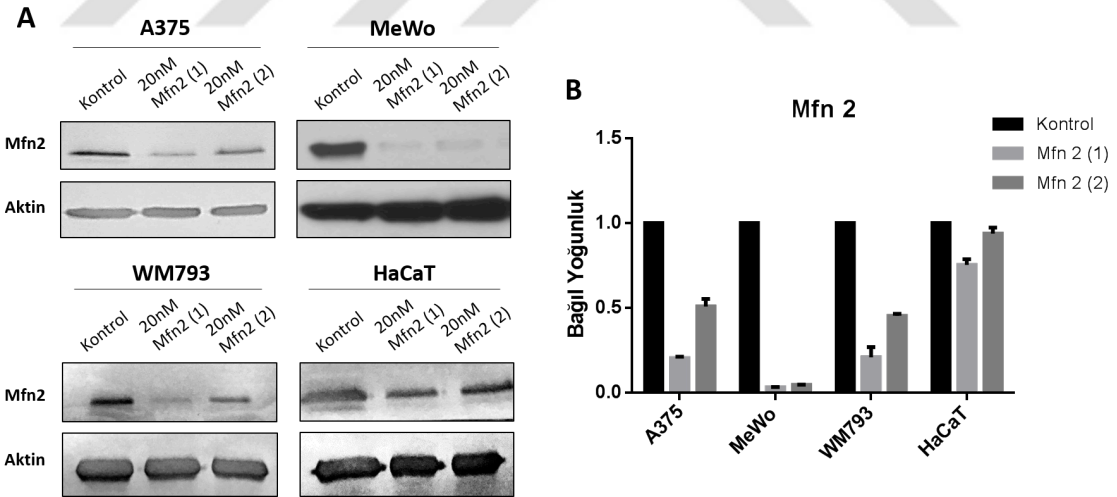
**Şekil 4-5: Farklı konsantrasyonlarda iki farklı Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş MeWo hücresinde Drp-1 ve Mfn 2 protein anlatımlarının belirlenmesi.**

(A) Drp-1 (B) Mfn 2 protein anlatımları.



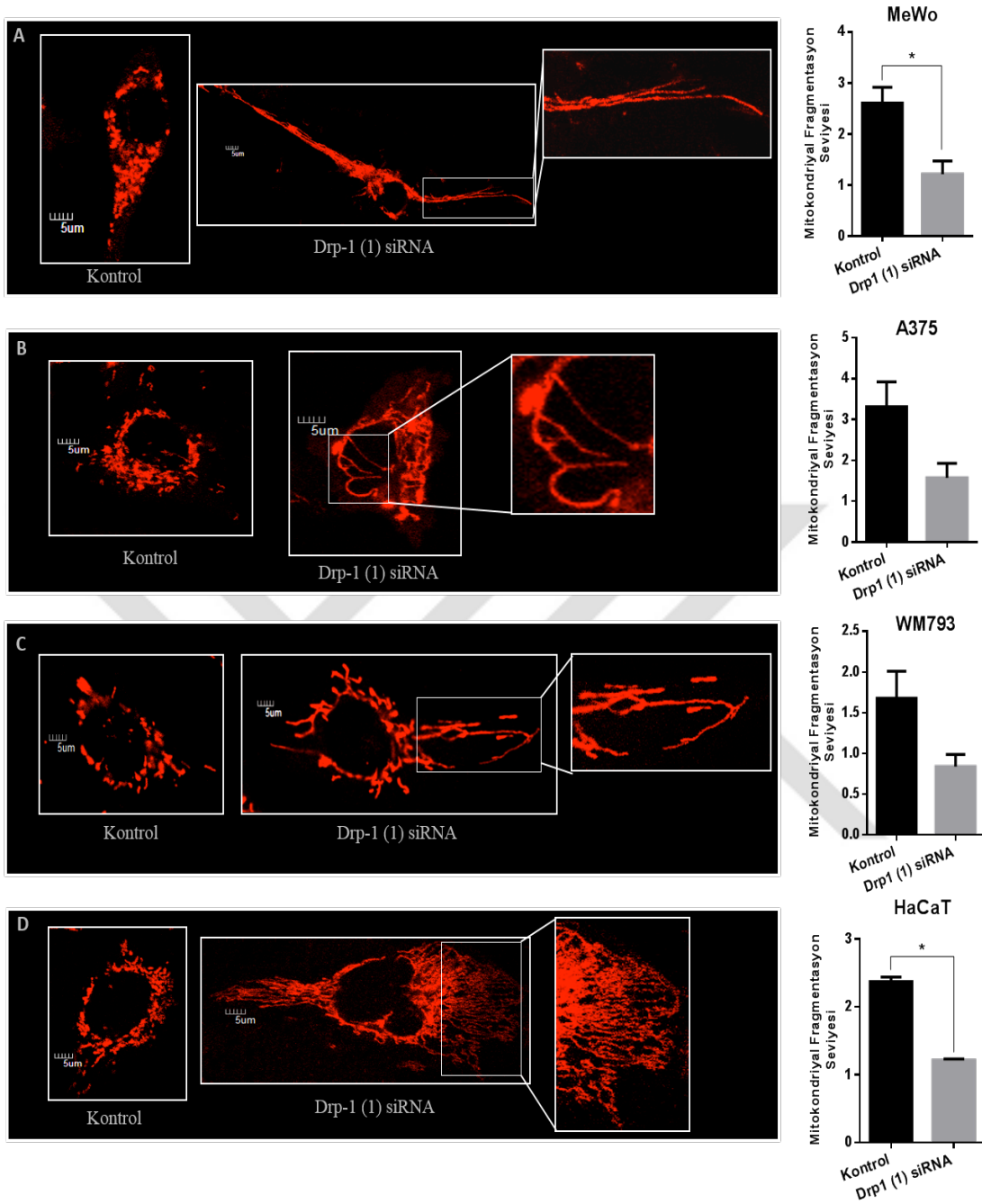
**Şekil 4-6: Drp-1(1) ve Drp-1 (2) siRNA ile muamele edilmiş melanoma (A375, MeWo, WM793) ve keratinositlerde (HaCaT) Drp-1 protein anlatımının western blot analizi.**

(A) Drp-1 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde Drp-1 protein anlatımlarının western blot analizi. (B) Bant yoğunluklarının Image J programı ile sayısallaştırılarak bar grafik gösterimi.



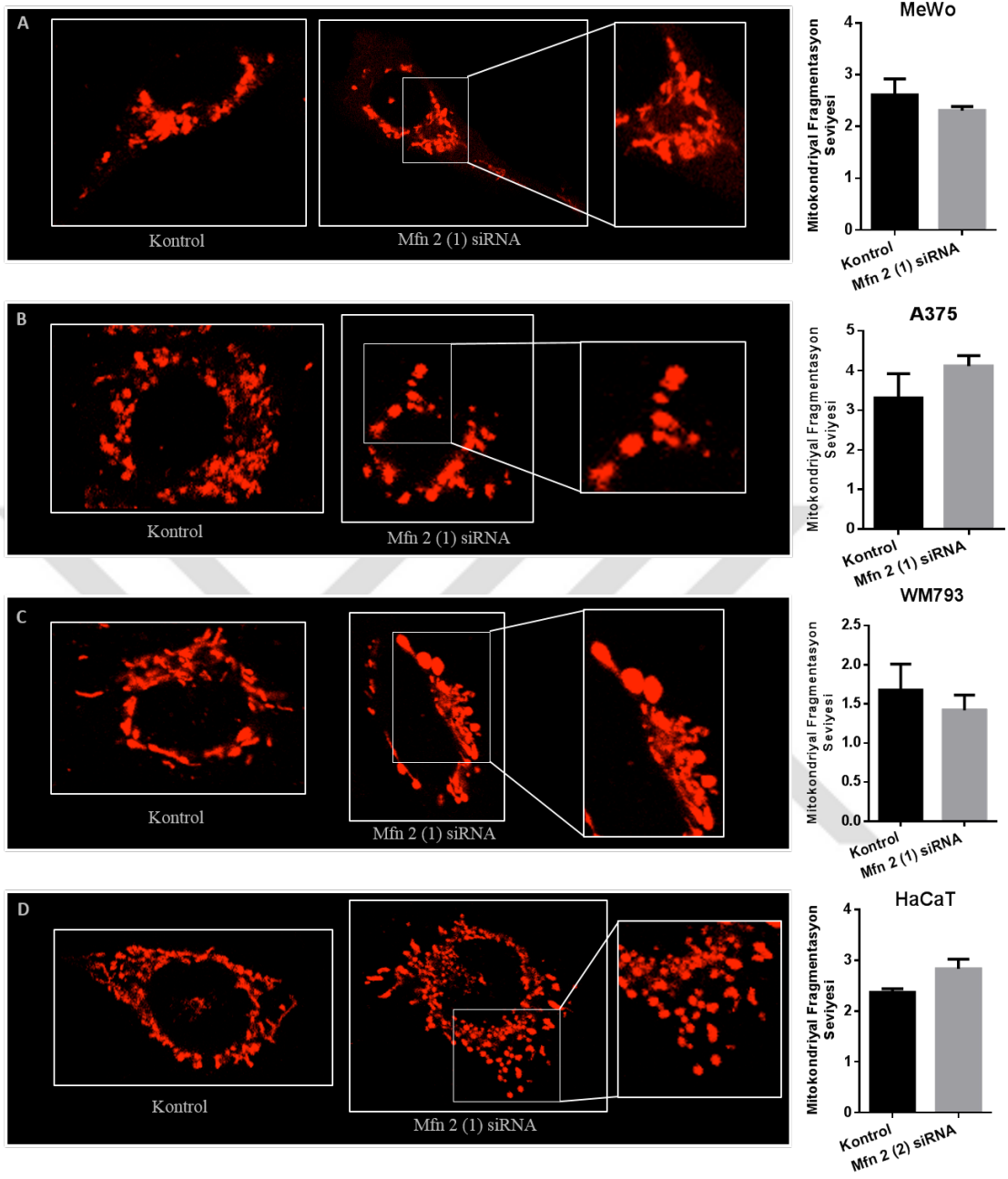
**Şekil 4-7: Mfn 2 (1) ve Mfn 2 (2) siRNA ile muamele edilmiş melanoma (A375, MeWo, WM793) ve keratinositlerde (HaCaT) Drp-1 protein anlatımının western blot analizi.**

(A) Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde Mfn 2 protein anlatımlarının western blot analizi. (B) Bant yoğunluklarının Image J programı ile sayısallaştırılarak bar grafik gösterimi.



**Şekil 4-8: Drp-1 (1) siRNA ile işlem görmüş melanoma ve keratinosit hücrelerinde mitokondriyal değişimlerin konfokal mikroskobu ile incelenmesi.**

(A) MeWo, (B) A375, (C) WM793 ve (D) HaCaT hücreleri. Mitokondriyal fragmentasyon sevipleri 3 ayrı deneyden elde edilen rastgele seçilmiş hücrelerden elde edilmiştir. Büyütme 60x, hata barları; standart hata,  $p < 0,05$  (\*) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

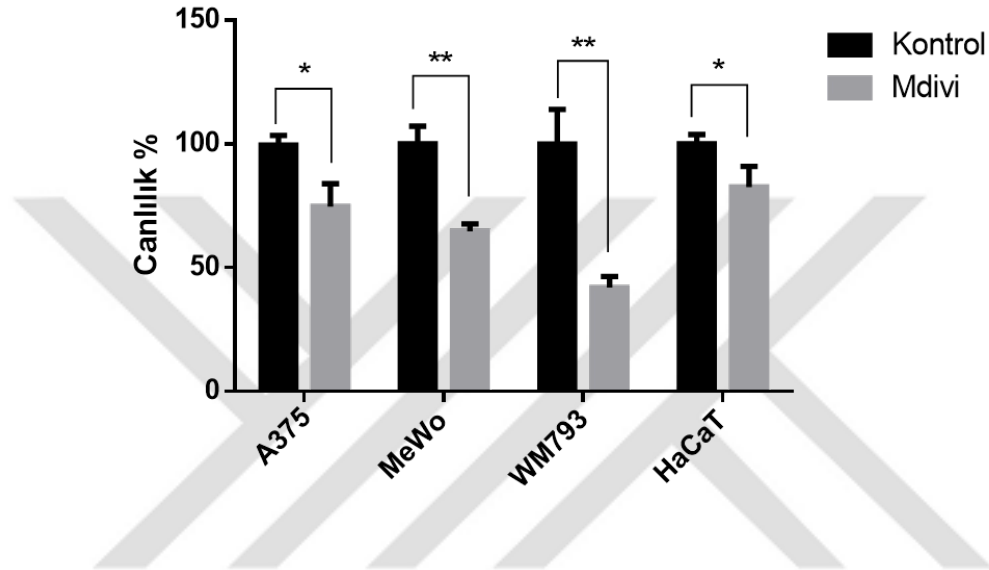


**Şekil 4-9: Mfn 2 (1) siRNA ile işlem görmüş melanoma ve keratinosit hücrelerinde mitokondriyal değişimlerin konfokal mikroskobu ile incelenmesi.**

(A) MeWo, (B) A375, (C) WM793 ve (D) HaCaT hücreleri. Mitokondriyal fragmentasyon sevipleri 3 ayrı deneyden elde edilen rastgele seçilmiş hücrelerden elde edilmiştir. Büyütme 60x, hata barları; standart hata.

#### 4.5. Mdivi-1'in Melanoma Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Melanoma hücreleri (A375, MeWo ve WM793) ve keratinositler (HaCaT), 20  $\mu$ M mdivi-1 ile 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücre canlılıklarının belirlenmesi 3.2.2.1'de açıklandığı şekilde yapıldı. Mdivi-1'in melanoma hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı, keratinosit hücrelerine ise etki etmediği belirlendi (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: Mdivi-1 ile inkübe edilmiş melanoma (A375, MeWo ve WM793) ve keratinosit (HaCaT) hücrelerindeki canlılık oranları.

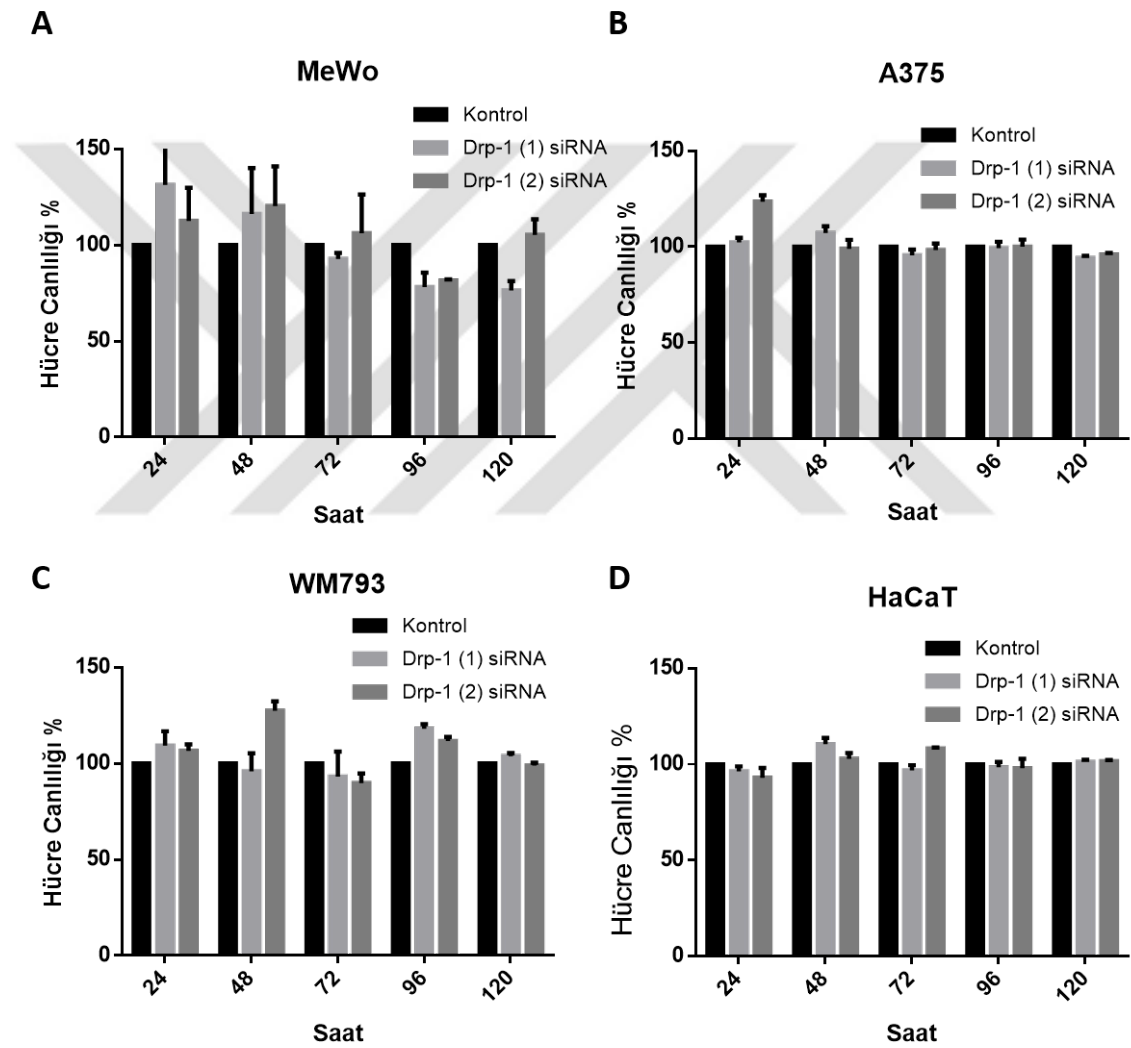
Hata barları; standart hata, p<0,05 (\*) ve p<0,01 (\*\*) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

#### 4.6. Drp-1 ve Mfn 2 siRNA Transfeksiyonunun Melanoma ve Keratinosit Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Melanoma hücreleri (A375, MeWo ve WM793) ve keratinosit hücreleri (HaCaT) 3.2.4'te açıklandığı şekilde Drp-1 (1) ve (2) ve Mfn 2 (1) ve (2) siRNA ile muamele edildikten sonra hücre canlılıkları 120 saat boyunca her 24 saate bir analiz edildi (sırasıyla Şekil 4-11 ve 4-12). Drp-1 (1) ve (2) siRNA ile transfekte edilmiş A375, MeWo, WM793 ve HaCaT hücrelerinden yalnızca MeWo hücrelerinde 96 saat sonra hücre canlılığının sırasıyla %78,7 ve %81,3'e düştüğü belirlendi. Ancak bu azalmanın istatistiki bir anlamlılığı bulunamadı. Mfn 2 (1) ve (2) siRNA ile transfekte edilmiş A375, MeWo, WM793 ve HaCaT hücrelerinde ise WM793 ve HaCaT hücre canlılıklarında herhangi bir değişim gözlenmezken, A375 hücrelerinde 48 saat sonra Mfn 2 (2) siRNA ile transfekte edilmiş grupta canlılığın %66,9'a düştüğü belirlendi.

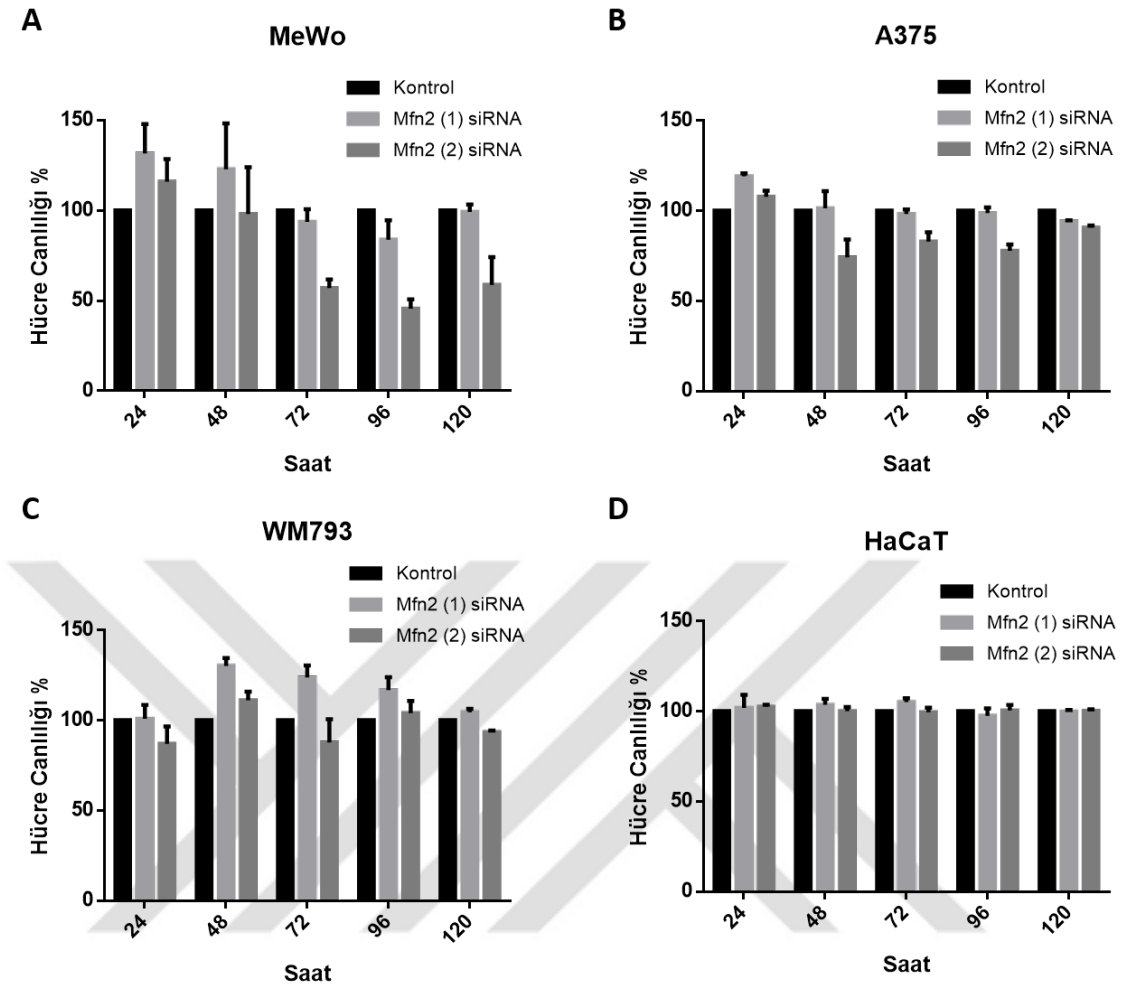


Ancak yine aynı grupta ilerleyen zaman dilimlerinde (72, 96 ve 120 saat) canlılığın sırasıyla % 79,4, 79,3 ve 91,7'e yükseldiği belirlendi. Mfn 2 (2) siRNA ile transfekte edilmiş MeWo hücrelerinde 72 ve 96 saatlerde hücre canlılıklarının sırasıyla % 59,7 ve 45,3'e düştüğü 120. Saatte ise bu oranın % 64' e yükseldiği belirlendi. Mfn 2 (1) siRNA ile transfekte edilmiş MeWo hücrelerinin hücre canlılıklarında ise herhangi bir değişim gözlemlenmedi.



**Şekil 4-11: Farklı sekanslara sahip iki Drp-1 siRNA ile transfekte edilmiş melanoma ve normal hücrelerdeki hücre canlılık oranları.**

(A) MeWo, (B) A375, (C) WM793 ve (D) HaCaT hücreleri. Hata barları; standart hata (SEM) olarak değerlendirilmiştir.

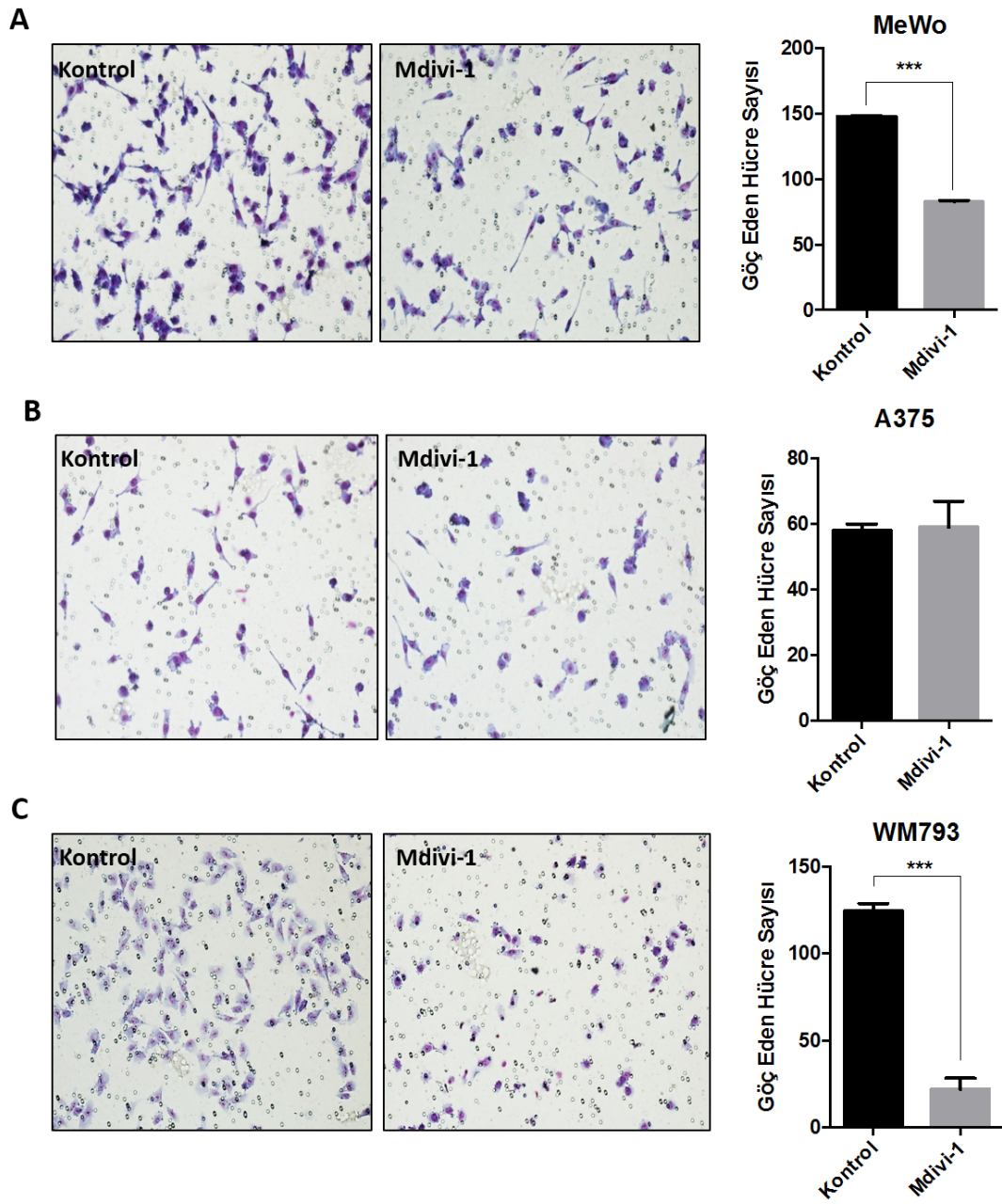


**Şekil 4-12: Farklı sekanslara sahip iki Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş melanoma ve normal hücrelerdeki hücre canlılık oranları.**

(A) MeWo, (B) A375, (C) WM793 ve (D) HaCaT hücreleri Hata barları; standart hata (SEM) olarak değerlendirilmiştir.

#### 4.7. Mdivi-1'in Hücre Göçü Üzerine Etkisi

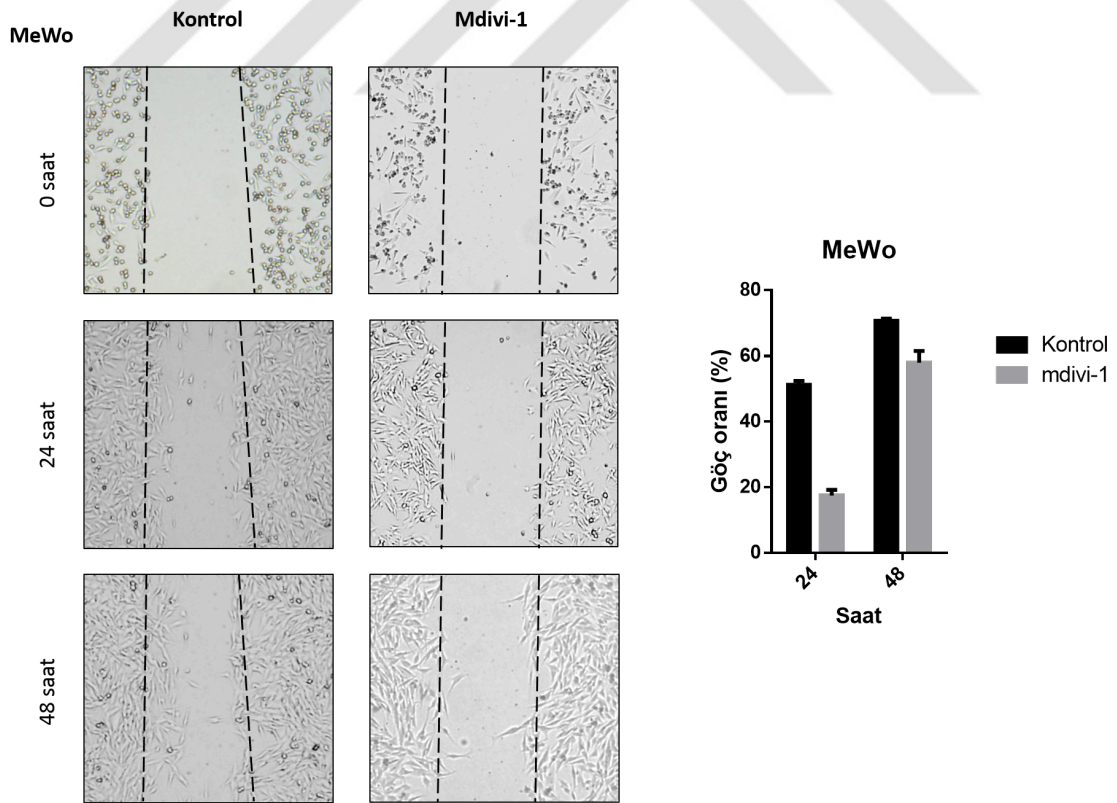
Melanoma hücreleri (A375, MeWo ve WM793) ve keratinositler (HaCaT) 20  $\mu$ M mdivi-1 ile 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 72 saat inkübe edildi. Hücre göç analizleri Boyden hazneleri kullanılarak hücrelerin kimyasal çekici maddeye karşı (FBS) hareketleri izlenerek gerçekleştirildi. Haznenin FBS'siz kısmından FBS bulunan kısmına geçen hücreler boyanarak sayıldı. Mdivi-1 ile muamele edilmiş A375 hücrelerinin göç oranlarında herhangi bir değişim gözlenmezken, MeWo ve WM793 hücrelerinde göç oranlarının azaldığı belirlendi (Şekil 4-13).



**Şekil 4-13: Mdivi-1 ile muamele edilmiş melanoma hücrelerinde göç analizi.**

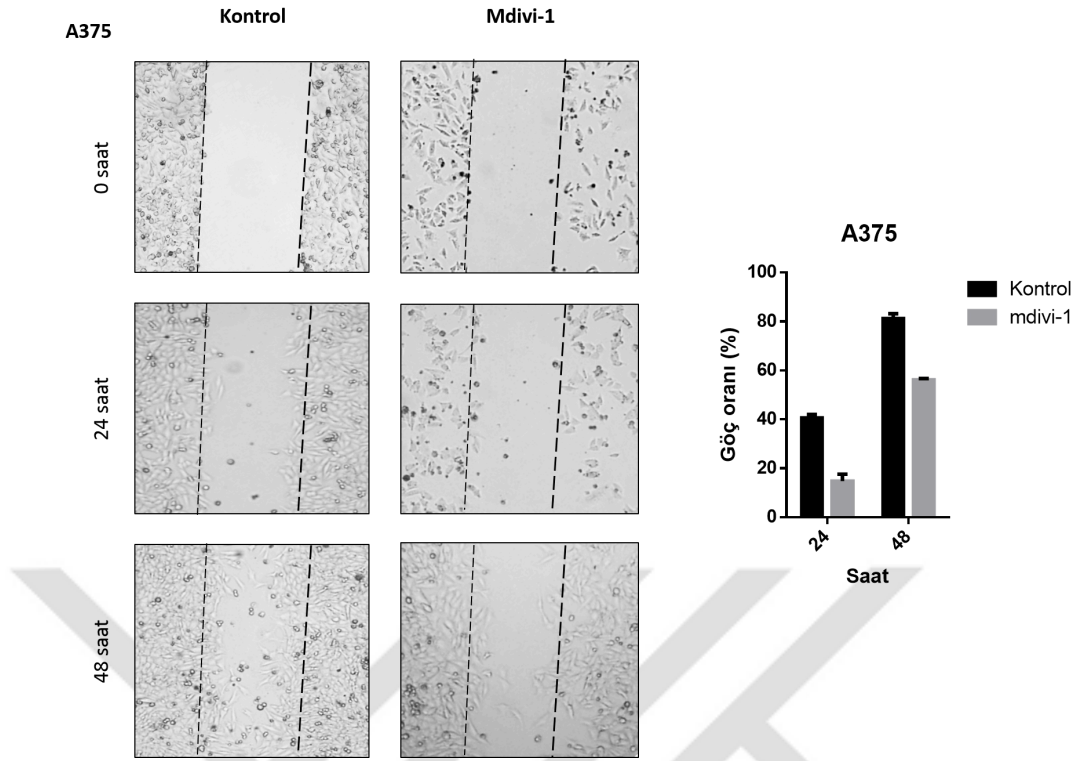
(A) MeWo, (B) A375, (C) WM793 hücreleri. Hata barları; standart hata,  $p < 0,001$  (\*\*\*) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Hücre göç analizleri ayrıca yara çizgisi analizleri kullanılarak da yapıldı. 6 kuyulu platelere ekilen hücelere 20  $\mu$ M mdivi-1 verilerek 72 saat bekletildikten sonra kuyunun tam ortasından geçecek şekilde pipet ucu yardımıyla yara açıldı. Açılan yaralar 0, 24 ve 48 saat boyunca izlenerek analiz edildi. MeWo kontrol hücrelerinde yara çizgisi açıldıktan 24 ve 48 saat sonra yara kapatma oranları sırasıyla %52,39 ve 71,36, mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde ise bu oranlar sırasıyla %17,52 ve 54,33 olarak belirlendi. A375 kontrol hücrelerinde yara çizgisi açıldıktan 24 saat sonra kontrol hücrelerinin yara kapatma oranları kontrol hücrelerinde %39,18, mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde ise %12 olarak belirlendi. 48 saat sonra bu oranların sırasıyla %83,15 ve %56,7'ye yükseldiği belirlendi. WM793 kontrol hücrelerinde yara çizgisi açıldıktan 24 sonra hücrelerin yaranın tamamını kapattığı, mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde ise 24 saat sonra yara kapatma oranının %63, 48 saat sonra ise %77,17 olduğu belirlendi. Bu verilere göre mdivi-1 ile muamele edilmiş her üç melanoma hücre tipinde de hücre göçünün kontrol hücrelerine kıyasla azaldığı belirlendi (Şekil 4-14, 4-15 ve 4-16).



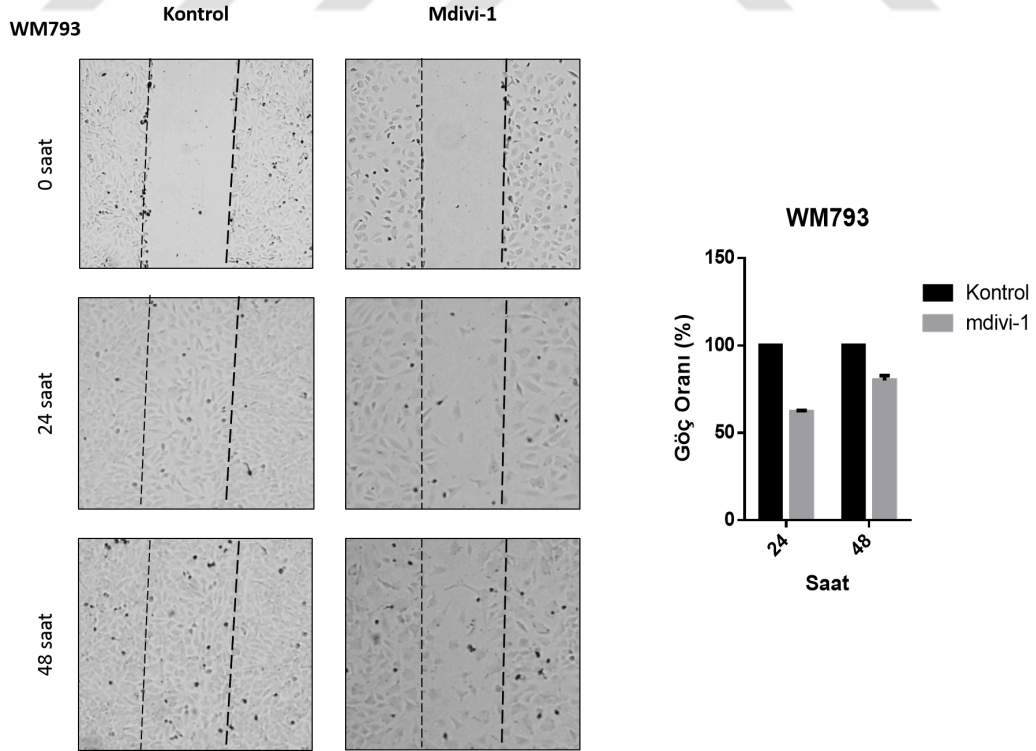
Şekil 4-14: Mdivi-1 ile muamele edilmiş MeWo hücrelerinde yara çizgisi analizi.

Büyütme 4x, hata barları; SEM.



**Şekil 4-15: Mdivi-1 ile muamele edilmiş A375 hücrelerinde yara çizgisi analizi.**

Büyütme 4x, hata barları; SEM.

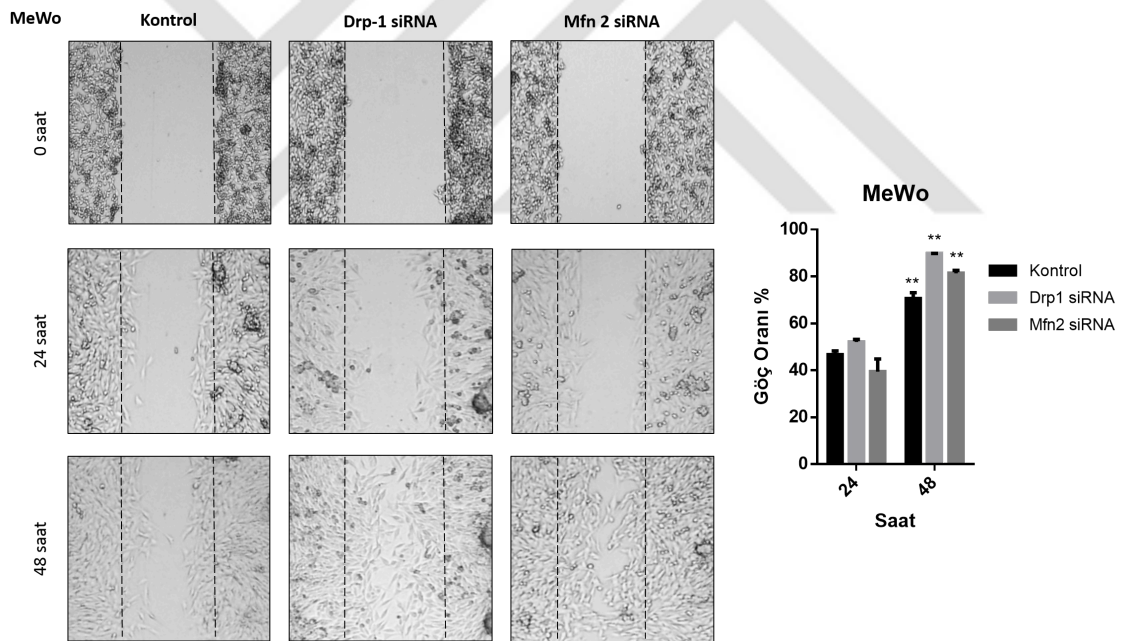


**Şekil 4-16: Mdivi-1 ile muamele edilmiş WM793 hücrelerinde yara çizgisi analizi.**

Büyütme 4x, hata barları; SEM.

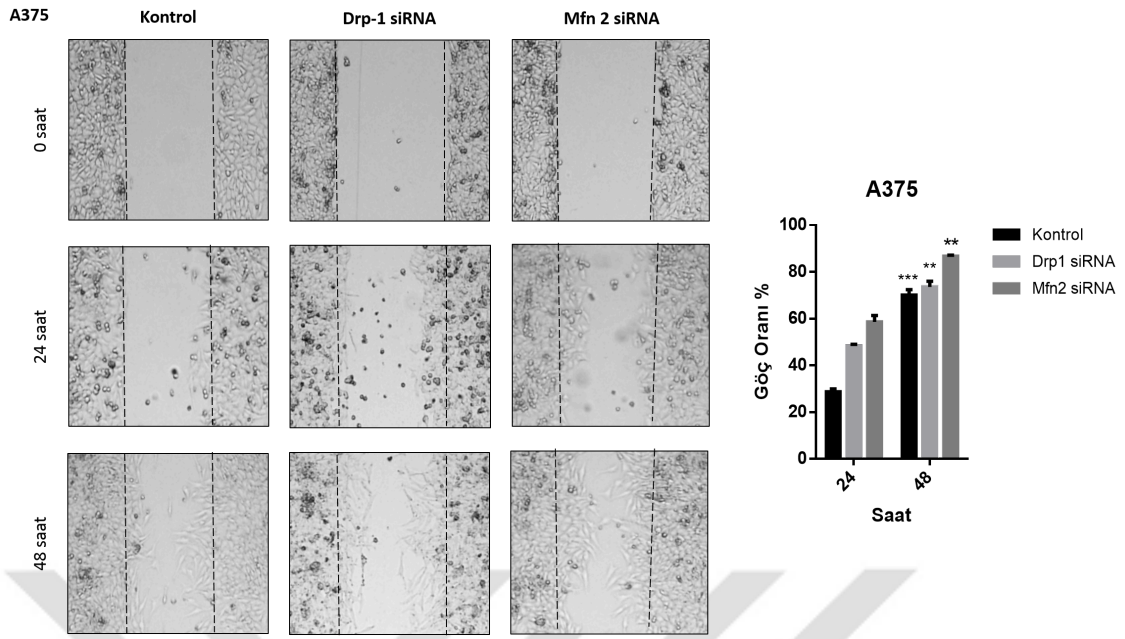
#### 4.8. Drp-1 ve Mfn 2 siRNA Transfeksiyonunun Hücre Göçü Üzerine Etkisi

Drp-1 ve Mfn2 siRNA ile transfekte edilen melanoma ve keratinosit hücrelerinde hücre göçü, yara çizgisi analizi ile değerlendirildi. siRNA transfeksiyonu gerçekleştirildikten sonra complete medyuma geçirilen hücreler 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücrelerin bulunduğu kuyulara 200 µl'lik pipet ucu yardımıyla çizgi şeklinde yaralar açıldı. 0, 24 ve 48 saatlik dilimlerde açılan yaraların fotoğrafları mikroskop altında çekildi. Hücrelerin göç oranları ImageJ programı kullanılarak orijinal yara aralığının kapanma seviyesine oranlanmasıyla değerlendirildi. MeWo ve A375 hücrelerinde Drp-1 ve Mfn 2 proteinlerinin siRNA transfeksiyonuyla susturulmasının ardından hücrelerin yara kapatma oranlarının kontrol hücrelerine oranla zamana bağlı olarak arttığı belirlendi (Şekil 4-17 ve 4-18). WM793 hücrelerinde ise kontrol, Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile işlem görmüş hücrelerin yara kapatma oranlarının 24 saat sonra %100'e ulaştığı belirlendi (Şekil 4-19).



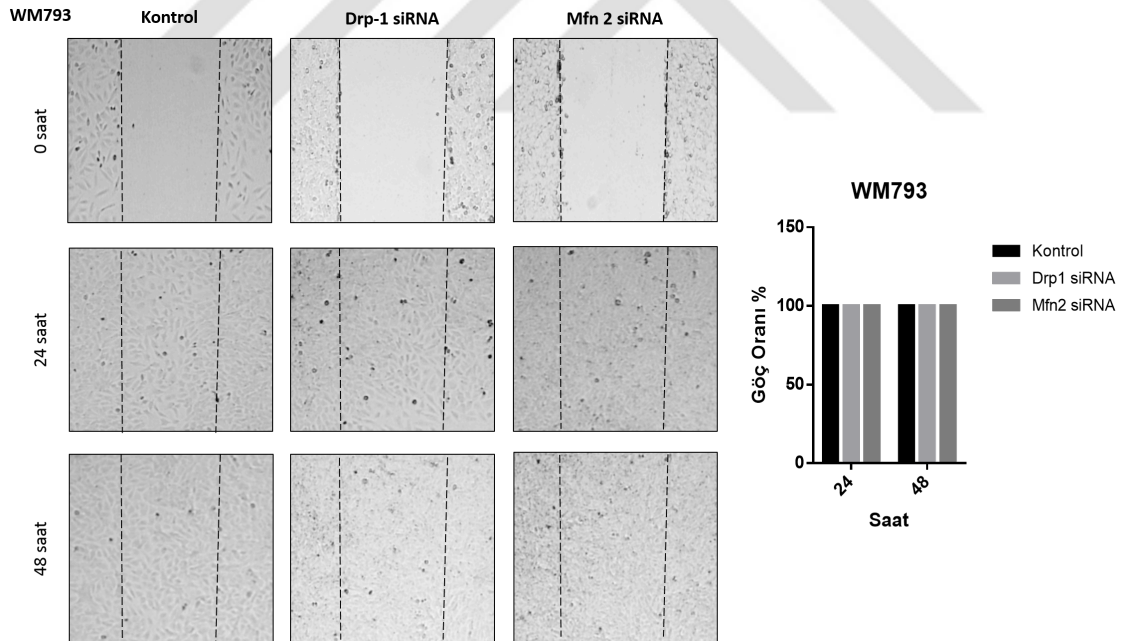
**Şekil 4-17: Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş MeWo hücrelerinde yara çizgisi analizi.**

Büyütme 4x, hata barları; SEM.  $p < 0,01$  (\*\*) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir



**Şekil 4-18: Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş A375 hücrelerinde yara çizgisi analizi.**

Büyütme 4x, hata barları; SEM.  $p < 0,01$  (\*\*) ve  $p < 0,001$  (\*\*\*) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

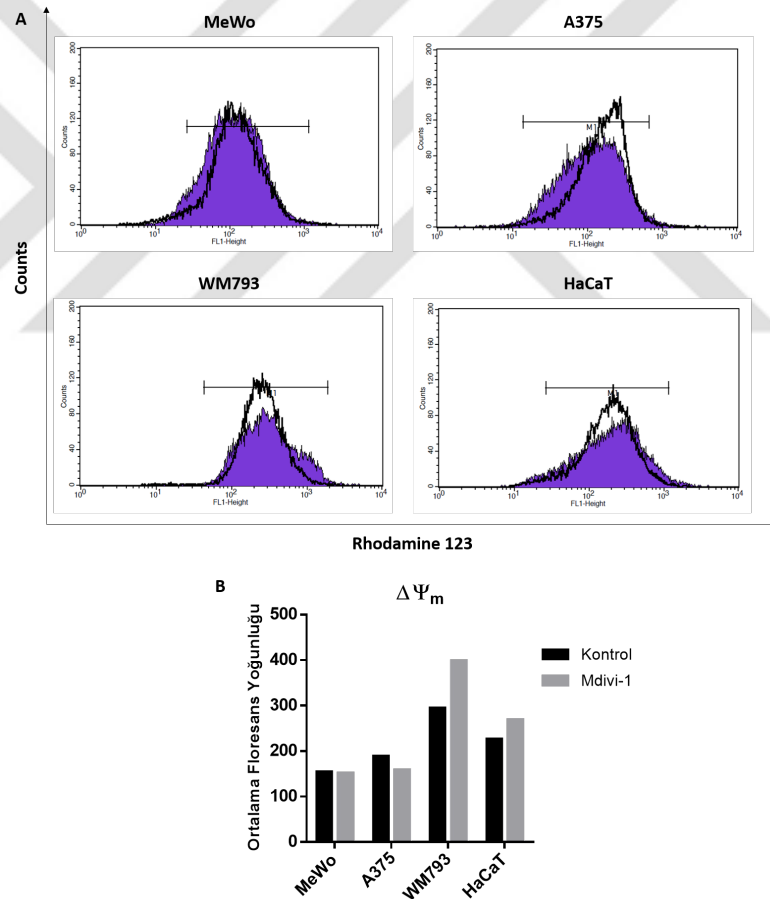


**Şekil 4-19: Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş WM793 hücrelerinde yara çizgisi analizi.**

Büyütme 4x.

#### 4.9. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

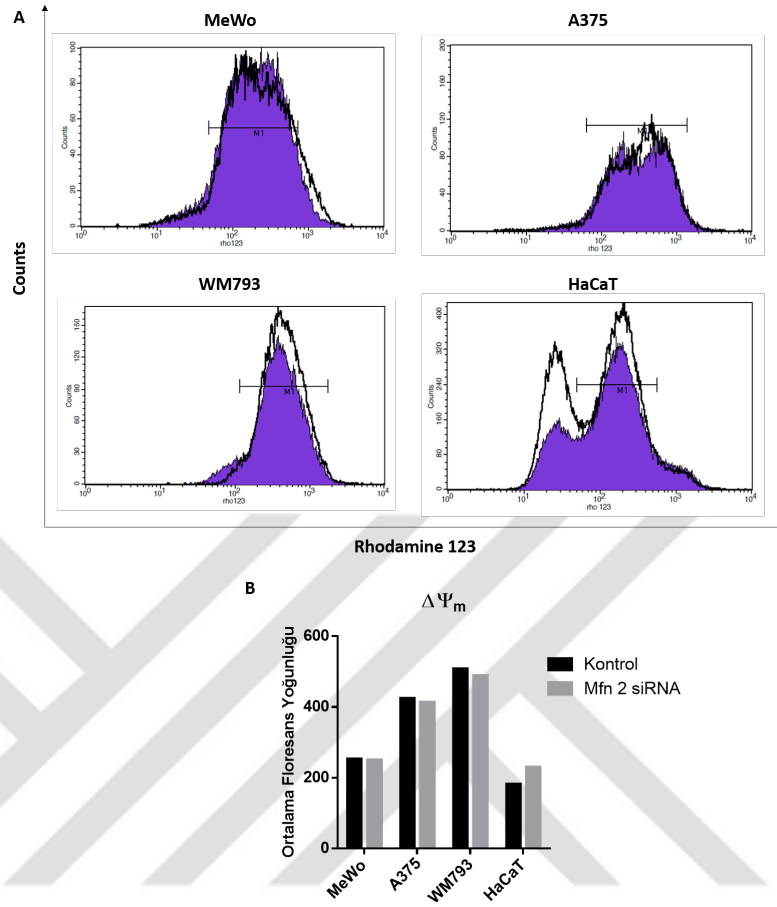
Mitokondri fonksiyonunda önemli bir işlevi olan  $\Delta\Psi_m$ 'in mitokondri dinamiklerindeki değişimlerden etkilenip etkilenmediğini belirlemek amacıyla mdivi-1 ile fizyon süreci inhibe edilen ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilen hücreler Rhodamine 123 ile işaretlendi ve FACS analizleri yapıldı. Ortalama floresans yoğunlukları karşılaştırıldığında mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerden yalnızca WM793 hücrelerinin  $\Delta\Psi_m$ 'de bir artış gözlemlendi ancak bu artışın istatistiksel anlamlılığı bulunamadı (Şekil 4-20). Mfn2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde ise ortalama floresans yoğunlukları karşılaştırıldığında hücrelerin  $\Delta\Psi_m$ 'nin değişmediği belirlendi (Şekil 4-21).



**Şekil 4-20: Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde mitokondri membran potansiyeli analizi.**

(A) Rhodamine ile işaretlenmiş hücrelerde mitokondri membran potansiyeli analiz sonuçlarının histogram ile gösterimi. Siyah çizgi; kontrol, mor dolgu; Mdivi-1. (B) Hücrelerin rhodamine 123 ortalama floresan yoğunluğunun bar grafik sonuçları.



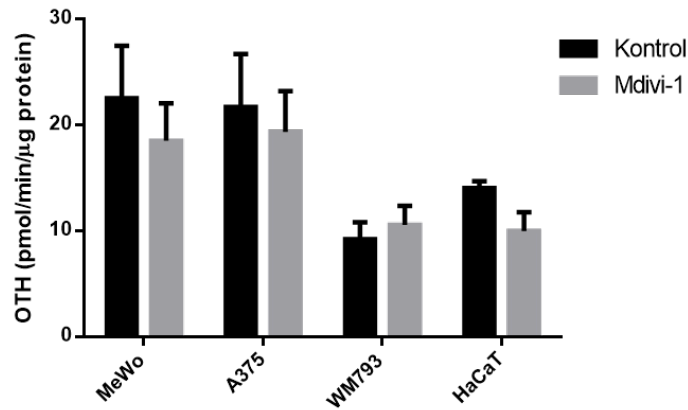


**Şekil 4-21: Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde mitokondri membran potansiyeli analizi.**

(A) Rhodamine ile işaretlenmiş hücrelerde mitokondri membran potansiyeli analiz sonuçlarının histogram ile gösterimi. Siyah çizgi; kontrol, mor dolgu; Mfn 2 siRNA. (B) Hücrelerin rhodamine 123 ortalama floresan yoğunluğunun bar grafik sonuçları.

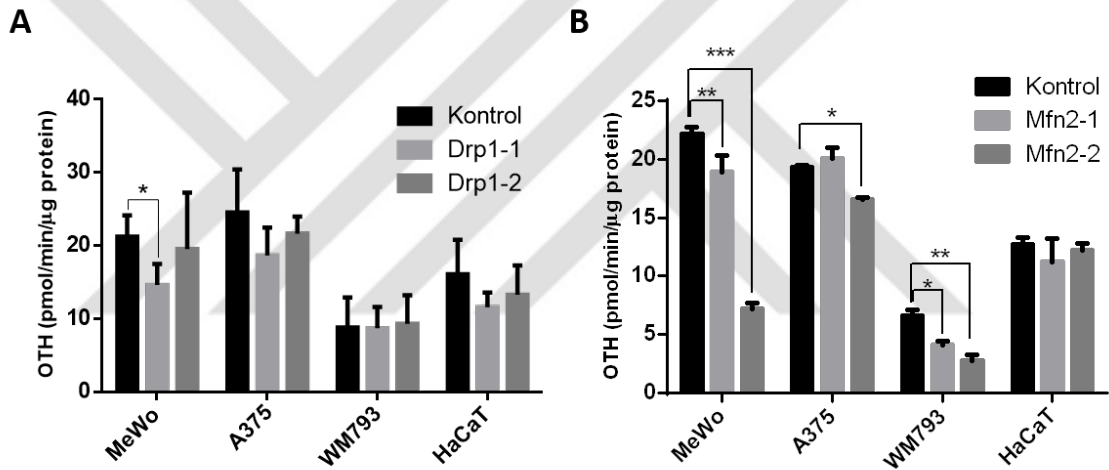
#### 4.10. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin Oksijen Tüketim Oranına Etkisi

Mdivi-1 ile normoksik ortamda inkübe edilen hücrelerin oksijen tüketim oranları Seahorse XF cihazı kullanılarak ölçüldü. Çıkan sonuçlar hücrelerin total protein miktarlarına oranlanarak normalize edildi. Kontrol ile karşılaştırıldığına hücrelerin oksijen tüketim oranlarında anlamlı bir farklılık belirlenemedi (Şekil 4-22). Aynı şekilde Drp-1 ve Mfn 2 siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş hücrelerin de oksijen tüketim oranları belirlendi. Drp-1 siRNA transfeksiyonu sonucunda MeWo hücrelerinde oksijen tüketim oranının azaldığı ve Mfn 2 siRNA transfeksiyonu sonucunda ise MeWo, A375 ve WM793 oksijen tüketim oranlarının azaldığı belirlendi (Şekil 4-23).



Şekil 4-22: Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde oksijen tüketim oranının belirlenmesi.

Hata barları; SEM olarak değerlendirilmiştir.



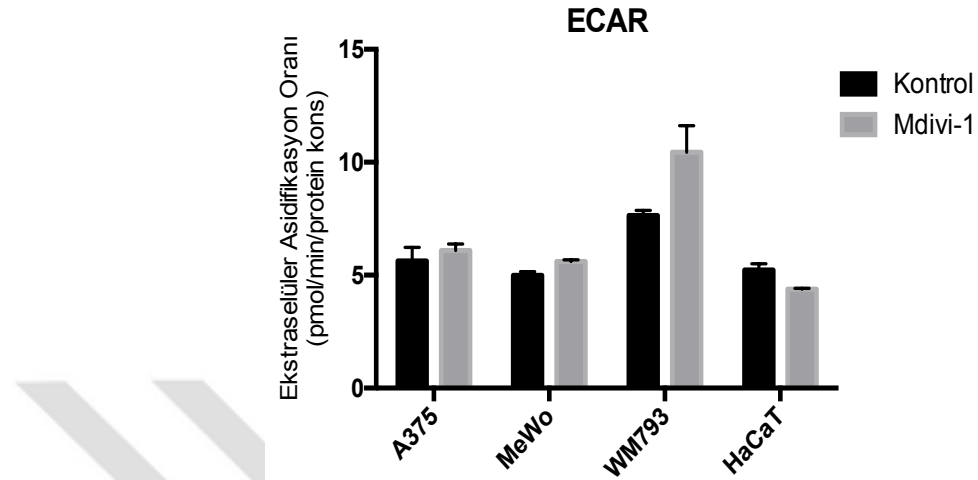
Şekil 4-23: Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde oksijen tüketim oranlarının belirlenmesi.

(A) Drp-1 ve(B) Mfn 2 siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş hücrelerde oksijen tüketim oranları. Hata barları; SEM.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) ve  $p < 0,001$  (\*\*\*) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

#### 4.11. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin Ekstraselüler Asidifikasyon Oranına Etkisi

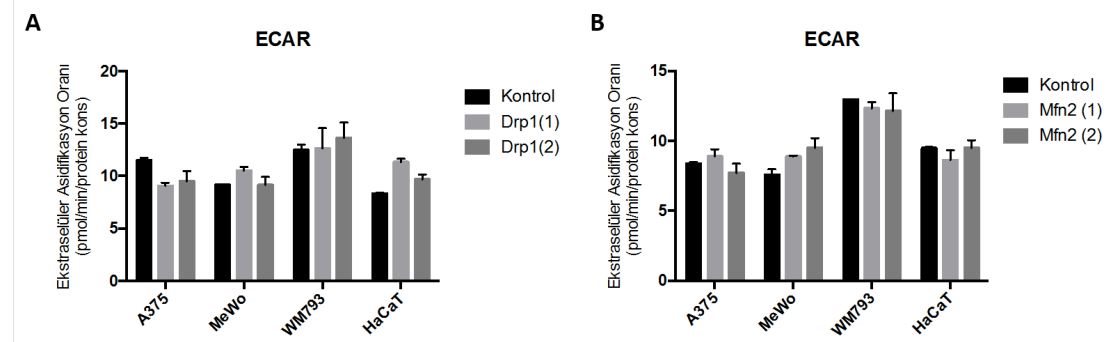
Mdivi-1 ile normoksik ortamda inkübe edilen hücrelerin ekstraselüler asidifikasyon oranları (ECAR) Seahorse XF cihazı kullanılarak ölçüldü. Çıkan sonuçlar hücrelerin total protein miktarlarına oranlanarak normalize edildi. Kontrol ile karşılaştırıldığına yalnızca WM793 hücrelerinin ekstraselüler asidifikasyon oranlarında bir artış belirlendi (Şekil 4-24). Aynı şekilde Drp-1 ve Mfn 2 siRNA transfeksiyonu gerçekleşmiş hücrelerin de ekstraselüler asidifikasyon oranları belirlendi. Kontrol ile

karşılaştırıldığına Drp-1 ve Mfn 2 siRNA protein anlatımları susturulmuş melanoma hücrelerin ekstraselüler asidifikasyon oranlarında anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4-25).



**Şekil 4-24: Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde ekstraselüler asidifikasyon oranlarının belirlenmesi.**

Hata barları; SEM olarak değerlendirilmiştir.



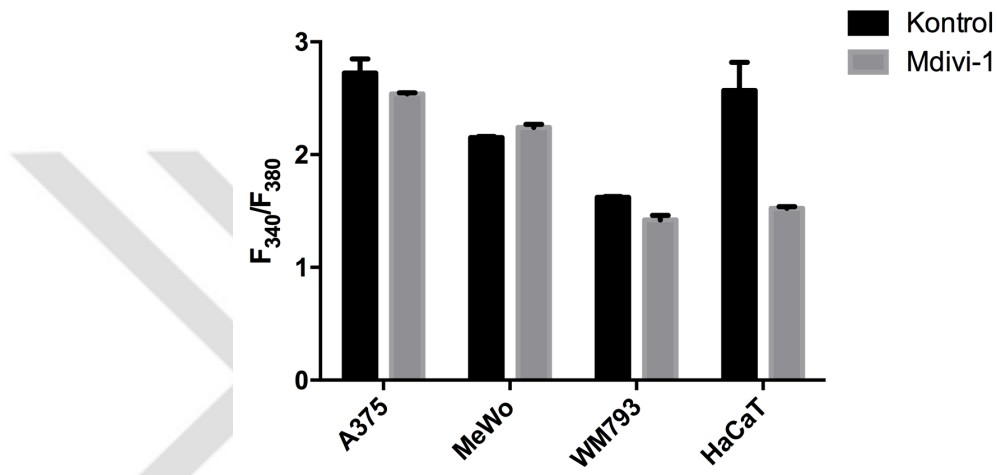
**Şekil 4-25: Drp-1 ve Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde ekstraselüler asidifikasyon oranlarının belirlenmesi.**

Hata barları; SEM olarak değerlendirilmiştir.

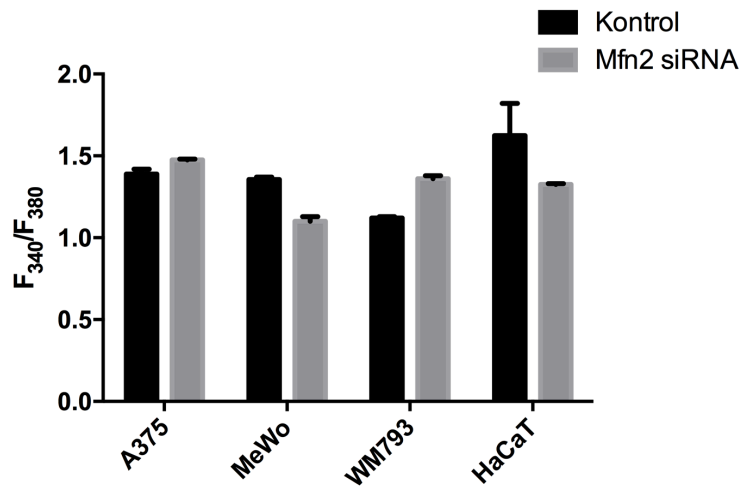
#### 4.12. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin Hücre İçi Kalsiyum Miktarına Etkisi

$Ca^{2+}$ , hücre döngüsü kontrolü, sağ kalım, apoptoz, hücre göçü ve gen ekspresyonu gibi temel fizyolojik fonksiyonlar için önemli bir sinyaldir. Mdivi-1 ile normoksik ortamda inkübe edilen hücrelerin hücre içi kalsiyum miktarları FURA 2 AM kullanılarak floresans spektroskopisinde 340/380 nm eksitasyon ve 510 nm emisyon dalga boylarında ölçüldü. Sonuçlar 340/380 oranları şeklinde değerlendirildi. Mdivi-1

muamelesi ile HaCaT hücrelerinde hücre içi kalsiyum miktarının azaldığı ancak A375, MeWo ve WM793 hücrelerinde değişmediği belirlendi. (Şekil 4-26). Aynı şekilde Mfn 2 siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş hücrelerin de hücre içi kalsiyum miktarları FURA 2 AM kullanılarak belirlendi. MeWo ve HaCaT hücrelerinde, hücre içi kalsiyum miktarları azalırken, WM793 hücrelerinde arttığı belirlendi ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı (Şekil 4-27).



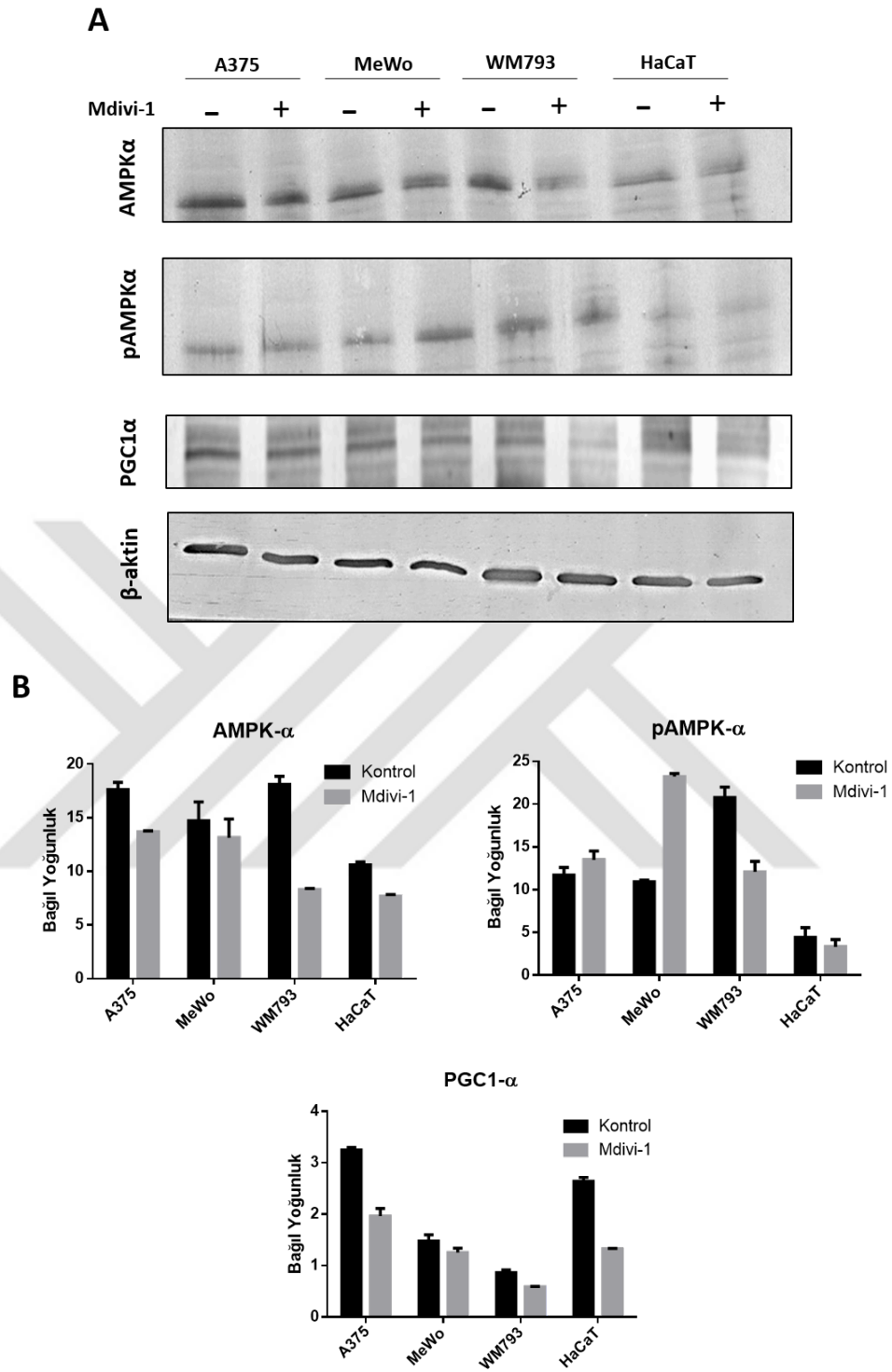
Şekil 4-26: Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde hücre içi kalsiyum miktarının belirlenmesi.



Şekil 4-27: Mfn 2 siRNA transfekte edilmiş hücrelerde hücre içi kalsiyum miktarının belirlenmesi.

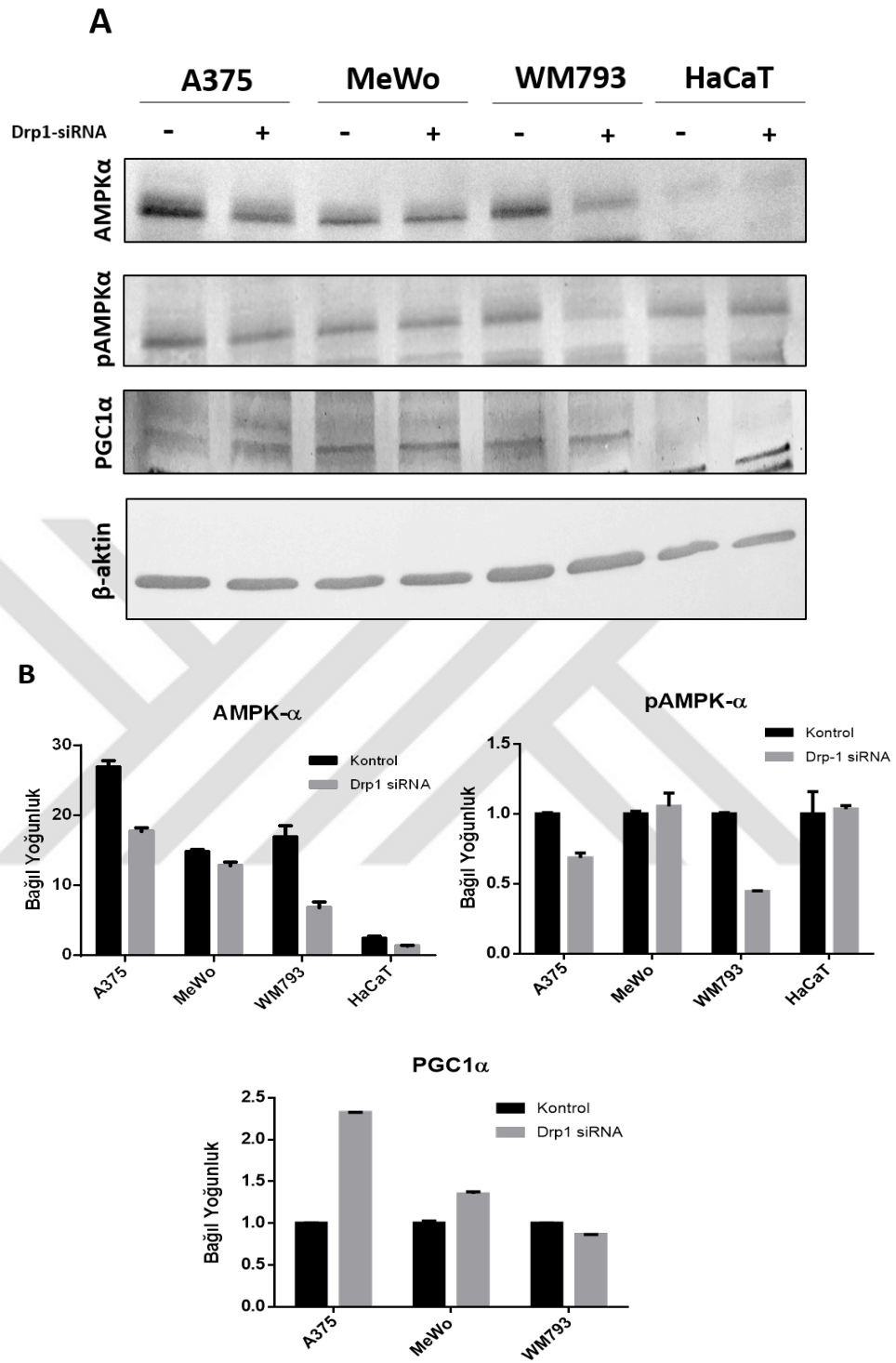
#### 4.13. Mitokondriyal Dinamik Değişimlerinin AMPK Sinyal Yolu Üzerine Etkisi

20  $\mu$ M mdivi-1 ile 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 72 saat boyunca inkübe edilen melanoma (A375, MeWo ve WM793) ve keratinosit hücrelerinin (HaCaT) lizatları 3.2.3.1'de anlatıldığı şekilde elde edildikten sonra örnekler SDS-PAGE'de yürütüldü. Proteinler nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra TBST-BSA (%5) ile doyuruldu. Gece boyu +4°C'de AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$ , PGC1 $\alpha$  ve  $\beta$ -Aktin antikolarıyla inkübe edildikten sonra uygun sekonder antikolar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Protein bantlarının görüntülenmesinde kromojenik bir substrat olan TMB kullanıldı. Protein bant yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak değerlendirildi. Mdivi-1 ile inkübe edilmiş A375, WM793 ve HaCaT hücrelerinde AMPK $\alpha$  ve PGC1 $\alpha$  anlatımları azaldığı belirlendi. A375 ve MeWo hücrelerinde pAMPK $\alpha$  anlatımının arttığı buna karşın WM793 ve HaCaT hücrelerinde ise azaldığı belirlendi (Şekil 4-28 A ve B). Drp-1 ve Mfn2 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde de AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$ , PGC1 $\alpha$  ve  $\beta$ -Aktin anlatımları western blot analizi ile belirlendi. Drp-1 siRNA ile transfekte edilmiş A375 ve WM793 hücrelerinde AMPK- $\alpha$  ve pAMPK- $\alpha$  anlatımlarının azaldığı belirlendi. PGC1 $\alpha$  anlatımının ise A375 ve MeWo hücrelerinde arttığı görüldü (Şekil 4-29 A ve B). Mfn 2 siRNA ile transfekte edilmiş A375, MeWo ve WM793 hücrelerinde AMPK- $\alpha$  ve pAMPK- $\alpha$  anlatımlarının azaldığı belirlendi. PGC1 $\alpha$  anlatımının ise yalnızca A375 hücrelerinde arttığı belirlendi (Şekil 4-30 A ve B).



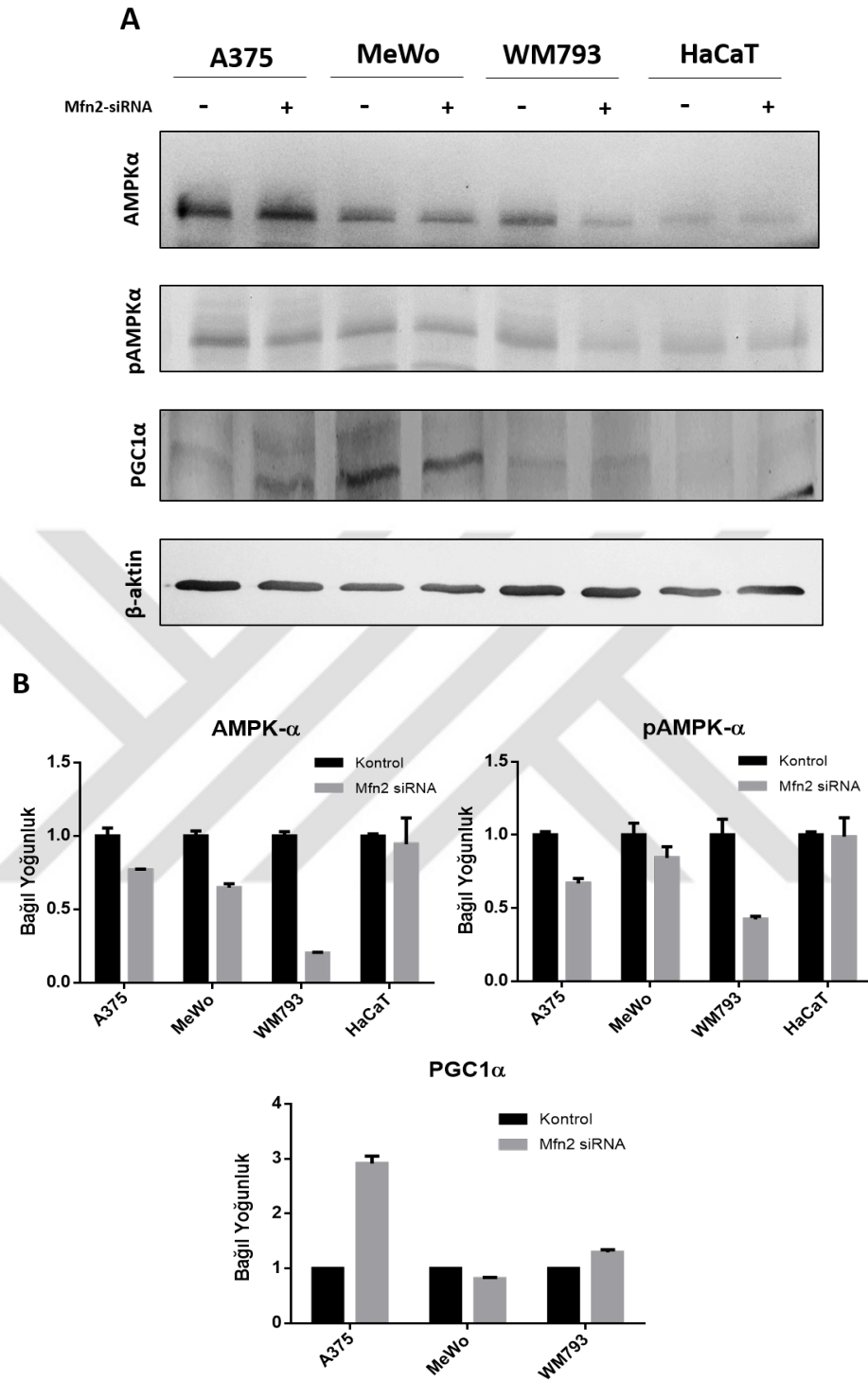
**Şekil 4-28: Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$  ve PGC1 $\alpha$  protein anlatımlarının belirlenmesi.**

(A) Mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerde AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$  ve PGC1 $\alpha$  protein anlatımlarının membran üzerinde gösterimi. (B) Bant yoğunluklarının ImageJ programı ile sayısallaştırılarak grafik halinde gösterimi.



**Şekil 4-29: Drp-1 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$  ve PGC1 $\alpha$  protein anlatımlarının belirlenmesi.**

(A) Drp-1 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$  ve PGC1 $\alpha$  protein anlatımlarının membran üzerinde gösterimi. (B) Bant yoğunluklarının ImageJ programı ile sayısallaştırılarak grafik halinde gösterimi.



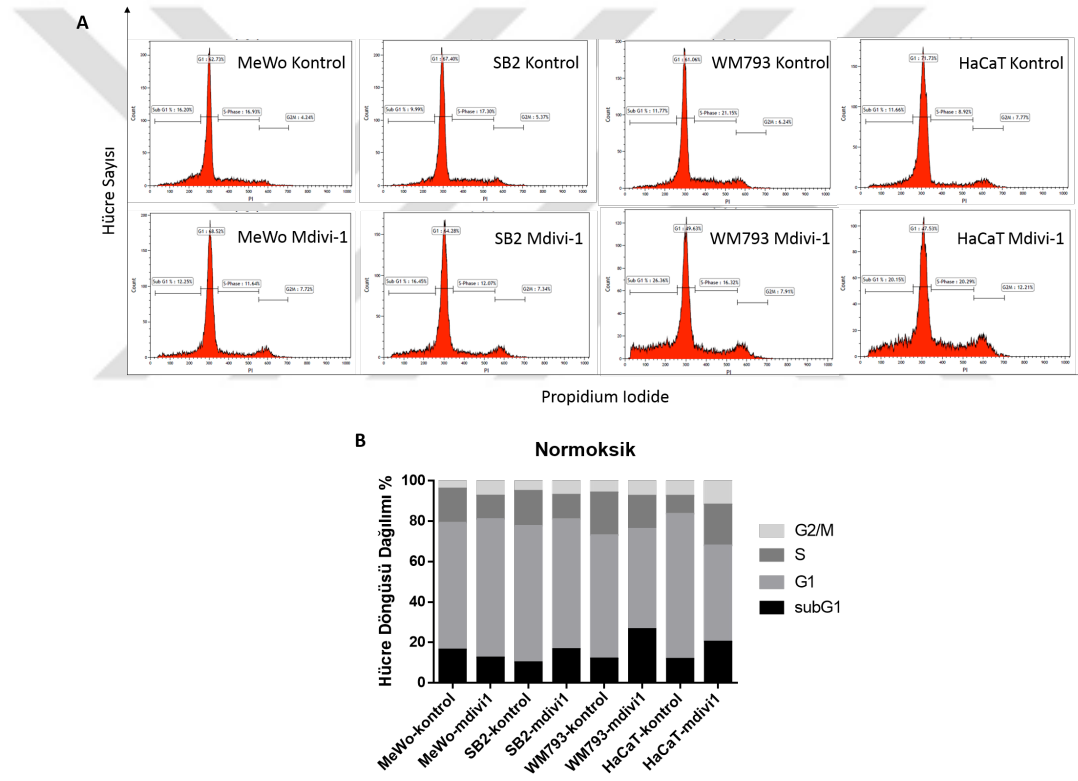
**Şekil 4-30: Mfn2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$  ve PGC1 $\alpha$  protein anlatımlarının belirlenmesi.**

(A) Mfn2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$  ve PGC1 $\alpha$  protein anlatımlarının membran üzerinde gösterimi. (B) Bant yoğunluklarının ImageJ programı ile sayısallaştırılarak grafik halinde gösterimi.



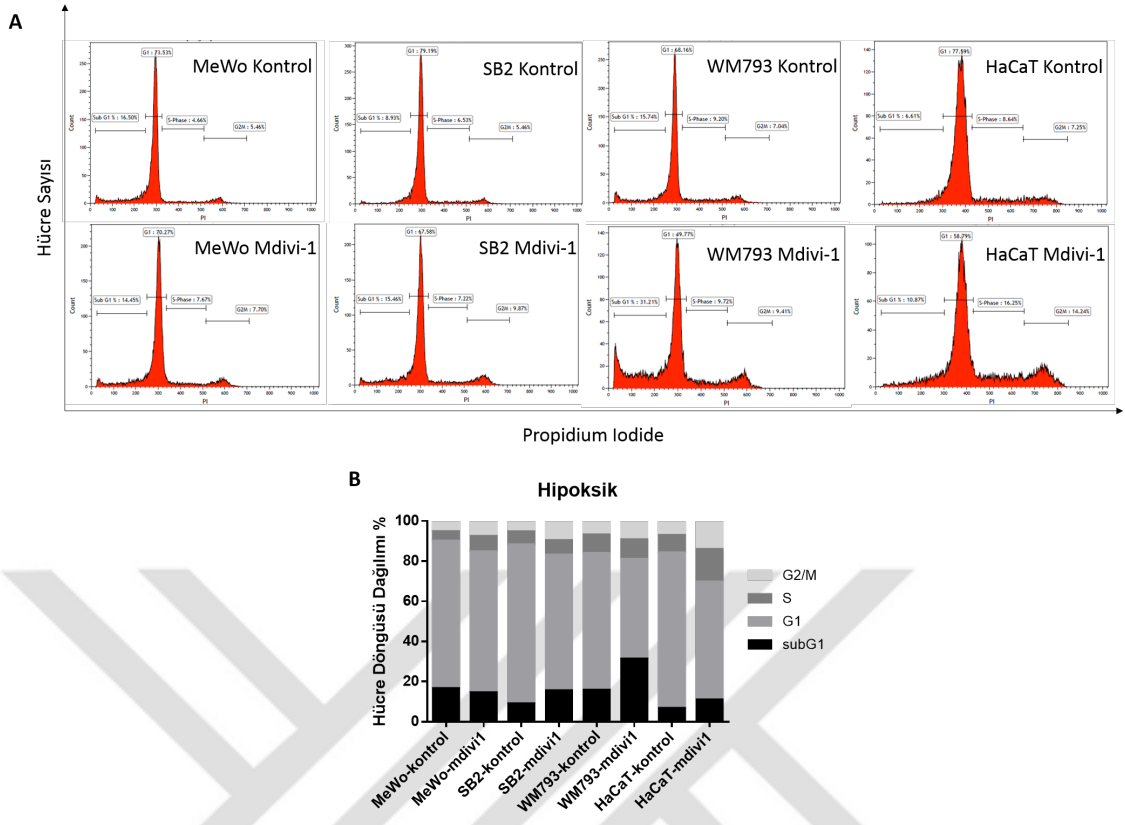
#### 4.14. Mdivi-1'in Melanoma Hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi

Mdivi-1 ile normoksik (37°C %5 CO<sub>2</sub>) ve hipoksik (37°C %1 O<sub>2</sub>) ortamda inkübe edilen melanoma (MeWo, SB2 ve WM793) ve keratinosit (HaCaT) hücrelerinin hücre döngüleri FACS analizleri ile belirlendi. Normoksik ortamda mdivi-1 ile inkübe edilen WM793 hücrelerinde Sub G1 fazında artış görülürken, G1 ve S fazlarında azalma gözlemlendi (Şekil 4-31). Aynı hücrelerin hipoksik ortamdaki hücre döngüsü analizlerinde Sub G1 ve G2/M fazlarındaki hücre sayısının normoksik ortama benzer şekilde arttığı, G1 fazlarındaki hücre sayısının azaldığı belirlendi (Şekil 4-32). HaCaT hücrelerinin normoksik ortamda G1 fazının azaldığı ve S fazının arttığı, hipoksik ortamda ise yalnızca S fazında bir artış olduğu belirlendi.



**Şekil 4-31: Normoksik ortamda Mdivi-1 ile inkübe edilmiş melanoma ve normal hücrelerin hücre döngüsü analizleri.**

(A) Hücre döngüsü analizlerinin histogram sonuçları. (B) Hücre döngüsü analizlerinin bar grafik sonuçları.



**Şekil 4-32: Hipoksik ortamda Mdivi-1 ile inkübe edilmiş melanoma ve normal hücrelerin hücre döngüsü analizleri.**

(A) Hücre döngüsü analizlerinin histogram sonuçları. (B) Hücre döngüsü analizlerinin bar grafik sonuçları.

## 5. TARTIŞMA

Mitokondri, hücresel strese mitokondriyal kütle değişimi, füzyon ve fizyon mekanizması ve hücre içi konum değişiklikleri ile yanıt veren oldukça dinamik bir organeldir. Mitokondri kütesinin hücre içerisindeki değişimi, mitokondriyal biyogenez ile mitofaji oranı arasındaki değişen dengeye bağlıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda mitokondriyal füzyon ve fizyonun (mitokondriyal dinamikler) mitokondriyal fonksiyonlar, apoptoz ve yaşlanma gibi birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde görev aldığı belirlenmiştir. Bunun dışında mitokondriyal dinamikleri yürüten süreçlerin çoğunlukla kanserde de düzensiz olduğu belirlenmiştir. Kanser hücrelerinin apoptoza direnç kazanabilmek için mitokondriyal dinamiklerini değiştirdiği ve tümör başlangıç ve dönüşüm özelliklerinden olan çoğalma, hücre göçü ve terapötik direnç gibi süreçleri desteklemek için ise biyoenerjetik ve biyosentetik gereksinimlerini düzenlediği bildirilmiştir.

Bu çalışmada mitokondri dinamiklerini düzenleyen mekanizmalar en hızlı yayılan malignant deri kanseri türü olan melanoma hücrelerinde incelendi. Bu amaçla öncelikle mitokondriyal dinamiklerle ilişki protein anlatımları farklı melanoma hücreleri seçildi. Sonrasında mitokondriyal bölünme inhibitörü (mdivi-1) ve mitokondriyal fizyon ve füzyon protein (Drp-1 ve Mfn 2) anlatımlarını susturan siRNA'ler varlığında mitokondriyal dinamik değişimleri indüklendi. Bu değişimlerin sonrasında hücre canlılığı, hücre göçü, mitokondriyal biyogenez, oksijen tüketim oranı, mitokondri membran potansiyeli, hücre içi kalsiyum değişimleri ve hücre döngüsü parametreleri incelendi.

Akciğer kanseri, metastatik meme kanseri, glioblastoma, nöroblastoma, kolorektal kanser, melanoma ve pankreatik kanser olgularında yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin yüksek Drp1 anlatımına bağlı fragmente mitokondrilere zengin olduğu bildirilmiştir (191-197). Rehman ve arkadaşları, normal hücrelere kıyasla akciğer adenokarsinoma örneklerinde MFN2 anlatımının azaldığını ve DRP1 anlatımının arttığını belirlemiştir (191). Bu çalışmada kullanılan 8 farklı melanoma hücresinde mitokondriyal dinamiklerle ilişki proteinlerin (Drp1, Mfn-1, Mfn-2 ve OPA1) anlatımları belirlendi. Elde edilen bulgularda Drp1 protein anlatımının keratinosit hücrelerine kıyasla A375, HS294T, MeWo, SB2, WM35 hücrelerinde yüksek, SK-Mel-

2, SK-Mel-28 ve WM793 hücrelerinde ise düşük olduğu belirlendi. Mitokondriyal füzyon ile ilişkili Mfn-2 protein anlatımının ise keratinosit hücrelerine kıyasla A375, HS294T, SB2, SK-Mel-2, WM793 hücrelerinde düşük, MeWo, SK-Mel-28 ve WM35 hücrelerinde ise yüksek olduğu belirlendi. Bunun yanında yapılan qPCR analizlerinde de füzyon ile ilişkili MFN1, MFN2 ve OPA1 gen anlatımlarının SB2, MeWo ve WM793 hücrelerinde keratinositlere kıyasla 2 kat daha az olduğu belirlendi. Her ne kadar MFN2 gen anlatımı MeWo hücrelerinde düşük olsa da protein anlatımının keratinositlere kıyasla yüksek olması bu hücre hattında post translasyonel modifikasyonların gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bunun yanında melanoma hücrelerinde füzyonun, keratinosit hücrelerine kıyasla, füzyondan daha aktif olduğu belirlendi.

Tümör mikroçevresinin yaygın bir özelliği olan hipoksi, onkogenler tarafından yürütülen kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu ortaya çıkmaktadır. Kanser hücrelerinin hızlı bir şekilde çoğalması ile tümör, normal vaskülatürden sağladığı besin ve oksijen desteğini tüketerek hipoksik konuma geçmektedir. Hücre kültür çalışmalarının yürütüldüğü flasklarda bulunan hücreler genellikle %20-21 oksijenli (160 mmHg) ortamlarda çoğaltılmaktadır. Bu nedenle normoksik ortamda yapılan çalışmalar tam olarak tümör mikroçevresini yansıtmamaktadır. Hipoksinin hücrel aktiviteyi HIF1 $\alpha$  üzerinden düzenlediği bilinmektedir (198). Metastatik melanoma hastaları ile yapılan çalışmalarda tümörün hipoksik bölgelerinin olduğu belirlenmiştir (199). Oksijen ile mitokondriyal fonksiyonlar arasındaki ilişki bilinmesine rağmen hipoksinin mitokondri morfolojisi üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Düşük oksijen ve glukoz bulunmayan *in vivo* ortamda kardiyomiyositlerle yapılan çalışmalarda mitokondriyal fragmentasyonun (füzyon) arttığı belirlenmiştir (200). Glioblastoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda ise hipoksinin Drp1 transkripsiyonu ve ekspresyonunu arttırdığı ve Drp1'e bağlı mitokondriyal füzyonu düzenlediği bildirilmiştir (193). Aynı çalışmada HIF-1 $\alpha$  inhibitörü olan echinomycin'in Drp-1'in hipoksi tarafından indüklenen anlatımını bloke ettiği belirtilmiştir. Glioblastoma hücrelerinde Drp-1, mdivi-1 ile inhibe edildikten sonra ise hipoksi indüklenmiş mitokondriyal füzyonun azaldığı gösterilmiştir (193). Bu çalışmada hem normoksik hem de hipoksik koşullarda mdivi-1 ile muamele edilmiş A375, MeWo, WM793 ve keratinosit (HaCaT) hücrelerinde mitokondriyal füzyonun indüklendiği belirlendi. Bu bulgu mdivi-1'in hem normoksik hem de hipoksik koşullarda mitokondriyal bölünmeyi inhibe edici etkisinin

değişmediğini ortaya koydu. Ancak normoksik ve hipoksik koşullarda inkübe edilmiş melanoma ve keratinosit hücreleri kendi aralarında kıyaslandığında hipoksik koşullarda mitokondriyal füzyonun normoksik koşullara göre arttığı belirlendi. Bu bulgu ile melanoma ve keratinosit hücrelerinde hipoksinin mitokondriyal füzyonu indüklediği belirlendi.

Sınırlı besin desteğinin bulunduğu ortamlarda tüketilen her bir besin için üretilen ATP oranının yükselmesi ve böylelikle besin tüketiminin azaltılması ve optimizasyonunun sağlanması beklenmektedir. Enerji verimliliğini arttıran mekanizmalar ATP üretiminde primer olarak anaerobik glikolize veya oksidatif fosforilasyona dayanan dokular arasında farklılıklar göstermektedir. Bu bağlamda transforme hücrelerde yapılan son çalışmalarda besin eksikliğinin mitokondriyal ATP sentez kapasitesini arttırdığı belirlenmiştir. Bu artışın krista kıvrımlarında daha yüksek aktivite gösteren ATP sentez dimerlerinin oluşumu üzerinden gerçekleştiği bildirilmiştir (201). Transforme hücrelerde görülen ATP sentez kapasitesindeki bu artışın, fizyon seviyelerinde azalma ve mitokondrilerin uzaması olarak görülen mitokondriyal dinamik değişimlerine bağlı olduğu da aynı çalışmada bildirilmiştir. Mitokondriyal dinamiklerdeki bu değişimler (mitokondrilerin uzaması) artan mitokondriyal biyoenerjetik verimliliğini destekleyen aktif mekanizma olarak değerlendirilmiştir. Mitokondriyal uzama ile mitokondrilerin ayrıca açlıkla indüklenmiş otofajiden de kaçabildiği bildirilmiştir (202). Bu çalışmada mdivi-1 ile mitokondriyal fizyonun inhibe edildiği melanoma hücrelerinde hücre canlılıklarının azaldığı belirlendi. Aynı hücrelerin Drp1 protein anlatımları susturulduğunda ise hücre canlılığının kontrole kıyasla değişmediği belirlendi. Mfn2 protein anlatımları susturulmuş hücrelerde ise yalnızca MeWo hücrelerinde hücre canlılığının azaldığı belirlendi. Mdivi-1'in melanoma hücre canlılığını azaltması inhibitörün hedef dışı etki mekanizmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Aerobik ATP sentezinden sorumlu mitokondriler, diğer organellerle bağlanan tubular ağlar oluşturmaktadır. Hücrenin farklı bölgelerindeki enerji ihtiyacı değişimiyle birlikte Drp1 ile mitokondriler daha mobil segmentlerine ayrılarak bu bölgelere göç etmektedirler. Kanser hücreleri ise oksijen varlığında bile enerji ihtiyacının büyük çoğunluğunu anaerobik glikolizden sağladığı için farklı biyoenerjetik mekanizmalara sahiptir. Enerji ihtiyaçlarının iki farklı yolak üzerinden sağlandığı göç eden kanser

hücrelerinde mitokondriyal dinamiklerin fonksiyonel önemi bilinmemektedir. J Zhao ve arkadaşları farklı insan meme kanseri tiplerinde yaptıkları çalışmada Drp1 protein anlatımının en yüksek invaziv meme karsinomlarında ve lenf nodlarına metastaz yapmış kanser hücrelerinde görüldüğünü bildirmiştir (192). Aynı çalışmada Drp 1, Mfn 1 ve Mfn 2 anlatım değişimlerinin meme kanseri hücrelerinin canlılığı, hücre döngüsü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkilerinin olmadığı belirtilmiştir. Bu çalışmada da J Zhao ve arkadaşlarının meme kanseri hücrelerinde yaptığı çalışmaya paralel şekilde melanoma hücrelerinde de mitokondriyal dinamik değişimlerin hücre döngüsü ve mitokondri membran potansiyelleri üzerine bir etkisinin olmadığı belirlendi. Onkositik tiroid tümörleriyle yapılan bir çalışmada ise Drp1 ve Fis1'in onkositik hücre tümörlerinde fazla anlatımının olduğu ve Drp1 anlatım seviyesinin *ex vivo*'da onkositik hücre tümörü malignitesiyle, *in vitro*'da ise hücre göçüyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur (203). Bu çalışmada mdivi-1 ile mitokondriyal fizyon inhibe edilmiş melanoma hücrelerinde kimyasal çekici ile analiz edilen hücre göçü MeWo ve WM793 hücrelerinde anlamlı derecede azaldı. Aynı şekilde inkübe edilmiş ve yara çizgisiyle analiz edilmiş hücrelerde de hücre göçünün mdivi-1 ile inkübe edilmiş melanoma hücrelerinde kontrole kıyasla azaldığı belirlendi. Ancak Drp1 ve Mfn-2 protein anlatımları susturulmuş MeWo ve A375 hücrelerinde yara çizgisiyle analiz edilen hücre göçünün kontrol hücrelerine kıyasla arttığı belirlenmiştir. Ancak mdivi-1 ile muamele edilmiş hücrelerle protein anlatımları susturulmuş hücreler arasındaki hücre göçü bağlamındaki bu farklılığın altında yatan mekanizmaların ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

İnvaziv kanser olgusunun bilinen en yaygın özelliği değişen glukoz metabolizmasıdır. Normal memeli hücrelerinde, aerobik şartlar altında enerji, glikoliz inhibisyonu ile (Pasteur etkisi) mitokondriyal oksidatif fosforilasyon üzerinden sağlanmaktadır. Ancak kanser hücrelerinde oksijen varlığında bile önemli derecede artmış glikoliz ve laktat üretimi olduğu belirlenmiştir. Aerobik glikoliz adı verilen bu durum ile kanserin hasarlı mitokondriyal metabolizma üzerinden oluştuğu hipotezi ortaya atılmıştır (58). Her ne kadar mitokondriyal bozuklukların kanserin temel nedeni olmadığı ortaya konmuş olsa da aerobik glikolizin tümör hücrelerine kontrolsüz çoğalma avantajı sağladığı bildirilmiştir (141). Kanser hücrelerinin farklı başlangıç noktaları ve farklılaşmaları bulunduğundan tüm kanser tipleri glikolize bağımlı değildir. Glikolizin toplam ATP'nin %1-64'ünü farklı kanser hücrelerinde sağladığı bildirilmiştir (60). Dört farklı lösemi

hücresinde glikoliz inhibitörü 2-deoksi-D-glukoz (2-DG) ve oksidatif fosforilasyon inhibitörü oligomycin kullanarak enerji metabolizmasını inceleyen Suganuma ve arkadaşları diğer üç hücre hattıyla karşılaştırıldığında NB4 hücre hattının 2-DG'ye daha duyarlı olduğunu göstermiş ve bu hücre hattını glikolitik hücreler olarak belirlemiştir. Yine aynı çalışmada THP-1 hücrelerinin ise 2-DG'ye dirençli, oligomycin'e ise duyarlı olduğu bulunmuş ve bu hücre hattını da oksidatif hücre hattı olarak bildirmiştir (204). Rizwan Haq ve arkadaşlarının melanoma hücrelerinde yaptıkları çalışmada ise, BRAF mutasyonlarının melanoma enerji metabolizmasını mitokondriyal biyogenez ve fonksiyonun temel düzenleyicileri olan MITF ve PGC1 $\alpha$ 'yı baskılayarak yeniden programladığını belirtmişlerdir (205). Aynı çalışmada BRAF inhibitörleri ile muamele edilmiş BRAF-mutasyonuna sahip melanomaların oksidatif fosforilasyona bağımlı hale geldikleri de bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında mdivi-1 ile mitokondriyal fizyonu inhibe edilen melanoma hücrelerinin oksijen tüketim oranlarında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Ancak Mfn-2 protein anlatımı susturulmuş melanoma hücrelerinin oksijen tüketim oranlarında anlamlı bir şekilde azalma görüldü. Bu çalışma ile melanoma hücrelerinde oksijen tüketim oranının mitokondriyal füzyon üzerinden düzenlendiği belirlendi.

Memeli hücrelerinde enerji dengesi hücre aktivitesi, besine ulaşılabilirlik ve enerji dönüşüm sürecinin düzenlenmesi arasında sabit bir koordinasyon gerektirmektedir. Bu koordinasyon kinazları ve transkripsiyon faktörlerini içeren hücrel efektörleri enerji ve besin algılamaya bağlayan kompleks sinyalizasyon süreci üzerinden gerçekleştirilmektedir. AMP-aktive edilmiş kinazlar, enerjinin karşılanması (ATP üretimi) ve enerji ihtiyacı (ATP tüketimi) arasındaki denge tarafından yönetilen hücrel AMP/ATP oranındaki değişimler ile birlikte aktive olmaktadır. AMPK, AMP tarafından aktive edildiğinde ATP üreten katabolik yolları (glikoliz, mitokondriyal biyogenez üzerinden düzenlenen oksidatif fosforilasyon) devreye sokmak için bir dizi fosforilasyon kaskadı başlatırken ATP tüketen anabolik yolları da (protein, yağ asidi ve kolesterol sentezi) devreden çıkartmaktadır (206). Kanserin ayırt edici özelliklerinden biri de hücrel enerjetik deregülyasyonudur. Yapılan çalışmalarla melanoma, meme, prostat, yumurtalık ve lösemi kanserleri ile AMPK ilişkisi ortaya çıkartılmıştır. Melanoma'da AMPK'nın normal melanosit gelişimi ve farklılaşmasında görevli olan MITF'in (mikrophthalmia-ilişkili transkripsiyon faktörü) bakımında görevli olduğu belirlenmiştir (207). Ayrıca melanoma hücrelerinin metastatik potansiyel

inhibisyonunun AMPK aktivasyonu üzerinden ERK sinyalizasyon yolağı aktivasyonu ve COX-2 protein seviyelerinin azalması şeklinde gerçekleştiği bildirilmiştir. Bunun yanında otofajik ve apoptotik hücre ölümünün de AMPK/JNK sinyali üzerinden indüklenmesi şeklinde gerçekleştiği belirlenmiştir (208, 209). Bu alışmada Mfn 2 protein anlatımları susturulmuş melanoma hücrelerinde AMPK $\alpha$  ve pAMPK $\alpha$  anlatımlarının azaldığı belirlendi. Aynı hücrelerde buna paralel olarak oksijen tkretim oranlarının da düştüğü ancak glikoliz seviyelerinin değişmediği belirlendi. Drp-1 protein anlatımları susturulmuş hücrelerde ise AMPK $\alpha$  anlatımının azaldığı, pAMPK $\alpha$  anlatımının ise A375 ve WM793 hücrelerinde azaldığı MeWo ve keratinosit hücrelerinde ise değişmediği belirlendi. Aynı şekilde Drp-1 protein anlatımı susturulmuş hücrelerde oksijen tkretim oranı ve glikoliz seviyelerinin ise değişmediği belirlendi. Mdivi-1 ile mitokondriyal fizyonu inhibe edilmiş melanoma hücrelerinde ise AMPK $\alpha$  anlatımının azaldığı, pAMPK $\alpha$  anlatımının MeWo hücrelerinde artarken, WM793 hücrelerinde azaldığı belirlendi. Oksijen tkretim oranı ve glikoliz seviyelerinin ise değişmediği belirlendi. Dolayısıyla melanoma hücrelerinde oksijen tkretiminin mitokondriyal füzyon ile ilişkili olduğu belirlendi.

Sonuç olarak bu çalışma mitokondriyal dinamik değişimleri ile melanoma tümör ilerleyişi arasındaki ilişkiyi farklı hücrenel süreçler bağlamında ortaya koymuştur. Bu yönüyle literatürdeki eksiklerin tamamlanmasına katkı sağlayacağı bir gerçektir. Bunun da ötesinde elde edilen bulgular, mitokondriyal dinamikleri regüle eden moleksel mekanizmalar üzerinden melanoma olgularında yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi yönünde değerlendirildiğinde umut vaadedici gözükmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Kwon SK ve ark. LKB1 Regulates Mitochondria-Dependent Presynaptic Calcium Clearance and Neurotransmitter Release Properties at Excitatory Synapses along Cortical Axons. *PLoS Biol* 2016; **14**(7): e1002516.
2. Fawcett DW. *The cell*. Place: W. B. Saunders Co.; 1981
3. Scheffler IE. *Mitochondria*. Place: Wiley; 1999
4. Mannella CA ve Tedeschi H. The emerging picture of mitochondrial membrane channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1992; **24**(1): 3-5.
5. Wander RC ve Berdanier CD. Effects of dietary carbohydrate on mitochondrial composition and function in two strains of rats. *J Nutr* 1985; **115**(2): 190-9.
6. Adams M. *Diet as a factor in length of life and in structure and composition of tissues of the rat with aging*. Place: U.S. Govt. Print. Off.; 1964
7. Heggeness MH, Simon M, ve Singer SJ. Association of mitochondria with microtubules in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; **75**(8): 3863-6.
8. Ball EH ve Singer SJ. Mitochondria are associated with microtubules and not with intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; **79**(1): 123-6.
9. Orlando L ve ark. Revisiting Neandertal diversity with a 100,000 year old mtDNA sequence. *Curr Biol* 2006; **16**(11): R400-2.
10. Lewis MR ve Lewis WH. Mitochondria (and other cytoplasmic structures) in tissue cultures. *American Journal of Anatomy* 1915; **17**(3): 339-401.
11. Nunnari J ve ark. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* 1997; **8**(7): 1233-42.
12. Twig G ve ark. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 2008; **27**(2): 433-46.
13. Chen H, Chomyn A, ve Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005; **280**(28): 26185-92.
14. Bereiter-Hahn J ve Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 1994; **27**(3): 198-219.

15. Patterson GH ve Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 2002; **297**(5588): 1873-7.
16. Hales KG ve Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 1997; **90**(1): 121-9.
17. Kanazawa T ve ark. The *C. elegans* Opa1 Homologue EAT-3 Is Essential for Resistance to Free Radicals. *PLoS Genet* 2008; **4**(2): e1000022.
18. Hermann GJ ve ark. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 1998; **143**(2): 359-73.
19. Eura Y ve ark. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem* 2003; **134**(3): 333-44.
20. Bleazard W ve ark. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* 1999; **1**(5): 298-304.
21. Labrousse AM ve ark. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* 1999; **4**(5): 815-26.
22. Mozdy AD, McCaffery JM, ve Shaw JM. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 2000; **151**(2): 367-80.
23. Tieu Q ve Nunnari J. Mdv1p Is a Wd Repeat Protein That Interacts with the Dynamin-Related Gtpase, Dnm1p, to Trigger Mitochondrial Division. *The Journal of Cell Biology* 2000; **151**(2): 353-366.
24. Otsuga D ve ark. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* 1998; **143**(2): 333-49.
25. Smirnova E ve ark. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2001; **12**(8): 2245-56.
26. Sesaki H ve Jensen RE. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol* 1999; **147**(4): 699-706.
27. Ingerman E ve ark. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 2005; **170**(7): 1021-7.
28. Yoon Y ve ark. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 2003; **23**(15): 5409-20.

29. Gandre-Babbe S ve van der Blik AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2008; **19**(6): 2402-12.
30. Jakobs S ve ark. Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J Cell Sci* 2003; **116**(Pt 10): 2005-14.
31. Santel A ve Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 2001; **114**(Pt 5): 867-74.
32. Koshiba T ve ark. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 2004; **305**(5685): 858-62.
33. Wong ED ve ark. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* 2000; **151**(2): 341-52.
34. Olichon A ve ark. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 2002; **523**(1-3): 171-6.
35. Delettre C ve ark. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* 2001; **109**(6): 584-91.
36. Meeusen S, McCaffery JM, ve Nunnari J. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 2004; **305**(5691): 1747-52.
37. Sesaki H ve Jensen RE. UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 2001; **152**(6): 1123-34.
38. Scott I ve Logan DC, *Mitochondrial Dynamics*, in *Plant Mitochondria*, Place: Springer New York; 2011. p. 31-63.
39. Mitra K ve ark. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(29): 11960-5.
40. Qian W ve ark. Mitochondrial hyperfusion induced by loss of the fission protein Drp1 causes ATM-dependent G2/M arrest and aneuploidy through DNA replication stress. *J Cell Sci* 2012; **125**(Pt 23): 5745-57.
41. Taguchi N ve ark. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 2007; **282**(15): 11521-9.
42. Fuller KM ve Arriaga EA. Advances in the analysis of single mitochondria. *Curr Opin Biotechnol* 2003; **14**(1): 35-41.

43. Kajstura J ve Bereiter-Hahn J. Scanning microfluorometric measurement of cell constituents. Principles of the method and its application to the determination of NAD content and redox state of XTH-2 cells in culture. *Histochemistry* 1988; **89**(1): 63-7.
44. Mayevsky A ve Barbiro-Michaely E. Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function in vivo. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; **41**(10): 1977-88.
45. Twig G ve ark. Tagging and tracking individual networks within a complex mitochondrial web with photoactivatable GFP. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; **291**(1): C176-84.
46. Jendrach M ve ark. Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* 2008; **8**(4): 293-304.
47. Mai S ve ark. Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J Cell Sci* 2010; **123**(Pt 6): 917-26.
48. Nicholls DG. Forty years of Mitchell's proton circuit: From little grey books to little grey cells. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1777**(7-8): 550-6.
49. Noji H ve ark. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* 1997; **386**(6622): 299-302.
50. Watt IN ve ark. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; **107**(39): 16823-16827.
51. Jekabsons MB ve Nicholls DG. In situ respiration and bioenergetic status of mitochondria in primary cerebellar granule neuronal cultures exposed continuously to glutamate. *J Biol Chem* 2004; **279**(31): 32989-3000.
52. Brand MD ve Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 2011; **435**(2): 297-312.
53. Clerc P ve Polster BM. Investigation of Mitochondrial Dysfunction by Sequential Microplate-Based Respiration Measurements from Intact and Permeabilized Neurons. *PLoS ONE* 2012; **7**(4): e34465.
54. Dranka BP ve ark. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med* 2011; **51**(9): 1621-35.

55. Hanahan D ve Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**(5): 646-74.
56. Cantor JR ve Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov* 2012; **2**(10): 881-98.
57. Tormos KV ve Chandel NS. Inter-connection between mitochondria and HIFs. *J Cell Mol Med* 2010; **14**(4): 795-804.
58. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; **123**(3191): 309-14.
59. Donnelly M ve Scheffler IE. Energy metabolism in respiration-deficient and wild type Chinese hamster fibroblasts in culture. *J Cell Physiol* 1976; **89**(1): 39-51.
60. Zu XL ve Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **313**(3): 459-65.
61. Griguer CE, Oliva CR, ve Gillespie GY. Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines. *J Neurooncol* 2005; **74**(2): 123-33.
62. Kelloff GJ ve ark. Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development. *Clin Cancer Res* 2005; **11**(8): 2785-808.
63. Koppenol WH, Bounds PL, ve Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**(5): 325-37.
64. Weber WA, Schwaiger M, ve Avril N. Quantitative assessment of tumor metabolism using FDG-PET imaging. *Nucl Med Biol* 2000; **27**(7): 683-7.
65. International Pigment Cell C. *Phenotypic expression in pigment cells : proceedings of the XIth International Pigment Cell Conference Sendai, Japan, 1980 / edited by Makoto Seiji*. Place: University of Tokyo Press; 1981
66. Fitzpatrick TB. *Dermatology in general medicine : textbook and atlas*. Place: McGraw-Hill; 1979
67. Fuchs E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 1990; **111**(6 Pt 2): 2807-14.
68. Gilchrist BA ve ark. Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 1993; **101**(5): 666-72.

69. Kadekaro AL ve ark. Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann N Y Acad Sci* 2003; **994**: 359-65.
70. Szabo G ve ark. Racial differences in the fate of melanosomes in human epidermis. *Nature* 1969; **222**(5198): 1081-2.
71. Halaban R ve ark. Paracrine stimulation of melanocytes by keratinocytes through basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 1988; **548**: 180-90.
72. Imokawa G, Yada Y, ve Miyagishi M. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem* 1992; **267**(34): 24675-80.
73. Kobayashi N ve ark. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1998; **110**(5): 806-10.
74. Gilchrest BA ve Eller MS. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999; **4**(1): 35-40.
75. Matsumura Y ve Ananthaswamy HN. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2002; **4**(26): 1-22.
76. Wei Q ve ark. Repair of UV light-induced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; **95**(4): 308-15.
77. Halder RM ve Bridgeman-Shah S. Skin cancer in African Americans. *Cancer* 1995; **75**(2 Suppl): 667-73.
78. Tadokoro T ve ark. UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *FASEB J* 2003; **17**(9): 1177-9.
79. Wikonkal NM ve Brash DE. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999; **4**(1): 6-10.
80. Yamaguchi Y ve ark. Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J* 2006; **20**(9): 1486-8.
81. Leiter U ve Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol* 2008; **624**: 89-103.
82. Giblin AV ve Thomas JM. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007; **60**(1): 32-40.

83. Geller AC ve ark. Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969-1999. *Jama* 2002; **288**(14): 1719-20.
84. Purdue MP ve ark. Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US Caucasian young adults. *J Invest Dermatol* 2008; **128**(12): 2905-8.
85. Armstrong BK ve Krickler A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* 1993; **3**(6): 395-401.
86. Gallagher RP ve ark. Ultraviolet radiation. *Chronic Dis Can* 2010; **29 Suppl 1**: 51-68.
87. Harvard report on cancer prevention. Causes of human cancer. Ultraviolet light. *Cancer Causes Control* 1996; **7 Suppl 1**: S39-40.
88. Ellerhorst JA ve ark. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res* 2011; **17**(2): 229-35.
89. Gandini S ve ark. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005; **41**(1): 45-60.
90. Nelemans PJ ve ark. An addition to the controversy on sunlight exposure and melanoma risk: a meta-analytical approach. *J Clin Epidemiol* 1995; **48**(11): 1331-42.
91. Stierner U ve ark. Regional distribution of common and dysplastic naevi in relation to melanoma site and sun exposure. A case-control study. *Melanoma Res* 1992; **1**(5-6): 367-75.
92. Gandini S ve ark. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005; **41**(1): 28-44.
93. Greene MH FJ, *The hereditary variant of malignant melanoma*, in *Human malignant melanoma*, Place: Grune & Stratton; 1979. p.
94. Kopf AW ve ark. Familial malignant melanoma. *JAMA* 1986; **256**(14): 1915-9.
95. de Visser KE, Eichten A, ve Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**(1): 24-37.
96. Vajdic CM ve ark. Cutaneous melanoma is related to immune suppression in kidney transplant recipients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; **18**(8): 2297-303.
97. Dinh QQ ve Chong AH. Melanoma in organ transplant recipients: The old enemy finds a new battleground. *Australasian Journal of Dermatology* 2007; **48**(4): 199-207.

98. Murphy GM ve ark. Low-dose ultraviolet-B irradiation depletes human epidermal Langerhans cells. *Br J Dermatol* 1993; **129**(6): 674-7.
99. Norval M. The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; **92**(1): 108-18.
100. Clark WH, Jr. ve ark. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; **29**(3): 705-27.
101. Smoller BR. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol* 2006; **19 Suppl 2**: S34-40.
102. Demierre MF ve ark. Early detection of thick melanomas in the United States: beware of the nodular subtype. *Arch Dermatol* 2005; **141**(6): 745-50.
103. Koch SE ve Lange JR. Amelanotic melanoma: the great masquerader. *J Am Acad Dermatol* 2000; **42**(5 Pt 1): 731-4.
104. McClain SE ve ark. Amelanotic melanomas presenting as red skin lesions: a diagnostic challenge with potentially lethal consequences. *Int J Dermatol* 2012; **51**(4): 420-6.
105. Swerdlow AJ ve ark. Benign melanocytic naevi as a risk factor for malignant melanoma. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; **292**(6535): 1555-9.
106. Argenziano G ve ark. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *J Am Acad Dermatol* 2003; **48**(5): 679-93.
107. Stolz W, Schiffner R, ve Burgdorf WH. Dermoscopy for facial pigmented skin lesions. *Clin Dermatol* 2002; **20**(3): 276-8.
108. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 2005; **386**(3): 193-205.
109. Campbell PM ve Der CJ. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2004; **14**(2): 105-14.
110. Davies H ve ark. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; **417**(6892): 949-54.
111. Goodall J ve ark. The Brn-2 transcription factor links activated BRAF to melanoma proliferation. *Mol Cell Biol* 2004; **24**(7): 2923-31.
112. Sharma A ve ark. Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* 2005; **65**(6): 2412-21.
113. Hemesath TJ ve ark. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 1998; **391**(6664): 298-301.



114. Bhatt KV ve ark. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. *Oncogene* 2005; **24**(21): 3459-71.
115. Gray-Schopfer VC ve ark. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *British Journal of Cancer* 2006; **95**(4): 496-505.
116. Huntington JT ve ark. Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem* 2004; **279**(32): 33168-76.
117. Ellerhorst JA ve ark. Regulation of iNOS by the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway in human melanoma. *Oncogene* 2006; **25**(28): 3956-62.
118. Omholt K ve ark. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2003; **9**(17): 6483-8.
119. Gerami P GB, Murphy M., *Melanocytic neoplasms I: molecular diagnosis*, in *Molecular Diagnostics in Dermatology and Dermatopathology*, Place: Humana Press; 2011. p. 478.
120. Jönsson G ve Tsao H, *Melanoma Genetics and Genomics*, in *Melanoma Development: Molecular Biology, Genetics and Clinical Application*, Place: Springer Vienna; 2011. p. 57-77.
121. Hazan C ve ark. Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 2002; **95**(3): 634-40.
122. Henrique R ve ark. Prognostic value of Ki-67 expression in localized cutaneous malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2000; **43**(6): 991-1000.
123. Steinbeck ZR ve ark. Diagnostic impact of nuclear DNA content and proliferative activity in benign and malignant melanocytic lesions. *Melanoma Res* 1996; **6**(1): 37-43.
124. Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; **21**(1): 27-38.
125. Sauroja I ve ark. Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; **28**(4): 404-14.
126. Bandyopadhyay D ve Medrano EE. Melanin accumulation accelerates melanocyte senescence by a mechanism involving p16INK4a/CDK4/pRB and E2F1. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **908**: 71-84.

127. Ranade K ve ark. Mutations associated with familial melanoma impair p16INK4 function. *Nat Genet* 1995; **10**(1): 114-6.
128. Koh J ve ark. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 1995; **375**(6531): 506-10.
129. Chudnovsky Y ve ark. Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat Genet* 2005; **37**(7): 745-9.
130. Haferkamp S ve ark. p16INK4a-induced senescence is disabled by melanoma-associated mutations. *Aging Cell* 2008; **7**(5): 733-45.
131. Straume O ve ark. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol* 2002; **161**(1): 229-37.
132. Hanahan D ve Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**(1): 57-70.
133. Galluzzi L ve ark. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med* 2010; **31**(1): 1-20.
134. Smith RA ve ark. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2012; **33**(6): 341-52.
135. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 2005; **10**: 1881-96.
136. Smolkova K ve ark. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; **43**(7): 950-68.
137. Moreno-Sanchez R ve ark. Metabolic control analysis indicates a change of strategy in the treatment of cancer. *Mitochondrion* 2010; **10**(6): 626-39.
138. Romero-Garcia S ve ark. Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biol Ther* 2011; **12**(11): 939-48.
139. Gogvadze V. Targeting mitochondria in fighting cancer. *Curr Pharm Des* 2011; **17**(36): 4034-46.
140. DeBerardinis RJ ve ark. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 2008; **7**(1): 11-20.
141. Gatenby RA ve Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; **4**(11): 891-9.

142. Weinberg F ve Chandel NS. Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1177**: 66-73.
143. Hardie DG, Carling D, ve Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 821-55.
144. Yeh LA, Lee KH, ve Kim KH. Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge. *J Biol Chem* 1980; **255**(6): 2308-14.
145. Suter M ve ark. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2006; **281**(43): 32207-16.
146. Hawley SA ve ark. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2003; **2**(4): 28.
147. Hawley SA ve ark. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2005; **2**(1): 9-19.
148. Hurley RL ve ark. The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 2005; **280**(32): 29060-6.
149. Momcilovic M, Hong SP, ve Carlson M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* 2006; **281**(35): 25336-43.
150. Woods A ve ark. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 2003; **13**(22): 2004-8.
151. Jones RG ve ark. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2005; **18**(3): 283-93.
152. Greer EL ve ark. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem* 2007; **282**(41): 30107-19.
153. Jager S ve ark. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(29): 12017-22.

154. Tan Z ve ark. The Role of PGC1 $\alpha$  in Cancer Metabolism and its Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics* 2016; **15**(5): 774.
155. LaGory EL ve ark. Suppression of PGC-1 $\alpha$  Is Critical for Reprogramming Oxidative Metabolism in Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep* 2015; **12**(1): 116-27.
156. Lamb R ve ark. *Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: Quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition*. Place: 2014
157. De Luca A ve ark. *Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells*. Place: 2015
158. LeBleu VS ve ark. PGC-1 $\alpha$  mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 2014; **16**(10): 992-1003.
159. Solaini G ve ark. Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Biosci Rep* 2007; **27**(1-3): 11-21.
160. Shaw RJ ve Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; **441**(7092): 424-30.
161. Klohn PC ve ark. Early resistance to cell death and to onset of the mitochondrial permeability transition during hepatocarcinogenesis with 2-acetylaminofluorene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(17): 10014-9.
162. Rasola A ve ark. Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(2): 726-31.
163. Derdak Z ve ark. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Res* 2008; **68**(8): 2813-9.
164. Tsujimoto Y ve ark. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; **226**(4678): 1097-9.
165. Bakhshi A ve ark. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; **41**(3): 899-906.
166. Crescenzi M ve ark. Thermostable DNA polymerase chain amplification of t(14;18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**(13): 4869-73.

167. Delivani P ve ark. Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Mol Cell* 2006; **21**(6): 761-73.
168. Li H ve ark. Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(6): 2169-74.
169. Karbowski M ve ark. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 2006; **443**(7112): 658-62.
170. Wasiak S, Zunino R, ve McBride HM. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* 2007; **177**(3): 439-50.
171. Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 1966; **30**(2): 269-97.
172. Hackenbrock CR. Energy-linked ultrastructural transformations in isolated liver mitochondria and mitoplasts. Preservation of configurations by freeze-cleaving compared to chemical fixation. *J Cell Biol* 1972; **53**(2): 450-65.
173. Pich S ve ark. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 2005; **14**(11): 1405-15.
174. Chiche J ve ark. Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *J Cell Physiol* 2010; **222**(3): 648-57.
175. Legros F ve ark. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 2002; **13**(12): 4343-54.
176. Barni S ve ark. Static cytofluorometry and fluorescence morphology of mitochondria and DNA in proliferating fibroblasts. *Biotech Histochem* 1996; **71**(2): 66-70.
177. Margineantu DH ve ark. Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 2002; **1**(5): 425-35.
178. Berridge MJ, Bootman MD, ve Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**(7): 517-29.

179. Carafoli E. The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**(4): 326-32.
180. Stewart TA, Yapa KT, ve Monteith GR. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1848**(10 Pt B): 2502-11.
181. Parkash J ve Asotra K. Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sci* 2010; **87**(19-22): 587-95.
182. Tsien RY, Rink TJ, ve Poenie M. Measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 1985; **6**(1-2): 145-157.
183. Grynkiewicz G, Poenie M, ve Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; **260**(6): 3440-50.
184. Parsons JT, Horwitz AR, ve Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**(9): 633-43.
185. Gardel ML ve ark. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010; **26**: 315-33.
186. Ridley AJ ve ark. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003; **302**(5651): 1704-9.
187. Prevarskaya N, Skryma R, ve Shuba Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**(8): 609-18.
188. Blaser H ve ark. Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev Cell* 2006; **11**(5): 613-27.
189. Berridge MJ, Lipp P, ve Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; **1**(1): 11-21.
190. Marchi S ve ark. Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25. *Curr Biol* 2013; **23**(1): 58-63.
191. Rehman J ve ark. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J* 2012; **26**(5): 2175-86.
192. Zhao J ve ark. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 2013; **32**(40): 4814-24.
193. Wan YY ve ark. Involvement of Drp1 in hypoxia-induced migration of human glioblastoma U251 cells. *Oncol Rep* 2014; **32**(2): 619-26.

194. Hagenbuchner J ve ark. BIRC5/Survivin enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery. *Oncogene* 2013; **32**(40): 4748-57.
195. Inoue-Yamauchi A ve Oda H. Depletion of mitochondrial fission factor DRP1 causes increased apoptosis in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **421**(1): 81-5.
196. Kashatus JA ve ark. Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol Cell* 2015; **57**(3): 537-51.
197. Serasinghe Madhavika N ve ark. Mitochondrial Division Is Requisite to RAS-Induced Transformation and Targeted by Oncogenic MAPK Pathway Inhibitors. *Molecular Cell* **57**(3): 521-536.
198. Chan DA ve Giaccia AJ. Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2007; **26**(2): 333-9.
199. Lartigau E ve ark. Intratumoral oxygen tension in metastatic melanoma. *Melanoma Res* 1997; **7**(5): 400-6.
200. Ong SB ve ark. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2010; **121**(18): 2012-22.
201. Gomes LC, Di Benedetto G, ve Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 2011; **13**(5): 589-98.
202. Rambold AS ve ark. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**(25): 10190-5.
203. Ferreira-da-Silva A ve ark. Mitochondrial Dynamics Protein Drp1 Is Overexpressed in Oncocytic Thyroid Tumors and Regulates Cancer Cell Migration. *PLOS ONE* 2015; **10**(3): e0122308.
204. Suganuma K ve ark. Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leuk Lymphoma* 2010; **51**(11): 2112-9.
205. Haq R ve ark. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell* 2013; **23**(3): 302-15.
206. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**(10): 774-85.

207. Borgdorff V ve ark. A chemical biology approach identifies AMPK as a modulator of melanoma oncogene MITF. *Oncogene* 2014; **33**(19): 2531-9.
208. Kim HS ve ark. Berberine-induced AMPK activation inhibits the metastatic potential of melanoma cells via reduction of ERK activity and COX-2 protein expression. *Biochem Pharmacol* 2012; **83**(3): 385-94.
209. Ambrosini G ve ark. Inhibition of mutant GNAQ signaling in uveal melanoma induces AMPK-dependent autophagic cell death. *Mol Cancer Ther* 2013; **12**(5): 768-76.

