



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MALAT1 VE B-MYB GENLERİN FARKLI KANSER HÜCRE
HATLARINDA GEN EKSPRESYONLARIN VE APOPTOZİSİN
ARAŞTIRILMASI

HASAN DAĞLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2018

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MALAT1 VE B-MYB GENLERİN FARKLI KANSER HÜCRE
HATLARINDA GEN EKSPRESYONLARIN VE APOPTOZİSİN
ARAŞTIRILMASI**

HASAN DAĞLI
YÜKSEK LİSANS

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

MALAT1 VE B-MYB GENLERİN FARKLI KANSER HÜCRE
HATLARINDA GEN EKSPRESYONLARIN VE APOPTOZİSİN
ARAŞTIRILMASI

Hasan DAĞLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Metin KILINÇ

Jüri Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Muhammed
SEYİTHANOĞLU

Jüri Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Recep
SARAYMEN

KAHRAMANMARAŞ-2018

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Hasan DAĞLI tarafından hazırlanan “MALAT1 ve B-MYB genlerin farklı kanser hücre hatlarında gen ekspresyonların ve apoptozisin araştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 05/01/2018 tarihinde oy birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Metin KILINÇ

.....

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, KSÜ

Yrd. Doç. Dr. Muhammed SEYİTHANOĞLU

.....

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, KSÜ

Yrd. Doç. Dr. Recep SARAYMEN

.....

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ERÜ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet BOŞNAK

.....

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hasan DAĞLI

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

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmamın bütün aşamalarında bilgi, tecrübe, destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Metin KILINÇ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönemim boyunca bilgi ve önerileri ile bize yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Ahmet ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince katkı ve yardımlarını esirgemeyen hocalarımız Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN'a, Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ'a, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr. Muhammed SEYİTHANOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Filiz ALKAN BAYLAN'a teşekkür ederim.

Deney sürecinin her aşamada katkı veren Dr. Kaifée Arman ve Öğr. Gör. Ebru TEMİZ'e teşekkür ederim.

Laboratuvarda beraber çalıştığımız, iyi ve kötü günlerimde her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Ayşe HEDEF, Seher KARA ve Eda GANİYUSUFOĞLU'na teşekkür ederim.

Bugünlere gelmeme vesile olan, beni yetiştirip büyüten, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli AİLEM'e teşekkür ederim.

Ocak-2018

Hasan DAĞLI

MALAT1 VE B-MYB GENLERİN FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA GEN EKSPRESYONLARIN VE APOPTOZİSİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Hasan DAĞLI

ÖZET

MALAT1 (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) 8000 baz uzunluğunda, tümör gelişimini destekleyen onkojen uzun kodlamayan RNA olarak tanımlanmıştır. MALAT1 çeşitli biyolojik süreçlerde görev alır. Transkripsiyonel sonrası mRNA'yı işler. Kanserde aşırı ifade olur. Onkojenik transkripsiyon faktörü olan B-MYB geni düzenler. Bu tez çalışmasında ki amacımız, MALAT1 lncRNA'sı ve B-MYB geni arasındaki ilişkiyi incelemektir. MALAT1'i spesifik mikroRNA'larla inhibe ederek, akciğer, meme ve kemik kanseri hücre hatlarında gen ifade düzeyi, proliferasyona, apoptozise olan etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

Çalışmada üç farklı kanser hücre hatları çalışıldı. Meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve kontrol hücresi hTERT-HME1, akciğer kanser hücre hattı A549 ve kontrol hücresi BEAS-2B ve kemik kanseri hücre hattı U2OS ve kontrol hücresi HUVEC hücre hatları çalışıldı. MALAT1'i inhibe etmek için miR-503, miR150, miR-15a mikroRNA'ları kullanıldı. Deneyde hücreler ekilip mikroRNA transfer edildikten sonra 48 saat inkübe edilip hücreler kaldırılmıştır. Gen ifadesi için total RNA eldesi edilip cDNA'ya çevrilmiştir. RT-PCR ile gen ifade düzeyine bakıldı. Hücre süspansiyonunda biyokimyasal parametreler; glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), superoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), Miyelin peroksidaz (MPO) ve Prolidaz aktiviteleri çalışıldı. Hücre hatlarında apoptozis düzeyleri belirlemek için Annexin V ve 7AAD içeren kiti, hücre döngüsü için BD Cycletest™ Plus DNA Reagent kiti kullanarak flov sitometride analiz edildi.

Gen ifadesi analiz edildiğinde, MALAT1 ve B-MYB farklı kanser türlerinde farklı seviyede eksprese oldu. Biyokimyasal incelemelerin sonucunda; kanser ve kontrol hücre hatları arasında tüm parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ($p < 0,05$). Apoptozis ve hücre döngüsü seviyelerinde bakıldığında, akciğer kanser hücre hattında apoptozis artmış proliferasyon azalmış, meme kanseri hücre hattında apoptozis değişmemiş,

proliferasyon artmıştır. Kemik kanseri hücre hattında ise kanserli hücreler hem apoptozise gitmiş hem de proliferasyon yapmıştır.

Sonuç olarak MALAT1 farklı kanserlerde farklı roller üstlenmektedir. MALAT1 akciğer kanserinde güçlü bir biyobelirteç olarak kullanabilirken, meme kanserinde proliferasyon için bir biyobelirteç, kemik kanserinde apoptozis için bir biyobelirteç olarak kullanabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, B-MYB, Kanser, MALAT1, mikroRNA,

Sayfa Adedi: 81

Danışman: Prof. Dr. Metin KILINÇ



INVESTIGATION OF GENE EXPRESSION AND APOPTOSIS IN DIFFERENT CANCER CELL LINES OF MALAT1 AND B-MYB GENES

Master Thesis

Hasan DAĞLI

ABSTRACT

MALAT1 (metastasis-linked lung adenocarcinoma transcript 1) is defined as an oncogene long coding RNA having length of 8000 bp that promotes tumorigenesis. MALAT1 has role in various biological processes. It participates in the post transcriptional processing of mRNA. MALAT1 has been found to regulate B-MYB gene, an oncogenic transcription factor. In this thesis, we aim to investigate the possible relationship between the lncRNA MALAT1 and the B-MYB gene. MALAT1 inhibits several miRNAs and regulates gene expression of genes in lung, breast and bone cancer cell lines and therefore its effect on proliferation and apoptosis is being investigated.

In this study, three different cancer cell lines were studied. They were lung cancer cell line (A549) and its control cell line BEAS-2B, breast cancer cell line (MCF-7) and its control cell line hTERT-HME1, bone cancer cell line (U2OS) and its control cell line HUVEC. miR-503, miR150 and miR-15a were used to inhibit MALAT1. In the experiment, the cells were cultured and incubated for 48 hours after the transfection of respective miRNAs. For gene expression analysis, total RNA was isolated and transformed to cDNA. The gene expression was determined by RT-PCR. Biochemical parameters like glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), Myelin peroxidase (MPO) and Prolidase activities were also studied in the cell suspension. Flow cytometry was used to determine apoptosis using the kit containing Annexin V for and 7AAD and cell cycle levels in cell lines using the kit BD Cycletest™ Plus DNA Reagents.

Gene expression was analyzed. MALAT1 and B-MYB expressed at different levels in different cancer types. As a result of biochemical studies, statistically significant differences were found between respective cancer and control cell lines in terms of all parameters ($p < 0.05$). When we analysed cell proliferation and apoptosis, there was an increase in the number of cells undergoing apoptosis while there was decrease in proliferation in lung cancer, while in breast cancer, there was no change in apoptosis but there was an increased

proliferation. In bone cancer, there was an increase in the number of cells undergoing apoptosis as well as there was increased proliferation.

As a result, MALAT1 plays different roles in different cancers. While MALAT1 can be used as a powerful biomarker in lung cancer, it can also be used as a biomarker for proliferation in breast cancer and for apoptosis in bone cancer.

Key words: Apoptosis, B-MYB, Cancer, MALAT1, microRNA,

Page Number: 81

Supervisor: Prof. Dr. Metin KILINÇ



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGE VE KISALTMALAR	x
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1) Kanser	3
2.1) Kanserin Karakteristik Özellikleri	3
2.1.1) Çoğalma (prolifreatif) Sinyallerin Devamlılığı.....	4
2.1.2). homeostazdan ve büyümeyi baskılayıcılardan kaçış.....	5
2.1.3). Hücre Ölümüne Karşı Direnç Göstermesi	5
2.1.4). Ölümsüz Çoğalmaya Olanak Sağlanması.....	7
2.1.5) Anjiyogenezesin Uyarılması.....	8
2.1.6. İnvazyon ve Metastazın Aktive Edilmesi	8
2.1.7. Genom İstikrarsızlığı ve Mutasyon	10
2.1.8. Tümör-Promotor İnflamasyonu.....	10
2.1.9. Enerji Metabolizmasını Yeniden Proplanması.....	11
2.1.10. Bağışıklık Yıkımından Kaçış	11
2.2. Kanser Mikroçevresi	12
2.3. Kodlamayan RNA Dünyası ve Kanser.....	14
2.3.1. Kısa Kodlamayan RNA'lar	15
2.3.1.1. Mikro RNA'lar.....	15
2.3.2. Uzun Kodlamayan RNA'lar.....	17
2.3.2.1. Uzun Kodlamayan RNA'ların Özellikleri.....	19
2.3.2.1.1. Sinyal Modeli	19
2.3.2.1.2. Yalancı (decoy) Modeli.....	19
2.3.2.1.3. Rehber (Guide) Modeli	19
2.3.2.1.4. İskele (Scaffold) Modeli.....	19
2.4. MALAT1	19
2.5. Serbest Reaktif Türler ve Kanser	21
3. MATERYAL METOD	23

3.1. Hücre Kültürü Öncesi Sterilizasyon.....	23
3.2. Hücre Soyları ve Kültür Aşaması	23
3.3. Mimik RNA'ların Besi Ortamındaki Hücrelere Aktarılması	24
3.4. Hücre Soylarından Total RNA Eldesi.....	25
3.5. RNA Örneklerinden Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Yöntemi ile cDNA Eldesi .26	
3.5.1. mRNA'dan cDNA eldesi	26
3.5.2. Elde edilen cDNA'lardan kalite ve miktar tayini.....	27
3.6. MALAT1 ve B-MYB İfade Düzeyleri Ölçümü için Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR) Yöntemi.....	27
3.6.1. Primer Seçimi.....	28
3.6.2. PCR bileşenleri.....	28
3.6.2.1. MALAT1 ve B-MYB ifade düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri.....	28
3.6.3. İstatistiksel Analiz	29
3.7. Akım (flow) sitometride apoptoz seviyelerine bakılması	31
3.8. Akım (flow) sitometride hücre döngüsü analizi	32
3.9.1. Hücre hatlarında MDA Düzeylerinin Ölçülmesi.....	32
3.9.2. Hücre hatlarında MPO Aktivitesinin Ölçülmesi	33
3.9.3. Hücre hatlarında NO Aktivitesinin Ölçülmesi	33
3.9.4. Hücre hatlarında GPx Düzeyinin Ölçülmesi.....	33
3.9.5. Hücre hatlarında SOD Aktivitesinin Ölçülmesi.....	34
3.9.6. Hücre hatlarında Prolidaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. Hücre soylarında MALAT1'in gen İfade analiz Sonuçları.....	36
4.1.1. A549 ve BEAS-2B hücre soylarında MALAT1'in katlı değişim ifade sonuçları...36	
4.1.2. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarında MALAT1'in katlı değişim ifade sonuçları.....	37
4.1.3. U2OS ve HUVEC hücre soylarında MALAT1'in katlı değişim ifade sonuçları....38	
4.2. Hücre soylarında MYB geninin İfade analiz Sonuçları	39
4.2.1. A549 ve BEAS-2B hücre soylarında B-MYB genin katlı değişim ifade sonuçları 39	
4.2.2. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarında B-MYB genin katlı değişim ifade sonuçları.....	39
4.2.3. U2OS ve HUVEC hücre soylarında B-MYB genin katlı değişim ifade sonuçları..40	
4.3. Akım (Flow) Sitometride Apoptozis ve Hüce Döngüsü Analiz Sonuçları.....	41

4.3.1. A549 ve BEAS-2B hücre soylarına negatif kontrol mimik (nc) verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları	41
4.3.2. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına miR-503-5p mimik (miR-503) verildiğinde elde edilen verilerin Apoptozis analiz sonuçları	42
4.3.3. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına miR-150-5p mimik (miR-150) verildiğinde elde edilen verilerin Apoptozis analiz sonuçları	42
4.3.4. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına miR-15a-5p mimik (miR-15a) verildiğinde elde edilen verilerin Apoptozis analiz sonuçları	43
4.3.5. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına negatif kontrol mimik (nc) verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları	44
4.3.6. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-503-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları	44
4.3.7. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-150-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları	45
4.3.8. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-15a-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları	46
4.3.9. U2OS ve HUVEC hücre soylarına negatif kontrol mimik (nc) verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları	46
4.3.10. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-503-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları	47
4.3.11. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-150-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları	47
4.3.12. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-15a-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları	48
4.4.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları	49
4.4.2. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları	50
4.4.3. U2OS ve HUVEC hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları	52
4.5.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası GPx aktiviteleri	53
4.5.2. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası GPx aktiviteleri	53
4.5.3. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası GPx aktiviteleri	54
4.5.4. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası SOD aktiviteleri	54
4.5.5. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası SOD aktiviteleri	55

4.5.6. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası SOD aktiviteleri	55
4.5.7. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası CAT aktiviteleri	56
4.5.8. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası CAT aktiviteleri.....	56
4.5.9. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası CAT aktiviteleri	57
4.5.10. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası MDA aktiviteleri.....	57
4.5.11. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası MDA aktiviteleri.....	58
4.5.12. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası MDA aktiviteleri	58
4.5.13. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası MPO aktiviteleri.....	59
4.5.14. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası MPO aktiviteleri	59
4.5.15. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası MPO aktiviteleri.....	60
4.5.16. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası NO aktiviteleri	60
4.5.17. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası NO aktiviteleri.....	61
4.5.18. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası NO aktiviteleri.....	62
4.5.19. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası Prolidaz aktiviteleri.....	62
TARTIŞMA	63
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR	69
TABLO LİSTESİ.....	78
ŞEKİL LİSTESİ.....	79
ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGE VE KISALTMALAR

AJCC	American Joint Commitee on Cancer
ATM	Ataxia telegiectasia mutant
CDI	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri
CDK	protein kinazlar
cDNA	Complementary DNA
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
LncRNA	Long non-coding RNA
MALAT1	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
miRNA	MikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
NcRNA	Non-coding RNA
NEAT2	Noncoding nuclear-enriched abundant transcript2
NSCLC	Non small cell lung cancer
p53	Tümör protein 53
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PRC1	Polycomb Repressive Complex
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
Rb	Retinablastoma
RISC	RNA-induced silencing complex
RT-PCR	Reverse transkriptaz PCR
SiRNA	Small interfering RNA
SR	Serin/Arjinin
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNM	Tümör-Nod-Metastaz
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UICC	Union for International Cancer Control
VALG	Veterans Administration Lung Cancer Group
WHO	World Health Organization

MDA	Malondialdehit
MPO	Miyelinperoksidaz
NO	Nitrik oksit
SOD	Superoksidismutaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
ROR	Reaktif oksijen radikalleri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
CAT	Katalaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Okside glutasyon



GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücudun herhangi bir yerinde gelişebilen, kontrolsüz hücre çoğalması, normal hücreleri istila ederek ve vücudun normal fonksiyonların yerine getirmesine engel olan bir hastalıktır (1,2). Günümüzde kanser, çağımızın en büyük problemi teşkil etmektedir. Dünyada kanser bağlı ölüm nedenleri giderek artmaktadır(1,3,4). Kanser Derneği, Amerika Birleşik Devletleri'nde meydana gelecek yeni kanser vakaları ve ölüm sayısını tahmin ederek ve kanser insidansı, mortalite ve hayatta kalma ile ilgili en son verileri düzenli olarak güncelleyip yayımlamaktadır (4). 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 1,685,210 yeni kanser vakası ve 595,690 kanser ölümünün gerçekleşmesi tahmin edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, önümüzdeki 20 yıl içinde yeni kanser vakalarının sayısının yaklaşık %70 artması beklenmektedir. Erkeklerde kanserin en yaygın olduğu bölgeler akciğer, prostat, kolon, rektum, karın ve karaciğer iken, kadınlarda göğüs, kolon, rektum, akciğer, serviks ve mide kanserleri olarak sıralanmaktadır. "Kanser", birçok hastalık grubu ve hücre tipine göre sınıflandırmasına rağmen, en önemli karakteristik özeliği anormal hücre büyümesidir (5-8).

Kanserli hücreler birçok hayati biyolojik süreçlerde hücre büyümesi, hücre bölünmesi gibi rol alan süreçlerde görev alan proto-onkogenler, tümör süpresör genler ve DNA tamir genlerin ifadesini düzenler (9). Kanserde terapiye yönelik çalışmalar, geçmişte alışageldiği gibi günümüzde ve gelecekte buna yönelik çalışmalar yapılmaya devam edecektir (10,11). Son yıllarda kanser ile ilgili yapılan son çalışmalarda, sigara kullanımı, çevresel karsinojenlere maruz kalma durumlarına karşın, uzun kodlamayan RNA'ların kanser gelişiminde, ilerlemesinde rol aldığı görülmektedir (11,12). Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) hem kanser oluşumunda hem de normal biyolojik süreçlerde önemli moleküllerin fonksiyonlarını düzenlenmesinde görev alan, 200 nükleotitten büyük kodlamayan bir transkripttir. lncRNA'lar: X-kromozomu etkisizleştirilmesi (inaktivasyonu), genomik damgalama (imprinting), kromatin düzenlenmesi, gen yazılımı (transkripsiyonu) ve uç uca ekleme dahil çok sayıda biyolojik süreçlerde, önemli rollere sahiptir (13,14). Kısaca lncRNA'lar kanser statik yapısını denetlemek için bir dizi mekanizma ile hareket eder. lncRNA'ların fonksiyonları ve moleküler mekanizma hakkındaki bilgi artmasına rağmen, kanserlerde çoğu lncRNA'ların işlevi gizemini hala korumaktadır (15,16).

Bu çalışmadaki amacımız bir lncRNA ailesi olan MALAT1'in farklı kanserlerde fonksiyonlarını araştırmak ve farklı kanserlerde bir biyomarkır olarak kullanılabilceğini ortaya koymaktır (17). MALAT1 hücre çekirdeğinde bol miktarda bulunur ve çekirdekte alternatif uç uca ekleme faktörleri olan serin arjiinin (SR) komplekslerinin hücre içindeki dağılımı ve aktivitesini modüle ederek pre-mRNA'yi düzenler (18,19). pre-mRNA ekleme faktörleri, yapıştırma faktörlerinin mekansal dağılımı, MALAT1 ile özel ilişkisi analiz edilmiş ve elde edilen bulgular sonucunda, MALAT1, SR ekleme faktörleri ile etkileşim içinde olduğu tespit edilmiştir. MALAT1 in vitro olarak kolaylıkla retina endotelial hücrelerde; hücre çoğalmasına, migrasyonu düzenler (19,20). Ayrıca MALAT1, transkripsiyon faktörü E2F1 aktivitesini düzenleyerek hücre döngüsü ve tümörögenез ilerlemesine neden olur. Tüm bu veriler bize MALAT1'in öncül hücre çoğalmasında işlevi olduğunu göstermektedir. Ayrıca MALAT1, p53 ve hedef genlerin etkinleşmesiyle DNA hasarı yanıtını tetiklemektedir (21). MALAT1, insan hücrelerinde onkojenik transkripsiyon faktörü olan BMYB gen ifadesini düzenler. Kanserli hücrelerde B-MYB gen ifadesini yeniden düzenleyerek hücre döngüsünün G2/M safhasında proliferasyonu arttırdığı bilinmektedir (22). Bu bulgulara dayanarak MALAT1 hedefleyen miRNA'larla inhibe ederek kanserde proliferasyonun önüne geçilebilir ve apoptozis tetikleyen faktörleri aktive edebiliriz.

GENEL BİLGİLER

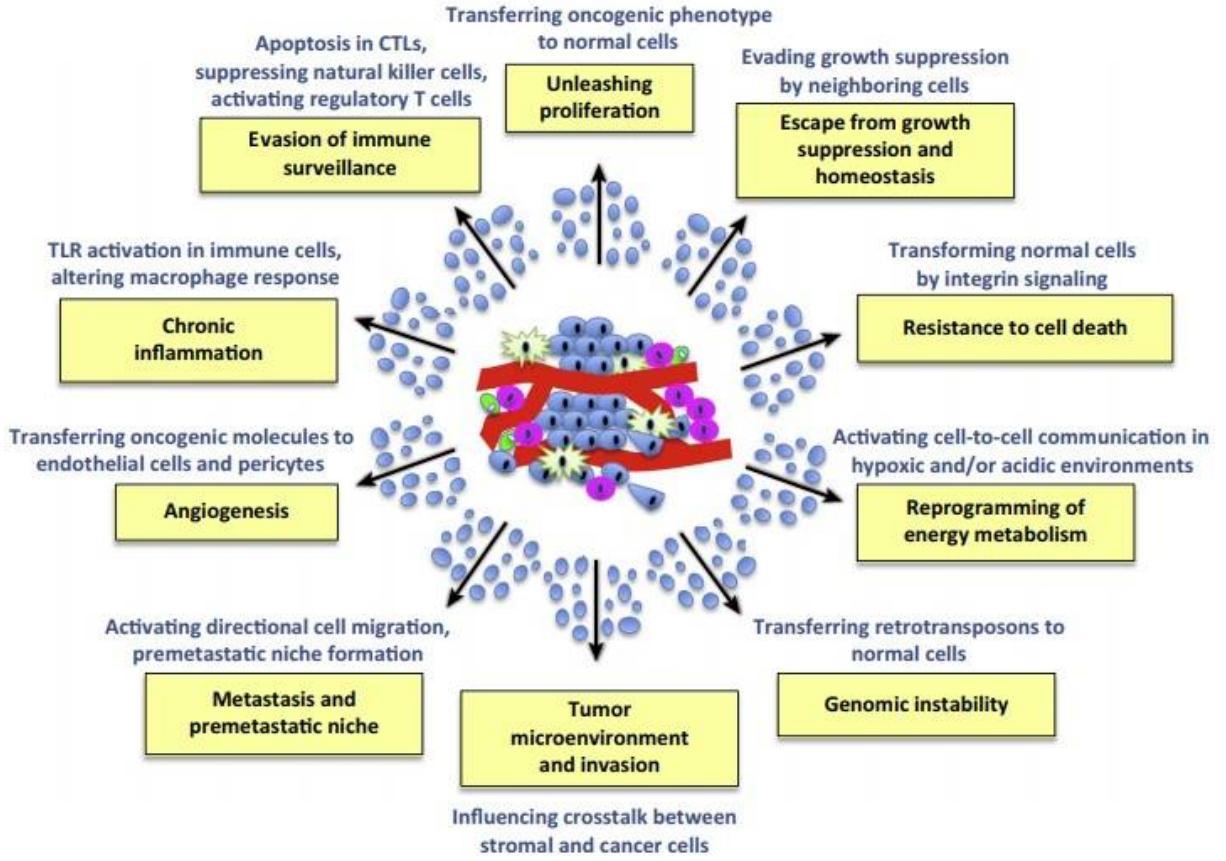
2.1. Kanser

Kanser, vücudun belirli bir bölümündeki hücrelerin kontrolsüz olarak büyüüp çoğaldığı bir durumdur (1,2). Kanserli hücreler, organlar da dahil olmak üzere çevresindeki sağlıklı dokuları istila edebilir ve yok edebilir. Genel olarak kanserler, tek bir hücrede mutasyonel olarak başlar ve daha sonra birçok farklı aşamalardan geçerek bölünmelere devam eder (23,24). Mutasyona uğramış bu hücre genetik yolla diğer hücre soylarına geçerler ve bundan dolayı kanser, klonel bir hastalıktır. Dünyada kanser bağlı ölüm nedenleri giderek artmaktadır. Kanser Derneği, Amerika Birleşik Devletleri'nde meydana gelecek yeni kanser vakaları ve ölüm sayısını tahmin ederek ve kanser insidansı, mortalite ve hayatta kalma ile ilgili en son verileri düzenli olarak güncelleyip yayımlamaktadır. 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 1,685,210 yeni kanser vakası ve 595,690 kanser ölümünün gerçekleşmesi tahmin edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, önümüzdeki 20 yıl içinde yeni kanser vakalarının sayısının yaklaşık %70 artması beklenmektedir. Hücre türü gözönüne alındığında 200'den daha fazla kanser türüne raslanır ancak meme, akciğer, kolorektal ve prostat tüm kanser vakaların yarısını teşkil etmektedir. Erkeklerde kanserin en yaygın olduğu bölgeler akciğer, prostat, kolon, rektum, karın ve karaciğer iken, kadınlarda göğüs, kolon, rektum, akciğer, serviks ve mide kanserleri olarak sıralanmaktadır. "Kanser", birçok hastalık grubu ve hücre tipine göre sınıflandırmasına rağmen, en önemli karakteristik özeliği anormal hücre büyümesidir (5,6).

2.1. Kanserin Karakteristik Özellikleri

Hanahan ve Weinberg, 2000 yılında yayınladıkları makalede kanser oluşumunun temelini oluşturan bazı ayırt edici özelliği öne sürdüler. Bu ayırt edici özellikler şu şekilde sıralanmaktadır:

(i) Çoğalma uyarısının devamlılığı, (ii) Büyüme baskılayıcılardan kaçış, (iii) Ölümsüz çoğalmaya olanak sağlama, (iv) İnvazyon ve metastazın aktifleşmesi, (v) Anjiogenezin indüklenmesi ve (vi) Hücre ölümüne karşı direnç sıralanmakla beraber, (vii) Genom İstikrarsızlığı ve Mutasyon, (viii) Tumor-Promotor inflamasyonu, (ix) Enerji metabolizmasını yeniden programlanması ve (x) Bağışıklık yıkımından kaçış kanserin ayırt edici özellikleri olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.1) (10). Son yıllarda kanserin karakteristik özellikleri üzerine yapılan çalışmalar kayda değer önemli ilerlemeler kaydedildi (10,25).



Şekil 2.1. Kanser Özellikleri ve Ekstraselüler kesecikler (EVs). Tümör ilerlemesini yönlendiren belirleyici özellikler, EV'ler aracılığıyla kanser hücreleri ile tümör mikroçevre hücreleri arasındaki iletişimi güçlendirmektedir (26).

2.1.1. Çoğalma (prolifreatif) Sinyallerin Devamlılığı

Kanser hücrelerinin en temel özelliği, Kronik çoğalmayı sürdürebilme becerisidir. Normal dokular dikkatlice büyümeyi teşvik eden sinyallerin üretimini ve serbest bırakılmasını kontrollü, genellikle uzak bölgelerde ekstraselüler olarak üretilir ve daha sonra kan dolaşımı yoluyla taşınır veya yakındaki hedef hücrelere yayılır (27). Böylelikle hücre sayısının homeostazı sağlanır ve böylece normal doku yapısı ve işlevi korunmuş olur (28). Normalde büyüme faktörü endokrin veya parakrin uyarı olarak alır. Ancak tümör hücrelerinde kendi büyüme faktörleri üreterek kendi büyüme faktörü reseptörlerini uyarabilir ve aktivitelerini artırabilir. Bu durum, herhangi bir eksojen proliferatif sinyal yokluğunda bile kendi ürettiği büyüme faktörleri ile sürekli olarak tümör hücresinin çoğalmasını uyarımla uyarmaya sebep olmaktadır. Kanser hücreleri proliferatif sinyal verme kapasitelerini artırma eğilimindedirler (29,30). Büyüme faktörü üretebilirler, kendine yanıt verebilecekleri ligandların ekspresyonunu artırabilir ve Aynı kökenli reseptörlerin, otkrin proliferatif uyarımı gibi birçok alternatif yollar kullanırlar (10,30).

2.1.2. Homeostazdan ve Büyüme Baskılayıcılardan Kaçış

Hasar gören hücrelerin ortadan kaldırılması, normal doku mimarisini ve fonksiyonunu korumak için önemlidir. Büyüme uyarıcı sinyaller kanserli hücrenin yaşamı teşvik etme ve sürdürme pozitif olarak düzenlerken, tümör baskılayıcı genler negatif olarak düzenler (31). *TP53*, *PTEN* veya *RB* gibi birçok tümör baskılayıcı protein kodlayıcı genler hücrenin büyümesini ve çoğalmasını inhibe eder (32). Bu tümör baskılayıcı genlerin harekete geçirilmesi birçok uyarılara bağlı olup, hücre döngüsünü durması, hücrelerde yaşlanmayı ve hatta apoptozu indükleyebilirler (33). Kanser hücreleri hayatta kalabilmeleri için tümör baskılayıcı genlerinden kaçmanın bir yolunu bulmalıdır. Bu genlerin aktivitelerinin ya en aza indirgeyerek ya da tamamen aktivitelerini kaybederek başa çıkabilirler. Bunun için genleri inaktif hale getiren mutasyon birikimi gibi mekanizmaları ergüman olarak kullanırlar. İnsan tümörlerinin %50'sinden fazlası *TP53* geninde bir mutasyon veya delesyon içermektedir (34). *TP53* geninin yalnızca bir işlevsel kopyasını taşıyan insanlar yetişkinliğin erken safhalarında kansere yakalanması muhtemeldir ve bu hastalık Li-Fraumeni sendromu olarak bilinmektedir.

Tümör hücreleri, komşu bölgelerden türetilen Ekstraselüler kesecikler yoluyla büyüme bastırmasını nasıl kaçtığı büyük oranda bilinmiyor.

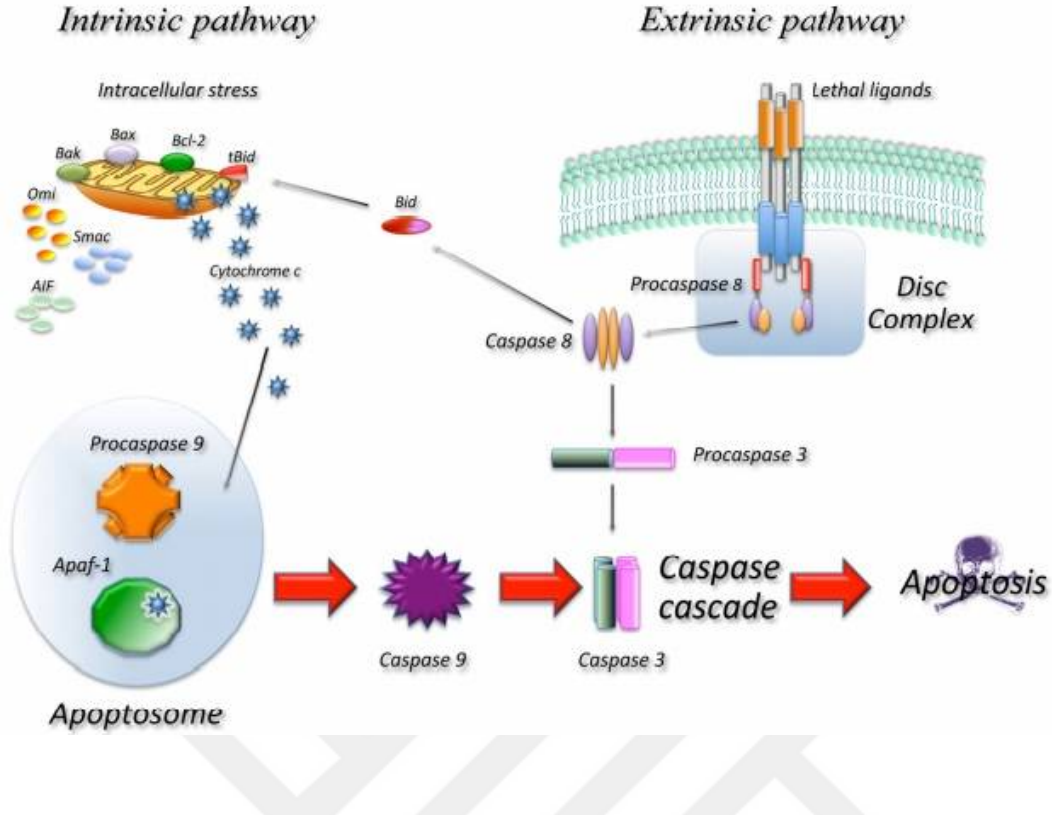
2.1.3. Hücre Ölümüne Karşı Direnç Göstermesi

Kontrollü hücre ölümüne yol açan ilk mekanizma apoptozdur. Apoptozis hücre ölümünü programlayan ve kanser gelişimine doğal bir bariyer oluşturan programlı hücre ölümü mekanizmasıdır. Apoptozis birçok iç ve dış uyarılar tarafından indüklenebilir (35,36). Son yapılan çalışmalarda, Çeşitli fizyolojik strese tepki olarak kanser hücreleri tümör gelişim sürecinde apoptozis mekanizmasını zayıflatabileceği ve bunun sonucu olarak tedaviye karşı dirençli olabileceğini göstermiştir (36). DNA hasarının kemoterapötik ajanlar (sisplatin, etoposid, vb.) ile indüklenmesi, *TP53* (p53) yolu ile apoptozu tetiklemenin yollarından biridir. Örneğin *BCL2* proteini, apoptozisi baskılayıcı olarak işlev gördüğü çeşitli in vitro ve in vivo deneylerde doğrulanmıştır. *BCL2* ifadesi, *TP53*'ün ifadesi ile ters ilişkili olduğu ve bu genin fonksiyonu, *TP53*'ün mutasyonlarını artırarak apoptozisi baskılayabileceğini gösterilmiştir (37,38).

Antikanser tedavisine potansiyel yanıt, tümör hücrelerinde DNA hasarına neden olur. Hücre türüne ve edinilen genetik mutasyonlara bağlı olarak, belirli bir tümör hücresi, apoptoz, mitotik felaket, otofaji veya nekroz (nonapoptotik hücre ölümü) ile ölür. Elbette

eliminasyon en olumlu sonuçtur (39). Alternatif olarak, hücre "kalıcı" bir duruma girebilir, hücre döngüsü yaşlanmış hücreler büyümeyi ve bölünmeyi teşvik edip etmediği büyüme faktörlerini salgılayarak komşu tümör hücrelerinin büyümesi veya nihayetinde hücrenin içine tekrar girip girmeyeceğine karar verir. En olumsuz sonuç, açık hücrelere apoptoz geçiremediği için terapotiye karşı dirençli olmasıdır (40).

Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriler rol alırlar. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve trans glutaminaz aktivasyonunda, gen düzenlenmesinde ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alır. Apoptoz, ölüm reseptör aracılı (veya dışsal) ve mitokondriye bağımlı (veya içsel) iki ana alternatif yolla çalışır. İlk yol, spesifik ölüm reseptörlerinin ligandları ile ligasyonu ile başlatılır. Ana ölüm reseptörleri-Fas ve tümör nekroz faktörü- (TNF-) ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörleri DR4 ve DR5 sırasıyla Fas ligandı (FasL) veya TRAIL ile bağlandıktan sonra hücre ölümünü indükler ve bunu takiben prokaspaz 8'i toplar. Bu işlem kaspaz 8 aktivasyonuna neden olur. Sonucusu, kaspaz 3'ü direkt olarak aktive ederek veya mitokondriyal disfonksiyon ve daha sonra sitokrom C'nin salınması ve kaspaz 9 ve 3'ün aktivasyonu ile sonuçlanan teklifi (BH3 etkileşen alan ölüm agonisti) parçalayarak apoptozu indükler. Kaspaz 3, DNA parçalanması da dahil olmak üzere tipik apoptoz özelliklerini teşvik eder ve birkaç dokuda hücre ölümü gerçekleşir. Mitokondriyal yol kısmen bax ve bcl-2'yi içeren mitokondriyal membrana bağlanan bcl aile üyelerinden etkilenir ki bunlar sırasıyla pro veya antiapoptotik düzenleyici proteinlerdir. Bcl-2 ile ilişkili X proteini (bax), bcl-2 homolog antagonist / katil (bak) ve tüm proapoptotik proteinler, anti-apoptotik proteinler bcl-2 ve bcl-XL, sitokrom c salınımını inhibe ederken mitokondriyondan salınmasını destekler. Sitokrom C ve deoksiadenosin trifosfat (dATP) apoptoz proteaz aktive edici faktöre (APAF-1) bağlar ve böylece apoptoz aracılı bir uygulama proteazı olan prokaspaz 9'u görevlendiren ve aktifleştiren bir multimerik kompleks oluşturur ve bu da kaspaz 3'ü aktive eder ve hücre apoptozu ile sonuçlanır (Şekil2.2) (41).



Şekil 2.2. Apoptozise yol açan ana moleküler yolların şematik gösterimi. Spesifik reseptörlere ligand bağlanması üzerine ekstrinsik yolda DISC kompleksi oluşur ve kaspaz 8 aktive olur. Mitokondriadan sit c'nin serbest yolda salınması, apoptozomun oluşumuna ve kaspaz 9'un aktivasyonuna neden olur. Kaspaz 8 ve 9, daha sonra kaspaz 3 hücre ölümüne neden olur (42).

2.1.4. Ölümsüz Çoğalmaya Olanak Sağlanması

Normal hücreler sınırlı sayıda bölünme geçirir. Yaşam ve büyüme sinyalleri inaktive olur. Hücre yaşlanarak fonksiyonlarını kaybeder ve apoptozise girer. Tümör hücreleri normal hücrelerin aksine neredeyse sınırsız replikasyon geçirir (42,43). Normal hücrelerde replikasyon potansiyeli yaşlanmanın veya krizin ortaya çıkması nedeniyle sınırlıdır ve kriz durumu genellikle hücre ölümü ile sonuçlanır. Kromozom uçlarında yer alan telomerler, hücrenin yaşlanması için çok önemlidir (44). Omurgalılarda bulunan bu kısa tekrar dizileri, "TTAGGG" birden fazla tekrarından oluşur ve kromozomların uçtan uca bağlanmalarına engel olur. Normal hücrelerde her bölünme sonrası bu kısa tekrar dizileri kısalır ve hücre yaşlanır (45). Tümör hücreleri kromozom ucundaki telomer kaybını önlemenin iki yolunu bulmuşlardır. Birincisi Tüm insan kanserlerinin yaklaşık %90'ı telomerez olarak adlandırılan ve kromozomların sonunatelomerik tekrarlar ekleyebilen özel bir enzimi ifade etmektedir, bu enzim kromozomun ucuna bu tekrar dizileri ekleyerek hücrenin ömrünü uzatır (46,47). İkincisi; geri kalan %10'u, kardeş

kromatidler arasında telomer ardışık tekrarlarının transferini içeren, konservatif 11 olmayan bir telomer uzatma yöntemi olan telomerlerin alternatif uzaması (ALT) mekanizmasını kullanmaktadır (48).

2.1.5. Anjiyogenezin Uyarılması

Çoklu sinyal yollarının sıkı düzenlenmesini içeren bir süreç olan anjiyogenez, yeni kan damarlarının mevcut olduğu fizyolojik süreçtir (49). Kanser hücreleri yaşam sinyallerin devamlılığı, antibüyüme faktörlerin baskılanması, apoptosize karşı direnç göstermesi ve sınırsız bölünmelerin yanında eğer kanser hücreleri anjiyogenez uyarma özelliğini kazanmazlarsa bu büyüme süreci oksijen ve besinlerin doğal difüzyon limiti ile sınırlanacaktır (50). Böyle bir sonuç kanser hücrelerin için istenmeyen bir durum teşkil eder (50). Tümör hücreleri bunu sağlamak için pro-anjiyogenik etmenleri uyarır veya anti-anjiyogenik uyarıları baskılar. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve kognat reseptör (VEGF reseptör 2 [VEGFR-2]) anjiyogenezin en baskın regülatörleri olduğuna dair evrensel bir görüş vardır (51,52). VEGF sinyali, yeni tümör kan damarlarının oluşumuna ve dallanmasına yol açan, hızlı tümör gelişimini teşvik eden ve metastatik potansiyumu kolaylaştıran hücrel yolları uyarır. Yeni kan damarlarının oluşması yalnızca besin maddeleri ve oksijen alımını değil aynı zamanda tümörlerin metabolik atıklarının atmasına ve hematojen metastatik sürece girmesine izin verir. Anjiyogenik anahtar “angiogenic switch” tümör ilerlemesinde de aktiftir (10).

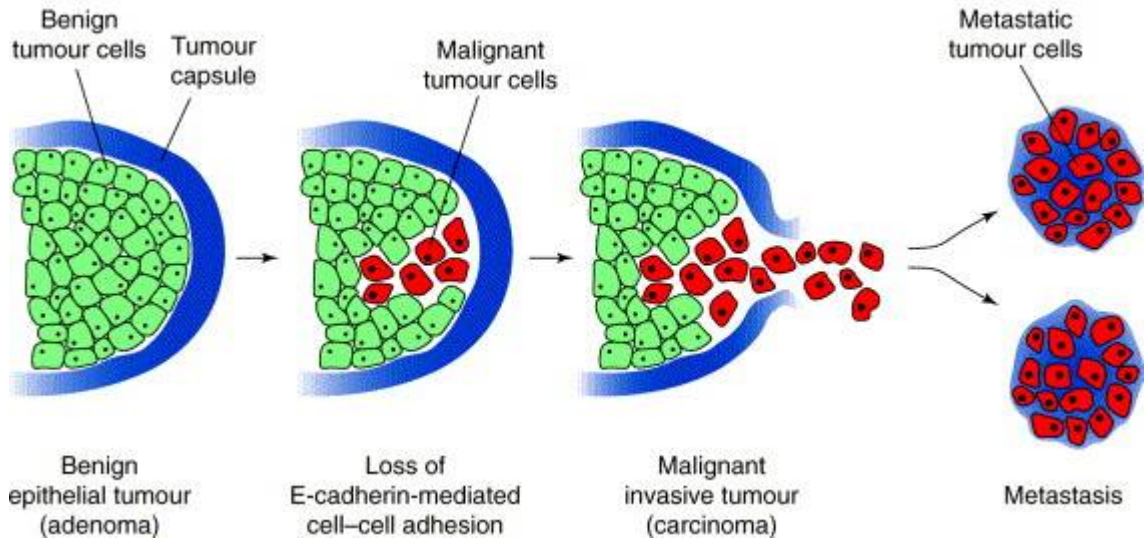
2.1.6. İnvazyon ve Metastazın Aktive Edilmesi

Kanser hücrelerinin diğer karakteristik özelliklerinden bir tanesi de doğrudan istila ve metastaz yapma yetenekleridir (53,54). Tümör hücreleri istila ve metastaz yaparken beden zayıflığı ile birlikte bağışıklık sistemini baskıladığı için çoğu insan kanserinin ölümcül olmasına neden olur (55). Genellikle kanser hücreleri morfolojik değişiklikler geçirir ve hücre-hücre veya hücre-matrik etkileşimlerini değiştirir. Bütün bunlar, invazyon ve metastazın çok basamaklı sürecinin ilk adımlarını başarıyla geçmesini sağlar. Tümörler ilerledikçe, içindeki tümörler gelişir çevresindeki normal dokulara girme kabiliyeti artar ve yeni doku oluşturmak için doku sınırları boyunca primer tümörden farklı bölgelerdeki büyüme gösterirler (56).

Epitelyal dokulardan kaynaklanan karsinomların, patolojik derecedeki malignite derecesine ilerlediği için, lokal istila ve uzak metastazlara yansıyan, en iyi karakterize

edilmiş alterasyon önemli bir hücre-hücre yapışma molekülü olan E-cadherin'in molekülüdür. E-cadherin, epitelin toplanmasına yardımcı olur. Hücrelerin bir tabaka gibi bir arada tutarak ve hücrelerin arada kalmalarını sağlar. E-cadherin ifadesinin artması, invazyon ve metastazı ilerlemesini durdururken, bu molekülünün ifadesinin baskılanması, invazyon ve metastazı artmasına neden olur. Karsinom küreler, hücre-hücre yapışmasını kodlayan genlerin ve hücre-ECM adhezyon molekülleri belirgin şekilde ifadesi değişir. Çoğunlukla bu genlerin ifadesi baskılanır (Şekil2.3)(57,58).

Son yıllarda invazyon ve metastazın aktive edilmesi "epitelyal mezenkimal geçiş" (EMT) olarak bilinen gelişimsel düzenleyici program tarafından istilanın düzenlenmesi gibi ilginç bir program önerilmiştir. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), polarize bir epitel hücresinin, artmış göç kapasitesi, artmış invazyon kapasitesi, apoptoza karşı artmış direnç ve büyük ölçüde artmış ECM (hücre dışı matris) bileşenlerini içeren ve hücrelerin epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal hücre fenotipi elde etmesini sağlayan çoklu biyokimyasal değişikliklere izin veren biyolojik bir süreçtir (59).



Şekil 2.3. E-cadherin aracılı hücre hücre yapışmasının kaybı, benign, invaziv olmayan tümörlerden (adenom) malign, invaziv tümörlere (karsinom) geçiş yapmaya katkıda bulunur (60).

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenir. Bir primer kanser hücrelerinde invaziv büyümeyi indükleme bağlamsal sinyallerin rolü kapasitesi (genellikle bir EMT aracılığıyla), geri dönüşüm olasılığına sahiptir. Primer tümör uzaktaki doku ve organlara metastaz yapıldıktan sonra stroma ve

invazyon / EMT indükleyici sinyaller aktivasoyonu azalır. Tümör hücresi yeni istala ettiği dokuda noninvaziv davranış gösterir.

Böylece, karsinoma hücreleri ilk istila ve metastatik dönemde EMT geçirirken dağıtım ters işleminden geçebilir, mezenkimal epitelyal geçiş (MET) olarak adlandırılır. Bu esneklikeyeni tümör kolonilerinin oluşumuna neden olabilir (10).

2.1.7. Genom İstikrarsızlığı ve Mutasyon

Tümör gelişimi ve başarılı koloni oluşturması birçok basamakta gerçekleşir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar, tümör baskılayıcı genlerin mutant genotipinin değişmesi sonucu fenotipi de kalıtsal olarak değiştirir (61). Bazen genom üzerinde mutasyona yol açmayan gen ifadesinin düzenlenmesini etkileyen değişiklikler genom kararsızlığına yol açabilir. Genomdaki tamir mekanizmaları olağanüstü yetenekleri sayesinde DNA'daki kusurları algılar ve çözer; spontan mutasyon her hücrede genellikle çok düşüktür. Mutant genler, tümörügezin gelişmesi ve kanser hücrelerinde mutasyon oranını artırarak, DNA kırıklarının onarılmaması sonucu mutajenik ajanlara duyarlı hale getirir. Bu da genomdaki tamir mekanizmaların çalışmasını etkiler ve mutasyon birikimini hızlandırır (62). Genomdaki kararsızlık hasar görmüş ve yaşlanmış hücreleri apoptozise gelmesini inhibe eder (63). Son on yılda yapılan çalışmalarda, tümör ile ilişkili genomik kararsızlığın önemli bir kaynağı ortaya çıkarıldı: daha önce açıklandığı gibi telomerik kaybı birçok tümörde DNA, karyotipik kararsızlık hale getirir ve bunlarla ilişkili kromozomal kesitlerin büyütülmesi ve silinmesine neden olur. Bu açıdan bakıldığında, telomeraz bu özelliğin sağlanmasından daha fazlasıdır. Genomu korumaktan sorumlu kritik görevler üslenir (64).

2.1.8. Tümör-Promotor İnflamasyonu

İnflamasyon dokuların ve hücrelerin yaralanmaya karşı; ağrı, ısı, şişme ve kızarıklık verdiği tepkidir. Akut enflamasyon yanıtı normal olarak lokalizedir ve koruyucudur. Bununla birlikte, eğer iltihaplanmaya neden olan madde uzun süre devam ediyorsa, vücuda verdiği tepki kronik bir enflamasyon haline gelir. Bu, enfeksiyon, çevre kirleticileri, inflamatuvar proteinlerin sürekli aktivasoyonu veya otoimmün reaksiyonlar nedeniyle olabilir. En önemlisi, kronik inflamasyon kanser riskini artırır (65). Kanserli bir tümör ile yara iyileşmesi süreci arasında pek çok benzerlik vardır. Her ikisi de hücrelerin büyümesi, hayatta kalması ve göçünü içerir, yeni kan damarlarının büyümesini gerektirir

(66). Önemli olan, tüm bu süreçler büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri tarafından kontrol edilmesidir. Tıpkı bağışıklık hücreleri doku tamirine başlamak için büyüme faktörleri salgılamak için yaralanma yerinin yakınında toplanırlarken, tümörler aynı zamanda kendilerini kontrol edilemeyen hücre büyümelerini teşvik etmek için aynı büyüme faktörlerini salgılayan bağışıklık hücreleri ile sarabilir. Tümör mikroçevre de görev alan Tümör ile ilişkili makrofajlar (TAM), malign tümörlerde bulunur ve bazı durumlarda hücre tümörü kitlesinin yüzde 50'sini oluşturabilir. TAM'lar kanserin ayırt edici özeliğinde görev alan sinyallerin aktif halde kalmasını sağlayarak kanser hücrelerin kontrolsüz büyüme çılgınlığıyla sonuçlanan bir evrilme dönemi geçirmesine neden olur (67).

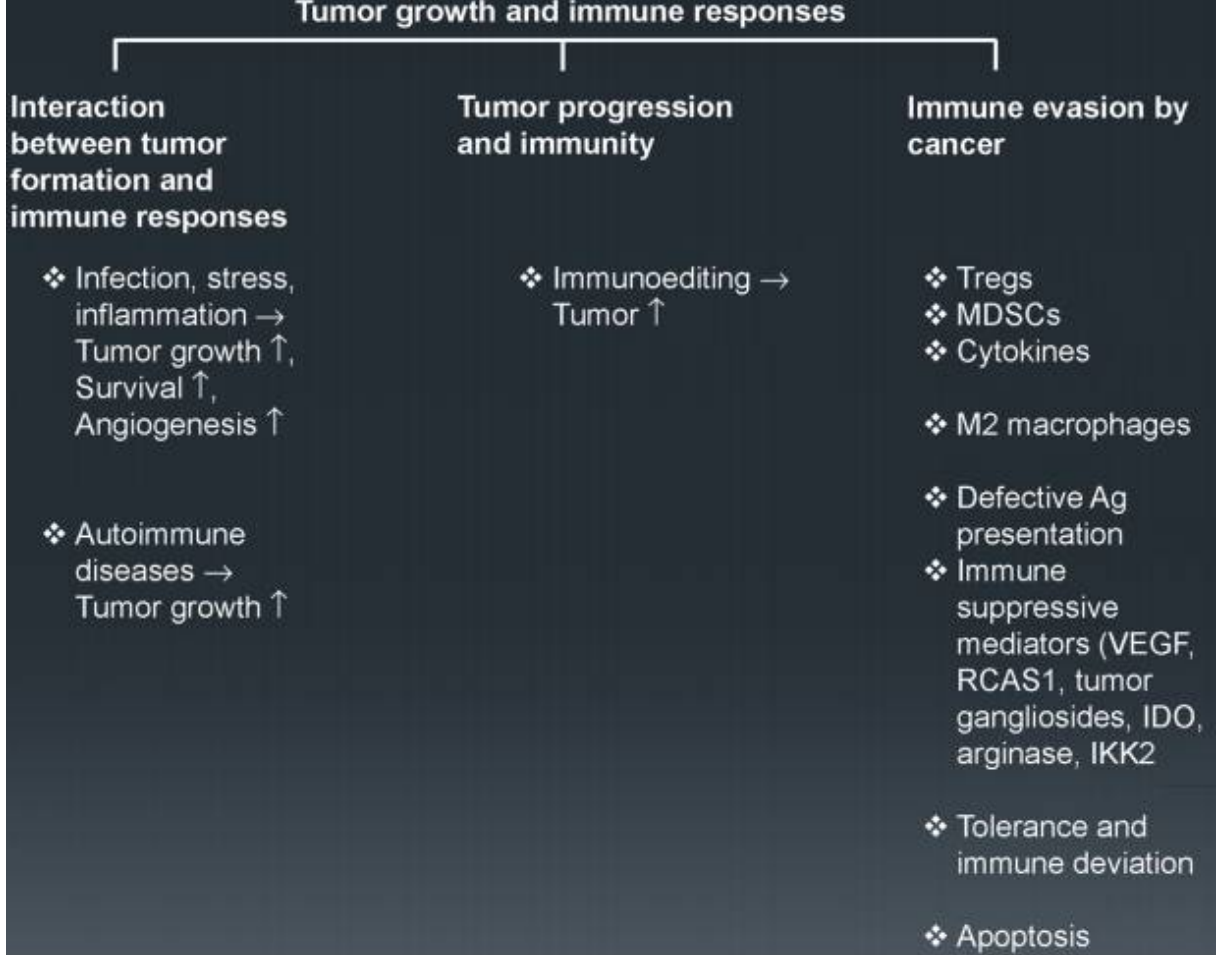
2.1.9. Enerji Metabolizmasını Yeniden Programlanması

Kanser hücreleri büyümesi ve bölünmesi için enerji metabolizmasının ayarlamaları gerekir. Aerobik koşullar altında, normal hücreler, önce sitozolde glikoliz vasıtasıyla piruvata kadar ve daha sonra mitokondride karbon dioksitte kadar parçalanarak hücre için gerekli enerjiyi üretirler. Anaerobik olarak koşullar altında, glikoliz tercih edilir ve nispeten az piruvat oksijen tüketen mitokondriye gönderilir (68). Otto Warburg, kanserde ilk hücre enerji metabolizmasındaki anormal bir özelliğini gördü. Kanser hücreleri oksijen varlığında enerji metabolizmasını glikoliz ile sınırlandırarak "Aerobik glikoliz" olarak adlandıran yeni bir düzenleme ile kendi enerji metabolizmasını yeniden programlayabilir(69). Kanser hücreleri normal hücrelere göre enerji ihtiyacını 18 kat daha düşük bir etkinlikle karşılar. ATP üretimi için sadece glikoliz yolağını kullanarak elde eder. Bunu, kısmen glikoz taşıyıcıları, özellikle de GLUT1, aktivasyonunu artırarak önemli ölçüde sitoplazmada glikoz alımını artırır (70).

2.1.10. Bağışıklık Yıkımından Kaçış

Bağışıklık sistemi, hastalık gelişiminin tüm aşamasında ve metastaza ilerleme boyunca tümörlerle yakından etkileşime girer. Bağışıklık ile kanser hücreleri arasındaki bu karmaşık çapraz etkileşim, hem tümör büyümesini inhibe edebilir hem de çoğaltabilir. Bağışıklık ile kanser hücreleri arasındaki bu etkileşim nihai sonucu belirlemektedir. Klinik açıdan bakıldığında, kanserde tümörler bağışıklık yıkımına neden olan bütün unsurlardan kaçmasından kaynaklanır. Tümör gelişimi ve hayatta kalma, kanser hücreleri, normal stromal hücreler ve konak savunma mekanizmaları arasındaki etkileşimi içeren kaotik olarak yönetilen bir süreçtir. Enfeksiyona bağlı hücresel değişiklikler veya hastalığa bağlı

stres gibi başka birçok faktör de tümör büyümesine veya tümör supresyonuna katkıda bulunabilir. Genel olarak, CD8 + sitotoksik T hücreleri (CTL) ve CD4 + yardımcı T (Th) 1 hücreleri, interferon (IFN) γ ve sitotoksinlerin üretimini yaygın olarak içeren mekanizmalar yoluyla kanser gelişimini engeller.fakat kronik inflamasyon gibi diğer faktörler kanser gelişimini teşvik eder (71).



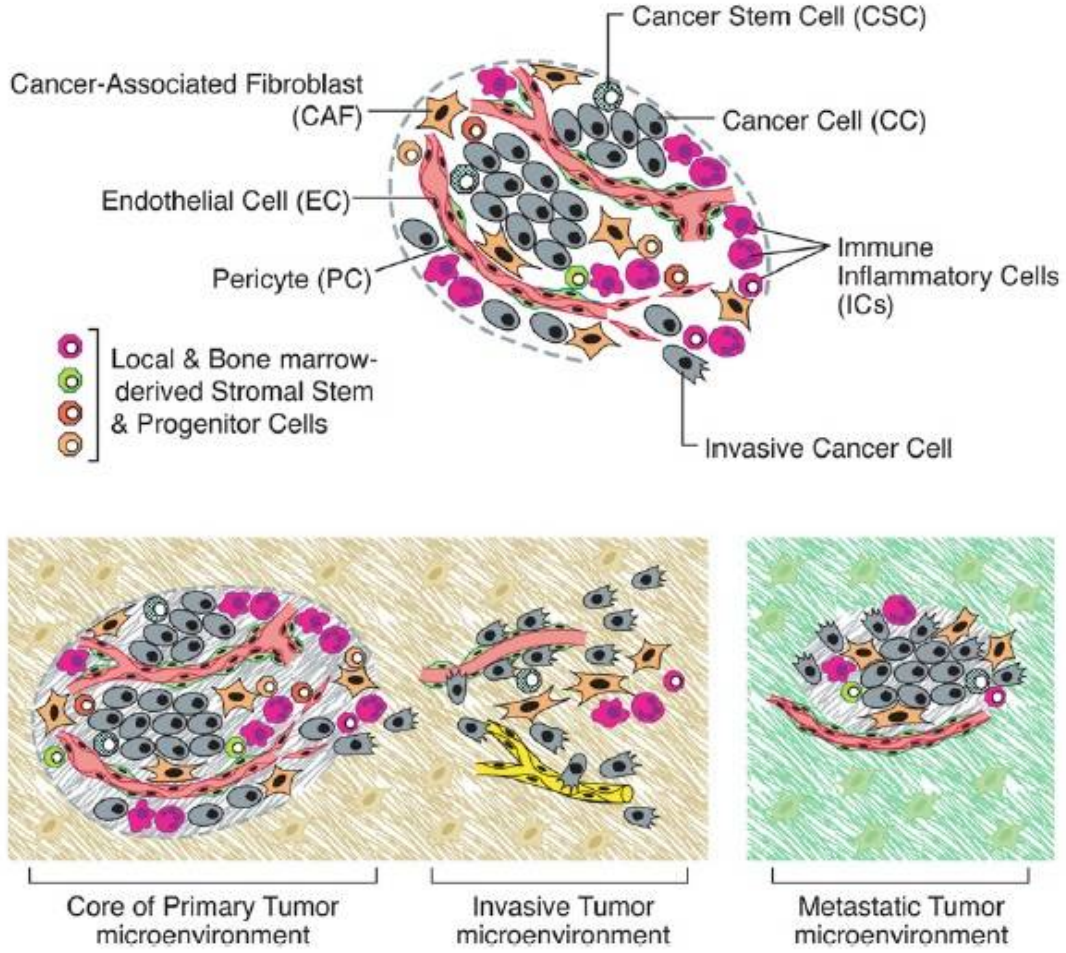
Şekil 2.4. Tümör büyümesi ve bağışıklık karşılığı. Tümör oluşumu, ilerlemesi ve bağışıklık kaçınma yöneten farklı anahtar faktörlere genel bir bakış (72).

Tümör oluşumunun en erken aşamalardan tümör mikroçevrenin bulunan bağışıklık baskılayıcı faktörler göz önüne alındığında, bağışıklık bastırıcı faktörleri kontrol eden veya ortadan kaldıran toksik olmayan maddeler kanser tedavisi için kullanılabilir veya kanser kontrolü için, kimyasal önleyici maddeler kullanılabilir (73).

2.2. Kanser Mikroçevresi

Son yıllarda tümörler yapısı giderek daha fazla tanımlanmaktadır. Bir tümörün biyolojisi anlayabilmek için içindeki özel uzmanlaşmış hücre tiplerini inceleyerek "tümör

mikroçevre" olarak tanımlı bölgede çok basamaklı tümörigenez sürecinde rollerini incelememiz gerekir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Katı tümörlerde farklı hücre tiplerinin birleşimi, Parankim ve stroma tümörler farklı hücre tipleri ve alt tipleri içerir. Toplu olarak tümör büyümesini ve ilerlemesini sağlar. İmmünflamatuvar hücreler ve alt sınıfları hem tümör teşvik edici hem de tümör öldürmeyi içerebilir (10).

Kanserli yaralarda miyofibroblastik fenotipi olan fibroblastların bir alt popülasyonu olan kansere ilişkili fibroblastlar (CAF'ler) olarak ayırt edilir. Aktivasyon sonrasında fibroblastlar, CAF'ler veya miyofibroblastlar olarak bilinir. Doğal yara onarımı sırasında miyofibroblastlar geçici olarak bulunur (74). Tümör bölgesindeki CAF'ler, yara iyileşmesinin aksine, doku fibrozunda olduğu gibi sürekli olarak aktive kalır. Fibroblast aktivasyonu, doku lezyonlarında büyüme faktörleri, direkt hücre-hücre iletişimi, lökositlerle temas eden adezyon molekülleri, reaktif oksijen türleri ve mikroRNA'yı içeren

mekanizmaları indükleyebilir. Bu CAF'lar, ECM'yi yeniden şekillendirerek, anjiyogenez indükler. CAF'lar, İnflamatuar hücreleri kullanarak, bağışıklık baskılayıcı sitokinler ve mezenkimal-epitel hücre etkileşimi yoluyla kanser hücre çoğalmasını doğrudan uyaran ve kanser ilerlemesinde belirgin bir etkiye sahiptir (75-76).

İmmün inflamatuar hücreler, fibroz, anormal anjiyogenez ve neoplazi de dahil olmak üzere çeşitli doku patolojilerine bağlı kronik enflamasyon bölgelerinde görev alır. Kanser hücrelerin tam temizlenmediği bölgelerde tümörü teşvik eden yolakların uyarır.

Adipoz dokusu, beyaz yağ dokusunu (WAT) ve adipositleri olmak üzere iki hücre türü vardır. Adipoz dokusu bazı özelliklerinin kanserle bağlantılı olduğunu kanıtlamıştır. obez adipoz doku hipoksisi, tümör üretmek için muhtemelen yüksek derece bir proenflamatuar mikroçevre oluşturur. Aynı zamanda 50'den fazla farklı sitokin, kemokin ve hormon benzeri faktörleri salgırlar (10).

Kanserle mücadelede, radyolojik müdahale, kemoterapi ve semptomları kontrol altına almaya yönelik terapatik çalmalar önemli stratejilerdir. Bununla birlikte, tümör hücreleri son derece esnektir ve tedavilere ve çevresel değışikliklere hızlı bir şekilde uyum sağlayabilirler.

2.3. Kodlamayan RNA Dünyası ve Kanser

Moleküler biyolojinin merkezi dogmasının önerisinden bu yana RNA, DNA ve protein arasındaki ara madde olarak kabul edildi Genetik bilginin biyolojik sürecin çeşitliliğine nasıl dönüştürüldüğü daha sonra, bu ara RNA'lar (mRNA'lar) sadece küçük toplam RNA popülasyonunun küçük bir fraksiyonu, oluşturduğu kodlamayan RNA'ların bulunması bilim insanların dikkatlerini buraya çekmiştir. Transkriptlerin sadece küçük bir kısmı proteini kodlar. Ancak son büyük ölçekli tamamlayıcı DNA klonlama projeleri sonucunda, memeli genomunun büyük bir kısmı transkribe edildiği belirlendi. Bu transkriplerin çoğunun fonksiyonları henüz bilinmemektedir. Genomda “karanlık madde” olduğu düşünölen kodlamayan RNA'lar (ncRNA) memeli transiptomunda ayrılmaz bir parçası olarak ortaya çıkmıştır. Bu RNA'lar protein kodlamayan dizi olarak tanımlanmıştır, ancak bu diziler biyolojik süreçlerde hem yapısal hem de işlevsel rol aldığı görölmüştür.

ncRNA'lar genetik ve epigenetik olarak işlev görür. Tanımlanan ve fonksiyonu bilinen ncRNA'ların sayısı her geçen gün artmaktadır (77). Kodlamayan RNA'lar yaygın olarak uzunluklarına göre sınıflandırılır. ncRNA'lar tanımlanırken nükleotit sayısı baz

alınır. Uzun kodlamayan RNA (lncRNA) ise; 200 nükleotitten büyük ve hücre döngüsünde, apoptoz, hücre çoğalması, genetik ve epigenetik gibi birçok biyolojik süreçte rol alan dizilerdir (78).

2.3.1. Kısa Kodlamayan RNA'lar

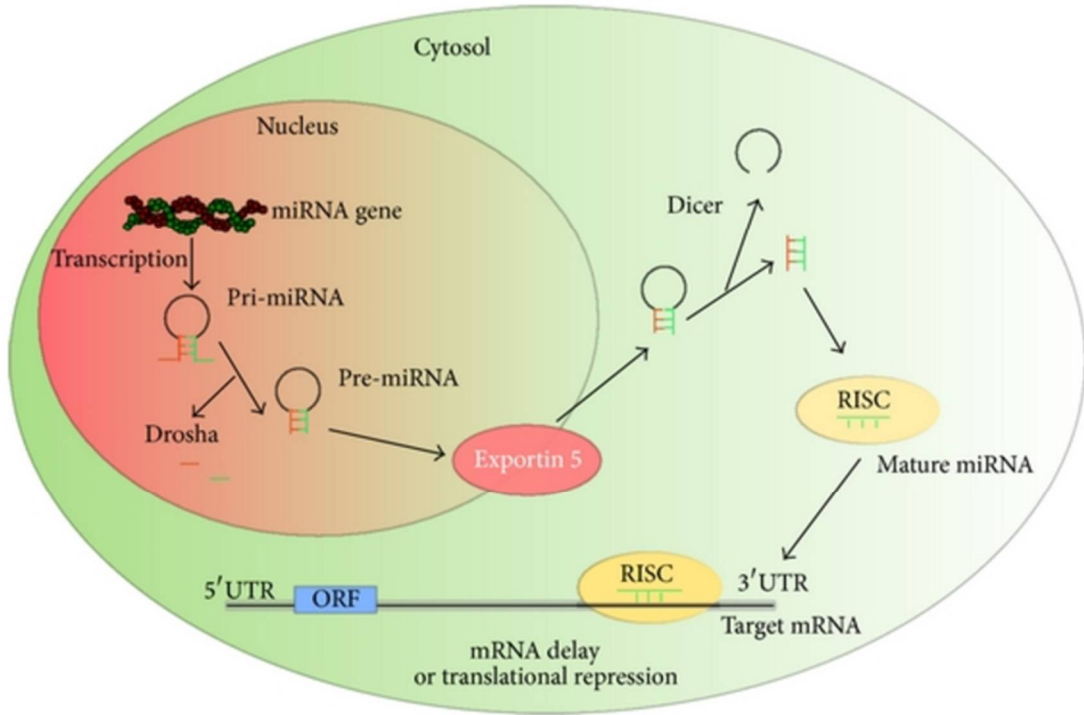
ncRNA'ların büyük bir kısmı kısa düzenleyici RNA'lardan oluşmaktadır. Bu RNA'lar, RNA enterferans (RNA interference-RNAi) mekanizması ile gen ya inhibe veya deprese ederek susturulur. Bu mekanizma, milyarlarca yıl önce, hücrelere saldıran virüslere karşı geliştirilmiş bir savunma mekanizması olarak keşfedilmiştir (77). Günümüzde artık, RNAi mekanizmasının gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptoz gibi önemli süreçlerin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir. Kısa düzenleyici RNA'ların uzunlukları 15-40 baz çifti arasında değişir. siRNA (small interfering RNA), mikro RNA (miRNA) ve PIWI (P-element induced wimpy testis) proteini ile etkileşimi olan RNA (piRNA) kısa düzenleyici RNA'lara örnek verilebilir (79).

2.3.1.1. Mikro RNA'lar

İlk defa *C.elegans*'ın gelişimini çalışan Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında tanımlanmıştır. mikro RNA (miRNA)'lar, genellikle 18-22 baz uzunluğunda, protein kodlayıcı olmayan, hücreler tarafından doğal olarak üretilen RNA'lar olarak bilinir (80). miRNA'lar hedef mRNA'nın translasyonel etkinliği ya da kararlılığını düzenleyerek gen inhibe ederler (80). miRNA'nın uygun dizi hedeflemesi, hedef dizi üzerindeki miRNA ve mesajcı RNA (mRNA) arasındaki baz eşleşmesine bağlıdır. Eğer dizilerde eşleşme %100 olarak gerçekleşmiyorsa miRNA mRNA'nın okunmasını baskılar. Tam baz eşleşmesinin olduğu durumlarda ise miRNA, mRNA'yı yıkıma götürür. miRNA genelde baz eşleşmesini mRNA'nın translasyona uğramayan bölgesinde (3' UTR) gerçekleştirir (80).

miRNA mekanizması şu şekilde gerçekleşir. Hücre çekirdeği içinde RNA Polimeraz II (RNA Pol II) veya RNA polimeraz III (RNA Pol III) ile pri-miRNA'lar oluşturulur. RNaz III endonükleaz "Drosha" enzimi ve çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein "Pasha kompleksi" tarafından işlenerek Pre-miRNA dönüştürülür (81). Pre-miRNA'lar çekirdek zar proteini "exportin-5" aracılığıyla sitozole aktarılır. Sitozole aktarılan pre-miRNA'lar doğrudan RNaz III endonükleaz "Dicer" kompleksine bağlanır (81). Dicer, pre-miRNA saptanmışını kestikten sonra, iki tamamlayıcı kısa RNA molekülü meydana gelir. Dicer aynı zamanda RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex)

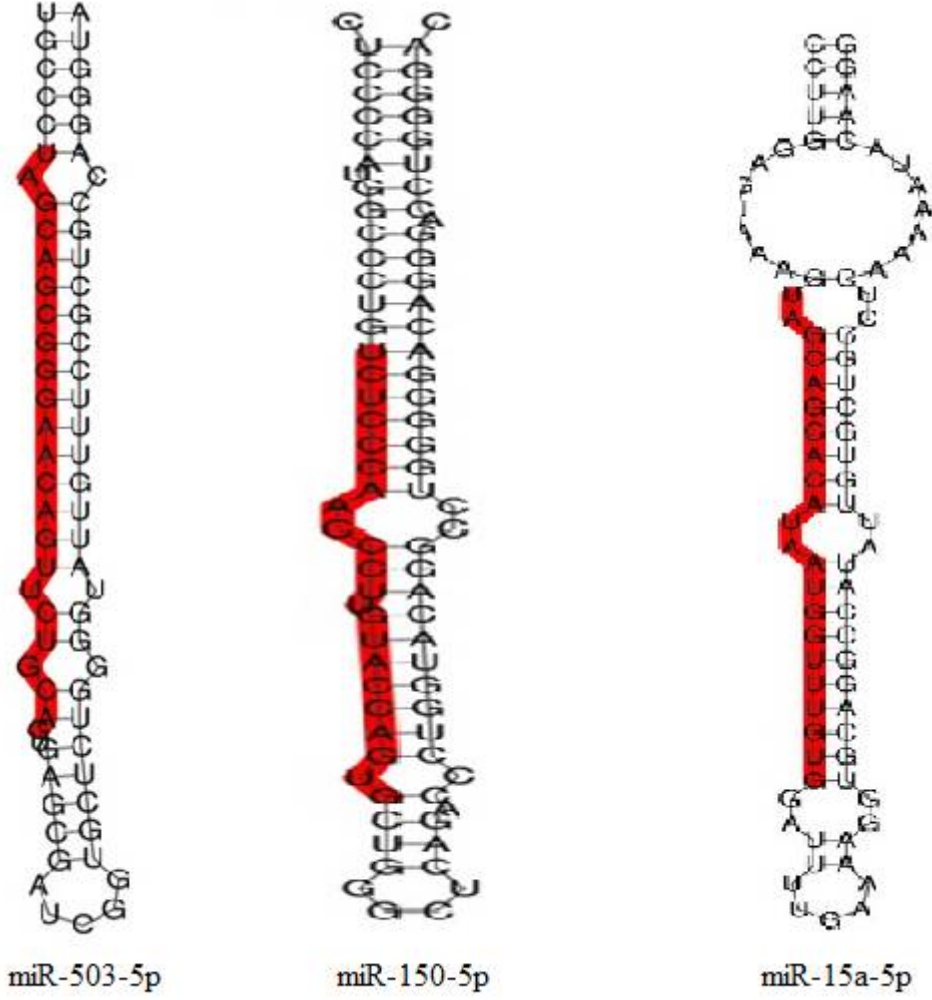
RISC'nin oluşumunu başlatır. Bu iki kısa RNA'dan sadece biri RISC'e dahil olur (Şekil 2.6)(82).



Şekil 2.6. MikroRNA biyosentezi (83).

miRNA'lar mesajcı RNA'ları hedefleyerek ya da işlevsel özelliklerini baskılayarak gen ifadesini düzenler, mRNA çevirisini bloke ederek protein sentezini durdurur. Böylece hücre çoğalması, hücre farklılaşması apaptoz gibi önemli olaylarda kritik rol oynarlar.

Çalışmamızda miRNA ve miRNA-lncRNA data veri tabanlarını araştırarak MALAT1'i hedefleyen veya hedefleyebilecek bu potansiyele sahip miRNA'lar seçildi.



Şekil 2.7. Çalışmamızda kullanılan mikro RNA'lar.

2.3.2. Uzun Kodlamayan RNA'lar

Son yıllarda lncRNA'lar, potansiyel olarak yeni ve önemli bir biyolojik düzenleme döngüsünde yaygın ilgi görmüştür. lncRNA'lar geniş bir hastalıklar yelpazesinde gelişimsel süreçlerde yer alırlar, ancak bunların hareket ettirdikleri mekanizmalar hala şaşırtıcı derecede sınırlıdır ve memeli genomunun tamamı, tartışmalı olmaya devam eden fonksiyonel kodlamayan transkriptlere dönüştürülür. Çekirdek proteinlerin katalitik ve yapısal fonksiyonları düzenlemesini araştıran merkezlerin sayıları giderek artmaktadır. lncRNA'lar büyük ölçüde biyoinformatikle belirlenir. Yüksek verimli sekanslama ve biyoinformatik yöntemler, lncRNA'ların büyük ölçekli tanımlanmasında muazzam ilerleme sağlamıştır. Bununla birlikte, klasik bir moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak lncRNA'ların ampirik geçerliliği hala gereklidir. Küresel yaklaşımları kullanarak potansiyel bir lncRNA transkriptinin yaklaşık konumunu öğrendikten sonra, cDNA ucunun

(RACE) 5'- ve 3'-hızlı amplifikasyonu, tam transkripsiyon başlatma ve sonlandırma yerlerini belirlemek ve mevcut ya da sonlanmayı incelemek için yapılabilir 5'-kapleyip ve 3'-poliadenosin kuyrukları takılır.

Genellikle protein kodlama potansiyeli olmayan, 200 nükleotidden büyük RNA moleküllü olarak tanımlanır (84). Ayrıca lncRNA, işlevsel özelliklerine göre makroRNA veya uzun intergenik kodlamayan RNA (lincRNA) gibi isimlerle de ifade edilir. LncRNA'lar sık sık örtüşen protein kodlayan ve kodlamayan transkriptler arasına serpiştirilmiştir.

lncRNA'ların uzunlukları, farenin cDNA kütüphanesinin büyük ölçekli dizilemesi sonucunda keşfedilmiştir. Son yıllarda lncRNA'nın farklı kanser türleri üzerinde etkisi araştırılmış fakat güçlü deliller ortaya konulamamıştır. Ancak daha sonra lncRNA dizilerinin belirlenmesi ve fonksiyonel özelliklerin açığa çıkmasıyla, doku, organ ve hastalıklar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi zamanla artmıştır (84).

Bu lncRNA'lar birçok belirli dokularda farklı zamanlarda, ifade seviye de ifade olur. Örneğin kanserin gelişim süreçlerinde, nörodejaneratif alzaimer hastalıklarında farklı zamanda farklı seviyede ifade edilir (85). İlk lncRNA yaklaşık 20 yıl önce DNA'daki bilgileri mRNA'ya aktaran, mRNA'yi baskılayan H19 geninin bulunması, özellikle mesane kanserinde emriyonik ve tümör büyümesini düzenlemesi ile lncRNA varlığı keşfedilmiştir. Kısa bir süre sonra X kromozomun in aktif hale getiren özel inaktif transkrip (XIST'in) tanımlanması ile ncRNA için düzenleyici ve yapısal fonksiyonlar önerilmeye başlanmıştır. İlerleyen zamanlarda Protein kodlamayan gen bölgelerindeki tümör baskılayıcı GAS5, küçük nükleolar RNA (snoRNA)birkaç transkriptin keşfedilmesi sağlandı. Prostat kanser antijen 3 lncRNA PCA3 DD3 malignant prostat kanserinde aşırı ifade edilmesi ile lncRNA'ların kansere özgü ifade edildiği algısı güçlendirmiştir (86).

İnsan genomunun ayrıntılı açıklanması ile kodlayan bölgelerde birçok transkriptin sessiz olması bu transkriptin gerçek anlamda bir lncRNA olduğuna işaret eder. Son 6 yıllık süreçte tespit edilen lncRNA'ların %15 nin fonksiyonlarının açıklanması beklenmektedir. Son yıllarda 6000 lncRNA'dan 14000 lncRNA'ya yeni transkriptlerin bulunacağı tahmin edilmektedir. Henüz keşfedilmeyi bekleyen binlerce belki milyonlarca lncRNA dizileri bulunuyor. Protein kodlayan bölgeleri ile örtüşen lncRNA'ların analizleri hala yapılmamıştır (86).

2.3.2.1. Uzun Kodlamayan RNA'ların Özellikleri

lncRNA'lar ortak bir hareket modu ile tanımlanamamıştır. Bu diziler gen ifadesinin yanı sıra protein sentezini de düzenler. Bazı lncRNA'lar kromatin düzenlemesi ve yapısını yanında doğrudan yazılımı düzenleme işlevleri deneysel olarak tanımlanmıştır. LncRNA'lar transkript sonrası yapıştırma, düzenleme, lokalizasyon, çeviri ya da yıkma gibi RNA işlenmesini düzenler (87).

2.3.2.1.1. Sinyal modeli

Molekül sinyali ya da yazılım aktivitesinin bir göstergesi olarak işlev görür. Bu model lncRNA'lar, işlevsel olarak önemli biyolojik olayların belirteçleri gibi davranabilir.

2.3.2.1.2. Yalancı (decoy) Modeli

Uzaktaki diğer düzenleyici RNA'ları ya da proteinleri titre ederek bağlar veya uzaklaştırır, ama başka hiçbir ek işlev göstermez.

2.3.2.1.3. Rehber (Guide) modeli

Belirli hedeflere ribonükleoprotein karmaşımlarını (kompleksleri) lokalizasyonunu yönlendirir. Bu model lncRNA rehber RNA'dır ve proteinlere bağlanarak lncRNA ribonükleoprotein karmaşımının özgül hedeflere lokalizasyonunu yönlendirir.

2.3.2.1.4. İskele (Scaffold) modeli

İlgili moleküler bileşenler (proteinler ve veya RNA) monte edilebileceği bir platform gibi yapısal bir role sahiptir. LncRNA'lar, ribonükleoprotein karmaşımlarını oluşturmak için birçok proteini bir araya getirebilir.

2.4. MALAT1

lncRNA MALAT1, başta akciğer kanseri olmak üzere birçok kanserde önemli roller üstlenir. MALAT1 yüksek oranda korunmuş ve 8000 bazuzunluğundadır. MALAT1'in kanser metastazı ve rekürrensi içerdiğini ve akciğer kanseri, uterus sarkomları ve hepatosellüler karsinomalar da dahil olmak üzere birçok solid tümörde aşırı ifade olduğu tespit edilmiştir (88). Bu uzun transkript kolonikal poly(A)kuyruğu olmamasına rağmen 3'lü sarmal yapısı ile kararlı hale gelir. Bu transkript ribonükleoprotein komplekslerinin moleküler yapısını düzenlediği için çekirdekte bulunuyor. Bu lncRNA onkogen genlerin ifadesini düzenleyerek hücre mortalitesi, invazyon ve metastaz yapar.

LncRNA'lar birçok hastalıkla ve kanserle ilişkilendirilmiştir. Kodlamayan nükleer zenginleştirilmiş transkript2 (noncoding nuclear-enriched abundant transcript 2) [NEAT2]); PRO2853; linc00047; ncRNA0iq0047 olarak bilinen lncRNA'lar; akciğer kanserinde, metastazın tespitinde biyobelirteç olarak kullanılır. MALAT1, böbrek, beyin, kalp, tiroit, meme, adipoz, yumurtalık, kolon, pankreatik, akciğer, kolon ve karaciğer gibi birçok organda yüksek oranda ifade edilir (89).

MALAT1'in ifadesi mesane ürotelyal karsinomunda normale göre yüksek oranda ifade edildiği belirlenmiştir. Bu lncRNA inhibe edildiğinde mesane kanserinde hücre büyümesi, apoptozis ve hücre hücre motalitesi azaltmıştır (89). Bu lncRNA akciğer kanseri metastazında etkindir. ncRNA'larla susturulduğunda akciğer kanser hücrelerinde hücre migrasyonunu engeller ve post transkripsiyonel değişiklikleri düzenler. Yine Short hairpin RNA ile susturulduğunda boyun kanseri hücre hatlarında proliferasyon ve invazyonu azaltır.

MALAT1, Serin /Arjinin proteinlerin aktif seviyelerini düzenleyerek (alternatif splicing) uç uca eklemeyi düzenler (90). Öncül mesajcı RNA'nın splicing faktörleri ile transkripsiyon bölgesi düzenlenmesinde ve post-transkripsiyonel gen ifadesini düzenler (91). MALAT1 memelilerde ifadesi yüksek oranda korunmuştur. Birçok kanserde işlevi tartışmalıdır. Birkaç farklı mekanizmada önemli rol oynar. Stoplazmada üretilen mscRNA (yeni tRNA- ncRNA gibi) MALAT1' in 3 ucu) RNase P ve RNase Z tarafından ayrılabilir, sonra serin /arjinin proteinlerin aktif seviyelerini kontrol ederek uç uca eklemeyi düzenleyebilir. Dahası MALAT1 CBX4'a (Chromobox homolog 4) bağlanabilir. Hem Pc2 (Polycomb 2), sevk edilir hemde Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) ile birleşir (92). Tüm bu etkileşim kontrolleri, interkromatin granüllerin yeniden yerleşmesi ve gen ifadesinin susması ve aktivitenin artması ile açıklanabilir. Böylece MALAT1 bilinen belirli genleri, birkaç hücre döngü kontrol genleri (p21, p27 ve B-MYB) ve metastazla ilişkili genleri (MIA2, ROBO1,CTHRC1 ve CCT4) düzenleyerek kanser hücre hatlarında, hücre göçüne, hücre yayılımına ve hücre çoğalmasına dolaylı olarak etki eder (92).

Daha önce yapılan çalışmalarda, MALAT1'in hücre döngüsü sırasında ki rolü ve insan hücrelerinde MALAT1'in gen ifade düzeyi, hücre bölünmesi sırasında düzenlendiği açıklanmıştır (11). Ayrıca MALAT1-depleted (tükenmiş) hücrelerde hücre döngüsünde keşfedilen hasarlarda p53 seviyesine duyarlı olması MALAT1' in önemli bir efektördür. Sonuç olarak MALAT1, onkojenik transkripsiyon faktörleri ve hücre döngüsü işleyişini

özellikle mitotik ilerlemeleri sırasında öncül mRNA işlenmesi veya ifade seviyesi, düzenlemelerinde rol oynar (93).

MALAT1' in hücresel seviyeleri G1/S ve M esnasında esnasında yüksektir. Hücre döngüsünde DNA eşlenmesi fazına girmesi ve/veya hücre bölünmesi geçirmesi (M) gibi iki önemli evre vardır. MALAT1, hücre döngüsü ilerleyişinde G1/S ve mitotik evrede anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Hücre döngüsü kontrol fonksiyonu olarak bilinen B-MYB transkripsiyon faktörüdür. B-MYB farklı belirli kanser tiplerin de yüksek oranda ifade edilir. Transkripsiyon faktörlerinden biri olan B-MYB ailesi hücre döngüsünde rol oynayan nükleer bir proteindir. Bu kodlanan protein, S fazında hücre döngüsü ve ilerleyişi sırasında siklinA / siklin-bağımlı kinaz 2 ile fosforile ederek hem aktivator hem de represör aktivitesini artırır. B-MYB kendi transkripsiyonel özelliklerine ek olarak çok birçok basamakta görev alan bir proteindir. Hücre döngüsünde diğer düzenleyicilerle doğrudan etkileşim halindedir (94). Yakın zamanda yapılan son araştırmalar S fazında B-MYB, MuvB (complex) ile ilişkili çoklu proteindir ve mitosis sırasında aşırı ifade olur (94).

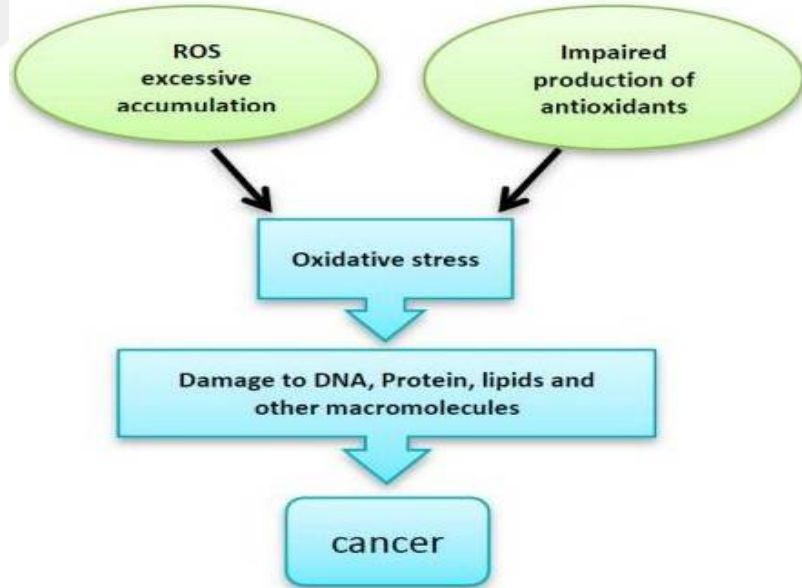
Sonuç olarak MALAT1'in ifade edilmediği hücrelerde B-MYB çoğu mitotik genlerin ifadesini göstermektedir. MALAT1'in ifade edilmediği hücrelerde B-MYB anormal genlerin ifadesinden sorumludur. Yakın zamanda chip-seq veri tabanına göre B-MYB, MALAT1'in promotor bölgesine bağlanmaktadır ve MALAT1 'in ifadesini düzenlemektedir. Bu da B-MYB ve MALAT1 olumlu düzenleyici döngünün bir parçası olabileceğini göstermektedir (93). MALAT1 ile yapılan çalışmalar gösteriyor ki, insan hücrelerinde B-MYB onkojenik yazılım faktörünü pozitif olarak düzenler. Ayrıca farklı kanser türlerinde MALAT1'in anormal ifadesinin dikkat çekici derecede arttığı tespit edilmiştir. Her ne sebepten olursa olsun MALAT1'in ifadesi karsinogenezdeki etkisinin araştırılması gerekmektedir. Tüm bu araştırmalara dayanarak hücre döngüsü ilerlemesinde veya hücre ölümünde rol alan genlerin, belirli hücrelerdeki veya dokulardaki anormal ifadesi, anormal alternatif eklemeler, tümörün ilerlemesinde önemli katkı yapmaktadır (95).

2.5. Serbest Reaktif Türler ve Kanser

Reaktif oksijen türleri (ROS), kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkta önemli bir etken olduğu bilinmektedir. ROS'un neden olduğu oksidatif hasar, transkripsiyonel inhibisyon veya indüksiyona neden olan DNA mutasyonlarına, sinyal iletim yollarının geliştirilmesi veya yeniden düzenlenmesi, proliferasyon kaynaklı hataların neden olduğu genomik anormalliklere neden olabilir (96).

ROS, endojen antioksidanlarla birlikte her yerde bulunan heterojen bir moleköl grubu olarak tanımlanabilir. Genellikle aerobik hücrelerde üretilirler. Olgun myeloid hücreler doğuştan gelen bağışıklık tepkileri sırasında ROS oluştururlar. Düşük ROS seviyeleri, normal hücre proliferasyonunu ve ayrıca hücre içi sinyallerini düzenler. Bu nedenle, molekülleri işaret eden ikincil bir haberci gibi davranmaya eğilimlidirler. Oksijenin zararlı etkisi, oksidatif stres adı verilen bir süreçte ROS ile antioksidanlar arasındaki sıkı düzenlemenin bozulmasıyla ortaya çıkar. Bu bozukluk ROS'un aşırı birikimi, antioksidan küçük moleköl üretimini yetersizliği, antioksidan enzim sistemlerinin bozulması veya redoks dengesine bağlı transkripsiyonel faktörlerin değişmesi nedeniyle oluşabilir (97).

Oksidatif stres malign transformasyonlar ve birçokçeşitli klinik komplikasyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. ROS, DNA ve protein oksidatif hasar, tümör süpresör genlere somatik mutasyonlar (P53 gibi) neden olabilir. ROS ayrıca proto-onkogenlerin ekspresyonunu indükleyebilir (Şekil 2.8) (98).



Şekil 2.8. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı birikimi, antioksidan enzimlerin bozulmuş üretimi ve / veya antioksidan savunma sistemi, DNA, protein ve diğer intraselüler makromoleküller hasarına neden olabilir, bu da son zamanlarda malign transformasyona neden olur (99).

3. MATERYAL METOD

3.1. Hücre Kültürü Öncesi Sterilizasyon

Hücre kültüründe kullanılan tüm plastik malzemeler ve hazır olarak bulunan steril medyumlar ticari firmalardan sağlandı. Cam malzemeler 160°C’de 60-90 dakika sterilize edildi (otoklavlandı). 0,22 µm delik büyüklüğündeki mikrobiyolojik filtreler kullanılarak tüm sıvı maddeler süzüldü ve steril edildi. 20 dakika ultraviyole ışık açılarak ve bunu takiben 15 dakika havalandırılarak Steril kabin (SafeMate 1.2, BioAir, LAF Technologies Pty Ltd, Victoria, Avusturalya) steril edildi. Sterilize edilen kabine alınacak malzemeler ise %70 alkolle silinerek steril alındı.

3.2. Hücre Soyları ve Kültür Aşamaları

Çalışmada kullanılacak olan hücre soyları A549, BEAS-2B, MCF-7, hTERT-HME1, U2OS ve HUVEC ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Bu hücre soylarının ATCC adları, kanser durumları, morfolojisi ve histopatolojileri Tablo 3.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan hücre soyunun özellikleri

Hücre soyu	ATCC adı	Kanser	Morfolojisi	Histopatoloji
A549	(ATCC® CCL185™)	Karsinom	Epiteyal	Küçük hücreli olmayan karsinom
BEAS-2B	(ATCC® CRL-9609™)	Normal	Epiteyal	Akciğer, bronş
MCF-7	(ATCC® HTB-22™)	Adenokarsinom	Epiteyal	Praveral efizyon
hTERT-HME1	ATCC® CRL4010	Normal	Epiteyal	Meme bezi
U2OS	(ATCC® HTB-96™)	Osteosarkoma	Epiteyal	Kemik
HUVEC	(ATCC® PCS-100-010™)	Normal	Endotel	İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücreleri

Bu hücre hatları 25 cm²'lik flaskta, 100 ml besiyeri içinde, 10 ml Fetal Sığır Serum (FCS) (Sigma, Deisenhofen, Almanya), 1 ml Penisilin/streptomisin solüsyonu (Sigma, Deisenhofen, Almanya) destekli 5 ml 10x DMEM solüsyonu (Sigma, Deisenhofen, Almanya) olacak şekilde % 5 karbondioksitli ortamda çoğaltıldı. Hücre soyları ilk geldikleri gün, 37°C karbondioksitli etüvde 24 saatliğine dinlendirmeye bırakıldı. 48 saat sonra flasktaki tüm besiyeri steril pipet yardımıyla çekildi. Besiyeri çekilmiş flasklara 37°C su banyosunda ısıtılan 1X'lik Tripsin'den 1-2 ml eklendi. Flasklar 5-7 dakika 37°C CO₂ etüvde bekletildi. Daha sonra flasklara 5 ml FCS'li DMEM eklenerek Tripsin'in aktivitesini durduruldu. Kalkan hücreler, 50 ml'lik flakonlara alındı. Flakonlara alınan 5 ml FCS'li DMEM ortamındaki hücreler 75 cm²'lik flasklara aktarıldı ve 10 ml FCS'li DMEM eklenerek % 5 karbondioksitli 37°C ortamda yetiştirildi. Hücre soyu karbondioksitli etüvde 24 saatliğine dinlendirmeye bırakıldı.

24 saat sonra flasktaki tüm besiyeri steril pipet yardımıyla çekildi. Besiyeri çekilmiş flasklara 37°C su banyosunda ısıtılan 1X'lik Tripsin'den 1-2 ml eklendi. Flasklar 5-7 dakika 37°C CO₂ etüvde bekletildi. Flask tabanına tutunmuş hücrelerin birbirlerinden ayrılmaları inverted mikroskop ile kontrol edildi. Daha sonra flasklara Tripsin'in aktivitesini durdurmak için 5 ml FCS'li DMEM eklendi. Kalkan hücreler, 50 ml'lik flakonlara alındı ve oda ısısında 3000 devir ile 4 dakika boyunca santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı. Dipte kalan hücreler hafifçe çözdürüldü ve yaklaşık 0,5 ml sıvı içerisindeki hücreler steril pipet yardımıyla alınarak, önceden içlerine 4 ml besi yeri konmuş flakona aktarıldı.

3.3. Mimik RNA'ların Besi Ortamındaki Hücrelere Aktarılması

1. nmol mimik miRNA (QIAGEN) (miR-503-5p, miR-150-5p, miR-15a-5p) 50 µl RNase saf su (RNase free water) ile çözdürüldü. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 12'lik well plateki her kuyucuğa 1ml FCS'li DMEM ortamında 200.000-300.000 hücre olacak şekilde complete medium ekildi. 0,5 ml ependorf tüplere 200 µl DMEM konuldu. Üzerine RNase saf su ile çözdürülmüş 0,3 µl mimik RNA ve 6 µl transfection reagent konulup kısaca vortekslendi. 5-10 dakika inkübe edildi. Hazırlanan karışım damla damla hücrelerin üzerine damlatıldı ve karışımında emin olmak için well plate hafifçe çalkalandı. Hücreler 37°C karbondioksitli etüvde 48 saatliğine dinlendirmeye bırakıldı.

3.4. Hücre Soylarından Total RNA Eldesi

Hücre soylarından total RNA izole etmek için miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılmıştır.

Kitin çalışma presedörü bâz alınarak RNA elde edilmiştir. Prosedör aşağıdaki gibidir:

- Çoğaltılan hücre soyları kaldırıldı, santrifüj yardımıyla çöktürülüp, süpernatant atıldı ve üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent eklendi.
- 2. Elde edilen homejenat oda sıcaklığında (15–25°C) 5 dakika boyunca inkübe edildi. Üzerine 140 µl kloroform eklendi ve 15 sn boyunca çalkalandı. 2-3 dakika boyunca oda sıcaklığında tutuldu.
- 15 dakika boyunca 4°C’de 12.000 g’de santrifüj yapıldı ve üst faz temiz bir tüpe alındı.
- Tüpteki miktarın 1,5 katı (yaklaşık 600 µl) 100% etanol eklendi ve pipet ile iyice karıştırıldı.
- En fazla 700 µl örnek 2 ml toplama tüpü içerisindeki RNeasy® Mini kolona yüklendi ve oda sıcaklığında 20 sn boyunca 8000 g’de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı. Kalan örnek olduğunda işlem tekrarlandı.
- Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 700 µl Buffer RWT çözültisi eklendi ve oda sıcaklığında 20 saniye boyunca 8000 g’de santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.
- Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona bu sefer 500 µl Buffer RPE çözültisi eklendi ve yine oda sıcaklığında 15 saniye boyunca 8000 g’de santrifüj yapıldı. (Not: Kullanmadan önce Buffer RWT ve RPE çözültilerine %96-100 etanol eklendi.) Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.
- Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona tekrar 500 µl Buffer RPE çözültisi eklendi ve bu sefer oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 8000 g’de santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.
- 1,5 ml’lik toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 30–50 µl RNase içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. Daha sonra 1 dakika boyunca 8000g’de santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki birikinti total RNA’yı içermektedir.

3.5. RNA Örneklerinden Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Yöntemi ile cDNA Eldesi

3.5.1. mRNA'dan cDNA eldesi

Elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için Ipsogen RT Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı.

Test edilecek (10 µl) her bir RNA örneğinin 1 µg'ı 65°C'de 5 dakika süreyle inkübe edildi. Hemen 5 dakika buzda bekleterek soğutuldu. Tüpün altındaki sıvıyı toplamak için kısa süreli santrifüj edildi. Revers Transkriptaz ön karışımı buzda hazırlandı ve buzda tutuldu.

Tablo 3.2. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımının içerikleri

Bileşenler	Örnek başına hacim (µl)
5x Revers Transkriptaz tamponu	5
dNTP	2
Random primer (100 µM)	5,25
RNaz İnhibitörü (40 U/µl)	0,5
Ters transkriptaz (200 U/µl)	1
DTT	1,25
RNaz içermeyen su	0,5
Örnek başına RT ön karışım hacmi	15,5

Ön karışım titizlikle karıştırıldı, kısa süreli santrifüj yapıldı ve her bir RNA örneğinin üzerine ön karışımdan 15 µl eklendi. Her bir tüp dikkatlice karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj edildi. Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) cihazındaki kayıtlı revers transkripsiyon programı çalıştırıldı (Tablo 3.3). Tüpün altındaki cDNA'yı toplamak için kısa süreli santrifüj edildi ve qPCR gerçekleştirilene kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 3.3. mRNA'dan cDNA eldesinde revers transkripsiyon için termal döngüleyici ayarları

Süre (dakika)	Sıcaklık (°C)
10	25
60	50
5	85
∞	4

Tepkime tamamlandıktan sonra elde edilen tek sarmal cDNA örneklerinin dondurulup çözülerek oluşan kaybı önlemek için 0.2 ml'lik PCR tüplerine 2 µl eşit miktarlarda dağıtıldı. Eşit miktarlarda bölme işlemi yapıldıktan sonra cDNA'ların kullanım ömrünü uzatmak için -80°C'de muhafaza edildi.

3.5.2. Elde edilen cDNA'lardan kalite ve miktar tayini

İfade analizi deneyleri öncesi elde edilen cDNA örneklerinin miktarlarını ve kalitesini belirlemek amacıyla ve tüm örnekleri aynı yoğunlukta reaksiyona tabi tutmak amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Kalite ve miktar tayini Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System (BioTek, Winooski, United States) kullanılarak yapıldı. İfade analizi deneyleri öncesi örneklerden elde edilen cDNA miktarları mRNA cDNA'sı için 50 ng/µl'e çekildi.

3.6. MALAT1 ve B-MYB İfade Düzeyleri Ölçümü için Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR) Yöntemi

Eş zamanlı PCR reaksiyonu DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibine olanak sağlar. SYBR Green bu amaçla sıklıkla kullanılan boyalardan biridir. SYBR Green çift iplikli DNA molekülüne bağlanarak floresan ışımaya verir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. SYBR Green boyasından alınan ışımının sınır değeri aştığı noktaya Ct ya da Cp değeri adı verilmektedir. Bu noktada DNA amplifiye olmuş ve DNA'ya bağlanan boyanın verdiği ışımaya sınır değeri aşmıştır. Işımanın sınır değeri aştığı anda amplifikasyondan emin olunur ancak doğru ampikonun takibinin yapıldığının belirlenebilmesi için erime eğrisinin

incelenmesi gerekmektedir. Çünkü SYBR Green belirli bir DNA molekülüne bağlanan özgül bir boya değil, tüm çift iplikli DNA moleküllerine bağlanan bir boyadır.

3.6.1. Primer Seçimi

MALAT1 ve B-MYB primerleri, NCBI veritabanında yer alan “Gene” arayüzü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) kullanılarak tasarlandı. Kullanılan primerlerin ileri ve geri primer dizilimleri Tablo 3.4’te gösterilmiştir. Bütün genlerle ifade olan housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı.

Tablo 3.4. MALAT1 ve B-MYBL2 geninin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizilimleri.

Primer Adı	İleri Dizi (F)	Geri Dizi (R)
MALAT1	GAGTGTACCGCTGTGCTGTT	GCTGCACTGTGCTGTA CTTT
B-MYBL2	ACTTGATCGAGTCGGACCCT	GCTGCACTAGGCTGTTGTTG

3.6.2. PCR bileşenleri

Eş zamanlı PCR reaksiyonu Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazı kullanılmıştır. MALAT1 ve B-MYBL2 ifade analizi için hazırlanan ön karışımda RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılmıştır.

3.6.2.1. MALAT1 ve B-MYB ifade düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri

Tablo 3.5’te göre eş zamanlı PCR ön karışımı buz bloğunda hazırlandı. Eş zamanlı PCR ön karışımı cDNA haricinde ifade analizi reaksiyonu için gerekli olan her bileşenkarışımda mevcuttu.

Tablo 3.6. MALAT1 ve B-MYBL2 ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri

Bileşenler	Hacim (µl)
RT ² SYBR Green ROX FAST Mastermix	6,25
F Primer (10 µM)	0,25
R Primer (10 µM)	0,25
Rnaz/Dnaz içermeyen su	5,25
cDNA (50 ng)	0,5
Total	12,5

Her örneğe ait cDNA, eş zamanlı PCR ön karışımı içeren her tüpe eklendi ve pepetaj yapıldı, kısa bir şekilde santrifüj edildi ve buza tekrar konuldu.

Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazındaki kayıtlı programı çalıştırıldı (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. MALAT1 ve B-BMBL2 ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR ayarları

	Sıcaklık (°C)	Süre(sn)	
Enzim aktivasyonu	95	10 dakika	
Denaturasyon	95	15	45 döngü
Primer bağlanması/uzama	60	60	
Erime eğrisi	65	1	
	95	devamlı	

3.6.3. İstatistiksel Analiz

Hücre soylarından MALAT1 ve B-MYB ifade düzeyleri qRT-PCR yönteminde Cp (Crossing points) değerleri elde edilmiştir. qRT-PCR sonuçlarında, hücre soyları arası istatistiksel analiz yapılırken $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bu değer bize ilgili genin bir hücre hattındaki ifade düzeyinin, kontrol baz alınarak diğer hücre hattındakine göre kıyaslanmasını sağlar; yani, katsayı bilgisi edinilir.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\text{Örnek } \Delta Ct (\text{Gen-Referans}) - \text{Kontrol } \Delta Ct (\text{Gen-Referans})]}$$

Şekil 3.1. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ göre hesaplama formülü

qRT-PCR sonuçlarında ilgili genin referans gene göre kıyaslaması için $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır(Şekil 3.2). Bu değer bize o genin referans gene göre hangi oranda ifade düzeyinin değiştiğini gösterir; yani, göreceli ifade bilgisi edinilir.

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-\Delta(\text{Gen Ct-Referans Ct})}$$

Şekil 3.2. $2^{-\Delta Ct}$ göre hesaplama formülü

3.7. Akım (flow) sitometride apoptoz seviyelerine bakılması

Hücre apoptozu Annexin V ve 7AAD içeren kit kullanılarak üretici firmanın (Becton Dickinson, Pharmingen, UK) tavsiyeleri doğrultusunda çalışıldı. Apoptotik hücrelerle nekrotik hücreleri ayırmak için, hücreler Annexin V (yeşil floresan) ve 7AAD (kırmızı floresan) ile aynı anda boyatıldı.

Well platalere total hücre 1.000.000 olacak şekilde ekildi.

Kitin çalışma prasedürü şöyledir:

- 12'lik well plate ekilmiş olan hücreler 300 ml tripsin, 1ml DMEM ile kaldırıldı.
- kaldırılan hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi, üst faz atıldı.
- Hücre süspansiyonlarının üzerine 1ml PBS eklendi, kısaca vortekslendi, 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi, üst faz döküldü. Böylece hücreler PBS ile yıkanmış oldu.
- Hücre süspansiyonlarının üzerine binding buffer eklendi. (1ml binding buffer + 9 ml distile su ile seyreltildi) 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı.
- Hücre süspansiyonların üzerine 500 µl binding buffer eklendi. Kısaca vortekslendi ve yeni tüplere 100 µl aktarıldı.
- Aktarılan yeni tüplere 5 µl Annexin, 5 µl 7AAD eklendi ve 15 dakika boyunca inkübe edildi. (Karanlık ortamda)
- Hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz döküldü.
- Hücre süspansiyonlarının üzerine 500 µl binding buffer eklendi.

Hücre süspansiyonları daha sonra Becton coulter NAVIOUS tipi akım (flow) sitometre ile değerlendirildi. Kaluza analysis programı kullanılarak her numune için hücreler sayılıp analiz edildi.

3.8. Akım (flow) sitometride hücre döngüsü analizi

Hücre döngüsü için BD Cycletest™ Plus DNA Reagent kiti (biosciences, Almanya) kullanıldı.

Kitin çalışma prosedörü şöyledir:

Hücreler 1×10^6 olacak şekilde sayıldı.

- 12'lik well plate ekilmiş olan hücreler 300 ml tripsin, 1ml DMEM ile kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi, üst faz atıldı.
- Hücre süspansiyonlarının üzerine buffer solution eklendi. (1ml buffer solution + 9 ml destile su ile seyreltildi) 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı.
- Önce ki Adım tekrar edildi.
- Hücre süspansiyonunun üzerine 250 µl solution A eklendi. Tüplerin dibine hafifçe vurularak karışması sağlandı. Hassas olduğundan vorteks yapılmadı. 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
- Hücre süspansiyonunun üzerine 200 µl solution B eklendi. Yine tüplerin dibine hafifçe vurularak karıştırılması sağlandı. 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
- Hücre süspansiyonunun üzerine 200 µl solution C eklendi ve yine tüplerin dibine hafifçe vurularak karıştırılması sağlandı. 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.

Hücre süspansiyonları daha sonra Becton coulter NAVIOUS tipi akım (flow) sitometre ile değerlendirildi. Kaluza analysis programı kullanılarak her numune için hücreler sayılıp analiz edildi.

3.9.1. Hücre hatlarında MDA Düzeylerinin Ölçülmesi (Lipid Peroksidasyonu Değerlendirilmesi)

MDA düzeyleri, Ohkawa yöntemi ile tespit edilmiştir. MDA'nın asidik PH ve sıcak ortamda tiyobarbitürik asitle (TBA) oluşturduğu bileşiğin pembe-kırmızı renginin 532 nm dalga boyunda absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanan Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak ölçüldü. Yöntemin uygulamasında ise; 0,1 ml homojenat üzerine 0,2 ml %8,1'lik sodyum dodesil sülfat, 1,5 ml %20'lik asetik asit, 1,5 ml %0,8'lik TBA ve 0,7 ml saf su konularak 95 °C'de 30 dakika su banyosunda kaynatıldı. Soğutulduktan sonra 1 ml saf su ve 5 ml butanol/piridin (1:14 oranında) eklendi ve sonra tüpler 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki organik faz

alınarak 532 nm dalga boyunda absorbans okunarak standart eğriden değerlendirildi. Sonuçlar nmol/mL protein olarak tanımlandı.

3.9.2. Hücre hatlarında MPO Aktivitesinin Ölçülmesi

MPO aktivitesi Lowry'nin yöntemi ile tespit edilmiştir. Deney karışımı, 1 cm yol uzunluğunda bir küvet içinde, 0.3 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH 6.0), 0.3 mL 0.01 M H₂O₂, deiyonize su içinde taze hazırlanmış 0.5 mL 0.02M o-dianisidin ve 10 uL serum ilave edilerek son serumda 3 ml'lik bir nihai hacim elde edilerek gerçekleştirildi. Serum en sonunda ilave edilerek 460 nm absorbans değişikliği, 10 dakika boyunca takip edilmiştir. Tüm ölçümler iki kez yapıldı. MPO'nun 1 ünitesi dakikada 0.001 absorbans artışı olarak tanımlandı. Miligram protein başına düşen MPO aktivitesi hesaplanarak sonuçlar spesifik aktivite olarak değerlendirildi. Enzim aktivite sonuçları u/ml olarak verildi.

3.9.3. Hücre hatlarında NO Aktivitesinin Ölçülmesi

Serum NO düzeyleri Griess reaktifi kullanılarak ölçülme esasına dayanan yöntemdir. 5 ul nitrat redüktaz ve 2 mmol / l NADH'a 10 ul numune ilave edildi ve nitriti tüm nitrate dönüştürmek için 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örnekler deproteinize edildi, ve sonra Griess reaktifi (sülfanilamid ve N-1-Naphthylethylendiamine dihidroklorür) ilave edildi. Oda sıcaklığında, renk gelişimi sonrası absorbans değerleri, 540 nm'lik bir dalga boyunda ölçüldü. Her bir numune, iki kopya halinde test edildi. Serum nitriti, potasyum nitratın nitrite enzimatik dönüşümü ile elde edilen standart bir eğri ile hesaplandı. Sonuçlar litre başına nmol/ml protein olarak NO olarak rapor edildi.

3.9.4. Hücre hatlarında GPx Düzeyinin Ölçülmesi

GPx aktivite ölçümü için Beutler metodu kullanılmıştır. GPx, H₂O₂ vasıtasıyla redükte glutatyon (GSH)'nun okside glutatyon (GSSG)'a oksidasyonunu katalize eder. H₂O₂ t-bütül hidroperoksite bulunduğu ortamda GPx'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir. GPx aktivitesi NADPH'nin NADP'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak okunmasıyla tayin edilir. Enzim aktivite sonuçları u/ml olarak verildi.

3.9.5. Hücre hatlarında SOD Aktivitesinin Ölçülmesi

SOD aktivitesi, hemolizatta Fridovich yöntemiyle belirlenmiştir. Bunun için serum hücre süpernandı 1:20 oranında 0,01 M fosfat tampon ile dilüe edilerek, bu dilüsyonda aktivite tayini yapıldı. Reaksiyon karışımı 1 ml'lik total volümde 25 µl enzim içeren hücre süpernandı, 850 µl ksantin ve INT (p-iyodonitrotetrazolium viyole) içeren miks substrat ve 125 µl 80 U/L ksantin oksidaz içermektedir. Kör de tıpkı numune gibi hazırlandı fakat örnek yerine fosfat tamponu kondu. Ksantin oksidazın etkisiyle ksantin oluşturduğu süperoksid radikali; (O₂-), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium (INT) boyası ile kırmızı renk meydana getirir. SOD, süperoksid radikalini hidrojen perokside dönüştürür. SOD'un bu reaksiyonu inhibe etme derecesine bağlı SOD aktivitesi belirlenmiştir. SOD aktivitesi ile renk miktarı arasında ters ilişki vardır. Tepkimede, 37 °C'de ışık yolu 1 cm olan küvetlerde 505 nm dalga boyunda havaya karşı ilk 30 saniyedeki başlangıç absorbansları standart eğriden değerlendirildi. Enzim aktivite sonuçları U/mikrolitre olarak verildi.

3.9.6. Hücre hatlarında Prolidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Aşama: preinkübasyon; 2ml 2,5 mmolar MnCl₂, 1,9 ml tampon, 100µl serum, 1/40 sulandırılmış bu karışım iyice vortekslenip ağzı kapalı bir şekilde 37 °C da 2 saat preinkübe edildi.

2.Aşama

	0 zaman tüpü	İnkübasyon tüpü
Tampon	400 µl	400 µl
Substrat	300 µl	300 µl
Distile su	200 µl	200 µl
Preinkübe edilmiş örnek	100 µl	100µl

İnkübasyon tüplerinin ağzı iyice kapatılıp, vortekslendi ve 30 dakika 37 °C da benmaride inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda inkübasyon tüplerine 500 µl TCA ilave edildi ve reaksiyon durduruldu. Daha sonra 0 zaman ve inkübasyon tüplerinin her ikisinde 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan süpernatan prolin ölçümü için kullanmaya hazır hale geldi.

3.Aşama: Prolinin spektrofotometrik ölçümü:

Ayrıçlar	Kör	Standart	0 zaman	İnkübasyon
Glasiyel asetik asit	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Süpernatant	-	-	1 ml	1 ml
Standart	-	1 ml	-	-
Distile su	1ml	-	-	-
Ninhidrin	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Bu tüpler ağzı kapatılarak vortekslendi, 20 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Bu zaman sonunda tüpler buzlu su banyosunda soğutularak spektrofotometrede köre karşı 515 nm'de ölçülüp Prolidaz aktivite düzeyi: (İnk. tüp abs. – 0 zaman tüp abs.) x standart kon. x 40x 15/ Standart abs. 30' mmol /L dakika olarak hesaplandı

4.BULGULAR

MALAT1'in farklı kanserlerdeki rolünü anlamak için MALAT1' inhibe eden mikro RNA'larla çalışılmıştır. Bu amaçla tedaviye yönelik yeni yaklaşımları geliştirmesi için miR-503, miR-150 ve miR-15a'larla MALAT1'in ifadesi inhibe edilmiş, farklı kanser hücre hatlarında (A549, MCF7 ve U2OS) ve normal hücre hatlarında (BEAS-2B, HTERT-HME1 ve HUVEC) gen ifadesinin analizleri yapılmış, apoptozis ve hücre döngüsü seviyelerine bakılmıştır.

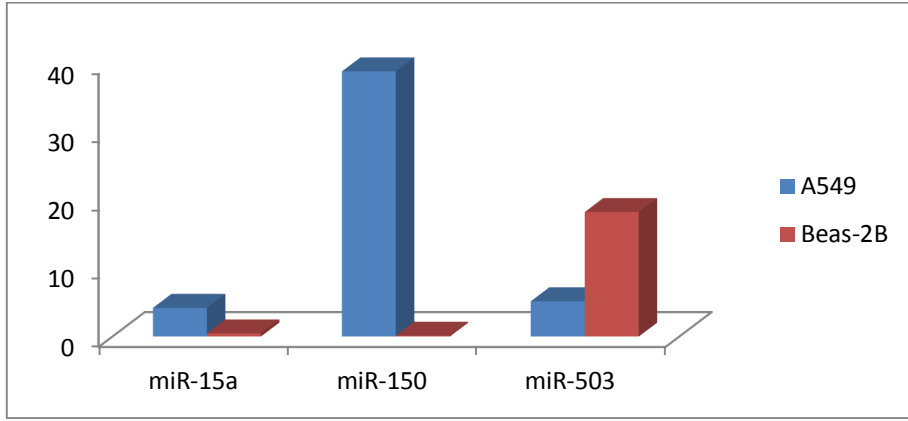
4.1. Hücre soylarında MALAT1'in gen ifade analiz Sonuçları

Hücre soyuna mimik miRNA'lar aktarılıp 48 saat sonra hücreler kaldırılıp total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'lardan cDNA'ya elde edilmiş, kalite ve miktar tayini yapılmıştır. Daha sonra bu yoğunluklar ifade analizi öncesi 50 ng/µl'ye çekilmiştir.

Bu hücre hatlarında miR-150-5p, miR-15a-5p ve miR-503-5p ifade sonuçları gerçek zamanlı PCR yöntemiyle ölçülmüştür. miR-150-5p, miR-15a-5p ve miR-503-5p ifadelerinin normalizasyonu yapılırken hamarat gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

4.1.1. A549 ve BEAS-2B hücre soylarında MALAT1'in katlı değişim ifade sonuçları

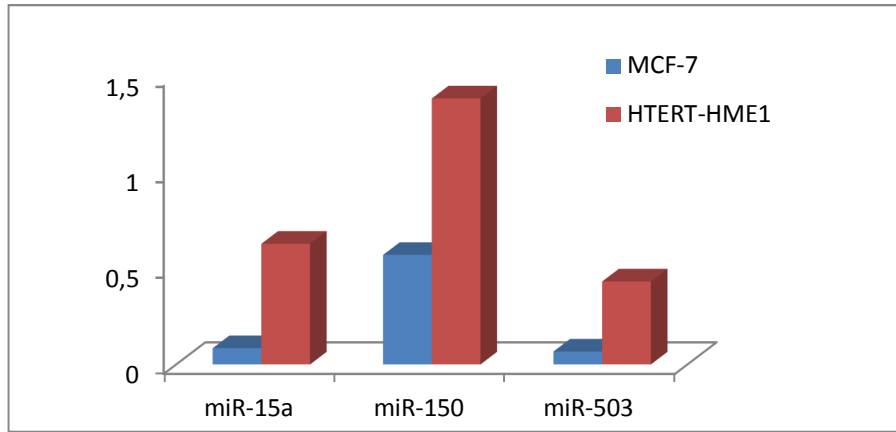
Şekil 4.1' de MALAT1 lncRNA'sının ifade düzeyi, A549 hücre hattı ile BEAS-2B hattında birbirine göre kıyaslanması gösterilmiştir. Grafikte $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarları şöyledir: miR-15a için A549 hücre hattında 4,19 iken, BEAS-2B hücre hattında 0,41, miR-150 için A549 hücre hattında 38,85 iken BEAS-2B hücre hattında 0,13, miR-503 için A549 hücre hattında 5,16 iken BEAS-2B hücre hattında 18,25 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. MALAT1'in ifadesel değeri A459 hücre soyu ile BEAS-2B hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değışim grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.1.2. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarında MALAT1'in katlı değışim ifade sonuçları

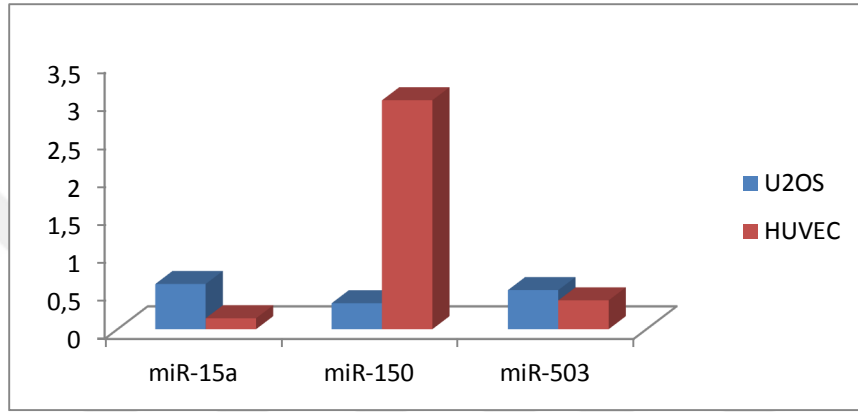
Şekil 4.2' de MALAT1 lncRNA'sının ifade düzeyi, MCF-7 hücre hattı ile HTERT-HME1 hattında birbirine göre kıyaslanması gösterilmiştir. Grafikte $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değışim miktarları şöyledir: MiR-15a için MCF-7 hücre hattında 0,08 iken, HTERT-HME1 hücre hattında 0,62, miR-150 için MCF-7 hücre hattında 0,57 iken, HTERT-HME1 hücre hattında 1,38, miR-503 MCF-7 hücre hattında 0,07 iken, HTERT-HME1 hücre hattında 0,43 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2. MALAT1'in ifadesel değeri MCF-7 hücre soyu ile HTERT-HME1 hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değışim grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.1.3. U2OS ve HUVEC hücre soylarında MALAT1'in katlı değişim ifade sonuçları

Şekil 4.3' te MALAT1 lncRNA'sının ifade düzeyi, U2OS hücre hattı ile HUVEC hattında birbirine göre kıyaslanması gösterilmiştir. Grafikte $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarları şöyledir: MiR-15a için U2OS hücre hattında 0,59 iken, HUVEC hücre hattında 0,14, miR-150 için U2OS hücre hattında 0,34 iken, HUVEC hücre hattında 3,01, miR-503 U2OS hücre hattında 0,51 iken, HUVEC hücre hattında 0,37 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. MALAT1'in ifadesel değeri U2OS hücre soyu ile HUVEC hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.

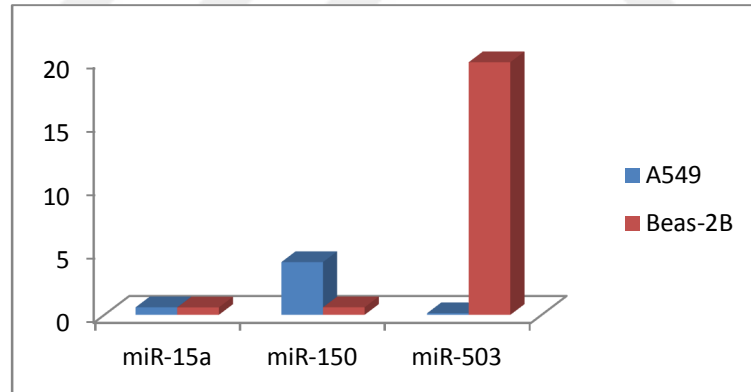
4.2. Hücre soylarında MYB geninin İfade analiz Sonuçları

Hücre soyuna mimik miRNA'lar aktarılıp 48 saat sonra hücreler kaldırılıp total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'lardan cDNA'ya elde edilmiş, kalite ve miktar tayini yapılmıştır. Daha sonra bu yoğunluklar ifade analizi öncesi 50 ng/μl'ye çekilmiştir.

Bu hücre hatlarında miR-150-5p, miR-15a-5p ve miR-503-5p ifade sonuçları gerçek zamanlı PCR yöntemiyle ölçülmüştür. miR-150-5p, miR-15a-5p ve miR-503-5p ifadelerinin normalizasyonu yapılırken hamarat gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

4.2.1. A549 ve BEAS-2B hücre soylarında B-MYB genin katlı değişim ifade sonuçları

Şekil 4.4' de B-MYB genin ifade düzeyi, A549 hücre hattı ile BEAS-2B hattında birbirine göre kıyaslanması gösterilmiştir. Grafikte $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarları şöyledir: MiR-15a için A549 hücre hattında 0,6 iken, BEAS-2B hücre hattında 0,6, miR-150 için A549 hücre hattında 4,14 iken BEAS-2B hücre hattında 0,6, miR-503 için A549 hücre hattında 0,13 iken BEAS-2B hücre hattında 19,8 olarak bulunmuştur.

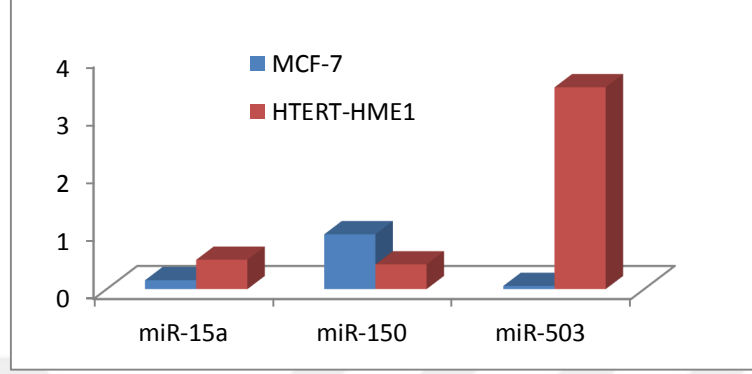


Şekil 4.4. B-MYB genin ifadesel değeri A459 hücre soyu ile BEAS-2B hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.2.2. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarında B-MYB genin katlı değişim ifade sonuçları

Şekil 4.5' de B-MYB genin ifade düzeyi, MCF-7 hücre hattı ile HTERT-HME1 hattında birbirine göre kıyaslanması gösterilmiştir. Grafikte $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre

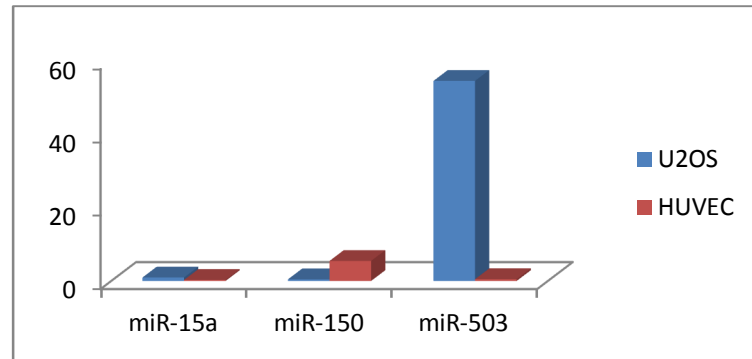
hesaplanan katlı değişim miktarları şöyledir: MiR-15a için MCF-7 hücre hattında 0,15 iken, HTERT-HME1 hücre hattında 0,50, miR-150 için MCF-7 hücre hattında 0,95 iken, HTERT-HME1 hücre hattında 0,43, miR-503 MCF-7 hücre hattında 0,06 iken, HTERT-HME1 hücre hattında 3,48 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. B-MYB genin ifadesel değeri MCF-7 hücre soyu ile HTERT-HME1 hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.2.3. U2OS ve HUVEC hücre soylarında B-MYB genin katlı değişim ifade sonuçları

Şekil 4.6' da B-MYB genin ifade düzeyi, U2OS hücre hattı ile HUVEC hattında birbirine göre kıyaslanması gösterilmiştir. Grafikte $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarları şöyledir: MiR-15a için U2OS hücre hattında 0,93 iken, HUVEC hücre hattında 0,27, miR-150 için U2OS hücre hattında 0,45 iken, HUVEC hücre hattında 5,46, miR-503 U2OS hücre hattında 54,5 iken, HUVEC hücre hattında 0,49 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6. B-MYB genin ifadesel değeri U2OS hücre soyu ile HUVEC hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.3. Akım (Flow) Sitometride Apoptozis ve Hüce Döngüsü Analiz Sonuçları

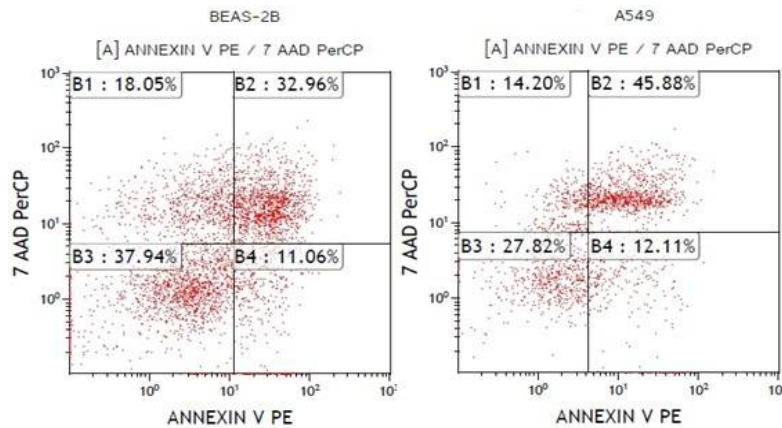
Kanser ve normal hücre hatlarına mimik miRNA'lar aktarılıp 48 saat sonra hücreler kaldırıldı. Hücre apoptozisi Annexin V ve 7AAD içeren kit kullanılarak üretici firmanın (Becton Dickinson, Pharmingen, UK) prosedürü esas alınarak çalışıldı. Apoptotik hücrelerle nekrotik hücreleri ayırmak için, hücreler Annexin V (yeşil floresan) ve 7AAD (kırmızı floresan) ile aynı anda boyanma işlemi yapıldı.

Hüce döngüsü için BD Cycletest™ Plus DNA Reagent kiti (biosciences, Almanya) kullanıldı. Kitin çalışma prosedürü baz alınarak hücreler flow sitometri de okutmak için hazır hale getirildi.

Hüce süspansiyonları karanlıkta buz üstünde 15 dk inkübe edilecek, daha sonra Becton-Coulter tipi akım (flow) sitometre ile değerlendirildi. Hücreler Navios Software programı ile okutuldu, kaluza (analysis) analiz programı ile değerlendirildi.

4.3.1. A549 ve BEAS-2B hücre soylarına negatif kontrol mimik (nc) verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları

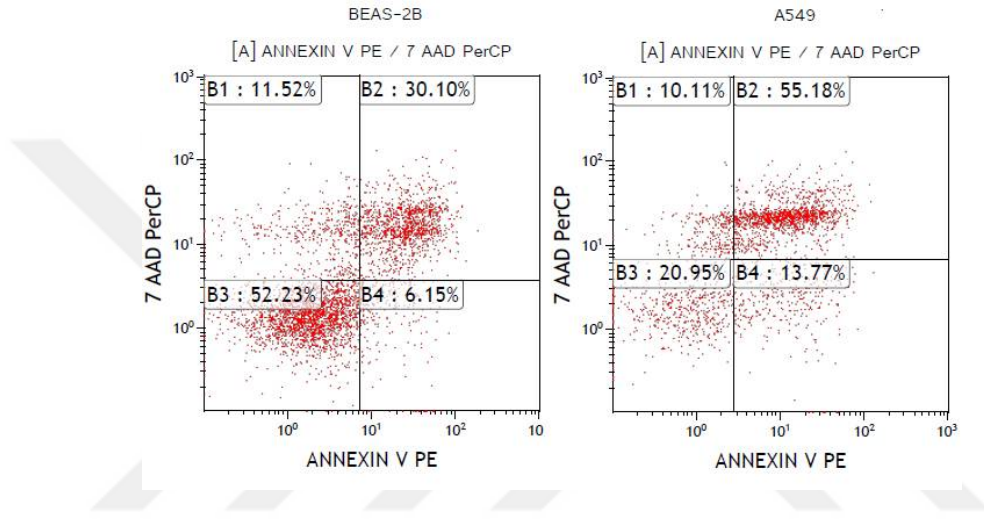
Şekil 4.7'de A549 ve BEAS-2B hücre soylarına negatif kontrol mimik (NC) verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir: BEAS-2B hücre hattında canlı hücreler % 37,94, erken apoptozis %11,06, geç apoptozise giden hücreler %32,96, A549 hücre hattında canlı hücreler % 27,82, erken apoptozis %12,11, geç apoptozise giden hücreler %45,88 oranında hesaplanmıştır.



Şekil 4.7. A549 ve BEAS-2B hücre soylarına negatif kontrol (NC) mimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.2. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına miR-503-5p mimik (miR-503) verildiğinde elde edilen verilerin Apoptozis analiz sonuçları

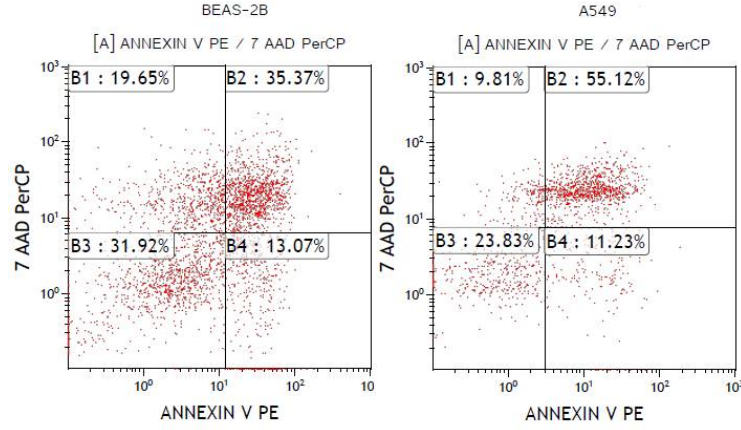
Şekil 4.8'de A549 ve BEAS -2B hücre soylarına miR-503-5p mimik verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir: BEAS-2B hücre hattında canlı hücreler % 52.23, erken apoptozis % 6,15, geç apoptozise giden hücreler %30,10, A549 hücre hattında canlı hücreler % 20,95 erken apoptozis %13,77 geç apoptozise giden hücreler % 55,18 oranında hesaplanmıştır.



Şekil 4.8. A549 ve BEAS-2B hücre soylarına miR-503-5p verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.3. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına miR-150-5p mimik (miR-150) verildiğinde elde edilen verilerin Apoptozis analiz sonuçları

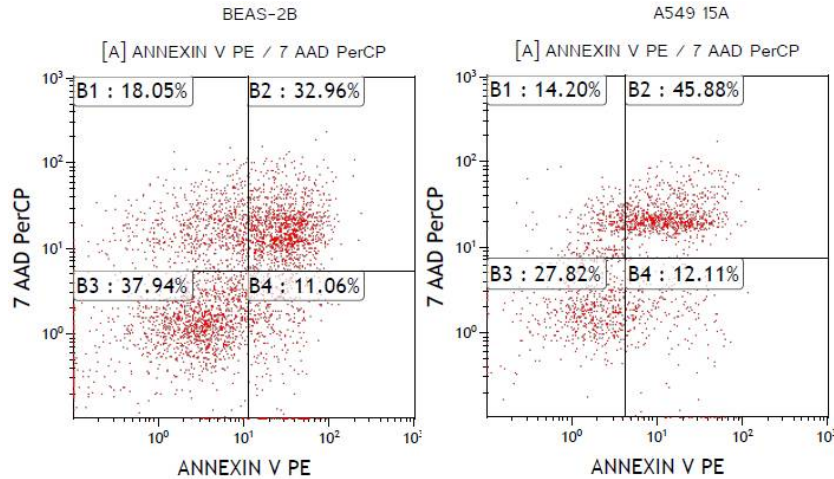
Şekil 4.9' da A549 ve BEAS -2B hücre soylarına miR-150-5p mimik verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir: BEAS-2B hücre hattında canlı hücreler % 31,92, erken apoptozis % 13,07, geç apoptozise giden hücreler % 35,37, A549 hücre hattında canlı hücreler % 23,83 erken apoptozis %11.23 geç apoptozise giden hücreler % 55,12 oranında hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. A549 ve BEAS-2B hücre soylarına miR-150-5p verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.4. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına miR-15a-5p mimik (miR-15a) verildiğinde elde edilen verilerin Apoptozis analiz sonuçları

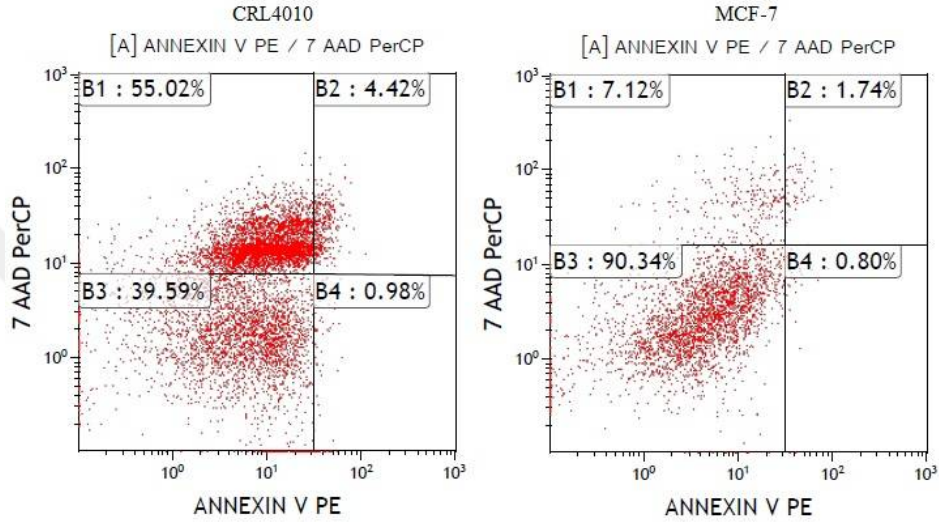
Şekil 4.10'da A549 ve BEAS -2B hücre soylarına miR-15a-5p mimik verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir: BEAS-2B hücre hattında canlı hücreler % 37,94, erken apoptozis % 11,06, geç apoptozise giden hücreler % 32,96, A549 hücre hattında canlı hücreler % 27,82, erken apoptozis % 12,11, geç apoptozise giden hücreler % 45,88 oranında hesaplanmıştır.



Şekil 4.10. A549 ve BEAS-2B hücre soylarına miR-15a-5p verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.5. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına negatif kontrol mimik (nc) verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları

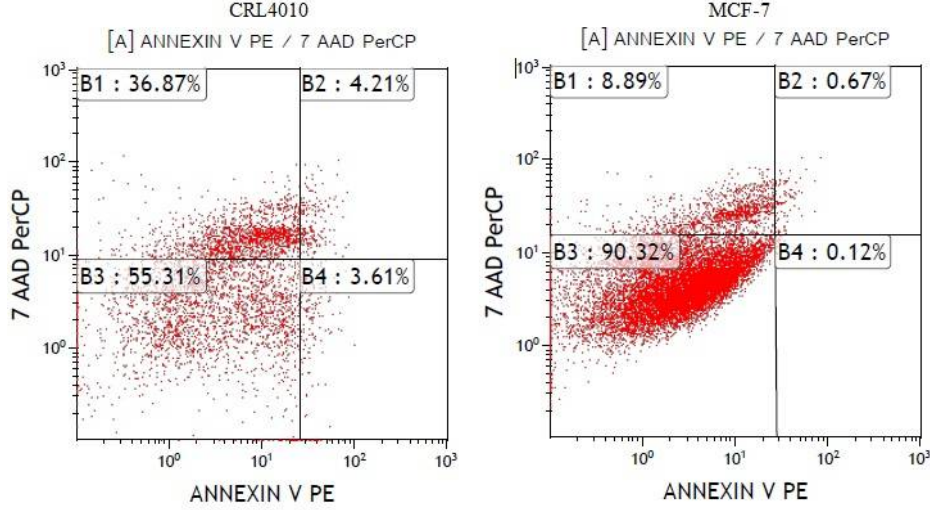
Şekil 4.11’de MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına negatif kontrol mimik (NC) verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir HTERT-HME1 hücre hattında canlı hücreler % 39,59, erken apoptosiz % 0,98, geç apoptozise giden hücreler % 4,42, MCF-7 hücre hattında canlı hücreler % 90,34 erken apoptosiz % 0,80, geç apoptozise giden hücreler % 1,74 oranında hesaplanmıştır



Şekil 4.11. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına negatif kontrol mimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.6. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-503-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları

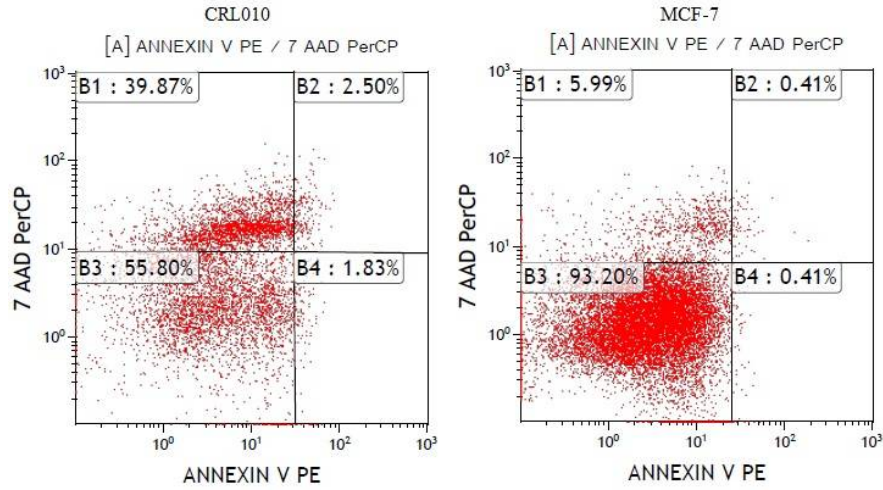
Şekil 4.12’de MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-503-5p mimik verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir HTERT-HME1 hücre hattında canlı hücreler % 39,59, erken apoptosiz % 0,98, geç apoptozise giden hücreler % 4,42, MCF-7 hücre hattında canlı hücreler % 90,34 erken apoptosiz % 0,80, geç apoptozise giden hücreler % 1,74 oranında hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-503-5p verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.7. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-150-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları

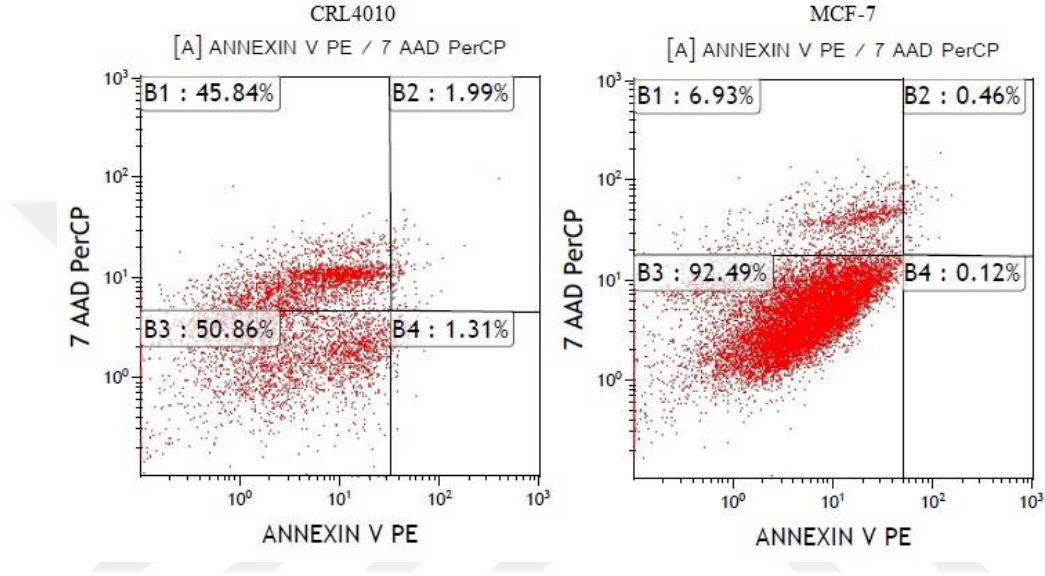
Şekil 4.13'te MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-150-5p mimik verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir HTERT-HME1 hücre hattında canlı hücreler % 55,80, erken apoptosiz % 1,83, geç apoptozise giden hücreler % 2,5, MCF-7 hücre hattında canlı hücreler % 93,20 erken apoptosiz % 0,41, geç apoptozise giden hücreler % 0,41 oranında hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-150-5p verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.8. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-15a-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları

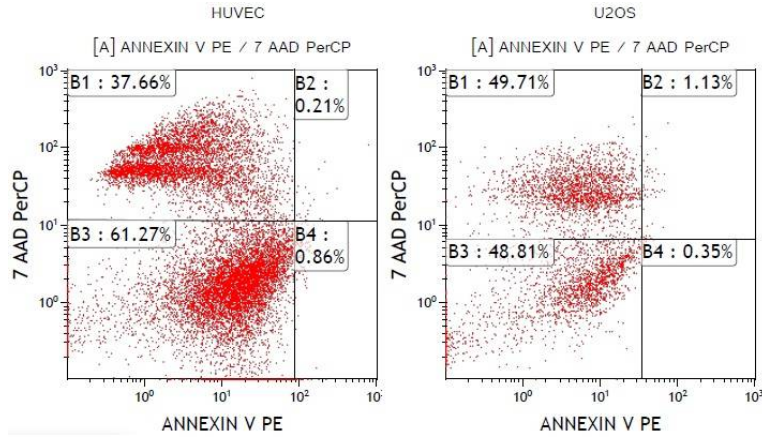
Şekil 4.14'te MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-15a-5p mimik verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir HTERT-HME1 hücre hattında canlı hücreler % 50,86, erken apoptosiz % 1,31, geç apoptozise giden hücreler % 1,91, MCF-7 hücre hattında canlı hücreler % 92,49 erken apoptosiz % 0,12, geç apoptozise giden hücreler % 0,46 oranında hesaplanmıştır.



Şekil 4.14. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-15a-5p verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.9. U2OS ve HUVEC hücre soylarına negatif kontrol mimik (nc) verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları

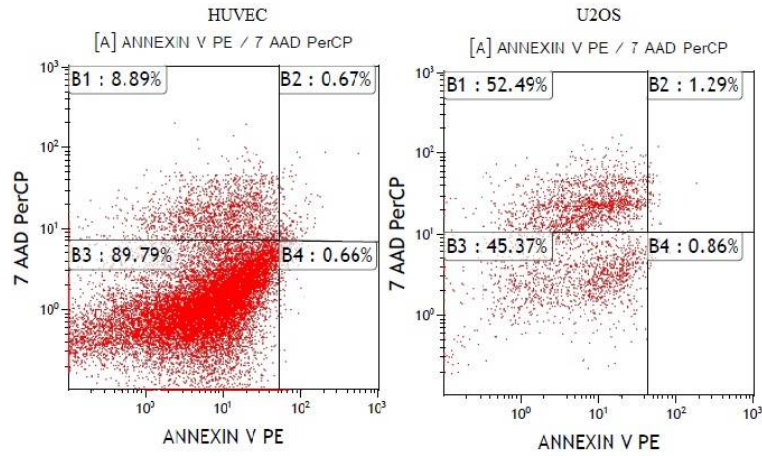
Şekil 4.15'te U2OS ve HUVEC hücre soylarına negatif kontrol mimik (NC) verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir HUVEC hücre hattında canlı hücreler % 61,27, erken apoptosiz % 0,86, geç apoptozise giden hücreler % 0,21, U2OS hücre hattında canlı hücreler % 48,81 erken apoptosiz % 0,35, geç apoptozise giden hücreler % 1,13 oranında hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. U2OS ve HUVEC hücre soylarına negatif kontrol mimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.10. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-503-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları

Şekil 4.16’ da U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-503-5pmimik verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir HUVEC hücre hattında canlı hücreler % 89,79, erken apoptozis % 0,66, geç apoptozise giden hücreler % 0,67, U2OS hücre hattında canlı hücreler % 45,37 erken apoptozis % 0,86, geç apoptozise giden hücreler % 1,29 oranında hesaplanmıştır.

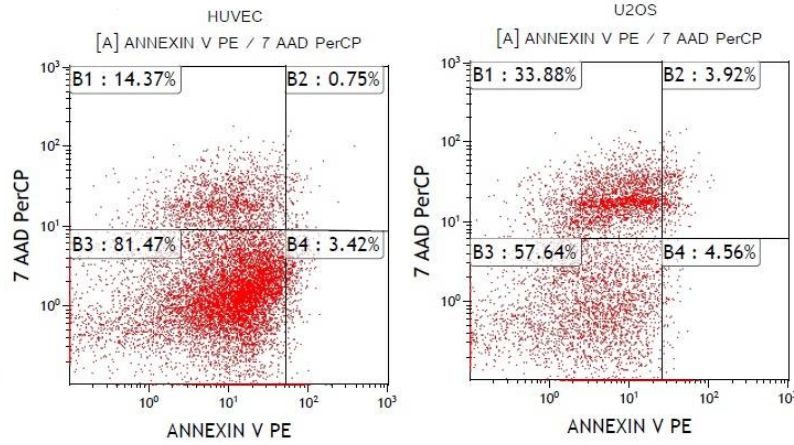


Şekil 4.16. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-503-5pmimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.11. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-150-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları

Şekil 4.17’de U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-150-5pmimik verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir HUVEC hücre hattında canlı hücreler

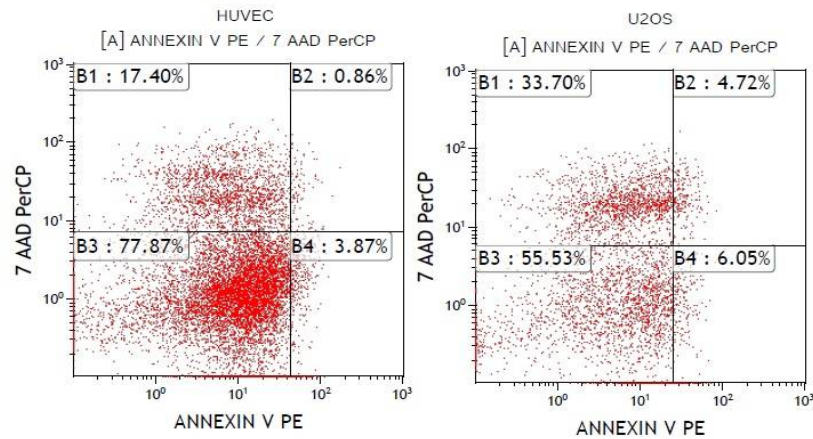
% 81,47, erken apoptozis % 3,42, geç apoptozise giden hücreler % 0,75, U2OS hücre hattında canlı hücreler % 57,64, erken apoptozis % 4,56, geç apoptozise giden hücreler % 3,92 oranında hesaplanmıştır.



Şekil 4.17. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-150-5pmimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.3.12. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-15a-5p mimik verildiğinde elde edilen verilerin apoptozis analiz sonuçları

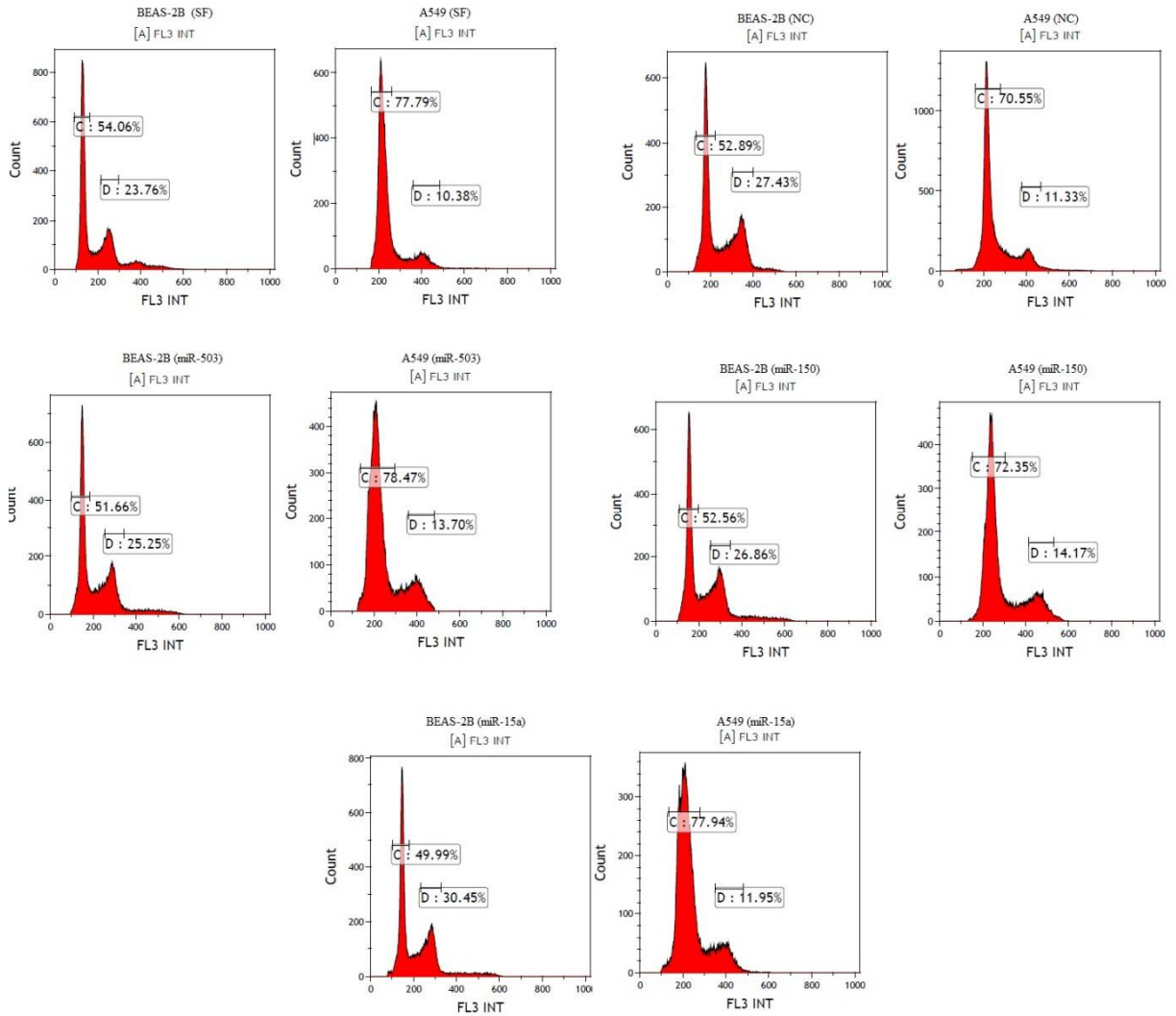
Şekil 4.18’de U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-15a-5pmimik verildiğinde elde edilen apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir HUVEC hücre hattında canlı hücreler % 77,87, erken apoptozis % 3,87, geç apoptozise giden hücreler % 0,86, U2OS hücre hattında canlı hücreler % 55,53, erken apoptozis % 6,05, geç apoptozise giden hücreler % 4,72 oranında hesaplanmıştır.



Şekil 4.18. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-15a-5pmimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.

4.4.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları

Şekil 4.19’da A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen veriler Tablo 4.1’ de gösterilmiştir.



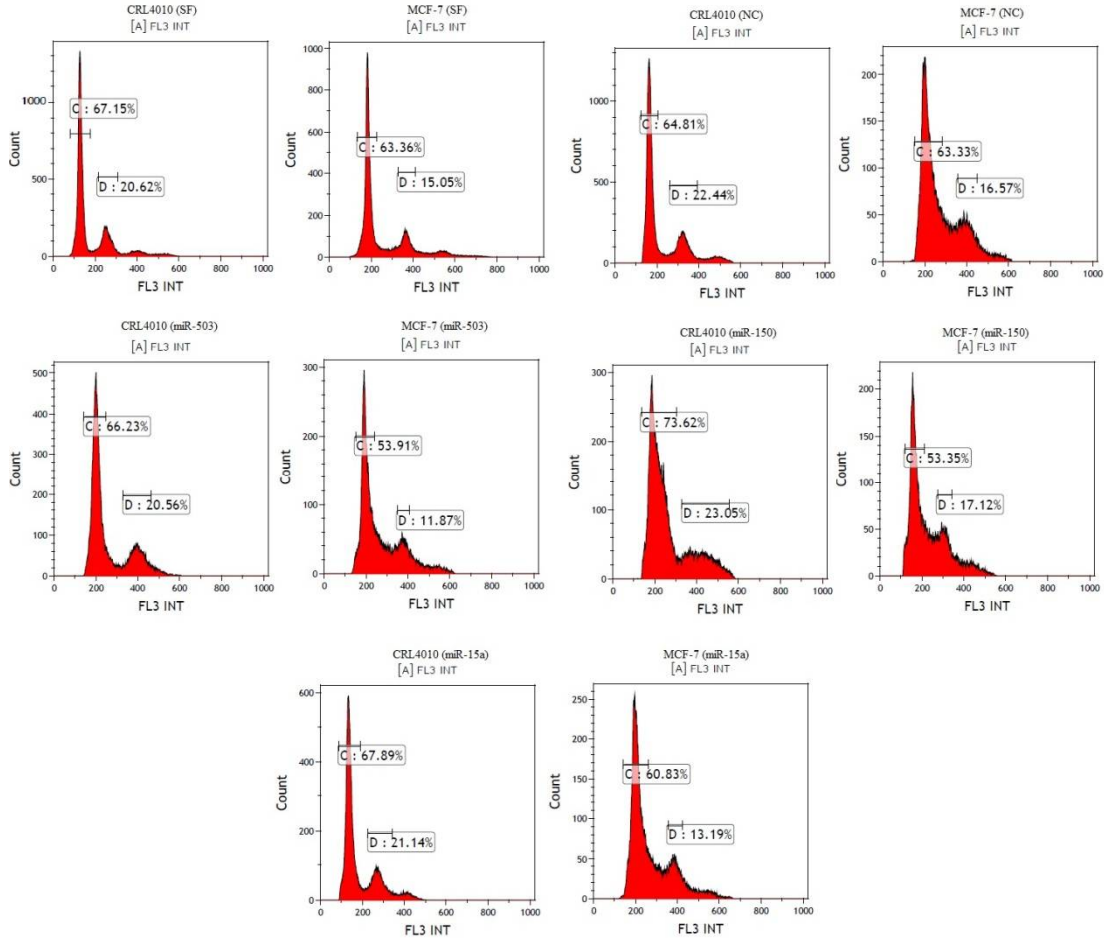
Şekil 4.19. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları grafiksel gösterimi.

Tablo 4.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde G1/S, G2/M seviyeleri

Hücre hattı	G1/S (%)	G2/M (%)
A549-SF	77,79	10,38
A549-NC	70,55	11,33
A549-miR-503	78,47	13,33
A549- miR-150	72,35	14,17
A549- miR-150a	77,94	11,95
BEAS-2B-SF	54,06	23,76
BEAS-2B -NC	52,89	27,43
BEAS-2B -miR-503	51,66	25,25
BEAS-2B - miR-150	52,56	26,86
BEAS-2B - miR-150a	49,99	30,45

4.4.2. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları

Şekil 4.20’de MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen veriler Tablo 4.2’ de gösterilmiştir.



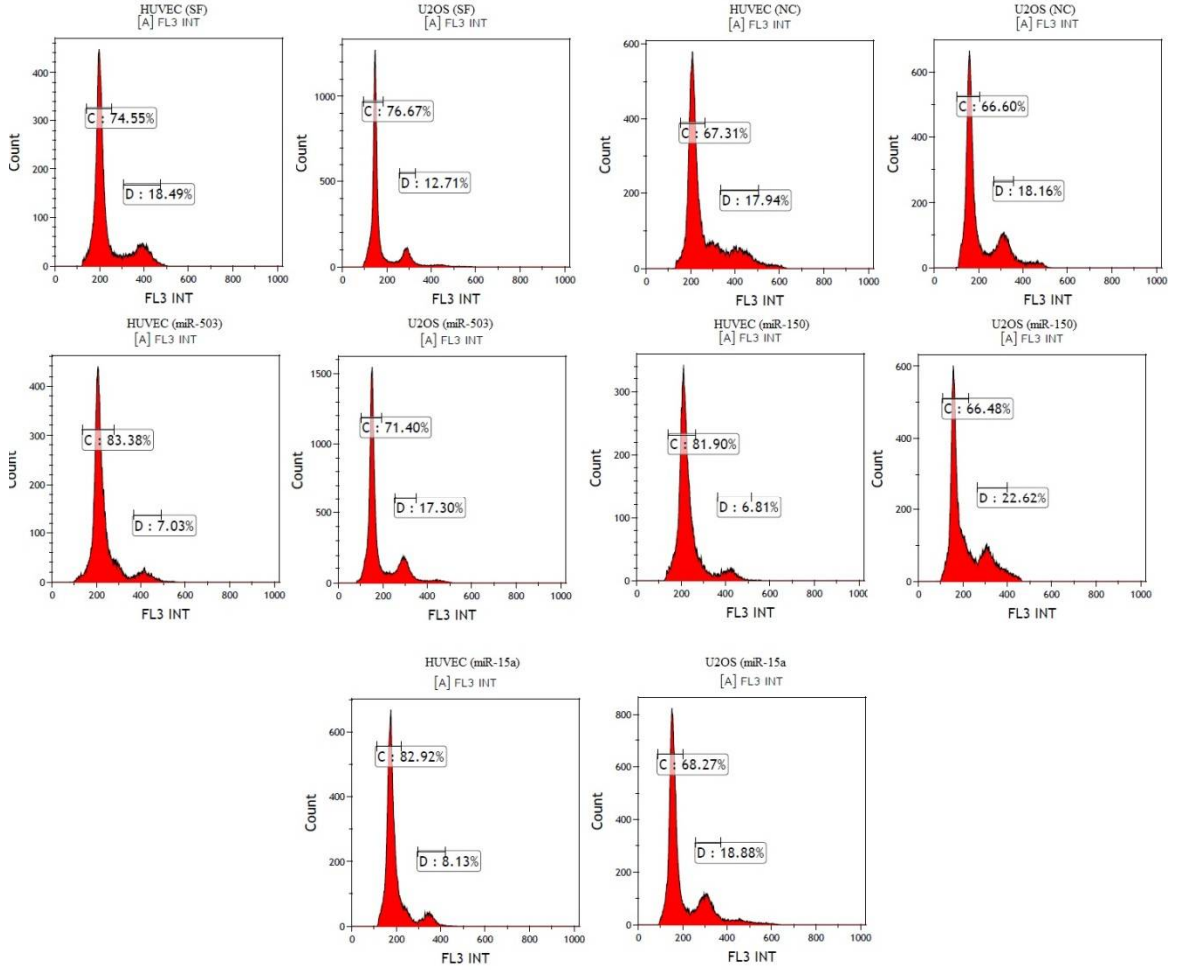
Şekil 4.20. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları grafiksel gösterimi.

Tablo 4.1. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde G1/S, G2/M seviyeleri

Hücre hattı	G1/S (%)	G2/M (%)
MCF-7-SF	63,36	15,05
MCF-7-NC	63,33	16,57
MCF-7-miR-503	53,91	11,87
MCF-7- miR-150	53,35	17,12
MCF-7- miR-150a	60,83	13,19
HTERT-HME1-SF	67,15	20,62
HTERT-HME1-NC	64,81	22,44
HTERT-HME1-miR-503	66,23	20,56
HTERT-HME1- miR-150	73,62	23,05
HTERT-HME1- miR-150a	67,89	21,14

4.4.3. U2OS ve HUVEC hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları

Şekil 4.21’de U2OS ve HUVEC hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen veriler Tablo 4.3’ te gösterilmiştir.



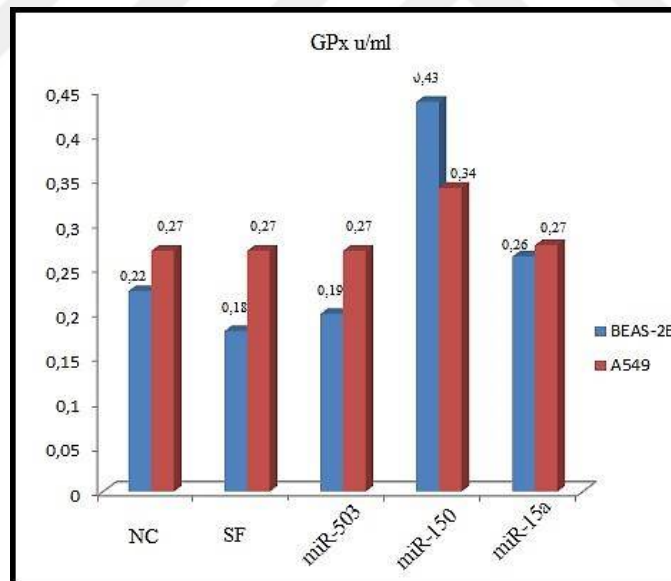
Şekil 4.21. U2OS ve HUVEC hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları grafiksel gösterimi.

Tablo 4.3. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde G1/S, G2/M seviyeleri

Hücre hattı	G1/S (%)	G2/M (%)
U2OS-SF	76,67	12,71
U2OS -NC	66,60	18,16
U2OS -miR-503	71,40	17,30
U2OS - miR-150	66,48	22,62
U2OS - miR-150a	68,27	18,88
HUVEC-SF	74,55	17,49
HUVEC -NC	67,31	17,94
HUVEC -miR-503	83,38	7,03
HUVEC - miR-150	81,90	6,81
HUVEC - miR-150a	82,92	8,13

4.5.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası GPx aktiviteleri

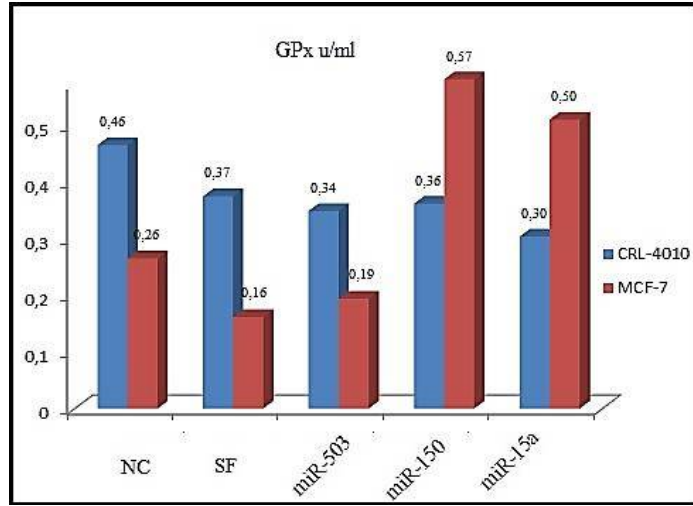
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,002$ ve miR-150 için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.22. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası GPx düzeyleri

4.5.2. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası GPx aktiviteleri

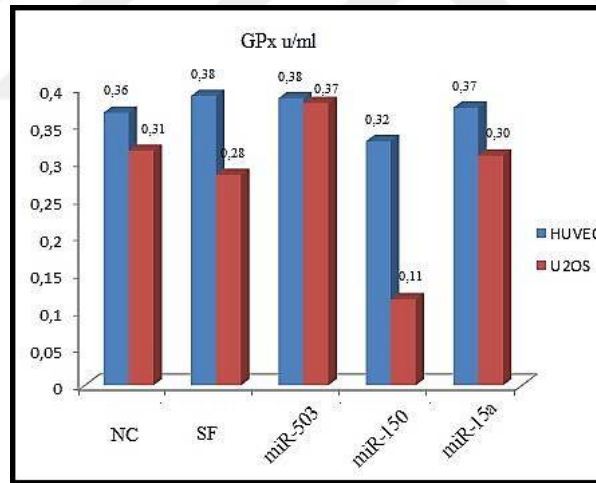
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,001$, miR-150 için $p=0,001$ ve miR-150 için $p=0,001$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.23. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası GPx düzeyleri

4.5.3. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası GPx aktiviteleri

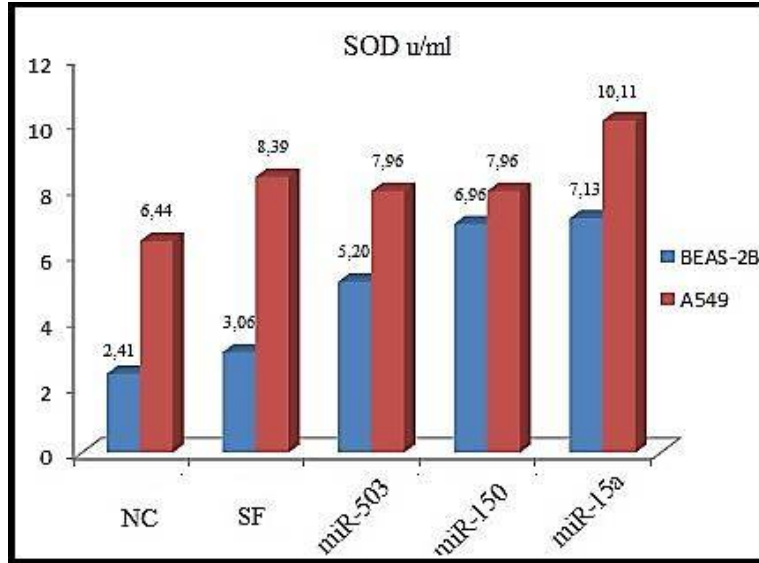
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunurken MiR-503 için anlamlı fark bulunmamıştır. MiR-503 için $p=0,31$, miR-150 için $p=0,001$ ve miR-150 için $p=0,001$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.24. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası GPx aktiviteleri düzeyleri

4.5.4. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası SOD aktiviteleri

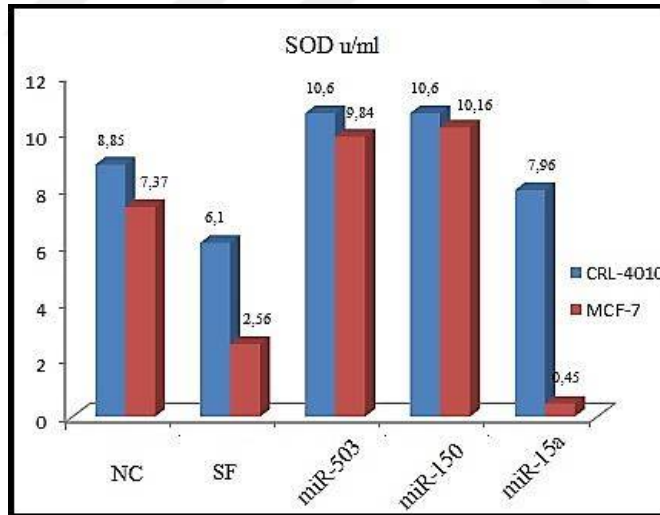
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,001$, miR-150 için $p=0,001$ ve miR-150 için $p=0,001$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.25. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası SOD düzeyleri

4.5.5. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası SOD aktiviteleri

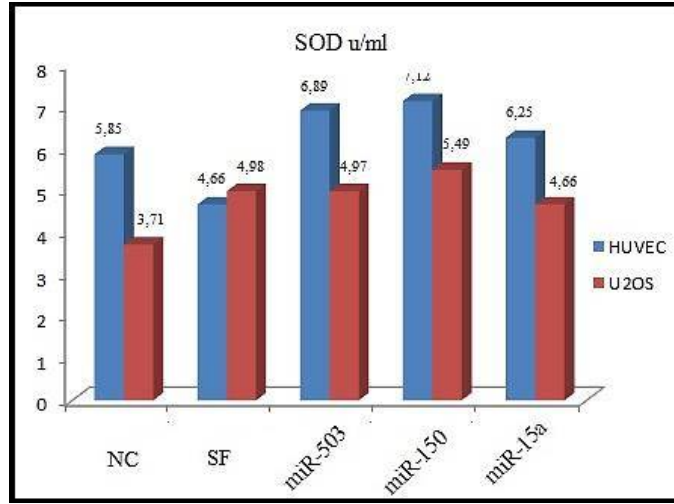
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,002$, miR-150 için $p=0,002$ ve miR-150 için $p=0,002$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.26. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası SOD düzeyleri

4.5.6. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası SOD aktiviteleri

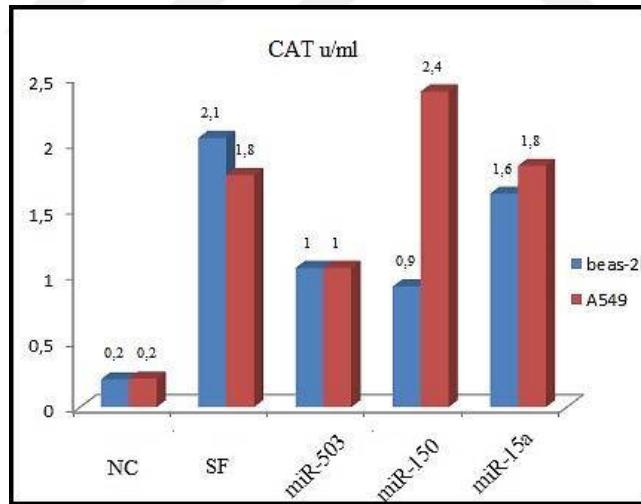
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,002$, miR-150 için $p=0,002$ ve miR-150 için $p=0,002$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.27.U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası SOD düzeyleri

4.5.7. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası CAT aktiviteleri

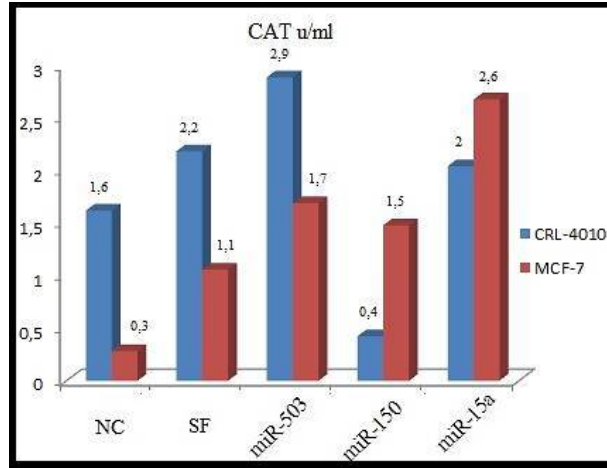
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunurken miR-503 için anlamlı fark bulunmamıştır. MiR-503 için $p=1$, miR-150 için $p=0,001$ ve miR-15a için $p=0,001$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.28. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası CAT düzeyleri

4.5.8. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası CAT aktiviteleri

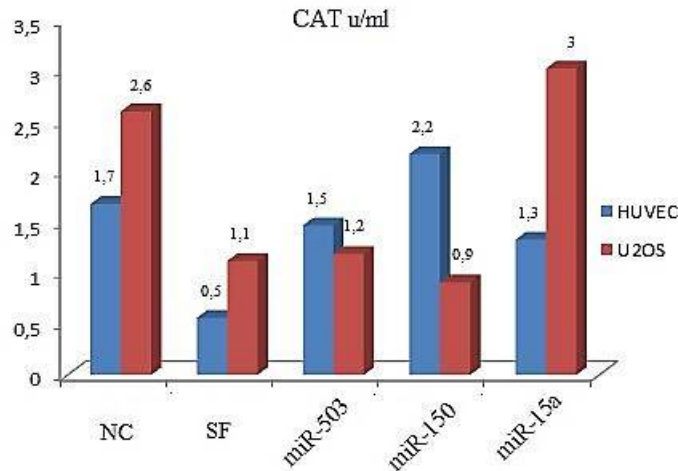
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,003$ ve miR-15a için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.29. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası CAT düzeyleri

4.5.9. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası CAT aktiviteleri

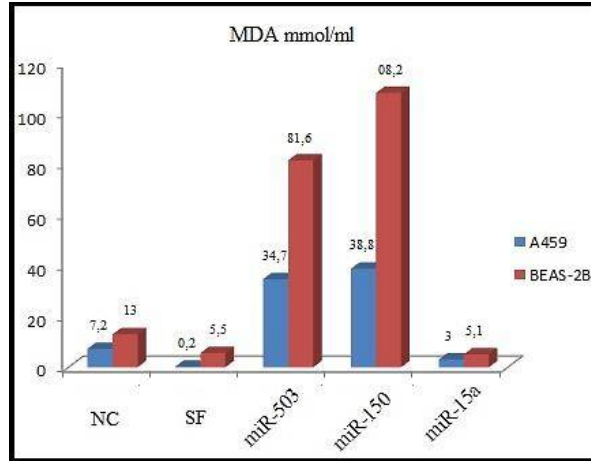
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,003$ ve miR-150 için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.30. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası CAT düzeyleri

4.5.10. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası MDA aktiviteleri

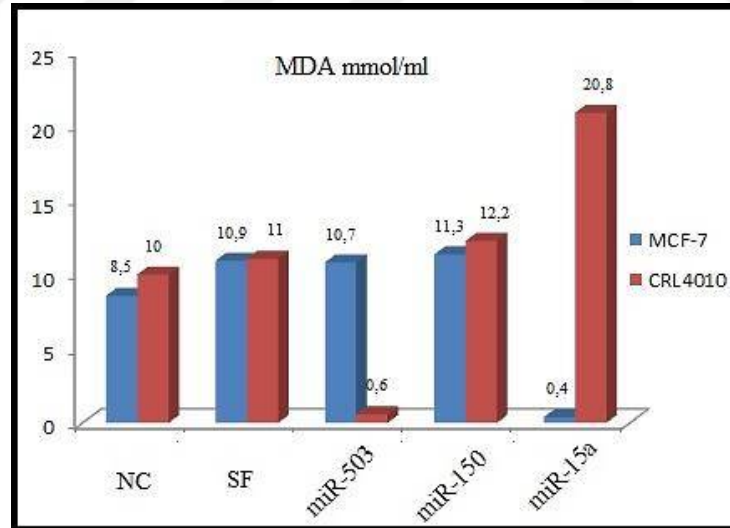
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunurken miR-15a için anlamlı fark bulunmamıştır. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,003$ ve miR-15a için $p=0,083$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.31. A459 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası MDA düzeyleri

4.5.11. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası MDA aktiviteleri

Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,003$ ve miR-150 için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

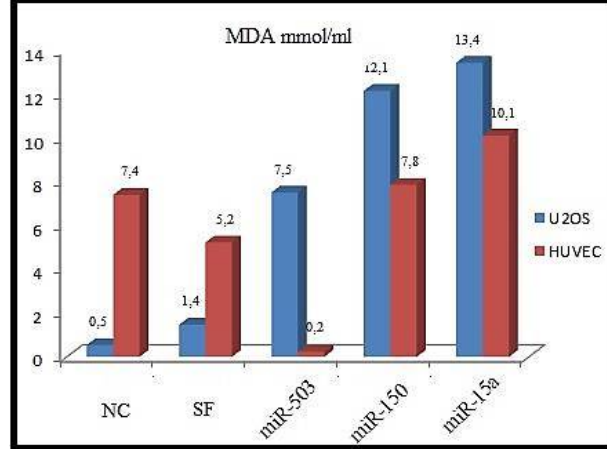


Şekil 4.32. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası MDA düzeyleri

4.5.12. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası MDA aktiviteleri

Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,003$

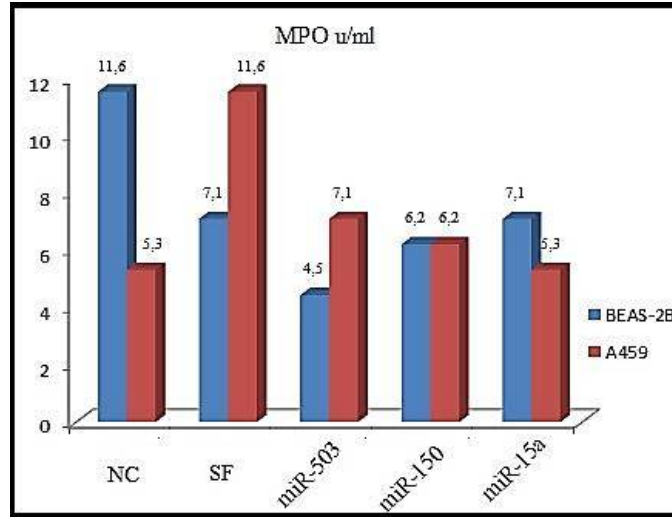
ve miR-150 için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.33. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası MDA düzeyleri

4.5.13. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası MPO aktiviteleri

Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunurken miR-150 için anlamlı fark bulunmamıştır. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=1$ ve miR-15a için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

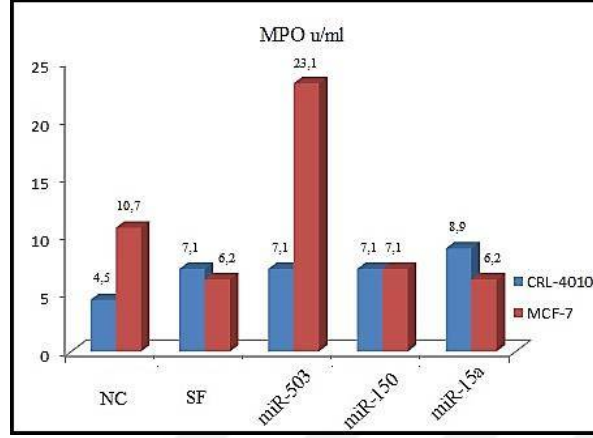


Şekil 4.34. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası MPO düzeyleri

4.5.14. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası MPO aktiviteleri

Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunurken miR-150 için anlamlı fark bulunmamıştır. MiR-

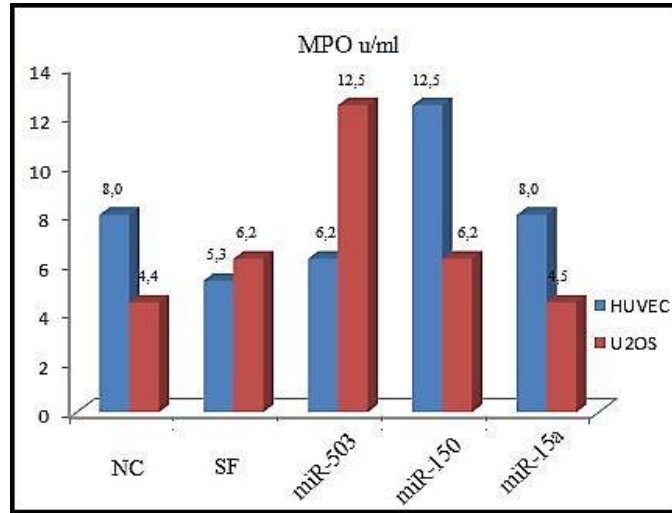
503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=1$ ve miR-15a için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.35. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası MPO düzeyleri

4.5.15. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası MPO aktiviteleri

Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,003$ ve miR-150 için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

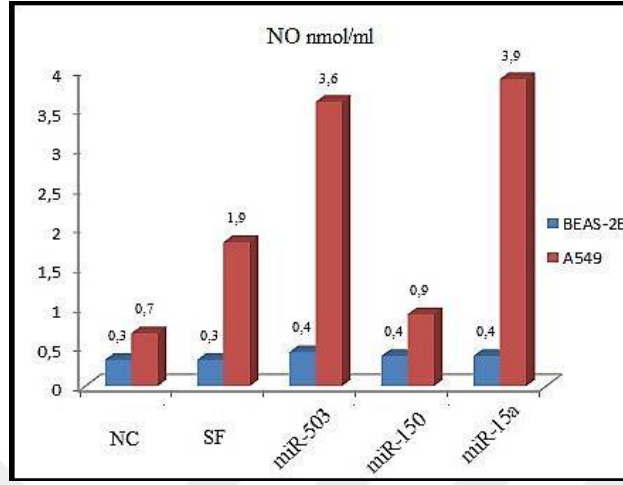


Şekil 4.36. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası MPO düzeyleri

4.5.16. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası NO aktiviteleri

Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,003$

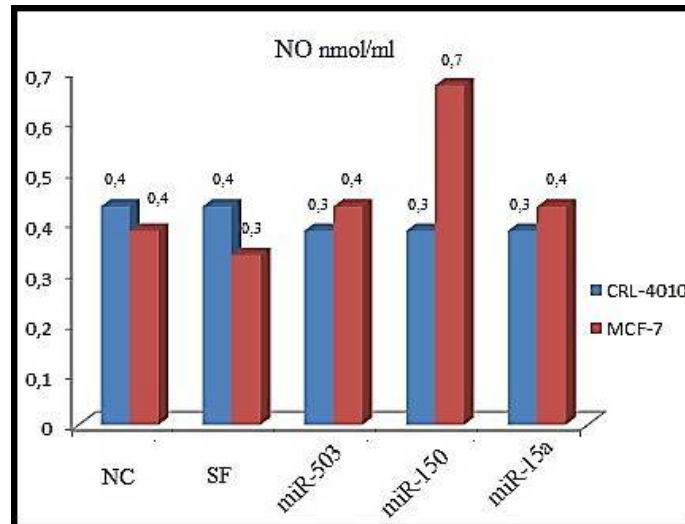
ve miR-150 için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.37. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası NO düzeyleri

4.5.17. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası NO aktiviteleri

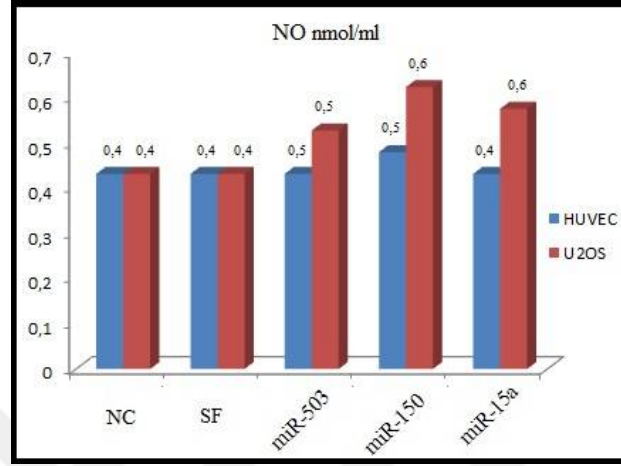
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,003$ ve miR-150 için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.38. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası NO düzeyleri

4.5.18. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası NO aktiviteleri

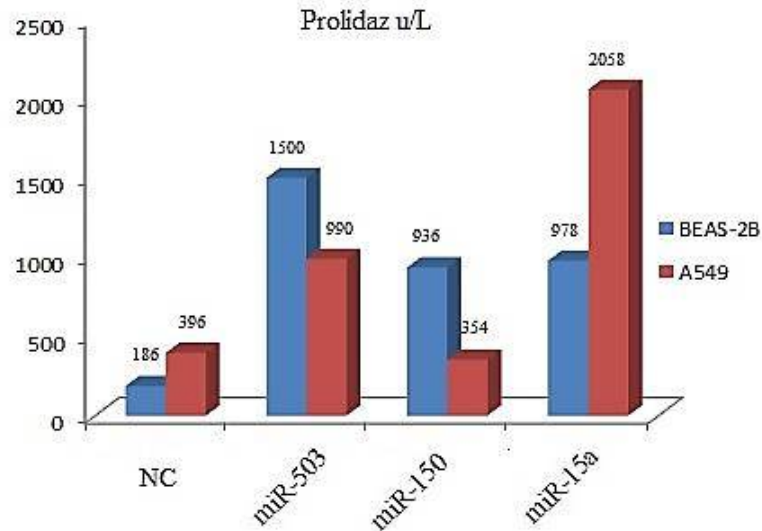
Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,003$ ve miR-150 için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.39. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası NO düzeyleri

4.5.19. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası Prolidaz aktiviteleri

Negatif kontrol mimik ve serum fizyolojik kontrol amaçlı kullanılmıştır. Diğer gruplar arasındaki anlamlı fark bulunmuştur. MiR-503 için $p=0,003$, miR-150 için $p=0,003$ ve miR-150 için $p=0,003$ bulunmuştur. Her test için $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.40. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası Prolidaz düzeyleri

5.TARTIŞMA

Son onbeş yılda da kısa bir sürede genomda kodlamayan uzun kodlamayan RNA'ların transkript ekspresyonların profil analizleri yapılmaya başlandı.(1) GENCODE, insan genomunda 15.000 ile 60.000 lncRNA varolduğu ve bunların çoğunun kötü bir biçimde korunduğuna dair açıklamalar yapmıştır. XIST, PVT1, MIAT, NEAT1, MALAT1 ve OIP5- AS gibi lncRNA genleri, rasgele seçilen genomik bölgelere kıyasla daha yüksek dizi koruması sergilemektedir; bu, konumlandırılmış koruma ve aynı zamanda promotör bölgelerinin korunması, ekleme yerleri veya transkripsiyon hareketinin kendisini içermektedir (2.3). lncRNA'ların biyolojik önemi, birkaç lncRNA'nın silinmesiyle gelişimsel kusurların ve ölümlerin meydana geldiği bir fare knockout çalışmasında kanıtlanmıştır (1).

Solid tümörlerde, lncRNA'lar hayatta kalma, göç etme, ölüme direnç göstermesi, anjiyogenez yapması ve proliferasyon gibi gibi kanser tüm karakteristik özelliklerine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Lnc MALAT1 doğrudan veya dolaylı olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesi mükemmel bir örneği temsil eder. MALAT1 her yerde bulunan ve yüksek miktarda ifade edilen 8000 nt uzunluğunda lncRNA'dır. MALAT1 akciğer kanserinde metastazik ve birçok tümörün düzenlenmesinde prognostik biyobelirteç olarak keşfedilmiştir. Ancak tümörlerde transkripsiyonel düzenleme mekanizması hala açıklığa kavuşturulamamıştır (91). MALAT1 alternatif uç uca ekleme faktörlerini düzenleyerek B-MYB ile doğrudan etkileşime girerek hücre döngüsünde G2/M'de proliferasyonu düzenler. MiRNA'lar, özgül genleri, protein kodlayan genleri ve uzun kodlamayan genleri doğrudan hedefleyerek gen ifadesini değiştirebilirler. Buna bağlı olarak gen ifadesinde meydana gelen değişiklik fenotipide yansır.

Yaptığımız çalışmada, MALAT1 hedefleyen miRNA'ları seçildi MiRNA'lar, özgül genleri, protein kodlayan genleri ve uzun kodlamayan genleri hedefleyebilir farklı kanser hücre hatlarında ve bu kanser hücre hatların kontrol amaçlı olarak normal hücre hatlarında, proliferasyona, hücre ölümüne olan potansiyel etkisini inceledik. Literatür ve miRNA-lncRNA data veri tabanı taranarak miR-150, miR-15a ve miR-503'larla MALAT1 hedefleyen uygun mikro RNA'lar olduğu için çalışmada bu mikro RNA'lar kullanılmıştır.

Yaptığımız çalışmada miR-150, miR-15a ve miR-503'larla MALAT1'i hedefleyerek akciğer kanseri, meme kanseri ve kemik kanser hücre hatlarında MALAT1'in

ve B-MYB geninin ekspresyonu, proliferasyonu apoptozis ve oksidan-antioksidan, nitrik oksit ve prolidaz seviyelerine bakıldı.

A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında MALAT1'in ifadesi en iyi baskılayan miR-503 olduğu, diğer iki mikro RNA ise MALAT1'in ifadesini artırmıştır. B-MYB genin ifadesine bakıldığında, benzer sonuçlar elde edildiği ve bu sonuçlar MALAT1'in B-MYB geni Akciğer kanserinde aynı yönde ilişkili olduğunu gösterir. Bu hücre hatlarında apoptosiz seviyelerine bakıldığında, A549 hücre hattının BEAS-2B hücre hattına göre daha fazla apoptozise gitmiştir. En fazla değişim miR-503 mikro RNA'nın verildiği hücrelerde olmuştur. Proliferasiyona seviyelerine bakıldığında, BEAS-2B hücre hattının A549 hücre hattına göre daha fazla proliferasyona girdiği, kanserli hücrelerin daha az çoğaldığı tespit edilmiştir. En fazla değişim miR-503 mikro RNA'nın verildiği hücrelerde olmuştur. Diğer biyokimyasal parametreler incelediğinde kanserli hücre hatların kontrol hücresine göre kıyaslanması Tablo 5.1'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1. A549 hücre hattının kontrol hücre hattına göre kıyaslandığında elde edilen değişimin biyokimyasal parametreleri

	SF	NC	MİR-503	MİR-150	MİR-15a
CAT	Değişim yok	Azalmış	Değişim yok	Artmış	Artmış
SOD	Artmış	Artmış	Artmış	Artmış	Artmış
GPx	Artmış	Artmış	Artmış	Azalmış	Artmış
MPO	Artmış	Azalmış	Azalmış	Değişim yok	Artmış
MDA	Artmış	Artmış	Artmış	Artmış	Artmış
NO	Artmış	Artmış	Artmış	Artmış	Artmış
Prolidaz	-	Azalmış	Azalmış	Azalmış	Artmış

MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında MALAT1'in ifadesi baskılayamadığı gibi MALAT1'in ifadesi arttırmıştır. B-MYB genin ifadesine bakıldığında, miR-150 maruz bırakılan hücrelerde gen ifadesi artarken diğer mikro RNA'lara maruz bırakılan hücrelerde gen ifadesi azalmıştır. Bu sonuçlar MALAT1'in B-MYB geninin meme kanserinde miR-150 maruz bırakılan hücrelerde aynı yönde ilişkili iken miR-15a ve miR-503'e maruz bırakılan hücrelerde aralarında ters ilişkili olduğunu gösterir. Bu hücre hatlarında apoptosiz seviyelerine bakıldığında, MCF-7 hücre hattının, HTERT-HME1 hücre hattına göre daha az apoptozise gitmiştir. Meme kanserinde MALAT1'in ifadesini baskılayamadığı için

kanserli hücreler kontrol hücreye göre daha az apoptozise gitmiştir. Proliferasiyona seviyelerine bakıldığında, HTERT-HME1 hücre hattının MCF-7 hücre hattına göre daha fazla proliferasyona girdiği, kanserli hücrelerin daha az çoğaldığı tespit edilmiştir. Meme kanserinde apoptozis ve proliferasyon incelendiğinde kanserli hücrelerde çoğalamadığı gibi ölüm yolağına gitmemiştir. Diğer biyokimyasal parametreler incelendiğinde kanserli hücre hatların kontrol hücrelerine göre kıyaslanması Tablo 5.2’de gösterilmiştir.

Tablo 5.2. MCF-7 hücre hattının kontrol hücre hattına göre kıyaslandığında elde edilen değişimin biyokimyasal parametreleri

	SF	NC	MİR-503	MİR-150	MİR-15a
CAT	Azalmış	Azalmış	Azalmış	Artmış	Artmış
SOD	Azalmış	Azalmış	Azalmış	Azalmış	Azalmış
GPx	Azalmış	Azalmış	Azalmış	Artmış	Artmış
MPO	Artmış	Değişim yok	Artmış	Değişim yok	Azalmış
MDA	Değişim yok	Değişim yok	Azalmış	Artmış	Artmış
NO	Azalmış	Azalmış	Artmış	Artmış	Artmış

U2OS ve HUVEC hücre hatlarında MALAT1’in ifadesi en iyi baskılayan miR-150 olduğu, diğer iki mikro RNA ise MALAT1’in ifadesini baskılayamadığı gibi gen ifadesini artırmıştır. B-MYB genin ifadesine bakıldığında, benzer sonuçlar elde edildiği ve bu sonuçlar MALAT1’in B-MYB geni kemik kanserinde aynı yönde ilişkili olduğunu gösteriyor. Bu hücre hatlarında apoptosiz seviyelerine bakıldığında, U2OS hücre hattının HUVEC hücre hattına göre daha fazla apoptozise gitmiştir. En fazla değişim miR-150’ye maruz kalan hücrelerde olmuştur. Proliferasiyona seviyelerine bakıldığında, HUVEC hücre hattının U2OS hücre hattına göre daha fazla proliferasyona girdiği, kanserli hücrelerin daha az çoğaldığı tespit edilmiştir. Proliferasiyona en giren miR-15a’ya maruz kalan hücrelerde meydana gelmiştir. Oksidan antioksidan ve diğer biyokimyasal parametreler incelendiğinde kanserli hücre hatların kontrol hücrelerine göre kıyaslanması Tablo 5.3’te gösterilmiştir.

Tablo 5.3. U2OS hücre hattının kontrol hücre hattına göre kıyaslandığında elde edilen değişimin biyokimyasal parametreleri

	SF	NC	MİR-503	MİR-150	MİR-15a
CAT	Artmış	Azalmış	Artmış	Artmış	Azalmış
SOD	Değişim yok	Azalmış	Azalmış	Azalmış	Azalmış
GPx	Azalmış	Azalmış	Azalmış	Azalmış	Azalmış
MPO	Değişim yok	Azalmış	Artmış	Azalmış	Azalmış
MDA	Artmış	Artmış	Azalmış	Azalmış	Azalmış
NO	Artmış	Artmış	Azalmış	Azalmış	Azalmış

Akciğer kanserinde miR-503 mikroRNA'nın bir biyobelirtec kullanılabileceğini düşünmekteyiz. miR-503'e maruz kalan hücrelerde MALAT1'in ifadesi baskılanmış dolaylı olarak B-MYB geninin de ifadesi baskılanmıştır. Dolayısıyla B-MYB geni daha az eksprese olduğu için G2/M proliferasyon gözlenmemiştir. Çoğalamayan hücreler ölüm mekanizmasına girerek yok olmuşlardır (Şekil 4.8). Diğer mikroRNA'lara maruz kalan akciğer kanseri hücre hatlarında benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Yine antioksidan seviyelerine bakıldığında akciğer kanserinde antioksidan seviyeri yükselmiş, ancak oksidan seviyelerinin de yükseldiği gözlenmiştir. Nitrik oksit seviyelerine bakıldığında artma, Prolidaz seviyelerinde ise azalma gözlenmiştir. Hücreler ölüm mekanizmasına giderken oksidan/antioksidan dengesi gözlenirken, hücre de nitrik oksit seviyelerin artış gözlenmesi kanser hücrelerin hayatta kalma isteğinin hala etkin olduğu ve bunun sonucu olarak anjiogenezesin yaptığı, fakat prolidaz seviyelerinde azalma gözlenmesi, kanserli hücrelerin canlılığının azaldığını bunun sonucu olarak ta diğer uyaranlarla beraber kanserli hücreler ölüm yolağına götürülmüştür.

Meme kanseri hücre hatlarına bakıldığında miR-150'e maruz kalan hücrelerde MALAT1'in ifadesi baskılanmış dolaylı olarak B-MYB geninin de ifadesi baskılandığı gözlenmiştir. Meme kanserinde, hücreler ne apoptozise gitmiş ne de proliferasyon yapmıştır (Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve şekil 4.14). Meme kanseri hücre hatlarında oksidan/antioksidan dengesi gözlenirken, hücre de nitrik oksit seviyelerin artış gözlenmesi kanser hücrelerin hayatta kalma isteğinin hala etkin olduğu ve bunun sonucu olarak anjiogenezesin yaptığını gösterir. Bu verilerimize göre meme kanserinde, kanserli hücreler durdurulmuş fakat ölüm mekanizmasına götürülmemiştir.

Kemik kanseri hücre hatlarına bakıldığında miR-150'e maruz kalan hücrelerde MALAT1'in ifadesi baskılanmış dolaylı olarak B-MYB geninin de ifadesi baskılandığı gözlenmiştir. Kemik kanserinde, hücreler hem apoptozise gitmiş hem de proliferasyon yapmıştır (Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.21). Kemik kanseri hücre hatlarında oksidan/antioksidan seviyelerinin düştüğü gözlenirken, hücrede nitrik oksit seviyelerinin azalma gözlenmesi kanser hücrelerini anjiogenezin uyarılarının inhibe ettiğini dolayısıyla hayatta kalmak için gerekli besin ve oksijeni alamayan hücrelerin apoptozise gittiğini düşünüyoruz. Bu verilerimize göre kemik kanserinde, kanserli hücreler, ölüm mekanizmasına giderken diğer yandan proliferasyon yapmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak MALAT1 farklı kanserlerde farklı roller üstlenmektedir. Akciğer kanserinde MALAT1 ifadesi baskılanırken hücreler hem apoptozise gitmiş hem de proliferasyon yapmamıştır. Meme kanserinde kanserli hücreler proliferasyonu baskılanırken, apoptozis hücreler ölüm yolağına götürülmemiştir. Kemik kanserinde ise kanserli hücreler hem apoptozise gitmiş hemde proliferasyon yapmıştır. MALAT1 akciğer kanserinde güçlü bir biyobelirteç olarak kullanabilirken, meme kanserinde proliferasyon için bir biyobelirteç, kemik kanserinde apoptozis için bir biyobelirteç olarak kullanabileceğini düşünürüz.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verileri doğrulanması için yapılan deneylerin, deneysel tümör modeli oluşturulmuş hayvan modellerinde miR-503, miR-15a ve miR-150 kullanarak tümör gelişimi izlenebilir ve buradan elde edilecek verilere gönüllü hastalar üzerinde bu çalışmaları araştırılabiliriz.

KAYNAKLAR

1. Bieri U, Moch H, Dehler S, Korol D, Rohrman- Virchows S. Changes in autopsy rates among cancer patients and their impact on cancer statistics from a public health point of view: a longitudinal study from 1980 to 2010 with data from Cancer Registry Zurich. *Virchows Arch*, 2015. 466(6): p. 637-43.
2. Zeng H, Zeng R, Zhang S, Zou X, Wang C. Female breast cancer statistics of 2010 in China: estimates based on data from 145 population-based cancer registries. *J Thorac Dis*, 2014. 6(5): p. 466-70.
3. Iwamoto M, Nakamura F, Higashi T. Estimated life expectancy and risk of death from cancer by quartiles in the older Japanese population: 2010 vital statistics. *Cancer Epidemiol*, 2014. 38(5): p. 511-4.
4. Jemal A, Siegel R, Xu j, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010. 60(5): p. 277-300.
5. Aabo K. Prostate cancer: evaluation of response to treatment, response criteria, and the need for standardization of the reporting of results. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1987. 23(2): p. 231-6.
6. Inoue T, Chatani M, Teshima T, Hata K, Ueda, K. Assessment of response to therapy based on the application of the guideline of reporting treatment results of head and neck cancer. *Gan No Rinsho*, 1985. 31(12): p. 1613-20.
7. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer*, 1981. 47(1): p. 207-14.
8. Van Hoe L, Van E, Vergote I. ve ark. Reporting on the results of cancer treatment in patients with metastatic liver disease: proposal of symmetric size-dependent CT-criteria for response. *Ann Oncol*, 1996. 7(8): p. 871-2.
9. Hainaut P, Plymoth A. Targeting the hallmarks of cancer: towards a rational approach to next-generation cancer therapy. *Curr Opin Oncol*, 2013. 25(1): p. 50-1.
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
11. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov*, 2011. 1(5): p. 391-407.
12. Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T. ve ark. Long Noncoding RNA HOTAIR Regulates Polycomb-Dependent Chromatin Modification and Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancers. *Cancer Research*, 2011. 71(20): p. 6320-6326.

13. Yang L, Froberg JE, Lee JT. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends in Biochemical Sciences*, 2014. 39(1): p. 35-43.
14. Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol*, 2011. 21(6): p. 354-61.
15. Lalevee S, Feil R. Long noncoding RNAs in human disease: emerging mechanisms and therapeutic strategies. *Epigenomics*, 2015. 7(6): p. 877-9.
16. Xue M, Zhuo Y and Shan B. MicroRNAs, Long Noncoding RNAs, and Their Functions in Human Disease. *Methods Mol Biol*, 2017. 1617: p. 1-25.
17. Gutschner T, Hämmerle M, Eißmann M, Hsu J, Kim Y, Hung G. ve ark. The Noncoding RNA MALAT1 Is a Critical Regulator of the Metastasis Phenotype of Lung Cancer Cells. *Cancer Research*, 2013. 73(3): p. 1180-1189.
18. Gutschner T, Hammerle M, Diederichs S. MALAT1 - a paradigm for long noncoding RNA function in cancer. *J Mol Med (Berl)*, 2013. 91(7): p. 791-801.
19. Tripathi V, Ellis DJ, Shen Z, DY, Song, Pan Q, Watt TA, Free MS. ve ark. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*, 2010. 39(6): p. 925-38.
20. Tripathi V, Ellis JD, Song DY, Pan Q, Watt AT. The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. *Molecular Cell*, 2010. 39(6): p. 925-938.
21. Jeffers LK, Duan K, Ellies GL, Seaman WT, Burger- Calderon RA, Diatchenko LB. ve ark. Correlation of transcription of MALAT-1, a novel noncoding RNA, with deregulated expression of tumor suppressor p53 in small DNA tumor virus models. *J Cancer Ther*, 2013. 4(3).
22. Tripathi V, Shen Z, Chakraborty A, Giri S, Freier SM, Wu X. ve ark. Long Noncoding RNA MALAT1 Controls Cell Cycle Progression by Regulating the Expression of Oncogenic Transcription Factor B-MYB. *Plos Genetics*, 2013. 9(3).
23. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Ando H, Horii A. ve ark. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 1991. 253(5020): p. 665-9.
24. Clarkson JE, Worthington HV, Eden OB. Interventions for treating oral candidiasis for patients with cancer receiving treatment. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002(1): p. CD001972.
25. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*, 2017. 7(5): p. 1016-1036.
26. Kanada M, Bachmann MH, Contag CH. Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks. *Trends Cancer* 2016 Feb;2(2):84-94

27. Poole A, Kacer D, Tarantini F, Pru I. Sustained Inhibition of Proliferative Response After Transient FGF Stimulation Is Mediated by Interleukin 1 Signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 2016. 231(3): p. 650-658.
28. Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer A long non-coding RNA point of view. *Rna Biology*, 2012. 9(6): p. 703-719.
29. He H, Hirokawa Y, Manser E, Lim L, Levitzki A, Maruta H. Signal therapy for RAS-induced cancers in combination of AG 879 and PP1, specific inhibitors for ErbB2 and Src family kinases, that block PAK activation. *Cancer Journal*, 2001. 7(3): p. 191-202.
30. Memmi EM, Sanario AG, Giacobbe A, Peschiaroli A, Frezza V, Cicalese A. ve ark. p63 sustains self-renewal of mammary cancer stem cells through regulation of Sonic Hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015. 112(11): p. 3499-3504.
31. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*, 2014. 15(12): p. 1243-53.
32. Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*, 2012. 9(6): p. 703-19.
33. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. 11(3): p. 220-8.
34. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994. 54(18): p. 4855-78.
35. Penaloza C, Lin L, Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem Cell Biol*, 2006. 126(2): p. 149-58.
36. Flusberg DA, Sorger PK Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. *Trends Cell Biol*, 2015. 25(8): p. 446-58.
37. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. 15(1): p. 49-63.
38. Champa D, Russo MA, Liao XH, Refetoff S, Ghossein RA, Cristofano AD. Obatoclax overcomes resistance to cell death in aggressive thyroid carcinomas by countering Bcl2a1 and Mcl1 overexpression. *Endocr Relat Cancer*, 2014. 21(5): p. 755-67.
39. Law, B.Y., Chan, W.K., Xu, S.W., Wang, J.R., Bai, L.P., Liu, L. ve ark. Natural small-molecule enhancers of autophagy induce autophagic cell death in apoptosis-defective cells. *Sci Rep*, 2014. 4: p. 5510.
40. Repnik U, Cesen MH, Turk B. The endolysosomal system in cell death and survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. 5(1): p. a008755.

41. Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner, T, Tanzi RK. ve ark. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(9): p. 919-26.
42. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of Apoptosis in disease. *Aging-U.S.*, 2012. 4(5): p. 330-349.
43. Gu J, Kagawa S, Takakura M, Kyo S, Inoue M, Roth JA. ve ark. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Research*, 2000. 60(19): p. 5359-5364.
44. Lanson NA, Friedlander PL, Schwarzenberger P, Kolls JK, Wang G. Replication of an adenoviral vector controlled by the human telomerase reverse transcriptase promoter causes tumor-selective tumor lysis. *Cancer Research*, 2003. 63(22): p. 7936-7941.
45. Engelhardt M, Martens UM. The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality (Review). *Oncology Reports*, 1998. 5(5): p. 1043-1052.
46. Rhyu MS. Telomeres, Telomerase, and Immortality. *Journal of the National Cancer Institute*, 1995. 87(12): p. 884-894.
47. Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: The role of telomeres and telomerase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1997. 214(2): p. 99-106.
48. di Fagagna FD, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T. ve ark. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 2003. 426(6963): p. 194-198.
49. Szabo S, Vattay P, Scarbrough E, Folkman j. Role of Vascular Factors, Including Angiogenesis, in the Mechanisms of Action of Sucralfate. *American Journal of Medicine*, 1991. 91: p. S158-S160.
50. Kim KJ, Li B, Winer, J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS. ve ark. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 841-4.
51. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*, 2006. 312(5): p. 549-60.
52. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(10): p. 795-803.
53. Abramczyk H, Surmack J, Brożek-Pluska B, Morawiec Z. ve Tazbir, M. The hallmarks of breast cancer by Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 2009. 924: p. 175-182.

54. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 2009. 30(7): p. 1073-1081.
55. Gupta GP, Massague, J. Cancer metastasis: Building a framework. *Cell*, 2006. 127(4): p. 679-695.
56. Gonzalez-Perez A, Jene-Sanz A, Tamborero D, Lopez-Bigas N. The role of new cancer hallmarks in tumorigenesis. *European Journal of Cancer*, 2014. 50: p. S110-S110.
57. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 5991-5; discussion 5995.
58. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, 1991. 113(1): p. 173-85.
59. Brittain AL, Basu R, Qian Y, Kopchick, J.J. Growth Hormone and the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017. 102(10): p. 3662-3673.
60. Ba MC, Long H, Cui SZ, Gong YF, Yan ZF, Wang S. Mild hyperthermia enhances sensitivity of gastric cancer cells to chemotherapy through reactive oxygen species-induced autophagic death. *Tumour Biol*, 2017. 39(6): p. 1010428317711952.
61. Moynahan ME, Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010. 11(3): p. 196-207.
62. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Lucy A. et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*, 2010. 467(7319): p. 1109-1113.
63. Clark VE, Erson-Omay ES, Serin A, Yin j, Cotney j, Özduman, K. Genomic Analysis of Non-NF2 Meningiomas Reveals Mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science*, 2013. 339(6123): p. 1077-1080.
64. Pino MS, Chung, DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*, 2010. 138(6): p. 2059-2072.
65. Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*, 2013. 339(6117): p. 286-91.
66. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research*, 2010. 316(8): p. 1324-1331.
67. Sica A. Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Exp Oncol*, 2010. 32(3): p. 153-8.

68. Zhao Y, Liu H, Riker AI, Fodstad O, Ledoux SP, Wilson GL. ve ark. Emerging metabolic targets in cancer therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011. 16: p. 1844-60.
69. Menendez JA, Joven J, Cufi S, Corominas-Faja B, Oliveras-Ferraros C, Cuyas E. ve ark. The Warburg effect version 2.0: metabolic reprogramming of cancer stem cells. *Cell Cycle*, 2013. 12(8): p. 1166-79.
70. Yoshida GJ, Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015. 34: p. 111.
71. Cheng WF, Hung CF, Lin KY, Ling M, Juan j, He L. ve ark. CD8+ T cells, NK cells and IFN-gamma are important for control of tumor with downregulated MHC class I expression by DNA vaccination. *Gene Ther*, 2003. 10(16): p. 1311-20.
72. Ahn HJ, Kim KLL, Hoan NN, Kim CH, Moon E, Choi KS Yang SS. ve ark. Targeting cancer cells with reactive oxygen and nitrogen species generated by atmospheric-pressure air plasma. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e86173.
73. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E. ve ark. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*, 2015. 35 Suppl: p. S185-S198.
74. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*, 2010. 316(8): p. 1324-31.
75. Zhao L, Sun Y, Hou Y, Peng Q, Wang,L, Luo H. ve ark. MiRNA expression analysis of cancer-associated fibroblasts and normal fibroblasts in breast cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. 44(11): p. 2051-9.
76. Gajewski TF, Schreiber H, FuNYX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, 2013. 14(10): p. 1014-22.
77. Akkaya, Z.Y, P. DİNÇER, Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Medical Journal*, 2013. 26(1).
78. Tsai M-C, Manor O, Wan Y, Mosammamparas N, Wang JK, Lan F. ve ark. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 2010. 329(5992): p. 689-693.
79. Voinnet O. Origin biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 2009. 136(4): p. 669-687.
80. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in cell biology*, 2007. 17(3): p. 118-126.
81. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim, VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, 2002. 21(17): p. 4663-4670.

82. Lee YS, Nakahara K, Pham J W, Kim K, He Z, Sontheimer EJ. ve ark. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 2004. 117(1): p. 69-81.
83. Malgorzata Guz, Adolfo RM, Estera O, Agnieszka SB, Krzysztof P, Maria B. ve ark. MicroRNAs-Role in Lung Cancer. Hindawi Publishing Corporation Disease Markers. 2014, Article ID 218169, 13 pages
84. Bergmann JH. Spector DL. Long non-coding RNAs: modulators of nuclear structure and function. *Current opinion in cell biology*, 2014. 26: p. 10-18.
85. Haemmerle M. ve Gutschner T. Long Non-Coding RNAs in Cancer and Development: Where Do We Go from Here? *International journal of molecular sciences*, 2015. 16(1): p. 1395-1405.
86. Martens-Uzunova ES, Böttcher R, Croce CM, Jenster G, Visakorpi T, Calin GC. ve ark. Long noncoding RNA in prostate, bladder, and kidney cancer. *European urology*, 2014. 65(6): p. 1140-1151.
87. Quinn jj, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet*, 2016. 17(1): p. 47-62.
88. Bowman RV, Yang IA, Semmler ABT. ve Fong KM. Epigenetics of lung cancer. *Respirology*, 2006. 11(4): p. 355-365.
89. Han Y, Liu Y, Nie L, Gui Y. ve Cai Z. Inducing cell proliferation inhibition, apoptosis, and motility reduction by silencing long noncoding ribonucleic acid metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in urothelial carcinoma of the bladder. *Urology*, 2013. 81(1): p. 209. e1-209. e7.
90. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT. ve ark. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular cell*, 2010. 39(6): p. 925-938.
91. Bernard D, Prasanth KV, Tripathi V, Colasse S, Nakamura T, Xuan Z. ve ark. A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression. *The EMBO Journal*, 2010. 29(18): p. 3082-3093.
92. Wang X. Silencing of long noncoding RNA MALAT1 by miR-101 and miR-217 inhibits proliferation, migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2014: p. jbc. M114. 596866.
93. Tripathi V, Shen Z, Chakraborty A, Giri S, Freier XM, Wu X. ve ark. Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. *PLoS genetics*, 2013. 9(3): p. e1003368.

94. Barletta C, Druck T, Laforgia S, Calabretta B, Drabkin H, Patterson D. ve ark. Chromosome locations of the MYB related genes, AMYB and BMYB. *Cancer research*, 1991. 51(14): p. 3821-3824.
95. Helin K. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current opinion in genetics & development*, 1998. 8(1): p. 28-35.
96. Li Y, LI Y, Bai H, Wang H, Shen, Y, Tang Y, Ping Y. Reactive oxygen species (ROS)-responsive nanomedicine for RNAi-based cancer therapy. *Nanoscale*, 2017.
97. Mates JM, FM. Sanchez-Jimenez, Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000. 32(2): p. 157-70.
98. Hamanaka RB, NS. Chandel, Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*, 2010. 35(9): p. 505-13.
99. Khaled AS, Hend A, Mohamed A, Ahmed MT. The Role of the MAPK Signaling, Topoisomerase and Dietary Bioactives in Controlling Cancer Incidence. *Diseases* 2017, 5(2), 13.



TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Kullanılan hücre soyunun özellikleri.....	23
Tablo 3.2. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımının içerikleri.....	26
Tablo 3.3. mRNA'dan cDNA eldesinde revers transkripsiyon için termal döngüleyici ayarları.....	27
Tablo 3.4. MALAT1 ve B-MYBL2 geninin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizilimleri.	28
Tablo 3.6. MALAT1 ve B-MYBL2 ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri.....	28
Tablo 3.6. MALAT1 ve B-BMML2 ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR ayarları..	29
Tablo 4.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde G1/S, G2/M seviyeleri.....	50
Tablo 4.1. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde G1/S, G2/M seviyeleri .	51
Tablo 4.3. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde G1/S, G2/M seviyeleri .	53
Tablo 5.1. A549 hücre hattının kontrol hücre hattına göre kıyaslandığında elde edilen değişimin biyokimyasal parametreleri.....	64
Tablo 5.2. MCF-7 hücre hattının kontrol hücre hattına göre kıyaslandığında elde edilen değişimin biyokimyasal parametreleri.....	65
Tablo 5.3. U2OS hücre hattının kontrol hücre hattına göre kıyaslandığında elde edilen değişimin biyokimyasal parametreleri.....	66

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Kanser Özellikleri ve Ekstraselüler kesecikler (EVs). Tümör ilerlemesini yönlendiren belirleyici özellikler, EV'ler aracılığıyla kanser hücreleri ile tümör mikroçevre hücreleri arasındaki iletişimi güçlendirmektedir(26).....4
- Şekil 2.2.** Apoptozise yol açan ana moleküler yolların şematik gösterimi. Spesifik reseptörlere ligand bağlanması üzerine ekstrinsik yolda DISC kompleksi oluşur ve kaspaz 8 aktive olur. Mitokondriadan sit c'nin serbest yolda salınması, apoptozomun oluşumuna ve kaspaz 9'un aktivasyonuna neden olur. Kaspaz 8 ve 9, daha sonra kaspaz 3 hücre ölümüne neden olur(42).7
- Şekil 2.3.** E-cadherin aracılı hücre hücre yapışmasının kaybı, benign, invaziv olmayan tümörlerden (adenom) malign, invaziv tümörlere (karsinom) geçiş yapmaya katkıda bulunur(60).9
- Şekil 2.4.** Tümör büyümesi ve bağışıklık karşılığı. Tümör oluşumu, ilerlemesi ve bağışıklık kaçınma yöneten farklı anahtar faktörlere genel bir bakış(72)..... 12
- Şekil 2.5.** Katı tümörlerde farklı hücre tiplerinin birleşimi, Parankim ve stroma tümörler farklı hücre tipleri ve alt tipleri içerir.Toplu olarak tümör büyümesini ve ilerlemesini sağlar. İmmünflamatuvar hücreler ve alt sınıfları hem tümör teşvik edici hem de tümör öldürmeyi içerebilir(10). 13
- Şekil 2.6.** MikroRNA biyosentezi(83)..... 16
- Şekil 2.8.** Reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı birikimi, antioksidan enzimlerin bozulmuş üretimi ve / veya antioksidan savunma sistemi, DNA, protein ve diğer intraselüler makromoleküller hasarına neden olabilir, bu da son zamanlarda malign transformasyona neden olur (99).....22
- Şekil 3.1.** $2^{-\Delta\Delta Ct}$ göre hesaplama formülü30
- Şekil 3.2.** $2^{-\Delta Ct}$ göre hesaplama formülü30
- Şekil 4.1.** MALAT1'in ifadesel değeri A459 hücre soyu ile BEAS-2B hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.37
- Şekil 4.2.** MALAT1'in ifadesel değeri MCF-7 hücre soyu ile HTERT-HME1 hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.37
- Şekil 4.3.** MALAT1'in ifadesel değeri U2OS hücre soyu ile HUVEC hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.38
- Şekil 4.4.** B-MYB genin ifadesel değeri A459 hücre soyu ile BEAS-2B hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.39

Şekil 4.5. B-MYB genin ifadesel değeri MCF-7 hücre soyu ile HTERT-HME1 hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.	40
Şekil 4.6. B-MYB genin ifadesel değeri U2OS hücre soyu ile HUVEC hücre soyu miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p'nin hesaplanan katlı oran değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.	40
Şekil 4.7. A549 ve BEAS-2B hücre soylarına negatif kontrol (NC) mimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	41
Şekil 4.8. A549 ve BEAS-2B hücre soylarına miR-503-5p verildiğinde ; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	42
Şekil 4.9. A549 ve BEAS-2B hücre soylarına miR-150-5p verildiğinde ; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	43
Şekil 4.10. A549 ve BEAS-2B hücre soylarına miR-15a-5p verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	43
Şekil 4.11. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına negatif kontrol mimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	44
Şekil 4.12. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-503-5p verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	45
Şekil 4.13. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-150-5p verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	45
Şekil 4.14. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre soylarına miR-15a-5p verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	46
Şekil 4.15. U2OS ve HUVEC hücre soylarına negatif kontrol mimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	47
Şekil 4.16. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-503-5p mimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	47
Şekil 4.17. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-150-5p mimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	48
Şekil 4.18. U2OS ve HUVEC hücre soylarına miR-15a-5p mimik verildiğinde; Apoptozise giden ve canlı hücrelerin yüzde grafiksel gösterimi.	48
Şekil 4.20. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarına serum fizyolojik, negatif kontrol, miR-503-5p, miR-150-5p ve miR-15a-5p mimikleri verildiğinde elde edilen verilerin hücre döngüsü analiz sonuçları grafiksel gösterimi.	51
Şekil 4.22. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası GPx düzeyleri.	53
Şekil 4.23. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası GPx düzeyleri.	54
Şekil 4.24. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası GPx aktiviteleri düzeyleri.	54
Şekil 4.25. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası SOD düzeyleri.	55
Şekil 4.26. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası SOD düzeyleri.	55

Şekil 4.27. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası SOD düzeyleri	56
Şekil 4.28. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası CAT düzeyleri.....	56
Şekil 4.29. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası CAT düzeyleri	57
Şekil 4.30. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası CAT düzeyleri.....	57
Şekil 4.31. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası MDA düzeyleri.....	58
Şekil 4.32. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası MDA düzeyleri	58
Şekil 4.33. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası MDA düzeyleri.....	59
Şekil 4.34. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası MPO düzeyleri	59
Şekil 4.35. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası MPO düzeyleri.....	60
Şekil 4.36. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası MPO düzeyleri	60
Şekil 4.37. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası NO düzeyleri.....	61
Şekil 4.38. MCF-7 ve HTERT-HME1 hücre hatlarında gruplar arası NO düzeyleri.....	61
Şekil 4.39. U2OS ve HUVEC hücre hatlarında gruplar arası NO düzeyleri	62
Şekil 4.40. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında gruplar arası Prolidaz düzeyleri.....	62

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Hasan DAĞLI
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi ve yeri : 01/04/1987
e-posta : hasandagli63@gmail.com

Eğitim

Derece	Mezuniyet	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ/ Sağlık Bilimleri Tıbbi Biyokimya	2018
Yüksek Lisans	GAÜN/ Sağlık Bilimleri Tıbbi Biyoloji	2015
Lisans	DÜ/ Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2012

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görevi
2015-	Kahramanmaraş Sütcü İmam Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Diller

İngilizce

Hobiler

Futbol, yüzme, tenis, seyahat, kitap okuma