

**T.C. TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAŞ VE BOYUN KANSERLERİNDE KÖK HÜCRE İZOLASYONU
KARAKTERİZASYONU VE MICROARRAY ANALİZİ İLE GEN
EKSPRESYON PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

ELİF NİHAN ÇETİN

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR**

Bu tez TUBİTAK 1001 projesi (Proje No: 112S497) kapsamında desteklenmiştir

ANKARA-2015

**T.C. TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAŞ VE BOYUN KANSERLERİNDE KÖK HÜCRE İZOLASYONU
KARAKTERİZASYONU VE MICROARRAY ANALİZİ İLE GEN
EKSPRESYON PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

ELİF NİHAN ÇETİN

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR**

Bu tez TÜBİTAK 1001 projesi (Proje No: 112S497) kapsamında desteklenmiştir

ANKARA-2015

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,

-atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,

- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,

- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

Elif Nihan ÇETİN

ONAY

Elif Nihan ÇETİN tarafından hazırlanan “*Baş Ve Boyun Kanserlerinde Kök Hücre İzolasyonu Karakterizasyonu Ve Microarray Analizi İle Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi*” başlıklı bu çalışma, **16.06.2015** tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oybirliği ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....
Yrd. Doç. Dr. Muradiye Acar (Başkan)

.....
Prof. Dr. Mehmet Gündüz

.....
Doç. Dr. Beyhan Cengiz

ÖNSÖZ

Çalışmalarım süresince her türlü bilgi ve tecrübesi ile çalışmama ışık tutan, ayrıca bana bu çalışmayı vererek kendimi geliştirmeye yönelik de birkaç adım ileride olmamı sağlayan, proje yürütücüm Sayın Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ'e ve bu bölüme başladığım ilk günden beri, güleryüzü ile bize bir anne şefkati ile her zaman yardımcı olan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Esra GÜNDÜZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve beni yönlendiren değerli tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımın başlangıcından itibaren büyük bir sabır ve özveri ile proje, deneyler ve birçok konuda bana yardımcı olan, fedakârlıkta sınır tanımayan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimin başından beri bana yardımcı olan bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak, eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi destekleriyle benim yanımda olan ve hiç bir zaman desteklerini esirgemeyen sevgili ailem, babam Ahmet ÇETİN'e, annem Gülsen ÇETİN'e, abim Hasan ÇETİN'e ve kardeşim Ömer Yiğit ÇETİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez TÜBİTAK 1001 projesi (Proje No: 112S497) kapsamında desteklenmiştir

ÖZET

[ÇETİN, Elif Nihan]. [Baş ve Boyun Kanserlerinde Kök Hücre İzolasyonu Karakterizasyonu ve Microarray Analizi ile Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi], [Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2015].

Kanser, günümüzde karşılaşılan en önemli sağlık sorunlarından biridir. Tanı ve tedavi imkanlarının gelişmesiyle her geçen yıl daha fazla kanser vakası teşhis edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, 2008'de Dünya'da toplam 12 milyon kişiye kanser tanısı konulurken, 2030 yılında bu sayının 26 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir. Kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra 2. ölüm sebebidir.

Tıpta yaşanan son gelişmelere rağmen, baş ve boyun kanseri hastalarının tedavilerinde ve sağkalım oranlarında önemli bir artış olmamıştır. Tümörün agresif yapısı ve metastaz yeteneğinin yanısıra kullanılan mevcut tedavilerin yetersizliğide bu durumun nedenleri arasındadır. Bu nedenle daha etkili ve daha az toksik yaklaşımlar geliştirmek amacıyla, bu hastalığın biyolojisinin daha iyi bilinmesi büyük önem arz etmektedir.

Kök hücrelerin kendini yenileme mekanizmalarında meydana gelen bozukluklar, kanser kök hücre oluşumuna sebep olmaktadır. Bu hücreler mevcut kanser tedavilerine direnç göstermektedir. Kanser kök hücrelerinin ve kanser hücrelerinin tümör ve metastaz oluşturma yeteneklerinin farklı olması, hücre yollarının farklı olduğuna işaret etmektedir.

Kemoradyoterapi, hızla bölünen kanser hücrelerinin çoğunluğunu öldürüyor olsa da, daha az sayıda bulunan ve seyrek hücre döngüsüne sahip kanser kök hücrelerine etkili olamamaktadır. Prince ve arkadaşları 2007 yılında ilk kez, baş ve boyun kanseri kök hücrelerinin varlığını bildirmişlerdir. Fare xenografi modeli üzerinde yaptıkları araştırmada, az sayıda CD44+ olan hücrelerin tümör oluşumunu başlattığı, CD44- olan çok daha yüksek orandaki hücrelerin ise tümör oluşturmadığı görülmüştür. Aynı grup baş ve boyun kanser kök hücrelerine özgü Aldehit dehidrogenaz (ALDH) biomarkırını tanımlayıp düşük ve yüksek ALDH aktivitesine

sahip hücreleri izole ederek, yüksek ALDH oranına sahip hücrelerin son derece tümörjenik olduğunu göstermişlerdir.

Bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmada, baş ve boyun kanserine ait UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarında ALDH biomarkını kullanılarak kanser kök hücresi ve kanser hücresi izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen hücrelerin validasyonu morfolojik olarak, immünofloresan ve markır genlerin ekspresyonuna bakılarak kontrol edilmiştir. Ayrıca izole edilen hücrelerden, RNA izole edilerek microarray yöntemi ile baş ve boyun kanserleri kanser kök hücrelerinde ekspresyonu artan ve azalan genler belirlenmiştir.

ABSTRACT

[CETİN, Elif Nihan]. [Head and Neck Cancer Stem-Cell Isolation, Characterization and Microarray Analysis of Their Gene Expression Profiles], [Masters Thesis, Ankara, 2015].

Cancer is one of the most important health problems of our day. With each passing year, alongside developments in diagnosis and treatment, the number of diagnosed cases of cancer steadily increases. According to data from the World Health Organization, in the year 2008 a total of 12 million cancer diagnoses worldwide were given and it was estimated that in the year 2030 this number will increase to 26 million. Behind heart disease, cancer is the second highest cause of death in the developed world.

Despite recent developments in medicine, there has not been a significant increase in the cure rate or survival rate for head and neck cancer. One of the reasons why current therapies remain insufficient is the aggressive nature of tumors and their metastatic capacity. Therefore, there is an urgent need for a better understanding of the biology of this disease in order to develop more effective and less toxic treatment modalities.

Defects in the self-renewal mechanisms of stem-cells is one of the causes of the development of cancer stem cells. These cells are resistant to available cancer treatments. As primary tumor cells, metastatic tumor cells and cancer stem cells have different characteristics, their cellular pathways should also be different from one another.

While chemoradiotherapy is able to kill the majority of rapidly dividing cancer cells, the slowly cycling and rare cancer stem cells remain unaffected. In 2007, Prince et al. showed for the first time the existence of cancer stem cells in head and neck cancer. In their study, using mouse xenograft model, they showed that the rare CD44⁺ cells initiated tumor growth when transplanted into mice, while the majority CD44⁻ cells did not initiate tumor growth. The same group identified aldehyde dehydrogenase (ALDH) as a head and neck cancer stem-cell marker. They

isolated cells with low and high ALDH activity and showed that the cells with high ALDH activity were highly tumorigenic.

With these results in mind, in this study, cancer stem-cells were isolated from head and neck cancer cell lines UT-SCC 74A and UT-SCC 74B using ALDH as a biomarker. The stemness of the isolated cells was validated by morphology, immunofluorescence and stem-cell marker gene expression analysis. Furthermore, RNA was collected from the isolated stem cells and then, using microarray, upregulated and downregulated genes were identified.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xi
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1 Kanser.....	1
1.1.1 Kanserin Dünyadaki İnsidansı	2
1.1.2 Kanserin Moleküler Özellikleri	2
1.1.3 Kanser Genleri	2
1.1.4 Kanserin Hücresel Kökeni ve İlerlemesi	3
1.2 Kanser Çeşitleri	4
1.3 Baş ve Boyun Kanseri	4
1.3.1 Baş ve Boyun Kanserinin Epidemiyolojisi	4
1.3.2 Baş ve Boyun Kanserinin Risk Faktörleri	5
1.3.3 Baş ve Boyun Kanserinin Belirtileri	6
1.3.4 Baş ve Boyun Kanserinin Boyun Kitlelerine Yaklaşım	7
1.3.5 Baş ve Boyun Kanserinin Boyun Kitleleri İçin Laboratuvar Çalışmaları ...	7
1.3.6 Baş ve Boyun Kanserinde Tanı	8
1.3.7 Baş ve Boyun Kanserinde Tedavi ve Sağkalım Oranı.....	8
1.4 Kök Hücre	9
1.4.1 Farklılaşma kaynaklarına göre;.....	10
1.4.2 Elde edildikleri yere göre.....	11
1.5 Kanser Kök Hücreleri.....	13
1.5.1 Kanser Oluşumunda Sinyal İletim Yolları	14
1.5.2 Kanser Kök Hücrelerinin Kanser Oluşumundaki Fonksiyonları.....	14
1.5.3 Kanser Kök Hücre Markırlarının Araştırılması	14
1.5.4 Dokuya Özgü Kök Hücre Yüzey Markırları.....	15
2. MATERYAL ve METODLAR	17

2.1 Hücre Kültürü.....	17
2.1. 1 Kullanılan Hücrelerin Genel Özellikleri.....	17
2.1. 2 Stoktan Hücre Ekimi.....	18
2.1. 3 Hücre Pasajlama	18
2.1. 3 Hücre Sayımı	18
2.1. 4 Hücrelerin Stoğa Alınması.....	19
2.2 Kök Hücre İzolasyonu.....	20
2.2. 1 Fluorescence-activated cell sorting.....	20
2.2. 2 Magnetic Beads.....	21
2.3 Kanser Kök Hücrelerinin ve Kanser Hücrelerinin Kültüre Edilmesi.....	23
2.4 Kanser Kök Hücre Validasyonu.....	24
2.4.1 Küre Oluşumu Deneyi	24
2.4.2 İmmünofloresan Boyama.....	24
2.4.3 Kök Hücre markırları ile KKH'lerinin Validasyonu	25
2.5 Microarray Analizi	29
2.5.1 Poly-A RNA Kontrolleri Hazırlama	31
2.5.2 Tek Zincir cDNA Sentezi	32
2.5.3 Çift Zincir cDNA Sentezi	32
2.5.4 In Vitro Transkripsiyon ile İşaretli aRNA Sentezi	33
2.5.5 aRNA Pürifikasyonu.....	33
2.5.6 Pure aRNA Miktar Tayini.....	34
2.5.7 Fragmentasyon.....	35
2.5.8 Hibridizasyon.....	36
2.5.9 Yıkama - Boyama – Tarama.....	37
3. BULGULAR.....	38
3.1 Hücre Kültürü.....	38
3.2. Kök Hücre İzolasyonu.....	39
3.3 Magnetic Beads	44
3.4 İzole edilen KKH'lerinin Validasyonu.....	44
3.4.1 Küre Oluşumu Deneyi	44
3.4.2 İmmünofloresans Boyama	44

3.4.3 Kök Hücre markırları ile KKH'lerinin Validasyonu	45
3.5 Microarray Analizi ile Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlendi	49
4.TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	56

KISALTMALAR

UT-SCC	Universty of Turku Squamous Cell Carcinoma
KKH	Kanser Kök Hücresi
KH	Kanser Hücresi
KKHM	Kanser Kök Hücre Mediumu
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
PE	Phycoerythin
ALDH	Aldehit Dehidrogenaz
DAP	4',6-diamino-2-phenylindole
FGF	Fibroblast Growth Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
EKH	Embriyonik Kök Hücre
GKH	Germinal Kök Hücre
OCT-4	Octamer-Binding Transcription Factor 4
SOX-2	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2
KLF-4	Kruppel-Like Factor 4
IPS/IPSCs	Induced Pluripotent Stem Cells

TABLÖLAR

Tablo.1: Normal Vücut Hücresi ve Kök Hücre Arasındaki Farklar

Tablo.2: Kanser Kök Hücre markırları

Tablo.3: Kök hücre yüzey markırlarının tanımı

Tablo.4: Çalışmada kullanılan primer dizileri

Tablo.5: qRT-PCR için hazırlanan mix (her bir örnek için)

Tablo.6: qRT-PCR Şartları

Tablo.7: Poly-A RNA Kontrol Stok Seri Sulandırılması

Tablo.8: Total RNA/Poly-A RNA Kontrol Karışımı

Tablo.9: Tek Zincir Master Mix (tek reaksiyon için)

Tablo.10: Thermal Cyclers Programı

Tablo.11: Çift Zincir Master Mix (tek reaksiyon için)

Tablo.12: Thermal Cyclers Programı

Tablo.13: IVT Master Mix (tek reaksiyon için)

Tablo.14: Thermal Cyclers Programı

Tablo.15: aRNA Binding Mix Hazırlanması (tek reaksiyon için)

Tablo.16: aRNA fragmentasyon mix'in hazırlanması

Tablo.17: Thermal Cyclers Programı

Tablo.18: Tek Probe Array için Hibridizasyon Kokteyli

Tablo.19: Probe Array Kartuş Hacimleri

Tablo.20: ALDH+ Kanser Kök Hücreleri ve ALDH- Kanser Hücrelerine ait RNA konsantrasyonları

Tablo.21: qRT-PCR sonrası genlerin ΔC_t değerleri

Tablo.22: B.Actin (-) Hedef genlerin $\Delta\Delta C_t$ değerleri

ŞEKİLLER

Şekil.1: Kök Hücrelerin Gruplandırılması

Şekil.2: Totipotent Hücre

Şekil.3: Pluripotent Hücre

Şekil.4: qRT-PCR pickleri

Şekil.5: Çalışmada kullanılan GeneChip Human Genome U133a 2.0 model chip

Şekil.6: Microarray basamaklarının şematize edilmiş hali

Şekil.7: 10X'deki görünüm

Şekil.8: 20X'deki görünüm

Şekil.9: 10X'deki görünüm

Şekil.10: 20X'deki görünüm

Şekil.11: UT-SCC 74A hücre hattının ALDH yüzey makını ile muamele edilmemiş FACS sonuçları

Şekil.12: UT-SCC 74A hücre hattının ALDH yüzey makını ile muamele edilmiş FACS sonuçları;

Şekil.13: UT-SCC 74B hücre hattının ALDH yüzey makını ile muamele edilmemiş FACS sonuçları;

Şekil.14: UT-SCC 74B hücre hattının ALDH yüzey makını ile muamele edilmiş FACS sonuçları;

Şekil.15: UT-SCC 74A ALDH- KH

Şekil.16: UT-SCC 74A ALDH+ KKH

Şekil.17: UT-SCC 74B ALDH- KH

Şekil.18: UT-SCC 74B ALDH+ KKH

Şekil.19: ALDH- KH DAPI Boyaması

Şekil.20: ALDH- KH ALDH1 Boyaması

Şekil.21: ALDH+ KH DAPI Boyaması

Şekil.22: ALDH+ KH ALDH1 Boyaması

Şekil.23: KKH' lerinden ve KH' lerinden izole edilen RNA'ların jel görüntüsü

Şekil.24: UT-SCC 74A qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri belirlenen genlerin jel görüntüsü

Şekil.25: Kök hücre markırı OCT-4, SOX-2 ve KLF-4 genlerinin ALDH+ KKH'lerin ALDH- KH'lerine göre ekspresyon oranı

Şekil.26: Kök hücre markırı OCT-4, SOX-2 ve KLF-4 genlerinin ALDH+ KKH'lerin ALDH- KH'lerine göre ekspresyon oranı

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1 Kanser

İlk defa M.Ö. 460-377’de Hipokrat, kanser için organizmanın şifa bulamayan yapılanmaları tanımını kullandı. Vücut yüzeyinde büyüyen, kırmızı, ağrılı ve diğerlerinden daha farklı karaktere sahip olan şişlikleri “karkinoma” ya da “karkinos” olarak adlandırırken, M.S. 2. Yüzyılda Galen, yengece benzettiği görünümü ile “kanser” adını verdi [1].

1298 yılında Tarsuslu Osman Hayri Efendi’nin “Kenzüsıhhatül Ebdaniye” isimli eserinde seretan, küçük yumru veya fındık büyüklüğünde, etrafı damarlı ağrılı bir yapı olarak tanımlanmaktadır. Bu yüzden Türk tıp tarihinde kansere “Seretan” denilmektedir [2].

Kanser, DNA’da meydana gelen hasar sonucu hücrelerin kontrolsüz, anormal bir biçimde çoğalması ve büyümesidir. Gün içinde DNA’da yaklaşık 10.000 mutasyon olmasına rağmen bağışıklık sistemimiz aktif olarak vücudumuzu tarar ve bu hücreleri imha eder [1-3].

Yaşlanan - ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacı ile sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptir. Ama hücrelerin bu yetenekleri sınırlıdır. Sonsuz bir şekilde bölünüp çoğalamazlar. Hücreler özelliklerine göre, belli sayıda bölünebilme geçirirler. Sağlıklı hücreler ne zaman ve nerede bölüneceklerini bilecek şekilde programlanmışlardır [1-3].

Kanser hücrelerinde ise böyle bir program yoktur. Yani sağlıklı hücreler gibi kontrollü bölünemezler. Bu programı kaybeden hücreler kontrolsüz bir biçimde bölünerek çoğalmaya başlar [1-3].

Kanser hücreleri bir araya gelerek tümör kitlesini oluştururlar. Tümör kitlesi sağlıklı dokulara baskı yaparak onları sıkıştırabilir ya da tahrip edebilirler. Kanser hücreleri tümör kitlesinden ayrılıp, lenf veya kan dolaşımına katılarak vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri bölgelerde yeni koloniler oluşturup büyümeye

devam ederler. Kanserin bu şekilde vücudun başka bölgelerine dağılmasına metastaz denir [3].

1.1.1 Kanserin Dünyadaki İnsidansı

Kanser, günümüzde karşılaşılan en önemli sağlık sorunlarından biridir. Tanı ve tedavi imkanlarının gelişmesiyle her geçen yıl daha fazla kanser vakası teşhis edilmektedir. Tedavi olanaklarındaki artış ve toplumun bilinçlenmesi ile daha çok sayıda hasta hekime başvurmaktadır. İlerleyen teknoloji ile kanserojen maddelere maruziyetin artışı kanserli vaka sayısını arttırmıştır. Kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra 2. ölüm sebebidir [4].

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı ve Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, 2008'de Dünya'da toplam 12 milyon kişiye kanser tanısı konulurken, 2030 yılında bu sayının 26 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir [5].

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre kanser vakalarındaki artışın 3 temel sebebi; tütün kullanımı, yaşlı nüfus sayısındaki artış ve obezitedir [5].

1.1.2 Kanserin Moleküler Özellikleri

Kanser belirtileri, gelişimi ve sonuçları yönünden hastaya göre etkisi değişen karmaşık bir hastalıktır. Hastalıkta görülen bu heterojenite, hücresel ve moleküler düzeyde de kendini göstermektedir. Kanser, hücrelerin anormal bir şekilde çoğalmalarına, bağışıklık sisteminin gözetiminden kaçmasına ve buna bağlı olarak da başka dokulara ulaşarak metastaza yol açan birçok evreden oluşur [6].

1.1.3 Kanser Genleri

İnsan genomunda yaklaşık 20.000 kadar gen vardır. İşlevini yitiren bir gen, önemli bir proteinin anormal düzeyde üretilmesine, anormal bir protein üretimine ya da proteinin hiç üretilmemesine sebep olabilir. Örneğin; Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (KRAS) geninde meydana gelen bir mutasyon, hücre zarının içinde yer alan küçük bir proteinin hücre büyüme sinyalini arttıran bir proteine dönüşmesine sebep olur. KRAS geninde meydana gelen mutasyonlar, birçok kanser türünde görülmekle birlikte özellikle kolorektal veya akciğer adenokarsinomlarında yaygındır. Bu gene karşılık gelen protein, ise görevini yerine getiremeyerek sürekli hücre bölünme sinyali verir. Bu şekilde normal fonksiyonunu kaybederek sürekli

hücre bölünme sinyali veren genlere “onkogen” denir. Onkogenler hücre çoğalmasını hızlandırmaktadır. Bu durumun tersine, bazı genler aktif olmadıklarında kanser oluşumuna katkı sağlarlar. Örneğin; TP53 geni yanlış hücre bölünmesini engellemek amacıyla hareket eder. Bu gende meydana gelen bir mutasyon proteinin yapısını bozarak, proteinin görevini yerine getirememesine neden olur. Bu durumda hücrelerin çoğalması durdurulamaz. TP53 mutasyonu hemen hemen her kanser türünde gözlenmektedir. İşlevini yitirerek kanser oluşumunda etkili olan bu tür genlere “tümör baskılayıcı gen” adı verilmektedir [7].

1.1.4 Kanserın Hücresel Kökeni ve İlerlemesi

Bir hücrenin kanserli olabilmesi için onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin, hücrenin anormal bir şekilde çoğalmasını sağlayacak değişiklikler geçirmesi gerekmektedir. Bu süre içerisinde “agresif” hücrelerden oluşan klonlar meydana gelir. Organizma bu klonları tolere edip, çoğalmalarını engellemediği sürece, hücreler gittikçe artan sayıda modifikasyonu bünyelerinde biriktirir. Böyle bir durumda, sadece en uygun ve en saldırgan hücreler hayatta kalacaklardır. Tümörler bu şekilde malign hale gelirler. Hastalara kanser hücrelerini öldüren bir ilaç uygulandığında, ilaca karşı direnç geliştirmiş az sayıda hücre vardır. Bu az sayıdaki dirençli hücreler, kanserin başlangıç döneminden daha etkili bir şekilde nüks etmesi için yeterli olabilmektedir [8].

Kanser erken dönemde teşhis edilemediği zaman sadece büyüklük değil, aynı zamanda komşu hücrelere de zarar vererek ilerler. Böylece kanser etkilenen organ içerisine yayılıp, daha sonra komşu hücrelere atlar. Lenfatik damarlara geçerek, lenf düğümlerine dağılırlar. Kanser, lenf ve kan dolaşımı ile kemik, karaciğer, akciğer ya da beyin gibi organlara metastaz yapabilir. Kanser hücrelerinin vücuda yayılması anjiyogenez ile tümöre oksijen ve besin sağlaması sonucunda kolaylaşır [8].

Metastaz yapmış kanserin tedavisi daha zordur. Tümör odaklı tedaviye ek olarak, kemoradyoterapide gerektirmektedir. Kemoterapi, temel olarak kanser hücrelerini öldürmek, DNA ve hücre bölünmesini durdurmaya yönelik toksik bir maddedir. Kemoterapi kullanımı, kanserli hücrelerin bölünmek üzere DNA'larını daha çok kopyaladıkları ve bu yolla DNA hasarı ile hücreleri öldürerek normal

hücrelerden daha hassas oldukları düşünülmektedir. Son dönemde ise kanser ile ilişkisi bulunan ve belirli moleküler değişiklikleri hedefleyen moleküllerin kullanıldığı yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiştir [8]. Bunların arasında, kanser hücreleri tarafından eksprese edilen hücre yüzey moleküllerine özgü antikorlar ya da kanserli hücrelerde aktive olan enzimlerin aktivitesini durduran ilaçlar sayılabilir. Sonuç olarak, birçok kanser türünde, organın bulunduğu yere ya da hastalığa bağlı olmaksızın, bazı tümör baskılayıcı ve onkogenler değişir. Bu genlerin meydana getirdiği ürünler ise hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağkalım oranlarını etkilemektedir [9].

1.2 Kanser Çeşitleri

Kanser bedende görüldüğü bölgeye ve organa göre çeşitlilik göstermektedir. Örneğin; Baş ve Boyun Kanseri, Mide Kanseri, Serviks Kanseri (Rahim Ağzı Kanseri), Safra Yolu Kanseri, Safra Kesesi Kanseri, Prostat Kanseri, Pankreas Kanseri, Göz Kanseri, Melanoma, Karaciğer Kanseri, Kan Kanseri (Lösemi), Kalın Bağırsak Kanseri, İnce Bağırsak Kanseri, Rahim Kanseri, Meme Kanseri, Böbrek Kanseri, Cilt Kanseri, Böbrek Kanseri, Anüs Kanseri, Anal Kanal Kanseri ve Akciğer Kanseri olmak üzere pek çok kanser çeşiti vardır [4].

Kadınlarda en çok görülen kanser çeşiti akciğer, meme, kolorektal, deri ve rahim kanserleridir. Erkeklerde ise en çok görülen kanser türleri prostat, akciğer, kolorektal, mesane ve deri kanserleridir [10].

1.3 Baş ve Boyun Kanseri

Her bölgede kansere rastlanabilir. Baş ve boyun bölgesinden kökenlenen kanser türüne baş boyun kanseri denir. Baş boyun kanserleri, nazofarinks, paranasal sinüs, oral kavite, orofarinks, hipofarinks, larinks ve tükürük bezi kanserlerini kapsamaktadır [11].

1.3.1 Baş ve Boyun Kanserinin Epidemiyolojisi

Baş ve boyun kanserleri, diğer kanserler ile karşılaştırıldığında en sık karşılaşılan 5-6. Kanser türüdür [12].

Yılda ortalama 160.000 larinks ile 400.000 kişiye ağız boşluğu ve farinks kanseri tanısı konmaktadır. Bu vakalardan yaklaşık 300.000'ni ölümlerle sonuçlanmaktadır [13]. Tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen hastaların sağkalım oranlarında anlamlı bir artış olmamıştır [14].

Hastalığın 5 yıllık sağkalım oranı %64 olarak belirlenmiştir. Baş ve boyun kanserleri içerisinde, 5 yılda en yüksek sağkalım %91 ile dudak kanserinde olurken, en düşük sağkalım %31 ile hipofarenks kanserinde olmuştur [14].

1.3.2 Baş ve Boyun Kanserinin Risk Faktörleri

Baş ve boyun kanserlerinin etiyolojisinde etkili olan birçok faktör bulunmaktadır. Böyle bir durumla karşılaşıldığında risk faktörleri iyi sorgulanmalıdır [15]. Baş ve boyun kanserlerinin büyük bir çoğunluğu histolojik olarak skuamoz hücreli karsinom (SCC) türündedir ve bu kanserler için temel risk faktörleri tütün ve alkol kullanımınıdır. Uzun süreli, ağır içiciler ve yüksek katranlı sigara ya da kara tütün kullanan kişiler için bu risk daha da yüksektir. Pipo ve puro kullanımı da hastalıkta etkili olup, bu maddelerin kullanımının bırakılmasıyla beraber riskte azalma görülmektedir [16].

Alkol kullanımı ise başlı başına bir risk faktörü olup, tütün ile birlikte kullanıldığında sinerjistik bir etki göstermektedir [17]. Alkol ve tütünün birlikte kullanımı bölgelere göre çeşitlilik gösterebileceği düşünülmekte olup, her ikisine maruz kalındığındaki etkisi, dünya genelinde tüm baş ve boyun kanserlerinin çoğunluğunu açıklamaktadır [18].

Baş ve boyun kanserlerinde radyasyona maruz kalınmasıyla tiroid ve tükrük bezlerinde tümör gelişimi olabilmektedir. Dudak kanserleri için, uzun süreli güneş ışığına maruziyet bir risk faktörüdür [17].

Mesleki olarak kullanılan, sülfürik asit ve hardal gazı içeren inorganik asit gibi maddelerin buharı ya da izopropanol imalatı gibi iş koşullarındaki bir çok faktörün, gırtlak kanseri için risk faktörü oluşturduğundan şüphelenilmektedir [19].

Yetersiz ağız bakımı ve ağız gargaralarının çokça kullanımı, diğer baş ve boyun kanserleriyle pek ilişkilendirilmese de ağız kanserleri için potansiyel risk faktörlerindedir [19].

İnsan Papilloma Virüsünde (HPV) de son yıllardaki çalışmalar ile baş ve boyun kanserleri gelişimi için bir risk faktörü olarak literatürdeki yerini almıştır [17].

1.3.3 Baş ve Boyun Kanserin Belirtileri

Kanser vakalarının en çok tespit edildiği yaş 50-60 arasındır. Boyunda görülen kitleler çocukluk döneminde genellikle iyi huylu çıkarken, bu kitleler yetişkinlerde çoğunlukla kötü huylu çıkmaktadır. Kitlenin fark edildiği andan itibaren geçen sürede, büyüme hızı, görünümü ve boyutunda gerçekleşen farklılıklar, kıvamında meydana gelen değişimler ve uygulanan antibiyotik tedavisine nasıl bir yanıt verdiği önemlidir. Ayrıca kişide meydana gelen bu değişikliklerle beraber; kulak ağrısı, yutma güçlüğü, kan tükürmek, koku alma bozukluğu, boğaz ağrısı gibi semptomlar önemli olmaktadır [20].

Yutkunma sırasında meydana gelen kulak ve kulak bölgesi ağrıları boyundaki bir tümöre ya da enfeksiyona bağlı olabilir [21]. Göğüs ve yemek borusunda görülen kanserlerde yutma problemleri olup, çoğunlukla katı yiyecekler tüketilirken yutmada zorluk yaşanabilir [20].

Kan tükürmek, kanser dışında farklı sebeplerle de gözlenebilir. Fakat bununla birlikte akciğer, burun, göğüs ve ağız kanserleri kanamaya sebep olabilir. Eğer balgam ya da tükürükte uzun süreli kan görülür ise kanser riski artmaktadır [20].

Baş boyun kanserleri çoğunlukla, vücuda yayılmadan önce boyundaki lenf düğümlerine yayılır. Görülen tüm şişlikler kanser olmamakla beraber, bu şişlikler guatr, gırtlak, ağız, bazı lenf kanserleri ve kan kanserinin işareti olabilir. Bu tür şişlikler çoğunlukla ağrısız ve büyümeye meyillidir [21]. Ağız ya da dildeki kanser türlerinde ağrı ve şişme görülür. Ağızda oluşan bu değişiklikler genellikle ağrısızdır, fakat iltihaplanırsa ağrı meydana gelebilir. Boyundaki kitleyle beraber şişme ya da ülser varsa dikkat edilmesi gerekmektedir [20].

Dil ve dudak kanserlerinin birçoğu şişliklere ve iyileşmeyen yaralara sebep olmaktadır. Hastalığın ileri dönemlerine kadar kanama görülmeyebilir. Gırtlak kanserleri ise ses değişimine sebep olur. Her ses değişikliği kanser olmamakla birlikte, 2 haftadan uzun süreli değişiklikler kanserin belirtisi olabilir [21].

1.3.4 Baş ve Boyun Kanserinin Boyun Kitlelerine Yaklaşım

Kısa süreli var olan şişlikler çoğunlukla inflamatuvar olmakla birlikte, uzun süreli yani haftalar veya aylardır varlığını devam ettiren kitleler ise genellikle neoplazi bulgusudur. Yıllardır varlığını sürdüren ve büyüme eğilimi göstermeyen kitleler ise çoğunlukla konjenital veya benign karakterdedir [22].

Detaylı fizik muayene sonucunda orta hat lezyonları genellikle benign olup (tiroglossal dukt kisti, dermoid kist), özellikle yetişkinlerde lateral boyun lezyonları ise aksi ispat edilene kadar malign neoplastik kitleler olarak kabul edilmelidir. Süperior lateral boyun kitleleri genelde baş ve boyunun metastatik kitleleridir. Bu bölgeye metastaz yapan tümörler genellikle primer odakları tonsil, dil kökü ve nazofarenksdir. İnférieur lateral bölgede ve özellikle supraklaviküler bölgede var olan kitleler ise genellikle mide ve meme kaynaklıdır. Ancak supraklaviküler bölgedeki kitlelerin lenfoma kaynaklı olabileceği ihtimalide dikkat edilmesi gereken bir ayrıntıdır [22].

1.3.5 Baş ve Boyun Kanserinin Boyun Kitleleri İçin Laboratuvar Çalışmaları

Baş ve boyun kanserlerinin tanısında laboratuvar çalışmalarının çok az yeri vardır. Tümörün lokalizasyonu ve uzanımı açısından ise diagnostik laboratuvar çalışmalarının önemli bir yeri bulunmaktadır. Endoskopik muayenenin baş ve boyun kanserlerinin araştırılmasında yeri büyüktür. Çünkü var olan bir tümörün kaynağı, üst solunum-sindirim sistemi kaynaklı ise ancak endoskopik muayene ile belirlenebilir. Fakat kesin bir tanı konulması için histopatolojik inceleme gereklidir [22].

1.3.6 Baş ve Boyun Kanserinde Tanı

Sebebi belirlenemeyen boyun kitlelerinde, tanı için ilk adım ince iğne aspirasyon biyopsisi olmalıdır. Orijini belirlenen boyun kitlelerinin tanısında kullanılacak olan yöntem ise punch biyopsi veya insizyonel biyopsi olmalıdır [22].

1.3.7 Baş ve Boyun Kanserinde Tedavi ve Sağkalım Oranı

Hastalık evresine ve anatomik alt bölgesine göre birincil tedavi yöntemi de değişiklik göstermektedir. Erken evrede tanımlanan kanserlerin çoğunluğu için cerrahi rezeksiyon, tedavinin dönüm noktasıdır [23]. Bununla beraber, dil tabanı, bademcikler, ağız yüzeyi gibi bazı anatomik bölgelerde ve aynı zamanda yerel olarak ilerlemiş tüm kanserlerde ya tek başına ya da cerrahi müdahaleyle beraber radyoterapi uygulanmaktadır. Bazı durumlarda radyoterapiye ek olarak kemoterapi de kullanılabilir [24].

Oral kavite ve orofarengeal kanserlerinde erken evre (Evre I-II) tedavi cerrahi veya radyoterapi şeklinde olabilirken, ileri evre (Evre III-IV) kanserlerde ise en iyi yöntem cerrahi ve sonrasında radyoterapidir. Tümörün rezeke edilemeyeceği durumlarda ise yöntem kemo-radyoterapi şeklinde olmaktadır. Bu tümörlerde 5 yıllık sağkalım oranı Evre I' de %60-80 arasında iken Evre IV' de %25' e düşmektedir [25, 26].

Erken evre hipofarenks kanserlerinde radyoterapi veya cerrahi kullanılabilirken, daha ileri evreli hipofarenks kanserleri için cerrahi sonrası radyoterapiye ihtiyaç duyulabilir. Hipofarenks kanserlerinde lokorejyonel metastazla sık karşılaşmakta olup tedavide boyun da göz önünde bulundurulmalıdır (boyun diseksiyonu ve boyuna radyoterapi). Çünkü bu tür tümörlerde mortalite genelde boyun nüksü ile beraber gelmektedir. Hipofarenks kanserlerinde 5 yıllık sağkalım oranı Evre I' de %70 civarında olurken, Evre IV' de %4'te kalmaktadır [27].

Erken evre larenks kanserleri cerrahi veya radyoterapi ile tedavi mümkünken daha ileri evreli tümörler cerrahi + radyoterapi veya kemoradyoterapi ile tedavi edilebilirler. Larenks kanserinin 5 yıllık sağkalım oranı Evre I' de %90' nın üzerinde olup, Evre IV' de ise %40'a düşmektedir [28].

Erken evre dudak kanserlerinde tümörlerde cerrahi ve radyoterapi eşit oranda etkili olup, ileri evreli tümörlerde cerrahi sonrası radyoterapi uygun görülmektedir. Dudak kanserlerinde 5 yıllık sağkalım oranı erken evrede %90 civarında olurken [29], ileri evrede bu oran %40' a kadar düşmektedir [30].

Erken evre nazofarenks kanserlerinde ise tedavi yöntemi biraz farklıdır. Erken evre nazofarenks kanserleri boyuna metastaz yapmış olsa dahi tedavi seçeneği radyoterapi olup, ileri evre nazofarenks kanserlerinde ise tedavi kemoradyoterapidir. Nazofarenks kanserlerinin tüm evrelerinde 5 yıllık sağkalım oranı %50-76 arasında farklılık göstermektedir [31].

ABD'de ve Avrupa'da ağız boşluğu ve farinks kanserine tanı konulmasından sonra 5 yıllık görelî sağkalım oranı %40'a yakındır. Ayrıca, ağız boşluğu malinitelerinde, hipofarinks malinitelerine göre hastalığın prognozu kadınlarda erkeklere oranla genellikle daha iyidir. Avrupa'da 5 yıllık sağkalım oranı 1983 yılından 1994'e kadar değişmemiş ve bu da belirgin bir ilerlemenin kaydedilemediğini düşündürmektedir [32].

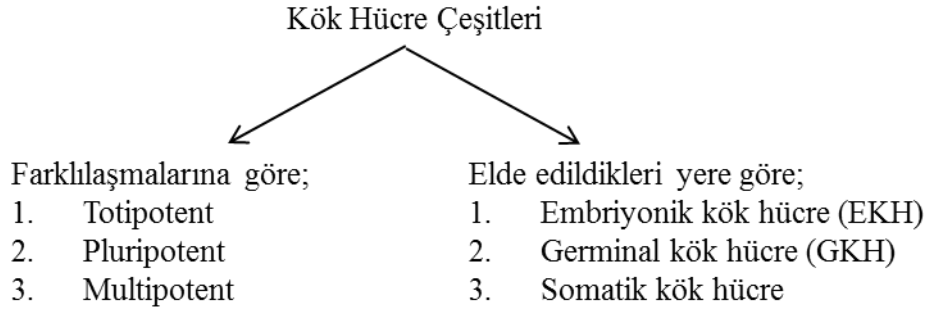
1.4 Kök Hücre

Kök hücre kendini yenileme özelliğiyle, organizmanın ömrü boyunca bir hücrenin kendi kopyasını yaparak çoğalması ve ihtiyaç duyulduğunda organ ve dokuya özgü öncü hücrelere dönüşebilmesidir [31, 32].

Normal Vücut Hücresi	Kök Hücre
Sınırlı sayıda çoğalabilir ya da hiç çoğalmazlar.	Neredeyse sonsuza dek bölünebilir ve çoğalabilirler.
Bir görevi yapmak üzere özelleşmişlerdir.	Özelleşmemiş (farklılaşmamış) hücrelerdir.
Bir başka hücre tipine dönüşemezler.	Özelleşmiş (farklılaşmış) hücrelere dönüşebilirler.

Tablo.1: Normal Vücut Hücresi ve Kök Hücre Arasındaki Farklar

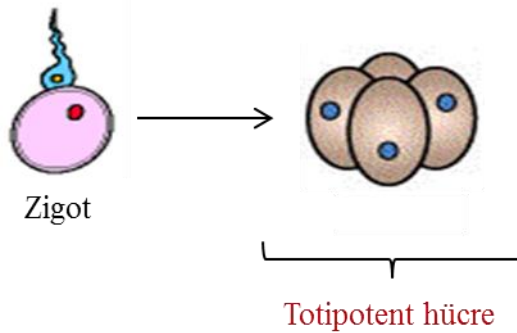
Kök hücreler farklılaşmalarına, özelliklerine ve elde edildikleri yere göre gruplandırılabilir.



Şekil.1: Kök Hücrelerin Gruplandırılması

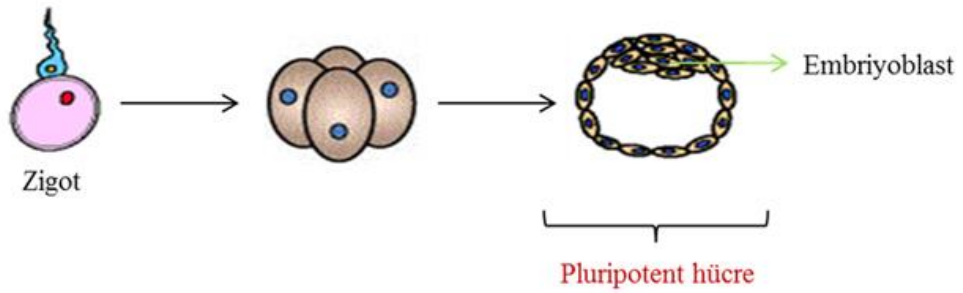
1.4.1 Farklılaşma kaynaklarına göre;

1.4.1.2 Totipotent: Olgun dişi üreme hücresi oositin, olgun erkek üreme hücresi spermatozoon ile döllenmesinden sonra zigot adını verilen yeni bir hücre oluşur. Zigot, tek başına yeni bir organizmayı oluşturabilecek, hücresel içerik ve genetik bilgiye sahiptir. Blastomer sayısı 16'ya ulaştığında zigot morula diye adlandırılır. Zigotun mitoz bölünmeleri sonucunda meydana gelen ve blastomer adını verilen erken dönem hücrelerinin, her şeyi yapabilen anlamına gelen totipotent gelişim özelliği vardır. Blastomerlerin bu özelliklerini 8 hücreli evreye kadar korudukları ve daha sonra farklılaşma göstererek totipotent özelliklerini kaybedip pluripotent hücrelere dönüştükleri kabul edilmektedir [33].



Şekil.2: Totipotent Hücre

1.4.1.3 Pluripotent: Döllenmeden sonraki 5. günden itibaren oluşmaya başlayan hücreler blastokist adı verilen küresel şekli meydana getirir. Blastokistde hücrel farklılaşma sonucu küreyi dışarıdan saran hücelere trofoblast, içerde kalan hücelere embriyoblast denir. Bu iç embriyoblast hüceleri vücuttaki tüm hücelere dönüşebilecek fonksiyona sahip olup, tek başlarına bütün organizmayı oluşturacak güçleri yoktur. Bu tür hücelere pluripotent hücre adı verilir [33].



Şekil.3: Pluripotent Hücre

1.4.1.4 Multipotent: Embriyonik gelişimin ileri safhalarında ait hücelerdir. Erişkin kök hücelerine ve özelleşmiş hücelere farklılaşabilirler. Erişkin kök hüceler, buldukları hücre doku tipine göre hücre üretirler. Multipotent hüceler, doğumla beraber kordon kanında, kemik iliği ve yağ dokusunda bulunurlar [33].

1.4.2 Elde edildikleri yere göre;

1.4.2.1. Embriyonik Kök Hücre (EKH): Blastokistin, embriyoblastlardan elde edilir. Bu hüceler uygun şartlarda kültüre edildiğinde farklılaşmadan çoğalabildikleri gibi, mevcut ortam değiştirildiğinde hücelerinde farklılaşması sağlanabilir. Embriyonik kök hücelerin farklılaşma özelliklerinden faydalanılarak doku hasarlarında hızlı iyileşme ya da sinir hücresi gibi hasar meydana geldikten sonra onarılması mümkün olmayan hücelere farklılaşarak yara tamirinde kullanılması, son dönemdeki önemli araştırma konularından biridir [34].

Embriyonik kök hüceler, hücre yüzey markırı olarak Oct-4, TRA1-60, TRA1-81 ve SSEA-1 eksprese ederler. İnsan embriyonik kök hüceleri, fare embriyonik fibroblast hüceleri ve LIF (Leukemia Inhibitory Factor) varlığında bu özelliklerini korumaktadır. EKH'lerin farklılaşmadan kendilerini yenileyebilmeleri

için birçok faktörün dengede olması gerekmektedir [35]. Pluripotent embriyonik kök hücre fenotipinin devamlılığında Oct-4, Nanog ve Sox-2 önemli transkripsiyon faktörleridir [36, 37].

1.4.2.1.1 Oct-4 (Octamer-binding transcription factor 4): Oct-4 Octamer transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesi olup, pluripotent hücre yapısının sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynar. Blastomerler ve EKH'lerdeki gibi Oct-4+ hücrelerde Oct-4 yokluğu, hücrelerin kendiliğinde trofoblasta dönüşmesine sebep olur. Oct-4 varlığında ise, EKH'ler için potansiyel bir pluripotent ve farklılaşma durumu oluşur.

Octamer ailesinin Oct-1 ve Oct-6 gibi diğer çeşitli üyeleri indüksiyon aşamasında başarısız oldukları için bu basamakta da Oct-4'ün özel bir rolü olduğu görülmektedir [38].

1.4.2.1.2 Sox-2 (SRY (sex determining region Y)-box 2): Sox ailesindeki genler Oct-4'e benzer olarak pluripotent hücre özelliği göstermektedir. Oct-4'ün multipotent ve unipotent kök hücrelerle de ilişkisi olmasına rağmen, Sox-2 sadece pluripotent hücrelerde ekspres olur. Sox-2 Yamanaka, Jaenisch, Thomson ve arkadaşları tarafından kullanılan ilk indüksiyon genidir [39].

1.4.2.1.3 KLF-4 (Kruppel-Like Factor 4): KLF ailesi genlerinden olan KLF-4 ilk olarak Yamanaka ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Jaenisch ve arkadaşları tarafından fare IPS hücreleri oluşumunda bir faktör olduğu doğrulanmıştır. Ardından Yamanaka ve arkadaşları insan IPS hücreleri oluşumunda bir faktör olduğunu göstermişlerdir. Ancak Thomson ve arkadaşları KLF-4'ün insan IPS hücresi oluşumu için gereksiz olduğunu ve aslında bunu engellediğini yayınlamışlardır. KLF-2 ve KLF-4 IPS hücresi oluşturma yeteneğindedir ve verimliliği düşürmesinde rağmen ilgili KLF-1 ve KLF-5 genleride bu yeteneğe sahiptir [37, 40].

1.4.2.1.4 Nanog: EKH'lerde, Nanog, Oct3/4 ve Sox-2 ile birlikte pluripotensiyi artırmak için gereklidir. Bu yüzden şaşırtıcı bir şekilde Yamanaka ve arkadaşlarının Nanogun indüksiyon için gereksiz olduğunu belirtmesine rağmen

Thomson ve arkadaşları Nanogun IPS hücresi geliştirmede en önemli faktörlerden biri olduğunu göstermişlerdir [37, 41].

1.4.2.2 Germinal Kök Hücre (GKH): Embriyonun germinal tabakasından köken alıp, farklılaşarak belli organları meydana getirirler.

1.4.2.3 Somatik Kök Hücre: Kendini yenileyip, köken aldığı organın hücresine farklılaşabilen hücrelerdir. Erişkin kök hücreler doku ve organlarda kendilerine ait özel bölgelerde bulunurlar. Buldukları bölgede hücrelerin hasar görmesi durumunda, hasarın şiddetine göre çoğalıp, farklılaşarak hasarlı doku ve organın tamirinde görev yaparlar [42].

1.5 Kanser Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri de (KKH), embriyolojik kök hücrelerde (EKH) bulunan özelliklerin çoğunu göstermektedir. Aralarındaki farklılığın sebebi ise embriyolojik kök hücreler başka hücelere farklılaşabilirken, KKH'lerinden yalnızca kanser hücreleri oluşmaktadır. KKH'lerinde kendini yenileme özelliği vardır. EKH'lerde olduğu gibi bölünme simetrik ve asimetrik şekildedir. Bu özelliklerinden dolayı "Kanser Başlangıç Hücreleri (KBH)" olarak adlandırılırlar. KBH'lerinin küçük bir kısmı normal kök hücre fenotipik özellikleri gösterirken, diğerleri farklılaşmadan KKH özelliklerini sürdürürler [43, 44].

Kanserin gelişim süresinde tümörü oluşturan hücrelerin hiyerarşisi vurgulanır. Hiyerarşi terimi, hücreler heterojeniteyi kastetmektedir. Bununla beraber heterojenite, tümörü çevreleyen invaziv endotelial, hematopoetik hücre veya diğer kanser olmayan hücreler anlamına gelmektedir. Burada bahsedilen heterojenite genellikle tek tümördeki kanser hücrelerinin farklılığını ifade etmektedir. Bağışıklığı zayıflatılmış farelerde yapılan çalışmalar tümörde, sadece belli grup hücrelerin tümör büyümesini sağlarken, diğer hücrelerin böyle bir etkisinin olmadığını ve KKH'lerinin, kendi kendini yenileme ve farklılaşma olmak üzere iki temel yeteneği olduğunu göstermiştir [45, 46].

Tümörler farklı KKH popülasyonlarından kökenlenebilir. Bu farklılığın sebebi, farklılaşmış kanser hücrelerinin ya farklı kök hücrelerinden oluşması ya da

farklı mutasyonlardan olabilir. Meydana gelen bu farklılıklar, hücrelerin moleküler profilleri ile aydınlatılabilir. Bu şekilde kanserin önlenmesi ve uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından hedefin belirlenmesini kolaylaştırır [42, 47].

Tümörlerde erken kök hücrelerde birçok farklı fenotip geliştiği araştırılmış ve bu farklılığında metastatik potansiyeli arttırdığı düşünülmüştür [48, 49].

1.5.1 Kanser Oluşumunda Sinyal İleti Yolakları

Kanser ile ilişkili birçok ileti sistemi, kök hücrelerin farklılaşmasını ve kendi kendilerini yenilemelerini düzenlemektedir. İleti sisteminde oluşabilecek anormallikler, KKH'sinin gelişimi ve proliferasyonunu arttırabilmektedir [48].

Bu süreçte Leukaemia İnhibitory Factor (LIF), Notch, Phospatase and Tensin Homologue Deleted Form Chorosome 10 (PTEN), Wnt/ β katenin, Sonic Hedgehog (SHH) gibi sinyal ileti yolakları etkilidir ve bu yolakların görevlerinin anlaşılması ile tümör oluşumunun anlaşılmasında önemli bir basamak olmuştur [48, 50, 51].

1.5.2 Kanser Kök Hücrelerinin Kanser Oluşumundaki Fonksiyonları

Kanserin gelişimi sırasında, kanser hücrelerinde meydana gelen genetik veya epigenetik değişiklikler, epitelial mezenkimal geçiş döneminde tümör hücrelerinin göç yeteneği kazanmaları, diğer organlara metastaz yapabilmeleri için invaziv özellik kazanmaları gerektiğini göstermektedir. Tümör gelişiminde gözlenen KKH modeli, tümürlü dokudan izole edilen KKH'lerinin in vivo ve exviro olarak değişime uğramış kanserli hücre kitlesi oluşturduğu ve bu kitlelerin tümör veya lösemi oluşumunda etkili olduğunun gösterilmesiyle desteklenmiştir [52, 53].

1.5.3 Kanser Kök Hücre Markırlarının Araştırılması

İlk kez 1997'de Akut Myeloid Lösemide (AML) KKH'leri belirlenmiştir. Çalışmada AML hastalığına sahip kişilerden, lösemik hücreler izole edilmiştir. İzole edilen hücreler, zar antijenik özelliklerine göre gruplandırılmıştır. CD34+ ve CD38- yüzey antijenine sahip hücreler, bağıışıklıkları zayıflatılmış farelere transfekte edilmiş ve farelerde neoplazma benzeri tümörlerin oluştuğu gözlenmiştir. Aynı şekilde,

farelere CD34+ ve CD38- dışında farklı antijenik özelliğe sahip lösemi hücreleri transfer edildiğinde tümör oluşumu gözlenmemiştir [54]. Baş ve boyun kanserlerinde ise ilk kez 2007 yılında KKH'lerinin var olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada CD44+ hücrelerin baş ve boyun kanserlerinde, KKH'lerinin bir alt grubu olduğu tanımlanmıştır. Fare xenografi modeli üzerinde yapılan çalışmada, CD44+ olan hücreler farelere transfekte edilip, tümör oluşumu başlattığını gözlemlemiştir. CD44- olan daha fazla sayıda hücre farelere verilmiş ve tümör oluşumu görülmemiştir [55]. Aynı grup son dönemde yapılan çalışmalarda baş ve boyun KKH'lerine spesifik Aldehit dehidrogenaz (ALDH) belirtecini tanımlamışlardır. Çalışmayı yapan grup, düşük ve yüksek ALDH oranına sahip hücreleri izole etmişler ve yüksek ALDH aktivitesine sahip hücrelerin çok daha tümörjenik olduğunu belirlemişlerdir [56, 57].

ALDH aktivitesinin yüksek olduğu hücrelerde, CD44 antijeninin + ve - olduğu durumlar karşılaştırılmıştır. Hücrelerin çoğunda CD44 aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun tersine, CD44+ hücrelerde ALDH aktivitesine bakıldığında, sadece %10-25 lik bir kısmın yüksek ALDH aktivitesi göstermiştir. Bu bilgiler sonucunda, yüksek ALDH aktivitesine sahip çoğu hücrenin aynı zamanda CD44+ olduğu ve dolayısıyla ALDH'ın KKH'si için daha spesifik bir belirteç olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, CD44+ ve ALDH aktivitesinin birlikteliği, baş-boyun KKH'lerinin tanımlanmasında önemli bir alt grubu oluşturmaktadır [56, 57].

1.5.4 Dokuya Özgü Kök Hücre Yüzey Markırları

Dokulara spesifik kök hücre markırları kullanılarak, kanser tiplerine göre kök hücreleri belirlemek mümkündür[52, 53].

Kanser Tipi	Kanser Tipine Göre Hücre Yüzey Markırları	Kaynaklar
Akut Miyeloid Lösemi	CD34+ CD38-	[53]
Baş ve Boyun Kanseri	CD44+ ALDH	[55, 58]
Dalak Kanseri	CD44+ CD24+ ESA+	[59]
Glioblastom Kanseri	CD133+	[60]

Kolon Kanseri	ESA+ CD44+	[61]
Kolon Kanseri	ESA+ CD166+	[61]
Kolon Kanseri	CD133+	[62]
Medülloblastom	CD133+	[60]
Melanom	CD20+	[42]
Meme Kanseri	CD44+ CD24-	[63]
Multipl Kanseri	CD138	[42]
Over Kanseri	CD44+	[64]
Prostat Kanseri	CD133+ CD44+	[53]

Tablo.2: Kanser Kök Hücre markırları

Kök Hücre Yüzey Markırları	Tanımı
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
CD24	Heat stable antigen, luminal
CD29	Beta 1 integrin
CD31	Endotelial marker
CD44	Hyalurinic acid receptor
CD45	Hematopoetik marker
CD49F	Alfa 6 integrin
CD133	Prominin-1
CD140a	Stromal marker
CD166	Aktif lökosit adezyon molekülü (ALCAM)
CD201	PROCR, protein C reseptör
CD326	Epithelial surface antigen (ESA), EpCam
Nestin	Intermediate filament
Ter119	Hematopoetik marker

Tablo.3: Kök hücre yüzey markırlarının tanımı [65].

2. MATERYAL ve METODLAR

2.1 Hücre Kültürü

Çalışmada UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B (A-Primer tümör hücre hattı ve B-Metastatik tümör hücre hattı) Baş ve Boyun Kanseri hücre hatları kullanıldı. Hücreler Prof. Grenman'ın nazik katkılarıyla Turku Üniversitesi Otorinolaringoloji - Tıbbi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Bölümü, Finlandiya'dan sağlandı.

2.1.1 Kullanılan Hücrelerin Genel Özellikleri

UT: Universty of Turku

SCC: Squamous Cell Carcinoma

A: Primer tümör

B: Metastatik tümör

UT-SCC-74A hücre hattı, 31 yaşındaki bir erkeğin dilinin sağ marjinde G1-G2 evresinde, skuamoz hücreli karsinom olan hücrelerdir.

UT-SCC-74B hücre hattı aynı hastanın ileri evre boyun metastazından elde edilmiş hücrelerdir.

Bu hücre hatları %10 FBS (Fetal Bovine Serum) katkılı DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde, kullanım kılavuzuna uygun olarak kültüre edildi.

Kullanılan besiyeri: 500 ml DMEM (Lonza / Lot No: 4MB177 / Cat No: BE12-604F) /High Glucose mediumun içerisine;

50 ml FBS (Hyclone / Cat No: SV30160.03),

5 ml penicilin /streptomycin (Hyclone / Cat No: SV30010),

4 ml L-Glutamine (Hyclone / Cat No: SH3003.01),

0.5 ml Plasmocin (Invitrogen / ant-mmp)

2.1. 2 Stoktan Hücre Ekimi

-196° C’de Azot Tankında bulunan hücreler, 37° C’de benmaride 1 – 2 dakikada eritildi. Eritilen hücreler 15 ml falkon içerisine alındı. DMEM ile karıştırılan hücreler 3 dakika 1100 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet (hücre) DMEM’de çözüldü. Hücre yoğunluğuna göre uygun olan flaska ekilip, 37° C’de % 5 CO₂’lik inkübatörde kültüre edildi.

2.1. 3 Hücre Pasajlama

Kültüre edildikten hücreler %70 – 80 doluluk oranına ulaştığında, hücreler yüzey alanı daha büyük flasklara pasajlandı. Pasajlama işlemi şu şekilde yapıldı.

- Flaskdaki mevcut medium, flaskdan uzaklaştırıldı.
- Hücreler PBS (Phosphate Buffered Saline) (Lonza / Cat No: #51226) ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.
- Flask yüzeyini kaplayacak şekilde hücreler Tripsin (Biochrom / Cat No: #L2153) ile muamele edildi. Tripsinin aktif hale gelmesi için hücreler 37° C’de % 5 CO₂’lik inkübatörde 5 dakika inkübe edildi.
- Flask yüzeyinden ayrılan hücreler, falkon içerisinde bulunan DMEM ile karıştırıldı.
- 3 dakika 1100 rpm’de santrifüj edildi.
- Tripsin içeren süpernatant falkondan uzaklaştırıldı.
- Pellet (hücre) DMEM içinde homojen bir şekilde çözülerek yeni bir flaska ekilip, 37° C’de % 5 CO₂’lik inkübatörde kültüre edildi.

2.1. 3 Hücre Sayımı

Çalışmada kullanılacak olan hücre sayısının belirlenmesi için hücre sayımı yapıldı. Hücre sayım işlemleri şu şekilde yapıldı.

- Flasklarda kültüre edilen hücrelerin üzerindeki medium çekildi.
- Hücreler PBS’le 2 kez yıkandı.

- Flask yüzeyini kaplayacak şekilde hücreler Tripsin ile muamele edildi. Tripsinin aktif hale gelmesi için hücreler 37° C'de % 5 CO₂'lik inkübatörde 5 dakika inkübe edildi.
- Flask yüzeyinden ayrılan hücreler, falkon içerisinde bulunan DMEM ile karıştırıldı.
- 3 dakika 1100 rpm'de santrifüj edildi.
- Tripsin içeren süpernatant falkondan uzaklaştırıldı.
- Pellet (hücre) DMEM içerisinde çözündürüldü.
- Hücre sayımı 1:1 oranda yapıldı (10 ul Tripan Blue :10 ul Hücre).
- Tripan Blue ile muamele edilen hücreler hücre sayım cihazının (BioRad Cell Counter) slaytlarına yüklenerek sayım yapıldı.

2.1. 4 Hücrelerin Stoğa Alınması

Çalışmada kullanılan hücreler işlemler bittiğinde daha sonradan kullanılmak üzere stoğa alındı. Stoğa alma işlemleri şu şekilde yapıldı.

- Tripsin muamelesi ile flask yüzeyinden ayrılan hücreler, DMEM içeren falkonlara alındı.
- 3 dakika 1100 rpm'de santrifüj edildi.
- Stoğa alınan hücrelerde Tripsinin tamamen ortamdan uzaklaşması için santrifüj aşaması 2 kez yapıldı.
- Pellet (hücre) %10 DMSO içeren FBS içerisinde çözüldü.
- FBS içerisinde bulunan hücreler, 1 ml olacak şekilde Cryovial tüplere aktarıldı.
- Cryovial tüpler BiCell kutularına konularak -80° C olan buzdolabına kaldırıldı.
- -80° C'de 1 gece kalan hücreler ertesi gün -196° C olan Azot tankına koyuldu.

2.2 Kök Hücre İzolasyonu

Çalışmada kullanılan UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarından ALDH yüzey markırı kulanılarak Kanser Kök Hücre (KKH) ve Kanser Hücre (KH) izole edildi. Validasyon amacıyla kök hücre izolasyonu 2 şekilde yapıldı.

2.2.1 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Hücrelerin FACS İşlemi İçin Hazırlanması

- Flasklarda kültüre edilen hücrelerin üzerindeki medium çekildi.
- Hücreler PBS'le 2 kez yıkandı.
- Flask yüzeyini kaplayacak şekilde hücreler Tripsin ile muamele edildi. Tripsinin aktif hale gelmesi için hücreler 37° C'de % 5 CO₂'lik inkübatörde 5 dakika inkübe edildi.
- Flask yüzeyinden ayrılan hücreler, falkon içerisinde bulunan DMEM ile karıştırıldı.
- 3 dakika 1100 rpm'de santrifüj edildi.
- Tripsin içeren süpernatant falkondan uzaklaştırıldı.
- Pellet (hücre) PBS içerisinde çözdürüldü.
- Hücre sayımı yapıldı.
- Sayım sonrası hücreler 400.000 olacak şekilde falkonlara bölündü.
- 400.000 hücre 1 ml PBS içerisinde çözdürüldü.
- PBS + Hücre karışımına 1 µl 1. Antikor (abcam / Ms mAb To ALDH1A1 / ab105920 / Lot: GR120645 – 1) eklenip, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 15 dakika sonra, 1 µl 2. Antikor eklendi.
- 2. Antikor (Goat pAb to Ms IgG / PE / ab97024 / Lot: GR87493 – 11) işaretli olduğu için karanlıkta 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 15 dakika sonrasında santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atıldı.
- Pellet (hücre) 1 ml PBS'de çözüldü.

- Pipetaj ile hücreler çözdürüldü.
- Santrifüj aşaması 2 kez yapıldı.

2.2. 2 Magnetic Beads

Goat Anti – Mouse Ig Magnetic Beads Kullanılarak Kök Hücre İzolasyonu

- Flasklarda kültüre edilen hücrelerin üzerindeki medium çekildi.
- Hücreler PBS'le 2 kez yıkandı.
- Flask yüzeyini kaplayacak şekilde hücreler Tripsin ile muamele edildi. Tripsinin aktif hale gelmesi için hücreler 37° C'de % 5 CO₂'lik inkübatörde 5 dakika inkübe edildi.
- Flask yüzeyinden ayrılan hücreler, falkon içerisinde bulunan DMEM ile karıştırıldı.
- 3 dakika 1100 rpm'de santrifüj edildi.
- Tripsin içeren süpernatant falkondan uzaklaştırıldı.
- Pellet (hücre) PBS içerisinde çözdürüldü.
- Hücre sayımı yapıldı.
- Hücre sayınıza göre Magnetic Beads kullanıldı.
- 1 µl Magnetic Beads içindeki tanecik sayısı $3,65 \times 10^7$
- Protokole göre 1 hücreye 5 Magnetic Beads bağlanacak şekilde hesaplama yapıldı.

Gerekli hesaplama işlemlerini tamamladıktan sonra Magnetic Beads' ler yıkandı.

- 1,5'luk ependorf tüp içerisine hesaplanan miktarda beads' ler koyulup ve üzerine 1 ml steril PBS eklendi. Yavaş bir şekilde alt – üst yaparak karıştırıldı.
- PBS ve Magnetic Beads'lerin birbirinden ayrılması için oluşan karışım metal (demir) rack üzerine yerleştirildi.
- 2–3 dakika içinde Madnetic Beads'ler ependorfun metal rack tarafında toplandı.
- Magnetic Beads'lere zarar vermeden PBS yavaş yavaş ependorfdan çekildi.

- Magnetic Beads'leri PBS ile yıkama işlemi 3 kez yapıldı.
- Yıkamış olan Magnetic Beads'lerin üzerine 20 µl PBS eklendi.
- 20 µl'lik PBS + Magnetic Beads karışımına 1. Antikor (abcam / Ms mAb To ALDH1A1 / ab105920 / Lot: GR120645 – 1) eklendi.
- 1. Antikor eklendikten sonra, Magnetic Beads'leri shakerda 1 saat +4 °C'de inkübe ediniz.
- İnkübasyon sonrası ependorf metal rack üzerine yerleştirildi. PBS ve Magnetic Beads'lerin birbirinden ayrılması sağlandı.
- İlk basamakta yapılan PBS ile yıkama işleminin aynısını bu kez 100 µl PBS kullanarak 3 kez yapıldı.
- Yıkamanın ardından tüp içerisindeki 100 µl PBS'i çekiniz.
- Daha önce sayılan hücreler 1ml PBS içerisinde çözdürülüp, Magnetic Beads içeren ependofa aktarıldı. Hücre karışımının homojen olmasına dikkat edildi.
- Hücre + Magnetic Beads karışımını shakerda 30 dakika +4 °C'de inkübe edildi.
- Magnetic Beads içeren hücreler daha önce ki PBS ile yıkama aşmalarında olduğu gibi birbirinden ayrıldı.
- 5 dakika sonunda hücreleri içeren ependorf metal rackdan çekilmeden Magnetic Beads dışında kalan süpernatant boş bir ependorfa aktarıldı.
- Yeni ependorfa aktarılan hücreler negatif (-) yani 1. Antikor (ALDH) bağlanmayan hücrelerdi.
- Metal rack üzerinde bulunan ependorfun duvarına yapışmış olan hücreler ise pozitif (+) yani 1. Antikor (ALDH) ile işaretlenmiş hücrelerdi.

2.3 Kanser Kök Hücrelerinin ve Kanser Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

ALDH markırı kullanılarak, UT-SCC-74A / UT-SCC-74B hücrelerinden izolasyonu yapılan ALDH+ Kanser Kök Hücreleri (KKH) ve ALDH- Kanser Hücreleri (KH), Kanser Kök Hücre Mediumu (KKHM) kullanılarak kültüre edildi.

Kullanılan besiyeri: DMEM içerisine;

B27 %2 (B-27 Supplement (50x) / Gibco / Cat No: 17504-044)

N2 %1 (N-2 Supplement (100x) / Gibco / Cat No: 17504-048)

EGF 100 ng/ml (Abcam / Cat No: ab179628)

FGF 20 ng/ml (Abcam / Cat No: ab9596)

Penicillin/Streptomycin %1

Çalışmada KKHM her seferinde 50 ml'lik falkonlarda taze olarak hazırlandı.

50 ml KKHM için; 1 ml B27

500 µl N2

20 µl EGF

50 µl FGF

500 µl Penicillin/Streptomycin kullanıldı.

İzole edilen hücrelerin plate yüzeyine yapışmaması için, ekim yapılacak yüzeyler agaroz ile kaplandı.

Agarozun hazırlanması: Distile su içerisine;

Agaroz %2

NaCl %0,9 konularak hazırlandı.

Çalışmada kullanılan agaroz 1 lt distile su ile hazırlandı. 1 lt distile su içerisine, 20 gr Agaroz + 9 gr Nacl eklendi. Otoklav yapıldı. Otoklav sonrası, kullanılacak olan plate yüzeyleri agaroz ile kaplandı. Plate içerisindeki agaroz oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Donmuş olan agaroz kaplı planelere KKHM kullanılarak, KKH ve KH'leri ekildi.

2.4 Kanser Kök Hücre Validasyonu

2.4.1 Küre Oluşumu Deneyi

ALDH markırı kullanılarak, UT-SCC-74A / UT-SCC-74B hücrelerinden izole edilen ALDH+ KKH'leri ve ALDH- KH'leri eşit koşullarda kültüre edildi. İnkübasyon koşulları; hücreler agaroz kaplı plateler kullanılarak, KKH'leri ile 37° C'de % 5 CO₂'lik etüv içerisinde inkübe edildi. 1 hafta süresince takip edilen hücrelerden KKH olanlar küre oluştururken KH'lerinde böyle bir durum gözlenmedi.

2.4.2 İmmünofloresan Boyama

UT-SCC-74A / UT-SCC-74B hücrelerinden izole edilen KKH'leri ve KH'lerine ALDH yüzey markırı kullanılarak immünofloresan boyama yapıldı. Boyama şu şekilde yapıldı.

- 6'lık well plate içerisinde kültüre edilen KKH ve KH 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı.
- Hücreler 1 ml PBS ile yıkandı.
- Santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- %4'lük Paraformaldehit/PBS solüsyonu ile hücreler fikse edildi.
- 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Hücreler 750 µl PBS ile 3 kez yıkandı.
- Santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücrelere 500 µl Blocking solüsyon eklenip, 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

Blocking solüsyon hazırlanışı; BSA %10 (Total hacmin %1' i olacak şekilde)

PBS – TX %0,3

- Santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet (hücre) üzerine 300 µl PBS eklendi.
- PBS + Hücre karışımına 1 µl 1. Antikor (abcam / Ms mAb To ALDH1A1 / ab105920 / Lot: GR120645 – 1) eklendi.

- Hücreler 4° C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı.
- Santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücreler 750 µl PBS – TX (%0,3) ile yıkandı.
- Santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücreler 750 µl PBS ile yıkandı.
- Santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet (hücre) üzerine 1 ml PBS eklendi.
- PBS + Hücre karışımına 1 µl 2. Antikor (Goat pAb to Ms IgG / PE / ab97024 / Lot: GR87493 – 11)
- Hücreler 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
- Santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1 ml PBS ile yıkandı.
- Santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücrelere DAPI (1:500 DAPI + PBS) ile muamele eklenip, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1 ml PBS ile 3 kez yıkandı.

2.4.3 Kök Hücre markırları ile KKH’lerinin Validasyonu

2.4.3.1 KKH ve KH’ lerinden RNA İzolasyonu

- Agaroz kaplı plateler üzerine yüzer durumda bulunan hücreler 1,5 ml’lik ependorfa alındı.
- Santrifüj yapılarak KHM uzaklaştırıldı.
- Pellet (hücre) üzerine 800 µl Tripure (Roche / Lot No: 93936020) eklendi.

- Hücrelerin homojenize olması için 2 dakika alt üst ederek karıştırıldı.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- 200 µl Cloroform (Merck, Cat. No: 102431) eklenip, ependorflar renk değişimi olana kadar alt üst edildi.
- 12.000 rpm'de 15 dakika 4° C'de santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrası üstteki şeffaf kısım yeni bir ependorfa aktarıldı.
- 500 µl 2-propanol (Merck, Cat. No: 100995) eklendi. Alt üst edilerek karıştırıldı.
- 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- 12.000 rpm'de 10 dakika 4° C'de santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atıldı.
- Pellet (hücre) üzerine 1 ml % 75'lik Etanol (Merck, Cat. No: 100993) eklenerek yavaşça alt üst edildi.
- 12.000 rpm'de 5 dakika 4° C'de santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atıldı.
- Etanolün tamamen uzaklaşması için ependorfun ağzı açık olarak 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- 40 µl PCR-grade DEPC (Invitrogen, Cat. No: 46-224) eklenip, pipetaj yapıldı.
- Elde edilen RNA -85° C'de mufahaza edildi.

2.4.3.2 İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi

- Thermo cDNA sentez kiti (Thermo / #K1622 / Lot No: 00247104) kullanılarak, RNA'dan cDNA sentezi yapıldı.
- Tüm RNA'lar bir sabit bir sayıya eşitlendi (0,5 µg – 1 µg – 2 µg gibi).
- Ependorfa 1 µl Oligo (DT) primer konuldu.
- Sabit sayıya eşitlenen miktarda RNA eklendi.
- RNA + Su toplamı 11 µl olacak şekilde su eklendi.
- Mix Hazırlanışı; 5X Reaction Buffer 4 µl
Ribolock™ RNase Inhibitor 1 µl
10mM DNTP mix 2 µl

RevertAid™ M-MulV 1 µl

- Hazırlanan Mix + Oligo (Dt) + RNA + Su karıştırıldı.
- Total volüm 20 µl oldu.
- 42° C’de 60 dakika, 70° C’de 5 dakika inkübe edildi.
- Sentezlenen cDNA’lar -70° C’de muhafaza edildi.

2.4.3.3 OCT-4, SOX-2 ve KLF-4 Kullanılarak KKH ve KH Arasındaki

Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Kök hücre markırı olarak bilinen genler ile KKH ve KH arasındaki ekspresyon farklılıkları belirlendi. Tablo.4’deki primerler kullanılarak Tablo.6’daki PCR şartlarında qRT-PCR yapıldı.

OCT – 4	Forward	5’-CAGTGCCCGAAACCCACAC-3’
	Reverse	5’-GGAGACCCAGCAGCCTCAA-3’
SOX – 2	Forward	5’-AACCCCAAGATGCACAAC-3’
	Reverse	3’-CGGGGCCGGTATTTATAATC-5’
KLF – 4	Forward	5’-AAACCAAAGAGGGGAAGACG-3’
	Reverse	5’-ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC-3’
B – Actin	Forward	5’-TTCCTGGGCATGGAGTCCT-3’
	Reverse	5’-AGGAGGAGCAATGATCTTGATC-3’

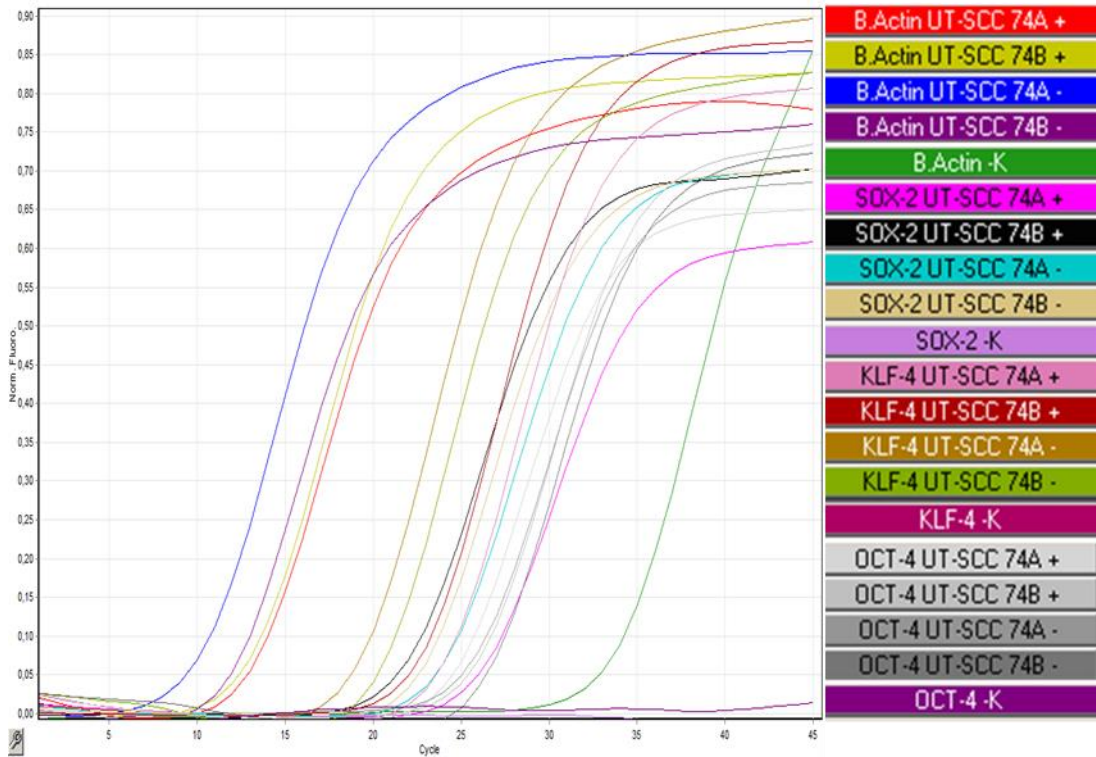
Tablo.4: Çalışmada kullanılan primer dizileri

Sybeer Green	12,5 µl
Nuclease Free Water	9 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
cDNA	2,5 µl

Tablo.5: qRT-PCR için hazırlanan mix (her bir örnek için)

Hold	95°C 15 dakika
45 cycle	Step 1 - 95°C 15 saniye
	Step 2 - 55°C 30 saniye
	Step 3 - 72°C 30 saniye
Melt	Ramp from 72°C to 95°C

Tablo.6: qRT-PCR Şartları



Şekil.4: qRT-PCR pikleri

2.4.3.4 Agaroz Jel Elektroforezi

qRT-PCR sonrası istediğimiz gen gölgesinin çoğalıp-çoğalmadığını kontrol etmek amacıyla PCR ürünleri %1'lik jele yüklenerek görüntülendi. Yükleme yapılan jel şu şekilde hazırlandı.

- 100 ml 1xTAE (Tris/Asetik Asit/EDTA) çözeltisinin içerisine 1 gr agaroz (Invitrogen Cat. No: 16500) konuldu.
- Mikrodalga fırında TAE + agaroz karışımı homojen hale gelene kadar ısıtıldı.
- 1,8 µl Ethidium Bromide (Merck, Cat. No: 11608.0030) eklenip, karıştırıldı.

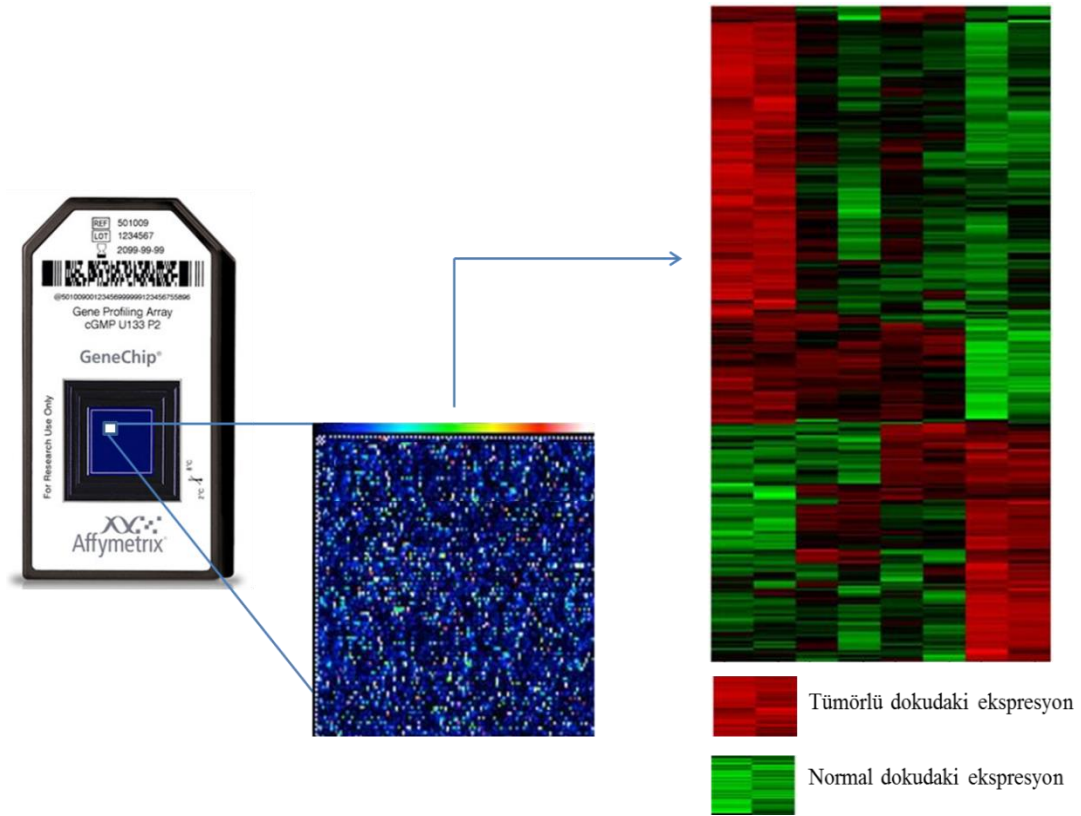
- Oluşan jel, jel kalıbına dökülerek tarakları takıldı ve donmaya bırakıldı.
- Jelin donmasıyla PCR ürünleri jele yüklendi.
- Yükleme 1:5 oranında yapıldı. 1 ul 6xLoding dye (Thermo, #R0611): 5µl PCR ürünü karıştırılarak kuyucuklara yüklendi.
- Yüklemesi tamam ürünler, 100 V'da 30 dakika yürüldükten sonra UV cihazında görüntülendi.

2.5 Microarray Analizi

Mikroarray, hücre ve dokulardaki gen ekspresyon profillerindeki değişikliklerin incelenmesinde kullanılan bir teknolojidir. Transkripsiyonun genomik olarak değerlendirilmesi, tüm genomu ya oligonükleotid ya da bireysel genleri temsil eden PCR ürünleri barındıran cam slaytlar ve ince katman camlar ile yani DNA mikroarray teknolojisiyle sağlanmıştır [66].

Microarray teknoloji, çeşitli spesifik genlerin (Örn. enfeksiyöz bir ajan ile ilişkili olan genler) ya da gen polimorfizminin araştırılması ve ekspresyon analizinde kullanılmaktadır. Polimorfizm analizinin yanı sıra, sekans analizlerinde, evolüsyoner çalışmalar ve mutasyon analizi, potansiyel terapötik ajanların tespit edilmesi, geliştirilmesi, optimizasyonu ve klinik değerlendirmelerinde de kullanılabilir. Ayrıca mikroarray verilerinin analizi ile bilinen ya da bilinmeyen genlerin mRNA modellerine bakılarak sınıflandırılmasını da sağlamaktadır [66, 67].

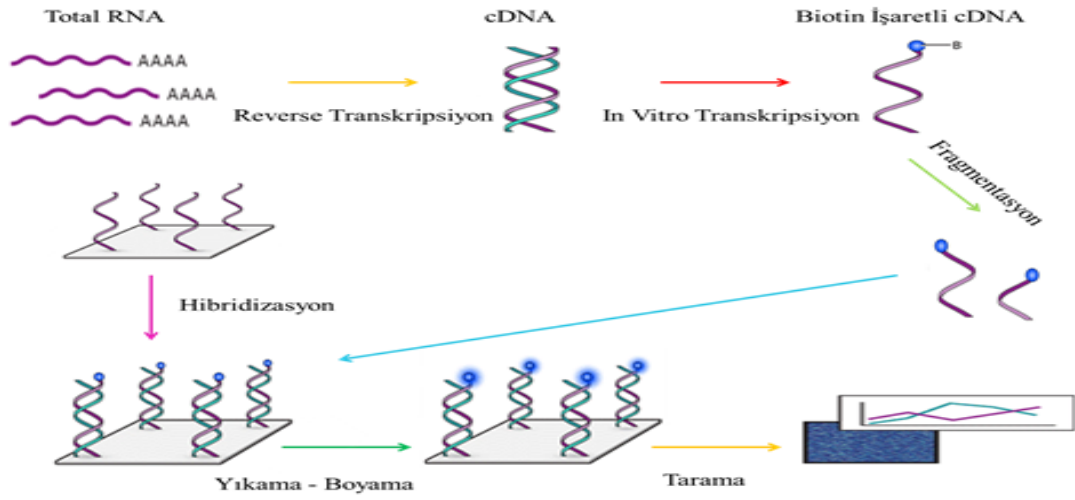
Çalışmada UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücrelerinden izole edilen KKH'leri ve KH'leri arasındaki ekspresyon profillerinin belirlenmesi için microarray teknolojisinden yararlanıldı.



Şekil.5: Çalışmada kullanılan GeneChip Human Genome U133a 2.0 model chip
 Çalışmanın miroarray basamağı için hizmet alımı yapıldı. UT-SCC-74A / UT-SCC-74B hücrelerinden izolasyonu yapılan ALDH (+) KKH'lerinin ve ALDH (-) KH'lerinin RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'lar çalışma için şirkete teslim edildi.

Microarray işlem basamakları sırasıyla aşağıdaki gibidir.

1. Poly-A RNA Kontrolleri Hazırlama
2. Tek Zincir cDNA Sentezi
3. Çift Zincir cDNA Sentezi
4. In Vitro Transkripsiyon ile İşaretli aRNA Sentezi
5. aRNA Pürifikasyonu
6. Pure aRNA Miktar Tayini
7. Fragmentasyon
8. Hibridizasyon
9. Yıkama - Boyama – Tarama



Şekil.6: Microarray basamaklarının şematize edilmiş hali

2.5.1 Poly-A RNA Kontrolleri Hazırlama

Başlangıç miktarı	Seri Sulandırım				4.üncü sulandırmadan alınacak miktar
	Birinci sulandırım	İkinci sulandırım	Üçüncü sulandırım	Dördüncü sulandırım	
50 ng	1:20	1:50	1:50	1:20	2 µl
100 ng	1:20	1:50	1:50	1:10	2 µ
250 ng	1:20	1:50	1:50	1:4	2 µl
500 ng	1:20	1:50	1:50	1:2	2 µl

Tablo.7: Poly-A RNA Kontrol Stok Seri Sulandırılması

BİLEŞENLER	MİKTAR
Örnek Total RNA (50-500 ng)	Değişken
Dilue Poly-A RNA Kontrol (Dördüncü Sulandırım)	2 µl
Nuclease-free Water	Değişken
Toplam Hacim	5 µl

Tablo.8: Total RNA/Poly-A RNA Kontrol Karışımı

2.5.2 Tek Zincir cDNA Sentezi

BİLEŞENLER	MİKTAR
First-Strand Buffer Mix	4 µl
First-Strand Enzyme Mix	1 µl
Toplam Hacim	5 µl

Tablo.9: Tek Zincir Master Mix (tek reaksiyon için)

- 5 µL Total RNA/poly-A Kontrol karışımı master mix'e eklendi. Son hacim 10 µl oldu.

İnkübasyon için;

Program	
First-Strand cDNA Synthesis	42 °C for 2 hrs 4 °C indefinite hold

Tablo.10: Thermal Cycler Programı

2.5.3 Çift Zincir cDNA Sentezi

BİLEŞENLER	MİKTAR
Nuclease-free Water	13 µl
Second-Strand Buffer Mix	5 µl
Second-Strand Enzyme Mix	2 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo.11: Çift Zincir Master Mix (tek reaksiyon için)

- 20 µl çift zincir master mix her (10 µl) cDNA örneği üzerine buz üzerinde eklendi.

İnkübasyon için;

Program	
Second-Strand cDNA Synthesis	16 °C for 1 hr 65 °C for 10 min 4 °C indefinite hold

Tablo.12: Thermal Cycler Programı

2.5.4 In Vitro Transkripsiyon ile İşaretli aRNA Sentezi

BİLEŞENLER	MİKTAR
IVT Biotin Label	4 µl
IVT Labeling Buffer	20 µl
IVT Enzyme Mix	6 µl
Toplam Hacim	30 µl

Tablo.13: IVT Master Mix (tek reaksiyon için)

- 30 µl IVT master mix her çift zincir (20 µl) cDNA üzerine eklendi.

İnkübasyon için;

Program	
IVT	40 °C for 16 hr 4 °C indefinite hold

Tablo.14: Thermal Cycler Programı

2.5.5 aRNA Pürifikasyonu

BİLEŞENLER	MİKTAR
RNA Binding Beads*	10 µl
aRNA Binding Buffe Concentrate	50 µl
Toplam Hacim	60 µl

Tablo.15: aRNA Binding Mix Hazırlanması (tek reaksiyon için)

- Hazır halde olan 60 µl aRNA binding buffer 60 µl örneğin üzerine eklendi (120 µl).
- Her örneğe 120 µl %100 ethanol eklendi (240 µl).
- Tüpler magnetic standda yerleştirilip, 5 dakika RNAların beade bağlanması için beklendi. Bağlanma tamamlandığında karışım şeffaf hale geldi. aRNA'nın en iyi şekilde bağlanması için, iyi şekilde vortekslenip, tam şeffaflaşması beklenildi.
- Tüpdeki sıvı tam olarak şeffaflaşınca beade zarar vermeden süpernatant atıldı.
- 100 µl aRNA wash solution eklenir. 2 dakika orta şiddette vortekslenir.
- Örnek magnetic standda geçirilip 5 dakika beklendi. Süpernatant atıldı.
- Tekrar 100 µl aRNA wash solution eklendi. 2 dakika orta şiddette vortekslenir.
- Örnek magnetic standda geçirilip 5 dakika beklendi. Süpernatant atıldı.
- Tüp ağzı açık şekilde vortekse yerleştirilip, maksimum hızda bir dakika vortekslenir.
- Önceden ısıtılmış olan aRNA elution bufferdan 50 µl örnek üzerine eklendi.
- 3 dakika maksimum hızda vortekslenir.
- Örnek magnetic standda geçirilip, şeffaflaşmaya kadar yaklaşık 5 dakika beklendi.
- Elue edilmiş örnek 0,2'lik tüplere alındı.

2.5.6 Pure aRNA Miktar Tayini

Pürifiye edilmiş aRNA konsantrasyonu NanoDrop Spektrofotometre ile ölçüldü. Ölçüm yaparken dilusyona gerek kalmadan örnek tüpünden 2 µl çekilerek ölçüm yapıldı (ölçüm sonucunda en az 15µg aRNA olması beklenir).

2.5.7 Fragmentasyon

Array Formatına göre Fragmentasyon Reaksiyonu

BİLEŞENLER	49/64 Format	100 Format	169/400 Format
aRNA	15 µg (1 to 32 µl)	12 µg (1 to 23.6 µl)	7.5 µg (1 to 16 µl)
5x Array Fragmentation Buffer	8 µl	6.4 µl	4 µl
Nuclease-free Water	Değişken (40 µl son hacim olacak şekilde)	Değişken (30 µl son hacim olacak şekilde)	Değişken (20 µl son hacim olacak şekilde)
Total Volume	40 µl	30 µl	20 µl

Tablo.16: aRNA fragmentasyon mix'in hazırlanması

İnkübasyon için;

Program	
Fragmentation	94 °C for 35 min 4 °C indefinite hold

Tablo.17: Thermal Cycler Program

2.5.8 Hibridizasyon

Pre-hibridizasyon mix aşağıdaki tabloya göre uygun miktarda arraylere yüklendi. Önceden 45° C 60 rpm'e getirilmiş hibridizasyon fırınında 10 dakika inkübe edildi.

BİLEŞENLER	49 (Standard) / 64 Format	100 (Midi)	400 (Micro) / 169 (Mini)	Final Dilution
Fragmented and Labeled aRNA	12.5 µg (33.3µl)	10 µg (26.7 µl)	5 µg (13.3 µl)	0.05 µg/ µl
Control Oligonucleotid e B2 (3 nM)	4.2 µl	3.3 µl	1.7 µl	50 pM
20X Hybridization Controls (<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i>)	12.5 µl	10 µl	5 µl	1.5, 5, 25, and 100 pM respectively
2X Hybridization Mix	125 µl	100 µl	50 µl	1X
DMSO	25 µl	20 µl	10 µl	10%
Nuclease-free Water	50 µl	40 µl	20 µl	
Total Volume	250 µl	200 µl	100 µl	

Tablo.18: Tek Probe Array için Hibridizasyon Kokteyli

Array	Hacim
49 Format (Standard)	200 µl

64 Format	200 µl
100 Format (Midi)	130 µl
169 Format (Mini)	80 µl
400 Format (Micro)	80 µl

Tablo.19: Probe Array Kartuş Hacimleri

İnkübasyon sonrası arrayler fırından çıkarılıp pre-hibridizasyon mix boşaltılıp 45 °C ‘deki hibridizasyon kokteyli enjekte edildi. Arrayler 45 °C 60 rpm’deki fırına 16 saatlik hibridizasyon için yerleştirildi.

2.5.9 Yıkama - Boyama – Tarama

Bu aşamaya geçilmeden önce kullanılan array sistem bilgisayarına tanıtılıp, yıkama istasyonu ve tarayıcı için uygun protokoller bilgisayara yüklendi. Hibridizasyon sonrası array boşaltılıp yerine Array Holding Buffer yüklendi.

Yıkama ve boyama için kit içindeki Stain Coctail-1, Stain Coctail-2 ve Array Holding Buffer sırasıyla 600µl-600µl-800µl miktarlarında ependorflara alındı ve yıkama istasyonunda uygun yerlere yerleştirildi. Sistem bilgisayarı kontrolünde aşama 1saat 30 dakikada tamamlandı.

Array, yine sistem bilgisayarı ile kontrol edilen tarayıcıya yerleştirildi ve datalar elde edildi.

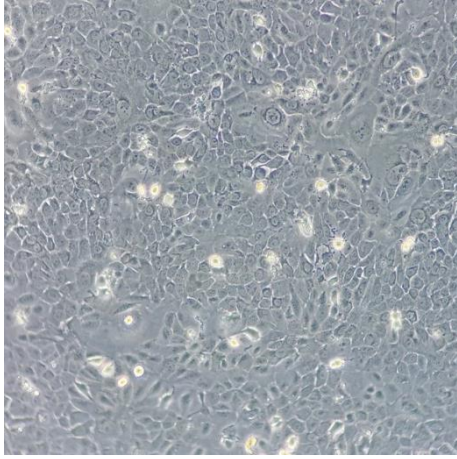
3. BULGULAR

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B (A-Primer tümör ve B-Metastatik tümör) Baş ve Boyun Kanseri hücre hatları kullanıldı. Çalışmanın temelini UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarından izole edilen KKH ve KH' leri oluşturdu.

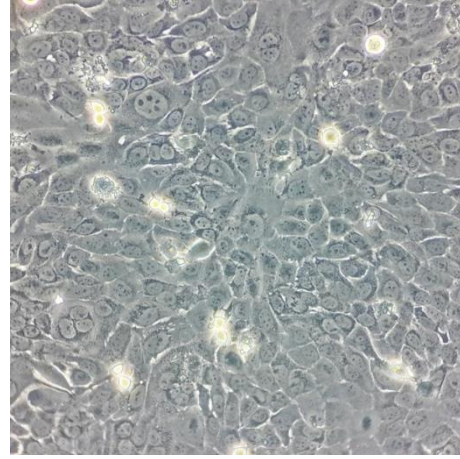
3.1 Hücre Kültürü

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarının kültürdeki görünüşleri

UT-SCC-74A

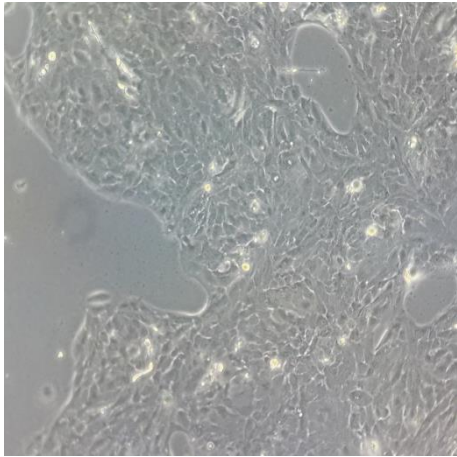


Şekil.7: 10X'deki görünüm

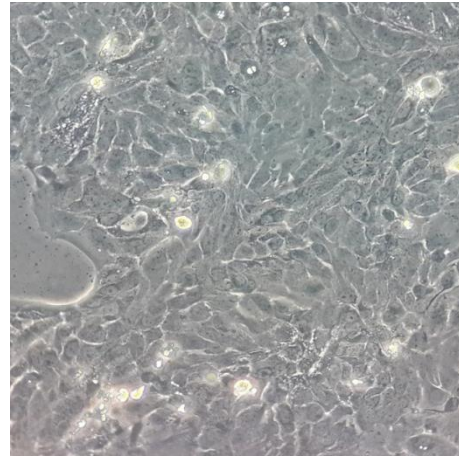


Şekil.8: 20X'deki görünüm

UT-SCC-74B



Şekil.9: 10X'deki görünüm



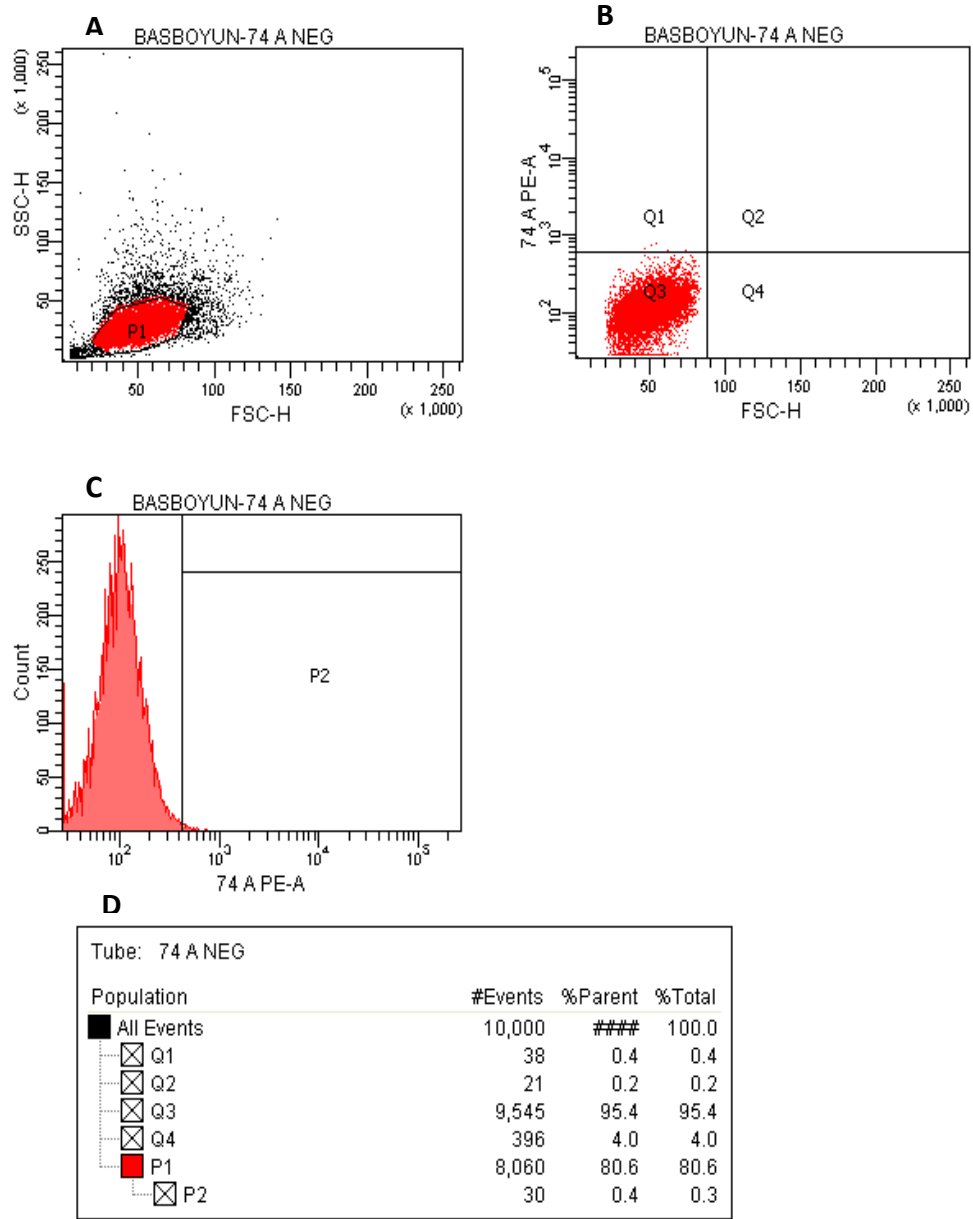
Şekil.10: 20X'deki görünüm

3.2. Kök Hücre İzolasyonu

Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Kültüre edilen UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarından Fluorescence-activated cell sorting (FACS) ile KKH ve KH izolasyonu yapıldı. 74A NEG ve 74B NEG yazılı analizlerde hücreler yalnızca 1. Antikor ile muamele edilirken, 74A ve 74B yazılı hücreler PE ile işaretli 2. Antikor ile muamele edildi.

1. Antikor: (abcam / Ms mAb To ALDH1A1 / ab105920 / Lot: GR120645 – 1)
2. Antikor: (Goat pAb to Ms IgG / PE / ab97024 / Lot: GR87493 – 11)



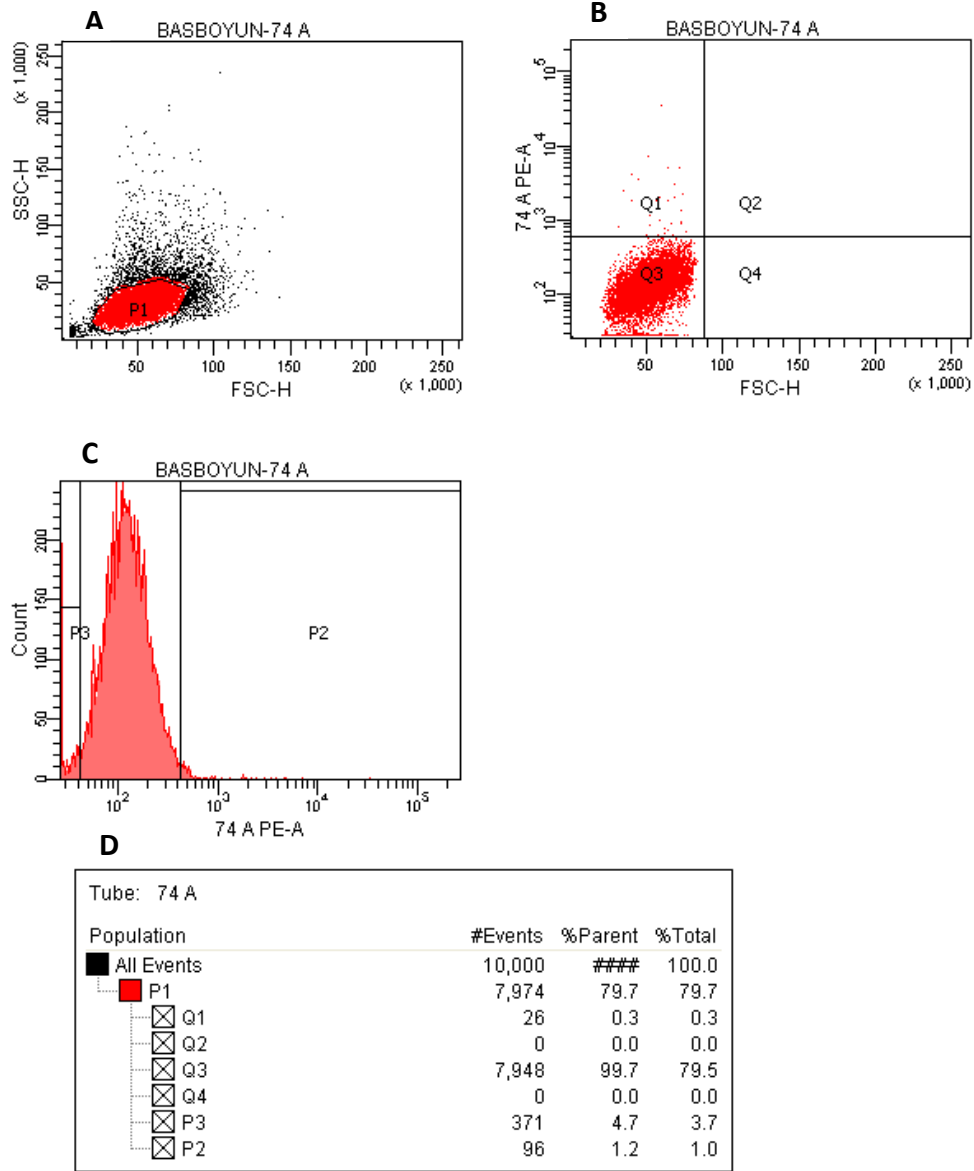
Şekil.11: UT-SCC-74A hücre hattının ALDH yüzey makını ile muamele edilmemiş FACS sonuçları

A: UT-SCC-74A'ya ait total hücre miktarını ve kapı alınan bölgedeki (P1) homojen hücre popülasyonunu,

B: Q3 bölgesi, P1'de kapılarak diğer hücrelerden ayrılan homojen hücre popülasyonunu,

C: 1. Antikor ile muamele edilmiş hücrelerin ne kadarlık bir bölgeyi kapsadıklarını,

D: P1 bölgesi, total hücreden ne kadarının 1. Antikor ile işaretlendiğini göstermektedir.



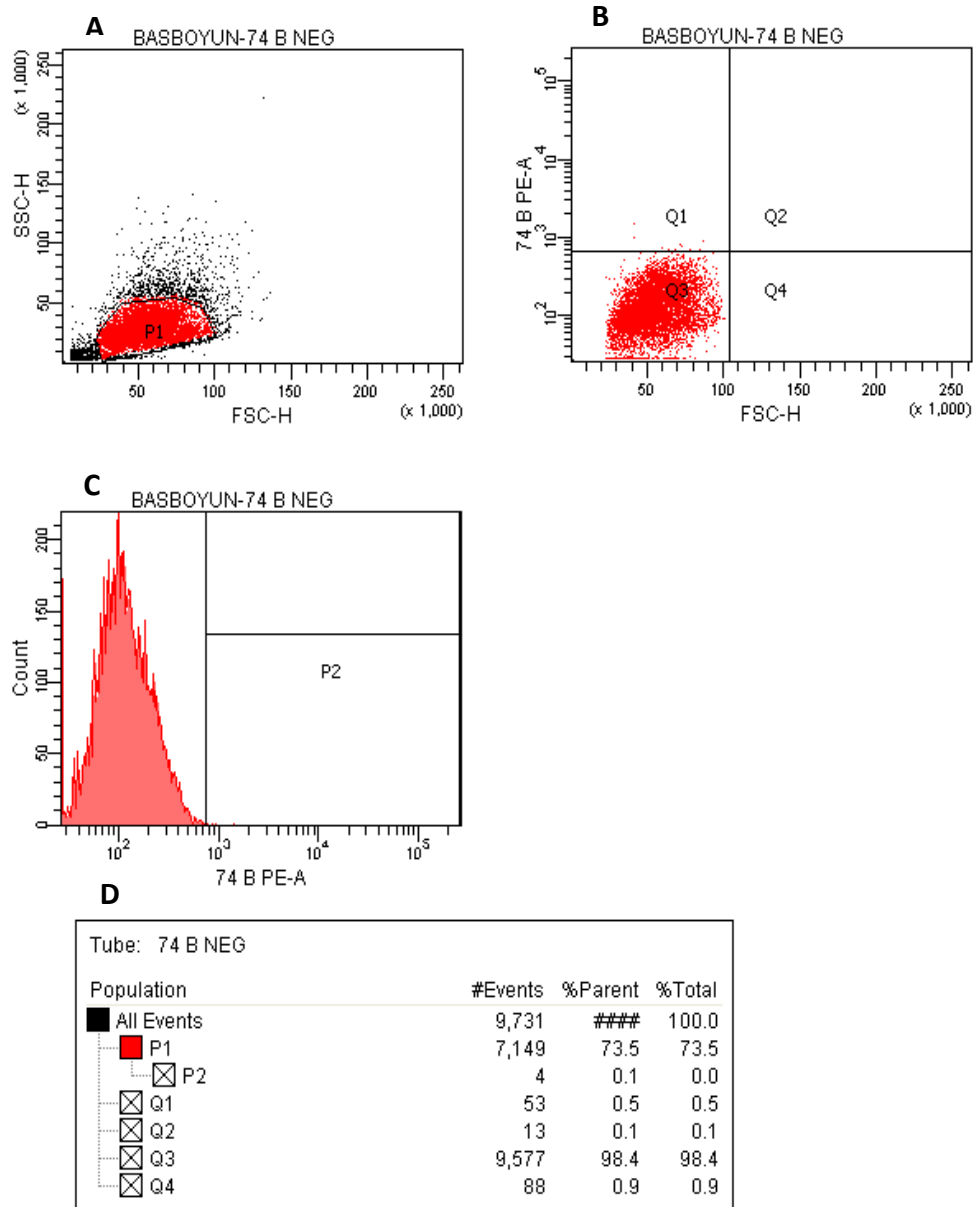
Şekil.12: UT-SCC-74A hücre hattının ALDH yüzey makını ile muamele edilmiş FACS sonuçları;

A: UT-SCC-74A'ya ait total hücre miktarını ve kapı alınan bölgedeki (P1) homojen hücre popülasyonunu,

B: Q3 bölgesi, P1'de kapılarak diğer hücrelerden ayrılan homojen hücre popülasyonunu,

C: 1. Antikor ve 2. Antikor (PE işaretli) ile muamele edilmiş hücrelerin yaptığı ışımı ve ne kadarlık bir bölgeyi kapsadıklarını,

D: P2 bölgesi total hücreden ne kadarının 2. Antikor (PE) işaretlendiğini göstermektedir.



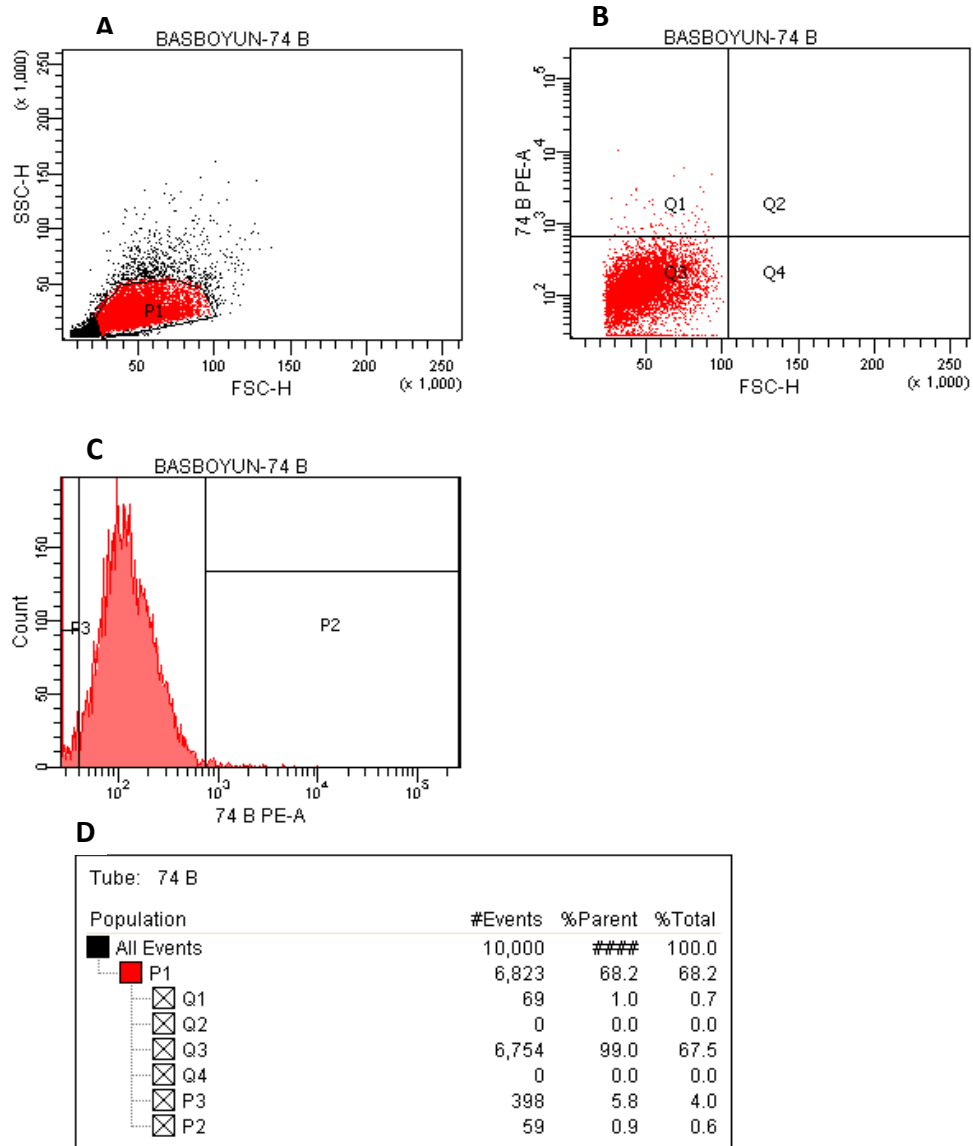
Şekil.13: UT-SCC-74B hücre hattının ALDH yüzey makını ile muamele edilmemiş FACS sonuçları;

A: UT-SCC-74B'ya ait total hücre miktarını ve kapı alınan bölgedeki (P1) homojen hücre popülasyonunu,

B: Q3 bölgesi, P1'de kapılarak diğer hücrelerden ayrılan homojen hücre popülasyonunu,

C: 1. Antikor ile muamele edilmiş hücrelerin ne kadarlık bir bölgeyi kapsadıklarını,

D: P1 bölgesi, total hücreden ne kadarının 1. Antikor ile işaretlendiğini göstermektedir.



Şekil.14: UT-SCC-74B hücre hattının ALDH yüzey makını ile muamele edilmiş FACS sonuçları;

A: UT-SCC-74A'ya ait total hücre miktarını ve kapı alınan bölgedeki (P1) homojen hücre popülasyonunu,

B: Q3 bölgesi, P1'de kapılarak diğer hücrelerden ayrılan homojen hücre popülasyonunu,

C: 1. Antikor ve 2. Antikor (PE işaretli) ile muamele edilmiş hücrelerin yaptığı ışımayı ve ne kadarlık bir bölgeyi kapsadıklarını,

D: P2 bölgesi total hücreden ne kadarının 2. Antikor (PE) işaretlendiğini göstermektedir.

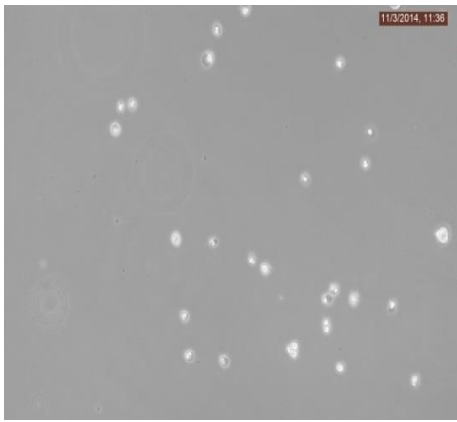
3.3 Magnetic Beads

Kültüre edilen UT-SCC 74A ve UT-SCC 74B hücre hatlarından Magnetic Beads yöntemi ile KKH ve KH izolasyonu yapıldı.

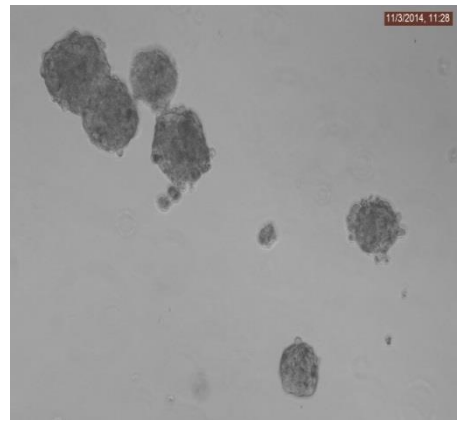
3.4 İzole edilen KKH'lerinin Validasyonu

3.4.1 Küre Oluşumu Deneyi

UT-SCC-74A

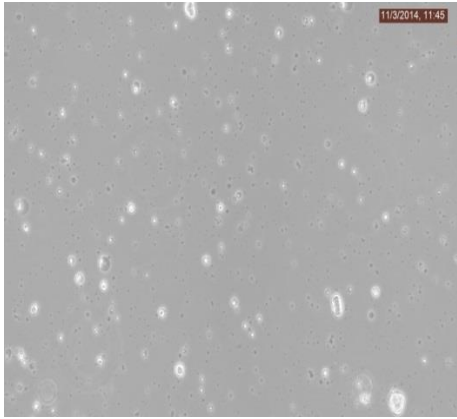


Şekil.15: UT-SCC-74A ALDH- KH

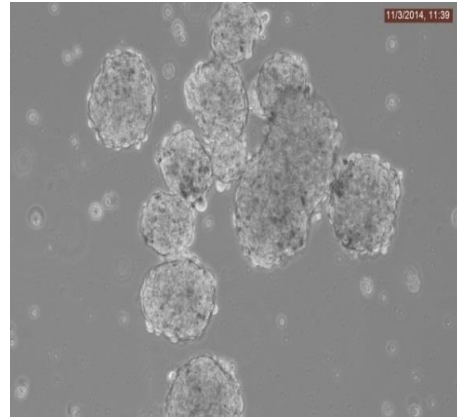


Şekil.16: UT-SCC-74A ALDH+ KKH

UT-SCC-74B



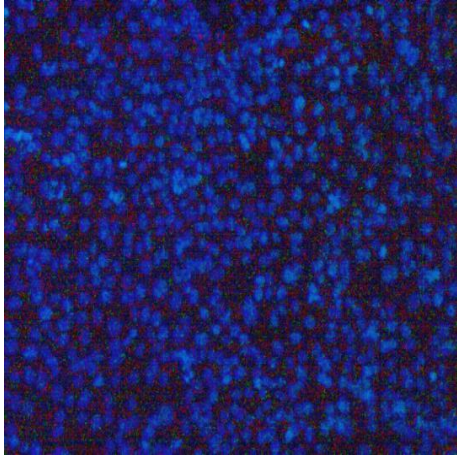
Şekil.17: UT-SCC-74B ALDH- KH



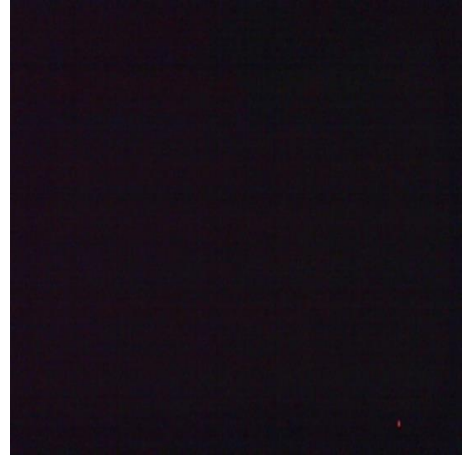
Şekil.18: UT-SCC-74B ALDH+ KKH

3.4.2 İmmüno Floresans Boyama

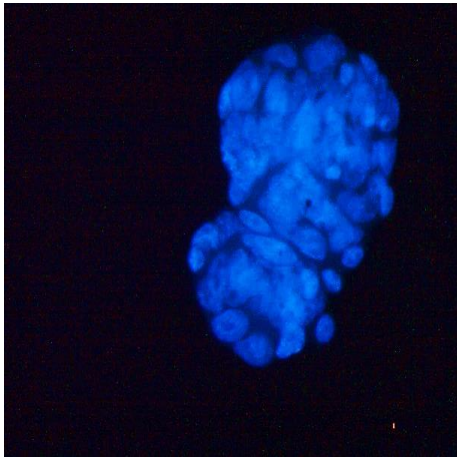
UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarından izole edilen ALDH+ KKH'leri ve ALDH- KH'leri validasyon amaçlı boyandı. İmmüno Floresans boyama ALDH ile yapıldı.



Şekil.19: ALDH- KH DAPI Boyaması



Şekil.20: ALDH- KH ALDH1 Boyaması



Şekil.21: ALDH+ KH DAPI Boyaması



Şekil.22: ALDH+ KH ALDH1 Boyaması

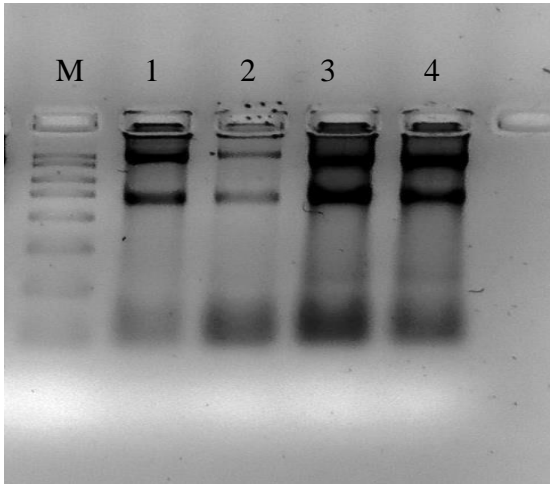
3.4.3 Kök Hücre markırları ile KKH'lerinin Validasyonu

İzole edilen KKH'leri ve KH'lerinin validasyonu için kök hücre markırı olarak bilinen genler kullanılarak, KKH'si ve KH'si arasındaki ekspresyon farklılıkları belirlendi.

3.4.3.1 KKH ve KH' lerinden RNA İzolasyonu Sonuçları

ÖRNEK NO	ÖRNEK ADI	ÖLÇÜLEN KONSANTRASYON ve ABSORBANS DEĞERLERİ
1	UT-SCC 74A ALDH (+)	715 ng/ μ l - 1.8 - 1.2 OD
2	UT-SCC 74B ALDH (+)	410 ng/ μ l - 1.7 - 1.2 OD
3	UT-SCC 74A ALDH (-)	2057 ng/ μ l - 1.9 - 1.7 OD
4	UT-SCC 74B ALDH (-)	1339 ng/ μ l - 1.9 - 1.5 OD

Tablo.20: ALDH+ Kanser Kök Hücreleri ve ALDH- Kanser Hücrelerine ait RNA konsantrasyonları

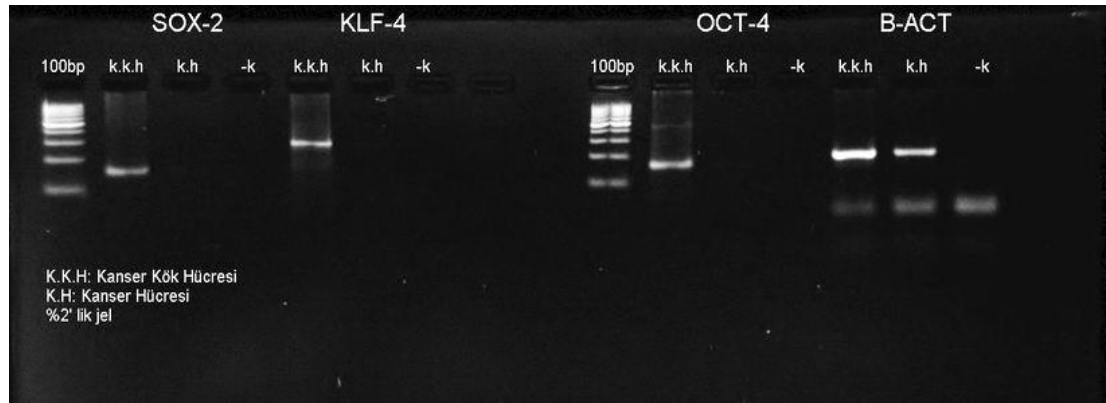


Şekil.23: KKH' lerinden ve KH' lerinden izole edilen RNA'ların jel görüntüsü

M. Markır, **1.** UT-SCC 74A ALDH+, **2.** UT-SCC 74B ALDH+, **3.** UT-SCC 74A ALDH-, **4.** UT-SCC 74B ALDH-

3.4.4.2 OCT-4, SOX-2, KLF-4 Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri

ALDH markırı kullanılarak, UT-SCC 74A / UT-SCC74B hücrelerinden Kanser Kök Hücreleri ve Kanser Hücreleri izole edildi. İzole edilen hücrelerden RNA izolasyonu yapıp, cDNA sentezlendi. KKH'leri ve KH'lerine ait cDNA'lar kullanılarak, Kök hücre markırı olarak bilinen genlerle qRT-PCR yapıldı. qRT-PCR sonuçlarının analizinde $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ yöntemi kullanıldı.



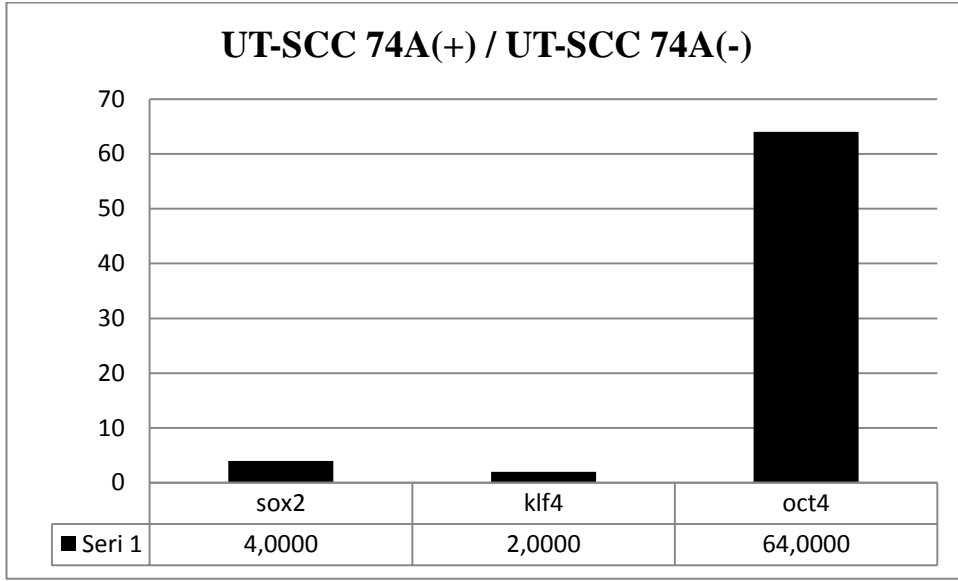
Şekil.24: qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri belirlenen genlerin jel görüntüleri

Genlerin ΔCt değerleri				
	B.Actin	OCT4	SOX2	KLF4
UT-SCC 74A ALDH (+)	17	28	30	27
UT-SCC 74B ALDH (+)	18	30	26	27
UT-SCC 74A ALDH (-)	13	30	28	24
UT-SCC 74B ALDH (-)	16	30	26	24

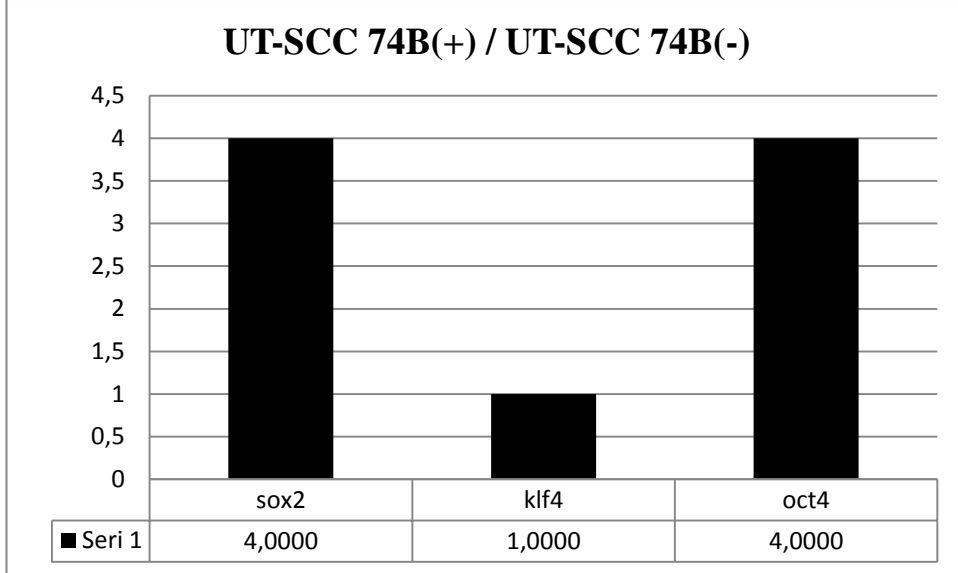
Tablo.21: qRT-PCR sonrası genlerin ΔCt değerleri

Genlerin $\Delta\Delta Ct$ değerleri (Hedef genCt- B.ActinCt)			
	OCT4	SOX2	KLF4
UT-SCC 74A ALDH (+)	11	13	10
UT-SCC 74B ALDH (+)	12	8	9
UT-SCC 74A ALDH (-)	17	15	11
UT-SCC 74B ALDH (-)	14	10	8

Tablo.22: B.Actin (-) Hedef genlerin $\Delta\Delta Ct$ değerleri



Şekil.25: Kök hücre markırı OCT-4, SOX-2 ve KLF-4 genlerinin ALDH+ KKH'lerin ALDH- KH'lerine göre ekspresyon oranı (B.Actin kontrol olarak kullanılmıştır)



Şekil.26: Kök hücre markırı OCT-4, SOX-2 ve KLF-4 genlerinin ALDH+ KKH'lerin ALDH- KH'lerine göre ekspresyon oranı (B.Actin kontrol olarak kullanılmıştır)

3.5 Microarray Analizi ile Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlendi

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücrelerinden ALDH yüzey markırı kullanılarak KKH'leri ve KH'leri izole edildi. Bu hücrelerin RNA izolasyonu yapıldı ve microarray analizi için şirkete teslim edildi. Çalışmada GeneChip Human Genome U133a 2.0 model chip ile 18.400 transkript tarandı. KKH'leri ve KH'leri arasındaki gen ekspresyon profilleri belirlendi.

Analiz sonucunda, UT-SCC 74A ALDH+ KKH'lerinde KH'lerine göre, 2.037 genin ekspresyonu artmış, 2.263 genin azalmıştır. UT-SCC 74B ALDH+ KKH'lerinde KH'lerine göre, 6.349 genin ekspresyonu artmış, 5.322 genin azalmıştır.

4.TARTIŞMA

Kanser, tanı ve tedavi imkanlarının gelişmesine rağmen günümüzde karşılaşılan en sık hastalıklardan biridir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, 2008'de Dünya'da toplam 12 milyon kişiye kanser tanısı konulmuş, 2030 yılında ise bu sayının 26 milyonu aşacağı düşünülmekte olup kalp ve damar hastalıklarından sonra 2. ölüm sebebidir [5, 11].

Kanser belirtileri, gelişimi ve sonuçları yönünden hastaya göre etkisi değişen karmaşık bir hastalıktır. Hastalıkta görülen bu heterojenite, hücresel ve moleküler düzeyde de kendini göstermektedir [6].

İnsan vücudunda her bölgede kanser oluşabilir. Baş ve boyun bölgesinden kökenlenen kanser türüne baş ve boyun kanseri denir. Baş ve boyun kanserleri, nazofarinks, ağız boşluğu, paranasal sinüs, orofarinks, hipofarinks, larinks ve tükürük bezi kanserlerini kapsamaktadır [11].

Baş ve boyun kanserleri, diğer kanserler ile karşılaştırıldığında en sık karşılaşılan 5. kanser türüdür [12].

Tıpta yaşanan son gelişmelere rağmen, baş ve boyun kanseri hastalarının tedavilerinde ve sağkalım oranlarında önemli bir artış olmamıştır. Tümörün agresif yapısı ve metastaz yeteneğinin yanısıra günümüzde kullanılan mevcut tedavilerin yetersizliğide bu durumun nedenleri arasındadır. Bu nedenle daha etkili ve daha az toksik yaklaşımlar geliştirmek amacıyla, bu hastalığın biyolojisinin daha iyi bilinmesi büyük önem arz etmektedir.

Kök hücrelerin kendini yenileme mekanizmalarında meydana gelen bozukluklar, KKH oluşumuna sebep olmaktadır. Oluşan bu hücreler mevcut kanser tedavilerine direnç göstermektedir. KKH'lerinin ve kanser hücrelerinin tümör ve metastaz oluşturma yeteneklerinin farklı olması, hücre yolaklarında farklı olduğu düşünülmektedir.

Primer tümörler kanser vakalarının %10'nundan sorumludur. Çoğu durumda en önemli ölüm nedeni ise kanserin metastaz yapmasıdır. Kanser hücrelerinin bir alt grubu olarak sınıflandırılan KKH, tümörün oluşumu ve metastazında esas sorumlu olduğuna dair kanıtlar her geçen gün artmaktadır. Günümüzde mevcut olan tedaviler kanserin teşhis edilmesinden sonra, hayatta kalma ve iyileşme oranı açısından

başarısız olmuştur. KKH'leri çok uzun süre hareketsiz kalabilirler ve kemoterapiye karşı dirençlidir [68].

Kök hücreler sürekli kendilerini yenileyebilme ve farklılaşabilme kapasitesine sahip hücrelerdir. Uzun süreli sağkalm, ilaç direnci ve sınırsız bölünme gibi özellikleri vardır [69, 70].

KKH'leri, tümör oluşturmak üzere farklılaşmış hücrelerdir. KKH hipotezine göre, KKH'leride erişkin dokulardaki hücreler gibi kendini yenileme ve farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Bu hücreler normal şartlar altında, erişkin kök hücreleri ve doku rejenerasyonu için gereklidir[54].

KKH'leri, yüzeye yapışmadan küre oluşturarak çoğalma, aldehit dehidrojenaz (ALDH) aktivite deneyi, KKH'lerine spesifik yüzey markırları kullanılarak ve yan popülasyonların tespitinde Hoechst boyama ile tespit edilebilirler [71].

KKH'leri ilk kez 1997 yılında Akut Myeloid Lösemide (AML) belirlenmiştir. Çalışmada AML hastalığına sahip kişilerden, lösemik hücreler izole edilmiştir. İzole edilen hücreler, zar antijenik özelliklerine göre gruplandırılmıştır. CD34+ ve CD38- yüzey antijenine sahip hücreler, bağışıklıkları zayıflatılmış farelere transfekte edilmiş ve farelerde neoplazma benzeri tümörlerin oluştuğu gözlenmiştir. Aynı şekilde, farelere CD34+ ve CD38- dışında farklı antijenik özelliğe sahip lösemi hücreleri transfer edildiğinde tümör oluşumu gözlenmemiştir [54].

Bu bulgularla beraber araştırmacılar, diğer kanser türlerindeki KKH'lerini tanımlamak için yüzey markırlarını kullanmışlardır.

Başta meme kanseri olmak üzere CD44, çeşitli tümörlerde KKH'si yüzey markırı olarak kullanılmaktadır. Solid tümör KKH'lerinde ilk tanımlamayı Al-Hajj ve arkadaşları yapmışlardır. 2003 yılında CD24- ve CD44+ markırlarını kullanarak meme kanseri KKH'lerini tanımlamışlardır [63]. Bu tarihten sonra çeşitli solid tümörlerde KKH'leri tanımlanmıştır. Örneğin; glioblastoma [72], melanoma [73], osteosarkoma [74], kondrosarkoma [75], prostat kanseri [76], yumurtalık kanseri [77], gastrik kanser [78] ve akciğer kanseri [79, 80] gibi solid tümörlerde KKH'leri belirlenmiştir.

Birden fazla tümör için çeşitli yüzey markırları araştırılmıştır (Tablo.2). Çalışmalardan anlaşıldığı ve tabloda da belirtildiği gibi yüzey markırları tek başlarına ya da kombine edilerek kullanılmıştır.

ALDH+ ve ALDH- olan insan meme kanseri kök hücreleri, NOD / SCID farelere düzenli periyotlarla enjekte edilmiştir. ALDH+ olan hücreler tümör oluşumuna sebep olurken, tümörün büyüklüğü ve oluşum süresi hücre sayısı ile ilişkilidir. ALDH+, CD44+ ve CD24- kombinasyonu sonucu hücrelerin tümör oluşturma kapasitelerinde artış yaşanmıştır [81].

ALDH, hücre içi aldehidler ve retionik asit biyosentezinin oksidasyonundan sorumludur. Yapılan son çalışmalarda, ALDH aktivitesinin çeşitli kanserlerde tümör oluşumuna sebep olduğu belirlenmiştir. Hematopoietik, nöral, prostat kök hücrelerinde ve göğüs, kolon, akciğer kanserlerinde yüksek ALDH aktivitesi görülmüştür [82-85].

Prince ve arkadaşları ilk kez 2007 yılında baş ve boyun kanserlerinde, KKH'lerinin var olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada CD44+ hücrelerin baş ve boyun kanserlerinde, KKH'lerinin bir alt grubu olduğu tanımlanmıştır. Fare xenografi modeli üzerinde yapılan çalışmada, CD44+ olan hücreler farelere transfekte edilip, tümör oluşumu başlattığını gözlemlemişlerdir. CD44- olan daha fazla sayıda hücre farelere verilmiş ve tümör oluşumu görülmemiştir [55].

Aynı grup son dönemde yapılan çalışmalarda baş ve boyun KKH'lerine spesifik Aldehit dehidrogenaz (ALDH) belirtecini tanımlamışlardır. Çalışmayı yapan grup, düşük ve yüksek ALDH oranına sahip hücreleri izole ettiler. Yüksek ALDH aktivitesine sahip hücrelerin çok daha tümörjenik olduğunu belirlemişlerdir [56, 57].

ALDH aktivitesinin yüksek olduğu hücrelerde, CD44 antijeninin + ve - olduğu durumlar karşılaştırılmıştır. Hücrelerin çoğunda CD44 aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun tersine, CD44+ hücrelerde ALDH aktivitesine bakıldığında, sadece %10-25 lik bir kısmın yüksek ALDH aktivitesi göstermiştir. Bu bilgiler sonucunda, yüksek ALDH aktivitesine sahip çoğu hücrenin aynı zamanda CD44+ olduğu ve dolayısıyla ALDH'ın KKH'si için daha spesifik bir belirteç

olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, CD44+ ve ALDH aktivitelerinin birlikteliği, baş ve boyun KKH'lerinin tanımlanmasında önemli bir alt grubu oluşturmaktadır [55, 57].

Visus ve arkadaşları yaptıkları çalışmada skuamöz hücreli baş ve boyun karsinomlarında (HNSCC), ALDH1'in premalignan hücreleri ayırt etmekte kullanılabileceğini belirtmişlerdir. ALDH1 aktivitesi hastaların insidansı ve evreleriyle doğru orantılı bir kolerasyon sergilemiştir [86].

Yılda yaklaşık 470.000 kişiye servikal karsinom tanısı konmakta ve bunlardan 233.000'ü ölümlerle sonuçlanmaktadır. Dünyada kadınlarda kansere bağlı ölüm sıralamasında 2. sırada yer alan kanser türüdür [87, 88]. Serviks kanserlerde kök hücre izolasyonu için, erken kök hücre farklılaşmasında görevli ALDH yüzey markırı kullanılmıştır [89]. Serviks kanserlerde tekrarlayan kanser vakalarında ve metastaz durumunda yüksek ALDH1 aktivitesi görülmüştür [90].

ALDH ailesinin bir alt grubunda yer alan ALDH1, insan hematopoietik kök hücrelerinde, kök hücre farklılaşmasında ve hücre proliferasyonunda görev yapar. Bin Chang ve arkadaşları, ALDH1 aktivitesini tanı, tümör büyüklüğü, evresi ve kemoterapiye verdiği cevap gibi parametreleri kullanarak analiz etmişlerdir. Ve yumurtalık kanseri için prognostik bir faktör olduğu görülmüşlerdir [91].

Çalışmada baş ve boyun kanserlerine ait UT-SCC 74A ve UT-SCC 74B hücre hatları kullanılmıştır. Baş ve boyun kanserlerinde KKH izolasyonu için Prince ve arkadaşlarının yaptığı deneylerden yola çıkılarak ALDH yüzey markırı seçilmiştir[57]. UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarından izole ALDH+ hücreler, serum içermeyen DMEM/High Glucose medium içerisine, B27 %2, N2 %1, EGF 100 ng/ml, FGF 20 ng/ml ve Penisilin/Streptomysin %1 eklenerek kültüre edilmiştir [71].

Literatürde de belirtildiği üzere KKH'leri serum içermeyen KKH'u kullanarak, flask yüzeyine tutunmayacak (flask yüzeyi agaroz jel ile kaplandı) şekilde kültüre edilmiştir. Yapılan çalışmalarda da görüldüğü üzere KKH'leri sayılarına ve izole edildikleri bölgelere göre farklı sürelerde küre oluşturmuştur [71].

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücrelerinin küre görünüşleri (Şekil.16-18). Çalışmada ALDH+ olan KKH'leri morfolojik olarak literatür bilgileriyle orantılı çıkmıştır.

İzolasyonu yapıldıktan sonra eşit şartlarda kültüre edilen ALDH+ KKH'leri ve ALDH- KH'leri ALDH yüzey markırı ile immüno Floresan boyanmıştır (Şekil.19-20-21-22).

KKH'leri ve KH'leri arasındaki ekspresyon farklarının belirlenmesi için, kök hücre markırı olan genlerle OCT-4, KLF-4 ve SOX-2 [37] qRT-PCR yapıldı.

Takahashi ve Yamanaka tarafından hücrelerin yeniden programlanabileceği bulunmuştur [92]. Bu programlama Nanaog gibi pluripotent hücreler sayesinde yapılmıştır. Kyoto Ünivesitesinden Prof. Yamanaka, 36 yaşındaki bir bayanın yüzündeki deriden alınan fibroblast hücrelerine OCT-4, KLF-4, SOX-2 ve C-MYC olmak üzere, bu 4 geni transfekte ederek ilk defa insan IPS/IPSCs (Induced Pluripotent Stem Cells) hücrelerini elde etmişlerdir [93]. IPS rejeneratif tıpta çığır açmıştır [94]. Çünkü bu yönetmele beraber vücutta zarar gören kısımlar kişinin kendi somatik hücrelerinden elde edilebilecek potansiyeline sahiptirler [95]. Ayrıca embriyodan elde edilen embriyonik kök hücre gibi etik problemlerde içermemektedir [96-98].

SOX2, SOX ailesinin bir üyesi olan transkripsiyon faktörüdür. Memeli embriyogenezinde anahtar kilit rol oynamaktadır. Bu protein, 80 amino asit içeren HMG (High-mobility group) domeini içerip, DNA'ya bağlanır [39]. SOX2'nin pluripotent hücre oluşumunu artırması ve rejeneratif tıpta kullanılması gibi çok önemli bir rolü vardır [94].

Oct-4, embriyonik kök hücrelerin kendilerini çoğaltmasında rolü vardır. Niwa ve arkadaşları 2000 yılında, Oct-4'ün farklılaşmamış (kök hücre özelliğini kaybetmemiş) hücre markırı olarak kullanıldığını göstermişlerdir [38, 99].

KLF4, KLF ailesinden bir transkripsiyon faktörü olup, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve somatik hücrelerin yeniden programlanmasını kontrol eder.

Ayrıca El-Karim ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada kolorektal kanserlerde KLF4, tümör supressör gen olduğu belirtilmiştir [40].

Bu bilgiler dahilinde çalışmada kök hücre oluşumunda eksprese olan Oct-4, KLF-4 ve SOX2 genleri kullanılarak, ALDH+ ve ALDH- hücreler arasındaki ekspresyon farklılıkları belirlenmiştir (Şekil.25-26).

Literatür de de belirtildiği gibi kök hücre oluşumunda ekspresyonu artan 3 gen (Oct-4, KLF-4 ve SOX-2) ile qRT-PCR yapıldığında, baş ve boyun hücrelerinden izole edilen ALDH+ hücrelerin ekspresyonu ALDH- olan hücelere oranla artmıştır. Kontrol olarak B-Actin geni kullanılmıştır.

Baş ve boyun kanserlerinde kök hücre oluşumunda etkili olan (ekspresyonu artan ve azalan) genlerin belirlenmesi için UT-SCC 74A ve UT-SCC 74B'den izole edilen ALDH+ ve ALDH- hücrelerden elde edilen RNA kullanılarak microarray analizi yapılmıştır.

Microarray analizi sonucunda; UT-SCC-74A ALDH+ KKH'lerinde ALDH-KH'lerine göre, 2037 genin ekspresyonu artmış, 2263 genin azalmıştır. UT-SCC-74B ALDH+ KKH'lerinde, ALDH- KH'lerine göre, 6349 genin ekspresyonu artmış, 5322 genin azalmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sigerist, H.E., The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer. Bull N Y Acad Med, 1932. 8(11): p. 642-53.
2. SA, Ü., Türk tıp Tarihinde Kanser ve Tedavisine Dair. İst Tıp Fak Mecmuası, 1938. 1(5): p. 673-8.
3. <http://tr.wikipedia.org>, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kanser#Kaynak.C3.A7a>.
4. Derneği, T.K., <http://www.turkkanser.org.tr/dosyalar/istatistikler/dunya-kanser-istatistikleri.pdf>.
5. Bakanlığı, T.C.S., <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-15486/dunya-ve-turkiyede-kanser.html>.
6. Merlo, L.M., et al., Cancer as an evolutionary and ecological process. Nat Rev Cancer, 2006. 6(12): p. 924-35.
7. Olivier, M., et al., Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. Cancer Gene Ther, 2009. 16(1): p. 1-12.
8. Baselga, J., Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. Science, 2006. 312(5777): p. 1175-8.
9. Herceg, Z. and P. Hainaut, Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. Mol Oncol, 2007. 1(1): p. 26-41.
10. Universitesi, B., <http://bilheal.bilkent.edu.tr/aykonu/ay2007/Nisan07/kanser.html>.
11. <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir.html>.
12. Koyar, M.Ç., <http://mazharcelikoyar.net/kbb-uzmanlik-alanlari/bas-boyun-cerrahisi/bas-ve-boyun-kanserleri-hakkinda/>.
13. Franceschi, S., et al., Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. Oral Oncol, 2000. 36(1): p. 106-15.
14. Lin, C.J., et al., Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: Established models and rationale for selection. Head & Neck, 2007. 29(2): p. 163-188.
15. Vaughan CW, H.F., Shapshay SM, Soto E, Carcinogenesis in the upper aerodigestive tract. Otolaryngol Clin North Am, 1980. 13: p. 403-412.
16. Kjørheim, K., M. Gaard, and A. Andersen, The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancers: a prospective study of 10,900 Norwegian men. Cancer Causes & Control, 1998. 9(1): p. 99-108.
17. Goldsher, M., et al., Laryngeal carcinoma associated with multiple additional primary tumors: Immunologic studies. Archives of Otolaryngology, 1977. 103(9): p. 550-552.
18. World Health Organization, I.A.f.R.o.C., Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut derived nitrosamines. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2004. 85: p. 1-334.
19. Guha, N., et al., Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. Am J Epidemiol, 2007. 166(10): p. 1159-73.
20. <http://www.doktorcare.com>, <http://www.doktorcare.com/haber/153/bas-ve-boyun-kanserleri>.
21. T.K.B.B.v.B.B.C Derneği., <http://www.kbb.org.tr/menu/32/bas-boyun-kanserleri>.

22. Beldan Polat , G.H., Baş Boyun Kanserleri. Klinik Gelişim-Kulak Burun Boğaz Hastalıkları, 2012. 25(4): p. 104-105.
23. Forastiere, A., et al., Head and neck cancer. *N Engl J Med*, 2001. 345(26): p. 1890-900.
24. Coleman, M.P., et al., EURO CARE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Ann Oncol*, 2003. 14 Suppl 5: p. v128-49.
25. Levine PA, S.D., Neoplasms of the oral cavity. *Head and Neck Surgery. Otolaryngology*, 1998: p. 1523–1539.
26. Seikaly H, R.C., Oropharyngeal cancer. *Head and Neck Surgery. Otolaryngology*, 1998: p. 1655–1671.
27. Schechter GL, W.T., Hypopharyngeal cancer. *Head and Neck Surgery Otolaryngology*, 1998: p. 1673–1691.
28. Fried MP, G.H., Frankenthaler R, Advanced cancer of the larynx. *Head and Neck Surgery Otolaryngology*, 1998: p. 1739–1758.
29. McCombe, D., et al., Squamous cell carcinoma of the lip: a retrospective review of the Peter MacCallum Cancer Institute experience 1979-88. *Aust N Z J Surg*, 2000. 70(5): p. 358-61.
30. Cerezo, L., et al., Squamous cell carcinoma of the lip: analysis of the Princess Margaret Hospital experience. *Radiother Oncol*, 1993. 28(2): p. 142-7.
31. Amabile, G. and A. Meissner, Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med*, 2009. 15(2): p. 59-68.
32. S, B., Cancer stem cells. *Identification and Targets*. Wiley&Sons Inc.USA, 2009.
33. Thomson, J.A., et al., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998. 282(5391): p. 1145-7.
34. Draper, J.S. and V. Fox, Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal. *Arch Med Res*, 2003. 34(6): p. 558-64.
35. Trounson, A., The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev*, 2006. 27(2): p. 208-19.
36. Rodda, D.J., et al., Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 2005. 280(26): p. 24731-7.
37. Zhao, W., et al., Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules*, 2012. 17(6): p. 6196.
38. Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith, Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 2000. 24(4): p. 372-6.
39. Rizzino, A., Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2009. 1(2): p. 228-36.
40. El-Karim, E.A., et al., Kruppel-like factor 4 regulates genetic stability in mouse embryonic fibroblasts. *Mol Cancer*, 2013. 12: p. 89.
41. Silva, J., et al., Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*, 2009. 138(4): p. 722-37.
42. Kakarala, M. and M.S. Wicha, Cancer stem cells: implications for cancer treatment and prevention. *Cancer J*, 2007. 13(5): p. 271-5.

43. Demiray ŞB, A.Ş., Oltulu F, Çavuşoğlu T, Akarca Ö, Dilsiz ÖY, Ergüven M, Öktem G, Bilir A, MDAH-2774 Over kanser kök hücrelerinde kemoterapi sonrası apoptotik etkilerin incelenmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 2011. 50(2): p. 103-109.
44. Neuzil, J., et al., Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: what's in the name? *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 355(4): p. 855-9.
45. Al-Hajj, M. and M.F. Clarke, Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 2004. 23(43): p. 7274-82.
46. Clarke, M.F., et al., Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 2006. 66(19): p. 9339-44.
47. Wicha, M.S., Cancer stem cell heterogeneity in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2008. 10(2): p. 105.
48. Spillane, J.B. and M.A. Henderson, Cancer stem cells: a review. *ANZ J Surg*, 2007. 77(6): p. 464-8.
49. Tu, S.M., S.H. Lin, and C.J. Logothetis, Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours. *Lancet Oncol*, 2002. 3(8): p. 508-13.
50. Pardal, R., M.F. Clarke, and S.J. Morrison, Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(12): p. 895-902.
51. Dontu, G., et al., Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*, 2003. 36 Suppl 1: p. 59-72.
52. M., T., Solid tümörlerde ve lösemilerde kanser kök hücresi. *Türk Onkoloji Dergisi* 2009. 24(1): p. 42-47.
53. Mimeault, M., et al., Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med*, 2007. 11(5): p. 981-1011.
54. Bonnet, D. and J.E. Dick, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997. 3(7): p. 730-7.
55. Prince, M.E., et al., Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(3): p. 973-8.
56. Clay, M.R., et al., Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*, 2010. 32(9): p. 1195-201.
57. Joshua, B., et al., Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck*, 2012. 34(1): p. 42-9.
58. Campos, M.S., et al., Endothelial derived factors inhibit anoikis of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol*, 2012. 48(1): p. 26-32.
59. Li, C., et al., Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 2007. 67(3): p. 1030-7.
60. Singh, S.K., et al., Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004. 432(7015): p. 396-401.
61. Dalerba, P., et al., Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(24): p. 10158-63.

62. O'Brien, C.A., et al., A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 2007. 445(7123): p. 106-10.
63. Al-Hajj, M., et al., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(7): p. 3983-8.
64. Szotek, P.P., et al., Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(30): p. 11154-9.
65. Woodward, W.A. and E.P. Sulman, Cancer stem cells: markers or biomarkers? *Cancer Metastasis Rev*, 2008. 27(3): p. 459-70.
66. Bednar, M., DNA Microarray Technology and Application. *Med Sci Monid*, 2000. 6(4): p. 796-800.
67. S., C., DNA Chips and Microarray Analysis, Handbook of fungal biotechnology. *Handbook of Fungal Biotechnology*, 2004.
68. Tirino, V., et al., Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *Faseb j*, 2013. 27(1): p. 13-24.
69. Reya, T., et al., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001. 414(6859): p. 105-11.
70. Tan, B.T., et al., The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest*, 2006. 86(12): p. 1203-7.
71. Moserle, L., et al., The side population of ovarian cancer cells is a primary target of IFN-alpha antitumor effects. *Cancer Res*, 2008. 68(14): p. 5658-68.
72. Singh, S.K., et al., Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003. 63(18): p. 5821-8.
73. Fang, D., et al., A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*, 2005. 65(20): p. 9328-37.
74. Tirino, V., et al., Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS One*, 2008. 3(10): p. e3469.
75. Tirino, V., et al., Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *Faseb j*, 2011. 25(6): p. 2022-30.
76. Collins, A.T., et al., Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, 2005. 65(23): p. 10946-51.
77. Bapat, S.A., et al., Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(8): p. 3025-9.
78. Takaishi, S., et al., Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*, 2009. 27(5): p. 1006-20.
79. Eramo, A., et al., Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, 2008. 15(3): p. 504-14.
80. Tirino, V., et al., The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009. 36(3): p. 446-53.
81. Ginestier, C., et al., ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 2007. 1(5): p. 555-67.

82. Burger, P.E., et al., High aldehyde dehydrogenase activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells. *Stem Cells*, 2009. 27(9): p. 2220-8.
83. Alison, M.R., et al., Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *J Pathol*, 2010. 222(4): p. 335-44.
84. Ohi, Y., et al., Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology*, 2011. 59(4): p. 776-80.
85. Levi, B.P., et al., Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems. *Blood*, 2009. 113(8): p. 1670-80.
86. Yoshida, A., Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogenetics*, 1992. 2(4): p. 139-47.
87. Parkin, D.M., et al., Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 2001. 94(2): p. 153-6.
88. Bosch, F.X. and S. de Sanjose, Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003(31): p. 3-13.
89. Visus, C., et al., Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 as a novel CD8+ T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*, 2007. 67(21): p. 10538-45.
90. Yao, T., et al., The expression of ALDH1 in cervical carcinoma. *Med Sci Monit*, 2011. 17(8): p. Hy21-26.
91. Dylla, S.J., et al., Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One*, 2008. 3(6): p. e2428.
92. Takahashi, K. and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006. 126(4): p. 663-76.
93. Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007. 131(5): p. 861-72.
94. Robinton, D.A. and G.Q. Daley, The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 2012. 481(7381): p. 295-305.
95. Yu, J., et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007. 318(5858): p. 1917-20.
96. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007. 448(7151): p. 313-7.
97. Wernig, M., et al., In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 2007. 448(7151): p. 318-24.
98. Meissner, A., M. Wernig, and R. Jaenisch, Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007. 25(10): p. 1177-81.
99. Raman, J.D., et al., Decreased expression of the human stem cell marker, Rex-1 (zfp-42), in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 2006. 27(3): p. 499-507.